

分类号

密级

江南大学
博士学位论文

题目:	抗黄曲霉毒素 B ₁ 的单链抗体的 筛选、表达和改造
英文并列题目:	Selection, Expression and Improvement of Anti-Aflatoxin B ₁ Single Chain Fragment Variable
研 究 生:	杨炼
专 业:	食品科学
研 究 方 向:	食品生物技术
导 师:	张灏
指导小组成员:	陈卫, 丁虎生
学位授予日期:	

答辩委员会主席:

江南大学

地址：无锡市蠡湖大道1800号

二〇一〇年三月

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含本人为获得江南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

签 名：_____ 日 期：_____

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解江南大学有关保留、使用学位论文的规定：江南大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签 名：_____ 导师签名：_____
日 期：_____

摘 要

黄曲霉毒素是一类真菌次级代谢产物,有强烈致癌性,其中黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) 是致癌能力最强的一种。食品和饲料中的黄曲霉毒素污染对人民群众的健康造成了极大伤害,每年造成了上亿美元的损失。因此世界各国都对食品和饲料中黄曲霉毒素的限量做了严格规定。目前检测黄曲霉毒素的方法主要是色谱学方法和免疫学方法,其中免疫学方法简单快速,特异性强,预处理简单,越来越广泛地被应用到黄曲霉毒素的检测中。高质量的抗体是免疫学方法的核心。重组抗体技术是继多克隆抗体制备技术和单克隆抗体制备技术之后第三代抗体制备技术。人们在重组抗体的筛选、表达和改造方面投入了很多研究工作。

本研究旨在建立高特异性的抗 AFB₁ 的单链抗体筛选方法,选择合适的系统表达筛选到的抗体基因,采用同源建模的方法建立该单链抗体的模型并进行了分子对接,以此为依据进行了亲和力和稳定性改造。

在筛选过程中, AFB₁ 被直接包被到 Maxisorp 酶标板上,并用该板对 Tomlinson I+J 文库进行筛选,这避免了以往筛选研究中半抗原-载体复合物对半抗原表位的破坏和载体上占主导地位的表位对筛选的误导。在洗脱过程中,采用竞争洗脱与胰蛋白酶处理联用洗脱的方法可以极大地提高洗脱结果中目标抗体的比例。三轮筛选后随机挑取的 46 个克隆中有 44 个阳性克隆,这个比例远高于以前的报道。获得的一个有较高亲和力的抗体克隆 H4,经测定其 AFB₁ 的半抑制浓度(IC₅₀)为 0.4 ng/mL,亲和力为 1.2×10^{-12} L/mol。scFv-H4 与 AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 的交叉反应性分别为 12%, 42%和 9%。我们首次报道了抗黄曲霉毒素单链抗体的序列。另外聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)也首次用于研究抗体文库的筛选过程,PCR-DGGE 可更直接反应筛选过程中克隆的富集情况和筛选结果的多样性和丰度。

将 scFv-H4 的基因克隆到 pET 载体上,在 pET 表达系统中表达。比较了四种表达载体 pET20b, pET22b, pET28a 和 pET32a 对 scFv-H4 的表达效果后,发现 pET20b 和 pET22b 能够表达有生物活性的蛋白, pET28a 不能用来表达 scFv-H4,而 pET32a 表达的 scFv-H4 只能以包涵体的形式存在。pET22b 的 T7lac 启动子可以严谨地控制 scFv-H4 的本底表达,有利于宿主自身生长,诱导结束时有生物活性的 scFv-H4 量也较高。有生物活性的 scFv-H4 主要存在于细胞周质中,而细胞质内的 scFv-H4 以包涵体的形式存在。诱导物浓度对 scFv-H4 表达影响不大,温度对 scFv-H4 总表达量和包涵体的形成有明显影响,20°C 是较适宜的诱导温度,能表达较多有生物活性的 scFv-H4,减少包涵体的形成。

根据 scFv-H4 的氨基酸序列,用 WAM 服务器建立了其空间模型。二面角分析认为该模型基本合理,另外相对可及面积,相对残基体积,空间/填充质量指数,三维轮廓质量指数都处于合理范围。参照 scFv-H4 与 AFB₁-BSA, AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的交叉反应性,用 Patchdock 服务器对 scFv-H4 和 AFB₁ 进行硬对接后用 Firedock 服务器对侧链的定向和构象进行优化,获得了 10 个能量最低的对接方案。用 Ligplot 软件分析 scFv-H4

与 AFB₁ 的相互作用以疏水相互作用为主，同时也分析他们的范德华引力，范德华斥力，原子接触能和氢键。

基于 TomlinsonI+J 文库序列多样性分析和分子 scFv-H4 与 AFB₁ 的对接模型，在 H50、H52、H52a、H53、H58、H95、H96、H97、H98、L50、L53、L91、L92、L93、L94 和 L96 个 18 氨基酸位点采用 NNK 形式进行饱和突变，并进行亲和筛选，结果表明 CDR H2 和 CDR L2 不参与 scFv-H4 对 AFB₁ 的识别。CDR L3 中的 AL91 是一个关键性的结合位点，HH95 对抗原-抗体的识别也有重要影响。用 CDR 步移法获得的一个亲和力提高的克隆 A10，scFv-A10 对 AFB₁ 的 IC₅₀ 为 0.12 ng/mL。我们还采用结构域间二硫键来提高 scFv-H4 的稳定性，比较了一些引入二硫键的候选位点后，确定 H44-L100 是较好的位点。经过定点突变后，含有 H44-L100 结构域间二硫键的 dscFv-H4 对盐酸胍的耐受性提高，蛋白聚集现象明显减少；亲和力保持不变。

关键词：单链抗体，黄曲霉毒素，大肠杆菌，筛选，表达，同源建模，亲和性，稳定性

Abstract

Aflatoxins are a group of *Aspergillus flavus* metabolites that contaminate the food and feed supply due to their strong carcinogenicity. Among these aflatoxins, aflatoxin B₁ (AFB₁) is the most toxic. Dietary exposure to AFB₁ is one of the major risk factors in the multi-factorial etiology of hepatocellular carcinoma (HCC), especially in populations exposed to hepatitis B virus (HBV). To effectively monitor the occurrence of AFB₁ in food at low contamination levels, sensitive, reliable, and simple analytical methods are required. High performance liquid chromatograph (HPLC) and immunoassay are the most common methods for AFB₁ detection in food and feed. High quality antibody is very important in the competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Antibody is also important in HPLC analysis, since immunoaffinity chromatograph (IAC) is often used for cleaning up the samples prior to HPLC analysis. Bypassing the immunization of animals, the recombinant antibody technology could produce low-cost antibodies with easy manipulation of affinity and specificity.

In the study, we selected an anti-AFB₁ single chain fragment variable (scFv-H4) with an improved screening method and the selected colon *H4* was expressed in pET system. With homology molding, the 3-D structure of scFv-H4 was constructed. Referencing to the docking result between scFv-H4 and AFB₁ and sequential diversity of Tomlinson I+J libraries, the affinity and the stability of scFv-H4 were improved.

AFB₁ was directly coated to Maxisorp plates and the Tomlinson I+J libraries were selected against these plates. Traditionally, the conjugation of haptens and carriers might change antigenicity of haptens and the selection might be misled by immunodominant epitopes in carriers. These problems have been completely avoided in our methods. The competitive eluted phages were subsequently treated by trypsin, which disabled the phages without scFvs. Compared to the previously reports, our selection showed higher specificity for AFB₁ (44 positives out of 46 random clones). In addition, polymerase chain chain-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was employed to describe the biopanning for the first time. The scFv-H4 with K_a of 9.8×10^{-11} L/mol to AFB₁-BSA and K_a of 1.2×10^{-12} L/mol to AFB₁ was sequenced. The scFv-H4 has cross reactivity of 12% with AFB₂, 42% with AFG₁, and 9% with AFG₂.

We employed four pET vectors (pET20b, pET22b, pET28a and pET32a) in the functional expression of scFv-H4 in *Escherichia coli* (*E.coli*). The comparison of functional scFv-H4 and its inclusion body indicated that pET20b and pET22b were able to express the functional antibody in the periplasm. The vector of pET28a seemed not suitable in the expression of scFv-H4 due to no detectable scFv-H4 in SDS-PAGE of total cell protein. There was only inclusion body detected in the expression with pET32. When expressed with pET22b, the amount of functional scFv-H4 was significantly affected by induction temperature, but not by inducer concentration. With the optimized conditions, *E.coli* BL21(DE3)/pET22b/H4 could express 35 mg/L cultural medium.

The 3-D model of scFv-H4 was homologically built with WAM server. According to the

evaluation of Ramachandran plot server, the orientation of the most amino acid residues in the model was allowed in the perspective of dihedral angles (ψ , ϕ), as well as fractional accessible surface area, fractional residue volume, stereo/packing quality index, the 3-D profile quality index. After the hard docking with Patchdock sever, the interaction between scFv-H4 and AFB₁ was refined with Firedock sever in terms of side chains' orientation. The best solution was evaluatedd by Ligplot software and the hydrophobic interaction might be the dominant force between scFv-H4 and AFB₁.

Basing on the sequential diversity and the molecular docking, 18 sites of scFv-H4 (H50、H52、H52a、H53、H58、H95、H96、H97、H98、L50、L53、L91、L92、L93、L94 and L96) was saturated mutated in NNK mode. The mutants selected by affinity were sequenced. The results indicated that complementarity-determinning region H2 (CDR H2), CDR L2 were not evolved into the interaction between scFv-H4 and AFB₁ while AL91 and HH95 might be necessary in the reorganizations. With CDR walking, an affinity-enhanced clone of *A10* was obtained and its IC₅₀ to AFB₁ is 0.12 ng/mL. We stabilized scFv-H4 with interdomain disulphide bond and the effect of disulphide bond on affinity was studied. With homology modeling and molecular docking, we designed a scFv (dscFv-H4) containing interdomain disulphide bond between H44 and L100. The stability was increased from a GldHCl₅₀ of 2.4 M for scFv-H4 to 4.2 M for dscFv-H4. The analysis with size exclusion chromatography revealed that dscFv-H4 existed primarily as monomer and no aggregates were detected. Competative ELISA indicated that scFv-H4 and dscFv-H4 had similar IC₅₀ to AFB₁.

Keywords: single chain fragment variable, aflatoxin, *Escherichia coli*, selection, expression, homology modeling, affinity, stability

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
目 录.....	I
第一章 绪论.....	1
1.1 黄曲霉对人类健康造成巨大的威胁.....	1
1.1.1 黄曲霉毒素的分类及理化性质.....	1
1.1.2 黄曲霉毒素导致肝癌的流行病学证据.....	2
1.1.3 黄曲霉毒素的致癌机理.....	2
1.2 黄曲霉毒素的检测.....	3
1.2.1 关于食品和饲料中黄曲霉毒素污染的法规 and 标准.....	3
1.2.2 黄曲霉毒素 B ₁ 的检测方法.....	4
1.3 重组抗体是新一代的抗体制备技术.....	4
1.3.1 抗体的制备技术.....	5
1.3.2 重组抗体的发展.....	5
1.3.3 Tomlinson I+J 人源单链抗体文库.....	6
1.4 重组抗体的研究现状.....	7
1.4.1 重组抗体的筛选.....	7
1.4.2 重组抗体的表达.....	8
1.4.3 重组抗体的建模.....	8
1.4.4 重组抗体的改造.....	8
1.5 立题意义及主要研究内容.....	9
参考文献.....	10
第二章 抗黄曲霉毒素 B ₁ 单链抗体的筛选.....	16
2.1 引言.....	16
2.2 材料与方法.....	16
2.2.1 文库与菌株.....	16
2.2.2 酶、试剂、培养基及其他实验材料.....	16
2.2.3 主要仪器.....	17
2.2.4 辅助噬菌体的大量制备.....	17
2.2.5 文库的保存.....	17
2.2.6 用酶标板筛选文库.....	18
2.2.7 多克隆噬菌体 ELISA 对文库筛选结果的鉴定.....	19
2.2.8 单克隆噬菌体 ELISA 对文库筛选结果的鉴定.....	19
2.2.9 可溶性单链抗体的制备.....	19
2.2.10 噬菌粒的提取.....	20
2.2.11 目的基因的测序.....	20
2.2.12 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳联用 (PCR-DGGE).....	20
2.2.13 表面等离子共振法测定亲和力.....	21
2.3 结果与讨论.....	21
2.3.1 洗脱方法对筛选效率的影响.....	21
2.3.2 用半抗原 AFB ₁ 直接包被用以筛选文库.....	24
2.3.3 抗 AFB ₁ 的抗体克隆的亲和力与交叉反应性.....	27
2.3.4 游离 AFB ₁ 与酶标板的结合.....	29

2.2.5 scFv-H4 的蛋白序列.....	29
2.3 本章小结.....	30
参考文献.....	30
第三章 scFv-H4 的在大肠杆菌中的表达	33
3.1 引言.....	33
3.2 材料与方法.....	33
3.2.1 菌株, 载体与培养基.....	33
3.2.2 试剂与仪器	33
3.2.3 质粒提取	33
3.2.4 目的基因的聚合酶链式反应 (PCR)	33
3.2.5 目的基因的酶切	34
3.2.6 目的基因的回收	34
3.2.7 H4 的克隆与转化.....	34
3.2.8 scFv-H4 的诱导表达.....	34
3.2.9 大肠杆菌各部分蛋白的提取及纯化	34
3.2.10 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)	35
3.2.11 用 Peterson 法测定蛋白质浓度	35
3.2.12 酶联免疫吸附法 (ELISA)	35
3.3 实验结果与讨论	35
3.3.1 用不同的载体表达 scFv-H4 的结果.....	35
3.3.2 严谨的启动子有利于 scFv-H4 的表达的影响	38
3.3.3 E. coli BL21 (DE3)/pET22b/H4 表达的 scFv-H4 的分布.....	39
3.3.4 E. coli BL21 (DE3)/pEt22b/H4 的表达条件的优化.....	40
4 结论	42
参考文献	43
第四章 scFv-H4 的同源建模与分子改造	45
4.1 引言	45
4.2 材料与方法	45
4.2.1 菌株、载体与培养基.....	45
4.2.2 试剂与仪器	45
4.2.3 scFv-H4 的蛋白序列比对.....	45
4.2.4 scFv-H4 的同源建模.....	45
4.2.5 scFv-H4 模型的评估.....	46
4.2.6 scFv-H4 与 AFB ₁ 的分子对接	46
4.2.7 用生物素标记 AFB ₁ -BSA	46
4.2.8 液相亲和力筛选	47
4.2.9 定点饱和突变目的基因	47
4.2.10 ELISA	48
4.2.11 游离巯基的测定	48
4.2.12 排阻色谱测定蛋白质的聚集	49
4.2.13 荧光光谱测定蛋白质的去折叠	49
4.3 结果与讨论	49
4.3.1 scFv-H4 的一级结构分析.....	49
4.3.2 scFv-H4 模型的建立.....	51
4.3.3 scFv-H4 模型的评估.....	52
4.3.4 抗原与抗体分子对接的结构分析.....	53

4.3.5 CDR L3 的定点突变.....	56
4.3.6 CDR L2 的定点突变.....	57
4.3.7 CDR H3 的定点突变.....	57
4.3.8 CDR H2 的定点突变.....	58
4.3.9 二硫键的设计, 克隆和表达	59
4.3.10 scFv-H4 和 dscFv-H4 的去折叠.....	60
4.3.11 scFv-H4 和 dscFv-H4 的聚集.....	60
4.3.12 dscFv-H4 的亲合力.....	62
4.4 本章小结	62
参考文献	63
创新点	67
附录一 作者在攻读博士学位期间发表的论文	69
附录二 scFv-H4 模型的构建	70
附录三 缩略语表	76

第一章 绪论

1.1 黄曲霉对人类健康造成巨大的威胁

真菌毒素主要是由丝状真菌产生的一类次级代谢产物，但并不是所有的次级代谢产物都有毒。对人类健康和农业生产威胁较大的真菌毒素包括黄曲霉毒素（aflatoxins, AFT）、赭曲霉毒素（ochratoxins）、单端孢霉烯族毒素（trichothecenes）、米烯酮（zearalenone）、腐马菌毒素（fumonisins）、震颤真菌毒素（tremorgenic toxins）和麦角生物碱（ergot alkaloids）等。全世界每年死于真菌毒素诱发癌症的人就多达 25 万；真菌毒素的污染也导致大量农产品被白白浪费，每年造成的损失以数亿美元计^[1]。

人们最早认识黄曲霉毒素是通过这样一个案例：1960 年英国的几家火鸡养殖场的 10 万只火鸡突然都死掉，人们在解剖时发现火鸡的肝脏均出血坏死。流行病学研究发现：死亡的火鸡有 80% 分布在伦敦周围 80~100 英里内，鸡饲料中含有由巴西进口的花生粉，而巴西花生受到含黄曲霉毒素的污染^[2]，从此人们开始认识并关注黄曲霉毒素。

黄曲霉毒素是主要由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)产生的，温特曲霉(*Aspergillus wentii*)也能产黄曲霉毒素，但是产量非常低^[3]。人类接触黄曲霉毒素主要通过两种途径：一是由黄曲霉毒素污染的植物性食物摄入，主要是黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁)；二是经由动物饲料而进入乳制品(包括乳酪、奶粉等)，主要是黄曲霉毒素 M₁ (AFM₁)^[4]。在未加工的谷物中也能检测到黄曲霉毒素，如花生、玉米，大米、小麦等；另外在豆类、坚果类、肉类、水产品等均有黄曲霉毒素污染的报道，其中以花生和玉米污染最严重^[5]。

我国东南沿海地区，夏季湿热多雨，气候条件适宜霉菌生长，因此粮食被黄曲霉毒素污染的几率也较高。即使在生活条件相对较好的城市人口中，黄曲霉毒素的污染也是一个重大的卫生问题^[1]。1980 年测定了从 17 个省粮食中分离黄曲霉 1660 株，广西地区的产毒黄曲霉最多，检出率为 58%。华中、华南、华北产毒株多，产毒量也大；东北、西北地区较少。

1.1.1 黄曲霉毒素的分类及理化性质

AFT 是一类结构类似的化合物，均为二氢呋喃香豆素的衍生物，结构上分为氧杂萘邻酮部分和双呋喃环两部分。根据紫外线照射下产生荧光颜色不同，AFT 分为 B 族（发蓝色荧光）和 G 族（发绿色荧光）两大类及其衍生物。AFT 目前已发现 20 余种，相对分子质量为 312-346，熔点为 200-300°C，自然界中常见的是 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 以及由 AFB₁ 和 AFB₂ 在体内经过羟化衍生的代谢产物 AFM₁、AFM₂ 等（图 1-1）。

AFT 微溶于水，饱和浓度为 10~20 mg/L，易溶于甲醇、乙醇、氯仿和二甲基甲酰胺等有机溶剂，不溶于己烷、石油醚和乙醚。AFB₁ 易被碱或强氧化剂破坏，裂解温度为 280°C，一般烹调加工不能将其破坏。在所有黄曲霉毒素中，AFB₁ 致癌能力最强；而 AFM₁ 只会引起急性肝中毒而不会致癌。

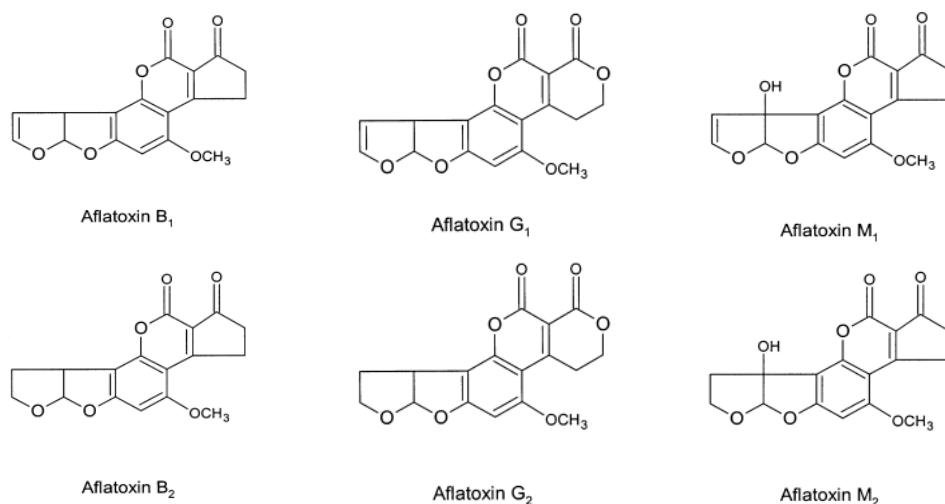


图 1-1 黄曲霉毒素的化学结构

Fig.1-1 the structure of aflatoxins

1.1.2 黄曲霉毒素导致肝癌的流行病学证据

黄曲霉毒素中毒事件时有发生。长期低水平接触黄曲霉毒素（特别是 AFB₁）与患肝癌的危险性增加，免疫功能降低及营养不良正相关。急性高水平接触黄曲霉毒素的案例比较罕见，早期会引起食欲下降、身体不适以及低热等症状，随之而来的是呕吐、腹痛和肝炎，这些都是潜在的致命性肝功能衰竭的信号。

在我国，肝癌是第三大致命癌症。每年约有 10 万人死于肝癌，占死于癌症总人数的 15%。在上海，罹患肝癌的风险要比美国要高 5~10 倍，钱耕荪等人采用分子流行病学的方法调查了上海人膳食中的黄曲霉毒素与肝癌的患病风险的关系^[1]。他们在 1986 年 1 月到 1989 年 9 月间，跟踪并分析 18244 人（45 岁到 64 岁）的饮食和其他黄曲霉接触机会。他们分析了调查对象日常饮食中黄曲霉毒素的量与罹患肝癌的风险之间的联系，饮食中黄曲霉毒素的量与尿液中的黄曲霉毒素的生物标记物的量的关系。这些生物标记物是 AFB₁ 的代谢产物和中间体，包括 AFM₁，AFP₁ 和黄曲霉毒素-N7-鸟苷酸结合物 (AFB₁-N7 guanine adducts, AFB₁-N7-Gua)。这个调查报告确定了饮食中低剂量、长期地摄入黄曲霉与罹患肝癌的风险之间的关系。

1.1.3 黄曲霉毒素的致癌机理

肝脏是 AFB₁ 的主要目标器官，然而通过消化系统和呼吸系统摄入 AFB₁ 也可能会导致肺癌。AFB₁ 的生物转化主要是由细胞色素 P450 介导的，P450 主要存在于肝细胞内，这可能是 AFB₁ 易诱发肝癌的重要原因；而在某些实验中，前列腺素 H 和脂肪氧合酶对 AFB₁ 的激活作用可能比 P450 更为重要（如在人肺细胞的微粒囊和单独的肺细胞）。当 AFB₁ 被细胞色素 P450 激活时，其双呋喃环上的双键被氧化形成亲电的 8,9-环氧化物 (AFB₁-8,9-epoxide, AFBO)。AFBO 具有立体异构性，包含外型加成 (exo) 和内型加成 (endo) 两种类型。AFB₁-endo-epoxide 的致突变能力非常弱，相较而言 AFB₁-exo-epoxide 能让核酸和蛋白发生烷基化反应。AFB₁-exo-epoxide 还没有从生物体

内成功得到, 只能通过它的稳定的产物结构中推断^[6, 7]。

AFB₁-exo-epoxide 在水中的半衰期大约只有 1 s, 能与高浓度的 DNA 反应, 生成 AFB₁-DNA 结合物。AFB₁-exo-epoxide 攻击 DNA 的 G:C 碱基对中鸟嘌呤的 N 位置, 形成 AFB₁-N7-Gua, 与其他 AFB₁ 代谢产物如 AFM₁、AFQ₁、AFP₁ 等一起从尿液中排出体外。AFB₁-exo-epoxide 也可攻击蛋白质, 以 AFB₁-白蛋白加合物 (AFB₁-albumin adducts, AFB₁-ALB) 的形式残留于血液中 (其形式主要为 AFB₁-赖氨酸加合物), AFB₁-ALB 在体内的半衰期较长。因此尿液中的 AFB₁-N7-Gua 可反映新近 AFB₁ 的接触情况, 而血清中 AFB₁-ALB 可作为另一种生物标记物, 反映长期累积接触水平^[8]。尿液中 AFB₁-N7-Gua 浓度是肝癌的重要指标, 而血清中 AFB₁-ALB 的检测可用于高危人群的筛选^[9]。

AFB₁-N7-Gua 活性很高, 带正电荷的咪唑环能促进自身脱嘌呤, 产生无嘌呤位点 (apurinic site, AP 位点), 或开环形成更为稳定的 AFB₁-甲酰胺结合物 (aflatoxin B₁-formamidopyrimidine adduct, AFB₁-FAPY DNA adduct)。在暴露于 AFB₁ 之后几周内, 人体内 AFB₁-FAPY 可以达到最高浓度, 且在体内会在较长时间内一直处于高水平。AFB₁-N7-Gua、带有 AP 位点的加合物、AFB₁-FAPY 可能是 AFB₁ 在体内发挥毒性作用的 3 种主要形式, 其他 AFB₁ 代谢产物浓度要低于这 3 种物质^[10-13]。AFB₁ 和 DNA 的这些结合物都会引起基因突变, 这些突变的积累是 AFB₁ 致癌的基础。

1.2 黄曲霉毒素的检测

1.2.1 关于食品和饲料中黄曲霉毒素污染的法规 and 标准

黄曲霉毒素危害性大、存在范围广, 为了预防黄曲霉毒素中毒事件的发生, 已有 70 多个国家和地区对食品中 AFT 的含量作了限量要求。世界卫生组织 (the World Health Organisation, WHO), 联合国粮农组织 (the Food and Agriculture Organisation of United Nations, FAO) 都对 AFB₁ 在食品和饲料中最高含量做了严格限制。FAO 编撰了食品、饲料中黄曲霉毒素相关的指导意见。1993 年黄曲霉毒素被 WHO 的癌症研究机构划定为 I 类致癌物。2006 年 WHO 食品法典委员会就如何预防和减少食品中的二噁英和黄曲霉毒素向各国政府提供指导意见^[14, 15]。作为 FAO 和 WHO 的科学顾问机构, 食品添加剂联合专家委员会最近评估了多种真菌毒素的危害, 阐述这些毒素的一些特性, 包括吸收和分泌, 毒性试验, 以及分析方法。食品法典委员会推荐食品、饲料中黄曲霉毒素最大允许量标准为总量 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的总和) 小于 15 µg/kg; 牛奶中 AFM₁ 的最大允许量为 0.5 µg/kg^[15]。

2002 年, 欧盟决议对从中国进口的花生和花生制品实施 AFB₁ 强制性检测的特殊条件。欧盟于 2008 年重新评估了真菌毒素在谷物和谷物制品中的水平, 制定了更为严格的上限标准: AFB₁ 限量 2 µg/kg, AFT 总量限量 4 µg/kg。美国联邦政府有关法律规定人类消费食品和奶牛饲料中的 AFT 总含量不能超过 15 µg/kg, 人类消费的牛奶中 AFB₁ 的含量不能超过 0.5 µg/kg, 其他动物饲料中 AFB₁ 的含量不能超过 300 µg/kg。1990 年南非颁布了 AFT 的最大允许标准: 食品中 AFT 总量小于 10 µg/kg, 其中 AFB₁ 小于 5 µg/kg。印度的标准是花生中 AFB₁ 小于 30 µg/kg; 越南和阿根廷的标准为 AFB₁ 小于 20 µg/kg。

我国卫生部于 1990 年 11 月发布了《防止黄曲霉毒素污染食品卫生管理办法》。我国现行使用的国家标准 GB/T5009.22-2006 规定了食品中 AFB₁ 的测定方法, GB/T5009.23-2006 规定了食品中 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 的测定方法和限量标准, GB/T5009.24-2006 规定了食品中 AFM₁ 与 AFB₁ 的测定方法和限量标准。

1.2.2 黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法

上述法规标准的实施促进了真菌毒素的检测方法的发展。食品和农产品中的各种真菌毒素性质各不相同, 含量差别巨大, 增加了这些毒素分析的难度。以定性为目的的生物学方法包括以利用微生物进行的抑菌试验、溶菌试验、荧光试验; 利用动物进行的大白鼠试验、鸡胚试验、鸭雏试验、鳟鱼试验; 利用植物进行的发芽抑制试验等。

AFT 的定量测定方法分为两大类, 一类是建立在色谱基础上的理化分析方法, 其中包括了应用荧光检测的薄层色谱法 (TLC)^[16]、液相色谱法 (LC)^[17-20]、高效液相色谱法 (HPLC) 以及液相-质谱联用检测 (LC-MASS)^[21, 22]; 另一类为免疫化学法, 如放射免疫测定法 (RIA) 和酶联免疫分析法 (ELISA)^[23]。新近发展起来的样品纯化技术, 如免疫亲和柱 (IAC) 能够极大地简化样品制备方法, 提高方法的选择性。其中, 免疫学方法在分析黄曲霉毒素方面应用越来越多。

放射免疫分析法 (RIA), 利用抗 AFM₁ 的抗血清与 AFB₁ 的交叉反应性^[24, 25], Harder 等用 ³H 标记 AFB₁ 建立了放射免疫测定方法测定乳和乳制品中的 AFM₁, 脱脂奶的三氯甲烷提取液不需要净化就直接可以用于 RIA 测定, 其方法灵敏度为 0.5~20 ng/mL^[26]。Rauch 等用 ¹²⁵I 标记的 AFB₁ 建立 AFM₁ 的放射免疫测定方法, 并使用 Stubbiefield 和 Shannon 方法作为定量测定的前处理方法, 本法检出限为 4 pg/mL^[27]。

用 ELISA 分析 AFT 最早是由 EI-Nakkib 建立的^[28]。由于 ELISA 样品处理简单, 分析快速, 价格低廉, 国内外均有大量的研究报道, Reddy 用竞争 ELISA 分析了采自印度 20 个州 1200 个稻米样品中黄曲霉毒素的污染情况^[29]。Hu 等用 Sep-Pak 色谱柱作为 ELISA 的前处理方法, 灵敏度提高了 20~40 倍, 检测限达到 15 pg/mL。此外尚有用聚苯乙烯微珠和尼龙珠包被抗原(体)建立的 ELISA 法的报道。

最近发展起来的 IAC 能快速、简便地分析 AFT。Trucksess 等人建立了抗体亲和柱层析方法分离牛奶中的 AFM₁, 脱脂牛奶直接通过亲和柱, 再将 AFM₁ 洗脱至检测管, 用荧光检测计检测, 每一试样耗时 8 min, 方法检出限为 0.05 µg/kg, 回收率为 97%, 测定结果和 HPLC 结果一致^[30]。IAC 特别适合从复杂的体系中纯化和富集生物毒素, 分析化学家协会 (AOAC) 和欧盟已经批准了用 IAC 分析一些食品中真菌毒素的含量, 比如早餐谷物中的 AFB₁ 含量的测定^[31]。我国政府也已经批准了一些采用 IAC 分析 AFB₁ 的方法, 比如 GB/T 18979-2003, GB/T 18980-2003。

1.3 重组抗体是新一代的抗体制备技术

免疫学方法由于灵敏度高、可定量、操作人员可不直接接触毒素等优点而越来越被人们所重视和采纳。制备高特异性、高亲和力的抗体是免疫学分析方法的前提。无论是 RIA、ELISA 还是 IAC 都依赖于高质量的抗体, 而传统方法中抗体复杂的制备过程, 抗

体品质的不稳定性，昂贵的价格限制了这些方法的发展。到目前为止，抗体的制备经历了三个阶段：多克隆抗体制备技术，单克隆抗体制备技术和重组抗体技术。

1.3.1 抗体的制备技术

通过用抗原免疫动物获得动物的抗血清后，然后纯化获得的抗体是多克隆抗体，因为这样的抗血清中含多种不同的抗体，其中包括目标抗体。多克隆抗体的出现开启了分析免疫学的领域，但是多克隆抗体成本高昂，而且质量不稳定。

将产生目标抗体的 B 淋巴细胞与瘤细胞通过细胞融合术形成杂交瘤细胞，这样的杂交瘤细胞具有 B 细胞的特性（产生抗体）也具有瘤细胞的特征（强大的生命力），回收和纯化杂交瘤细胞的培养液就可以获得所需的抗体，这些抗体是由同一个 B 细胞克隆产生的，都是一样的抗体。

重组抗体技术是基于人们对抗体分子的蛋白质结构和基因结构有了深刻认识的基础之上，利用分子生物学技术发展起来的第三代抗体制备技术。通过 DNA 重组技术克隆全套抗体可变区基因，在原核系统表达有生物活性的抗体分子片段，从中筛选目标抗体的基因。这一进展的基础在于两项关键技术的突破。一是 PCR 技术的发展使人们能用一组引物扩增出全套免疫球蛋白的可变区基因。抗体分子虽具有极大的多样性，但是立体结构极为保守，一级序列具有很高的同源性，多样性主要集中在轻重链的六个互补决定区（complementarity determining regions, CDRs）中，骨架区的序列比较保守。因此可设计适当引物，用 RT-PCR 技术从 B 细胞全套抗体基因中扩增出所有可变区 cDNA，为构建抗体库提供了必要的基础。二是大肠杆菌（*Escherichia coli*, *E.coli*）直接表达有生物活性抗体分子片段，完整的抗体分子由四条肽链组成(图 1-2)，是一个结构复杂的大分子，在大肠杆菌中表达完整的抗体分子一直未获成功。1988 年 Skerra^[32]和 1989 年 Pluckthum^[33]分别报到了在 *E.coli* 表达有抗原结合功能的抗体分子片段，他们将细菌的前导序列拼接到抗体分子可变区的氨基端，抗体分子可以在周质腔内完成分子的折叠，二硫键的形成，组装成异二聚体（如 Fab 段）。这一成功使人们能够将全套抗体在 *E.coli* 进行生物活性表达并可能用抗原筛选出特异性抗体的基因，奠定了重组抗体发展的基础。

1.3.2 重组抗体的发展

英国剑桥的 Ward 等人在 1989 年利用 PCR 从溶菌酶免疫后的小鼠脾细胞 DNA 中扩增出 VH 基因，并测序证实了其多样性；并将这些 VH 基因在 *E.coli* 表达，检测 200 个克隆表达的 VH 蛋白后得到 21 个可以与溶菌酶特异结合的克隆^[34]。Ward 的研究虽未能构建完整的抗原结合部位，也未提出有效的筛选方法，但它证明了抗体库技术的可行性。两个月之后，《科学》杂志上发表了美国 Scripps 研究所 Huse 等人构建完整的抗体库的工作^[35]，他们利用 RT-PCR 技术从淋巴细胞克隆出全套抗体的轻链基因和重链 Fd 基因，将二者分别组建到噬菌体表达载体中，得到轻链基因库和重链 Fd 基因库，再通过 DNA 重组技术将轻链基因和 Fd 段基因随机配对重组于一个表达载体中，形成组合抗体库。将所得到的抗体库 DNA 经体外包装成噬菌体后感染 *E.coli* 铺盘培养，每个感染了噬菌体的 *E.coli* 由于噬菌体的增殖而裂解，所释放的噬菌体再感染周围的 *E.coli*，形成噬菌

斑,相应地噬菌体载体上的 κ 链基因和 Fd 段基因得到表达,在周质腔折叠形成有功能的 Fab 段,释放于噬菌斑内,将噬菌斑转印到硝酸纤维素膜上,可以用标记有放射性元素或过氧化物酶的抗原筛选得到的特异性抗体克隆,并得到其 Fab 段的基因,从而成功地建立了完整的抗体库技术。此论文一经发表便引起轰动,舆论界纷纷发表评论,认为这是继 1975 年杂交瘤-单克隆抗体出现之后的重大突破,对抗体工业将带来革命性变化。

20 世纪 90 年代初,人们将噬菌体展示技术(phage display)应用到抗体的筛选与克隆中,将含有亿万种多样性抗体可变区基因文库,抗体在大肠杆菌功能性表达与高效快速筛选的手段结合起来,彻底改变了抗体制备的传统途径,使抗体制备技术进入了基因工程时代。

近几年来重组抗体技术逐渐普及,成为一个发展迅速的领域。重组抗体技术较细胞融合杂交瘤技术制备单克隆抗体有明显的优势:

- 1) 抗体库技术省去了细胞融合的步骤,省时省力,避免了杂交瘤不稳定而需要反复亚克隆的繁琐程序;
- 2) 扩大了筛选容量,用杂交瘤技术一般筛选能力在上千个克隆以内,而抗体可筛选 10^6 以上个克隆;
- 3) 抗体库技术直接克隆到抗体的基因,既免去了杂交瘤分泌抗体不稳定而丢失之虞,又便于进一步构建各种基因工程抗体;
- 4) 抗体库技术得到的抗体可以在大肠杆菌中表达,可利用原核表达系统的优势;
- 5) 一些难于制备的抗体,如针对弱免疫原,毒性抗原的抗体,人源抗体的制备可以得到解决。



图 1-2 重组抗体中 Fab 和 scFv 结构示意图

Fig.1-2 schematic presentation of recombinants in forms of Fab and scFv.

1.3.3 Tomlinson I+J 人源单链抗体文库

一些大型的抗体文库已经建立并商业化,比如 Tomlinson I+J 人源单链抗体文库,ATLAS 单链抗体文库,Griffin 单链抗体文库等^[36]。其中英国剑桥的 MRC 分子生物学中心和蛋白质工程中心的 Greg Winter 实验室采用噬菌体展示技术,已经构建了多个抗体文库。他们将 Tomlinson I+J 文库提供给世界各地的实验室,以供研究。文库 I 和文库 J 构建于含有青霉素抗性的噬菌粒载体上,含有数亿不同的克隆,重链基因 VH 和轻链基因 VL 之间由一段 15 个氨基酸(GGGGS)₃ 的肽链连接(图 1-3)。文库中的这些抗体采用的人源 VH (V3-23/DP-47 和 JH4b) 和 V κ (O12/O2/DPK9 和 J κ 1) 的框架,并在与抗原接触的位点引入了突变以获得高度多样性的文库。VH:1-3, V κ :2-1-1 编码的框架是人

源抗体中最常采用的标准结构 (canonical structure)，而重链第三互补决定区 (CDR H3) 在保持与抗原接触的情况下，尽量短。文库中所有的克隆均可以被 Protein A 和 Protein L 识别，这样文库的筛选可以在不知道具体克隆序列的情况下进行，同时也保证了文库中绝大部分的克隆都是有功能活性的^[37]。

Tomlinson I 库构建于噬菌粒 pIT2 (含 his 和 myc 标签)。文库中的 H50、H52、H52a、H53、H58、H95、H96、H97、H98、L50、L53、L91、L92、L93、L94 和 L96 18 个氨基酸位点采用 DVT 突变形式进行突变，库容为 1.47×10^8 。Tomlinson J 库采用的是 NNK 突变，库容为 1.37×10^8 。

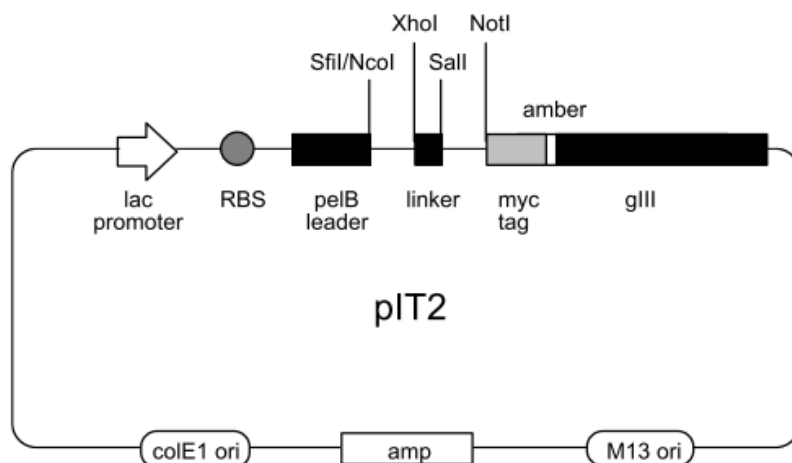


图 1-3 Tomlinson I+J 文库的载体结构
Fig. 1-3 Vector map of Tomlinson I+J

1.4 重组抗体的研究现状

1.4.1 重组抗体的筛选

噬菌体抗体库技术能够迅速发展，重要的一点在于它具有高效率的筛选能力，其经典的筛选方法是用固相化或液相化的抗原和抗体库孵育，通过数次“吸附-洗脱-扩增”，使特异克隆得以富集，因而具有简便、快速和高效的特点。利用纯抗原筛选抗体库有多种方式，其中包括将抗原直接或间接包被于酶标板中，塑料管上或交联在层析介质上，也可通过生物素-链亲和素-磁珠的特异性识别在液相中完成。

能否从抗体库中得到目标的抗体受到的制约因素很多，包括抗体库库容、多样性、保存条件、扩增情况以及对抗体库的筛选过程等^[38]，其中筛选手段的正确选择与合理应用具有重要的意义。根据抗原包被于固相介质表面后是否影响其与抗体的结合，可以采用固相化或液相化筛选两种策略。最早的办法是用酶标板包被抗原，此方法筛选的效果令人满意且操作简便易行，经过 3~4 轮的富集后所获得特异性克隆的比例比较高^[39-41]。其中在筛选过程中噬菌体抗体的回收率逐渐升高是特异性抗体富集的表现，可作为判断筛选效果的指标。不足的是筛选过程中消耗的抗原较多；有的抗原在固相化后会破坏抗原表位^[42, 43]；不太容易根据抗体库和抗原的性质进行量化处理，因而在对抗体亲和力的选择时其效果欠佳。

关于抗黄曲霉重组抗体的筛选已经有过两篇文献报道, Moghaddam 等人采用 AFB₁ 与牛血清白蛋白结合物 (AFB₁-BSA) 作为抗原从半合成抗体文库和人淋巴细胞抗体文库中分离到了抗 AFB₁ 的抗体克隆^[42], Daly 等人用 AFB₁-糊精结合物和 AFB₁-BSA 轮流作为抗原从免疫过的老鼠脾细胞抗体文库中获得了抗 AFB₁ 的抗体克隆^[44]。

液相法筛选获得的克隆特异性相对较低, 多数抗体非特异地与多种抗原结合, 但容易得到高亲和力的抗体。而生物素化的抗原与不同亲和力的抗体特异结合后, 向筛选体系中加入超量未标记的抗原^[41, 45-47]。Hwkins 等在设定筛选体系时使抗原超出噬菌体数目而其浓度低于期望的抗体的离解常数 (K_a), 就能够选择性地筛选到高亲和力的噬菌体抗体^[45]。

1.4.2 重组抗体的表达

有很多文献从不同角度研究了 scFv 或 Fab 这样的抗体片段蛋白的表达。表达系统的选择是首要的问题。已报道的 scFv 的表达系统涉及细菌^[48-50], 酵母^[51, 52], 转基因植物^[53, 54], 昆虫细胞和哺乳动物细胞^[55, 56], 以及体外表达系统^[57]。在比较了酿酒酵母、毕赤酵母和 *E.coli* 对人源 scFv 的表达结果后, Miller 等人认为 *E.coli* 表达系统是最为快速、稳定的表达系统^[58]。相对于哺乳动物细胞, *E.coli* 生长非常迅速, 能在较短的时间纯化、分析和使用这些蛋白, 而且原核的克隆转化操作简单。*E.coli* 也是研究得最为清楚的微生物之一, 人们构建了多种多样的 *E.coli* 表达系统, 以满足不同的需求。pET 表达系统是最常用的 *E.coli* 表达系统, 这个系统最突出的优势是能表达大量的蛋白。但是由于 *E.coli* 的胞内是还原性的, 所以异源蛋白易在胞内形成不溶性的包涵体, 包涵体需在体外复性^[59]。

1.4.3 重组抗体的建模

蛋白质所具有的功能在很大程度上取决于其空间结构, 蛋白质空间结构的研究对蛋白质工程具有极其重要的意义。X 射线晶体学方法^[60]和近年来发展起来的多维核磁共振方法^[61]都可以预测蛋白质的构象, 但是这些方法样品需要量大, 纯度要求高。相比之下, 利用蛋白质的一级结构的氨基酸序列信息来进行高级结构的预测方法, 是一种不依赖晶体培养, 简便易行的预测蛋白质结构的方法。

免疫球蛋白超家族是人们研究最多的蛋白结构之一^[62, 63], 免疫球蛋白超家族成员的氨基酸序列同源性高达 75%到 95%^[60]。Kusharyoto 用同源建模和定点突变的方法确定了 Fab K411B 的结合位点^[64], Sivasubramanian 用同源建模的方法测定了一个鼠源抗体的结合位点并建立了一个高分辨率 Fv 的模型^[65, 66]。Reiter 根据同源建模的模型引入了结构域间二硫键, 使 scFv 的稳定性得到了提高, Ewert 根据其建立的单链抗体的模型, 将易变性的 scFv 的 CDRs 整体转移到一个稳定的框架区上, 从而提高了抗体的稳定性。

1.4.4 重组抗体的改造

随机突变和噬菌体展示筛选为研究抗体结合特性提供了出色的工具, 抗体体外亲和力的改造主要是在已有抗体的可变区中引入突变的形式来进行, 都是模拟体内体细胞的

抗体亲和力成熟的几种方式,包括链置换(chain shuffling)^[41],易错 PCR(error prone PCR)^[67],DNA 改组(DNA shuffling)^[68]等。

互补决定区(CDR)的突变是一个提高抗体亲和力的有效办法。在体内 B 细胞超突变的过程中,突变主要集中于 CDR,这些 CDR 的突变进一步提高了抗体的多样性^[69]。很多 CDR 氨基酸残基,尤其是 CDR H3 和 CDR L3 的残基,在抗原相互结合中起关键作用,这些位置的突变会改变抗体与抗原的结合能力。如果将 CDR 中与抗原接触的残基中低亲和性或者排斥性的残基替换为更为适合的残基,可以提高抗体的亲和力。应用定向突变,可以鉴定出结构和功能保守的残基以及调控亲和力的残基,这些结果将有助于进一步提高抗体的亲和力。Yang 等人用 CDR 步移法(CDR walking),经过 4 轮筛选,获得一个高亲和力的抗 HIVgp120 的 Fab,将筛选到的突变进行组合,将抗体的亲和力提高了 420 倍^[70]。Schier 将轻链和重链 CDR3 序贯优化,通过不断降低筛选步骤中生物素化抗原的浓度,得到一株高亲和力的抗 c-erbB-2 的 scFv ($K_a = 1.3 \times 10^{-11}$ L/mol)^[41]。CDR 步移法的累加效应可以提高抗体的亲和性和特异性。

蛋白质有复杂而严密的结构,这是蛋白质具有生物活性的物质基础,在外界物理化学因素的作用下,维持蛋白质空间结构的次级键被打开,多肽链展开,结构变得松散。单链抗体是最小的抗原识别单位,只有一条肽链,由于缺少恒定区支持而容易变性^[71, 72]。单链抗体的变性包括:蛋白质的去折叠(unfolding)和蛋白质的聚集(agggregation)^[59, 72, 73]。在稳定单链抗体的多种方法中,添加二硫键是最有效的方法^[74]。

1.5 立题意义及主要研究内容

黄曲霉毒素污染对食品安全造成极大的威胁,严重损害人们的身体健康。而用免疫学相关的方法检测黄曲霉毒素,预处理简单,检测快速。高质量的抗体是免疫学检测方法的核心。目前国内酶联免疫法试剂盒所用的抗体主要还是多克隆抗体和单克隆抗体。这两种抗体制备技术成本高昂,产量有限极大地限制了免疫学方法在 AFB₁ 检测中的广泛应用。重组抗体是新发展起来的第三代抗体制备技术。通过对抗体文库的高效筛选,可以获得特性优良的抗体片段;结合高效的表达系统可以低成本、大量制备抗体,分子生物学技术也让抗体的改造变得简单易行。

目前在抗半抗原的抗体筛选过程中,所用的抗原都是将半抗原与载体的结合物,因为半抗原和载体的结合有利于提高半抗原的溶解性和在酶标板上的固定能力。然而这样的结合可能会改变半抗原本身的免疫反应性,在上述两例黄曲霉毒素抗体的研究中就报道了有些筛选到的抗体克隆能识别 AFB₁-BSA 结合物,但是不能识别游离的 AFB₁^[42, 44]。另外重组抗体的筛选过程是更有利于结合物上占主导地位的表位的抗体的筛选,如果我们的半抗原表位在结合物上不占主导地位,筛选的趋势就会偏移,很难筛选到抗半抗原的抗体。

本研究将 AFB₁ 直接包被在酶标板上,避免了载体对筛选的干扰和误导,建立高特异性筛选方法;每轮筛选结果经竞争-胰蛋白酶联用洗脱后,展示了目标抗体片段的噬菌体的比例大幅提高。从试验结果来看,通过上述改进极大地提高了从 Tomlinson I+J

文库中筛选到抗 AFB₁ 的单链抗体的几率,这也为其他食品中有害半抗原(如农药,兽药)的抗体的筛选给出一个参考。通过这样的筛选获得了一个亲和力较高的克隆 H4。

通过对不同的 pET 载体表达 scFv-H4 的结果进行比较,确定了比较合适的抗体蛋白表达的载体和宿主,在优化后的表达条件下 scFv-H4 的表达量达到了 36 g/L 培养基,并对大肠杆菌表达 scFv-H4 的特点进行了简单探讨。

在美国国立生物信息中心网站(NCBI)和蛋白质数据库(PDB)中比对 scFv-H4 的氨基酸序列,分析了 scFv-H4 的多样性特点,通过同源建模建立了所筛选到的单链抗体的三维结构模型,并分析了抗原抗体的结合位点。并通过 CDR 步移法对抗体的亲和力进行改造,确定了 scFv 结合部位以及抗原-抗体结合密切相关的氨基酸残基位点;完全抗体还有多组二硫键,是一个相对稳定的蛋白质;单链抗体却非常容易失活,我们根据 scFv-H4 的模型找到了 H44-L100 作为引入结构域间二硫键的位点,提高了该单链抗体的稳定性,而不影响其亲和力。

参考文献

1. Qian G S, Ross R K, Yu M C. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994, 3(1):3-10.
2. Asao T, Buechi G, Abdel-Kader M M. The Structures of Aflatoxins B and G. *J Am Chem Soc*, 1965, 87:882-886.
3. Kaaya A N, Kyamuhangire W. The effect of storage time and agroecological zone on mould incidence and aflatoxin contamination of maize from traders in Uganda. *Int J Food Microbiol*, 2006, 110(3):217-223.
4. Atanda O, Oguntubo A, Adejumo O. Aflatoxin M₁ contamination of milk and ice cream in Abeokuta and Odeda local governments of Ogun State, Nigeria. *Chemosphere*, 2007, 68(8):1455-1458.
5. Hasan H A. Studies on toxigenic fungi in roasted foodstuff (salted seed) and halotolerant activity of emodin-producing *Aspergillus wentii*. *Folia Microbiol (Praha)*, 1998, 43(4): 383-391.
6. Alekseyev Y O, Hamm M L, Essigmann J M. Aflatoxin B₁ formamidopyrimidine adducts are preferentially repaired by the nucleotide excision repair pathway in vivo. *Carcinogenesis* 2004, 25(6):1045-1051.
7. Smela M E, Currier S S, Bailey E A. The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2001, 22(4):535-545.
8. Sharma R A, Farmer P B. Biological relevance of adduct detection to the chemoprevention of cancer. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(15):4901-4912.

9. Bedard L L, Massey T. E. Aflatoxin B₁-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett*, 2006, 241(2):174-183.
10. Waters R, Jones C J, Martin E A. The repair of large DNA adducts in mammalian cells. *Mutat Res*, 1992, 273(2):145-155.
11. Duan X X, Ou J S, Li Y. Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(30):4740-4744.
12. Feng Z B, Chen G, Su J. Dynamic expression of survivin during hepatocarcinogenesis in rats. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2007, 29(9):662-665.
13. Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(5):513-520.
14. 世界卫生组织. 食品法典委员会通过新的标准以保护消费者和放宽贸易[EB/OL]. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr35/zh/>, 2006-07-10.
15. 世界卫生组织. 食品安全和食源性疾病 [EB/OL]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/zh/>, 2006-07-11.
16. Park D L, Trucksess M W, Nesheim S. Solvent-efficient thin-layer chromatographic method for the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in corn and peanut products: collaborative study. *J AOAC Int*, 1994, 77(3):637-46
17. Carisano A, Della Torre G. Sensitive reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in dry milk. *J Chromatogr*, 1986, 355(1):340-344.
18. Chang H L, DeVries J W. Rapid high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk and nonfat dry milk. *J Assoc Off Anal Chem*, 1983, 66(4):913-917.
19. Gomez-Catalan J, Pique E, Falco G. Determination of aflatoxins in medicinal herbs by HPLC. An efficient method for routine analysis. *Phytochem Anal*, 2005, 16(3):196-204.
20. Cavaliere C, Foglia P, Guarino C. A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(4):550-556.
21. Haddon W F, Wiley M, Weiss A C J. Aflatoxin detection by thin-layer chromatography--mass spectrometry. *Anal Chem*, 1971, 43(2):268-270.
22. Walton M, Egner P, Scholl P F. Liquid chromatography electrospray-mass spectrometry of urinary aflatoxin biomarkers: characterization and application to dosimetry and chemoprevention in rats. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14(7):919-926.
23. Fisher A C, DeLisa M P. Efficient isolation of soluble intracellular single-chain antibodies using the twin-arginine translocation machinery. *J Mol Biol*, 2009, 385(1):299-311.

24. Korde A, Pandey U, Banerjee S. Development of a radioimmunoassay procedure for aflatoxin B₁ measurement. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(4):843-846.
25. Jiang H, Xiong Y H, Xu Y. Research progress in analysis methods of Aflatoxins. *Wei Sheng Yan Jiu*, 2005, 34(2):252-255.
26. Harder W O, Chu F S. Production and characterization of antibody against aflatoxin M₁. *Experientia*, 1979, 35(8):1104-1107.
27. Rauch P, Fukal L, Brezina P. Interferences in radioimmunoassay of aflatoxins in food and fodder samples of plant origin. *J Assoc Off Anal Chem*, 1988, 71(3):491-493
28. El-Nakib O, Pestka J J, Chu F S. Determination of aflatoxin B₁ in corn, wheat, and peanut butter by enzyme-linked immunosorbent assay and solid phase radioimmunoassay. *J Assoc Off Anal Chem*, 1981, 64(5):1077-1082
29. Reddy K R, Reddy C S, Muralidharan K. Detection of *Aspergillus spp.* and aflatoxin B₁ in rice in India. *Food Microbiol*, 2009, 26(1):27-31
30. Trucksess M W, Stack M E, Nesheim S. Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn, peanuts, and peanut butter: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*, 1991, 74(1):81-88
31. Castegnaro M, Tozlovanu M, Wild C. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(6):480-487
32. Skerra A, Pluckthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 1988, 240(4855):1038-1041
33. Pluckthun A. Mono- and bivalent antibody fragments produced in *Escherichia coli*: engineering, folding and antigen binding. *Immunol Rev*, 1992, 130:151-188
34. Ward E S, Gussow D, Griffiths A D. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 1989, 341(6242):544-6
35. Huse W D, Sastry L, Iverson S A. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science*, 1989, 246(4935):1275-1281
36. Tomlinson I. Tomlinson I+J libraries [EB/OL]. http://www.geneservice.co.uk/products/proteomic/scFv_tomlinsonIJ.jsp, 2005-10-2
37. de Bruin R, Spelt K, Mol J. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(4):397-399
38. Ueberberg S, Schneider S. Phage library-screening: A powerful approach for generation of targeting- agents specific for normal pancreatic islet-cells and islet-cell carcinoma in vivo. *Regul Pept*, 2009, 22(10):1965:1972

39. Leong M K, Chen C, Shar K C. Selection and characterization of lipase abzyme from phage displayed antibody libraries. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(3):567-573.
40. Lauer B, Ottleben I, Jacobsen H J. Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B₁. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(4):899-904.
41. Schier R, Bye J, Apell G. Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J Mol Biol*, 1996, 255(1):28-43.
42. Moghaddam A, Loberli I, Gebhardt K. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B₁ from naive recombinant antibody libraries. *J Immunol Methods*, 2001, 254(1-2):169-181.
43. Wu S, Ke A, Doudna J A. A fast and efficient procedure to produce scFvs specific for large macromolecular complexes. *J Immunol Methods*, 2007, 318(1-2):95-101.
44. Daly S, Dillon P, Manning B. Production and characterization of murine single chain Fv antibodies to aflatoxin B₁ derived from a pre-immunized antibody phage display library system. *Food and Agricul Immunol*, 2002, 14:255-274.
45. Hawkins R E, Russell S J, Winter G. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol*, 1992, 226(3):889-896.
46. Cosma A. Affinity biotinylation: nonradioactive method for specific selection and labeling of cellular proteins. *Anal Biochem*, 1997, 252(1):10-14.
47. Kobayashi N, Karibe T, Goto J. Dissociation-independent selection of high-affinity anti-hapten phage antibodies using cleavable biotin-conjugated haptens. *Anal Biochem*, 2005, 347(2):287-96.
48. Yang X, Hu W, Li F. Gene cloning, bacterial expression, in vitro refolding, and characterization of a single-chain Fv antibody against PreS1(21-47) fragment of HBsAg. *Protein Expr Purif*, 2005, 41(2):341-348.
49. Santala V, Lamminmaki U. Production of a biotinylated single-chain antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Immunol Methods*, 2004, 284(1-2):165-75.
50. Lim K P, Li H, Nathan S. Expression and purification of a recombinant scFv towards the exotoxin of the pathogen, *Burkholderia pseudomallei*. *J Microbiol*, 2004, 42(2):126-132.
51. Ren F, Li B C, Zhang N N. Expression, purification and characterization of anti-BAFF antibody secreted from the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(6):1075-1080.
52. Shi X, Karkut T, Chamankhah M. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2003, 28(2):321-230.

53. Schouten A, Roosien J, de Boer J M. Improving scFv antibody expression levels in the plant cytosol. *FEBS Lett*, 1997, 415(2):235-241.
54. Artsaenko O, Peisker M, zur Nieden U. Expression of a single-chain Fv antibody against abscisic acid creates a wilted phenotype in transgenic tobacco. *Plant J*, 1995, 8(5):745-750.
55. Hu Y C. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(4):405-416.
56. Verma R, Boleti E, George A J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J Immunol Methods*, 1998, 216(1-2):165-181.
57. Rungpragayphan S, Nakano H, Yamane T. PCR-linked in vitro expression: a novel system for high-throughput construction and screening of protein libraries. *FEBS Lett*, 2003, 540(1-3):147-150.
58. Miller K D, Weaver-Feldhaus J, Gray S A. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2005, 42(2):255-267.
59. Worn A, Pluckthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol*, 2001, 305(5):989-1010.
60. Mandal C, Kingery B D, Anchin J M. ABGEN: a knowledge-based automated approach for antibody structure modeling. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(3):323-328.
61. Vu B K, Walsh J D, Dimitrov D S. Dynamics of antibody domains studied by solution NMR. *Methods Mol Biol*, 2009, 525:533-543
62. Whitelegg N, Rees A R. Antibody variable regions: toward a unified modeling method. *Methods Mol Biol*, 2004, 248:51-91
63. Martin A C, Cheetham J C, Rees A R. Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(23):9268-9272
64. Kusharyoto W, Pleiss J, Bachmann T T. Mapping of a hapten-binding site: molecular modeling and site-directed mutagenesis study of an anti-atrazine antibody. *Protein Eng*, 2002, 15(3):233-241
65. Sivasubramanian A, Maynard J A, Gray J J. Modeling the structure of mAb 14B7 bound to the anthrax protective antigen. *Proteins*, 2008, 70(1):218-230
66. Sivasubramanian A, Sircar A, Chaudhury S. Toward high-resolution homology modeling of antibody Fv regions and application to antibody-antigen docking. *Proteins* 2009, 74, (2),497-514.
67. Irving R A, Kortt A A, Hudson P J. Affinity maturation of recombinant antibodies using *E. coli* mutator cells. *Immunotech*, 1996, 2(2):127-143.

68. Stemmer W P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(22): 10747-10751.
69. Goletz S, Christensen P A, Kristensen P. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. *J Mol Biol*, 2002, 315(5):1087-1097.
70. Yang W P, Green K, Pinz-Sweeney S. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J Mol Biol*, 1995, 254(3):392-403.
71. Worn A, Pluckthun A. Different equilibrium stability behavior of scFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. *Biochem*, 1999, 38(27), 8739-8750.
72. Rothlisberger D, Honegger A, Pluckthun A. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol*, 2005, 347(4):773-789.
73. Pedroso I, Irun M P, Machicado C. Four-state equilibrium unfolding of an scFv antibody fragment. *Biochem*, 2002, 41(31):9873-9884.
74. Saerens D, Conrath K, Govaert J. Disulfide bond introduction for general stabilization of immunoglobulin heavy-chain variable domains. *J Mol Biol*, 2008, 377(2):478-488.

第二章 抗黄曲霉毒素B₁单链抗体的筛选

2.1 引言

半抗原是小分子，没有免疫原性，无法直接免疫动物获得抗体。重组抗体技术无需免疫动物，通过体外筛选抗体文库能获得抗半抗原的抗体克隆。半抗原一般需要和载体形成复合物以提高半抗原的溶解性和更好的固定化^[1]。但在复合过程中，半抗原表位可能被破坏，用复合抗原筛选到的抗体可能不能识别游离的半抗原^[2,3]。

我们尝试用游离 AFB₁ 直接包被酶标板，这样可以避免载体表位的干扰。另外我们还讨论了筛选过程中的一些细节，如洗脱条件和描述抗体富集的新方法等，这些有利于我们认识筛选过程，提高筛选的效率和特异性。

2.2 材料与方法

2.2.1 文库与菌株

本研究所采用的文库由英国剑桥MRC分子生物学实验室和MRC蛋白质工程中心共同开发。该文库由数亿单链抗体基因克隆组成，建于青霉素抗性的噬菌粒pIT2 上，并转化到大肠杆菌 TG1 (*E.coli* TG1) 中。访问以下链接可以获得更多信息 (http://www.geneservice.co.uk/products/proteomic/scFv_tomlinsonIJ.jsp)。

在本章中，我们使用了 *E.coli* TG1(K12 $\Delta(lac-proAB)$ *supE thi hsdD5/F' traD36 proA⁺B lacI^f lacZ Δ M15)和 *E.coli* HB2151 (K12 *ara (lac-proAB) thi/F' proA⁺B lacI^f lacZ Δ M15)^[4]。*E.coli* TG1 由 Tomlinson I+J 文库自带，*E.coli* HB2151 是 GE Healthcare 公司的产品，购于杭州远方生物科技有限公司。**

2.2.2 酶、试剂、培养基及其他实验材料

胰蛋白酶是 Bio Basic Inc 公司的产品；AFB₁-BSA、AFB₁、AFG₁ 和 AFG₂ 是 Sigma 公司的产品；鼠抗 M13 单克隆抗体-辣根过氧化氢酶复合物 (HRP/Anti-M13) 和蛋白 A-辣根过氧化氢酶复合物 (HRP /Protein A) 是 GE Healthcare 公司的产品；卡那霉素 (kana)、氨苄青霉素 (amp)、异丙基-B-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、琼脂糖、脱脂乳粉是上海生工的产品；胰蛋白胨、酵母提取粉是 Oxoid 公司的产品；核酸染料 Gelred 是 Biotium 公司的产品。其余未明确标注的试剂均由国药集团上海化学试剂有限公司生产，江南大学试剂处领用。

2×TY 培养基：16 g 胰蛋白胨、10 g 酵母提取粉和 5 g 氯化钠溶于 1 L 去离子水中，121°C 高压灭菌 20 min。TYE 培养基：15 g 琼脂、8 g 氯化钠、10 g 胰蛋白胨和 5 g 酵母提取粉分散与 1 L 去离子水中，分装，121°C 高压灭菌 20 min。

本实验所用酶标板有两种：在筛选过程中所用酶标板为 Nunc 公司（丹麦）所产的平底 96 孔 Maxisorp 免疫吸附板 (Cat No. 442404)，ELISA 鉴定所用酶标板 Costar 公司（美国）所产的高吸附聚苯乙烯 96 孔板 (Cat No. 2592)，均购于上海睿津公司。

2.2.3 主要仪器

2MK4 洗板机和 MK3 酶标仪都是热电（上海）有限公司的产品；UV2100 型紫外-可见分光光度计是尤尼柯（上海）仪器有限公司的产品；梯度 PCR 仪是英国 G-Storm 公司的产品；PowerPac 型电泳仪，D-Code 变性梯度凝胶电泳仪和 GelDoc XR 型凝胶成像系统是伯乐生命医学产品(南京)有限公司的产品。

2.2.4 辅助噬菌体的大量制备

- 1) 将 *E.coli* TG1 在 37°C, 200 rpm 条件下培养至对数生长期中期 ($OD_{600} = 0.4$)；将梯度稀释的 KM13 辅助噬菌体 (10 μ L) 侵染该状态的 *E.coli* TG (200 μ L)，在 37°C 水浴中静止 30 min。将侵染完毕的 *E.coli* TG1 加入 3 mL 溶解状态的 H-top 琼脂中，平铺在温浴好的 TYE 平板上（不含抗菌素），37°C 培养过夜。
- 2) 将一个噬菌斑挑入 5 mL 对数中期的 *E.coli* TG1 ($OD_{600} = 0.4$) 中，37°C, 200 rpm 条件下振摇 2 h。
- 3) 将培养好的 *E.coli* TG1 全部加入 500 mL 2×TY 中，37°C 振摇 1 h 后，加入卡那霉素至终浓度 50 μ g/mL（不含葡萄糖），30°C 振摇过夜。
- 4) 将过夜培养物在 10800×g 离心 15 min。将 100 mL 含 2.5 mol/L NaCl 的 10% 聚乙二醇 6000 (PEG/NaCl) 加入 400 mL 上清中，冰浴 1 h。
- 5) 在 10800×g 离心 30 min，倒掉 PEG/NaCl。
- 6) 将沉淀重悬于 8 mL PBS 中，并加入 2 mL PEG/NaCl，混匀，冰浴 20 min。
- 7) 3300×g 离心 30 min，倒掉上清，快速离心，除去剩余的 PEG/NaCl。
- 8) 将沉淀重悬于 5 mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4)，11600×g 下离心 10 min，除去细菌残片。
- 9) 将辅助噬菌体在 PBS 中，4°C 短期储藏，长期储藏则须将噬菌体保藏在含 15% 甘油的 PBS 中，-70°C 冻存。
- 10) 确定噬菌体的滴度并验证噬菌体的质量。取 45 μ L 噬菌体加入 5 μ L 胰蛋白酶溶液。在 37°C 温浴 30 min。将 1 μ L 胰蛋白酶处理过的噬菌体稀释到 1 mL，连续 5 次 100 倍梯度稀释。将梯度稀释的噬菌体 (50 μ L) 加入 1 mL *E.coli* TG1 ($OD_{600} = 0.4$)，混匀后加入 3 mL H-Top 琼脂中，均匀平铺于 TYE 平板。未经胰蛋白酶处理的噬菌体也按上述步骤操作。

2.2.5 文库的保存

- 1) 将文库加入 200 mL 预先温浴过的 2×TY 培养基中（含 amp 和 1% 葡萄糖）。
- 2) 37°C, 200 rpm 振摇至 $OD_{600} = 0.4$ （约 1~2 h）。
- 3) 取 50 mL 的菌液加入 2×10^{11} 个 KM13 辅助噬菌体。（剩下的 150 mL 在 37°C 继续振摇 2 h，10800×g 离心后重悬于 10 mL 含 15% 甘油的 PBS 中，分装并保存于 -70°C）
- 4) 在 37°C 水浴静置 30 min。
- 5) 3000×g 离心 10 min，用 100 mL 2×TY 培养基（含 amp 和 0.1% 葡萄糖）重悬。
- 6) 30°C 振摇过夜。

- 7) 过夜菌液 3300×g 离心 30 min。
- 8) 将 20 mL PEG/NaCl 加入到 80 mL 上清液中，混匀，冰浴 1 h。
- 9) 3300×g 离心 30 min，倒掉 PEG/NaCl，快速离心，除去剩余的 PEG/NaCl。
- 10) 将沉淀重悬于 4 mL PBS 并在 11600×g 离心 10 min 除去细菌残片。
- 11) 将噬菌体放置于 4°C 短期保存，用含 15%甘油的 PBS 在 -70°C 长期保存。
- 12) 噬菌体文库的滴度测定。1 μ L 噬菌体稀释于 100 μ L PBS，如此梯度稀释 6 次。将 900 μ L *E.coli* TG1 (OD₆₀₀ = 0.4) 加入到每个 EP 管内，37°C 水浴中静止 30 min。取 10 μ L 梯度稀释的样品涂布于 TYE 平板（含 amp 和 1%的葡萄糖），37°C 培养过夜。噬菌体滴度应在 10¹²~10¹³ PFU/mL，足够 10 次筛选。

2.2.6 用酶标板筛选文库

- 1) 用 200 μ L 含 AFB₁-BSA (33 μ g/mL) 或 AFB₁ (0.3 μ g/mL) 的 PBS，在 4°C 包被 Maxisorp 96 孔酶标板过夜。
- 2) 次日，用 PBS 洗板 3 次。
- 3) 用 2%的脱脂乳封闭酶标板孔（至孔沿），37°C 温浴 2 h 后，用 PBS 洗板 3 次。
- 4) 向包被并封闭好的酶标板孔中，加入 200 μ L 噬菌体文库，在 37°C 轻微振荡 2 h，弃去上清。
- 5) 用含 0.1%的吐温 20 的 PBS (PBST) 洗板 10 次（第一轮筛选）到 20 次（第二轮筛选，第三轮筛选）。
- 6) 弃去多余的 PBS，用以下五种方法洗脱噬菌体
 - A. 酸洗脱：加入 200 μ L，pH 2.2 的甘氨酸-HCl 缓冲液，37°C 温浴 10 min；
 - B. 竞争洗脱：加入 200 μ L，100 μ g/mL 的 AFB₁ 溶液，37°C 温浴 2 h；
 - C. 酶洗脱：用胰蛋白酶（终浓度 1 mg/mL）在 37°C 处理 10 min；
 - D. 酸-胰蛋白酶联用洗脱：加入 200 μ L，pH 2.2 的甘氨酸-HCl 缓冲液，37°C 温浴 10 min，转移至另一封闭好的板孔，用胰蛋白酶（终浓度 1 mg/mL）在 37°C 处理 10 min；
 - E. 竞争-胰蛋白酶联用洗脱：加入 200 μ L，100 μ g/mL 的 AFB₁ 溶液，37°C 温浴 2 h；转移至另一封闭好的板孔，用胰蛋白酶（终浓度 1 mg/mL）在 37°C 处理 10 min。
- 7) 洗脱噬菌体（100 μ L）加入 900 μ L *E.coli* TG1 (OD₆₀₀ = 0.4)，37°C 水浴静置 30 min。
- 8) 取 10 μ L，100 倍梯度稀释的菌液涂布于 TYE 平板（含 amp 和 1%的葡萄糖），37°C 培养过夜，计数。
- 9) 将剩余的 TG1 菌液 11600×g 离心 5 min，弃上清，沉淀用 2×TY 重悬并涂布与 TYE 平板（含 amp 和 1%的葡萄糖），37°C 培养过夜。
- 10) 将过夜培养的菌苔用 2 mL 含 15%甘油的 2×TY 培养基刮下，混合均匀。将 50 μ L 刮下菌苔加入 50 mL 2×TY 培养基（含 amp 和 1%的葡萄糖），将剩余的菌液 -70°C 保存。
- 11) 将转接的菌在 37°C，200 rpm 振摇至 OD₆₀₀ = 0.4（1~2 h）。
- 12) 取 10 mL 菌液加入 5×10¹⁰ PFU 辅助噬菌体，37°C 水浴静止 30 min。
- 13) 菌液 3000 ×g 离心 10 min。用 50 mL 2×TY 培养基（含 amp，kana 和 0.1%葡萄糖）

重悬菌液，并在 30°C，200 rpm 振摇过夜。

- 14) 将过夜培养菌液在 3300×g 离心 15 min。
- 15) 取上清 40 mL，加入 10 mL PEG/NaCl，混合均匀后，冰浴 1 h。
- 16) 3300×g 离心 30 min，倒掉 PEG/NaCl，快速离心除去残余的 PEG/NaCl。
- 17) 将沉淀用 2 mL 的 PBS 重悬后，在 11600×g 离心 10 min，以去掉细胞残片。
- 18) 将 1 mL 噬菌体用来进行下一轮筛选。
- 19) 重复上述实验 2 遍。

2.2.7 多克隆噬菌体 ELISA 对文库筛选结果的鉴定

- 1) 取 25 μ L，含 3.3 μ g/mL AFB₁-BSA 的 PBS 包被于 Costar 96 孔板。
- 2) 用 PBS 洗板 3 次，拍干残余 PBS。向每个板孔中，加入 400 μ L，含 2% 脱脂乳的 PBS 溶液（2% MPBS），37°C 封闭 2 h。
- 3) 用 PBS 洗板 3 次。加入 100 μ L 2% MPBS 和 10 μ L 每轮筛选后用 PEG 沉淀下来的噬菌体，混合均匀。
- 4) 在 37°C 温浴 1 h，在 4MK2 洗板机上，用 PBST 洗板 5 次。
- 5) 加入 5000 倍稀释于 2% MPBS 的 HRP/anti-M13，37°C 温浴 1 h，用 PBST 洗板 5 次。
- 6) 将 TMB 稀释于 100 mmol/L 的醋酸钠缓冲液(pH5.5)至终浓度 100 μ g/mL，将 30% 的过氧化氢 5000 倍稀释于该溶液，成为反应底物。每孔加入 100 μ L 该反应底物，在 37°C 温浴 15 min。
- 7) 加入 1 mol/L 的硫酸 50 μ L 终止反应。读取 OD₄₅₀ 和 OD₆₅₀。

2.2.8 单克隆噬菌体 ELISA 对文库筛选结果的鉴定

- 1) 将每轮筛选中，从测定滴度的 TYE 平板上随机挑取单克隆，接种到每孔装有 100 μ L 2×TY 培养基（含 amp 和 1% 葡萄糖）的 96 孔培养板孔中，37°C，250 rpm 振摇过夜。
- 2) 从每孔中取 2 μ L 转接与第二块 96 孔培养板，每孔装有 200 μ L 2×TY 培养基（含 amp 和 1% 葡萄糖）。剩余的添加甘油至终浓度 15%，-70°C 保存。
- 3) 在 37°C，250 rpm 培养 2 h 后，每孔加入 25 μ L 2×TY 培养基（含 amp，1% 葡萄糖和 10⁹ 个辅助噬菌体）。
- 4) 在 37°C 下，250 rpm 振摇 1 h。然后 1800×g 离心 10 min，甩去上清。
- 5) 将沉淀重悬于 200 μ L 2×TY 培养基（含 amp 和 kana），30°C，250 rpm 振摇过夜。
- 6) 次日，培养板在 1800×g 离心 10 min，取 50 μ L 上清做 ELISA（按照 2.2.7 的步骤）。

2.2.9 可溶性单链抗体的制备

- 1) 在 96 孔培养板孔中加入 100 μ L *E.coli* HB2151 (OD₆₀₀ = 0.4)，接入 2.2.8 制备的含噬菌体的上清 2 μ L，37°C 静置 30 min 后，37°C，250 rpm 振摇过夜。
- 2) 在第二块培养板上加入 200 μ L（含 amp 和 0.1% 的葡萄糖），每孔接入 2 μ L 过夜培养的菌液，在 37°C，250 rpm 振摇 3 h (OD₆₀₀ 约 0.9)。
- 3) 每孔加入 25 μ L 2×TY 培养基（含 amp 和 9 mmol/L 的 IPTG），继续在 30°C，250 rpm

振摇过夜，将过夜菌液 $1800\times g$ 离心 10 min。

- 4) 在 96 孔酶标板上单数列包被 $3.3\ \mu\text{g/mL}$ AFB₁-BSA，双数列包被 $3.3\ \mu\text{g/mL}$ BSA 作为阴性对照，并封闭酶标板。然后，每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 2%的 BSA-PBS，将第 3 步获得的上清 $50\ \mu\text{L}$ 按照 2.2.7 的步骤做 ELISA，HRP/anti-M13 为 HRP/Protein A 所代替。

2.2.10 噬菌粒的提取

- 1) 取 $1.5\ \text{mL}$ 菌液到 $1.5\ \text{mL}$ EP 管中， $11600\times g$ 离心 30 s。
- 2) 弃上清，将 EP 管倒置于卫生纸上数分钟，使液体流尽。
- 3) 菌体重悬于 $100\ \mu\text{L}$ 溶液 I（10%的葡萄糖）中，剧烈振荡，温室下放置 5 min。
- 4) 加入新配制的溶液 II（ $0.2\ \text{mol/L}$ NaOH， $0.78\ \text{mol/L}$ SDS） $200\ \mu\text{L}$ ，盖紧管口快速温和颠倒 EP 管数次，以混匀内容物（千万不要振荡），室温放置 10 min 以上。
- 5) 加入 $150\ \mu\text{L}$ 预冷的溶液 III（每 $100\ \text{mL}$ 的溶液 III 中含 $60\ \text{mL}$ $5\ \text{mol/L}$ 乙酸钾， $11.5\ \text{mL}$ 冰乙酸， $28.5\ \text{mL}$ H_2O ），盖紧管口，并倒置离心管，温和振荡 10 s，使沉淀混匀，冰浴 5 min 以上， 4°C 下 $11600\times g$ ，离心 5 min。
- 6) 上清移入干净 EP 管中，加入等体积的酚/氯仿（1:1）溶液，振荡混匀， $11600\times g$ 离心 5 min。
- 7) 将水相移入干净 EP 管中，加入 2 倍体积的无水乙醇，振荡混匀后放置 10 min 以上，然后 4°C 下， $11600\times g$ 离心 5 min。
- 8) 弃上清，将管口敞开倒置于卫生纸上使所有液体流出，加入 $1\ \text{mL}$ 70%乙醇沉淀一次， 4°C 下 $11600\times g$ 离心 3 分钟
- 9) 吸除上清液，倒置 EP 管使液体流尽，干燥
- 10) 用 $20\ \mu\text{L}$ RNase 水溶液重新溶解， -20°C 贮存。

2.2.11 目的基因的测序

目的基因测序由上海生工生物工程技术有限公司提供，引物为 LMB：CAGGAAACAGCTATGAC 和 pHEN：CTATGCGGCCCCATTCA。

2.2.12 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳联用（PCR-DGGE）

每轮筛选的菌体依照 2.2.10 提取质粒后（ $100\ \text{ng}$ 每样），通过 PCR 扩增。引物为 VK 基因 GC clamp + DPK9 Fr1（ $5'$ -CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCGCTATGCGGCC CCATT CA）^[5]和 pHEN。

PCR 体系：水 $36.5\ \mu\text{L}$ ， $10\times$ Thermopol PCR 缓冲液 $5.0\ \mu\text{L}$ ，dNTP（ $10.0\ \text{mmol/L}$ ） $2.5\ \mu\text{L}$ ，Taq DNA 聚合酶 $1.0\ \mu\text{L}$ ，质粒 $1.0\ \mu\text{L}$ ，引物 1（ $10.0\ \mu\text{mol/L}$ ） $2.0\ \mu\text{L}$ ，引物 2（ $10.0\ \mu\text{mol/L}$ ） $2.0\ \mu\text{L}$ ，总体积为 $50.0\ \mu\text{L}$ 。PCR 条件： 94°C 变性 5 min，进入 30 个 PCR 循环， 94°C 变性 1 min， 55°C 回火 1 min， 72°C 延伸 1 min，然后 72°C 再延伸 10 min。

变性梯度凝胶电泳(DGGE)由南京农业大学食品生物技术学院的华长春先生在 D-Code 变性梯度凝胶电泳仪上完成。PCR 产品经 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(37.5:1)，凝胶含有线性浓度梯度的尿素(35%~70%)。电泳在 60°C ， $1\times$ TAE 缓冲溶液中进行，200

V 运行 10 min 后, 然后将电压调至 85 V 再运行 12~14 h。电泳完毕后, 将凝胶在 10% 的乙醇溶液 (含 0.5% 的醋酸) 处理 5 min, 用 0.5% 的硝酸银染色 10 min, 然后用 1.5% 的 NaOH 溶液 (含 0.3% 甲醛和硼氢钠) 脱色。

2.2.13 表面等离子共振法测定亲和力

scFv-H4 与 AFB₁ 的结合动力学是通过表面等离子共振测定的, 本实验是在中国科学院上海生化细胞所的何淑芳老师指导下完成。AFB₁-BSA 按照 BIAcore 公司的碳化二亚胺试剂盒的方法固定在 CM5 芯片上, 用 BSA 封闭芯片。抗体片段(0.1 μmol/L)在 1 min 内, 以 10 μL/min 的速度通过芯片的通道让抗体片段与固定在芯片上的 AFB₁-BSA 结合, 用 PBS 冲洗通道 2 min 使抗体片段从 AFB₁-BSA 解吸。用 BSA 直接封闭的空白通道作为参照。用 20 μL, 6 mol/L 的盐酸胍冲洗芯片 2 min 以再生芯片。BIAevaluation software 3.0 中 Langmuir 1:1 模型的用来分析吸附曲线。实际数据与模型之间的拟合度用 χ^2 分析来评估。

2.3 结果与讨论

2.3.1 洗脱方法对筛选效率的影响

将噬菌体抗体加入包被了 AFB₁-BSA 的酶标板以后, 为了获得目的克隆, 我们需要用 PBST 洗去非目标的克隆。噬菌体抗体在包被了抗原的酶标板中存在四种情况: 未吸附, 非特异性吸附, 针对非目标抗原的特异性吸附和针对目标抗原的特异性吸附。我们加入了噬菌体的滴度为 8.0×10^{11} PFU/mL, 而文库的库容为 1.4×10^8 , 平均而言每个克隆约有 6×10^3 个拷贝。用 PBST 洗去不吸附或吸附不牢固的噬菌体抗体, 这里将讨论如何把结合在 AFB₁-BSA (固定在酶标板上) 的噬菌体洗脱下来。现在已经报道的有酸碱洗脱^[6], 竞争洗脱^[7]和针对 Tomlinson I+J 文库的酶洗脱^[8]。

我们考察了这些洗脱方法对筛选抗黄曲霉毒素单链抗体筛选的影响。在第一轮筛选的结果中, 酸洗脱获得的噬菌体的滴度最高, 而竞争洗脱下来的噬菌体仅占酸洗脱下来的 1%, 但还是有很多没有展示 scFv 的噬菌体, 因为经胰蛋白酶处理后, 洗脱下来的噬菌体滴度又下降了一个数量级 (表 2-1)。单独的胰蛋白酶洗脱获得的噬菌体是酸洗脱的 10%, 说明在酸洗脱的噬菌体中, 90% 是不展示抗体的克隆。

第二轮和第三轮筛选过程中, 无论采用哪种洗脱方法, 噬菌体的滴度都在增加, 这说明在筛选过程中有克隆富集的现象产生, 而竞争-胰蛋白酶联用洗脱的增加幅度是最快的 (约为 4 个数量级), 这可能意味着这种方法富集的效率最高。尽管是洗脱方法不同, 第三轮洗脱噬菌体的滴度测定结果都是 $10^8 \sim 10^9$ PFU, 这可能是酶标板孔所包被的 AFB₁-BSA 所能结合的噬菌体抗体的饱和量。

除了富集效率外, 不同洗脱的洗脱方法对每一轮也能筛选的阳性率也有明显的影响。根据表 2-1 中所示的结果, 第一轮筛选的结果中, 无论是哪种洗脱方法都没有阳性克隆产生。通过第二轮筛选, 随机挑取的 AFB₁ 竞争洗脱的 46 个克隆中出现了一个阳性克隆, 而由竞争-胰蛋白酶联用洗脱的 46 个克隆中有 7 个阳性克隆。通过第三轮筛选, 除了酸

洗脱外，其他洗脱方法获得的结果都出现了阳性克隆，酸-胰蛋白酶联用洗脱的结果中，噬菌体的阳性率最低，而竞争洗脱-胰蛋白酶洗脱联用的噬菌体阳性率最高，超过了 50%。

结合表 2-1 和表 2-2，酸洗脱得到的噬菌体抗体数量最多，这是因为甘氨酸缓冲液洗脱通过改变抗原抗体相互作用环境的 pH 值来分离抗原抗体，具有普遍适用性，但是在这些洗脱方法中是选择性最差的一种。胰蛋白酶洗脱是根据 pIII-scFv 融合蛋白结构和改造的辅助噬菌体 pIII 蛋白结构设计的（图 2-1），在 pIII-scFv 和改造 pIII 蛋白的胰蛋白酶敏感位点被胰蛋白酶水解后，还能侵染大肠杆菌并在大肠杆菌中获得扩增的噬菌体都是展示了 scFv 的噬菌体克隆（图 2-1）。从胰蛋白酶洗脱的结果和甘氨酸洗脱结果的比较可以看出，用甘氨酸洗脱的绝大部分噬菌体并没有展示 scFv。

在抗半抗原的抗体筛选过程中，竞争性洗脱是常采用的方案，竞争洗脱能使筛选更特异地针对半抗原。AFB₁ 竞争洗脱后，再用胰蛋白酶处理，这样噬菌体滴度最低，说明了仅用游离 AFB₁ 洗脱下来的噬菌体还含有许多未展示 scFv 的噬菌体。我们所需要的抗 AFB₁ 的噬菌体抗体仅占用甘氨酸洗脱的噬菌体的千分之一，不恰当的洗脱过程会让接下来的筛选过程偏离方向，导致筛选失败，因此选择高效的洗脱方法显得至关重要。

表 2-1，通过三轮筛选，不同洗脱方法获得的噬菌体抗体的富集情况。

Tab. 2-1, the enrichment of phage antibodies eluted by various elution methods.

洗脱方法	第一轮	第二轮	第三轮
酸洗脱	3.7×10^7	6.9×10^8	4.9×10^9
竞争洗脱	2.4×10^5	3.7×10^7	5.9×10^8
胰蛋白酶洗脱	3.6×10^6	4.8×10^7	5.6×10^8
酸-胰蛋白酶联用洗脱	5.7×10^5	6.4×10^6	2.8×10^8
竞争-胰蛋白酶联用洗脱	6.1×10^4	3.5×10^5	4.5×10^8

表 2-2，不同洗脱方法对每一轮筛选结果阳性率的影响（当结合在 AFB₁-BSA 上的噬菌体抗体的 ELISA 信号值为结合在 BSA 上的噬菌体抗体信号值的 3 倍以上时为阳性）

Tab. 2-2 the positive ratio of phage antibodies eluted by different methods

洗脱方法	第一轮	第二轮	第三轮
酸洗脱	0/46	0/46	0/94
竞争洗脱	0/46	1/46	29/94
胰蛋白酶洗脱	0/46	0/46	12/94
酸-胰蛋白酶联用洗脱	0/46	0/46	7/94
竞争-胰蛋白酶联用洗脱	0/46	7/46	51/94

Tomlinson I+J文库的噬菌体展示系统是 3+3 型^[9]。在 M13 丝状噬菌体顶端所展示的 pIII 蛋白一共有两种。一种是野生型 pIII 和 scFv 的融合蛋白①，一种是改造过的 pIII 蛋白②（图 2-1）。pIII 蛋白在噬菌体侵染大肠杆菌过程中发挥关键作用，pIII 蛋白的 D3 结构域负责识别大肠杆菌的表面受体，而 D1、D2 结构域负责引导噬菌体的基因进入大肠杆菌^[10]。融合 pIII 蛋白①是由噬菌粒编码，在融合位点中设计了一个胰蛋白酶酶切位点；而

改造过的pIII蛋白中，在D3 结构域与D2 结构域之间有一个胰蛋白酶酶切位点，这个蛋白由辅助噬菌体编码。当pIII蛋白的完整性被胰蛋白酶破坏以后，辅助噬菌体就失去侵染性^[11]。经测定我们制备的辅助噬菌体经过胰蛋白酶处理后，辅助噬菌体的滴度由 1.2×10^{12} CFU/mL 下降到 6.4×10^4 CFU/mL，降幅达 7 个数量级，这说明辅助噬菌体编码的pIII蛋白对胰蛋白酶敏感。在*E.coli*内，由噬菌粒的PIII基因翻译的pIII-scFv融合蛋白和由辅助噬菌体PIII基因翻译的改造pIII蛋白随机装配到噬菌体抗体的表面。融合蛋白pIII-scFv，胰蛋白酶切去scFv后，重新获得了侵染的能力（图 2-2）。Tomlinson等人采用这样的设计极大地降低了未展示抗体噬菌体的数量。

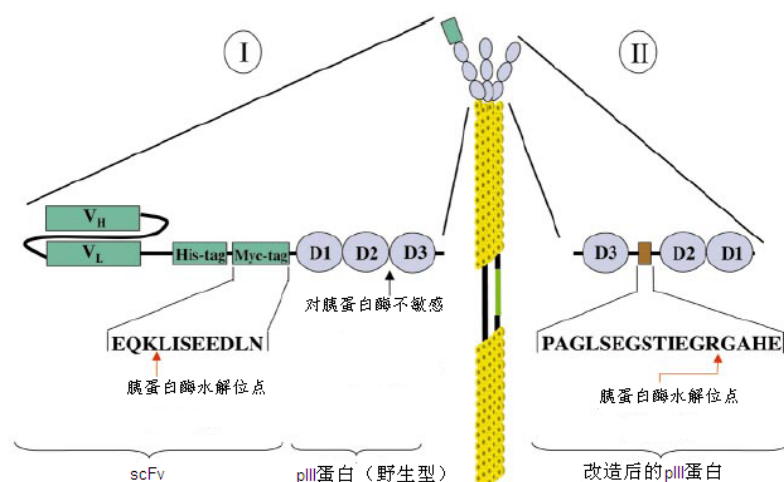


图 2-1 用 3+3 型噬菌体展示系统展示 scFv 的示意图^[2]。

Fig.2-1 the schelamatic presentation of scFv displayed by a “3+3” phage display

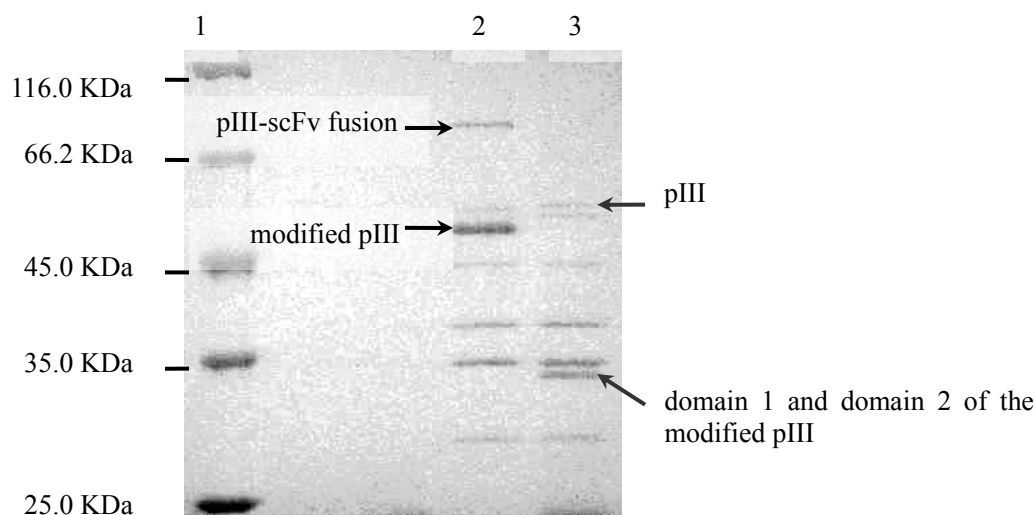


图 2-2 展示了scFv的噬菌体胰蛋白酶处理前后的SDS-PAGE结果。第1道：标准蛋白质；第2道：未经胰蛋白酶处理的展示了scFv的噬菌体；第3道：经过胰蛋白酶处理的展示了scFv的噬菌体。

Fig. 2-2 SDS-PAGE results of scFv-phage before and after trypsin treatment. Lane 1: protein marker; lane 2: protein profile of scFv-phage; lane 3: protein profile of scFv-phage after 1 mg/mL trypsin treatment at 37°C for 10 min.

2.3.2 用半抗原 AFB₁ 直接包被用以筛选文库

在以前的研究中,半抗原的抗体通常是用半抗原-载体结合物来筛选的,但是复合物中的载体上的抗原表位可能会误导筛选方向,或者筛选到抗体仅能识别结合形式的半抗原而不能识别游离形式的半抗原^[3]。如将半抗原直接固定后用以筛选抗体也许就可以避免上述问题。这里我们比较用 AFB₁ 和 AFB₁-BSA 筛选 Tomlinson I+J 文库的效果,再用筛选到的抗体再来讨论 AFB₁ 能否直接固定在酶标板上。

在第一轮筛选中,从 AFB₁ 直接包被的孔中洗脱下来的噬菌体的滴度为 8×10^2 个,占从 AFB₁-BSA 包被的孔中洗脱下来的噬菌体滴度 (4.2×10^4 个) 的 5% 左右;在第二轮和第三轮筛选中,噬菌体的滴度持续上升,这反映在筛选过程中有克隆富集现象出现,而从 MPBS 封闭的空白孔中洗脱下来的噬菌体滴度一直很低,没有明显克隆富集的趋势(表 2-3)。从 AFB₁ 包被孔洗脱下来的噬菌体滴度一直比从 AFB₁-BSA 包被的孔洗脱下来的噬菌体的滴度要低,这可能和 AFB₁ 直接包被到酶标板上的效率较低有关系。

表 2-3 在以固定的 AFB₁ 和 AFB₁-BSA 为抗原的三轮筛选中每轮筛选后噬菌体滴度的比较
Tab. 2-3 the titer of phage recovered from each rounds of selection against AFB₁ or AFB₁-BSA

	以 AFB ₁ 为抗原	以 AFB ₁ -BSA 为抗原	空白对照
第一轮	8.0×10^2	4.2×10^4	3.2×10^2
第二轮	2.0×10^3	2.5×10^6	5.7×10^2
第三轮	9.4×10^5	1.1×10^8	1.9×10^3

筛选过程中噬菌体的富集现象也可以通过 PCR-DGGE 来考察。PCR-DGGE 常用来考察自然环境中微生物群落的多样性和丰度^[12]或确定 DNA 片段中的突变^[13]。以前在考察抗体筛选过程中的富集现象时,研究人员一般都会采用每轮筛选的回收率为指标。而在本研究中,我们采用 PCR-DGGE 来考察筛选过程中克隆的富集情况,以每一轮筛选的噬菌粒的轻链基因为模板进行 PCR,然后将轻链 PCR 的结果(约 400 bp)用 DGGE 分离(图 2-3)。第 1 道是没有筛选过的文库的 DGGE 结果,可以看到没有明显的条带出现,只是在某些区域有些弥散;而经过一轮针对 AFB₁ 的筛选以后,在弥散的区域里明显出现了一些条带,这可以被认为是某些克隆在筛选中获得了富集(第 2 道);这样的富集现象在第二次筛选后更加明显,越来越多的条带出现(第 3 道),在第三轮筛选过程中,一些条带消失了,而另外一些条带得到了加强,这可以反映出此轮筛选的克隆的取舍情况(第 4 道)。而在采用 AFB₁-BSA 的筛选过程中,也可以发现类似的现象(第 5、6、7 道)。这两种不同的筛选方法都可能获得一些一样的条带,这说明两种不同的筛选方法可以得到相同的克隆。

但是在使用 PCR-DGGE 对筛选结果评估中,DGGE 也有一些不足之处。DGGE 不能分析长度大于 500 bp 的基因片段^[1],而 scFv 的基因全长为 700 bp 以上,所以 scFv 全长的多样性还不能用 DGGE 来考察。另外目前 DGGE 的分辨率还有限,只有那些丰度在 1% 以上的基因克隆才能显示为清晰的条带,而丰度低于 1% 的克隆只能以弥散的形式存在^[15]。比如原始的文库的大小为 10^8 以上,所以 DGGE 在分析这样的基因多样性上还是

无能为力。但是如图 2-3 所示，筛选过程的富集情况以及筛选结果的多样性都可以通过 DGGE 来考察。到目前为止，还没有用 PCR-DGGE 来考察抗体的文库的筛选情况的报道，我们也希望在以后条件具备的情况下开展进一步的研究。

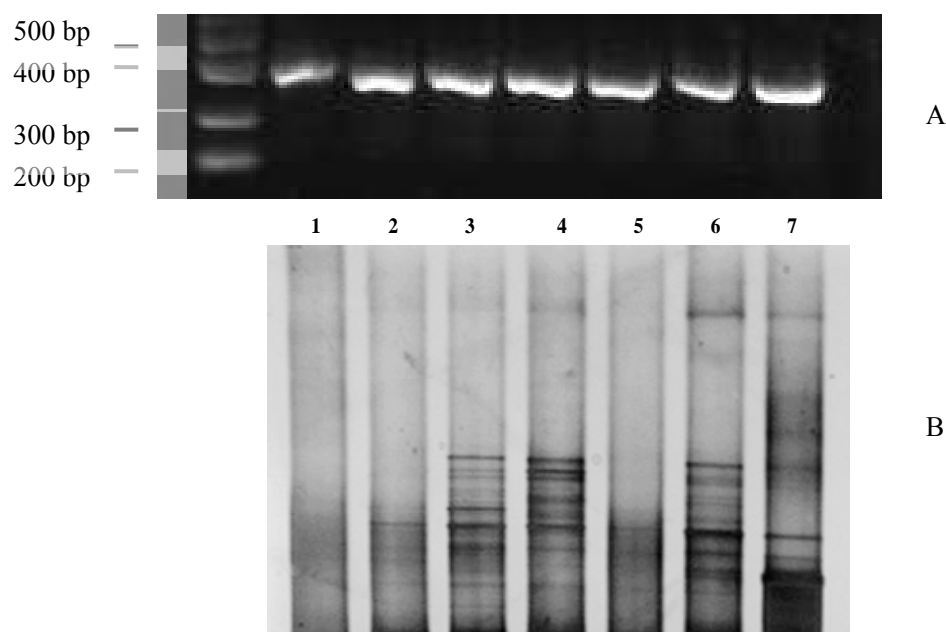


图2-3 在包被了 AFB_1 或 AFB_1 -BSA的ELISA板进行3轮筛选，每轮筛选结果的PCR (A) 后用DGGE电泳分离 (B)。第1道为原始文库；第2、3、4道分别为用 AFB_1 为抗原的第1、2、3轮筛选的结果；第5、6、7道分别为用 AFB_1 -BSA为抗原的第1、2、3轮筛选的结果。

Fig.2-3 the DGGE profiles of the outcomes selected against AFB_1 or AFB_1 -BSA.

Lane 1 was the original library; Lane 2, 3, 4 were the 1st, 2nd, 3rd round of selection against AFB_1 , respectively; Lane 5, 6, 7 were the 1st, 2nd, 3rd round of selection against AFB_1 -BSA, respectively.

在多克隆 ELISA 中 (图 2-4)，用 AFB_1 进行筛选的抗体的信号随着筛选逐渐上升，可以认为那些能识别 AFB_1 -BSA 的克隆在筛选过程中富集，所占的比例逐轮上升；而阴性对照 (BSA 包被的孔) 的信号值一直较低。用 AFB_1 -BSA 筛选的抗体信号总体上也是逐轮上升，但是阴性对照的一开始比较高，随着筛选逐轮降低，这可能是第一轮洗脱的噬菌体中含有大量能够识别 BSA 的克隆所致，而经过多轮竞争洗脱识别 BSA 的克隆被逐步排除。这一点可通过单克隆 ELISA 得到验证，当 AFB_1 -BSA 的信号是 BSA 信号的 3 倍时，我们就认为其中有足够量的抗体能识别 AFB_1 -BSA，记为阳性^[16]。用 AFB_1 筛选抗体，三轮以后筛选结果呈阳性；而用 AFB_1 -BSA 筛选，在两轮以后的筛选结果就呈阳性了。而用 MPBS 封闭的空白空筛选结果的 ELISA 信号一直都比较低，说明在筛选过程中没有能识别 AFB_1 -BSA 的克隆富集。

从用这三种抗原筛选方法每轮的滴度计数平板中，随机挑取 46 个克隆做单克隆 ELISA，以检查筛选过程中阳性克隆的富集情况 (表 2-4)。在第一轮筛选过后，在随机的 46 个克隆中，这三种方法都没有获得一个阳性。第二轮筛选后，在用 AFB_1 筛选的结果中出现了 21 个阳性克隆，而用 AFB_1 -BSA 筛选到了 4 个阳性克隆，而用空白孔筛选的结果没有阳性克隆出现。经过第三轮筛选以后，以 AFB_1 为抗原的筛选结果阳性率为

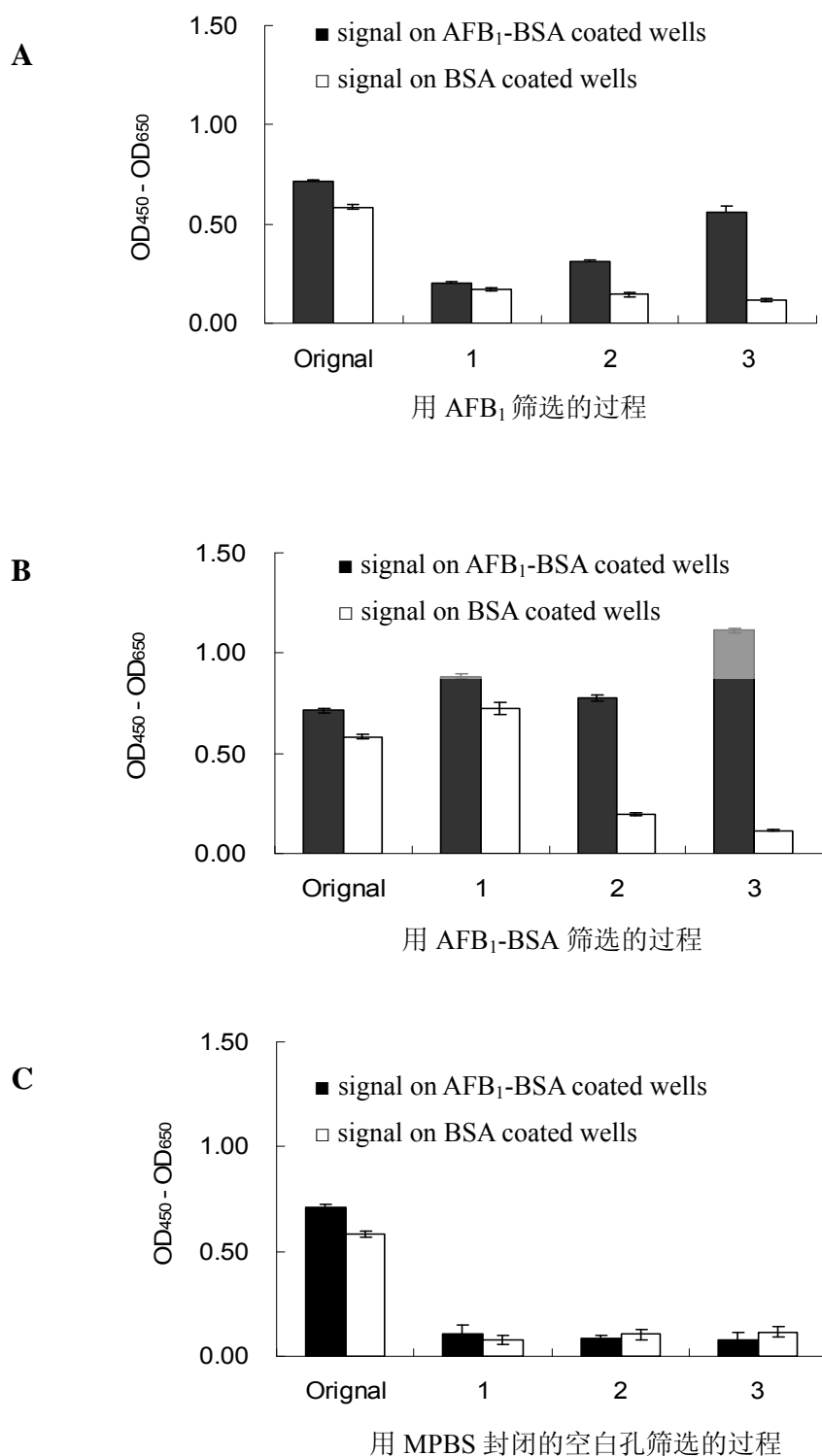


图2-4 用AFB₁、AFB₁-BSA或空白对照孔进行筛选中，每轮洗脱并扩增后的噬菌体多克隆ELISA结果。A是以AFB₁为抗原筛选的结果；B是以AFB₁-BSA为抗原筛选的结果；C是空白对照筛选的结果。

Fig.2-4 the polyclonal ELISA of the phage eluted and amplified from each round of selection against AFB₁, AFB₁-BSA and MPBS-blocked wells. A panned against AFB₁; B panned against AFB₁-BSA, C: panned against the MPBS-blocked blank wells

44/46, 以 AFB₁-BSA 为抗原的筛选结果阳性率为 31/46, 而用空白孔筛选的结果的阳性率为 0/46。在以前的文献报道中, Daly 用 AFB₁-BSA 和 AFB₁-糊精轮流作为抗原筛选由免疫过的小鼠脾细胞基因构建的文库, 三轮筛选后阳性率为 9/96^[17]。Moghaddam 用 AFB₁-BSA 为抗原对未免疫过的人脾细胞抗体文库和半合成抗体文库进行筛选, 三轮筛选以后阳性率分别为 19/46 和 24/32^[3]。和他们的结果比较, 我们的方法专一性更好, 筛选的效率更高。

表 2-4 用 AFB₁, AFB₁-BSA 和空白孔为抗原的三轮筛选中每轮筛选后噬菌体的阳性率的比较

Tab. 2-4 the positive ratio of clones selected against AFB₁, AFB₁-BSA and MPBS-blocked wells

	以 AFB ₁ 为抗原	以 AFB ₁ -BSA 为抗原	空白对照
第一轮	0/46	0/46	0/46
第二轮	21/46	4/46	0/46
第三轮	44/46	31/46	0/46

2.2.3 抗 AFB₁ 的抗体克隆的亲合力与交叉反应性

在随机单克隆 ELISA 试验中, 这些克隆 ELISA 信号大小不一, 我们将 ELISA 信号大于 2.5 的认为是具有较高结合能力的克隆。其中, 用 AFB₁ 筛选获得的较好的克隆有 14 个, 用 AFB₁-BSA 筛选获得的较好的克隆有 8 个。测序的结果确认, 用 AFB₁ 筛选获得 5 个不同的克隆 (A7、C5、C11、G1 和 H4), 而用 AFB₁-BSA 筛选获得 2 个不同的克隆 (D6 和 F8)。测序结果表明以 AFB₁ 为抗原筛选获得的克隆 C5 和以 AFB₁-BSA 为抗原筛选获得的克隆 F8 是相同的。两种不同的方法在能够筛选到同样的克隆, 也说明这两种方法在筛选抗 AFB₁ 的 scFv 方面具有相同的效果。

在竞争 ELISA 中, 将 ELISA 信号在 1.0 左右的噬菌体抗体浓度来与不同浓度的 AFB₁ (0.05~512 ng/mL) 孵育, 然后将共孵育的溶液加入包被了 AFB₁-BSA 的酶标板孔中, AFB₁ 就和 AFB₁-BSA 竞争噬菌体抗体, 这样结合在 AFB₁-BSA 的噬菌体抗体减少, ELISA 信号值也降低了, 因此我们用竞争 ELISA 考察了不同的克隆对 AFB₁ 的半抑制浓度 (IC₅₀)。从图可以看到所选取的这些克隆的 IC₅₀ 的范围从 0.4 到 120 ng/mL (图 2-5)。在 Daly 和 Maghaddam 的报道中, 他们筛选到的抗体中, 亲合力最高的克隆 IC₅₀ 分别为 400 ng/mL 和 16 ng/mL。亲合力最高的克隆 H4 被用在以后的研究中。

所筛选到抗体的亲合力也可以通过表面等离子共振 (SPR) 来考察。在图 2-6A 中, scFv-H4 与包被在感应芯片上的 AFB₁-BSA 的结合与浓度相关, 浓度越高, 表面等离子共振的信号越高, 由此可以估算出 scFv-H4 与 AFB₁-BSA 的亲合力为 9.8×10^{-11} 。当这些抗体与 AFB₁ 预先孵育后, 表面等离子共振的信号随着预先孵育中 AFB₁ 的浓度的上升而下降 (图 2-6B), 这说明 scFv-H4 能够识别游离的 AFB₁, 而且由表面等离子共振测定的 IC₅₀ 与 ELISA 的结果类似。由模拟软件估算的得到 H4 与 AFB₁ 的亲合力为 1.2×10^{-12} 。

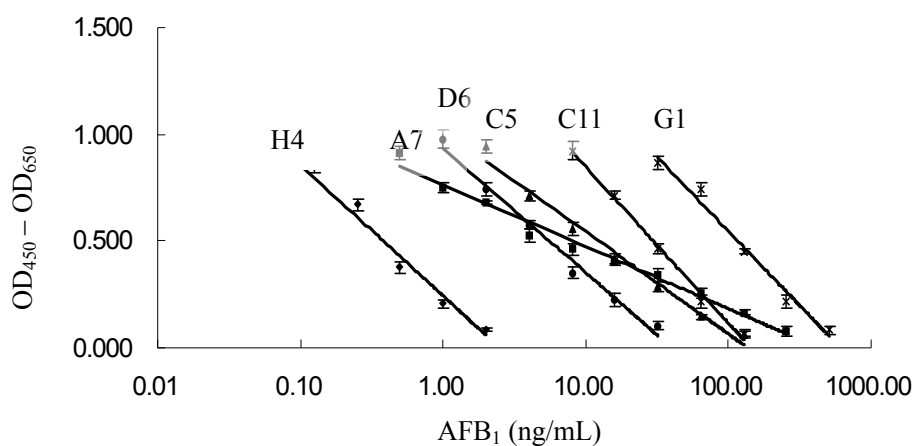


图2-5, 多个单克隆的竞争ELISA。

Fig. 2-5, competitive ELISA of selected clones with AFB₁.

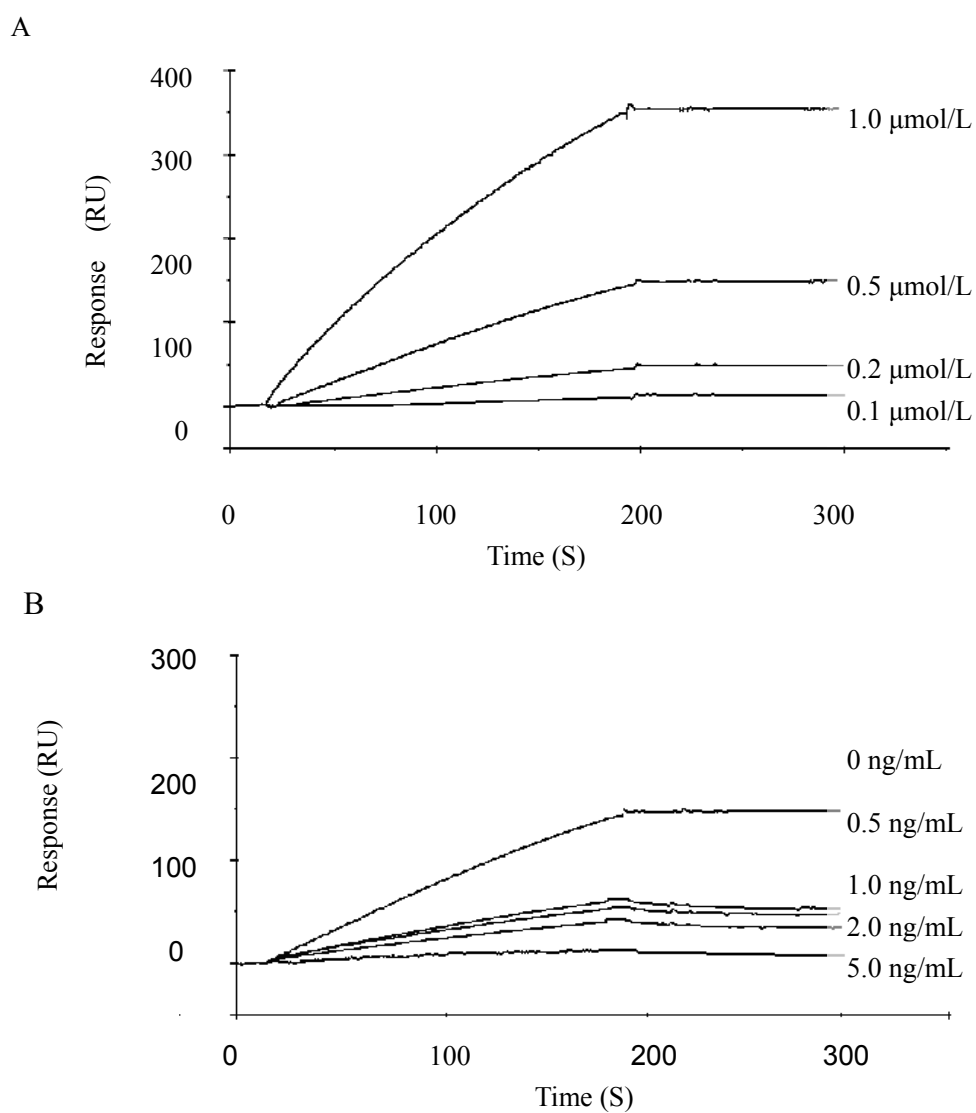


图2-6 用表面等离子共振测定的scFv-H4与AFB₁-BSA与AFB₁之间的结合。

Fig. 2-6 the binding of scFv-H4 with AFB₁-BSA and AFB₁ monitored by SPR.

2.2.4 游离 AFB₁ 与酶标板的结合

将 AFB₁ 与 BSA 或糊精结合的目的就是为了让 AFB₁ 能固定在酶标板上。半抗原分子较小, AFB₁ 能否与酶标板结合? 就此, 我们用 AFB₁ (0.3 μg/mL) 包被酶标板。用亲和力最高的 scFv-H4 来检测 AFB₁ 与酶标板的结合情况, 并用 AFB₁-BSA (33 μg/mL, AFB₁ 的摩尔浓度与游离的 AFB₁ 相当) 作为对照 (图 2-7)。随着 AFB₁ 和 AFB₁-BSA 浓度的降低, ELISA 信号也在降低。由 AFB₁-BSA 包被的浓度与 ELISA 的关系曲线是一个 S 型曲线, AFB₁ 包被的浓度-ELISA 关系曲线大大低于相对应的 AFB₁-BSA 包被的浓度-ELISA 关系曲线。这说明 AFB₁ 和 AFB₁-BSA 都能固定在酶标板上, 但是 AFB₁ 结合的能力远低于 AFB₁-BSA。Nunc Maxisorp 酶标板是由聚苯乙烯制成, 表面主要以疏水基团为主, 经过特殊的工艺改造后表面又连上了一些亲水基团。这样 Maxisorp 表面是亲水和疏水基团相互间隔的结构, 适合于不同性质的分子结合。有文献报道 ρ-氨基苯丙氨酸 (相对分子质量为 180) 能很稳定地结合到 Maxisorp 酶标板的表面^[18]。AFB₁ 与酶标板之间的结合可能主要是疏水相互作用, 但是 AFB₁ 的结合远不如 AFB₁-BSA 结合稳固, 这可能是由于 AFB₁-BSA 分子较大, 和酶标板是多位点结合, 而 AFB₁ 分子较小, 单位点结合没有多位点结合牢固。然而这样比较弱的结合可能能满足重组抗体筛选的需要。

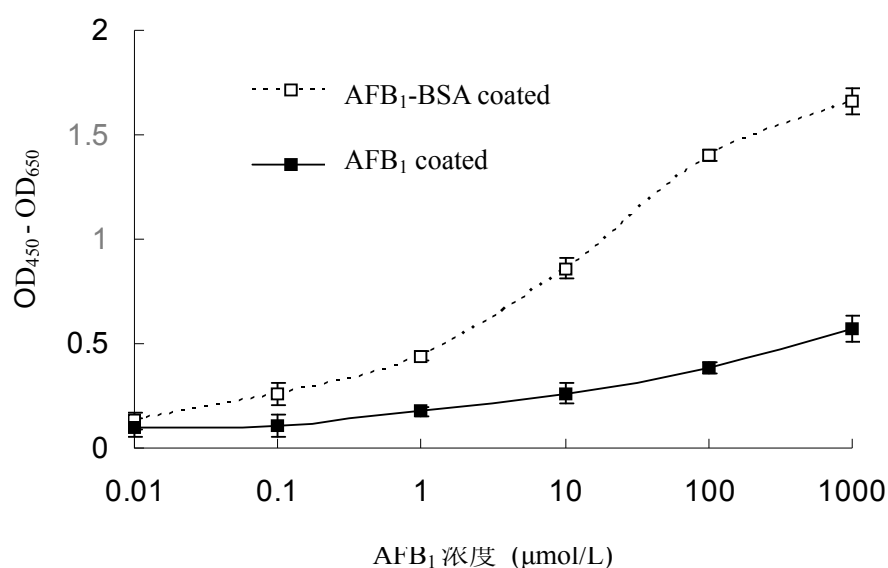


图2-7 AFB₁与AFB₁-BSA与Maxsorp酶标板的结合

Fig. 2-7 binding of AFB₁ and AFB₁-BSA to Maxisorp ELISA plate

2.2.5 scFv-H4 的蛋白序列

scFv-H4 的基因序列测定后, 经翻译的蛋白质序列如图 2-8 所示, 用阴影背景突出的序列是根据 Kabat Numbering 的方法定义出来的 scFv-H4 的高变区 HVR(或互补决定区,

CDR)。简单的序列比较确定 H4 的重链属于人重链的第三亚类,而轻链属于人 κ 链的第一亚类。

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKCLEWVSSITGAGGG
TRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKHKTTFDYWGQGT LVT
VSSGGGGSGGGGSGGGGSTD IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK
PGKAPKLLIYRASHLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQATASPVTF
GCGTKVE

图 2-8 scFv-H4 的氨基酸序列

Fig. 2-8 amino acid sequence of scFv-H4

2.3 本章小结

在这一章中,我们讨论了半抗原直接包被用以筛选和不同洗脱的条件等对抗 AFB₁ 单链抗体筛选结果的影响。

(1) AFB₁ 作为半抗原小分子物质能吸附到 Maxisorp 酶标板上,但是这样的结合不及 AFB₁-BSA 的结合那样牢固,但是能够满足重组抗体筛选的需要。而且, AFB₁ 直接包被半抗原能避免在半抗原与载体结合过程中半抗原免疫反应性的变化,另外也避免了载体上占主导的抗原表位对筛选的误导,使筛选效率大大提高,具体在本次研究中阳性率高达 95%。

(2) 洗脱方式对筛选结果阳性率的影响显著。由于许多非特异性克隆的干扰,筛选结果中往往含有大量不能特异识别半抗原的克隆,竞争-胰蛋白酶联用洗脱能有效的提高筛选的特异性,大大提高筛选结果中阳性克隆的比例。

(3) PCR-DGGE 首次用来考察筛选过程中克隆的富集情况和筛选结果中的多样性和丰度。

参考文献

1. Lauer B, Otteleben I, Jacobsen H. Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B₁. J Agric Food Chem, 2005, 53(4):899-904.
2. Goletz S, Christensen P A, Kristensen P. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display. J Mol Biol 2002, 315(5):87-97.
3. Moghaddam A, Lobersli I, Gebhardt K. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B₁ from naive recombinant antibody libraries. J Immunol Methods, 2001, 254(1-2):169-181.
4. Leong M K, Chen C, Shar K C. Selection and characterization of lipase abzyme from phage displayed antibody libraries. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361(3):567-573.

5. Lawnicki L C, Rubocki R J, Chan, W. C. The distribution of gene segments in T-cell receptor gamma gene rearrangements demonstrates the need for multiple primer sets. *J Mol Diagn*, 2003, 5(2):82-87.
6. Meulemans E V, Slobbe, R, Wasterval P. Selection of phage-displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody. *J Mol Biol*, 1994, 244(4):353-360.
7. Missailidis S, Thomaidou D, Borbas K. E. Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting. *J Immunol Methods*, 2005, 296(1-2):45-62.
8. Guo L, Yan X, Qian S. Selecting and expressing protective single-chain Fv fragment to stabilize L-asparaginase against inactivation by trypsin. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 31(1):21-27.
9. Schlaman H R, Schmidt K, Ottenhof D. Analysis of interactions of signaling proteins with phage-displayed ligands by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biomol Screen*, 2008, 13(8):766-776.
10. Shi B, Wang H, Guo S. Protein III-based single-chain antibody phage display using bacterial cells bearing an additional genome of a gene-III-lacking helper phage. *Biotechniques*, 2007, 42(6):760-765.
11. Fowlkes D M, Adams M D, Fowler V A. Multipurpose vectors for peptide expression on the M13 viral surface. *Biotechniques*, 1992, 13(3):422-42
12. Fontana C, Vignolo G, Cocconcelli P S. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *J Microbiol Methods*, 2005, 63(3):254-26
13. Tchernitchko D, Lamoril J, Puy H. Evaluation of mutation screening by heteroduplex analysis in acute intermittent porphyria: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Clin Chim Acta*, 1999, 279(1-2):133-143.
14. Myers R M, Fischer S G, Lerman L S. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(9):3131-3145.
15. Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3):695-700.
16. Paknejad M, Javad Rasaee M, Mohammadnejad J. Development and characterization of enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B₁ measurement in urine sample using penicillinase as label. *J Toxicol Sci* 2008, 33(5):565-73.

17. Daly S, Dillon P, Manning B. Production and characterization of murine single chain Fv antibodies to aflatoxin B₁ derived from a pre-immunized antibody phage display library system. Food and Agricultural Immunology, 2002,14:255-274.
18. Hofstetter O, Hofstetter H, Then D. Direct binding of low molecular weight haptens to ELISA plates. J Immunol Methods, 1997, 210(1):89-92.

第三章 scFv-H4的在大肠杆菌中的表达

3.1 引言

scFv-H4 在原来的筛选系统 *E.coli* HB215/pIT2 中表达时, 存在表达不稳定, 表达量偏低, 目的蛋白不易纯化等问题。抗体片段的表达水平严重地限制了后续对抗体片段的研究^[1], 我们希望用一个新的表达系统来表达 H4。Miller 等人比较了酿酒酵母、毕赤酵母和大肠杆菌表达抗体片段的效率和稳定性, 认为大肠杆菌表达系统能最快速、最稳定地表达单链抗体, 也有利于后续的纯化操作^[2]。基于 T7 启动子的 pET 表达系统是目前最为常用的表达异源蛋白的大肠杆菌表达系统^[3], 而该表达系统有多种载体以适应不同性质蛋白的要求, 我们研究了不同的 pET 载体 (pET20b, pET22b, pET28a and pET32a) 表达抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体 (scFv-H4) 的特点, 为 scFv-H4 的表达选择合适的载体。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌株, 载体与培养基

E.coli DH5 α 、*E.coli* BL21(DE3)和 *E.coli* Origami(DE3)以及载体 pET20b、pET22b、pET28a 和 pET32a 由 Novagen 公司提供 (本实验室自己保存)。LB 培养基: 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 5 g NaCl 溶于 1000 mL 去离子水; LB 平板培养基: 10 g 琼脂粉, 10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 5 g NaCl 分散于 1000 mL 去离子水。

3.2.2 试剂与仪器

本章研究中所用的 *Taq* DNA 聚合酶, 限制性内切酶 *Nco* I、*Not* I、*Xho* I、*Sal* I 是 New England Biolabs 公司的产品; 胶回收试剂盒是北京 Bio-west 公司的产品。仪器同 2.2.3。

3.2.3 质粒提取

同 2.2.10

3.2.4 目的基因的聚合酶链式反应 (PCR)

本章所采用的引物为 LMB3 (CAGGAAACAGCTATGAC)、Link seq new (CGACCCGCCACCGCCGCTG)、DPK9 FR1 seq (CATCTGTAGGAGACAGAGTC) 和 pHEN (CTATGCGGCCCCATTCA)。重链 PCR 采用 LMB3 和 Link seq new 作为引物, 轻链采用 DPK9 FR1 seq 和 pHEN 作为引物, 全长基因采用 LMB3 和 pHEN 作为引物。PCR 体系和条件同 2.2.12, 只是变性时间为 30 s。

3.2.5 目的基因的酶切

H4 基因的酶切体系（反应条件：37°C，1 h）

全长		重链		轻链	
pIT2	17.6 μ L	pIT2	17.6 μ L	pIT2	17.6 μ L
NEB Buffer 3	2.0 μ L	NEB Buffer 4	2.0 μ L	NEB Buffer 3	2.0 μ L
BSA	0.2 μ L	BSA	0.2 μ L	BSA	0.2 μ L
<i>Nco</i> I	0.1 μ L	<i>Nco</i> I	0.1 μ L	<i>Sal</i> I	0.1 μ L
<i>Not</i> I	0.1 μ L	<i>Xho</i> I	0.1 μ L	<i>Not</i> I	0.1 μ L
总体积	20.0 μ L	总体积	20.0 μ L	总体积	20.0 μ L

3.2.6 目的基因的回收

参考小试剂盒产品说明书

3.2.7 *H4* 的克隆与转化

将含有 *H4* 基因的 pIT2 噬菌粒通过 PCR 获得 *H4* 基因。1.2%的琼脂糖凝胶电泳纯化和回收目的片段，用限制性内切酶 *Nco*I 和 *Not*I 双酶切 *H4* 基因与 pET 载体，经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳纯化和胶回收后，用 T4 连接酶将二者在 16°C 连接 24 h。连接产物 10 μ L 热激转入感受态的 *E.coli* DH5 α ，将该 *E.coli* DH5 α 涂布于 LB 平板培养基（含 amp）。20 h 后挑取单克隆用 LB 培养基（含 amp）培养，重组质粒经测序验证（上海生工）。然后将成功构建的 pET/4H 转入感受态的 *E.coli* BL21(DE3)或 *E.coli* Origami(DE3)中，在 LB 平板培养基（含 amp）上涂布培养，挑取单克隆用 LB 培养基（含 amp）培养过夜，提取质粒后酶切验证后，将甘油加入剩余的菌液中至终浓度 8%，分装于 -20°C 冻存。

3.2.8 scFv-H4 的诱导表达

将冻存的菌株接入 5 mL LB 培养基（含 amp）中，37°C，200 r/min 振摇至培养物 OD₆₀₀ 约为 0.5。将活化的菌 2 mL 加入 100 mL LB（含 amp）培养基中，37°C，200 r/min 振摇至 OD₆₀₀ 0.6-0.8 后，加入 1 mmol/L 的 IPTG，再在 30°C 继续诱导 20 h。我们还对 IPTG 浓度和诱导温度做了一定的优化。在 *E.coli* Origami(DE3)的发酵过程中，培养基中还添加卡那霉素。

3.2.9 大肠杆菌各部分蛋白的提取及纯化

取发酵物 1 mL，在 11600 \times g 条件下离心 15 min，沉淀用 100 μ L，2 \times 上样缓冲液溶解，用以分析全细胞蛋白（TCP）。培养基上清：取 40 mL 培养物，14000 \times g 离心，富集菌体；上清用三氯乙酸浓缩 10 倍后用于电泳分析。细胞周质组分：将富集的菌体重悬于 10 mL，30 mmol/L 的 Tris-HCl（pH8），20%的蔗糖溶液中，加入 20 μ L，0.5 mol/L EDTA，室温缓慢震荡 10 min 后，10000 \times g，4°C 离心收集细胞，弃上清。将处理后的细胞重悬于 10 mL，冰冻的 5 mmol/L MgSO₄ 溶液中，在冰上缓慢震荡 10 min，此时周质蛋白被释放到缓冲液中。4°C，10000 \times g 离心收集细胞，上清浓缩 10 倍后用于电泳分析。细胞质可溶

组分：提取周质后的细胞沉淀，用 10 mL PBS 重悬，冰浴上超声（200 w，1 s 工作，9 s 间歇），1 h 后，4°C，10000×g 离心，上清用于电泳分析。取超声破碎液 1 mL 于一个干净的离心管，11600×g 离心 15 min 后，用 1 mL 含 2% 曲拉通的 PBS 洗涤沉淀三次，再 11600×g 离 15 min，沉淀用 100 μL 2×上样缓冲液溶解，用以分析包涵体。

将发酵物 100 mL，3300×g 离心 15 min 后收集菌体沉淀，用 10 mL 的磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）重悬菌体。重悬的菌体用超声破碎仪（Sonic，Vibracell）在 200 W（1 s 工作，9 s 间歇）超声 60 个循环，将超声破碎液 11600×g 离心 15 min。离心上清加入螯合有 Ni²⁺的 Sepharose Fast Flow 凝胶上，用 50 mmol/L 的咪唑溶液（含 0.5 mol/L NaCl，pH7.7）洗去杂蛋白后，用 10 mL，200 mmol/L 的咪唑溶液（含 0.5 mol/L NaCl，pH7.7）将目标蛋白洗脱。取 50 μL 洗脱液与 50 μL 2×上样缓冲液混合，以分析蛋白纯度。

3.2.10 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

将 5 μL 样品（按 3.2.9 制备）在 12%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳，80 V 浓缩 25 min，再 150 V 分离 60~80 min。用考马斯亮蓝染色和醋酸-乙醇溶液脱色，在凝胶成像系统上分析蛋白分布与浓度。

3.2.11 用 Peterson 法测定蛋白质浓度

采用孙雪奇等人测定视明注射液中微量多肽的含量的方法^[4]。

3.2.12 酶联免疫吸附法 (ELISA)

25 μL 0.33 μg/mL 的 AFB1-BSA 平铺于酶标板孔底（Costar 2592），在 37°C 包被 2 h，用 PBS 洗涤 2 次后，用 2%的 BSA 溶液封闭酶标板，37°C 2 h，再用 PBS 洗涤 2 次。将待测样液 50 μL 与 2% BSA 溶液一起加入酶标板，37°C 温浴 1h，用含有 0.1% Tween 20 的 PBS（PBST）洗板 5 次，加入 1:5000 稀释于 2%的 BSA 的 Protein A-HRP 100 μL，再在 37°C 温浴 1 h，用 PBST 洗板 5 次。加入含 H₂O₂（0.006%）和 TMB（100 μg/mL）的醋酸钠缓冲溶液（pH5.5），室温下反应 15 min 后，用 50 μL 1 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应，在酶标仪上读取 OD₄₅₀ 和 OD₆₅₀，ELISA 的信号值为 OD₄₅₀-OD₆₅₀。

在竞争 ELISA 中，50 μL 纯化后的抗体，100 μL，2%的 BSA 和不同浓度的黄曲霉毒素 B1 至黄曲霉毒素 B1 的终浓度为 0-2 ng/mL，混合，37°C 温浴 1 h，取 100 μL 混合液加入上述包被并封闭好的 96 孔板，ELISA 剩余过程如上所述。

3.3 实验结果与讨论

3.3.1 用不同的载体表达 scFv-H4 的结果

scFv-H4 中有 4 个半胱氨酸。重链部分含有 2 个半胱氨酸，分别位于可变区的第一框架区和第三框架区，形成连接上下两个反平行的β-片层的二硫键，而轻链部分也含有 2 个半胱氨酸，分别位于可变区的第一框架区和第三框架区，也形成二硫键以连接上下两个反平行的β-片层。这两个保守的二硫键的形成对维持 scFv-H4 的正确构象并保持其生物活性具有重要意义。另外经模型 Wilkinson- Harrison 模型预测，当 scFv-H4 在大肠杆菌中过

量表达时, scFv-H4有高达96.5%的可能性以不溶的状态聚集, 形成包涵体^[5]。重组蛋白在细菌细胞质中的大量表达会导致蛋白来不及正确折叠, 形成不可溶的包涵体, 此形式的蛋白一般都是没有活性的。为了便于以后的研究, 我们希望scFv-H4能以有生物活性的形式表达。

如何促进抗体片段正确折叠是在 *E.coli* 表达有生物活性的抗体片段的关键。*E.coli* BL21 (DE3) 的细胞质是还原性的, 不利于半胱氨酸的巯基氧化为二硫键^[5], 所以要使scFv-H4 形成正确的二硫键有两种策略: 一是将 scFv-H4 转运到周质中, 周质中的氧化性环境有利于二硫键的形成; 二是让 scFv-H4 和能够增加蛋白溶解性的标签融合, 这些融合标签是高度可溶的多肽, 可以增加目标蛋白的溶解性, 在氧化性细胞质中还可以促进二硫键的形成^[6, 7]。

我们采用了四种pET载体 (pET20b, pET22b, pET28a, pET32a) 来表达scFv-H4。这四种载体有着诸多的不同, 比如启动子, 筛选标记和信号肽等(表3-1)。pET20b载体上的多克隆位点的N端有一个pelB信号肽序列, 用于引导目标蛋白穿过细胞内膜, 分泌到周质空间, 启动子为T7。pET22b的多克隆位点的N端也有一个pelB信号肽序列, 但是其启动子为T7lac, 比T7启动子能更严谨地控制目标蛋白的表达, 降低目标蛋白的本底表达。pET28a载体不含信号肽, 所表达的产物主要在细胞质中积累。pET32a在多克隆位点的N端有一个109个氨基酸残基的硫氧还原蛋白结构, 能够增加蛋白的溶解性, 也可以在E.coli Origami(DE3)这样的组合可以用来促进含有二硫键的蛋白的正确折叠^[8, 9]。

表3-1 表达scFv-H4所采用的pET载体

Tab.3-1 the vectors used the expression of scFv-H4

	抗性	启动子	信号肽	融合标签
pET20b	amp	T7	pelB	His
pET22b	amp	T7lac	pelB	His
pET28a	kana	T7lac	无	His
pET32a	amp	T7lac	无	His, Trx

根据scFv-H4的氨基酸序列估算scFv-H4的大小为29 KDa, 加上信号肽等载体上的元件, 最后的蛋白大小约为31 KDa左右, 而在图3-1A中, 纯化后的scFv-H4约为31 KDa左右。比较含pET20b/H4和pET22b/H4的*E.coli* BL21 (DE3) 的TCP后, 发现未诱导的TCP明显多于诱导后的TCP, 这与图3-1B中的菌体生物量在未诱导的情况下也明显高于诱导条件下的现象一致; 在诱导后可以发现在31 KDa处有明显条带增强现象, 该条带应该是诱导产生的scFv-H4, 图3-1B中的ELISA信号能反映scFv-H4的生物活性, 也可以发现诱导后菌体破碎液中ELISA信号大大高于未诱导的菌体破碎液。而在用pET28a表达scFv-H4的试验中, 菌体的生物量、TCP和ELISA信号无论诱导与否差别都不大, 说明pET28a不合适作为scFv-H4的表达载体。在采用pET32a作为载体的试验中, scFv-H4是与硫氧还原蛋白形成融合蛋白表达的, 大小约为44 KDa。比较*E.coli* BL21 (DE3) /pET32a/H4在诱导和非诱导情况下的TCP的差别可以发现, 诱导后的TCP比未诱导的情况下明显减少, 这一点也可以通过检验培养物的生物量来确认 (图3-1B); 而在IPTG的诱导下, 44 KDa附近有明显的条带产生, 这就是融合蛋白。但图3-1B中显示诱导后*E.coli* BL21 (DE3) /pET32a/H4菌体破碎液没有生物活性, 该融合蛋白可能是包涵体。

大肠杆菌的细胞质中存在硫氧还原蛋白还原酶 (*trxB*) 和谷胱甘肽还原酶 (*gor*), 保持了细胞质环境的还原性, 所以 scFv-H4 中的半胱氨酸以巯基的形式存在, 不利于 scFv-H4 中重链可变区和轻链可变区中二硫键的形成, 可能导致 scFv-H4 不能正确折叠。我们将 pET32a/H4 转入 *E.coli* Origami (DE3) 中, *E.coli* Origami (DE3) 是 *trxB* 和 *gor* 突变体, 氧化性的细胞质会增强二硫键的形成^[5, 10, 11]。然而在 *E.coli* Origami (DE3) 中, pET32a 表达的 scFv-H4 也没有生物活性。在图 3-2 中, *E.coli* Origami (DE3) 经过诱导后也表达了大量的 scFv-H4-Trx 融合蛋白 (第 1, 2 道), 而这些融合蛋白绝大多数是以包涵体的形式存在 (第 3, 4 道), ELISA 试验没有检测到明显的生物活性。由此可见, 细胞的氧化还原势不是唯一决定 scFv-H4 正确折叠的因素, 其他的因素比如分子伴侣可能也决定着 scFv-H4 的正确折叠^[12-14]。

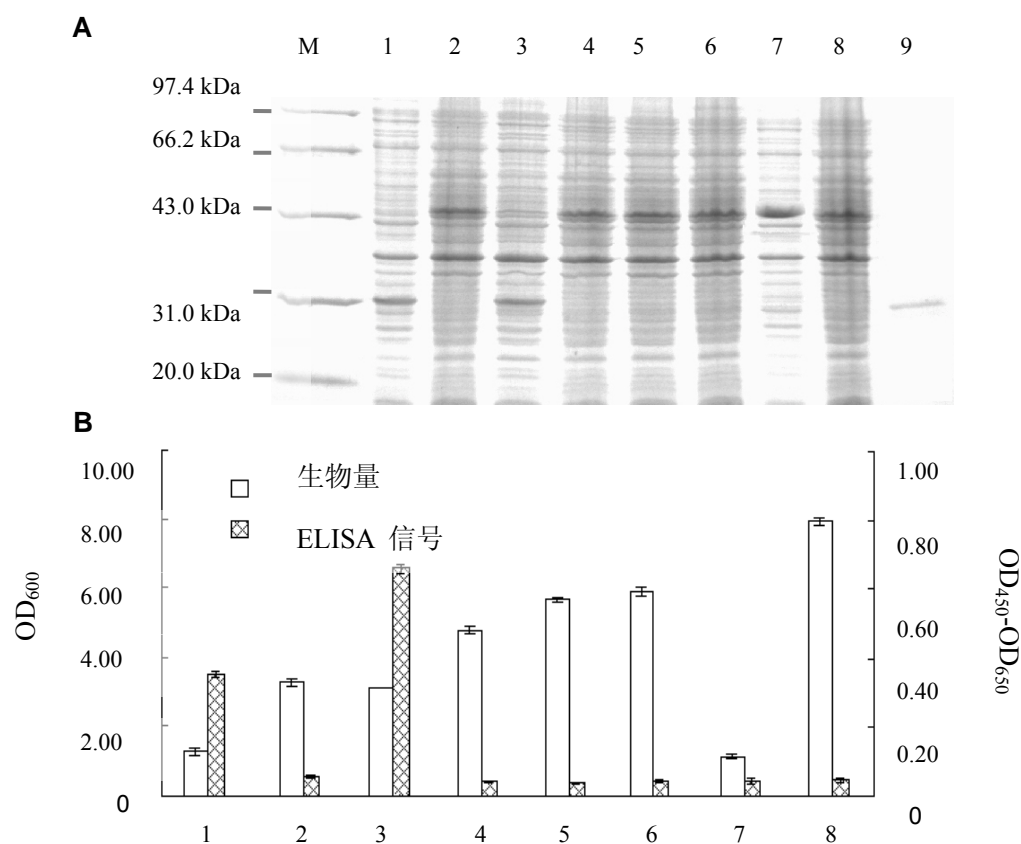


图3-1 用不同的pET载体表达scFv-H4。A: *E. coli* BL (DE3) 的细胞总蛋白电泳图; B: 诱导结束时, *E. coli* BL (DE3) 的生物量和细胞破碎液的生物活性。M: 标准蛋白质; 1: 诱导条件下的pET20b/H4; 2: 未诱导条件下的pET20b/H4; 3: 诱导条件下的pET22b/H4; 4: 未诱导条件下的pET22b/H4; 5: 诱导条件下的pET28a/H4; 6: 未诱导条件下的pET28a/H4; 7: 诱导条件下的pET32a/H4; 8: 未诱导条件下的pET32a/H4; 9: 纯化后的scFv-H4。

Fig. 3-1, The expression of scFv in *E. coli* BL21(DE3) containing different pET vectors. M: protein maker; 1: pET20b/H4 under induction; 2: pET20b/H4 under non-induction; 3: pET22b/H4 under induction; 4: pET22b/H4 under non-induction; 5: pET28a/H4 under induction; 6: pET28a/H4 under non-induction; 7: pET32a/H4 under induction; 8: pET32a/H4 under non-induction; 9: the purified scFv.

3.3.2 严谨的启动子有利于 scFv-H4 的表达的影响

从 3.3.2 可以看出在 *E.coli* BL21(DE3) 宿主中, 具有信号肽的载体 pET20b 和 pET22b 所表达的 scFv-H4 都是有生物活性的。但是 *E.coli* BL21 (DE3) /pET20b/H4 的菌体破碎液中的生物活性没有 *E.coli* BL21 (DE3) /pET22b/H4 的菌体破碎液的高。pET20b 和

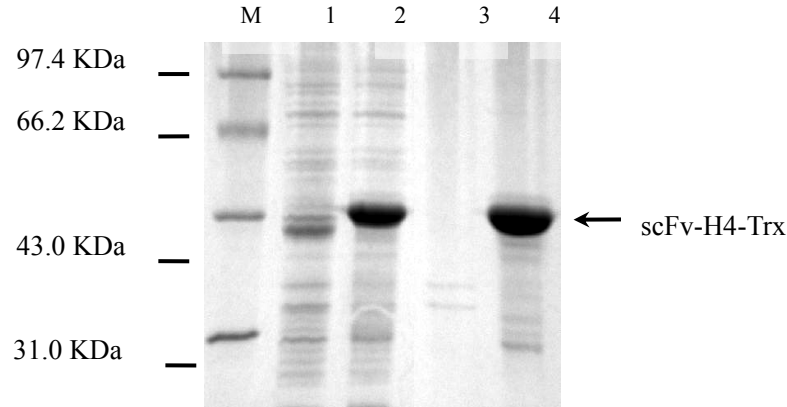


图 3-2 *E. coli* Origami (DE3) /pET32a/H4 的 TCP 和包涵体。M: 标准蛋白; 1: 未诱导条件下的 TCP; 2: 诱导条件下的 TCP; 3: 未诱导条件下的包涵体; 4: 诱导条件下的包涵体。

Fig. 3-2 the TCP profile and inclusion body of scFv-H4 expressed with pET32a in *E. coli* Origami (DE3). M: marker protein; 1: TCP under non-induction; 2: TCP under induction; 3: inclusion body under non-induction; 4: inclusion body under induction.

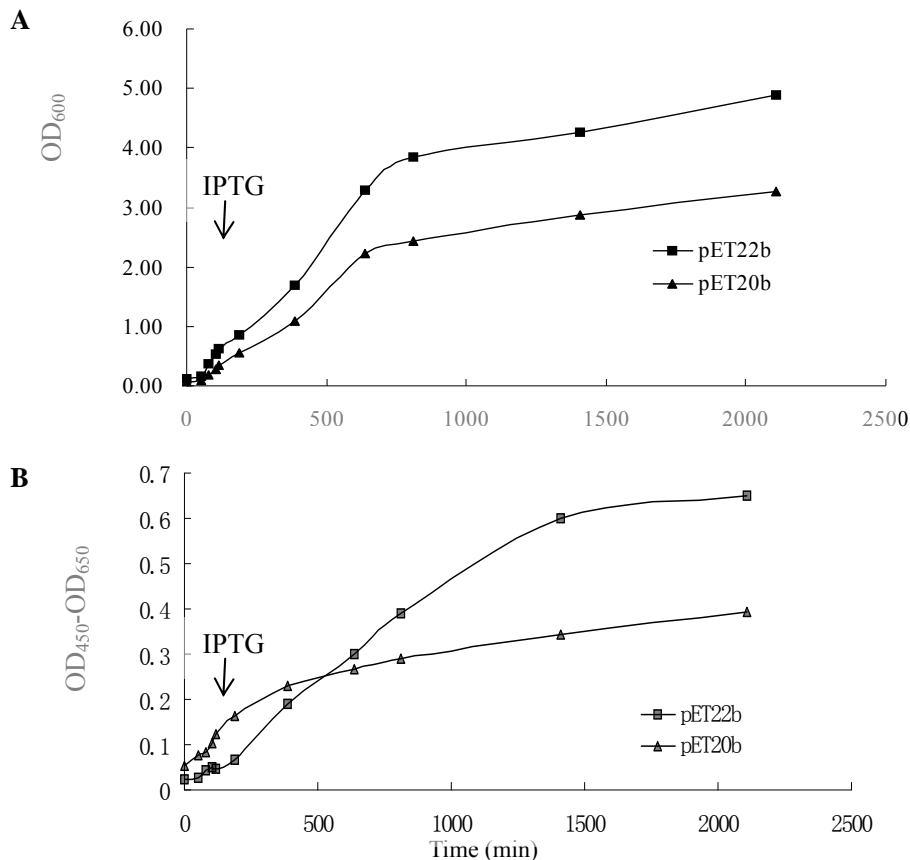


图 3-3 含有 pET20b 和 pET22b 的 *E. coli* BL21 (DE3) 在表达 scFv-H4 过程中的生长曲线 (A) 和期间具有生物活性的 scFv-H4 的表达情况 (B)。

Fig. 3-3 the growth curves of *E. coli* BL21 (DE3) /pET20b/H4 and *E. coli* BL21 (DE3) /pET22b/H4 (A) and the functional expression of scFv-H4 with these two constructs (B).

pET22b 载体的主要区别在于启动子, pET22b 由 T7 $_{lac}$ 启动子启动, 比 pET20b 的 T7 启动子更加严格。从 *E.coli* BL21 (DE3) /pET20b/H4 和 *E.coli* BL21 (DE3) /pET22b/H4 培养的生长曲线 (图 3-3A) 和期间 scFv-H4 的生物活性变化情况中 (图 3-3B) 可以发现它们之间的区别。在尚未添加 IPTG 的时候, *E.coli* BL21 (DE3) /pET20b/H4 菌体破碎液已经能检测到一定水平的 scFv-H4 的生物活性, *E.coli* BL21 (DE3) /pET22b/H4 菌体破碎液能检测到明显的 scFv-H4 生物活性。添加了 IPTG 后, *E.coli* BL21 (DE3) /pET20b/H4 表达的 scFv-H4 量有所上升, 但上升的速度较慢, 而 *E.coli* BL21 (DE3) /pET22b/H4 在 IPTG 的诱导下 scFv-H4 的表达量快速上升。

T7 启动子由 *E.coli* BL21 (DE3) 基因组上的 T7 RNA 聚合酶启动, 而 T7 RNA 聚合酶由 *lacUV5* 启动子控制表达。在没有 IPTG 的情况下, 也会有少量 T7 RNA 聚合酶表达, 外源蛋白就会有本底表达。IPTG 一般是在对数中期添加以解除对 *lacUV5* 的抑制, 目的基因开始大量表达。在此之前, 足够的生物量是大量表达目的蛋白的基础^[15]。用 pET20b 表达 scFv-H4 时, 由于 T7 启动子不严谨, 导致 *E.coli* BL (DE3) /pET20/H4 有较高的本底表达 (图 3-3B), 此时宿主需要耗费能量与资源去表达 scFv-H4, 这对宿主来说是一种代谢负担, 会或多或少影响到宿主的正常生理功能, 影响了菌体的生长, 此后的菌体量一直较低, 从而影响了 scFv-H4 总的表达水平。而 pET22b 能严谨地控制 scFv-H4 的表达, 在未添加 IPTG 时, scFv-H4 的活性表达量很低, 菌体生物量在对数期以及后面的稳定期一直都处于比较高的水平; 当添加 IPTG 后, 有生物活性的 scFv-H4 迅速表达, 菌体破碎液中 scFv-H4 的生物活性明显高于采用 pET20b 的情况。

3.3.3 *E. coli* BL21 (DE3) /pET22b/H4 表达的 scFv-H4 的分布

pET22b 带有信号肽, 能引导目标蛋白穿过细胞内膜, 分泌于细胞周质中^[16]。我们通过培养物上清, 细胞周质, 细胞质可溶部分和细胞质不可溶部分的电泳图来分析 scFv-H4 的分布。从图 3-4 中可以发现, 由于外膜的限制, 很少有蛋白质能表达到培养基上清中^[17], 在细胞周质中的蛋白质种类较少, 但是有大量可溶性的 scFv-H4, 而在细胞质可溶部分仅有很少量的 scFv-H4, 细胞质中的 scFv-H4 基本上是以不溶性的包涵体形式存在。

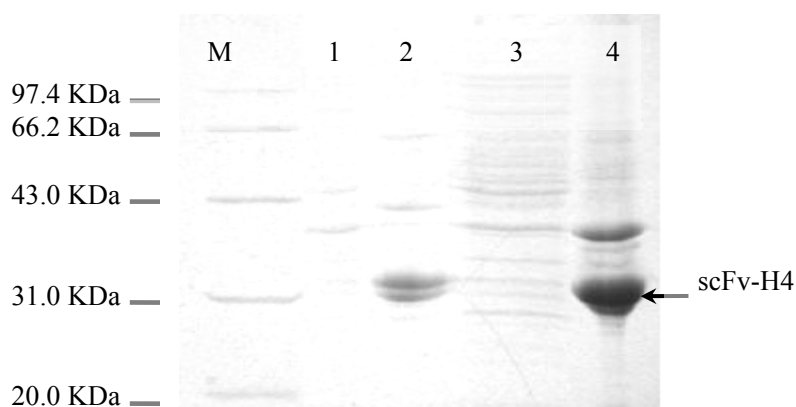


图 3-4 *E. coli* BL21 (DE3) /pET22b/H4 培养物各部分的分布情况。第1道为标准蛋白质; 第2道为培养基上清; 第3道为周质; 第4道为可溶细胞质; 第5道为TCP。

Fig. 3-4 Distribution of scFv-H4 in the culture.

3.3.4 *E. coli* BL21(DE3)/pEt22b/H4 的表达条件的优化

在用 *E. coli* BL21(DE3)/pET22b/H4 诱导表达 scFv-H4 的过程中, 正确折叠的、具有生物活性的 scFv-H4 用 ELISA 的信号来表征 (表 3-2); 而 scFv-H4 的量用电泳图来表征 (图 3-5 和图 3-6)。在诱导温度为 20°C, IPTG 浓度分别为 0 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L 的条件下, IPTG 添加与否对 scFv-H4 的表达影响很大, 但是 IPTG 的添加量对 scFv-H4 的表达影响并不显著, 在所讨论的 IPTG 浓度, 无论是具有生物活性的 scFv-H4 还是 scFv-H4 包涵体没有明显差别 (图 3-5), 而且菌体的生物量也相当 (表 3-2)。

诱导温度对 scFv-H4 的影响更加明显。在 16°C 诱导时, 菌生长缓慢; 诱导结束时, 生物量也明显低于其他诱导温度, 包涵体也比较少。当温度上升到 20°C 时, 具有生物活性的 scFv-H4 的量有一定的增加 (表 3-2), 但是同样伴随着大量包涵体出现 (图 3-6)^[15]。在较高的诱导温度, 宿主的新陈代谢增加, 外源蛋白的合成速度也加快了, 大量蛋白来不及转运和正确折叠, 只能以包涵体的形式存在。当温度进一步升高时, 包涵体反而有所减少, 而具有生物活性的 scFv-H4 的量也有所下降。这可能是因为在高温下, 由于疏水相互作用, 蛋白质分子容易发生聚集; 诱导温度较高时, 部分热激蛋白酶也产生了活性, 水解了一部分蛋白; 另外在较高的温度条件下, 大肠杆菌中分子伴侣的数量和活性都有所减少^[13]。这也许是在低温诱导时, 可溶的、具有生物活性的 scFv-H4 更多一些的原因。

表 3-2, 在不同的诱导条件下, *E. coli* BL21(DE3)的生长情况与具有生物活性的 scFv-H4 表达量 (数据为两次平行实验的均值加标准差)

Tab. 3-2 The functional scFv-H4 production by *E. coli* BL21(DE3) induced at different conditions.

编号	温度 (°C)	IPTG (mmol/L)	生物量 (OD ₆₀₀)	ELISA 信号 (OD ₄₅₀ -OD ₆₅₀)
1	20	0	5.58 ± 0.15	0.063 ± 0.013
2	20	0.5	2.72 ± 0.22	0.887 ± 0.090
3	20	1.0	2.50 ± 0.16	0.810 ± 0.050
4	20	2.0	2.76 ± 0.28	0.793 ± 0.104
5	16	1.0	1.38 ± 0.02	0.558 ± 0.108
6	25	1.0	2.48 ± 0.32	0.746 ± 0.007
7	30	1.0	2.54 ± 0.16	0.546 ± 0.013

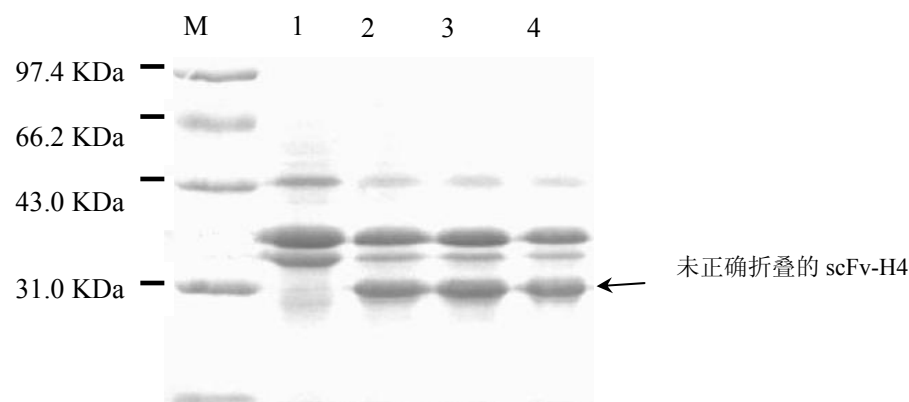


图3-5 在20℃, 不同浓度的IPTG诱导下, scFv-H4在*E. coli* BL21 (DE3) 形成的包涵体。

Fig. 3-5 The inclusion body formed in *E. coli* BL21(DE3) induced at various IPTG concentrations. M. protein. Marker; 1. 0 mmol/L IPTG; 2. 0.5 mmol/L IPTG; 3. 1.0 mmol/L IPTG; 4. 2.0 mmol/L IPTG (induction temperature: 20℃).

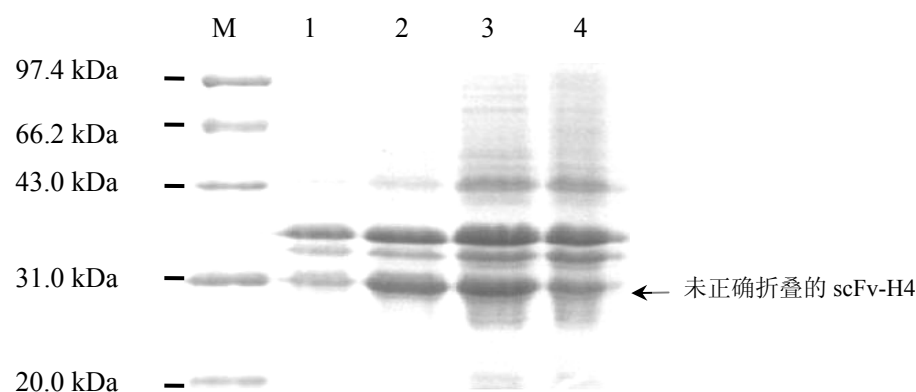


图3-6 在不同的温度下, scFv-H4在*E. coli* BL21 (DE3) 中形成的包涵体 (IPTG: 1.0 mmol/L)。

Fig 3-6 The inclusion body formed in *E. coli* BL (DE3) induced at different temperature.

M. protein marker; 1. 16℃; 2. 20℃; 3. 25℃; 4. 30℃ (IPTG: 1.0 mmol/L).

诱导后的菌体超声破壁后, 可用镍亲和柱将其中的可溶 scFv-H4 纯化出来。固定在凝胶柱上的 Ni^{2+} 能与 scFv-H4 中所含的多聚组氨酸标签 (His tag) 特异性结合。由 *E. coli* HB2151/pIT2/H4 表达的 scFv-H4 不易纯化 (图 3-7)。由于筛选载体 pIT2 上 scFv 与 pIII 蛋白之间由一个琥珀抑制子 TAG 分隔 (图 1-3), 在大肠杆菌中, 所有的琥珀抑制子都具有反密码子, 可能通读琥珀抑制子, 并将其翻译成为丝氨酸、谷氨酸或酪氨酸^[18], 这样有一部分 scFv 可能以 scFv-pIII 融合蛋白的形式存在。scFv-pIII 融合蛋白也能与 Ni^{2+} 结合, 所以继续留存在洗脱液中。而将 scFv 基因转入 pET22b 后, 避免了融合蛋白的出现。所以由 pET22b/H4 表达的 scFv-H4 更容易纯化。

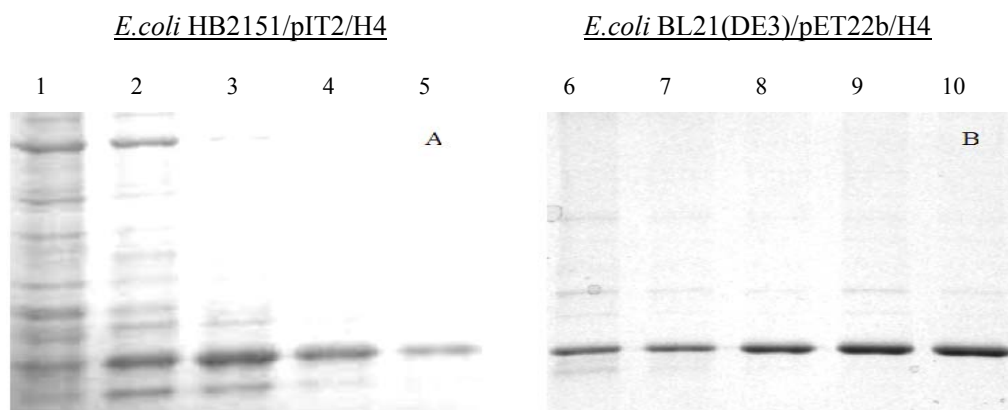


图3-7, 用含有不同浓度的咪唑的Tris缓冲液梯度洗脱吸附在Ni亲和柱上的scFv-H4。咪唑浓度分别为第1, 6道: 100 mmol/L; 第2, 7道: 110 mmol/L; 第3, 8道: 120 mmol/L; 第4, 9道: 130 mmol/L和第5, 10道: 200 mmol/L。A图为 *E. coli* HB2151/pIT2/H4中scFv-H4梯度洗脱的结果; B为 *E. coli* BL21/pET22b/H4梯度洗脱的结果。

Fig 3-7, Gradient elution of scFv from Ni chelating column with Tris buffer containing imidazole in various concentration. Lane 1 and 6: 100 mmol/L ; lane 2 and 7: 110 mmol/L; lane 3 and 8: 120 mmol/L, lane 4 and 9: 130 mmol/L, lane 5 and 10: 200 mmol/L).

经测定用 *E. coli* BL21(DE3)/pET22b 表达 scFv-H4 可获得的可溶的 scFv-H4 是 36 mg/L 培养基^[19]。Shi 等人用毕赤酵母表达的某 scFv 在最优化的条件下, 经 7 天的发酵后, 获得的 scFv 的表达量为 25 mg/L 培养基^[20]; Wong 等人用枯草芽孢杆菌 WB600 表达某 scFv, 经优化后表达量为 5 mg/L 培养基^[21], 用改进后的基因工程菌 WB800HM 最高表达量可达 10~15 mg/L 培养基^[22]。Yang 等人向 *E. coli* 的培养基加入甘氨酸和曲拉通 X100 使某 scFv 的表达量提高了 170 倍, 达到了 50 mg/L 培养基^[23], 但是这样的方法并不适用我们的研究 (数据未给出)。

4 结论

人源单链抗体由两个免疫球蛋白超家族结构域构成, Wilkinson- Harrison 模型预测: 当抗黄曲霉毒素 B₁ 的单链抗体 scFv-H4 在大肠杆菌中大量表达的时候, 有 96.5% 的可能会形成包涵体。为得到可溶的、有生物活性的 scFv-H4, 我们采用了 4 个不同的 pET 载体 pET20b, pET22b, pET28a 和 pET32a 来表达 scFv-H4。

(1) 试验结果证明 pET20b 和 pET22b 能用来表达有生物活性的 scFv-H4, 而 pET22b 的 T7lac 启动子能严谨地控制 scFv-H4 的本底表达, 从而避免 scFv-H4 影响对数前期的细胞生长, 有利于诱导后 scFv-H4 的表达。pET22b 表达的 scFv-H4 分为两部分: 一部分为分泌到周质中的有生物活性的可溶蛋白和在细胞质中的包涵体。而采用 pET20b 作为表达载体时, scFv-H4 的本底表达比较高, 影响了细菌本身的生长和新陈代谢。在较低的诱导温度 (20°C) 能较多的获得具有生物活性的蛋白。而且用 *E. coli* BL21(DE3)/pET22b/H4 表达的 scFv-H4 比较容易用镍柱纯化。

(2) pET28a 不能用来表达 scFv-H4, 试验结果显示没有明显的 scFv-H4 蛋白产生。带有 Trx 标签的载体 pET32a 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中能表达大量的 Trx-scFv-H4 融合蛋

白,但是都没有生物活性,把宿主换为细胞质呈氧化性的 *E.coli* Origami (DE3) 后,情况并没有特到改善,所以 scFv-H4 的正确折叠可能不仅局限于分子中二硫键的因素,还需要考虑其他影响因素。

参考文献

1. Lim K P, Li H, Nathan S. Expression and purification of a recombinant scFv towards the exotoxin of the pathogen, *Burkholderia pseudomallei*. J Microbiol, 2004, 42(2):126-132.
2. Miller K D, Weaver-Feldhaus J, Gray S A. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2005, 42(2):255-267.
3. Smialowski P, Martin-Galiano A J, Mikolajka A. Protein solubility: sequence based prediction and experimental verification. Bioinformatics, 2007, 23(19):2536-2542.
4. E.哈洛等编著. 抗体技术实验指南——分子克隆实验指南系列[M]:沈关心等译. 北京:科学出版, 2006:141-147.
5. Sorensen H P, Mortensen K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Microb Cell Fact, 2005,4(1):1-7.
6. Sorensen H P, Mortensen K K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J Biotechnol, 2005, 115(2):113-128.
7. Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. Cancer Metastasis Rev, 2005, 24(4):501-519.
8. Sun Y, Wu W, Zhang Y. Intestinal trefoil factor produced in *Escherichia coli* promotes the healing of rat burn-induced acute gastric mucosal lesions. J Trauma, 2008, 65(1):163-169.
9. Ming-Kai X, Cheng-Gang Z. Gene expression and function study of fusion immunotoxin anti-Her-2-scFv-SEC2 in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 70(1):78-84.
10. Heo M A, Kim S H, Kim S Y. Functional expression of single-chain variable fragment antibody against c-Met in the cytoplasm of *Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2006, 47(1):203-209.
11. Proba K, Ge L, Pluckthun A. Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB). Gne, 1995, 159(2):203-207.
12. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nat Biotechnol, 2004, 22(11):1399-1408.
13. Jurado P, Ritz D, Beckwith J. Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. J Mol Biol, 2002, 320(1):1-10.

14. Sandee D, Tungpradabkul S, Kurokawa Y. Combination of Dsb coexpression and an addition of sorbitol markedly enhanced soluble expression of single-chain Fv in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 91(4):418-424.
15. Scott N, Reynolds C B, Wright M. J. Single-chain Fv phage display propensity exhibits strong positive correlation with overall expression levels. *BMC Biotechnol*, 2008, 8:97-105.
16. Harvey B R, Georgiou G, Hayhurst A. Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from *Escherichia coli*-expressed libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25):9193-9198.
17. Berks B C, Palmer T, Sargent F. The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv Microb Physiol*, 2003, 47:187-254.
18. 本杰明·卢因. 基因[M]:第八版. 余龙等译. 北京:科学出版社,2005.
19. 孙雪奇, 刘仲义, 陈奇英. Peterson 法测定视明注射液中微量多肽的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1):104-106.
20. Shi X, Karkut T, Chamankhah M. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2003, 28(2):321-330.
21. Wu X C, Ng S C, Near R I. Efficient production of a functional single-chain antidigoxin antibody via an engineered *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Biotechnology*, 1993, 11(1):71-76.
22. Wu S C, Yeung J C, Duan Y. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(7):3261-3269.
23. Yang J, Moyana T, MacKenzie S. One hundred seventy-fold increase in excretion of an FV fragment-tumor necrosis factor alpha fusion protein (sFV/TNF-alpha) from *Escherichia coli* caused by the synergistic effects of glycine and triton X-100. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(8):2869-2874.

第四章 scFv-H4的同源建模与分子改造

4.1 引言

人们对相似蛋白的空间结构研究发现,蛋白质的三维结构比蛋白质的一级序列更加保守,而氨基酸序列又比 DNA 序列更加保守^[1]。同源蛋白质结构预测的前提就是通过对序列和功能分析,找出未知蛋白与已知蛋白结构间的同源性。通常预测的保守部分的预测是可靠的,用多个参考结构的效果要比一个好^[2]。预测的结构能为分子间相互作用提供信息。蛋白质结构预测通常包括:结构保守性分析,序列对比,主链和侧链预测以及结构模型的优化和后处理^[3]。通过同源建模的方法,预测了 scFv-H4 的三维结构,为该单链抗体的稳定性改造和亲和力成熟提供了有价值的参考信息。采用 CDR 步移法对一些序列中多样性的热点位置逐一突变,并通过亲和筛选找到亲和力有变化的克隆^[4],确定该点是否对抗原-抗体结合有贡献。单链抗体的稳定性是抗体片段应用的瓶颈^[5],提高抗体稳定性的方法很多^[6],我们采用了有效的方法—引入结构域间二硫键增加 scFv-H4 的稳定性^[7]。架设结构域间二硫键的位点对不同的抗体会不同,根据我们构建的模型我们分析了不同位点间架设结构域间二硫键的对亲和力的影响,并验证了结构域间二硫键 H44-L100 能增加抗体的稳定性,而不影响亲和力。

4.2 材料与方法

4.2.1 菌株、载体与培养基

同 2.2.1 和 3.2.1

4.2.2 试剂与仪器

Dynabeads[®] M-270 亲和素包被磁珠购于 Invitrogen 公司;生物素标记试剂盒购于 Dojindo Molecular Technologies, Inc 公司。荧光分光光度计是 Hitachi 公司的 650-60 型,体积排阻色谱是 GE Healthcare 的 AKTA 色谱仪,色谱柱为 Superdex 75。其余试剂及设备同 2.2.3 和 3.2.2。

4.2.3 scFv-H4 的蛋白序列比对

将 scFv-H4 的氨基酸序列提交美国国立生物信息中心网站 (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST^[8]。

4.2.4 scFv-H4 的同源建模

所有同源抗体的晶体结构都从蛋白质数据库 (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) 获得。将 scFv-H4 的序列上传到 <http://antibody.bath.ac.uk/> 服务器,用 WAM 同源建模软件对 scFv-H4 的各部分结构分别进行 scFv-H4 的主链构象的预测^[9, 10]。侧链也以同源蛋白的侧链为基础构建,并用“死路消除法”和 Gromos96 算法寻找到能量最低的状态。框架区 FR 和有标准结构 (canonical structure) 的 CDR 采用 PDB 中序列同源性最高的蛋白结构。侧链的构象采用 Congen 进行

迭代算法,以获得球蛋白的最低能量状态。对于没有标准结构的CDR H3 则在PDB中进行结构和序列双重搜索,并用Congen算法优化到能量最低的状态。将上述获得的结构单元拼接好以后,用力场进行能量优化^[11]。最后选取 5 个能量最低的构象与模板结构比较张力角,与模板结构张力角最接近的就是最后的结果。

4.2.5 scFv-H4 模型的评估

scFv-H4 的模型主链构象的正确性可以用二面角来评估。将scFv-H4 的模型被提交到 the Ramachandran Plot Serve (<http://swift.cmbi.kun.nl/swift/servers/modrama-submit.html>), 所分析的数据包括所有氨基酸残基,以及甘氨酸, Pre-Pro和脯氨酸的二面角。由于主链上C α 与其他原子之间均形成单键,因此两相邻的肽键平面可以作相对旋转,而二面角之间存在张力,会影响主链的构象。其中, C α -N单键的旋转角度用 Φ 表示, C α -C单键的旋转角度用 Ψ 表示,这两个角度决定相邻肽键平面的空间位置,称为二面角^[12],用 Φ 作横坐标, Ψ 做纵坐标,作出 Φ - Ψ 图此构象图通常称为Ramachandran图(简称拉氏图),可根据此图确定哪些成对二面角(Φ , Ψ)所决定的相邻二肽单位的构象是允许的,哪些是不允许的。

除了拉氏图外, scFv-H4 的模型还采用 VADAR 服务器(<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar/index.html?>)评估了相对可及面积(Fractional Accessible Surface Areas), 相对体积(Fractional Volume), 空间/填充质量指数(Stereo/Packing Quality Index)和三维轮廓质量指数(3D Profile Quality Index)。

4.2.6 scFv-H4 与 AFB₁ 的分子对接

分子对接是将 scFv-H4 的模型和 AFB₁ 的结构提交到 <http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>,用 PatchDock[®] Server Dockings 服务器来进行^[13]。Clustering RMSD 为 4.0, 结合模式采用“抗体-抗原模式”。在经 PatchDock 进行硬对接(rigid docking), 然后用 FireDock 对 PatchDock 的对接的方案进行优化^[14]。他们之间的相互作用由 Ligplot 软件(<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>)来分析^[15]。

4.2.7 用生物素标记 AFB₁-BSA

生物素的标记 AFB₁-BSA 是按照试剂盒提供的方法进行。简言之,将 100 μ L WS 缓冲液和 100 μ L, 1 mg/mL 的 AFB₁-BSA 加入到过滤管中,在 8000 - 10000 \times g 离心 10 min。将 10 μ L 二甲亚砜加入到 NH₂-生物素中,用移液器反复吹打溶解二甲亚砜。将 100 μ L 反应缓冲液加入过滤管中,加入 8 μ L 的 NH₂-生物素溶液到离心管中,用移液器反复吹打溶解,37 $^{\circ}$ C 温浴 10 min。加入 100 μ L WS 缓冲液,8000 - 10000 \times g 离心并弃去滤液。加入 200 μ L WS 缓冲液,8000 - 10000 \times g 离心并弃去滤液,并重复洗涤一次。加入 200 μ L WS 缓冲液,并用移液器混合 10 ~ 15 次,将溶液中的生物素标记的 AFB₁-BSA (AFB₁-BSA-biotin) 转移到一个干净的 EP 管中,0 ~ 5 $^{\circ}$ C 存储。

将 200 mmol/L 的对羟基苯偶氮邻苯甲酸 4'-羟基苯偶氮-2-羧酸(PBS 溶解, pH7.4) 用和 0.5 g/L 的亲素混合,向 15 个酶标板孔每个加入 100 μ L。分别将 50 μ L 的生物素

(12.5 $\mu\text{mol/L}$, 6.25 $\mu\text{mol/L}$, 3.13 $\mu\text{mol/L}$, and 1.56 $\mu\text{mol/L}$)加入 50 μL 梯度稀释的 AFB₁-BSA-biotin。读取 OD₄₀₅ 和 OD₄₉₂，以生物素的标准曲线确定样品中的生物素浓度，读取 OD₂₈₀ 算得蛋白质浓度。计算得到生物素的结合率约为 6.7。

4.2.8 液相亲和力筛选

亲和力筛选参考 Winter 等人的方法^[16]，并稍作修改，简述如下。将待筛选的噬菌体 100 μL (约 10^{12} PFU) 与 100 nmol/L AFB₁-BSA-biotin 抗原 (以后每轮筛选用的 AFB₁-BSA-biotin 的浓度都下降 10 倍)，37°C 震荡温浴 2 h。加入 20 μL 亲和素包被的磁珠，温和震荡 30 min，然后在磁力架上静置 20 min。用 TBS 漂洗磁珠 20 次；然后在 37°C，1 ng/mL 的 AFB₁ 的温和震荡磁珠，竞争洗脱结合在 AFB₁-BSA-biotin 的噬菌体抗体。11600 \times g 离心后，将上清移入一新的 EP 管中，用胰蛋白酶 (1 mg/mL) 处理 10 min。其余扩增的步骤同第二章所述。

4.2.9 定点饱和突变目的基因

H4 突变是通过将突变位点设计在引物上，然后用 PCR 引入 (原理如图 4-1)。

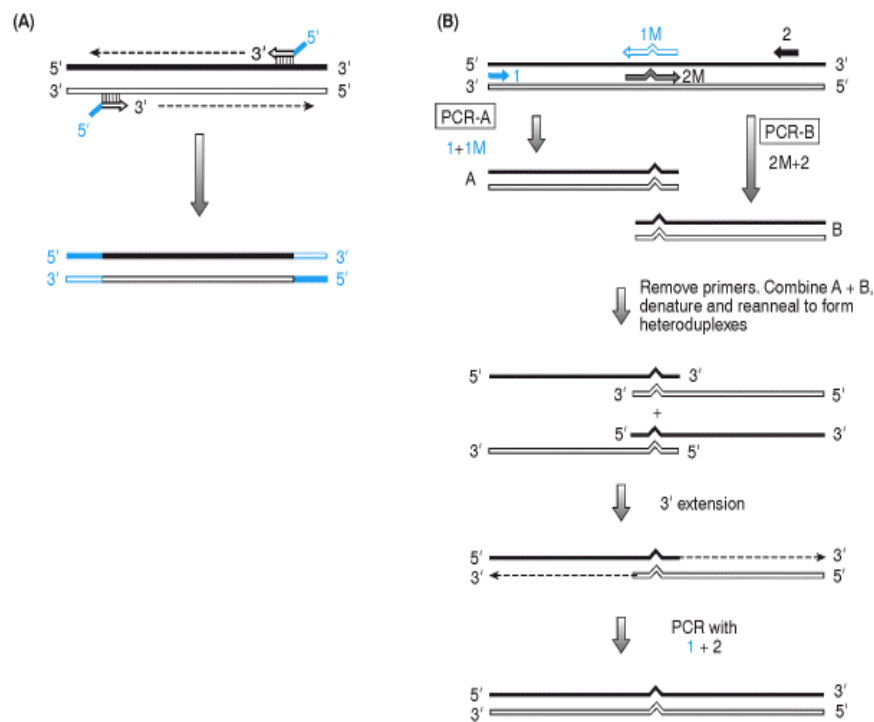


图 4-1 定点突变的原理。(A) 常规 PCR；(B) 通过 PCR 引入突变

Fig. 4-1 the mechanism of site-directed mutagenesis. (A) normal PCR; (B) mutation with PCR.

PCR 的条件如 2.2.12 所述。先用上游突变引物和 pHEN，下游突变引物和 LMB3 先进行 30 个 PCR 循环，然后用 1.2% 琼脂糖电泳分离纯化出上下游目标条带。PCR 体系为：超纯水 36.5 μL ，10 \times Thermopol PCR 缓冲液 5.0 μL ，dNTP (10 mmol/L) 2.0 μL ，Taq 酶 1.0 μL ，上游突变引物 2.0 μL ，下游突变引物 2.0 μL ，总体积 48.0 μL 。PCR 10 个循环，然后加入上下游引物 LMB3 和 pHEN 各 1.0 μL ，再 PCR 30 个循环。将 PCR 产

物经过琼脂糖电泳分离纯化后，目的基因和 pIT2 载体用限制性内切酶 *NcoI* 和 *NotI* 切 4 h（酶切方法如 3.2.5 所述，小牛肠磷酸酯酶处理）后回收。将目的基因与 pIT2 用 T4 连接酶在 16°C 连接 24 h。将连接产物转入 *E.coli* TG1，并在含有 amp 的 TYE 平板上生长过夜。噬菌体抗体的制备过程如 2.2.5 和 2.2.6 所述。

其中 L93、L94 位突变和 L100 位的突变位点直接设计在引物上，直接用 PCR 的方法就可以引入突变。

表 4-1 突变过程中所用的引物
Tab 4-1 primers used in the mutation experiments

引物名称	引物序列
L93, L94 back	ATGTGCGGCCGCCCCGTTTGATTTCACCTTGGTCCCTTGGCCGAACGTAGG AGGNNKNNKAATCTC
L92, L91 for	TACAACTGTCATCAGNNKNNKNNKNNKCCCTCTACG
L92, L91 back	CGTAGGAGGNNKNNKMNNMNNCTGATGACAGTTGTA
L53 for	TATCGTGCATCCNNKTTGCAAAGTGGG
L53 back	CCCACCTTTGCAAMNNGGATGCACGATA
L50 for	CTGATCTATCGTNNKTCCCATTGCAA
L50 back	TTGCAAATGGGAMNNACGATAGATCAG
H97, H98 for	GCCCCAGTAGTCAAAMNNMNNCTTATGTTTCACACA
H97, H98 back	TGTGTGAAACATAAGNNKNNKTTTGACTACTGGGGC
H95, H96 for	TATTACTGTGTGAAANNKNNKACGACTTTTGACTAC
H95, H96 back	GTAGTCAAAAGTCGTMNNMNNNTTTCACACAGTAATA
H58 for	GGTTAGGGGACANNKTACGCAGACTCC
H58 back	GGAGTCTGCGTAMNNTGTCCCCTAACC
H55, H56 for	ACGGGGGCGGGTNNKNNKACACGTTACGCA
H55, H56 for	TGCGTAACGTGTMNNMNNACCCGCCCCCGT
H53 for	TCTATTACGGGGNNKGGTTAGGGGACA
H53 back	TGTCCCCTAACCMNNCCCCGTAATAGA
H52, H52a for	GTCTCATCTATTNNKNNKGCGGGTTAGGGG
H52, H52a back	CCCCTAACCCGCMNNMNNNAATAGATGAGAC
H50 for	GAGTGGGTCTCANNKATTACGGGGGCG
L100Back	ATGTGCGGCCGCCCCGTTTGATTTCACCTTGGTCCCACAGCC
H44For	GCTCCAGGGAAGTGTCTGGAGTGGGTC
H44Back	GACCCACTCCAGACACTTCCCTGGAGC
H50 back	CGCCCCGTAATMNNNTGAGACCCACTC
LMB3	CAGGAA ACAGCTATGAC
pHEN	CTATGCGGCCCCATTCA

4. 2. 10 ELISA

同 3.2.12。

4. 2. 11 游离巯基的测定

70 μ L scFv-H4 和 dscFv-H4 溶液加入 1 mL 的新鲜配制的 NBST 试剂 (2-nitro-5-thiosulfobenzoate)。20 min 后测定 OD₄₁₂, NSTB 溶液作为空白^[17]。

4.2.12 排阻色谱测定蛋白质的聚集

1.3 mL scFv-H4 和 dscFv-H4 的样品都在 37°C 温浴了 20 h。1 mL 的上清液注射入排阻色谱。所有的测量都是在含有 0.005% Tween 20 PBS 中进行。单链抗体 (10 $\mu\text{mol/L}$) 的进样量为 1 mL，流速为 0.5 mL/min。

4.2.13 荧光光谱测定蛋白质的去折叠

在盐酸胍变性试验中，单链抗体（终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ ）与 8 mol/L 的盐酸胍（GdnHCl）按照不同的比例混合，一起在 25°C 温浴 20 h。然后在 25°C 用荧光分光光度计测定蛋白溶液的荧光光谱。激发光的波长为 280 nm，而发射光光谱记录范围为 300 nm 到 380 nm。50% 的蛋白变性时盐酸胍的浓度（GdnHCl₅₀）可以作为衡量蛋白稳定性的一个指标。

4.3 结果与讨论

4.3.1 scFv-H4 的一级结构分析

VH 和 VL 分别约由 110 个左右的氨基酸组成，将这两个结构域的氨基酸序列进行多序列比对。多序列比对应用来评估蛋白质的序列保守区，在抗体轻链和重链中某些区域的氨基酸残基变化较其他部位更大，如轻链第 24~34、50~56、89~97 位和重链第 31~35、50~65、95~102 位^[18, 19]。这些区域称为互补决定区（complementarity-determining region, CDR）。可变区中的非高变区的氨基酸组成与序列变化相对较少，这些氨基酸残基组成可变区稳定的立体结构，即框架结构或支架结构（framework region, FR），他们夹持这些 CDR，可变区的 3 个 CDR 分别被 FR1、FR2、FR3 和 FR4 隔开（图 4-2）。scFv-H4 的氨基酸序列如表 4-1 所示，VL 一共由 105 个氨基酸组成，属于人 κ 链第 I 亚群；而 VH 一共由 114 个氨基酸组成，属于人重链第 III 亚群。

依据 MacCallum 等人的方法定义出重链和轻链 CDR^[20]。将 scFv-H4 的轻、重链与其他序列已知的抗体的轻、重链氨基酸序列进行比对，发现 scFv-H4 的 CDR3 H3 较短。用 Kabat 编号法和 Chothia 编号法分别对 scFv-H4 的氨基酸残基进行了编号。Kabat 编号法是根据序列的可变性来编号的，是最常使用的编号方法^[18, 19]；Chothia 编号法是根据 CDR 的环状结构来编号的，主要是用来寻找抗体上的抗原结合位点^[21]。用这两种编号方法对 scFv-H4 的序列进行编号，结果发现在 FR H3 中有 3 个氨基酸的编号不一致，在 72 位（Kabat 编号法）有 Asn、Ser 和 Lys 的插入，而 Chothia 编号法则认为插入发生在 82 位（Asn, Ser 和 Leu）。其余地方编号都一致。TmlinsonI+J 文库中的抗体的突变位点局限在 H50、H52、H52a、H53、H58、H95、H96、H97、H98、L50、L53、L91、L92、L93、L94 和 L96^[22]（表 4-1）。

图 4-2, scFv-H4 轻链和重链序列的比对 (黑框所示序列为 scFv-H4 的轻链和重链 CDR)。Fig. 4-1 sequential alignment of VH and VL (Bold letters indicate the CDRs)

轻 链

DIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVN-----YMYWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISMETEDAATYYC**QQWGR**---NP-TFGGGTKLEIKRA
 DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYS-----NLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC**QHFWG**---TR-TFGGGTRLEIKRA
 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIRK-----YLNWYQQKPKWSPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLESDDTATYYC**LQHGE**---YTFGGGTKLEINRA
 --ELTPPSVSV-SPGQTARITCSANALPNQ-----YAYWYQQKPGRAPVMVIY**KDTRPS**GIPQRFSSSTSGTTVTLTISGVQAEDEADYYC**QAWDN**---SASIFGGGTKLTVLGQ
 ENVLTQSPAIMASAPGEKVTMACRASSVSST-----YLHWYQQKSGASPKLLIY**STSNLAS**GVPARFSGSGSGTSYSLTISSEVAEDAATYYC**QQYSG**---YPLTFGAGTKLEIKRA
 QSVLTQPPSASG-TPGQRTVITSCGTSSNIG-----SSTVNWYQQLPGMAPKLLIY**RDAMP**SGVPDRFSGSGSGASASLAIGGLQSEDETYYC**AAWDVSLNAYV**FGTGTGKTVLGG
 DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHS-NGNTYLHWY LQKPGQSPKLLIY**KVSNR**FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFC**SQSTH**---VPLTFGAGTKLEIKRA
 DIVMTQSPSSLSVSAGERVTMSCKSSQSLNSGNQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIY**GASTRES**GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAE DLAVYYC**QNDHS**---YPLTFGAGTKLEIKRA
 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIY**WASTRES**GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAE DLAVYYC**QNDYS**---YPLTFGAGTKLEPG--
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISS-----YLNWYQQKPGKAPKLLIYRASHLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQATA---SPVTFGCGTKVEIKRA

重 链

QVQLQESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTG--YGVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDG---NTDYN SALKSRLSISKDNSKSVFLKMNSLHTDDTARYYCARERDYR-----LDYWGQGTTLTVS
 EVKLVESSGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFD--YYMSWVRQPPGKALEWLGFI RNKADGYTTEYSASVKGRFTISRDNQSILYLQMN LRAEDSATYYCTRDPYGP-----AAYWGQGTTLTVS
 EIQLQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKD--YYMHVWKQRPEQGLEWIGLIDPENG--NTIYDPKFQ GKASITADTSNTAYLQLSSLTSED TAVYYCARDNSYY-----FDYWGQGTTLTVS
 EVKLLESGGLVQPGGSLKLSAASGFDFSK--YWMSWVRQAPGKGLEWIGEIHPDSG--TINYTPSLKDKFIISRDN AKNSLYLQMSKVRSEDTALYYCARLHYYGY-----NAYWGQGTTLTVS
 EVKLQESGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSD--YYMYWVRQTPEKRLWVAYISNGGG--STYYPDTVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSRLKSEDTAMYYCARHGGYYA-----MDYWGQGTTLTVS
 QGQLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSS--FWVNWVKQRPGQGLEWIGQIYPGDG--DNKYN GKFKGKATLTADKSSTTAYMQLYSLTSEDSAVYFCARSGNYPYA-----MDYWGQGTTLTVS
 EVKLVESSGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSD--FYMEWVRQPPGKRLWIAASRNKGNYTTEYSASVKGRFIVSRDTSQ SILYLQMNALRAEDTAIYYCARNYYGSTWY-----FDVWGAGTTLTVS
 EVHLLSEGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFNI--FVMSWVRQAPGKGLEWVSGVFGSGG--NTDYADAVKGRFTITRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKHRVSYVLTG-----FDSWGQGTTLTVS
 EVHLLSEGGNLVQPGGSLRLSCAASGYSITS--DYAWNVRQAPGKGLEWVSGVFGSG--NTDYADAVKGRFTITRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKHRVSYVLTG-----FDSWGQGTTLTVS
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS--YAMSWVRQAPGKCLEWVSSITGAGG--GTRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKHKTT-----FDYWGQGTTLTVS

表 4-2 AFB1/H4 轻重连可变区氨基酸残基的编号

Tab. 4-2 the numbering of the amino acid residues of scFv-H4

VL	FR L1	CDR L1	FR L2	CDR L2	FR L3	CDR L3	FR L4
Chothia	1~23	24~34	35~49	50~56	57~88	89~97	98~104
Kabat	1~23	24~34	35~49	50~56	57~88	89~97	98~104
	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPGKAPKLLIY	RASHLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	QOATASPVIT	FGQGTKVE
VH	FR H1	CDR H1	FR H2	CDR H2	FR H3	CDR H3	FR H4
Chothia	1~25	26~35	36~49	50~52,52a, 53~65	66~82, 82a, 82b, 82c, 83~94	95~99,101~102	103~113
Kabat	1~25	26~35	36~49	50~52,52a, 53~65	66~72, 72a, 72b, 72c, 73~94	95~99,101~102	103~113
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	SITGAGGGTRYADSVKG	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVK	HKTTFDY	WGQGTTLTV

4.3.2 scFv-H4 模型的建立

免疫球蛋白超家族是我们研究最为透彻的结构之一^[23], 抗体的同源建模比一般的蛋白的建模有优势。通过 X 射线衍射分析和多位核磁共振, 各类免疫球蛋白的折叠基本相似。免疫球蛋白超家族 (IgSF) 是一种特有的紧密的结构。这样的结构由上下两个的 β 片层组成, 每个 β 片层由 4、5 个反平行的 β 折叠股构成, 亲水和疏水的氨基酸残基交替排成列与 β 片层平面的垂直方向, 疏水氨基酸残基向内, 亲水残基向外。除了 β 片层之间由疏水相互作用外, 它们之间通过一个二硫键来稳定结构。 β 片层对整个结构域起到支持作用, 称为抗体的框架区。 β 片层是 IgSF 中相对保守的结构, 如 scFv-H4 的 FR 与已经测定结构的蛋白非常接近, 轻链的 FR 与 6 个已知结构的抗体只有 1 个氨基酸残基的差别, 重链的 FR 与同源性最高 5 个结构已知的蛋白之间差别也在 5 个氨基酸残基以内 (具体数据参见附录二)。

β 折叠股之间由突环链接, 是抗体发挥识别功能的结构基础; 这些突环在长度和氨基酸序列上具有多样性, 这是抗体可以识别不同抗原的物质基础。虽然 CDR 具有多样性, 但是也有一些标准结构 (canonical structure)^[24], 可以依照这些标准结构对模型进行调整 (参见附录二)。整个抗体将 FR 和 6 个 CDR 分别进行优化。通过每段残基同源性的比对, 找出同源性最高的、结构已知抗体。综合这些抗体的 FR 的结构, 我们基本上就依照这些抗体构象的平均值来预测 scFv-H4 的构象。将建模获得的两个 FR 和 6 个 CDR 拼接后, 将拼接后的结果优化至能量最低的状态, 获得模型为最终结果。

图 4-3 是同源建模的结果, 模型由 VH 和 VL 可变区两个结构域组成, 不包含连接肽。由于连接肽以甘氨酸为主, 灵活而柔软, 没够固定的结构, 另外 15 个氨基酸残基的长度不会影响重链和轻链的结构域的构象, 也不会影响到 VH 和 VL 的相互作用, 所以我们的模型不包括连接肽。重链和轻链围绕成筒状结构, 桶壁由 FR 组成 (模型中扁平箭头), 桶的顶端是 CDR。

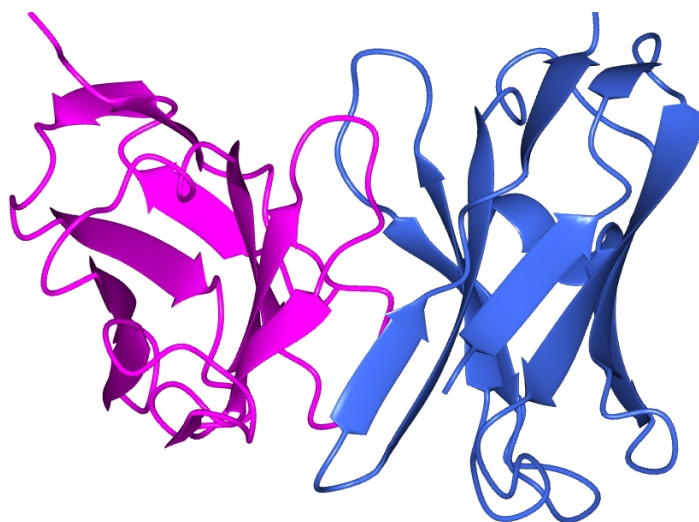


图 4-3 由同源建模获得的 scFv-H4 的主链结构模型

Fig. 4-3 the main chain structure of scFv-H4 induced by homology modeling

4.3.3 scFv-H4 模型的评估

scFv-H4 的模型的拉氏图(图 4-4)所示。总体上而言, scFv-H4 模型的氨基酸残基的二面角坐标点基本上都落在有利区域, 而 VL96 和 SL30 的二面角比较异常, 不利于该处残基的折叠。大部氨基酸残基的构象都在 β -片层区, 少数部分氨基酸残基构象是 α -螺旋结构, 有三个氨基酸残基(包括 SL30)采用左手螺旋结构。Gly 的侧链为 H, 空间位阻比较小, 所以二面角有较大的自由度, 而 Pro 是亚氨基型氨基酸, 其特殊的环状结构加强了对肽链结构的明显地限制, 其构象变化是很多蛋白质折叠与去折叠过程中的限速步骤。scFv-H4 序列中的甘氨酸, 脯氨酸和 Pre-Pro 的二面角坐标点都落在有利区域。通过拉氏图对 scFv-H4 模型中氨基酸残基的二面角 (Φ , Ψ) 分析, 我们可以认为 scFv-H4 的模型是合理的^[25]。

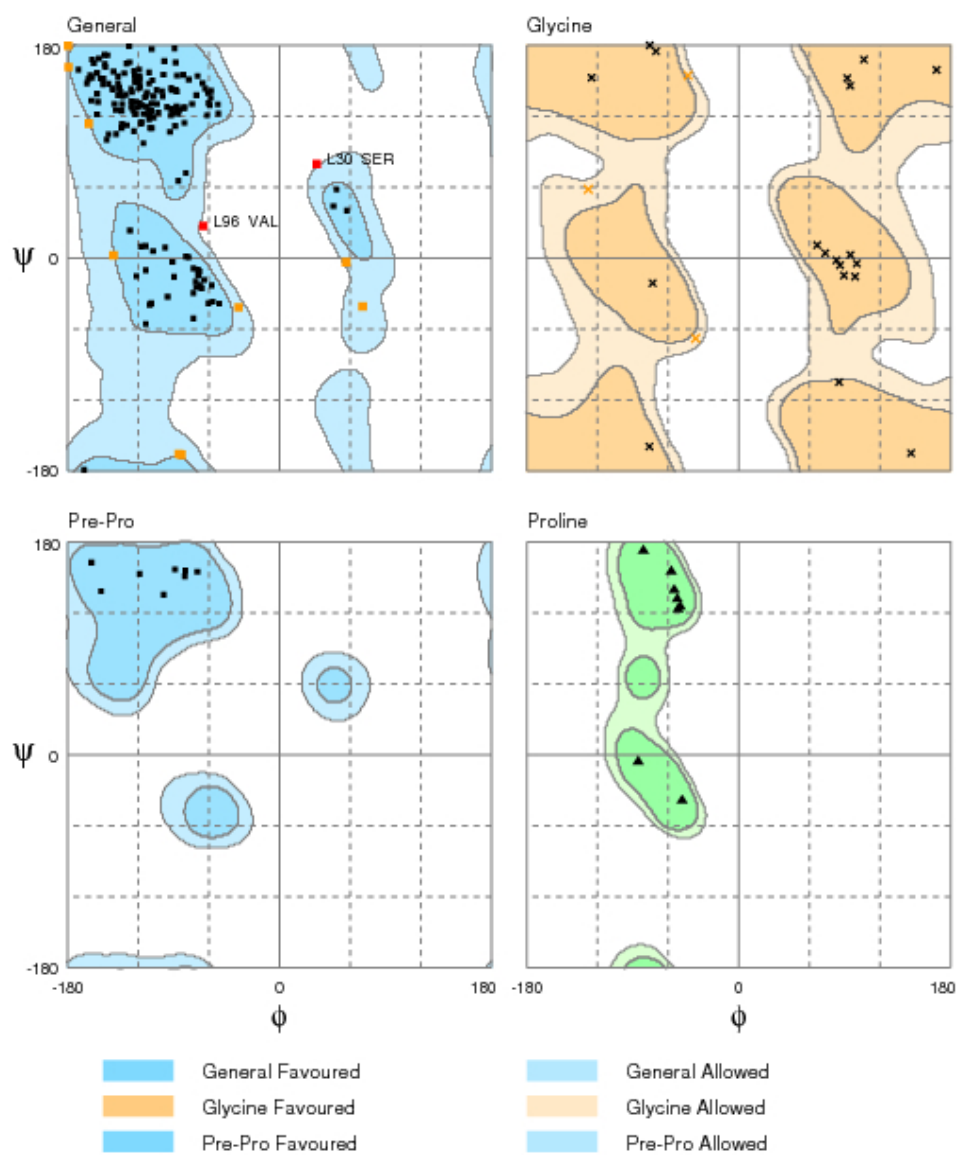


图 4-4, scFv-H4 模型的拉氏图。

Fig 4-4, the Ramachandran map of scFv-H4 model

相对可及面积是采用 Anarea 程序计算获得 (图 4-5A), 在本次评估中所采用的探针半径为 1.4Å。相对可及面积是模型中残基 X 的可及表面除和 Gly-X-Gly 三肽中 X 残基的可及面积的商值, 这个商值一般都小于 1。在 scFv-H4 的所有残基的可及面积的分布图中, 绝大多数残基相对可及面积都小于 1。

排斥体积与氨基酸残基的原子半径和相邻原子半径有关, 按照 Vorinói 多面体方法计算^[25] (图 4-5B)。一般而言, 如果蛋白质有效地包裹, 所有残基的相对体积为 1.0 ± 0.1 。如果氨基酸残基处于内凹孔中或者没有正确定位, 那么它的相对体积就要大于 1.2; 如果氨基酸残基位于压缩部位或者不规则区域, 那么它的相对体积就小于 0.8。scFv-H4 模型中的氨基酸残基的相对体积主要都集中在 0.9~1.1 之间, 极少少量氨基酸残基高于 1.2 或低于 0.8。

空间/填充质量指数是根据 Morris 等人设定的条件^[26], 将 ϕ , ψ , ω 分类 (图 4-5C)。对一些所谓的结构缺陷 (巨大的孔结构或原子交叠)。那些“问题”残基的空间/填充质量指数一般都小于 7, 而那些高质量的氨基酸的空间/填充质量指数一般为 9。

三维轮廓质量指数是另一个用来评估蛋白结构的参数^[27], 可以用来了解蛋白结构的疏水能和微环境 (图 4-5D)。正常条件下, 三维轮廓质量指数一般都介于 5 到 8 之间; 如果氨基酸残基的三维轮廓质量指数低于 5, 表明该残基在其微环境或折叠上有不恰当的地方。三维轮廓质量指数分析的结果显示, scFv-H4 的模型是基本合理的。

4.3.4 抗原与抗体分子对接的结构分析

PatchDock 服务器对 scFv-H4 和 AFB₁ 进行硬对接 (rigid docking), 然后用 FireDock 对 PatchDock 的对接的方案进行优化, 比如侧链的空间构象。FireDock 给出了能量最低的 10 个分子对接的方案, 此外还给出了范德华引力 (Attractive VdW), 范德华斥力 (Repulsive VdW), 原子接触能 (ACE) 数据和氢键 (HB) 的数据。从表 4-12 中可以看到 FireDock 的方案, 氢键对 AFB₁ 与 scFv-H4 之间的相互作用没有贡献 (表 4-2)。

由于抗原抗体的结合主要是抗体分子表面和抗原分子表面的相互作用, 所以抗体的抗原结合部位的形状与抗原的形状应该对应互补^[20]。不同类型和大小的抗原与抗体的结合会有不同。半抗原的分子较小, 一般认为抗半抗原的抗体的结合部位是呈孔洞状, 半抗原则定位在孔洞内; 而抗完全抗原的抗体的结合部位呈平面状^[29]。scFv-H4 的抗原结合部位是由重链结构域和轻链结构域构成的孔洞结构, AFB₁ 则应位于该孔洞结构中。scFv-H4 既能识别 AFB₁-BSA 又能识别 AFB₁, 所以 scFv-H4 应该不能识别 AFB₁ 与 BSA 的结合部位 (图 4-6)。AFB₁ 与 BSA 的结合部位为 1 位^[30], 而 AFB₁ 的致突变位点为 9 位^[31]。AFG₁ 与 AFB₁ 的氧杂萜邻酮部分有很大不同, 但是双呋喃环部分没有差别, 而 scFv-H4 与 AFG₁ 的交叉反应性又高达 42%。这说明 scFv-H4 主要识别 AFB₁ 的双呋喃环可能深埋于 scFv-H4 孔洞之中, 而氧杂萜邻酮部分暴露在外 (图 4-6)。

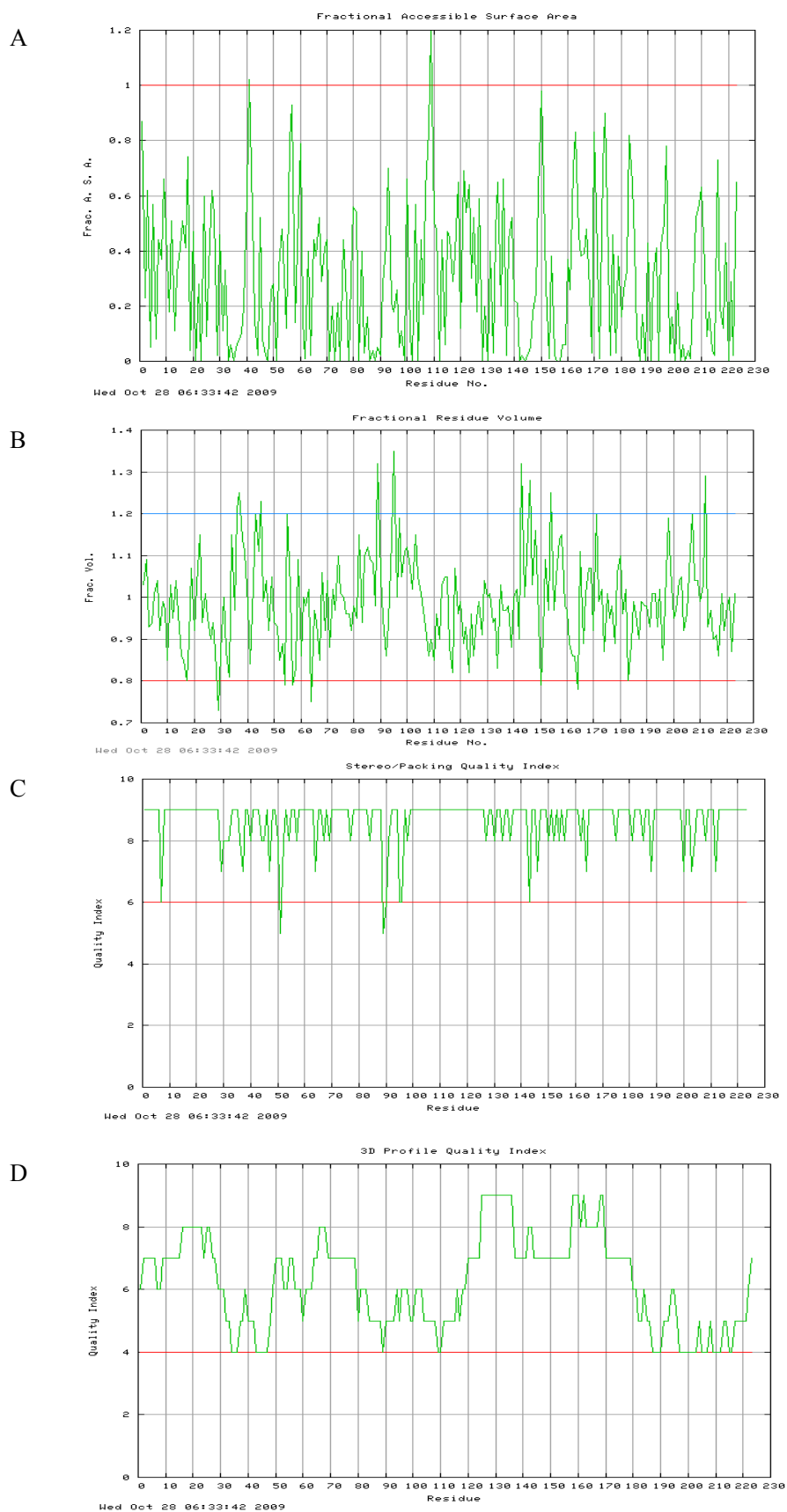
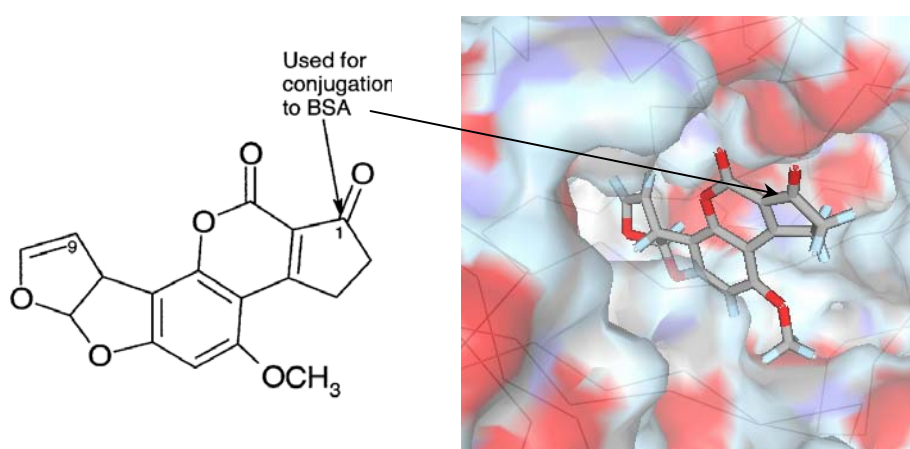


图 4-5 scFv-H4 模型的相对可及面积 (A)，相对残基体积 (B)，空间/填充质量指数 (C)，三维轮廓质量指数 (D)。

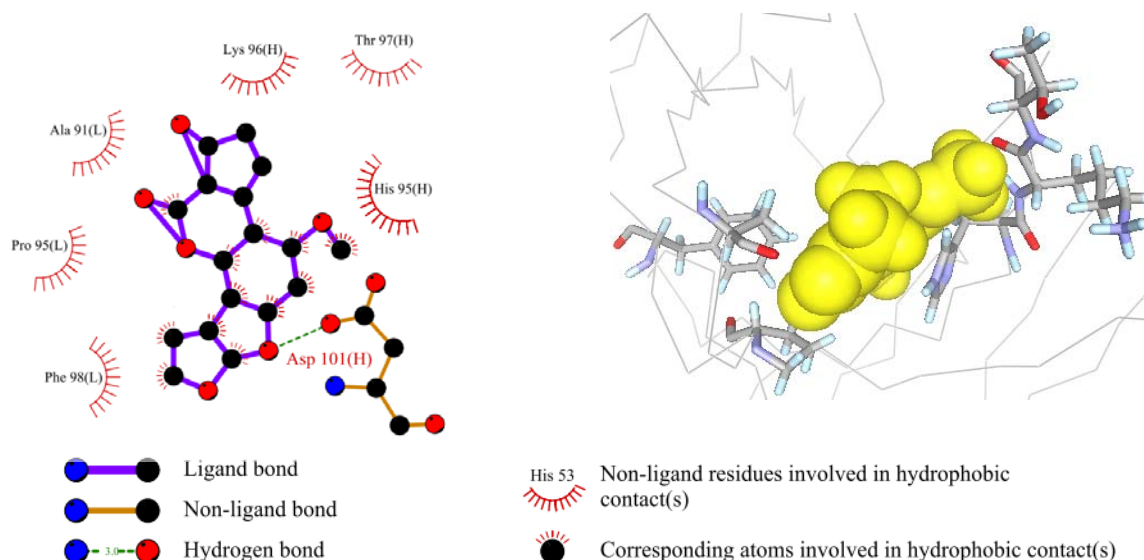
Fig. 4-5 the fractional accessible surface (A), the fractional residual volume (B), the stereo/packaging quality index (C), the 3D profile quality index (D) of scFv-H4 model.

表 4-3, 用 FireDock 优化后的 10 个 scFv-H4 与 AFB₁ 分子对接的模式Tab. 4-3, 10 docking solutions of scFv-H4 with AFB₁ refined by FireDock.

Rank	Global Energy	Attractive VdW	Repulsive VdW	ACE	HB
1	-45.95	-19.90	5.72	-14.01	0.00
2	-43.72	-17.63	2.64	-13.45	0.00
3	-42.79	-21.02	4.26	-9.38	0.00
4	-42.65	-19.36	6.09	-13.58	0.00
5	-41.83	-19.58	6.27	-11.61	0.00
6	-39.27	-15.33	0.46	-12.82	0.00
7	-38.91	-21.58	11.51	-10.58	0.00
8	-38.50	-14.69	5.60	-13.63	0.00
9	-38.38	-18.06	6.72	-11.58	0.00
10	-38.05	-19.11	8.29	-11.69	0.00

图 4-6, AFB₁ 的结构图和 AFB₁ 在 scFv-H4 的空间定向。Figure 4-10, the structure of AFB₁ and its orientation in the binding concave of scFv-H4.

结合能量最低的方案 1 是最优的方案。用 Ligplot 软件分析 AFB₁ 与 scFv-H4 结合部位的氨基酸残基的相互作用发现, 疏水相互作用是二者的主要作用力, 这与 Haskard 等人的报道一致^[32]。AFB₁ 主要被 AL91, PL95, FL98, HH95, KH96, TH97 形成的疏水腔包裹; DH101 与双呋喃环之间有一个氢键 (图 4-7)。根据 scFv-H4 的模型, 轻链的 L91, L92, L93, L94 构成的疏水性的区域与 AFB₁ 的氧杂萜邻酮部分相互作用, 用 Ligplot 分析 AL91, PL95, FL98 与 AFB₁ 之间的有疏水相互作用, 其中 AL91 的侧链与 AFB₁ 氧杂萜邻酮上的 1 位 C 发生疏水相互作用, 而 FL98 的侧链与双呋喃环的 8, 9 位发生疏水相互作用。重链的 H95、H96、H97、H98 构成的另一疏水区域则与双呋喃环部分相互作用, 用 ligplot 找到了 HH95, KH96, TH97 与双呋喃环有疏水相互作用。HH95 的侧链的杂环与 AFB₁ 的双呋喃环上的 10, 11 位有可能会有疏水相互作用, 而 KH96 与双呋喃环连接的甲氧基有疏水相互作用。另外 HH95 的杂环侧链的空间结构可能对 AFB₁ 的结合也有贡献。

图 4-7, scFv-H4 结合部位各残基与 AFB₁ 的相互作用。Fig. 4-7 the interaction between scFv-H4 and AFB₁.

4.3.5 CDR L3 的定点突变

表 4-4 L91, L92, L93, L94 的突变结果

Tab. 4-4 the mutants at L93 and L94.

	L93	L94	ELISA		L91	L92	ELISA
A1	G	F	0.412	A5	R	L	0.135
A5	R	N	0.330	A9	S	K	0.108
A10	K	P	0.357	A10	A	S	0.757
B9	H	N	0.401	B6	C	N	0.122
C6	R	T	0.342	B10	W	T	0.176
E2	R	N	0.322	E1	V	S	0.322
E3	K	T	0.338	E7	W	N	0.108
F3	Q	L	0.341	E8	G	Q	0.321
F4	S	S	0.347	E9	R	G	0.147
F11	S	R	0.301	F6	N	K	0.125
G9	P	N	0.364	G1	A	S	0.513
H2	P	T	0.349	G3	N	G	0.165
H6	N	E	0.337	G12	A	V	0.437
H12	R	L	0.273	H7	K	T	0.173
参照	A	S	0.130	参照	A	T	0.530

CDR L3 上的突变位点一共四个分别为 L91、L92、L93、L94，分两次来研究。其中 L93 和 L94 为第一组，L91, L92 为第二组。第一组突变并经亲和筛选后，随机挑取噬菌体抗体单克隆和 phage-H4 之间 ELISA 信号差异很小，测序证明这些克隆的 L93、L94 的氨基酸残基并不相同，这说明这两个位点的氨基酸残基的变化对抗原-抗体的结合没有明显的影响。第二组突变后发现随机挑取的克隆的 ELISA 信号之间有较大差异，这说明 L91 和 L92 的氨基酸残基变化会引起抗原-抗体结合的变化，L91 和 L92 的氨基酸与抗体-抗原结合有密切关系，多数克隆 ELISA 信号较低，个别克隆 ELISA 信号高于对照 phage-H4（表 4-3），从这些孔的测序结果发现 L91 为 Ala 时，ELISA 能维持较高的水平，所以 AL91 是参与抗原-抗体的结合，而 Ala 变为 Val 后，scFv 仍保持免疫反应性，但是活性降低，这可能和空间位阻有关。测序

结果如表 4.1 所示。从以前的报道认为 L91、L94 和 L96 是抗原抗体结合的热点部位，已测定的 26 个抗体-抗原服务结构中的 21 个的结合部位都有它们的参与，而 L92、L93 则分别是对 L91、L92 起支撑作用^[9]。

在噬菌体 ELISA 的初步筛选中，通过 CDR L3 改造获得的 phage-A10 亲和力高于 phage-H4。将 A10 进行可溶性表达为 scFv-A10，纯化后，用 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 scFv-H4 和 scFv-A10 的抗体进行竞争 ELISA，scFv-H4 的 IC_{50} 为 0.4 ng/mL ，而 scFv-A10 的 IC_{50} 为 0.12 ng/mL 。这可能是 scFv-H4 中 L92 位的 T 变为 S 后，侧链减小，链的柔韧性增加，能更好和 AFB₁ 契合。

4.3.6 CDR L2 的定点突变

在 CDR L2 内，从 Tomlinson I+J 筛选到的抗体克隆变化集中在 L50 和 L53 两个位点^[28]。我们在 L50 和 L53 先后引入突变，测序证明 L50 和 L53 突变出的氨基酸各不相同（表 4-4），这些随机挑取克隆的 ELISA 信号没和对照没有明显的变化，且彼此之间也没有明显的变化。这说明 CDR L2 中的 L50 和 L53 的氨基酸对抗原-抗体结合没有贡献。以前的文献报道一般抗半抗原抗体的 CDR L2 也很少影响抗原抗体的结合^[20, 33-35]。这个 scFv-H4 的模型保持了一致，CDR L2 不参与构成 scFv-H4 结合部位。

表 4-5 L50, L53 的突变结果
Tab. 4-5 the mutants at L50 and L53.

	L50	ELISA		L53	ELISA
A1	T	0.412	A9	V	0.347
A4	K	0.440	A12	R	0.431
B5	W	0.397	B1	G	0.376
B11	H	0.341	B6	D	0.322
B12	N	0.422	B10	S	0.349
C2	A	0.352	E1	N	0.421
E10	R	0.400	E7	T	0.422
F3	S	0.371	E8	K	0.408
F5	D	0.377	E9	E	0.398
F9	Q	0.433	F6	Q	0.423
F12	G	0.365	G1	L	0.412
H2	N	0.391	G3	I	0.375
H6	I	0.378	G12	A	0.404
H12	K	0.427	H7	K	0.398
参照	R	0.430	参照	H	0.430

4.3.7 CDR H3 的定点突变

Tomlinson I+J 文库中的抗体 CDR H3 一共由 7 个氨基酸残基组成，多样性集中在 H95，H96，H97 和 H98，我们将 H95、H96 为第一组进行突变，H97、H98 为第二组进行突变（表 4-5）。在第一组突变中，我们发现有明显免疫反应性的克隆 H95 都是 His，这个可能 His 侧链的空间结构有关系，也可能和侧链上疏水和亲水的分布有关。KH96 的侧链对 scFv-H4 的生物活性影响比较小，有免疫反应性的三个克隆中，Val, Lys, Lue, Gln 侧链较长，可能 C _{β} , C _{γ} 碳能形成疏水性的区域与氧杂萘邻酮连接的甲氧基有相互作用。而 H97 和 H98 的突变没有明显影响 scFv-H4 的生物活性，这两个位点可能没有在抗原-抗体结合中扮演重要的角色。

表 4-6 H95、H96、H97、H98 的突变结果
Tab. 4-6 the mutants at H95, H96, H97 and H98.

	H95	H96	ELISA		H97	H98	ELISA
A1	K	T	0.112	A5	F	I	0.392
A5	R	E	0.130	A11	W	G	0.411
A10	H	Q	0.257	B2	E	Q	0.421
B9	H	L	0.401	B4	N	N	0.388
C6	R	T	0.142	B7	S	A	0.398
E2	R	N	0.122	B12	A	T	0.411
E3	K	T	0.118	F7	W	N	0.398
F3	Q	L	0.141	F12	E	K	0.409
F4	S	S	0.097	G2	H	L	0.413
F11	S	R	0.101	G4	D	K	0.407
G1	P	N	0.134	G11	P	S	0.399
H3	P	T	0.109	H1	H	Y	0.412
H4	N	E	0.157	H11	E	F	0.418
H7	H	V	0.313	H12	K	A	0.429
参照	H	K	0.430	参照	A	T	0.409

4.3.8 CDR H2 的定点突变

Tomlinson I+J 文库中的但抗体的 CDR H2 比较长, 由 17 个氨基酸组成, 其中 H50, H52, H52a, H53, H55, H56 和 H58 七个位点具有多样性, 我们把突变分为四组, H52, H52a 为第一组, H55, H56 为第二组, H50 为第三组, H58 为第四组 (表 4-6, 4-7)。突变后的 scFv-H4 的 ELISA 信号与突变前没有变化, 发现这些位点突变对抗原-抗体结合没有明显的影响。

表 4-7 H52、H52a、H56、H57 的突变结果
Tab. 4-7 the mutants at H52, H52a, H56 and H57.

	H52	H52a	ELISA		H55	H56	ELISA
A4	V	Q	0.412	A2	S	I	0.435
A7	T	L	0.431	A11	H	Y	0.468
A8	K	S	0.396	B2	T	T	0.457
C2	H	K	0.406	C7	A	E	0.432
C9	F	R	0.376	C8	S	R	0.412
C11	G	R	0.422	D2	G	G	0.392
E2	L	T	0.400	D4	H	K	0.423
E3	M	D	0.404	D5	R	A	0.440
E9	S	D	0.422	G6	L	T	0.411
F4	D	F	0.431	G7	A	T	0.439
G9	R	N	0.398	G10	S	H	0.427
H1	Q	A	0.402	G11	T	R	0.419
H2	Q	Q	0.412	H1	Q	A	0.452
H4	L	T	0.398	H5	W	V	0.413
参照	T	G	0.430	参照	G	G	0.433

表 4-8 H50、H56、H58 的突变结果
Tab. 4-8 the mutants at H50, H56 and H58.

	H50	ELISA		H56	ELISA		H58	ELISA
B5	V	0.437	A9	R	0.367	A2	F	0.431
B6	T	0.423	A12	A	0.387	A7	D	0.451
C2	L	0.442	B1	R	0.401	C8	S	0.435
C3	W	0.401	B6	T	0.375	D1	Q	0.411
C4	R	0.402	B10	V	0.377	D9	A	0.452
C12	D	0.382	E1	K	0.389	E5	V	0.432
D3	Q	0.428	E7	S	0.402	E9	T	0.408
D9	S	0.426	E8	P	0.390	F1	G	0.422
E6	I	0.411	E9	L	0.376	G2	L	0.430
F12	S	0.426	F6	D	0.388	G3	I	0.419
G5	Y	0.406	G1	Q	0.376	H2	R	0.425
G10	V	0.410	G3	F	0.392	H3	H	0.447
H2	M	0.439	G12	N	0.384	H5	Y	0.413
H8	G	0.423	H7	L	0.386	H9	K	0.439
参照	S	0.430	参照	G	0.400	参照	R	0.445

4.3.9 二硫键的设计，克隆和表达

根据同源建模获得的 scFv-H4 模型，由重链可变区和轻链可变区形成了一个筒状的结构，而与抗原结合的区域位于桶状结构的顶端，由组成桶壁的框架区支持。我们希望能通过结构域间二硫键来增加重链可变区和轻链可变区的相互作用，改善抗体的稳定性。引入结构域间二硫键的位点应该位于桶壁的某些区域，如 FR H2 和 FR L4 之间以及 FR H4 和 FR L2 之间(表 4-8)。引入结构域间二硫键的长度可以用两个 $C\alpha$ 之间的距离($C\alpha-C\alpha$)来表征。已知结构的蛋白质中形成二硫键的氨基酸残基对的 $C\alpha-C\alpha$ 长度一般在 4.2 Å 到 6.6 Å 之间^[36]，我们可以看到 H44-L100, H46-L98 和 H103-L43 的 $C\alpha-C\alpha$ 符合要求，但是 L98 和 H103 分别紧邻 CDR L3 和 CDR H3 (表 4-1)，可能会影响到 scFv-H4 与 AFB₁ 的结合。而 H44-L100 远离抗原结合部位，可能对 scFv-H4 和 AFB₁ 的结合影响较小。

用 PCR 将 *H4* 基因上的 H44 位的 GGG 和 L100 位的 CAA 定点突变为 CTC，并测序验证。将突变后的基因放到 *E.coli* BL21(DE3)/pET22b 系统中表达。表达的抗体片段中没有检测到游离的-SH 存在，这说明 H44 位的 C 和 L100 位的 C 形成了二硫键，而 scFv-H4 形成含有结构域间二硫键的 dscFv-H4。

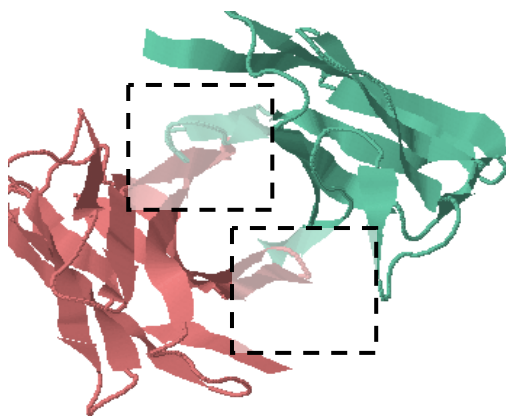


图 4-8 在 scFv-H 的模型中，VH 和 VL 相互接触的区域。
Fig. 4-8 the contact between VH and VL in scFv-H4.

表 4-9, 能够用以构建结构域间二硫键的位点和它们 C α 之间的距离。Tab. 4-9 candidate sites of the interdomain disulphide bond and and C α -C α distance

Site Pair	Locations	Distance (Å)
H44-L100	FR H2, FR L4	5.36
H46-L98	FR H2, FR L4	6.23
H103-L42	FR H4, FR L2	6.98
H103-L43	FR H4, FR L2	5.73

4.3.10 scFv-H4 和 dscFv-H4 的去折叠

scFv 的变性主要是去折叠 (unfolding) 和聚集 (aggregation) 两种。其中去折叠过程可以用发射荧光光谱来观察。最大发射波长(λ_{\max})和在此波长下的最大发光强度 (Y_{\max}) 是发射荧光光谱的特征指标。和 Y_{\max} 相比较, λ_{\max} 仅受发色基跃迁能级的影响, 能够准确的荧光发色基团的微环境, 与蛋白浓度无关, 适合在浓度较低的情况下分析蛋白的去折叠过程。scFv-H4 中有 4 个色氨酸, 色氨酸在完全疏水环境条件的发射光谱的 λ_{\max} 是 312 nm, 在完全亲水环境下的发射光谱的 λ_{\max} 是 352 nm^[37], 在 scFv-H4 的去折叠过程中, 包裹在 scFv-H4 内部的, 处于相对疏水环境的色氨酸逐步暴露到周围相对亲水性环境中, 色氨酸的 λ_{\max} 红移。图 4-9 是 VH, VL, scFv-H4 和 dscFv-H4 在不同浓度的盐酸胍溶液中的变性曲线。VH 的 GdnHCl₅₀ 为 1.9 mol/L, VL GdnHCl₅₀ 为 1.5 mol/L, 而 scFv-H4 的 GdnHCl₅₀ 为 2.4 mol/L, 高于任何一个单独的结构域, 这说明 VH 和 VL 之间存在相互作用, 能够起到彼此稳定的效果。多结构域蛋白的稳定性是其每一个结构域自身稳定性与这些结构域相互作用提供的稳定性的总和^[38], 结构域间二硫键能够增加结构域之间相互作用提供的稳定性, 这一点在 Fab 中已经得到了证明^[39]。scFv-H4 的变性基本上是两态去折叠过程 (a single two-state unfolding transition), 这与单结构域的蛋白类似, 多结构域的蛋白质的去折叠情况则比较复杂^[39]。dscFv-H4 的 GdnHCl₅₀ 为 4.2 mol/L, 高于 scFv-H4 的 GdnHCl₅₀。这说明 H44-L100 二硫键的加入对蛋白稳定有明显稳定作用, 单链抗体耐受变性剂的能力增加, 另外 dscFv-H4 的变性范围要比 scFv-H4 的窄, 这说明结构域间二硫键的让 VH, VL 这两个结构域的协同增加。

4.3.11 scFv-H4 和 dscFv-H4 的聚集

scFv 的聚集会让 scFv 失去生物活性, 干扰对 scFv 性质的研究, scFv 的聚集与浓度密切相关 (数据未给出)^[5]。我们用体积排阻色谱研究了不同浓度的 scFv-H4 与 dscFv-H4 的聚集现象。在浓度为 10 μ mol/L 条件下, 37°C, 20 h 的温浴后, scFv-H4 只有 30% 是单体形式而 dscFv-H4 几乎都是以单体的形式存在 (图 4-10)。作为由两个结构域构成的蛋白质, 同一个分子的 VH 和 VL 相互结合, 这种结合的溶度积常数 (K_a) 一般在 10^{-9} 到 10^{-6} L/mol 之间^[40]。结构域间的链接肽不能降低 VL 与 VH 的溶度积常数, 只能够起到增加同一 scFv 中 VH 和 VL 的微环境中有效浓度的作用。scFv-H4 中一个分子的 VH 能与另外一个分子的 VL 结合, 反之亦然, 这样蛋白质就可能发生聚集。结构域间二硫键能增加结构域间接触面的稳定性, 让同一个分子内的 VH 和 VL 更加紧密的结合在一起, 从而避免不同分子间重链和轻链相互结合。

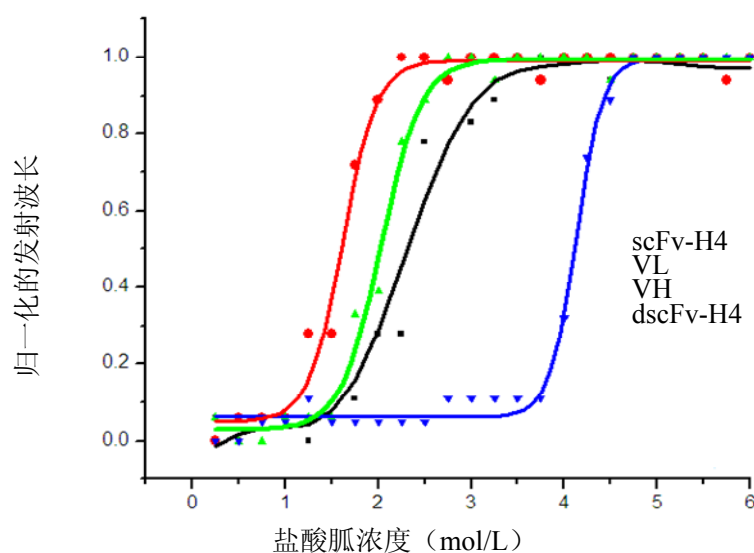


图 4-9, 在不同浓度的盐酸胍溶液中, VH, VL, scFv-H4 和 dscFv-H4 的变性曲线。

Fig. 4-9, the denature profiles of VH, VL, scFv-H4 and dscFv-H4 in a serial concentrations of G1dHCl.

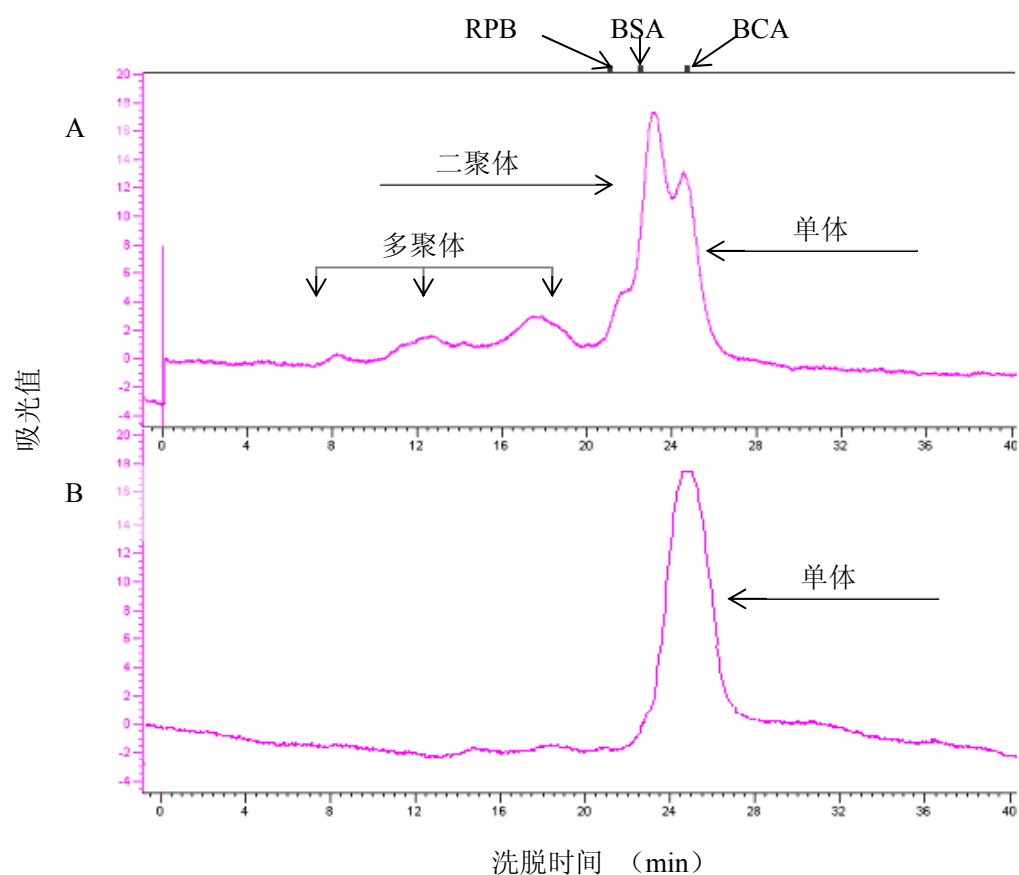


图 4-10 在 37°C 温浴 20 h 后, 用体积排阻色谱分析的 scFv-H4 (10 $\mu\text{mol/L}$, A) 和 dscFv-H4 (10 $\mu\text{mol/L}$, B) 的聚集情况。用牛碳酸酐酶 (BCA, 31 kDa), 牛血清白蛋白 (BSA, 66 kDa), 兔磷酸化酶 (RPB, 97 kDa) 作为标准蛋白质。

Fig. 4-10 Aggregation of H4 (a, 10 $\mu\text{mol/L}$,) and H44-L100 (b, 10 $\mu\text{mol/L}$) after incubation at 37°C for 20 h.

4.3.12 dscFv-H4 的亲合力

通常对结构域间二硫键的研究主要集中在其对 scFv 稳定性的影响,但是对 scFv 亲和力的影响鲜有报道。竞争 ELISA 的实验结果表明:scFv-H4 和 dscFv-H4 的抗原结合的能力相近(图 4-11)。竞争 ELISA 的实验结果显示,scFv-H4 和 dscFv-H4 的 IC_{50} 都在 0.4 ng/mL 左右。而结构域间二硫键 H44-L100 没有明显改变 H4 的亲合力。H44 和 L100 两个位点都远离抗原结合位点,不会影响到抗原结合。

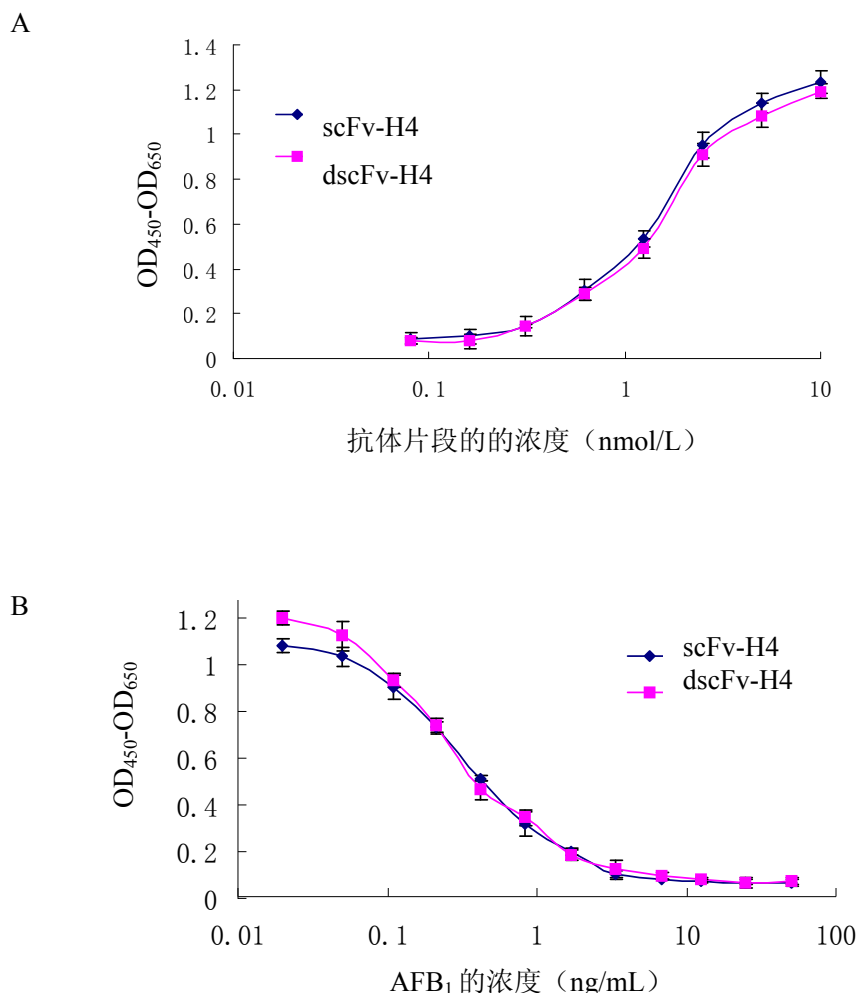


图 4-11, scFv-H4 和 dscFv-H4 用于 ELISA (A) 和竞争 ELISA (B) 结果。

Fig. 4-11 the binding of scFv-H4 and dscFv-H4 in direct ELISA (A) and competitive ELISA (B), respectively.

4.4 本章小结

(1) 保守性分析在 NCBI 数据库中对 scFv-H4 的重链、轻链的氨基酸序列进行比对,并参考 Kabat 编号法和 Chothia 编号法分析了 scFv-H4 较保守的各框架区和多样性较大的各互补决定区。

(2) 将 FR 和 CDR 分别进行序列分析,利用 WAM 服务器在 PDB 中寻找与各区域(包括轻、重框架区和各互补决定区)同源性最高的序列,并以此为模板分段建立 scFv-H4 的模

型。scFv-H4 的模型经过拉氏图、相对可及面积、相对残基体积、空间/填充质量指数、三维轮廓质量指数等指标的检验，确认了 scFv-H4 模型的合理性。

(3) 将 scFv-H4 的模型和 AFB₁ 的结构提交到 Patchdock 服务器上，获得了 scFv-H4 与 AFB₁ 的分子硬对接模型。并用 FireDock 服务器对分子硬对接的结果进行了优化。参考 scFv-H4 交叉反应的结果，确认了 AFB₁ 在 scFv-H4 中的定向，scFv-H4 的与 AFB₁ 的相互作用主要是疏水相互作用，关键结合位点包括 AL91, PL95, FL98, HH95, KH96, TH97。通过对 CDR L2, L3, H2, H3 中的 L50, L53, L91, L92, L93, L94, L96, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97 和 H98 进行定点饱和突变，确定了 CDR L3 和 CDR H3 是 scFv-H4 与 AFB₁ 结合的部位。试验证明 CDR L2 和 CDR H2 对 scFv-H4 与 AFB₁ 的结合没有贡献。在 CDR L3 中的 AL91 和 CDR H3 中的 HH95 的对 scFv-H4 识别 AFB₁ 有较大影响。另外 scFv-H4 的 TL91 变为 SL91 后，亲和力提高了，IC₅₀ 降低到 0.12 ng/mL。其他位点的突变不会提高亲和力，甚至会降低亲和力。

(4) 单链抗体的较弱的稳定性是它在实际应用中的主要限制因素。依据 scFv-H4 的模型，VH 和 VL 接触面的分析结果表明 H44-L100 是引入结构域间二硫键的最优位点。盐酸胍变性试验和聚集试验证明结构域间二硫键能增加 scFv-H4 的变性剂耐受性，也不易发生聚集。竞争 ELISA 分析表明，dscFv-H4 和 scFv-H4 的 IC₅₀ 相同，也就是 H44-L100 二硫键的引入不会影响到 scFv-H4 与 AFB₁ 的结合，这和我们的预期一致。

参考文献

1. 来鲁华等. 蛋白质的结构预测和分子设计[M]. 北京大学出版社, 1993.
2. Grant M A. Protein structure prediction in structure-based ligand design and virtual screening. Comb Chem High Throughput Screen, 2009, 12(10):940-960.
3. Saunders R, Deane C M. Protein structure prediction begins well but ends badly. Proteins, 2009, 23(7):234-243.
4. Furukawa H, Shimojyo R, Ohnishi N. Affinity selection of target cells from cell surface displayed libraries: a novel procedure using thermo-responsive magnetic nanoparticles. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(5-6):478-483.
5. Worn A, Pluckthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. J Mol Biol, 2001, 305(5):989-1010.
6. Ewert S, Honegger A, Pluckthun A. Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. Methods, 2004, 34(2):184-199.
7. Yang W P, Green K, Pinz-Sweeney S. CDR Walking Mutagenesis for the Affinity Maturation of a Potent Human Anti-HIV-1 Antibody into the Picomolar Range. J Mol Biol, 1995, 254(3):392-403.

8. Sayers E W, Barrett T, Benson D A. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 38(Database issue), D5-D16.
9. Whitelegg N, Rees A R. Antibody variable regions: toward a unified modeling method. *Methods Mol Biol*, 2004, 248:51-91.
10. Lauer B, Otteleben I, Jacobsen H J. Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B₁. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(4):899-904.
11. Dauber-Osguthorpe P, Roberts V A, Osguthorpe D J. Structure and energetics of ligand binding to proteins: *Escherichia coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins*, 1988, 4(1):31-47.
12. Sivasubramanian A, Sircar A, Chaudhury S. Toward high-resolution homology modeling of antibody Fv regions and application to antibody-antigen docking. *Proteins*, 2009, 74(2):497-514.
13. Dibrov A, Myal Y, Leygue E. Computational modelling of protein interactions: energy minimization for the refinement and scoring of association decoys. *Acta Biotheor*, 2009, 23(76):1779-1789.
14. Li V G, Galvano F, Frigiola A. Potential immunoregulatory role of heme oxygenase-1 in human milk: a combined biochemical and molecular modeling approach. *J Nutr Biochem*, 2009, 45(154):1843-1846.
15. Wiederstein M, Sippl M J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Web Server issue), W407-410.
16. Winter G, Griffiths A D, Hawkins R E. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12:433-455.
17. Thannhauser T W, Konishi Y, Scheraga, H. A. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Anal Biochem*, 1984, 138(1):181-188.
18. Johnson G, Wu T T. Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1):214-218.
19. Johnson G, Wu T T. Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Res* 2001, 29(1):205-206.
20. MacCallum R M, Martin A C, Thornton J M. Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol*, 1996, 262(5):732-45.
21. Chothia C, Lesk A M, Tramontano A. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*, 1998, 392(6652):877-883.
22. Griffiths A D, Williams S C, Hartley O. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J*, 1994, 13(14):3245-3260.

23. Bradbury A, Velappan N, Verzillo V. Atiibodies in proteomics I: generating antibodies. *Trends Biotechnol*, 2003, 21(6):275-281.
24. Al-Lazikani B, Lesk A M, Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 1997, 273(4):927-48.
25. Richards F M. Areas, volumes, packing and protein structure. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1977, 6:151-176.
26. Morris A L, MacArthur M W, Hutchinson E G. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, 1992, 12(4):345-364.
27. Luthy R, Bowie J U, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature*, 1992, 356(6364):83-85.
28. de Wildt R M, Mundy C R, Gorick B D. Antibody arrays for high-throughput screening of antibody-antigen interactions. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(9):989-994.
29. Li C H, Ma X H, Chen W Z. A soft docking algorithm for predicting the structure of antibody-antigen complexes. *Proteins*, 2003, 52(1):47-50.
30. Moghaddam A, Lobersli I, Gebhardt K. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B₁ from naive recombinant antibody libraries. *J Immunol Methods*, 2001, 254(1-2):169-181.
31. Bedard L L, Massey T E. Aflatoxin B₁-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett*, 2006, 241(2):174-183.
32. Haskard C A, El-Nezami H S, Kankaanpaa, P. E. Surface binding of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(7):3086-3091.
33. Sottriffer C A, Flader W, Cooper A. Ligand binding by antibody IgE Lb4: assessment of binding site preferences using microcalorimetry, docking, and free energy simulations. *Biophys J*, 1999, 76(6):2966-2977.
34. Wilson I A, Stanfield R. L. Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol*, 1994, 4(6):857-867.
35. Stanfield R L, Takimoto-Kamimura M, Rini J M. Major antigen-induced domain rearrangements in an antibody. *Structure*, 1993, 1(2):83-93.
36. Mizuguchi K, Parker J. S, Blundell T. L. Getting knotted: a model for the structure and activation of Spatzle. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(7):239-242.
37. Monsellier E, Bedouelle H. Quantitative measurement of protein stability from unfolding equilibria monitored with the fluorescence maximum wavelength. *Protein Eng Des Sel*, 2005, 18(9):445-556.
38. Brandts J F, Hu C Q, Lin L N. A simple model for proteins with interacting domains. Applications to scanning calorimetry data. *Biochemistry*, 1989, 28(21):8588-8596.

39. Rothlisberger D, Honegger A, Pluckthun, A. Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol*, 2005, 347(4):773-789.
40. Pluckthun A. Mono- and bivalent antibody fragments produced in *Escherichia coli*: engineering, folding and antigen binding. *Immunol Rev*, 1992, 130:151-88.

创新点

1. 改进了抗 AFB₁ 的单链抗体的筛选方法。AFB₁ 直接包被和竞争-胰蛋白酶联用洗脱极大地提高了筛选的特异性和筛选效率，三轮筛选后随机挑取的 46 个克隆中有 44 个阳性克隆，这个比例远高于以前的报道。
2. 筛选到了一个高亲和力的抗 AFB₁ 的单链抗体克隆 ($K_a = 9.8 \times 10^{-11}$ L/mol)，并首次报道了抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体的基因。
3. PCR-DGGE 首次被用来研究筛选过程的克隆富集现象和筛选结果的多样性和丰度。
4. 建立了 scFv-H4 的模型，分析了 scFv-H4 与 AFB₁ 的分子对接的结果。并通过基因突变确认了抗原结合部位，改进了 scFv-H4 的亲合力和稳定性。

5. 致 谢

掩卷停笔之际，窗外已是繁星满天。斗转星移，光阴荏苒冲淡了曾经的苦辣酸甜。我已经记不得有多少次，我关上实验室最后一盏灯的时候，也是这样的夜色阑珊。因为艰难，幸福才会弥足珍贵；因为挫折，积淀才会如此丰满。

首先感谢我的导师张灏教授、陈卫教授和丁虎生副教授。先生之风，山高水长；学术精湛，品德馨香。他们一直在学业上给我指导，在生活上给我关怀，为我以后的工作和生活树立了典范。

食品生物技术研究中心的陈永泉教授，赵建新副教授，卢蓉蓉教授，田丰伟老师，陈海琴副教授，刘小鸣副教授，夏雨副教授，戴晓军老师，王淼教授，杨严峻教授也在各方面给我指导和帮助。

感谢我硕士学习阶段的导师冯麋教授，江波教授。感谢江南大学分析测试中心的秦昉老师，张银志老师；感谢中国科学院生化细胞所的何淑芳老师，通用电气医疗集团的陈雍硕先生和南京农业大学的华长春先生。

我们融洽的实验室给了我极大的温暖，感谢在我困难的时候给我帮助的兄弟姐妹们，叶强，阿赫曼，丽玛，董艺凝，陈晓华，李宝坤，邹强，范大明，胡兵，党辉，纪卿，王铁斌，张艳红，刘蓉，钮晓燕、张凤敏，李珏，余明洁，顾思天，许庆炎，陈洁，张白曦，李硕，金华，姜俊，王飏，曾伶俐，王霁昀，朱敬华，孟甜，赵红磊等。

感谢我的同学张文斌博士，郝刚博士，付湘晋博士和食品硕士 03 级全体同学和食品 05 秋博士班的全体同学。

感谢我的朋友唐晓涛先生，史国放先生，章秀慧女士，韩杰先生，梁芸女士，吴伟坚博士以及雀巢大家庭的成员。感谢希杰商贸公司的河凤洙先生，李英雨先生，沈燕霆女士以及在实习期间对我关爱和照顾的同事。

最后，我把最真挚的感谢给我的父母，母爱似海，父爱如山。他们虽然清贫却给我世上最宝贵的财产：三十年来无论发生什么，他们总是用爱和包容呵护着我，安慰着我。

一路同行，谢谢大家。

附录一 作者在攻读博士学位期间发表的论文

1. 杨炼,刘自琴,刘蓉.抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体的表达载体的比较[J].食品科学 (已接收)
2. Yang L, Ding H, Gu Z. Selection of single chain fragment variables with direct coating of aflatoxin B₁ to enzyme-linked immunosorbent assay plates. J Agric Food Chem,2009,57(19):8927-8932
3. 杨炼,张艳红,丁虎生.抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体在大肠杆菌中的表达及优化[J].微生物学报,2009,49(7):880-888
4. 刘蓉,杨炼,孙秀兰.应用抗黄曲霉毒素单链抗体检测酱油中黄曲霉毒素 B₁[J].食品工业科技 (已接收)
5. 王铁斌,丁虎生,杨炼.抗黄曲霉毒素 B₁ 单链抗体的筛选和鉴定[J].微生物学报,2009,49(1):135-140
6. 纪卿,丁虎生,杨炼. 幽门螺旋杆菌单链抗体的筛选及鉴定[J].生物加工过程,2008,6(5):55-59
7. 杨炼,沈燕霆,李英雨.肌苷酸和鸟苷酸的热稳定性和酸稳定性[J].中国调味品产业,2009,31(11):46-48

附录二 scFv-H4模型的构建

1 scFv-H4 的 FR 的建模

抗体的 FR 是高度保守的序列，而抗体的一些 CDR 则有一些标准结构（canonical structure），可以依照这些标准结构可以对模型进行调整。将整个 scv-H4 分为 FR 和 6 个 CDR 分别进行优化。scFv-H4 的 FR 与已经测定结构的蛋白非常接近，轻链的 FR 与 6 已知结构的抗体只有 1 个氨基酸的差别（表 1），而重链 FR 与 5 已知结构的抗体差别小于 5 个氨基酸残基（表 2）。综合这些抗体的 FR 的结构，我们基本上就依照这些抗体构象所提供的数据来预测 scFv-H4 的构象。

表 1，scFv-H4 的轻链框架区与已测定结构的抗体的序列比对。

Tab 1 the sequential alignment between the light chain FR of scFv-H4 with known structures.

No.	PDB	Identity	Align length	Mismatches	Gap openings	E val	Bit score
1	1za3	98.39	62	1	0	0.0e+00	127.00
2	1tzi	98.39	62	1	0	0.0e+00	127.00
3	1tzh	98.39	62	1	0	0.0e+00	127.00
4	1s78	98.39	62	1	0	0.0e+00	127.00
5	1l7i	98.39	62	1	0	0.0e+00	127.00
6	1hez	98.39	62	1	0	0.0e+00	127.00
7	1fgv	96.77	62	2	0	0.0e+00	127.00

表 2，scFv-H4 的重链框架区与已测定结构的抗体序列比对。

Tab 2 the sequential alignment between VH FRs with the protein with known structures.

No.	PDB	Identity	Align length	Mismatches	Gap openings	E val	Bit score
1	2v7n	95.52	67	3	0	0.0e+00	136.00
2	1mhp	94.03	67	4	0	0.0e+00	135.00
3	1igm	94.03	67	4	0	0.0e+00	135.00
4	1hez	92.54	67	5	0	0.0e+00	132.00
5	1dee	92.54	67	5	0	0.0e+00	132.00
6	1fvd	91.04	67	6	0	0.0e+00	130.00
7	1s78	89.55	67	7	0	0.0e+00	129.00

2 scFv 的 CDR L1 的建模

κ 链的CDR L1的包裹在V κ 的顶部，连接两个 β -片层结构。CDR L1位于L24到L34之间，这个区域内氨基酸的数目会有所变化。在抗体基因重排的时候，在L27有所增加或删减而在L30也发现了插入或删减。由于L26到L32的氨基酸残基在 β -片层以外，所以它们可能会呈现不同的构象。 κ 链的CDR L1一共有6种标准结构，他们在L30位和L31位之间的氨基酸残基数目不同。scFv-H4在L30和L31之间只有一个氨基酸残基，属于标准结构2。人的V κ 在CDR L1处一般采用2、3、4和6标准结构。研究表明在所有6种结构中，L26~L29和L32的构象都是一样的。L26~L29采用一种舒展的构象，L29~L32的氨基酸残基形成一个短连接或发夹环，其中标准结构1、2、3和4都已经X射线衍射测定了精确的结构。标准结构2有A型和B型两种，他们在L30，L31

之间的肽键构象不同，这与L71位的氨基酸残基有关。在B型中，L71的Tyr的羟基和L30氨基酸残基的羰基之间形成氢键；而在A型中，L71为Phe，不能形成氢键，肽键相对于B型就旋转了170°。在scFv-H4轻链的L71位为Phe，所以是标准结构2的A型。L29的N与L32的O的氢键对维持这个CDR L1的构象有重要的作用。

将H4与氨基酸序列最接近的7个已知结构的蛋白进行对比（表3），序列比对的结果表明H4与许多抗体在CDR L1的序列上没有太大的变化，与1rzi完全一致。将这七个蛋白质的CDR L1主链上的每个氨基酸残基酰胺键的二面角归纳得到了一个CDR L1上每个氨基酸残基的构象（表4），由此可以获得scFv-H4的CDR L1的氨基酸残基主链的构象。

表3，scFv-H4与已知结构的7种抗体的CDR L1同源比对的结果

Tab. 3 The CDR L1 sequential alignment between scFv-H4 and other antibodies of known structure

抗体	CDR L1	相似度	比较长度	错配	断开	E 值	对比分数
H4	RASQSISSYLN						
1rzi	RASQSISSYLN	100.00	11	0	0	6.0e-07	36.70
1hez	RTSQSISSYLN	90.91	11	1	0	5.0e-06	33.70
1dee	RTSQSISSYLN	90.91	11	1	0	5.0e-06	33.70
2f19	RASQDISNYLN	81.82	11	2	0	7.0e-05	29.90
1nmc	RASQDISNYLN	81.82	11	2	0	7.0e-05	29.90
1nmb	RASQDISNYLN	81.82	11	2	0	7.0e-05	29.90
1nma	RASQDISNYLN	81.82	11	2	0	7.0e-05	29.90

表 4 7种已知结构的抗体的CDR L1每个氨基酸残基二面角

Tab. 4 the dihedral angles of amino acid residues in CDR L1 of the 7 antibodies

残基位置	二面角	平均值	S.D.	二面角	平均值	S.D.
26	Φ	-80	10	Ψ	-20	33
27	Φ	-132	49	Ψ	166	8
28	Φ	-72	9	Ψ	128	3
29	Φ	-112	8	Ψ	6	6
30	Φ	56	16	Ψ	-120	2
31	Φ	-126	16	Ψ	21	20
32	Φ	-88	5	Ψ	73	4

3 scFv 的 CDR L2 的建模

CDR L2是连接框架区C'和C''的一个发夹形的片段。Kabat等人根据序列的变化性，将轻链的L50到L56之间定义为第二可变区，他们位于β-折叠片之外，可能会有多种构象。L49和L50的氨基酸残基通过主链上的两个氢键彼此相连，形成发夹结构。将scFv-H4与同源性最高的7个已知结构的蛋白进行对比发现CDR L2的变化主要集中在L50和L53之间（表5），这两个位点是抗原结合性能改造的热点位置。将这七个蛋白质的CDR L2主链上的每个氨基酸残基酰胺键的二面角归纳得到了一个CDR L2上每个氨基酸残基可能的走势，由此可以获得scFv-H4的CDR L2的氨基酸残基主链的构象（表6）。

表 5 H4 与已知结构的 7 种抗体的 CDR L2 同源比对的结果

Tab. 5 The CDR L2 sequential alignment between H4 and other antibodies of known structure

抗体	CDR L2	相似度	比较长度	错配	断开	E 值	对比分数
H4	RASHLQS						
lrei	-ASNLQ---	80.00	5	1	0	1.1e+00	14.60
lbww	-ASNLQ---	80.00	5	1	0	1.1e+00	14.60
lrzi	-ASSLQS-	83.33	6	1	0	1.1e+00	14.60
lhez	-ASSLQS-	83.33	6	1	0	1.1e+00	14.60
ldql	-ASSLQS-	83.33	6	1	0	1.1e+00	14.60
ldee	-ASSLQS-	83.33	6	1	0	1.1e+00	14.60
lrz7	-ASTLQS-	83.33	6	1	0	1.4e+00	14.20

表6 7种已知结构的抗体的CDR L2每个氨基酸主链氨基酸残基二面角的

Tab. 6 The dihedral angles of amino acid residues in CDR L2 of the 7 antibodies

残基位置	二面角	平均值	S.D.	二面角	平均值	S.D.
49	Φ	7	7	Ψ	158	9
50	Φ	8	8	Ψ	50	9
51	Φ	7	7	Ψ	-40	19
52	Φ	15	15	Ψ	2	15
53	Φ	10	10	Ψ	126	11

4 scFv 的 CDR L3 的建模

Kabat将轻链的L89到L96之间定义为CDR L3。该片段整体的构象也是一个种发夹环，连接框架区的F链和G链，CDR L3上的残基在 β 片层之外，在L91到L93可能会采用多种不同的构象。目前为止，已经发现CDR L3有6种标准结构，其中标准结构1是V κ L3中最常见的。QL90对维持该区域的结构非常重要，QL90主链上的N与L97主链上的O形成氢键，QL90的羰基与L97位主链上的N形成氢键，侧链上的OE1，N分别与L92位主链上的N，L95主链上的O形成氢键。

根据同一文库筛选到的，针对不同抗原的单链抗体的序列分析，L91~L93和L96为具有显著的多样性（表7），而FL95结构保守（数据未给出）。而在同源性比对中，VL96也比较保守，如抗人血管内皮细胞生长因子（hVEGF）的Fab 的96位都是V，所以91~93位也可能是我们研究scFv-H4和AFB₁结合的关键位点。

表7 H4与已知结构的7种抗体的CDR L3同源比对的结果

Tab. 7 the sequential alignment between CDR L3 of H4 and other antibodies of known structure

抗体	CDR L3	相似度	比较长度	错配	断开	E 值	对比分数
H4	QQATASPVT						
ltzi	-----GLSSPVT	71.43	7	2	0	7.4e-01	15.90
luwg	-----PVT	100.00	3	0	0	7.7e+00	12.50
luwe	-----PVT	100.00	3	0	0	7.7e+00	12.50
lqlr	HQGLSSPVT	55.56	9	4	0	1.0e+01	12.10
ldn0	HQGLSSPVT	55.56	9	4	0	1.0e+01	12.10
lrzg	-----GLSSPVT	57.14	7	3	0	2.5e+01	10.80
lrhh	-----GLSSPVT	57.14	7	3	0	6.1e+01	9.50

表8 7种已知结构的抗体的CDR L3每个氨基酸主链氨基酸残基二面角

Tab. 8 the dihedral angles of amino acid residues in CDR L3 of the 7 antibodies

残基位置	二面角	平均值	S.D.	二面角	平均值	S.D.
90	Φ	-96	19	Ψ	131	16
91	Φ	-122	13	Ψ	25	12
92	Φ	-91	23	Ψ	-39	12
93	Φ	-128	17	Ψ	145	22
94	Φ	-86	9	Ψ	140	9
95	Φ	-74	6	Ψ	144	7
96	Φ	-66	9	Ψ	136	8
97	Φ	-130	6	Ψ	148	9

5 scFv 的 CDR H1 的建模

重链的 CDR H1 片段处于 VH 结构域的顶部, 连接两个 β -折叠片结构。根据 Kabat 的结论, H31 到 H35 为重链的 CDR H1。根据已报道的结果, 在 H35 后可能会插入两个氨基酸残基, 在 H31 也可能会有氨基酸残基的插入, 所以 L26 到 L32 都在 β -片层框架区以外, 所以 CDR H1 构象可能会有多种变化。CDR H1 一共有三种标准结构, 标准结构 1 是最常见的, 而其他两种较为少见。属于标准结构 1 的蛋白质的结构之间的多样性明显要高于其他两种标准结构, 这可能是由于 L24、L29 和 L34 多为疏水氨基酸, 而疏水氨基酸的残基之间尺寸差异比较大。将 scFv-H4 与同源性最高的 7 个已知结构的蛋白进行对比 (表 9)。这七个已知结构的蛋白质的 CDR H2 主链上的每个氨基酸残基酰胺键的二面角 (表 10) 归纳得到了一个 CDR H1 上每个氨基酸残基可能的走势, 由此可以模拟 scFv-H4 的 CDR H1 的氨基酸残基主链的构象。

表 9 scFv-H4 与已知结构的 7 种抗体的 CDR H1 同源比对的结果

Tab. 9 The CDR L3 sequential alignment between H4 and antibodies of kwon structure

抗体	CDR H1	相似度	比较长度	错配	断开	E 值	对比分数
H4	GFTFSSYAMS						
1kfa	GFTFSSYAMS	100.00	10	0	0	1.0e-06	35.40
1h3p	GFTFSSYAMS	100.00	10	0	0	1.0e-06	35.40
1dql	GFTFSSYAM-	100.00	9	0	0	7.0e-06	32.90
1qle	GFTFSSYTMS	90.00	10	1	0	9.0e-06	32.50
1mqk	GFTFSSYTMS	90.00	10	1	0	9.0e-06	32.50
1h0d	GFTFSSYTMS	90.00	10	1	0	9.0e-06	32.50
1ejo	GFTFSSYTMS	90.00	10	1	0	9.0e-06	32.50

表10 7种已知结构的抗体的CDR H1每个氨基酸主链氨基酸残基二面角

Tab. 10 the dihedral angles of amino acid residues in CDR L3 of the 7 antibodies

残基位置	二面角	平均值	S.D.	二面角	平均值	S.D.
26	Φ	90	8	Ψ	6	16
27	Φ	-158	8	Ψ	157	42
28	Φ	-88	16	Ψ	111	19
29	Φ	-54	13	Ψ	-40	13
30	Φ	-71	13	Ψ	-9	17
31	Φ	-98	15	Ψ	-6	18
32	Φ	-125	14	Ψ	148	11

6 scFv 的 CDR H2 的建模

Kabat 等人将 H50 到 H65 定义为重链的 CDR H2。后来人们发现 H56 到 H58 的氨基酸残基形成一个短的 C α 股结构，而构象的变化主要集中在 H52 和 H56 之间。在此区域，目前发现了 4 种标准结构。其中，标准结构 1 形成一个环状结构，是标准结构中最短的一种，其中 H52 的 O 和 H55 的 N 之间的氢键，H52 的 N 和 H56 的 O 之间的氢键是此类转角中常见的。

将 scFv-H4 与 CDR H2 氨基酸序列最接近的 7 个已知结构的蛋白进行对比(表 11)。scFv-H4 与许多抗体在 CDR H2 的序列上的变化主要集中在 50 位和 53 位。将七个已知结构的蛋白质的 CDR H3 主链上的每个氨基酸残基酰胺键的二面角(表 12)归纳得到了一个 CDR H2 氨基酸残基可能的构象，由此可以获得 scFv-H4 的 CDR H2 的氨基酸残基主链的构象。

表 11 H4 与已知结构的 7 种抗体的 CDR H2 同源比对的结果

Tab.11 The CDR L3 sequential alignment between H4 and antibodies of known structure

抗体	CDR H2	相似度	比较长度	错配	断开	E 值	对比分数
H4	SITGAGGGTRYADSVKG						
1sjx	--ITSGGSTLYADSVKG--	75.00	15	3	1	6.0e-06	33.70
1bzq	----GGGTLYADSVKG----	91.67	12	1	0	3.0e-05	31.60
1fgv	-----GGTSYADSVKG-----	90.91	11	1	0	4.0e-05	31.20
1i3v	-----TRYADSVKG-----	100.00	9	0	0	5.0e-05	30.80
1i3u	-----TRYADSVKG-----	100.00	9	0	0	5.0e-05	30.80
1n8z	-----TRYADSVKG-----	100.00	9	0	0	5.0e-05	30.80
1fve	-----TRYADSVKG-----	100.00	9	0	0	5.0e-05	30.80

表12 7种已知结构的抗体的CDR H2每个氨基酸主链氨基酸残基二面角

Tab.12 The dihedral angles of amino acid residues in CDR H2 of the 7 antibodies

残基位置	二面角	平均值	S.D.	二面角	平均值	S.D.
52	Φ	-62	7	Ψ	156	10
52a	Φ	-50	9	Ψ	-37	8
53	Φ	-100	12	Ψ	8	21
54	Φ	-76	17	Ψ	-5	10
55	Φ	-71	3	Ψ	-27	8
56	Φ	-138	22	Ψ	140	17

7 scFv 的 CDR H3 的建模

CDR H3 是位于 F 股和 G 股之间的一个发夹型的结构。根据氨基酸的变化, Kabat 将 H95 到 H102 定义为 CDR H3, 是抗体变化最为多样的区域, 缺乏相对恒定的标准结构。人们对 CDR H3 的功能和结构之间的关系也知之甚少。Kabat 将 H100 以后的一些参加的插入命名为 H100a, H100b, H100c, 等。在 H92 到 H96 与 H100y-H100z-H101 位到 104 位之间形成一种扭结的结构, 几乎所有的 CDR3 H3 都采用这样的结构。CDR H3 结构的算法与前面的几个 CDR 有所不同, 因为 scFV-H4 的 CDR H3 较短, 只有 7 个氨基酸残基, 我们采用的 Calpha-Calpha 数据库搜索, 获得 10 个模板 CDR H3 (图 4-2)。搜索到的结构进行能量比对, 找到能量最低的结构。

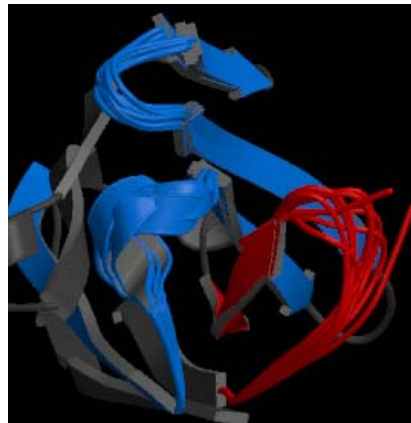


图 4-2 Calpha-Calpha 数据库中获得的 10 个序列和结构同源性最高的主链结构(红色片段)。
Fig. 4-2 the ten CDR H3 structures (highlighted in red) with highest sequential and structural homology in Calpha-Calpha database.

将 FR 和 CDR 进行拼接并能量优化获得 scFv-H4 的结构如图 4-3。

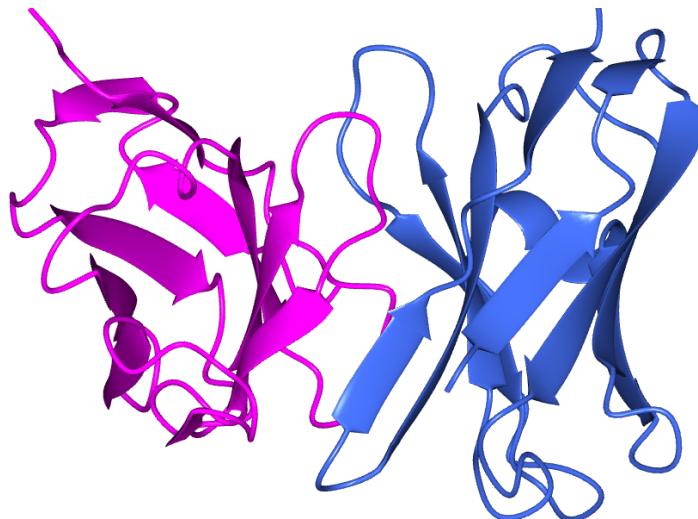


图 4-3 有同源建模获得的 scFv-H4 的主链结构模型
Fig. 4-3 the main chain structure of scFv-H4 induced by homology modeling

附录三 缩略语表

AFB1	黄曲霉毒素 B1	PEG	聚乙二醇
AFB2	黄曲霉毒素 B2	PFU	噬菌斑形成单位
AFB1-BSA	黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白结合物	RBS	核糖体结合位点
AFB1-N7-Gua	黄曲霉毒素鸟嘌呤结合物	RIA	放射免疫分析法
AFB1-ALB	黄曲霉毒素 B1-白蛋白结合物	RT-PCR	反转录聚合酶链式反应
AFB1-FAPY	黄曲霉毒素 B1-甲酰胺基嘧啶结合物	RPB	兔磷酸化酶
AFBO	8,9-黄曲霉毒素 B1 环氧化合物	scFv	单链抗体
AFG1	黄曲霉毒素 G1	SDS	十二烷基磺酸钠
AFG2	黄曲霉毒素 G2	SPR	表面等离子共振
AFM1	黄曲霉毒素 M1	TCP	全细胞蛋白
AFM1	黄曲霉毒素 M2	TLC	薄层色谱
AFT	黄曲霉毒素	TMB	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
Amp	氨苄青霉素	<i>trxB</i>	硫氧蛋白还原酶
VdW	范德华力	VH	重链可变区
BCA	牛碳酸酐酶	VL	轻链可变区
BSA	牛血清白蛋白	WHO	世界卫生组织
CDR	互补决定区	Y_{\max}	最大发光强度
3-D	三维	λ_{\max}	最大发射波长
DGGE	变性梯度凝胶电泳		
dscFv-H4	含结构域间二硫键的单链抗体		
E.coli	大肠杆菌		
EDTA	乙二胺四乙酸		
ELISA	酶联免疫法		
FAO	世界粮农组织		
FR	框架结构		
GdnHCl ₅₀	50%的蛋白变性时盐酸胍的浓度		
<i>gor</i>	谷胱甘肽还原酶		
HB	氢键		
HBV	乙肝病毒		
His	组氨酸标签		
HCC			
HPLC	高效液相色谱		
HVR	高变区		
IgSF	免疫球蛋白超家族		
IPTG	异丙基-B-D-硫代半乳糖苷		
Kana	卡那霉素		
LC	液相色谱		
LC-MASS	液相色谱-质谱连用		
MPBS	含 2%的脱脂乳的 PBS		
NCBI	美国国立生物信息中心网站		
IAC	亲和层析		
IC50	半抑制浓度		
OD	光密度		
PBS	磷酸盐缓冲液		
PBST	含 0.1%的吐温 20 的 PBS		
PCR	聚合酶链式反应		
PDB	蛋白质数据库		