

· 论 著 ·

人源乳腺癌噬菌体抗体库的构建及初步筛选*

唐树彬¹, 李少林^{2△}, 彭 杰¹, 邹安娜¹, 罗 弋²

(1. 四川省内江市第一人民医院肿瘤科 641000; 2. 重庆医科大学基础医学院核医学教研室 400016)

摘要:目的 构建人源乳腺癌噬菌体单链抗体库,并筛选乳腺癌特异性单链抗体(Scfv)。方法 利用乳腺癌患者癌旁淋巴结组织来构建抗乳腺癌噬菌体抗体库。通过正常乳腺细胞(MCF-10F)和乳腺癌细胞(MCF-7)筛选富集后,用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测噬菌体抗体活性。**结果** 成功的构建了1个 4.2×10^7 的噬菌体抗体库,并从该库中筛选到6株对乳腺癌细胞株MCF-7有结合活性的阳性克隆。**结论** 从人源乳腺癌噬菌体抗体库中筛选到6株特异性噬菌体抗体,为下一步进行单链抗体的乳腺癌放射性核素显影及治疗奠定了基础。

关键词:乳腺癌;噬菌体抗体库;筛选;单链抗体**中图分类号:**R737.9;R730.44**文献标识码:**A**文章编号:**1671-8348(2010)05-0516-03

Constructing humanize phage antibody library and screening antibody binding to breast cancer*

TANG Shu-bin¹, LI Shao-lin^{2△}, PENG Jie¹, et al.

(1. Department of Oncology, First People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan 641000, China;

2. Department of Nuclear Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct humanize phage antibody library against breast cancer and to screen specificity Scfv to breast cancer. **Methods** To construct phage library from tumor adjacent lymphatic tissue of breast cancer patients. After screening and amplifying by normal lacteal gland cell (MCF-10F) and breast cancer cell (MCF-7), the binding activity of antibody was detected by ELISA. **Results** A phage antibody of 4.2×10^7 was obtained and six active clones against breast cancer cell MCF-7 were gained from the Scfv library. **Conclusion** Six antibody binding to breast cancer cell more strongly were identified from humanize phage antibody library. This work provides us the basis for radionuclide imaging and therapy for breast cancer.

Key words: breast cancer; phage antibody library; screening; Scfv

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,全世界每年约有120万妇女发生乳腺癌,有50万妇女死于乳腺癌,发病率占全年各种恶性肿瘤的7%~10%^[1]。我国乳腺癌的发病率虽较西方国家为低,但近年来亦有上升趋势。目前,以超声及X线等为主的乳腺癌诊断方法,对早期乳腺癌的诊断尚缺乏足够的准确性和特异性。而以手术、化疗和放疗及生物治疗为主的综合治疗又因不良反应太大而在临床应用中受到一定限制。因此,许多学者把目光投向了乳腺癌的抗体诊断及治疗。1985年Smith^[2]提出了噬菌体展示技术概念;1992年Huse等^[3]成功地构建第1个噬菌体组合文库,为肿瘤的诊断及治疗提供了一种全新的方法。但是,目前报道的抗乳腺癌噬菌体抗体库多为鼠源性,因人抗鼠免疫反应而不适合临床运用。本研究利用乳腺癌患者癌旁淋巴结来构建人源性抗乳腺癌抗体库,从而避免了人抗鼠免疫反应而适合于临床运用。

1 材料与方

1.1 材料 RNA抽提试剂盒(RNA Kit)、质粒抽提试剂盒(Plasmid Kit)购自上海华舜生物工程有限公司。RT-PCR试剂盒(RNA PCR Kit)、Sfi I和Not I限制性内切酶、Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶为大连宝生物公司产品。噬菌粒载体pCANTAB5E、辅助噬菌体M13K07、大肠埃希菌E. coli TG1、鼠抗M13噬菌体单克隆抗体(Anti-M13 Monoclonal Antibody)、辣根过氧标记的羊抗鼠抗克隆抗体(HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate)均购自法玛西亚。正常乳腺细胞MCF-10F、乳腺癌细胞MCF-7为本实验室保存。引物参照Xu

等^[4]设计,由北京三博志远生物技术有限公司合成。

扩增VH(重链可变区)基因的引物:5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC-3';5'-CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3'。扩增VL(轻链可变区)基因的引物:5'-ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3';5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'。VH连接Linker的引物:5'-AGA GCC ACC TCC GCC TGA ACC GCC TCC ACC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC-3';5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC-3'。VL连接Linker的引物:5'-GTT CAG GCG GAG GTG GCT CTG GCG GTG GCG GAT CGG ACA TCS WGA TGA C CC AGT CTC C-3'(S.W为兼并引物);5'-GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC-3'。Scfv(单链抗体可变区)扩增的引物(引物的带有Sfi I和Not I内切酶位点):5'-GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG-3';5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC-3'。

1.2 方法

1.2.1 组织来源 将术中分离的乳腺癌患者癌旁淋巴结用无菌纱布包好后迅速放入液氮中冻存。共取14例患者癌旁淋巴结,其病理分型,见表1。

1.2.2 总RNA的提取 首先在盛有液氮的碾钵中迅速把淋巴结组织碾成粉末,这样可以使组织脆硬同时防止RNA破坏^[5]。然后再利用RNA抽提试剂盒进行提取,得到总RNA。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370422)。△ 通讯作者,电话:(023)68485007。

1.2.3 VH 和 VL 基因片段的扩增 首先,通过以 Oligo dT-Adaptor primer 作为引物合成 cDNA,PCR 条件:50 °C 30 min,99 °C 5 min,5 °C 5 min,1 个循环。然后以 cDNA 为模板,以上下游引物配对分别扩增轻链基因片段和重链基因片段,PCR 条件:94 °C 2 min,1 个循环;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 90 s,30 个循环。最后利用 Linker 引物分别扩增 VH-Linker 基因片段和 VL-Linker 基因片段,PCR 条件:94 °C 2 min,1 个循环;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,35 个循环。得到 VH-Linker 基因片段和 VL-Linker 基因片段。

表 1 患者的病理分型 (n)

项目	浸润性导管癌	浸润性小叶癌	髓样癌
Her2/neu 阳性	3	3	0
Her2/neu 阴性	6	1	1

1.2.4 Scfv 基因片段的连接及 PCR 扩增 通过重叠-延伸-拼接 PCR(SOE-PCR)形成单链抗体(Scfv)基因片段。先将胶回收纯化的 VH-Linker 基因片段和 VL-Linker 基因片段进行连接,反应条件为:94 °C 5 min,1 个循环;94 °C 1 min,60 °C 1 min,72 °C 90 s,5 个循环。从而将 VH 基因片段和 VL 基因片段连接形成 Scfv 基因片段。然后再向反应体系中加入 Scfv 扩增的引物(带有酶切位点),反应条件为:94 °C 30 s,60 °C 60 s,72 °C 90 s,5 个循环。形成两端分别带有酶切位点的 Scfv 基因片段。

1.2.5 重组质粒的构建 用 T4 DNA 连接酶连接经 Sfi I 和 Not I 双酶切 Scfv 基因片段和 PCANTAB-5E 载体,用电穿孔法转化 TG1 感受态细菌制备参照文献[6],将转化后的感受态细菌 TG1 铺于氨苄青霉素选择培养基上,培养过夜,计算克隆数。随机挑取 32 个转化后 TG1 菌落,分别加入到 2-YT 培养液中振荡培养过夜,提取质粒,用 PCR 检查 DNA 中是否有 Scfv 基因插入。

1.2.6 抗体库的构建 将阳性细菌克隆铺于 SOBAG 平板上 37 °C 培养过夜,再加入 10 mL 2-YT 培养液收集菌液。用 2-YT 培养液稀释至 A600=0.3。加入氨苄青霉素,终浓度为 100 μg/mL,葡萄糖的终浓度为 2%。37 °C 150 r/min 振荡培养 1 h,再加入 5.1×10¹⁰ puf 的 M13K07 至终浓度为 4×10⁹,37 °C 250 r/min 振荡培养 1 h。4 000 g 离心 20 min,弃上清液。沉淀重悬于 100 mL-YTAK 培养液,30 °C 250 r/min 振荡培养过夜。10 000 g 离心 10 min 沉淀细菌,取上清液加入 1/5 的 PEG/NaCl,冰浴 60 min。10 000 g 4 °C 离心 20 min,弃上清液。沉淀重悬于 1 mL 2-YT 培养液,10 000 g 再次离心 10 min,上清液中加入终浓度为 0.02% 的叠氮钠,4 °C 保存。

1.2.7 噬菌体的筛选 取 107 正常乳腺细胞(MCF-10F),用 2% 的脱脂牛奶/磷酸盐缓冲液(PBS)冰浴 1 h,4 °C 250 r/min 离心 5 min,弃上清液。用 1 mL Scfv 噬菌体抗体库溶液重悬细胞,室温缓摇 1 h,4 °C 250 r/min 离心 5 min,取上清液。在上清液中加入 10⁷ MCF-7 细胞,室温缓摇 1 h,4 °C 250 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入 1 mL PBS 洗涤细胞(第 1 轮洗涤 3 次,第 2 轮洗涤 5 次,第 3 轮洗涤 8 次,以后洗涤 10 次),4 °C 200 r/min 离心 5 min,弃上清液。用 1 mL 0.2% 的 HCL-甘氨酸(pH=2.2)重悬细胞,冰浴 10 min,用 1 mol/L 的 Tris 碱(pH=9.1)中和,4 °C 200 r/min 离心 5 min。上清液即为第 1 轮筛选到的噬菌体,取少许感染生长对数期的 TG1 细胞 3

mL,铺 SOBAG 平板,计数重组噬菌体量。其余噬菌体重新进行第 2 轮筛选,共重复 5 次筛选。

1.2.8 细胞 ELISA 鉴定 Scfv 的特异性 从第 5 轮筛选后 SOBAG 平板上挑取 40 个单菌落,制备噬菌体单链抗体,分别以 MCF-7 细胞和 MCF-10F 细胞作为靶抗原做 ELISA 检测,检测方法参照文献[7]。将细胞用 0.25% 的戊二醛固定于 96 孔培养板中,以 2% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h,将上述单克隆噬菌体 Scfv 各 100 μL 与等体积的 2% 脱脂奶粉混合,室温静置 20 min,加入到平板中,以 0.05% Tween20-PBS 洗涤 6 次。加入鼠抗 M13 噬菌体单克隆抗体为二抗,辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体为三抗,以 TMB 为底物显色,450 波长酶标仪读板。

2 结 果

2.1 总 RNA 的鉴定 从淋巴组织中提取总 RNA 后,经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。电泳可见明显的 8 s 和 28 s 两条带,见图 1。

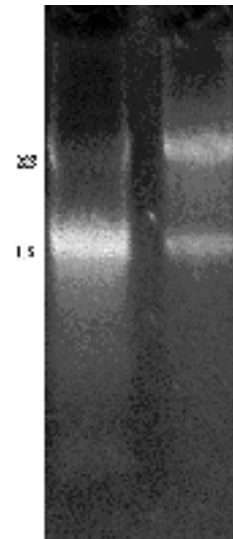


图 1 RNA

2.2 VH 基因片段和 VL 基因片段的鉴定 VH 和 VL 基因扩增后,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果提示 VH 基因片段在 360 bp,VL 基因片段在 300 bp,见图 2。

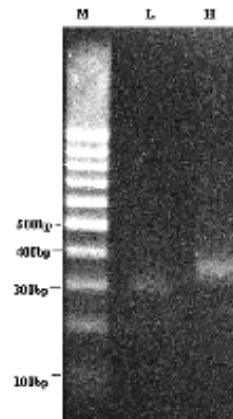


图 2 轻重链

2.3 Scfv 基因片段的鉴定 VH-Linker 基因和 VL-Linker 基因连接后,利用含有 Sfi I 和 Not I 酶切位点的引物进行 PCR 扩增。得到含有酶切位点的 Scfv 基因。利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,结果提示 Scfv 基因在 750 bp 左右,见图 3。

2.4 质粒 DNA 的 PCR 检测 从 SOBAG 平板上随机挑选 32 个单菌落加入 3 mL 2-YT 培养液中振荡培养过夜,取 1.5 mL 提取质粒。质粒 PCR 鉴定提示 Scfv 基因插入率为 81%(26/32),见图 4。

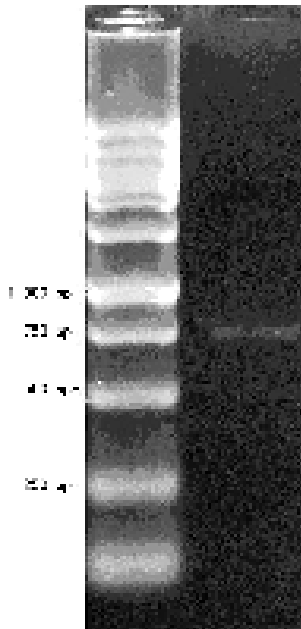


图 3 单链

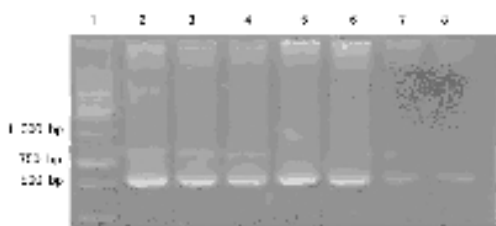


图 4 质粒 PCR

2.5 质粒 DNA 的酶切鉴定 将 PCR 阳性的质粒用 Sfi I 和 Not I 双酶切,用 1%的琼脂糖凝胶电泳后可见在 750 bp 及 4 500 bp 处见条带,见图 5。

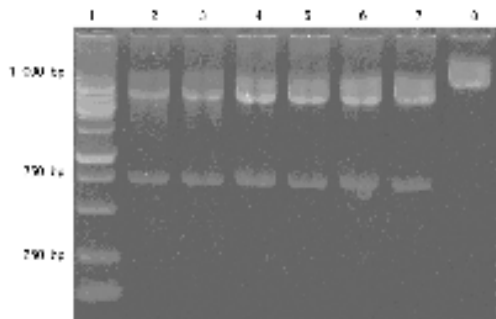


图 5 双酶切图片

2.6 噬菌体单链抗体库的筛选 先以 ER 阴性的正常乳腺细胞 MCF-10F 对噬菌体抗体库进行负性筛选,再以 ER 阳性的人乳腺癌细胞 MCF-7 对噬菌体 Scfv 库进行了 5 轮“吸附-洗脱-扩增”的富集筛选。得到 1 个 4.2×10^7 的噬菌体抗体库,说明特异性的 Scfv 得到了有效富集,见表 2。

2.7 噬菌体 Scfv 的 ELISA 鉴定 以 MCF-7 和 MCF-10F 为靶抗原进行 ELISA 检测,其中有 6 个噬菌体 Scfv 与 MCF-7 细胞反应的 P/N 值大于 MCF-10F 的两倍以上,见图 6。

表 2 噬菌体抗体库的筛选

淘洗轮次	加入噬菌体量(cfu)	洗脱噬菌体量(cfu)	收获数(cfu)
1	5.0×10^{12}	7.8×10^6	1.56×10^{-6}
2	2.6×10^{12}	3.7×10^6	1.42×10^{-6}
3	1.2×10^{12}	8.2×10^6	6.83×10^{-5}
4	3.4×10^{11}	3.9×10^7	1.15×10^{-4}
5	1.8×10^{11}	4.2×10^7	2.33×10^{-4}

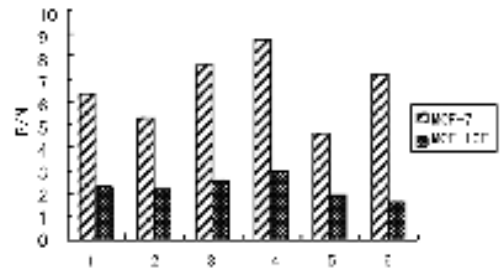


图 6 ELISA 检测噬菌体抗体与 MCF-7 和 MCF-10F 细胞的结合活性

3 讨 论

噬菌体库技术是近 20 年发展起来的一种制备抗体的新技术,噬菌体单链抗体具有分子量小,组织穿透性强,在靶抗原部位浓聚快等优点^[7-8],在肿瘤的诊断及治疗中有很强的应用价值。但是,目前文献报道的是噬菌体单链抗体多为鼠源性的抗体,这些抗体因为人抗鼠免疫反应而不适合于临床运用。

本实验直接从乳腺癌患者癌旁淋巴组织中提取总 RNA,通过逆转录 PCR 和 SOE-PCR 合成单链抗体基因,再利用噬菌体展示技术构建了 1 个 4.2×10^7 的人源乳腺癌噬菌体单链抗体库。实验中,本研究选择的患者癌旁淋巴组织来构建的噬菌体抗体库比用患者外周血淋巴细胞构建的噬菌体抗体库更易筛选到高亲和力的抗体^[9]。淋巴转移是乳腺癌最常见的转移方式,本研究选择乳腺癌患者癌旁淋巴组织来构建抗乳腺癌单链抗体基因有助于提高单链抗体的敏感性和特异性。同时,本研究选择病理类型不同及 Her2/neu 阳性与否的乳腺癌患者,增加了抗乳腺癌单链抗体基因的多样性,有利于构建较大的抗乳腺癌噬菌体单链抗体库。

在筛选过程中本研究采用先低后高的洗涤力度,低洗涤力度保证低丰度的噬菌体抗体不丢失,高洗涤力度则有利于得到高亲和力的噬菌体抗体^[10]。此外,本研究选择正常乳腺细胞和乳腺癌细胞做正负差异性筛选。先用 ER 阴性的 MCF-10F 细胞进行负性筛选,既清除了大量的非特异噬菌体,同时又有效地保护了抗 ER 的噬菌体。然后再利用 ER 阳性的 MCF-7 细胞进行选择,从而有效地提高了选择效率,得到 6 株高亲和力噬菌体抗体。

本实验成功地构建了人源乳腺癌噬菌体单链抗体库,通过 5 轮的“吸附-洗脱-扩增”筛选到 6 株高亲和力噬菌体单链抗体,为本研究下一步进行单链抗体的放射性核素显影及治疗奠定了基础。

参考文献:

[1] 李少林,陈小品,吴凯南. 乳腺癌的生物学特性和临床对策[M]. 北京:科学出版社,2004:65. (下转第 521 页)

制研究历程中的突破性事件。这一突变导致 BRAF 蛋白第 600 位的氨基酸由 V 变为 E, 造成 Ras → Raf → MEK → ERK/MAP 激酶通路(MAP 激酶通路)的异常持续激活, 促进 PTC 发生、进展和侵袭转移。BRAF 基因突变发生于约 45% 的 PTC 和 25% 的甲状腺未分化癌(ATC)患者中, 大样本的研究显示该突变与肿瘤的高恶性度相关^[10]。本研究中 BRAF 突变虽然与肿瘤的腺外侵袭和淋巴结转移有相关的趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 考虑是由于研究纳入的样本量较小。对 BRAF 基因突变导致甲状腺癌恶性程度增高的分子机制还没有令人信服的解释。最近的一些研究观察到甲状腺癌中 BRAF 基因 T1799A 突变与多种基因高甲基化的存在相关, 如 SLC5A8、TIMP3、DAPK 和 RAR β_2 ^[11]。本研究也提示 DNA 修复基因的甲基化与 BRAF 基因突变有关。因为这些基因发生甲基化也预示肿瘤具有更多的恶性病理特征, 推测 BRAF 基因突变可能是通过基因的甲基化改变导致肿瘤具有更高的侵袭性, 更容易发生转移。

总之, 本研究结果显示, PTC 中 DNA 修复基因 hMLH1 甲基化较 T1799A BRAF 突变少见; 甲基化的发生与肿瘤的临床病理特征差异无统计学意义($P > 0.05$), 但在携带 T1799A BRAF 突变的 PTC 病例中更为常见。

参考文献:

- [1] Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002[J]. JAMA, 2006, 295(18):2164.
- [2] Hu S, Liu D, Tufano RP, et al. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer[J]. Int J Cancer, 2006, 119(10):2322.
- [3] Liu D, Hu S, Hou P, et al. Suppression of BRAF/MEK/MAP kinase pathway restores expression of iodide-metabolizing genes in thyroid cells expressing the V600E BRAF mutant[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(4):1341.
- [4] Porra V, Ferraro-Peyret C, Durand C, et al. Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(5):3028.
- [5] Friedberg EC. DNA damage and repair[J]. Nature, 2003, 421(6921):436.
- [6] Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction? [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(2):107.
- [7] Wang L, Cunningham JM, Winters JL, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair[J]. Cancer Res, 2003, 63(17):5209.
- [8] Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(23):1731.
- [9] Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer[J]. Nat Genet, 2006, 38(7):787.
- [10] Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications[J]. Endocr Rev, 2007, 28(7):742.
- [11] Xing M. Gene methylation in thyroid tumorigenesis[J]. Endocrinology, 2007, 148(3):948.

(收稿日期:2009-08-10 修回日期:2009-09-10)

(上接第 518 页)

- [2] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. Science, 1985, 228(4705):1315.
- [3] Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. 1989[J]. Biotechnology, 1992, 24:517.
- [4] Xu MY, Xu XH, Chen GZ, et al. Production of a human single-chain variable fragment antibody against esophageal carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(18):2619.
- [5] 何映谊, 何新荣, 叶铁真. 人类胚胎组织完整 RNA 的分离[J]. 中国实验血液学杂志, 2005, 13(6):1058.
- [6] Cummings PJ, Hooper NE, Rocolanel SS. Generation of a recombinant bacteriophage antibody library to mycobacterium tuberculosis[J]. Hybridoma, 1998, 17(2):151.
- [7] 杨清浩, 王祥卫, 金燕, 等. 噬菌体展示肽表位的免疫原性研究[J]. 重庆医学, 2005, 34(10):1480.
- [8] Yokota T, Milenic DE, Whidow M, et al. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms[J]. Cancer Res, 1992, 52(12):3402.
- [9] Saerens D, Kinne J, Bosmans E, et al. Single domain antibodies derived from dromedary lymph node and peripheral blood lymphocytes sensing conformational variants of prostate-specific antigen[J]. J Biol Chem, 2004, 279(50):51965.
- [10] 张青, 郝晓柯, 苏明权, 等. 噬菌体抗体库筛选方法的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(3):222.

(收稿日期:2009-07-21 修回日期:2009-09-10)