

本文引文格式:周凌婕,邵慧敏,李仁杰,等.人源单重链噬菌体展示纳米文库的构建以及抗 HER-2 抗体的筛选[J].右江民族医学院学报,2025,47(3):457-464.

【论著与临床报道】

人源单重链噬菌体展示纳米文库的构建以及抗 HER-2 抗体的筛选

周凌婕¹,邵慧敏²,李仁杰¹,徐振宇²

[1. 皖南医学院药学院,安徽 芜湖 241000;

2. 皖南医学院第一附属医院(弋矶山医院)精准医学中心,安徽 芜湖 241000]

摘要:目的 构建天然人源化单重链噬菌体展示纳米文库,筛选出特异性靶向人表皮生长因子受体-2(HER-2)的单重链抗体,作为后续嵌合抗原受体 T(CAR-T)细胞疗法的抗原靶向结构域。**方法** 分离志愿者的外周血,提取淋巴细胞中的总 RNA,逆转录为 cDNA,根据重链抗体保守区域骨架区 FR 设计引物,扩增出抗体的人抗体重链可变区(VH)片段,再利用噬菌体展示技术,重组到噬菌体中,建立天然的人单重链噬菌体纳米文库,筛选特异性靶向 HER-2 的噬菌体,应用 ELISA 和流式细胞术检测抗体亲和力和特异性。**结果** 成功构建了人源化单重链噬菌体纳米文库,总库容达到 5×10^{10} 且多样性较好,并成功筛选到高亲和力的抗 HER-2 单重链抗体。**结论** 本研究成功筛选到了抗 HER-2 的单重链抗体,并通过 ELISA、流式等方法验证了其亲和力和特异性,为后续基于 HER-2 的抗体筛选与开发,以及临床肿瘤治疗奠定基础。

关键词:噬菌体库;人抗体重链可变区;人表皮生长因子受体-2

中图分类号:R392.9

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)03-0457-08

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.03.014

Construction of a human-derived single-heavy-chain phage display nanobody library and screening of anti-HER-2 antibodies

ZHOU Lingjie¹, SHAO Huimin², LI Renjie¹, XU Zhenyu²

[1. School of Pharmacy, Wannan Medical College, Wuhu 241000, Anhui, China;

2. Precision Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College(Yijishan Hospital), Wuhu 241000, Anhui, China]

Abstract: **Objective** To construct a natural human-derived single-heavy-chain phage display nanobody library and screen for single-heavy-chain antibodies that specifically target human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2), which can serve as the antigen-targeting domain for subsequent chimeric antigen receptor T (CAR-T) cell therapy. **Methods** Peripheral blood was collected from volunteers. Total RNA was extracted from lymphocytes. The extracted RNA was then reverse-transcribed into complementary cDNA. Primers were designed based on the framework region (FR) of the conserved regions of the heavy-chain antibodies. The human antibody heavy-chain variable region (VH) fragments were amplified using the designed primers. Subsequently, using phage display technology, the amplified VH fragments were recombined into phages to establish a natural human-derived single-heavy-chain phage nanobody library. Phages specifically targeting human epidermal growth factor receptor-2 (HER-2) were screened from the library. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and flow cytometry were applied to detect the affinity and specificity of the antibodies encoded by the selected phages. **Results** A human-derived single-heavy-chain phage nanobody library was successfully constructed, with a total library capacity of 5×10^{10} and good diversity. High-affinity anti-HER-2 single-heavy-

第一作者:周凌婕,在读硕士研究生,研究方向:分子药理学,E-mail:zhoulingjie@20.163.com

通讯作者:徐振宇,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:分子药理学,E-mail:xzy03421@163.com

chain antibodies were successfully screened. **Conclusion** In this study, anti-HER-2 single-heavy-chain antibodies were successfully screened, and their affinity and specificity were verified by ELISA, flow cytometry, and other methods. This provides a foundation for subsequent HER-2-based antibody screening and development, as well as clinical tumor treatment.

Key words: phage library; human antibody heavy-chain variable region; human epidermal growth factor receptor-2

噬菌体展示是一种分子生物学技术,利用能够感染细菌的病毒(即噬菌体)来呈现单链抗体片段,能在短时间内筛选出大量特异性结合分子。噬菌体纳米文库的库容越大,越有可能筛选出高亲和力的针对靶标的单克隆抗体。噬菌体纳米文库的多样性是开发抗原特异性抗体的先决条件。人源单重链噬菌体纳米文库由于抗体基因来自人体,筛选出的抗体免疫性较低,更加适合临床应用,减少了异源抗体可能引发的免疫反应。由于其结构简单,便于基因工程改造,可以进一步优化亲和力、稳定性,更好与 CAR-T 细胞结合,显著提高 CAR-T 细胞疗法的有效性和安全性。噬菌体展示技术能够迅速生成和筛选针对耐药性病原体的新抗体或多肽,帮助应对耐药性,并且可以同时结合多个靶点的分子,减少病原体产生耐药性的机会。噬菌体展示技术从库构建到筛选,周期较短,能迅速获得目标抗体,加快研发进程,降低研发成本。噬菌体是一种具有多种作用的工具,可以用来诊断和治疗癌症,因为它们能够被工程化来靶向肿瘤特异性抗原^[1]。选择性结合目标的噬菌体克隆的过程称为亲和选择或生物淘选^[2]。这一过程是必要的,因为噬菌体纳米文库将由数十亿个噬菌体克隆组成,每个克隆都将插入不同的 DNA,以允许不同抗体在表面上表达,因此需要高效的系统来选择合适的抗体用于筛选过程,目前,噬菌体展示技术已成为获得人源抗体的主要手段之一^[3]。

人表皮生长因子受体-2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER-2) 是 17 号染色体上 HER-2 癌基因编码的受体酪氨酸激酶(RTK)跨膜蛋白^[4]。HER-2 在 30% 以上的肿瘤中过表达,其中包括乳腺癌^[5]、胃肠道癌症^[6]、胰腺癌^[7]、胆管癌^[8]和结直肠癌^[9],是最具临床代表的检测分子之一。HER-2 阳性肿瘤往往具有高分级、快速生长和早期全身转移的特点。因此 HER-2 阳性表达的患者往往预后较差^[10]。HER-2 激活和调节细胞生长和增殖的相关下游信号介质,通过培育这些通路,HER-2 信号传导可以促进肿瘤生长、血管生成和转移^[11]。HER-2 过度表达会增加药物外排泵的表达,如多药耐药蛋白 1 (MDR1)和 P-糖蛋白,它们将药物泵出癌症细胞并降低其有效性^[12]。此外,HER-2 的激活已被证明可以提高 DNA 修复酶的表达,这通过修复化疗诱导的

DNA 损伤来促进耐药性^[13]。此外,HER-2 过表达诱导上皮间质转化 (Epithelial-Mesenchymal Transitions, EMT),通过 EMT,癌症细胞失去上皮特征,获得间充质特征,EMT 与各种癌症类型的耐药性有关^[14]。已经开发了几种针对 HER-2 阳性肿瘤患者的疗法^[15-17]。例如,曲妥珠单抗(TRA)、曲妥珠单抗-德鲁替康(T-DXd)、曲妥珠单抗-恩坦辛(T-DM1)、拉帕替尼(LAP)和帕妥珠单抗,都是抑制 HER-2 受体和下游信号通路的靶向疗法,从而减少肿瘤生长并提高生存率^[18]。曲妥珠单抗,一种单克隆抗体(MAb)是首个 HER-2 靶向治疗,被发现在转移性 HER-2 阳性乳腺癌患者中获得持久的反应。曲妥珠单抗随后作为标准治疗方案被引入 HER-2 阳性乳腺癌的早期治疗中,与化疗联合用于一线转移性、辅助和新辅助治疗^[19],但仍然存在一定的弊端和潜在风险,需要开发新的治疗策略。人抗体重链可变区人抗体重链可变区 (VH) 包含 3 个高变区 (HVR)/抗原互补决定区 (CDR) 和其两侧的 4 个骨架区 (FR)。FR 区氨基酸组成和排列变化相对 CDR 较少。可变区中 CDR 与 FR 的组成方式为“FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4”。本研究根据重链抗体保守区域 FR 设计引物,从天然的未经过特殊免疫的人的 B 淋巴细胞中扩增获得全套重链抗体可变区基因,而后重组到噬菌体中,构建出一种库容量大的天然的人单重链噬菌体抗体库。噬菌体展示筛选技术可用于检测生物标志物分子,以促进疾病筛查,用噬菌体来筛选抗 HER-2 抗体,为肿瘤预测以及治疗 HER-2 过表达提供了重要基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 载体 pCANTAB5E 质粒、TG1 感受态细胞、辅助噬菌体 M13KO7 均由皖南医学院弋矶山医院精准医学中心提供。氨苄青霉素、卡那霉素、氯仿、异丙醇购自北京索莱宝科技有限公司,酵母粉、蛋白胨、氯化钠、琼脂粉购自北京博奥拓达科技有限公司,淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限责任公司,T4 连接酶、逆转 cDNA 试剂盒、Sfi I 均购自 Takara 公司,75% 乙醇购自宿州众望科技有限公司,Trizol 试剂购自赛默飞科技有限公司,生理盐水、PBS 购自美国 Gibco 公司,1 000 份外周血样品来自皖南医学院弋矶山医院。

1.2 样品配置 2×YT 培养基:NaCl 5 g,酵母粉 10 g,蛋白胨 16 g,用超纯水定容到 1 L,121 °C 高压灭菌 20 min。20%葡萄糖:无水葡萄糖 100 g,用超纯水定容到 500 mL,115 °C 高压灭菌 30 min。2×YT 固体平板:氯化钠 1 g,酵母粉 2 g,蛋白胨 3.2 g,琼脂粉 1 g 用超纯水定容到 200 mL,等温度降到 60 °C 以下,加 200 μL 氨苄青霉素(Amp)和 20 mL 20%葡萄糖,倒平板。PEG/NaCl:20% 聚乙二醇-800 40 g,NaCl 29.2 g,用超纯水定容到 200 mL,121 °C 高压灭菌 20 min。10%甘油:100 mL 纯甘油+900 mL 超纯水,121 °C 高压灭菌 20 min。20%甘油:20 mL 纯甘油+80 mL 超纯水,121 °C 高压灭菌 20 min。60%甘油:60 mL 纯甘油+40 mL 超纯水,121 °C 高压灭菌 20 min。PBST:在 1×PBS 溶液中加入 1 mL Tween-20,121 °C 高压灭菌 20 min。TAE 配置:先配置 50×TAE,称取 24.2 g Tris-base;5.71 mL 冰乙酸;10 mL 0.5 mol/L EDTA 超纯水定容至 100 mL。取 20 mL 50×TAE,加超纯水定容至 1 L,则为 1×TAE。1%琼脂糖凝胶:称取 0.5 g 琼脂糖,用 1×TAE 定容至 50 mL,使用微波炉大火高温加热直至全部融化,溶液变为透明,加入 5 μL 核酸染料,混匀。4%脱脂牛奶:称取 2 g 脱脂牛奶,用无菌水定容到 50 mL。

2 实验步骤

2.1 噬菌体建库

2.1.1 分血 在 15 mL 离心管内提前加入 2 mL 淋巴细胞分离液,1:1 加入外周血,离心机的升降速度调到最低,650 g 离心 20 min,离心后吸取分层中的第二层白膜层,用生理盐水补加至 10 mL,470 g 离心 10 min,用生理盐水清洗两次,得到 PBMC。

2.1.2 提 RNA 加入 1 mL Trizol 试剂到 PBMC 中,混匀后在冰上静置 5 min;加入 200 μL 氯仿,混匀冰上静置 10 min,13 000 r/min 4 °C 离心 15 min;留上清加入 500 μL 异丙醇,混匀,冰上静置离心 10 min;弃上清,加入 1 mL 75%乙醇,混匀,冰上静置离心;弃上清,加入 30 μL 无酶水。

2.1.3 逆转 cDNA 10 μL 总 RNA、1 μL PrimeScript RT Enzyme Mix、1 μL RT Primer Mix、4 μL 5×PrimeScript Buffer 2 和 4 μL dH₂O 37 °C 反应 15 min,85 °C 反应 5 min,4 °C 保存。

2.1.4 PCR 上述 cDNA 模板 1 μg、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、2×Taq PCR Mix 12.5 μL,加 ddH₂O 补至 25 μL 体系,总共 24 个体系。预变性 94 °C 3 min;循环 30 次:94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 1 min;72 °C 延伸 5 min。使用 1%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物,见表 1。

表 1 引物序列表

引物	引物名称	引物序列(5'→3')
上游引物	HuVH1	CTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
	HuVH2	CTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTCAACTTAAGGGAGTCTGG
	HuVH3	CTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
	HuVH4	CTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
	HuVH5	CTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
	HuVH6	CTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGG
下游引物	HuJH1	ATCGGGCCGAGTGGCCCCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
	HuJH2	ATCGGGCCGAGTGGCCCCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTGCC
	HuJH3	ATCGGGCCGAGTGGCCCCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC
	HuJH4	ATCGGGCCGAGTGGCCCCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
	HuJH5	ATCGGGCCGAGTGGCCCCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCC
	HuJH6	ATCGGGCCGAGTGGCCCCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC

2.1.5 PCR 产物胶回收 加入 500 μL 平衡液 BL 到吸附柱内,12 000 r/min 离心 1 min,弃废液;切取 1%琼脂糖电泳的 PCR 产物,放到离心管中,加入等体积的 PC 溶液,50 °C 水浴锅融化 10 min,胶块完全溶解;将溶液加入吸附柱内,离心,弃废液;加 500 μL 漂洗液 PW,离心,弃废液;空离 2 min 弃废液;加入 30 μL 灭菌水,室温等待 2 min,离心收集 DNA 溶液。

2.1.6 酶切载体/DNA 使用 Sfi I 对 pCANTAB5E

载体和 DNA 进行单酶切。DNA 体系:DNA 2 μg(浓度为 127 ng/μL,加 16 μL)、10×NEBuffer 4 μL、Sfi I 1 μL、ddH₂O 19 μL。总共配制 6 个 DNA 体系。pCANTAB5E 体系:1 μg(浓度为 334 ng/μL,加 6 μL)、10×NEBuffer 4 μL、Sfi I 1 μL、ddH₂O 30 μL。总共配制 12 个 pCANTAB5E 载体体系。50 °C PCR 仪器过夜酶切。使用 1%琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物。Sfi I 酶切位点:GGCCNNNN~NGGCC。

2.1.7 载体和 DNA 产物胶回收 同 2.1.5。

2.1.8 连接 按照载体:DNA 的 bp 比为 1:3 的比例连接,即 2 μg 载体、553.85 ng DNA、1 μL T4 连接酶、2 μL T4 连接酶 Buffer,加 ddH₂O 补至 20 μL ,共连接 10 μg 载体,16 $^{\circ}\text{C}$ PCR 仪过夜连接。使用 1%琼脂糖凝胶电泳检测连接产物。

2.1.9 连接产物胶回收 同 2.1.5。

2.1.10 TG1 感受态细胞制备(现用现配) 前 1 天 TG1 菌用不加氨苄和葡萄糖的 2 \times YT 固体平板划线。第 2 天挑取单克隆到 40 mL 2 \times YT 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,220 r/min 摇过夜。第 3 天以 1:100 的比例接种扩大,即吸取 800 μL TG1 菌到 800 mL 2 \times YT 培养基中,摇至 OD₆₀₀=0.4 时即可开始制备感受态细胞。离心机 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷,全程冰上无菌操作,保持低温(OD₆₀₀=0.4 表示大肠杆菌密度适中,此时具有较高的代谢活性和细胞壁通透性,有助于感受态细胞的制备和后续。低温是为了维持细胞膜的流动性,防止细胞应激,保护外源 DNA,提高转化效率)。准备 14 个 50 mL 离心管,每管倒入 50 mL 菌液,4 $^{\circ}\text{C}$,4 500 r/min 离心 5 min;弃上清,每管加入 25 mL 无菌水混匀,离心 5 min;弃上清,每管再加入 15 mL 无菌水洗 1 遍,5 000 r/min 离心 5 min;弃上清,每管加入 15 mL 10%甘油清洗 2 次,5 500 r/min 离心 5 min;弃上清,加入 10%甘油,把菌液合并到一管,终体积为 8 mL (800 mL 菌液,浓缩 100 倍);分装:取 10 个 EP 管,800 μL 一管。

2.1.11 电转 取 100 个电击杯插在冰上,每管感受态中加入 1 μg 连接产物,混匀后取 80 μL 加入电击杯。使用 BTX Gemini SC 电穿孔仪电转,电转条件为电压:2 500V,电阻:750 Ω ,电容:25 μF ,电极间隙:2 mm。电完之后补加 2 \times YT 培养基至 1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$,220 r/min 摇 2 h。

2.1.12 测滴度 取 6 个 EP 管,依次标记为③④⑤⑥⑦⑧,代表稀释倍数,加入 99 μL 培养基,随机选取一管菌,取 1 μL 加入,逐级梯度稀释,④⑤⑥⑦⑧管中各取 10 μL 滴在固体平板上,第 2 天计算库容量:菌落数 $\times 10$ n(n=稀释倍数+2),做 3 个重复。

2.1.13 保存菌库 剩余菌液 6 000 r/min 离心 4 min,弃上清,涂 2 \times YT 固体平板(含氨苄和 2%葡萄糖),倒置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜培养,第 2 天长满后将菌刮下来即为噬菌体单重链库,加 20%甘油分装后-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.1.14 测序 在滴度板上随机挑取 30 个克隆加入 200 μL 2 \times YT 培养基中,摇 2 h 后菌液测序,引物为载体通用引物(pCantab5-R1: ccatgattacgccaagctttg-gagcc),检测文库多样性。

2.2 噬菌体筛选

2.2.1 一轮筛选 ①制库一:取 500 μL 冻存的噬菌体库+200 mL 2 \times YT 培养基+200 μL Amp+2%葡萄糖,37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 摇至 OD₆₀₀=0.6(TG1 大肠杆菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下快速生长,适合噬菌体感染和繁殖并且噬菌体在 37 $^{\circ}\text{C}$ 时感染效率最高。为了确保 TG1 大肠杆菌处于对数生长期,从而优化噬菌体的感染和增殖)。补加辅助噬菌体 M13KO7 1 μL ,摇 1 h。6 000 r/min 离心 4 min,换成新鲜 2 \times YT 培养基 200 mL+200 μL Amp+200 μL Kana,摇过夜。第 2 天 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 20 min,把上清倒入新的 50 mL 离心管中,按照上清:PEG/NaCl=4:1 的比例加入 PEG/NaCl,冰上孵育沉淀 1 h。离心 20 min,弃上清,每管加入 1 mL 2 \times YT 培养基溶解沉淀,0.45 μm 滤膜过滤,4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。②挑取一个 TG1 单克隆到 5 mL 2 \times YT 菌液里,37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 摇过夜。③抗原包被:按照每孔 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、400 ng/mL 的抗原浓度进行三轮筛选包被 ELISA 板,PBS 稀释抗原,每孔 200 μL ,设置复孔;另外每轮取两孔加入 350 μL 4%脱脂牛奶,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜孵育包被。第一轮筛选中使用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗原浓度,旨在捕获尽可能多的潜在克隆;第二轮将抗原浓度降为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,为了增加筛选压力并集中高亲和力克隆;第三轮进一步将抗原浓度降为 400 ng/mL,以筛选出具有最高亲和力的克隆。通过逐步降低抗原浓度,确保每一轮筛选都能有效富集目标抗体,同时避免筛选效率的下降。④将一轮抗原吸出,加入后面牛奶孔的 350 μL 4%脱脂牛奶;后面牛奶孔吸出 350 μL 4%脱脂牛奶后,加入 100 μL 4%脱脂牛奶+100 μL 制备好的噬菌体,贴上封板膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育封闭 1 h(阻断非特异性结合,1 h 足以让牛奶中的蛋白质充分吸附到表面,形成均匀的封闭层)。⑤将抗原孔 350 μL 4%脱脂牛奶吸出,加入牛奶孔中封闭 1 h 的 100 μL 4%脱脂牛奶+100 μL 噬菌体,贴上封板膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 2 h(2 h 是为了确保抗体与目标分子充分结合,提高结合的特异性和信号强度,不同的抗体亲和力不同,2 h 是一个适用于大多数抗体的折中时间)。⑥1:100 接种过夜摇的 TG1 单克隆 200 μL 到 20 mL 2 \times YT 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 摇至 OD₆₀₀=0.6。ELISA 孔板孵育 2 h 后,用 420 μL PBST 清洗 6 次,420 μL PBS 清洗 3 次,甩干液体,加入 200 μL 0.2M pH2.2 的甘氨酸盐酸缓冲液,静置 8 min,随后将洗脱下来的抗体加入到 30 μL 1 M pH 9.1 的 Tris-HCl 中和液中,加入 800 μL TG1 菌,37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 摇床感染 1 h(感染 1 h 是为了确保抗体与噬菌体颗粒充分结合,同时保持 TG1 细胞的活性和感染效率)。⑦6 000 r/min 离心 4 min,弃

上清,沉淀涂 $2 \times$ YT 平板, 37°C 培养箱培养过夜。⑧第 2 天将菌刮下来,放入 4°C 备用。

2.2.2 二轮筛选 重复一轮制库和筛选步骤,抗原包被浓度为 $2\ \mu\text{g}$ 。

2.2.3 三轮筛选 重复一轮制库和筛选步骤,抗原包被浓度为 $400\ \text{ng}$ 。

2.3 ELISA ELISA 的目的是检测展示在噬菌体表面的外源蛋白(如抗体片段)与靶抗原的结合能力。本研究使用 M13 抗体进行噬菌体 ELISA 检测。M13 抗体是针对 M13 噬菌体衣壳蛋白(pⅧ)的特异性抗体,能够与噬菌体颗粒结合,用于检测噬菌体的存在。在噬菌体与靶抗原结合后,使用 HRP 标记的 M13 抗体作为二抗,通过显色反应检测噬菌体的存在。通过吸光度值(OD 值)定量分析噬菌体与靶抗原的结合能力,从而评估展示抗体的亲和力。挑取 32 个单克隆。制备噬菌体。提前包被 $400\ \text{ng/mL}$ HER-2 蛋白, $400\ \text{ng/mL}$ 无关蛋白 NY-ESO-1 以及空白对照 PBS。加入 $350\ \mu\text{L}$ 4% 脱脂牛奶, 37°C 培养箱封闭 1 h; 96 孔板菌 $10\ 000\ \text{r/min}$ 离心 2 min,取 $50\ \mu\text{L}$ 上清 + $50\ \mu\text{L}$ 4% 脱脂牛奶 37°C 培养箱孵育 1 h; $420\ \mu\text{L}$ PBST 和 PBS 各洗 3 次,加入 $100\ \mu\text{L}$ 牛奶稀释 1 000 倍的噬菌体抗体[Anti-M13 Antibody (HRP), $2\ \mu\text{g/mL}$], 37°C 培养箱孵育 30 min; $420\ \mu\text{L}$ PBST 和 PBS 各洗 3 次,加入 $100\ \mu\text{L}$ TMB 显色液,黑暗处显色 10 min,加 $50\ \mu\text{L}$ 终止液终止,蓝色即为阳性,证明筛选出来有能结合靶抗原的抗体。

2.4 细胞结合流式验证 将所有阳性克隆菌液送去测序,排除重复序列,选出结合力最强的单克隆, $10\ 000\ \text{r/min}$ 离心 2 min,取 $100\ \mu\text{L}$ 上清和靶细胞 HeLa 或 HER-2 HeLa 37°C 孵育 1 h。 $420\ \mu\text{L}$ PBS 洗 3 次,加入 $100\ \mu\text{L}$ PBS 稀释的噬菌体抗体[Anti-M13 Antibody(PE), $2\ \mu\text{g/mL}$], 4°C 孵育 30 min,流式上机检测。

3 结果

3.1 噬菌体文库的建立 使用 PCR 对 VH DNA 进行扩增, DNA 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分离验证,结果如图 1 所示, PCR 产物大小在 $360\sim 400\ \text{bp}$ 左右。对 VH DNA 的 PCR 产物进行胶回收,使用 Sfi I 酶对 VH DNA 还有 pCANTAB 5E 载体进行过夜酶切,酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分离验证,结果如图 2 所示, pCANTAB 5E 载体酶切产物在 $4\ 600\ \text{bp}$ 左右。对 VH DNA 还有 pCANTAB 5E 载体酶切产物胶回收,使用 T4 连接酶连接 VH DNA 和 pCANTAB 5E 载体,连接产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分离验证,结果如图 3 所示,连接产物大小在 $5\ 000\ \text{bp}$ 左右。

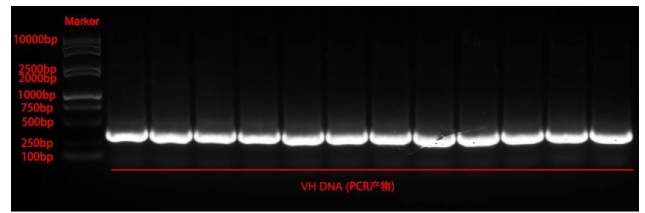


图 1 VH DNA PCR 产物电泳图

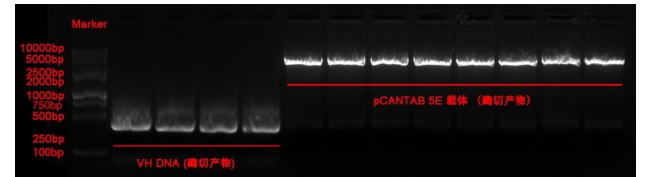


图 2 VH DNA/pCANTAB 5E 载体酶切产物电泳图

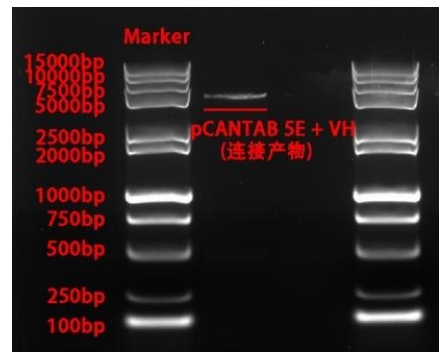


图 3 pCANTAB 5E+VH 连接产物电泳图

3.2 噬菌体文库的鉴定 对 2.1.11 中菌液进行梯度稀释检测库容,算出 VH 噬菌体展示库容为 5×10^{10} , 见图 4。随机挑取 30 个单克隆,测序得到抗体序列,见表 2,30 个单克隆都能检测出抗体,并且抗体序列都不相同,可以看出抗体多样性较好,库容多且复杂性较高。



图 4 库容滴定板

表 2 单克隆抗体序列

序号	序列
1	MAQVQLQQSGGGLIQQPGGSLRLSCAASGFTVSNDDYVSWVRQAPGKGLEWVSIHYDGRDITDYSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRVEDTAVYYCARVQDSSVPYWDNGHRLFR
2	MAEVQLVESGAEELKPGASVKVCKASGYFTFTSYHHWFRQAPRQGLEWGMGVNPSDLTTTYAQRFRDRVTMTRDTSTSTVYMEVSSLRSEDTAVYYCARGDCTGNTCYDSFDIWGGQLTVTVSS
3	MAQVNLRESGAEVKPKGASVKVCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWGGFDPEDETIYAQKFKGRVMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDRPVTAPYYGMDVWQGGTLTVTVSS
4	MAQVHLQESGGVVKPGTSLKVCSEASGYFTFELSMHWVRQAPGKGLEWGGIYPEESETYYAHTFQGRFTITEDTSTNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCATDLRAGVADCYSPYDCCRATLTASS
5	MAEVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMNWRQAPGKGLEWVSTISGGGDSFYRDSVKGRFTVSRDNRNRTLYLEMNKLEVEDAAVYFCAREMVAVAVPEHLQFWGQGTTVTVSS
6	MAEVQLVESGGGVVQPGRSLGLSCAASGFTLSTYAMHWRQAPGKGLEWVAIVSSDGSKKYVVDVSKGQFIHSRDNKNTVYLMNSLRPEDTAVYYCTREDDEDSNEFYFYGMDLWGGTLTVTVSS
7	MAEVQLVESGPGLVKPESETLSLCTVSGGSISSTSYWGWIRQPPGMALEWIGSIYSGSTYNNPSLRKSRVTSVDTSKSQFALNLSVTAADTAVYHCARVPLHRGAFDCWGGAPWSPSPQ
8	MAQVQLVQSGGGVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAATWYDGSNTNYADFVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCARGWITMIRGVADHAFDIWGGTLTVTVSS
9	MAQVQLQQSGSELKPKGASVKVCKASGYFTFTSYAMNWRQAPGQGLEWGMGWINTNTGNPTYAAGQFTGRFVFLSDTSVSTAYLQISLKAEDTAVYYCARGYDGEHGGWVWDFPWGQGRSPSPQ
10	MAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYMNWRQAPGKGLEWVSIYSSSTSTIYADSVKGRFTLSRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARPSSWYADYWGQGRSPSPQ
11	MAQVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDYAMHWRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTALYYCAKDLKCYSGGSCYAFDYWDHGHRLLR
12	MAQVNLRESGAEVKPKGASVKVCKASGYFTFTSYDISWRQATGQGLEWGMWLNPHSGKTYAQRQGRVMTNRNTSISTAYMELSLRSEDTAVYYCARGRGTVPYFYNGMDVWQGGTLTVTVSS
13	MAQVQLQESGAEVKPKGSSVKVCKASGFTFSSYAISWVRQAPGQGLEWGMGIIPIFGTANYAQKFKGRVTTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASSTGDFDPWGGTTVTVTVSS
14	MAQVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYGMNWRQAPGKGLEWLSYISSSSVTIYADSVKGRFTVSRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARAPKAAASDYWGQEPWSPSPQ
15	MAQVQLQESGPGLVKPESETLSLCTVSGGSISGYYSWIRQPPGKLEWIGYIYTGITNYPNLSKSRVTSIDTSKNSQFSLNLSVTAADTAVYYCAIRSGRNYFGIDVWGGTMTVTVSS
16	MAQVQLQESGPGLVKPSQTLISLCTVSGGSISGSYYWNRQAPGKLEWVIGRIYTSSTNYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSDSSSWYRVGRVWYFDLWGRGTLTVTVSS
17	MAQVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCLTSGFSFKDYMDWVRQTPGKLEWVGRIRNRSRGRSTNYAASVSGRFTISRDNSENTLYLQISLKTDDTAVYYCVRDNWGLDYWDHGHRLLR
18	MAQVNLRESGAEVKPKGESLKISCKSGSYFTSYWIGWVRQMPGKLEWGMGIHPGDSDFRYSPFQGGVQVTSADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCARHRDSSGYSRNFDPWGGQTLTVTVSS
19	MAQVQLQQSGGGLVQPGRTLSLCTASGFTFRFGMHWRQAPGKLEWVGVSSYDGSAYYADSVRGRFTISRDNKNTLYLEMNSLRDEDTAVYFCTKEGGHCGSATCDESTAFSFDYWGGQTLTVTVSS
20	MAEVQLVESGPGLVKPESETLSLCTVSGGSVSSGSYYWNRQPPGKLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARSDYDFWSGYYIWGGQWSPSLQ
21	MAQVQLQESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDYAMHWRQAPGKLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTALYYCAKDLGLDGHGHRLLR
22	MAQVQLQESGAEVKPKGASVKVYCKASGYNFAAHGMHWVRQAPGQGFQEWGMWAGTNTKYSQNFQGRVTFITDTSASTLYMELSSLTSEDTAVYFCARYAYGNWADVWDHGHRLLR
23	MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQINSLRAEDTAVYYCAKESPGLYWGQGTTLTVTVSS
24	MAQVQLVQSGAGLVKPESETLSLTCVAYGGSFSDYYWSWIRQSPGKLEWIGEINHRRTNYNPSLKSRTVMSVDTSKNQFSLNLRVTAADTAVYYCARPGIPAGHHLDPWGGTTLTVTVSS
25	MAQVQLQQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTFTSYDINWVRQATGQGLEWGMWNPNSGNTGYAQRQGRVMTNRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCATLLGYCSGGSCYSYDYGQGTTLTVTVSS
26	MAEVQLVESGGTMVQPGGSLRLSCVASGFSFSSYAMSWVRQAPGKPEWVSGTGGSDGKYYADSVKGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRDEDTAVYYCAKESYNWNAFYFDHWGGQTLTVTVSS
27	MAQVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYDMHWVRQGGGKLEWVSGISGSDGTYYPASVEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDGDYAVYYCARVHSDYGMVWGGQTLTVTVSS
28	MAQVQLQQSGAEVKKPGSSVKVCEVSGGFTFSRSALSWVRQAPGQGLEWIGRIIPFGMPTYAQKFKGRVTSVATTTAYMELTSLRSDDTAVYYCANLNDYSSGYSLNYYFDYWGGQGRSPSPQ
29	MAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSSYAMSWVRQASGKLEWVSGIGGSGATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRDEDTAVYYCAKGRSAWVRGVTREYYPMDVWDHGHRLLR
30	MAQVQLQESGAEVKPKGESLKISCKSGSYFTSYWIGWVRQMPGKLEWGMGIHPGDSDFRYSPFQGGVQVTSADKSISTA YLQWSSLKASDTAMYYCARFSTVTTWDFPWGGQTLTVTVSS

3.3 抗 HER-2 噬菌体的筛选 以 HER-2 为靶抗原,筛选抗 HER-2 的抗体 噬菌体抗体筛选过程采用了 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \rightarrow 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ \rightarrow 400 ng/mL 的抗体浓度梯度,逐步富集高亲和力抗体。高浓度抗原(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)用于初步富集结合能力较强的噬菌体抗体,而低浓度抗原(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 400 ng/mL)则用于筛选出更高亲和力的克隆。最终选择 400 ng/mL 的浓度进行阳性克隆验证,是因为该浓度能够更严格地筛选出高亲和力抗体,同时避免非特异性结合。通过 ELISA 检测,本研究发现高亲和力克隆在低浓度抗原(400 ng/mL)下表现出较高的吸光度值,表明其与 HER-2 抗原的结合能力较强。总共挑取 32 个噬菌体单克隆。1~4 列包被无关蛋白 400 ng/mL NY-ESO-1, 5-8 列包被目标蛋白 400 ng/mL HER-2, 9-12 列包被 PBS, 作为空白对照, 随后, 依次加入相同的噬菌体单克隆。通过图 5 和图 6 可以观察到无关蛋白 NY-ESO-1 和 PBS 中基本检测不到阳性克隆, 而 HER-2 抗原板中 32 个单克隆里有 24 个阳性克隆, 其中有 21 个吸光度均在 1.5 以上, 见表 3, 最高值可达到 2.209(表 3 C6 克隆), 表明本研究筛选到的抗 HER-2 噬菌体抗体与 HER-2 抗原的亲和力高, 特异性强。

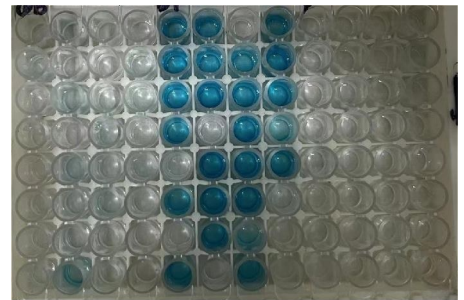


图 5 ELISA 显色图

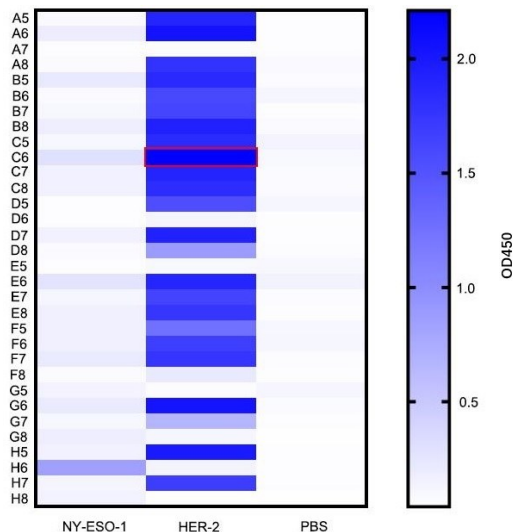


图 6 ELISA 结果 OD450 吸光度

表 3 OD450 处吸光度

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.091	0.191	0.053	0.081	1.890	2.047	0.054	1.775	0.052	0.049	0.056	0.083
B	0.213	0.082	0.104	0.182	1.845	1.590	1.615	1.924	0.063	0.114	0.052	0.081
C	0.100	0.298	0.158	0.143	1.841	2.209	1.898	1.821	0.132	0.099	0.082	0.072
D	0.057	0.052	0.154	0.075	1.540	0.113	1.912	0.876	0.110	0.057	0.054	0.061
E	0.050	0.264	0.116	0.166	0.098	1.892	1.623	1.742	0.108	0.138	0.058	0.049
F	0.164	0.167	0.205	0.072	1.240	1.672	1.754	0.222	0.100	0.110	0.061	0.054
G	0.130	0.205	0.100	0.180	0.061	2.034	0.659	0.115	0.116	0.073	0.051	0.044
H	0.148	0.845	0.125	0.138	1.984	0.129	1.687	0.040	0.052	0.049	0.053	0.048

3.4 抗 HER-2 抗体流式验证 基因编辑 HeLa 细胞,使其过表达 HER-2。过表达质粒表达 GFP 标签,通道为 FL1,同时用抗 HER-2 的抗体(偶联 APC 荧光素,通道为 FL6)检测 HER-2 的过表达情况。通过图 7 可以看出编辑后的 HeLa 细胞过表达 HER-2,和抗 HER-2 抗体结合率高达 97%(图 7 的右上象限),表明 HeLa HER-2 细胞成功过表达 HER-2 抗原。随后,再将表 3 中吸光度最高的噬菌体单克隆 C6 分别与 HeLa 细胞和 HeLa HER-2 细胞孵育,通过 anti M13 antibody(2 μg/mL)检测结合效率。HeLa HER-2 表达 GFP 标签,通

道为 FL1,M13 抗体偶联 PE 荧光素,通道为 FL2。由图 8 可知,HeLa 细胞与 C6 噬菌体单独孵育,或者 HeLa HER-2 细胞单独加入 M13 抗体,都检测不到 FL2 通道的阳性率(图 8 中具体表现为流式图的右上象限),只有过表达 HER-2 的 HeLa 细胞与 C6 噬菌体共孵育后,再加入 M13 抗体才能通过流式检测到阳性信号值,阳性率高达 93%(图 8 下图的右上象限),证明本研究筛选到的 C6 噬菌体单克隆是抗 HER-2 的单重链抗体。

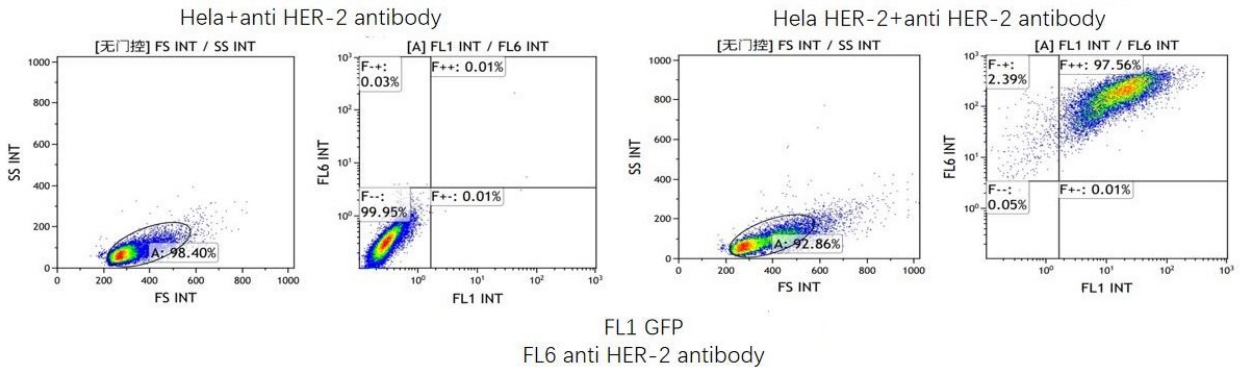


图 7 过表达 HeLa 与抗 HER-2 抗体结合流式图

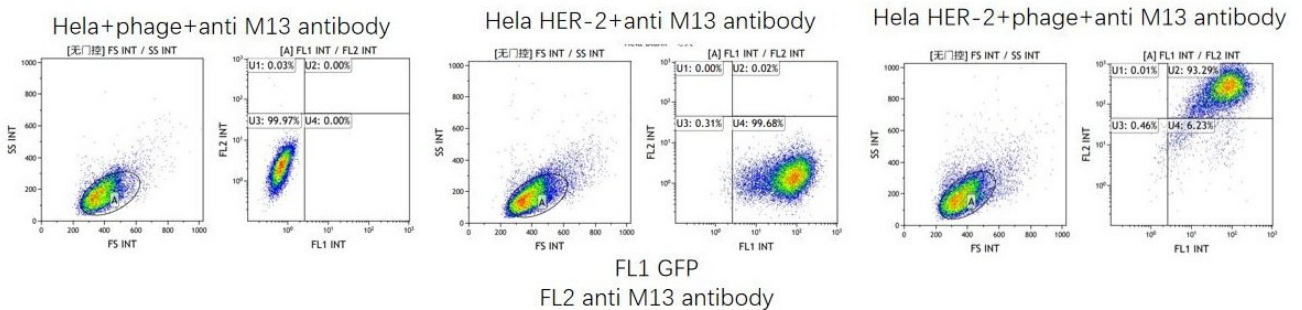


图 8 噬菌体 C6 与抗噬菌体抗体结合流式图

4 讨论

HER-2 已被研究为许多癌症的治疗靶点,包括乳腺癌、肝癌、胰腺癌、结直肠癌、肺癌和泌尿生殖系统癌,以及一般固体癌的肿瘤不可知靶点^[20]。HER-2 的过表达或扩增在不同类型的癌症中变化很大,是潜在治疗策略的目标。但是一些阳性患者对 HER-2 靶向

治疗没有反应或反应不佳,基于 HER-2 的治疗和靶向治疗并没有产生令人满意的结果。因此,迫切需要以低成本开发对 HER-2 具有高亲和力的新抗体。

噬菌体展示技术因其在多种生物科学领域的高效而受到广泛关注,特别是在癌症治疗和诊断方面。该技术利用噬菌体纳米文库,其容量巨大,包含数 10 亿

抗体,使其成为筛选、鉴定和分离抗体的强大工具。全合成人源化抗体纳米文库技术能够通过体外技术筛选高质量、完全人源化的抗体,并进一步增强所选高质量单克隆抗体的生物活性,通过亲和检测技术检测抗体。

本研究的库容为 5×10^{10} ,可以筛选出具有极高亲和力的针对 HER-2 靶标的单克隆抗体。此外,通过利用 ELISA 和流式细胞术分析,研究了 HER-2 抗原和抗 HER-2 噬菌体抗体的结合活性,并用于选择对 HER-2 具有最高亲和力的抗体。本研究用 HER-2 抗原鉴定出具有最高结合活性的最佳候选 C6。随后通过交叉反应实验,检测了本研究抗体与非靶标蛋白的结合情况,数据显示,与非靶标蛋白的交叉反应率低于 1%,而文献报道曲妥珠单抗为 5%,本研究筛选抗体的特异性比曲妥珠单抗高 4 个百分点,因此,筛选抗体对 HER-2 的特异性显著高于曲妥珠单抗,其潜在应用价值在于更高的特异性可减少脱靶效应,降低副作用,提高治疗安全性。因为人源纳米噬菌体抗体不具有亲和力损失的限制且免疫原性的风险较小^[21-22],所以,该抗体可作为 CAR-T 细胞疗法的抗原靶向结构域。CAR-T 相较于曲妥珠单抗,可以通过多靶点设计,增加对肿瘤细胞的识别和杀伤能力,CAR-T 在细胞内表达和工程化设计具有更高的稳定性,能够实现单次治疗实现长期缓解,减少患者的治疗负担,降低脱靶效应,更好克服耐药性问题。

参考文献:

[1] MANIVANNAN A C, DHANDAPANI R, VELMURUGAN P, et al. Phage in cancer treatment-biology of therapeutic phage and screening of tumor targeting peptide[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2022, 19(7): 873-882.

[2] PUNG H S, TYE G J, LEOW C H, et al. Generation of peptides using phage display technology for cancer diagnosis and molecular imaging[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(5): 4653-4664.

[3] 刘碧霞,刘媛,谢静,等.噬菌体展示技术在全人源性抗体发现中的应用[J].*免疫学杂志*, 2023, 39(10): 910-915.

[4] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment: a review[J]. *JAMA*, 2019, 321(3): 288-300.

[5] XIE H, TAN T, LI Q, et al. Revolutionizing HER-2 assessment: multidimensional radiomics in breast cancer diagnosis[J]. *BMC Cancer*, 2025, 25(1): 265.

[6] MALLA R R, NELLIPUDI H R, SRILATHA M, et al. HER-2 positive gastric cancer: current targeted treatments[J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 274(Pt 1): 133247.

[7] AUMAYR K, SOLEIMAN A, SAHORA K, et al. HER2 gene amplification and protein expression in pancreatic ductal adenocarcinomas[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2014, 22(2): 146-152.

[8] GALDY S, LAMARCA A, MCNAMARA M G, et al. HER2/HER3 pathway in biliary tract malignancies: systematic review and meta-analysis: a potential therapeutic

target? [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2017, 36(1): 141-157.

[9] ROBINSON H R, MESSERSMITH W A, LENTZ R W. HER2-positive metastatic colorectal cancer[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2024, 25(5): 585-604.

[10] MARCHIÒ C, ANNARATONE L, MARQUES A, et al. Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 72: 123-135.

[11] WANG N N, CAO Y P, SI C S, et al. Emerging role of ERBB2 in targeted therapy for metastatic colorectal cancer: signaling pathways to therapeutic strategies[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(20): 5160.

[12] MARIN J J G, PEREZ-SILVA L, MACIAS R I R, et al. Molecular bases of mechanisms accounting for drug resistance in gastric adenocarcinoma[J]. *Cancers*, 2020, 12(8): 2116.

[13] MAO P F, WU S X, FAN Y J. Upregulation of exonuclease 1 caused by homology-dependent repair confers cisplatin resistance to gastric cancer cells[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2022, 100(9): 903-914.

[14] LIU Y L, CHEN L L, JIANG D X, et al. HER2 promotes epithelial-mesenchymal transition through regulating osteopontin in gastric cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 227: 153643.

[15] SCHECK M K, HOFHEINZ R D, LORENZEN S. HER2-positive gastric cancer and antibody treatment: state of the art and future developments[J]. *Cancers*, 2024, 16(7): 1336.

[16] KIM I H. Emerging targets for systemic treatment of gastric cancer: HER2 and beyond[J]. *J Gastric Cancer*, 2024, 24(1): 29-56.

[17] NISHIDA N, SAKAI D, SATOH T. Treatment strategy for HER2-negative advanced gastric cancer: salvage-line strategy for advanced gastric cancer[J]. *Int J Clin Oncol*, 2024, 29(9): 1237-1243.

[18] MANIVANNAN A C, DHANDAPANI R, VELMURUGAN P, et al. Phage in cancer treatment-Biology of therapeutic phage and screening of tumor targeting peptide [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2022, 19(7): 873-882.

[19] PUNG H S, TYE G J, LEOW C H, et al. Generation of peptides using phage display technology for cancer diagnosis and molecular imaging[J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(5): 4653-4664.

[20] OH D Y, BANG Y J. HER2-targeted therapies: a role beyond breast cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(1): 33-48.

[21] FRIDY P C, ROUT M P, KETAREN N E. Nanobodies: from high-throughput identification to therapeutic development[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2024, 23(12): 100865.

[22] MINATEL V M, PRUDENCIO C R, BARRAVIERA B, et al. Nanobodies: a promising approach to treatment of viral diseases[J]. *Front Immunol*, 2024, 14: 1303353.

收稿日期: 2025-03-06; 修回日期: 2025-03-25

(本文编辑 覃黎黎)