

刘媛, 刘敏, 张霄, 等. Cry2A 毒素抗独特型单链抗体库的构建[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 1174-1182.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.05.029

Cry2A 毒素抗独特型单链抗体库的构建

刘媛¹, 刘敏¹, 张霄¹, 徐重新¹, 林曼曼¹, 胡晓丹¹, 仲建锋¹, 谢雅晶¹, 罗楚平², 张存政¹, 刘贤金¹

(1. 江苏省食品安全重点实验室, 江苏 南京 210014; 2. 淮阴工学院生命科学与食品工程系, 江苏 淮安 223003)

摘要: 为了降低苏云金杆菌 Cry2A 毒素的免疫检测成本, 开发廉价、无毒试剂盒, 采用整体抗体免疫和噬菌体展示技术的路线, 设计和构建了 Cry2A 抗独特型单链抗体库。以 Protein A 纯化的 Cry2A 兔多克隆抗体为免疫原, 对雌性 Balb/c 系小鼠进行了免疫。在优化的包被原浓度下, 用 ELISA 法测定小鼠血清效价及抗独特型抗体组分。选取效价最高的小鼠, 取脾脏提取总 RNA, RT-PCR 法合成 cDNA 第一链。设计简并引物, 利用 PCR 法扩增小鼠 VH、Vk 基因, 再用 SOE-PCR 法进行单链抗体基因的拼接。SOE-PCR 产物和 pIT2 载体经双酶切后连接, 电转入感受态 *E. coli* TG1 完成建库, 并用多克隆噬菌体 ELISA 对抗体库与免疫原的结合能力进行了鉴定。结果表明, 免疫鼠血清的效价在 $1:1.6 \times 10^5$ 到 $1:6.4 \times 10^5$ 倍之间。免疫鼠血清可对 Cry2A 与其兔多克隆抗体的结合最高可产生 17.6% 的抑制, 证明 Ab2B 和 Ab2 γ 型抗独特型抗体的存在。最终构建了库容为 1.2×10^7 的 Cry2A 抗独特型单链抗体库, 该抗体库与免疫原的结合信号/背景比值为 6.04。

关键词: Cry2A 毒素; 抗独特型抗体; 单链抗体; 噬菌体展示

中图分类号: X836 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)05-1174-09

Construction of the anti-idiotypic single-chain variable fragment (scFv) library of Cry2A toxin

LIU Yuan¹, LIU Min¹, ZHANG Xiao¹, XU Chong-xin¹, LIN Man-man¹, HU Xiao-dan¹, ZHONG Jian-feng¹, XIE Ya-jing¹, LUO Chu-ping², ZHANG Cun-zheng¹, LIU Xian-jin¹

(1. Key Laboratory of Food Safety of Jiangsu Province, Nanjing 210014, China; 2. Department of Life Science and Food Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, China)

Abstract: In order to reduce the cost of immunoassay of *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxin and develop a cheap and toxin-free ELISA kit, an anti-idiotypic single-chain variable fragment (scFv) library of Cry2A toxin was designed and constructed by immunization with the whole molecule of rabbit polyclonal antibody and phage display. Rabbit polyclonal antibody against Cry2A toxin was purified by protein A and used as immunogen for the female Balb/c mice. The titer and the component of anti-idiotypic antibodies in mice antiserum were determined by ELISA under the optimized concentration of

coating antigens. Then the best mouse was chosen to extract total RNA, and the first strand of cDNA was synthesized by RT-PCR. The VH, VK genes of mice and linker fragments were amplified by PCR with designed primers, and the single chain antibody gene was spliced by SOE-PCR. The SOE-PCR product and the pIT2 vector were digested by restriction enzymes and linked together, then were electroporated into competent *E. coli* TG1. The binding ability of library with the immunogen was deter-

收稿日期: 2017-11-09

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31630061); 江苏省社会发展项目(BE2017706); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(17)3018]; 中央财政农业推广项目[TG(16)-031]; 江苏省自然科学基金项目(BK20181247)

作者简介: 刘媛(1980-), 安徽合肥人, 女, 硕士, 副研究员, 主要从事农产品污染物生物控制技术研究。(Tel) 025-84390401; (E-mail) zeranol@163.com

通讯作者: 刘贤金, (Tel) 025-84390401; (E-mail) jaasliu@jaas.ac.cn

mined by polyclonal phage ELISA. The results showed that the titers of immunized mouse antiserum were between $1:1.6 \times 10^5$ and $1:6.4 \times 10^5$. The antiserum could also produce 17.6% inhibition on the binding of Cry2A with its rabbit polyclonal antibodies, and that proved the existence of Ab2 β and Ab2 γ type anti-idiotypic antibodies. And eventually an anti-idiotypic scFv library was built with the capacity of 1.2×10^7 . The ratio of signal to background of library with immunogen was 6.04.

Key words: Cry2A toxin; anti-idiotypic antibody; single-chain variable fragment (scFv); phage display

苏云金杆菌 Cry 毒素是全球应用最为成功的杀虫蛋白资源,对多种鳞翅目、双翅目、鞘翅目等昆虫存在毒性,也对线形动物门和原生动物门的某些种类存在毒性^[1]。随着转 Cry 毒素基因作物的广泛种植和在农药制剂中的大量使用 Cry 毒素,Cry 毒素可能存在的生态安全风险和对非靶标生物的安全隐患也广受关注^[2]。为加强转基因作物监管,保障消费者的知情权,国内外各实验室也陆续开展了 Cry 毒素检测方法的研究^[3-5]。其中免疫学检测以其检测灵敏度高、检测通量大等优势成为一种主流的检测方法^[6-7]。Cry 毒素标准品作为免疫学检测的必备试剂,目前主要由美国 Envirologix 公司提供,价格较高,这导致 Cry 毒素免疫学检测成本的增加。因此,有必要寻找 Cry 毒素的廉价、无毒、安全替代蛋白质,创制具有自主知识产权的生物制剂。

抗独特型抗体作为一种有效的生物模拟材料,可以模拟多种毒素的特征表位,作为毒素标准品的替代物应用于免疫检测试剂盒以降低检测成本,而且不具毒性。目前已在黄曲霉毒素^[8-9]、微囊藻毒素^[10-11]、呕吐毒素^[12]、富马毒素^[13]、T2 毒素^[14]等生物毒素的抗独特型抗体制备和应用中取得成功。但是抗独特型抗体技术的发展也存在一些制约因素,其中之一是抗独特型抗体的制备难度大。以抗独特型抗体制备的主流方法单克隆抗体技术为例^[15],首先是抗独特型抗体的阳性克隆率低,一般制备成功率是常规抗体的几百分之一。其次,抗体分离纯化困难。由于抗独特型抗体形成过程中,同时产生针对不同决定簇的 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种类型抗独特型抗体,要筛选获得建立检测技术所需的 β 或 γ 型,难度较大^[16]。20 世纪 90 年代兴起的抗体库技术,为抗独特型抗体的制备提供了新契机^[17-18]。但是由于从天然抗体库中筛选获得抗独特型抗体的几率较低且亲和力不高^[19],因此先通过动物免疫增加抗独特型抗体丰度,再构建免疫抗体库用于筛选,可以大大增加筛选阳性率和抗体的亲和力^[20]。

虽然 Cry 毒素存在较大的检测需求,但是国内

外尚无 Cry 毒素抗独特型单链抗体库构建的报道。本研究拟联合采用整体抗体免疫和噬菌体展示的技术路线,构建 Cry2A 毒素抗独特型单链抗体库,为其独特型单链抗体的筛选和无毒检测试剂盒的构建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Cry2A 多抗血清由本实验室免疫新西兰大白兔自制获得。HiTrap Protein A HP 柱、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗 M13 单抗购自美国 GE Healthcare 公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自康为世纪有限公司。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、四甲基联苯胺(TMB)购自美国 Sigma 公司。6~8 周龄雌性 BALB/c 系小鼠购自扬州大学比较医学研究中心。Cry2A 毒素标准品购自美国 Envirologix 公司。TRIzol 购自美国 Thermo Fisher 公司。SuperScriptTM III 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nco* I 和 *Not* I、辅助噬菌体 M13KO7 购自美国 NEB 公司。2 \times taq PCR master mix 和 2 \times pfu PCR master mix 分别购自德国 DBI 公司和东盛生物有限公司。半合成人源 Tomlinson I 库、含有牛血清白蛋白(BSA)单链抗体基因的 pIT2 载体、*E. Coli*. TG1 购自英国 Source Bioscience 有限公司。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自美国 KPL 公司。DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、96 孔酶标板购自美国 Corning 公司。四甲基联苯胺(TMB)购自美国 Sigma 公司。脱脂奶粉购自索莱宝生物科技有限公司。试验所用其他化学试剂及有机溶剂均为国产分析纯。

1.2 Cry2A 兔多克隆抗体的纯化与鉴定

参照 HiTrap Protein A HP 说明书,将实验室自制的 Cry2A 兔多抗血清进行亲和纯化。纯化抗体用 SDS-PAGE 检测纯度,银染显色^[21]。并以 BSA 为参照蛋白质,用蛋白质定量试剂盒测定纯化抗体浓度,分装后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 动物免疫

以 Protein A 柱纯化的 Cry2A 兔多克隆抗体作为免疫原,免疫 3 只 6~8 周龄雌性 Balb/c 系小鼠,免疫前 1 周采集阴性血清。具体免疫程序如下:首免采用每只 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 用 50 mmol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)溶解的免疫原与等体积弗氏完全佐剂混和,乳化成油包水结构后进行腹腔注射。14 d 后用同样剂量的免疫原与等体积不完全弗氏佐剂混合乳化后进行加强免疫。此后每隔 14 d 加强免疫 1 次。共计免疫 4 次。从第 2 次加强免疫开始,每次免疫后 7 d,断尾取血,制备鼠抗血清,用于效价监测。

1.4 包被原工作浓度优化、抗血清效价及抗独特型抗体组分的测定

用间接非竞争 ELISA 法优化包被原浓度并测定小鼠抗血清效价。具体步骤如下:(1)包被:用 50 mmol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液(CBS)对 Cry2A 兔多抗血清从 100 倍开始进行 5 倍稀释,每孔 100 μl 加入 96 孔酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。(2)封闭:含 0.05% Tween 20 的 PBS 缓冲液(PBST)洗板 3 次后,每孔 200 μl 加入 PBS 溶解的 2% 脱脂奶粉(MPBS),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。(3)加样:PBST 洗板 3 次后,将最后一次采血得到的 1 号鼠抗血清和对应的阴性血清,用 PBS 稀释 10 000 倍,每孔 100 μl 加入酶标板,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。(4)加酶标二抗:PBST 洗板 3 次后,每孔 100 μl 加入 5 000 倍 PBS 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。(5)显色:PBST 洗板 3 次后,每孔 100 μl 加入现配的底物溶液(100 μl 10 mg/ml 二甲亚砜溶解的 TMB 和 25 μl 0.65% H_2O_2 溶于 9.875 ml 100 mmol/L pH 5.5 的柠檬酸缓冲液),37 $^{\circ}\text{C}$ 显色 15 min。(6)终止反应:每孔 50 μl 加入 2 mol/L H_2SO_4 ,用酶标仪在 450 nm 波长下读数。小鼠抗血清效价测定在优化的包被原浓度下进行,具体操作同包被原优化方法,以吸光值大于阴性孔 2.1 倍时的鼠抗血清的最大稀释倍数作为效价。

采用间接竞争 ELISA 法测定鼠抗血清中抗独特型组分。具体操作同包被原优化方法,但在以下操作中有改动:(1)包被:用 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cry2A 毒素包被酶标板。(2)加样:每孔加入 50 μl 250~16 000 倍 PBS 稀释的最后一次采血得到的 1 号鼠抗血清与 50 μl 10 000 倍稀释的 Cry2A 兔多抗血清,另外以同样稀释倍数的鼠阴性血清与 Cry2A 兔多抗血清混

合,作为阴性对照。(3)二抗:加入 5 000 倍 PBS 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG。其余 ELISA 步骤同包被原优化方法。

1.5 鼠抗体 VH 和 V κ 基因的扩增和拼接

1 号小鼠拉颈处死后取脾脏,参照 TRIzol 试剂说明书提取总 RNA。再采用 SuperScriptTM III 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA 第一链。参考 Clackson^[22] 等和 Orlandi 等^[23] 的报道,设计 VH 和 V κ 扩增引物(表 1)。以 cDNA 第一链为模板,用 VH1BACK-NcoI 和 VH1FOR-2 为引物扩增 VH 基因,以 V κ 2BACK 和 V κ 4FOR-Not I (V κ 4FOR1-Not I、V κ 4FOR2-Not I、V κ 4FOR3-Not I、V κ 4FOR4-Not I 等比例混合)为引物扩增 V κ 基因,反应体系在 1 \times PFU PCR master mix 中进行。Linker 则以 pSW2scD1.3 基因为模板,LINKBACK 和 LINKFOR 为引物,1 \times PFU PCR master mix 中进行扩增。PCR 反应条件均为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。产物胶回收后用于下一步 scFv 基因的拼接。

参考 Pasello 等的方法^[24] 进行 scFv 基因拼接。具体为取等摩尔的 VH、V κ 和 Linker 基因混合后,在 1 \times taq PCR master mix 体系中,进行第一步 SOE-PCR,PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,65 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。第一步拼接产物用无菌水稀释 1 000 倍后,加入含有引物 VH1BACK-NcoI 和 V κ 4FOR1-NotI 的 1 \times taq PCR master mix 体系。PCR 条件设置为 94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,45 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,5 个循环;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,40 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,15 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min,产物胶回收后用于酶切。

1.6 Cry2A 毒素抗独特型单链抗体库的构建

分别对 1 μg 胶回收纯化的 SOE-PCR 产物及 1 μg 带有 BSA 单链抗体基因的 pIT2 质粒,采用 Not I 和 Noc I 双酶切。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜后,80 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 10 min。酶切产物及质粒用 T4 连接酶 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,65 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 10 min,PCR 产物纯化试剂盒纯化,去除连接酶及缓冲液中的盐离子成分,再用无菌水溶解备用。将 50 μl TG1 电感受态和 2 μl 纯化后的连接产物加入预冷的 1 mm 电转杯(共设置 10 组反应),调节电压为 1.25 kV,用 Biorad 电转仪进行电转。电转产物快速加入 1 ml SOC 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$,100

r/min缓慢振荡培养 1 h。取适当稀释后的培养液涂布 1 块含有 1 % 葡萄糖和 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素的 TYE 平板 (TYE-AG), 其余培养液涂布 10 块 TYE-AG 平板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜。次日对稀释液涂布板计数, 计算抗体库库容。抗体库的扩增、辅助噬菌体救援方法参考 De Wildt 等的报道^[25]。

表 1 用于单链抗体库构建的引物及 linker 模板序列

Table 1 Sequence of the PCR primers and template of linker for the construction of single-chain variable fragment (scFv) library

扩增 基因	引物	序列 (5'→3')
Vk	Vk2BACK	GACATTGAGCTCACCCAGTCCA
	Vk4FOR1-Not I	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTTTC CAGCTTGGTGCC
	Vk4FOR2-Not I	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTTTC CAGCTTGGTGCC
	Vk4FOR3-Not I	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTTTC CAGCTTGGTGCC
	Vk4FOR4-Not I	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTTTC CAGCTTGGTGCC
VH	VH1BACK-Nco I	GTCTCGCAACTGCGGCCGAGCCGGCCATG GCCCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
	VH1FOR-2	TGAGGAGACGGTGACCGTGCTCCCTTGCC CC
Linker	pSW2scD1.3	TGGAGACTGGGTGAGCTCAATGTCAGAACCA CCACCACCGGAGCCGCCGCCGAGAACCC ACCACCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT CCC
	LINKBACK	GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	LINKFOR	TGGAGACTGGGTGAGCTCAATGTC

下划线部分为酶切位点, pSW2scD1.3 模板中的斜体部分为与 VH1FOR-2 及 Vk2BACK 的重叠区域。S 代表 G/C, M 代表 A/C, R 代表 A/G, W 代表 A/T。

1.7 多克隆噬菌体 ELISA

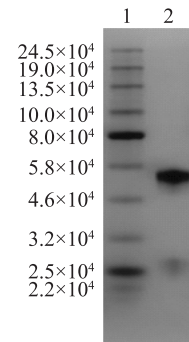
采用 CBS 缓冲液稀释的 10 $\mu\text{g/ml}$ Cry2A 纯化兔多克隆抗体及同样质量浓度的脱脂奶粉以每孔 100 μl 加入酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。次日 PBST 洗板 3 次后, 每孔 200 μl 加入 2 % MPBS, 室温孵育 2 h。PBST 洗板 3 次后, 每孔 100 μl 将从 Cry2A 抗独特型单链抗体库中救援的噬菌体分别加入 Cry2A 纯化兔多克隆抗体及脱脂奶粉包被孔, 同样数量的未经筛选的人源 Tomlinson I 库救援噬菌体作为阴性对照, 室温孵育 1 h。PBST 洗板 3 次, 每孔 100 μl 加入 5 000 倍 PBS 稀释的 HRP 标记的抗 M13 单抗, 室温孵育 1 h。其余显色步骤同方法 1.4 中的 ELISA 操作。读取 Cry2A 抗独特型单链抗体库和 Tomlinson I 库分别在 Cry2A 纯化兔多克隆抗体和脱脂奶粉包

被孔产生的吸光值, 计算信号/背景比值 (S/B)。

2 结果与分析

2.1 Protein A 纯化的抗 Cry2A 毒素兔多克隆抗体

免疫原的纯度是获得高质量免疫应答效果的重要影响因素之一。除了免疫球蛋白 (γ 球蛋白) 之外, 抗血清中还存在大量的白蛋白、 α 球蛋白、 β 球蛋白等组分。前期制备的 Cry2A 兔多克隆抗血清, 成分较为混杂, 因此采用对兔多克隆抗体 Fc 片段有强烈结合能力的 Protein A 柱对抗血清进行了亲和纯化。经过 Protein A 纯化的抗 Cry2A 毒素兔多克隆抗体的 SDS-PAGE 鉴定结果 (图 1) 显示, 分别在相对分子质量 5.5×10^4 和 2.6×10^4 左右有 2 个条带, 这是由于抗体经过 SDS 的变性处理后, 抗体重链和轻链之间的二硫键打开形成的 2 条链。凝胶上未见其他杂带, 纯化效果较好, 可以用于下一步的小鼠免疫试验。



1: 蛋白质相对分子质量 Marker; 2: 纯化后的 Cry2A 兔多克隆抗体。

图 1 纯化的 Cry2A 兔多克隆抗体的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.1 Identification of purified anti-Cry2A rabbit polyclonal antibodies by SDS-PAGE

2.2 包被原工作浓度的优化及免疫鼠血清效价和抗独特型组分的测定

由于本试验所用的二抗 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 对包被原 Cry2A 兔多抗血清存在较高的交叉识别, 因此在测定免疫鼠血清效价前, 需对 Cry2A 兔多抗血清的包被浓度进行优化。优化试验结果 (图 2) 表明, 包被原在 100 倍到 2 500 倍稀释范围内, 鼠阴性血清的吸光值从 1.70 左右的高背景值, 快速下降为 0.37, 从 1.25×10^4 倍到 1.50×10^6 倍稀释范围内, 吸光值趋于平衡维持在本底水平 (0.30 以下)。而 1.25×10^4 倍稀释的免疫鼠血清可以产生 3.00 以上

的吸光值。在保证阴性鼠血清低背景和免疫鼠血清高信号值以及稀释操作简便性的综合考虑下,最终

选择 1×10^4 倍稀释的 Cry2A 兔多抗血清作为优化的包被原浓度,测定免疫鼠血清效价。

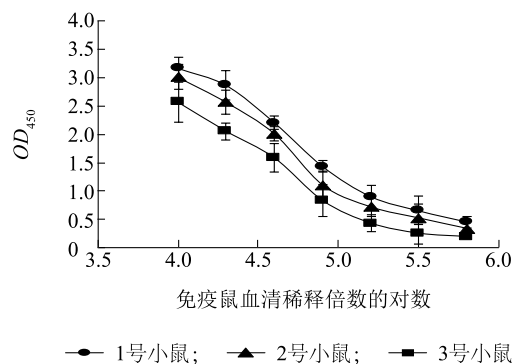
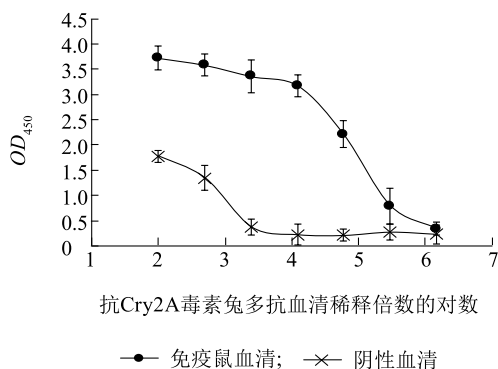


图2 包被原工作浓度的优化及免疫鼠血清效价的测定

Fig.2 Optimization of the working concentration of coating antigen and determination of the titers of immunized mouse antiserum

在优化的包被原工作浓度下,以信号值大于背景值 2.1 倍计,3 只免疫小鼠抗血清效价在 $1:1.6 \times 10^5$ 到 $1:6.4 \times 10^5$ 倍之间(图2)。图3显示1号免疫鼠血清在 250 倍到 16 000 倍稀释范围内,可对 Cry2A 兔多抗和 Cry2A 毒素的结合产生最高 17.6% 的抑制。而该浓度范围的阴性鼠血清对其结合没有抑制作用。说明1号免疫鼠血清中有部分组分能够替代 Cry2A 与兔多克隆抗体结合,为 Ab2 β 型或 Ab2 γ 型抗独特型抗体。因此,选用效价最高的1号小鼠取脾脏,提取总 RNA 用于 Cry2A 抗独特型单链抗体库的构建。

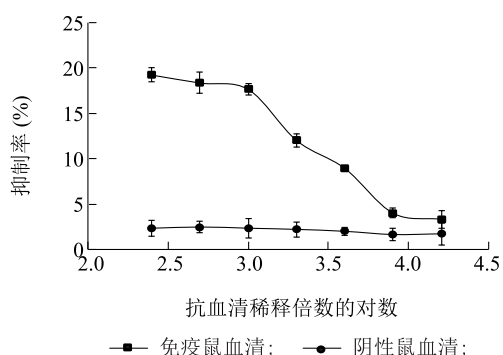


图3 免疫鼠血清中 Ab2 β 和 Ab2 γ 型抗独特型抗体成份的鉴定

Fig.3 Determination of Ab2 β and Ab2 γ type anti-idiotypic antibodies of immunized mouse antiserum

2.3 Cry2A 抗独特型单链抗体库的构建

采用3片段法对单链抗体基因进行拼接(图4)。首先引物 VH1BACK-Nco I 和 V κ 2BACK 分别

与 VH 和 V κ 基因的 N 端恒定区互补,引物 VH1FOR-2 和 V κ 4FOR-Not I 分别与 VH 和 V κ 基因的 J 片段互补,扩增小鼠的 VH、V κ 基因,同时在 VH 的 5'端和 V κ 的 3'端引入 Nco I 和 Not I 2 个酶切位点。另外合成与 VH 基因、V κ 基因具有重叠序列的 linker 片段,最后采用 SOE-PCR 法完成 3 个异源片段的连接,并克隆至 pIT2 载体。

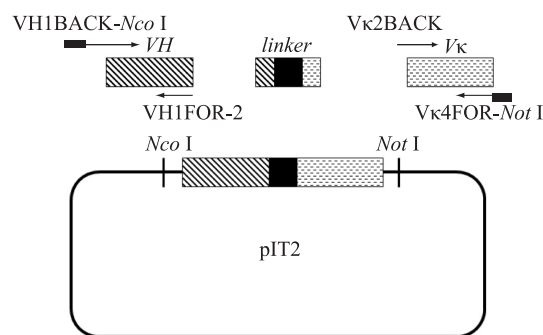


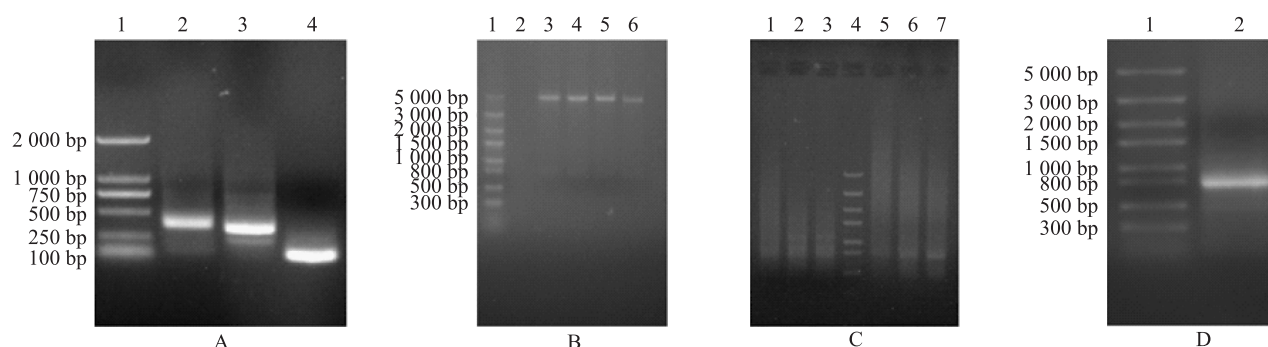
图4 鼠单链抗体基因的拼接和 pIT2 载体克隆示意图

Fig.4 Scheme for assembling of scFv genes and cloning into pIT2 vector

VH、V κ 和 linker 基因的 PCR 扩增结果(图5A)显示,VH 基因、V κ 基因分子大小在 250 bp 至 500 bp 之间,linker 基因位于 100 bp 偏下位置,符合预期分子大小。图5B显示 pIT2 载体通过 Nco I 和 Not I 双酶切,释放出 735 bp 左右的能识别 BSA 的人源单链抗体基因片段。SOE-PCR 反应条件优化结果(图5C)表明,在 pfu PCR master mix 体系下,scFv 基因

的扩增条带均较为模糊;在 *Taq* PCR master mix 体系下,采用1 000倍稀释的第1步 SOE-PCR 产物作为模板,获得的 800 bp 左右的目的片段最为明亮。

最后选用 *Taq* PCR master mix 和1 000倍稀释的第1步拼接产物作为模板,对 *scFv* 基因进行大量扩增,获得了较为清晰的 800 bp 左右目的条带(图 5D)。



A 图中,1 为 DNA 分子量 Marker,2、3、4 分别为 *VH* 基因、*VK* 基因、*linker* 基因;B 图中,1 为 DNA 分子量 Marker, 3~6 为 pIT2 载体的酶切产物;C 图中,1~3 为在 *pfu* PCR master mix 体系中第1步 SOE-PCR 拼接产物分别稀释 10、100 和1 000倍作为模板用于第2步拼接,4 为 DNA 分子量 Marker,5~7 为在 *Taq* PCR master mix 体系中第1步 SOE-PCR 产物分别稀释 10、100 和1 000倍作为模板用于第2步拼接;D 图中,1 为 DNA 分子量 Marker, 2 为优化条件下大量扩增的 SOE-PCR 产物。

图 5 Cry2A 抗独特型单链抗体库的构建

Fig.5 Construction of the Cry2A anti-idiotypic scFv library

scFv 基因转入 pIT2 载体后,电转入感受态 TG1,构建的抗体库库容为 1.2×10^7 。随机挑取了 10 个克隆测序,除了 1 个克隆存在终止密码子和 1 个克隆为模板序列外(人源 BSA 单链抗体基因),其余 8 条均可以翻译出不同的鼠 *scFv* 单链抗体基因。图 6 为 1 个从库中随机挑取的 *scFv* 克隆的 DNA 碱基序列及其编码的氨基酸序列,标注了酶切位点、引物、CDR 区及 *linker* 位置。在 *Nco* I 和 *Not* I 2 个酶切位点间单链抗体基因共有 702 bp,其中 *VH* 基因 336 bp, *VK* 基因 321 bp, *linker* 基因 45 bp。

2.4 Cry2A 抗独特型单链抗体库的多克隆噬菌体 ELISA 分析

Cry2A 抗独特型单链抗体库经辅助噬菌体救援后,用多克隆噬菌体 ELISA 测定抗体库对 Cry2A 兔多克隆抗体的整体结合能力。结果(图 7)显示, 1×10^7 CFU 的噬菌体抗体对免疫原结合信号与背景的比值 (*S/B*) 为 6.04,而未经筛选的半合成人源 Tomlinson I 库的 *S/B* 值为 1.33。说明未经筛选的 Cry2A 抗独特型单链抗体库对免疫原具有较高的结合能力,下一步将用于 Cry2A 抗独特型单链抗体的筛选。

3 讨论

通常抗独特型抗体制备有 2 种方案。第 1 种方案是将整体抗体消化为 5.0×10^4 左右的 Fab 片段后

与载体蛋白连接用于动物免疫。这样可以避免整体抗体中的 Fc 段产生抗体,让抗独特型抗体的丰度提高。但是由于该方法需要对整体抗体进行酶切和纯化,Fab 片段得率较低,对抗体的消耗量较大。消化后的抗体片段免疫原性也会减弱。酶解、纯化、载体蛋白偶联等步骤,也可能对抗体独特位的空间构象造成影响。第 2 种方案是直接整体抗体作为免疫原用于抗独特型抗体制备。该方法的优点是较为简单,抗原需求量小,有利于独特位原始空间结构的维持,但也存在由于抗独特位较小,导致抗独特型抗体产生比例较低等问题^[26]。考虑到后续试验采用的是建立单链抗体库的形式来筛选抗独特型抗体,在筛选过程中可以采用阴性血清负筛选和抗原竞争性洗脱等方法来去除与 Fc 片段结合的噬菌体抗体的干扰^[27],我们最终选用了整体抗体免疫的方案。从实际效果看,整体兔多克隆抗体免疫小鼠,最高效价在 $1 : 6.4 \times 10^5$ 左右,小鼠的免疫应答效果良好。而且通过免疫鼠血清对 Cry2A 毒素与其兔多克隆抗体的抑制试验分析发现,免疫鼠血清对 Cry2A 与兔多克隆抗体的结合最高可产生约 17.6% 的抑制,这证明了鼠血清中存在能模拟 Cry2A 特征结构的 Ab2 β 和 Ab2 γ 型抗独特型抗体的存在,且比例超过预期值。因此该小鼠的抗体基因可以用于下一步 Cry2A 抗独特型单链抗体库的构建。

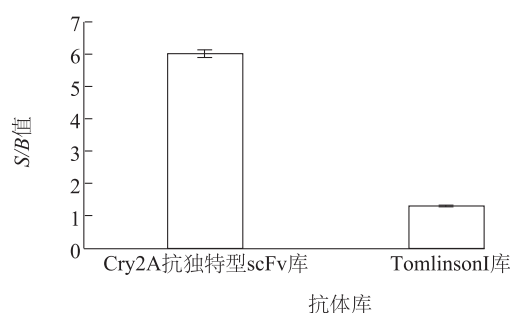


图7 Cry2A 抗独特型单链抗体库的多克隆噬菌体 ELISA 分析
Fig.7 Polyclonal phage ELISA for anti-idiotypic scFv library of Cry2A toxin

成熟抗体 VH 和 VK 基因序列,发现成熟抗体的 VH 和 VK 基因的 N 端相对保守区,另外 VH 和 VK 基因 3'端的 J 片段也较为保守区,本研究用于扩增全套抗体基因的引物正是依据这些区域设计。另外,本试验设计的 $scFv$ 拼接为 2 步法,第 1 步 SOE-PCR 中,在没有引物加入的情况下将 VH 、 VK 和 $linker$ 基因等摩尔混合进行循环扩增。在这一反应中 VH 基因通过 $linker$ 与 VK 基因随机连接起来形成少量的 $scFv$ 基因。接着将随机连接的 $scFv$ 基因稀释后与引物 VH 的 5'端引物和 VK 的 3'端引物混合,在 Taq 酶的作用下进行第 2 步 SOE-PCR 扩增。但是由于第 1 步 SOE-PCR 中随机产生的 $scFv$ 基因难以定量,而 PCR 反应的模板浓度也是决定第 2 步 SOE-PCR 拼接效果的关键因素,因此对第 1 步 SOE-PCR 的产物稀释倍数进行了优化。试验中还同时考察了 pfu PCR master mix 和 Taq PCR master mix 体系对 SOE-PCR 拼接效果的影响。结果表明 1 000 倍稀释的第 1 步拼接产物在 Taq PCR master mix 体系作用下产生的目的片段最为明亮。因此本试验最终选择了 1 000 倍稀释的第 1 步 SOE-PCR 产物用作第 2 步拼接的模板。

库容和多样性是评价抗体库质量的关键^[28]。从抗体库中随机挑取的 10 个克隆测序结果看,其中 1 条为模板序列,这可能是噬菌体载体 pIT2 酶切不完全导致的,由于该模板序列为识别 BSA 的单链抗体基因,在后期的库筛选中应注意避免使用 BSA 作为封闭蛋白而导致模板克隆的富集;另有一条序列在 $scFv$ 基因中存在终止密码子。其余 8 条序列均可翻译为不同的鼠 $scFv$ 序列,证明抗体库具有较好的多样性。另外,由于本试验构建的是鼠免疫抗体

库,其抗体可变区基因高度倾向于能识别的免疫原抗体,因此免疫抗体库的库容无需达到天然抗体库的大库容水平(1×10^8 左右)即可筛选到高亲和力的目标抗体^[20]。有研究者报道 1×10^6 左右的免疫抗体库即可成功筛选到目标抗体^[29]。因此本试验构建的库容为 1.2×10^7 Cry2A 抗独特型单链抗体库可以应用于后期的筛选。抗体库的多克隆噬菌体 ELISA 分析结果表明,未经筛选的 Cry2A 抗独特型单链抗体库对免疫原的结合信号大大高于未经筛选的天然抗体库,直接证明了 Cry2A 抗独特型单链抗体库的有效性。

本研究采用整体抗体免疫和噬菌体展示技术的路线,成功构建了库容为 1.2×10^7 的鼠免疫 Cry2A 抗独特型单链抗体库,为 Cry2A 毒素的抗独特型单链抗体的筛选及无毒免疫检测试剂盒的研制奠定了基础。

参考文献:

- [1] VAN FRANKENHUYZEN K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 101:1-16.
- [2] DONG S, ZHANG C Z, LIU Y, et al. Simultaneous production of monoclonal antibodies against *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1 toxins using a mixture immunization [J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 531:60-66.
- [3] YANG Q, TANG S J, RANG J, et al. Detection of toxin proteins from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 by strategy of 2D-LC-MS/MS [J]. *Current Microbiology*, 2015, 70:457-463.
- [4] NOGUERA P A, IBARRA J E. Detection of new cry genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76:6150-6155.
- [5] GAO H F, WEN L K, WU Y H, et al. An ultrasensitive label-free electrochemiluminescent immunosensor for measuring CryIAb level and genetically modified crops content [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 97:122-127.
- [6] JIAO L X, LIU Y, ZHANG X, et al. Site-saturation mutagenesis library construction and screening for specific broad-spectrum single-domain antibodies against multiple Cry1 toxins [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101:6071-6082.
- [7] XU C X, ZHANG X, LIU X Q, et al. Selection and application of broad-specificity human domain antibody for simultaneous detection of Bt Cry toxins [J]. *Analytical Biochemistry*, 2016, 512:70-77.
- [8] HU L, LIU A P, CHEN W F, et al. A non-toxic enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B1 using anti-idiotypic antibodies as substitutes [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*

- ture, 2017, 97:1543-1548.
- [9] WANG D, XU Y, TU Z, et al. Isolation and characterization of recombinant variable domain of heavy chain anti-idiotypic antibodies specific to aflatoxin B-1 [J]. Biomedical and Environmental Sciences, 2014, 27:118-121.
- [10] TSUTSUMI T, NAGATA S, YOSHIDA F, et al. Anti-idiotypic monoclonal antibodies against anti-microcystin antibody and their use in enzyme immunoassay [J]. Toxicon, 1998, 36:235-245.
- [11] LIU B H, YU F Y, CHU F S. Anti-idiotypic and anti-anti-idiotypic antibodies generated from polyclonal antibodies against microcystin-LR [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44:4037-4042.
- [12] MARAGOS C M. Production of anti-idiotypic antibodies for deoxynivalenol and their evaluation with three immunoassay platforms [J]. Mycotoxin Research, 2014, 30:103-111.
- [13] YU F Y, CHU F S. Production and characterization of a monoclonal anti-anti-idiotypic antibody against fumonisin B (1) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47:4815-4820.
- [14] 江涛, 郑佳, 李楠, 等. 抗T-2毒素单抗独特型抗体的制备及应用研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(3): 234-237.
- [15] LAN H N, ZHENG X, KHAN M A, et al. Anti-idiotypic antibody: A new strategy for the development of a growth hormone receptor antagonist [J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015, 68:101-108.
- [16] 刘媛, 梁颖, 王耘, 等. 抗独特型抗体在小分子农药、真菌毒素免疫检测中的应用 [J]. 浙江农业学报, 2010, 23(3): 398-402.
- [17] XU Y, XIONG L, LI Y P, et al. Anti-idiotypic nanobody as citrinin mimotope from a naive alpaca heavy chain single domain antibody library [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407:5333-5341.
- [18] XU Y, XIONG L, LI Y P, et al. Citrinin detection using phage-displayed anti-idiotypic single-domain antibody for antigen mimicry [J]. Food Chemistry, 2015, 177:97-101.
- [19] GOLETZ S, CHRISTENSEN P A, KRISTENSEN P, et al. Selection of large diversities of anti-idiotypic antibody fragments by phage display [J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 315:1087-1097.
- [20] ZHOU H Y, ZHANG Y L, LU G D, et al. Recombinant antibody libraries and selection technologies [J]. New Biotechnology, 2011, 28:448-452.
- [21] 伯吉斯, 多伊彻. 蛋白质纯化指南 [M]. 陈薇, 译. 北京: 科学出版社, 2009:383-460.
- [22] CLACKSON T, HOOGENBOOM H R, GRIFFITHS A D, et al. Making antibody fragments using phage display libraries [J]. Nature, 1991, 352:624-628.
- [23] ORLANDI R, GUSSOW D H, JONES P T, et al. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain-reaction [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1989, 86:3833-3837.
- [24] PASELLO M, ZAMBONI S, MALLANO A, et al. Design and construction of a new human naive single-chain fragment variable antibody library, IORISS1 [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 224:1-11.
- [25] 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, 18:989-994.
- [26] 李敏, 计融. 抗独特型抗体的研究现状 [J]. 中国预防医学杂志, 2006, 7(2):147-149.
- [27] 蒂姆克拉克森, 亨利洛曼. 噬菌体展示: 通用实验指南 [M]. 马岚, 卢帅, 李铭, 译. 北京: 化学工业出版社, 2004: 147-168.
- [28] 徐重新, 张霄, 张存政, 等. 鼠源噬菌体展示库的构建及初步应用 [J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1):210-217.
- [29] 郑志明, 金社胜, 肖希龙, 等. 抗诺氟沙星噬菌体单链抗体库的构建与筛选 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(S1):36-41.

(责任编辑:张震林)