

技术方法

DOI:10.11699/cyxh20130918

人源甲状腺髓样癌噬菌体抗体库的构建及初步鉴定

胡小丽,王政杰,庞 华

(重庆医科大学附属第一医院核医学科,重庆 400016)

【摘要】目的:应用噬菌体抗体展示技术,构建大容量天然人源甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)噬菌体单链抗体库。**方法:**提取 MTC 病人癌周淋巴结总 RNA,通过 RT-PCR 方法获得抗体可变区基因 V_H 和 V_L 基因片段,以它们为模板分别扩增 V_H -Linker 和 V_L -Linker,再用剪切重叠延伸 PCR 技术将之拼接组装成单链抗体可变区基因片段(single chain fragment variable, scFv)后引入酶切位点 *Sfi* I 和 *Not* I。将 scFv 基因克隆入噬菌粒载体 pCANTAB-5E 后经电转入大肠杆菌 *E. coli* TG1,之后经辅助噬菌体 M13K07 超感染,构建人源 MTC 噬菌体单链抗体库。PCR 鉴定 scFv 片段阳性插入率,1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆双酶切产物。**结果:**MTC 周围淋巴结总 RNA 的琼脂糖电泳结果可见清晰的 28 S、18 S 条带; V_H 基因的大小约为 370 bp, V_L 基因为 350 bp,组装后的 scFv 基因约为 750 bp。用 pUC19 标准质粒测定转化效率达到 10^8 cfu/ μ g, scFv 的阳性插入率为 87.5%(21/24)。**结论:**成功地构建了人源 MTC 噬菌体展示文库,为进一步筛选具有 MTC 细胞特异性的人源噬菌体单链抗体奠定了实验基础。

【关键词】噬菌体展示技术;噬菌体单链抗体;甲状腺髓样癌;构建

【中国图书分类号】R581.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-12

Construction of human medullary thyroid carcinoma phage antibody library and preliminary identification

HU Xiaoli, WANG Zhengjie, PANG Hua

(Department of Nuclear Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct natural human medullary thyroid carcinoma phage antibody library using phage display technology. **Methods:** Total RNA was extracted from the lymphatic tissue around medullary thyroid carcinoma. V_H and V_L fragments were amplified with RT-PCR, which were used as templates to amplify V_H -Linker and V_L -Linker. Then restricted enzyme cutting sites *Sfi* I and *Not* I after single chain fragment variable(scFv) gene fragments was assembled with splicing-overlap-extension PCR. The scFv gene was cloned in pCANTAB-5E plasmid then transferred to *E. coli* TG1. After the helper phage M13K07 infection, a human phage antibody library was constructed. The insertion ratio of scFv gene was identified with PCR and the double enzyme digestion products of positive clones were analyzed with 1.0% agarose gel electrophoresis. **Results:** Clear 28 S and 18 S strips were found in total RNA; size of V_H gene was about 370 bp, of V_L gene was about 350 bp and of scFv gene was about 750 bp. Determination of conversion efficiency reached 10^8 cfu/ μ g with pUC19 standard plasmid and the positive insert ratio was 87.5%(21/24). **Conclusions:** Human medullary thyroid carcinoma phage display library is constructed successfully. It could provide experimental basis for further screening of people with medullary thyroid cancer cell-specific phage single-chain antibody.

【Key words】phage display; single-chain antibody of phage; medullary thyroid carcinoma; construction

甲状腺癌是危害人类生命健康的常见的恶性肿瘤,甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)起源于甲状腺滤泡旁细胞^[1],又称 C 细胞,是甲状腺癌中少见的病理类型,1959 年由 Hazard 首

先提出,并将其作为一个独立的临床病理类型^[2],约占全部甲状腺癌的 5%~10%^[3]。虽然 MTC 发病率并不高,但 MTC 起病隐匿,其癌组织具有多灶性和淋巴结转移早等特点,容易被延误诊治,故 50% 以上的患者就医时已有颈部淋巴结转移,因此实现早期诊断、早期治疗是治疗 MTC 的重要策略。目前肿瘤研究中,自身抗体作为肿瘤早期诊断的标志物已成

作者介绍:胡小丽,Email:397142613@qq.com,

研究方向:肿瘤核医学。

通信作者:庞 华,Email:ph1973@163.com。

为肿瘤早期诊断领域的研究热点,备受重视^[4]。噬菌体抗体库技术掀起了抗体技术的第 3 次革命,它易于体外筛选和扩增,不需要繁杂的大规模的细胞培养和动物饲养即可得到人源单克隆抗体。本研究利用噬菌体展示技术,构建人源 MTC 噬菌体单链抗体库,从而可以从抗体库中筛选出与 MTC 特异性结合的噬菌体单链抗体,拟解决 MTC 早期诊断的问题。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 噬菌粒及试剂 总 RNA 抽提试剂盒,RT-PCR 试剂盒均购自北京百泰克生物技术有限公司。*Sfi* I 和 *Not* I 限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶均购自大连宝生物公司,胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、均购自上海鼎国生物科技有限公司。噬菌粒载体 pCANTAB-5E、辅助噬菌体 M13K07、大肠杆菌 *E. coli* TG1 均购自 NEB 公司。

1.1.2 PCR 引物 PCR 引物参考文献[5-6]设计,委托重庆迈凯科技有限公司合成。网格筛选出 V_H 和 V_L 基因片段的引物对。扩增重链可变区引物对:5'-TGAAGAGACGGTGACCA-TTGTCCC-3';5'-GAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC-3'。扩增轻链可变区引物对:5'-ACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCC-3';5'-GAAACGACACTCACGCAGTCTCC-3'。扩增 V_H -Linker 引物对:5'-AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCT-CCACCT-GAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3';5'-GAGGTGCAGCTG-TTGCAGTCTGC-3'。扩增 V_L -Linker 引物对:5'-ACGTTTG-ATCTCCACCTTGGTCCC-3';5'-GTTTCAGCGGAGGTGGC-TCTGGCGGTGGCGGATCGGAAACGACACTCACGCAGTCTC-C-3'。引入酶切位点的引物:5'-GTCCTCGCAACTGCGGCC-CAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGC-3';5'-GAGTCATTCTCGACTTGGCGCCGACGTTTGATCTCCA-CCTTGGTCCC-3'。

1.2 方法

1.2.1 MTC 病人癌周淋巴结总 RNA 提取 术中分离的甲状腺癌患者(重庆医科大学附属第一医院内分泌外科甲状腺癌病人 5 例,手术后经病理确诊均为 MTC)癌周淋巴结,用无菌纱布包好后,迅速放入临时液氮盒中冻存。取回后一部分立即进行总 RNA 提取,余下淋巴结组织放入液氮中保存。总 RNA 提取按照试剂盒说明操作。琼脂糖电泳判断 RNA 的完整性,分光光度计测 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 判断 RNA 的纯度,将提取的 RNA 贮存于 -80 °C。

1.2.2 RT-PCR 逆转录反应(cDNA 第 1 链的合成) 参照试剂盒说明进行。

1.2.3 V_H 和 V_L 基因扩增 以 cDNA 为模板和确定好的引物对分别扩增 V_H 和 V_L 基因片段。PCR 反应条件:94 °C,5 min 1 个

循环,94 °C 30 s,53 °C 30 s,72 °C 30 s min,35 个循环,72 °C,10 min,1 个循环。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳(1.0%)纯化回收 V_H 和 V_L 基因片段。

1.2.4 scFv 基因的组装及 SOE-PCR

1.2.4.1 V_H 和 V_L 基因片段延伸连接肽 V_H -linker 和 V_L -linker

用上述纯化后的 V_H 和 V_L 基因片段作为它们延伸连接肽的模板,用相对应的 HuJ_h3FORLinker 和 hHuV_H5aBACK 扩增 V_H -linker,用相对应的 Linker-HuV_L5aBACK 和 HuJ_k4FOR 扩增 V_L -linker。

1.2.4.2 SOE-PCR(剪切重叠延伸 PCR) 将上述扩增的 V_H -Linker 和 V_L -Linker 的 PCR 产物在无引物情况下用 SOE-PCR 连接:首先变性步骤 94 °C 5 min,1 个循环;94 °C 1 min,60 °C 1 min,72 °C 1.5 min,5 个循环;然后加入含酶切位点引物 HuV_H5aBACKSfi 和 HuJ_k4FORNot,94 °C 30 s,60 °C 1 min,72 °C 1.5 min,35 个循环,胶纯化回收 scFv。

1.2.5 噬菌体抗体文库的构建 单链抗体基因先后用限制性内切酶 *Sfi* I 和 *Not* I 酶切过夜,产物纯化后,与同样酶切后噬菌体载体 pCANTAB-5E 进行连接反应,连接产物纯化后,电转化大肠杆菌 *E. coli* TG1,涂 LB 平板,同时用 pUC19 标准质粒测定转化效率,在含 2%葡萄糖和 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基上 37 °C 培养过夜。

1.2.6 噬菌体抗体文库的滴定 将抗体库梯度稀释,取 1 μl 抗体库液感染 100 μl 大肠杆菌 TG1($A_{600\text{ nm}} \approx 1$),37 °C 孵箱静置 15 min,涂 SOBAG 板,37 °C 培养过夜,计数菌落,并计算出菌落形成单位(cfu)。

1.2.7 PCR 法鉴定抗体基因插入率 挑取 24 个细菌集落,加入 5 ml 含氨苄青霉素 100 μg/ml 的 LB 培养过夜。按质粒提取试剂盒说明提取质粒,取 1 μl 为模版, HuV_H5aBACKSfi 和 HuJ_k4FORNot 为引物作 PCR 扩增,产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.8 阳性克隆酶切鉴定 对 PCR 阳性的克隆进行 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切鉴定,产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳,鉴定是否可见目的片段释放。酶切阳性的质粒委托上海英俊生物技术有限公司进行测序。

2 结果

2.1 淋巴结总 RNA 的提取

MTC 病人淋巴结总 RNA 用 1.0%琼脂糖凝胶电泳判断 RNA 的完整性,可见 2 条带 28 S 和 18 S,而且 28 S 条带的亮度是 18 S 的 2 倍(图 1)。分光光度计测 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 判断 RNA 的纯度>1.8。

2.2 V_H 和 V_L 基因扩增产物的鉴定

V_H 和 V_L 基因扩增后,经 1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定, V_H 基因的大小约为 370 bp, V_L 基因为 350 bp(图 2)。

2.3 单链抗体可变区基因片段(single chain fragment variable, scFv)基因的组装

scFv 基因组装后,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,组装后的 scFv 基因约为 750 bp (图 3)。

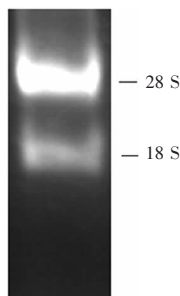
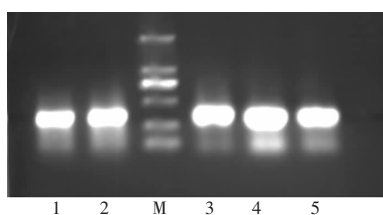


图 1 MTC 癌周淋巴结总 RNA

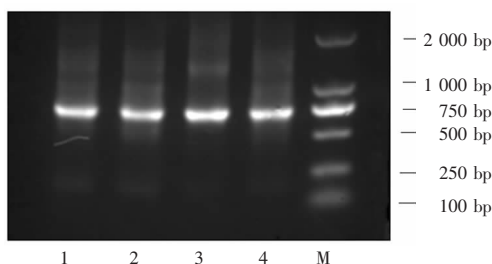
Fig.1 Total RNA of lymph nodes around MTC



M. DL2000; 1, 2. V_H 片断; 3~5. V_L 片断

图 2 抗体重链 V_H 和轻链 V_L 可变区 PCR 扩增片段的琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig.2 Agarose gel electrophoresis identification of antibody variable range V_H and V_L



M. DL2000; 1~5. scFv 片断

图 3 拼接后的单链抗体基因的琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig.3 Agarose gel electrophoresis identification of single antibody gene after link

2.4 PCR 连接产物的转化效率的测定

pUC19 标准质粒测定大肠杆菌 TG1 转化效率为 10^8 cfu/ μ g, PCR 连接产物的转化效率为 2.3×10^7 cfu/ μ g。

2.5 PCR 法鉴定抗体基因插入率

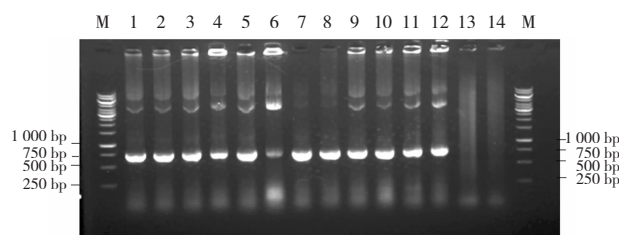
随机挑取 24 个克隆质粒进行 PCR 法检测, 21 个克隆扩增出 scFv, 目的基因插入率为 87.5% (图 4)。

2.6 双酶切鉴定抗体基因插入率

随机挑取 8 个单克隆质粒以 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切, 均可见目的片段的释放 (图 5)。

2.7 酶切阳性质粒测序结果

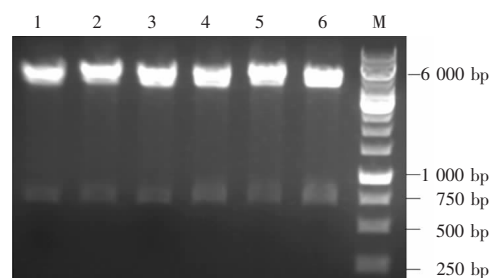
测序结果表明与整码的 scFv 编码序列符合率达 98%。



M. 1 kb DNA Ladder; 1~12. PCR 阳性; 13、14. PCR 阴性

图 4 随机挑取克隆质粒 PCR 鉴定

Fig.4 PCR identification of randomly picked clones plasmid



M. 1 kb DNA Ladder, 1~6. scFv 的片断 (下) 和载体 (上)

图 5 阳性克隆 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切结果

Fig.5 Double enzyme results of positive clone *Sfi* I and *Not* I

3 讨论

MTC 是一种起源于甲状腺滤泡旁细胞 (C 细胞) 的恶性肿瘤, 具有分泌降钙素且不具备摄碘功能, 其恶性程度介于分化型与未分化甲状腺癌之间, 虽然 MTC 发病率并不高, 但其起病隐匿且癌组织具有多发性和淋巴道转移出现早的生物学特性, 易被延误诊治, 故很多患者就诊时已有颈部淋巴结转移, 因此多数患者疗效效果欠佳。目前认为 MTC 除了外科手术, 其它治疗方法基本无效^[7]。近些年来, 肿瘤的生物治疗被认为一种重要的治疗手段被广泛的研究和应用于临床, 已成为人们日益关注的焦点。

噬菌体展示技术的出现, 是基因工程抗体库技术的一个里程碑, 使得单抗制备的方法发生了根本的革新, 它既完全摆脱了鼠源单抗的 HAMA 反应 (人鼠免疫反应), 又具备抗体多样性的机制, 将抗体可变区基因 V_H 和 V_L 通过 RT-PCR 进行克隆和扩增, 并随机组合电转入表达载体, 使得抗体的人源化成为可能。噬菌体展示在实用性方面有着独特的优势, 很大程度上推动了生物医学研究的进步发展, 特别是在对蛋白质的研究与应用方面显示了强大的实用价值^[8]。scFv 被认为是抗原结合的最小活性单位^[9]。是抗体重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L 由

一个肽段(linker)首尾相连形成的单一肽链,具有分子量小、组织穿透力强、靶/非靶比值高、免疫原性低、组织损害小且易于基因工程制备和改造等优点,在基因抗体工程的研究中有着重要地位。噬菌体单链抗体指将 scFv 表达在噬菌体表面或称丝状噬菌体,这种表面表达是通过单链抗体与单链噬菌体外壳蛋白(PⅢ或 PⅧ)融合形成。噬菌体展示技术将表型和基因型联系在一起^[10],把抗体抗原识别性和噬菌体自身可扩增的能力紧密结合在一起,成为一项高效率的表达和筛选体系,在生物技术领域有着广阔的应用前景。

本文利用噬菌体展示文库技术,从患者癌周淋巴结中克隆出抗体可变区基因V_H和V_L,以pCANTAB-5E为载体,构建了全人源甲状腺髓样癌噬菌体单链抗体库,滴度达 2.1×10^{10} cfu/ml,库容为 3×10^5 ,PCR鉴定目的片段的阳性插入率为87.5%,且双酶切后可见目的片段的释放,表明本实验成功构建了人源MTC噬菌体单链抗体库,为进一步筛选和鉴定具有TT细胞特异亲和力的人源性噬菌体单克隆抗体奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Brandi M L, Gagel R F, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2[J]. J Clinical Endocrinology and Metabolism, 2001, 86(12): 5658–5671.
- [2] 廖二元, 超楚生. 内分泌学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1329–1341.
- Liao E Y, Chao C S. Hemadenology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 1329–1341.
- [3] Raue F, Frank-Raue K, Grauer A. Multiple endocrine neoplasia type 2. clinical features and screening[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 1994, 23(1): 137–156.
- [4] 刘卫红, 李志, 王鹏, 等. 肿瘤相关抗原抗体联合检测在肺癌早期诊断中的价值评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(12): 1412–1414.
- Liu W H, Li Z, Wang P, et al. Evaluation of diagnostic value on lung cancer using a panel of multiple tumor-associated antigens[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 16(12): 1412–1414.
- [5] Marks J D, Hoogenboom H R, Gonnert T P, et al. By-passing immunization human antibodies from V-gene libraries displayed on phage[J]. J Mol Biol, 1991, 222(3): 581–597.
- [6] Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibody for the treatment of autoimmune diseases[J]. Drug Discov Today, 2003, 8(18): 845–851.
- [7] 陈瑞慧, 刘勤江, 廖世奇. 甲状腺髓样癌的研究进展[J]. 甘肃医药, 2012, 31(5): 355–359.
- Chen R H, Liu Q J, Liao S Q, et al. Research progress of medullary thyroid carcinoma[J]. Gansu Medical Journal, 2012, 31(5): 355–359.
- [8] 秘勇建, 马志奎, 赵炜疆. 噬菌体展示技术及其应用的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(14): 2766–2768.
- Mi Y J, Ma Z K, Zhao W J, et al. Progress for phage display technique and its application[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(14): 2766–2768.
- [9] 赵岩, 王清明, 付学奇, 等. 噬菌体抗体库的构建及抗乳腺癌细胞单链抗体的筛选[J]. 生物工程学报, 2004, 20(5): 667–672.
- Zhao Y, Wang Q M, Fu X Q, et al. Construction of phage antibody library and screening of single-chain antibody against human breast cancer cells[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2004, 20(5): 667–672.
- [10] 古雅珏, 杨晓仪, 张晓坤. 人源性肺癌噬菌体展示抗体库的构建[J]. 中国医药指南, 2012, 10(19): 22–24.
- Gu Y Y, Yang X Y, Zhang X K, et al. Biochem sex lung cancer phage display antibody library construction[J]. Guide of China Medicine, 2012, 10(19): 22–24.

(责任编辑: 冉明会)

热烈祝贺本刊被 CSCD 核心库收录