

[文章编号] 1000-4718(2006)06-1203-04

# 错配 PCR 和 DNA 改组技术提高抗肝癌单链抗体亲和力\*

卢筱华<sup>1</sup>, 杨冬华<sup>1</sup>△, 汤绍辉<sup>1</sup>, 周 敏<sup>2</sup>( <sup>1</sup>暨南大学附属第一医院消化内科, 广东 广州 510632; <sup>2</sup>广州市肿瘤医院内科, 广东 广州 510095)

**[摘要]** 目的: 采用错配 PCR 和 DNA 改组技术制备抗肝癌单链抗体。方法: 联合采用错配 PCR 和 DNA 改组技术随机突变抗肝癌单链抗体 A4-16 重链和轻链可变区, 构建抗肝癌噬菌体抗体次级突变库, 利用噬菌体展示技术从中筛选出高亲和力单链抗体突变株。结果: 抗肝癌噬菌体抗体次级突变库容为  $4.5 \times 10^7$ , 经过 3 轮富集筛选和 ELISA 鉴定获得 2 株突变株 M25 M36, 不仅保留原始克隆的特异性, 而且相对亲和力指数分别为原始克隆的 2 倍和 2.4 倍。结论: 错配 PCR 结合 DNA 改组技术是提高单链抗体亲和力的一种有效的手段。

[关键词] 错配 PCR; DNA 改组; 肝肿瘤; 抗体亲和力

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

## Affinity maturation of a single-chain antibody for hepatocellular carcinoma by error-prone PCR and DNA shuffling

LU Xiao-hua<sup>1</sup>, YANG Dong-hua<sup>1</sup>, TANG Shao-hui<sup>1</sup>, ZHOU Min<sup>2</sup>( <sup>1</sup>Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China; <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Guangzhou Hospital for Tumor, Guangzhou 510095, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To obtain a single-chain antibody with high affinity for hepatocellular carcinoma (HCC). **METHODS:** A second single-chain antibody mutant library was established by using error-prone PCR and DNA shuffling. Single-chain antibodies with high affinity for hepatocellular carcinoma were selected from phage antibody library by using ELISA. **RESULTS:** The content of the second single-chain antibody mutant library was about  $4.5 \times 10^7$ . Two selected mutants M25 and M36 were obtained after 3 rounds of panning and ELISA. Immunoassay showed that M25 and M36 bound to human HCC cells specifically. The relative affinity of M25 was 2.0 folds higher than that of the original antibody, and M36 was 2.4 folds higher than the original antibody. **CONCLUSION:** Error-prone PCR combined with DNA shuffling is an effective method to improve affinity of antibodies isolated from phage antibody library.

[KEY WORDS] Error-prone PCR; DNA shuffling; Liver neoplasms; Antibody affinity

构建抗肝癌单链抗体是目前肝癌治疗研究的一个新策略, 近年来有关构建抗肝癌单链抗体库的研究已有报道<sup>[1,2]</sup>, 2001 年我们构建抗肝癌噬菌体单链抗体库<sup>[3]</sup>, 并已筛选出一株抗肝癌特异性单链抗体 A4-16。但由于单链抗体的亲和力较弱, 如何提高单链抗体亲和力以满足临床应用, 既是抗体工程需要解决的关键问题, 也是我们一直致力探索解决的课题之一。目前提高亲和力常用的方法有错配 PCR DNA 改组等技术, 但鲜见有将错配 PCR 和 DNA 改组优化组合应用于抗体亲和力改造的报道。我们

尝试应用错配 PCR 和 DNA 改组对抗肝癌特异性单链抗体 A4-16 进行亲和力改造, 旨在获得具有临床应用前景的高亲和力抗肝癌单链抗体。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

含有抗肝癌单链抗体基因的 pCANTAB5E-A4-16 重组质粒由本实验室构建; 大肠杆菌 TG1 辅助噬菌体 M13KO7 噬菌体载体 pCANTAB 5E、辣根过氧化物酶标记抗体 M13 为 Amershan 公司产品; Not I、

[收稿日期] 2005-10-13 [修回日期] 2005-11-22

\* [基金项目] 广东省名医工程研究项目资助(No. 粤卫[2004]199号); 广州市科委领域专项创新药物基金资助项目(No. 2004Z3-E4121)

△通讯作者 Tel: 020-85220303; E-mail: thdyang@163.com

*Sfi* I 内切酶、T4 连接酶、Pyrobest DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品; Taq DNA 酶、DNase I 酶为 Promega 公司产品。人肝癌细胞系 (HepG2、Bel-7402、SMMC7721)、正常人胎肝细胞系(L-02)、胃癌细胞系(SCG-7901)、肠癌细胞系(CaCO2)、胰腺癌细胞系(PANC-1)均为本实验室保存。PCR 引物均由北京奥科公司合成(表 1)。

表 1 用于扩增抗体重链、轻链可变区和接头(linker)的引物

Tab 1 Primers of heavy chain, light chain and linker

Primers	Sequences
Heavy chain primers	
sense:	5'-TCTATGCCGCCAGCCGCCAT-3'
antisense:	5'-TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGGCCCC-3'
Light chain primers	
sense:	5'-GACATTGAGCTACCCAGTCTCCAGC-3'
antisense:	5'-TTGGTCCCAGTCATTCTGCGGCCGCC-3'
Linker primers	
sense:	5'-GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGT-3'
antisense:	5'-TGGAGACTGGGTGAGCTCAATGTCAGA-3'

## 2 错配 PCR 分别扩增抗体重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)

以含有抗肝癌单链抗体基因的 pCANTAB 5E-A4-16 重组质粒为模板,在反应体系中加入 7 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1 mmol/L dCTP、1 mmol/L dTTP、0.2 mmol/L dATP、0.2 mmol/L dGTP、0.5 mmol/L MnCl<sub>2</sub>、5 U Taq 酶进行 35 轮循环,每循环反应条件为 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min。VH、VL 的 PCR 产物经电泳分析后分别回收备用。

## 3 错配 PCR 后获得的 VH、VL 分别进行 DNA 改组

**3.1 碎片化反应** 上述错配 PCR 扩增的 VH 或 VL 各约 4-6 μg 在 100 μL 反应体系(40 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)、10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 0.3 U DNase I)中 20 °C 反应 15-20 min, 65 °C 水浴 10 min 使 DNase I 灭活,2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收约 50 bp 左右小片段。

**3.2 重聚反应** 50 μL PCR 体系(10 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0)、50 mmol/L KCl、1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.2 mmol/L dNTPs)加入约 1 μg 经 DNase I 消化的片段、2.5 U Taq DNA 聚合酶,不加入引物进行 45 轮循环,每循环反应条件为 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s。取 5 μL 上述无引物 PCR 反应产物进行第 2 轮有引物 PCR 反应,50 μL 反应体系(同上)中加入重链或轻链的正义和反义引物进行 30-35 个循环,每循环反应条件为 94 °C 55 °C 72 °C 各 1 min,琼脂糖凝胶电泳检测并回收目的片段,若无目的条带,则取 5 μL 产物

为模板,按上述相同 PCR 反应条件再进行一次反应。

## 4 抗肝癌噬菌体抗体次级突变库的构建

上述 DNA 改组后获得的 VH、VL 与高保真 Pyrobest DNA 聚合酶扩增的 linker 等摩尔混合,进行 20 轮连接反应,每循环条件为 98 °C 10 s, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min。再以上述 PCR 产物 5 μL 为模板,加入重链正义引物和轻链反义引物进行 30 轮循环 PCR 扩增,每循环条件为 98 °C 10 s, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min,凝胶电泳分析并从凝胶上回收 780 bp 片段。回收片段经 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切后,插入载体 pCANTAB 5E 中,电穿孔把重组质粒经过 55 次转化全部导入大肠杆菌 TG1,用 SOB/氨苄平板测定库容。

## 5 抗肝癌噬菌体抗体突变库的筛选及 ELISA 鉴定

以人肝癌细胞作为抗原,按文献<sup>[3]</sup>方法对噬菌体突变库进行 3 轮“吸附-洗脱-扩增”富集筛选。从最后 1 轮洗脱的噬菌体抗体库中挑选共 120 个克隆制备噬菌体抗体。以肝癌细胞(浓度为 10<sup>8</sup>/L)包被 ELISA 板,正常肝细胞作为阴性对照,经 1% BSA 封闭后加入待测噬菌体抗体上清,同时设 3 个复孔;然后以 HRP 标记的抗 M13 为 II 抗,孵育,洗涤后 OPD 底物显色,标本 A<sub>490</sub> 值大于阴性对照两倍以上者为阳性。将显色阳性的噬菌体抗体调至相同滴度,再以肝癌细胞、正常肝细胞、肠癌细胞、胃癌细胞、胰腺癌细胞为抗原同时包被酶标板,ELISA 法鉴定其抗原抗体反应特异性。

## 6 相对亲和力测定

经 ELISA 鉴定获得的阳性噬菌体抗体与原始噬菌体抗体 A4-16 采用硫酸盐洗脱法进行相对亲和力比较。肝癌细胞 10<sup>8</sup>/L 包被酶标板,1% BSA 封闭后加入待测的相同滴度的噬菌体抗体 37 °C 孵育 2 h,0.05% Tween/PBS 洗 3 次,加入不同浓度 NH<sub>4</sub>SCN (0-2 mol/L),室温放置 15 min, PBS 洗 3 次,加入 HRP 标记的 M13 抗体 37 °C 孵育 2 h,经洗涤后以 OPD 为底物显色,测定 A<sub>490</sub> 值,以 A<sub>490</sub> 下降 50% 时相应的 NH<sub>4</sub>SCN 浓度作为该抗体的相对亲和力指数。

## 7 单链抗体基因序列测定

选择经错配 PCR 和 DNA 改组后所获得的亲和力比原始噬菌体抗体 A4-16 高的克隆进行单链抗体基因序列测定。

# 结 果

## 1 抗肝癌噬菌体抗体次级突变库

首先经错配 PCR 扩增得到的 VH 为 383 bp, VL 为 349 bp(图 1)。然后进行 DNA 改组,VH 或 VL 经 DNase I 消化后获得约 50 bp 的随机片段;在 45 个循

环的无引物 PCR 反应中, 这些随机片段互为引物拼接成许多大小不一的改组分子, 但在琼脂糖电泳中未见有明显的目的条带; 经 35 个循环有引物 PCR 后, 成功获得与模板大小相同的 VH 或 VL 改组分子 (图 2)。最后连接反应得到单链抗体片段约为 780 bp (图 1)。抗肝癌噬菌体抗体次级突变库实际库容为  $4.5 \times 10^7$ 。

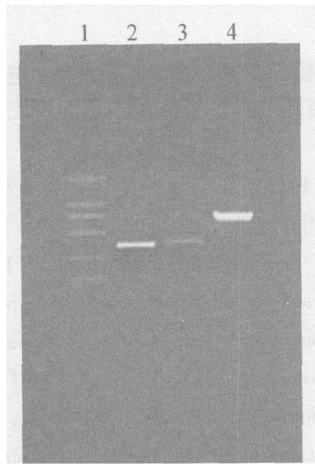


Fig 1 Agarose gel electrophoresis of error-PCR products and assembly product. 1: DNA marker (from the top to bottom is 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp); 2: VL; 3: VH; 4: single chain antibody fragment.

图 1 错配 PCR 扩增产物和连接反应产物的琼脂糖凝胶电泳分析

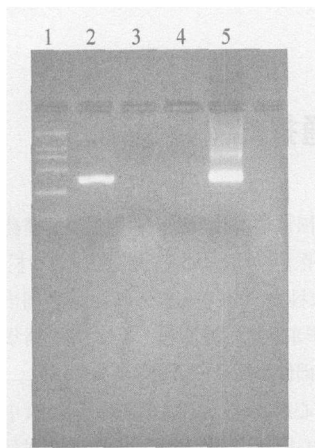


Fig 2 Agarose gel electrophoresis of DNA shuffling products. 1: DNA marker (from the top to bottom is 2 000 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp); 2: template before DNA shuffling; 3: DNase I digest fragments (30-100 bp); 4: reassembly products without primers; 5: reassembly products with primers.

图 2 DNA 改组产物的琼脂糖凝胶电泳分析

## 2 抗肝癌噬菌体抗体筛选及鉴定

随机突变库进行 3 轮“吸附-洗脱-扩增”筛选后, 从最后 1 轮挑选的 120 个克隆中经 ELISA 检测有

4 个显示出与肝癌细胞的结合活性, 但只有 2 个克隆 M25 M36 与正常肝细胞、肠癌细胞、胃癌细胞、胰腺癌细胞均无结合。

## 3 相对亲和力测定

A4-16 噬菌体抗体对应的  $\text{NH}_4\text{SCN}$  浓度即相对亲和力指数为 0.8 mol/L, M25 为 1.6 mol/L, 而 M36 为 1.9 mol/L。M25、M36 相对亲和力为 A4-16 的 2.0 和 2.4 倍。

## 4 高亲和力单链抗体的基因鉴定

通过对上述 2 株突变株 M25 M36 的核苷酸序列分析及原始克隆 A4-16 基因序列比较, 发现 M25 有 3 个氨基酸改变, 分别是  $\text{Phe}_{31}(\text{TTC}) \rightarrow \text{Ser}_{31}(\text{TCC})$ ,  $\text{Ile}_{165}(\text{ATA}) \rightarrow \text{Thr}_{165}(\text{ACA})$ ,  $\text{Phe}_{97}(\text{TTC}) \rightarrow \text{Tyr}_{97}(\text{TAC})$ , 其中  $\text{Ser}_{31}$  位于重链 CDR1 区,  $\text{Thr}_{165}$  位于轻链 CDR1 区,  $\text{Tyr}_{97}$  位于重链可变区第 3 骨架区; 而 M36 有 3 个氨基酸改变, 分别是  $\text{Arg}_{106}(\text{CGC}) \rightarrow \text{Leu}_{106}(\text{CTC})$ ,  $\text{Ser}_{160}(\text{AGT}) \rightarrow \text{Cys}_{160}(\text{TGT})$ ,  $\text{Tyr}_{221}(\text{TAT}) \rightarrow \text{His}_{221}(\text{CAT})$ , 其中  $\text{Leu}_{106}$  位于重链 CDR3 区,  $\text{Cys}_{160}$  位于轻链 CDR1 区,  $\text{His}_{221}$  位于轻链可变区第 3 骨架区。

## 讨 论

单链抗体是在体外利用噬菌体展示技术构建的, 因缺乏类似于体内的自然进化过程, 故其抗原结合能力较弱, 难于满足临床治疗的要求, 需通过各种手段进行体外分子定向进化。体外定向进化是一种蛋白质改造新策略, 可在未知蛋白质三维结构信息和作用情况下, 通过对编码基因的随机突变、重组和定向筛选, 获得具有改进功能或全新功能的蛋白质。目前错配 PCR<sup>[5]</sup> 和 DNA 改组<sup>[6]</sup> 技术是进行体外定向进化常用的两种方法。错配 PCR 操作简单, 应用广, 主要用于单一起始亲本基因的进化, 其特征是没有方向性, 易出现有害突变。DNA 改组操作较错配 PCR 复杂, 但得到良性突变比例较高, 效果优于错配 PCR, 主要适合对一组高同源性的同家族、同功能蛋白质改造。我们从已建立的抗肝癌噬菌体库中筛选到的特异性噬菌体抗体 A4-16 是单一亲本基因, 故先采用错配 PCR 获得一组同源基因后, 再采用 DNA 改组技术进一步构建抗肝癌噬菌体抗体突变库, 这样可以避免多次错配 PCR 造成有害突变的累积。经过错配 PCR 和 DNA 改组后, 我们得到库容为  $4.5 \times 10^7$  抗肝癌噬菌体抗体突变库, 经过 3 轮富集筛选后经 ELISA 鉴定获得 2 株与肝癌细胞有高度亲和力的噬菌体抗体突变株 M25 M36, 采用硫氰酸盐洗脱法比较原始克隆 A4-16 和 M25 M36 的相对亲和力发现, M25 M36 相对亲和力分别为 A4-16 的 2.0 和

2.4倍,显示突变后抗体亲和力得到明显提高,证明错配 PCR 结合 DNA 改组技术是进行体外定向进化的一种可行的有效方法。

根据目前已有的抗体-抗原复合物晶体结构发现,抗体重链和轻链可变区的 CDR 区在抗体结合抗原时具有关键作用。通过对突变株 M25 M36 氨基酸序列研究,我们发现与原始克隆 A4-16 相比, M25 有 3 个氨基酸改变,其中 Ser<sub>31</sub> 位于重链 CDR1 区, Thr<sub>165</sub> 位于轻链 CDR1 区, Tyr<sub>97</sub> 位于重链可变区第 3 骨架区;而 M36 有 3 个氨基酸改变,其中 Leu<sub>106</sub> 位于重链 CDR3 区, Cys<sub>160</sub> 位于轻链 CDR1 区, His<sub>221</sub> 位于轻链可变区第 3 骨架区。骨架区氨基酸的突变主要与抗体折叠有关,不直接参与抗原的结合,故可推测突变株 M25 Ser<sub>31</sub> Thr<sub>165</sub> 的突变与 M36 Leu<sub>106</sub> Cys<sub>160</sub> 的突变可能是影响抗体亲和力的结构基础。

我们在已构建的抗肝癌噬菌体单链抗体库的基础上,利用错配 PCR 和 DNA 改组技术再构建抗肝癌噬菌体抗体次级突变库,并筛选到高亲和力的抗肝癌单链抗体,为进一步进行抗体人源化改造和肝癌早期诊治的应用研究奠定了基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] Sandee D, Tungpradabkul S, Tsukio M, et al. Construction and high cytoplasmic expression of a tumoricidal single chain antibody against hepatocellular carcinoma[J]. BMC Biotechnol, 2002, 2(1): 16-20.
- [2] 李 赏,胡宝成,绳纪坡,等. 肝癌细胞特异性结合抗体的筛选及序列测定[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(3): S20-S25.
- [3] 毕向军,杨冬华,崔 俊,等. 抗肝癌单链抗体的构建及其结合特性[J]. 上海免疫学杂志, 2001, 21(5): 289-292.
- [4] 毕向军,杨冬华,陈 湖. 单链抗体在肿瘤中的应用[J]. 实用肿瘤杂志, 2002, 17(3): 213-215.
- [5] Zahnd C, Spinelli S, Luginbuhl B, et al. Directed *in vitro* evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment with low picomolar affinity[J]. J Biol Chem, 2004, 279(18): 18870-18877.
- [6] van der Linden RH, de Geus B, Frenken GJ, et al. Improved production and function of llama heavy chain antibody fragments by molecular evolution[J]. J Biotechnol, 2000, 80(3): 261-270.

## 欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是由中国药理学会主办,安徽医科大学编辑出版的全国性学术性杂志。本刊主要刊登药理学研究论文,辟有论著、讲座与综述、小专论、实验方法学、新药介绍与老药新用、国内外医药学动态、研究简报、快报等专栏。

本刊荣获 2003-2005 年两届国家期刊奖百种重点期刊奖,第 1、第 2 届全国国家科委、中共中央宣传部、国家新闻出版署优秀科技期刊二等奖,第 1、第 2、第 3 届中国科学技术协会优秀期刊二等奖,第 1 届华东地区优秀期刊一等奖,第 2 届华东地区最佳期刊奖。本刊 1999、2002、2004 年分别获国家自然科学基金和中国科协资助基础性和高科技期刊专项奖金资助。

本刊已被中国科学院文献情报中心中国科学引文数据库确定为医学类核心期刊;被北京大学图书馆主编《中文核心期刊要目总览》第 1、第 2 版及 2000 版,2004 版均选定为药理学类核心期刊;被国际核心期刊研究会确定为核心期刊;被国家科委科技信息研究所确定为科技论文统计源期刊即中国科技核心期刊。

本刊已被国内几乎所有相关检索期刊及国际著名检索期刊 Chemical Abstract(美国)、《P & C》(俄罗斯)、Biochemical Abstract(美国)、Index Medicus(美国)、EMBASE/Excerpta Medica(荷兰)、Kunst and Wissen(德国)、Centre for Agriculture and Biosciences international(CAB international,英国)等收录利用。连续 9 年进入《CA 千种表》。

医师用药要懂药理,药师药研人员要更懂药理。中国药学通报,医师药师都需要

本刊为月刊,大 16 开 128 页,彩色铜版纸印刷,每期定价 15.00 元(零售:20 元/期),全年 180.00 元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至本刊编辑部(零售价:每期 20 元),免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、程西望、武明静。电话:0551-5161221 5161222,电子信箱:cpb@ahmu.edu.cn