

噬菌体抗体库的构建及抗乳腺癌细胞单链抗体的筛选

赵 岩^{1,2} 王清明^{1*} 付学奇² 陈吉中¹ 范国才¹ 陈惠鹏³

¹(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

²(吉林大学生命科学学院,长春 130023)

³(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘 要 构建抗人乳腺癌细胞 MCF-7 的噬菌体单链抗体库,从中筛选 MCF-7 细胞特异性单链抗体。用 MCF-7 细胞免疫 BALB/C 小鼠,取脾脏,提取总 RNA,用 RT-PCR 技术扩增小鼠抗体重链(V_H)和轻链(V_L)可变区基因,经重叠 PCR(SOE-PCR),在体外将 V_H 和 V_L 连接成单链抗体(scFv)基因,并克隆到噬菌粒载体 pCANTAB5E 中,电转化至大肠杆菌 TG1,经辅助噬菌体超感染,构建噬菌体单链抗体库。从该抗体库中筛选特异性识别 MCF-7 细胞的噬菌体单链抗体,将表面展示单链抗体的单克隆噬菌体转化大肠杆菌 TOP10 进行可溶性表达。成功地构建了库容为 1.2×10^6 的抗 MCF-7 乳腺癌细胞的单链抗体库,初步筛选到了与 MCF-7 细胞特异性结合的 scFv,Western blot 检测表明,在大肠杆菌 TOP10 中实现了单链抗体可溶性表达。

关键词 MCF-7, 单链抗体(scFv), 噬菌体抗体库, 筛选, 表达

中图分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0667-06

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,其发病率具有明显的地域性。在欧美等发达国家的发病率远高于亚、非、拉等地区。我国虽然是乳腺癌低发区,但是随着我国经济的快速发展,人民生活水平的不断提高,乳腺癌的发病率正呈逐年上升趋势,这一现象在大中城市尤为突出。目前,我国大城市中的乳腺癌发病率有逐步接近欧美发达国家水平的趋势。乳腺癌治疗的主要手段仍然是手术治疗,但仅通过手术不可能根治乳腺癌。在手术治疗的基础上辅以化疗、放疗、免疫治疗、中医中药治疗等各项治疗手段,才能取得一个较好的治疗效果。多年来,人们一直在探索应用免疫学的方法来治疗乳腺癌,但直到 1998 年,美国 FDA 批准针对原癌基因表达产物 HER2 受体的人源化单克隆抗体 Herceptin^[1]用于乳腺癌的临床治疗,人们才真正看到了免疫治疗乳腺癌的曙光。

20 世纪 90 年代发展起来的噬菌体抗体库技术为抗体的筛选提供了一种简便高效的方法^[2,3]。本实验利用人乳腺癌细胞 MCF-7 免疫小鼠的脾脏总 RNA 为材料,构建了抗人 MCF-7 乳腺癌细胞的噬菌体单链抗体库,以期从中筛选特异性识别人 MCF-7

乳腺癌细胞的 scFv,用于乳腺癌的免疫治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:6 周龄雌性 BALB/C 小鼠由军事医学科学院实验动物中心提供的。

1.1.2 噬菌粒、菌株及试剂:人乳腺癌细胞 MCF-7 为本室保存;噬菌粒载体 pCANTAB5E、辅助噬菌体 M13KO7、大肠杆菌 *E. coli* TG1 由中科院生物工程研究所胡宝成副研究员、田媛博士惠赠;Trizol 试剂为 GIBCO BRL 公司产品;M-MLV 逆转录酶、Oligo(dT)₁₅、DNA Purification System 为 Promega 公司产品;LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Sfi* I、*Not* I 限制酶为大连宝生物公司产品;QIAquick PCR Purification Kit 为 QIAGEN 公司产品。

1.1.3 PCR 引物:扩增鼠 V_H 和 V_L 的引物参照文献[4]和[5]设计,并经适当修改,两端加入 *Sfi* I、*Not* I 酶切位点。所有引物均由北京三博远志生物公司合成。重链 5'端引物 VH BACK:

5'-GTC CTC GCA ACT GC G GCC CAG CCG GCC ATG
Sfi I

收稿日期:2004-02-06, 修回日期:2004-04-28。

* 通讯作者。 Tel:86-10-66932202; E-mail:wang6801@sohu.com

GCC CAG GTS MAR CTG CAG SAG TCW GG-3'

重链 3'端引物 V_H FOR:

5'-TGA GGA GAC GGT GAC CCT GCT GCC TTG GCC CC-3'

轻链 5'端引物 V_K BACK:

5'-GAC ATC GAG CTC ACT CAG TCT CCA-3'

轻链 3'端引物 V_K FOR:

5'-GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT BAK YTC
Not I

CAR CTT KGT SCC-3'

其中 M = A, C; R = A, G; S = G, C; W = A, T; B = T, C, G; K = T, G; Y = C, T.

1.2 方法

1.2.1 动物免疫及脾细胞总 RNA 的提取:取 6 周龄的雌性 BALB/C 小鼠,每只腹腔注射 5×10^6 个 MCF-7 细胞进行免疫,每 2 周加强免疫 1 次,每次免疫后的第 3 天采血,用 ELISA 方法测血清抗体的效价。取免疫效果好的小鼠脾脏,以 Trizol 试剂提取脾脏总 RNA。

1.2.2 V_H 和 V_L 基因的扩增:以总 RNA 为模板, Oligo(dT)₁₅ 为引物,在 M-MLV 逆转录酶作用下反转录合成 cDNA 第一条链。以 cDNA 第一链为模板, V_H BACK/ V_H FOR 和 V_K BACK/ V_K FOR 为引物分别扩增鼠的重链和轻链可变区基因。PCR 条件为 95℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 1 min, 55℃ 2 min, 72℃ 2 min, 共进行 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,用 DNA Purification System (Promega) 纯化回收目的片段。

1.2.3 V_H 和 V_L 基因的拼接及 PCR 扩增:纯化回收的 V_H 和 V_L 片段与编码 (Gly, Ser)₃^[6] 的 linker 以等摩尔浓度混合,经重叠延伸法^[3]将 V_H -linker- V_L 随机连接成 scFv,并用 V_H BACK 和 V_K FOR 为引物进行二次 PCR 扩增 scFv。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段。

1.2.4 大肠杆菌的电转化:参照文献[7]和[8]制备电转化感受态 *E. coli* TG1,悬于 10% 甘油中,分装保存于 -70℃。在 *E. coli* Pulser 电穿孔 (Bio-RAD) 仪上进行电转,条件为电压 2.3 kV, 电容 25 μ F, 电阻 200 Ω 。

1.2.5 噬菌体抗体库的构建:用 Sfi I 和 Not I 酶切 scFv 基因片段,与经同样双酶切的 pCANTAB5E 载体在 T4DNA 连接酶作用下进行连接。连接产物经 QIAquick PCR Purification Kit 纯化后电转化感受态

E. coli TG1。转化产物立即加入至 37℃ 预热的 2 mL $2 \times$ YTG (20% Glucose) 培养基中, 37℃ 培养 1 h, 取少部分转化菌经梯度稀释后铺 SOBAG 琼脂板, 计数菌落, 测定库容。其余的菌液涂于 SOBAG 琼脂板, 30℃ 培养 24 h。用 $2 \times$ YT 培养基收集细菌集落, 取一部分悬于 10 mL $2 \times$ YTAG (100 μ g/mL Ampicillin, 20% Glucose) 培养基中, 稀释细胞至 OD_{600} 约为 0.3, 37℃、250 r/min 振荡培养 1 h。至对数生长期后, 加入 5×10^{10} pfu 的 M13K07 辅助噬菌体进行超感染, 继续振荡培养 1 h, 离心, 菌体重悬于 $2 \times$ YTAK (50 μ g/mL Kanamycin 20% Glucose) 培养基中过夜培养, 次日离心收集上清, 加入 1/5 体积的 PEG /NaCl 溶液沉淀噬菌体, 冰浴 1 h 以上, 离心, 以 1 mL PBS 重悬沉淀, 即为噬菌体 scFv 抗体库, 4℃ 储存备用。

取 10 μ L 经梯度稀释的噬菌体 scFv 库加入到 100 μ L OD_{600} 为 1.0 的 TG1 菌中, 37℃ 缓摇 20 min 后铺 LBAG 平板, 37℃ 过夜培养, 次日计算菌落形成单位 (cfu)。

1.2.6 噬菌体抗体库重组率鉴定及多样性分析:从 SOBAG 平板上随机挑取 10 个单菌落, 用 V_H BACK 和 V_K FOR 引物进行 PCR 扩增, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测相应扩增条带, 测定抗体库的重组率。

随机挑取抗体库的 6 个单克隆, 提取质粒后用 Bst N I 酶切, 琼脂糖电泳分析酶切图谱。

1.2.7 噬菌体 scFv 抗体库的筛选:取胰酶消化的 MCF-7 细胞 1×10^7 个, PBS 洗涤后, 用含 2% 脱脂奶粉的 PBS 冰浴 1 h, 离心沉淀细胞后, 用 1 mL scFv 噬菌体抗体库溶液重悬细胞, 室温缓摇 1 h, 离心弃上清, 用预冷的 PBS 充分洗涤细胞 (第 1 轮洗 3 次, 第 2 轮洗 5 次, 第 3 轮以后洗 8 次)。加入 500 μ L 洗脱液 (0.1 mol/L 甘氨酸/HCl, pH = 2.2), 冰浴 5 min 后离心沉淀细胞, 立即加入 30 μ L Tris (2 mol/L) 中和, 加入当日培养的 *E. coli* TG1 菌液 2 mL, 37℃ 缓摇 20 min 进行感染, 取 10 μ L 测定 cfu, 其余菌液继续培养至 1 h, 按照 1.2.5 的方法制备次级噬菌体抗体库。重复上述步骤进行下一轮筛选, 共进行 5 轮筛选。

1.2.8 细胞 ELISA 鉴定 scFv 的特异性:从筛选后的平板上随机挑取单菌落, 制备单克隆噬菌体 scFv, 以 MCF-7 细胞为靶标作 ELISA 检测 scFv 的结合活性。鉴定为阳性的再以 HpG2、Hela 细胞作 ELISA 检测, 以确定 scFv 的细胞特异性。将生长至单层的细胞用 0.25% 的戊二醛固定于 96 孔培养板中, 2% 脱脂奶粉的 PBS 37℃ 封闭 1 h, 将单克隆噬菌体 scFv 与

等体积含 2% 脱脂奶粉的 PBS 混合,室温温育 15 min,加入到 96 孔板中,每孔 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,0.05% Tween20-PBS 洗涤 6 遍,加入 HRP-M13 单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,0.05% Tween20-PBS 洗涤 6 遍后,加入 TMB 底物显色,测定 A_{450} 值。

1.2.9 scFv 基因的表达及表达产物的鉴定:用 ELISA 检测为阳性的噬菌体 scFv 感染 *E. coli* TOP10,铺板生长后,挑取单克隆接种到 2 \times YTAG 培养基中,培养至对数生长期,离心,菌体重悬于 2 \times YT 培养基中,加入 IPTG 至 1 mmol/L 诱导表达 4h,然后用 SDS-PAGE 及 Western blot(以 HRP-anti E-tag 抗体检测)鉴定 scFv。

2 结果

2.1 V_H 和 V_L 基因的扩增和 scFv 基因的拼接

BALB/C 小鼠血清效价由免疫前的小于 1:100 上升到大于 1:24800,说明有特异性 IgG 表达。用 Trizol 试剂提取的小鼠脾脏总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见 18S 和 28S 两条清晰条带(图未列出),表明提取的 RNA 质量较好。以总 RNA 为模板,反转录合成 cDNA 第一条链,用两组简并引物分别扩增出大约 340bp 的 V_H 和 320bp 的 V_L 基因片段(图 1),将 V_H 和 V_L 基因与编码 (Gly₄Ser)₃ 的 linker 基因片段混合后经过重叠延伸拼接法随机连接成 scFv 并进行二次 PCR 扩增。1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果表明,扩增的 scFv 产物大小约为 750bp 左右(图 2),与文献报道相符。

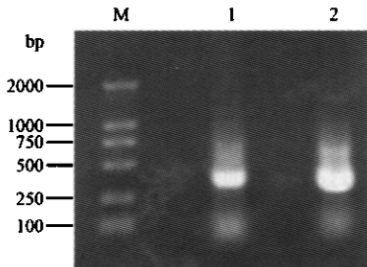


图 1 V_H 和 V_L 的基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of V_H and V_L genes

M: DNA marker; 1: V_H genes; 2: V_L genes

2.2 噬菌体单链抗体库的构建及鉴定

scFv 基因片段经 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切后,与经同样双酶切的 pCANTAB5E 载体连接。连接产物纯化后,电转化感受态 *E. coli* TG1。菌液涂布 SOBAG 平板,经计算长出约 1.2×10^6 个氨苄抗性菌落,随机挑取 10 个单菌落,用 V_H BACK 和 V_L FOR 引物进

行 PCR 扩增,全部含有 750bp 的全长 scFv 基因片段(图 3),因此,所构建文库的有效库容为 1.2×10^6 。随机挑取文库的单克隆进行 *Bst*NI 酶切,结果呈现多样性的酶切图谱(图 4),表明文库的多样性比较好。菌液经 M13KO7 辅助噬菌体超感染,PEG /NaCl 沉淀浓缩后得到噬菌体 scFv 抗体库,测定噬菌体滴度为 3.64×10^{13} cfu/mL。

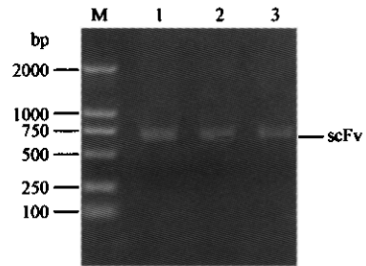


图 2 scFv 基因的装配

Fig.2 Assembly of scFv

M: DNA marker; 1, 2, 3: PCR products of scFv

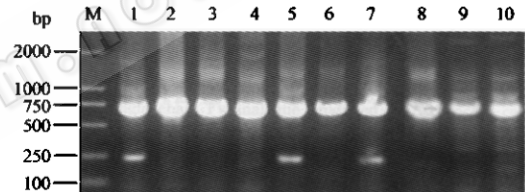


图 3 重组单克隆的菌落 PCR 鉴定

Fig.3 PCR analysis of recombinant clones

M: DNA marker; 1 ~ 10: randomly selected clones

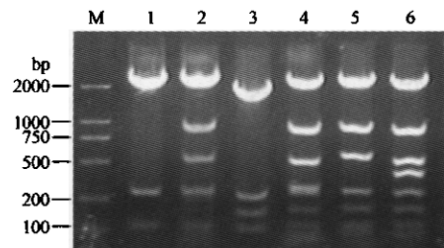


图 4 单克隆的 *Bst*NI 酶切图谱

Fig.4 *Bst*NI fingerprinting of individual clones

M: DNA marker; 1 ~ 6: individual clones

2.3 噬菌体单链抗体库的筛选

以人乳腺癌细胞 MCF-7 活细胞为抗原对噬菌体 scFv 抗体库进行了 5 轮“吸附、洗脱、扩增”的富集筛选。尽管从第 1 轮到第 5 轮的洗涤次数洗涤力度不断加强,由 3 次上升到 8 次,但噬菌体的收率却显示了一个增加的趋势,第 5 轮比第 1 轮增加了约 75 倍(表 1)。说明特异性的 scFv 得到了有效富集。

表 1 噬菌体抗体库的富集
Table 1 Selective enrichment of phage antibodies
against MCF-7 cells from the library

Rounds of panning	Phages input (cfu)	Phages output (cfu)	Yield /%
1	3.64×10^{13}	9.95×10^7	2.73×10^{-6}
2	2×10^{12}	3.5×10^7	1.75×10^{-5}
3	1×10^{12}	1.75×10^7	1.75×10^{-5}
4	3.8×10^{12}	5.32×10^7	1.4×10^{-5}
5	5×10^{10}	1.03×10^7	2.06×10^{-4}

2.4 噬菌体 scFv 的特异性鉴定

从第 4 轮和第 5 轮筛选后文库中,分别随机挑取 20 个和 10 个单菌落,制备噬菌体 scFv,以乳腺癌细胞 MCF-7 为靶标进行 ELISA 检测。第 4 轮中挑取的 20 个噬菌体 scFv,其中有 4 个与 MCF-7 细胞有阳性反应;而第 5 轮筛选后的文库中挑取的 10 个噬菌体 scFv 全部与 MCF-7 细胞反应的 P/N 值均大于 6 (以 P/N 值 > 3 为阳性),这表明经过第 5 轮筛选后,文库中与 MCF-7 细胞结合的噬菌体 scFv 的阳性率由 20% 上升到 100%。同时为了验证噬菌体 scFv 的特异性,我们又用人 HepG2 肝癌细胞、人 Hela 宫颈癌细胞为靶标进行 ELISA 检测,结果显示 10 个噬菌体 scFv 与 Hela 细胞反应的 P/N 值均小于 3 (图 5);除 1 号克隆与 HepG2 细胞反应的 P/N 值略大于 3 外,其它噬菌体 scFv 与 HepG2 细胞反应的 P/N 值也均小于 3,这说明这些噬菌体 scFv 能特异性识别 MCF-7 细胞。

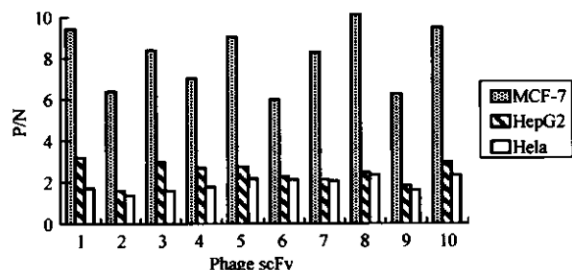


图 5 ELISA 检测噬菌体 scFv 与 MCF-7、HepG2 和 Hela 细胞的结合活性

Fig.5 Binding affinity of the selected phage scFv against MCF-7, Hela and HepG2 cells by ELISA

2.5 scFv 的表达及鉴定

将阳性的噬菌体 scFv 感染 *E. coli* TOP10,经 IPTG 诱导后,以全菌体作 SDS-PAGE 鉴定,考马斯亮蓝 R250 染色后,在相对分子量约 32kD 处出现了一

条表达带(图 6),为 p III signal-scFv-E tag 融合蛋白^[5],表达的蛋白用 HRP-anti E-tag 抗体作 Western blot 分析发现在相对分子量 32kD 处有一条清晰的显色条带(图 6),为能与 anti E tag 抗体特异性结合的 p III signal-scFv-E tag,与文献报道相符^[5]。说明 scFv 在 *E. coli* TOP10 中实现了可溶性表达。

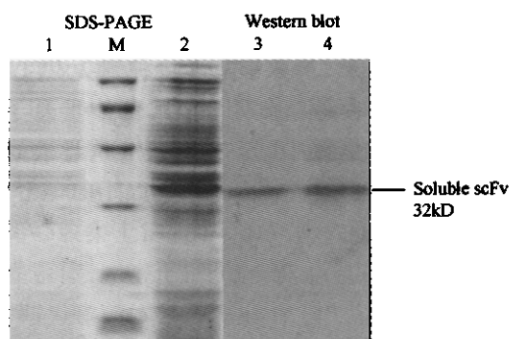


图 6 scFv 表达及 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.6 SDS-PAGE and Western blot analysis of scFv expression M:low molecular weight markers (14.4 ~ 97.4kD); 1:uninduced *E. coli* TOP10; 2:induced *E. coli* TOP10 by IPTG; 3, 4:expressed scFv in *E. coli* TOP10

3 讨 论

单链抗体(scFv)被认为是抗原结合的最小活性单位,具有分子量小、免疫原性低、非靶部位存留时间短、组织穿透力强、易于基因工程制备和改造等优点^[9]。因此,scFv 非常适合于肿瘤的导向治疗。噬菌体抗体库技术的出现^[3]使得抗体的筛选变得方便快捷,也使得抗体的人源化成为可能。本项研究的目的是利用抗体库技术寻找肿瘤细胞特异性的单链抗体,以期用于肿瘤的导向治疗。

本文构建了抗人乳腺癌细胞株 MCF-7 的噬菌体单链抗体库。抗体可变区引物采用简并引物的形式,以期尽可能地扩增出多样性的抗体基因,并减少工作量。抗体可变区引物的设计参考了 Olandi 等^[4,5]设计的引物,上游引物与抗体可变区的 FR1 互补,下游引物与抗体可变区的 FR4 互补。另外, V_H 下游引物的 3' 端和 V_L 上游引物的 5' 端还分别和 Linker 序列的两端互补。由于 κ 链占小鼠抗体轻链 95% 以上,因此,扩增 V_L 时只使用了 κ 链的引物。利用设计的引物,通过 RT-PCR 从 MCF-7 细胞免疫小鼠的脾脏总 RNA 中克隆出了抗体的轻链和重链可变区基因,构建了库容为 1.2×10^6 的抗体库。理论上讲,抗体库的库容越大,从中筛选到高亲和力抗体的机会就越大。但由于我们构建的是一个免疫文

库,在免疫动物时经过了多次加强免疫,目标抗体在体内经过了抗体亲和力成熟的过程,所以,所建的抗体库中目标抗体的比例较高,亲和力也较高,所以,我们并没有致力于构建高库容的抗体库。我们构建的抗体库库容为 1.2×10^6 ,利用该抗体库,经过5轮的筛选得到了与MCF-7细胞特异结合的噬菌体单链抗体。

scFv的表达采用噬菌粒载体 pCANTAB5E (Pharmacia),该载体使用 Lac 启动子,scFv 插入 pⅢ蛋白信号肽序列与 pⅢ蛋白编码区之间,在 scFv 后面连有1个 E-tag 序列和琥珀终止密码子(TAG),在琥珀抑制型菌株(如 TG1)中,琥珀终止子只有20%有效,大多被通读成谷氨酸,scFv 与 pⅢ蛋白融合表达,在辅助噬菌体超感染下可将 scFv 展示于噬菌体的表面。而在非琥珀抑制的菌株(如 TOP10 或 HB2151)中,多肽链的翻译终止于 E-tag, scFv-E-tag 在信号肽引导下分泌到细胞膜间隙,成为可溶性的 scFv-E-tag 融合蛋白,可以用抗 E-tag 抗体来检测 scFv 的表达情况。我们将阳性克隆转化 *E. coli* TOP10,诱导表达的菌液作 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定表明,scFv 在 *E. coli* TOP10 得到了正确表达。

由于细胞表面抗原种类多,每种抗原的数量少,筛选针对细胞表面抗原的单链抗体的难度较大。我们曾尝试用固定的细胞进行筛选,但筛选到的克隆数量少,含有 scFv 片段的阳性克隆率较低,这可能是由于固定对细胞表面抗原的改变或对抗原暴露程度的改变造成的。后来采用活细胞悬液进行筛选^[10,11],在筛选中,采用先低后高的洗涤力度,低洗涤力度保证低丰度的抗体不丢失,逐步加强洗涤力度以获得高亲和力的抗体。在第5轮筛选后,挑取了10个噬菌体单克隆,以3种肿瘤细胞作 ELISA 检测,其中9个克隆与 MCF-7 细胞特异性结合。我们将通过基因序列分析确定其是否为独立克隆。所以,筛选细胞特异性抗体采用活细胞悬液进行筛选可能比用固定细胞进行筛选效果更好。

本文成功构建了抗 MCF-7 乳腺癌细胞的噬菌体单链抗体库,利用该抗体库经过5轮的筛选得到了特异识别 MCF-7 细胞的噬菌体单链抗体,为我们下一步构建人源化的抗体库积累了宝贵的经验,为开展肿瘤特异性治疗研究奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Carter P, Presta L, Gorman CM *et al.* Humanization of an anti

p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992,89: 4285 - 4289

[2] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G *et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990,348:552 - 554

[3] Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD *et al.* Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature*, 1991,352(15):624 - 628

[4] Olandi R, Gussow D, Jones PT *et al.* Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989,86:3833 - 3837

[5] Qiaoping Yuan, Clarke JR, Hui-ren Zhou *et al.* Molecular cloning, expression, and characterization of a functional single-chain fv antibody to the mycotoxin zearalenone. *Applied And Environmental Microbiology*, 1997,63(1):263 - 269

[6] Huston JS, Levinson, Mudgett-Hunter M *et al.* Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988,85:5879 - 5883

[7] Dower JW, Miller JF. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 1988, 16: 6127 - 6145

[8] Song SD(宋诗铎), Zhang TH(张同海), Qi W(祁伟) *et al.* Electroporation of foreign DNA into *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 1993,9(3):237 - 240

[9] Yokota T, Milenic DE, Whitlow M *et al.* Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Research*, 1992,52:3402 - 3408

[10] Ridgway JB, Ng E, Kern JA *et al.* Identification of a human anti-CD55 single-chain Fv by subtractive panning of a Phage library using tumor and nontumor cell lines. *Cancer Research*, 1999,59:2718 - 2723

[11] Zhang GF(张广发), Wang Y(王琰), Wang YM(王雅明) *et al.* Cloning of anti-breast cancer monoclonal antibodies from phage antibody libraries. *Chinese Journal of Oncology(中华肿瘤杂志)*, 1995,17(4):258 - 262

Construction of Phage Display Antibody Library to MCF-7 Cells and Screening of Single-chain Antibodies Against Breast Cancer Cells

ZHAO Yan^{1,2} WANG Qing-Ming^{1*} FU Xue-Qi² CHEN Ji-Zhong¹ FAN Guo-Cai¹ CHEN Hui-Peng³

¹ (Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

² (College of Life sciences, Jilin University, Changchun, 130023 China)

³ (Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract The aim of this study is to construct a phage display single-chain variable fragment (scFv) library against breast cancer cells and screen the specific antibodies against MCF-7 cells from the library. The BALB/C mice were immunized with MCF-7 cells. Total RNA of spleens was isolated. The heavy-chain (V_H) and light-chain variable region genes (V_L) of the antibodies were amplified by RT-PCR and joined into a single chain by overlapping PCR with a linker DNA encoding the peptide (Gly₄Ser)₃. The assembled scFv fragments were cloned into the phagemids (pCANTAB5E) and the recombinant phagemids were used to transform competent *E. coli* TG1. The transformed TG1 cells were infected by helper phage M13KO7 and the recombinant phagemids were rescued. The scFv fusion proteins were displayed on the surfaces of the recombinant phages. A phage display antibody library of repertoire of 1.2×10^6 clones was constructed. The specific antibodies against MCF-7 cells were enriched by 75 times after five rounds of affinity selection. Ten recombinant phages clones that exhibited specific binding to MCF-7 cells were identified. The specificity of those phage clones was analyzed by reactivity against HepG2 cells and Hela cells by ELISA. One of the selected phage clones against MCF-7 cells was used to infect *E. coli* TOP10 to produce the soluble scFv antibodies after induction with IPTG. The strategy of construction and screening of antibody library directed against the whole tumor cells described in this report should be generally applicable to generate tumor cell-specific antibodies.

Key words MCF-7, scFv, phage display antibody library, screen, expression

Received: 02-06-2004

* Corresponding author. Tel: 86-10-66932202; E-mail: wang6801@sohu.com

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