

研究报告

人抗 *E. coli* J5 噬菌体抗体制备的初步研究

俞晓峰 王海涛 黄 策

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 以 *E. coli* J5 株对含人 Ig 基因的噬菌体抗体库进行淘筛富集, 免疫印迹筛选, 以及 ELISA 检测, 结果获得 4 株能与 *E. coli* J5 株结合的阳性克隆, 且阳性克隆结合抗原的活性可分别被 *E. coli* J5 株、*E. coli* Rc-LPS 和抗 *E. coli* J5 株核心糖脂域 MAbs 抑制。PCR 检测表明, 4 株阳性克隆均分别带有约 660 bp 大小的重链和轻链基因片段。SDS-PAGE 与蛋白质印迹的结果显示, 经 IPTG 诱导的阳性克隆能表达分子量约为 50 000 大小的蛋白, 提示该 4 株阳性克隆能够表达具有一定抗原结合活性的人源 Fab 片段。

关键词 PCR, 噬菌体抗体库, 人源抗体

从 1984 年国外首次报道人-鼠嵌合抗体成功地在骨髓瘤细胞内表达, 开创了基因工程抗体技术以来, 人源化抗体、小分子抗体, 以及到 90 年代初报道用附着型表达载体成功构建抗体基因库制备人源抗体等技术的相继出现, 使基因工程抗体技术研究得以迅猛发展^[1~3]。

噬菌体抗体库技术是应用基因工程的方法制备人源基因工程抗体。该项技术以其制备周期短, 且可绕过免疫步骤而在体外获得人源抗体等优越性而被认为给人源抗体的制备带来了曙光^[4]。我们应用噬菌体抗体库技术制备了针对 *E. coli* J5 株的人源噬菌体抗体 (PhAb)。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人源噬菌体抗体库 (由王海涛教授在美国构建)、pComb3 表达载体 (购自美国 Scripps Research Institute)、*E. coli* XL1-blue 宿主菌和 VCSM13 辅助噬菌体 (购自美国 Stratagene 公司)。 *E. coli* J5 株由美国 Ziegler 博士惠赠。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 *E. coli* J5

株脂多糖 (LPS) 核心糖脂域 MAbs (EL1 和 EL3) 为自制。

1.2 方法

1.2.1 PhAb 的淘筛 (panning) 及阳性克隆筛选: 用 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 8.6) 稀释经热处理的 *E. coli* J5 株成 1×10^{12} cfu/L, 100 μ l/孔包被 96 孔板, 4℃ 过夜; 用含 3% BSA-磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 37℃ 封闭 1 h, 以 100 μ l/孔加入噬菌体抗体库 (10^{12} cfu), 以下的淘筛步骤按文献 [5] 进行。并重复 4 次, 以达到对特异性 PhAb 的富集作用。对最后一轮淘筛的抗体库同样参照以上文献的免疫印迹方法, 用 HRP 标记的抗 *E. coli* J5 株 LPS 核心糖脂域 MAbs 筛选与 *E. coli* J5 株反应的阳性克隆。

1.2.2 PhAb 克隆的制备: 参照文献 [5] 方法挑选与 *E. coli* J5 株反应强阳性的克隆进行培养, 并加入 1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 于 37℃ 振荡过夜; 离心收集细胞; 用 PBS (含 30 mg/L 苯甲基磺酰氟化物) 悬浮于冰浴中超声打碎细胞; 离心收集的上清于

-20℃贮存, 以备 ELISA 检测。

1.2.3 间接 ELISA: 用经热处理的 *E. coli* J5 株 (1×10^{12} cfu/L) 和 *E. coli* Rc-LPS (40 mg/L) 4℃ 过夜包被酶联板; 3% BSA-PBST 于 37℃ 封闭后, 加入经 1% 脱脂奶粉-PBST 稀释的 PhAb 克隆上清液, 室温作用 1.5 h; 并与 1% 脱脂奶粉-PBST 适当稀释的 HRP 标记羊抗人 κ 链或 λ 链 IgG 作用 1 h 后, 测定 A_{490} 值。以 pComb3 载体或 1% 脱脂奶粉-PBST 作为对照。

1.2.4 抑制 ELISA: 用 1% 脱脂奶粉-PBST 稀释 *E. coli* J5 株成不同浓度, 并与阳性克隆上清等量混合, 4℃ 过夜; 离心收集的上清按间接 ELISA 法操作。以封闭稀释液代替 *E. coli* J5 与 PhAb 混合作为对照。

1.2.5 竞争抑制 ELISA: 分别用 3% BSA-PBST 稀释抗 *E. coli* J5 株 LPS 核心糖脂域 MAb (EL1 和 EL3) 成不同浓度, 与 PhAb 阳性克隆上清等量混合后, 加至包被有 *E. coli* J5 株的酶联板中, 并按间接 ELISA 法测定。

1.2.6 交叉反应 ELISA: 按以上间接 ELISA 法分别对阳性克隆上清与不同革兰氏阴性菌 (GNB) 及 LPS 的交叉反应进行测定。

1.2.7 阳性克隆质粒 DNA 提取: 按经典碱变性法操作。

1.2.8 PCR 扩增阳性克隆重链及轻链基因片段: 选用人 IgG Fab 重链及轻链 (κ) 可变区及稳定区两端引物^[6], 按常规 PCR 操作步骤进行。在 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察 PCR 产物片段的大小。

1.2.9 SDS-PAGE 及蛋白质印迹: 按常规 SDS-PAGE 及蛋白质印迹法进行。

2 结 果

2.1 *E. coli* J5 株选择性富集 PhAb 的作用

用 *E. coli* J5 株对 PhAb 库进行四轮淘筛过程, 计算每次 *E. coli* J5 株选择性吸附 PhAb 的产出率 (%) (表 1), 每一轮淘筛之后, 选择性吸附于 *E. coli* J5 株的 PhAb 均有所增加。经过第四轮淘筛后, PhAb 的产出率约为第一

轮的 200 倍, 提示 *E. coli* J5 株对抗体库中相应 PhAb 进行了选择性富集。

表 1 *E. coli* J5 株对抗体库中 PhAb 的选择性富集作用

淘筛次数	产出率/%
1	1.7×10^{-5}
2	7.0×10^{-5}
3	1.4×10^{-4}
4	3.6×10^{-3}

2.2 阳性克隆与 *E. coli* J5 株的结合反应

对最后一轮淘筛获得的 PhAb 库进行免疫印迹筛选, 并分别从能与 *E. coli* J5 株形成较强反应的硝酸纤维素膜 (NCM) 上, 对应地挑选约 30 个克隆进行 ELISA 检测。结果获得 4 株能与 *E. coli* J5 株形成明显结合反应的阳性克隆 (表 2), 且轻链均为 κ 链, 其中阳性值较强的 2 株 (A1 和 E3) 克隆与 *E. coli* J5 株反应的效价可达 1:16。

表 2 4 株阳性克隆与 *E. coli* J5 株结合的 ELISA 结果

阳性克隆	亚类 (轻链)	A_{490}	滴度
A1	IgG1 (κ)	1.29 ± 0.28	1:16
E3	IgG1 (κ)	1.63 ± 0.47	1:16
E9	IgG1 (κ)	0.79 ± 0.22	NT
E16	IgG1 (κ)	0.69 ± 0.05	NT

注: pComb3 载体或 1% 脱脂奶粉-PBST 对照 A_{490} 值为 0.18 ± 0.03 。NT: 未检测。

抑制 ELISA 结果表明 *E. coli* J5 株和 *E. coli* J5 Rc LPS 分别能明显抑制 A1 和 E3 克隆与 *E. coli* J5 株结合的作用 (图 1a、1b)。另外, 抗 *E. coli* J5 株 LPS 核心糖脂域 MAb (EL1) 也能与 A1 克隆竞争结合 *E. coli* J5 株抗原 (图 1c)。

2.3 阳性克隆与其他 LPS 及菌株的反应

将阳性克隆分别与不同的 LPS 及菌株作 ELISA 检测, 结果发现, E3 克隆除与 *E. coli* J5 Rc LPS 反应较强外, 还能与其他的 LPS 发生交叉反应, 而其他阳性克隆则只与 *E. coli*

J5 Rc LPS 反应 (表 3). 另外, E3 克隆也与部分菌株发生一定的结合.

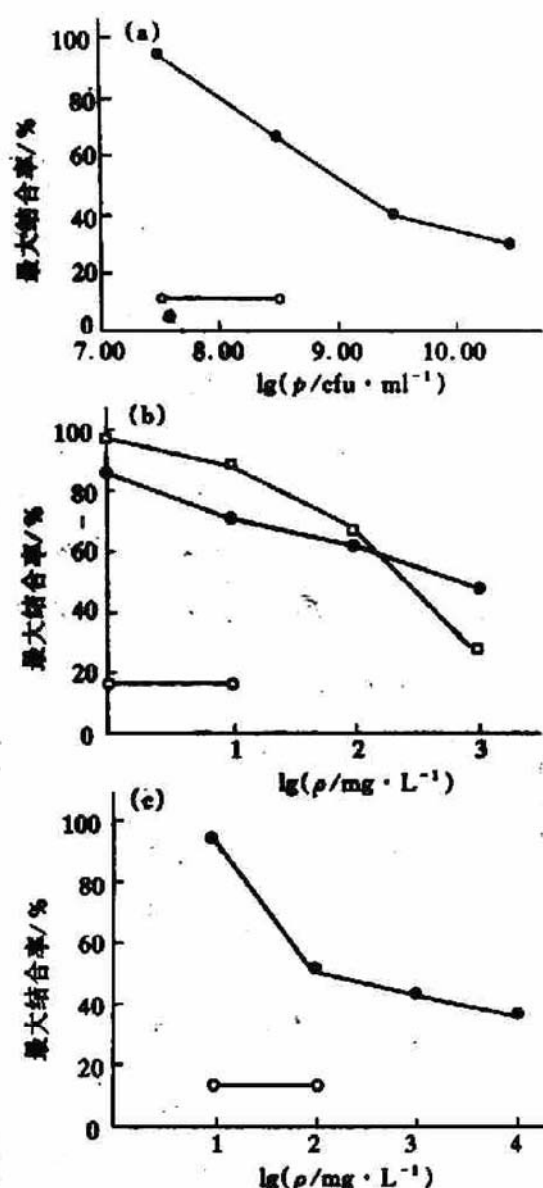


图1 不同抑制剂分别对 A1 和 E3 克隆结合抗原的抑制作用

(a) 抑制剂为 *E. coli* J5, (b) 抑制剂为 *E. coli* RcLPS, (c) 竞争抑制剂为抗 *E. coli* J5 株 MA5 (EL1). ●—●: A1 克隆; □—□: E3 克隆; ○—○: 对照.

2.4 阳性克隆 DNA 的 PCR 图谱

按常规碱变性法提取各株克隆的质粒 DNA, 并用相应人的 IgG Fab 可变区及恒定区引物进行 PCR 扩增, 以观察扩增片段的大小, 结果获得的 PCR 产物与插入基因片段 (660 bp) 大小相似 (图 2), 初步证实阳性克

隆 DNA 中含有人 Fab 的基因片段.

表 3 阳性克隆与不同 LPS 及菌株的交叉反应

LPS	阳性克隆			
	A1	E3	E9	E16
大肠杆菌 Rc	++	++	+	++
大肠杆菌 O111:B4	-	+	-	-
明尼苏达沙门氏菌	-	+	NT	-
鼠伤寒沙门氏菌	-	+	NT	-
肺炎克雷伯氏菌	-	+	NT	-
粘质沙雷氏菌	-	+	NT	-
菌株				
大肠杆菌 J5	+++	+++	NT	NT
大肠杆菌	+	+	NT	NT
鼠伤寒沙门氏菌	-	+	NT	NT
肺炎克雷伯氏菌	-	+/-	NT	NT
粘质沙雷氏菌	-	+/-	NT	NT
宋内志贺氏菌	-	-	NT	NT
绿脓杆菌	-	-	NT	NT
类炭疽杆菌	-	-	NT	NT
白色葡萄球菌	-	-	NT	NT
金黄色葡萄球菌	-	-	NT	NT

注: +: $2.0 \leq P/N \leq 2.9$; ++: $3.0 \leq P/N \leq 3.9$; +++: $P/N \geq 4.0$. NT: 未检测.

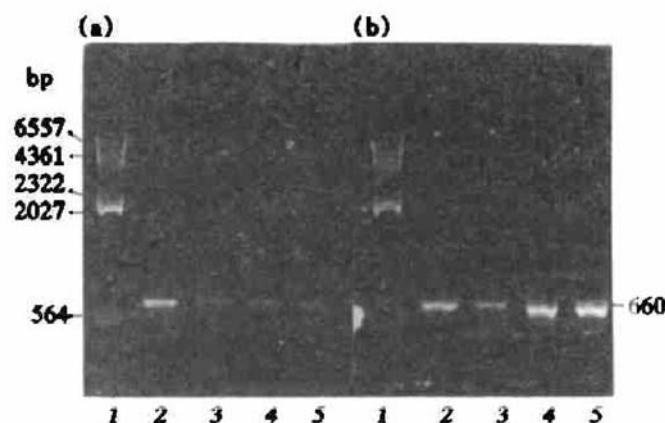


图2 阳性克隆重链和轻链的 PCR 图谱

(a) 重链; (b) 轻链. 1: DNA 标准 (λ DNA/HindIII); 2~5: 分别为克隆 A1、E3、E9、E16.

2.5 阳性克隆 Fab 的表达

由各阳性克隆的 SDS-PAGE 图谱可见 (图 3 和 4), 经 IPTG 诱导的阳性克隆在分子量约 50 000 大小处均有一明显的蛋白表达带, 而未经 IPTG 诱导的或 pComb3 载体对照则无此明显的表达带; 蛋白质印迹结果也证实, 此

表达蛋白带能与 HRP 标记的羊抗人 IgG 发生明显的结合反应 (图 5), 表明这 4 株阳性克隆能够表达与人抗体 Fab 段分子量大小相似的蛋白。

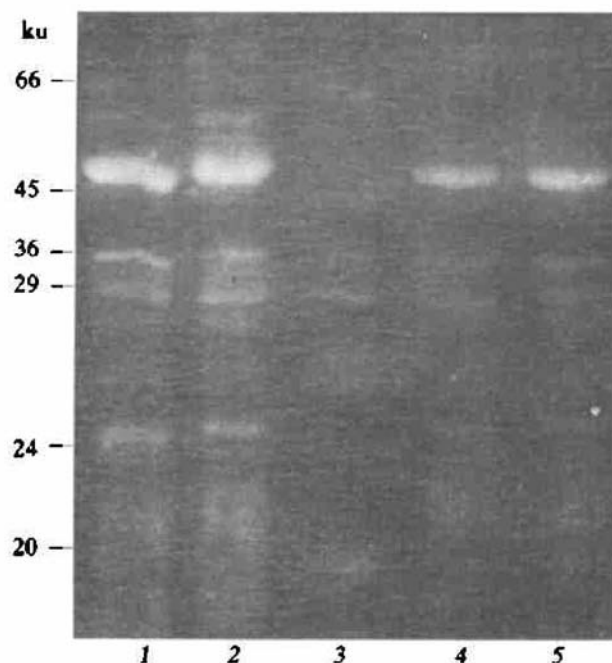


图 3 阳性克隆的 SDS-PAGE 图谱

1、2: 克隆 A1 和 E3; 3: 蛋白标准; 4、5: 克隆 E9 和 E16.

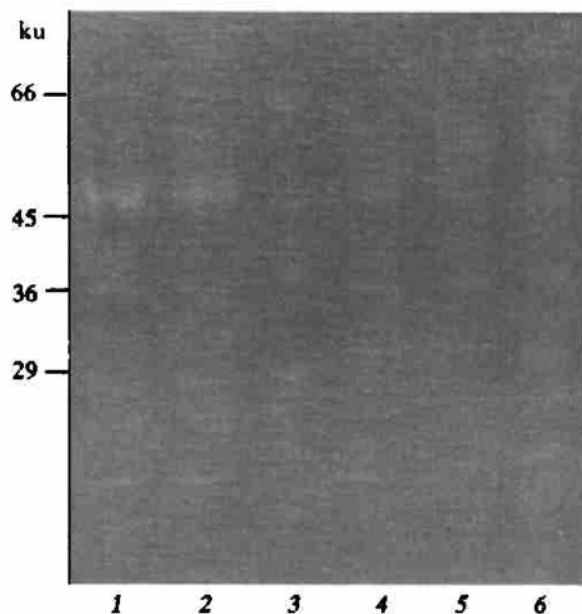


图 4 阳性克隆诱导前后的 SDS-PAGE 图谱

1、2: 经 IPTG 诱导的克隆 A1 和 E3; 3: 蛋白标准; 4、5: 未经 IPTG 诱导的克隆 A1 和 E3; 6: pComb3 载体对照.

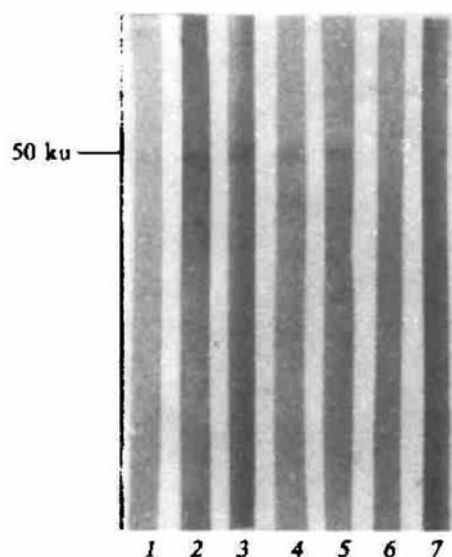


图 5 阳性克隆的蛋白质印迹图谱

1: pComb 3 载体对照; 2 ~ 5: 经 IPTG 诱导的克隆 A1、E3、E9 和 E16; 6、7: 未经 IPTG 诱导的克隆 A1 和 E3.

3 讨 论

噬菌体抗体技术是 90 年代初出现的应用基因工程方式制备人源抗体的最新技术. 该项技术是以 PCR 能够用有效引物克隆出全套人免疫球蛋白可变区基因, 以及使大肠杆菌能成功分泌有结合活性的免疫球蛋白分子等技术的突破为基础发展起来的^[7].

噬菌体抗体技术的原理是以丝状噬菌体为载体, 将抗体基因与编码噬菌体外壳蛋白基因 III 或基因 VI 相连, 并借助蛋白 III 或 VI 的穿膜部位表达在细菌细胞壁内膜表面; 在经过辅助病毒感染后, 携带有表达载体的宿主菌就会释放出膜上带有抗体片段的噬菌体颗粒, 这种由噬菌体表面携带的抗体即为 PhAb. 由于噬菌体抗体技术从根本上改变了特异抗体的筛选程序, 因而使抗体的筛选变得非常方便而有效^[8].

PhAb 将杂交瘤技术的细胞无限传代发展为基因无限传代, 克服了用细胞杂交方法难以获得人源 MAbs 的不足. 而且, PhAb 的制备过程简便, 筛选容量增加, 周期明显缩短. 目

前, 国外应用该项技术已制备出抗破伤风类毒素、抗人红细胞、抗人补体 (C_{5a})、抗 HIVgp120 和抗 HBsAg 等人抗体^[9-13]。另外, 抗体库技术的建立, 也使得不经过免疫, 直接利用抗原从抗体库中筛选特异抗体成为可能。如 Marks 等^[14]由未经免疫供体构建的人抗体库中, 筛选出抗 BSA 和溶菌酶的抗体。

本文用 *E. coli* J5 株对未经免疫来源的人噬菌体抗体库进行富集与筛选, 最后获得 4 株能与 *E. coli* J5 株结合的阳性克隆。抑制试验证实, *E. coli* J5 株或 *E. coli* Rc-LPS 能抑制阳性克隆与相应抗原的结合反应; 且抗 *E. coli* J5 株 LPS 核心糖脂域 MAb (EL1) 也能与阳性克隆 (A1) 竞争结合 *E. coli* J5 株抗原。分别对阳性克隆 DNA 进行 PCR 扩增, 获得的重链和轻链基因片段, 以及 SDS-PAGE 和蛋白质印迹结果表明, 4 株阳性克隆可能含有人抗体 Fab 基因片段, 且能有效表达具有结合抗原活性的 Fab 蛋白。E3 克隆与不同的 LPS 及某些 GNB 有一定交叉反应的现象, 可能与该克隆所识别的抗原表位位于 *E. coli* J5 株 LPS 核心糖脂结构中的保守区域有关。另外, E3 克隆抗原反应特性与 A1 克隆的不同间接提示, E3 与 A1 为两个不同的克隆株。而其他克隆株之间的关系尚有待于进一步研究证实。

本文所用的抗体库来自未经免疫的供体淋巴细胞。一般而言, 由这种抗体筛选的 PhAb 亲和力较低。根据免疫系统中亲和力突变是在 B 淋巴细胞分裂过程中, 通过抗体基因的随机突变和重排而实现的原理, 在体外, 则可利用 PCR 的错配, 或在致突变株中反复传代等技术来模拟体内细胞突变过程, 使抗体基因发生随机突变, 达到改善 PhAb 亲和力的目的^[15]。

目前, 国内外尚未见用细菌抗原从人抗体库中制备 PhAb 的研究报道, 本文的初步研究结果, 有可能为今后进一步研究 PhAb 提供有益的经验 and 基础。

参 考 文 献

1 俞晓峰, 黄 策. 生命的化学, 1995; 3: 20

- 2 Jones P T, Dear T, Foote P H *et al.* Nature, 1986; 321: 522
- 3 Skerra A, Pluckthun A. Science, 1988; 240: 1038
- 4 王 琰. 单克隆抗体通讯, 1993; 9: 23
- 5 Barbas C F, Lerner R A. Methods: Companion Methods Enzymol, 1991; 2: 119
- 6 Kang A S, Burton D R, Lerner R A. Methods: Companion Methods Enzymol, 1994; 2: 111
- 7 Wright A, Shin S U, Morrison S L. Crit Rev Immunol, 1992; 12: 125
- 8 Hawkins R E, Llewelyn M B, Russell S J. British Medical Journal, 1992; 305: 1348
- 9 Chiswell D J, McCafferty J. TIBTECH, 1992; 10: 80
- 10 Siegel D L, Silberstein L E. Blood, 1994; 83: 2334
- 11 Ames R S, Tornetta M A, Jones C S *et al.* J Immunol, 1994; 152: 4572
- 12 Barbas C F, Bjorling E, Chiodi F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 9339
- 13 Zebedee S L, Barbas C F, Hom Y L *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 3175
- 14 Marks J D, Hoogenboom H R, Bonner T P *et al.* J Mol Biol, 1991; 222: 581
- 15 Marks J D, Hoogenboom H R, Griffiths A D *et al.* J Biol Chem, 1992; 267: 16007

Preliminary Study on Preparation of Human Phage Antibodies to *E. coli* J5 Strain. Yu Xiaofeng, Wang Haitao, Huang Ce (*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*).

Abstract The clones of phage antibody (PhAb) to *E. coli* J5 strain were enriched and screened by panning and filter blot with *E. coli* J5 strain from a human antibody library. Four positive clones binding to *E. coli* J5 strain were determined by ELISA. The results of inhibition test showed that the binding of positive clones to antigens could be respectively inhibited by *E. coli* J5 strain, *E. coli* Rc-LPS and anti-CGL MAbs to *E. coli* J5 strain. PCR amplification showed that all of the four positive clones contained the expected heavy and light chain genes of human Fab fragment. SDS-PAGE and

Western blot analysis confirmed that positive clones were able to express about 50 ku proteins after induced with IPTG. These data indicate that four positive clones express the human Fab

fragment with antigen specificities.

Key words PCR, phage antibody library, human antibody

壳聚糖固定化纤维素酶的研究

陈 盛 黄智跃 刘艳如

(福建师范大学高分子研究所, 福州 350007)

摘要 以蟹壳为原料提取壳聚糖, 用戊二醛作交联剂, 将纤维素酶固定于壳聚糖上. 同时探讨了一定量壳聚糖载体与交联剂浓度、给酶量等关系的最适固定化酶条件, 并对固定化酶的热稳定性、操作稳定性、米氏常数、最适温度、离子强度的影响及使用半衰期等理化性质进行了探讨.

关键词 纤维素酶, 戊二醛, 壳聚糖, 固定化

近年来壳聚糖作为固定化酶载体的研究引起了不少学者重视^[1,2]. 壳聚糖是从蟹、虾等甲壳动物废弃的外壳中提取的一种氨基多糖, 它来源丰富, 制备较简单, 应用广泛. 壳聚糖学名为: 2-氨基-1, 4- β 葡聚糖. 在蟹壳中它与蛋白质及无机盐交织成网状结构, 在去除钙盐和蛋白质之后, 其机械性能大为改善, 而且化学性质稳定, 耐热性好, 特别是其分子中存在的氨基, 既易于与酶共价结合, 又可络合金属离子, 使酶免受金属离子的抑制, 同时又易通过接枝而改性. 是一种亟待开发利用的固定化酶的良好载体.

据文献 [3] 报道, 壳聚糖与戊二醛发生 Schiff 反应, 再与酶发生 Schiff 反应制得的固定化酶活力最高. 因此, 本文将通过壳聚糖与戊二醛交联, 再将纤维素酶固定化, 并对固定化酶的最适条件及稳定性、最适 pH 值、最适反应温度, 表观米氏常数、离子强度对酶活力的影响及该固定化酶的使用半衰期等理化性质进行了探讨.

1 材料与方法

1.1 材料

蟹壳, 自己收集. 纤维素酶, Sigma 产品.

底物, 羧甲基纤维素钠盐, 购自上海化学试剂采购供应站. 戊二醛, 生化试剂, 上海化学试剂站分装厂 (按 25% 计). 壳聚糖从蟹壳制备, 40 目, 脱酰度 60% 左右. 3, 5-二硝基水杨酸, 湖州生物化学厂产品. 其他试剂均为分析纯.

仪器: 721 分光光度计, 上海第三分析仪器厂产品; 电热恒温水浴锅, 武汉建新器械厂产品; 800 型离心沉淀器, 上海手术器械厂产品; NDJ-1 型旋转粘度计, 上海天平仪器厂出品.

1.2 方法

1.2.1 壳聚糖载体的制备: 将洗净晒干的蟹壳经稀酸浸泡脱钙和稀碱煮沸脱蛋白质反复处理 2 至 3 次, 得白色几丁质. 几丁质再经 50% 浓碱于 80℃~100℃ 保温 5~6 h, 趁热取出洗涤, 晒干即得白色壳聚糖^[4].

1.2.2 纤维素酶的固定化: 称取一定量 40 目壳聚糖, 加入一定浓度的戊二醛, 室温下搅拌 3.5 h, 静置过夜, 离心弃去上清液, 水洗 3 次以除去残余戊二醛, 抽滤. 往交联后的壳聚糖中加入纤维素酶, 室温下搅拌 2.5 h 后, 转入冰箱中于 4℃ 静置过夜. 离心弃上清, 水洗 3 次, 抽滤即得固定化酶.