

白鲢肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶单域抗体 文本库构建及淘选

周文锦, 屈跃宽, 张 葵, 林 洪, 隋建新*

(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 鱼肉中的肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶(myofibril-bound serine proteinase, MBSP)在加工过程中可降解肌原纤维,引起鱼糜制品的凝胶劣化。一种新型特异性高的鲨源抗体——单域抗体(single-domain antibodies, sdAbs),能直接与抗原结合并抑制酶的活性。研究主要完成了针对MBSP单域抗体制备的前期工作:文本库建立及淘选过程,以克隆表达的MBSP为抗原免疫较口鲨鱼(nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*),构建鲨鱼单域抗体文本库,并从中淘选针对MBSP的特异性单域抗体噬菌粒,最终得到31个能与MBSP特异性结合的噬菌粒,为获得抗MBSP单域抗体鉴定了基础,以期抑制或消除MBSP的活性,解决现有鱼糜制品凝胶劣化的问题。

关键词: 肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶;较口鲨;单域抗体;噬菌体展示技术

中图分类号: Q 511 文章编号:1673-1689(2020)03-0087-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.012

Construction and Panning of Single Domain Antibody Library against Silver Carp Myofibrill-Bound Serine Protease

ZHOU Wenjin, QU Yuekuan, ZHANG Yan, LIN Hong, SUI Jianxin*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Myofibril-bound serine proteinase (MBSP) in fish can degrade myofibrils during processing, resulting in gel deterioration of surimi products. A new highly specific shark-derived antibody, single-domain antibodies (sdAbs), binds directly to antigens and inhibits enzyme activity. In this paper, nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) was immunized with expressed MBSP to construct the library of single domain antibody, and 31 phagemids specific to MBSP were panned from the library. The results could provide the basis for the expression and identification of specific single domain antibody which was expected to overcome the gel deterioration of the surimi products by inhibiting or eliminating the activity of MBSP.

Keywords: myofibril-bound serine proteinase, nurse shark, single-domain antibody (sdAbs), phage-display technology

收稿日期: 2018-01-17

基金项目: 2014年泰山学者蓝色产业领军人才团队支撑计划项目(鲁政办字[2005]19号);现代农业产业技术体系专项经费资助项目(CARS-47)。

* 通信作者: 隋建新(1981—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事水产品加工及贮藏工程方向研究。

E-mail: suijianxin@ouc.edu.cn

鱼糜制品是我国淡水鱼加工的一个重要的方向,而凝胶劣化是当今影响鱼糜制品质量的主要因素之一^[1-3]。最早日本学者研究发现^[4],鱼类肌肉组织中的肌原结合型丝氨酸蛋白酶(myofibril-bound serine proteinase, MBSP)是鱼糜制品在 50~65 °C 下长时间加热而引起凝胶强度下降的主要原因。MBSP 在一定的温度条件下可降解肌原纤维中的肌球蛋白重链,同时对 α -辅肌动蛋白、肌动蛋白和原肌球蛋白产生降解现象。由于 MBSP 广泛存在与鱼类肌肉组织中,鱼糜生产过程中经漂洗也无法去除,严重制约了鱼糜制品行业的发展,目前针对 MBSP 抑制的研究主要分两类:1)针对 MBSP 所在丝氨酸蛋白酶家族的抑制:如卵清蛋白^[5]、动物血浆蛋白^[6]、马铃薯淀粉^[7]、豆类胰蛋白酶抑制剂^[8]等均能显著抑制丝氨酸蛋白酶活性,但由于其成本高、影响鱼糜制品颜色和风味,不利于人体消化吸收等缺陷限制了其在实际生产中的应用;2)针对 MBSP 特异性抑制剂:此类抑制剂研究较少,主要是鱼体内的内源性葡萄糖-6-磷酸异构酶(GPI)对 MBSP 的抑制作用^[9-11],这些 GPI 只对同类鱼的 MBSP 具有抑制作用,不具备广谱特异性。由于 MBSP 抑制剂的匮乏,现阶段鱼糜生产大都采用添加谷氨酰胺转氨(TG)酶^[12]的方式提高鱼糜制品的凝胶强度,但 TG 酶催化作用对加工条件要求较高,还需要添加非肌肉蛋白共同作用以提高效果,影响了鱼糜本身属性^[13]。因此研究开发安全、高效,可以在加工过程直接作用于 MBSP 的新型广谱特异性抑制剂,实现对鱼糜制品凝胶劣化的控制,对整个鱼糜制品产业的发展具有重要的推动作用。

单域抗体(single-domain antibody, sdAbs)是近年来通过基因工程技术,从骆驼科动物和软骨鱼类血清中,克隆获得的仅保留重链可变区且仍具有抗原结合活性的新型抗体^[14]。单域抗体的制备不同于传统抗体,存在单域抗体文库情况下,通过噬菌体展示技术^[15](phage display technology)淘选特异性噬菌粒,通过基因工程对特异性噬菌粒插入的基因进行克隆表达,从而获得特异性抗体分子。与传统抗体相比,除了能与抗原特异性识别外^[16-17],单域抗体最大的优点在于其与抗原物质特异性结合后可直接抑制抗原活性。根据以上特性,单域抗体用于致病菌的抑制、毒素的中和,蛋白酶活性的抑制等方面已有报道并展现出良好的应用前景。Dolk 等在

洗发香波中加入抗糠秕马拉色氏霉菌特异性单域抗体可有效治疗由糠秕马拉色氏霉菌引起的皮下感染^[18];Hmila 和 Anderson 等筛选出针对蓖麻毒素、肉毒梭菌神经毒素的单域抗体后,不仅可以用于检测还可以用于中和毒素^[19];Koch-Nolte F 等从驼源抗体库中淘选得到针对毒素相关胞外酶 ART2.2 特异性单域抗体,能在体内直接抑制 ART2.2 细胞毒素与酶活性^[20]。

根据单域抗体的以上特性,本文作者旨在建立一个抗 MBSP 天然单域抗体文库,借助噬菌体展示技术,通过 MBSP 从文库中淘选得到特异性噬菌粒,为下一步获得抗 MBSP 单域抗体奠定基础,以此抑制或消除 MBSP 的活性,解决现有鱼糜制品凝胶劣化的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、噬菌粒 pHEN2 噬菌粒载体、*E.coli* TG1、*E.coli* BL21 (DE3)、pET-28a 质粒均由实验室保存。

1.1.2 主要仪器与试剂 JY88-II 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司产品;Tanon-4200SF 凝胶成像及分析系统,上海天能公司产品;Power Wave XS 酶标仪,美国 Biotek 公司产品;HZQ-F280 全温振荡培养箱公司产品,太仓市华美生化仪器厂制造。

限制性内切酶 (*Nde* I、*Xho* I、*Nco* I 和 *Not* I): NEB 公司产品;QIAGEN 柱式胶回收纯化试剂盒: QIAGEN 公司产品;兔源抗组氨酸多克隆抗体,HRP 标记的山羊抗兔 IgG:生工生物工程(上海)股份有限公司产品;Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶: TaKaRa 公司产品;卡那霉素、氨苄霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(简称 IPTG)、咪唑,北京索莱宝生物技术有限公司产品。其他常规试剂均为国产分析纯。

自配试剂:2xYT/A100/G2: 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素和质量分数 2%葡萄糖的 2xYT 培养基; LB/K30/C34: 含有 30 μ g/mL 卡那霉素和 34 μ g/mL 氯霉素的 LB 培养基;2xYT/A100/G1: 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素和质量分数 1%葡萄糖的 2xYT 培养基; 2xYT/A10 0/K50: 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 50 μ g/mL 卡那霉素的 2xYT 培养基;2xYT/A100/ K50/G0.1: 含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素和 50 μ g/mL

卡那霉素,质量分数 0.1%葡萄糖的 2xYT 培养基; Binding buffer:8 mol/L Urea,50 mmol/L Tris,300 mmol/L NaCl,pH 8.0;Elut ion buffer:8 mol/L Urea,50 mmol/L Tris,300 mmol/L NaCl,20/50/500 mmol/L Imidazole, pH 8.0。

1.2 方法

1.2.1 MBSP 表达载体的构建 鱼体肌肉中的 MBSP 与肌原纤维结合紧密且含量低,直接提取困难,相关研究大都采用重组表达的 MBSP^[21],本实验根据 Gen Bank 数据库中白鲢鱼 MBSP 的基因序列(核苷酸序列号为 EU661606)预测其理论相对分子质量为 2.7×10^4 ,并以此为模版设计引物(见表 1),PCR 扩增目的基因。

将 MBSP 目的基因与载体质粒 pET-28a 用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,纯化双酶切产物,通过 T4 连接酶 16 °C 过夜连接,利用热击法将重组质粒导入 Rosetta(DE3)感受态细胞中,在 LB/K30/ C43 固体培养基上筛选阳性克隆单菌落,提取质粒,酶切并测序鉴定。

1.2.2 融合蛋白的诱导表达以及纯化 将鉴定正确的阳性单克隆菌株接种于 LB/K30/C34 液体培养基,37 °C 过夜振荡培养,取 100 μ L 培养液接种到 10 mL 的 LB/K30/C34 液体培养基中,37 °C 振荡培养至 $OD_{600}=0.6$,添加终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 分别在 20 °C 过夜和 37 °C 下 4 h 培养诱导,同时以未加 IPTG 的作为阴性对照。

离心收集诱导表达的菌体,用 500 μ L PBS (pH 7.4)缓冲液悬浮,超声破碎 6 min(超声 0.5 s 间隔 1.5 s),离心收集上清液和沉淀,沉淀用 500 μ L 包涵体溶解液(8 mol/L Urea,50 mmol/L Tris-HCl,300 mmol/L NaCl,pH 8.0)溶解,12% SDS-PAGE 电泳鉴定表达效果,以此确定最佳的诱导条件。

按照上述确定的最佳条件大量表达重组菌 pET 28a-MBSP,将得到的粗蛋白液进行纯化。取 5 mL Ni-IDA 装柱,用 Binding buffer 清洗平衡柱子,将粗蛋白液过 0.22 μ m 膜后上柱,收集流出液。用 Binding buffer 清洗未结合组分,收集流出液。用不同浓度的 Elution buffer 洗脱,收集流出液。将收集的流出液进行 12%SDS-PAGE 鉴定,确定最佳洗脱条件。将纯化后的蛋白液在含有质量分数 0.1% SKL 的 PBS(pH 7.4)中 4 °C 透析 16 h,再在 PBS(pH 7.4)中透析 4 h,离心取上清,测定其浓度,经 12%SDS-PAGE

表 1 MBSP 基因扩增所需引物

Table 1 Primers of target gene

引物序号	引物序列(5'-3')
X3213-1	GACACGACACCATATGGATGAA
X3213-2	ACATTTCATAGCCGCCTATTATTTTCATCCATATGCTGTCGT
X3213-3	AATAGGCGGCTATGAATGTAAACCACATAGCCA GCCGTGG
X3213-4	TTTGTTATCAACCAGGTAAGCCTGCCACGGCTG GCTATGT
X3213-5	GCTTACCTGGTTGATAACAAATTCAGCTGCCGGCG GTAGCC
X3213-6	GCTAACAAACCAACGGTTGTTGATCAGGCTACC GCCGCAG
X3213-7	ACCGTTGGGTTGTTAGCGCGGCGCACTGCACCTT CAGCCG
X3213-8	ACCCAGGTGAACGCTCAGTTTGTACGGCTGAAG GTGCAG
X3213-9	GAGCGTTCACCTGGGTCGTCCTCTCTGCAGACC AACGAA
X3213-10	ACTTTGATTTTCTGGCCGGTGTTTTCGTTGCTCTG CAGAG
X3213-11	CGGCCAGAAAATCAAAGTTGAAAAAATCATCCC GTTCCCG
X3213-12	TTGTGCGGACGATCGTTGTATTTTCGGAACGGGA TGATTT
X3213-13	ACGATCGTCCGCACAACAACGATATCATGCTTAT CAAACT
X3213-14	TGAAGGTAACCGGTTTTCAGTTTGATAAGCAT GATATCGT
X3213-15	GAAAAAACCGGTTACCTTCAACAAATACGTTAA ACCGATCC
X3213-16	GGGCATTTTTCGGCAGACGGATCGGTTTAACGT ATTTGT
X3213-17	CTGCCGAAAAAATGCCCGAGCGTTGGCGAAAAA TGCCTGG
X3213-18	CCGCGGTACGACCCCAACAGAAACAGGCATT TTTGCC
X3213-19	GGTCTGACCGCGCGGCGAGCGGAGCGTTCT GCAGTGC
X3213-20	CTGAGACAGAACCGGCAGGTTTCAGGCACTGCAG AACGCTC
X3213-21	GCCGCTTCTGTCTCAGCGTACCTGCAAACGTGCG TACAAA
X3213-22	AACATATTTTGGTGATGATCTTTTGTACGCACG TTTGC
X3213-23	AAGATCATCACCAAAAATATGTTCTGCGCGGGC TTCATCA
X3213-24	CCCTGGCAGCTATCTTACCGCCTTTGATGAAGC CCGCGC
X3213-25	GTAAAGATAGCTGCCAGGCTGATTCTGGTGGTCC GGTGT
X3213-26	ACGCCTTTCAGCTGACCGCCGCAACAAACCGGA CCACCAG
X3213-27	GTCAGCTGAAAGGCGTTGTTTCTTCGGCAACGG ATGCGC
X3213-28	TGTAAACGCCCGGATATTTTCGGTTTCGCGCATCC GTTGCC

和 Western blot 鉴定后-80 ℃保存。

1.2.3 鲨鱼免疫与免疫应答分析 称取 200 μg MBSP 溶解于 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中,与等量的弗氏完全佐剂充分混合后,于成年鲛口鲨鱼侧鳍处皮下散点注射,每隔 2 周更换弗氏不完全佐剂以同样剂量加强免疫 1 次,总共加强免疫 3 次,取免疫后鲨鱼血浆进行间接 ELISA 分析其对 MBSP 的免疫应答情况。

1.2.4 单域抗体文本库的构建与鉴定 鲨鱼免疫应答成功后,提取外周血液淋巴细胞用 TRIzol 法提取 RNA,逆转录成第一链 cDNA,根据引物(表 2)扩增鲨鱼新抗原受体 (new or nurse shark antigen receptor, NAR)可变区片段,回收纯化目的片段;将 VNAR 片段与载体 pHEN2 用 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切,经 T4 连接酶构建重组噬菌粒,利用电击法将重组噬菌粒 pHEN2-VNAR 电转入新鲜制备的感受态大肠杆菌 TG1,梯度稀释后涂布到 2xYT/A100/G2 固体培养基,计算库容量,随机挑取 30 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定。刮取培养基上菌落,悬浮于有质量分数 15%甘油的 2xYT 液体培养基中,分装-80 ℃保存。

表 2 抗体可变区引物

Table 2 Primers of target gene

引物序号	引物序列(5'—3')
GcNAR-Fr1F1	ATA ATA AGG TCC ATG GCT CGA GTG GAC CAA ACA CCG
GcNAR-Fr4R1	ATA ATC AAG CTT GCG GCC GCA TTC ACA GTC ACG ACA GTG CCA CCT C
GcNAR-Fr4R2	ATA ATC AAG CTT GCG GCC GCA TTC ACA GTC ACG GTG CCA TCT C

1.2.5 噬菌体展示技术淘选针对 MBSP 的特异性噬菌 粒噬菌体展示过程:将转化菌液接种至 2xYT/A100/G2 液体培养基,37 ℃振荡培养至对数生长期,加入 M13K07 辅助噬菌体。37 ℃静置水浴 30 min,离心去上清液,用 2xYT/A100/K50 液体培养基重悬沉淀,30 ℃振荡过夜培养。离心取上清液,按照 4:1 体积比例加入 PEG/NaCl 溶液冰浴至少 1 h,离心去上清液并用无菌 PBS(pH 7.4)重悬噬菌体沉淀,再次离心去除细菌碎片沉淀,所得上清即得原始噬菌粒文库。

淘选过程:添加 4 mL 的 MBSP (PBS 稀释至 100 μg/mL)到免疫管中,4 ℃包被过夜。PBST 洗管后,用 5 mL 含 3 g/dL 脱脂奶粉的 PBS (MPBS)封

闭,37 ℃孵育 2 h。PBST 洗管后,加入 3 mL 的 MPBS 和 1 mL 原始噬菌粒文库,旋转振荡 1 h,静置 1 h。弃掉噬菌体文库,PBST 洗管。用 1 mL 的三乙胺 (100 mmol/L) 洗脱结合在免疫管上的噬菌粒,并加入 0.5 mL 的 Tris-HCl(1 mol/L,pH 7.4)中和洗脱液。再加入 250 μL 的 Tris-HCl(1 mol/L,pH 7.4)溶液于免疫管中,冲洗离心管壁中残留的噬菌体,合并 2 次洗脱噬菌粒溶液,加入甘油-80 ℃保存。取 750 μL 第 1 次洗脱下噬菌粒溶液感染 15 mL 的 TG1 菌液,37 ℃水浴 30 min。取 100 μL 梯度稀释后,涂布于 2xYT/A100/G2 固体培养基,用于计算滴度。剩下感染液离心弃上清液,用 500 μL 的 2xYT 液体培养基悬浮沉淀,涂布于 2xYT/A100/G2 固体培养基上,30 ℃过夜培养。

过夜生长后,向平板中加入 5 mL 的 2xYT/A100/G2 液体培养基,刮取细菌菌落。取 100 μL 菌液接种于 50 mL 的 2xTY/A100/G2 液体培养基中,剩余菌液加入甘油-80 ℃保存。将培养液按照上述噬菌体展示过程操作,得到的噬菌粒溶液即为第 1 次淘选噬菌粒文库。取 1 mL 噬菌粒溶液用于下一轮淘选,剩下的加入甘油-80 ℃保存。随后降低包被抗原质量浓度为 10、1 μg/mL,分别重复上述淘选过程与噬菌体展示过程,总共进行 3 轮淘选。

1.2.6 特异性噬菌粒的多克隆 ELISA 鉴定 每孔加 100 μL 的 MBSP (用 PBS 稀释至 10 μg/mL)包被 96 孔酶标板,4 ℃过夜。弃包被液,PBST 洗板 3 次,每孔加入 200 μL MPBS,37 ℃封闭 2 h。弃封闭液,PBST 洗板 3 次,加入 100 μL/孔 MPBS 和 10 μL/孔 3 轮淘选的噬菌粒文库,37 ℃孵育 1 h。PBST 洗板 3 次,每孔加入 100 μL HRP/anti-M13(用 PBS 按 1:5 000 稀释),37 ℃孵育 1 h。PBST 洗板 3 次,按 100 μL/孔加入 TMB 显色液,37 ℃孵育 10 min 显色,按 50 μL/孔加入 2 mol/L 硫酸终止反应,酶标仪在 450 nm 下读值。以原始噬菌粒文库作为阴性对照。

1.2.7 特异性噬菌粒的单克隆 ELISA 鉴定 单克隆噬菌粒扩增:选择 3 轮滴度测定平板,随机挑取 96 个单菌落至 96 孔细胞培养板,加入 200 μL 2xYT/A100/G2 液体培养基,37 ℃过夜振荡培养。隔日从培养板每孔取 10 μL 菌液转移到新的 96 孔细菌培养板对应位置,加入 200 μL 的 2xYT/A100/G2 液体培养基,37 ℃培养 2 h。加入 M13K07 辅助噬菌体 37 ℃振荡培养至少 1 h,离心去上清液,每孔

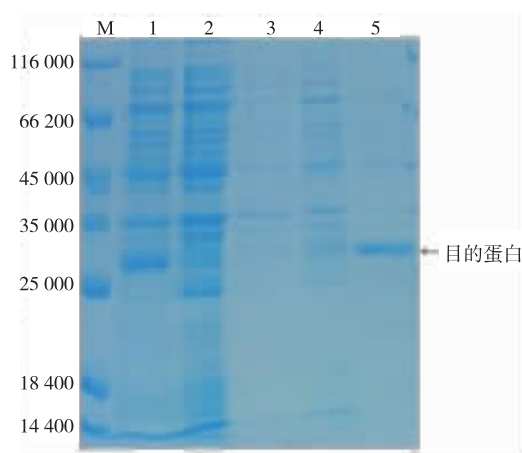
用 200 μ L 2xYT/A100/K50/G0.1 液体培养基重悬菌液,30 $^{\circ}$ C培养过夜。隔日离心,取上清液。

ELISA 鉴定:每孔加 100 μ L 的 MBSP(用 PBS 稀释至 10 μ g/mL) 包被 96 孔酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST 洗板 3 次,每孔加入 200 μ L MPBS,37 $^{\circ}$ C封闭 2 h。PBST 洗板 3 次,加入 50 μ L 的 MPBS 和 50 μ L 培养板离心后上清液,37 $^{\circ}$ C孵育 1 h。随后步骤与 1.2.6 中 ELISA 步骤一致,以 OD₄₅₀ 值是阴性对照的 2 倍为标准,挑选阳性噬菌粒。

2 结果与分析

2.1 MBSP 最佳诱导条件的确定

经 20 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 诱导表达后,20 $^{\circ}$ C 诱导条件下没有出现目标蛋白质条带,37 $^{\circ}$ C 诱导条件下的上清液与沉淀均在 2.7×10^4 处均有明显的蛋白质条带,沉淀中的表达量显然多于上清液中,说明目的蛋白质主要以包涵体形式在沉淀中,见图 1。为了得到大量的 MBSP,选择 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 作为诱导表达的条件。



M:Protein Marker;1:诱导前总蛋白质;2:20 $^{\circ}$ C 上清液;3:20 $^{\circ}$ C 沉淀;4:37 $^{\circ}$ C 上清液;5:37 $^{\circ}$ C 沉淀

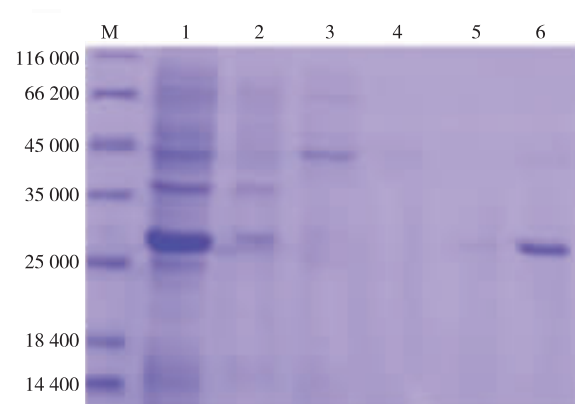
图 1 重组蛋白 MBSP 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 Endolysin expression of MBSP detected by SDS-PAGE

2.2 MBSP 的纯化与鉴定

表达的 MBSP 带有 his(组氨酸)标签,通过镍离子金属亲和层析柱时能与填料结合,再用高浓度的咪唑洗脱下来。收集洗脱下的溶液进行 SDS-PAGE 分析(图 2)。由图可见,当咪唑的浓度为 500 mmol/L 时,有大量的目的蛋白被洗脱。将纯化后的 MBSP 进行 SDS-PAGE 及 Western Blot (抗 his 标

签的兔抗及 HRP 标记的羊抗兔抗体)的检测,如图 3 所见,得到 MBSP 蛋白质。



M:Protein marker;1:上样液;2:流出液;3:20 mmol/L 咪唑洗脱组分;4:50 mmol/L 咪唑洗脱组分;5:200 mmol/L 咪唑洗脱组分;6:500 mmol/L 咪唑洗脱组分

图 2 镍琼脂糖亲和层析纯化 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 Purification of recombinant endolysin by Ni-IDA

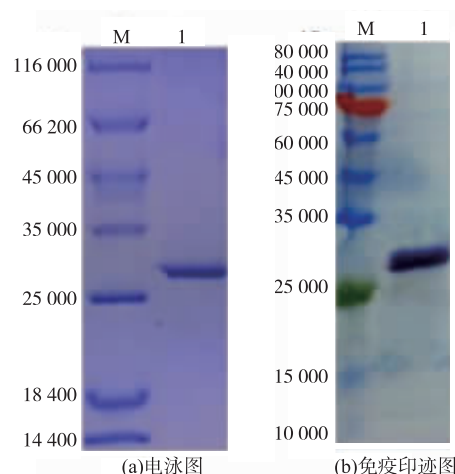


图 3 纯化后 MBSP 蛋白电泳及免疫印迹图

Fig. 3 SDS-PAGE and western blot of MBSP

2.3 鲨鱼的免疫应答分析

已有研究证明软骨鱼类与其他下颌脊椎动物有共同的祖先,它们具有包括免疫球蛋白(Ig),T 细胞受体和 MHC 的免疫系统。抗原免疫较口鲨后,会在第一时间产生体液应答,对应的淋巴 B 细胞反应产生针对抗原的 IgNAR^[22]。如图 4 所示,随着较口鲨的 3 次免疫进行,血浆对 MBSP 存在结合反应。这证明 MBSP 免疫较口鲨后,于其体内产生了特异性的抗体。

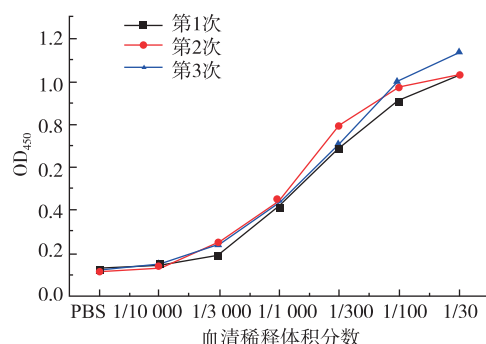


图4 鲨鱼血清结合反应分析

Fig. 4 Analysis of serum binding

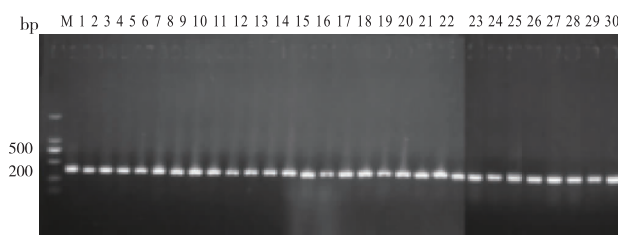
2.4 单域抗体文库的构建与鉴定

噬菌体展示技术常被用于抗体工程中,在噬菌体展示文库中对特定抗原的特异性抗体的筛选。IgNAR的可变区由于体细胞高突变而高度多样化^[23-24],因此已有研究利用铰口鲨、须鲨(*Orectolobus maculatus*)、白斑角鲨(*Squalus acanthias*)和大星鲨(*Mustelus canis*)的IgNAR的可变区,成功构建噬菌体展示文库^[25]。单域抗体文库质量的好坏决定着噬菌体展示能否顺利进行,其质量好坏主要取决于文库库容大小、插入率与文库的多样性。通过PCR后电泳结果(图5)显示,30个单菌落扩增后均得到与插入基因片段大小一致,约400 bp的产物,说明文库的正确插入率为100%。经计算本实验所制备的文库的库容达到 4.7×10^7 ,达到建库要求(一般为 10^7)。虽然没有深入探究其多样性,但是根据以往研究显示,相对于人工合成库,免疫文库多样性完全能够保障淘选出多样性的抗体,综上所述,得到了一个高质量的针对MBSP的单域抗体文库,为接下来的淘选提供了保障。不仅如此,鲨鱼的VNAR区和骆驼重链可变区片段(variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody, VHH)虽然都来源于天然存在的重链抗体,但不同于骆驼VHH结构域,VNAR结构域与轻链和T细胞受体比其他的VH结构域更具有相似性和抗原结合能力^[26-29]。

2.5 特异性噬菌粒的多克隆ELISA鉴定

淘选过程是从所制噬菌体展示文库中,固定抗原结合特异性噬菌粒,从而富集特异性单域抗体基因的过程。为了得到特异性高的噬菌粒,淘选一般进行3轮,每轮淘选可以纯化约4~10倍^[30]。淘选过程决定着得到的抗体基因的特异性高低,本文淘选过程采用免疫管代替常用96孔酶标板,扩大了淘

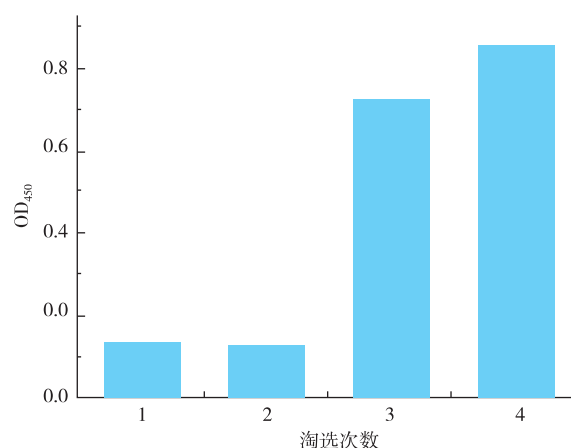
选的规模,提高了特异性噬菌粒结合的可能性。间接ELISA结果显示(图6)相同抗原浓度下,第1轮淘选后OD₄₅₀值与阴性对照没有显著差异,说明噬菌粒结合能力较弱,但2、3次淘选后,OD₄₅₀值明显高于阴性对照,且3轮OD₄₅₀值呈递增趋势,说明MBSP结合上的特异性噬菌粒逐渐增多。这与Jinny L. Liu等人^[31]研究相同,证明伴随淘选过程中抗原浓度的降低,淘选得到的特异性噬菌粒对抗原的结合逐渐增强。



M:DNA marker DL2000;1~30:随机挑取单菌落

图5 菌落PCR鉴定初级文库

Fig. 5 Colony PCR analyses of randomly picked colonies from NAL



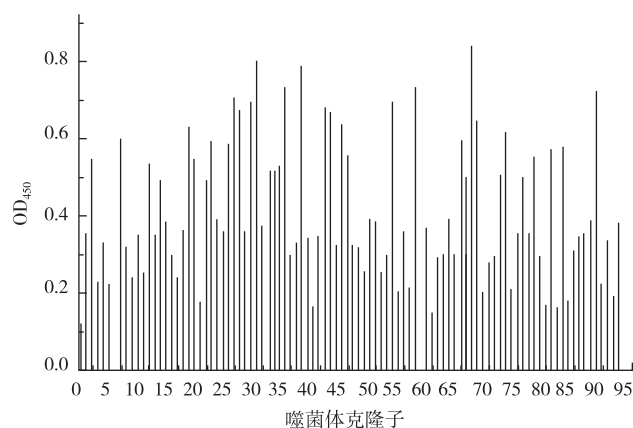
1:原始文库;2:第1轮淘选;3:第2轮淘选;4:第3轮淘选

图6 Phage-ELISA测定噬菌体

Fig. 6 Phage-ELISA for amplified phage library from each round of panning

2.6 特异性噬菌粒的单克隆ELISA鉴定

将MBSP作为抗原,用间接ELISA验证96个噬菌粒的特异性。以OD₄₅₀值>阴性对照2倍(0.4)作为标准,挑选特异性高的噬菌粒,即与抗原结合能力最强的噬菌粒。由图7可见,96个噬菌粒中有31个OD₄₅₀值>0.4,阳性率为32.3%,即有31个对MBSP有高结合能力的特异性噬菌粒,为后续分离特异性高的噬菌粒中VNAR基因,进行表达与纯化,得到针对MBSP的特异性单域抗体奠定了基础。



1: 阴性对照; 2-96: 随机挑取单菌落

图7 Phage-ELISA 测定噬菌体单克隆子

Fig. 7 Phage-ELISA for phage clones randomly picked from the panning

3 结 语

作者以 MBSP 作为抗原免疫鲛口鲨,经验证免疫后血浆与抗原具有良好结合反应。通过 PCR 技术从鲛口鲨血液淋巴 B 细胞中获得单域抗体基因,构建单域抗体文库。该免疫文库通过实验的验证,大小、插入率及多样性良好。借助噬菌体展示技术,固定 MBSP 从单域抗体文库中淘选出能与其特异性结合的噬菌粒,为后续快速获得特异性抗 MBSP 单域抗体奠定技术与物质基础。有效扩展了免疫技术的应用范围,又为食品中酶抑制剂的研究开发提供了新思路和新方法。

参考文献:

- [1] SHIMIZU Y, NOMURA A, NISHIOKA F. Modori inducing property of croaker myosin preparation. Modori (fish gel degradation occurring at around 60.DEG.C)-inducing property of croaker myosin preparation[J]. *Nihon-Suisan-Gakkai-Shi*, 1986, 52(11): 2027-2032.
- [2] TOYOHARA H, SAKATA T, YAMASHITA K, et al. Degradation of oval-filefish meat gel caused by myofibrillar proteinase(s) [J]. *Journal of Food Science*, 2010, 55(2): 364-368.
- [3] CAO M J, HARA K, OSATOMI K, et al. Myofibril-bound serine proteinase(MBP)and its degradation of myofibrillar proteins[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 64(4): 644-647.
- [4] OSATOMI K, SASAI H, CAO M, et al. Purification and characterization of myofibril-bound serine proteinase from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology*, 1997, 116(2): 183-190
- [5] RAWDKUEN S, BENJAKUL S. Whey protein concentrate: Autolysis inhibition and effects on the gel properties of surimi prepared from tropical fish[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(3): 1077-1084.
- [6] RAWDKUEN S, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, AND LANIERT C et al. Effect of chicken plasma protein and some protein additives on proteolysis and gel-forming ability of sardine (*Sardinella gibbosa*) surimi[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2007, 31: 492-516.
- [7] AKAZAWA H, MIYAUCHI Y, SAKURADA, K, et al. Evaluation of protease inhibitors in Pacific whiting surimi [J]. *Journal of Aquatic and Food Products Technology*, 1993, 2: 79-95.
- [8] ZHANG Bin, WANG Dongfeng, DENG Shanggui. Study on the degradation of anti-silver carp surimi with trypsin inhibitor of bean[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(14): 107-110. (in Chinese)
- [9] CAO M, OSATOMI K R, OHKUBO M, et al. Purification of a novel serine proteinase inhibitor from the skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*) [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2000, 272(2): 0-489
- [10] CAO M J, OSATOMI K, HARA K, et al. Purification of a novel myofibril-bound serine proteinase inhibitor (MBSPI) from the skeletal muscle of lizard fish[J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2001, 128(1): 19-25.
- [11] SUN L C, ZHOU L G, DU C H, et al. Glucose-6-phosphate isomerase is an endogenous inhibitor to myofibril-bound serine proteinase of crucian carp (*Carassius auratus*) [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2009, 57(12): 5549.
- [12] ZHOU Hongxia, JIANG Bo. Studies on the mechanism of glutamine transaminase gelling myosin[J]. *Food Science*, 2002, 23(3):

- 49-54. (in Chinese)
- [13] KAEWJUMPOL G, THAWORNCHINSOMBUT S, AHROMRIT A, et al. Effects of bicarbonate, xanthan gum, and preparation methods on biochemical, physicochemical, and gel properties of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn) mince [J]. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 2013, 22: 241-257.
 - [14] LIU Sheng, LI Jing, LIANG Xingguo, et al. Research progress in single domain antibodies[J]. **Qianren Biology**, 2015(3): 26-38. (in Chinese)
 - [15] SHOAHESSANI A, MORTAZAVITABATABAEI S A, SHARIF S, et al. Recombinant λ bacteriophage displaying nanobody towards third domain of HER-2 epitope inhibits proliferation of breast carcinoma SKBR-3 cell line[J]. **Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis**, 2013, 61(1): 75-83
 - [16] ANDERSON G P, GLAVEN R H, ALGAR W R, et al. Single domain antibody-quantum dot conjugates for ricin detection by both fluoroimmunoassay and surface plasmon resonance[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2013, 786(13): 132-138
 - [17] HE T, WANG Y, LI P, et al. Nanobody-Based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol[J]. **Analytical Chemistry**, 2014, 86(17): 8873-800
 - [18] DOLK E, VAN D V M, LUTJE H D, et al. Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo[J]. **Applied & Environmental Microbiology**, 2005, 71(1): 442-50.
 - [19] LIU J L, ANDERSON G P, GOLDMAN E R. Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library[J]. **Bmc Biotechnology**, 2007, 7(1): 1-10
 - [20] KOCHNOLTE F, REYELT J, SCHOWB, et al. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2[D]. US, 2007: 1-10
 - [21] LI Ting, LI Huan, CHEN Haiying, et al. Preliminary prokaryotic expression and purification of carp MBSP and preparation of its polyclonal antibody[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2017, 36(8): 99-105. (in Chinese)
 - [22] DOOLEY H, MARTIN, F. FLAJNIK. Shark immunity bites back: affinity maturation and memory response in the nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*[J]. **European Journal of Immunology**, 2005, 35(3): 936-945
 - [23] GREENBERG A S, AVILA D, HUGHES M, et al. A new antigen receptor family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks[J]. **Nature** 1995. 374: 168-173.
 - [24] DIAZ M, VELEZ J, SINGH M, et al. Mutational pattern of the nurse shark antigen receptor gene (NAR) is similar to that of mammalian Ig genes and to spontaneous mutations in evolution: the translesion synthesis model of somatic hypermutation[J]. **Int Immunol**, 1999, 11: 825-833.
 - [25] ROUX K H, GREENBERG A S, GREENE L, et al. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1998. 95: 11804-11809
 - [26] ROUX K H, GREENBERG A S, GREENE L, et al. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1998, 95(20): 11804-11809.
 - [27] STRELTSOV V A, VARGHESE J N, CARMICHAEL J A, et al. Structural evidence for evolution of shark Ig new antigen receptor variable domain antibodies from a cell-surface receptor [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004, 101(34): 12444-12449.
 - [28] NUTTALL S D, IRVING R A, HUDSON P J. Immunoglobulin VH domains and beyond: design and selection of single-domain binding and targeting reagents[J]. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2000, 1(3): 253-263.
 - [29] NUTTALL S D, KRISHNAN U V, HATTARKI M, et al. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries[J]. **Molecular Immunology**, 2001, 38(4): 313-326.
 - [30] BEHDANI M, ZEINALI S, KHANAHMAD H, Generation and characterization of a functional nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor[J]. **Molecular Immunology**, 2012, 50, 35-41.
 - [31] LIU J L, ANDERSON G P, DELEHANTY J B, et al. Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naive shark library[J]. **Molecular Immunology**, 2007, 44(7): 1775-1783