

# 噬菌体单链抗体文库的构建及筛选

朱萍霞, 黄伟

(西南农业大学 动物科技学院, 中国重庆 荣昌 402460)

**摘要:**噬菌体抗体是继多克隆抗体、单克隆抗体之后兴起的第3代基因工程抗体。噬菌体抗体库技术是抗体基因文库技术和噬菌体表面展示技术相结合形成的一项新技术与方法, 在生物科学领域极具潜力。现主要就近年来该技术在抗体基因扩增、抗体库的构建、筛选方法等方面的进展进行综述。

**关键词:**单链抗体; 噬菌体抗体库; 噬菌体表面展示技术

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2005)S0-0017-05

## Construction and Selection of Single Chain Fv Phage Antibody Library

ZHU Ping-xia, HUANG Wei

(College of Animal Science and Technology, Southwest Agricultural University, Rongchang 402460, Chongqing, China)

**Abstract:** The phage antibody is the third generation of gene engineering antibody after the polyclonal and monoclonal antibody. The phage antibody library technology is a novel method with many potential applications, consisting of antibody library and phage surface display technology. Advances in construction and selection of a scFv phage antibody library are described.

**Key words:** single chain variable fragment; phage antibody library; phage surface display technology

(Life Science Research, 2005, 9(2): 017 ~ 021)

抗体 (Antibody) 是由抗原诱导的能够与抗原发生特异性结合的免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig), 免疫球蛋白是一种多功能区域蛋白, 是最复杂的分子之一。抗体分子作为机体防卫系统的重要组成部分, 以其特有的基因结构和重排形成的多样性, 可以高亲和力与各种不同的特异性抗原结合, 为机体提供了有效的保护。抗体技术发展经历了 3 个阶段, 第一代抗血清多克隆抗体 (Polyclonal Antibody, PAb), 早在 1890 德国学者

用白喉外毒素注射动物后, 就发现血清中含有很多抗菌或与疾病相关的因子, 如溶菌素、类风湿因子等, 统称为抗体 (也称抗血清多克隆抗体)<sup>[1]</sup>; 第二代为单克隆抗体 (Monoclonal Antibody, MAb), 第一株单克隆抗体由德国学者 Kohler 和英国学者 Milstein<sup>[2]</sup> 于 70 年代中期利用细胞融合技术首次成功制备而得, 它在诊断、治疗、预防和蛋白质提纯等方面都显示了重要作用。1984 年国外首次报道人-鼠嵌合体在骨髓瘤细胞中成功表达, 开

收稿日期: 2005-05-17; 修回日期: 2005-06-19

基金项目: 重庆科委攻关项目 (8244)

作者简介: 朱萍霞 (1980-), 女, 安徽人, 西南农业大学硕士研究生, 主要从事鸡单链抗体文库的构建与筛选, Tel: 023-46751032, E-mail: zhupxia@126.com.

创了基因工程抗体技术, 标志着第三代抗体——基因工程抗体的诞生<sup>[3]</sup>。基因工程抗体包括 3 种, 即嵌合抗体、改形抗体和抗体库技术制备的抗体。其中前两者为部分人源化抗体, 而抗体库技术可以制备出全人源化抗体。抗体库技术中目前研究较热的是单链抗体 (Single chain variable fragment, ScFv) 库, 即用基因克隆技术将全套抗体重链和轻链可变区基因克隆出来, 重组到原核表达载体, 通过在大肠杆菌直接表达有功能的抗体分子片段, 筛选特异性的可变区基因。目前, 抗体工程领域最突出的进展就是噬菌体抗体库技术的建立。该技术的出现开创了一条简便快捷的基因工程抗体生产路线, 为人源抗体的制备提供了新途径, 是抗体工程史上的里程碑。

## 1 噬菌体抗体库技术

### 1.1 噬菌体展示技术的原理

Smith 等<sup>[4]</sup>于 1985 年首次报道了将 *EcoRI* 核酸内切酶基因克隆到丝状噬菌体 fd 外壳蛋白基因 (III) 中与外壳蛋白融合表达并展示在噬菌体表面上, 宣告了噬菌体展示技术的诞生。噬菌体展示技术 (Phage display technology) 是以噬菌体核酸为载体, 将外源性基因插入噬菌体衣壳蛋白基因中, 编码多肽的 DNA 片段与噬菌体表面蛋白的编码基因融合后, 以融合蛋白的形式表达出多肽序列, 并随该衣壳蛋白定位于噬菌体的表面<sup>[5]</sup>。该技术的基础是把外源多肽或蛋白和噬菌体的某种外壳蛋白融合表达于噬菌体表面, 一方面, 外源多肽或蛋白被展示于噬菌体表面, 具有空间上的可接近性; 另一方面, 噬菌体壳内具有外源多肽或蛋白的编码序列, 由此建立了表型和基因型的联系, 可进行大规模的有效筛选<sup>[6]</sup>。噬菌体展示技术不但可以用来筛选针对几乎任何靶标的亲和性多肽, 而且能够用来分析蛋白质间相互作用。

### 1.2 噬菌体展示系统

噬菌体展示系统有噬菌体氨基端展示系统和羧基端展示系统。目前常用的噬菌体氨基端展示系统主要是丝状噬菌体 M13、fd、f1。丝状噬菌体有 5 种衣壳蛋白, 主要衣壳蛋白 pVIII 在野生型丝状噬菌体中大约有 2 700 个拷贝, 其它如 pIII 等次要衣壳蛋白, 只有 3~5 个拷贝<sup>[7]</sup>。外源多肽或蛋白基因直接插入噬菌体外壳蛋白 pVIII 和 pIII 基因的 3' 端中, 使外源多肽/蛋白和噬菌体 pVIII 和 pIII 蛋白的氨基端融合表达。但是在某些情况

下, 外源蛋白和噬菌体外壳蛋白氨基端的融合是不合适的。当要研究的蛋白质相互作用要求有自由羧基端时, 氨基端噬菌体展示系统便不能够使用, 因为此时外源蛋白是不存在自由的羧基端。氨基端噬菌体展示系统也同样不适用于 cDNA 库表达产物的展示, 这是由于 cDNA 的 3' 端不翻译区存在许多终止密码子。另外, 部分胞内蛋白用丝状噬菌体氨基端展示时会干扰融合蛋白从细胞质向细菌周质内的转运。而羧基端展示系统则可以避开上述问题。到目前为止, 人们已经开发了几种噬菌体羧基端展示系统。如  $\lambda$ pV 羧基端展示系统、T4 噬菌体羧基端展示系统和  $\lambda$ 噬菌体 D 蛋白展示系统等, 对这些羧基展示系统郭强<sup>[8]</sup>曾作过详细的描述。但近年来最受研究者欢迎的羧基端展示系统是 T7 噬菌体羧基展示系统。这主要是因为 T7 噬菌体有其独特的优点: 复制周期短, 细胞质蛋白组装, 操作和储存方便, 克隆效率高, 稳定性好, 且淘洗方便。Joseph Castillo<sup>[5]</sup>等于 2001 年使用 T7 噬菌体展示的多肽从 M13 噬菌体抗体文库中成功筛选出了特异性单链抗体; Hamid Houshmand<sup>[9]</sup>等 2003 年构建了 T7 噬菌体 HCV cDNA 展示文库, 并发现了 HCV 氮-末端与 La 蛋白可以结合。

## 2 噬菌体抗体文库的构建

### 2.1 构建噬菌体抗体文库的技术路线

噬菌体抗体库技术是建立在噬菌体展示技术的基础之上的, 即将抗体基因插入噬菌体外壳蛋白基因中, 以融合蛋白的形式展示于噬菌体表面。噬菌体抗体库技术的出现是以 3 项实验技术为基础的: 一是 RT-PCR 技术的发展; 二是抗体基因片段在大肠杆菌的功能性表达的成功; 三是噬菌体展示技术 (phage display) 的出现。在此 3 项技术的基础上, 噬菌体抗体库技术的操作路线变得非常的简便。其路线是: 首先用 PCR 方法扩增抗体全套可变区基因, 将扩增产物重组到噬菌体载体中, 并通过与丝状噬菌体的外壳蛋白形成融合蛋白, 把单链抗体展示在噬菌体表面, 扩大培养即获得噬菌体抗体文库。

### 2.2 单链抗体

Fv 是抗体分子中保留抗原结合部位的最小功能片段, 由免疫球蛋白的轻链可变区 (V<sub>L</sub>) 和重链可变区 (V<sub>H</sub>) 组成, 二者以非共价键结合在一起, 分子质量约为完整抗体分子的 1/6, 具有单一

抗原结合位点. 将  $V_H$  和  $V_L$  基因用一段适当的寡聚核苷酸(接头, linker)连起来, 使之表达为单一的肽链, 称为单链抗体(ScFv). ScFv 具有许多优点<sup>[10]</sup>: 1) 具有与原亲本抗体相同的特异性; 2) 半衰期短, 血循环和正常组织清除快; 3) 分子小, 肿瘤穿透能力强, ScFv 能均匀分布于肿瘤, 而完整抗体分子则主要聚集于接近血管部分; 4) 避免了 Fc 段引起的非特异性细胞毒性及免疫原性; 5) 易于基因操作和基因工程大量生产.

Linker 在维持单链抗体的空间构像中起重要作用<sup>[11]</sup>, 单链抗体的空间构像对于单链抗体的亲和力和至关重要. 其长度及性质应不干扰  $V_H$  和  $V_L$  的立体折叠, 并且不对抗原结合部位造成妨碍. 因此, Linker 不应过短, 至少应含有 10 个氨基酸, 但亦不应过长, 以免对抗原结合部位造成干扰. 目前应用最多的一种肽段是由疏水性氨基酸甘氨酸、丝氨酸组成的 15 肽  $(Gly_4Ser)_3$ . 其中甘氨酸与抗体的柔韧性有关, 丝氨酸与抗体的溶解度相关<sup>[12]</sup>. 因此,  $(Gly_4Ser)_3$  能较好的维持单链抗体的空间构像.

### 2.3 噬菌体单链抗体文库构建方法

目前, 常用的单链抗体构建策略有两种: 一种是将重链基因和轻链基因通过不同的酶切位点先后克隆入表达载体, 载体本身自带连接肽基因序列. 这种方法操作步骤较为复杂, 抗体库的多样性易于在反复的克隆操作中丢失. 另一种是用重叠 PCR 的方法先将重链和轻链可变区基因拼接, 称为重叠延伸拼接法 (Splicing by overlap extension, SOE)<sup>[13]</sup>, 再通过罕见的酶切位点克隆入表达载体. 笔者近年来采用 SOE 构建了鸡 ScFv 文库. 首先用两对引物通过 RT-PCR 分别扩增鸡  $V_H$ 、 $V_L$  基因, 再采用 SOE 将  $V_H$ 、Linker、 $V_L$  基因连接成  $V_H + Linker + V_L$ . 结果显示, 这种方法连接效率较高.

构建噬菌体单链抗体文库方法过程通常为: 首先提取 B 淋巴细胞(来自骨髓、外周血、扁桃体或是动物脾脏等)的总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增获得全套抗体可变区基因. 抗体基因扩增的 5'端引物通常根据成熟抗体 V 区外显子 1 的框架区 (FR1) 或前导区的保守序列设计, 3'端引物主要依据抗体绞链区 (J 区) 的保守序列设计. 分别扩增出抗体的  $V_H$ 、 $V_L$  基因后, 用 SOE-PCR 将  $V_H$ 、Linker、 $V_L$  基因连接形成 ScFv. 再用两种内切酶分别对 ScFv 基因和噬菌体载体进行双酶切, 将重

组 DNA 经体外包装后与宿主菌混合, 裂解产物即为噬菌体单链抗体文库.

## 3 噬菌体抗体文库的筛选

### 3.1 筛选方法

噬菌体抗体库技术模拟了机体免疫系统的选择作用, 展示在噬菌体表面的抗体能够在体外用固相化抗原进行筛选. 同时, 由于噬菌体对大肠杆菌的感染性, 噬菌体抗体库技术能够使用淘选的方式, 为快速选择特异性抗体提供了简便而高效的操作系统. 从噬菌体抗体库中筛选表达特异性抗体噬菌体的常用方法主要有两种: 1) 将纯抗原包被在固相介质上, 如酶标板、免疫试管或亲和层析柱, 然后加入待筛选的噬菌体, 洗去非亲和性或低亲和性的噬菌体, 回收高亲和性的噬菌体; 2) 将抗原与生物素基因相连, 再将其固定在包被有 Streptavidin 的顺磁珠上对噬菌体进行筛选<sup>[14]</sup>. 小分子纯抗原直接包被效果不佳, 所以第二种方法筛选效果更佳. 两种方法包被后都要封闭空白位点. 封闭的主要目的是减少噬菌体非特异性地吸附在空白点. 封闭剂目前最常用的为牛血清白蛋白 (BSA) 和(或)脱脂牛奶. 笔者曾经将纯抗原包被在酶标板上, 然后将 BSA 包被酶标板进行筛选, 仍可以得到相当大的噬菌体量, 并且可以低程度富集. 这说明我们采用 BSA 作为封闭剂, 筛选得到的噬菌体抗体可能不纯. 对噬菌体这种很强的非特异性吸附固相表面的能力, 赵慧斌<sup>[15]</sup>指出在封闭剂中加入 0.05% ~ 0.1% 的吐温可减少噬菌体这种非特异性吸附. 如何能更好的避免噬菌体的非特异性吸附, 还有待进一步探索, 这对文库的筛选及 ELISA 检测都至关重要.

筛选的具体步骤包括: 1) 靶抗原吸附噬菌体抗体; 2) 洗涤去除非特异性结合, 收集与抗原结合的噬菌体; 3) 感染大肠杆菌, 使特异的噬菌体抗体基因扩增, 从而达到富集特异抗体基因的目的. 再进行下一轮筛选. 一般经过 3 ~ 5 轮这样的筛选可得到表达高亲和性的目的抗体的克隆. 用这种方法, Shadidi 等<sup>[16]</sup> 2001 年从合成的人噬菌体单链抗体库中筛选到了抗白血病的人单链抗体; Kang XP<sup>[17]</sup> 等构建了人 Fab 抗体库, 并使用 SARS 病毒筛选到了抗 SARS 病毒的抗体.

前述两种筛选技术的前提条件是目标抗体所针对抗原的性质明确, 能得到纯抗原. 但对于无法提纯的抗原、性质不确定的抗原或在筛选过程

中会失活的抗原,如癌细胞表面受体、某些膜的内在蛋白等,这两种筛选技术并不适用.为了提高筛选效率,许多研究者对传统的筛选技术进行了改进,建立了新的筛选系统.如双层膜筛选系统、选择性感染噬菌体筛选系统及用宿主菌直接洗脱法.魏东芝<sup>[18]</sup>等对这些筛选系统做了综述.这些新的筛选系统更适应以上情况的要求,将会成为研究的另一个热点.

### 3.2 筛选效率的检测

每一轮筛选都需要进行检测,以证实筛选的有效性.这可通过以下3个测试指标得到答案:1)感染的噬菌体数.它随筛选轮数的增加而增加;2)抗体基因插入载体的频率.由于噬菌体表达的一个突出问题是外源基因的部分或全部丢失,因此有必要用PCR检测被洗脱的噬菌体感染的宿主单克隆,通过测序进行分析;3)亲和性.随机选择一些被洗脱的噬菌体感染的宿主单克隆,用ELISA鉴定洗脱噬菌体的亲和性.ELISA主要用于后几轮的筛选,并可作为是否终止筛选的判定依据,当大多数的克隆均呈阳性反应,便可结束筛选.

## 4 应用前景

利用抗体噬菌体展示技术构建和制备出的单链抗体,与单克隆抗体相比,可降低甚至消除人体对抗体的排斥反应;且其分子量较小,更有利于穿透血管壁,进入病灶的核心部位;还可以采用原核细胞、真核细胞和植物等多种表达方式<sup>[19]</sup>,大量表达抗体蛋白,从而大大降低抗体的生产成本.此外,ScFv可作为载体与药物、同位素、毒素、酶等结合,构建成双功能抗体用于肿瘤的导向治疗<sup>[11]</sup>.目前报道较多的是构建重组单链免疫毒素,是将单链抗体基因与毒素基因相连,表达scFv与毒素的融合蛋白,利用抗体的特异性将毒素定位于靶部位,发挥杀伤作用<sup>[10]</sup>.这种免疫毒素具有免疫原性低、易于穿透肿瘤组织、分子稳定性好、靶向性好等优势,在肿瘤的导向治疗中更具潜力.在基因治疗方面单链抗体使用最多的应该是在免疫缺陷病毒HIV-I的研究中<sup>[20]</sup>,用scFv抗体在病毒生命周期中通过阻断整合前和整合后抑制HIV-I的复制已越来越受到人们的重视,并可望成为AIDS基因治疗的有效手段.但目前大多数单链抗体是建立在动物模型和体外实验的基础上,单链抗体在产量、亲和性、稳定性等方面尚未达到临床应用

的要求.因此,如何提高单链抗体在体内的表达,以及如何增强其稳定性和特异性等方面的问题,仍需作大量深入的研究.

### 参考文献(References):

- [1] 于善谦,王洪海,朱乃硕,等.免疫学导论[M].北京:高等教育出版社,1999.41-52.
- [2] KOHLER G, MILSTEIN. Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specificity[J]. *Nature*, 1975, 256: 495.
- [3] 李有全,刘光远,白启,等.基因工程抗体的研究进展[J]. *中国兽医科技*, 2003(6): 36-40.
- [4] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228 (4705): 1315-1317.
- [5] CASTILLO Joseph, GOODSON Bob, WINTER Jill. T7 displayed peptides as targets for selecting peptide specific scFvs from M13 scFv display libraries[J]. *Immunological Methods*, 2001, 257: 117-122.
- [6] CONRAD U, SCHELLER J. Considerations on antibody-phage display methodology[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2005, 8(2): 117-126.
- [7] 高学良,赵群飞.噬菌体展示技术的发展及应用[J]. *生命化学*, 2001, 21(5): 432-433.
- [8] 郭强,程度胜.噬菌体羧基端展示系统[J]. *生物技术通讯*, 2002, (4): 322-324.
- [9] HOUSHMANDA Hamid, BERGQVIST Anders. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 695-701.
- [10] 高宁.单链重组抗体的表达及其临床应用[J]. *免疫学杂志*, 1998, 14(1): 56-59.
- [11] 陈小红,邹毅.单链抗体及其应用[J]. *实用医学杂志*, 1999, 15(4): 325-327.
- [12] 刘燕.单链抗体的研究进展及其应用前景[J]. *中国兽药杂志*, 2003(37): 41-42.
- [13] SHEETS M D, AMERSDORFER P, FINNERN R, et al. Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: The production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6157.
- [14] SHUGHRUE P J, KOMM B, MERCHNTHALER I. The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus[J]. *Steroids*, 1996, 61: 678-681.
- [15] 赵慧斌.噬菌体抗体库筛选技术[J]. *临床检验杂志*, 2004, 22(2): 146-148.
- [16] SHADIDI M, SIOUD M. An anti-leukemic single chain Fv antibody selected from a synthetic human phage antibody library[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280(2): 548-552.
- [17] KANG X P, XIONG W, CHANG G H, et al. Construction

- and screening of human phage antibody library against SARS virus[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2005, 21(1): 46-49.
- [18] 魏东芝, 赖敏. 噬菌体抗体库筛选技术[J]. *生命科学*, 2000, 12(6): 134-136.
- [19] SHI Xian-zong, KARKUT Tammy. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody(scFv) gene in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, (28): 321-330.
- [20] 邓宁, 向军俭, 黄峙. 小分子抗体技术研究进展[J]. *生物学通报*, 2004, 39(8): 1-3.