

A 型流感病毒核蛋白噬菌体单链抗体的原核表达

房师松¹,赵玉梅²,何建凡³,刘涛³,刘建军³,赵树进⁴

摘要:目的 从构建的 A 型流感病毒核蛋白(Nucleoprotein)噬菌体单链抗体库中筛选阳性克隆,在大肠杆菌 HB₂₁₅₁ 中表达流感病毒核蛋白噬菌体单链抗体,为研制 A 型流感病毒免疫渗漏试剂盒建立基础。方法 经过连续三轮固相“亲和-洗脱-富集”筛选,丰富噬菌体抗体库中阳性克隆的比例,采用 ELISA 和 SDS-PAGE 方法对大肠杆菌培养上清液和细菌周质腔蛋白进行分析目的产物。结果 随着淘洗轮数的增加,NP 抗原特异性的噬菌体抗体得到了高度富集,每轮淘洗可以增加 10 倍左右的特异性的噬菌体抗体;从 96 个克隆中筛选到 10 个阳性克隆,其中三个阳性信号较强,分别为 A1、E1 和 C3。其 OD_{450nm} 分别达到 0.469、0.582 和 0.507。结论 利用噬菌体抗体库技术,初步在大肠杆菌中表达了 A 型流感病毒噬体单链抗体。

关键词:噬菌体抗体库;单链抗体;A 型流感病毒;核蛋白

中图分类号:R373.13 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-9727(2005)01-19-03

Expression of phage single chain antibody against nucleoprotein of influenza virus type A in prokaryote. FANG Shi-song¹, ZHAO Yu-mei², HE Jian-fan¹, et al. (1. Food and Bioengineering College of Huanan Science and Engineering University, Guangzhou 510642, Guangdong, P. R. China)

Abstracts: Objective To express the phage single chain antibody against nucleoprotein of influenza virus type A in *E. coli* strain HB₂₁₅₁ by screening the positive clone from the phage antibody library against nucleoprotein, and prepare for the construction of fast leak kit of Influenza virus type A. **Methods** The ratio of positive clone in the phage antibody library was enriched by three-round continual solid panning, ELISA and SDS-PAGE methods were used to analyze the protein secreted in the supernatant and periplasmic. **Results** Along with the increase of rounds nucleoprotein specific phage antibody was highly enriched and the screening efficiency was increased 10 folds than the former round. Ten clones were screened from 96 clones and among the 10, there were 3 stronger positives with OD_{450nm} value of 0.469, 0.582 and 0.507, respectively. **Conclusion** By using phage chain antibody library technique, phage chain antibody library technique, phage single antibody against nucleoprotein of influenza virus type A was preliminary expressed in *E. coli*.

Key words: Phage antibody library; Single chain antibody; Influenza virus type A; Nucleoprotein

抗体工程经历过多克隆血清、单克隆抗体,现在发展到了基因工程抗体时代。目前,抗体工程领域最突出的进展是噬菌体抗体库技术的建立。该技术的出现开创了一条简便而快捷的基因工程抗体生产路线,是基因工程抗体发展史上的里程碑。

噬菌体抗体库技术^[1](phage display antibody library techniques)是指利用 PCR 方法扩增抗体的全套可变区基因,通过噬菌体表面展示技术,把 Fab 段或单链抗体(ScFv)表达在噬菌体表面上,经过“吸附-洗脱-扩增”过程筛选并富集特异性抗体。噬菌体抗体库技术的最明显优点是能够基因型和表现型统一起来。通过噬菌体抗体库技术,对筛选到的阳性克隆直接进行基因序列测序分析,进而推测其蛋白结构以及氨基酸序列,对某些蛋白类似分子的体外模拟提供了直接数据。

本研究在前人研究的基础上,利用噬菌体表面展

示技术,成功制备了 A 型流感病毒核蛋白(NP)噬菌体单链抗体,为下一步 A 型流感病毒免疫渗漏试剂盒的研制打下了科学基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

A 型流感病毒核蛋白(NP)噬菌体单链抗体库由本人构建并保存。大肠杆菌 HB₂₁₅₁、M₁₃K₀₇辅助噬菌体购自瑞典 Amershambiosciences 公司。大肠杆菌 TG1 为深圳市疾病预防控制中心深圳市医学重点实验室-病原微生物参比实验室保存。其他试剂均购自广州基因有限公司。

1.2 方法

1.2.1 单链噬菌体抗体库的 PEG 沉淀 制备的噬菌体抗体库中加入 2mL PEG/NaCl,充分混匀,冰浴 60min。4℃ 10 000g 离心 20min。充上清,沉淀用 16mL 2 × YT 培养基重新悬浮,并用 0.45μm 的微孔滤膜抽滤

作者单位:1. 华南理工大学食品与生物工程学院,广东 广州 510642; 2. 深圳市园林科学研究所,广东 深圳 518003; 3. 深圳市疾病预防控制中心,广东 深圳 518020; 4. 广州军区广州总医院,广东 广州 510642。

作者简介:房师松(1976~),男,博士。主要从事病原微生物快速诊断研究。

后 4℃ 保存备用。

1.2.2 A 型流感病毒 NP 蛋白小鼠全套单链抗体库的固相 panning^[2,3]从建立的 A 型流感病毒核蛋白全套单链噬菌体抗体库中筛选出具有 NP 蛋白结合活性的重组噬菌体抗体,一般要经过三轮固相筛选和富集过程。具体流程如下:在一 50ml 细胞培养瓶内包被 5ml 有 Na₂CO₃ 稀释成 10μg/ml 的 NP 蛋白,4℃ 包被过夜。PBS 洗 3 次,加入 50ml 封闭液,室温封闭 1h。PBS 洗 3 次,加 20ml 上述处理的重组噬菌体到包被好的细胞培养瓶内,37℃ 孵育 2h,用 50ml PBS 洗涤 20 次,再用相同体积的 PBS-Tween 20 重复洗涤 20 次。加入 10ml 对数生长期的大肠杆菌 TG1,37℃ 250rpm 振荡培养 1h,将所有菌液转移到一新的 50ml 离心管中,加入终浓度为 100μg/ml 的 Amp 和 2% 的葡萄糖,加入终浓度 PFU 为 4 × 10¹⁰ 的 M₁₃K₀₇ 辅助噬菌体,37℃ 250rpm 振荡培养 1h。1000g 室温离心 10min,弃上清,沉淀用 10ml 2 × YTAK 培养基小心悬浮,1000g 室温离心 20min 转移上清到一新的 50ml 离心管,将上清进行 PEG/NaCl 沉淀,并计算噬菌体滴度。重复上述固相筛选、富集过程 3 次,每次计算噬菌体滴度和筛选效率。

1.2.3 固相 Panning 后全套单链噬菌体再感染大肠杆菌 TG1 A 型流感病毒核蛋白小鼠全套单链噬菌体抗体库经过三轮固相 Panning 后,加入 10ml 对数生长期大肠杆菌 TG1 到细胞培养瓶。37℃ 250rpm 振荡培养 1h。取出 100μl 菌液用 2 × YT 培养基作 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、梯度稀释。将每个稀释度菌液均匀涂布 SOBAG 培养皿,30℃ 培养过夜。

1.2.4 单链噬菌体抗体库阳性克隆的 ELISA 筛选^[4,5]重组噬菌体再次感染大肠杆菌 TG1,经过 SOBAG 培养基培养过夜后,分离单菌落接种 2 × YT 培养基,经过辅助噬菌体辅助拯救后,产生重组的子代噬菌体。通过抗原(NP)结合,将阳性的重组噬菌体克隆筛选出来,为下一步进行单链抗体原核分泌表达打下基础。具体流程如下:(1)准备 Master 96 孔板 2ml 96 孔板中每孔加入 400μl × YTAG 培养基,挑取分离的单菌落接种于 96 孔板中,30℃ 250rpm 振荡培养过夜;(2)S1 96 孔板的制备在 2ml 96 孔板(S1)中每孔加入 400μl 2 × YTAG 培养基,从 Master 96 孔板中吸取 40μl 菌液接种到 S1 96 孔板,30℃ 250rpm 振荡培养 2h。1500g 室温离心 20min,小心吸弃上清,每孔加入 400μl 2 × YT-AI 培养基,30℃ 振荡培养 16h。1500g 室温离心 20min,转移 320μl 上清液到另一新 2ml 96 孔板(标记 S2);(3)ELISA 鉴定阳性重组噬菌体抗体在 96 孔板中包用 0.05 mol/L Na₂CO₃ 稀释成 10μg/ml 的 NP 蛋白,200μl/孔,同时设 BSA 阴性对照和阳性抗原对照孔,4℃ 包被过夜。倒掉液体,用 300μl/孔的封闭液封闭

96 孔板,同时封闭一新 96 孔板,室温放置 1h,在封闭的 96 孔板中,将(2)制备的重组噬菌体上清与等体积的封闭液混匀,室温放置 30min,阳性对照噬菌体作相同处理。将 200μl 混合液加入到封闭好的 96 孔板,室温放置 2h,倒掉孔中液体,用洗涤液洗涤 5 次,每孔加入 1:5000 稀释的 HRP/Anti-M13 单克隆抗体酶结合物,室温放置 1h。倒掉孔中液体,用洗涤液洗涤 6 次,每孔加入底物液 ABTS 200μl,室温放置 20min,每孔加入 100μl 1M H₂SO₄ 终止颜色反应,酶标仪测量 OD_{410nm}。SOD_{nm}/CK410nm 大于或等于 2 判断为阳性。

1.2.5 A 型流感病毒核蛋白单链噬菌体抗体的原核分泌表达。(1)单链噬菌体阳性克隆的重组噬菌体制备:从 Master 96 孔板中阳性克隆孔吸取 40μl 菌液,接种到灭菌的 1.5ml 的离心管中(含 400μl 2 × YT-AG 培养基和 2.5 × 10⁸ pfu 的辅助噬菌体 M₁₃K₀₇),37℃ 150rpm 振荡培养 2h。1500g 室温离心 20min,小心吸弃上清,沉淀加入 400μl 2 × YT-AK 培养基,37℃ 250rpm 振荡培养过夜。1500g 室温离心 20min,转移上清至干净的离心管。(2)重组阳性噬菌体感染大肠杆菌 HB₂₁₅₁:制备对数生长期大肠杆菌 HB₂₁₅₁,分装到 1.5ml 离心管中,400μl/管。每管加入(1)制备的阳性重组噬菌体 2μl,37℃ 温和间歇振荡培养 30min,接种环划线到 SOBAG-N 固体培养基,30℃ 培养过夜。挑取单菌落接种到 5ml 2 × YT-AG 培养基,30℃ 250rpm 振荡培养过夜,将 5ml 菌液接种到 50ml 2 × YT-AG 培养基中,30℃ 250rpm 振荡培养 1h。1500g 室温离心 20min,小心吸弃上清,沉淀用 50ml 2 × YT-AI 重新悬浮,30℃ 250rpm 振荡培养 16h,将 50ml 菌液分为 2 管,25ml/管,分别作细胞周质腔和全细胞蛋白提取并进行 10% SDS-PAGE 电泳和 ELISA 分析。

2 结果

2.1 A 型流感病毒噬菌体抗体库三轮固相淘洗富集效率 将制备的 A 型流感病毒噬菌体抗体库,经过三轮固相“亲和-洗脱-富集”选择。每次洗脱结束,将洗脱下来的噬菌体进行噬斑实验。结果如表 1。

表 1 亲和选择对噬菌体抗体库的富集效应
Table 1 The enrichment result of phage antibody library by affinity screening

淘洗轮数 Round	加入噬菌体 Phage added	洗脱噬菌体 Phage eluted	富集效率 Result of enrichment
1	2.8 × 10 ¹¹	2.7 × 10 ⁵	0.96 × 10 ⁻⁶
2	1.6 × 10 ¹¹	4.1 × 10 ⁶	2.56 × 10 ⁻⁵
3	1.1 × 10 ¹¹	2.5 × 10 ⁷	2.27 × 10 ⁻⁴

由表 1 可以看出,随着淘洗轮数的增加,NP 抗原特异性的噬菌体抗体得到了高度富集,每轮淘洗可以增加 10 倍左右的特异性的噬菌体抗体。

2.2 A 型流感病毒噬菌体抗体库中阳性克隆的 ELISA 筛选 A 型流感病毒噬菌体抗体库经过三轮固

相亲和淘洗后,重新进行感染大肠杆菌 TG1。将分离的单菌落接种 96 孔板,经过噬菌体辅助拯救后,在培养液中将产生重组特异性的重组噬菌体抗体。通过 ELISA 检测,将阳性 A 型流感病毒噬菌体克隆筛选出来,结果如图 1。

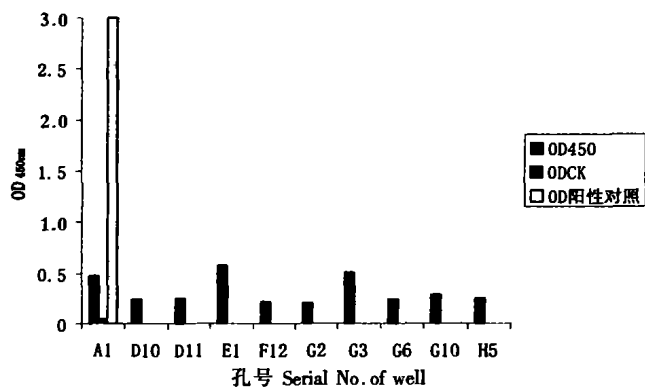


图 1 A 型流感病毒噬菌体抗体库单克隆 ELISA 筛选

Fig.1 The assay of phage antibody library by ELISA

在 1 块 96 孔板中,筛选到 10 个阳性克隆,其中三个阳性信号较强,分别为 A1、E1 和 G3。其 OD_{450nm} 分别到 0.469、0.582 和 0.507。从图 1 可以看出,经过 ELISA 筛选,成功从构建的噬菌体抗体库中筛选到了阳性的重组噬菌体抗体单克隆,结果比较理想。

2.3 A 型流感病毒单链噬菌体抗体在大肠杆菌中的表达 将 ELISA 鉴定结果 OD_{450nm} 最高的单克隆 E1 的噬菌粒重新转染大肠杆菌 HB₂₁₅₁, 经过 IPTG 诱导后在细菌的周质腔和细菌培养液中将产生可溶性的 A 型流感病毒单链噬菌体抗体。

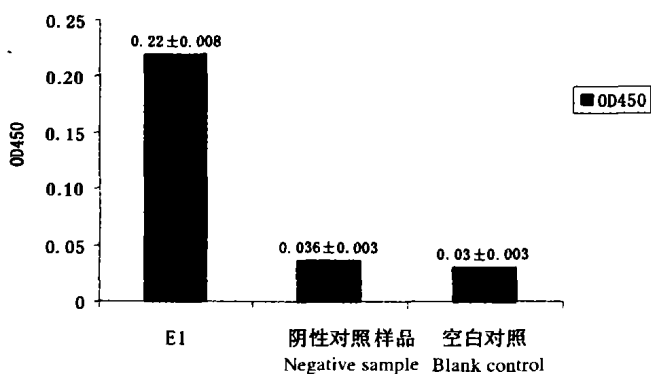


图 2 A 型流感病毒单链噬菌体抗体 ELISA 结果

Fig.2 The ELISA result of phage antibody of influenza virus type A

由图 2 可以看出,阳性噬菌体克隆重新转染大肠杆菌 HB₂₁₅₁ 后经过诱导培养,在细菌培养液中有单链抗体的分泌。其 OD_{450nm} 达到 0.22, 而阴性对照的 OD_{450nm} 为 0.036。但是在细菌培养液中的单链抗体阳性信号比较弱,需要进一步研究单链抗体在细菌周质腔中的可溶表达情况以及诱导表达的时间和具体其他参数。

分别将诱导培养 16h 的细菌培养液上清、细菌周

质腔蛋白提取物和全细胞蛋白提取物进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结果见图 3。

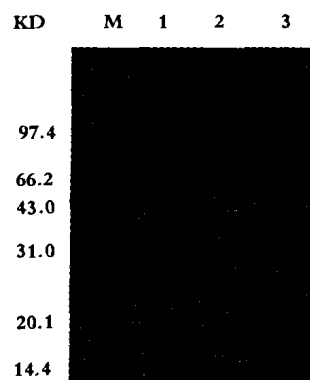


图 3 A 型流感病毒单链抗体 SDS-PAGE 图

Fig.3 The result of SDS-PAGE of single chain antibody of influenza virus type A

M 蛋白分子量标准; 1 阴性对照细菌周质腔蛋白提取物; 2 阳性重组子细菌周质腔蛋白提取物; 3 阳性重组子全细胞蛋白提取物;

M: Standard protein molecular weight; 1. Negative control phage protein extracts; 2. Positive recombinant phage protein extracts; 3. Positive recombinant extracts of phage whole cell protein.

由上图可以看出,细菌周质腔蛋白提取物和全细胞蛋白提取物在分子量 3,200D_r 左右都出现了特异性分子条带,与 A 型流感病毒核蛋白噬菌体单链抗体的理论蛋白分子量相近,而阴性对照细菌没有该条带。初步说明成功的在大肠杆菌 HB₂₁₅₁ 中表达了噬菌体单链抗体。原核表达的噬菌体抗体的特性需要进一步研究和鉴定。

3 讨论

能否从噬菌体抗体库中得到所希望的噬菌体抗体受诸多因素的影响。其中筛选方法的合理应用在很大程度上起着决定作用。筛选方法从最早的是用酶标板包被抗原,以后又改进利用抗原管进行噬菌体抗体库的筛选。目前比较合适的是固相筛选方法,经过 3~5 轮亲和筛选,能够获得比较理想的结果。在固相筛选过程中噬菌体抗回收率的逐渐升高是特异性抗体富集的表现(在本研究中利用固相筛选,每轮亲和富集过程可以得到 10 倍左右的特异性抗体的富集)。

目前还有其他几种筛选方法。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的作用进行噬菌体抗体库的筛选是一种新颖的方法。但是该方法筛选到的噬菌体抗体特异性较差,很难实际应用。在进行噬菌体抗体库筛选过程中,希望获得高亲和力抗体而避开低亲和力抗体,由此研究开发了解离速率筛选方法,但是该方法实际操作比较困难。

从该研究结果看,当噬菌体抗体库容量比较大,目的抗体拷贝数或亲和力比较大时,(下转第 24 页)

后短期内快速产生高水平抗体则是预防的关键。

自 1978 年 Dalsgaard 用 Quil A (*Quillaja saponaria*, *Molima saponins*) 作为口蹄疫疫苗辅佐剂, 相对铝佐剂而言, 它可以产生两种抗体提高动物的免疫活性和 CMI 功效, 然而副作用较大, 可造成较强溶血发生和注射部位反应, 由此限制其使用。然而, 由 *Q-saponaria* 初提取物作为佐剂使用, 如用纯化皂苷替代, 可减轻这种副作用。

从人参 (*P. ginseng* C. A) 根部分离的提取物包括: 皂苷、类萜糖苷等, 其中皂苷 Rb1 被公认为是一类主要的有效成分, 皂苷作为理想佐剂具有以下优点: ① 它们比 *Q-saponaria* 的皂苷具有安全性, 实验动物包括豚鼠、猪和奶牛, 对大动物奶牛而言, 其安全性高于常用的铝佐剂。② 与多数 *Q-saponaria* 相比, 人参皂苷作为佐剂使用完全无溶血现象发生, 由此认为人参皂苷是理想的佐剂。③ 人参皂苷先于抗原使用在免疫豚鼠时发现: 可增加专一性抗体产生, 而先于疫苗使用, 能提高免疫效应 (11)。④ 皂苷对胃和胃分泌均具有安全性, 因而认为可作为口服佐剂使用。

氢氧化铝作为佐剂使用已经成熟, 对 PPV 疫苗而言, 各种动物使用的理想浓度均已知。而人参提取物和皂苷单体作为 PPV 疫苗和一些病原菌疫苗佐剂使用的研究工作刚刚开始, 理想剂量还有待进一步研究。有趣的是, 用人参提取物和 $Al(OH)_3$ 共同与猪细小病毒 (PPV) 疫苗混合后皮下注射豚鼠, 可获得最佳

免疫效果。同样的结果在铝和 *Q-saponaria* 作联合佐剂使用时也有同样的报导, 其作用机制有待进一步研究。然而关于二者联合使用 Riverra 的观点认为: 人参皂苷和铝胶混合后会被铝胶吸附, 形成人参皂苷-铝胶-抗原复合物。该复合物免疫动物后在注射部位缓慢释放出来刺激免疫系统, 引起更强、更持久的免疫反应; 可刺激免疫系统细胞谱的扩大 (与各自单独使用相比), 产生广泛抗体; 复合物也有促进抗原提呈细胞的作用; 同时可产生细胞免疫, 佐剂使用后激活体液免疫和细胞免疫反应对于预防动物感染具有同样重要意义。

人参皂苷 Rb1 和狂犬病疫苗联合使用增加疫苗的免疫效果则未见报道。我们采用人参皂苷 Rb1 协同狂犬疫苗进行免疫后的结果表明, 在人参皂苷 Rb1 的参与下 ICR 小鼠狂犬疫苗特异性和 IgG 抗体出现的时间比单纯疫苗组提前 2 ~ 5d。由于被狂犬咬伤者潜伏期最短 10d, 所以, 人参皂苷 Rb1 的应用有利于控制狂犬病的发生。国外研究表明人参皂苷 Rb1 作为佐剂, 可以提高病毒抗原的免疫原性和增强免疫治疗效果, 本实验结果进一步证实了上述观点。

此外, 研究结果表明加入人参皂苷 Rb1 (1000 μ g) 后免疫三针可达到五针常规疫苗免疫效果, 说明人参皂苷 Rb1 是人用纯化 Vero-细胞狂犬病疫苗的有效辅佐剂。

收稿日期: 2004-08-10

(上接第 21 页)

利用固相筛选方法可以获得比较理想的结果, 可以筛选到高特异性和高亲和力的抗体。

利用噬菌体表达载体 pCANTAB5E 构建噬菌体抗体库, 从理论上讲, 随着培养时间的延长, 目的抗体分泌到细菌培养基中。但是从本研究发现, 在细菌培养基上清中特异性的单链抗体, Western blot 方法水平较低, 所表达的单链噬菌体主要存在于细菌的周质腔中。其中的原因可能是: 所采用的噬菌体表达载体中, 目的基因片段与噬菌体 g III 蛋白融合表达^[6], 而 g III 蛋白为低拷贝的外壳蛋白, 其大量表达对宿主菌具有毒性效应, 因而外源蛋白的表达量较低; 另外, 表达产物分泌在培养基上清中, 容易被菌体蛋白酶降解而影响其稳定性。许多研究学者在实际工作中都发现, 利用噬菌体抗体库技术表达特异性单链抗体, 都需要对细菌周质腔中的蛋白提取物进行变性与复性工作, 保证单链抗体在体外进行正确的折叠, 获得高亲和力的抗体, 这也是本研究下一步主要进行的工作与目标。

参考文献:

- [1] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315 ~ 1317.
- [2] Marks J D, Hoogenboom H R, Bonnert T P, et al. By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage[J]. *J Mol Biol*, 1991, 222: 581 ~ 597.
- [3] Kang A S, Barbas C F, Janda K D, et al. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 4363 ~ 4366.
- [4] Charlton K, Harris W J, Porter A J. The isolation of super sensitive anti hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep[J]. *Biosens Bioelectron*, 2001, 16: 639 ~ 646.
- [5] Tordsson J M, Ohlsson L G, Abrahmsen L B, et al. Phage selected primate antibodies fused to superantigens for immunotherapy of malignant melanoma [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2000, 48: 691 ~ 702.
- [6] Barbasii C F, Kang A S, Lerner R A, et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 7978 ~ 7982.

收稿日期: 2004-10-26