

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)16-1445-04

应用细胞内 PCR 技术构建及筛选白癜风噬菌体抗体库

刘玲, 田艳丽, 李春英, 高天文 (第四军医大学西京医院皮肤科, 陕西 西安 710033)

Construction and screening of human vitiligo phage autoantibody library based on in-cell PCR

LIU Ling, TIAN Yan-Li, LI Chun-Ying, GAO Tian-Wen

Department of Dermatology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To obtain *in situ* pairing of the variable region genes of the heavy and light chains of vitiligo patients' lymphocytes, then construct and screen a human ScFv phage antibody library. **METHODS:** We amplified *in situ* pairing of the variable region genes of the immunoglobulin heavy and light chains using the in-cell PCR together with Cre-recombination, constructed and panned a human ScFv phage antibody library, and screened it with pigment cell suspension, then detected the activity of positive clones. **RESULTS:** We constructed an antibody library of 3×10^6 in size, and obtained one specific autoantibody against melanocyte membrane antigens. **CONCLUSION:** In-cell PCR together with human phage antibody library may be useful tools for the study of vitiligo antibody gene family and the VH/VL pairing that occurs during the autoimmune process.

【Keywords】 vitiligo; polymerase chain reaction; phage antibody library; autoantibodies

【摘要】目的:克隆白癜风患者淋巴细胞中原始配对的自身抗体基因,构建噬菌体抗体库并筛选针对黑素细胞膜抗原的特异性抗体。方法:细胞内 PCR 法扩增人免疫球蛋白轻链和重链可变区基因,Cre 重组酶介导下完成单个细胞内的轻重链连接,获得反映体内原始配对信息的单链抗体可变区基因,构建噬菌体抗体库,筛选针对黑素细胞膜抗原的自身抗体。结果:构建完成库容量约为 3×10^6 的噬菌体抗体库,筛选得到 1 株针对黑素细胞膜抗原的自身抗体。结论:利用细胞内 PCR 技术和噬菌体抗体库技术成功构建免疫文库,为进一步研究自身抗体在白癜风发生发展过程中的作用奠定了基础。

【关键词】 白癜风; 聚合酶链反应; 噬菌体抗体库; 自身抗体

【中图分类号】 R758.41 **【文献标识码】** A

收稿日期 2006-03-09; 接受日期 2006-05-17

基金项目 国家自然科学基金(30300307)

通讯作者 高天文。Tel: (029) 84775401 Email: gaotw@fmmu.edu.cn

作者简介:刘玲, 硕士生(导师高天文)。Tel: (029) 84775406

Email: vanilla@fmmu.edu.cn

0 引言

白癜风是一种常见的皮肤色素脱失性疾病,病因尚未完全明确,近年的研究倾向于自身免疫在黑素细胞破坏中发挥了重要作用。患者体内存在包括抗黑素细胞抗体在内的多种自身抗体^[1]。抗黑素细胞抗体针对多种黑素细胞成分,其滴度与疾病活动性平行^[2]。部分抗体针对细胞膜抗原,在黑素细胞破坏中有重要作用。我们在前面的实验中已经摸索出细胞内 PCR 扩增抗体基因的方法,成功扩增患者体内原始亲本配对的自身抗体基因^[3],进一步结合噬菌体抗体库技术,构建免疫文库并筛选针对黑素细胞膜抗原的自身抗体,为研究血清中抗体对黑素细胞的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 样本 白癜风患者均来自西京医院皮肤科门诊,诊断依据白癜风临床分型及疗效标准(2003 修订稿)^[4],选择进展期、面积较大(皮损面积占体表面积 5% 以上)的患者,其中男 48 例,女 52 例;年龄 12 ~ 55(平均 21)岁;平均病程 2 mo;所有患者采血前 3 mo 内未接受皮质类固醇、免疫调节药物、光化学等系统治疗。

1.2 试剂 免疫磁珠,CD19 + 单抗(BD Pharmingen 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗人 IgG 和 HRP 标记羊抗鼠 IgG(武汉博士德生物制品公司),蛋白酶 K(Merck kGaA 公司),PCR 引物由赛百盛公司合成,Trizol 和逆转录酶 SuperScript III(Invitrogen 公司),Cre 重组酶(纽英伦生物公司),Taq 酶和 PCR 产物回收纯化试剂盒(TaKaRa 公司),限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶(Promega 公司),噬菌体表达载体 PHENI 由本校生化教研室雷迎峰博士惠赠,大肠杆菌 XL-Blue 和含卡那霉素抗性的辅助噬菌体 VC-SM13 由本实验室常规保存。

1.3 扩增体内亲本配对的抗体基因

1.3.1 分离 CD19⁺ B 淋巴细胞 常规培养人黑素细胞,活细胞 ELISA 法^[5]筛选强阳性血清,抽取相应静脉血各 15 mL,用淋巴细胞分离液按常规方法分离外周血单核细胞,免疫磁珠分离收集 CD19⁺ B 淋巴细胞。

1.3.2 扩增抗体基因 按文献 [3] 扩增人类主要的轻重链可变区基因, 所有引物序列 5'GCTGCTGAGG-GAGTAGAG 3', 5'CAGATTTCAACTGCTCATCAGAT-GG 3', 5'ATGGACTGGACCTGGAGGRTCTCTKC 3', 5'ATGGAGYTTGGGCTGASCTGGSTTTT 3', 5'TCAT-TCTCGACATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAA-GTTAT AGAGCCGCCGCCGCGCCACTGCCGCCACCACC TGARGAGACRGTGACCRKKGTBCC 3', 5'CTCGCAA-CTGCATAACTTCGT GCCATGGCCGMCATCCRGWTG-ACCCAGTCTCC 3', 5'CTCGCAACTGCATAACTTCGT GCCATGGCCGATATTGTGATGACYCAGWCTCC 3' 5'CTCGCAACTGCATAACTTCGT GCCATGGCC GAAAT-TGTGWTGACRCAGTCTCC 3', 5'GTCCTCGCAACT-GCGGCCAGCCGGCCTTGCCAGGTGCAGCTGSW-GSAGTCWGG 3', 5'GAGTCATTCTCGACTTGGCCGCG-GCTCGTTTGATYTCCASCTTGGTCCC 3', 5'GAGTCA-TTCTCGACTTGGCCGCGCTCGTTTGATATCCACTTTG-GTCCC 3', 5'GAGTCATTCTCGACTTGGCCGCGCTCG-TTTAATCTCCAGTCGTGTCC C 3', 5' CAGATTTCAACTGCTCATCAGATGG 3'. (*Sfi*I 位点 CCG GCC TTG GCC; *Not*I 位点 TGC GGC CGC. 引物中的简并碱基符号 K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = C/G, W = A/T, Y = C/T, B = C/G/T, D = A/G/T, H = A/C/T, V = A/C/G). PCR1 反转录、分别扩增轻链和重链可变区基因, Cre 酶重组后 PCR2 及 PCR3 扩增反映体内原始装配的抗体基因, 各步 PCR 反应条件均优化为 95℃ 30 s, 57℃ 40 s, 72℃ 1 min.

1.4 构建 ScFv 噬菌体抗体库 纯化的 ScFv 基因产物经 *Sfi*I 和 *Not*I 双酶切, 与同样双酶切回收的 PHE-NI 载体大片段连接, 电转化 XL-Blue 感受态菌, 37℃ 100 r/min 振荡 1 h, 取适量菌液铺于 Amp 阳性的 LB 琼脂平板, 37℃ 数菌落计算库容, 并挑单菌落提取质粒, 酶切鉴定抗体库的重组率. 其余菌液转入含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 SB 培养液, 37℃ 振荡 1 h, 加入四环素 (10 mg/L), 37℃ 振荡 1 h, 按 1×10^{12} cfu/mL 加入辅助噬菌体 VCSM13, 37℃ 振荡 2 h 后加入卡那霉素 (70 mg/L), 37℃ 振荡过夜. 次日收集菌液 4℃ 5000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 加 PEG8000 至 40 g/L, NaCl 至 30 g/L, 冰浴中沉淀 30 min, 4℃ 8000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 10 g/L BSA-10 g/L 甘油-PBS 溶解沉淀, 12 000 r/min 离心, 上清即为噬菌体抗体库, -20℃ 保存.

1.5 筛选噬菌体抗体库 参照文献 [6], 以完整的黑素细胞为抗原对噬菌体抗体库进行 4 轮富集筛选. 2×10^7 个细胞洗涤离心, 30 g/L BSA-PBS 1 mL, 37℃

封闭 1 h, 弃封闭液, 加噬菌体抗体库液 1 mL, 37℃ 缓慢颠倒吸附 2 h. 离心弃上清, PBS 洗涤 (第一轮洗 2 次, 以后每轮洗 20 次), 加入对数期生长的 XL-Blue 菌液 2 mL, 37℃ 振荡培养 30 min, 取适量铺盘计算回收率, 其余转入三角烧瓶, 加 SB 至总体积 10 mL, 37℃ 振荡培养 1 h, 加入 70 mL SB 培养液和 AMP (100 mg/L), 于 37℃ 振荡培养至对数生长期, 加 1×10^{12} cfu VCSM13 诱导表达, 30℃ 振荡培养过夜. 次日将菌液离心收集上清, 浓缩后得到次级库, 反复筛选 4 轮.

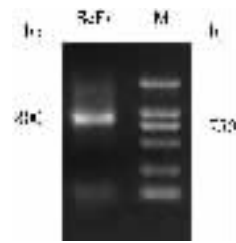
1.6 噬菌体抗体的表达和特异性检测

1.6.1 噬菌体抗体的表达 从第 3 轮和第 4 轮筛选后的培养皿上分别随机挑取 40 个菌落各加入到 1.5 mL LB 培养液中 (Amp 100 mg/L, Kan 25 mg/L) 中, 37℃ 振荡培养过夜. 补加 1.5 mL LB, 振荡培养 1 h, 加入 50 μ L VCSM13, 30℃ 振荡培养过夜. 次日, 菌液离心上清即为初步筛得的噬菌体抗体.

1.6.2 抗体特异性的细胞 ELISA 检测 将黑素细胞接种于 96 孔培养板上, 待贴壁生长后, PBS 洗涤加入 30 g/L 的 BSA-PBS (300 μ L/孔), 37℃ 封闭 1 h. 弃去封闭液, 加入待测噬菌体抗体 (50 μ L/孔), 37℃ 孵育 1 h. 用 0.5 mL/L Tween20-PBS 洗涤 3 次, 加 HRP-抗 M13 抗体 (工作浓度 1:5000, 50 μ L/孔), 37℃ 孵育 1 h. 0.5 mL/L Tween20-PBS 洗涤 5 次后显色, 于波长 490 nm 测定 A 值. 显色阳性的克隆再以黑素瘤细胞系 LiBr 375, 角质形成细胞、成纤维细胞和角蛋白等为抗原鉴定抗原抗体反应的特异性.

2 结果

2.1 扩增 ScFv 基因 细胞内 PCR 扩增 ScFv 基因, 电泳目的条带约为 800 bp, 与预期大小相符 (图 1).



M: Marker (DL2000).

图 1 细胞内 PCR 扩增 ScFv 基因

2.2 构建噬菌体抗体库 构建的噬菌体抗体库库容约为 3×10^6 , 挑 20 个单菌落提质粒进行 *Sfi*I 和 *Not*I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳, 19 个见 800 bp 左右目的条带, 重组率为 95% (图 2).

2.3 筛选噬菌体抗体库 用黑素细胞对噬菌体抗体库进行亲和吸附筛选,经过4轮筛选,特异性噬菌体抗体逐渐富集,到第4轮回收率增加约67倍(表1)。



M: Marker (DL 2000).

图2 噬菌体抗体库重组分析,显示 *SfiI* 和 *NotI* 双酶切后的阳性克隆

表1 每轮筛选噬菌体抗体库的投入产出比 (cfu)

次数	投入	产出	投入产出比
1	1.5×10^{12}	2×10^6	1.3×10^{-6}
2	8×10^{11}	2.2×10^7	2.7×10^{-5}
3	2.1×10^{12}	8.2×10^7	4×10^{-5}
4	9×10^{11}	7.8×10^7	8.7×10^{-5}

2.4 抗体特异性的ELISA检测 随机挑取80个单菌落制备噬菌体抗体,ELISA检测到1株可与黑素细胞结合,而与黑素瘤细胞系LiBr 375,角质形成细胞、成纤维细胞和角蛋白等无关抗原反应呈阴性。

3 讨论

早在20世纪80年代,国外学者就发现白癜风与自身免疫有密切关系,开始了对白癜风自身抗体的研究。Bystryn等^[7]发现,白癜风患者体内存在多种抗体,除针对黑素细胞胞浆和胞膜抗原的抗体外,还检测到针对角质形成细胞或其他普通组织抗原的抗体,相当数量的白癜风患者合并有甲状腺功能不全,部分患者可以检测到甲状腺自身抗体^[8]。我们通过活细胞ELISA法、Western blotting,免疫组化、免疫荧光等多种方法证实,白癜风患者体内存在抗黑素细胞膜自身抗体,主要为IgG抗体,滴度与疾病活动性相关,此类抗体直接针对黑素细胞膜表面抗原导致黑素细胞破坏,进一步释放酪氨酸酶及相关蛋白等胞浆抗原,产生更多自身抗体引起损伤^[5,9]。但自身抗体在疾病发生中究竟是始动因素还是继发反应,也一直存在争议,因此有必要深入研究白癜风自身抗体,特别是针对黑素细胞膜抗原的特异性抗体。

20世纪90年代开始出现的噬菌体抗体库技术是抗体研究和制备方面的重大突破,应用于寻常型天疱疮、系统性红斑狼疮、Grave'病等自身免疫性疾病和病毒感染性疾病,已经筛选得到疾病相关性自身抗体^[10-12]。但传统方法构建的抗体库,是将大量的细

胞混合,反转录分别扩增轻链基因和重链基因,得到的扩增产物是多种轻链基因的混合产物和多种重链基因的混合产物,混合产物再随机组合到噬菌体载体。最终同一个载体上的轻链与重链的配对是人工随机组合的,而不是在体内时的原始配对,无法反映患者体内抗体的原始配对情况。为解决这一问题,我们引入细胞内PCR技术扩增抗体可变区基因。细胞内PCR技术是一种全新的扩增抗体可变区基因的方法,通过固定通透化外周血淋巴细胞,以一组引物直接在细胞内部扩增抗体轻、重链基因并装配成单链抗体,可以获知编码体内原始轻、重链对抗体基因的准确信息,从分子水平上阐述致病性自身抗体的产生机制、编码基因的规律和基因突变特点^[13-14]。本研究结合细胞内PCR技术和噬菌体抗体库技术,从人免疫细胞中扩增体内亲本配对的单链抗体可变区基因,克隆到噬菌体载体,同时以融合蛋白的形式表达在噬菌体外壳表面,利用完整细胞筛选特异性针对黑素细胞膜抗原的自身抗体,从而得到编码疾病相关抗体基因的准确信息。

研究中筛选血清抗体滴度高的白癜风患者,因其B细胞已经对黑素细胞抗原产生体液免疫应答,抗体在体内经过抗原选择、可变区基因重排和亲和力成熟,产生特异性和亲和力较好的目的抗体。本实验经细胞内PCR成功克隆白癜风自身抗体基因,构建完成库容量 3×10^6 ,重组率95%的免疫库。白癜风发病过程中,直接针对黑素细胞膜表面抗原的自身抗体扮演了重要角色,因此以完整黑素细胞为抗原,通过4轮"亲和吸附-洗脱-扩增"筛选,获得1株特异性针对黑素细胞膜抗原的抗体。该抗体基因反映体内原始的轻重链搭配,进一步探索其性能和生物学作用,可能为白癜风发病机制的研究提供新思路。

【参考文献】

- [1] Chatain C, Ring J, Schallreuter KU. Total serum immunoglobulins and atopic symptoms in patients with vitiligo [J]. *Dermatology*, 1994, 89(1): 27-31.
- [2] Harming R, Cui J, Bystryn JC. Relation between the incidence and level of pigment cell antibodies and disease activity in vitiligo [J]. *J Invest Dermatol*, 1991, 97(6): 1078-1080.
- [3] 田艳丽,李春英,王刚,等. 细胞内PCR技术扩增白癜风自身抗体基因 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2006, 39(1): 37-39.
- [4] 中国中西医结合学会皮肤病专业委员会色素病学组. 白癜风临床分型及疗效标准(2003修订稿) [J]. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37(7): 440-440.
- [5] 李志强,高天文,赵晓东,等. 白癜风患者血清中抗黑素细胞表面抗原自身抗体检测 [J]. *中华皮肤科杂志*, 2001, 34: 268-270.

- [6] Szardenings M, Tornroth S, Mutulis F, et al. Phage display selection on whole cells yields a peptide specific for melanocortin receptor [J]. *J Biol Chem*, 1997 272(44): 27943-27948.
- [7] Bystryn JC. Serum antibodies in vitiligo patients [J]. *Clin Dermatol*, 1989 7: 136-145.
- [8] Hegedus L, Heidenheim M, Gervil M, et al. High frequency of thyroid dysfunction in patients with vitiligo [J]. *Acta Derm Venereol*, 1994 74: 120-123.
- [9] 李志强, 高天文, 马翠玲, 等. 白癜风患者血清中抗黑素细胞 IgG, IgM 抗体的检测及补体介导的血清细胞毒反应 [J]. *临床皮肤科杂志* 2000 29: 136-138.
- [10] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. *Nature*, 1990 348(6301): 552-554.
- [11] Aujame L, Geoffroy F, Sodoyer R. High affinity human antibodies by phage display [J]. *Hum Antibodies*, 1997 8(4): 155-168.
- [12] Payne AS, Ishii K, Kacir S, et al. Genetic and functional characterization of human pemphigus vulgaris monoclonal autoantibodies isolated by phage display [J]. *J Clin Invest*, 2005 115(4): 888-899.
- [13] Embleton MJ, Gorochov G, Jones PT, et al. In-cell PCR from mRNA: Amplifying and linking the rearranged immunoglobulin heavy and light chain V-genes within single cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992 20(15): 3831-3837.
- [14] Chapal N, Chardes T, Bresson D, et al. Thyroid peroxidase autoantibodies obtained from random single chain FV libraries contain the same heavy/light chain combinations as occur *in vivo* [J]. *Endocrinology*, 2001 142(11): 4740-4750.

编辑 袁天峰

· 技术方法 · 文章编号 1000-2790(2006)16-1448-01

HemoSonic™100 与热稀释法测量心输出量在肺切除术中的研究

龚毅¹, 徐世元², 许平², 梁启波² (¹南京军区福州总医院麻醉科, 福建福州 350025, ²南方医科大学珠江医院麻醉科, 广东广州 510282)

【关键词】经食管超声多普勒, 心输出量, 热稀释法, 测量方法
【中图分类号】R445.1 【文献标识码】B

1 对象和方法

1.1 对象 选择择期行肺切除术患者(男4,女2)例, 年龄 51.2 ± 14.7(31~75)岁。术前 ASA 分级: I 级 4 例, II 级 2 例, 6 例均无食管、瓣膜和主动脉严重病变。

1.2 方法 在诱导前、气管插管后、开胸后、单肺通气后 10 和 50 min, 肺切除及恢复双肺通气后、侧卧改平卧 8 个时间点, 用两法同时测量 CO。患者充分镇静后, 将食道探头装上探头套, 检查探头和探头套间无气泡后, 将探头经口或经鼻插入患者食道。当探头到达胸 5、胸 6 两椎体间, 与降主动脉平行。此时慢慢旋转探头, 当显示屏上清晰显示主动脉前后壁, 绿色的回波能量条较长, 多普勒血流图形标准, 血流声音响亮时, 表明探头位置正确。平卧位将静脉导管置入患者颈内静脉, 固定后放入 110 cm 肺动脉导管, 接压力传感器, 根据压力曲线判断导管位置。当导管进入右房后, 向球囊内注入 1.5 mL 空气, 继续进管, 观察压力曲线, 直至导管漂到肺动脉。测量时, 在吸气末快速(≤3 s)向右房内注入 0℃的 50 g/L 葡萄糖溶液 10 mL。连续测量 3 次, 取均值作为检测结果。如其中 1 次测量值变异大于均值的 10%, 则再检测 1 次, 取 4 次的均值。

2 结果 Hemo 法测得 CO 为 (4.9 ± 1.1) L/min, TD 法为 (6.3 ± 1.5) L/min。F 值为 13.31, P < 0.001。两法测得 CO 差值的均值为 -1.4 L/min, 标准差 1.1 L/min, 95% 一致性区间为 -3.6 ~ 0.8 L/min。回归方程为 Hemo = 1.69 + 0.50 Td, r = 0.48, 相关系数为 0.692。

3 讨论 TD 测量 CO 在过去 30 a 得到国内外广泛接受并用于术中、ICU 的心功能监测, 是目前 CO 测量的金标准。近年来, 血流动力学监测仪发展迅速, 无创、连续和实时监测成为新的趋势。其中, 超声多普勒技术相对较成熟, 国外对其临床应用的评价文章较多, 但一直存在争论。Moxon 等^[1]对 13 例心脏手术后患者用 Hemo 和 TD 同时测量 CO。研究发现, 两法的相关系数为 0.81。Jaeggi 等^[2]却发现两者的相关系数仅为 0.09, 据此认为不能单用 Hemo 监测 CO, 且目前难以替代 TD。著名医学统计学家 Altman 和 Bland 认为相关系数和回归不能正确评价测量研究, 推荐采用 Bland-Altman 分析来评价, 用 95% 一致性区间代替相关和回归。

分析造成本研究 Hemo 和 TD 测量结果有较大差异的因素, 可能有以下这些。Hemo 方面: 定位虽有多种衡量指标, 但实际操作仍有一定难度; 测量结果易受电刀干扰; 术中吸痰、患者体位变动、手术操作也可影响探头位置, 因而影响结果。TD 方面: 冰水的误差, 冰水进入人体前温度升高造成测得 CO 增大; CO 结果受注入时间影响, 肺动脉温度基线水平随呼吸变化, 因此注射冰水应与通气周期中某一点同步。虽然研究中已经注意, 但影响难以全部排除; 输液速度对测量的影响, 补液过快会造成测量值偏低, 但因病情因素, 研究中有时补液较快, 病理状态的影响, 如左向右分流, 右向左分流亦可影响测量结果。

【参考文献】

- [1] Moxon D, Pinder M, van Heerden PV. Clinical evaluation of the HemoSonic monitor in cardiac surgical patients in the ICU [J]. *Anaesth Intensive Care*, 2003 31(4): 408-411.
- [2] Jaeggi P, Hofer CK, Klaghofer R, et al. Measurement of cardiac output after cardiac surgery by a new transesophageal Doppler device [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2003 17(2): 217-220.

编辑 井晓梅

收稿日期 2005-09-13; 接受日期 2005-10-21

作者简介 龚毅, 硕士, 医师。Tel: 13599065623 Email: gongyizhou@hotmail.com