

· 论 著 ·

抗生物素化三聚氰胺人源单链可变区抗体筛选与鉴定^{*}

马巍娜¹, 刘雪林², 宋宏彬², 沈建良¹, 黄友章¹, 刘毅¹, 向丹¹

(1. 中国人民解放军海军总医院血液科, 北京 100037; 2. 中国人民解放军军事医学科学院十所, 北京 100039)

摘要:目的 筛选生物素化三聚氰胺人源单链可变区(scFv)抗体,为研究相关快速检测试剂盒创造条件。方法 本试验利用生物素化三聚氰胺为包被抗原,从半合成噬菌体抗体库中筛选其特异性噬菌体抗体片段。即采用菌噬体表面展示技术,以链亲和素-生物素标记的三聚氰胺为固相包被靶抗原,把靶抗原包被在免疫平板上,加入噬菌体抗体库,则头部带有能与靶抗原特异性结合的抗体分子的噬菌体就被固定在免疫平板上,不能特异结合的噬菌体则被漂洗掉;将特异结合的噬菌体洗脱下来,感染大肠杆菌,就可以得到含抗体基因的噬菌粒。**结果** 从半合成的菌噬体单链可变区抗体库中经过 3 轮“吸附-洗脱-扩增”筛选过程后,获得抗原特异性和结合性较强的生物素化三聚氰胺 scFv 片段。**结论** 酶联免疫吸附试验等进行鉴定后,筛选得到了抗生物素化三聚氰胺的噬菌体抗体基因片段,为下一步亲和力鉴定、蛋白表达及开发相关检查试剂盒奠定了基础。

关键词:噬菌体表面展示技术; 筛选; 三聚氰胺; 人源单链可变区抗体; 生物素化

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.12.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)12-1608-03

Screening and identification of biotinylated melamine in human single-chain variable region antibody^{*}

MA Weina¹, LIU Xuelin², SONG Hongbin², SHEN Jianliang¹, HUANG Youzhang¹, LIU Yi¹, XIANG Dan¹

(1. Department of Hematology, General Hospital of PLA Navy, Beijing 100037, China; 2. The Tenth Institute of Chinese People's Liberation Army Military Medical Science Academy, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To screen biotinylated melamine in human single-chain variable region (scFv) antibody and to create conditions for the study of rapid detection kit. **Methods** Biotinylated melamine were used as coating antigen and antigen-specific phage antibody fragments were screened from semisynthetic phage antibody library. Using bacteria phage surface display technology, streptavidin-biotinylated melamine coated solid phase target antigen and the target antigen was coated on the immune flat. After phage library were added, the phages' head with antibody molecule which could bind with scFv-antigen specifically was fixed on the immune plates, which could not bind with the antigen specifically were rinsed. Then the eluted specific binding phages were used to infect E. coli, macrophages contained specific antibody genes bacteria tablets were obtained. **Results** After three semi-synthetic bacteria from phage single chain variable region antibody library “absorption-elution-amplification” screening process, scFv fragments biotinylated melamine with stronger antigen binding specificity were obtained. **Conclusion** By enzyme-linked immunosorbent assay, fragments of biotinylated melamine in human single-chain variable region antibody could be identified, which may lay the foundation of the identification of affinity, the expression of protein and the development of the test kits.

Key words: phage display technology; screening; melamine; scFv; biotinylated

近年对制备化学物质抗体的研究很多,而利用噬菌体抗体库表面展示技术完成制备的报道少见^[1-2]。农药、兽药和食品添加剂抗体制备技术平台的建设是标准抗体资源库和快速检测方法建立的基础和关键。小分子的农药、兽药和食品添加剂,由于本身没有免疫原性,常规方法很难获得理想的免疫效果。三聚氰胺化学式:C₃H₆N₆,俗称蜜胺、蛋白精,IUPAC命名为1,3,5-三氨基-2,4,6-三嗪,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,被用作化工原料。由于直接测量蛋白质技术比较复杂,所以常用一种叫做凯氏定氮法的方法,通过测定氮原子水平来间接推算食品中蛋白质水平。由于三聚氰胺与蛋白质相比含有更多的氮原子,所以被中国造假者利用,添加在食品中以造成食品蛋白质水平较高的假象。在前期研究中,已通过直接筛选方法获得了具有特异性相对较好的抗氯菊酯、甲硝唑等农、兽药的抗体片段,在之后试验中发现此抗体片段在表达、纯

化方面试验难度大,效果不理想。分析原因:由于化学药品相对分子质量小,免疫原性差,在完全溶解的状态下,对聚丙烯免疫平板的吸附量尚不能确定,不能排除与封闭液非特异性结合的可能性,文献支持弱,增加了淘洗的难度和非特异性抗体产生的概率,进而进一步完善试验方案,目的是能有效避免非特异性抗体产生。故本研究选用另一种化学药品三聚氰胺,将其生物素化并为包被靶抗原,从噬菌体抗体库中筛选生物素化三聚氰胺噬菌体抗体克隆,为进一步研究三聚氰胺的生物学功能及研发三聚氰胺快速准确的测定试剂盒奠定基础,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 三聚氰胺抗原:国家标准物质中心 KH P2636 25 mg,多聚左旋氨酸 Sigma 公司产品, Mol, wt: 30000-70000(简: poly-Lys), 20% 戊二醛 (Glutaraldehyde, GA), 甘氨酸 (Gly),

* 基金项目:国家 863 计划科学基金资助项目(2006BAK02A09)。

作者简介:马巍娜,女,主管技师,主要从事微生物控制技术研究。

0.001 mol/L, pH 7.2, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 为进口日产 PBS, 0.1 mol/L, pH 9.0, 二甲基甲酰胺 (Flaka), 羧基琥珀酰亚胺酯, 生物素, Fluka, 14405, 活化生物素 (BNHS), Mr: 341.39. 1×10^{12} cfu/mL 辅助噬菌体 M13 辅助噬菌体 M13KO7; 北京纽英伦生物技术有限公司; 生物素 D-Biotin, Exy: 07. 2010 UBIO 公司纯度大于或等于 99%。大肠杆菌感受态细胞 XL1-Blue; 本实验室保存。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 生物素化三聚氰胺的生物素化反应 (1) 由 GA 将生物素化三聚氰胺与 Poly-Lys 连接起来, 反应为三聚氰胺-GA-Poly-Lys; (2) BNHS 竞争去 Poly-Lys 多余的-NH₂, 即三聚氰胺-GA-Poly-Lys-BNHS; (3) BNHS-NH₂-三聚氰胺, 多余的 BNHS 与 BSA 的 NH₂ 连接, BNHS-BSA 经过透析将 BNHS-NH₂-三聚氰胺透入 BSA 中, 而 BNHS-BSA 层压透析袋中二者分开。以上述 3 种方法制成 3 种产品: (1) 三聚氰胺-GA-Poly-Lys-BNHS (生物素化); (2) BNHS-NH₂-三聚氰胺 (生物素化三聚氰胺); (3) BNHS-BSA。

1.2.2 生物素化三聚氰胺噬菌体抗体的筛选 抗原包被: 将链亲和素包被于免疫培养板中, 至终浓度为 10 μg/mL, 4 °C 包被过夜, 次日, 将 10 μg/mL 生物素化三聚氰胺靶抗原 100 μL/包被, 4 °C 过夜。BSA 封闭 2 h 后加入 200 μL 处理后抗体库 2 h, 37 °C 放置 90 min, 以含有 0.1 g/mL 吐温 20 (Tween20) PBS (洗涤液) 和 PBS 快速洗涤 20 次, 以 0.1 mol/L 三乙胺洗脱已吸附在平皿上的噬菌体, 然后用 1 mol/L Tris (pH 7.4 中和液) 中和, 再感染对数生长期的 大肠杆菌 TG1、加入辅助噬菌体; 重复 3 次上述“吸附-洗脱-扩增”过程^[3]。

1.2.3 生物素化噬菌体抗体鉴定 经 3 轮筛选获得的克隆体生长在 96 孔酶联免疫板上, 按上面的过程用 M13KO7 也可以收集到噬菌体抗体, 但特异的与生物素化三聚氰胺结合的噬菌体上清液就需用间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行测定。间接 ELISA 可以鉴定每轮筛选经聚乙二醇沉淀的结合噬菌体, 与噬菌体克隆结合的是生物素化三聚氰胺, 而不是链亲和素、生物素、BSA、甘氨酸都独立存在。

1.2.4 ELISA 鉴定、竞争抑制 ELISA 鉴定生物素化噬菌体抗体 10 μL 噬菌体上清液与等体积的以 PBS/BSA 稀释的 2 μg/mL 生物素化三聚氰胺单克隆抗体混匀, 于 37 °C 孵育 30 min。加入到包被链亲和素-生物素-生物素化三聚氰胺抗体的 ELISA 板中, 37 °C 孵育 1 h, 用含有 0.1 g/mL Tween20/PBS 洗 5 次, 然后加入 1:5 000 稀释的 HRP-鼠抗 M13。37 °C 孵育 1 h, M13KO7 为阴性对照, 邻苯二胺为底物显色^[3]。筛选时再做一组浓度为 50 μg/mL 的筛选, 摸索条件; ELISA 方面阴性对照另设只包有链亲和素孔, 只包有生物素孔, 只包有 BSA 孔; 空白对照: 水、PBS。

2 结 果

2.1 三聚氰胺的生物素化反应 (1) 三聚氰胺与多聚赖氨酸约 5.4 mL, 三聚氰胺-GA-Poly-Lys-BNHS; (2) 生物素化三聚氰胺 (BNHS-三聚氰胺) 4.3 mL; (3) 生物素化 BSA, 1.8 mL (BNHS-BSA)。

2.2 具有免疫活性的生物素化三聚氰胺噬菌体人源单链可变区 (scFv) 抗体的筛选 以生物素化三聚氰胺作为支持分子, 对噬菌体抗体文库进行 3 轮“吸附-洗脱-扩增”的筛选。生物素

化三聚氰胺 scFv 抗体特异性噬菌粒得到了富集结果, 见表 1。第 1 轮产出率 [产出率 (cfu/mL) = 捕获的噬菌体数量/投入的噬菌体数量] 为 1.0×10^{-5} , 随着淘洗次数增加, 从固相平板洗脱下来的噬菌粒数显示为增加的趋势, 在第 3 轮筛选后结合到包被生物素化三聚氰胺平皿的噬菌体, 产出率为 6.0×10^{-4} , 与第 1 轮相比, 富集了 60 倍 (富集倍数 = 第 3 轮产出率/第 1 轮产出率)。

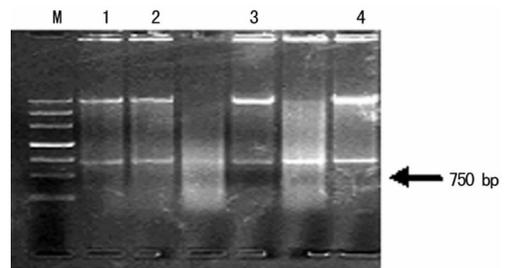
表 1 亲和吸附筛选对生物素化三聚氰胺噬菌体 scFv 抗体的富集

筛选次数	投入	捕获	产出率 (cfu/mL)
第 1 轮	1×10^{12}	1×10^7	1×10^{-5}
第 2 轮	1×10^{12}	1×10^7	1×10^{-5}
第 3 轮	1×10^{12}	6×10^8	6×10^{-4}

2.3 采用 ELISA 对生物素化三聚氰胺噬菌体 scFv 抗体的鉴定筛选 从第 3 轮筛选后得到的细菌集落中随机挑选 60 个克隆, 用 ELISA 测定上清液中含有的噬菌体 scFv 抗体与生物素化三聚氰胺抗原结合活性。其中有 12 株 ELISA 的吸光度 (A) 值在 490 nm 读数数值较高。对这些噬菌体抗体与 BSA 的交叉反应试验后, 确定其中有 5 株 (生物素化三聚氰胺 1~5) 交叉反应较弱, 数据见表 2。抑制率 (%) = 抑制前 - 抑制后 / 抑制前 × 100%。生物素化三聚氰胺 1~5 为不同的克隆编号; 0~1.5 为 490 nm 波长读数。抑制前阴性对照: 链亲和素 0.205, 生物素 0.159; 抑制后阴性对照: 链亲和素 0.193, 生物素 0.177; 空白对照值: 链亲和素 0.074、生物素 0.180。

表 2 5 株不同的克隆编号竞争抑制 ELISA

序号	抑制前	抑制后	抑制率 (%)
1	0.674	0.448	31
2	0.403	0.124	55
3	0.999	0.512	49
4	0.439	0.211	51
5	1.380	0.659	57



注: M 为 maker III, 对应片段大小约 750 bp, 1~4 为 PHEN-1 载体上的生物素化三聚氰胺噬菌体抗体片段。

图 1 生物素化三聚氰胺 scFv 噬菌体抗体筛选酶切图

2.4 初筛出生物素化三聚氰胺噬菌体 scFv 抗体筛选酶切结果 结合 3 次 ELISA 重复试验的 A 值, 对其进行双酶切鉴定, 该噬菌体抗体连接于 pHEN-1 载体中, 确定插入酶切位点后, 从噬菌体抗体阳性克隆中提取质粒, 经 *Sfi* I / *Not* I 酶切后, 片段大小约为 750 bp, 与目的基因片段相符, 见图 1。

3 讨 论

现今用噬菌体抗体库技术已经获得了大量针对病原微生物的抗体,如人类免疫缺陷病毒和衣原体抗体^[3-8]。这些噬菌体抗体中,许多具有临床诊断和治疗应用前景^[9-12]。利用噬菌体抗体库技术筛选化学药品抗体的报道极少见,并且不完整,用基因工程手段制备化学药品的单克隆抗体的报道也很稀少。故本研究旨在开辟一种新的化学药品抗体的制备方法。

1979 年 Guesdon 利用生物素与亲和素间具有高度亲和力的特点,建立了标记亲和素与生物素法及桥联亲和素-生物素技术,生物素-亲和素系统具有高特异性、灵敏度等显著特点。抗原分子经生物素化后,其结合抗体的活性稳定,不受影响,一旦结合则很难分离,因此生物素能与多种标记物结合,适合用于多种免疫检测技术,可明显降低或避免反应中可能存在的非特异性结合的噬菌体抗体。

随着人们对食品安全的重视和对农、兽药滥用造成危害的认识加深,农、兽药残留分析现在已变得更加紧迫和重要。本研究设计利用链亲和素-生物素标记抗原后进行筛选其生物素化抗体片段,故试验利用生物素标记后的生物素化三聚氰胺为包被抗原,从半合成噬菌体库中筛选其噬菌体抗体。经过 3 轮“吸附-洗脱-扩增”筛选过程后,获得与目的抗原结合特异性较强,亲和性较好的生物素化三聚氰胺噬菌体抗体,且前期试验结果均优于直接包被抗原筛选抗体片段,经鉴定认为是经过筛选得到初期的抗体基因片段。对其表达、纯化及研究与开发农、兽药,以及饲料添加剂残留检测试剂(盒)及样品的前处理方法正在继续试验和探索中。

参考文献

[1] 何方洋,邱阳生,杨根海,等. 克伦特罗单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(6): 30-32.

[2] 扬金娥. 克伦特罗单克隆抗体的研制与初步鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2001.

(上接第 1607 页)

[4] Maruyama S, Hirayama C, Yamamoto S, et al. Red blood cell status in alcoholic and non-alcoholic liver disease[J]. J Lab Clin Med, 2001, 138(5): 332-337.

[5] 姚咏明. 重视对脓毒症免疫状态的监测与评估[J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(8): 795-796.

[6] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ES-ICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference[J]. Intensive Care Med, 2003, 29(4): 530-538.

[7] Hunziker S, Stevens J, Howell MD. Red cell distribution width and mortality in newly hospitalized patients[J]. Am J Med, 2012, 125(3): 283-291.

[8] 赵静静, 柴艳芬, 张晓堃. 红细胞分布宽度对脓毒症休克患者预后的预测价值[J]. 天津医科大学学报, 2015, 21(2): 168-170.

[3] McElhiney J, Lawton LA, Porter AJ. Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a native human phage display library[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 193(1): 83-88.

[4] 成军. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS4A 的研究进展[J]. 国外医学病毒学分册, 2000, 7(1): 14-17.

[5] 王琳, 李克, 成军, 等. 筛选与克隆肝再生增强因子结合蛋白的基因[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(2): 161-164.

[6] 钟彦伟, 成军, 王刚, 等. 乙肝病毒核心抗原人源单链可变区抗体的筛选[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(2): 31-32.

[7] 许艇, 邵晓龙, 秦治翔, 等. 杀虫剂西维因单克隆抗体的研制及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(1): 61-64.

[8] 覃雅丽, 石德时, 王桂枝, 等. 抗氯霉素单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国兽医学报, 2001, 21(6): 556-558.

[9] Shelver WL, Smith DJ, Berry ES. Production and characterization of a monoclonal antibody against the betaadrenergic agonist ractopamine[J]. Food Hyg Soc Jpn, 2000, 41(1): 48-53.

[10] Kristensen P, Winter G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages[J]. Fold Des, 1998, 3(5): 321-328.

[11] Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, et al. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries[J]. EMBO J, 1993, 12(2): 725-734.

[12] Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, et al. By-passing immunization: human antibodies displayed on phage[J]. J Mol Biol, 1991, 222(3): 581-597.

(收稿日期: 2016-01-21 修回日期: 2016-02-26)

[9] Spinarová L, Toman J, Pospíšilová J, et al. Humoral response in patients with chronic heart failure[J]. Int J Cardiol, 1998, 65(3): 227-232.

[10] Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, et al. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(14): 9450-9455.

[11] Perlstein TS, Weuve J, Pfeffer MA, et al. Red blood cell distribution width and mortality risk in a Community-Based prospective cohort[J]. Arch Intern Med, 2009, 169(6): 588-594.

(收稿日期: 2016-01-22 修回日期: 2016-03-18)