

- 抗氧化功能影响的研究. 营养学报 2003;25:61-64
- 3 吕鹏. 四氯化碳腹腔注射制备肝纤维化模型的实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:339-340
- 4 李校天, 高红旗, 蒋树林, 姚希贤. 四氯化碳和免疫血清法大鼠肝纤维化模型进程的时效关系对比研究. 中国医师杂志 2003;10:1315-1317
- 5 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:228-271
- 6 池肇春, 刘勇立, 马素真. 简明肝病诊疗手册. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1996:30-67
- 7 张叶青, 刘平, 都广礼, 王宪波, 李凤华. 二甲基亚硝胺肝硬化大鼠血清元素含量变化及其意义. 肝脏 2003;8:34-36
- 8 于占洋, 侯哲. 微量元素与疾病诊断及治疗. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:170-171
- 9 张月红, 程义勇, 洪燕, 王冬兰, 李树田. 锌缺乏对大鼠骨骼矿化的影响. 中华预防医学杂志 2003;37:121-124
- 10 高围澈, 黄连珍, 李涛, 杨雪锋. 缺锌对衰老小鼠抗氧化系统和肝脏DNA损伤修复功能的影响. 中华老年医学杂志 2003;22:543-546
- 11 张越, 唐小云, 杨丽群, 贾秀坤, 梁再斌. 锌对天冬氨酸转氨酶和线粒体酶功能的影响. 工业卫生与职业病 2004;30:95-96
- 12 王慧芬, 王业东. 肝脏疾病. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 2001:282-283
- 13 单延春, 盛晓阳, 洪昭毅. 锌缺乏对生长期大鼠免疫细胞凋亡的影响. 营养学报 2004;26:94-97
- 14 Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T. Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are GPI-anchored to cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 2004;2(待发表)
- 15 Zmarzly A, Simon K, Krause K, Rotter K, Gasiorowski J. Zinc status in ex-intravenous drug users infected by HIV, without clinical presentation of AIDS. *Wiad Lek* 2004;57:249-254
- 16 Rodovicius H, Viezeleiene D, Sadauskiene I, Valentukonyte S, Ivanov L. The effects of zinc ions on activities of tRNA^{Leu} and leucyl-tRNA synthetase of mice liver. *Medicina (Kaunas)* 2004;40:982-986
- 17 Hulisz D. Efficacy of zinc against common cold viruses: an overview. *J Am Pharm Assoc (Wash DC)* 2004;44:594-603
- 18 Hammond GM, Loewen ME, Blakley BR. Diagnosis and treatment of zinc poisoning in a dog. *Vet Hum Toxicol* 2004;46:272-275
- 19 Lim NC, Freake HC, Bruckner C. Illuminating zinc in biological systems. *Chemistry* 2004;14[Epub ahead of print]
- 20 Coutinho EM. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(5 Suppl 1):85-92
- 21 Ming ZJ, Liu SZ, Cao L. Effect of total glucosides of centella asiatica on antagonizing liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2004;8:731-734

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

全人源肝癌噬菌体单链抗体库的鉴定及筛选

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 药立波

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032

药立波, 中国人民解放军第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西省西安市 710032

国家自然科学基金资助项目, No. 30371399

项目负责人: 窦科峰, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科. gdwk@fmmu.edu.cn

电话: 029-83375259

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-11

结论: 利用噬菌体抗体库技术结合减数筛选得到了肝癌噬菌体单链抗体及其基因, 且筛选后的抗体片段与人肝癌细胞有特异性的结合活性。

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 药立波. 全人源肝癌噬菌体单链抗体库的鉴定及筛选. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2898-2901

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2898.asp>

摘要

目的: 对全人源肝癌噬菌体单链抗体库进行鉴定, 筛选肝癌抗体, 同时对抗体的活性进行鉴定。

方法: PCR鉴定阳性重组菌TG1中人肝癌ScFv的插入率. 先以人成纤维细胞黏附后再以肝癌细胞SMMC-7721为抗原对所建抗体库进行3轮“黏附-洗脱-扩增”的亲和筛选. 将筛选后的ScFv进行PCR鉴定及双酶切鉴定; 通过ELISA法鉴定其与人肝癌细胞的结合活性。

结果: ScFv基因插入率为70%. 在亲和筛选过程中, 肝癌噬菌体单链抗体得到富集, 收获率逐轮得到提高, 第3轮为第1轮的214倍. 筛选后的ScFv进行PCR鉴定及双酶切鉴定后, 均可检测到目的基因. 得到3株特异性肝癌单链抗体。

0 引言

有关抗肿瘤单链抗体(ScFv)的报道较多, 但大多是通过基因工程技术把鼠源杂交瘤抗体改造成小分子单链抗体, 仍属鼠源抗体^[1-3]. 我们已利用噬菌体抗体库技术, 从200例原发性肝癌患者的B淋巴细胞中克隆出抗体重链和轻链可变区基因, 以具有氨苄青霉素抗性的pDAN5为载体, 参照Sblattero *et al*^[4]的方法, 构建了全人源肝癌单链抗体噬菌体呈现库. 本文中我们利用该抗体库进行肝癌噬菌体单链抗体基因克隆并进行抗体的活性分析。

1 材料和方法

1.1 材料 表达载体噬菌粒pDAN5、大肠杆菌TG1、肝

癌细胞系 SMMC-7721 由本室保存; 人成纤维细胞系由西京医院烧伤科汤朝武技师惠赠; 辅助病毒 M13K07 由董红霖博士惠赠; rTaq 酶及限制性核酸内切酶 *Nhe* I、*Bss*H II 均为大连宝生物产品; 质粒提取试剂盒为杭州维特洁公司产品; PCR 引物序列为 5' -ACC TATT GCCT ACGG CAGC-3', 5' -ACTTTCAACAGTAGCGGCC GC-3', 由上海基康公司合成。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体抗体库滴度测定 将 1-10 μ L 经适当稀释的噬菌体抗体库菌铺于氨苄青霉素培养板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 计数集落, 计算集落形成单位(clone forming unit, cfu)。

1.2.2 PCR 法鉴定抗体基因插入率 挑取单个细菌集落, 加入 3 mL 含氨苄 100 mg/L 的 LB 培养过夜, 按质粒提取试剂盒说明书提取质粒, 取 2 μ L 为模板采用 25 μ L 体系, 进行 ScFv PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳检测相应的 DNA 扩增带。

1.2.3 人源肝癌噬菌体 ScFv 的筛选 取冻存抗体库菌种 1 mL, 进行噬菌体表面呈现, 调整滴度为 10^{15} cfu/L。先以人成纤维细胞黏附后再以人肝癌细胞系 SMMC-7721 对初级库进行筛选, 然后以人肝癌细胞 SMMC-7721 进行黏附筛选。共进行 3 轮筛选。

1.2.4 阳性噬菌体单克隆 PCR 鉴定 挑取第三轮筛选出的单克隆, 按前述方法提取单克隆质粒进行 ScFv 基因克隆。随机挑取 20 个单克隆, 加入 3 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液过夜培养, 常规提取质粒。以质粒为模板进行 PCR 反应, 然后以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定是否扩增出目的基因。

1.2.5 阳性噬菌体单克隆酶切鉴定 随机挑取 10 个单克隆质粒以 *Nhe* I 及 *Bss* H II 双酶切, 以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定是否含有目的基因。

1.2.6 阳性单克隆 ScFv 活性分析 挑取阳性单克隆, 以不含目的基因的载体为对照。按前述方法进行噬菌体表面呈现, 收集上清即为噬菌体抗体。将单克隆 ScFv 及对照上清加入接种有人成纤维细胞及肝癌细胞的 96 孔板过夜, 再加入 HRP-羊抗 M13 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 加入 TMB 显色 10 min, 加入 2 mol/L 硫酸终止反应。酶标仪读板, 以 P/N>2.1 为阳性。

2 结果

2.1 抗体库滴度 经 10 倍系列稀释, 测定抗体库滴度为 7.6×10^{12} cfu/L。

2.2 PCR 法检测 20 个菌落, 14 个克隆扩增出 ScFv, 目的基因插入率为 70%(图 1)。

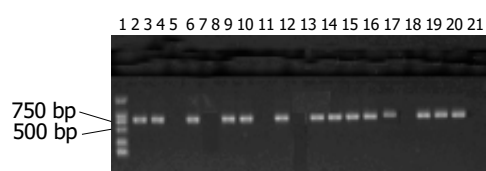


图 1 PCR 扩增 ScFv 片段。1: Marker。

2.3 肝癌噬菌体 ScFv 的筛选 以人成纤维细胞黏附后再以人肝癌细胞系 SMMC-7721 对噬菌体抗体库进行 3 轮富集筛选, 将每一轮洗脱下来的噬菌体再感染 TG1 细菌, 并取少量细菌铺盘, 测定噬菌体滴度, 计算每一轮筛选后噬菌体的收获率。噬菌体收获率由第 1 轮的 $2.2 \times 10^{-5}\%$ 增到第 3 轮的 $4.7 \times 10^{-3}\%$, 共增加了 214 倍(表 1)。

表 1 SMMC-7721 对噬菌体抗体库的亲亲和富集

富集轮次	噬菌体滴度(cfu/L)		噬菌体收获率(%)
	富集前	富集后	
1	1.0×10^{15}	2.2×10^8	2.2×10^{-5}
2	1.5×10^{15}	3.5×10^9	2.3×10^{-4}
3	1.1×10^{15}	5.2×10^{10}	4.7×10^{-3}

2.4 噬菌体单克隆 ScFv PCR 鉴定 以来自 20 个单克隆菌落的质粒为模板进行 PCR 反应, 全部扩增出约 750 bp 片段(图 2)。

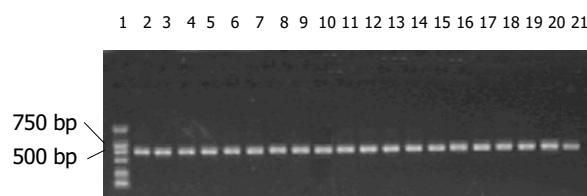


图 2 PCR 扩增 ScFv 片段。1: Marker

2.5 阳性单克隆 ScFv 酶切鉴定 随机挑取 10 个单克隆质粒以 *Nhe* I 及 *Bss* H II 双酶切, 均放出约 750 bp 片段(图 3)。

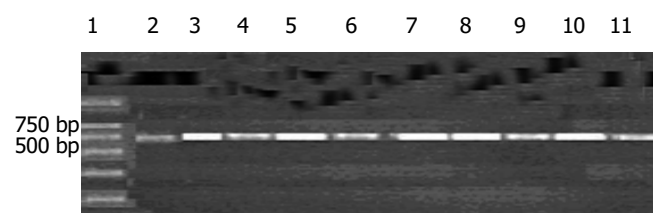


图 3 10 个单克隆质粒 *Nhe* I 及 *Bss* H II 双酶切鉴定。1: Marker。

2.6 阳性单克隆 ScFv 活性分析 随机选取 20 个克隆, 进行噬菌体表面呈现后的抗体上清对人成纤维细胞及 SMMC-7721 的结合活性进行 ELISA 检测。结果显示 18 个克隆与 SMMC-7721 呈阳性反应, 阳性率为 90%, 15 个克隆与成纤维细胞有交叉反应, 3 个克隆与成纤维细胞呈阴性反应(表 2)。

3 讨论

自从首次报道用小鼠 B 细胞杂交瘤技术制备 mAb 以来已有 29 a。FDA 批准同意用 mAb 治疗也已 18 a(OKT[®]3)。目前进行临床试验的 mAb 约有 140 种, 大部分仍是由

表2 3株 ScFv 与肝癌细胞结合的 A 值

克隆编号	SMMC-7721	成纤维细胞	P 值
11	0.366 ± 0.034	0.112 ± 0.011	< 0.01
18	0.295 ± 0.002	0.081 ± 0.006	< 0.01
23	0.306 ± 0.024	0.095 ± 0.005	< 0.01

阴性对照 A 值 = 0.06 ± 0.001.

鼠杂交瘤技术生产. 而噬菌体抗体为抗体的片段, 分子小、穿透力强、廓清快、异源性低, 而且能在原核系统中表达, 易于生产. 利用抗体库技术可简便地制备出针对不同肿瘤患者多种肿瘤的 mAb 片段, 这些 mAb 片段与细胞毒素、破坏细胞的酶和细胞因子等连接后, 可形成对肿瘤细胞有特异性杀伤作用的复合物, 称为免疫毒素或生物导弹. 对感染性疾病、器官移植排斥反应的防治及肿瘤的早期诊断、治疗, 以及手术及化疗后晚期肿瘤的辅助治疗均具有广阔的应用前景^[5-7].

噬菌体展示库技术在一定程度上较好地模拟了体内抗体生成亲和力成熟过程, 可快速高效地从大量克隆中筛选展示特异性抗体的噬菌体, 为制备高亲和性的抗体提供了有力工具. 其特点是“他既可识别相应的抗原并与其结合, 又能够感染宿主菌进行再扩增”. 该技术可绕过免疫制备全人源性抗体, 可有效避免鼠源性抗体在人体应用时诱发产生人抗鼠抗体(HAMA)等不良反应. 他将表型(与抗原特异结合)与基因型(含 V 区基因)联系在一起, 把识别抗原的能力和进行再扩增的能力结合起来, 是一种高效的筛选体系, 在人源性特异抗体的筛选和制备上独具优势^[8-11].

肿瘤抗原种类繁多, 免疫原性低, 难于纯化, 其抗体制备非常困难. 用常规方法制备的单抗往往种类单一, 亲和力较低, 且抗原性强, 限制了其在临床上的应用^[9, 12-16]. 抗体基因的多样性提供了构建可能靶分子的新方法, 单链抗体的多样性使人们可从人自身噬菌体文库筛选的任何靶抗原上得到. 利用噬菌体抗体库技术建立的抗肿瘤基因文库, 可以绕过杂交瘤, 甚至绕过免疫, 很方便地得到针对多种肿瘤的不同抗原、不同决定簇的功能抗体片段.

目前文献报道的特异性噬菌体抗体, 多数是由固相纯化抗原筛选得到的. 经典筛选技术的前提条件是, 目的抗体所针对抗原的性质明确且可获得到纯品. 对于无法提纯或抗原性质不确定的抗原(如癌细胞表面受体), 采用传统的筛选方法可使抗原失活, 如某些膜蛋白, 因此, 需建立新的筛选系统或对传统的筛选技术进行改进. 直接用细胞系从单链噬菌体抗体库中筛选细胞表面受体结合的抗体已有报道. Kupsch *et al*^[14]用肿瘤细胞作为靶抗原, 已从噬菌体抗体库中筛选出与黑色素瘤细胞特异性结合的抗体.

我们以 pDAN5 为载体, 从 200 例原发性肝癌患者的 B 淋巴细胞中克隆出抗体重链和轻链可变区基因,

构建了全人源肝癌单链抗体库, 滴度达 10^{12} /L. PCR 法鉴定目的基因插入率为 70%. 以 SMMC-7721 细胞对该抗体库进行 3 轮筛选. 在“黏附-洗脱-扩增”的筛选过程中, 回收的噬菌体比率却逐渐增加, 3 轮共增加了 214 倍. 在洗脱下来的噬菌体中, 含 ScFv 基因的克隆比率也得到明显提高(由筛选前的 70% 增到筛选后的 100%), 证实了特异性噬菌体抗体在筛选过程中得到富集. 因此用噬菌体抗体库技术制备肿瘤单抗不失为一种有效的方法. 首先利用正常人成纤维细胞对非特异性噬菌体抗体进行黏附, 使得筛选出的抗体的特异性更强. 对阳性单克隆 ScFv 活性分析表明, 90% 的克隆与 SMMC-7721 呈阳性反应, 其中 3 株与人成纤维细胞呈阴性反应, 对肝癌细胞呈特异性结合. 我们将对这些克隆进一步分析, 以获得理想的全人源抗肝癌噬菌体抗体及其基因.

4 参考文献

- 1 Szardenings M. Phage display of random peptide libraries: applications, limits, and potential. *J Recept Signal Transduct Res* 2003;23:307-349
- 2 Rojas G, Almagro JC, Acevedo B, Gavilondo JV. Phage antibody fragments library combining a single human light chain variable region with immune mouse heavy chain variable regions. *J Biotechnol* 2002;94:287-298
- 3 邢金良, 杨向民, 张思河, 姚西英, 梁瑞安, 陈志南. 人鼠嵌合 Fab 抗体通用表达载体的构建和抗人肝癌相关抗原 HAb18G 嵌合 Fab 抗体的表达. *世界华人消化杂志* 2004;12:271-275
- 4 Sblattero D, Bradbury A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nat Biotechnol* 2000;18:75-80
- 5 Osbourn J, Jermutus L, Duncan A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Drug Discov Today* 2003;8:845-851
- 6 Stockwin LH, Holmes S. The role of therapeutic antibodies in drug discovery. *Biochem Soc Trans* 2003;31:433-436
- 7 Winthrop MD, Denardo GL, Denardo SJ. Antibody phage display applications for nuclear medicine imaging and therapy. *Q J Nucl Med* 2000;44:284-295
- 8 Gao C, Mao S, Ronca F, Zhuang S, Quaranta V, Wirsching P, Janda KD. De novo identification of tumor-specific internalizing human antibody-receptor pairs by phage-display methods. *J Immunol Methods* 2003;274:185-197
- 9 Huston JS, George AJ. Engineered antibodies take center stage. *Hum Antibodies* 2001;10:127-142
- 10 Zampieri S, Mahler M, Bluthner M, Qiu Z, Malmegrim K, Ghirardello A, Doria A, van Venrooij WJ, Raats JM. Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: reactivity, specificity and epitope recognition. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:588-598
- 11 Azzazy HM, Highsmith WE Jr. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clin Biochem* 2002;35:425-445
- 12 Popkov M, Rader C, Barbas CF III. Isolation of human prostate cancer cell reactive antibodies using phage display technology. *J Immunol Meth* 2004;291:137-151
- 13 Heitner T, Moor A, Garrison JL, Marks C, Hasan T, Marks JD. Selection of cell binding and internalizing epidermal growth factor receptor antibodies from a phage display library. *J Immunol Methods* 2001;248:17-30
- 14 Kupsch JM, Tidman NH, Kang NV, Truman H, Hamilton S, Patel N, Newton Bishop JA, Leigh IM, Crowe JS. Isolation of human tumor-specific antibodies by selection of an antibody phage library on melanoma cells. *Clin Cancer Res* 1999;5:925-931

- 15 Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* 2004;9:525-529
- 16 Korn T, Nettelbeck DM, Volkel T, Muller R, Kontermann RE.

Recombinant bispecific antibodies for the targeting of adenoviruses to CEA-expressing tumour cells: a comparative analysis of bacterially expressed single-chain diabody and tandem scFv. *J Gene Med* 2004;6:642-651

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 5 反式调节基因的筛选

张 健, 刘 妍, 成 军, 王 琳, 邵 清

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室
北京市 100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队“九、五”科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135
北京市自然科学基金项目, No. 5042024
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路 100 号, 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室, cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-66933392 传真: 010-63801283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因表达谱芯片技术研究丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 5 的反式调节基因。

方法: 以分子生物学技术构建 NS5ATP5 的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-NS5ATP5, 以表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS5ATP5 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-) 为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取 mRNA。应用基因表达谱芯片技术对差异表达 mRNA 进行检测和分析。

结果: HepG2 细胞经转染 NS5ATP5 后, 有 17 条基因表达增强, 12 条基因表达降低。

结论: 成功筛选了 NS5ATP5 的反式调节基因, 为进一步阐明 NS5ATP5 的反式激活作用及免疫调节机制提供了新的依据。

张健, 刘妍, 成军, 王琳, 邵清. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 5 反式调节基因的筛选. 世界华人消化杂志 2004; 12(10):2901-2904
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2901.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)的感染, 不仅能够引起急慢性病毒性肝炎, 而且能够引起肝纤维化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 严重危害人们的生命健康。我国目前一般人群的感染率达 3.2%, 因而具

有很大的危害性^[1-13]。HCV 至少被分为 10 种结构蛋白和非结构蛋白, 其中非结构蛋白 NS5A 基因(位于 6258-7601 nt 之间)编码的 Mr 58 000 的 NS5A 蛋白(448 aa)具有多种生物学功能, 在 HCV 多蛋白的成熟和 RNA 的复制过程中具有十分重要的作用^[14-17]。研究表明, NS5A 是一种作用很强转录激活因子^[18-22], 调控着细胞内许多病毒及细胞基因的转录, 与感染 HCV 的细胞发生恶性转化过程有关。我实验室应用抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)对 NS5A 的反式调节基因进行了初步的研究, 筛选出了一系列已知及未知功能基因, 并将其中一个未知功能基因克隆, 命名为丙型肝炎病毒非结构蛋白 5A 反式激活蛋白 5(human gene 5 transactivated by nonstructural protein 5A of hepatitis C virus, HCV NS5ATP5)^[23]。此外, 我实验室已经对 NS5ATP5 进行酵母双杂交研究, 观察了他与白细胞之间有相互作用的蛋白^[24]。为了从不同的角度对 NS5ATP5 的反式调节基因进行验证及研究, 我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对 NS5ATP5 反式调节的靶基因成功地进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究 NS5ATP5 的反式调节基因打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 JM109(本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen 公司); Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco 公司), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech 公司), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech 公司), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim 公司), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega 公司)。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体及细胞转染 NS5ATP5 蛋白真核表达