人源抗体组合文库的构建及抗甲状旁腺素相关蛋白单克隆抗体的筛选

王 学 张 莉 刘顺受 周 莹 田 波*

(中国科学院微生物研究所,北京 100080;* 联系人)

摘要 用 PCR 技术从人外周血淋巴细胞中扩增出 Fd 段和 κ 链基因,构建了噬菌体抗体库,其库容量为 1.5×10^8. 将甲状旁腺素相关蛋白(PTHrP)合成肽固相化对该文库进行了"吸附-洗脱-扩增"的筛选,使特异性抗体富集了 500 多倍. 经 5 轮筛选其噬菌体抗体阳性率为 62% (31/50). 抑制实验表明. 可溶性表达的 Fab 段具有结合 PTHrP 的特异性. SDS-PAGE 分析显示其分子量约为 50 ku.

关键词 抗体库 噬菌体抗体 甲状旁腺素相关蛋白 抗体 Fab 肿瘤性高血钙症

某些肿瘤在没有骨移植情况下就可产生肿瘤性高血钙症(humoral hypercalemia of malignancy, HHM),其主要原因已于 1987 年被确认为甲状旁腺素相关蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP)[1]. PTHrP 的氨基末端与甲状旁腺素(PTH)具有高度的同源性,正是因为这种同源性,PTHrP 才能够与 PTH/PTHrP 受体结合并具有与 PTH 相似的功能[2]. 在正常的生理条件下,PTHrP 在局部以自分泌/旁分泌形式行使着许多功能,特别是在调节细胞生长和分化等方面起一定的作用,在胎儿的骨骼发育过程中起关键的调节作用. 并参与将 Ca^{2+} 转移到乳房上皮、肾和胎盘中[3];促进子宫平滑肌、膀胱和血管壁等肌肉松驰[4]. 在正常组织中 PTHrP 含量甚微,难以检测出来. 在肿瘤性高血钙症中,PTHrP 也主要起着自分泌因子的作用,但癌细胞可产生大量的 PTHrP 并分泌到循环系统,使体内 PTHrP 浓度增高,引起骨过量吸收并释放出 Ca^{2+},增加肾对 Ca^{2+} 的再吸收,其结果导致高血钙症并危及生命[4].

据统计,恶性肿瘤伴发的高血钙症约占肿瘤患者的 10%. 所有的恶性肿瘤都能产生高血钙症,其中鳞状细胞癌、泌尿系统癌、乳腺癌和卵巢癌等 HHM 发病率较高. 在临床上,血液中 PTHrP 的高低是鉴定 HHM 极其有用的标志之一,并且也是肿瘤复发的预测指标. 体外实验表明,PTHrP 的杂交瘤中和抗体不但能降低 PTHrP 的浓度,而且还能抑制肿瘤细胞的生长[5]. 本文利用噬菌体表面呈现表达系统构建人源抗体组合文库,从中筛选出抗 PTHrP 的单克隆抗体,为治疗癌症患者的高钙血症和抑制肿瘤生长提供先决条件.

1 材料与方法

用淋巴细胞分离液(中国医学科学院天津血液研究所生产)从 150 mL 人外周血中分离出淋巴细胞,按 mRNA 提取试剂盒(美国 Promega 公司生产)说明书所述步骤提取 mRNA,定容至 50 μL. 然后用第 1 条链合成试剂盒(美国 GIBCO BRL 公司)和以 oligo-(dT)为引物逆转录为 cDNA. 用半套式 PCR 方法对其进行扩增,方法和引物序列见文献[6].

大肠杆菌 XL1-Blue 为宿主菌,其转化方法见文献[7],参照文献[8]所述的方法构建抗体库.

将 10 μL 经适当稀释的噬菌体抗体库加到 100 μL 新鲜的 $A_{600}\approx1.0$ 的 XL1-Blue 的菌液

中室温放置 20 min，铺到含有羧苄青霉素的培养板中，37℃ 培养过夜，计算集落数，并随机挑取 10 个菌落进行培养，提取其质粒进行酶切鉴定.

将人工合成 PTHrP 多肽(1～85 个氨基酸)(购于美国 BACHEM 公司)溶解在 0.05 mol/L 碳酸缓冲液(pH9.6)中，终浓度为 10 μg/mL，其筛选方法同文献[8].

用第 5 轮洗脱下来的噬菌体感染 1 mL XL1-Blue，铺到含有羧苄青霉素的培养板中，37℃ 培养过夜. 挑取单菌落于 2 mL 含羧苄和四环素的 SB 培养中，37℃ 培养到 $A_{600}\approx 0.2\sim 0.3$，加入 10 μL 辅助噬菌体 VCSM13($11\times 10^{12}$ CFU)，继续培养过夜，离心取上清 100 μL 加到 PTHrP 包被的 ELISA 板孔中，HRP-兔抗 M13(军事医学科学院五所惠赠)进行结合反应，邻苯二胺显色. DNA 序列分析参照文献[9].

取上述 ELISA 鉴定为阳性的噬菌体抗体感染 XL1-Blue，37℃ 振荡培养过夜提取其噬菌粒 DNA，参照文献[9]方法制备抗体 Fab 段和 ELISA 鉴定，并对 Fab 进行初步纯化.

2 结果与讨论

取 150 mL 正常人外周血，经密度梯度离心获得约 2×10^8 个单核细胞，提取其 mRNA 并逆转录为 cDNA. 用 PCR 扩增 Fd 段和 κ 链基因，在约 660 bp 处可见到扩增带[6]，将 PCR 产物 Fd 和 κ 链分别用 Xho Ⅰ/Spe Ⅰ 和 Sac Ⅰ/Xba Ⅰ 酶切后与相应酶切的载体相连，电穿孔转化 XL1-Blue 细胞，其库容为 1.5×10^8，Fd 段和 κ 链插入分别为 80% 和 90%，由于 PTHrP 是人体内正常组分，不太可能用杂交瘤等传统途径获得人源单克隆抗体，而这种正常人体细胞组分能从人源抗体库中获得其相应的单克隆抗体[10]. 以前的报道表明，万分之一数量的分子能从抗体库中筛选出来[8]. 利用 PTHrP 筛选抗体库时，噬菌体抗体库投入 1.5×10^{12} CFU 进行第 1 轮筛选，选脱下来噬菌体 2×10^4 CFU，投入产出比 1.33×10^{-7}，约合百万分之一，经过 5 轮筛选后投入产出比为 5.7×10^{-5}，比第 1 轮高出 500 多倍，这说明识别 PTHrP 的抗体在噬菌体抗体库中含量很低，经过 5 轮的筛选特异性噬菌体得到了高度富集.

从第 5 轮筛选后得到的细菌集落中挑取 50 个克隆制备噬菌体抗体，用 ELISA 测定其抗原结合活性，有 31 个对 PTHrP 有结合反应，其中 A_{495} 值达到 1.00 以上有 5 个. 取其中的一个克隆对其重链和轻链可变区的 DNA 序列进行分析(见图 1).

	CDR1	CDR2	CDR3
重链	.....FNNYAISWV.....	GLLSRNRDTTNSPMFQG.....	DNSGEGDI
轻链	.....ASSTGAVTSGYYPN.....	STYNRHS.....	LLYYVMLNWV

图 1 抗体可变区中 CDR 区氨基酸序列

噬菌体抗体借助单链噬菌体外壳蛋白 Ⅲ 将 Fab 段表达在噬菌体颗粒表面，用 Spe Ⅰ/Nhe Ⅰ 内切酶将基因 Ⅲ 片段从表达载体中除去，得到可溶性 Fab 表达质粒，将该质粒转化大肠杆菌 XL1-Blue，经 IPTG 诱导后收取上清 100 μL，检测其抗原结合活性，PTHrP 的包被量为 1 μg/孔，HBsAg 的包被量为 1 μg/孔，抗 PTHrP 的稀释度为 1∶100. 结果见表 1.

表 1 Fab 与 PTHrP 结合反应的 ELISA 测定(A_{495})

	包被的抗原	
	PTHrP	HBsAg
Anti-PTHrP Fab	1.25±0.03	0.05±0.01
Anti-HBsAg Fab	0±0	1.30±0.04

为了进一步鉴定噬菌体抗体的特异性，以 PTHrP 包被和作为竞争性抗原，将含有 Fab 的上清加以适当稀释，使其 A_{495} 值在 1.00 以下，进行 ELISA 竞争抑制实验，其结果见表 2.

表 2 噬菌体抗体的 ELISA 竞争抑制实验

	PTHrP/$\mu g \cdot mL^{-1}$				
	0	0.1	0.5	2	10
A_{495}	0.96	0.89	0.83	0.67	0.41
抑制率/%		8.50	24.70	51.50	73.65

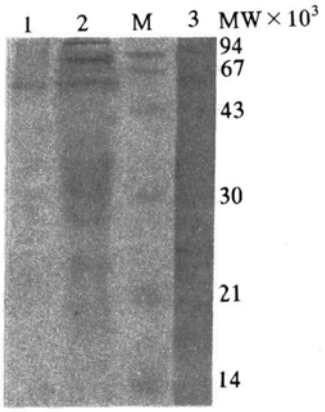

图 2 可溶性表达 Fab 的 SDS-PAGE 分析(考马斯亮蓝染色)

1——初步纯化的 Fab，2——诱导未纯化，M——标准分子量，3——未诱导，MW——分子量

从表 2 中可以看出，PTHrP 可产生与剂量相关的抑制效应. Fab 电泳结果见图 2，在约 50 ku 可见 1 条 Fab 表达带.

参 考 文 献

1 Bartis W J, Wu T, Bunch C, et al. Identification of a novel 17 000-Dalton parathyroid hormone-like denylate cyclase stimulating protein from a tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. J Biol Chem, 1987, 262: 7 151～7 156

2 Rabbani S A, Mitchell J, Roy D R, et al. Influence of the amino-terminus on *in vitro* and *in vivo* biological activity of synthetic parathyroid hormone-like peptides of malignancy. Endocrinology, 1988, 123: 2 709～2 716

3 Sebag M, Henderson J, Goltzman D, et al. Regulation of parathyroid hormone-related peptide production in normal human mammay epithelial cells *in vitro*. Am J Physiol, 1994, 267: C723～730

4 Philbrick W M, Wysolmerski J J, Galbraith S. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. Physiol Rev, 1996, 76: 127～170

5 Benitez-Verguizas J, Esbrit P. Proliferative effect of parathyroid hormone-related protein on the hypercalcemic Walker 256 carcinoma cell line. Biochem Biophy Res Common, 1994, 198: 1 281～1 289

6 王 学，王海涛，陈万荣，等. 半套式 PCR 扩增人抗体基因以增加抗体库的多样性. 军事医学科学院院刊，1996，20(1)：45～48
7 Dower W, Miller J F, Ragsdale C W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acid Res, 1988, 16: 6 127～6 145
8 王 学，王海涛，陈万荣，等. 人抗体组合文库的构建和抗 HBsAg 噬菌体抗体的筛选. 生物化学与生物物理学报，1997，29(2)：183～191
9 王 学，王海涛，陈万荣. 人抗 HBsAg 噬菌体抗体 Fab 段基因的序列分析及表达. 军事医学科学院院刊，1997，21(1)：10～13
10 王 学，王海涛. 抗体库的发展与未来. 生物化学与生物物理进展. 1996，23(4)：312～316

(1998-03-23 收稿，1998-05-29 收修改稿)

鲅状黄姑鱼养殖群体的遗传多样性

丁少雄 王 军 全成干 苏永全
(厦门大学海洋学系、亚热带海洋研究所，厦门 361005)

摘要 对鲅状黄姑鱼养殖个体不同组织提取的、不同纯度及不同浓度的 DNA 模板的 RAPD 扩增结果进行对照分析. 在此基础上，应用 20 个随机引物对其群体的遗传多样性进行 RAPD 检测. 结果表明：(ⅰ) 该养殖群体平均多态性为 15.32%，平均遗传差异度为 0.0319，遗传多样性水平较低，但仍具有一定的变异潜力，尽快采取适当的管理保护措施，可以保持乃至提高鲅状黄姑鱼遗传多样性水平. (ⅱ) 从不同部位(鳍条、肌肉、性腺、血液)提取的 DNA 模板的扩增产物基本一致，由鳍条取样能确保实验鱼继续存活. (ⅲ) RAPD 检测方法对 DNA 模板纯度要求不高，DNA 模板浓度在一个较大范围内(0.05～50 ng/μL)对扩增产物的重复性影响甚微. (ⅳ) RAPD 技术在鱼类种质资源的遗传多样性检测中是一种灵敏、有效和方便的技术方法.

关键词 鲅状黄姑鱼 遗传多样性 RAPD 技术

鲅状黄姑鱼(*Nibea miichthioides*)具有生长快、抗病力强、肉质鲜美等特点，近年来成为我国南方沿海重要的养殖对象. 1993 年以来，由于迅速发展的网箱养殖大量放养海区天然苗，使得天然苗的捕获量下降 80%，至 1996 年则已捕不到天然苗. 鲅状黄姑鱼人工育苗获得成功后，近年来的养殖生产中几乎都用人工苗. 由于采用小群体亲鱼人工育苗容易产生“瓶颈”效应、遗传漂变及近交衰退，导致养殖鱼类遗传变异能力的丧失和种质资源的退化. 因此，对现有群体进行种质资源调查及遗传多样性分析，以制定相应的管理保护措施，对于保护鲅状黄姑鱼养殖种群的优质性，避免种质退化，具有重要的现实意义及广阔的应用前景.

90 年代初发展起来的随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD)作为一种新型的遗传标记技术，其灵敏、方便和准确的特点使之在近年来的系统分类[1～3]、基因定位[4]、资源评估[5～7]等许多方面的研究中得到广泛应用. 但在鱼类研究方面，国内仅在系统分类[8]和育种[9]方面有过探索，而在遗传多样性方面则尚未见过公开报道. 本文应用 RAPD 技术对鲅状黄姑鱼养殖群体基因组 DNA 进行多态性分析，对其遗传结构做了相应的描述和讨论，并就防止鲅状黄姑鱼种