

## 抗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 单链抗体的筛选和鉴定

王铁斌, 丁虎生, 杨炼, 纪卿, 陈卫\*, 张灏

(江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

**摘要** 【目的】从 Tomlinson (I) 噬菌体抗体库中筛选人源化抗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 单链抗体蛋白(scFv)并进行鉴定。【方法】分别采用甘氨酸洗脱、胰蛋白酶洗脱、游离 AFB<sub>1</sub> 竞争洗脱和 AFB<sub>1</sub> 竞争洗脱加胰蛋白酶处理 4 种方法对噬菌体抗体进行特异性洗脱。将筛选到的噬菌体阳性克隆转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) HB2151, IPTG 诱导表达 scFv。ELISA 检测和基因序列测定。【结果】比较 4 种洗脱方法, 发现用 AFB<sub>1</sub> 竞争加胰蛋白酶洗脱筛选到阳性克隆的概率最高, 把此方法得到的阳性噬菌体克隆转化大肠杆菌 HB2151 表达, 竞争性 ELISA 检测得到 2 个能特异性结合游离的 AFB<sub>1</sub> 阳性克隆。间接性 ELISA 测定相对亲和力分别为 0.4 μg/mL 和 0.7 μg/mL。测序证实 scFv 属于人类免疫球蛋白可变区。【结论】利用噬菌体展示技术获得高特异性抗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的人源化单链抗体, 本实验方法可以为其它抗半抗原重组抗体的筛选提供一定的借鉴意义。

**关键词:** 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 重组抗体, 筛选, 鉴定

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0135-06

黄曲霉毒素(Aflatoxin)是一组化学结构类似的化合物,目前已分离鉴定出 12 种,包括 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、P<sub>1</sub>、Q、H<sub>1</sub>、GM、B<sub>2</sub>a 和毒醇。黄曲霉毒素的基本结构为二呋喃环和香豆素, B<sub>1</sub> 是二氢呋喃氧杂萘邻酮的衍生物。即含有一个双呋喃环和一个氧杂萘邻酮(香豆素),前者为基本毒性结构,后者与致癌有关。M<sub>1</sub> 是黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 在体内经过羟化而衍生的代谢产物。黄曲霉毒素的主要分子型式含 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 等。被 WHO 癌症研究机构划定为 I 类致癌物,与乙型肝炎病毒一起成为肝癌的两大诱因<sup>[1]</sup>。非常不幸,食品中的黄曲霉污染十分常见,如粮食、油料作物、坚果等。因此,对食品中黄曲霉含量进行检测是一项很重要的工作<sup>[2]</sup>。

现在检测食品中农药残留和毒素残留的方法主要是色谱方法,如黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的检测

采用的是薄层色谱法,薄层色谱法、高效液相色谱法和荧光光度法(GB/T 5009.23-1996;GB/T 5009.24-2003)。但是这些方法存在一些不足,比如灵敏度不高、样品预处理繁杂、其他物质干扰较大等。而一些地方标准(如浙江省)已经开始探索才用酶联免疫吸附法来检测黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>(DB33/T 556-2005)。事实上,由于抗体的高度特异性和灵敏性,免疫化学分析法非常适用于建立快速、准确、廉价、有公信力检测方法。近十年来,测定黄曲霉毒素的方法发展很快,其中以免疫化学方法发展尤其迅速。用于黄曲霉毒素测定的免疫化学方法主要有酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)、时间分辨荧光免疫测定法(TR-FLA)、荧光偏振免疫测定法(FPIA)、流动注射免疫测定法(FI-IA)<sup>[3]</sup>。获得高质量的黄曲霉毒素的特异性抗体是上述研究方法的保证。

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目(NCET-06-0482)

\* 通信作者。Fax: +86-510-85912155; E-mail: weichen@jiangnan.edu.cn

作者简介:王铁斌(1982-)女,内蒙古赤峰市人,硕士研究生,研究方向为微生物学。E-mail: wangtiebin00@sina.com

收稿日期:2008-07-03;修回日期:2008-09-28

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

**1.1.1 实验材料:**筛选的出发文库为:Tomlinson(1) scFv 文库(库容为  $1.4 \times 10^8$ ) 大肠杆菌 TG1 (*Escherichia coli* TG1)和辅助噬菌体 KM13(KM13 Help Phage)均购自于英国剑桥大学 MRC 分子生物学实验室。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**大肠杆菌 HB2151 (*Escherichia coli* HB2151)辣根过氧化酶耦联的抗 M13 抗体(HRP/Anti-M13)单克隆抗体和辣根过氧化酶耦联的蛋白 A(HRP/Protein A)购于 GE Healthcare 游离 Aflatoxin B<sub>1</sub> 和 Aflatoxin B<sub>1</sub>-BSA 复合物购于 Sigma 酶标板购于 Nunc 公司,脱脂乳、琼脂糖和质粒抽提试剂盒,购自于上海生物工程技术服务有限公司,其他试剂均为国产分析纯。凝胶成像系统 GelDocXR(美国 BIO-RAD 公司)和核酸电泳仪(美国 BIO-RAD 公司),PCR 仪 G-Strom(英国 GRI 公司),酶标仪 Thermo Multiskan MK3(美国 Thermo 公司)。

## 1.2 单链噬菌体抗体阳性克隆的筛选

取  $3 \mu\text{L}$   $2 \text{ mg/mL}$  的结合牛血清白蛋白的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>-BSA)复合物包被 Maxisorp 96 孔板(Nunc), $37^\circ\text{C}$  温育 2 h。抗体与抗原反应前需经过 BSA 和 MPBS 两步前吸附以去除抗 BSA 和 MPBS 的噬菌体抗体,避免后续实验发生交叉反应。最后分别用  $50 \mu\text{L}$  甘氨酸缓冲液、 $10 \text{ mg/mL}$  胰蛋白酶、 $10 \mu\text{g/mL}$  AFB<sub>1</sub> 和  $10 \mu\text{g/mL}$  AFB<sub>1</sub> 竞争洗脱后用  $10 \text{ mg/mL}$  胰蛋白酶在  $37^\circ\text{C}$  水浴处理 30 min 4 种洗脱方式。其余的步骤按常规的“吸附-洗脱-扩增<sup>[4]</sup>”程序对原始噬菌体抗体库重复进行 3 轮筛选。以选取一种最优的洗脱方法筛选特异性单链抗体。

## 1.3 单链抗体的可溶性表达和纯化

scFv 是由 VH 和 VL 中间加一段 Linker 构成,具有免疫原性低、穿透力强等优点,利于作为“导向载体”等应用于人体。在构建噬菌体抗体载体时,在抗体基因与 g<sub>III</sub> 基因之间引入了一个琥珀终止密码子,在含有琥珀抑制基因的宿主菌中,抗体基因和编码 g<sub>III</sub> 的基因可以被转录翻译,这时抗体就能借助噬菌体外壳蛋白呈现在噬菌体表面,而在不带有琥珀抑制基因的宿主菌 HB2151 中,由于终止密码子的存在,抗体分子不与 g<sub>III</sub> 融合表达,在信号肽介导下分泌到质周腔中进行折叠,产生抗体片段<sup>[5]</sup>。

从每种洗脱方法的第三轮测定洗脱滴度的平板

上随机挑选 46 个克隆到 96 孔板,在实验中,以相同浓度的 BSA 代替 AFB<sub>1</sub>-BSA 作为阴性对照,而未加 AFB<sub>1</sub>-BSA 的孔作为空白对照。实验测得的 P/N(阳性克隆吸光值-空白对照吸光值/阴性对照吸光值-空白对照吸光值)大于 4 的为噬菌体阳性克隆<sup>[4]</sup>。比较四种洗脱方法获得阳性克隆的概率。

将获得阳性克隆概率最高的洗脱方法中的阳性克隆转化到 *E. coli* HB2151 中进行可溶性表达, $37^\circ\text{C}$  培养到  $OD_{600} = 0.9$  (约 3 h)后,加入  $4 \text{ mL}$   $2 \times \text{TY}$  培养基( $100 \mu\text{g/mL}$  氨苄青霉素和  $9 \text{ mmol/L}$  异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷) $30^\circ\text{C}$  震荡培养过夜。次日离心取上清保存在  $4^\circ\text{C}$ ,沉淀用  $30 \text{ mL}$  细菌裂液( $1\%$  曲拉通 X-100, $0.2 \text{ mol/L}$  乙二氨四乙酸, $10 \text{ mg/mL}$  的溶菌酶)悬浮,置于  $-70^\circ\text{C}$  反复冻融 10 次后离心。ELISA 测定沉淀上清和培养基上清,以检测 scFv 在细胞内的分泌情况。

以 Ni-NTA agarose 装柱,用结合缓冲液( $\text{pH } 7.7$ ,  $20 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl, $0.5 \text{ mmol/L}$  NaCl)平衡后,加入上述培养基上清和菌体沉淀上清。上样完毕后用结合缓冲液洗涤,再用洗涤缓冲液( $\text{pH } 7.7$ ,  $20 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl, $0.5 \text{ mmol/L}$  NaCl, $50 \text{ mmol/L}$  的咪唑洗脱缓冲液)洗涤,最后用洗脱缓冲液( $\text{pH } 7.7$ ,  $20 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl, $0.5 \text{ mmol/L}$  NaCl, $1 \text{ mol/L}$  的咪唑洗脱目的蛋白)取  $20 \mu\text{L}$  SDS-PAGE 电泳分析。

## 1.4 竞争性 ELISA 鉴定特异性结合的 scFv

用  $3 \mu\text{L}$   $2 \text{ mg/mL}$  的 AFB<sub>1</sub>-BSA 包被 ELISA 板, $37^\circ\text{C}$  温育 2 h。取  $10 \mu\text{L}$  经镍柱纯化的 scFv 分别与游离的  $1 \mu\text{g/mL}$  AFB<sub>1</sub>、 $100 \text{ ng/mL}$  的 AFB<sub>1</sub> 进行竞争性 ELISA 反应,以获得与游离 AFB<sub>1</sub> 特异性结合的 scFv。scFv 分别与 PBS、 $1 \mu\text{g/mL}$  AFB<sub>1</sub>、 $100 \text{ ng/mL}$  AFB<sub>1</sub>  $37^\circ\text{C}$  温育 1 h 后再加入到包被有 AFB<sub>1</sub>-BSA 的孔里进行竞争性反应,二抗用 HRP/Protein A 代替 HRP/anti-M13 外其余步骤同单克隆 ELISA。

## 1.5 间接性 ELISA 测定 scFv 的相对亲和力

将 2 个阳性克隆用 PBS 分别稀释成  $100 \text{ mg/L}$ 、 $10 \text{ mg/L}$ 、 $1 \text{ mg/L}$ 、 $0.1 \text{ mg/L}$ 、 $0.01 \text{ mg/L}$  和  $0.001 \text{ mg/L}$ ,间接性 ELISA 测定<sup>[6]</sup>。用  $3 \mu\text{L}$   $2 \text{ mg/mL}$  的 AFB<sub>1</sub>-BSA 包被 ELISA 板, $37^\circ\text{C}$  温育 2 h。PBS 洗 3 遍,然后用  $400 \mu\text{L}$   $2\%$  的 MPBS 溶液  $37^\circ\text{C}$  封闭 2 h,PBS 洗 3 遍。依次加入不同浓度的 scFv, $37^\circ\text{C}$  水浴中 2 h。其余步骤同单克隆 ELISA 鉴定。在酶标仪上读取  $450 \text{ nm}$  和  $650 \text{ nm}$  处的吸光值。结果以与 AFB<sub>1</sub>-BSA 抗原出现 50% 结合时的 scFv 的浓度为相对亲和力。

## 1.6 酶切和 PCR 鉴定阳性克隆

对筛选到的阳性克隆抽提质粒,经 NcoII + NotI 和 SalI + NotI 双酶切鉴定正确后进行 PCR 扩增。抗体重链可变区 VH 上游引物:5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', VH 下游引物:5'-CGACCC GCCACCGCCGCT G-3', 抗体轻链可变区 VL 上游引物:5'-CATCTGTAGGAGACAGAGTC-3', VL 下游引物:5'-CTATGCGGCCCCATTCA-3'; scFv DNA 上游引物:5'-CAGGAA ACAGCTATGAC-3', scFv DNA 下游引物:5'-CTATGCGGCCCCATT CA-3'。扩增条件:95℃ 60 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环 30 次, 72℃ 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。

## 1.7 DNA 测序

将质粒送往上海生工测序部采用双脱氧末端终止法进行 DNA 测序,测序引物为:5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'和 5'-CTATGCGGCCCCATTCA-3'。对测定的序列在 GenBank 中进行比较,确定其与人类免疫球蛋白基因的符合情况。

## 2 结果

### 2.1 噬菌体抗体阳性克隆的筛选

从第一轮筛选结果来看,用游离 AFB<sub>1</sub> 竞争洗脱下来的噬菌体滴度比用甘氨酸缓冲液洗脱低一个数量级,但是比用胰蛋白酶洗脱高一个数量级。这说明竞争洗脱下来的噬菌体包含了大量未展示 scFv 的噬菌体,这主要是因为竞争洗脱的时间比较长(6 h),也可能是由于噬菌体之间相互纠缠的结果。用游离 AFB<sub>1</sub> 竞争洗脱后用胰蛋白酶处理得到的噬菌体滴度最低,再次说明了仅用游离 AFB<sub>1</sub> 洗脱下来的噬菌体中含有许多未展示 scFv 的噬菌体。

表 1 洗脱方式对筛选结果的影响

Table 1 Influence of elution methods on phage titers

Screening rounds	Phage titers/(cfu)			
	Glycine buffer elution	Trypsin elution	AFB <sub>1</sub> competitive elution	Competitive elution following trypsin elution
1	$3.7 \times 10^7$	$2.4 \times 10^5$	$9.6 \times 10^6$	$7.6 \times 10^4$
2	$6.9 \times 10^8$	$3.7 \times 10^7$	$4.8 \times 10^7$	$2.0 \times 10^5$
3	$4.9 \times 10^9$	$5.9 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$

### 2.2 scFv 的可溶性表达

经过 3 轮筛选,4 种方法中目标噬菌体均得到富集,单克隆 ELISA 鉴定每一轮筛选到噬菌体阳性克隆的概率。结果表明用游离 AFB<sub>1</sub> 竞争洗脱加胰蛋白酶处理筛选到的噬菌体阳性克隆概率最高,46 克隆中有 38 个是阳性克隆,同其它 3 种洗脱方法比

较,此种筛选方法效果较好。将 38 个阳性克隆转化到 HB2151,ELISA 测定培养基上清全为阴性,说明 scFv 未分泌至培养基中。但其中有 5 个阳性克隆的沉淀上清经间接性 ELISA 测定,P/N 大于 4,显较高阳性(图 1),而且与 BSA 无交叉反应。结果说明菌体周质腔分泌有 scFv,可用于后续的竞争性 ELISA 反应。

取 20 μL 经镍柱纯化和超滤浓缩的 scFv,SDS-PAGE 电泳分析(图 2)。在 30 kDa 左右出现目标条带,此目标条带出现的位置与预期实验结果相符,纯化后的蛋白可作为以后实验中的阳性对照。

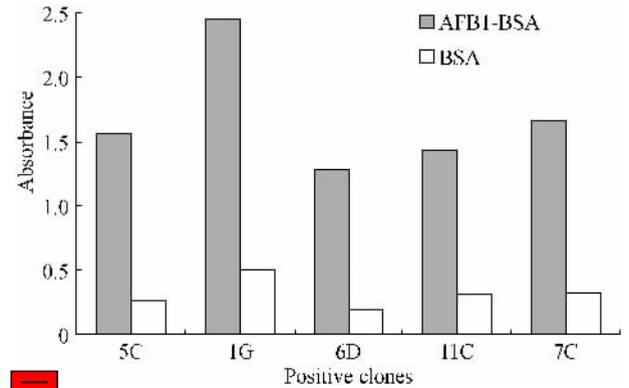


Fig. 1 阳性克隆与 AFB<sub>1</sub> 结合活性的 ELISA 鉴定

Fig. 1 Identification of positive clones by ELISA.

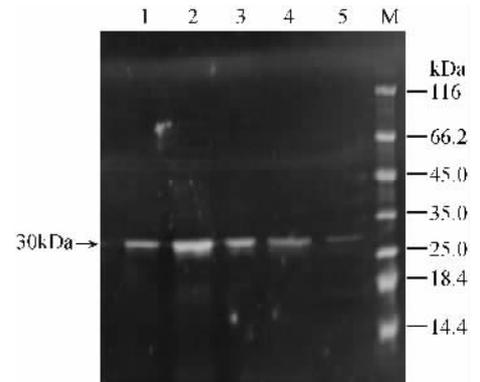


Fig. 2 SDS-PAGE 蛋白电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE. 1.1G; 2.5C; 3.7C; 4.11C; 5.6D; 6.Marker.

### 2.3 竞争性 ELISA 鉴定特异性 scFv

在 scFv 与 AFB<sub>1</sub> 和 AFB<sub>1</sub>-BSA 竞争性 ELISA 结合反应中,AFB<sub>1</sub> 对阳性克隆 5C、11C 抑制率达到 50% 以上。由于抗体针对 AFB<sub>1</sub> 有的特异性,优先与 AFB<sub>1</sub> 结合,AFB<sub>1</sub> 浓度增大,对应的信号值减小,抑制率明显增高。证明我们筛选到的 5C、11C 是特异性抗 AFB<sub>1</sub> 单链抗体。

在 scFv 与 AFB<sub>1</sub> 和 AFB<sub>1</sub>-BSA 竞争性 ELISA 结合反应中,AFB<sub>1</sub> 对阳性克隆 5C、11C 抑制率达到

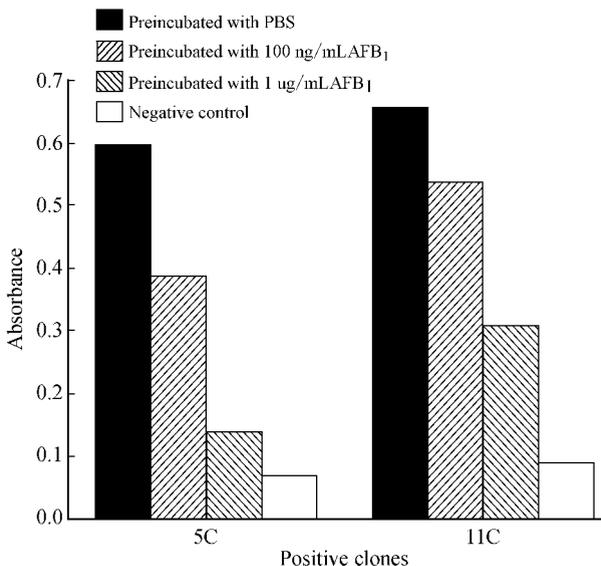


图3 竞争性ELISA检测AFB<sub>1</sub>对scFv的抑制作用

Fig.3 The inhibition of AFB<sub>1</sub> to scFv by competitive ELISA.

50%以上。由于抗体针对AFB<sub>1</sub>有的特异性,优先与AFB<sub>1</sub>结合,AFB<sub>1</sub>浓度增大,对应的信号值减小,抑制率明显增高。证明我们筛选到的5C、11C是特异性抗AFB<sub>1</sub>单链抗体。

#### 2.4 间接性ELISA测定scFv的相对亲和力

以ELISA间接法测定scFv浓度(mg/L)与其对应的吸光值作图,曲线趋于平坦时的吸光值作为100%,即抗原与抗体的结合已达到饱和状态,曲线上50%饱和度所对应的抗体浓度,即为该抗体的相对亲和力。亲和力越大,所需抗体的量越低。(图4)5C和11C的相对亲和力分别是0.4 μg/mL和0.7 μg/mL。5CscFv的相对亲和力较11C的稍高。

#### 2.5 PCR和酶切鉴定抗AFB<sub>1</sub>scFv的阳性克隆

将两个阳性克隆5C、11C抽提质粒,PCR和酶切

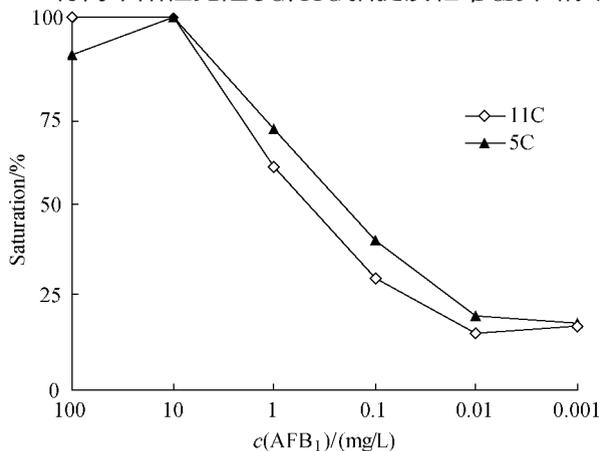


图4 单链抗体的相对亲和力测定

Fig.4 Relative affinities of scFv antibodies to AFB<sub>1</sub>.

鉴定,经2%琼脂糖凝胶电泳结果显示scFv扩增后的全长为900 bp左右,VH为500 bp左右,VL为350 bp左右。NcoII + NotI双酶切全长后单带出现在750 bp左右,Sal I + Not I双酶切VL得到的单带为320 bp左右(图略)。PCR和酶切鉴定说明两阳性克隆来源于购买的噬菌体抗体库,未发生污染。

#### 2.6 阳性克隆DNA序列的测定

阳性克隆经上海生工公司序列测定(已经申请到的基因库序列号:5C FJ357576;11C FJ357577)对两个阳性克隆序列比较分析后,确定筛选的单链抗体来源同一人源单链抗体噬菌体展示库,在筛选的过程中没有受到污染,同时也表明我们筛选的单链抗体是针对AFB<sub>1</sub>的scFv。此抗体经GenBank检索证实该克隆重链可变区与人免疫球蛋白IgG重链VH3-23 \* 01 5C有95.9%的同源性,11C有99.3%的同源性,轻链可变区与人免疫球蛋白k链KV1D39 \* 01 5C有98.5%同源性,11C有99.2%的同源性。根据同一基因家族同源性在85%以内,VH属于人免疫球蛋白VH3基因家族,轻链V区属于人免疫球蛋白Vk1基因家族。

### 3 讨论

作为第三代抗体制备技术,重组抗体技术大大的推进了免疫检测技术在食品安全方面的应用,特别是在获得一些针对毒素抗体方面具有独特的优势。这些毒素可能是由食品中的微生物产生的有害代谢产物,也可能是食品原料中残留的农药或者兽药,严重地威胁到人们的饮食安全,同时也给食品工业带来了巨大的损失。食品中的许多半抗原毒素不能直接免疫动物,需要与载体形成复合物后才具有免疫原性<sup>[7-8]</sup>,或者由于某些半抗原具有毒性,而不适宜直接免疫动物,以致抗该类半抗原的杂交瘤细胞难以获得。另外由杂交瘤获得的单克隆抗体的特性改造也比较困难,往往亲和力不高或者存在较严重的交叉反应。而采用抗体重组技术,不需要免疫动物,就能够较容易的获得一些通过免疫动物难以获得的抗体。

多年来利用噬菌体抗体库技术筛选得到的重组抗体,已经应用于疾病的诊断和食品的检测方面。抗体的可变区片段是保留抗体结合位点的最小片段,噬菌体展示技术得到的可溶性单链抗体分子量小,易于渗透。同时由于噬菌体可以在细菌中大量复制,随着细菌的快速繁殖,可以产生大量的scFv,而且整合有scFv片段的噬菌体载体可以长期稳定

的保存在细菌里<sup>[9]</sup>。

本实验是从大容量未经过免疫的合成抗体库中筛选抗 AFB<sub>1</sub> 抗体,不同的洗脱方式对筛选的效率至关重要,决定着筛选的成败,特别是在抗半抗原的 scFv 的筛选。由于噬菌体展示文库的筛选通常是扩增识别优势抗原表位的抗体片段,那些识别劣势的抗原表位的抗体很难筛选到<sup>[9]</sup>,试验中从第一轮筛选的计数结果可以看出,用甘氨酸缓冲液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的环境的 pH 值来解离抗原抗体结合,具有普遍性,但是在 3 种方法中选择性最差。胰蛋白酶洗脱是根据 scFv-pIII 融合蛋白结构和改造的辅助噬菌体 pIII 蛋白结构设计的。在大肠杆菌内,由噬菌粒 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。pIII-scFv 融合蛋白的胰蛋白酶酶切位点在 pIII 蛋白和 scFv 之间而改造的 pIII 蛋白的胰蛋白酶酶切位点位于 pIII 蛋白内部。噬菌体表面蛋白 pIII 负责侵染大肠杆菌,如果 pIII 蛋白的结构遭到破坏,噬菌体抗体就丧失了侵染的能力。而融合蛋白 pIII-scFv 酶切去掉 scFv 后,重新获得了侵染的能力。因此用胰蛋白酶洗脱获得只有展示了 scFv 的噬菌体抗体能侵染大肠杆菌,得到计数并获得扩增。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,这可能是由于 M13 是丝状噬菌体,相互缠绕的结果。针对抗半抗原的抗体筛选,竞争性洗脱加酶处理是常常采用的方案,这样的洗脱方法具有比较好的特异性。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在抗体的筛选过程中显得至关重要。

实验中我们将筛选到的 38 个阳性克隆转化到 HB2151 中, IPTG 诱导可溶性表达, SDS-PAGE 电泳分析在 30 kDa 左右出现目标条带,竞争性 ELISA 鉴定,得到 2 个能够和游离的 AFB<sub>1</sub> 特异性结合的阳性克隆,相对亲和力分别是 0.4 μg/mL 和 0.7 μg/mL。序列测定后,证实两克隆属于人类免疫球蛋白可变区。得到高质量的抗游离 AFB<sub>1</sub> 的单链抗体,进一步克隆出全长免疫球蛋白就变的很简单,因为可变

区知道了,融合上抗体基因的恒定区就可以轻易完成<sup>[10]</sup>。所以利用噬菌体抗体库技术筛选抗 AFB<sub>1</sub> 的 scFv 是即经济又简便易行的方法。而且我们筛选到的抗体是单克隆 scFv,相对于免疫动物得到的多克隆抗体具有更高的特异性,并可以通过分子生物学方法对其特异性进行定向改造,从而进一步开发用于检测食品中 AFB<sub>1</sub> 抗体的潜力。

## 参考文献

- [ 1 ] Qian GS, Ross RK, Yu MC, et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*, 1994, 3: 3-10.
- [ 2 ] Clegg BS, Stephenson GR, Hall JC. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Dicamba. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 49: 2168-2174.
- [ 3 ] 柳洁,何碧英. 黄曲霉毒素免疫化学分析方法研究进展. *现代预防医学( Modern Preventive Medicine )*, 2005, 32(5): 47-50.
- [ 4 ] Goletz S, Christensen PA, Kristensen P, et al. Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragment by phage display. *Journal of molecular biology*, 2002, 315: 1087-1097.
- [ 5 ] Wang D, Wong K, Wilkins J. Construction and expression of hu2ma $\beta$ 2integrin single chain Fv ( scFv ) antibody by phage display. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2001, 5: 5673-5679.
- [ 6 ] Beatty JD, Beatty BG, Vlahos W. Measurement of monoclonal antibody affinity by noncompetitive enzyme immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 1987, 100: 173-181.
- [ 7 ] Daly SJ, Dillon PP, Manning BM, et al. Production and characterization of murine single chain Fv antibodies to Aflatoxin B<sub>1</sub> derived from a pre-immunized antibody phage display library system. *Food and Agricultural Immunology*, 2002, 14: 255-274.
- [ 8 ] Moghaddam A, L?bersli I, Gebhardt K, et al. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B<sub>1</sub> from naive recombinant antibody libraries. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 254: 169-181.
- [ 9 ] 师珍艳,阴彬,魏群,等. 抗 SARS-CoV 病毒 N 蛋白的单链抗体( scFv )筛选. *基础医学与临床( Basic & Clinical Medicine )* 2007, 27(6): 32-35.

## Screening and identification of a single chain antibody fragment

Tiebin Wang, Husheng Ding, Lian Yang, Qing Ji, Wei Chen\*, Hao Zhang

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract [ Objective ]** To screen and identify anti - Aflatoxin B<sub>1</sub> single chain antibodies ( scFv ) from Tomlinson ( I ) library .

**[ Methods ]** The phages absorbed on the ELISA plate were eluted by four methods including glycine buffer elution , trypsin elution , AFB<sub>1</sub> competitive elution and competitive elution following trypsin treatment . The phage positive clones were transformed into Escherichia coli HB2151 and soluble scFv protein was expressed with the induction of Isopropyl β-D-1-Thiogalavtopy ranoside ( IPTG ). The scFv was identified by ELISA and DNA sequence . **[ Results ]** Comparing the four methods , we found that the most efficient way to get positive clones was competitive elution following trypsin treatment . Obtaining two positive clones that could bind specifically with free AFB<sub>1</sub> , which their relative affinity were 0.4 μg/mL and 0.7 μg/mL , respectively . DNA sequencing results showed that the scFv belonged to human immunoglobulin variable region . **[ Conclusion ]** The specific human scFv could be obtained with phage antibody library , and our method provided an alternative for screening recombinant antibody against anti-hapten .

**Keywords :** aflatoxin ; recombinant antibody ; screening ; identification

( 本文责编 : 王晋芳 )

Supported by the Program for the new century talents of the Ministry of Education( NCET-06-0482 )

\* Corresponding author. Tel/Fax : + 86-510-85912155 ; E-mail : weichen@jiangnan.edu.cn

Received : 3 July 2008 / Revised : 28 September 2008



### 科学出版社新书推介(2008-11)

薛庆中等 编著

978-7-03-022633-4 ¥48.00 2008年11月出版

内容简介: 全书分9章。第1章, 阐述序列比较的核心方法, 即运用 BLAST 和 ClustalX 等工具做序列比对。第2章, 重点介绍核苷酸序列分析工具, 主要包括: 基因可读框的识别, CpG 岛、转录终止信号和启动子区域的预测分析, 用 mRNA 序列预测基因等。第3章, 介绍电子克隆的概念和具体操作方法。第4章, 用 MEGA4 做分子进化遗传分析, 绘制系统进化树, 为研究基因进化打好基础。第5章, 对蛋白质基本理化性质、二级结构、结构域和三维空间结构、预测目标

蛋白的生物学功能等工具做逐一介绍。第6章, 通过 Gene Ontology 和 KEGG 两个数据库, 挖掘基因和蛋白质的功能并做代谢途径分析。第7章, 利用 X! Tandem 软件鉴定蛋白质的串联质谱数据, 进而预测蛋白质, 同时借助 TPP 软件包进行蛋白质组学数据统计学分析, 优化检索结果。第8章, 使用 TM4 软件实现芯片的数据采集和标准化处理, 并借助 GenMAPP 软件挖掘芯片数据的生物学意义。第9章, 通过 Cytoscape 软件演示, 介绍系统生物学分析概况, 展示蛋白质-蛋白质相互作用, 应用插件做网络结构分析。书后附有专业词中英文对照。

本书7是为从事生物学、医学、农学及计算机科学等领域研究的研究生、大学生、教师、医生、研究人员、计算机工作人员提供的通俗易懂的手册和工具。