

递呈 BAC₅ 单抗识别位点的 M₁₃噬菌体克隆系的建立

肖锡宾, 张昌卿, 李经略, 冯凯涛, 孙 韵, 叶永照

(中山医科大学肿瘤医院中心实验室, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】获得可递呈抗低分化和未分化癌细胞单克隆抗体(BAC₅ 单抗)抗原表位的 M₁₃噬菌体克隆系。【方法】以 BAC₅ 单抗为靶抗体, 对由 M₁₃噬菌体构建的随机 12 肽文库进行生物淘洗。用抗体竞争方法从阳性克隆中选出与 BAC₅ 单抗结合率较高的克隆系。通过 ELISA 方法检测 BAC₅ 单抗对上述克隆的选择性识别。【结果】经过 3 轮淘洗, 获得的阳性克隆率为 77% (35/45)。来自 C2、C17 和 C29 号克隆的噬菌体对外加 BAC₅ 单抗的结合率分别为 71.6%、49.4% 和 64.0%, 高于其它阳性克隆。BAC₅ 单抗与来自上述 3 个克隆的噬菌体呈阳性反应, 与来自辅助型 M₁₃ 株的噬菌体(VCSM₁₃)和淘洗前的文库噬菌体(RPLM₁₃)呈阴性反应。【结论】来自 C2、C17 和 C29 号克隆的噬菌体有可能递呈与 BAC₅ 单克隆抗相关的抗原表位。

关键词: 噬菌体 M₁₃/免疫学; 肽库; 抗体; 单克隆

中图分类号: R 392.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)03-0165-03

The Establishment of M₁₃ Phage Clones Displayed Epitope Recognized by BAC₅ McAb

XIAO Xi-bin, ZHANG Chang-qing, LI Jing-lue, FENG Kai-tao, SUN Yun, YE Yong-zhao

(Central Laboratory of Tumor Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

Abstract:【Objective】To obtain M₁₃ phages displayed antigenic epitope recognized by BAC₅ McAb, a kind of monoclonal antibody located on poorly or undifferentiated squamous carcinoma cells.【Methods】Using BAC₅ McAb as selected target, a 12-mers RPL was biopanned. The positive clones were selected by antibody competition assay. The clones combined with BAC₅ McAb were demonstrated by ELISA.【Results】77% (35/45) of positive clones from eluted phage clones were obtained by 3 rounds of biopanning. The combination rates of the phages from clone C2, C17, C29 with added BAC₅ McAb were 71.6%, 49.4% and 64.0% respectively much higher than those of phages from other positive clones. BAC₅ McAb had positive reaction to M₁₃ phages from C2, C17, C29 clones as compared with those from helper M₁₃ phage strain, VCSM₁₃ and no-biopanning RPL M₁₃ phages (P/N > 2.1).【Conclusion】The M₁₃ phages from C2, C17, C29 clones may display antigenic epitope recognized by BAC₅ McAb.

Key words: bacteriophage M₁₃/immunology; peptide library; antibodies, monoclonal

蛋白质抗原表位分析是研究抗原的分子结构和功能、抗原-抗体反应机制的基础。研究和分离癌细胞表达的抗原表位, 可以为肿瘤的血清学诊断, 特异性免疫治疗和抗肿瘤疫苗设计提供重要的线索和依据。

BAC₅ 单抗(BAC₅ McAb)是本室制备的小鼠 IgG₁

单克隆抗体^[1]。其相关的抗原决定簇存在于低分化/未分化鼻咽癌细胞的表面。由于传统的抗原表位分析方法, 即抗体筛选重叠(overlapping)方法, 需要对分离纯化后的 BAC₅ 相关抗原进行氨基酸序列分析再合成肽后才能进行, 工作比较复杂, 因此有关 BAC₅ 单抗的抗原表位结构一直未能确定。

收稿日期: 1999-09-02

基金项目: 广东省卫生厅科研基金资助(A 1999212)

作者简介: 肖锡宾(1945-), 男, 广东兴宁人, 硕士, 副研究员。

一种新的生物技术——随机多肽文库(random peptide libraries, RPL)技术,使抗原表位分析趋向简单^[2,3]。该技术可以直接用已知抗体从肽库中筛选出能与之结合的多肽。这些多肽或者是该抗体所相关的线性表位,或者是模拟(mimotope)相应抗原空间构型的构象型表位。多肽的量可随特异噬菌体的繁殖而增加。只要对携带相应抗原表位的噬菌体进行DNA序列测定,即可确定它所递呈的抗原表位的氨基酸序列。利用这一技术,我们已成功地筛选出可以和BAC₅单抗相结合的M₁₃噬菌体克隆系,为确定BAC₅相关抗原表位的基础奠定了基础,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 M₁₃噬菌体 M₁₃噬菌体递呈的随机12肽文库(RPL)是美国NEW ENGLAND BIOLABS公司产品,肽库的滴度(噬斑形成单位, pfu/L)为 2×10^{16} pfu/L。随机多样性为 2×10^9 。受体菌是*E. coli* ER2537。VCSM₁₃为辅助性M₁₃噬菌体。上述材料由北京军事医学科学院王海涛教授提供。RPLM₁₃为本室扩增的递呈随机12肽的M₁₃噬菌体,滴度为 10^{15} pfu/L。

1.1.2 抗 体 纯化的小鼠BAC₅单克隆抗体(IgG₁)由本室制备,抗体浓度为0.5 g/L。辣根过氧化物酶标记的兔抗M₁₃噬菌体IgG(1:250)由王海涛教授提供。鼠抗M₁₃噬菌体血清(1:3 200)本室用RPLM₁₃免疫Balb/C小鼠后制备。辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG(1:800)为丹麦DAKO公司产品。

1.1.3 主要试剂 TBS(50 mol/L Tris-HCl, 150 mol/L NaCl, pH 7.5), TBST含体积分数为0.1% Tween 20的TBS, 邻苯二胺(OPD)为Sigma公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 肽库的生物淘洗(biopanning) 将BAC₅单抗稀释至150 mg/L,每个微孔用150 μL包被,经体积分数为3%BSA-PBS封闭。300 μL TBST缓冲液稀释10 μL肽库原液,按100 μL/孔加到微孔内,室温1 h。TBST缓冲液洗涤10次后,每孔加入100 μL 0.2 mol/L甘氨酸-盐酸(pH 2.2)室温10 min洗脱结合的噬菌体。每孔加入20 μL pH 9.2的Tris溶

液中和洗脱液。测定洗下的噬菌体滴度(pfu)然后加到20 mL LB培养液中,同时加入过夜培养的*E. coli* ER2537/菌1 mL, 37 °C, 250 r/min,培养5 h制备繁殖后的噬菌体,并测定滴度作为下一轮淘洗的噬菌体。每次淘洗后计算噬菌体的产量,如此反复淘洗3次。用第3次淘洗下的噬菌体10 μL感染*E. coli* ER2537菌铺制平板,挑取平板内的单个噬斑制备噬菌体原种。

1.2.2 噬菌体原种的ELISA检测 依“1.2.1”法用BAC₅单抗包被酶联板。经体积分数为3%BSA-PBS封闭后,加入用稀释液对倍稀释的噬菌体原种各100 μL,以*E. coli* ER2537菌培养上清为阴性对照,37 °C孵育1 h后PBS洗板3次。加入1:250稀释的辣根过氧化物酶标记兔抗M₁₃抗体,37 °C反应1 h,充分洗涤后用邻苯二胺显色。凡A₄₉₀吸光度值大于3倍阴性对照者为阳性噬菌体原种。

1.2.3 抗体竞争试验 将50 μL从“1.2.2”中获得的阳性噬菌体原种与BAC₅单抗50 μL(100 mg/L)混合放置37 °C,1 h后,分别加到依“1.2.1”法包被了BAC₅单抗的微孔中(实验孔)。每个实验孔均设置以稀释液代替外源BAC₅单抗的对照孔。依“1.2.2”法进行ELISA测定,计算每个噬菌体原种在加入BAC₅单抗后的抑制率。

1.2.4 BAC₅单抗对M₁₃噬菌体的ELISA反应 选出从“1.2.3”中获得的抑制率接近/高于50%的噬菌体以及VCSM₁₃、RPLM₁₃噬菌体分别作为抗原,调节噬菌体密度为 10^9 pfu/μL。各用50 μL包被微孔,每种噬菌体包被3个复孔,用体积分数为3%BSA-PBS封闭后,每孔加入50 μL BAC₅单抗(100 mg/L),以小鼠抗M₁₃血清(1:1 000)为阳性对照。用辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG作为二抗,依“1.2.2”法进行ELISA测定。取3个复孔的均值代表每株噬菌体的光吸收值(A₄₉₀),观察BAC₅单抗对不同来源的噬菌体的反应。

2 结 果

2.1 M₁₃噬菌体随机肽库的淘洗

表1显示3次淘洗的结果,洗出的噬菌体及其相对产率依次递增。

表1 噬菌体随机多肽文库的淘洗

Table 1 The phages eluted from RPL¹⁾ by biopanning

Biopanning	Phages added (pfu)	Phages eluted (pfu)	Yield ²⁾ (%)
First	4.0×10^{10}	1.5×10^3	3.7×10^8
Second	1.2×10^{10}	4.2×10^6	3.5×10^4
Third	5.4×10^{10}	1.8×10^9	3.3×10^2

1) RPL: Random Peptide Libraries; 2) Yield (%) = (pfu of phages eluted / pfu of phages added) × 100%

2.2 噬菌体原种的 ELISA 检测及抗体竞争试验

从第3次淘洗后铺制的平板中取出45个克隆(噬斑)进行ELISA测定,其中有阳性克隆35个占77%。经抗体竞争试验检测,其中8个能与外源BAC₅单抗有不同程度结合,即加入外源BAC₅单抗后,这8个克隆的噬菌体可以显示出对ELISA反应有不同程度的“抑制”作用,见表2。其中以来自C2、C17、C29克隆的噬菌体与外源BAC₅ McAb的结合率(对ELISA反应的抑制率)最高,分别为71.6%、49.4%和64.0%。

表2 BAC₅ 单抗对阳性噬菌体 ELISA 反应的竞争Table 2 Competition of positive phages between coated and added BAC₅ McAb¹⁾ by ELISA

Eluted Positive Phages	Value of A_{490} (\bar{x})		Inhibition rate ²⁾ (%)
	Before competition (coated BAC ₅ McAb)	After competition (added BAC ₅ McAb)	
C2	1.130	0.321	71.6
C12	0.827	0.484	41.5
C15	0.895	0.534	40.3
C17	1.066	0.539	49.4
C25	0.773	0.466	39.7
C28	0.713	0.418	32.5
C29	0.951	0.342	64.0
C32	0.756	0.423	44.0

1) BAC₅ McAb: A kind of monoclonal antibody located on the poorly or undifferentiated squamous carcinoma cells; 2) Inhibition rate: [(Value of A_{490} before the Competition - Value of A_{490} after the competition) / Value of A_{490} before the Competition] × 100%

2.3 BAC₅ 单抗对噬菌体的 ELISA 反应

鼠抗 M₁₃ 血清对所有的噬菌体都有阳性反应,而 BAC₅ 单抗只对来自 C2、C17、C29 的噬菌体才有阳性反应,对 VCSM₁₃、RPLM₁₃ 为阴性反应。阳性与阴性反应

光吸收值 (A_{490}) 之比 (P/N) 大于 2.1。见表 3。

表3 BAC₅ 单抗对 M₁₃ 噬菌体的 ELISA 反应Table 3 Reaction of BAC₅ McAb to M₁₃ phages by Elisa

M ₁₃ Phages ¹⁾ (5×10^{10} pfu/well)	Value of A_{490} (X)	
	BAC ₅ McAb 100 mg/L	Mouse Sera to RPL M ₁₃ (1:1000)
C2	0.321	0.581
C17	0.295	0.501
C29	0.205	0.571
VCSM ₁₃	0.089	0.316
RPLM ₁₃	0.089	0.636

1) C2, C17, C29: Positive M₁₃ phages clone eluted by biopanning; VCSM₁₃: Helper M₁₃ phages strain; RPLM₁₃: M₁₃ phages from Random Peptide Library

3 讨论

利用随机多肽文库技术进行抗原表位分析的关键是要从文库中筛选到能与特定抗体相结合的噬菌体克隆。本实验经过3轮淘洗后,最末1轮收获的噬菌体百分比(3.3×10^{-2})比初次淘洗得到的百分比(3.75×10^{-8})高出 10^6 。提示经淘洗→扩增→淘洗3次后,能被BAC₅单抗俘获的噬菌体已得到极大的富集。将最后1轮淘洗后得到的噬菌体感染宿主菌后接种琼脂获得噬斑,经BAC₅抗体捕获方法证实其阳性率达到77%(35/45),进一步支持了淘洗的效果。

由于缺少BAC₅相关的抗原,我们对来自35个阳性克隆的噬菌体进行抗体俘获竞争试验。即在ELISA测定系统中加入外源BAC₅单抗与包被在酶标板上的BAC₅竞争特异性噬菌体。35个阳性克隆中只有来自8个克隆的噬菌体能与外源BAC₅单抗结合影响ELISA测定结果,呈现出程度不等的“抑制”作用。其中来自C2、C17和C29号克隆的M₁₃噬菌体所显示的抑制率较高,分别为71.6%、49.4%、64.0%。导致大部份阳性克隆(27/35)的噬菌体不与外源BAC₅相结合的可能原因是①抗体本身:包被在酶标板上的BAC₅单抗与液相中用以竞争噬菌体的外源BAC₅单抗可能在构型上产生差异。由于淘洗过程是以固相的BAC₅单抗作为靶抗体,所以大部分的噬菌体更适应于与包被在板上的

(下转第201页)

T 细胞(CTL)攻击的靶抗原。核心蛋白诱导的细胞免疫对清除病毒感染的细胞以及病理损伤方面均具有重要作用。

pDNA3 是含 CMV 启动子的高水平真核表达质粒载体,与其他真核表达载体(如 pAp031)比较,由于 pDNA3 上所含有氨苄青霉素抗性基因包含一个短免疫刺激 DNA 序列而有利于 DNA 免疫后体液和细胞免疫应答的产生^[1]。对 HBV S 基因的 DNA 免疫研究提示,以 pDNA3 为载体的 S 区 DNA 免疫所诱导的抗体转化率高于其他载体^[2]。pDNA3-HBVc 重组体的构建成功,为探讨 HBV C 基因的 DNA 免疫研究,选择优势载体及进行与 C 基因相关的免疫病理机制研究提供了物质基础。

参考文献:

- [1] Geissler M, Tokushige K, Wands J. Polynucleotide based immunization: study of the cellular and humoral immune response to hepatitis B virus(abstr)[J]. *Hepatology*, 1995, 22(4): 324A.
- [2] Geissler M, Tokushige K, Chante C G *et al*. Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural pro-

teins in mice after DNA-based immunization[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(4): 1307.

- [3] Chisari F V, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis [J]. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 29.
- [4] Rehmann B, Chang K M, McHutchinson J, *et al*. Differential cytotoxic T lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C chronically infected patients [J]. *J Virol*, 1996, 70(10): 7092.
- [5] Tsai S L, Chen P J, Lai M Y, *et al*. Acute exacerbation of chronic type B hepatitis are accompanied by increased T cell responses to hepatitis B core and e antigens. Implication for hepatitis B e antigen seroconversion [J]. *J Clin Invest*, 1992, 89(1): 87.
- [6] Ono Y, Onda H, Sasada R, *et al*. The complete nucleotide sequences of the cloned hepatitis B virus DNA; subtype adr and adw [J]. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11(6): 1747.
- [7] Sato Y, Roman M, Tighhe H, *et al*. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization [J]. *Science*, 1996, 273(5273): 352.

(编辑 关淡庄)

(上接第 167 页)

BAC₅ 单抗结合;②噬菌体间的差异:来自不同克隆的噬菌体,由于递呈的氨基酸序列不一样,其表面多肽所形成的构象之间会有差异,因此与液相中外源 BAC₅ 单抗的亲合力也会有差别。如果大部分噬菌体与包被在板上的 BAC₅ 单抗的亲合力比较高,则不容易受外加抗体的影响。因此,大部分的噬菌体克隆在加入外源 BAC₅ 单抗后也就不显示出对原有 ELISA 结果的“抑制”。

BAC₅ 单抗只与 C2、C17 和 C29 的 M₁₃ 噬菌体有阳性反应,对 VC_{SM}₁₃ 和 RPLM₁₃ 呈阴性反应,阳性与阴性反应的光吸收值(A₄₉₀)之比大于 2.1。导致这一特异性识别的原因是因为 VC_{SM}₁ 是辅助性噬菌体,不存在外源随机多肽的 DNA 序列,因此表面蛋白构象没有特异性改变,不被 BAC₅ 所识别。虽然 RPLM₁₃ 噬菌体重组了外来随机多肽的 DNA 序列,但未进行淘洗,含特异序列的噬菌体的比例必定大大地低于经过 BAC₅ 单抗反复淘洗后所获得的 C2、C17 和 C29 克隆,因此 RPLM₁₃ 也呈现阴性反应。

通过 3 次淘洗和 ELISA 选择后所获得的,来自 C2、C17 和 C29 克隆的噬菌体不仅能被酶标板上的 BAC₅ 单抗所俘获,还能与液相中的 BAC₅ 单抗相结

合。从它们有别于来自 VC_{SM}₁₃ 和 RPLM₁₃ 的噬菌体的特点推测,这 3 个克隆的噬菌体表面可能具有相似的,能被 BAC₅ 单抗所识别的抗原表位。至于它们之间所递呈的外源肽段是否具有相同的氨基酸序列,其中哪一个能作为免疫原诱导实验动物产生相应的可定位于低分化/未分化癌细胞表面的抗体,还有待进一步研究。

(北京军事医学科学院微生物与流行病学研究所王海涛教授、杜勇博士对本工作给予了热情的指导和帮助,特此致谢)

参考文献:

- [1] 肖锡宾,张昌卿,刘长征,等. BAC₅ 单抗的制备及其在鼻咽癌细胞上的反应 [J]. *中山医科大学学报*, 1996, 17(1): 75.
- [2] 刘北一,富宁. 噬菌体表位文库在免疫学中的应用 [J]. *国外医学免疫学分册*, 1997, 20(5): 252.
- [3] 杜勇,王海涛. 应用噬菌体随机肽库研究丙型肝炎病毒核心蛋白 B 细胞抗原表位 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19(1): 4.

(编辑 黄小延)