

利用噬菌体抗体库筛选 U251 细胞血清应答基因蛋白特异抗体

余 敏* 谭德勇 钱 伟 赖建华 孙桂林

(云南大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室,昆明 650091)

摘 要 利用噬菌体表面展示抗体库对不同血清处理 U251 细胞吸附的抗体进行差异筛选,筛选获得血清饥饿细胞吸附的阳性噬菌体克隆 96 个和血清饥饿后恢复血清培养细胞吸附的阳性噬菌体克隆 82 个。细胞免疫组化检测发现应答反应差异较大的抗体 2 个,即血清饥饿培养细胞特异反应的抗体 1 个(11 号抗体)和血清饥饿后恢复血清培养细胞特异反应的抗体 1 个(2 号抗体),其中 2 号抗体在恢复血清培养细胞中的应答反应强于血清饥饿培养细胞,是一个血清应答基因蛋白特异抗体,且在血清饥饿后恢复血清培养不同时间的 U251 细胞中具有一定的特异性反应。该研究为寻找与细胞周期调控有关的因子奠定了基础,同时对肿瘤的诊断和治疗研究也有重要意义。

关键词 噬菌体抗体库, U251 细胞, 血清应答基因蛋白特异抗体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)03-0356-05

抗体库技术是近 10 多年来发展起来的一种新技术,它包含免疫球蛋白可变区重组产生的各种抗体的总和。1989 年 Ward 等首先用重链可变区组成单链抗体库,同年 Huse 等用 PCR 技术建立了全套抗体轻链库和全套重链 Fd 段基因库。1991 年,研究者将噬菌体表面递呈技术引入抗体库的构建,出现了噬菌体抗体库^[1,2]。由于噬菌体抗体库具有高通量筛选、特异性强、实验周期短的特点,目前被广泛应用于疾病的诊断治疗和药物设计中。

抗体库的产生过程是将未免疫小鼠的脾脏组织取出,将成熟的免疫球蛋白基因的可变区通过 PCR 技术进行扩增,然后将这些扩增产物重组于表达载体上,形成一个免疫球蛋白可变区的文库。由于小鼠未经特异抗原免疫,抗体库中的任何一种抗体的比例基本接近,抗体库的库容量一般在 $10^8 \sim 10^9$,所以理论上几乎所有蛋白质都可能在抗体库中找到相应的抗体,研究者可根据需要,筛选到目的抗体。

细胞在细胞周期的不同时期会产生一些特定的蛋白质,利用这些蛋白质与抗体库中的抗体相互吸附,就可以获得这些蛋白质的特异抗体。对于某些血清敏感细胞而言,血清是细胞体外培养所必须的成分,在无血清条件下细胞停滞在 G_0 期而不分裂,

加入血清后即可启动休止状态的细胞进入细胞周期^[3,4]。本研究以血清敏感细胞 U251 为材料,利用噬菌体抗体库对不同血清处理细胞吸附的抗体进行差异筛选,试图获得血清应答基因蛋白特异抗体。利用这些抗体可能找到与细胞周期调控有关的因子,这一研究对于细胞周期调控机制的研究及肿瘤的诊断和治疗研究都有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

人脑胶质瘤细胞株 U251 由重庆医科大学范维珂教授提供,噬菌体表面展示抗体 ScFv 库由上海生物工程有限公司提供,ABC 免疫组化试剂盒购于华美生物公司。

1.2 方法

血清饥饿 U251 细胞特异抗体筛选技术路线见图 1,血清饥饿后恢复血清培养细胞特异抗体筛选方法也基本相同,只是将细胞处理方式改变。下面以血清饥饿 U251 细胞特异抗体筛选为例说明具体的筛选步骤。

1.2.1 细胞培养及固定 将 U251 细胞接种于 25mL 培养瓶中,用含 10% 血清的 1640 培养基进行传代

收稿日期 2003-10-17,修回日期 2004-02-16。

基金项目 云南省教育厅青年基金资助(No.0141168)和云南大学校级基金资助(No.2002Q012SM)。

* 通讯作者。 Tel:86-871-5032061; Fax:86-871-5033724; E-mail:yumin_11@sina.com

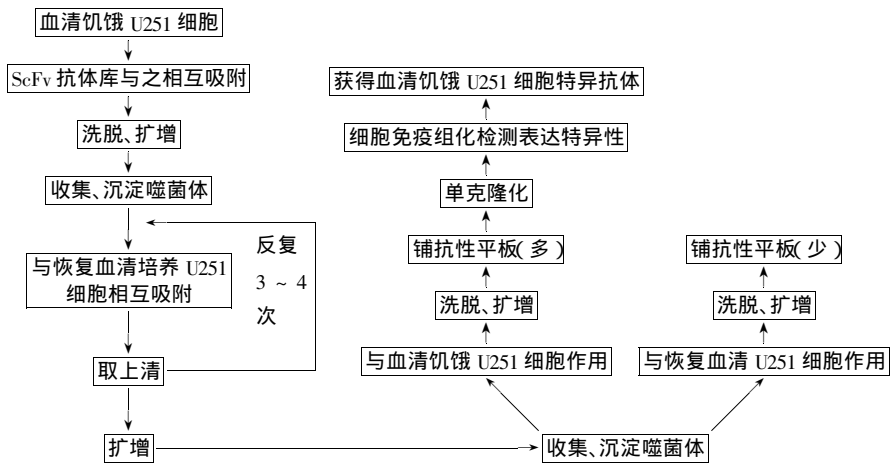


图 1 血清饥饿 U251 细胞特异抗体筛选流程图

Fig.1 Method of screening special antibodies in serum starvation U251 cells

扩增,以 80% 铺满接种后培养 48 h,换无血清培养基培养 48 h,加入无水乙醇固定 30 min 即为血清饥饿培养细胞;以 80% 铺满接种后培养 48 h,换无血清培养基培养 48 h,然后又换 10% 血清培养基培养 48 h,取出加入无水乙醇固定 30 min 即为血清饥饿后恢复血清培养细胞(以下简称恢复血清培养细胞);以 80% 铺满接种后培养 48 h,换无血清培养基培养 48 h,然后换 10% 血清培养基分别培养 30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h,取出加入无水乙醇固定 30 min 即为血清饥饿后恢复血清培养不同时间的细胞。

1.2.2 血清饥饿细胞吸附的噬菌体的富集:取一瓶血清饥饿培养细胞加入 10 μ L ScFv 库和 20 mL 封闭剂,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h,分别用 1 \times PBS 和含 0.1% Tween-20 的 1 \times PBS 各洗 20 次,以洗脱非特异性结合的噬菌体,加入 5 mL 对数期大肠杆菌 TG1 菌液 37 $^{\circ}$ C 感染 1 h,然后加入辅助噬菌体 M13K07,过夜培养,4000 r/min 离心,弃沉淀,上清用 PEG/NaCl 混合,冰浴 1 h,10 000 r/min 离心 20 min,沉淀悬浮于 2 \times YT 培养基中,即为血清饥饿培养细胞吸附的噬菌体。

1.2.3 血清饥饿细胞特异吸附的噬菌体的筛选:

(1)取恢复血清培养细胞一瓶加入 10 μ L 血清饥饿细胞吸附的噬菌体(1.2.2 获得的噬菌体)和 20 mL 封闭剂,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h,反应液转入另一瓶恢复血清培养细胞,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h,如此反复吸附 3~4 次,以去除血清饥饿培养细胞、恢复血清培养细胞共同吸附的噬菌体,反应液中加入对数期 TG1 37 $^{\circ}$ C 感染 1 h 后加入 M13K07,过夜培养,4000 r/min 离心,弃沉淀,上清用 PEG/NaCl 混合,冰浴 1 h,10 000 r/min 离心 20 min,沉淀悬浮于 2 \times YT 培养基中,即为血清饥饿培养细胞特异吸附的噬菌体。

(2)取血清饥饿培养细胞和恢复血清培养细胞各一瓶,分别加入上一步制备的噬菌体和 20 mL 封闭剂,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h,用 1 \times PBS 和含 0.1% Tween-20 的 1 \times PBS 各洗 20 次,以洗脱非特异性结合的噬菌体,加入 5 mL 对数期 TG1 37 $^{\circ}$ C 感染 1 h,分别取培养液 100 μ L 铺氨苄抗性平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日比较不同处理细胞吸附的噬菌体感染菌液所铺平板的菌落数,如果血清饥饿培养细胞吸附的噬菌体感染菌液所铺平板上的菌落数是恢复血清培养细胞吸附的噬菌体感染菌液所铺平板的 5~10 倍,证明筛选有效。

(3)挑取血清饥饿培养细胞吸附的噬菌体感染菌液所铺平板上的单克隆于 2 \times YT 培养基中培养至对数期,加入 M13K07 扩增制备单克隆噬菌体。

(4)细胞免疫组织化学检测 取不同血清处理的 U251 细胞分别与单克隆化的噬菌体进行免疫检测,于显微镜下观察其应答反应,筛选血清应答基因蛋白特异抗体(具体操作按免疫组化检测试剂盒进行)。

2 结果

2.1 筛选血清饥饿细胞和恢复血清培养细胞特异抗体

以处于生长停滞状态(G_0 期)的血清饥饿培养细胞为材料,通过反复“吸附-洗脱-扩增”过程,首先获得了血清饥饿 U251 细胞吸附的噬菌体,再将上述噬菌体与恢复血清培养细胞相互作用,通过反复作用 3~4 次,将反应液分离、扩增,获得血清饥饿 U251 细胞特异吸附的噬菌体,通过对比筛选,铺抗性平板,结果显示血清饥饿细胞吸附的噬菌体感染菌液

所铺平板上的菌落数(510 个)是恢复血清培养细胞吸附的噬菌体感染菌液所铺平板上菌落数(83 个)的 6 倍 ,即血清饥饿细胞吸附的噬菌体平板上的 6 个菌落中可能有 5 个是血清饥饿细胞特异吸附的噬菌体克隆(结果见图 2) ,从血清饥饿细胞吸附的噬菌体感染菌平板上挑选出 96 个克隆 ,制备成单克隆噬菌体。以同样的方法 ,筛选到了恢复血清培养细胞吸附的噬菌体克隆 82 个。每个克隆即代表一个相应的抗体。

2.2 U251 细胞特异抗体的免疫学筛选

对初步筛选出的血清饥饿培养细胞和恢复血清培养细胞特异吸附的噬菌体进行免疫组化检测 ,筛选出应答反应差异较大的抗体 2 个 ,即血清饥饿培养细胞特异反应的抗体 1 个和恢复血清培养细胞特异反应的抗体 1 个。从图 3A 和图 3B 中可以看到 2 号抗体在恢复血清培养细胞中反应强烈 ,而在血清饥饿培养细胞中反应较弱 ,而 11 号抗体则只在血清饥饿培养细胞中有信号 ,而在恢复血清培养的细胞中几乎无信号(见图 3 C 和 D)。

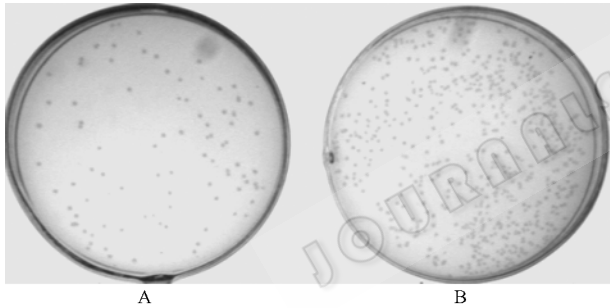


图 2 血清饥饿 U251 细胞特异吸附的噬菌体对比筛选结果

Fig.2 Contrast screening result of special adsorption phages in serum starvation cells

Clones of special adsorption phages in serum cultured cells after serum starvation (A) ;

Clones of special adsorption phages in serum starvation cells (B)

2.3 特异抗体在恢复血清培养不同时间细胞中的应答变化

本研究小组已有的研究表明血清敏感细胞 U251 在无血清培养条件下细胞停滞在 G₀ 期(休眠期) ,恢复血清培养后细胞进入细胞周期继续增殖 ,恢复血清培养不同时间 ,细胞将进入细胞周期的不同时期^[9]。为进一步研究筛选出的特异抗体在血清饥饿处理后恢复血清培养不同时间的细胞中的应答变化 ,对恢复血清培养细胞中特异反应的 2 号抗体分别做了在血清饥饿培养细胞、血清饥饿后恢复

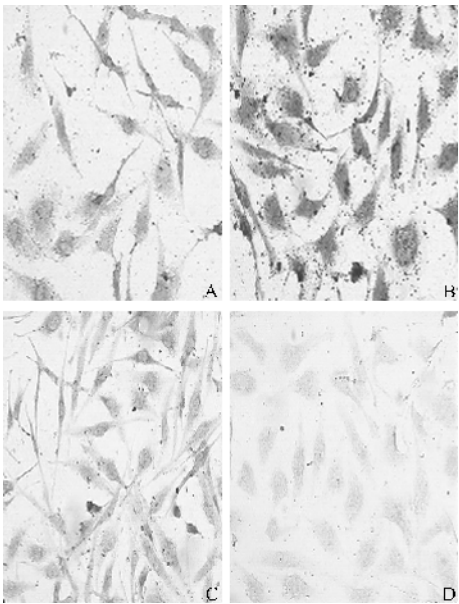


图 3 细胞特异抗体在不同处理 U251 细胞中的应答反应

Fig.3 The response of cell special antibody in U251 cells of the different treatment

The response of special antibody No. 2 in serum starvation cells (A) and serum cultured cells after serum starvation (B) ;

The response of special antibody No.11 in serum starvation cells (C) and serum cultured cells after serum starvation (D)

血清培养 15min、30min、1h、2h、4h、8h、12h 和 48h U251 细胞中的免疫组化检测。结果发现该抗体在血清饥饿培养细胞中反应较弱 ,且细胞质中的反应强于细胞核 ,图中可见到颜色相对较浅的核区(见图 4 A) ;恢复血清培养 15min 后反应明显增强 ,且信号在细胞核中强于细胞质中(见图 4 B) ;恢复血清培养 4h ,细胞处于增殖状态 ,细胞数明显增多 ,信号主要在核中出现 ,几乎只能见到细胞核(见图 4 D) ;恢复血清培养 12h ,细胞生长状态良好 ,细胞数多且形态饱满 ,信号在细胞核和细胞质中均有反应 ,核中信号稍强于质中(见图 4 E) ;恢复血清培养 24h ,信号在整个细胞中出现(见图 4 F)。表明该抗体在恢复血清培养细胞中的应答反应强于血清饥饿培养细胞 ,是一个血清应答基因蛋白特异抗体 ,且在血清处理不同时间的细胞中有一定的特异性反应。

3 讨论

噬菌体抗体库(Surface display phage antibody library)技术是近年来迅速发展起来的一种抗体筛选技术。由于其具有基因工程抗体的获得容易、筛选方式简便快速及产量高等优点 ,所以比起传统的杂交瘤单抗技术有很多优势。近几年越来越多的研究者将利用抗体库筛选目的抗体用于疾病的治疗和诊

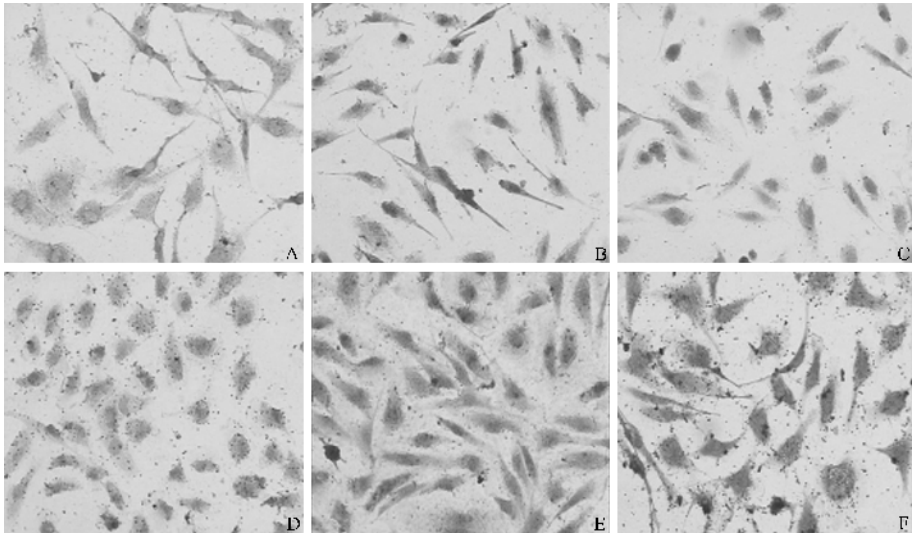


图 4 恢复血清培养不同时间的 U251 细胞对抗体应答水平的影响

Fig.4 Effect of the antibody response level in U251 cells cultured different time in the serum medium

Serum starvation cells (A) ; serum cultured 15min (B) ;
30min (C) ; 4h (D) ; 12h (E) ; 48h (F) cells after serum starvation

断上。本研究利用噬菌体抗体库筛选到 U251 细胞血清应答基因蛋白的抗体 ,表明该方法在进行特异抗体筛选中有其独特的应用价值。

本研究利用噬菌体抗体库筛选 U251 细胞血清应答基因蛋白特异抗体 ,由于细胞表面存在各种各样的蛋白 ,怎样去除大量非特异性吸附 ,提高筛选效率是一大难题 ,通常的筛选方法是通过“ 吸附-洗脱-扩增 ”多次富集以获得相对特异的抗体^[10-14] ,本实验中对以往的方法进行了改进 ,在“ 吸附-洗脱-扩增 ”的基础上又进行了扣除筛选和对比筛选 ,获得了较好的结果。我们首先获得血清饥饿 U251 细胞吸附的噬菌体 ,再将其与恢复血清培养细胞相互作用 ,以去除两种细胞共有的噬菌体 ,经多次扣除后 ,将上清液扩增、富集即获得血清饥饿 U251 细胞特异吸附的噬菌体 ,通过对比筛选 ,铺抗性平板 ,结果血清饥饿细胞吸附的噬菌体远远多于恢复血清培养细胞吸附的噬菌体 ,证明扣除法筛选非常有效 ,我们运用同样的方法又获得了恢复血清培养细胞特异抗体 ,这一方法不仅大大减少了工作量 ,又筛选到了相对特异的目的抗体 ,该筛选方法和研究思路具有一定的先进性和可行性。

为进一步研究特异抗体在血清饥饿处理后恢复血清培养不同时间的细胞中的应答变化 ,我们对血清培养细胞中强表达的 2 号抗体做了在不同处理细胞中的免疫检测 ,结果显示在血清饥饿培养细胞中 ,该抗体应答水平较低 ,信号主要在细胞质中出现 ,恢复血清培养后 ,启动处于停滞状态的细胞进入细胞

周期 ,抗体应答反应增强 ,信号逐渐转移到细胞核中 ,在恢复血清培养 4h 时 ,细胞核信号较强 ,几乎看不到细胞质的信号 ,之后 ,细胞核和细胞质中均有信号。表明在无血清条件下 ,细胞处于休眠状态 ,对抗体的应答水平较低 ,加入血清后 ,细胞脱离休眠状态进入增殖状态 ,细胞对抗体的应答水平明显增强 ,且随着培养时间的延长 ,细胞体积不断增大 ,数目不断增多 ,抗体在细胞中的应答水平也随之呈现一定的特异性 ,血清的加入对该抗体对应蛋白的基因的表达具有一定的调控作用 ,该基因的表达是否与 U251 细胞的增殖有关还有待进一步深入研究。由于肿瘤是细胞增殖失控所致 ,本研究获得的与细胞增殖周期有关的蛋白抗体对肿瘤发病机制及诊断应用都有重要意义。

REFERENCES (参考文献)

[1] Tian B (田 波) , Li CZ (李传昭) , Sun LQ (孙仑泉) *et al.* . *Molecular Evolution Engineering* . Beijing : Science Press (科学出版社) , 1999

[2] Du H (杜 辉) , Wang J (王 健) , Xin XY (辛晓燕) . Research and application of single chain antibodies in gynecological tumors . *Journal of The Fourth Military Medical University* (第四军医大学学报) 2000 , 21 (3) 31 - 35

[3] Lelang H , Hartwell *et al.* . Cell cycle control and cancer . *Science* , 1994 , 266 : 1821 - 1827

[4] Charles J , Sherry . Cancer cell cycle . *Science* , 1996 , 274 : 1672 - 1677

[5] Feng-Tian He , Yong-Zhan Nie , Bao-Jun Chen *et al.* . Expression and identification of recombinant soluble single-chain variable fragment of monoclonal antibody MC3 . *World J Gastroenterol* , 2002 , 8 (2) 258

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- 262

- [6] Duenas M ,Borrebaeck CA. Clonal selection and amplification of phage displayed antibodies by linking antigen recognition and phage replication. *Biotechniques* ,1994 , **12** (10) 999
- [7] Kettleborough CA ,Ansell KH ,Allen RW *et al.* Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the reconstruction of whole antibodies from these antibody fragments. *Bur J Immunol* ,1994 **24** (4) 953
- [8] McCafferty J ,Griffiths AD ,Winter G *et al.* Phage antibodies :filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* ,1990 , **348** 552
- [9] He X(何 婕) ,Tan DY(谭德勇). The development and analysis of cell synchronization model in G0 phase. *Journal of Yunnan University* (云南大学学报) ,2003 **25** 202 – 204
- [10] Cao JY(曹经媛) ,Liang MK(梁米芳) ,Guo KJ(郭可馨). Human Fab antibodies derived from phage display library neutralize hep-

atitis A virus *in vitro* Chinese. *Journal of Experimental and Clinical Virology* (中华实验和临床病毒学杂志) ,2000 , **4** (14) : 392 – 397

- [11] Wang XI(王希良) ,Huang YH(黄云辉). Strategies for selection of human antibodies by phage display. *Immunological Journal* (免疫学杂志) ,2000 **4** (16) : 467 – 470
- [12] Sui JH(隋建华) ,He YX(何一心) ,Xu X(许 静) *et al.* Screening and identification of anti-KG1a cell ScFvs from a phage display antibody library. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志) ,2000 , **4** (20) : 521 – 527
- [13] Crameri R ,Kodzius R. The powerful combination of phage surface display of cDNA libraries and high throughput screening. *Comb Chem High Throughput Screen* ,2001 , **4** : 145 – 155
- [14] Nakajima O ,Hachisuka A ,Teshima R *et al.* Study on a method for delivering scFv recombinant antibody into cultured cells. *Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku* ,2003 , (121) 34 – 39

Screening Serum Response Special Antibodies of U251 Cell Line from Surface Display Phage Antibody Library

YU Min* TAN De-Yong QIAN Wei LAI Jian-Hua SUN Gui-Lin

(Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology , School of Life Science ,
Yunnan University , Kunming 650091 ,China)

Abstract U251 cell is a sensitive cell line to serum , which stops at G₀ phase of cell cycle in no-serum medium , and recovers growth when the serum is added into no-serum medium. The cell can express corresponding proteins in different phase of cell cycle. Therefore it is very signification for the study of cell cycle regulation mechanism that explores these proteins. In this paper , the mouse antibody phage display library was added into the bottle in which the serum starvation U251 cells had been cultured , and the special antibody phages were absorbed. Then the absorbed antibody phages were amplified by adding *E. coli* TG1 and helper phage M13K07. Amplified antibody phages were added into bottle in which the serum cultured cell after serum starvation (follow named as serum recovered cells) were incubated , so that the cell absorbed the no-special antibody phages for the serum starvation cell and the special antibody phages were in supernatant. The remaining no-special antibody phages in the supernatant were discarded by repeating above program 3-4 times. The pure special antibody phages were gotten , and amplified by adding the host cell *E. coli* TG1 and helper phage M13K07. Then the host bacterium infected special antibody phage was spread on the plate medium with ampicillin , and the monoclonal antibody phages were gotten. Using same as above program , the monoclonal antibody phages absorbed specially for serum recovered U251 cells were obtained when the serum recovered cells instead of serum starvation cells and serum starvation cells instead of serum recovered cells. In this study , ninety-six positive monoclonal antibody phages that absorbed specially the serum starvation cells and eighty-two positive monoclonal antibody phages that absorbed specially the serum recovered cells were obtained. By using cell immunochemistry assay , two special signification antibodies were obtained. one(No.11) was the strong response in serum starvation cells , the other(No.2) was the strong response in serum recovered cells. The antibody No.2 had the distinctive response to the serum recovered cells in different incubation time(15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h and 48h) after serum starvation. The results showed that No.2 antibody would be useful to research the factors of cell cycle regulation and apply to tumor diagnosis.

Key words surface display phage antibody library , U251cell , special antibody of serum response protein

Received : 10-17-2003

This work was supported by Grants from the Young Foundation of Yunnan Province Education Department (No. 0141168) and the Foundation of Yunnan University (No.2002Q012SM).

* Corresponding author. Tel : 86-871-5032061 ; Fax : 86-871-5033724 ; E-mail : yumin_11@sina.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>