

文章编号:1673-1689(2011)06-0950-06

抗 AFB₁ 单域重链抗体文库淘选方法的研究

刘夏¹, 许杨^{*1, 2}, 涂追¹, 何庆华²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 中德联合研究院, 江西 南昌 330047)

摘要: 比较两种从噬菌体展示文库中淘选抗黄曲霉毒素 B₁ 单域重链抗体的方法, 并为淘选针对小分子物质的单域重链抗体提供参考。采用固相淘选技术, 以黄曲霉毒素 B₁ 人工抗原为靶分子, 淘选天然单域重链抗体库, 分别采用 Gly-HCl 法和 AFB₁ 竞争法洗脱结合噬菌体, 对洗脱物进行滴度测定, 以回收率和富集度为指标, 对两种洗脱方法进行比较。采用 phage-ELISA 法鉴定噬菌体克隆, 并对阳性克隆进行交叉反应分析以及序列测定。滴度测定结果显示, Gly-HCl 法回收率比竞争法高 5~10 倍。分别随机挑取 20 个单克隆进行 phage-ELISA 鉴定, 其中, Gly-HCl 洗脱法未获得阳性克隆, AFB₁ 竞争洗脱法得到 8 个阳性克隆。序列测定结果显示, 这 8 个克隆均编码单域重链抗体。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 单域重链抗体; 噬菌体展示; 天然文库

中图分类号: R 392.1; Q 511

文献标识码: A

Research on Panning Methods of Single-Domain Heavy-Chain Antibody Fragments for Aflatoxin B₁ from Non-Immune Library

LIU Xia¹, XU Yang^{*1, 2}, TU Zhui¹, HE Qing-hua²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The objective of this study was to compare the efficiency of two elute strategies in biopanning of single-domain heavy-chain antibody (HCAbs) phage display library against low molecular hapten, Aflatoxin B₁ (AFB₁). For this, the artificial antigen AFB₁-BSA and AFB₁-OVA were used as ligand to screen the binding phages from an Alpaca non-immune library by antigen-coated solid phase selection. The binding phages were directly eluted with Gly-HCl or competitively eluted with AFB₁ solution. The eluants were tittered separately. It was found that the recovery rate of Gly-HCl is 5 to 10 times higher than that of competition method. Twenty colons randomly picked from each eluant were characterized by phage-ELISA. Eight positive colons were isolated from the eluant by the competition method; however, no positive colons were isolated by Gly-HCl method. The sequencing data show that all the colons are encoding

收稿日期: 2010-11-04

基金项目: 食品科学与技术国家重点实验室目标导向资助项目 (SKLFF-MB-201002); 国家中小企业创新基金项目 (09C26213604449)。

* 通信作者: 许杨 (1951—), 女, 安徽安庆人, 博士, 教授。主要从事食品微生物与生物技术研究。

Email: xuyang@ncu.edu.cn

single-domain HCAs.

Key words: Aflatoxin B₁, single-domain heavy-chain antibody fragments (HCAs), phage display, non-immune library

黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 是真菌的次级代谢产物,主要是由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 和集峰曲霉 (*Aspergillus nomius*) 产生^[1]。它广泛存在于花生、棉籽、玉米、小麦和稻米等农作物中,是目前化学致癌物中最强的一种致癌诱变剂。1993 年 AFB₁ 被 WHO 的癌症研究机构划定为 I 类致癌物,其作用的靶器官主要为肝脏^[2]。目前,常采用酶联免疫吸附法 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 对 AFB₁ 进行快速筛查,该方法需要以单克隆抗体为基础,但单克隆抗体制备过程复杂、周期长、生产成本较高。此外,李井泉等^[3]建立了基于银增强纳米金标记探针技术的 AFB₁ 高灵敏度免疫分析方法,该法的检出限可达 0.002 ng/mL。

目前,噬菌体抗体库技术已经广泛应用于生物、医学等领域,尤其在基因工程抗体的制备方面,发挥着越来越重要的作用^[4]。目前,针对蛋白质等大分子的噬菌体抗体库淘选技术已相对成熟,而针对小分子物质的淘选技术还存在一些技术难题。因此,为了满足不同的淘选要求,人们对传统的筛选方法不断进行改进。例如,在固相淘选过程中,将抗原的特异性抗体与噬菌体文库联合,进行竞争筛选,以获得更高亲和力的噬菌体抗体^[5]。筛选方法的改进始终是噬菌体展示技术发展的动力^[6]。

研究采用 2 种洗脱方法,从天然单域重链抗体库中淘选针对 AFB₁ 的特异性抗体,从回收率、富集度以及阳性克隆率等方面对两种方法进行分析比较,为淘选获得针对小分子物质的抗体提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

辣根过氧化物酶标记的抗 M13 抗体购自 GE Healthcare; AFB₁ 标准品购自 Sigma 公司;天然噬菌体文库 (NA-PDL), AFB₁ 人工抗原 AFB₁-OVA、AFB₁-BSA (AFB₁ 分别与 OVA、BSA 偶联) 由本实验室自制^[7-8];大肠杆菌 TG1,辅助噬菌体 M13K07 由英国剑桥医学研究委员会 (MRC) 分子生物学实验室 Greg Winter 博士惠赠;96 孔酶标板购自 Greiner 公司。

2×YT 液体培养基:16 g 蛋白胨,10 g 酵母提取物,5 g 氯化钠,800 mL 水,用氢氧化钠调 pH 至 7.0,补水至 1 000 mL,121 °C 灭菌 20 min。

LB 液体培养基:10 g 蛋白胨,5 g 酵母提取物,10 g 氯化钠,800 mL 水,用氢氧化钠调 pH 至 7.4,补水至 1 000 mL,121 °C 灭菌 20 min。

LB 固体培养基:10 g 蛋白胨,5 g 酵母提取物,10 g 氯化钠,800 mL 水,用氢氧化钠调 pH 至 7.4,补水至 1 000 mL,加入 20 g 琼脂,121 °C 灭菌 20 min。

LB 半固体培养基:1 g 蛋白胨,0.5 g 酵母提取物,1 g 氯化钠,80 mL 水,用氢氧化钠调 pH 至 7.4,补水至 100 mL,加热溶解后,分装于试管,3 mL/支,121 °C 灭菌 20 min。

氨苄青霉素 (ampicillin, Amp): 储存液 100 mg/mL,工作质量浓度 100 μg/mL,过滤除菌;卡那霉素 (kanamycin, Kana): 储存液 15 mg/mL,工作质量浓度 45 μg/mL,过滤除菌;2×YT/Amp 液体培养基:1 000 mL 2×YT 液体培养基中加入 1 mL 氨苄青霉素储存液;2×YT/Amp/Kana 液体培养基:1 000 mL 2×YT 液体培养基中加入 1 mL 氨苄青霉素储存液和 3 mL 卡那霉素储存液;LB/Amp 固体培养基:1 000 mL LB 固体培养基加入 1 mL 氨苄青霉素储存液,混匀后,分装于灭菌的空平板中,20 mL/块;LB/Glucose/Amp 液体培养基:1 000 mL LB 液体培养基中加入 1 mL 氨苄青霉素储存液和 20 g 葡萄糖 (glucose)。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体文库的淘选 以质量浓度为 100 μg/mL 的 AFB₁-OVA 抗原溶液 (溶于磷酸缓冲液 PBS, pH 值 7.4) 包被 96 孔酶标板,100 μL/孔,4 °C,12 h。弃包被液, PBS 洗板 3 次,每孔加 300 μL 体积分数 3% OVA-PBS 封闭液,37 °C,2 h。PBS 洗板 6 次,加入 100 μL 噬菌体抗体库 (与封闭液混匀,预先在 37 °C 孵育 1 h,约 2×10¹¹ colony-forming unit, CFU), 37 °C,作用 2 h。PBST (含 0.5% Tween20) 洗板 5 次, PBS 洗板 10 次,拍干。然后加入洗脱液 100 μL Glycine-HCl (0.1 mol/L, pH 值为 2.2), 37 °C 孵育 8 min,洗脱特异性结合的噬菌体。用 50 μL Tris-HCl (1 mol/L, pH 值为

8.0) 中和洗脱液,取 10 μL 洗脱物测定滴度,其余洗脱物进行扩增和纯化,用于下一轮亲和淘选。第 2、3、4 轮淘选包被的抗原浓度分别为 75、50 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,包被抗原依次为 $\text{AFB}_1\text{-BSA}$ 、 $\text{AFB}_1\text{-OVA}$ 和 $\text{AFB}_1\text{-BSA}$,封闭液依次为体积分数 3% BSA-PBS 、3% OVA-PBS 和 3% BSA-PBS ,其余淘选步骤与第一轮相同。在竞争洗脱法中,以不同质量浓度的 AFB_1 溶液(质量浓度分别为 7.5、5.0、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)代替 Gly-HCl 作为洗脱液^[9],100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h 后,其余步骤与 Gly-HCl 洗脱法相同。

1.2.2 噬菌体的扩增和纯化 将淘选洗脱物与处于对数生长前期的 *E. coli* TG1 培养物 5 mL 混匀,37 $^\circ\text{C}$,220 r/min 振荡培养 45 min 后,转移至 20 mL $2\times\text{YT}/\text{Amp}$ 液体培养基中,37 $^\circ\text{C}$,220 r/min 振荡培养 2 h,加入 M13K07 辅助噬菌体(感染复数为 20:1),37 $^\circ\text{C}$,静置 15 min 后,220 r/min 振荡培养 30~45 min。将培养物离心(4 $^\circ\text{C}$,3 500 r/min,10 min),细胞沉淀以 25 mL $2\times\text{YT}/\text{Amp}/\text{Kana}$ 液体培养基重悬,30 $^\circ\text{C}$,250 r/min 振荡培养 4~5 h,4 $^\circ\text{C}$,10 000 r/min 离心,10 min,将上清转移至新离心管,加入 1/5 体积 PEG-NaCl 溶液($\text{PEG}8000$,20 g/dL; NaCl ,2.5 mol/L),4 $^\circ\text{C}$,静置 1 h,4 $^\circ\text{C}$,10 000 r/min,离心 20 min,弃上清,沉淀以 200 μL PBS 重悬,即为扩增产物,测定滴度。

1.2.3 噬菌体滴度的测定 接种 *E. coli* TG1 单菌落于 5 mL LB 培养基中,摇床培养至 OD_{600} 达到 0.5。融化 LB 半固体培养基,47 $^\circ\text{C}$ 水浴保温。用 PBS 系列稀释待测噬菌体,分别取 10 μL 与 100 μL 上述 TG1 培养物混匀,37 $^\circ\text{C}$,静置 15 min。将感染细胞加入预温的上层琼脂培养基中,快速混匀,立即倾注于 37 $^\circ\text{C}$ 预温的 LB/Amp 平板上。待平板冷却后,37 $^\circ\text{C}$ 倒置培养过夜,次日计数菌落,按每毫升所含的克隆数计算滴度。

1.2.4 噬菌粒的救援 从第 4 轮测定淘选物滴度的平板上(菌落数 30~200 个),用灭菌牙签随机挑取 20 个单菌落接种于 $\text{LB}/\text{Glucose}/\text{Amp}$,37 $^\circ\text{C}$,220 r/min 振荡培养 12 h。按体积分数 1% 接种量接种于 $\text{LB}/\text{Glucose}/\text{Amp}$,37 $^\circ\text{C}$,220 r/min,培养至对数生长前期。加入辅助噬菌体 M13K07(感染复数为 1:1),37 $^\circ\text{C}$,静置 15 min,220 r/min 振荡培养 30~45 min。4 $^\circ\text{C}$,3 500 r/min,离心 10 min,沉淀以等体积 $2\times\text{YT}/\text{Amp}/\text{Kana}$ 液体培养基重悬,30 $^\circ\text{C}$,剧烈摇动培养 5~8 h。 PEG-NaCl 法纯化噬菌体,方法同 1.2.2。测定噬菌体滴度。

1.2.5 ELISA 鉴定特异性结合的阳性噬菌体克

隆 用 PBS 将 $\text{AFB}_1\text{-BSA}$ 稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4 $^\circ\text{C}$ 包被过夜。 PBST 洗板 3 次,3% 脱脂牛奶,37 $^\circ\text{C}$ 封闭 2 h。 PBST 洗板 3 次,加入 1.2.4 中扩增纯化的噬菌体(PBS 稀释后,与等体积的封闭液混合,37 $^\circ\text{C}$,孵育 30 min),100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^\circ\text{C}$,1 h。 PBST 洗板 5 次,加入辣根过氧化物酶标记的抗 M13 单克隆抗体(3% 脱脂牛奶,1:5 000 稀释),100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^\circ\text{C}$ 作用 1 h。 PBST 洗板 6 次。加入反应底物 TMB 显色液显色,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^\circ\text{C}$,20 min,加入 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ H_2SO_4 (2 mol/L) 终止反应,于 450 nm 下测光密度。用原始肽库包被作为阳性对照,抗原包被加原始肽库作阴性对照,抗原包被加 PBS 作空白对照。阳性克隆判断标准:测试样品 OD 值(S)与阴性对照 OD 值(N)的比值(S/N) ≥ 2.1 。

1.2.6 序列测定与分析 将阳性克隆送至南京金思瑞公司测序,根据核酸序列翻译出氨基酸序列,采用 ClustalW 软件进行多序列比对分析。

2 结果与分析

2.1 文库淘选

2.1.1 竞争洗脱法 经过 4 轮亲和淘选,具有结合活性的噬菌体得到明显富集,回收率提高了约 10^3 倍(见表 1)。

表 1 亲和淘选对噬菌体的富集(竞争洗脱法)

Tab. 1 Enrichment of phages in biopanning (competitive elution method)

淘选轮数	噬菌体投入量/ (CFU)	噬菌体产出量/ (CFU)	回收率/%	富集度
1	1.75×10^{11}	2×10^4	1.14×10^{-7}	—
2	2×10^{11}	7.9×10^5	3.95×10^{-6}	34.65
3	2×10^{11}	6.71×10^6	3.36×10^{-5}	8.51
4	2×10^{11}	7.5×10^7	3.75×10^{-4}	11.16

注:回收率=噬菌体产出量/噬菌体投入量;富集度=后一轮回收率/上一轮回收率。

2.1.2 Gly-HCl 洗脱法 如表 2 所示,经过四轮亲和淘选,能与抗原特异性结合的噬菌体得到了显著的富集,回收率提高了约 10^4 倍(见表 2);第 4 轮的富集度仅为 4.35,提示特异性噬菌体的富集已经达到理想效果,不需要继续进行淘选富集。

2.2 ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆

从第 4 轮测定滴度的平板上分别随机挑取 20 个菌落,共 40 个克隆进行救援和纯化。(AFB₁ 溶液竞争洗脱法菌落编号 $A_1\sim A_{20}$, Gly-HCl 洗脱法菌落编号为 $G_1\sim G_{20}$)利用间接 ELISA 鉴定噬菌体克

粒,40 个纯化后的噬菌体中有 8 个可以与 AFB₁ 人工抗原结合(图 1),并且均为 AFB₁ 溶液竞争洗脱法所得的菌落,8 个阳性克隆分别为 A2、A5、A6、A13、A14、A15、A16、A17。

表 2 亲和淘选对噬菌体的富集(Gly-HCl 洗脱法)

Tab. 2 Enrichment of phages in biopanning (Gly-HCl elution method)

淘选轮数	噬菌体投入量/(CFU)	噬菌体产出量/(CFU)	回收率/%	富集度
1	1.75×10^{11}	2×10^4	1.14×10^{-7}	—
2	2×10^{11}	1.34×10^6	6.7×10^{-6}	58.77
3	2×10^{11}	6.02×10^7	3.01×10^{-4}	44.93
4	2×10^{11}	1.91×10^8	1.31×10^{-3}	4.35

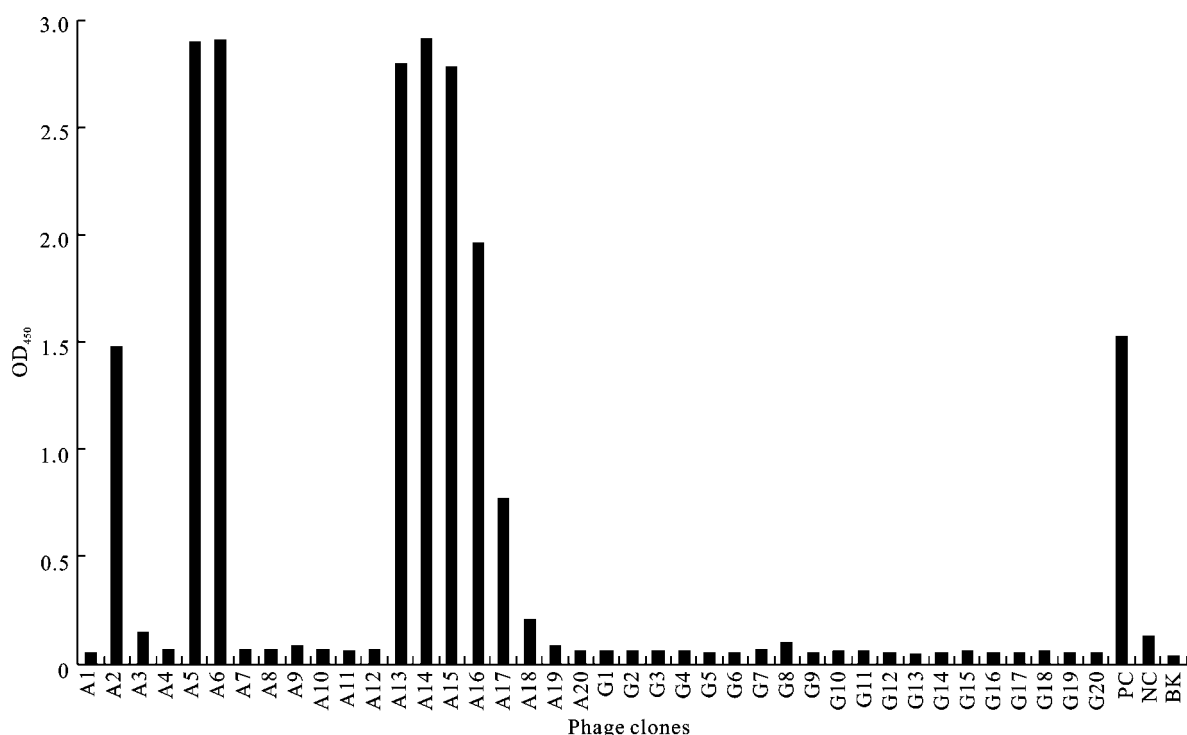
注:回收率=噬菌体产出量/噬菌体投入量;富集度=后一轮回收率/上一轮回收率。

2.3 ELISA 测定阳性克隆交叉反应

分别用 AFB₁-OVA, BSA 和 OVA 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。利用 phage-ELISA 测定阳性克隆与抗原载体蛋白的交叉反应。结果显示, A5 和 A13 与载体蛋白有交叉反应。

2.4 阳性克隆的序列分析

对 6 个阳性克隆(A2, A5, A6, A15, A16, A17)进行测序,将测序结果翻译为氨基酸序列,进行多序列比对,共得到 3 种氨基酸序列(图 3),其中 A2, A6, A15, A17 为同一种序列(Type 1),说明特定序列得到了富集。



A1~A20: AFB₁ 溶液竞争洗脱法洗脱物中挑取的克隆; G1~G20: Gly-HCl 洗脱法洗脱物中挑取的克隆; PC: 阳性对照; NC: 阴性对照; BK: 空白对照

图 1 间接 phage-ELISA 测定噬菌体克隆

Fig. 1 Indirect phage-ELISA for phage randomly picked

3 结 语

文库的容量和多样性直接决定了淘选结果,包括淘选出所需特异性克隆的数量和亲和力。此外,淘选方法的合理应用也在很大程度上起着决定作用。本研究采用 Gly-HCl 法和竞争洗脱法从天然单域重链抗体库中淘选针对 AFB₁ 的单域重链抗

体,并比较了两种洗脱方法对淘选结果的影响。

结果发现, Gly-HCl 洗脱法的逐轮回收率均高于竞争洗脱法,约为后者的 5~10 倍;除第四轮外, Gly-HCl 法的富集度均高于竞争洗脱法;并且进行四轮亲和淘选后,前者的富集度下降为 4.35,而后者仍有较高的富集度(富集度为 11.16)。通过间接 phage-ELISA,未从该洗脱方法所得文库中鉴定得到阳性克隆。综上所述,虽然 Gly-HCl 法的洗脱强

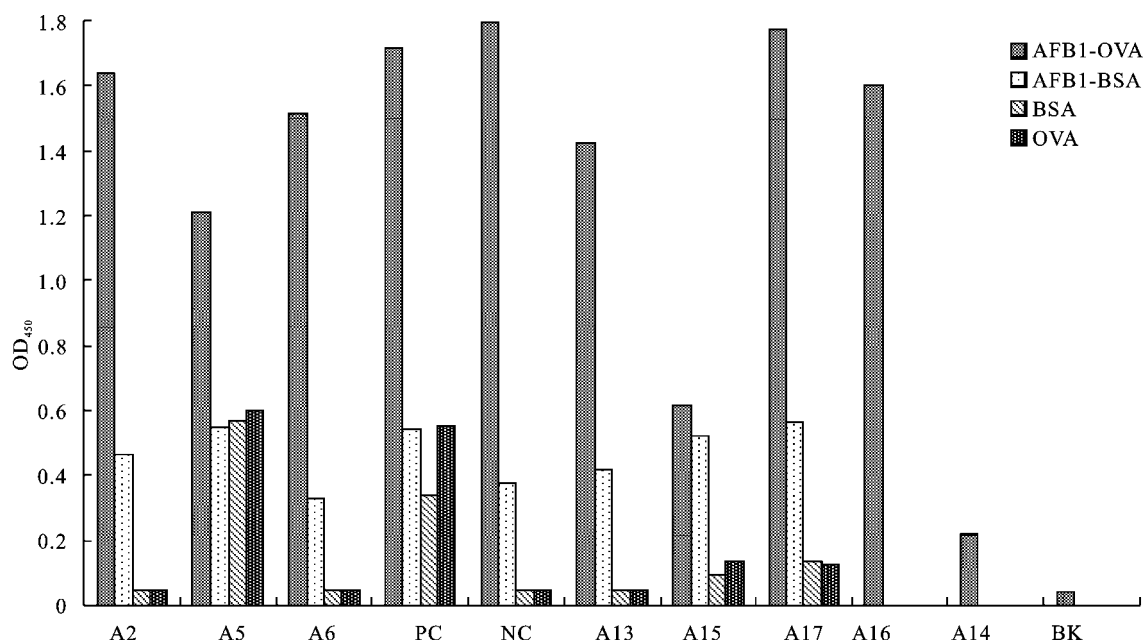


图2 phage-ELISA 测定阳性克隆交叉反应

Fig. 2 Detection for the cross reaction of positive clones by phage-ELISA

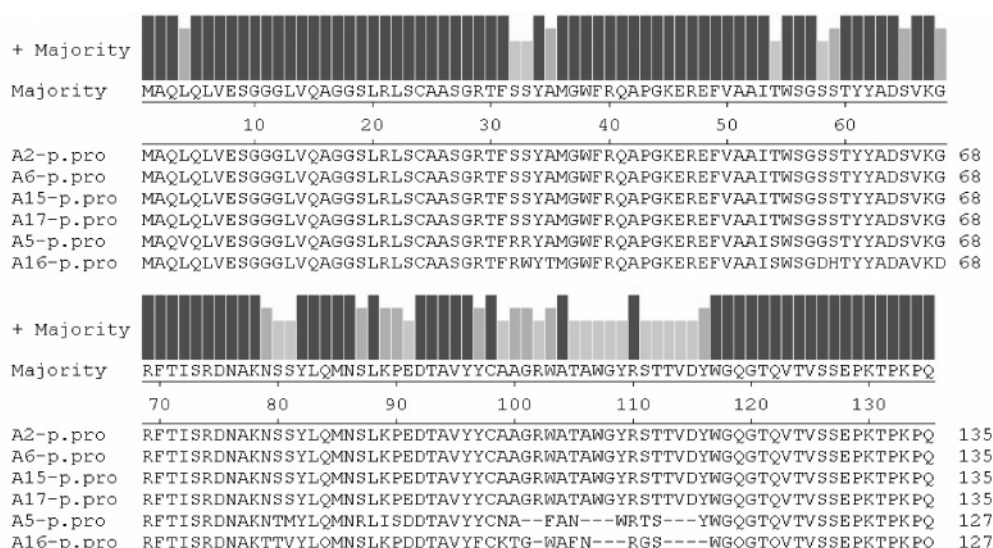


图3 阳性克隆编码蛋白序列比对

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of positive clones

度大且富集效率高,但是洗脱所得到的噬菌体克隆的特异性较差,非目的噬菌体克隆(例如针对载体蛋白的噬菌体)的比率较高,阳性克隆率低。

通过间接 phage-ELISA,从竞争洗脱法所得的文库中鉴定得到 8 个阳性克隆(图 1),阳性克隆率达到 40%,提示竞争洗脱法更有利于目的噬菌体的富集。通过动态解离平衡,竞争洗脱液可以选择性地洗脱结合在包被抗原上的特异性噬菌体克隆,降低了载体蛋白等不利因素的影响。另外,在竞争洗脱的过程中,通过逐轮降低竞争洗脱溶液的浓度实现洗脱严格度的逐步增加,从而使高亲和力的抗体

得到进一步的富集,因此,该法具有较高的特异性。

在竞争洗脱过程中,通过改变游离抗原的浓度,可以洗脱获得具有不同亲和力的抗体。本研究中,通过阳性克隆的交叉反应测定,发现阳性克隆 A5, A13 与载体蛋白 OVA 有较大的交叉反应(图 2);其它阳性克隆虽然未见交叉反应,但与 AFB₁-BSA 的结合力较低,提示这些阳性克隆可能是与抗原 AFB₁-OVA 的部分结构发生特异性结合,而不是特异性识别 AFB₁。针对这一问题,可以进一步降低竞争洗脱液中抗原的浓度,以获得针对 AFB₁ 的高亲和力抗体。

综上所述,笔者认为,虽然 Gly-HCl 法富集效率较高,但是竞争洗脱法的特异性较好,更适于淘选针对小分子物质的噬菌体克隆。

参考文献(References):

- [1] MIGUEL M J, LUCIA M V S, Esuardo S S, et al. Aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in Brazilian corn cultivars[J]. *Sci Food Agric*, 2001, 81: 1001—1007.
- [2] 张东升, 赵晓联. 黄曲霉毒素 M₁ 的危害、污染现状及检测方法进展[J]. 中国卫生检验, 2004, 14(3): 266—269.
ZHANG Dong-sheng, ZHAO Xiao-lian. Advancement in researches of hazards, polluting situation and detecting methods of aflatoxin M₁ [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2004, 14(3): 266—269. (in Chinese)
- [3] 李井泉, 毛秀君, 王周平, 等. 纳米金标记黄曲霉毒素 B₁ 新型检测方法[J]. 食品与生物技术学报, 2002, 26(5): 99—103.
LI Jing-quan, MAO Xiu-jun, WANG Zhou-ping, et al. Nanogold labeling based novel detection method for aflatoxin B₁ [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(5): 675—681. (in Chinese)
- [4] 王刚, 刘玉峰, 王琰, 等. 噬菌体抗体库几种筛选方法的比较[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(16): 1482—1484.
WANG Gang, LIU Yu-feng, WANG Yan, et al. Comparison on panning strategies of phage antibody library[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2001, 22(16): 1482—1484. (in Chinese)
- [5] 吴雯峰, 王双, 孙志伟. 噬菌体展示抗体库筛选技术研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(3): 476—479.
WU Wen-feng, WANG Shuang, SUN Zhi-wei. The advances on screening technology of phage-display antibody libraries [J]. *Letters in Biotechnology*, 2007, 18(3): 476—479. (in Chinese)
- [6] OSBOURN J, JERMUTUS L, DUNCAN A. Current methods for the generation of human antibodies for the treatment of autoimmune diseases[J]. *Drug Discov Today*, 2003, 8(18): 845.
- [7] GENDLOFF E H, CASALW L, RAM B P. Hapten protein conjugate prepared by the mixed anhydride method[J]. *J Immunol Method*, 1986, 92: 15.
- [8] 孙秀兰, 张银志, 汤坚, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 完全抗原构建中结合位点研究[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(5): 99—103.
SUN Xiu-lan, ZHANG Yin-zhi, TANG Jian, et al. Study on the binding site in the construction of AFB₁ complete antigen [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26(5): 99—102. (in Chinese)
- [9] AMIR M, INGER L, KIRSTI G, et al. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin B₁ from naive recombinant antibody libraries[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 254: 169—181.