

学校编码：10384

分类号_____密级_____

学 号：200126003

UDC_____

学 位 论 文

人源天然噬菌体抗体库的构建及初步应用

Construction and preliminary application of human naïve phage antibody library

李利峰

指导教师：夏宁邵（研究员） 张军（副研究员）

厦门大学生命科学学院

申请学位级别： 硕士

专业名称： 植物学

论文提交日期：2004年9月24日 论文答辩日期：2004年9月27日

学位授予和日期：厦门大学 2004年 月

答辩委员会主席： 曾 定 教授

评阅人： 郑文竹 教授

蔡建春 教授

2004年9月

目 录

英文缩写	i
中文摘要	1
英文摘要	3
前言	5
1. 治疗性抗体	5
2. 噬菌体抗体库技术	6
2.1 丝状噬菌体及噬菌体展示技术	6
2.2 噬菌体抗体库技术	8
2.3 噬菌体抗体库的分类	9
2.4 菌体抗体库的构建	11
2.5 菌体抗体库的筛选	17
2.6 噬菌体抗体库技术展望	20
3. 本研究的目的意义	20
材料与方法	22
1. 材料	22
2. 方法	26
2.1 人源天然抗体库的构建	26
2.2 抗体库的筛选	37
结果与分析	44
1. PCR 扩增人源 V_H 和 V_L 基因片段	44
2. ScFv 基因的组装	50
3. ScFv 基因与 pCANTAB - 5E 载体的连接	50
4. 大肠杆菌感受态的制备及电转化条件的优化	52
5. 抗体库的构建与质量鉴定	55
6. 抗体库的淘洗	57

7. 阳性克隆鉴定模式的探索..	61
讨论 ..	72
1. 抗体库的构建..	72
2. 抗体库的筛选..	76
小结	80
参考文献	81
致谢	87
附录	88

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Contents

Abbreviation.....i

Abstract.....1

Preface.....5

1 . Therapeutic antibody.....5

2 . Phage antibody library technology.....6

2 . 1 Filaceous phage and phage display technology.....6

2 . 2 Phage antibody library technology.....8

2 . 3 Sort of phage antibody library.....9

2 . 4 Construction of phage antibody library.....11

2 . 5 Screening of phage antibody library.....17

2 . 6 Prospect of phage antibody library technology.....20

3 . The purpose and meaning of this study.....20

 Materials and Methods.....22

1 . Materials.....22

2 . Methods.....26

2 . 1 Construction of human naïve antibody library26

2 . 2 Screening of human naïve antibody library.....37

Results and analysis.....44

1 . Amplification of V_H and V_L genes.....44

2 . Assembling ScFv genes..50

3 . The ligation of scFv genes and pCANTAB-5E..50

4 . Preparation competence cell and optimization transform conditions.....52

5 . Construction and identify of antibody library.....	55
6 . Panning of antibody library.....	57
7 . The exploration of positive clones identify mode.	61
Discussion	72
1 . Construction of antibody library.....	72
2 . Screening of antibody library.....	76
Brief summary	80
References	81
Acknowledgements	87
Appendix	88

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
A	absorbance	吸光值
Amp	ampicillin	氨苄青霉素
bp	base pair(s)	碱基对
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
CDR	complementary determinant region	互补决定区
CFU	Colony-forming unit	菌落形成单位
CP	coat protein	衣壳蛋白
CP	coat protein	衣壳蛋白
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附分析
FR	frame-work region	骨架区
g	gene	基因
g	gene	基因
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HE	Hepatitis E	戊型肝炎
HEV	Hepatitis E virus	戊型肝炎病毒
Ig	immunoglobulin	免疫球蛋白
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactoside	β -D 异丙基硫代半乳糖苷
Kb	kilo-base pair(s)	千碱基对
mRNA	messenger RNA	信使 RNA
NC	nitrocellulose	硝酸纤维素膜
OFR	open reading frame	开放读码框
OD	optical density	光密度
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
pfu	plaque forming unit	噬菌斑形成单位

缩略词表

rpm	rounds per minute	每分钟转数
RT-PCR	reverse transcriptase PCR	反转录 PCR
ScFv	single-chain variable fragment	单链可变区片段
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine	四甲基联苯胺
VH	variable domain of a heavy chain	重链可变区
VL	variable domain of a light chain	轻链可变区

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

治疗性抗体在临床的应用已从上世纪 30 年代的抗血清时代经由 80 年代后的单克隆抗体时代进入到今天的基因工程抗体时代。目前处于各期临床的生物新药中，基因工程抗体是最多的一类，显示出治疗性抗体具有广阔的临床应用前景，而人源抗体是治疗性抗体的发展趋势。人源性噬菌体抗体库技术解决了人源性单抗来源困难、人体杂交瘤系统低效及鼠单抗的动物源性难题，是分子生物学和免疫学领域中一个强有力的研究手段。

本研究从 20 例未经免疫的健康人的外周血中分离出淋巴细胞，提取总 RNA 并纯化出 mRNA，然后反转录成 cDNA。在一组能识别所有功能性家族 V 基因引物的基础上，增加了酶切位点和部分 Linker 序列，并另外设计合成了 5 条恒定区特异下游引物。采用直接 PCR 与半套式 PCR 相结合的方式，使每一对引物都扩增出相应的抗体可变区基因，从而获得全套人源 V_H 、 V_L 基因。然后采用重叠延伸的方法直接经 PCR 将 V_H 、 V_L 随机拼接成 scFv，再重组到噬菌粒载体 pCANTAB-5E 中。制备高效率电转化感受态 TG1 细胞，采用优化的连接条件及电转化条件，连接物经多次电穿孔转化，构建了一个库容为 5.2×10^7 的人源天然抗体库。随机挑取 20 个菌落提取质粒，经酶切鉴定 19 个质粒有 scFv 基因的插入，重组率为 95%。10 个质粒的测序结果经 Blast 分析，发现均是人源抗体可变区序列，且无重复序列出现。将 10 个纯化的 scFv 基因用 BstN I 酶切，PAGE 胶分析表明酶切图谱各不相同。以上结果说明本研究构建的天然人源抗体库具有良好的多样性。

将抗体库的转化菌以辅助噬菌体 M13KO7 超感染，获得了滴度为 6.79×10^{12} cfu 的人源天然噬菌体抗体库。以固相化包被的 NE2 抗原对噬菌体抗体库进行 3 轮“吸附-洗脱-富集”的筛选，结果，噬菌体抗体的收获率由 9.2×10^{-6} 提高到了 1.9×10^{-3} ，提高了 207.6 倍，噬菌体抗体库的多克隆 ELISA 活性提高了 5.28 倍，这些都表明特异性噬菌体抗体得到了有效富集。

采用常规的间接 ELISA 法检测噬菌体抗体，从约 2300 个克隆中检测出 309 个噬菌体抗体阳性克隆，而进一步的实验证实它们都是假阳性。在此基础

上，我们建立了竞争 ELISA 法来检测单克隆噬菌体抗体，可有效避免常规间接 ELISA 法检测假阳性率高的缺点，使整个检测过程高效且特异，并大大减少了下一步检测的工作量。我们已用此方法获得 3 株针对 NE2 抗原的特异性噬菌体抗体。

综上所述，本研究成功地构建了一个多样性良好的人源天然噬菌体抗体库，并建立竞争 ELISA 法检测单克隆噬菌体抗体，为以后针对各种病毒、病原菌、毒素等抗原进行筛选，获得特异性人源治疗性单抗奠定基础。

关键词：人源天然噬菌体抗体库，噬菌体抗体，单链抗体

Abstract

Therapeutic antibody has developed into the genetically engineering antibody era in clinical application today through antiserum era in thirties and monoclonal antibody era in eighties. In terminally clinical new medicine at present, the genetic engineering antibody is the most one, and demonstrates that therapeutic antibody has wide clinical application prospects and human source antibody is the development trend of therapeutic antibody. Human source phage antibody library technology has solved some difficult problems such as human source antibody preparation, human hybridoma technology poor efficiency, mouse monoclonal antibody animal source and so on. So it is a powerful research tool in molecular biology and immunology domain.

In this research, lymphocytes were isolated from peripheral blood of 20 healthy people who did not undergo immune inoculation, and total RNA were extracted and mRNA was isolated, and then reverse transcribed into cDNA. On the basis of the primers which were designed by Bradbury in 1998, additional 5 items primers were designed. With the combination of the direct PCR and hemi-nest PCR, all human Ig V genes were amplified. By PCR assembly method, VH and VL genes were assembled into scFv directly, and then the scFv gene was cloned into pCANTAB-5E vector. The ligation product was transformed into *Escherichia coli* TG1 by electroporation. A human naïve antibody library containing 5.2×10^7 clones was constructed, and result of restriction digestion analysis showed that its recombination rate is 95%. 10 random-chosen clones were sequenced and those results were analyzed by Blast. It was found that these clones all contained human antibody variable sequence and no repeat sequences exist. Purified scFv genes segments were digested by BstN I and analyzed by PAGE electrophoresis; as a result, their profiles of restriction digestion had nothing in common with each other. The results mentioned above proved that the human naïve antibody library has good genes variety.

Transformed cells are then infected with M13KO7 helper phage, and

the human naïve phage antibody library was constructed successfully. The titer of phage antibodies was 6.79×10^{12} cfu. The phage antibodies were screened with purified antigen NE2. After three rounds “absorb - elute -concentrate” screening, the yield rate of phage antibody was improved to 1.9×10^{-3} from original 9.2×10^{-6} . And ELISA activity also increased 5.28 times. All these indicated human phage antibodies have got effective harvest.

With routine indirect ELISA, 309 phage positive clones were detected from about 2300 clones. Further analysis showed that these clones were not the specific clones for NE2 antigen. Subsequently, competitive ELISA was used to replace indirect ELISA to measure phage antibody. The results showed that 3 phage antibodies with specifically binding NE2 antigen were gained. All these results indicated competitive ELISA was more suitable for measurement of phage antibodies and could get rid of non-specific absorption more effectively.

In summary, in this study a human naïve phage antibody library with good genes variety was constructed successfully, and the methods for screening phage antibody were optimized. And this study established the foundation for screening neutral human monoclonal antibodies specific for a lot of antigens, such as virus, pathogenic bacterium, toxin, etc.

Keywords: human naïve phage antibody library, phage antibody, scFv

前 言

一．治疗性抗体

治疗性抗体在临床应用经历了20世纪30年代的抗血清时代、80年代后的单克隆抗体时代后，进入到今天的基因工程抗体时代，抗体分子已由实验室进入临床药物的行列。“新生物技术药物”的新趋势显示治疗性抗体将可能成为今后生物技术药物发展最为迅速的领域。1997年治疗性抗体在生物技术药物所占市场份额还微不足道。2年后迅速上升，2000年已上升到十多亿美元，据估算2001年仅Herceptin和Rituxan两种用于肿瘤治疗的抗体的市场销售额将超过10亿美元。目前，美国已有十几种治疗性抗体上市。更为人关注的是，在2001年，美国FDA批准的369种处于各期临床的生物新药中有87种是治疗性抗体，是各类生物新药中最多的一类，显示出治疗性抗体具有广阔的临床应用前景。据专家预计2008年美国治疗性抗体的市场将上升到44亿美元，到2010年将有近100个上市，产值可达300亿美元以上^[1-3]。治疗性单抗的临床适应症主要包括：抗肿瘤作用^[4-8]、抗感染作用^[9-12]、在器官移植中^[13-15]、自身免疫性疾病以及超敏反应中的应用^[16]等。

目前天然的人或动物源性抗体（特别是单克隆抗体）在临床上仍有应用，但由于它们来源的限制及免疫原性问题，预计很快将由基因工程人源化抗体代替，现在已获批准上市的抗体药物70-80%为人源化抗体。至2004年3月，美国及其他发达国家已经批准18种治疗性单抗进入市场。值得注意的是，美国FDA批准的16种抗体药物中有5种为人鼠嵌合抗体，8种为人源化抗体或人单抗，如表1。这提示着人源抗体是治疗性抗体的发展趋势。

目前，已经进入临床的140多种单克隆抗体中，85%仍然是来源于鼠杂交瘤技术的单克隆抗体，包括少量鼠单抗和大部分鼠单抗人源化改造后的嵌合抗体和人源化抗体；全人源抗体约占15%，其中一部分来自基因工程小鼠，另一部分来自人源噬菌体抗体库技术。而在治疗性人单抗的前期研究中，约有30%的人抗体是来自人源噬菌体抗体库^[17]。

表 1 已经获批上市的治疗性单抗^[18-21]

Table 1 Monoclonal-antibody-based therapeutics on the market

抗体名称	抗体种类	靶向抗原	适应症	批准日期
OKT3	鼠单抗	CD3	移植排斥	1986
Panorex	鼠单抗	17-1A	大肠癌	1995 (德国)
ReoPro	人-鼠嵌合 Fab	血小板受体 b	冠心病	1994
Zenapax	人源化抗体	CD25	移植排斥	1997
Rituxan	人-鼠嵌合抗体	CD20	淋巴瘤	1997
Simulect	人-鼠嵌合抗体	CD25	移植排斥	1998
Remicade	人-鼠嵌合抗体	TNF-	炎症性肠病类风 湿关节炎	1998
Herceptin	人源化抗体	HER-2	乳腺癌	1998
Synagis	人源化抗体	RSV F 蛋白	RSV 感染	1998
Mylotarg	人源化抗体化疗 药物交联物	CD33	淋巴瘤	2000
Campath	人源化抗体	CD52	淋巴瘤	2001
Zavalin	Y ⁹⁰ -鼠单抗	CD20	淋巴瘤	2002
Humira	人单抗	TNF- α	类风湿关节炎	2002
Xolair	人源化单抗	IgE	过敏哮喘	2002 (澳大利亚)
Bexxar	I ¹³¹ -鼠单抗	CD20	NHL	2003-6-30
Raptiva	人源化鼠单抗	CD11a	银屑病	2003-10-27
Erbitux	人-鼠嵌合抗体	EGFR	大肠癌	2004-2-12
Avastin	人源化鼠单抗	VEGF	大肠癌	2004-2-26

二. 噬菌体抗体库技术

1. 丝状噬菌体及噬菌体展示技术

丝状噬菌体是一组能够感染具有 F 性菌毛的革兰氏阳性细菌的噬菌体，主要包括 M13、fd、f1 等，噬菌体颗粒呈柔软长丝状。丝状噬菌体的基因组都是一条单链环状 DNA，长约 6400 nt，共含有 10 个基因，分别编码 10 种蛋白。构成外壳蛋白主要是基因 编码的 CP 蛋白，有 2700 个拷贝，另外还有基因 ， 、 和 ，分别编码次要外壳蛋白 CP 、 CP 、 CP 、 CP 。从理论上讲，外源蛋白或多肽通过融合蛋白的方式可以展示在丝状噬菌体的各种外壳蛋白上。但目前大部分多肽主要展示在 CP 和 CP 蛋白上。在噬菌体展示技术中，常采用的是 CP 和 CP 融合蛋白。CP 和 CP 两种展示系统各有特点（见表 2），具体应用时可根据需要（如展示蛋白的大小、亲和力等）决定。在噬菌体抗体库中，CP 和 CP 蛋白都得到了应用。重组抗体与 CP 蛋白融合表达的形式展示在 M13 噬菌体的顶部，而通过一

种抗 CP 蛋白的酶标抗体(抗 M13 - HRP)就可以使噬菌体本身得到检测。由于 CP 蛋白有大约 2700 个拷贝表达在噬菌体表面 ,这就有效的放大了检测信号 ,增加了 ELISA 筛选的灵敏性。在噬菌体基因组中还有一段基因间隔区 ,其不编码任何蛋白 ,主要是一些 DNA 合成的起始和终止信号以及子代噬菌体的组装信号。

表2 CP 和CP 噬菌体展示系统的比较^[22]

Table 2 The compare of phage display system of protein 3 and protein 8

比较项目	CP 噬菌体展示系统	CP 噬菌体展示系统
价	单价	多价
展示部位	噬菌体颗粒末端	噬菌体颗粒四周表面表面
展示蛋白大小	几百个氨基酸	十几个氨基酸
配体亲和力	适合筛选高亲和力配体	适合筛选中、低亲和力配体
用途	适用于抗体库	随机肽库

在 CP 展示系统中 ,外源蛋白的基因被克隆到噬菌体载体中 ,与 CP 蛋白融合表达 ,展示在噬菌体颗粒的表面。这样 ,噬菌体抗体将外源蛋白的基因型和表型统一于一体 ,将选择能力与扩增能力偶联起来 ,具有强大的筛选能力 ,能够在体外模拟体内的抗体生成过程 ,图 1 显示其原理。

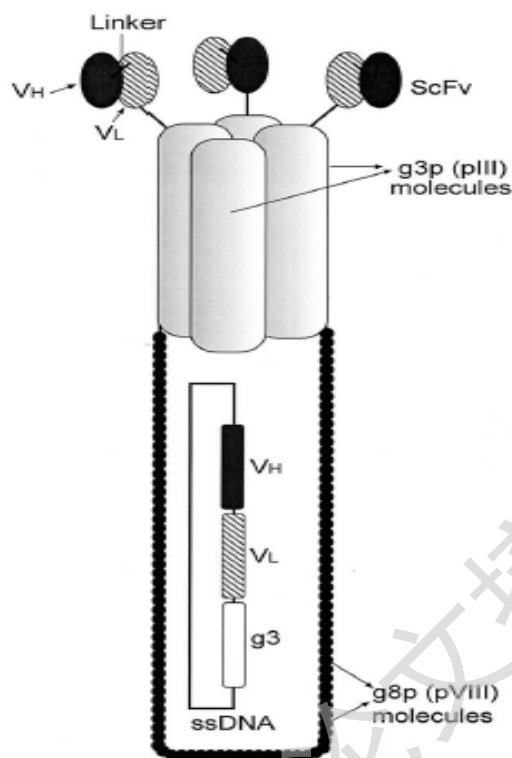


图 1 丝状噬菌体展示scFv示意图^[23]

Fig .1 Schematic diagram of a filamentous phage displaying scFv

2 . 噬菌体抗体库技术

噬菌体抗体库技术的出现有赖于PCR技术的建立、抗体分子在大肠杆菌的功能性表达以及噬菌体展示技术的发展。其基本原理是通过RT-PCR克隆出全套抗体可变区基因，然后将抗体基因片段组装到噬菌体表达载体内，使之与噬菌体外壳蛋白融合表达，并展示在噬菌体表面，形成噬菌体抗体；表达在噬菌体表面的全套抗体构即成噬菌体抗体库，然后通过几轮的“吸附→洗脱→扩增”的富集过程，就可以从噬菌体抗体库中筛选出特异性抗体及其基因。这使得不经免疫在体外制备特异性抗体成为可能。这是上世纪末抗体工程领域的重大进展，使抗体工程技术进入了一个新的时代。其突出用途有三点：（1）解决了人源抗体制备的难题，可通过噬菌体抗体库制备人单抗，也可用抗体库技术进行鼠单抗人源化；（2）抗体库技术使抗体性能的改良进入了新的阶段：可以筛选具有特定性能的未知结构，如优化抗体的结构、提高抗体的表达量、改善抗体的特异性等等，

尤其是利用抗体库技术在体外进行亲和力成熟，目前通过多种突变手段和先进的筛选技术已可得到远远超过体内免疫所获得的高亲和力抗体，这对抗体的制备和应用将产生深远的影响。（3）抗体库技术可以高效、快速地筛选针对毒性抗原、自身抗原、弱免疫原等的抗体，这类抗体靠传统方法通常难以得到。

2002年，美国发生炭疽恐怖袭击后，Zhou等^[24]人仅用数月时间，就从一大容量非免疫噬菌体单链抗体库中筛选得到能与炭疽孢子结合的单链抗体，立即应用于检测可疑粉末中的炭疽孢子。2003年2~3月份，中国爆发SARS后，中国CDC杜润蕾等^[25]人在5月份就通过抗体库技术筛选获得特异性针对SARS病毒的基因工程Fab抗体。这些例子充分显示了噬菌体展示技术的优势和应用价值。

3. 噬菌体抗体库的分类

根据抗体基因的不同来源和不同的构建目的，噬菌体抗体库可分为免疫抗体库，天然（非免疫）抗体库和合成抗体库。

3.1. 免疫抗体库

免疫抗体库由从被抗原免疫过的或有免疫史的动物的脾脏B细胞中扩增得到的V区基因构建而成。Zhang等^[26]从6个健康人身上分离出淋巴细胞，采用BSA偶联的PreS1体外致敏淋巴细胞，提取总RNA构建了库容为 7×10^8 的人源噬菌体抗体库，再以PreS1为抗原进行了3轮富集筛选，结果得到了亲和力为 10^8M^{-1} 的人源scFv，为今后乙肝的基因治疗打下了基础。与杂交瘤技术相比，免疫抗体库的优点在于能更快速地筛选抗原特异性的抗体，甚至所得的抗体的亲和力比单克隆抗体还高。Chester等^[27]从 10^7 的免疫库中筛选得到亲和力和特异性都优于单克隆抗体的抗CEA抗体MFE-23，其亲和常数 K_a 为 $2.5 \times 10^9 \text{M}^{-1}$ ，而相应的单克隆抗体A5B7的 K_a 仅为 $2.5 \times 10^8 \text{M}^{-1}$ 。免疫抗体库的另一优点是可用来研究体液免疫反应，如一些自身免疫性疾病^[28]，病毒感染^[29]，肿瘤发生^[30]等。但是，免疫抗体库的构建比较复杂，通常只能得到针对特定抗原的抗体，并需反复免疫动物方能建库，且欲获得针对

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库