

徐重新, 张霄, 张存政, 等. 鼠源噬菌体抗体展示库的构建及初步应用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 210-217.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.034

## 鼠源噬菌体抗体展示库的构建及初步应用

徐重新, 张霄, 张存政, 刘媛, 仲建锋, 董飒, 胡晓丹, 林曼曼, 刘贤金  
(江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 省部共建国家重点实验室培育基地——江苏省食品质量安全重点实验室, 农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 构建可用于特异性单链抗体(ScFv)筛选和应用的大容量鼠源噬菌体抗体展示库, 获得拥有自主知识产权的抗体库材料。从小鼠脾脏细胞中提取总 RNA, 反转录成 cDNA 后, 分别扩增抗体的重链基因、轻链基因, 并设计 2 条互补的 *Linker* 基因。采用重叠延伸 PCR (SOE-PCR) 法将重链-*Linker* 和 *Linker*-轻链拼接为完整的 *ScFv* 基因, 酶切、酶连后, 将 *ScFv* 基因克隆到 pCANTAB-5E 噬菌粒载体上, 经电穿孔导入 *E. coli* TG1 感受态细胞中, 过夜培养获得初级噬菌体展示库。以单克隆菌落数计算库容量大小, 通过比对随机挑取的单克隆噬菌体 *ScFv* 可变区序列的差异, 分析库的多样性。以 Bt 毒素 (Cry1B、Cry1C、Cry1F) 为包被抗原, 从库中筛选具有结合活性的 ScFv 验证库的实用性。经检测, 提取的总 RNA 条带清晰, 浓度为 2.76  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 扩增的抗体重链基因、轻链基因条带清晰, 且 2 条互补的 *Linker* 基因成功添加到重链基因和轻链基因上。经 SOE-PCR 法扩增, 重链-*Linker* 与 *Linker*-轻链成功拼接为 *ScFv* 基因。电转化后, 经 PCR (Polymerase chain reaction) 扩增和凝胶电泳检测, 证实 *ScFv* 基因克隆成功, 测得初级噬菌体抗体展示库的库容为  $3.67 \times 10^8$ 。随机挑取 12 个单克隆菌种进行测序和比对, 证实 *ScFv* 基因为鼠源抗体基因, 且 12 个单克隆菌种的 *ScFv* 基因可变区均有一定差异, 说明 *ScFv* 基因具有多样性。以 3 种 Bt 毒素 (Cry1B、Cry1C、Cry1F) 为抗原, 经 4 轮特异性富集筛选后均获得了具有抗原结合活性的噬菌体 *ScFv* 菌种, 表明该库的实用性较强。

**关键词:** 噬菌体展示库; 单链抗体; 重叠延伸 PCR; 噬菌粒载体; Bt 毒素

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0210-08

## Construction and preliminary application study of phage display antibody library from mouse

XU Chong-xin, ZHANG Xiao, ZHANG Cun-zheng, LIU Yuan, ZHONG Jian-feng, DONG Sa, HU Xiao-dan, LIN Man-man, LIU Xian-jin

(Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu/Province-State Key Laboratory Breeding Base, Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Institute of Food Quality Safety and Detection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

收稿日期: 2016-05-06

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31630061、31371778); 省部共建国家重点实验室培育基地——江苏省食品质量安全重点实验室自主研究课题 (49114063201604、49114063201608); 江苏省农业科学院院基金项目 (6111676)

**作者简介:** 徐重新 (1987-), 男, 湖南永州人, 硕士, 助理研究员, 从事食品质量安全检测技术研究。(E-mail) hxyxex@163.com

**通讯作者:** 刘贤金, (E-mail) jaasliu@jaas.ac.cn

**Abstract:** A large phage display antibody library of mice for ScFvs screening and application research was constructed to obtain the independent intellectual property of the library. Extraction total RNAs from spleen cells of mice, then reverse transcribed them to cDNAs. Amplification of heavy chain gene (*VH*) and light chain gene (*VL*) fragments with PCR, design two complementary *Linker* se-

quences and add to *VH* and *VL* respectively. Splicing *VH-Linker* and *Linker-VL* sequences by overlapping extension PCR (SOE-PCR) to a whole *ScFv*. Then clone *ScFv* into the pCANTAB-5E phagemid vectors, after being digested by restriction endonuclease (*Not* I, *Sfi* I) and linked by T4 DNA ligase. Obtained primary phage display antibody library with over-night cultured that the pCANTAB-5E-*ScFv* recombinant plasmid introduced into *E. coli* TG1 by electroporation. The capacity of this library was calculated by monoclonal colonies. To analyze the diversity of the library, the amino acid sequences of monoclonal colony phage *ScFv* in variable regions were alignment. We made Bt toxin proteins as coating antigen to verify its practicality by screening ScFvs which had antigen binding activity from the library. After detection, the total RNAs had clear bands and its concentration was 2.76  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . We could clearly find bands of *VH* and *VL* by agarose gel electrophoresis and their complementary *Linker* genes were added respectively. Finally, the *VH-Linker* and *VL-Linker* were spliced to *ScFvs* by SOE-PCR and cloned into the pCANTAB-5E phagemid vector successfully. We obtained the primary phage display antibody library with a capacity of  $3.67 \times 10^8$ . By sequencing and sequence alignment of 12 monoclonal colonies phage *ScFvs* from random selection, we could determine the *ScFvs* were from mice and the library had high diversity. After four rounds of panning in the library with three kinds of Bt (Cry1B, Cry1C, Cry1F), the *ScFvs* which could combine with Cry1B, Cry1C, Cry1F were obtained. The results showed that this library had a stronger practicality.

**Key words:** phage display library; single chain antibody (ScFv); gene splicing by overlapping extension PCR (SOE-PCR); phagemid vector; Bt toxins

噬菌体展示抗体库构建技术是伴随分子生物学、分子免疫学发展起来的新型基因工程抗体改造技术,是第3代抗体的重要载体<sup>[1-3]</sup>。1985年Smith首次发明了噬菌体表面展示技术,将人工抗体基因克隆到噬菌粒载体上,实现了外源基因在噬菌体衣壳蛋白表面的串联共表达<sup>[4]</sup>。通过该技术将基因工程抗体基因克隆到丝状噬菌粒载体的基因组DNA中,随着噬菌体传代复制进行串联共表达,使抗体蛋白展示在噬菌体衣壳蛋白表面,形成融合形式的蛋白抗体,从而使抗体的表型和基因型联系在一起,并通过固相化包被抗原捕获特异性结合的噬菌体展示抗体,经洗脱分离后即可获得单一抗体及其基因,从而实现特异性抗体和基因的筛选<sup>[5-6]</sup>。噬菌体展示抗体库构建及配套筛选技术有效避免了多克隆抗体、单克隆抗体须经动物免疫或细胞杂交等的繁冗过程,经高通量筛选直接获得靶标特异性抗体及其基因,同时可以在基因水平上进行抗体结构和功能的定向改造,并能将筛选出的基因克隆到多种表达系统中进行抗体蛋白的大量表达和体内亲和成熟进化<sup>[7-9]</sup>。2002年英国剑桥大学蛋白质工程中心成功构建大库容量( $1 \times 10^8$ 级)的人源化Tomlinson (J+I)噬菌体抗体库,并获得国际专利授权,是目前研究最成熟、商业化运营最成功的噬菌体抗体展示库<sup>[10-11]</sup>,获得了巨大的经济效益。近年美国NEB (New England Biolabs)公司也成功推出了大库容量( $1 \times 10^9$ 级)的噬菌体展示随机十二肽抗体库<sup>[12]</sup>,深

受市场认可。

本研究拟通过构建大容量天然鼠源噬菌体展示库,获得能在农产品产供过程中对农药、生物毒素等各类危害物进行检测的单链抗体筛选库材料,从而提高在农产品质量安全管控过程中对危害物的筛查和分析能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Balb/c小鼠购自扬州大学比较医学中心,电穿孔仪ECM 830购自美国BTX公司,全自动凝胶成像分析仪购自上海培清科技有限公司,PCR仪购自日本TaKaRa公司,酶标仪购自美国Thermo公司,酶标板购自美国Corning公司,超微量分光光度计、pCANTAB-5E噬菌粒载体及配套菌种均购自美国GE公司,Trizol和GBSS缓冲液购自美国Invitrogen公司,引物和DEPC购自上海生工公司,PCR Mix和DNA marker购自北京TransGen Biotech公司,*Not* I、*Sfi* I、T4 DNA Ligase酶均购自美国NEB公司,PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自德国Qiagen公司,Bt毒素(Cry1B、Cry1C、Cry1F)标样购自上海佑隆生物科技有限公司,Anti-M13-[HRP] Antibody购自武汉博士德公司,其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 鼠脾脏细胞总RNA提取及cDNA合成 小

鼠麻醉致死后置入纯酒精中浸泡 3 min 以消毒, 于无菌条件下解剖取出脾脏, 在 GBSS 缓冲液中预冷并去除残留的脂肪和结缔组织, 将脾脏迅速剪碎分装到经 DEPC 处理过的 2 ml 离心管中, 在液氮中放置 2 min, 用组织研磨器磨碎后, 每管加入 1 ml Trizol, 室温静置 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min。将上清液加入 200  $\mu$ l 氯仿中, 充分混匀, 静置 15 min, 12 000 g 离心 15 min。吸取上层水相, 加入 500  $\mu$ l 异丙醇, 充分混匀, 静置 10 min, 12 000 g 离心 10 min, 弃上清液。用 1 ml 75% 乙醇重悬沉淀, 8 000 g 离心 5 min, 弃上清液, 室温干燥后, 用 30  $\mu$ l 去 RNase 水溶解沉淀物。以超微量分光光度计测  $A_{260}/A_{280}$  确定 RNA 的浓度<sup>[13]</sup>, 以琼脂糖凝胶电泳检测其纯度, 按 RNA 反转录试剂盒产品操作手册中的步骤将提取的 RNA 反转录成 cDNA, 纯化后于 -80  $^{\circ}$ C 下冻存备用。

**1.2.2 重链基因 (VH)、轻链基因 (VL) 扩增及拼接 ScFv 基因** 参考文献[14]设计鼠源重链抗体基因和轻链抗体基因特异性上下游通用物、Linker 引物以及单链抗体基因上下游加酶切位点引物(表 1)。PCR 产物及酶切产物、酶连产物均经试剂盒纯化回收再供后续试验用, 纯化步骤参照商品说明书。重链基因和轻链基因的扩增程序为: 取冻存的 cDNA 为模板, 以 VH-1-back 和 VH-1-2-for 为上下游引物扩增重链基因, 以 VL2back 和 MJ $\lambda$ 1for、MJ $\lambda$ 2for、MJ $\lambda$ 4for、MJ $\lambda$ 5for(按 1:1:1:1 混合)为上下游引物扩增轻链基因。PCR 条件均为: 95  $^{\circ}$ C 10.0 min; 94  $^{\circ}$ C 1.0 min, 56  $^{\circ}$ C 1.0 min, 72  $^{\circ}$ C 1.0 min; 72  $^{\circ}$ C 10.0 min, 共 35 个循环。重链基因、轻链基因添加 Linker 序列为: 分别取纯化的重链基因、轻链基因为模板, 以合成的 VH-1-back 和 Linker-back 为上下游引物, 扩增重链-Linker 基因, 以合成的 Linker-for 基因和轻链 MJ $\lambda$ 1for、MJ $\lambda$ 2for、MJ $\lambda$ 4for、MJ $\lambda$ 5for(按 1:1:1:1 混合)为上下游引物, 扩增 Linker-轻链基因。其 PCR 条件为: 95  $^{\circ}$ C 10.0 min; 95  $^{\circ}$ C 1.0 min, 58  $^{\circ}$ C 1.5 min, 72  $^{\circ}$ C 1.0 min; 72  $^{\circ}$ C 10.0 min, 共 30 个循环。ScFv 重链基因、ScFv 轻链基因拼接程序为: 采用 SOE-PCR 法, 以扩增的重链-Linker 基因和 Linker-轻链基因(1:1)为模板, 经 PCR 拼接为完整的 ScFv 基因。其 PCR 条件为: 95  $^{\circ}$ C 10.0 min; 95  $^{\circ}$ C 1.0 min, 60  $^{\circ}$ C 1.5 min, 72  $^{\circ}$ C 1.0 min; 72  $^{\circ}$ C 10.0 min, 共 30 个循环。ScFv 基因添加酶切位点程

序为: 以拼接的 ScFv 基因为模板, 以添加酶切位点的 Sfi I back 和 J $\lambda$ 1 Not I、J $\lambda$ 2 Not I、J $\lambda$ 4 Not I、J $\lambda$ 5 Not I(按 1:1:1:1 混合)为上下游引物, 进行 ScFv 基因扩增。其 PCR 条件为: 94  $^{\circ}$ C 10.0 min; 94  $^{\circ}$ C 1.0 min, 56  $^{\circ}$ C 1.0 min, 72  $^{\circ}$ C 1.0 min; 72  $^{\circ}$ C 10.0 min, 共 35 个循环。

**1.2.3 E. coli TG1 电转感受态制备** 挑取 E. coli TG1 单菌落, 接种到 10 ml 2 $\times$ TY 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 下 250 r/min 振荡培养过夜。次日取 5 ml 菌液加入到 500 ml 经 37  $^{\circ}$ C 预热的 2 $\times$ TY 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 下 250 r/min 振荡培养。每隔 20 min 以超微量分光光度计测一次  $D_{600}$  值, 直至  $D_{600}$  值达到 0.4 时迅速将菌液置于冰水混合物中, 冰水浴冷 30 min, 期间不时缓慢摇动菌液, 以确保 E. coli TG1 充分冷却。将冷却好的菌液转移到冰水预冷的 250 ml 离心瓶中, 4  $^{\circ}$ C 下以 1 000 g 离心 15 min, 弃上清液。沉淀细胞用 500 ml 冰水预冷的纯水重悬, 4  $^{\circ}$ C 下以 1 000 g 离心 15 min, 弃上清液, 此步骤重复 2 次。收集沉淀细胞, 用 250 ml 冰水预冷的 10% 甘油重悬, 4  $^{\circ}$ C 下以 1 000 g 离心 15 min, 弃上清液。向沉淀细胞中加入适量冰水预冷的 10% 甘油, 调节细胞浓度为  $2 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{10}$ , 每管 100  $\mu$ l 分装, -80  $^{\circ}$ C 下冻存备用。按照公式(1)测定制备的感受态电转效率<sup>[15]</sup>。

电转感受态电转化率 (CFU/ $\mu$ g) = 克隆菌落数 (CFU)/质粒 DNA 量 (ng)  $\times$  稀释倍数  $\times 1 000$  (1)

**1.2.4 噬菌体 ScFv 展示库构建** 参照质粒提取试剂盒附录操作方法提取 pCANTAB-5E 噬菌粒载体。将 pCANTAB-5E 载体和方法 1.2.2 中加酶切位点的单链抗体基因分别用 Not I 酶和 Sfi I 酶进行酶切, 产物用试剂盒纯化回收, 然后通过 T4 DNA Ligase 连接, 构建 pCANTAB-5E-ScFv 重组噬菌粒载体, 并采用电转法 (2 500 V, 100  $\mu$ s) 将其导入到 E. coli TG1 感受态细胞中。菌液涂到 TYE-AG 固体培养基 (含终质量浓度为 100  $\mu$ g/ml 的 Amp, 1% 的葡萄糖) 上, 次日长出的菌落计数后参照文献[16]方法洗脱并处理, 即构成噬菌体 ScFv 库。

**1.2.5 抗 Bt 毒素 ScFv 筛选** 参照 Tomlinson (J+I) 噬菌体抗体库操作手册和文献[17]报道方法, 从构建的鼠源展示库中筛选与 Bt 毒素具有结合活性的 ScFv, 以分析该库的实用性。

表 1 试验中所需合成的引物序列

Table 1 Synthesis of primer sequence for experiment

基因	引物名称	序列 (5'→3')	参考来源
重链基因 (VH)	VH-1-2-for	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC TTGGCCCC	参考文献[13]
	VH-1-back	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG	
轻链基因 (VL)	MJA1for	CCGTTTGATTTCAGCTTGGTCCC	
	MJA2for	CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC	
	MJA4for	CCGTTTTATTTCCAACTTTGTCCC	
	MJA5for	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC	
	Vλ2back	GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA	
	连接肽 (Linker)	Linker-back	
Linker- for	CGATCCGCCACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCC ACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCCTTGGCCCC		
单链抗体 (ScFv)	Sfi I back	GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTSMA RCTGCAGSAGTCWGG	
	JA1 Not I	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTCCAGCTTGGTCCC	
	JA2 Not I	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTCCAGCTTGGTCCC	
	JA4 Not I	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTCCAACTTTGTCCC	
	JA5 Not I	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC	
pCANTAB-5E 基因	R1	CCATGATTACGCCAAGCTTGGAGCC	产品说明书
	R2	CGATCTAAAGTTTTGTCGCTTTCC	

S=G or C;R=G or A;M=A or T。

## 2 结果与分析

### 2.1 鼠脾脏细胞总 RNA

取 2 管分装的鼠脾脏组织,分别提取总 RNA,最后各获得 30  $\mu\text{l}$  的 RNA 提取物。从中各取 1  $\mu\text{l}$  进行 RNA 凝胶电泳检测,发现均含有 28 S、18 S、5 S 3 条高等动物脾脏细胞总 RNA 特征性目的条带(图 1)。测得  $A_{260}/A_{280}$  总 RNA 浓度为 2.76  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,说明提取成功,可供后续试验使用。由于 RNA 容易被自然环境中无处不在的 RNAase 降解,所以在提取和上样检测过程中要严格进行 RNAase 酶消解处理。本试验中提取的总 RNA 也有部分降解的痕迹,可能是电泳上样过程中被空气中的 RNAase 降解了,所以电泳检测过程中还需对环境 and 容器进行更为严格的酶失活处理。

### 2.2 重链基因和轻链基因扩增及 ScFv 基因拼接

对重链基因和轻链基因进行扩增,先分别添加 Linker 序列,最后通过 SOE-PCR 将重链基因和轻链基因拼接为完整的 ScFv 基因,试验效果分别见图 2、图 3 和图 4。从图 2、图 3 和图 4 中可以看出,各

28 S RNA  
18 S RNA  
5 S RNA

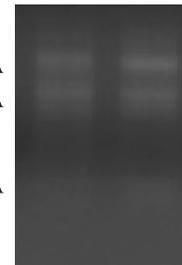


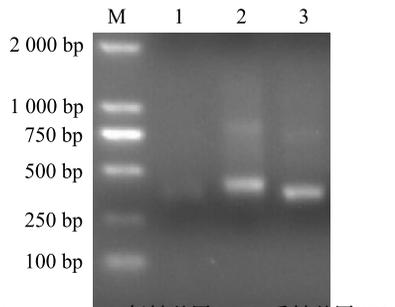
图 1 鼠脾脏细胞总 RNA

Fig.1 Total RNA extraction from spleen cells of mouse

PCR 产物(重链基因约 340 bp,轻链基因约 320 bp,重链-Linker 基因约 440 bp,Linker-轻链基因约 420 bp,ScFv 基因约 750 bp)经 DNA 电泳检测,均含有清晰的目的基因片段,表明各 PCR 试验都达到了预期效果,目的基因扩增成功。

### 2.3 E.coli TG1 电转感受态制备

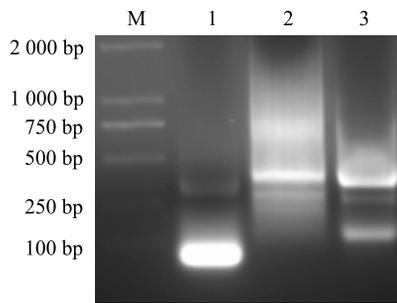
取 1  $\mu\text{l}$  DNA 浓度为 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  的 pCANTAB-5E 噬菌粒载体,将其电转化到制备的 E.coli TG1 感受态细胞中,按公式(1)算得电转化效率为  $6.76 \times 10^9$ ,转化效率达到高效电转要求。



M: DNA marker; 1, 3; 轻链基因 VL; 2; 重链基因 VH。

图2 重链基因、轻链基因 PCR 扩增

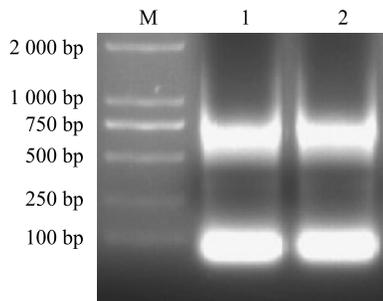
Fig.2 PCR amplification of VH and VL



M: DNA marker; 1, 3; Linker-VL; 2; VH-Linker。

图3 重链基因和轻链基因添加 Linker 基因 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification of VH and VL added Linker gene



M: DNA marker; 1, 2; ScFv 基因。

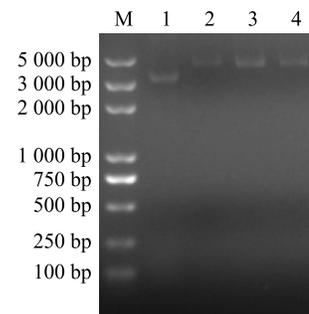
图4 ScFv 基因 PCR 扩增

Fig.4 PCR amplification of ScFv gene

## 2.4 噬菌体单链抗体展示库构建

pCANTAB-5E 噬菌粒载体提取并纯化后, 分别以 *Not* I 酶、*Sfi* I 酶进行单酶切, 以 *Not* I 酶和 *Sfi* I 酶进行双酶切, 经 DNA 电泳跑胶 (图 5) 后, 发现 3 种酶切方式处理的质粒载体条带均比未经过酶切处理的质粒大, 表明在购买的噬菌粒载体中存在 *Not* I 酶和 *Sfi* I 酶的酶切位点, 且酶具有活性。将拼接好并且添加酶切位点基因扩增的 *ScFv* 基因和 pCANT-

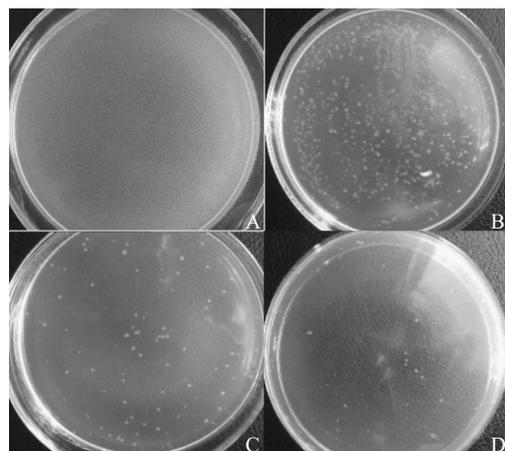
AB-5E 噬菌粒载体酶切、酶连后, 电转入到 *E. coli* TG1 电转感受态细胞中, 经系列梯度稀释后涂板 (图 6)。计算获得初级噬菌体展示库库容量为  $3.67 \times 10^8$ , 随机挑取 12 个单克隆菌种进行 PCR (图 7) 和测序验证 (表 2), 发现所有供测菌种中均含有目的基因大小片段 (约 900 bp, 含克隆位点前后约 150 bp 通用序列), 经序列比对分析, 证实均为小鼠抗体基因, 且这些单克隆菌中 *ScFv* 基因的重链可变区基因、轻链可变区基因均存在或多或少差异。由此说明, 试验中构建的鼠源噬菌体展示库库容量较大, 多样性较丰富, 初步确定达到预期试验目标。



M: DNA marker; 1; pCANTAB-5E; 2; pCANTAB-5E (经 *Not* I 酶切); 3; pCANTAB-5E (经 *Sfi* I 酶切); 4; pCANTAB-5E (经 *Not* I、*Sfi* I 双酶切)。

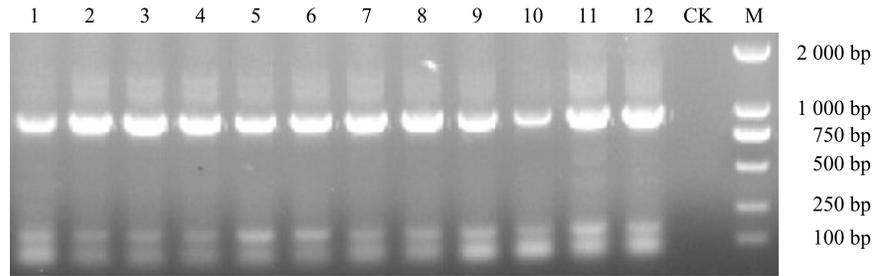
图5 pCANTAB-5E 噬菌粒载体酶切验证

Fig.5 The restriction enzyme cutting of pCANTAB-5E phage vector



A: 原液 (100  $\mu$ l); B: 稀释比例  $1 \times 10^4$  (100  $\mu$ l); C: 稀释比例  $1 \times 10^5$  (100  $\mu$ l); D: 稀释比例  $1 \times 10^6$  (100  $\mu$ l)。

图6 pCANTAB-5E-ScFv 重组质粒电转 *E. coli* TG1 后涂板菌种  
Fig.6 Colonies of pCANTAB-5E-ScFv recombinant plasmid introduced into *E. coli* TG1 by electroporation

M: DNA marker; CK: *E. coli* TG1; 1~12: 单链抗体基因。图7 随机单克隆菌落噬菌体 *ScFv* 基因 PCR 验证Fig.7 PCR identification of the monoclonal colony phage *ScFv* from random selection表2 随机单克隆菌落噬菌体 *ScFv* 基因翻译后的氨基酸序列Table 2 The amino acid sequence of monoclonal colonies phage *ScFv* gene from random selection

单克隆编号	重链可变区			轻链可变区		
	<i>VH-CDR1</i>	<i>VH-CDR2</i>	<i>VH-CDR3</i>	<i>VL-CDR1</i>	<i>VL-CDR2</i>	<i>VL-CDR3</i>
1	--SRLRSGNQDY--	--YWADTRES--	--CQNDYDYP--	--GFDFSYSYG--	--INSYGTST--	--QWREKGL--
2	--SRLRSGWQYY--	--YQASTQES--	--CWNDLSYP--	--GFDFMYSYG--	--INPYGTSW--	--CWREKML--
3	--VRLNSYNWKY--	--WYATTRRS--	--VQVTYDQY--	--TNSFSAYG--	--INTQRSYA--	--CVRTMPP--
4	--SLLRSGNQYY--	--YWDSTQEL--	--WRNSLSYQ--	--GFSFMYSR--	--CIVQPYSW--	--VVITAPS--
5	--SRLRCGNQDY--	--WSADDIRS--	--CQYSQLWN--	--GFDFSYSAG--	--INVPYST--	--CNRSKMS--
6	--RDLRCGNQDN--	--WYSTVRRS--	--WLYSTLWP--	--YFTFMYYG--	--IRTQPYDT--	--CDRAMPQ--
7	--SRLQSGWKPL--	--SWVSTQQL--	--LRTDLSPQ--	--GRDFSYSR--	--INSQTSYA--	--IVRLMPQ--
8	--VRLNSWRWKY--	--YSVRTRES--	--CQVTKDQE--	--VDFSYST--	--IRTQPYDT--	--QWRMIGL--
9	--SLLQSWWKPL--	--CQASVQSL--	--VRVDYSQY--	--GFTFSSYG--	--NRTQGYDV--	--QVREKGL--
10	--RLLRCYNQDP--	--WSSTVRIS--	--CLYSTLVP--	--TFSFAMYG	--QYTQIYPA--	--VNLELGL--
11	--RRDRSTWQY--	--YSDRQRES--	--CRTLDYQ--	--GLTFSSAG--	--INVSYST--	--QQITMGN--
12	--LRLNCYNQKN--	--YYNSWQES--	--CTNTYDYP--	--GRFFNSYG--	--IVTIPYRT--	--VQITGPI--

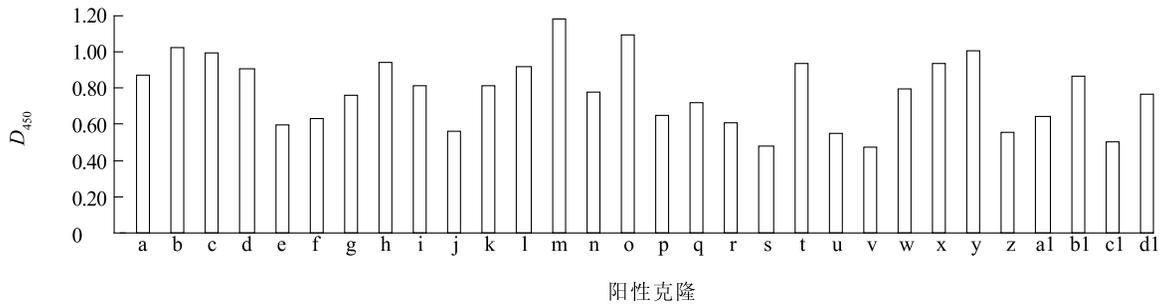
“--”: 两端同位点相同氨基酸。

### 2.5 抗 Bt 毒素 ScFv 筛选

分别以 Cry1B、Cry1C、Cry1F 毒素为抗原,采用固相包被抗原筛选法,从构建的鼠源噬菌体抗体展示库中筛选具有毒素结合活性的 ScFv。采用间接非竞争 ELISA 法进行测定,若阳性孔值与阴性孔值的比值大于 2.1,即判定为具有结合活性的阳性克隆<sup>[18]</sup>。结果如图 8 显示,经 4 轮针对特异性包被抗原的“吸附-洗脱-扩增”处理后,分别从库中筛选到 10 株具有 Cry1B 毒素结合活性的噬菌体 *ScFv* 菌,12 株具有 Cry1C 毒素结合活性的噬菌体 *ScFv* 菌,8 株具有 Cry1F 毒素结合活性的噬菌体 *ScFv* 菌。经 PCR 鉴定和测序比对分析,发现这 30 株阳性单克隆噬菌体 *ScFv* 重链可变区基因和轻链可变区基因均或多或少存在一些差异。

### 3 讨论

噬菌体抗体展示库构建技术及配套高通量筛选与鉴定技术的发展和完善,为人工基因工程抗体的高效筛选和定向改造打开了方便之门。评价构建的噬菌体抗体展示库质量有 2 个关键指标:一是容量,二是多样性。构建的库容量越大,库抗体多样性越丰富,说明库所包含的信息量越多,抗原针对性越广,适用性也就越强。在构建库的过程中,库容量和库多样性取决于总 RNA 提取量、反转录效率、PCR 扩增以及感受态转化效率等因素。而 PCR 扩增及其产物电泳验证贯穿整个构库过程,是决定和评价构库成败的重要环节和直观参考指标。PCR 扩增



a; Cry1B-A2; b; Cry1B-A10; c; Cry1B-C1; d; Cry1B-C7; e; Cry1B-D12; f; Cry1B-E1; g; Cry1B-E7; h; Cry1B-F6; i; Cry1B-F1; j; Cry1B-G3; k; Cry1C-B3; l; Cry1C-C6; m; Cry1C-C9; n; Cry1C-C12; o; Cry1C-D2; p; Cry1C-F9; q; Cry1C-H1; r; Cry1C-H7; s; Cry1C-H11; t; Cry1C-G2; u; Cry1C-G6; v; Cry1C-G12; w; Cry1F-A12; x; Cry1F-B3; y; Cry1F-B7; z; Cry1F-D5; a1; Cry1F-D11; b1; Cry1F-E2; c1; Cry1F-F5; d1; Cry1F-F8。

图8 抗Bt毒素(Cry1B、Cry1C、Cry1F)阳性克隆单链抗体ELISA分析

Fig.8 The positive clones of anti-Bt (Cry1B, Cry1C, Cry1F) ScFv by ELISA analysis

效率和产物质量决定因素主要有反应条件(如延伸温度、退火时间)、模板纯度(是否纯化)、DNA聚合酶(*Taq*酶或*Pfu*酶)、引物(长度、浓度、是否除盐纯化等)等。如图2中1、3泳道都是上样1  $\mu$ l 轻链基因的PCR产物,唯一不同的是泳道1中PCR体系延伸温度设置为55  $^{\circ}$ C,而泳道3中PCR体系延伸温度设置为56  $^{\circ}$ C,结果泳道3中轻链基因PCR产物条带明显比泳道1中的要亮。图3中1、3泳道都是上样1  $\mu$ l *Linker-VL*基因的PCR产物,唯一不同的是泳道1中PCR体系*Linker*引物浓度为100 pmol/ $\mu$ l,而泳道3中PCR体系*Linker*引物浓度为10 pmol/ $\mu$ l,结果泳道1中PCR产物虽然单一性比泳道3中要强,但产物浓度却很低,而且产生了明显的引物二聚体,相比之下,还不如泳道3中的PCR产物好。因此,在文库所需的PCR过程中,要不断摸索各PCR体系反应条件,以获得高纯度和高浓度的基因产物,从而保证抗体库的容量和多样性。天然噬菌体抗体展示库作为“万能”抗体筛选源,因其适用性广而深受科研工作者追捧,但不足之处就是筛选效率普遍较低,很难快速获得高抗原结合活性的抗体<sup>[19]</sup>。因此在筛选方法上还需进一步改进传统的抗原固相包被法或采用新的更为高效的磁珠免疫筛选方法<sup>[20]</sup>,以弥补天然噬菌体展示库在抗原特异性方面的不足。

本研究成功构建了一个库容量大、多样性丰富的天然鼠源噬菌体展示抗体库,对几种Bt毒素特异性抗体进行初步筛选,均获得了相应的阳性克隆,并展示出了良好的实用性,具有广阔的应用前景。

## 参考文献:

- [1] SCHIRRMANN T, MEYER T, SCHÜTTE M, et al. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy[J]. *Molecules*, 2011, 16(1):412-426.
- [2] HUST M, DÜBEL S. Mating antibody phage display with proteomics[J]. *Trends in Biotechnology*, 2004, 22(1): 8-14.
- [3] KIM S J, PARK Y, HONG H J. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies [J]. *Molecules and Cells*, 2005, 20(1):17-29.
- [4] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science*, 1985, 228(4705):1315-1317.
- [5] DANTAS-BARBOSA C, DE MACEDO BRIGIDO M, MARANHAO A Q. Antibody phage display libraries: contributions to oncology[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(5): 5420-5440.
- [6] QI H, LU H, QIU H J, et al. Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 417(3):129-143.
- [7] SHARMA S K, SURESH M R, WUEST F R. Improved soluble expression of a single-chain antibody fragment in *E. coli* for targeting CA125 in epithelial ovarian cancer [J]. *Protein Expression and Purification*, 2014, 102: 27-37.
- [8] ZUHaida A A, SWEE K Y, ABDUL M A, et al. ScFv antibody: principles and clinical application [J]. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 2012: 1-15.
- [9] EDWARD E. Isolation of ScFv fragments specific for monokine induced by interferon-gamma (MIG) using phage display [J]. *Journal of Immunol Methods*, 2010, 358(1): 104-110.
- [10] DE WILDT R M T, MUNDY C R, GORICK B D, et al. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(9): 989-994.
- [11] PANDE J, SZEWCZYK M M, GROVER A K. Phage display:

- concept, innovations, applications and future [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(6): 849-858.
- [12] TIWARI R, NEGI S S, BRAUN B, et al. Validation of a phage display and computational algorithm by mapping a conformational epitope of Bla g 2 [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2011, 157(4): 323-330.
- [13] 朱玉贤,李毅,郑晓峰.现代分子生物学[M].北京:高等教育出版社,2008:172-176.
- [14] 裴世春,孙大庆,郭德军,等.鼠源抗 AFB1 噬菌体单链抗体库的构建与鉴定[J].*齐齐哈尔大学学报(自然科学版)*,2010,26(6):76-80.
- [15] 张晓楠,肖玉,黄勇,等.影响大肠杆菌电转化效率因素的探讨[J].*中国现代医学杂志*,2008,18(4):466-472.
- [16] 苗向阳,邵建军,朱瑞良,等.天然鼠源噬菌体抗体库的构建及抗羊抑制素基因工程单抗的筛选[J].*中国农业科学*,2009,42(1):299-303.
- [17] WANG Y, ZHANG X, ZHANG C Z, et al. Isolation of single chain variable fragment (ScFv) specific for Cry1C toxin from human single fold ScFv libraries [J]. *Toxicon*, 2012, 60(7):1290-1297.
- [18] ZHANG X, LIU Y, ZHANG C, et al. Rapid isolation of single-chain antibodies from a human synthetic phage display library for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1B toxin [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 81:84-90.
- [19] SHEEDYA C, MACKENZIE C R, HALLA J C. Isolation and affinity maturation of hapten-specific antibodies [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(4): 333-352.
- [20] 刘媛, TUOMAS H, 刘贤金, 等. 基于磁珠液相筛选和时间分辨荧光免疫分析的微囊藻毒素 LR 单链抗体的淘选与鉴定 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(2): 330-337.

(责任编辑:王妮)