

人源性促甲状腺激素受体抗体 Fab 段抗体库的构建

杜晓明 李宁 宋春青 方佩华

【摘要】 目的 通过噬菌体表面展示技术,构建人源性促甲状腺激素受体抗体(TRA b)Fab 片段抗体库。**方法** 从甲状腺功能亢进症患者外周血单个核细胞抽提总 RNA,PCR 法扩增免疫球蛋白分子轻链 κ 、 λ 基因及重链 Fd 基因。构建轻链文库及组合文库。一个随机的组合文库在噬菌体表面表达。**结果** 从外周血单个核细胞中抽提得到总 RNA,并反转录获得 cDNA 文库。PCR 法扩增了大小约为 680 bp 的轻链 κ 、 λ 基因及重链 Fd 基因,并构建了库容为 1.32×10^5 基因抗体库(轻链库)和库容为 2.28×10^5 Fab 抗体库(组合文库)。Fab 组合文库转化到大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞,在辅助噬菌体 M13K07 的辅助下,扩增得到噬菌体抗体库。**结论** 噬菌体表面展示技术可成功构建人源性 TRA b Fab 片段组合文库。

【关键词】 噬菌体表面展示技术;人源性单克隆抗体;促甲状腺激素受体抗体 Fab

Construction of Fab fragment library of human thyrotrophin receptor antibody Du Xiaoming*, Li Ning, Song Chunqing, Fang Peihua. *Department of Endocrinology, Tianjin 4th Center Hospital, Tianjin 300140, China

Corresponding author: Fang Peihua, Email: raysinomail@163.com

【Abstract】 Objective To construct a Fab fragment library of human thyrotrophin receptor antibody (TRA b) using phage display technology. **Methods** Total RNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells of patients with hyperthyroidism. Human immunoglobulin κ/λ light chain and heavy chains Fd genes were amplified by PCR. A light chain library and a combinatorial library were constructed respectively. A random combinatorial library was expressed on the surface of filamentous phage. **Results** cDNA library was harvested successfully by reverse transcription technology from total RNA of peripheral blood mononuclear cells. Human immunoglobulin 680 bp κ/λ light chain and heavy chain Fd genes were obtained by PCR. The size of κ light chain library was 1.32×10^5 . The actual diversity of Fab combinatorial library was 2.28×10^5 . The Fab combinatorial library were transformed in E.coli XL1 Blue. The transformed cells were infected with M13K07 helper phage to amplify phage antibody Fabs. **Conclusion** A human TRA b Fab fragment phage combinatorial library can be constructed by phage surface display technology.

【Key words】 Phage display technology; Human monoclonal antibodies; Thyrotrophin receptor antibody Fab

(Int J Endocrinol Metab, 2015, 35: 238-241)

组合抗体库是继杂交瘤技术之后,抗体研究领域取得的一大进展。该技术依赖于噬菌体表面展示技术的建立。噬菌体表面展示技术通过富集筛选抗体、抗原,可在短期内筛选到较高亲和力的抗体。来源于免疫库的抗体,其特性偏向于免疫的特定靶抗原。因此,通过宿主的免疫系统,虽然能够获得高亲和、

高特异的抗体,但为了获得与体内相似的成熟过程,相对于每个单个的抗原,需要构建新的抗体库^[1]。

促甲状腺激素受体抗体(TRA b)是自身免疫性甲状腺疾病中的特异性抗体。本实验构建的 TRA b Fab 噬菌体抗体库为免疫抗体库,有利于获得高丰度的 TRA b Fab 表达基因。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 XL1.Blue 为本室保存。促甲状腺激素(TSH)-N 为天津医科大学总医院核医学科制备。Horizon 58 Gel 凝胶电泳仪为美国 GIBCO BRL 公司产品。噬菌粒 pComb3Hss 为海军总医院周丽君

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2015.04.006

基金项目:天津市卫生局科技重点项目(2013KR04)

作者单位:300140 天津市第四中心医院内分泌科(杜晓明,宋春青);300052 天津医科大学总医院核医学科(李宁,方佩华)

通信作者:方佩华,Email: raysinomail@163.com

教授惠赠。辅助噬菌体 M13K07 为 New England 公司产品。化学感受态 XL1-Blue 为北京全世金生物技术有限公司产品。血液总 RNA 快速提取试剂盒购自 Biotech 公司。限制性内切酶 Sac I、Xba I、Xho I、Spe I、T₄ DNA 连接酶购自大连宝生物公司。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 RNA 提取、引物和 PCR 扩增 选取 3 例天津医科大学总医院门诊确诊为 Graves 病的患者 (TRAb > 0.04 IU/L) 为研究对象。取患者抗凝外周血, 用血液总 RNA 快速提取试剂盒提取外周血 RNA, 以 Olig(dT) 为引物, 合成 cDNA 第一链, 反转录合成 cDNA。以 Coronella 等^[3]报道的方案设计一组兼并引物, 该引物以人抗体可变区胚系基因序列为基础, 上游引物位于可变区的第一骨架区 (FR1), 轻链下游引物位于恒定区 (CL), 重链下游引物位于铰链区 (hinge region)。进行 PCR 扩增, 条件为: 95℃ 变性 3 min, 循环中模板变性 30 s, κ 、 λ 轻链及重链基因退火温度分别为 62℃、56℃、58℃, 时间 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 继之 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 终止。

PCR 引物: (1) 轻链 (λ) 可变区引物 VL4B: 5'-CCG (GAGCTC) CAGCCTGTGCTGACTCARYC-3'; (2) 轻链 (λ) 恒定区引物 CL2: 5'-CGCCG (TCTAGA) ACTATGAACATTCTGTAG-3'; (3) 轻链 (κ) 可变区引物 VK1B: 5'-CCG (GAGCTC) GACATCCRGDTGAC-CCAGTCTCC-3'; (4) 轻链 (κ) 可变区引物 VK9B: 5'-CCG (GAGCTC) GATATTGTGMTGACBCAGWCTCCG-3'; (5) 轻链 (κ) 恒定区引物 CK1Z: 5'-GCGCCG (TCTAGA) ACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGG GCGATCTCA-3'; (6) 重链 (H) 可变区引物 VH22B: 5'-CCG (CTCGAG) CAGGTGCAGCTGGTGSARTCTGG-3'; (7) 重链 (H) 恒定区引物 CG1Z: 5'-GCATGT (AC-TAGT) TTTGTCAACAAGATTTGGG-3'。

1.3 凝胶电泳 应用 1% 甲醛变性的琼脂糖电泳鉴定 RNA 完整性、DNA 条带以及限制性内切酶酶切产物。

1.4 噬菌体 Fab 抗体库的构建

1.4.1 构建轻链库 经 Sac I 和 Xba I 酶切的噬菌粒载体 pComb3Hss 和轻链 PCR 产物由 T₄ DNA 连接酶连接为环状, 经化学转化转入大肠杆菌 XL1-Blue 中。扩增转化后的细菌, 提取质粒得到轻链库载体 DNA。

1.4.2 辅助噬菌体敏感宿主菌的制备 接种 XL1-Blue 于 LB (Luria-Bertani) 固体培养基琼脂平板, 挑

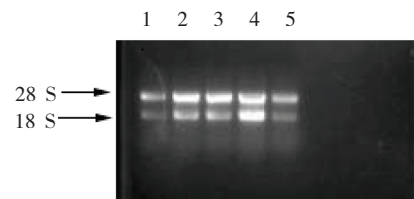
取单菌落接种, 培养至对数生长期, 取辅助噬菌体 M13K07 贮存液 1 μ l 加入到以上 EP 管中, 孵育, 观察菌斑。挑取辅助噬菌体 M13K07 单个空斑接种菌液扩增。制备好的辅助噬菌体 M13K07, 滴定不同稀释度的平板, 计数空斑数并计算滴度。

1.4.3 TRAb Fab 片段噬菌体抗体库的制备 经 Xho I 和 Spe I 酶切重链 Fd 段 PCR 产物和轻链库, 连接后转化, 转化后的细菌经适当地扩大培养后, 转化到大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞, 加入约 10^{12} 空斑形成单位 (pfu) 的辅助噬菌体 13K07, 继续培养过夜, 次日 4000 r/min ($r=7$ cm) 离心菌液收集上清, 加入 PEG8000 及 NaCl, 振荡促溶 9000 r/min ($r=7$ cm) 离心, 弃上清, 用 2 ml 1% BSA-PBS 悬浮噬菌体沉淀, 收集上清, 加叠氮钠 (NaN_3) 至 0.2%, 得到噬菌体抗体库。

2 结果

2.1 轻链和 Fd 段基因的扩增结果 提取外周血细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 用 PCR 扩增轻链和 Fd 段的基因。

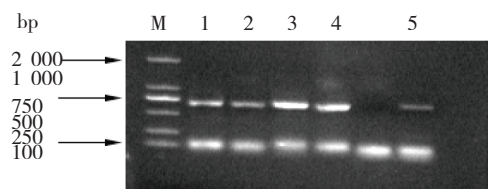
(1) RNA 凝胶电泳显示 5 个样本中, 第 4 个 RNA 条带清晰, 28S、18S 亮度之比大于 1:1, 无 RNA 降解。测 OD 值约等于 1.8, 证明 RNA 无降解, 无蛋白质污染, 可作为模板进行逆转录 (图 1)。



注: 外周血单个核细胞 5 个样本分别提取的总 RNA

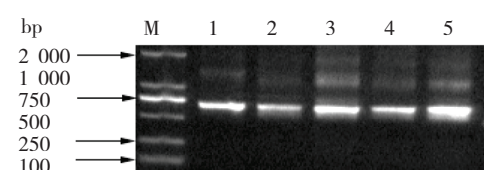
图 1 外周血总 RNA 甲醛变性凝胶电泳图

(2) 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示扩增 IgG1 的重链与 κ 、 λ 轻链基因片段的长度约为 680 bp, 符合理论预期值 (图 2, 3)。



注: 1、2、5 为 λ 链; 3、4 为 κ 链; M: marker

图 2 IgG1 λ 、 κ 轻链基因引物的扩增产物

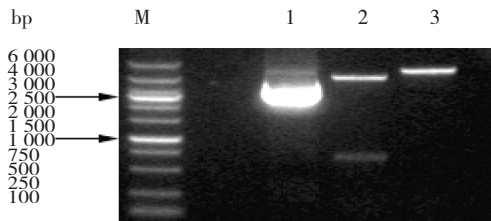


注: 1、2、3、4、5 为 Fd; M: marker

图 3 IgG1 重链 Fd 基因引物的扩增产物

2.2 噬菌体 Fab 抗体库的构建和鉴定

2.2.1 轻链文库构建 抽提轻链重组噬菌粒 L+P 经 Sac I /Xba I 双酶切,电泳结果显示两条长度分别约为 3 700 bp 与 680 bp 的 DNA 条带;经 Xho I 单酶切,电泳结果显示为一条约为 4 300 bp 的 DNA 条带,符合理论预期值(图 4)。



注:1.闭环的轻链库;2. Sac I /Xba I 双酶切的 L+P,噬菌粒 P 约 3 700 bp,轻链 L 约 680 bp;3.Xho I 单酶切的 L+P,约 4 300 bp;M: marker

图 4 轻链重组噬菌粒 L+P 克隆的单、双酶切鉴定的电泳结果

轻链文库推算转化子数为: 1.47×10^5 cfu。从 $1 \mu\text{l}$ 平板中挑取 10 个菌落,分别扩增后提取质粒。10 份质粒均用 Sac I 和 Xba I 双酶切处理。其中有 9 份可以切下约 680 bp 的片段,故轻链的插入率为 90%,实际库容为: $1.47 \times 10^5 \times 90\% = 1.323 \times 10^5$ 。

将已构建的轻链库噬粒 DNA 用 Sac I 和 Xba I 双酶切,回收纯化经 Xho I 和 Spe I 酶切重链 Fd 段 PCR 产物和轻链文库,连接后转化。组合文库的插入率为 60%,组合文库 Fab 的库容量为: $3.8 \times 10^5 \times 60\% = 2.28 \times 10^5$ cfu。

2.2.2 Fab 组合文库构建 在辅助噬菌体 M13K07 的辅助下超感染 XL1-Blue,次日在 Amp 平板上可见菌落生长(图 5)。挑取菌落后抽提质粒,电泳显示用 Sac I /Xba I 以及 Xho I /Spe I 双酶切,可释放出约 680 bp 的插入片段,单用 Xho I 没有释放出插入片段,将闭合状态的抗体库质粒切开为大约 4 700 bp 的片段(图 6)。

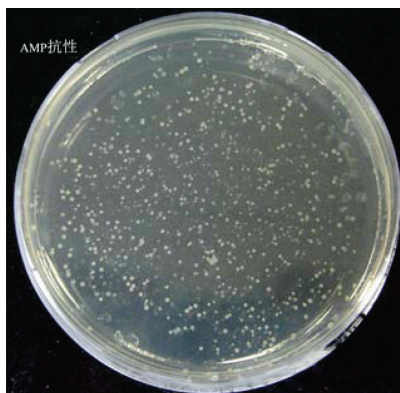
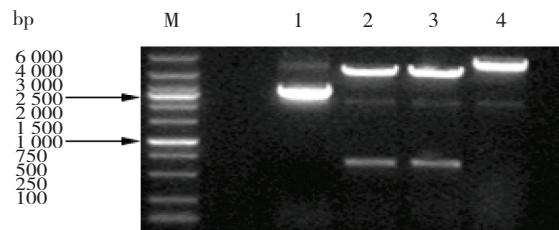


图 5 含有轻链和 Fd 的重组子转化菌斑



注:1.闭环的噬菌体 Fab;2.Sac I /Xba I 双酶切,轻链 L 约 680 bp,噬菌粒 P 约 4 300 bp;3.Spe I /Xho I 双酶切,Fd 约 680 bp,噬菌粒 P 约 4 300 bp;4.Xho I 单酶切,约 4 700 bp;M:marker

图 6 噬菌体 Fab 抗体库单、双酶切鉴定电泳结果

3 讨论

免疫抗体库的构建来源于不同种类的经抗原免疫的个体。从该类抗体库中便于筛选到针对某一特定抗原的特异性抗体。国内有学者通过制备免疫抗体库得到有一定亲和力及特异性的抗核抗体 Fab 段^[2]。本实验需要筛选的 TRAb 是自身免疫性甲状腺疾病中的特异性抗体,因此选择了免疫抗体库。

本实验构建的 TRAb Fab 噬菌体抗体库基因来源于自身免疫性疾病患者外周血单个核细胞,有利于高丰度 TRAb 表达基因的获得。对 TRAb Fab 噬菌体抗体库的菌落的随机检测,应用 Sac I /Xba I 以及 Xho I /Spe I 双酶切,可释放出约 680 bp 的插入片段,证实有轻链和重链 Fd 段插入片段存在,单用 Xho I 没有释放出插入片段,将闭合状态的抗体库质粒切开为大约 4 700 bp 的片段,说明构建抗体库成功。重组产物中包含目的基因,表明库容的有效性良好。本实验采用常规的化学法转化噬菌粒,简单易行,感受态大肠杆菌 XL1-Blue 库容量在 10^8 数量级,考虑抗体库基因来源的高丰度性以及库容良好的有效性,该库容可以满足下一步高亲和力抗体的筛选。

本实验参考 Biotherapeutics 实验室 Coronella 等^[3]的设计,选择性地合成了一组引物。实验合成的引物为兼并引物,尽量包括抗体重链 IgG 各亚型,以及抗体轻链 κ 型和 λ 型。利用上游和下游不同的引物组合,均扩增出了相应的片段,保证了所需抗体库的多样性。

重组抗体与传统的单克隆抗体在基本功能方面是一致的。而重组抗体能够在体外批量生产,在制备过程中更加灵活,在制成后有更多机会优化,能更方便的制作、筛选、成熟,并且能够选择性进行结构性的改变,这在传统的单克隆技术中是不可能实现的^[1]。

单克隆抗体在诊断、治疗和靶向给药系统方面均有潜在的应用,不仅可应用于细菌、病毒和原生动物导致的感染,还可应用于淋巴细胞恶性肿瘤、

组织配型、酶联免疫吸附试验、放射免疫以及微生物血清分型^[4]。

TRAb 可导致 Graves 病,在不同甲状腺功能亢进症中,TRAb 有何作用,TRAb 是否可用于 Graves 病复发、胎儿或新生儿甲状腺毒症的预测,以及临床 Graves 眼病的临床评估,还需要在临床实践中进一步探索^[5]。因此有必要了解 TRAb 的结构、功能以及临床诊断、治疗方面的应用。

本实验利用噬菌体表面展示技术构建了人源性 TRAb Fab 段噬菌体抗体库。TRAb 为异质性抗体^[6]。因此可能通过促甲状腺激素受体抗原,在后续的工作中进一步筛选得到甲状腺刺激性抗体。甲状腺刺激性抗体可用于 Graves 病诊断技术中的定量检测,而甲状腺刺激阻断性抗体作为阻断性抗体可用于探讨自身免疫性疾病的免疫治疗,为自身免疫性疾病的诊断以及免疫治疗提供新的思路。

(上接第 237 页)

物组较 ¹³¹I 治疗组短期治疗效果较好,而 ¹³¹I 治疗组较抗甲状腺药物组远期治疗效果较好;相关性分析表明,游离 T₃、游离 T₄、TRAb 与 CD3⁺CD19⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺呈正相关,与 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺(CD16⁺CD56⁺)呈负相关。TSH 与 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺(CD16⁺CD56⁺)呈正相关,与 CD3⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD19⁺呈负相关。说明甲状腺功能的变化与外周 T 淋巴细胞关系密切,甲状腺本身也是 T 淋巴细胞攻击的靶器官。

综上所述,外周淋巴细胞亚群与 Graves 病之间关系密切,甲状腺本身可能是淋巴细胞攻击的靶器官,各种治疗方法可能是通过调节机体外周血淋巴细胞亚群来调节机体免疫应答,从而达到对 Graves 病的治疗作用,为 Graves 病诊断和治疗提供一定的指导意义,但其具体机制仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, et al. Williams textbook of endocrinology[M]. 12th ed. Elsevier Saunders Press, 2011: 368-411.

参 考 文 献

- [1] Shukra AM, Sridevi NV, Dev Chandran, et al. Production of recombinant antibodies using bacteriophages[J]. Eur J Microbiol Immunol(Bp), 2014, 4(2): 91-98.
- [2] 陆慧琦, 钱新宇, 李爱民, 等. 人源性抗核抗体 Fab 片段的筛选及鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(1): 87-91.
- [3] Coronella JA, Tellman P, Truong TD, et al. Amplification of IgG VH and VL (Fab) from single human plasma cells and B cells[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(20): E85.
- [4] Siddiqui MZ. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal[J]. Indian J Pharm Sci, 2010, 72(1): 12-17.
- [5] Barbesino G, Tomer Y. Clinical review: clinical utility of TSH receptor antibodies[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(6): 2247-2255.
- [6] Latif R, Morshed SA, Zaidi M, et al. The thyroid-stimulating hormone receptor: impact of thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor antibodies on multimerization, cleavage, and signaling[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2009, 38(2): 319-341.

(收稿日期: 2015-02-24)

- [2] 高硕, 方佩华, 来则民, 等. 天津地区 Graves 病流行病学调查[J]. 中华核医学杂志, 2002, 22(4): 197-200.
- [3] 廖二元, 莫朝辉, 主编. 内分泌学[M], 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012, 450-476.
- [4] 沈华英, 董吉祥, 韩惠琴, 等. Graves 病患者 T 淋巴细胞亚群水平的变化[J]. 苏州医学院学报, 2001, 21(1): 51-52.
- [5] McLachlan SM, Nagayama Y, Pichurin PN, et al. The link between Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: a role for regulatory T cells[J]. Endocrinology, 2007, 148(12): 5724-5733.
- [6] 张永红, 薛元明, 潘薇, 等. 介入栓塞治疗对 Graves 病 T 淋巴细胞亚群的影响[J]. 现代医药卫生, 2003, 19(5): 532-533.
- [7] 马春燕, 郭军, 高聆, 等. 抗甲状腺治疗对 Graves 病患者外周血 T、B 淋巴细胞亚群及部分协同刺激分子表达的影响[J]. 现代免疫学, 2007, 27(1): 49-52.
- [8] Weetman AP. Graves' disease[J]. N Engl J Med, 2000, 343(1): 1236-1248.
- [9] McIver B, Morris JC. The pathogenesis of Graves' disease[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 1998, 27(1): 73-89.
- [10] Bossowski A, Urban M, Stasiak-Barmuta A. Analysis of changes in the percentage of B(CD19) and T(CD3) lymphocytes, subsets CD4, CD8 and their memory(CD45RO), and naïve(CD45RA) T cells in children with immune and nonimmune thyroid diseases[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2003, 16(1): 63-70.

(收稿日期: 2014-11-17)