

半合成抗体库的构建及抗 Tie2 Fab 抗体的筛选*

廖振林¹ 侯利华¹ 李建民¹ 陈薇¹ 童贻刚^{1* * *}

(军事医学科学院流行病学与微生物学研究所 北京 100071)¹

(西北农林大学 杨凌 712100)² (佳木斯大学医学院 佳木斯 154007)³

摘要: 构建一个半合成抗体库, 不经免疫制备人源抗 Tie2 Fab 抗体。通过 RT-PCR 方法, 从人脐带血淋巴细胞总 RNA 扩增轻链基因及重链 VH 段基因, 将轻链基因插入 pCOMb3 载体中, 得人轻链质粒库; 从 HBsAb 的 Fd 段基因制备含有不同长度随机化 CDR3 的 FR3-CDR3-J-CH1 片段, 然后将 VH 段基因与随机化的 CDR3 融合, 得到 Fd 基因片段, 再将其插入轻链质粒库中, 得半合成 Fab 质粒库。通过多次建库, 获得总容量为 2×10^7 的半合成抗体库。其 Fd 段和轻链基因的重组率为 50%。经 3 轮淘洗, 从噬菌体抗体库中筛选到与 Tie2 抗原特异结合的噬菌体克隆。测序确定抗体基因序列。

关键词: 噬菌体抗体库, Tie2, Fab

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 06-0037-05

Construction of a Semi-synthetic Antibody Library and Screening Anti-Tie2 Fab Antibody*

LIAO Zhen-Lin¹ HOU Li-Hua¹ LI Jian-Min¹ CHEN Wei¹ TONG Yi-Gang^{1* * *}

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100071)¹

(Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100)²

(Medical College of Jiamusi University Jiamusi 154007)³

Abstract: A semi-synthetic antibody library was constructed, from which anti-Tie2 Fab antibodies were screened. Human immunoglobulin light chain genes and a part of heavy chain variable region genes were amplified by RT-PCR from fetus umbilical cord blood, light chain genes were cloned into pComb3 vector to generate light chain library; FR3-CDR3-J-CH1 segments were amplified from HBsAb's Fd fragment, then VH and synthetic random CDR3 of different length were overlapped by PCR, and inserted into light chain library to form a semi-synthetic phage antibody library. An antibody library containing 2×10^7 cfu was obtained. With more than 50% containing Fd and light chain genes, specific Fab could be selected after three rounds of panning. Then the positive clones were sequenced.

Key words: Phage display, Tie2, Fab

噬菌体抗体库技术使单克隆抗体的制备可以在体外模拟抗体的生成, 达到不经免疫制备抗体的目的^[1,2], 对于制备人源抗自身受体抗体具有特殊意义。本实验从胎儿脐带血中分离总 RNA, 扩增出人抗体的轻链基因, 部分重链基因, 并将重链 CDR3 随机化, 构建好未经免疫的半合成噬菌体抗体库^[3]。然后从该库中筛选出抗血管生成素受体 Tie2^[4] 抗体。

* 北京市自然科学基金资助项目 (No.5022012)

作者还有: 王臣² 王慧春³ 安小平¹

* * 联系人 Tel: 010-66948563, E-mail: tongyg@interchange.ubc.ca

收稿日期: 2004-01-19, 修回日期 2004-06-10

1 材料与方法

1.1 实验材料

噬菌体抗体表达载体 pCOMb3, 大肠杆菌 XL-1, 辅助噬菌体 VCSM13 为本室保存。人源化抗乙型肝炎表面抗原抗体 (HBsAb) 真核表达质粒为本室童贻刚博士构建。人 Tie2 购自 R&DSYSTEMS 公司。常规分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司。脐带血取自解放军 301 医院、协和医院、复兴医院妇产科。

1.2 引物设计

1.2.1 重链引物设计: 主要参考王 琰^[3] 等的设计 (表 1)。H135、H2 及 H4 为根据 VH 不同亚群设计的 VH5' 端引物, FR3 为扩增 VH 段所需的 3' 端引物, 位于 VH 的第 3 骨架区, CDR3~5、CDR3~8、CDR3~10 和 CDR3~12 为引入随机化 CDR3 的引物, 分别编码不同长度随机化 CDR3, 其 5' 端 26 个碱基与 FR3 互补, 以进行重叠 PCR。VH5 和 HG3 为扩增 Fd 段的 5' 端和 3' 端引物, 下划线处分别为 *Xho*I 和 *Spe*I 酶切位点。所有引物均为上海生工公司合成。

表 1 用于构建半合成抗体库的重链引物

H135	CAGGTGCAGCTGGTGSAGTCTGG
H2	CAGCTCAACTTCAAGGAGTCTGG
H4	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGC
FR3	CTYGCACAGTAATACAYRGGCGTGTG
CDR3-5	GACACGGCYRTGTATTACTGTGCRAGA (NNK) 5WTSGACGCTCTGGGGCCAA
CDR3-8	GACACGGCYRTGTATTACTGTGCRAGA (NNK) 8WTSGACGCTCTGGGGCCAA
CDR3-10	GACACGGCYRTGTATTACTGTGCRAGA (NNK) 10WTSGACGCTCTGGGGCCAA
CDR3-12	GACACGGCYRTGTATTACTGTGCRAGA (NNK) 12WTSGACGCTCTGGGGCCAA
VH5	CAGGTGCAGCT <u>CGAGS</u> AGTCTGG
HG3	CCATGTA <u>CTAGT</u> TTTGTCAACA

1.2.2 轻链引物设计: 主要根据 Kang^[5] 等的设计 (表 2), 下划线处为 *Sac*I 和 *Xba*I 酶切位点。

表 2 用于构建半合成抗体库的轻链引物

CK1z	5' CCCCTCTAGAACTAACACTCTCCCTCTTGAAGCTCTTTGTCAGCGGCCATCTCA 3'
VK1a	5' GACATCGAGCTCACCAGTCTCCA 3'
VK2a	5' GAAATTGAGCTCACCAGTCTCCA 3'
VK3a	5' GAT AITGAGCTCACTCAGTCTCCA 3'
CLz	5' CGCCGCTAGAACTATGAACATTCTGTAGG 3'
VL1	5' AATTTGAGCTCACTCAGCCCCAC 3'
VL2	5' TCTGCCGAGCTCCAGCCCTGCCCTCCGTG 3'
VL3	5' TCTCTGGAGCTCCAGCCGCCCTCAGTG 3'
VL4	5' TCTGAAGAGCTCCAGGACCCCTGTGTGTCTGTG 3'
VL5	5' CAGTCTGAGCTCACGACCCGCC 3'
VL6	5' CAGACTGAGCTCACTCAGGAGCCC 3'

1.3 胎儿脐带血中分离总 RNA

取 100 mL 脐带血, 用 Ficoll-Paque Plus 分离淋巴细胞; 然后用 Trizol 提取淋巴细胞总 RNA。用 AMV 反转录酶制备 cDNA。以上操作均按操作手册进行。

1.4 半合成抗体库的构建

1.4.1 轻链扩增及轻链质粒库的构建:按文献[6]方法扩增轻链基因,将轻链基因经 *SacI* 和 *XbaI* 消化与相应酶切的载体 pComb3 连接,电穿孔转化 XL1-Blue 菌株,扩增培养转化的细菌,提取质粒,即为轻链质粒库。

1.4.2 重链 VH 基因扩增:分别以不同亚群 VH5 端引物 (VH135、VH2、VH4) 配以 FR3,常规 PCR 扩增 VH 基因段。以抗 HBSAb Fd 段基因为模板,分别以不同长度随机化 CDR3 引物配以 HC3,常规 PCR 扩增 FR3-CDR3-J-CH1 基因段。将上述得到的 VH 段和 FR3-CDR3-J-CH1 段分组配对通过重叠 PCR 拼接成 Fd 段基因库。

1.4.3 重叠 PCR:将纯化的 VH 段、FR3-CDR3-J-CH1 段,先循环扩增 10 圈,使之通过 FR3 部位的互补序列互为引物和模板产生完整 Fd 段基因,再补加引物 VH5 和 HC3,继续反应 25 圈,扩增出 Fd 段。

1.4.4 半合成噬菌体 Fab 抗体库的构建:将扩增的 Fd 段经电泳分离纯化后用 *XhoI* + *SpeI* 酶解,同时轻链质粒库亦用相同内切酶水解,连接,电转化穿孔,加入 SB 培养基和辅助噬菌体 VCSM13,用 PEG-NaCl 沉淀回收噬菌体^[6],即为半合成噬菌体 Fab 抗体库。

1.5 抗体库的筛选

用 100 μL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Tie2 抗原包被抗原板,经 3% BSA 封闭后加入 100 μL 噬菌体抗体库液,室温孵育 2 h 后以 0.05% Tween20-PBS 洗涤数次(第 1 轮 1 次,第 2 轮洗 5 次,第 3 轮洗 10 次,每次 5 min)。结合的噬菌体用 100 μL 0.1 mol/L Glycine-HCl (pH 为 2.2,并含有 0.1% 的 BSA) 洗脱下来,立即用 6 μL 2 mol/L Tris 中和,然后感染 2 mL XL1-Blue ($A_{600} = 1.0$),根据文献[6]的方法进行了 3 轮“吸附—洗脱—扩增”。

1.6 夹心 ELISA 鉴定特异性噬菌体抗体

将第 3 轮淘洗后洗脱的噬菌体,感染 XL1-Blue 后涂板,随机挑取菌落,接种至 2 mL SB 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 A_{600} 为 0.6~0.8,加入 20 μL 辅助噬菌体 VCSM13 (10^{12} pfu),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。12,000 $\times g$ 离心 10 min,取上清液 100 μL 加入包被有 Tie2 抗原 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的酶联板孔中,温育 2 h,洗板,加入 HRP-抗 M13 噬菌体抗体,温育 1 h,洗板,TMD 显色,VCSM13 做阴性对照。

1.7 噬菌体抗体的特异性鉴定-交叉反应

用鉴定出的阳性克隆对不同抗原进行交叉结合活性鉴定,这些抗原有:BSA,丙型肝炎病毒 NS5 抗原,将这两种抗原包被酶联板,3% 脱脂奶粉封闭后,加入噬菌体抗体,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBST 洗板 3 次,加入 HRP-抗 M13 噬菌体抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗板 3 次,加 TMD 底物液,显色 5 min。在酶标仪上测定 A_{490} 读数

1.8 DNA 序列测定

筛选出来的抗 Tie2 单克隆抗体株,提质粒后,酶切鉴定,送军事医学科学院生物工程研究所测序。

2 结果

2.1 半合成抗体库的构建

Fd 基因拼接完成后取纯化 PCR 产物,与 pMD18-T 载体连接,按 CDR3 长度不同,随机挑取 5 个克隆送军事医学科学院生物工程研究所测序,发现 5 个克隆的 CDR3 随机化序列符合最初的 NNK 设计。

将经过鉴定的 Fd 基因库与轻链基因库组合构建噬菌体抗体库,共构建了 8 个抗体

库,总库容为 2×10^7 。轻链基因和 Fd 段基因的重组率均在 50% 以上。

2.2 半合成抗体库的筛选

将 Tie2 抗原过夜包被在酶连板中,对所得总库进行了 3 轮淘筛。每轮洗脱噬菌体铺平板计数,分别是: 2.8×10^4 , 2.9×10^5 , 2.6×10^6 。经过 3 轮的吸附、洗脱、扩增的筛选, Tie2 抗原对噬菌体抗体进行了特异性富集。从表 3 可以看出在 3 轮淘洗的过程中,噬菌体确实出现了特异性的富集,第 3 轮淘洗比第 1 轮的高出近 40 倍。[产率% = (洗脱噬菌体数 \times 100) / (投入噬菌体数)]

表 3 噬菌体抗体库的富集

淘洗次数 (pfu)	投入数量 (pfu)	洗脱数量	产率
1	1.5×10^{12}	2.8×10^4	1.9×10^{-6}
2	1.3×10^{12}	2.9×10^5	2.2×10^{-5}
3	3.9×10^{12}	2.6×10^6	0.7×10^{-4}

2.3 噬菌体抗体的鉴定

第 3 轮淘筛后,随机挑取 60 个克隆,制备单克隆噬菌体抗体,用间接 ELISA 法检测对 Tie2 抗原的结合活性。 A_{490} 值超过 0.8 的有 10 个(见表 4)。

2.4 和其他抗原的交叉反应性

将噬菌体抗体滴度较高的 10 个克隆同其他两种不同的抗原(HCV NS5 蛋白, BSA)进行 ELISA 交叉反应,排除交叉反应抗体,剩余的抗体是特异性针对 Tie2 抗原的。

表 4 筛选所得抗体克隆和其他抗原的交叉反应性

	12	15	51	S1	S2	S3	S4	S8	S9	S12	Negative
NS5	0.101	0.123	0.099	0.144	0.158	0.145	0.142	0.155	0.132	0.146	0.075
BSA	0.483	0.134	0.104	0.138	0.193	0.115	0.144	0.157	0.144	0.106	0.093
Tie2	1.04	1.32	0.835	0.979	1.108	0.808	1.025	0.891	1.132	1.651	0.268

2.5 克隆测序

克隆 S12 测序结果与抗体胚系基因数据库(V-BASE)比较,表明该抗体基因重链属于 VH4 基因家族,与胚系基因 DP-66 同源性最高;D、J 分别是 D7-27 和 JH3a;轻链属于 Vk1 家族,来自胚系基因 DPk3, J 段属于 Jk2。在重链的 CDR3 区,符合最初的(NNK)8 的随机化设计,在 CDR3 前面共有人工加入的 8 个氨基酸,后面 3 个氨基酸是基本固定的。从序列的翻译结果来看,在重链的免疫球蛋白标准位置 22、96 位,在轻

1	ATG	GCC	GAG	CTC	ACC	CAG	TCT	CCA	TCC	TCC	CTG	TCT	GCA	TCT	GTA
	M	A	E	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V
46	GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	<u>CGG</u>	<u>GCG</u>	<u>AGT</u>	<u>CAG</u>	<u>GGC</u>	<u>ATT</u>	<u>AGC</u>
	G	D	R	V	T	I	T	C	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>I</u>	<u>S</u>
91	<u>AAI</u>	<u>TCT</u>	<u>TIA</u>	<u>GCC</u>	TGG	TAT	CAG	CAG	AAA	CCA	GGG	AAA	GCC	CCT	AAG
	<u>N</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K
136	CTC	CTG	CTC	TAT	<u>GCT</u>	<u>GCA</u>	<u>TCC</u>	<u>AGA</u>	<u>TTG</u>	<u>GAA</u>	<u>AGT</u>	GGG	GTC	CCA	TCC
	L	L	L	Y	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	G	V	P	S
181	AGG	TTC	AGT	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACG	GAT	TAC	ACT	CTC	ACC	ATC
	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	Y	T	L	T	I
226	AGC	AGC	CTG	CAG	CCT	GAA	GAT	TTT	GCA	ACT	TAT	TAC	TGT	<u>CAA</u>	<u>CAG</u>
	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	<u>Q</u>	<u>Q</u>
271	<u>TAT</u>	<u>TAT</u>	<u>AGT</u>	<u>ACC</u>	<u>CCG</u>	<u>TAC</u>	<u>ACT</u>	TTT	GGC	CAG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAG
	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>P</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	F	G	Q	G	T	K	L	E

VH4

1	GTG	AAA	CTG	CTC	GAG	CAG	TCT	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG
1	V	K	L	L	E	Q	S	G	P	G	L	V	K	P	S
46	GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCC	GGT	GGC	TCC	GTC	AGC
16	E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	V	S
91	<u>AGT</u>	<u>GGT</u>	<u>AGT</u>	<u>TAC</u>	<u>TAC</u>	<u>TGG</u>	<u>AGC</u>	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG
31	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>W</u>	<u>S</u>	W	I	R	Q	P	P	G	K
136	GGA	CTG	GAG	TGG	ATT	GGG	<u>JAT</u>	<u>ATC</u>	<u>TAT</u>	<u>TAC</u>	<u>AGT</u>	<u>GGG</u>	<u>AGC</u>	<u>ACC</u>	<u>AAC</u>
46	G	L	E	W	I	G	<u>Y</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>Y</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>T</u>	<u>N</u>
181	TAC	AAC	CCC	TCC	<u>CTC</u>	<u>AAG</u>	<u>AGT</u>	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	GTA	GAC	ACG
61	<u>Y</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>K</u>	<u>S</u>	R	V	T	I	S	V	D	T
226	TCC	AAG	AAC	CAG	TTC	TCC	CTG	AAG	CTG	AGC	TCT	GTG	ACC	GCT	GCG
76	S	K	N	Q	F	S	L	K	L	S	S	V	T	A	A
271	GAC	ACG	GCT	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	CCG	GCT	GGT	GTT	TGT	GAG
91	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	<u>P</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>V</u>	<u>C</u>	<u>E</u>
316	TAT	GCG	ATC	GAC	GTC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACT	CTC	ACA	GTC	TCC
106	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>D</u>	<u>V</u>	W	G	Q	G	T	T	L	T	V	S

图1 抗Tie2人源Fab的轻重链可变区DNA及氨基酸序列

链的23、89位各有能形成第一对链内二硫键的两个半胱氨酸(图1)。另外一个克隆测序结果与抗体胚系基因数据库(V-BASE)比较,重链属于VH1家族,与胚系基因DP-23同源性最高,D、J分别是DP-26和JH4d,CDR3区,符合最初的(NNK)12随机化设计;轻链属于VL2家族,来自胚系基因DPL11,J段属于JL2/JL3a。另外两个克隆测序发展D基因缺失。

3 讨论

Tie/2Ang1系统是肿瘤血管发生与形成的重要受体/配体系统,如果能用Tie2抗体阻止该系统的信号传导途径,那么肿瘤治疗又多了一个可以选择的方案^[7]。但不从人源抗体库中筛选,直接获得抗Tie2人源单克隆抗体是很困难的。噬菌体抗体库展示技术的发展为不经免疫直接制备抗体成为可能;利用半合成抗体库直接获得人源抗体,是噬菌体展示技术中的最主要方法。我们在本研究中从半合成抗体库中成功筛选出抗Tie2人源抗体Fab抗体,说明这一方法是可行的。但所得的Tie2抗体是否能在体内抑制Ang1配体的结合,还需进一步的试验。半合成抗体库的库容是一个重要参数,用组合感染法可以达到 10^{10} ,用常规的电穿孔法很难达到。我们的库容通过多次建库为 2×10^7 。在所建库中筛到的有些克隆VH基因不全,这和王琰^[3]的结论有相似的地方,在CDR3随机化的过程中,由于引物合成和重叠PCR的错误,会产生一些不完整的基因。

参考文献

- [1] Winter G, Griffith A D, Hawkins R E, *et al.* *Annu Rev Immunol*, 1994, **12**: 433~437.
- [2] Barbas C F, Bain J D, Hoekstra D M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 4457~4461
- [3] 王琰, 化冰, 刘群英, 等 *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, **19** (3): 238~241.
- [4] Fiedler U, Krissl T, Koidl S, *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278** (3): 1721~1727.
- [5] Kang, A S, Burton, D R, Lerner R A, *et al.* *Companion to Method in Enzymology*, 1991, **147**: 933~941.
- [6] Du G X, Yu C M, Wang H T, *et al.* *US Chinese J of Microbio and Immunol*, 2002, (2): 31~35.
- [7] Lin P, Buxton J A, Acheson A, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (15): 8828~8834.