

全人源食管癌单链抗体 scFv 基因文库的构建

段红¹, 唐树彬², 庞华², 彭志平², 李少林²

Construction of Gene Library of Human-Originated Single-Chain Variable Fragment Antibody Associated with Esophageal Cancer

DUAN Hong¹, TANG Shu-bing², PANG Hua², PENG Zhi-ping², LI Shao-lin²

1. Department of Pathophysiology of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; 2. Department of Nuclear Medicine of Chongqing University of Medical Sciences

Corresponding Author: LI Shao-lin, E-mail: shaolinli202@sina.com

Abstract Objective To construct human single-chain variable fragment (scFv) antibodies gene library associated with esophageal cancer. **Methods** Metastatic periesophageal lymph nodes of esophageal cancer were used as the B cells source, the total RNA of these B cells was extracted and prepared as the template of RT-PCR. Firstly, we screened gratefully two pairs of primers of the heavy and light regions separately, then the V_H and V_L fragments were first amplified from the cDNA. Secondly, the V_H-linker and V_L-linker were amplified from the V_H and V_L fragments. Lastly, SOE-PCR was used to connect the V_H-linker and V_L-linker to ScFv, the Sfi I and Not I restriction site was inlet in the scFv. The gel purified scFv gene repertoires are digested by Sfi I and Not I separately. The ligation mixes of scFv and pCANTAB-5E are transformed into competence E. coli TGI. The insert ratio of scFv antibodies library was identified by PCR. The products of Sfi I/Not I double digestion reaction positive insert clone were identified by 1.5% agarose gel electrophoresis. **Results** Total RNA is good. The size of V_H is about 450bp, and V_L is about 350bp. The size of scFv is about 850bp. After transformation into E. coli TGI, 2 × 10⁷ cfu/μg ampicillin resistant bacteria colonies grow after overnight culture. Randomly digestive reaction showed that the positive insert ratio was 91.7% (22/24). **Conclusion** These results are bases to further phage antibody library construction.

Key words: Phage antibody library; Single-chain variable fragment; Esophageal cancer; Genetic engineering antibody

摘要:目的 制备全人源食管癌单链抗体 scFv 基因文库。方法 取食管癌病人癌肿周围淋巴结作为 B 细胞的来源,提取总 RNA,用 RT-PCR 的方法获得抗体可变区基因 cDNA 文库。首先分别网格筛选确定扩增 V_H和 V_L基因片段的引物对,以 cDNA 为模板扩增 V_H和 V_L基因片段,再以它们为模板分别扩增 V_H-linker 与 V_L-linker,用 SOE-PCR 技术将它们拼接成 scFv,再引入酶切位点 Sfi I 和 Not I,胶回收 PCR 产物获得 scFv。将 scFv 基因克隆到噬菌粒载体 pCANTAB-5E 后电转入 E. coli TGI。PCR 法鉴定抗体基因插入率,1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆酶切产物。结果 食管癌周围淋巴结的提取总 RNA 琼脂糖电泳结果中可见清晰的 28S、18S 条带;V_H基因的大小约为 450bp, V_L基因为 350bp,组装后的 scFv 基因约为 850bp。PCR 连接产物的转化效率为 2 × 10⁷ cfu/μg, scFv 的阳性插入率为 91.7% (22/24)。结论 食管癌相关的人源单链抗体基因文库的构建为进一步筛选单链抗体库奠定了基础。

关键词: 噬菌体抗体库;单链抗体;食管癌;基因工程抗体

中图分类号:R735.1 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2007)07-0486-04

0 引言

食管癌(esophageal cancer)是人类较常见的恶

性肿瘤之一,尤其是我国更是食管癌的高发区。据估计,全世界每年大约有 20 余万人死于食管癌,我国每年约死亡 15 万余例。肿瘤的抗体导向治疗,迄今仍处于研究阶段,远未能达到临床广泛应用水平,主要原因之一是目前所采用的抗体仍多为异源性抗体,用于人体会引起人抗鼠抗体反应(human anti-murine antibody response, HAMA)。而人源化的抗体则在肿瘤的诊断、靶向治疗中具有较高的

收稿日期:2006-06-16;修回日期:2006-08-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370422),重庆市科委自然科学基金计划资助(CSTC,2006BB5297)

作者单位:1. 400016 重庆医科大学病理生理教研室,2. 核医学教研室

通讯作者:李少林, E-mail: shaolinli202@sina.com

作者简介:段红(1966-),女,博士,副教授,硕士生导师,主要从事肿瘤免疫与肿瘤药学研究

应用价值。为此,本研究从食管癌患者癌肿周围淋巴结,利用噬菌体抗体库技术构建了人抗体基因库,以期获得食管癌的人源化单链抗体。

1 材料和方法

1.1 材料

总 RNA 抽提试剂盒 (W6701) 购自上海华舜生物工程有限公司, cDNA 合成试剂盒 RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 购自大连宝生物工程有限公司、DNA100bp Marker 购自上海生工生物工程技术服务有限公司, DNA 纯化试剂盒 (W5211) 购自上海华舜生物工程有限公司、Sfi I 和 Not I 内切酶、T4 DNA 连接酶、Ta KaRa Ex Taq™ HS 均购于大连宝生物公司;载体 pCANTAB- 5 E 和大肠杆菌 TG1 均购自 Amersham Biosciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 淋巴结总 RNA 的提取 食管癌病人(重庆医科大学临床学院胸外科食管癌病人 10 例,手术后经病理确诊鳞癌 6 例,腺癌 4 例)手术时取癌肿周围淋巴结,无菌生理盐水漂洗后,剪成约 0.3cm 大小的组织块,立即放入盛有液氮的冰瓶中,取回后立即进行总 RNA 的提取或放入液氮中保存。

淋巴结的裂解及 RNA 的纯化按试剂盒说明操作,将获得的 RNA (鳞癌和腺癌的 RNA 混匀后) 贮存于 - 70 ℃。琼脂糖电泳判断 RNA 的完整性,分光光度仪测 A₂₆₀ / A₂₈₀ 判断 RNA 的纯度。

1.2.2 确定扩增 V_H 和 V_L 基因引物对 引物序列中的简并符号采用 IUPAC 命名方式: R = A 或 G; W = A 或 T; K = G 或 T; Y = C 或 T; S = G 或 C; H = A 或 C 或 T; N = A 或 C 或 G 或 T, 引物参照文献^[1,2]设计,引物委托北京三博远志生物技术有限责任公司合成,为 PAGE 纯化产品。引物浓度的计算: PCR 反应中引物工作浓度为 0.2 μM。

1.2.3 网格筛选确定扩增 V_H 和 V_L 基因片段的引物对 IgG 特异 V_H 和 V_L 基因片段扩增: 用扩增重链可变区和扩增轻链可变区的每一个后引物和每个前引物交叉配对(网格筛选)做 PCR, 然后分别将 PCR 产物电泳, 确定扩增 V_H 和 V_L 基因片段的引物对。

扩增重链可变区引物对:

Hu_H3FOR: 5' TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC-3'

HuV_H5aBACK: 5' GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC-3'

扩增轻链可变区引物对:

Hu_L2FOR: 5' ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC-3'

HuV_L5aBACK: 5' GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'

扩增 V_H-linker 引物对:

Hu_H4-5Linker: 5' A GA GCCACCTCCGCCTGAACCGCC TCCACCTGA GGA GACGGT GACCA GGGTTCC-3'

HuV_H5aBACK: 5' GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC-3'

扩增 V_L-linker 的引物对:

Hu_L2FOR: 5' ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT C CC-3'

Linker- HuV_L2-3-6BACK: 5' GTTCA GCGGGA GGTGGC TCTGGCGGTGGCGGATCGGAWRTTGTGHTGACKCA GTC TCC-3'

引入酶切位点的引物:

HuV_H5aBACKSfi: 5' GTCCTCGCAACTGC GGCCCACGCGCCATGGCCCA GGTGCA GCTGTTGCA GTCTGC-3'

Hu_L2FORNot: 5' GAGTCATTCTCGACTTGC GGCCCGACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCC-3'

1.2.4 RT-PCR

逆转录反应(cDNA 第一链的合成)

A 按下列组成配制反转录反应液: MgCl₂ 2 μl, 10 ×RT Buffer 1 μl, RNase Free dH₂O 2.75 μl, dNTP Mixture (10mM each) 1 μl, RNase Inhibitor 0.25 μl, Oligo dT 3' Adaptor Primer 0.5 μl, RNA 2 μl, AMV Reverse Transcriptase 0.5 μl, 总量 10 μl。

按以下条件进行反转录反应: 42 ℃ 20 min, 99 ℃ 5 min, 5 ℃ 5 min 1 个循环。

1.2.5 V_H 和 V_L 基因扩增 用确定好的引物对分别在 PCR 仪上扩增 V_H 和 V_L 基因片段。

PCR 反应

B 按下列组成配制 PCR 反应液: 重链可变区和轻链可变区分别进行: 5 ×PCR Buffer 10 μl, 灭菌蒸馏水 27.75 μl, Back primer 1 μl, Forward primer 1 μl, Ta KaRa Ex Taq™ HS 0.25 μl, 总量 40 μl。

把 B- 的反应液加入到 A- 的反转录反应结束后的 PCR 反应管中, 轻轻混匀。

按以下条件进行 PCR 反应: 94 ℃, 2 min 1 个循环, 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳 (1.5 %) 纯化回收 V_H 和 V_L 基因片段。

1.2.6 scFv 基因的组装 V_H 和 V_L 基因片段延伸连接肽 V_H-linker 和 V_L-linker: 用上述纯化的 V_H 和 V_L 基因片段作为它们延伸连接肽的模板, 用相对应的人 J_H-linker primers 和 human V_H back primers 扩增 V_H-linker, 用相对应的 linker-human V primers 和 human J forward primers 扩增 V_L-linker。

SOE-PCR (剪切重叠延伸 PCR, splicing over-

lapping extend - PCR)^[3]:将上述扩增的 V_H-linker 和 V_L-linker 的 PCR 产物在无引物情况下用 SOE-PCR 连接:首先变性步骤 94 5 min, 94 1 min, 60 1 min, 72 1.5 min, 5 个循环, 然后加入含酶切位点引物, 94 30 s, 60 1 min, 72 1.5 min, 30 个循环, 胶纯化回收 scFv。

1.2.7 单链抗体基因文库的建立^[4] 单链抗体基因先后用限制性内切酶 Sfi I 和 Not I 酶切过夜, 产物纯化后, 与同样酶切后的噬菌体载体 pCANTAB-5E 进行连接反应, 连接产物纯化后, 电转化大肠杆菌 TG1, 涂 SOBAG 平板, 同时用 pUC18 标准质粒测定转化效率, 在含 2 % 葡萄糖和 100 μg/ml 的 SOB 培养基上 30 培养过夜。

1.2.8 PCR 法鉴定抗体基因插入率 挑取 24 个细菌集落, 加入 3 ml 含氨苄青霉素 100 mg/ml 的 LB 培养过夜。按质粒提取试剂盒说明提取质粒, 取 2 μl 为模板采用 50 μl 体系, 进行 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳检测 scFv 的阳性插入率。

1.2.9 阳性克隆酶切鉴定 PCR 反应阳性的质粒用 Sfi I 和 Not I 双酶切, 产物进行 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 淋巴结总 RNA 的提取

食管癌患者淋巴结总 RNA 用 1.5 % 琼脂糖电泳判断 RNA 的完整性, 可见两条带 18S 与 28S, 而且 28S 条带的亮度是 18S 的两倍。分光光度仪测 A₂₆₀/A₂₈₀ 判断 RNA 的纯度 > 1.8。

2.2 V_H 和 V_L 基因扩增产物的鉴定

V_H 和 V_L 基因扩增后, 经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定, V_H 基因的大小约为 450 bp, V_L 基因为 350 bp, 见图 1。

2.3 scFv 基因的组装

scFv 基因组装后, 经 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳证实, 组装后的 scFv 基因约为 850 bp, 见图 2。

2.4 PCR 连接产物的转化效率的测定

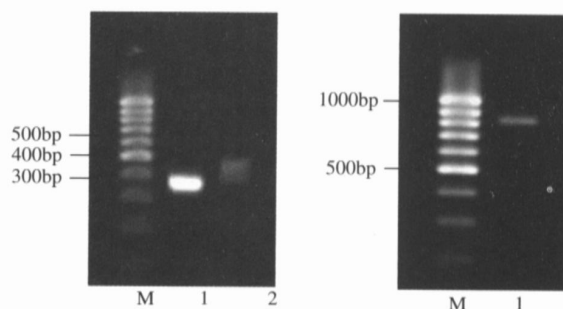
pUC18 标准质粒测定大肠杆菌 TG1 转化效率为 10⁸ cfu/μg, PCR 连接产物的转化效率为 2 × 10⁷ cfu/μg。

2.5 PCR 法鉴定抗体基因插入率

PCR 法检测 24 个菌落, 22 个克隆扩增出 scFv, 目的基因插入率为 91.7 %, 见图 3。

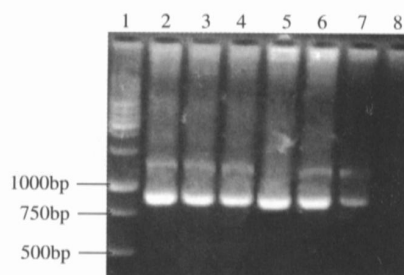
2.6 阳性克隆酶切鉴定

随机挑取 6 个单克隆质粒以 Sfi I 和 Not I 双酶切, 均有目的片段释放, 见图 4。

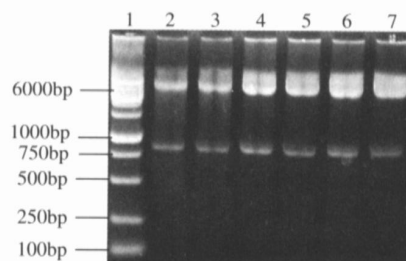


M:100bp marker;
1:V_L基因;2:V_H基因
图 1 V_H和 V_L基因扩增
产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定

M:100 bp marker;
1:scFv 基因
图 2 scFv 基因的琼脂
糖凝胶电泳鉴定



1:DNA Marker;2-7: PCR 反应阳性;8:PCR 反应阴性
图 3 随机挑取克隆抽提质粒 PCR 反应



1:DNA Marker, 2-7:均可见 scFv 的片段(下)和载体(上)
图 4 PCR 反应阳性的质粒用 Sfi I 和 Not I 酶切结果

3 讨论

自从首次报道用小鼠 B 细胞杂交瘤技术制备单克隆抗体 (mAb) 以来约有 140 种目前进行临床试验, 大部分仍是由鼠杂交瘤技术生产。而噬菌体抗体为抗体的片段, 分子小、穿透力强、廓清快、异源性低, 而且能在原核系统中表达, 易于生产。利用抗体库技术可简便地制备出针对不同肿瘤患者多种肿瘤的 scFv 片段, 这些 scFv 片段与细胞毒素、破坏细胞的酶和细胞因子等连接后, 可形成对肿瘤细胞有特异性杀伤作用的复合物, 称为免疫毒素或生物导弹。对感染性疾病、器官移植排斥反应的防治及肿瘤的早期诊断、治疗, 以及手术及化疗后晚期肿瘤的辅助治疗均具有广阔的应用前景^[4,5-7]。噬菌体展示

库技术在一定程度上较好地模拟了体内抗体生成亲和力和成熟过程,可快速高效地从大量克隆中筛选展示特异性抗体的噬菌体,为制备高亲和性的抗体提供了有力工具,其特点是“它既可识别相应的抗原并与其结合,又能够感染宿主菌进行再扩增”,该技术可绕过免疫制备全人源性抗体,可有效避免鼠源性抗体在人体应用时诱发产生人抗鼠抗体(HAMA)等不良反应。它将表型(与抗原特异结合)与基因型(含 V 区基因)联系在一起,把识别抗原的能力和进行再扩增的能力结合起来,是一种高效的筛选体系,在人源性特异抗体的筛选和制备上独具优势^[8-10]。

目前的研究大都是根据 Kabat 等^[11]的免疫球蛋白数据库的信息来设计引物。扩增 Ig 可变区引物的设计,一般可选:

1) 5' 端引物选 Ig 前导肽保守序列,5' 端引物也可选 Ig 分子骨架区(FRI)的保守序列;

2) 3' 端引物常选 J 区保守序列,构建 Fab 抗体库,则在重链铰链区和轻链恒定区设计引物;

3) 依据抗体基因家族保守序列设计引物;

4) 设计多套引物分别扩增,为保证引物与模板最大匹配,扩增出所有基因,有时尚需采用简并引物。

本研究是根据上面第 3 条设计引物的。PCR 引物的设计是影响抗体库有效表位多样性的因素之一。引物设计应尽可能包含绝大部分可变区基因类型^[12]。可变区基因家族中以 V_H3 型和 V_H3 型最常见。因此在引物的简并性问题上,我们选择了以轻链为主的核苷酸序列。由于作为模板的 B 细胞来源于淋巴结,因此在选择重链可变区的简并引物时,我们选择了以 IgG 型重链为主的核苷酸序列。设计后的引物符合引物的一般原则:各引物间 3' 端不存在互补性。

目前人源抗体库的主要来源是外周血淋巴细胞。构建一定容量的抗体库需要约 1×10^7 个 B 淋巴细胞,这意味着至少需要 200 ml 外周血。因此临床操作十分不便。本实验以食管癌手术个癌肿周围转移淋巴结标本为来源,构建人源抗体基因文库。以此来源的 B 细胞数量多,且可能经过食管癌相关抗原刺激,是构建食管癌相关的人源抗体库的最佳来源。

构建大容量的人源抗体基因文库是噬菌体抗体库技术的关键步骤。影响抗体库有效表位多样性的因素很多,最主要的是宿主菌的转化效率和 PCR 引物的设计。一般来说,细菌的转化效率介于 $10^7 \sim 10^8$ cfu/ μ g 之间。本文用 10% 超纯甘油制备了高转化效率的 TG1 感受态菌。用 pUC18 标准质粒测定转化效率达到 10^8 cfu/ μ g,PCR 连接产物的转化效率也能达到 2×10^7 cfu/ μ g, scFv 的阳性插入率为

91.7%,说明此方法制备的大肠杆菌基本达到抗体库构建的要求。

常用的单链抗体构建方式有两种:一种是将重链基因和轻链基因通过不同的酶切位点先后克隆入表达载体,载体本身自带连接肽基因序列,这种方法操作步骤较为复杂,抗体库的多样性易于在反复的克隆操作中丢失;另一种是采用 SOE-PCR 的方法,先将重链和轻链可变区基因拼接起来,再通过罕见的酶切位点克隆入表达载体。本实验成功地从食管癌转移淋巴结中扩增并克隆了抗体可变区基因,构建人源单链抗体基因文库、为进一步建立大容量的噬菌体抗体筛选文库打下基础。

参考文献:

- [1] Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, et al. Bypassing immunization human antibodies from V-gene libraries displayed on phage[J]. J Mol Biol, 1991, 222(3):581-597.
- [2] Osbourn J, Jeremius L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibody for the treatment of autoimmune diseases[J]. Drug Discov Today, 2003, 8(18):845-851.
- [3] Lu Z, Masaki T, Shoyama Y, et al. Construction and expression of a single chain Fv fragment against pharmacologically active paeoniflorin in Escherichia coli, and its potential use in an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Planta Med, 2006, 72(2):151-155.
- [4] Chen XH, Chen Z, Chen F, et al. Construction and characterization of a cDNA library from human liver tissue of cirrhosis [J]. 浙江大学学报医学版, 2005, 34(2):98-103.
- [5] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(9):1126-1136.
- [6] Chowdhury PS, Wu H. Tailor-made antibody therapeutics[J]. Methods, 2005, 36(1):11-24.
- [7] Sanz L, Cuesta AM, Compte M, et al. Antibody engineering: facing new challenges in cancer therapy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(6):641-648.
- [8] Gao C, Mao S, Ronca F, et al. De novo identification of tumor-specific internalizing human antibody-receptor pairs by phage-display methods[J]. J Immunol Methods, 2003, 274(1-2):185-197.
- [9] Dall'Acqua WF, Damschroder MM, Zhang J, et al. Antibody humanization by framework shuffling [J]. Methods, 2005, 36(1):43-60.
- [10] Azzazy HM, Highsmith WE Jr. Phage display technology: clinical application and recent innovation [J]. Clin Biochem, 2002, 35(6):425-445.
- [11] Kabat EA, Wu TT, Perry HM, et al. Sequences of protein of Immunological Interest[M](U, S, Dept. Health Human Services, Washington DC), 5th Ed, 1991. 1229.
- [12] Staelens S, Desmet J, Ngo TH, et al. Humanization by variable domain resurfacing and grafting on a human IgG4, using a new approach for determination of non-human like surface accessible framework residues based on homology modelling of variable domains[J]. Mol Immunol, 2006, 43(8):1243-1257.

[编辑校对:贺文]