

# 轮换淘选法筛选凝血酶特异的噬菌体抗体\*

洪 龙 杨柏成 朱圣庚\*\*

(北京大学生命科学院 北京 100871)

**摘要:**以抗原为选择剂,通过淘选可以从噬菌体抗体库中获得特异的单链抗体克隆。采用液相—固相轮换淘选的方法,从鼠源噬菌体抗体库中淘选出与凝血酶特异结合的单链抗体。首先,用光敏生物素将凝血酶生物素化,然后用链亲和素磁珠法淘选与凝血酶特异结合的重组噬菌体。噬菌体扩增后使用酶标板进行第2轮淘选,以除去上一轮中非特异结合的重组噬菌体。经4轮轮换淘选,最后从23个单克隆噬菌体抗体中分离出4个凝血酶特异的噬菌体抗体。

**关键词:**轮换淘选法,噬菌体抗体库,凝血酶特异的单链抗体

**中图分类号:**Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654 (2005) 03-0073-04

## The Selection of Thrombin-specific scAbs by Alternative Panning Strategy\*

Hong Long YANG Bai-Cheng ZHU Sheng-Geng\*\*

(College of Life Sciences, Beijing University, Beijing 100871)

**Abstract:** Specific scAbs could be obtained through biopanning from phage antibody libraries by use of antigens as target molecules. scAbs specific to thrombin were separated from mouse antibody library by the panning strategy of alternating liquid-solid phase in this paper. Thrombin was biotinylated by photobiotin at first, then avidin-coated magnetic beads were utilized to isolate specific scAbs. The eluted phages were amplified and subject to the second round panning in microtiter plate to remove the unspecific recombinant phages. 4 specific scAbs were separated from 23 phage clones after four rounds of alternative panning.

**Key words:** Alternative panning strategy, Phage antibody library, Thrombin-specific scAb

抗体技术的发展可分为3个阶段:第1阶段由动物免疫产生多克隆抗体;第2阶段为经杂交瘤产生单克隆抗体;第3阶段为通过基因工程获得各种抗体。应用噬菌体展示技术构建噬菌体抗体库,通过淘选可以从中选择出特异的噬菌体抗体<sup>[1]</sup>。噬菌体抗体技术的主要优点为:①无需免疫动物,可直接从噬菌体抗体库中淘选出特异噬菌体抗体<sup>[2]</sup>;②可以得到按常规免疫方法难于获得的人源抗体<sup>[3]</sup>;③展示的抗体与其基因存在于同一重组噬菌体内,获得抗体的同时也就获得了它的基因,便于用抗体工程大规模生产抗体。

然而在噬菌体抗体库的淘选过程中,总存在一些非特异性吸附<sup>[4]</sup>,如果一直使用同一种方法,这些非特异吸附的噬菌体也同样被吸附、洗脱和扩增,因而被保留下来。近年来,随着淘选方式、洗脱方法的不断改进和发展,研究者不再局限于使用传统固相或液相的单一淘选方法<sup>[5-7]</sup>,而轮换淘选法是新方法中简单实用的一种。本文使用

\*国家自然科学基金资助重点项目 (No. 20333010)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 20333010)

\*\*通讯作者 Tel: 010-62755453, E-mail: zhushg@pku.edu.cn

收稿日期: 2004-09-06, 修回日期: 2004-09-26

了轮换淘选法从本实验室构建的鼠源噬菌体抗体库中成功地淘选到凝血酶特异的噬菌体抗体。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 抗体库：鼠源噬菌体抗体库为本室构建。

1.1.2 菌株：*E. coli* TG1 为本室保存。

1.1.3 试剂：凝血酶购于天津血液病研究所，光敏生物素为 Sigma 产品，链亲和素磁珠购自 Promega 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 凝血酶的生物素化及其检测：将凝血酶溶于 PBS 缓冲液中，加入光敏生物素，置于碘钨灯下强光照 45min。将反应后的混合溶液对大量 0.5mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 透析过夜，次日再更换 1 次缓冲液过夜。

用 PBS 对生物素化的凝血酶进行梯度稀释，在酶标板中包被各稀释度的凝血酶溶液于 4℃ 过夜。次日用 PBSM 进行封闭后，加入 PBSM 稀释 (1:200) 的亲合素-HRP，37℃ 反应 1h。洗涤后，向酶标板中加入新配制的底物溶液 [柠檬酸缓冲液 (pH4.0)，ABST (0.22mg/mL)，1.8μL/mL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]，暗处显色 20~40min，拍照。

1.2.2 轮换淘选法：噬菌体抗体库首先用液相法进行淘选：先将生物素化的凝血酶与噬菌体抗体库相互作用，然后加入偶联有链亲和素的磁珠，富集能与凝血酶结合的噬菌体抗体。加入 0.1mol/L 三乙胺 (洗脱液) 以洗脱噬菌体抗体，经 0.1mol/L NaAc/HAc (pH4.0) 溶液中和。取 1μL 所得到的重组噬菌体溶液进行梯度稀释，计算第一轮淘选的回选率，将剩余的噬菌体溶液进行扩增。重组噬菌体经两次 PEG/NaCl 沉淀后，溶于 PBS 缓冲液中，并经 0.45μm 的滤膜过滤除菌。取 1μL 重组噬菌体溶液测定滴度，进行下一轮淘选。

第 2 轮用固相法淘选：将凝血酶包被在酶标板中，加入经 PBSM 封闭的噬菌体抗体库，于室温下反应 2h，倒出噬菌体溶液，PBST 洗涤酶标板 20 次，再用 PBS 洗涤酶标板 20 次。加入三乙胺以洗脱噬菌体抗体，经 NaAc/HAc 溶液中和。测定回收率并扩增噬菌体。

第 3、4 轮分别重复第 1、2 轮。但为了富集特异结合的噬菌体抗体，适当降低凝血酶的浓度和所投入的噬菌体库的量。将第 4 轮淘选得到的噬菌体进行梯度稀释，感染对数期的大肠杆菌 TG1，然后涂在 LB-A 平板上，37℃ 培养过夜。

1.2.3 ELISA 筛选阳性重组噬菌体：挑取单菌落以扩增重组噬菌体，噬菌体经两次 PEG/NaCl 沉淀后，溶于 PBS 缓冲液中，并经 0.45μm 的滤膜过滤除菌。将凝血酶包被在酶标板中，加入经 PBSM 封闭的各个噬菌体抗体溶液，37℃ 反应 2h。洗涤后，加入辣根过氧化酶偶联的鼠抗噬菌体 M13 单抗 (原液 1:5,000 稀释于 2% PBSM)，37℃ 反应 2h，洗涤后，加入新配制的底物溶液 (同 1.2.1)，暗处显色 20~40min。

读出各孔 OD<sub>410</sub>，选择阳性克隆进行序列分析 (由 Bioasia 公司完成)。

2 结果

2.1 凝血酶的生物素化

使用光敏生物素对凝血酶进行生物素化,然后将生物素化的凝血酶包被在酶标板上,用亲和素—HRP 检测凝血酶的生物素化效果(图1)。实验结果表明,各种浓度的凝血酶均呈阳性反应,而阴性对照(未生物素化的凝血酶)则不显色,说明凝血酶已被成功地生物素化。



图1 凝血酶生物素化的检测

W2 10U/mL 生物素化凝血酶, W3 2U/mL 生物素化凝血酶,  
W4 0.4U/mL 生物素化凝血酶, W5 0.08U/mL 生物素化凝血酶,  
W6 10U/mL 凝血酶

2.2 凝血酶特异噬菌体抗体的淘选

测定各轮重组噬菌体的滴度,结果见表1。

表1 凝血酶特异的噬菌体抗体的淘选

淘选轮次	抗原浓度 (U/mL)	投入噬菌体的滴度 (cfu)	洗脱噬菌体的滴度 (cfu)	回收率
1	4	$7.2 \times 10^{11}$	$3.3 \times 10^4$	$4.6 \times 10^{-8}$
2	5	$6.4 \times 10^{11}$	$5.6 \times 10^5$	$8.7 \times 10^{-7}$
3	0.8	$2.5 \times 10^{11}$	$9.0 \times 10^5$	$3.6 \times 10^{-6}$
4	1	$4.9 \times 10^{11}$	$2.5 \times 10^6$	$5.2 \times 10^{-6}$

通过对比第1轮和第3轮以及第2轮和第4轮,可以看出噬菌体抗体得到明显的富集。

2.3 ELISA 鉴定阳性克隆

挑选23个单克隆进行了ELISA鉴定,其中4个克隆呈阳性反应,而抗原阴性对照(BSA)和噬菌体M13K07 阴性对照的OD值均很低(表2)。

选择阳性反应较强的14#克隆,测定其单链抗体基因的全序列,确定为一个正确的单链抗体基因。

表2 ELISA 鉴定与凝血酶结合的噬菌体抗体

噬菌体克隆	光密度 (OD <sub>410</sub> )
7#	0.156 ± 0.011
11#	0.152 ± 0.015
14#	0.160 ± 0.016
17#	0.153 ± 0.014
BSA	0.011 ± 0.010
M13K07	0.016 ± 0.008

3 讨论

在整个淘选过程中,以第一轮最为重要,因此在第一轮中我们采取了效率较高的液相淘选方法,即将凝血酶生物素化,用包被链亲和素的磁珠进行亲和吸附。在液相淘选中,抗原和噬菌体抗体都可以在溶液中自由地运动;而在固相淘选中,抗原被吸附在酶标板表面,不能自由运动,与液相淘选相比,与噬菌体抗体碰撞、继而结合的几率大减。其次,在液相中,抗原可以保持原有的构象,并且噬菌体抗体可以结合抗原所有的表位;但在固相中,抗原有可能因吸附在酶标板上而导致部分表位被掩盖,抗原分子受空间位阻而影响与噬菌体抗体的结合。在

生物素化过程中,生物素通过一个烃链长臂连接到抗原上,可以有效地消除空间位阻。在噬菌体抗体库的淘选过程中,总存在一些非特异性吸附,如果一直使用同一种方法,这些非特异吸附的噬菌体也同样被吸附、洗脱和扩增,因而被保留下来。因此在第二轮中我们换用了固相淘选的方法,虽然效率有所降低,但可以有效地去除上一轮中因非特异吸附而得到的噬菌体。整个淘选过程在液相和固相中轮换交替进行,有效地避免一些非特异性吸附,可选择性地扩增特异的噬菌体抗体。

此外,与单一淘选方法相比,轮换淘选法更能获得多种特异的噬菌体抗体。因为如果使用单一的淘选方法,对某一表位的结合优势一直存在,这种优势选择有可能在轮换淘选过程中,因反应条件的改变而不复存在,有利于多种噬菌体抗体的结合。

### 参 考 文 献

- [1] Smith G P. *Science*, 1985, **228**: 1315 ~ 1317.
- [2] Marks J D, Hoogenboom H R, Bonner P R, *et al.* *J Mol Biol*, 1991, **222**: 581 ~ 597.
- [3] Michael D S, Peter A, Richcarda F, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 6157 ~ 6162.
- [4] Hoogenboom H R, Bruine A P, Hufton S E, *et al.* *Immunotechnology*, 1998, **4**: 1 ~ 20.
- [5] Claus K, Stefania S, Dominique D, *et al.* *J Mol Biol*, 1997, **268**: 607 ~ 618.
- [6] Baek H, Suk K, Kim Y, *et al.* *Nucleic Acids Research*, 2002, **30**: e18.
- [7] Hideki W, Kouhei T, Ryutaro A, *et al.* *Biochem Biophys Res Communications*, 2002, **295**: 31 ~ 36.