

· 实验研究 ·

# 人噬菌体抗体库的构建及人源性 IL-17 单链抗体的筛选

钮敏红<sup>1</sup>, 闫晓霏<sup>1</sup>, 吕卫东<sup>1</sup>, 万晓春<sup>2</sup>

1. 深圳大学第一附属医院 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035;

2. 中国科学院深圳先进技术研究院抗体药物研究中心, 广东 深圳 518035

**摘要:** **目的** 通过噬菌体展示技术构建人源单链抗体库, 筛选抗 IL-17 的特异性抗体并鉴定。 **方法** 通过采集 35 位类风湿关节炎患者的外周血淋巴细胞, 提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, PCR 扩增人 H 链和 L 链可变区抗体基因。利用 SOE-PCR 法将 VH 和 VL 片段拼接成 ScFv 片段并插入噬菌体载体 pCANTAB5E 中, 构建人源噬菌体单链抗体库。通过固相化的抗原对抗体库进行 3 轮筛选后, 挑取单克隆进行 phage-ELISA 鉴定, 筛选与抗原具有较强结合性的噬菌体克隆。 **结果** 成功构建库容为  $3.5 \times 10^8$  的噬菌体抗体库, 从中筛选到 5 株阳性克隆, ELISA 证实其对抗原 IL-17 具有较强的结合性及中和活性。 **结论** 成功构建了人源噬菌体单链抗体库, 从中获得具有抗 IL-17 的人源 ScFv 抗体片段, 为进一步的研究和应用提供实验基础。

**关键词:** 白细胞介素-17; 噬菌体展示抗体库; 单链抗体; 类风湿关节炎

**中图分类号:** Q 813 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)05-0687-04

人白细胞介素-17 (IL-17) 是一种很强的促炎症细胞因子, 可以通过增强促炎细胞因子释放来放大炎症反应, 其在自身免疫病等疾病病理过程中的作用已引起了医学界广泛的关注, 在鼠模型及人类患者的研究中都表明 IL-17 在类风湿关节炎发病机制中有重要作用, 在类风湿关节炎小鼠模型中, 利用抗体中和 IL-17 后, 可以明显的降低软骨、骨组织以及关节的损坏, 另外治疗后 IL-6 水平也明显下降<sup>[1]</sup>。目前 TNF- $\alpha$  拮抗剂是治疗类风湿关节炎的有效手段之一, 但是其 ACR50 缓解率仍低于 50%, 在部分患者中, TNF- $\alpha$  拮抗剂疗效欠佳且不良事件发生率较高<sup>[2]</sup>, 并且研究提示抗 TNF- $\alpha$  很可能是通过影响 IL-17 的产生而达到治疗疾病的目的<sup>[3-4]</sup>。因此, 采用 IL-17 的中和性抗体治疗具有很好的临床应用前景。

本文以 IL-17 为靶标构建大容量人源 Fab 噬菌体抗体库, 并从中筛选出特异性抗 IL-17 的 ScFv 抗体片段, 人源性抗 IL-17 抗体的研究将会对自身免疫病、移植排斥等疾病的治疗产生深远的影响<sup>[5-6]</sup>。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 噬菌体载体 pCANTAB5E、辅助噬菌体 M13K07、大肠杆菌 TG1、抗 M13 单克隆抗体为 Amer-sham 公司产品。RT-PCR 试剂盒、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公

司。质粒小量抽提试剂盒、DNA 回收试剂盒、PCR 回收试剂盒购自 Axygen 公司。淋巴细胞分离液购自 AXIS-SHIELD 公司。IL-17 蛋白及 IL-17 检测试剂盒购自 R&D 公司。所用引物在 Life Technologies 公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 研究对象** 35 例类风湿关节炎患者 (RA 组) 外周血及 20 例健康体检者 (对照组) 血清来自深圳市第二人民医院, 所收集的病例组均符合美国风湿病学会 RA 诊断标准, 同时排除糖尿病、高血压、慢性系统性疾病及其他自身免疫性疾病。

**1.2.2 IL-17 表达水平的测定** 收集的抗凝血液样本经离心分装后取少量利用双抗夹心法 (ELISA) 测定 IL-17 的含量, 实验过程参照试剂盒提供的步骤完成, 其余血清置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

**1.2.3 淋巴细胞总 RNA 的抽提及轻重链基因的 PCR 扩增** 利用淋巴细胞分离液从采集的 35 位类风湿关节炎患者血液中分离出淋巴细胞, 用 Trizol 试剂提取淋巴细胞总 RNA, 以纯化的 RNA 为模板用 Oligo (dT) 为引物逆转录合成第一链 cDNA。依据人抗体序列的轻重链框架区设计引物序列组合<sup>[7]</sup>, 进行 PCR 扩增抗体 VH、 $\lambda$  和  $\kappa$  片段编码区。PCR 的反应条件为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后回收备用。具体方法按说明书进行。

**1.2.4 全人源抗 IL-17 ScFv 抗体库的构建** 以纯化的 VH 和 VL 为模板, 经重叠 PCR 后合成 ScFv 片段,

ScFv 采用的 Linker 为 (Gly4Ser)<sub>3</sub>, 最终形成 VL-(GGGGS)<sub>3</sub>-VH 的基因片段, 并分别在 VL 基因 5' 端及 VH 基因的 3' 端引入 Sfi I 和 Not I 酶切位点。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用纯化试剂盒回收备用。

**1.2.5 ScFv 噬菌体抗体库的构建** ScFv 基因及 pCANTAB5E 载体质粒分别用 SfiI 和 NotI 酶切, 酶切产物分别经胶回收后进行连接反应。连接物电转化 TG1 感受态细胞, 电转产物加入 2YT 培养基后于 37 °C 振荡培养 1 h, 取 100 μl 培养产物经 10 倍稀释后铺于 2YT 培养板, 37 °C 培养过夜, 依据细菌克隆数测定库容及转化效率。剩余培养产物全部接入 2YT-AG 液体培养基中, 37 °C 培养至对数生长期, 按照感染复数加入辅助噬菌体 M13K07, 37 °C 浸染 1 h。离心弃上清, 接入 1 L 新 2YT-AGK 液体培养基中, 30 °C 培养过夜。次日离心菌体收集上清, 从上清中用 PEG/NaCl 溶液沉淀噬菌体, 加入甘油保存于 -80 °C, 同时测定抗体库的滴度。

**1.2.6 噬菌体抗体库的富集筛选及鉴定** 抗体库采用固相筛选法进行筛选<sup>[8]</sup>, 以人源 IL-17 为抗原, 用 50 mmol/L 碳酸氢钠缓冲液 (pH 值 10.0) 稀释后包被酶联免疫吸附板, 每孔 100 μl 于 4 °C 过夜放置, 次日用 PBS/5% 牛奶封闭 1 h 后加入投入噬菌体库, 37 °C 孵育 2 h, 经 PBS/0.05% Tween (PBST) 洗 6 次后每孔加入 200 μl 洗脱缓冲液 (0.2 mmol/L HCl-Gly, pH 值 2.2) 洗脱结合的噬菌体, 再用 2 mol/L Tris-HCl 中和, 并测定噬菌体滴度, 扩增噬菌体进行下一轮筛选。按照“吸附-洗脱-扩增”的方式共进行 3 轮淘洗, 后 2 轮筛选逐步减少抗原包被量, 以使特异性噬菌体高度富集。

**1.2.7 单克隆噬菌体抗体的鉴定** 将筛选获得的阳性克隆分别接种于含 100 mg/L Amp 的 2YT 培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD<sub>600 nm</sub> = 0.3 ~ 0.4, 加入辅助噬菌体, 37 °C 浸染 0.5 h; 离心弃上清, 重悬于 2YT-AK 培养基中, 37 °C 培养过夜。次日离心菌体收集上清, 从上清中用 PEG/NaCl 溶液沉淀噬菌体。包被人 IL-17 100 ng/孔, 对富集的各个噬菌体克隆采用 ELISA 方法进行特异性鉴定, 加入噬菌体抗体颗粒, 37 °C 反应 2 h, PBST 洗涤 5 次后, 加入 HRP 标记的鼠抗 M13 抗体, 37 °C 反应 1 h, PBST 洗涤后, 加入显色底物, 终止后测定吸光值。

**1.2.8 ScFv 抗体的表达和纯化** 选取特异结合活性较好的单克隆 ScFv, PCR 扩增筛选到的 ScFv 并构建至原核表达载体 PET-28a 中, 转化大肠杆菌 BL21 进行可溶性表达, 37 °C 培养至 OD<sub>600</sub> ≈ 0.6 时加入

0.5 mmol/L IPTG, 30 °C 诱导培养过夜。次日离心菌液, 弃上清, 采用渗透压冲击法获得可溶性的 ScFv, 经镍柱纯化后获得 ScFv, SDS-PAGE 鉴定纯化结果。

**1.2.9 可溶性 ScFv 的 ELISA 鉴定** IL-17 包被 ELISA 板, 100 ng/孔, 4 °C 包被过夜, 37 °C 封闭 1 h, PBS-T 洗涤 3 次后加入系列稀释的 ScFv, 37 °C 孵育 1 h, 用 PBS-T 洗涤 3 次, 加 HRP 标记的抗 His-tag 抗体孵育 30 min。PBST 洗涤后, 加入显色底物, 终止后测定吸光值。

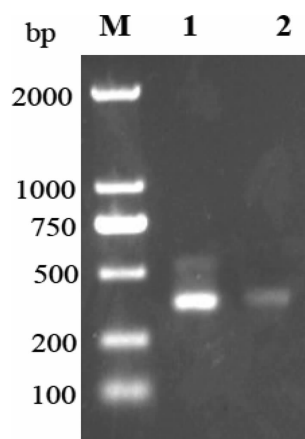
**1.3 统计学方法** 所测数据用 SPSS 17.0 软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本间比较用独立样本 *t* 检验; 组间比较采用  $\chi^2$  检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 RA 组与对照组的血清 IL-17 水平测定结果比较** ELISA 结果显示 RA 组血清 IL-17 水平为 (47.29 ± 4.21) pg/ml 与正常对照组 (16.33 ± 3.05) pg/ml 相比差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

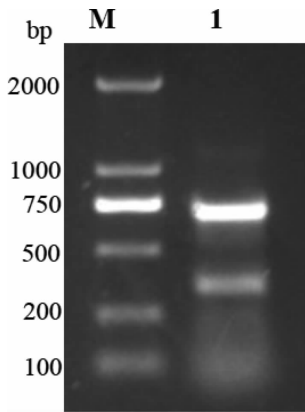
**2.2 VH 链、VL 链的 PCR 扩增及 ScFv 组装** 以逆转录合成的 cDNA 为模板, 通过 PCR 分别扩增出全套的轻重链可变区基因 VL 和 VH 基因, 其片段大小约 350 bp, 电泳结果如 (图 1) 所示。经重叠 PCR 后合成 ScFv 片段, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示其电泳条带约为 750 bp (图 2), 结果与预期值相符。

**2.3 ScFv 噬菌体抗体库的构建** 用 SfiI 和 NotI 分别酶切 ScFv 基因及 pCANTAB5E, 酶切产物分别经胶回收后进行连接反应, 连接产物经 4 次电转化后构建 ScFv 抗体库。依据转化产物的克隆数确定库容大小为  $3.5 \times 10^8$ 。收集含噬菌体抗体的上清经沉淀后获得噬菌体抗体库。



注: M: DL2000 marker; 1: VH PCR 产物; 2: VL PCR 产物

图 1 VH 和 VL 基因的扩增



注: M: DL2000 marker; 1: ScFv PCR 产物

图 2 重叠延伸 PCR 组装 ScFv

表 1 抗 IL-17 ScFv 的筛选

筛选次数	投入噬菌体 (pfu)	产出噬菌体 (pfu)	产出/投入
1	$3.2 \times 10^{11}$	$6.1 \times 10^4$	$1.9 \times 10^{-7}$
2	$3.5 \times 10^{11}$	$7.8 \times 10^5$	$2.2 \times 10^{-6}$
3	$6.5 \times 10^{10}$	$1.3 \times 10^6$	$2.0 \times 10^{-5}$

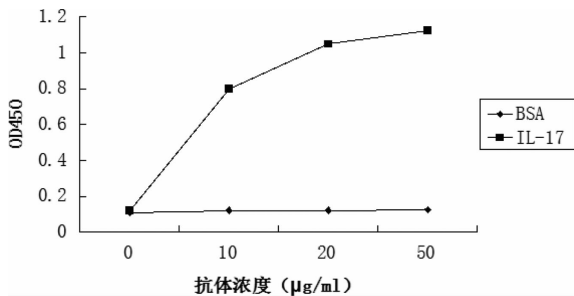


图 3 抗 IL-17 ScFv 的 ELISA 检验

2.4 IL-17 特异性噬菌体的筛选 以 IL-17 为抗原,按照“吸附-洗脱-扩增”的方式共进行 3 轮富集筛选,后 2 轮筛选逐步减少抗原包被量,并且逐步增大去污剂 Tween 的浓度 (0.1%, 0.3%, 0.5%),以使特异性噬菌体高度富集。通过淘洗后 IL-17 对噬菌体抗体库富集了  $10^5$  倍,已经成功的富集了与 IL-17 具有高亲和性的噬菌体(表 1)。经 3 轮筛选后随机挑选 96 个噬菌体克隆进行扩增,ELISA 检测其与 IL-17 的结合活性。共筛选到 5 个亲和力较高的噬菌体克隆。挑选特异性最好的阳性克隆进行测序鉴定,结果显示其插入了完整的 ScFv 链。

2.5 抗 IL-17 抗体 ScFv 的表达及结合性分析 利用 BL21 细菌可溶性表达活性最好的 ScFv 抗体,经镍柱纯化后通过 SDS-PAGE 鉴定纯化效果。ELISA 法进一步验证该抗体的特异性,分析结果显示经筛选得到的 ScFv 能够特异性的结合 IL-17 抗原,并呈浓度依赖性(图 3)。

### 3 讨论

噬菌体抗体库技术通过模拟体内抗体的生成过

程,经体外筛选获得特异性的人源抗体分子,为基因工程抗体的研究带来了极大的便利<sup>[9]</sup>。通过建立具有足够库容的人源噬菌体抗体库,就可以有效获得各种人源抗体,抗体库的库容越大获得高亲和力、高特异性抗体的几率就也高,该技术克服了人源抗体来源的困难,已获得了广泛的应用。

本研究收集 35 位类风湿关节炎患者的外周血淋巴细胞,保障了抗体基因的特异性,为成功获得特异性的 IL-17 抗体提供了基本的保证。从抗体库中获得高亲和力的特异性抗体关键在于抗体库中抗体基因的多样性及数量,从 1010 的天然抗体库中往往无需进行抗体亲和力成熟就能获得高亲和力的抗体<sup>[10]</sup>。本研究所获得抗体库的库容虽然只有  $3.5 \times 10^8$ ,但是所获得的淋巴细胞来自 IL-17 高表达的类风湿关节炎患者,抗体基因已在体内经过重排及亲和力成熟,以此构建的噬菌体抗体库目的性更强,较易获得高亲和力的特异性抗体。

IL-17 在自身免疫病等疾病的病理过程中的作用已引起了医学界广泛的关注,人源性抗 IL-17 抗体的研究将会对自身免疫病、移植排斥等疾病的治疗产生深远的影响<sup>[11-12]</sup>。目前,抗 IL-17 抗体已经生产并进入临床实验,用于治疗类风湿关节炎、银屑病关节炎等疾病<sup>[13-14]</sup>。本研究以 IL-17 为抗原,对所构建的 ScFv 噬菌体抗体库按照“吸附-洗脱-扩增”的方式共进行 3 轮富集筛选,共筛选到 5 株亲和力较高的噬菌体克隆,利用 BL21 细菌中可溶性表达其中活性最好的 ScFv 抗体,经 ELISA 分析表明所获得的 ScFv 抗体与 IL-17 有特异的结合活性及中和活性。

综上所述,本研究初步建立了一个库容为  $3.5 \times 10^8$  的单链噬菌体抗体库,并从所构建的噬菌体抗体库中成功筛选到了抗 IL-17 的单链抗体,为进一步的研究和应用提供了实验基础。

### 参考文献

- [1] Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin - 17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(2): 650 - 659.
- [2] Rubbert-Roth A, Finckh A. Treatment options in patients with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review [J]. Arthritis Res Ther, 2009, Suppl 1: S1.
- [3] Yue C, You X, Zhao L, et al. The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients[J]. Rheumatol Int, 2010, 30(12): 1553 - 1557.
- [4] Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, et al. Amelioration of epidermal

hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses[J]. J Exp Med, 2007, 204(13): 3183-3194.

- [5] Garber K. Anti-IL-17 mAbs herald new options in psoriasis[J]. Nat Biotechnol, 2012, 30(6): 475-477.
- [6] Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential[J]. Clin Sci (Lond), 2012, 122(11): 487-511.
- [7] 沈倍奋, 陈志南, 刘民培. 重组抗体[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 45-46.
- [8] Zhao Q, Wong PF, Lee SS, et al. Generation of anti-idiotypic scFv for pharmacokinetic measurement in lymphoma patients treated with chimeric anti-CD22 antibody SM03[J]. PLoS One, 2014, 9(5): 96697.
- [9] Tohidkia MR, Barar J, Asadi F, et al. Molecular considerations for development of phage antibody libraries[J]. J Drug Target, 2012, 20

(3): 195-208.

- [10] 董志伟, 王琰. 抗体工程[M]. 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2002: 45-46.
- [11] Yue C, You X, Zhao L, et al. The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients[J]. Rheumatol Int, 2010, 30(12): 1553-1557.
- [12] 曹雪涛. 免疫学前沿进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 480-485.
- [13] Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases[J]. Microbes Infect, 2009, 11(5): 625-630.
- [14] Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumor immunity and immunotherapy[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(4): 248-256.

收稿日期: 2016-02-03 编辑: 王国品

· 实验研究 ·

## 氨氯地平对高血压模型大鼠血管内皮功能、CGRP、Ang II、血压及心率的影响

肖洒, 胡艳丽, 翟莉

武警北京总队第二医院内一科, 北京 100037

**摘要:** **目的** 探讨氨氯地平片对高血压模型大鼠血管内皮功能、降钙素基因相关肽(CGRP)、血管紧张素 II(Ang II)、血压及心率的影响。**方法** 选取 Wistar 大鼠 50 只随机分为 5 组, 分别为正常对照组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组各 10 只。模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组采用双肾-夹法手术方法造模。正常对照组给予相同剂量生理盐水灌胃, 模型组给予 3% 羧甲基纤维素以  $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃, 低剂量组给予氨氯地平片  $0.625 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃, 中剂量组给予氨氯地平片  $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃, 高剂量组给予氨氯地平片  $2.50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃。各组均连续灌胃 4 周。比较各组大鼠血清一氧化氮(NO)、内皮素(ET)、CGRP、Ang II 及血压和心率变化。**结果** 与正常组比较, 模型组、低剂量组、中剂量组血清 NO 水平均明显下降( $P$  均  $< 0.05$ ), 血清 ET 水平均明显上升( $P$  均  $< 0.05$ ); 而高剂量组与正常组比较血清 NO 和 ET 均无明显变化( $P$  均  $> 0.05$ ); 与模型组比较, 各剂量组血清 NO 水平均明显上升( $P$  均  $< 0.05$ ), 而血清 ET 水平均明显下降( $P$  均  $< 0.05$ ), 呈剂量依赖性; 与正常组比较, 模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组血清 CGRP 水平均明显下降( $P$  均  $< 0.05$ ), 血清 Ang II 水平均明显上升( $P$  均  $< 0.05$ ); 与模型组比较, 各剂量组血清 CGRP 水平均明显上升( $P$  均  $< 0.05$ ), 而血清 Ang II 水平均明显下降( $P$  均  $< 0.05$ ), 呈剂量依赖性; 与正常组比较, 模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组血压和心率均明显下降( $P$  均  $< 0.05$ ); 与模型组比较, 各剂量组血压和心率均明显上升( $P$  均  $< 0.05$ ), 呈剂量依赖性。**结论** 氨氯地平可降低高血压大鼠血清 ET 和 Ang II 水平, 增加血清 NO、CGRP 水平, 且呈剂量依赖性, 可较好地控制高血压大鼠血压和心率。

**关键词:** 氨氯地平片; 高血压模型; 血管内皮功能; 降钙素基因相关肽; 血管紧张素 II; 血压; 心率

**中图分类号:** R-33 R 544 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)05-0690-03

高血压是常见的一种临床疾病, 流行病学调查研究发现该病发病率呈上升趋势, 严重影响了人们的生活质量和身心健康<sup>[1]</sup>。高血压发病原因较多, 研究报

道表明高血压主要是由多个环境因素以及多基因遗传相互作用的结果<sup>[2]</sup>。目前, 关于高血压的具体发病机制尚未完全阐明。近年来, 为能够更好的了解高血压的相关病理机制, 高血压动物模型成为了重要研究手段<sup>[3-5]</sup>。故而本研究旨在分析氨氯地平片对高血压模型大鼠血管内皮功能、降钙素基因相关肽