

与肺癌源性 HSP70 特异性结合单链融合抗体的筛选与序列分析

杨继要¹, 张慧珍², 王 静³, 吴逸明⁴, 买淑鹏²

Identification and Sequence Analysis of Fused scFv Antibody Binding Specifically to HSP70

YANG Ji-yao¹, ZHENG Hui-zhen², WANG Jing³, WU Yi-ming⁴, MAI Shu-peng²

1. Department of Histology and Embryology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Department of Environmental Health, College of Public Health; 3. Department of Respiration, the First Affiliated Hospital; 4. Department of Labor Health, College of Public Health
Corresponding Author: Wu Yi-ming, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

Abstract :Objective To identify the specific fused antibodies binding to HSP70 extracted from lung cancer by biopanning from a human scFv phage library of lung cancer. **Methods** HSP70 extracted from lung cancer was used as antigen to biopan human scFv phage library of lung cancer after four rounds of biopanning. High affinity and specificity positive monoclonal phage antibody was identified by ELISA. PCR was carried out for identification of the positive clones which combined with scFv gene sequence. DNA sequencing of positive clone was analyzed by Automated DNA sequencers, and their homologous sequences were searched in GeneBank. **Results** one positive clone was chosen and a single chain antibody with the functional variable region sequences was identified by searching GeneBank. **Conclusion** single chain fused antibody binding specially to HSP70 was selected from the phage library, and it lays the foundation for further research about preparation for the soluble antibody and drug target anti-tumor therapy.

Key words Lung cancer; Phage antibody library; HSP70; Biopanning

摘要:目的 从人源性肺癌噬菌体单链抗体库中筛选与肺癌源性 HSP70 特异性结合的融合抗体。方法 以肺癌源性的 HSP70 为抗原,对人源性肺癌噬菌体单链抗体库中经四轮筛选,单克隆噬菌体抗体与抗原 HSP70 结合经 ELISA 检测筛选出阳性菌株,再经 PCR 进一步鉴定,确定含有单链抗体基因的克隆并测序,测序结果通过 GeneBank 比对进行同源性分析。结果 获得了 1 个特异性强的阳性噬菌体克隆。经 DNA 测序后,在 Genebank 中与人的免疫球蛋白库进行比对,确定为单链抗体片段。结论 从人源性肺癌噬菌体单链抗体库中筛选到与 HSP70 特异性结合的具有功能活性的单链融合抗体,为进一步的 HSP70 可溶性抗体的制备以及以可溶性 HSP70 抗体为载体的药物导向抗肿瘤治疗奠定了基础。

关键词:肺癌;噬菌体抗体库;HSP70;筛选

中图分类号:R734.2;Q503 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)05-0331-03

0 引言

热休克蛋白 70 (Heat Shock Protein 70, HSP70)在很多肿瘤中高表达,研究表明^[1,2],肿瘤细胞的 HSP70 特异性表达于细胞表面,与正常组织细胞的细胞内表达不同。

本研究从构建的人源性肺癌噬菌体单链抗体库中筛选抗 HSP70 抗体,旨在寻找有临床应用价值的抗体,为肺癌免疫治疗奠定理论基础。

收稿日期:2005-09-28;修回日期:2006-01-10

作者单位:1. 450052 郑州大学基础医学院组织学与胚胎学教研室,2. 公共卫生学院环境卫生教研室,3. 第一附属医院呼吸内科,4. 公共卫生学院劳动卫生教研室

通讯作者:吴逸明, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

作者简介:杨继要(1971-),女,博士,讲师,主要从事肺癌分子生物学研究

1 材料和方法

1.1 材料 人源性肺癌噬菌体单链抗体库由我室张慧珍博士构建,库容为 1.2×10^{12} , -70 保存。TG1 大肠杆菌、KM13 辅助噬菌体为本实验保存。鼠抗 M13 单克隆抗体购自 Amersham 公司。鼠抗人 HSP70 一抗、兔抗鼠二抗购自北京中山公司,抗原 HSP70 由我研究室从肺癌组织中提取总蛋白,经过 ConA 亲和柱、透析、DEAE 离子交换柱获得,经 WESTERN-BLOT 鉴定具有抗原性。胰酶及其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 辅助噬菌体的制备 方法参照 Griffine 噬菌体抗体库操作手册:辅助噬菌体 M13 扩增并定量稀释到 1×10^{12} pfu/ml,分装后置 4 保存。

1.2.2 噬菌体抗体库的扩增和抗体库滴度测定

(1) 噬菌体抗体库的扩增 取 100 μ l 原库菌液,接种到 100ml 2YT-AG(含 100 μ g/ml 氨苄青霉素,1%葡萄糖的 2YT)培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.4;加 1ml 辅助噬菌体 KM13 于 25ml 培养液,37 $^{\circ}$ C 水浴 30min,4 $^{\circ}$ C 离心后弃上清;用 50ml 2YT-AK(含 100 μ g/ml 氨苄青霉素,50 μ g/ml 卡那霉素的 2YT)重悬沉淀,37 $^{\circ}$ C 培养过夜;4 $^{\circ}$ C 离心,上清即为扩增后的噬菌体抗体库。加 10ml PEG/NaCl 于上清中,冰浴 1h 后离心弃上清,用 PBS 洗涤沉淀,再重悬于含 15%甘油的 PBS 中,-70 $^{\circ}$ C 保存。

(2) 抗体库滴度测定 取 1 μ l 浓缩后的抗体库上清,用 PBS 100 倍梯度稀释,每个稀释度均加入 900 μ l 新鲜制备的大肠杆菌 TG1 (OD₆₀₀ = 0.4),37 $^{\circ}$ C 水浴 30min 后涂 TYE 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日计数菌落估计噬菌体抗体滴度:用噬菌体颗粒的菌落形成单位表示,pfu/ml = 集落数 \times 稀释倍数。定量稀释到 1 $\times 10^{12}$ pfu/ml 保存。

1.2.3 以肺癌组织中纯化的 HSP70 为抗原对抗体库进行四轮筛选 以纯化的 HSP70(10 μ g/ml)包被酶标板 4 个孔,室温放置过夜;次日用 2%MPBS(含 2%脱脂奶粉的 PBS)室温封闭,每孔加 1 μ l 融合抗体上清和 100 μ l 2%MPBS,室温孵育;弃上清,洗孔后,加入含胰酶的 PBS 400 μ l 洗脱噬菌体;加 200 μ l 洗脱液于 1.8ml OD₆₀₀ = 0.4 的 TG1 菌液中,37 $^{\circ}$ C 水浴 30min 后,取 10 μ l 涂 TYE 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日从 TYE 板上刮下菌落,所得到的菌落被扩增并用于制备下一轮筛选用噬菌体。剩余则测噬菌体抗体滴度。共进行四轮筛选。计算每轮投入和产出率。

1.2.4 抗体库的初步鉴定

(1) 从单个含噬菌粒细菌克隆制备融合抗体

从每一轮筛选后过夜培养的 TYE 平板上随机挑取 12 个单个细菌克隆,接种到含 200 μ l 2YT-AG 的酶标板孔中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,标记为母板;另取一块酶标板,标记为检测板,每孔加 200 μ l 2YT-AG,从母板中取 10 μ l 过夜培养物于检测板相应孔中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h;每孔加入 1 μ l 辅助噬菌体 KM13,37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h。离心弃上清,每孔加 200 μ l 2YT-AK,培养过夜,离心,上清即表面表达有融合抗体的单克隆噬菌体,4 $^{\circ}$ C 保存。

(2) 单克隆噬菌体与 HSP70 结合的 ELISA 检测 抗原 HSP70 包被酶标板(操作同上),向每孔加 50 μ l 单克隆噬菌体抗体上清液,2%MPBS 洗涤后,加入二抗 HRP-anti-M13;阳性对照为一抗(鼠抗

人 HSP70),二抗(兔抗鼠 IgG);阴性对照仅加入 2%MPBS。以 TMB 为底物,2M 硫酸终止反应,取经酶标仪检测 OD₄₀₅ ~ OD₆₃₀ 的平均值,以 OD 值大于阴性对照平均值的 2 倍,判断为阳性。

1.2.5 质粒提取及 PCR 扩增 将第四轮筛选后获得的阳性克隆菌接种平板培养过夜,挑取单克隆菌接种液体培养基,培养后提取质粒,PCR 扩增。引物 VH10 5' TTA TCA TCGA GCGGCCNNNNNGGCCGAGGTGCA GCTGKTGGA G3'(K = T, G)和引物 VL1/2 5' GTTATGGTTCGAACGCGCGGC-CGCTAGGACGGTSASCTTGGTCC3'(S = G, C),扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.6 单链抗体 DNA 序列测定及核苷酸序列分析 PCR 扩增阳性菌由上海基康生物公司测序,所得序列在 GeneBank 中与人的免疫球蛋白库进行比对,并进行可变区序列分析。

2 结果

2.1 初级噬菌体抗体库滴度 含重组噬菌粒的库容为 1.2 $\times 10^{12}$ 的抗体库经 KM13 辅助噬菌体辅助感染后,得到表达融合抗体的初级噬菌体抗体库,滴度为 4.2 $\times 10^{16}$ pfu/ml。

2.2 噬菌体淘洗产率 以纯化的肺癌相关蛋白 HSP70 为抗原进行了四轮“吸附-洗脱-扩增”的筛选,洗脱的噬菌体产率显示第四轮与第三轮的回收率相近,说明经过筛选后阳性克隆已得到富集,见表 1。

表 1 各轮筛选过程中噬菌体的回收率

筛选次数	投入量	产出量	回收率(%)
1	4.2 $\times 10^{13}$	8.0 $\times 10^2$	1.9 $\times 10^{-9}$
2	2.4 $\times 10^{13}$	2.0 $\times 10^5$	8.3 $\times 10^{-7}$
3	3.0 $\times 10^{13}$	4.2 $\times 10^6$	1.4 $\times 10^{-5}$
4	4.0 $\times 10^{13}$	7.2 $\times 10^6$	1.8 $\times 10^{-5}$

注:回收率(%) = 投入噬菌体量/产出噬菌体量 $\times 100\%$

2.3 单克隆噬菌体抗体与 HSP70 结合的 ELISA 检测结果 从四轮中每轮随机挑取 12 个单细菌克隆制备噬菌体融合抗体,与包被的 HSP70 抗原反应经 ELISA 检测,共得到 5 个阳性克隆(第一轮 0 个,第二轮 1,第三轮 1 个,第四轮 3 个)。

2.4 阳性克隆菌的质粒 PCR 鉴定结果 5 个阳性菌经质粒提取后行 PCR 扩增,经凝胶电泳,可见只有 1 个克隆片段为 800bp 左右,符合抗体片段的理论值,见图 1。

2.5 单链抗体 DNA 序列分析结果 将筛选出的 1 个单克隆菌交上海基康生物公司采用通用引物 LMB3 测序,所得序列在 GeneBank 中进行对比,结

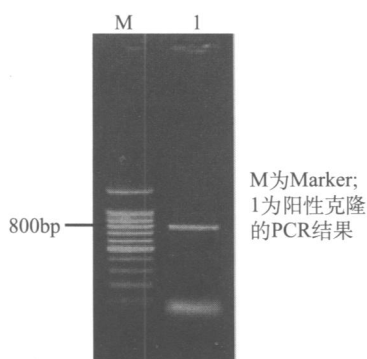


图 1 质粒 PCR 电泳鉴定图

果表明该克隆含有人类免疫球蛋白同源序列,测序结果(VH + Linker + VL)如下,下划线部分为 Linker。

5' CA GGTACA GCTGCTGGA GTCGGGTCCA GGGACCCA
 ACTGGA GA TAAACGTGC GGCCGCA GGTGCGCCGGT
 GCCGTA TCCGGA TCCGCTGGA ACCGC GTGCCGCA GA
 GACTGTTGAAA GTTGT TTA GCAAAACCTCA TACA G
 AAAATTCA TTTACTAACGTCTGGAAA GACGACAAA
 ACTTTA GA TCGTTACGCTAACTA TGA GGGCTGTCTG
 TGGAA TGCTACA GGC GTTGTGGTTTGTACTGGTGAC
 GAAACTCA GTGTTACGGTACATGGGTTCCTATTGGG
 CTTGCTA TCCCTGAAAA TGA GGGTGGTGGCTCTGA G
 GGTGGCGGT TCTGA GGGTGGCTA TTTA TACCTTACC
 TCTCTA TCCTCCTCA TTGC GGTCATTCACCTGGTCA
 CCGTCTCCTCACTGCA GGGTGGCGGTGGCTCGGGCGG
TGGTGGGTCGGGTGGCGGCGGA TCGGTGCACCA GTC
 TGTCTTGACGCA GCCGCCTTACTA TGTGCTGACTCA G
 CCACCTCA GCGTCA GTGGCCCCA GGAAA GACTGCCA
 GGCTTACCA GTGGGGCAACAACA TTGGCA GTAAAA
 GTGTGGACTGGTACCA GCA GAA GCCA GGCCA GGCT
 CTGTGCTGGTCA TCTA TTA TGA TA GC GACC GGGACT
 CACGGA TCCCTGA GC GAT TCTCTGGCTCCA ACTCTG
 CGAACACGCCA CCCTGACCA TCA GCACGGTCGAA GC
 CGGGGA TGA GGCCGACTA TTACTCTCA GGTGTTA GA
 CGGTA GTA GTGA TCA TCCGCCACGACTACGCCAA GC
 TTTGGACCAA GCTGACCGTCTTA GCGGCCGC 3'

3 讨论

近几年来随着更多肿瘤相关抗原的发现,基因工程抗体技术的日渐完善,新一轮以抗体为导向的肿瘤治疗又开始备受关注^[3]。20 世纪 90 年代初,人们将噬菌体展示技术应用于抗体克隆和表达,使抗体的制备技术产生突破性的进展^[4,5],与传统的杂交瘤技术相比,噬菌体展示技术筛选容量大,简便,易于进行抗体的改造,并且不需经免疫即可大量制备抗体,因此在肿瘤的诊断和治疗,肿瘤疫苗研制方面应用前景广阔^[6]。

HSP70 在很多人类肿瘤组织细胞中均有较高

的表达,肿瘤来源的 HSP70 诱导的抗肿瘤免疫是当前研究的热点。以往的研究表明^[2,7],HSP70 激发有效抗肿瘤免疫效应的抗原性来源于它所结合的多肽,而不是 HSP70 本身。但是,根据肿瘤细胞的 HSP70 特异表达于细胞表面,而正常细胞则是细胞内表达的特性,作者推测,可以利用该特性,制备肿瘤源性的 HSP70 抗体,使 HSP70 可作为肿瘤相关抗原而不是仅仅作为“肿瘤抗原载体”或者“免疫佐剂”来诱导的抗肿瘤免疫,成为以 HSP70 为基础的肿瘤靶向治疗的另一个切入点。

本研究作为先期研究工作,以肺癌组织中纯化出的具有抗原活性的 HSP70 作为抗原,从人源性肺癌噬菌体单链抗体库中筛选 HSP70 抗体,经四轮筛选,得到富集后的噬菌体抗体库。从四轮随机挑取的 48 个菌落中,经单克隆噬菌体抗体与 HSP70 结合的 ELISA 检测出中鉴定 5 个含单链融合抗体的阳性克隆,经随后的 PCR 鉴定,在 1 株阳性克隆中获得与理论值一致的 DNA 扩增片段,进一步序列分析表明该克隆含有完整 scFv 基因片段,在 GeneBank 中与人免疫球蛋白文库比对表明,其具有完整开放阅读框,其插入序列的相应酶切位点及 Linker 序列与载体图谱完全吻合,本研究为下一步的 HSP70 可溶性抗体的制备以及以可溶性 HSP70 抗体为载体的药物导向抗肿瘤治疗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Multhoff C, Botzler C, Wiesent M, et al. A stress-inducible 72-Kda-heat shock protein (HSP) is expressed on the surface of human tumor cells but not on normal cells[J]. Cancer, 1995, 61 (4): 272-273.
- [2] Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, et al. Unusual expression and localization of heat shock proteins in human tumor cells [J]. Int J Cancer, 1992, 51 (4): 613-619.
- [3] Romanov VI. Phage display selection and evaluation of cancer drug targets[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2003, 3 (2): 119-129.
- [4] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains [J]. Nature, 1990, 348 (6301): 552-554.
- [5] Kang AS, Barbas CS, Janda KD, et al. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab library along phage surfaces[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88 (10): 4363-4366.
- [6] Hoogenboom HR. Overview of antibody phage - display technology and its applications[J]. Methods Mol Biol, 2002, 178: 1-37.
- [7] 刘志勇,董驹,张树波,等.人肺癌 GLC-82 细胞热休克蛋白 70 多肽复合物的提取及对细胞毒性 T 淋巴细胞作用的实验研究[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32 (3): 141-143.

[编辑:刘红武]