

亲和层析法用于噬菌体抗体库的筛选

陈瑛炜, 罗文新, 王明桥, 王晋, 李利峰, 袁权, 张军, 夏宁邵

(福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 本研究报道一种基于固定化金属亲和层析(IMAC)的噬菌体抗体库液相筛选方法。将纯化的带有 His 标签的抗原与噬菌体抗体库混合, 噬菌体抗体与抗原充分结合后再加入亲和介质, 使噬菌体抗体抗原复合物通过 His 标签与介质结合, 然后通过充分洗涤去除非特异性噬菌体抗体, 最后将特异性噬菌体抗体洗脱下来, 感染 TG1, 进行下一轮筛选。整个筛选过程中抗原与抗体的结合在液相中完成, 不仅消除了固相介质对抗原表位的影响, 也更有利于噬菌体抗体与抗原的充分作用。将此方法应用于 HEV NE2 蛋白特异性人源噬菌体抗体的筛选, 抗原竞争 ELISA, 阳性血清阻断, 可溶性单链抗体表达检测及测序结果表明, 最终获得 2 个特异性人源抗体。

关键词: 噬菌体抗体库; 固定化金属亲和层析; 液相筛选

中图分类号: R373; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2006)01-0044-06

噬菌体抗体库技术已经成为目前获得人源抗体的主要途径之一。从大容量天然人源噬菌体抗体库中, 理论上可以获得针对任何抗原的人源单抗。噬菌体抗体库筛选方法包括纯抗原筛选, 非纯抗原筛选, 功能性筛选, 选择性感染筛选等^[1]。非纯抗原筛选包括细胞表面筛选^[2], 组织筛选^[3], 动物活体内筛选^[4]等。此外还有运用抗原与抗体结合后所引发的生物学效应来进行筛选, 如抗体酶的筛选^[5], 以及流式细胞分选(FACS)、磁珠分选(MACS)系统进行筛选^[6]等, 一般经过 2~4 轮, 可以获得针对目标抗原的抗体。

作为比较经典的筛选方法, 纯抗原筛选包括以下两种方式: 一种是将抗原包被在固相介质表面, 如酶标板^[7], 免疫管^[8]、BIAcore 生物传感器芯片^[9]、层析柱^[7,10]等, 然后加入噬菌体抗体库, 通过淘选去除非特异结合的抗体, 最终得到特异性抗体。这种方法较为简单, 但抗原固定后可能会引起天然构象的改变甚至失活, 会导致固相固定的抗原筛选出来的高亲和力抗体与天然抗原结合很弱^[11]。另一种方法是采用化学方法将生物素与抗原偶联, 然后在液相中与噬菌体抗体库反应后, 再用链霉素包被的磁珠或微孔板捕获抗原-噬菌体复合物, 从而获

得与抗原特异结合的噬菌体抗体^[12]。Chames 等^[13]的研究中, 利用该方法经过 4 轮筛选, 从 94 个克隆中鉴定出了 92 个阳性克隆。该方法提供了一个抗原抗体充分作用的液相环境, 但是抗原需经化学方法生物素化的过程, 可能引起结合位点的失活或蛋白构象的改变。

本研究是将固定化金属亲和层析(IMAC)技术引入到噬菌体抗体库的筛选中, 从而将上述两种方法的优点结合在一起, 成为一种改进的液相筛选方式。带有纯化标签的抗原仍保留其天然构象, 因此可在液相中与噬菌体抗体库结合, 然后通过纯化标签与亲和介质的结合而将抗原-噬菌体复合物分离出来, 从而获得抗原特异的抗体。本研究将 6×His 标签与 HEV ORF2 区重组蛋白 NE2^[14]的融合蛋白作为目标抗原, 针对构建的天然人源噬菌体抗体库, 将亲和层析技术应用于噬菌体抗体库的筛选。

材料与方法

1 菌株、质粒及其它材料 质粒 pTG-T7 由本室构建保存^[15], 天然人源噬菌体抗体(scFv)库由本室构建, 库容为 1.2×10^8 , 大肠杆菌 ER2566 株由本室保存, 大肠杆菌 TG1 株、HB2151 株, 辅助噬菌体 M13K07 与质粒 pCANTAB5E 购自 Pharmacia 公司, 鼠单抗 8C11 为本室筛选得到的抗 HEV 中和抗体; MA18/7 单链抗体为抗 HBV 前 S1 区 21~47aa 的特异性抗体, NE2, HIV, HBcAg, HCV 抗原由本室表达纯化, 21~47 肽由西安美联多肽合成公司合成。

2 酶及其它生化试剂 HRP/Anti-M13 酶, HRP/Anti-E Tag 酶购自 Pharmacia 公司, 限制性内切酶、载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司, T4 DNA 连接酶购自华美生

收稿日期: 2005-04-27; 修回日期: 2005-07-12

基金项目: 福建省科技重大项目(编号: 2002F013); 国家十五创新药物博士基金(编号: 2003A A2Z3539); 福建省自然科学基金(编号: C0310005); 厦门市科技计划项目(编号: 3502Z20055002)。

作者简介: 陈瑛炜(1982-), 女, 硕士, 从事基因工程抗体研究。

通讯作者: 罗文新, 副教授, Tel. 86-592-2184113; Fax: 86-592-

2181258; E-mail: wxluo@jingxian.xmu.edu.cn

物工程有限公司, Taq 酶、dNTP 购自上海生工生物工程有限公司, 引物合成以及测序由上海博亚生物技术有限公司完成, BD TALON™ 金属亲和层析介质购自 BD Biosciences 公司。

3 融合蛋白 His-NE2 原核表达载体的构建及融合蛋白的表达纯化 按常规分子生物学方法操作^[16] 构建融合蛋白原核表达载体 pHis-NE2, 质粒转化宿主菌 *E. coli* ER2566, 挑取单个菌落于 3 ml LB(含 Kan 100 mg/L) 培养基中, 于 37℃ 振荡培养过夜, 将菌液转接至 500 ml LB(含 Kan 100 mg/L) 培养基中, 于 37℃ 振荡培养, 当菌液 A₆₀₀ 值达 0.8 左右时, 加入 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导, 在 37℃ 下表达 4h, 离心收集菌体, 超声破碎后再离心分离包涵体沉淀和上清。将沉淀先后用 Buffer I (0.1 mol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-Cl, pH 8.5) 和 20 ml/L Triton 洗涤后溶于 4 mol/L 尿素中, 进一步经过透析复性而获得融合蛋白的纯化产物。表达产物用 Western blot 进行分析。

4 融合蛋白 His-NE2 洗脱条件的测定 将 700 μl 融合蛋白 (0.6 mg/ml) 与 1 ml 介质混合, 室温振荡 1h 后装入柱中, 分别以 300 μl 的 5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、40 mmol/L、60 mmol/L、80 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L 咪唑洗脱, 收集洗脱样品进行 SDS-PAGE 分析。

5 噬菌体抗体库的亲和筛选 取 2 ml 噬菌体抗体库 (2.0~3.5 × 10¹⁰ cfu) 与等体积 MPBS (4% 脱脂奶粉溶于 PBS) 混合, 室温封闭 30 min。抗原 His-NE2 经 PBS 稀释至 0.3 mg/ml, 取 4 ml 抗原稀释液与 4 ml 噬菌体-MPBS 混合物混合, 室温下轻微振荡, 第一轮筛选的抗原抗体结合时间为 2h (第二轮、第三轮依次减少为 1.5h、1h); 再将抗原抗体混合物与亲和层析介质混合, 室温下轻微振荡 1h; 然后将混合物装入柱中, 第一轮筛选以 PBST (0.5% Tween 20) 洗涤 5 次, PBS 洗涤 5 次 (第二轮为 PBST 10 次, PBS 5 次; 第三轮为 PBST 10 次, PBS 10 次), 然后以 1 ml 5 mmol/L 咪唑洗涤 1 次 (第二轮、三轮筛选依次增加为 2 次、3 次), 再取总体积为 2 ml 的 150 mmol/L 咪唑分 3 次洗脱, 收集全部 150 mmol/L 咪唑的洗脱液。取洗脱液感染 TG1 (OD 0.4), 37℃ 振荡培养 1h, 取 10 μl 稀释测定滴度, 其余菌液以 3 000g, 10 min 离心, 收集菌体铺 2 × YT-AG (含 0.1 mg/ml 氨苄青霉素, 2% 葡萄糖) 平皿, 30℃ 培养过夜。刮取平皿上菌落, 转接至 2 × YT-AG 液体培养基, 37℃ 培养至 OD 0.4, 加入辅助噬菌体 M13K07 (1 × 10¹² PFU), 再于 37℃ 培养 1h, 取菌液 3 000g, 10 min 离心, 菌体以 2 × YT-AK (含 0.1 mg/ml 氨苄青霉素, 含 0.1 mg/ml 卡那霉素) 重悬, 25℃ 培养过夜。次日用 PEG8000-NaCl 沉淀噬菌体, 取 10 μl 测定滴度, 并进入下一轮筛选, 总共进行 3 轮。

6 噬菌体抗体 ELISA

6.1 噬菌体抗体间接法 ELISA 挑单克隆于 96 孔培养板, 每孔含 400 μl 2 × YT-AG 培养基, 37℃ 培养 6h; 加入辅助噬菌体 M13K07 (2.5 × 10⁸ PFU), 37℃ 培养 1h; 然后将培养板以 3 000g, 10 min 离心, 弃上清, 每孔加 400 μl 2 × YT-AK 重悬, 25℃ 培养过夜。培养板以 3 000g, 10 min 离心后, 取噬菌体抗体上清与等体积脱脂奶混合, 室温静置 30 min。在 NE2 抗原板 (5 μg/ml), 不相关抗原 (HCV 抗原) 板及封闭液板中各加入 100 μl 混合液, 37℃ 孵育 1h; PBST 洗涤 5 次, 加入

HRP/Anti-M13 抗体 (1:5 000 稀释), 37℃ 孵育 1h; 同上洗涤, 加 HRP 底物显色液显色 15 min, 以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于波长 450/620 测定 A 值。取鼠单抗 8C11 为阳性对照, MA18/7 为阴性对照, 高于阴性读值 3 倍以上视为阳性克隆。每轮扩增的噬菌体抗体库与等体积脱脂奶混合, 室温静置 30 min 后按以上方法检测, 获得噬菌体多克隆 ELISA 结果。

6.2 噬菌体抗体竞争法 ELISA 噬菌体抗体上清与等体积 MPBS 混合, 室温静置 30 min; 同样样品与等体积含 10 μg/ml NE2 抗原的 MPBS 混合, 室温静置 30 min。各取 100 μl 与 NE2 抗原板反应, 其余操作同间接法 ELISA。抗原竞争达到 50% 以上的克隆视为阳性。

6.3 抗 HEV IgG 阳性血清对噬菌体抗体的阻断实验 取 HEV 阳性血清 1:10 稀释于 MPBS 中, 按 100 μl/孔加入包被了 NE2 的孔中, 37℃ 孵育 30 min, 弃去血清, 加入用等体积 MPBS 封闭的噬菌体抗体, 按照噬菌体 ELISA 的方法进行检测。

7 单链抗体 (scFv) 的可溶性表达及检测

提取阳性克隆质粒, 转化大肠杆菌 HB2151, 从过夜生长的 2 × YT-A 培养基上挑取单克隆, 接种至 2 × YT 液体培养基, 37℃ 培养至 OD 1.0, 加入 1 mmol/L IPTG, 25℃ 诱导表达 10~12h。

scFv ELISA 检测: 收集的菌体经反复冻融裂解后离心, 取上清 100 μl 加入包被了 NE2 抗原 (5 μg/ml) 的孔中, 37℃ 孵育 1h; PBST 洗涤 5 次, 加入 HRP/Anti-E Tag 抗体 (1:8 000 稀释), 37℃ 孵育 1h; 同上洗涤, 加 HRP 底物显色液显色 15 min, 以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于波长 450/620 测定 A 值。

Western blot: 离心收集表达 scFv 的菌体, 用 50 μl H₂O 悬浮菌体, 加入 50 μl 2 × SDS 凝胶加样缓冲液, 100℃ 沸水浴 10 min。离心, 取上清进行常规 SDS-PAGE (12%), 电转移至硝酸纤维素膜, 经 5% 脱脂奶封闭, 加以 HRP/Anti-E Tag 抗体 (1:5 000 稀释), 最后用 HRP 底物溶液显色, 对表达产物进行 Western blot 分析。

结 果

1 His-NE2 抗原的表达纯化及结合活性的测定

将 NE2 基因经 *Nde* I/*Eco*R I 双酶切后, 克隆至相同酶切的原核表达载体 pTG-T7, 构建质粒 pHis-NE2。转化了该质粒的宿主菌 ER2566 表达带 His 标签的 NE2 融合蛋白 (His-NE2), 且主要以包涵体形式存在。纯化包涵体, 将融合蛋白溶解在 4 mol/L 尿素中, 进一步经过透析复性而获得纯度 95% 以上的融合蛋白, 浓度为 1.7 mg/ml。Western blot 检测结果证明融合蛋白仍保留原有的抗原抗体结合活性, 可作为筛选用抗原。

2 His-NE2 洗脱条件测定

将纯化的抗原 His-NE2 与亲和介质结合后, 再

用一系列由低到高浓度的咪唑溶液洗脱,理论上,低浓度的咪唑溶液去除样品与介质的非特异性吸附而不会将目的蛋白洗脱,高浓度的咪唑可以将特异结合的蛋白洗脱。收集不同浓度的洗脱液,经过 SDS-PAGE 分析发现,采用 5 mmol/L、10 mmol/L 咪唑不能将融合蛋白洗脱下来,当咪唑浓度高于 20 mmol/L,可以洗脱融合蛋白 His-NE2。因此,采取低浓度的咪唑(5 mmol/L)洗涤非特异结合的噬菌体,采用较高浓度的咪唑(150 mmol/L)少量多次洗脱融合蛋白,尽可能收集特异结合的蛋白,从而收获与之结合的特异噬菌体抗体。

3 噬菌体抗体库筛选中洗涤条件的确定

将纯化的 His-NE2 抗原与天然人源噬菌体抗体库混合,使噬菌体抗体与抗原充分结合后再加入亲和层析介质,使噬菌体抗体抗原复合物通过 His 标签与介质结合,然后通过充分洗涤去除非特异性噬菌体抗体。

实验综合了噬菌体抗体库筛选所采用的传统 PBST 和 PBS 洗涤方式以及 IMAC 的洗涤方式。在每一轮筛选中,先用 PBST 洗涤,再用 PBS 洗涤,最后用 5mmol/L 咪唑洗涤。收集每一轮中 PBST、PBS 第一次及最后一次的洗涤液,以及 5mmol/L 咪唑最后一次洗涤液,感染 TG1 测定洗涤去除的噬菌体抗体的 cfu 值,结果如图 1。

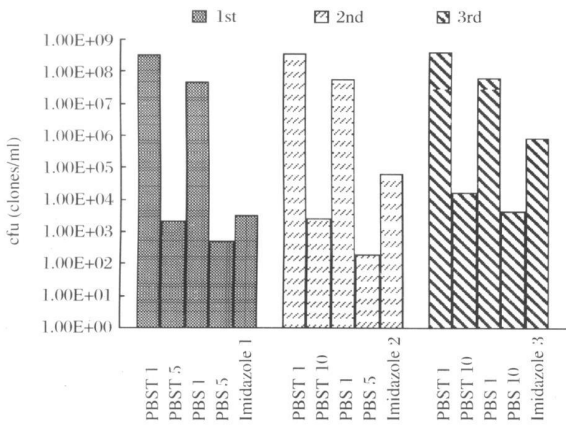


图 1 不同洗涤条件 cfu 值变化

Figure 1 The cfu under different washing conditions
 PBST 1. Washed one time by PBST; PBST 5 or 10. Washed 5 or 10 times by PBST; PBS 1. Washed one time by PBS; PBS 5 or 10. Washed 5 or 10 times by PBS; Imidazole 1, 2 or 3. Washed one, two or 3 times by imidazole.

随着洗涤次数增加,洗涤液中的噬菌体含量下降,推测非特异的噬菌体抗体逐步被洗涤去除。同时可以发现,不同洗涤液之间的洗涤效果存在差异,

例如 5mmol/L 咪唑洗涤液中的噬菌体 cfu 要高于 PBS 及 PBST 洗涤液,而且经抗原洗脱条件实验证明,在该浓度下不会洗去抗原 His-NE2,可见 5mmol/L 咪唑对于非特异吸附的去除有着重要的作用。经过重复验证,洗涤效果较为稳定一致,实验最终采取第一轮筛选以 PBST 洗涤 5 次、PBS 洗涤 5 次;第二轮为 PBST 洗涤 10 次、PBS 洗涤 5 次;第三轮为 PBST 洗涤 10 次、PBS 洗涤 10 次,然后以 1ml 5mmol/L 咪唑洗涤 1 次,第二、三轮筛选依次增加为 2 次、3 次。

4 亲和层析方法用于噬菌体抗体库的筛选

将特异性噬菌体抗体洗脱下来,感染 TG1,进行下一轮筛选,经过 3 轮筛选而得到特异的人源噬菌体抗体。对每轮筛选前后的噬菌体抗体库进行滴度测定,将筛选之后的噬菌体抗体(output)的滴度与筛选之前的噬菌体抗体(input)的滴度相比,可以获得噬菌体抗体的产率。结果表明(表 1),经过 3 轮筛选,噬菌体抗体的产率不断提高,特异性噬菌体抗体得到了一定程度的富集。

表 1 噬菌体抗体的筛选富集

Table 1 Selective enrichment of phage antibodies by His-NE2

Round of panning	Amount of input phage (cfu)	Amount of output phage (cfu)	Output/Input (%)
1st	3.5×10^{10}	5.0×10^4	1.4×10^{-4}
2nd	2.0×10^{10}	6.0×10^5	3.0×10^{-3}
3rd	3.0×10^{10}	8.0×10^6	2.7×10^{-2}

Note: Output/Input (%) = amount of output phage \times 100/ amount of input phage

由图 2 可见,3 轮筛选得到的噬菌体抗体库的多克隆 ELISA 呈明显的上升趋势,说明原始库中的特异性抗体得到了一定程度的富集,可以用作进一步的单克隆检测。

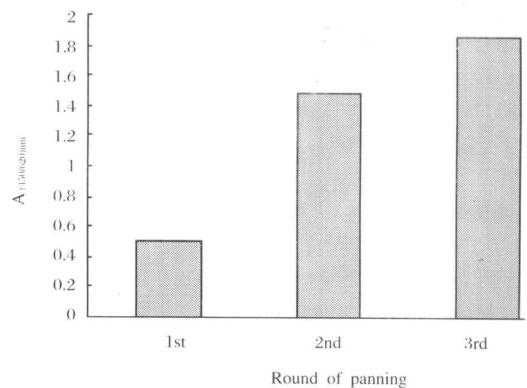


图 2 噬菌体抗体多克隆 ELISA 检测

Figure 2 ELISA result of multi-clone phage antibodies

5 特异噬菌体抗体的获得

从第三轮筛选的结果中随机挑取 200 个克隆, 进行噬菌体抗体单克隆 ELISA 检测, 部分检测结果如图 3。选取 10 个可能的阳性克隆, 它们与 NE2 有较强的反应活性, 而不与 HCV 抗原、封闭液反应。进一步用竞争法 ELISA 检测这 10 个克隆, 其中 2 个克隆即 126 和 138 的 NE2 抗原竞争达到 50% 以上, 在 HEV 阳性血清阻断实验中, 两者均表现出明显的阻断效应(图 4)。

6 scFv 的可溶性表达

取表达了 126、138 scFv 的 HB2151 菌体经反复冻融裂解后的上清, 进行 ELISA 检测, 由图 5 可知, 126、138 的可溶性 scFv 与 NE2 抗原具有特异性反应。表达了 126、138 scFv 的 HB2151 菌体总蛋白的

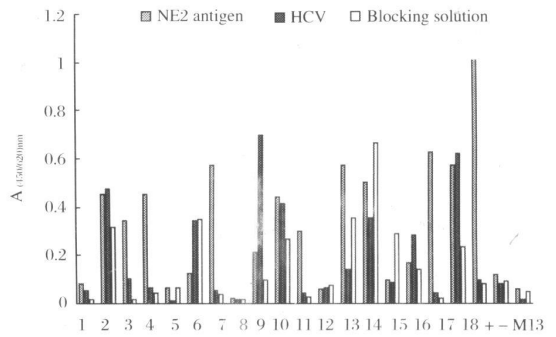


图 3 单克隆噬菌体抗体检测

Figure 3 Phage antibodies detected in monoclonal ELISA with different activity

+ . Positive control; - . Negative control; M13. Wild-type phage

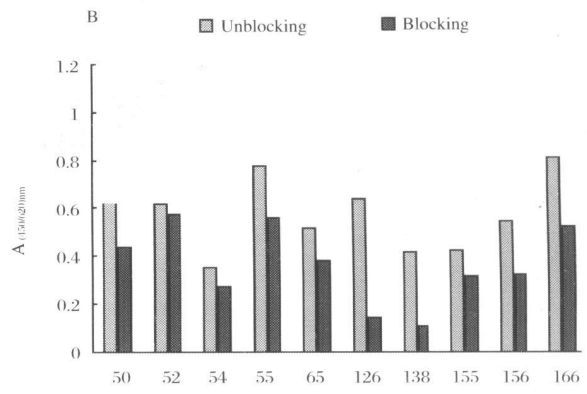
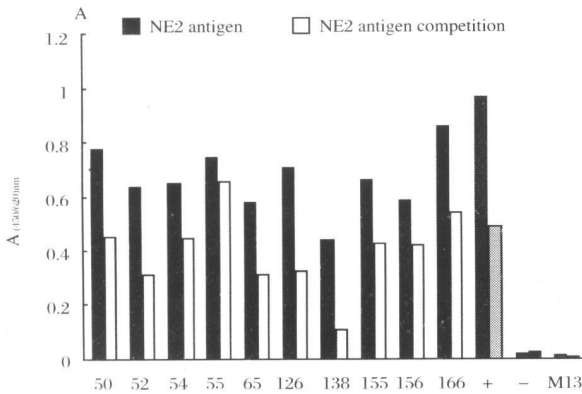


图 4 噬菌体抗体的竞争及阻断实验

Figure 4 Competitive and blocking tests of phage antibodies

A. Competitive ELISA of phage antibodies to NE2 antigen; B. Blocked by positive sera of anti-HEV IgG.

+ . Positive control; - . Negative control; M13. Wild-type phage

SDS-PAGE 结果如图 6A 所示, 看不到明显的表达条带, 进一步的 Western blot 检测如图 6B 所示, 约在 35kD 左右有显色条带, 表明了 scFv 蛋白的表达。

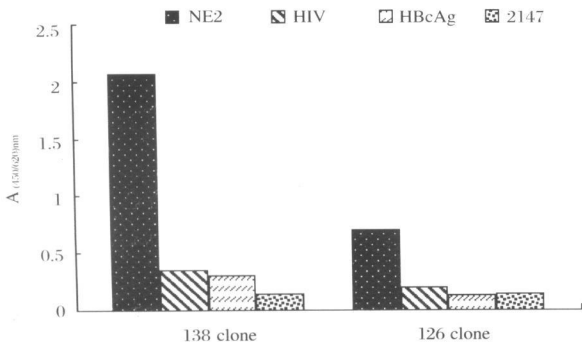


图 5 可溶性 scFv 与不同抗原的 ELISA 检测

Figure 5 Reaction of soluble scFv to a panel of antigens tested by ELISA

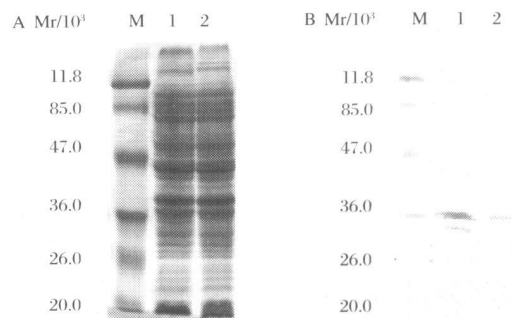


图 6 表达 138 和 126 scFv 的菌体总蛋白 SDS-PAGE (12%) 及 Western blot 检测

Figure 6 138 and 126 scFv expression tested by SDS-PAGE (12%) and Western blot

A. SDS-PAGE(12%); B. Western blot.

M. Protein marker; 1. 138 clone; 2. 126 clone

7 特异单链抗体的序列分析

对所得到的 2 株特异单链抗体进行测序, 用 IMGT/V-base 数据库分析抗体重链及轻链可变区

基因序列。序列分析结果显示, 2 个序列均为人源单链抗体, 有不同的 VH 及 VL CDR 区, 分属于不同家族(表 2)。

表 2 特异抗体的氨基酸序列分析

Table 2 Classification of the selected antibody clones according to their amino acid sequences

Clone	CDR1	CDR2	CDR3	Closest V family
126VH	NGSLSGYY	NHSGGA	ARGQHCSGSYVGGFYFYDC	IGHV4
126VL	QDIDDD	QEATT	LQHDNFPYTF	IGKV5
138VH	GDSVSSTFAA	TYYSHWNY	ARGWEGNIWYTEAYDT	IGHV6
138VL	QSVSSY	YDASN	QQRSNWP	IGKV2

Note: Sequences were compared with the human Ig set from the IMGT/V-base database

讨 论

通常运用的固相筛选方法存在着抗原能否维持天然构象的问题, 往往从固相筛选中获得的抗体对于天然的抗原不能识别^[1, 11], 而液相筛选可以避免蛋白质在固相载体上天然构象发生变化的缺点。目前的液相筛选方法大都采用抗原生物素化, 该方法的优点在于特别适用于利用多肽作为抗原进行的筛选, 因为多肽不容易固定于固相表面, 将肽段生物素化后可以液相筛选。生物素化的作用通过生物素与抗原蛋白的氨基酸侧链结合来实现, 这一作用可能导致抗原抗体结合位点的失活或者抗原蛋白结构的破坏, 引起蛋白构象与其天然构象的不完全一致, 固相上的链霉素也易引起非特异吸附^[17]。

固定化金属亲和层析(IMAC)是近年来发展的蛋白纯化技术, 通过与蛋白融合表达特定的氨基酸序列或多肽, 如多聚组氨酸(6×His)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)等而分离纯化蛋白。在目前的研究中, 亲和层析作为生物工程下游技术的一种重要方法而被大量运用, 通常都被用于蛋白质的分离、纯化^[18, 19]。

本研究将亲和层析的方法引入噬菌体抗体库的筛选, 为提高该方法的有效性, 本实验监测了筛选过程中各个强度洗涤液中噬菌体抗体的 cfu。由实验结果可知, 在筛选过程中, 不同洗涤液的使用对于洗涤的效果有重要的影响, 并非单纯的依靠增加一种洗脱液的洗涤次数而达到增强洗涤的效果, 可能每种洗涤液作用方式的差异导致了不同种非特异噬菌体抗体被洗去。根据最终确定的洗涤条件进行筛选, 随着筛选轮数的增加, 特异性抗体得到富集, 噬菌体抗体产出与投入的比率逐步提高。

与构建生物素化的蛋白相比, 新的液相筛选方法只在蛋白上加入一个由 6 个氨基酸构成的亲和层

析标签, 操作简单方便, 而且对蛋白本身的影响很小, 实验证明了带 His 标签的 NE2 融合蛋白仍保留原有的抗原抗体结合活性。带纯化标签的融合蛋白在液相环境中可以保持其天然构象, 又具有与亲和层析介质结合的能力, 这些特性使得该蛋白不仅可以应用于筛选, 而且使抗原与抗体的结合可以在液相中完成, 不仅消除了固相介质对抗原表位的影响, 也更有利于噬菌体抗体与抗原的充分作用。不过 6×His 标签以及亲和层析介质也可能增加潜在的非特异吸附, 其对筛选效率及结果的影响应作进一步研究。

此外, 在传统的筛选方法中, 采用 TG1 菌株直接感染或通过酸洗将噬菌体抗体洗脱下来, 在生物素方法中还可利用蛋白酶将噬菌体抗体与抗原分开。前者不能将与抗原特异性结合的噬菌体抗体与非特异吸附于其它物质的噬菌体抗体分离开来, 后者则因需酶消化而使方法复杂化。而本研究运用的方法是采用高浓度的咪唑将抗原-噬菌体抗体复合物洗脱下来, 既简单又特异。

因此本方法同时具备了传统的固相和液相筛选方法的优点。本研究将此方法应用于 HEV NE2 蛋白特异性人源噬菌体抗体的筛选, 抗原竞争 ELISA, 阳性血清阻断及可溶性表达结果表明, 最终获得 2 个特异性人源单链抗体。

对于一个大量的人源噬菌体抗体库, 要充分运用其资源, 筛选方法的多样性很重要, 针对同一抗原采用不同筛选方法可能获得完全不同的两套抗体^[20], 本研究运用的亲和层析方法将是对噬菌体抗体库液相筛选方法的有益补充。

参考文献:

[1] Azzazy H M, Highsmith W E Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations[J]. Clin Biochem, 2002, 35: 425- 445.

[2] Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the gener-

- ation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases [J]. *Therapeutic Focus*, 2003, 18: 847– 851.
- [3] Van Ewijk W, de Kruijf J, Germeraad W T, et al. Subtractive isolation of phage-displayed single-chain antibodies to thymic stromal cells by using intact thymic fragments [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3903– 3908.
- [4] Johns M, George A J, Ritter M A. *In vivo* selection of scFv from phage display libraries [J]. *J Immunol Meth*, 2000, 239: 137– 151.
- [5] Janda K, Lo L, Lo C, et al. Chemical selection for catalysis in combinatorial antibody libraries [J]. *Science*, 1997, 275: 945– 948.
- [6] Siegel D L, Chang T Y, Russell S L, et al. Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically activated cell sorting: an application in immunohematology [J]. *J Immunol Meth*, 1997, 206: 73– 85.
- [7] Clackson T, Hoogenboom H R, Griffiths A D, et al. Making antibody fragments using phage display libraries [J]. *Nature*, 1991, 352: 624– 628.
- [8] Griffiths A D, Williams S C, Hartley O, et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires [J]. *EMBO J*, 1994, 13: 3245– 3260.
- [9] Malmberg A C, Duenas M, Ohlin M, et al. Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor [J]. *J Immunol Meth*, 1996, 198: 51– 57.
- [10] 薛沿宁, 段凌浔, Pomerantz R J. 以 GST 融合蛋白为靶从噬菌体肽库中筛选结合肽 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1999, 26 (4): 381– 384.
- [11] Griffiths A D, Duncan A R. Strategies for selection of antibodies by phage display [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9: 102– 108.
- [12] Hawkins R E, Russell S J, Winter G. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation [J]. *J Mol Biol*, 1992, 226: 889– 896.
- [13] Chames P, Hufton S E, Coulie P G, et al. Direct selection of a human antibody fragment directed against the tumor T-cell epitope HLA-A1-FMAGE-A1 from a nonimmunized phage-Fab library [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 7969– 7974.
- [14] Zhang J Z, Ng M, Xia N S, et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein [J]. *J Med Virol*, 2001, 64: 125– 132.
- [15] 罗文新, 张军, 杨海杰, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16 (5): 578– 581.
- [16] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 著. 金冬雁, 黎孟枫等译. *分子克隆操作指南* [M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [17] Lu J, Sloan S R. An alternating selection strategy for cloning phage display antibodies [J]. *J Immunol Meth*, 1999, 228: 109– 119.
- [18] 杨敏, 刘新平, 韩炯. 乙型肝炎病毒 *PreS* 基因的克隆表达及亲和层析纯化 [J]. *第四军医大学学报*, 2001, 22 (16): 1493– 1496.
- [19] 刁理强, 周小明, 刘红兵. 应用固定化金属亲和层析纯化 His6 融合甲状旁腺激素相关蛋白 [J]. *中国生物制品学杂志*, 1999, 12 (2): 94– 97.
- [20] Lou J, Marzari R, Vezillo V, et al. Antibodies in haystacks: how selection strategy influences the outcome of selection from molecular diversity libraries [J]. *J Immunol Meth*, 2001, 253: 233– 242.

Affinity Chromatography Applied to Screening Phage Antibody Library

CHEN Ying-wei, LUO Wen-xin¹, WANG Ming-qiao, WANG Jin,

LI Li-feng, YUAN Quan, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(The Research Center for Molecular Virology of Fujian Province, The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: In this study, a new method based on immobilized metal affinity chromatography (IMAC) for screening phage antibody library against antigen in solution was reported. The purified antigen with His-tag was mixed with phage antibody library. After well combining, affinity resin was added to the mixture. Then the non-specific phage antibodies were removed by washing and the eluted specific bound phage antibodies were used to infect TG1 and then stepped into the next round. The binding process of antigen and antibody completed in the solution, which doesn't have the shortage of conformational changes encountered in the immobilized screening. We applied the method to screen human phage antibodies specific to HEV NE2. The results of antigen competitive ELISA, sera blocking ELISA, scFv expression and sequence analysis indicated that two specific human phage antibodies were obtained.

Key words: phage antibody library; immobilized metal affinity chromatography (IMAC); screen in solution