

# 鼠源抗 B 型肉毒毒素单链抗体噬菌体文库的构建筛选 及抗体免疫学活性的初步研究\*

杨秀清 王慧\*\* 史晶 蔡昆 侯晓军 包士中 荫俊

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

**摘要** :B型肉毒毒素重链 C-端片段 BoNTB/Hc 经金属螯和层析法纯化后免疫 Balb/c 小鼠,从其脾淋巴细胞中提取总 RNA,反转录成 cDNA,用抗体可变区混合引物进行全套抗体重、轻链可变区基因的扩增,体外随机装配成单链抗体(scFv)。将其克隆至 pCANTAB5E 中,构建单链抗体噬菌体抗体库。结果表明经过 4 轮“吸附-洗脱-扩增”的富集过程,筛选获得高亲和力的克隆。序列测定符合抗体可变区结构特点。

**关键词** :B型肉毒毒素,scFv,噬菌体抗体库

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)06-1037-05

## Construction and Screening of a Phage Display Library of Repertoire Single Chain Fv Antibody from Mouse Immunized with BoNTB/Hc\*

YANG Xiu-Qing WANG Hui\*\* SHI Jing CAI Kun HOU Xiao-Jun BAO Shi-Zhong YIN Jun

(Institute of Microbiology and Epidemiology, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

**Abstract** :To produce antibodies capable of neutralizing botulinum neurotoxin type B (BoNT/B), We cloned the carboxy-terminal end of Hc containing the major determinants responsible for specific toxin induced and purified. The heavy-chain and kappa light-chain variable region gene repertoire of immunoglobulin were amplified individually from the spleen cell mRNA by RT-PCR and joined as a single-chain Fv (scFv) DNA fragment. These fragment were cloned into the phagemid pCANTAB5E and the phage display library was constructed. Results showed that the high affinity scFv was obtained after 4 rounds of panning, with its DNA sequence conforming to that of mouse antibody.

**Key words** :Botulinum neurotoxin type B, scFv, Phage display library

肉毒毒素是肉毒梭状杆菌产生的外毒素,有 7 种血清型(A~G),是目前已知的毒性最强的细菌蛋白质之一。人类肉毒中毒主要是有 A、B 和 E 型引起<sup>[1]</sup>。作为一种重要的恐怖生物战剂,预防和治疗肉毒中毒至关重要<sup>[2,3,4]</sup>。目前疫苗是预防肉毒中毒的最有效方法。唯一有效的治疗方法是使用多价马血清抗毒素,未见其它有效治疗肉毒中毒药物的报道<sup>[4]</sup>。

研究表明各型肉毒毒素分子由重链(H链, MW100kD)和轻链(L链, MW50kD)组成,二者由 1 个二硫键连接<sup>[1]</sup>。不同的肉毒毒素有不同的细胞受

体,从而导致重链羧基末端序列的显著多样性。重链羧基末端对毒素与细胞受体的结合起着至关重要的作用,研究发现用单抗封闭毒素 Hc 上的表位,可以在一定程度上有效预防和治疗肉毒中毒<sup>[5]</sup>。因此,阻断肉毒毒素重链羧基末端与靶细胞的结合能有效地预防肉毒中毒<sup>[6]</sup>。

本研究中用重组表达并纯化的 B 型肉毒毒素重链 C-末端(BoNTB/Hc)免疫小鼠,从其脾淋巴细胞中提取全套抗体可变区基因,构建 scFv 噬菌体抗体文库并富集筛选抗 BoNTB/Hc 的抗体,进一步制备针对 BoNT/B 的单链抗体。

\* 国家自然科学基金(No. 30470102)

\*\* 通讯作者 Tel 010-66948532, E-mail: geno0109@vip.sina.com, toxinswh@126.com

收稿日期:2007-02-12, 修回日期:2007-06-25

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株:表达载体噬菌粒 pCANTAB5E、大肠杆菌 XL1-Blue、辅助病毒 M13KO7 均购自安玛西亚公司。BoNTB/Hc 为本室制备。

1.1.2 主要试剂:限制性核酸内切酶 *Sfi*I、*Not*I、T4 DNA 连接酶购自 Biolab 公司,质粒提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒均为道普公司产品。Taq 酶及一步法 RNA 提取试剂盒购自 TaKaRa 公司。参考文献设计小鼠 VH 和 VL 基因引物及 Linker(博亚公司合成)<sup>[5,7,8]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 scFv 噬菌体抗体文库的构建:依照文献免疫小鼠<sup>[9]</sup>。末次免疫 3d 后,处死小鼠,迅速取出脾脏,提取细胞总 RNA。以逆转录合成的 cDNA 第 1 链为模板,扩增全套 VH 和 VL 基因。采用两步克隆拼接法体外组装 scFv。先以纯化的 VL 为模板,用 VL 5' 端引物和 Linker 为引物修饰扩增 VL 片段得到 VL', 反应条件为:94℃ 1min,55℃ 50s,72℃ 80s,切胶纯化回收 VL' 片段。于 50μL 反应体系中加入等摩尔比的纯化 VH,VL' PCR 产物约 150ng,用加端引物 VH back *Sfi*I 和 VL for *Not*I 分别进行 PCR 扩增得 scFv 基因,反应条件为:94℃ 1min,55℃ 1min,72℃ 70s,共 30 个循环,割胶回收纯化 scFv 片段。将纯化的 scFv 基因片段经限制性内切酶 *Sfi*I 和 *Not*I 双酶切消化,以 3:1 摩尔比与以同样双酶切的噬粒载体 pCANTAB5E 在 T4 DNA 连接酶作用下连接过夜得到重组子 scFv-pCANTAB5E。依常规方法构建噬菌体抗体库。

1.2.2 特异性噬菌体抗体的亲和富集及特异性抗体基因的序列测定:用 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将纯化的 BoNTB/Hc 稀释,按每孔 100μL 包被 96 孔板,10μg/孔。以 100μL PBS 包被空白对照孔。4℃ 静置过夜。次日吸出包被液,PBSM 加满各孔,37℃ 静置 2h,或 4℃ 包被过夜。吸出封闭液,PBST 洗涤 2-3 次,拍尽洗涤液。各孔加入 100μL 噬菌体抗体库,37℃ 缓慢摇动或静置 2h。吸出噬菌体液,PBST 洗 1 次,PBS 洗 1 次,拍尽洗涤液,以除去未结合的噬菌体粒子。各孔加入 100μL 甘氨酸-HCl (pH2.2) 溶液,37℃ 缓慢摇动或静置 15min。吸出洗脱液,加入 5μL ~ 6μL 2mol/L 的 Tris 中和。取

10μL 中和液进行梯度稀释,加入已经转接培养到对数生长期的新鲜 XL1-Blue 菌液 50μL,混匀,37℃ 温育 30min,全部涂于含 AMP 100μg/mL 的 LB 固体培养板。37℃ 温箱培养过夜。次日计算单菌落数,计算滴度,以计算洗脱噬菌体总数。剩余的洗脱噬菌体液加入到 3mL 新鲜 XL1-Blue 溶液中,吸附 30min ~ 60min。加入 M13KO7,使感染系数达到 10:1,吸附 30min ~ 60min。5000r/min 离心 10min,重悬至 3mL 2×YTAK 中。37℃ 210r/min 振荡 12h ~ 16h。提取噬菌体,并测定扩增后的滴度。重复上述筛选 5 次。

挑选第 4 轮筛选后 ELISA 初步鉴定为阳性的单克隆,按前述方法获得噬菌体抗体上清,以本实验室培养的 BoNT/B 上清为包被抗原,以 BSA 和抗肝癌单链抗体融合 SEB 包被孔为阴性对照,以辅助噬菌体 M13KO7 为阳性对照,进一步鉴定结合能力较强的单克隆抗体。PCR 和双酶切鉴定后,分别将 scFv 克隆至 pMD-18T 测序载体,转化大肠杆菌,经蓝白斑筛选后,将酶切鉴定正确的阳性重组子进行测序。

1.2.3 噬菌体条件下抗 BoNT/B 鼠源抗体免疫学活性的初步研究:选取雄性昆明小鼠,体重 16g - 20g (军事医学科学院试验动物中心提供)。以 PBS 腹腔注射小鼠为对照,以 1:500 稀释的毒素抗毒素为阳性对照组,以 PBS 1:1 稀释的 BoNT/B 为致死对照组。设立 S3、S24 实验组和 S3 + S24 混合实验组,每组各分为  $10^3 \times LD_{50}$ 、 $10^2 \times LD_{50}$ 、 $10 \times LD_{50}$ 、 $5 \times LD_{50}$ 、 $2 \times LD_{50}$  (毒素终浓度) 5 个梯度。依照 1.2.2 方法分别制备 S3 和 S24 噬菌体抗体,与毒素以 1:1 体外 37℃ 温育 1h,小鼠腹腔注射,500μL/只。其中噬菌体抗体:BoNT/B = 1:1,混合实验组中 S3:S24 = 1:1。试验 7d 内每天观察小鼠存活情况。7d 后,检查存活小鼠并记录。

## 2 结果

### 2.1 抗体 VH 和 VL 基因的 PCR 扩增

用小鼠免疫球蛋白可变区基因不同家族的重链和轻链可变区引物,以逆转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增全套抗体 VH 和 VL 基因。电泳结果显示,VH 基因片段约为 360bp,VL 基因约为 330bp,VH 略大于 VL,与预期结果相符(图 1)。

### 2.2 两步拼接法体外组装 scFv

先用 VL 5' 端引物和 Linker 为引物修饰扩增 VL

片段得到 VL', 大小约为 420bp( 图 2 ), 再与 VH 基因拼接成 VH-Linker-VL( 图 3 )

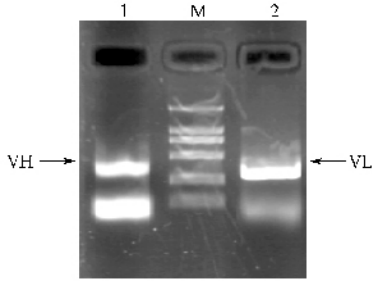


图 1 VH 和 VL 的 PCR 扩增结果  
M Marker( DL 2000 ); 1 VH ; 2 VL

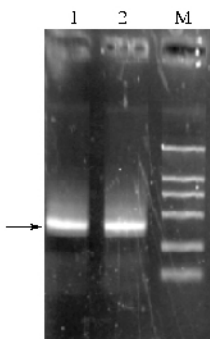


图 2 VL' 扩增结果

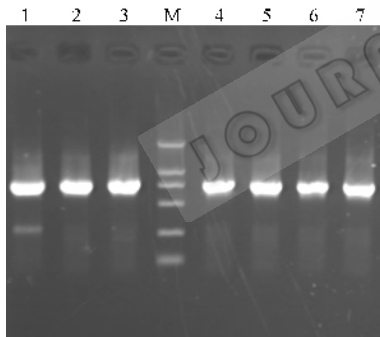


图 3 两步拼接法扩增 scFv 结果

### 2.3 全套 scFv 基因的克隆和抗体文库的构建

将重组质粒 scFv-pCANTAB5E 经电穿孔转化 XL1-blue 后, 取适量转化后细菌铺盘, 计数噬菌体抗体库容量为  $6.72 \times 10^7$  cfu。

### 2.4 抗原特异性单链抗体的获得

用固相化抗原 BoNTB/Hc 蛋白对所构建的噬菌体抗体库进行五轮“吸附-洗脱-扩增”中, 阳性克隆得到选择性扩增, 洗出的噬菌体滴度随每一轮循环的进行呈上升趋势。图 4 表明特异性噬菌体展示型单链抗体被 BoNTB/Hc 亲和富集, 同时非特异性噬菌体被洗脱。

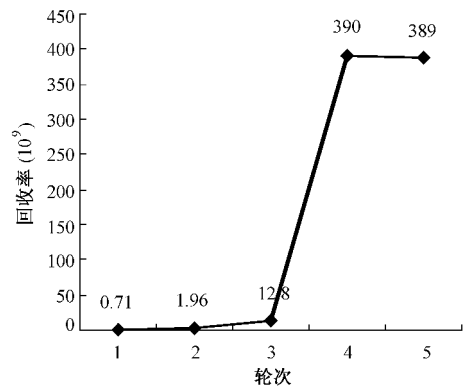


图 4 各轮回收率示意图

### 2.5 单链抗体基因的序列测定分析

挑取最后一轮筛选后得到的阳性单克隆抗体, 以 BoNT/B 培养上清为抗原进一步结合活性。将双酶切鉴定正确的 3、24 号克隆( 分别命名为 S3, S24 )中 scFv 基因亚克隆至 pMD-18T 载体进行测序( 图 5 )。其特异性反应结果见表 1。序列分析结果表明 S3 基因片段长度为 741bp, 编码 247 个氨基酸。其中 VH 基因长 366bp, 编码 122 个氨基酸, 属于 VH2 免疫球蛋白家族。VL 基因长 330bp, 编码 110 个氨基酸, 属于 V $\kappa$ 2 亚群, 其中 J 区来自于 J $\kappa$ 2。S24 基因片段长度为 756bp, 编码 252 个氨基酸。其中 VH 基因长 375bp, 编码 125 个氨基酸, 属于 VH2 免疫球蛋白家族。VL 基因长 336bp, 编码 112 个氨基酸, 属于 V $\kappa$ 1 亚群, 其中 J 区来自于 J $\kappa$ 1。

表 1 阳性克隆的 ELISA 反应结果

抗原		BoNT/B	BSA	SEB	M13K07
A <sub>490</sub>	S3	0.507	0.106	0.104	0.908
	S24	0.398			

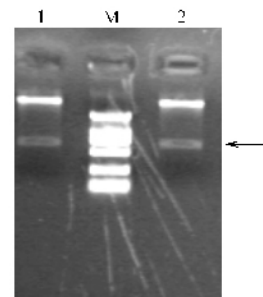


图 5 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切鉴定阳性克隆  
M Marker( DL 2000 ); 1 3 号克隆 ; 2 24 号克隆

### 2.6 噬菌体条件下 scFv 抗体免疫学活性初步研究

制备抗 BoNT/B 鼠源噬菌体抗体, 评价其免疫学活性的动物试验结果见表 2。

表2 抗B型肉毒毒素鼠源中和噬菌体抗体延缓小鼠死亡时间的记录结果

组别	剂量 ( $\times LD_{50}$ )	S/T* 延迟死亡时间(h) (从试验3h后计算)									
		4	8	12	24	48 (2d)	72 (3d)	96 (4d)	120 (5d)	144 (6d)	168 (7d)
S3	2	3/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5
	5	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
	10	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
	50	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	$10^2$	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	$10^3$	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
S24	2	2/5	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
	5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5
	10	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	50	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	$10^2$	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	$10^3$	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
S3 + S24	2	3/5	3/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5
	5	3/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
	10	2/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
	50	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	$10^2$	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	$10^3$	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
致死对照组						0/5					
阳性对照组						5/5					
对照组						5/5					

\* S/T = 小鼠存活数/每组试验小鼠总数

在 BoNT/B 低剂量时, S3, S24 和 S3 + S24 对小鼠有保护作用, 但当 BoNT/B 剂量  $\geq 50LD_{50}$  时, 不能抑制小鼠的死亡, 也不能有效延缓小鼠的死亡。

### 3 讨论

噬菌体抗体库有不同的种类, 包括天然抗体库(非免疫文库)、免疫抗体库和半合成库等。本研究中选择构建了免疫抗体库, 主要是因为机体接触肉毒毒素的机会非常少, 从天然抗体库中获得特异性抗体的几率非常小。研究表明, 虽然合成文库增加了抗体可变区的多样性, 但是无关或无功能基因的比例也高。通过特定抗原对机体的刺激, 激发机体的 B 细胞活性, 从 B 细胞中分离抗体基因构建免疫文库, 可以大大提高筛选获得特异性和高亲和力抗体的可能性<sup>[10]</sup>。

构建免疫抗体库时, 抗原可以是肉毒毒素的类

毒素、肉毒毒素的重组片段甚至可以直接以活性毒素为抗原。肉毒毒素的类毒素是通过福尔马林灭活肉毒梭菌培养液上清来制备, 费用高, 操作危险, 更重要的是无论作为免疫原或是抗原, 类毒素与毒素之间都存在这显著差异。一些表位, 尤其是对抗体识别和中和作用至关重要的表位可能在毒素灭活过程中发生改变<sup>[3, 4, 7]</sup>。如果使用活性毒素为抗原, 不但操作过程中非常危险, 而且免疫剂量不易控制。因此本研究选择了肉毒毒素分子结构中具有保护性作用的重链 C 端片段序列, 进行了重组表达和初步纯化, 对小鼠免疫后构建了免疫抗体库。提取小鼠脾脏淋巴细胞总 RNA 逆转录 PCR 扩增免疫球蛋白基因片段的方法, 避免了细胞融合等的繁杂操作, 与经典杂交瘤方法相比具有省时、省力、筛选容量大, 富集筛选过程短等优点<sup>[8]</sup>。

作为全套抗体库克隆技术的重要环节, 要求

PCR扩增出的全套抗体V区基因能够反映免疫球蛋白的多样性。目前,有关引物的设计大致有3种方案:含前导肽引物的设计,框架区引物的设计,混合引物的设计。本研究中主要根据第一框架区序列设计引物,且使用了高度简并引物。从理论上讲,应使其中每种V区基因都获得扩增,这样便可以通过选用混合引物加以保证<sup>[11,12]</sup>。

构建全套噬菌体scFv抗体库的第一个限速环节,是在体外将VH和VL基因随机拼接成scFv。本研究中采用两步克隆拼接法,与传统的SOE拼接反应相比,此方法中扩增参数较宽泛,易于掌握,各种组分的比例较易判断,并且重复性较好,稳定性强,拼接成功率较高,非特异性条带少。

本研究旨在探讨一种能够直接鉴定噬菌体抗体活性的试验方法。经过4轮富集筛选后,ELISA法进一步鉴定得到与BoNT/B结合能力较强的阳性克隆,经过双酶切鉴定并测序正确后得到的两个阳性克隆,分别命名为S3和S24,制备scFv噬菌体抗体后直接进行动物中和保护实验。动物试验直接鉴定噬菌体抗体中和活性,其优势在于抗体基因克隆、高亲和力抗体富集和中和抗体筛选在噬菌体水平一步完成,简便快速,研究周期短。

Amersdorfer等研究表明,用单抗封闭毒素Hc上的表位,可以一定程度上有效预防和治疗肉毒中毒<sup>[5]</sup>。由于抗体和毒素体外进行作用影响因素相对较少,各种参数也比较容易掌握,为了确保制备的噬菌体抗体和毒素能充分的相互作用,从而更好的评价抗体在噬菌体水平上对小鼠的保护作用,本研究主要参考Woodward等的方法<sup>[13]</sup>采用阳性噬菌体抗体与毒素体外37℃温育,小鼠腹腔注射的方法对阳性噬菌体抗体的体内中和活性进行初步研究。

本研究中以每组5只动物进行初步试验,从而对噬菌体抗体和毒素的中和作用进行较初步的研究。就目前结果表明,虽然S3和S24两种噬菌体抗体可以延缓小鼠的死亡,但二者共同作用时未观测到功能的明显叠加。蛋白质抗原并非通过其完整分子发挥功能,而是通过其表位(epitope)体现其特异

性。国外有研究表明,BoNT重链C-末端氨基酸残基,对毒素结合神经细胞毒素受体起着主要作用,包含大量的保护性抗原表位<sup>[14-16]</sup>,BoNT/B也不例外,但目前并没有明确具体的表位位置和类型,用其免疫小鼠,产生针对不同表位的不同抗体<sup>[16]</sup>,从而使得筛选和鉴定针对中和表位的特异性抗体工作繁杂。研究者推测仅仅以一个或几个抗体封闭有限的抗原表位可能很难有效保护有机体免受肉毒毒素的毒性作用。随着肉毒毒素重链C端保护性抗原表位的研究发展,期待可以进一步深入研究。

另外,小分子抗体的不稳定性和半衰期短等因素也可能是重要原因之一。

### 参考文献

- [ 1 ] Bennett A M, Perkins S D, Holley J L. *Vaccine*, 2003, **21**: 3110 ~ 3117.
- [ 2 ] Swaminathan S, Eswaranmoorthy S. *Nat Struct Biol*, 2000, **7**: 693 ~ 699.
- [ 3 ] Clayton J, Middlebrook J L. *Vaccine*, 2000, **18**: 1855 ~ 1862.
- [ 4 ] Holley J L, Elmore M, Mauchine M, *et al.* *Vaccine*, 2001, **19**: 288 ~ 297.
- [ 5 ] Amersdorfer P, Wong C, Chen S, *et al.* *Infect Immun*, 1997, **65**(9): 3743 ~ 3752.
- [ 6 ] Montecucco C, Schiavo G. *Mol Microbiol*, 1994, **13**(1): 1 ~ 8.
- [ 7 ] Brown D R, Lloyd J P, Schmidt J J. *Hybridoma*, 1997, **16**(5): 447 ~ 456.
- [ 8 ] Bradury A, Sblattero D. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(1): 75 ~ 81.
- [ 9 ] 杨秀清, 萌俊. *生物技术通讯*. 2005, **16**(2): 147 ~ 149.
- [ 10 ] Clackson T, Hoogenbom H R, Griffiths A D, *et al.* *J Nature*, 1991, **352**(6336): 624 ~ 626.
- [ 11 ] Welschof M, Terness P, Kolbinger F, *et al.* *J Immunol Methods*, 1995, **179**(2): 203 ~ 214.
- [ 12 ] De Haard H J, van Neer N, Reurs A, *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**(26): 18218 ~ 18230.
- [ 13 ] Woodward L A, Arimitsu H, Hirst R, *et al.* *Infect Immun*, 2003, **71**(5): 2941 ~ 2944.
- [ 14 ] Dertzbaugh M T and West M W. *Vaccine*, 1996, **14**: 1538 ~ 1544.
- [ 15 ] Hanson M A, Stevens R C. *Nat Struct Biol*, 2000, **7**(8): 687 ~ 692.
- [ 16 ] Sarah W M, Elomre M J, Bodsworth N J, *et al.* *Appl Env Microbiol*, 1992, **58**: 2345 ~ 2354.