

# B3HM 细胞免疫小鼠脾细胞 scFv 噬菌体展示文库的构建及表达\*

许 静 张 磊 刁世勇 刘 斌 孟 磊 姜学英 韩忠朝\*\*

(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室 天津 300020)

**摘要** 目的:利用噬菌体展示技术构建 B3HM 细胞免疫小鼠的脾细胞表达 scFv 文库。方法:用人骨髓细胞系 B3HM 细胞免疫小鼠,取其脾细胞采用 RT-PCR 方法扩增  $V_H$  和  $V_K$  基因并克隆入噬菌体展示表达载体,构建 scFv 文库,测定文库的库容量,*Bst*NI 酶切单克隆分析文库的多样性,对文库进行富集检测,鉴定单克隆噬菌体与 B3HM 细胞结合反应。结果:文库的库容为  $5 \times 10^6$  cfu,单克隆的 *Bst*NI 酶切图谱显示多样性,单克隆噬菌体抗体与 B3HM 细胞呈阳性反应。结论:噬菌体展示文库的成功构建为寻找新的致白血病相关基因,阐明白血病发病机理奠定了基础。

**关键词** B3HM 细胞 噬菌体展示 抗体库 单链抗体

**中图分类号** R392.11

抗体是分离新基因和研究基因功能的极为有效的探针和手段。单链抗体(single chain antibody, scFv)是抗体重链可变区( $V_H$ )和轻链可变区( $V_L$ )由一个连接肽首尾相连组成的单一肽链,具有分子量小,组织穿透力强,体内清除快,易于大肠杆菌发酵生产和进行基因工程改进等优点。噬菌体展示抗体技术是继杂交瘤技术之后抗体技术发展的又一新的里程碑<sup>[1]</sup>,该技术是将抗体可变区基因与单链丝状噬菌体衣壳蛋白基因融合,使 scFv 可随衣壳蛋白一起呈示表达于噬菌体的表面,通过简便的吸附-洗脱-富集的筛选过程,而分离获得特异性抗体可变区基因的技术。B3HM 细胞系是一株能诱发小鼠白血病的人骨髓细胞系<sup>[2]</sup>,但其致病机理尚不清楚,为研究它的致病机制、寻找致病活性分子,我们用 B3HM 细胞免疫小鼠的脾细胞,成功地构建 scFv 噬菌体展示文库,这对深入研究 B3HM 细胞致正常小鼠造血细胞发生恶性转化的机理具有实际意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 载体、细胞系和实验动物

噬菌粒 pSEX81, *E. coli* XL1-Blue, 辅助噬菌体

M13K07 均由德国海德堡大学 S. Dübel 博士惠赠。B3HM 为人骨髓细胞系由本室建立<sup>[2]</sup>。实验用 Balb/C 小鼠购自中国医学科学院动物中心,饲养于中国医学科学院血液学研究所实验动物中心。

### 1.2 主要试剂和培养基

SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit、TRIzol Reagent、逆转录酶(M-MLV)、Taq DNA 聚合酶、 $T_4$  DNA 连接酶、DNA 限制性内切酶等均购自 Invitrogen 公司。羊抗鼠 IgG-HRP 购自 Novagen 公司。凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、DL2000 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗小鼠 IgG(FITC-IgG)购自协和干细胞公司。PCR Marker 购自华美生物公司。电穿孔仪为 Bio-RAD 公司产品。SOB、SB、2YT 培养基按《分子克隆》配制,含葡萄糖(Glucose, G)培养基中 G 的浓度均为 100mmol/L;抗生素培养基中氨苄青霉素(Ampicillin, A)为 100 $\mu$ g/ml,四环素(Tetracycline, T)为 10 $\mu$ g/ml,卡那霉素(Kanamycin, K)为 50 $\mu$ g/ml。

### 1.3 动物免疫

用指数生长期人骨髓细胞系 B3HM 细胞,腹腔注射免疫 3 只 6~8 周龄的(18~20 克)雄性 Balb/C 小鼠,每只  $1 \times 10^7$  细胞,隔周注射一次,共 4 次,末次注射后第 3 天取尾静脉血分离血清。

收稿日期:2007-03-07 修回日期:2007-05-11

\* 国家自然科学基金资助项目(39870291)

\*\* 通讯作者,电子信箱:tjhzchan@public.tpt.tj.cn

## 1.4 ELISA 测定效价

取小鼠血清以常规 ELISA 法检测抗体滴度。包被指数生长期的 B3HM 细胞于 96 孔酶标板中,  $1.0 \times 10^5$  细胞/孔, PBS 缓冲液为阴性对照。一抗为免疫后鼠血清, 按相应比例稀释, 以 PBS 缓冲液注射小鼠的血清为阴性对照。二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 四甲基联苯胺(TMB)显色, 加入终止液, 用酶标仪检测波长 450nm 处的吸光值。

## 1.5 小鼠脾细胞总 RNA 的提取

取 3 只免疫好的小鼠脾脏混合, 分离脾淋巴细胞。取  $2 \times 10^7$  脾淋巴细胞按 Trizol 总 RNA 提取试剂说明进行。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。

## 1.6 引物及 RT-PCR

设计  $V_H$  和  $V_L$  引物, 采用简并引物形式, 并在 5' 端和 3' 端引入克隆入载体的酶切位点。5' 端引物均为小鼠抗体可变区的第一骨架区共有序列(FR1), 3' 端引物均为恒定区起始段。引物序列为

PH1( $\gamma$  重链 VH5' 端引物)

5'-GAAGCCATGGAGGTSMAACTGCAGSAGTCWGG-3'

PH2( $\gamma$  重链 VH 3' 端引物)

5'-CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGT

CGTTT-3'

PL1( $\kappa$  轻链 VK5' 端引物)

5'-AATTTTCAGAAGCACGCGTAGATATCKTGMTSA

CCCAAWCTCCA-3'

PL2( $\kappa$  轻链 VK3' 端引物)

5'-GAAGATGGATCCAGCGGCCGAGCATCAGC-3'

## 1.7 $V_H$ 和 $V_K$ 的克隆

逆转录 PCR(RT-PCR): 以总 RNA 为模板, 用 PH2 和 PL2 引物, 分别逆转录合成  $V_H$  和  $V_K$  cDNA 第一链。以逆转录产物为模板, PH1/PH2 和 PL1/PL2 为引物, 分别扩增全套  $V_H$  和  $V_K$  基因片段。PCR 反应程序为: 95℃ 预变性 2min, 继以 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 45s, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环。取 3 $\mu$ l PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。

## 1.8 scFv 文库的构建

$V_H$  亚文库的构建: HindIII 和 NcoI 双酶切经回收纯化的  $V_H$  PCR 产物, 回收此酶切产物后与经同样酶切和纯化的载体 pSEX81 片段连接, 电穿孔转化 XL1-Blue, 涂布 SOB-GA 平板, 30℃ 培养过夜, 提取质粒得到重链亚文库(pSEX81- $V_H$ )。

将  $V_K$  克隆入 pSEX81- $V_H$  亚文库, 获得完整的 scFv

文库: 将 NotI 和 MluI 双酶切的  $V_K$ -PCR 产物和经同样酶切反应的 pSEX81- $V_H$  质粒 DNA 连接, 电转化 XL1-Blue, 取少部分转化细菌铺 SOB-GA 平板, 计数菌落, 测定库容后, 其余同上述方法扩增得到完整的噬菌体 scFv 文库, 甘油保存备用。取一部分悬于 10ml 2YT-GA 培养基中当  $A_{600} = 0.1$  时加入  $8 \times 10^{11}$  pfu 的 M13K07 (感染复数 moi 为 20), 37℃ 温育 15min, 37℃ 振荡培养 45min, 离心沉淀感染的细胞并重悬于 10ml 2YT-AK 中 37℃ 培养 8h, 离心收集上清, 加入 PEG/NaCl 溶液以沉淀噬菌体, 冰浴 1h 离心, 以 1ml 含 1% BSA 的 PBS 重悬沉淀, 离心收集上清, 获得展示有抗体分子片段的噬菌体颗粒。

## 1.9 scFv 展示文库的初步鉴定

1.9.1 滴度测定 将制备的噬菌体抗体用培养液稀释后感染对数生长期的 *E. coli* XL1-Blue, 37℃ 静置 15min, 涂布 SOB-GA 平板上, 30℃ 培养过夜。次日按所生长菌落数计算噬菌体滴度(cfu)。

1.9.2 多样性分析 随即挑取文库单克隆提取质粒后进行 BstNI 酶切, 分析单克隆酶切前后的图谱。

## 1.10 用 B3HM 细胞筛选噬菌体展示 scFv 文库

取 PBS 洗涤的  $3 \times 10^6$  B3HM 细胞, 用 PBS 冰浴 90min, 沉淀细胞后, 用 1ml scFv 文库噬菌体上清(滴度为  $2 \times 10^{10}$ ) 重悬细胞, 4℃ 轻摇 2h, PBS 洗 5 次后加入 500 $\mu$ l 洗脱液(0.1mol/L 甘氨酸/HCl, pH=2.5, 含 1% BSA), 冰浴 5min 后沉淀细胞, 立即加入 20 $\mu$ l 1mol/L 的 Tris 中和, 加入 400 $\mu$ l  $A_{600} = 0.8$  的 XL1-Blue, 37℃ 静置 1h 感染 XL1-Blue, 离心后用 1ml SOB-GA 重悬细胞沉淀, 涂布 SOB-GA 平板, 30℃ 培养过夜, 刮取菌落, 重新扩增表达制备噬菌体抗体再进行下一轮的筛选, 同样方法筛选 4 轮。

## 1.11 单个克隆的噬菌体抗体制备

随机挑取 24 个单克隆菌落, 分别置于 1ml 2YT/GAT24 孔板中, 37℃ 培养 8h。以 1:100 比例稀释至新鲜的 2YT/GAT 1ml 培养液中, 37℃ 培养至  $A_{600} = 0.1$ , 分别加 M13K07 10 $\mu$ l (感染复数为 20), 37℃ 静置 15min, 摇动培养 45min 后, 离心弃上清, 沉淀用 1ml 2YTAK 重悬, 37℃ 培养 8h。离心收集表达产物, 上清即为展示有 scFv 的单个克隆的噬菌体抗体上清。

## 1.12 检测噬菌体抗体与 B3HM 细胞的结合

取  $1 \times 10^6$  B3HM 细胞与  $2 \times 10^{10}$  噬菌体抗体在含 3% 脱脂奶的 PBS 中混匀, 室温 1h, 加入抗-M13 抗体 4℃ 孵育 1h, PBS 洗 3 次后, 加入荧光标记二抗兔抗小



2.6 单克隆噬菌体抗体与 B3HM 细胞的结合反应

单克隆噬菌体抗体与 B3HM 细胞反应后在荧光显微镜下观察在细胞表面有点状荧光(图 5),而仅用荧光二抗与 B3HM 细胞反应的无荧光(图 6)。辅助噬菌体 M13KO7 与 B3HM 细胞亦无荧光反应(图 7),结果显示单克隆噬菌体抗体与 B3HM 细胞呈阳性反应。

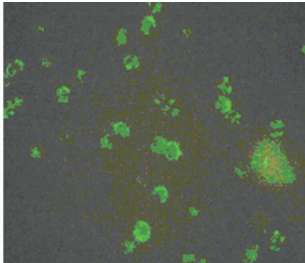


图 5 Phage-scFv 结合 B3HM 细胞  
Fig. 5 Phage-scFv binding B3HM cells



图 6 IgG-FITC 与 B3HM 细胞孵育  
Fig. 6 Negative control



图 7 M13KO7 与 B3HM 细胞反应  
Fig. 7 M13KO7 binding B3HM cells

3 讨 论

噬菌体展示抗体库技术是近年来发展较快的制备单克隆抗体的有效手段,尤其可直接克隆抗体可变区基因以利于进一步构建在疾病的诊断和靶向治疗方面具有广阔应用前景的各种基因工程抗体。

本研究利用噬菌体展示抗体库技术,从 B3HM 细

胞免疫的小鼠脾细胞 mRNA 扩增得到全套抗体可变区基因片段,将其克隆入噬菌体展示载体 pSEX81,构建了抗 B3HM 细胞的 scFv 表达文库,文库容量、多样性、滴度均能满足进一步筛选目的抗体基因的要求。本文根据 Kabat database,参考了 Dübél 报道的适于扩增大鼠和小鼠 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 的单一通用引物<sup>[3]</sup>,并结合我组在从杂交瘤细胞中克隆抗体可变区 cDNA 的经验<sup>[4,5]</sup>选择了免疫球蛋白重链和轻链恒定区起始段各 7 个氨基酸残基密码子为 3'引物互补区,其 5'引物则同源于 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 的 FRI 区 N 端第 1~8 个氨基酸密码子并采用简并引物形式以期尽可能地扩增出多样的抗体基因,结果表明我们设计的引物达到了预期的目标。由于小鼠轻链 95% 以上为 κ 轻链,我们扩增 V<sub>L</sub> 时只使用了适于 κ 轻链的引物,因此本文库均为 V<sub>H</sub>-V<sub>k</sub> 单链。

白血病又称血癌,产生于造血干细胞/祖细胞恶性转化,表现细胞增殖失控和分化障碍。许多研究结果发现细胞癌变与细胞内某些原癌基因的激活和抑癌基因的失活有关,白血病也不例外<sup>[6,7]</sup>。B3HM 细胞系是采用食道癌患者骨髓基质细胞与正常人骨髓造血细胞共培养后获得的永生细胞系,该细胞系在 mouse 体内不形成实体瘤,但可诱发小鼠白血病,但其致病机理尚不清楚。抗 B3HM 细胞抗体库的建立为寻找致白血病相关基因并将其分离、克隆及其表达产物的生物学特性分析是阐明白血病发病学的关键<sup>[8,9]</sup>,这可能为白血病的发病机理提供新的线索,对研究细胞癌变具有重要的意义。

参考文献

[ 1 ] Hoogenboom H R, Bruine A P, Hufton S E, et al. Antibody phage display technology and its applications . Immunotechnology,1998,4(1):1~20

[ 2 ] 姜学英,马月霞,杨少光,等. 一株能诱发小鼠白血病的人骨髓细胞系. 中华肿瘤杂志,1996,18:105~108  
Jing X Y, Ma Y X, Yang S G, et al. Chinese Journal of Oncology,1996,18:105~108

[ 3 ] Dubel S,Britling F,Fuchs P,et al. Isolation of IgG antibody Fv DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simple set primes. J Imm Meth,1994,175:89~93

[ 4 ] Zengxuan S, Yinglin C, Dangying S,et al. Primary structure and functional expression of heavy -and light -chain variable region genes of a monoclonal antibody specific for human fibrin. Hybridoma,1997,16(3):235~240

[ 5 ] Jianhua Sui, Yixin He, Xueying Jiang, et al. A single chain antibody obtained by cell panning of antibody phage inhibits homoaggregation of human leukemia cells. Human Antibodies, 2004,13;111 ~ 118

[ 6 ] Miller C, Koeffler H P. p53 mutation in human cancer. Leukemia,1993,7 ( suppl 2 ) :S18 ~ 22

[ 7 ] Sen S, Takahashi R, Rani S,et al. Expression of differentially phosphorylated Rb and mutant p53 protein in myeloid leukemia cell lines. Leukemia Res,1993,17( 8 ) :639 ~ 647

[ 8 ] Geuijen C A, Bijl N, Smit R C,et al. A proteomic approach to tumour target identification using phage display , affinity purification and mass spectrometry. Eur J Cancer, 2005, 41 ( 1 ) :178 ~ 187

[ 9 ] Yu J H, Schaffer D V. High-throughput, library-based selection of a murine leukemia virus variant to infect nondividing cells. Journal of Virology, 2006,80( 18 ) :8981 ~ 8988

The Construction and Expression of Phage Display scFv Library from the Spleen Cells of Mice Immunized With B3HM Cells

XU Jing   ZHANG Lei   DIAO Shi-yong   LIU Bin   MENG Lei   JING Xue-ying   HAN Zhong-chao  
( State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology,CAMS & PUMS, Tianjin   300020 ,China )

**Abstract**   To construct a scFv library by phage display technique from the spleen cells of mice immunized with B3HM cells. Three mice were immunized with B3HM cells, and their spleen cells were harvested. The genes of V<sub>H</sub> and V<sub>k</sub> were amplified by RT-PCR from the cDNA of the immunized spleen cells and a scFv-phage display antibody library was constructed. The capacity of library was measured,and the variety of the library was analyzed by digesting with restriction endonuclease *Bst*NI. ScFv phage clones were randomly picked and identified phage-scFv clone by binding B3HM cells using immunofluorescein. A scFv library containing 5 × 10<sup>6</sup> individual clones which showed different patterns after digested with restriction endonuclease *Bst*NI was produced. Individnal phage-scFv clone showed B3HM cells positive using immunofluorescein. A scFv library of anti-B3HM cell surface molecules has been constructed. It will be useful for finding out some novel genes of causing leukemia, and establishes the infarctate foundation of clarifying the pathogenesis of leukemiagenesis.

**Key words**   B3HM cell   Phage display   Antibody library   Single chain antibody

致   谢

近期为本刊审稿的专家( 姓氏笔画顺序排列 ):

丁久元   万印华   于静娟   马   端   毛旭虎   毛建平   王以光   王明丽   王   恒   王洪海   王常勇  
王韞芳   包永明   叶兴国   甘人宝   关   明   刘天庆   刘如林   刘思国   朱士恩   毕英佐   江   宁  
余龙江   宋思扬   张劲松   张治洲   李玉昌   李伟军   李佳慧   杨纯正   杨唐斌   肖   涛   陈忠斌  
陈金春   周奕华   林矫矫   欧阳静萍   范学工   修志龙   段明星   胡赓熙   贺   佳   赵宗保   赵春江  
钟建江   夏立秋   郭礼和   曹小红   曹学军   章金刚   黄国亮   惠   春   温博海   楼丽广   谭文松  
潘   皎   魏源送