

# 鼠源性抗雄性特异性抗原噬菌体 Fab 抗体的制备及分析

## Cloning and Analysis of Phage Fab Antibodies of Mouse Male Specific Antigen

王乃东<sup>1,2</sup>, 薛立群<sup>1,2\*</sup>, 许道军<sup>1</sup>, 袁安文<sup>1</sup>, 邓治邦<sup>1</sup>, 崔树良<sup>1</sup>

WANG Nai-Dong<sup>1,2</sup>, XUE Li-Qun<sup>1,2\*</sup>, XU Dao-Jun<sup>1</sup>, YUAN An-Wen<sup>1</sup>, DENG Zhi-Bang<sup>1</sup> and CUI Shu-Liang<sup>1</sup>

1 湖南农业大学动物医学院, 长沙 410128

2 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128

1 College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

2 College of Animal Science&Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

**摘要** 利用噬菌体抗体库筛选技术获得抗雄性特异性抗原的噬菌体 Fab 抗体,首次采用雄鼠脾细胞对鼠源性抗雄性特异性抗原噬菌体 Fab 抗体库进行 3 轮亲和富集和 2 轮雌鼠脾细胞吸附,对筛选后特异性噬菌体 Fab 抗体进行 ELISA 分析,重组率鉴定及基因测序分析。结果显示,5 次筛选后的 15 个菌落中有 9 个能产生抗雄性特异性抗原特异性噬菌体抗体,噬菌体 Fab 抗体的基因重组率为 60%,E5 克隆的重链、轻链可变区序列分别属于 V<sub>H</sub>I 和 V<sub>K</sub>IV 基因家族,这为挑选出高亲和力的抗雄性特异性抗原噬菌体 Fab 抗体奠定了实验基础,将推进雄性特异性抗原及其抗体的研究进程,并为性别控制研究开创新途径。

**关键词** 小鼠, H-Y 抗原, 噬菌体展示技术, 抗体库

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)05-0727-06

**Abstract** To clone mouse phage antibodies against H-Y antigen from a phage antibody library, three cycles of affinity enrichment of the mouse phage antibody library with male spleen cells and two cycles of nonspecific absorption with female spleen cells were performed. The presence of mouse Fab on the phage surface was determined by ELISA and sequence analysis. 9 of 15 strains can bind to male spleen cells with the specific activity. Recombination rate of the phage antibody library clones is 60%. Sequence analysis of the PCR products of plasmid DNA of E5 clones show V<sub>H</sub>I and V<sub>K</sub>IV had common characteristics shared by other known variable region of antibodies. The mouse phage Fab antibody could be used for identifying H-Y antigen, and for the development of sex determination of early embryos in mammals.

**Key words** mouse, H-Y antigen, phage display technology, antibody library

雄性特异性抗原(male-specific antigen)也称为雄性特异性弱组织相容性 Y 抗原(male-specific minor histocompatibility Y antigen),又称 H-Y 抗原,是一组雄性特异性表达的基因产物<sup>[1,2]</sup>。在 1955 年由 Eichwald 等<sup>[3]</sup>首次发现, H-Y 抗原在异性间组织移植

的排斥反应和性别控制等方面的研究中具有重要的理论和实践意义。由于 H-Y 多克隆抗体的特异性不强,而且单克隆抗体(mAb)的效价不能得到明显的提高,限制了 H-Y 抗体的应用,而噬菌体表面展示技术为上述问题的解决提供了可能。我们利用

噬菌体抗体库技术构建了鼠源性抗雄性特异性抗原的噬菌体抗体库。因为多数噬菌体抗体库的特异性抗体片段是由固相纯化抗原筛选得到的,而对于无法提纯的 H-Y 抗原,采用传统的筛选方法可使抗原失去活性,导致不能准确完成筛选,因此应该建立新的筛选体系。因为细胞表面抗原具有重要生物学功能,噬菌体抗体库的新筛选方法也开始被使用,其中以抗肿瘤抗原抗体的报道较多<sup>[4-7]</sup>。Ridgway 等<sup>[8]</sup>采用先采用正常支气管上皮细胞对噬菌体抗体库进行非特异性清除,再利用肺腺癌细胞进行特异性筛选,获得特异性单链抗体,但其筛选效率较低。Kupsch 等<sup>[9,10]</sup>成功筛选出抗黑色素瘤细胞抗原的特异性抗体。Siegel 等<sup>[11]</sup>报道了磁性细胞分离法(MACS),先用抗原阳性的细胞包裹磁珠,然后与大量抗原阴性的细胞混合,加入待筛选的噬菌体抗体库后,再通过磁柱快速分离,从噬菌体 Fab 抗体库中筛选出一系列抗 RH(D)的抗体。最近,利用细胞抗原筛选已获得广泛的成功<sup>[12-15]</sup>,说明利用细胞膜抗原来对噬菌体抗体库筛选是可行的。本文利用雄鼠脾细胞对噬菌体抗体库进行 3 轮亲和富集及 2 轮雌鼠脾细胞吸附的筛选,并对抗雄性特异性抗原噬菌体抗体进行抗体活性和基因分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

重组缺陷型大肠杆菌菌株 XL1-Blue 的基因型为 *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lac<sup>q</sup>ZΔM15Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]* 购自 Stratagene 公司。pComb3 载体是噬菌体表面 Fab 段表达载体,含氨基青霉素(Amp)的抗性基因,载体大小为 4 029 bp,由美国 Scipps 研究所惠赠。辅助噬菌体 VCSM13 购自 Stratagene 公司。*Xho* I、*Xba* I 购自 MBI 公司。4000 DNA marker 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。6 周龄雄性和雌性 C57BL/6 小鼠,体重为 15g 左右,由中国科学院上海实验动物中心(SLACCAS)提供。

### 1.2 抗雄性特异性抗原噬菌体抗体库构建

利用雄鼠脾细胞免疫 6~7 周龄 C57BL/6 雌鼠,加强免疫后取脾细胞,TRIZOL 法提取细胞总 RNA,并逆转录合成 cDNA 第一条链。以其为模板,利用特异性 Ig 基因的引物 PCR 扩增出重链 Fd 片段和 κ 链基因,并将扩增出基因重组到噬质粒载体 pComb3 中,重组噬质粒转化大肠杆菌 XL1-Blue 中,分别构建 κ 链基因库和抗体 Fab 段基因库,利用蓝白斑筛

选,计算其转化效率。通过 PCR 反应和双酶切反应鉴定抗体库的重组率。抗体 Fab 段基因库经过辅助噬菌体 VCSM13 超感染,构建鼠源性噬菌体 Fab 抗体库。

### 1.3 噬菌体抗体库的筛选

**1.3.1 雄鼠脾细胞进行亲和富集:**首先在 10mL 玻璃试管中加入 3mL 雄鼠脾细胞悬液( $5 \times 10^6$  个/mL),加入 200 $\mu$ L 抗体库,在 37 $^{\circ}$ C 摇床中轻摇 1h。在玻璃试管中,每次加入 5mL PBS,反复轻轻吹打 3min,1000rpm 离心 5min,弃上清,再加入 5mL PBS 洗涤,洗去非特异性吸附噬菌体。最后用 1.5mL PBS 重悬噬菌体,移入 1.5mL Eppendorf 管中。3000r/min 离心 5min,弃上清。然后加入 500 $\mu$ L 甘氨酸-盐酸(pH2.2)洗脱缓冲液,室温孵育 10min,用移液器吸头反复吹打几次。再加入 30 $\mu$ L 2mol/L Tris,使溶液的 pH 值在 7~8 之间,以中和洗脱下来的噬菌体溶液。将筛选洗脱的噬菌体抗体,加入 2mL 新鲜制备的大肠杆菌 XL1-Blue( $OD_{600} = 1$ ),室温 15min。取 0.1 mL 及 10 $\mu$ L 菌液铺在 LB 平板(含 25mg/L tet 和 50mg/L amp),于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后,计算菌落形成单位(cfu)。剩余菌液加入 12mL SB 培养液,于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h,加入 amp 至 50mg/L,于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h 后,加入 VCSM131 mL(约  $10^{12}$  pfu)转入 100 mL SB 培养液(含 10mg/L tet 和 50mg/L amp),于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h 后,加卡那霉素至终浓度 70mg/L,于 30 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜后 4 $^{\circ}$ C 4000r/min 离心 15min,收集上清入新管,加入 PEG800 终浓度为 40g/L,NaCl 终浓度为 30g/L,摇床 5 min,混匀后冰浴 0.5h,4 $^{\circ}$ C 9000 r/min 离心 20min 弃上清,倒置无菌吸水纸上 10min,加入 2mL 1% BSA-PBS 重悬沉淀,再以 14000r/min 离心 5min 弃去不溶解物,收集上清即为次级噬菌体抗体库,取 1mL 在 -70 $^{\circ}$ C 低温冰箱中冻存,然后将上述制备的噬菌体溶液用 LB 培养液做  $10^{-3} \sim 10^{-8}$  倍稀释,取 1 $\mu$ L 与 50 $\mu$ L XL1-Blue( $OD_{600} = 0.5$  左右),室温静置 15min,然后铺 LB(含 amp)平板中,置 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养过夜。计算皿上的空斑数。

**1.3.2 雌鼠脾细胞进行吸附:**将雌鼠脾细胞(约  $10^6$ )以 PBS 反复洗涤 3 次,收集细胞加入次级噬菌体抗体库 200 $\mu$ L,混合后置于 37 $^{\circ}$ C 1.5h。10000r/min 离心 30s,取上清加入 2mL 新鲜的 XL1-Blue 中,室温静置 15min 进行感染。

**1.3.3 交替重复进行上述的亲和富集及雌鼠脾细胞吸附:**按第一轮筛选方法继续进行下一轮筛选,筛选抗原雄鼠脾细胞包被量依次为  $2 \times 10^6$  个/mL, 10 $^6$  个/mL, 10 $^5$  个/mL, 10 $^4$  个/mL, 10 $^3$  个/mL, 10 $^2$  个/mL, 10 $^1$  个/mL。

$1 \times 10^6$  个/mL。洗涤次数分别为 5 次、10 次。进行吸附的雌鼠脾细胞浓度不变,最后将筛选后洗脱下来的噬菌体感染大肠杆菌 XL1-Blue,按第一轮筛选方法扩增制备下一级噬菌体抗体库,测定效价,交替重复进行上述的亲富集及雌鼠脾细胞吸附。

#### 1.4 噬菌体抗体库的双酶切鉴定

筛选后,随机挑取 5 个菌落克隆接种 SB(含 20mg/L tet 和 100mg/L amp)扩增后提取质粒,用 *Xba* I 和 *Xho* I 酶切鉴定 Fab 段插入率,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

#### 1.5 噬菌体抗体特异性的鉴定

首先将  $100 \mu\text{L}$  雌性和雄性 C57BL/6 小鼠脾细胞悬液 ( $5 \times 10^6$  个/mL) 接种于 ELISA 板 4°C 过夜,弃上清液。加入  $100 \mu\text{L}$ /孔 0.25% 的戊二醛固定 10min, PBST 洗 3 次,每次 3min。每孔加  $150 \mu\text{L}$  3% BSA PBS 封闭,37°C 孵育 1h 后洗涤,方法同上。再加  $10 \mu\text{L}$  PEG 沉淀的第 5 轮筛选后的噬菌体抗体,用 3% BSA PBS 补充至  $100 \mu\text{L}$  摇匀,同时设空白、VCSM13 阴性对照、6 号免疫雌鼠抗血清为阳性对照。37°C 1h 后用 PBST 洗 6 次,每次 3min。加 HRP-羊抗 M13(用 3% BSA-PBS 稀释 4000 倍)每孔  $100 \mu\text{L}$ ,37°C 孵育 1h 后洗涤,方法同上。甩去孔内液体, PBST 洗 3 次,每次 3min。加底物(TMB- $\text{H}_2\text{O}_2$ )溶液每孔  $100 \mu\text{L}$ ,室温显色 15min,用 2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应,空白调零,于 450nm 波长测吸光度值。以 OD 值 > 阴性对照 OD 值 2.1 倍以上作为阳性克隆判定标准。

#### 1.6 阳性克隆序列测定与结构分析

将 ELISA 检测结果较好的阳性克隆的 PCR 产物送北京奥科协公司测序,采用 ABI3730 型全自动测序仪。所测的序列按下列方法进行分析,首先利用 Sequencher™ 软件将引物序列删除,将所得到的序列进入 Genbank 非冗余数据库(选定参数为 nr)和 Immunoglobulin BLAST IgBlast(样品来源选 mouse),并选鼠源性免疫球蛋白数据库进行序列同源性分析,根据数据库的注释进行分析。然后利用 IMGT, the international Immunogenetics information system® (Initiator and coordinator: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, France) 对可变区序列进行分析和模拟其空间结构。

## 2 结果

### 2.1 抗雄性特异性抗原噬菌体抗体库构建

抗体库的轻链、重链 Fd 段基因的重组率均为 80%。抗体 Fab 段基因库经过辅助噬菌体 VCSM13

超感染,成功构建了鼠源性噬菌体 Fab 抗体库,并测定噬菌体抗体库的库容和滴度,结果分别为  $1.5 \times 10^7$ 、 $3.2 \times 10^{11}$  pfu/mL。

### 2.2 噬菌体抗体库的筛选中特异性噬菌体抗体的富集

通过雄鼠脾细胞对噬菌体抗体库进行 3 轮亲和富集及 2 轮雌鼠脾细胞吸附,检测每一轮筛选前后噬菌体的滴度并计算回收率,以评价噬菌体抗体的富集情况。从表 1 看出(1)随着雄鼠脾细胞浓度不断降低,每一轮亲和筛选的噬菌体的回收率却逐步升高,表明每一轮筛选后的特异性噬菌体在不断地富集(2)在雌鼠脾细胞数量不变的情况下,每一轮吸附后的噬菌体的回收率逐渐下降,说明非特异性的噬菌体在不断减少。结果表明噬菌体抗体亲和力及特异性逐渐得到提高。

表 1 噬菌体抗体库亲和富集及吸附的结果

Table 1 Phage input and output for all libraries during panning

| Rounds of panning | Phage input (pfu/mL) | Phage eluted (pfu/mL) | Yield %              |
|-------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 1                 | $3.2 \times 10^{11}$ | $1.7 \times 10^6$     | $5.3 \times 10^{-6}$ |
| 2                 | $4.4 \times 10^{11}$ | $1.3 \times 10^6$     | $3.3 \times 10^{-6}$ |
| 3                 | $9.0 \times 10^{11}$ | $1.5 \times 10^7$     | $2.3 \times 10^{-5}$ |
| 4                 | $6.4 \times 10^{11}$ | $3.5 \times 10^5$     | $5.5 \times 10^{-7}$ |
| 5                 | $1.2 \times 10^{12}$ | $2.1 \times 10^8$     | $1.8 \times 10^{-4}$ |

### 2.3 噬菌体抗体库的鉴定

2.3.1 鉴定含 Fab 基因的克隆:酶切产物在 0.8% 琼脂糖凝胶中以电压 5V/cm 电泳 50min 后,观察电泳结果。在 5 个菌落中有 3 个其中释放出 3kb + 2.3kb 条带,说明轻链和重链片段均有插入(图 1)。由此计算 Fab 基因的重组率约为 60%。库容量 = 转化率 × 转化 DNA 量 × 抗体库重组率 =  $4.3 \times 10^6$  cfu/ $\mu\text{g} \times 2 \mu\text{g} \times 60\% = 5.2 \times 10^6$ 。

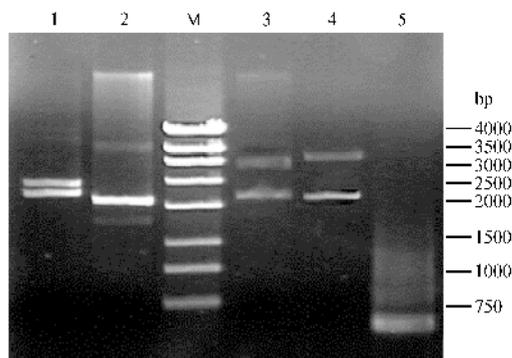


图 1 抗体组合文库重组噬粒的 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定结果

Fig. 1 Analysis of recombination rate of the phage antibody library clones are named 1 ~ 5

M: DNA marker, Lane 2, 3, 4 3kb + 2.3kb identified by *Xba* I and *Xho*

I contain the positive fragment.

**2.3.2 噬菌体抗体库的特异性的鉴定** :从第 5 次筛选后的噬菌体抗体库感染的 XL1-Blue 培养菌落中随机挑取 15 个菌落 ,以雄鼠脾细胞作为抗原、雌鼠脾细胞作为阴性细胞 ELISA 检测其能否产生抗 H-Y 抗原的噬菌体抗体。结果显示时 ,有 9 个菌落( A3 , A4 ,A5 ,A6 ,A7 , ,A8 ,E5 ,E6 ,E7 )产生的噬菌体抗体 OD 值大于阴性对照 OD 值 2.1 倍以上(图 2) ,噬菌体抗体与雄鼠脾细胞的结合活性明显高于雌鼠脾细胞( 阴性细胞 ) ,阳性率约为 60%。说明这些噬菌体抗体具有与 H-Y 抗原特异性结合的活性 ,但噬菌体抗体的 OD 值低于 6 号免疫雌鼠 H-Y 抗血清。

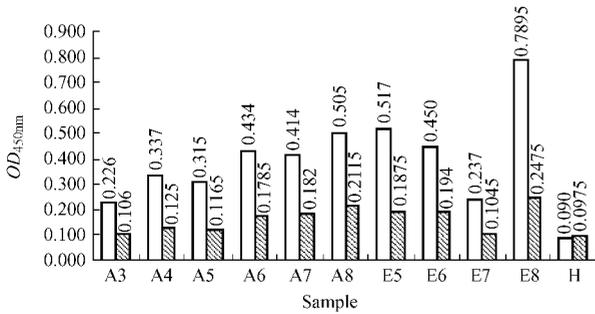


图 2 ELISA 检测抗 H-Y 噬菌体抗体结果

Fig. 2 ELISA of the last output Fab phage

□ male splenocytes ; ▨ female splenocytes. Note : VCSM13 as negative control( H ) , H-Y antiserum of 6 # mouse( E8 ) .

**2.4 基因同源性分析**

通过 Internet 在 GenBank 数据库及 IMGT 信息系统和 Ig BLAST 分析程序对测得的可变区基因序列进行同源性分析 ,分析结果显示筛选到的 E5 克隆重链可变区基因核苷酸序列大小为 354bp ,编码由 115 个氨基酸残基组成的多肽 ;轻链 κ 基因核苷酸

序列大小为 342bp ,编码由 111 个氨基酸残基组成的多肽。Fd 链可变区的核苷酸序列与登录号为 X02065 的鼠免疫球蛋白 H 链可变区的同源性为 69%( 图 3 ) ,轻链核苷酸可变区序列与鼠免疫球蛋白 κ 链可变区同源性为 88% ~ 96%( 图 4 )。将重、轻链可变区序列进入 VBASE 抗体胚系基因数据库分析 ,结果表明重链可变区序列属于 V<sub>H1</sub> 基因家族 ,而轻链可变区序列属于 V<sub>κ</sub>IV 基因家族 ,IMGT 信息系统分析结果显示具有免疫球蛋白轻链和重链可变区的结构( 图 5 )。

**3 讨论**

我们通过雄鼠脾细胞对噬菌体抗体库进行 3 轮亲和和富集及 2 轮雌鼠脾细胞吸附 ,使具有抗原结合活性的噬菌体抗体逐渐富集 ,为最终筛选出特异性的高亲和力抗 H-Y 抗原噬菌体抗体创造了条件。利用雄鼠脾细胞可进行雄性特异性筛选 ,而雌鼠脾细胞( 阴性细胞 )可完成非特异性清除 ,通过雄、雌鼠脾细胞对抗体库的交替筛选 ,最终获得抗雄性特异性抗原的噬菌体抗体。但在抗雄性特异性抗原的噬菌体抗体库筛选实验过程中 ,出现过挑选克隆的 ELISA 检测无任何阳性结果或阳性反应较弱。可能因为抗原浓度不准确 ,抗原浓度过高可能会筛选到特异性较低的克隆 ,抗原浓度应在实验中利用 ELISA 检测继续优化。以细胞抗原来筛选噬菌体抗体库时 ,由于细胞表面抗原较复杂、细胞膜蛋白的表型变化难判断、细胞膜蛋白暴露程度不同和细胞密度差异等因素的影响 ,所获得的数据通常较弱。也可能因为噬菌体表面的抗体表达量较低 ,可通过用

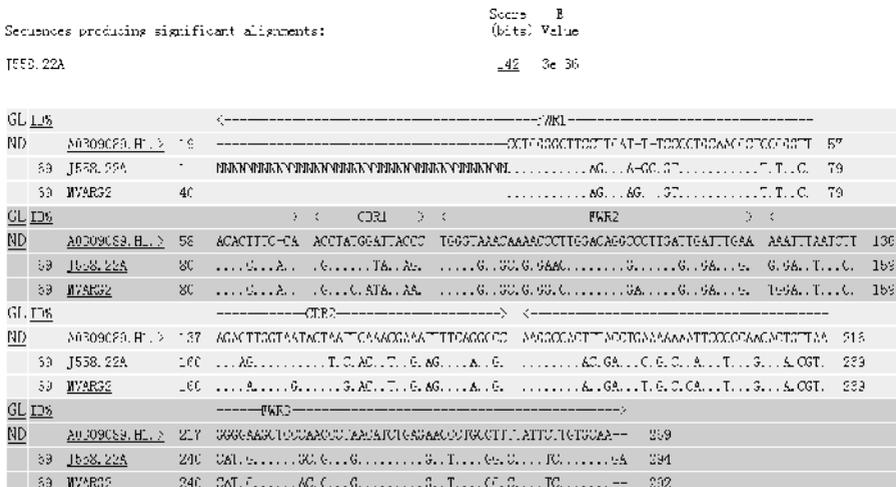


图 3 阳性克隆 E5 Fab 抗体重链可变区基因序列同源性分析

Fig.3 Comparison of clone E5 V<sub>H</sub> with Ig BLAST

```

>gi|4097823|gb|U69608.1|MMU69608 Mus musculus variable Ig light chain mRNA,
partial cds Length=339
Score = 462 bits (233), Expect = 2e-127
Identities = 263/273 (96%), Gaps = 0/273 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  42  TGC AAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTATCAATCAAAGAACTACTTGGCCTGGTAC 101
      |||
Sbjct  67  TGC AAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAGAACTACTTGGCCTGGTAC 126

Query  102 CAGCAAAAACCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCCTAGGGAATCT 161
      |||
Sbjct  127 CAGCAGAAAACCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCT 186

Query  162 GGGTCCCTGATCGCTTCACAGGTTTGGGATCTGGAACAGATTPCACTCTCACCATCAAC 221
      |||
Sbjct  187 GGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCTGGGATCTGGGACAGATTPCACTCTCACCATCAGC 246

Query  222 ATTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCATTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTATCCGCTC 281
      |||
Sbjct  247 AGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTATCCGCTC 306

Query  282 ACGTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA 314
      |||
Sbjct  307 ACGTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA 339
    
```

图 4 阳性克隆 E5 Fab 抗体轻链可变区基因序列同源性分析

Fig.4 Comparison of cloned E5 V<sub>κ</sub> with GenBank database

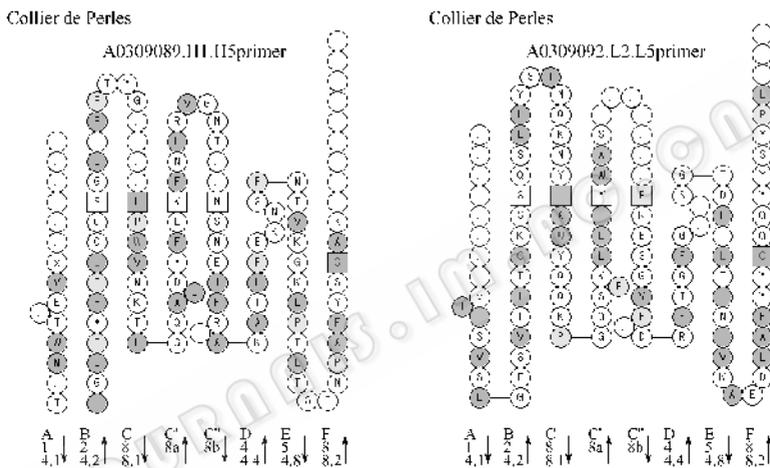


图 5 阳性克隆 E5 Fab 抗体重链(左)和轻链(右)可变区基因结构模拟

Fig.5 Structure prediction of E5 V<sub>H</sub> and V<sub>κ</sub>

PEG 浓缩噬菌体来解决,而 H-Y 抗原是一种弱抗原的特性也是阳性反应较弱现象的重要原因。鉴定含 Fab 基因的克隆重组率约为 60%,比先前抗体组合文库重组噬粒的重组率 80% 低,原因可能是噬菌体经过多代繁殖后,噬质粒中插入的抗体基因出现丢失现象。

将经过筛选获得的鼠源性抗雄性特异性抗原的噬菌体抗体进行 ELISA 初步分析,结果表明 9 个克隆的噬菌体抗体与雄鼠脾细胞的结合活性明显高于雌鼠脾细胞,说明该抗雄性特异性抗原噬菌体抗体库具有雄性特异性,但 ELISA 测定的 OD 值与 H-Y 抗血清测定值尚存在一定的差别,其原因可能为: H-Y 抗原是细胞膜抗原,可能具有多个抗原决定簇,ELISA 检测所使用的是噬菌体抗体,其实是抗雄性特异性抗原的多克隆抗体,在 3 轮亲和富集筛选及 2 轮吸附后,会导致克隆间的富集程度不同,优势克隆富集比例高于非优势克隆,因此测定值与 H-Y

抗血清测定值不能完全一致。经过筛选后,我们得到了与 H-Y 抗原结合较好的 9 株克隆,我们发现所获噬菌体抗体的中和活性较预想要低,而如何提高所获抗体的中和活性将会成为今后的一个研究方向。由于抗体的结合能力主要决定于 CDR 区,尤其是 CDR3 区的基因序列和其产生的三维结构折叠。在已获得鼠源性抗雄性特异性抗原的噬菌体抗体基础上,可以从基因突变、筛选和改造获得的特异性抗体基因等方面,在体外对抗体基因的亲和力进行提高。目前,有多种方法可完成抗体亲和力的提高<sup>[16,17]</sup>,如 CDR 位移(CDR Walking)突变提高抗体亲和力,还可通过链置换法,它是利用已筛选到的噬菌体抗体,用轻链或重链抗体库中的基因对该抗体中相应的轻链或重链基因进行替代,建立一个全新的带有突变基因的抗体库,然后用特异性抗原进行筛选表达,可以获得更高亲和力的抗体。在此基础上,还可以通过点突变来提高抗体亲和力,但是上述方

法建库的工作量很大。

在 GenBank 的非冗余数据库进行 BLAST 序列分析发现,轻链可变区基因序列能够在 GenBank 的非冗余数据库中找到同源性较高的序列,而重链可变区基因找不到同源性较高的序列。E5 的轻链可变区基因与登录号为 U69608( *Mus musculus* variable Ig light chain mRNA, partial cds )基因同源性最高,可达 96%。另外它与登录号为 AF421864( 抗血型糖蛋白 A 抗体的轻链可变区基因 ),AJ416412( 抗分枝杆菌多聚糖蛋白抗体的轻链可变区基因 ),L14553( 抗肿瘤相关的糖蛋白-72 抗体的轻链可变区基因 ),M95574( 抗肿瘤 CC49 抗体的轻链可变区基因 ),S74723( 抗铁传递蛋白抗体的轻链可变区基因 )等同源性较高,对应的抗体多属于 IgG 和 IgM 类,并且有些抗原是糖蛋白类,这些与 H-Y 抗体和抗原的已有报道相一致。重链可变区基因经 IMGT 和 Ig BLAST 分析发现与登录号为 X02065( 抗肝炎 B 病毒表面抗原的重链可变区基因 ),基因同源性达 69%,该重链可变区基因属于 V<sub>NP</sub> 基因家族。与登录号为 J00507 ( Mouse Ig germLine H-chain V-region VH105, subgroup V<sub>H</sub> II ),K02153( 抗脾酸盐[酯]的重链可变区基因 ),M34987( A/J J558 家族的重链可变区基因 ),X05746 ( 抗 ARS-血蓝蛋白抗体的重链可变区基因 )也有同源性,Score 值都在 300 以上。同时发现重、轻链可变区基因 CDR3 区的碱基变化显著,与现有序列相比同源性较低。

我们将对这些克隆进一步分析,并通过改进筛选策略,以获得更为理想的鼠源性抗雄性特异性抗原的噬菌体抗体。这些研究工作为挑选出高亲和力、高特异性的抗雄性特异性抗原 mAb 和在原核细胞表达可溶性 Fab 分子奠定了实验基础。抗雄性特异性抗原的噬菌体抗体库建立和筛选将推进 H-Y 抗原的研究进程,也将为性别控制研究提供一种新的途径,并将带来良好的社会及经济效益。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Muller U, H-Y antigens. *Hum Genet*, 1996, **97**: 701 - 704
- [ 2 ] Wolf U. The serologically detected H-Y antigen revisited. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, **80**( 1 - 4 ): 232 - 235
- [ 3 ] Eichwald EJ, Silmsen CR. Untitled communication. *Transplant Bull*, 1955, **2**: 148 - 149
- [ 4 ] Williams B, Atkins A, Zhang DH *et al.* Cell-based selection of internalizing fully human antagonistic antibodies directed against FLT3 for suppression of leukemia cell growth. *Leukemia*, 2005, **19**( 8 ): 1432 - 1438
- [ 5 ] Piazza T, Cha E, Bongarzone I *et al.* Internalization and recycling of ALCAM/CD166 detected by a fully human single-chain recombinant antibody. *J Cell Sci*, 2005, **118**( Pt 7 ): 1515 - 1525
- [ 6 ] Geuijen CA, Bij LN, Smit RC *et al.* A proteomic approach to tumour phage display, affinity purification and mass spectrometry. *Eur J Cancer*, 2005, **41**( 1 ): 178 - 187
- [ 7 ] Li Y, Moysse R, Molloy PE *et al.* Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**( 3 ): 349 - 354
- [ 8 ] Ridgway JB, Ng E, Kern JA *et al.* Identification of a human anti-CD55 single-chain Fv by subtractive panning of a phage library using tumor and nontumor cell lines. *Cancer Res*, 1999, **59**( 11 ): 2718 - 2723
- [ 9 ] Kupsch JM, Tidman NH, Kang NV *et al.* Isolation of human tumor-specific antibodies by selection of an antibody phage library on melanoma cells. *Clin Cancer Res*, 1999, **5**( 4 ): 925 - 931
- [ 10 ] Lev A, Denkberg G, Cohen CJ *et al.* Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the widely expressed tumor T-cell epitopes of the telomerase catalytic subunit. *Cancer Res*, 2002, **62**( 11 ): 3184 - 3194
- [ 11 ] Siegel RW, Coleman JR, Miller KD *et al.* High efficiency recovery and epitope-specific sorting of an scFv yeast display library. *J Immunol Methods*, 2004, **286**( 1 - 2 ): 141 - 153
- [ 12 ] Palmer DB, Crompton T, Marandi MB *et al.* Intrathymic function of the human cortical epithelial cell surface antigen gp200-MR6: single-chain antibodies to evolutionarily conserved determinants disrupt mouse thymus development. *Immunology*, 1999, **96**( 2 ): 236 - 245
- [ 13 ] Pereira S, Maruyama H, Siegel D *et al.* model system for detection and isolation of a tumor cell surface antigen using antibody phage display. *J Immunol Methods*, 1997, **203**( 1 ): 11 - 24
- [ 14 ] McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A *et al.* Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**( 4 ): 1041 - 1046
- [ 15 ] Valadon P, Garnett JD, Testa JE *et al.* Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**( 2 ): 407 - 412
- [ 16 ] Willats WG. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol Biol*, 2002, **50**( 6 ): 837 - 854
- [ 17 ] Hoogenboom HR, de Bruine AP, Hufton SE *et al.* Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*, 1998, **4**