

[文章编号] 1007-385X(2005)03-0222-03

噬菌体抗体库筛选方法的研究进展

张青 综述; 郝晓柯, 苏明权 审阅 (第四军医大学西京医院检验科临床分子生物学实验室, 西安 710032)

[摘要] 建立高效的筛选方法是噬菌体抗体库技术实际应用的主要瓶颈。人们对传统抗体库筛选方法(固相和液相淘筛法)所涉及的抗原表位构象及筛选通量问题做了相应改进,并针对一些天然抗原难以体外制备、或为降低筛选的非特异性、或为达到规模化筛选目的而发展了一些新型的筛选方法(细胞淘筛法、组织或体内淘筛法、选择感染法和自动化淘筛法),同时对影响筛选效率的主要条件参数(封闭与洗脱条件,筛选轮数与严紧度)进行了优化研究。这些研究必将加速抗体库技术快速规模化制备抗体的普及实现。

[关键词] 噬菌体抗体; 筛选方法; 抗体工程

[中图分类号] R392 **[文献标识码]** A

噬菌体抗体库技术是抗体工程近十年来最突出的进展之一。由于它既能在体外较好的模拟体内抗体的生成过程(即多样性的B细胞群体、克隆选择和亲和力成熟),又摒弃了传统杂交瘤技术及转基因鼠技术的繁杂,因此被公认为是目前抗体制备的高效技术平台^[1-2]。然而,要利用噬菌体抗体库技术快速得到理想抗体,一般受抗体库的容量、多样性、筛选方法及条件参数4种因素的影响^[3]。为此,近年来人们根据筛选目的和要求的不同,对传统的筛选方法做了改进并建立了一些新型筛选方法和优化的筛选条件参数。

1 传统筛选方法的改进

1.1 固相淘筛法

这是最常用也是最简单的筛选方法。一般是将纯化的抗原包被酶标板或免疫试管等固相介质上或将其交联制备成亲和层析柱来进行筛选。显然后者的筛选通量要远远大于前者。值得注意的是,选择任何固定方法都必须考虑到被固定抗原的构象完整性,因为有时抗原固定后有些表位易发生改变,使筛选出的抗体难以识别天然形式的抗原。这可利用已有的另一个针对该靶抗原的抗体通过间接包被法来解决。而对于淘筛不纯的抗原分子

(如融合蛋白),或需要淘筛不同表位的新抗体时,可通过在封闭液中加入过量的针对无关融合蛋白或无关表位的抗体或其它结合分子预先进行饱和封闭来实现特异性淘筛^[4-5]。

1.2 液相淘筛法

液相淘筛法多采用将抗原标记生物素后在液相中利用链亲和素磁珠借助磁场作用进行。该方法可以克服固相介质包被抗原时引起的构象改变问题,但同时抗链亲和素的噬菌体抗体也易被分离到。这可通过先用链亲和素包被的磁珠预先消除抗体库中抗链亲和素的抗体来解决^[6]。液相淘筛法的优点:筛选效率高,增加了噬菌体颗粒与抗原广泛接触的机率,能够把拷贝数较少或亲和力较低的抗体克隆从库中有效分离出来;可根据抗体库的库容、抗原相对分子质量及纯度等对筛选体系进行灵活调整;可以在一定程度上预先确定所期望筛到抗体的亲和力。液相淘筛法的缺点是筛选体系相对较为复杂,有些抗原标记后表位易改变^[7]。

[基金项目] 国家863计划资助项目(2001AA215321)十五重大科技专项(2002AA2Z3109)

[6] Harrington JR. SODD-silencer of death domains[J]. *Stem Cells*, 2000, 18(5): 388-389.

[7] Endres R, Hacker G, Brosch I, *et al*. Apparently normal tumor necrosis factor receptor 1 signaling in the absence of silencer of death domains[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(18): 6609-6617.

[8] Zhang L, Shimizu S, Tsujimoto Y. Two distinct Fas-activated signaling pathways revealed by an anti-tumor drug[J]. *Oncogene*, 2005, 24(18): 2954-2962.

[9] Willis AE. All's well that ends well: Translational control and cell

death[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(6): 533.

[10] Eichholtz-wirth H, Fritz E, Wolz L. Over expression of the "silencer of death domain", SODD/BAG-4, modulates both TNFR1- and CD95-dependent cell death pathways[J]. *Cancer Lett*, 2003, 194(1): 81-89.

[收稿日期] 2004-10-30

[修回日期] 2005-05-10

[本文编辑] 王莹

2 新发展的筛选方法

传统的淘筛法操作简单易行,但不足之处是必须有已知的纯化抗原且筛选过程消耗的抗原量较多,有时筛选出的抗体易出现非特异性结合,对于筛选高亲和力抗体的实际效果欠佳。围绕这些问题,近年来发展了一些新型的筛选方法。

2.1 细胞淘筛法

应用单层生长、或黏附、或悬浮的完整细胞对噬菌体抗体库进行直接淘筛,可筛选到细胞表面特定的标志物(抗原蛋白)的特异性抗体^[8]。一般而言,这种方法特别适用于针对难以表达或纯化的膜抗原筛选。理论上讲,先用正常或对照细胞吸附非特异性抗体,再用靶细胞对抗体库进行亲和筛选是可行的。这样不仅可省去了纯化抗原的繁琐操作,而且有利于保持靶抗原的天然构象。但由于细胞表面特定抗原的密度较低,在选择中靶抗原浓度有可能低于抗体库中任意抗体的亲和力常数。即便当抗原浓度足以满足任意抗体的结合和挽救,细胞表面其它蛋白或大量糖链分子所引起的空间位阻也会阻碍特异性噬菌体抗体的富集。尽管如此,基于不同类型细胞的消减淘筛法(先阴性选择,后阳性选择),或基于靶细胞流式或磁珠分离的共选择淘筛法(阴性和阳性选择同时进行),在分离针对细胞表面上公认肿瘤特异抗原的抗体方面也有成功的报道^[9-10]。另外,近年有报道利用有些抗体与细胞表面抗原结合后形成的复合物能被高效内化的特点,通过洗脱后裂解靶细胞可筛选到细胞内化型抗体^[11-12]。由于筛选到的必定是针对膜抗原的内化型抗体,这对于肿瘤的靶向治疗(如应用免疫脂质体)非常重要。

2.2 组织或体内淘筛法

针对一些在体内生理环境中存在的复杂蛋白,或难以在体外进行表达的某些抗原蛋白,体内筛选方法极大增加了从抗体库中筛选出其特异性抗体的机会^[13]。该方法是将低剂量放射标记的噬菌体抗体库直接静脉注入到动物体内,然后收集动物体内的靶器官或组织,用低PH值的甘氨酸洗脱特异结合的噬菌体,并感染大肠杆菌后进行可溶性表达,表达产物与相应的靶器官组织切片再进行免疫检测,以获得具有实际亲和性的特异抗体。体内筛选的方法一般适用于分离组织(如肿瘤内皮细胞)特异性标志物的抗体。体内淘筛法有如下几个优点:可分离到选择性聚集在人们感兴趣的“完整”天然构象靶分子上的噬菌体抗体;存在一种内在的封闭步骤,即非特异结合的噬菌体抗体被广泛存在的血浆及正常细胞表面的蛋白所清除;某些分离到的噬菌体抗体可用于新受体的功能分析(如其可与表达在特定组织中的血管内皮受体特异性结合)而用于鉴定新的药靶分子^[12]。

2.3 选择感染法

传统筛选方法中,基因重组噬菌体中会有野生型的pⅢ蛋白存在,因此重组噬菌体仍具有感染能力,这样在筛选后扩增时,特异性和非特异性的噬菌体均可进入宿主菌增殖。选择感染法将筛选和扩增合并为一步,只有特

异性的噬菌体才能感染宿主菌并扩增,而非特异性噬菌体则不能^[14]。这样不仅简化筛选步骤,而且大大提高了筛选效率。具体方法有两种:一是将噬菌体所有外壳PⅢ蛋白的N端用所展示的抗体片段取代,使其丧失感染能力,再将待筛选的靶抗原分子同PⅢ蛋白的N端相连作为筛选的探针。只有特异结合活性的噬菌体才能与融合靶抗原相结合,这样使特异性噬菌体重新具有了PⅢ蛋白的N端,从而恢复感染能力。二是将待筛选的抗原分子融合在大肠杆菌的F菌毛上,这样F菌毛失去了介导感染的能力,只有特异性的噬菌体抗体可与修饰了F菌毛结合,从而恢复F菌毛介导感染的能力,使特异性噬菌体进入细胞内繁殖。该方法非特异性本底较低,提高了筛选系统的灵敏性(可达10~1倍),适合于从大容量文库中筛选出特异的重组抗体,不足之处是系统建立较为复杂^[15]。

2.4 自动化淘筛

以上筛选方法大多针对单个靶抗原。对于近年来蛋白质组研究中需要快速规模化制备大量不同的抗体,上述筛选方法的抗体制备效率是远远不够的(这主要是由于有些蛋白难以原核表达而不能大规模提供筛选的靶抗原)。另外,与淘筛过程相比,对富集到克隆的选择鉴定过程仍是一项大量、繁杂和费时的的工作,当样品量增加或筛选靶标呈规模化时尤其如此。尽管现在还没有针对整个基因组表达产物的高通量筛选平台,但对于基于ELISA的传统选择鉴定过程,现已有一些基于膜或芯片的商业化设备可用于快速高通量的筛选^[16-17]。另外,结合规模化蛋白标签表达技术,针对大量不同抗原蛋白的抗体的高通量筛选现已成为可能^[18]。

3 筛选条件参数的优化

无论采用哪种筛选方法,没有最优化的筛选条件参数,在实际筛选过程中也难以达到高效的筛选效率。近年来国内外不同实验室主要对以下条件参数做了优化。

3.1 封闭与洗脱条件

抗体库被辅助噬菌体挽救后,实际上仅有部分噬菌体抗体可以被展示出来,且非特异性地结合在基质或抗原上是难以避免的。因此,选择合适的封闭液封闭非特异结合位点相当重要。常用的封闭试剂有脱脂奶粉、明胶、牛血清白蛋白及酪蛋白。这其中,封闭液中添加吐温20也能帮助减少非特异性噬菌体结合;在筛选抗体库过程中,洗脱条件依具体情况而定。最常用的洗脱方法是用酸性溶液(如HCl或甘氨酸缓冲液),或碱性溶液(如三乙胺)非特异地洗脱结合的噬菌体抗体。也可用过量的抗原或抗体以“竞争性筛选”的方式进行特异性洗脱。还可通过蛋白酶切割构建在抗体和g3p间的蛋白酶切割位点来提高洗脱的特异性,或用DTT破坏抗原与生物素间连接的二硫键来提高洗脱特异性。有时为避免酸性或碱性洗脱液对结合噬菌体的可能损伤,还可利用噬菌体与宿主菌间的亲和性用宿主菌进行直接洗脱,这样可把

洗脱与感染合而为一。

3.2 筛选的轮数与严紧度

噬菌体抗体库的筛选轮数受制于库容量及库中抗体基因的多样性。当抗体库的库容较小且多样性较差时,即使进行多轮筛选也较难得到理想的目的抗体。实际需要的筛选轮数常无法事先预测,因为具体筛选方法的实际富集效率与抗体库中目标抗体的相对亲和力对筛选所需轮数影响很大。库中抗体克隆间的亲和力相差越大,富集效率(即筛选前和筛选后结合噬菌体与非结合噬菌体比率,一般每轮 5 ~ 1 000 倍不等)越高,所需的筛选轮数就越少^[6]。另外,在实际筛选过程中,筛选效率也受噬菌体种类、固相介质表面的抗原密度(或溶液中抗原的浓度)和清洗时间三种因素的影响。噬菌体种类的影响目前研究较少,而后两种因素被认为对筛选的严紧度有很大的影响。当筛选较小的抗体库($10^7 \sim 10^8$)时,在前几轮采用中等的严紧度有利于避免高亲和力或低表达克隆的丢失,而对于库容较大的库则可采用较高的严紧度来快速富集亲和力高的克隆。另外,为获得更高亲和力新抗体而采用添加已有竞争抗体或抗原竞争结合物的 off-rate 筛选法,则需要较多的筛选轮数。

4 展望

自噬菌体抗体库技术建立以来,这一技术为单克隆抗体的快速规模化制备开辟了一条全新的途径。国内外的一些实验室先后建立了一批不同性质的抗体库,克隆到一些特异性单抗如抗 HBsAg, TNF- α , HIV 和某些肿瘤相关抗原的抗体,有些已进入到相关疾病治疗的临床前应用阶段^[1],在自身免疫病、多种癌症、变态反应及感染性疾病的抗体靶向生物治疗方面也得到了广泛地应用。不仅如此,噬菌体抗体库技术在抗体人源化、亲和力提高、蛋白质与蛋白质相互作用、蛋白质结构和功能等方面也显示出独特的应用潜力。

尽管噬菌体抗体库技术使单克隆抗体的制备变得简单易行,但目前还没有广泛普及并进入临床应用。目前面临的挑战是,如何最大限度减少非特异性结合的同时,最大程度地富集到特异性好、亲和力高的新抗体。相比而言,筛选方法仍是制约这一革命性技术普及的最主要瓶颈。随着国内外各实验室对筛选方法的不断发展和改进,噬菌体抗体库技术必将给生物医学研究及人类疾病的诊治带来深远的影响。

[参考文献]

- [1] Kretzschmar T, von Ruden T. Antibody discovery: Phage display [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(6): 598-602.
- [2] Brekke OH, Loset GA. New technologies in therapeutic antibody development [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(5): 544-550.
- [3] Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries

[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 290(1-2): 29-49.

- [4] Ditzel HJ. Rescue of a broader range of antibody specificities using an epitope-masking strategy [M]. *Methods Mol Biol*, 2002, 178: 179-186.
- [5] Tsui P, Tornetta MA, Ames RS, et al. Progressive epitope-blocked panning of a phage library for isolation of human RSV antibodies [J]. *J Immunol Methods*, 2002, 263(1-2): 123-132.
- [6] Azzazy HM, Highsmith WE Jr. Phage display technology: Clinical applications and recent innovations [J]. *Clin Biochem*, 2002, 35(6): 425-445.
- [7] Griffiths AD, Duncan AR. Strategies for selection of antibodies by phage display [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, 9(1): 102-108.
- [8] Palmer DB, George AJ, Ritter MA. Selection of antibodies to cell surface determinants on mouse thymic epithelial cells using a phage display library [J]. *Immunology*, 1997, 91(3): 473-478.
- [9] Siegel DL, Chang TY, Russell SL, et al. Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: Applications in immunohematology [J]. *J Immunol Methods*, 1997, 206(1-2): 73-85.
- [10] Kupsch JM, Tidman NH, Kang NV, et al. Isolation of human tumor-specific antibodies by selection of an antibody phage library on melanoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(4): 925-931.
- [11] Poul MA, Becerril B, Nielsen UB, et al. Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries [J]. *J Mol Biol*, 2000, 301(5): 1149-1161.
- [12] Liu B, Conrad F, Cooperberg MR, et al. Mapping tumor epitope space by direct selection of single-chain Fv antibody libraries on prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 704-710.
- [13] Rajotte D, Arap W, Hagedorn M, et al. Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by *in vivo* phage display [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(2): 430-437.
- [14] Krebber C, Spada S, Desplancq D, et al. Selectively-infective phage (SIP): A mechanistic dissection of a novel *in vivo* selection for protein-ligand interactions [J]. *J Mol Biol*, 1997, 268(3): 607-618.
- [15] Arndt KM, Jung S, Krebber C, et al. Selectively infective phage technology [M]. *Methods Enzymol*, 2000, 328(C): 364-388.
- [16] de Wildt RM, Mundy CR, Gorick BD, et al. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(9): 989-994.
- [17] Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, et al. Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses [J]. *Nat Med*, 2002, 8(3): 295-301.
- [18] Zacchi P, Sblattero D, Florian F, et al. Selecting open reading frames from DNA [J]. *Genome Res*, 2003, 13(5): 980-990.

[收稿日期] 2004-11-29

[修回日期] 2005-05-10

[本文编辑] 王莹