

# 人噬菌体抗体库技术的发展

周莹 王学田 波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**关键词** 人源抗体库, 噬菌体抗体, 亲和力

**分类号** Q939.48

抗体库技术的出现得益于用 PCR 的方法人为地设计一组引物克隆出全套免疫球蛋白可变区基因, 以及从大肠杆菌分泌有结合功能的免疫球蛋白分子的成功。1989 年, Huse 等<sup>[1]</sup>将扩增的轻链和重链片段分别克隆到以  $\lambda$  Zap 改造的表达载体中, 构建成轻链和重链库, 然后将两个库随机重组形成了组合抗体库。由于在 V 基因的 5' 末端有分泌信号序列, 所表达的 Fab 可分泌到细菌体外。由于对特异性抗体的筛选仍采用传统的“膜的原位杂交法”, 所以在对库容量为  $10^6 \sim 10^7$  的筛选时其工作量之大是可想而知的。为了克服随机组合文库的随机性强、库容量大、筛选系统极低和不易获得特异性抗体等缺点, 1991 年将噬菌体表面递呈技术引入抗体库的构建, 从而出现了噬菌体抗体库技术<sup>[2,3]</sup>, 该技术绕过了细胞杂交这一步, 较好地解决了人体杂交瘤系统低效的难题, 为单抗的制备开辟了广阔的前景<sup>[4]</sup>, 本文就噬菌体抗体库等构建和应用的几个关键问题进行讨论。

## 1 PCR 技术

要保证抗体的所有组分都能用 PCR 的方法扩增出来, 以使得绝大多数抗原都能从抗体库中筛选出相应的抗体, PCR 引物的设计是至关重要的。引物的设计需按抗体可变区基因上下游 DNA 碱基之序列来进行, 这需要了解尽量多的抗体基因序列。遗憾的是由于所报道的人杂交瘤抗体较少, 人们所能了解的 DNA 序列只有几十种, 所以以往大都是根据 Kabat 等<sup>[5,6]</sup>的免疫球蛋白数据库(database)的信息设计引物。总的来说, 所报道的引物设计可大致分为两类, 一是前导肽序列引物或前导肽序列简并引物, 利用该类引物已从人的杂交瘤和外周血细胞中扩增出 VH 基因<sup>[7,8]</sup>, Danielsson 等<sup>[9]</sup>非常赞同用前导肽序列简并引物, 他们认为前导肽

引物可以扩增出任何已知和未知碱基序列的抗体基因。另一种是可变区基因 5' 末端互补引物, Marks 等<sup>[10]</sup>认为前导肽序列引物通常需要高度简并, 退火条件不严格, 加之这些引物扩增出来的 PCR 产物不能直接用于细菌表达分泌系统, 所以他们设计出一组框架区引物, 利用这些引物从未经免疫的人外周血细胞扩增 V 基因, 构建成天然的噬菌体单链抗体库<sup>[3]</sup>。但是利用这种引物进行 PCR 时不能保证所有的引物都扩增出产物, 并且扩增出来的产量也较少<sup>[12]</sup>。

就目前人们所掌握的有限的抗体结构序列信息来说, 还不可能设计出一些通用引物把所有抗体基因都扩增。所以王学<sup>[11]</sup>等对现有的 PCR 程序进行了改造, 先用前导肽简并序列进行第一次 PCR, 然后在用 Kang 等<sup>[12]</sup>所报道的引物进行第二次 PCR, 结果所有的引物都能扩增出来, 且产量也相当高。用这种半套式 PCR 已从人外周血淋巴细胞中扩增出抗体基因, 并已构建成人噬菌体抗体库, 从中筛选出了抗 HBsAg<sup>[4]</sup>和抗 HIV-Igpl20(待发表)抗体。

## 2 载体的构建

在构建噬菌体抗体库时, 根据所设计的抗体的分子(Fab 和 ScFv)之不同而选用不同的载体, 但二者的基本原理是相同的, 只是前者有两个启动子, 后者有一个启动子。就拿构建 Fab 噬菌体抗体库来说, 一般多选用噬菌粒载体 pComb3<sup>[2]</sup>, 它有野生型丝状噬菌体基因的间隔区和复制原点, 以及两个 LacZ 启动子, 启动子后是 pelB 引导肽序列, 可同时插入抗体的重链 fd 段及整个轻链基因, 把表达产物分泌到细菌的周质腔中并组装为 Fab 抗体。重链基因与丝状噬菌体包膜蛋白 pIII 的 N

端基因相连接,并与之共表达。辅助噬菌体感染后提供包装蛋白和复制蛋白,把噬菌粒的一条DNA链包装到子代噬菌体中,同时把带有F<sub>d</sub>段的P<sub>III</sub>蛋白嵌合在噬菌体的表面,这就达到了基因型与表型的统一。

有报道说<sup>[13]</sup>要想在抗体库中筛选到特异性抗体,携带有该抗体的噬菌体数量必须超过100个,否则就很难筛选到这一特异性抗体。为了提高噬菌体的包装滴度,Sosserind等<sup>[14]</sup>研究了伴侣蛋白(chaperonin)对噬菌体M13组装的影响,将伴侣蛋白CroE基因插入到噬菌粒载体中,使之与pEXmids共同表达,同样条件下可提高被包装的噬菌粒滴度近200倍。因此这种载体可用作通用而简单的工具来增加所表达的抗体片段数量。最近,Johansson等<sup>[15]</sup>构建了一个新的表达载体。同以往所报道的载体相比<sup>[2,14]</sup>具有如下独特之处,(1)用一个启动子同时表达H和L链基因,避免了两个启动子之间的同源重组;(2)表达的阻遏物以阻遏其它无关基因的表达;(3)表达较短的P蛋白,以减少识别P<sub>III</sub>蛋白的噬菌体抗体的数量,相对增加携带特异型抗体的噬菌体的数量;(4)含有胰蛋白酶的酶切位点,利于回收只与抗原结合的噬菌体,以减少非特异性的噬菌体;(5)具有(His)<sub>6</sub>尾,利于Fab纯化和鉴定。

要使任何抗原都能从抗体库筛选出相应的抗体,就得保证抗体库中的抗体片段有足够的多样性,影响这一有效表位多样性的主要因素除了设计优良的PCR引物外还有细菌的转化效率。目前所用的转化方法首选的是电穿孔法,其转化效率高达 $10^{10}$ 个转化子/ $\mu\text{g}$  DNA,但如果在培养基中加入抗生素,其转化效率显著地降低<sup>[16]</sup>。所以目前所报道的抗体库的容量最高为 $10^8$ ,平均介于 $10^6 \sim 10^7$ 之间,Alting-Mees等<sup>[17]</sup>最近构建了一种新的质粒Polycos,它是具有包装识别序列COS位点串联多聚体的噬菌粒,它可以通过 $\lambda$ 体外包装和 $\lambda$ 粒子感染将噬菌粒转入大肠杆菌细胞中。为了满足 $\lambda$ 包装的需要,Polycos载体进行限制消化形成线状分子,这些线状载体单体与插入DNA连接,产生载体/插入片段串联体。 $\lambda$ 噬菌体包装提取物随机地选择COS位点,然后沿着DNA分子直至在超过38kb和小于51kb之间在遇到COS位点时,这之间的DNA片段都被包装到 $\lambda$ 噬菌体粒子内部。感染大肠杆菌后,Polycos串联体表达M13的P<sub>II</sub>蛋白,该P<sub>II</sub>蛋白在M13的复制起始位点切开切口,滚环式复制,包装成线性噬菌体粒子。

Polycos载体省去需要电穿孔法进行转化, $\lambda$ 噬菌体包装感染效率较高,并且其体外包装不受抗生素的影响,利于普及推广使用。

### 3 提高抗体的亲和力

在构建抗体库时,由于H链是随机重组的,加之大肠杆菌转化效率低的限制,很难获得亲和力较高的H链和L链原始配组,所以从抗体库中筛选出来的抗体其亲和常数平均在 $10^7 \text{M}^{-1}$ 左右。因此,需要在体外进行亲和力成熟。从理论上说,提高亲和力的方法很多,但目前所报道的而又特别有效的方法有以下三种。

**3.1 体外突变法:**用错配PCR(error-prone PCR)方法,可在噬菌体抗体的可变区基因或CDR区域的碱基中,产生随机位点突变(random point mutation)<sup>[18,19]</sup>,几次淘洗之后所筛选出来的抗体其亲和力提高4倍以上<sup>[19]</sup>。但是,应用错配PCR方法,需要预先对所筛选出来的抗体基因进行序列分析之后再设计引物。最近,又有报道<sup>[20]</sup>指出,有一种称作CDR巡查(CDR walking)的方法用于在体外引入抗体基因突变。该方法无需知道所筛选的抗体基因序列,而只根据Kabat等<sup>[6]</sup>所提供的重链CDR信息,采用重叠PCR诱变(mutagenesis)技术在重链CDR<sub>1</sub>的32位点和CDR<sub>2</sub>的96~99位点引入碱性多样性(diversity)。经筛选后,其亲和力提高10倍以上。

**3.2 链替换法:**由于在库容量不大的情况下,B细胞原有重轻链配组容易丢失,从原始(primary)库中筛选出来的抗体亲和力偏低。所以,人们试图从原始库中已筛选出来的可变区基因再重新配组,使其进一步多样化,从而提高其亲和力。这种再重新配组的方法称为链替换(chain shuffling)。同时链替换法也有助于研究抗体结构与功能以及亲和力变化之间的关系。链替换有几种情况,重链不变,替换轻链,使该重链与原始库中所有的轻链配组<sup>[21]</sup>,或与已筛选出的几(或几十)株抗体中的轻链配组<sup>[22]</sup>。轻链不变,替换重链,其配组方式与上轻链配组方式相同<sup>[22,23]</sup>。实践证明,链替换是一条切实可行的提高抗体亲和力的途径,替换轻链已得到了增加亲和力20倍的抗体,替换重链提高亲和力15倍<sup>[22]</sup>。

**3.3 利用大肠杆菌高突变株:**有一种大肠杆菌菌株MutD5,其DNA聚合酶全酶III中的 $\epsilon$ 亚基(epsiln subunit,该基具有3'-5'外切酶修正活性)的基因MutD

发生了突变,丧失了其校正功能,从而在该菌株复制时增加其体内基因突变频率。最近,Nissim等<sup>[24]</sup>将从单链抗体库中筛选出来的抗体基因,转化到 MutD5 菌株中,感染噬菌体,经过三次亲和选择得到超过原来亲和力 100 倍的抗体。

#### 4 应用及其前景

近几年来,人们对利用噬菌体抗体库技术克隆表达越来越感兴趣,这条途径能够更有效地操纵庞大的所有抗体组分,现已成功地从天然抗体库中筛选出很多不同的抗半抗原多糖病毒粒子和蛋白质抗原的抗体<sup>[24]</sup>。Burton等<sup>[25]</sup>从 HIV-1 阳性的志愿者抽取 5ml 骨髓构建噬菌体库,并从中筛选 30 多株抗 HIV-Igpl20 抗体 Fab,中和试验表明有几株能够与 HIV 结合而使之不能感染敏感细胞。其中一个克隆 IgG1612 对许多 HIV-1B 亚型的株系具有广谱中和能力,并且比其完整的分子中和活性还强<sup>[26]</sup>。最近有报道<sup>[27]</sup>从抗体库中筛选出 HIV-1 的 Rev (HIV-1 基因表达的磷酸蛋白调节物) 和 Tat (HIV-1 基因表达的反式激活因子) 之抗体 Fab,由于 Rev 和 Tat 比中和抗体所识别的 gp120 遗传稳定性要强得多,可能这类抗体在防治艾滋病方面更有应用前景。另外,从人源抗体库中还筛选出许多其它单抗,如抗破伤风类毒素<sup>[28]</sup>、呼吸道合胞病毒<sup>[29]</sup>、乙肝病病毒<sup>[4,30]</sup>、单纯疱疹病毒糖蛋白<sup>[31]</sup>和 TFN- $\alpha$ <sup>[32]</sup>的单抗。

目前,利用抗体库技术制备抗体都是在 *E.coli* 中表达的 Fab 片段或单链抗体,但对于治疗来说,具有 Fc 片段的全抗体分子半衰期较长,效果好;加之利用 *E.coli* 表达系统其产量一般都很低,难以在实践中应用,因此,今后研究主要问题是抗体的全分子表达,以及如何提高抗体的产量。要想突破这一技术难关,须用真核表达系统。

#### 参 考 文 献

- [1] Huse W D, Sastry L, Lverson S A *et al.* Science, 1989, 246:1275.
- [2] Barbas C F, Kang A S, Lerner R A *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:7978.
- [3] McCafferty J, Griffiths A D, Winter G. Nature, 1990,248:552.
- [4] 王 学,王海涛,陈万荣等. 生物化学和生物物理学报,1997, 29:185.
- [5] Kabat E A, Wu T T, Perry H M *et al.* Sequences of Protein of Immunological Interest (U.S. Dept. Health Human Sciences, U.S. Government Printing Office), 1987.
- [6] Kabat E A, Wu T T, Perry H M *et al.* Sequences of Protein of Immunological Interest (U.S. Dept. Health Human Sciences, U.S. Government Printing Office), 1991.
- [7] Larick J W, Danielsson L, Brenner C A *et al.* Bio/Technology, 1989, 7:934.
- [8] Campbell M J, Zelenetz A D, Levy S *et al.* Mol Immunol, 1992, 29:193.
- [9] Danielsson L. Antibody Engineering & Practical Guide. Borrebaeck CAF. WH. Freeman and Company, New York, 1992.
- [10] Marks J D, Tristrem M, Karpas A *et al.* Eur J Immunol, 1991, 21:985.
- [11] 王 学,王海涛,陈万荣等. 军事医学科学院院刊, 1996,20:45.
- [12] Kang A S, Barbas C F, Lerner R A. Methods, 1991, 2:111.
- [13] Winter G, Griffiths A D, Hoogenboom H R *et al.* Immunol Rev, 1992, 130:41.
- [14] Soderlind E, lagerkvist A C S, Duenas M *et al.* Bio/Technology, 1993, 11:503.
- [15] Johansson L K, Griffiths A D, Winter G. Protein Eng. 1995, 8:1063.
- [16] Steele C, Zhang S, Shillito E J. Bio / Techniques, 1994, 17:360.
- [17] Alting-Mees M A, Short J M. Gene, 1988, 73:305.
- [18] Gram H, Marconi L, Barbas C F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:3576.
- [19] Parnley S F, Smith G P. Gene, 1988, 73:305.
- [20] Barbas III C F, Hu D, Dunlop N *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:3809.
- [21] Kang A S, Jones T M, Burton D R *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:11120.
- [22] Marks J D, Griffiths A D, Maimqvist M *et al.* Bio/Technology, 1992, 10:779.
- [23] Collet T A, Toben P, O'kenney R *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 98:100026.
- [24] Nissim A, Hoogenboom H R, Tomlinson L M *et al.* EMBO J, 1994, 13:692.
- [25] Burton D R, Barbas C F, Persson M A A A. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:10134.
- [26] Burton D R, Pyati J, Koduri R *et al.* Science, 1994, 266:1027.

(下转第294页)

(上接第291 页)

- [27] Pilkington G R, Duan L, Zhu M *et al.* Mol Immunol, 1996, 33:439.
- [28] Persson M A A A, Cao R H, Burton D R. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:2432.
- [29] Williamson R A, Burioni R, Sanna P P *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 4341.
- [30] Zebedee S L, Barbas C F, Hom Y *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:3175.
- [31] Sanna P P, Williamson R A, Logu A D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92:6439.
- [32] Jespers L S, Robert A, Mahler S M *et al.* Bio / Technology, 1994, 12:899.