

抗松材线虫纤维素酶单链抗体库的构建及筛选

Construction and Screening of Phage Display Single Chain Antibody Library Against *Bursaphelenchus xylophilus* Cellulase

田 旺, 张 奇, 杨文博, 白 钢*

TIAN Wang, ZHANG Qi, YANG Wen-Bo and BAI Gang*

南开大学生命科学学院, 天津 300071

College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

摘 要 构建鼠源性松材线虫纤维素酶(*Bursaphelenchus xylophilus* cellulase, BXC)的噬菌体单链抗体库,从中筛选特异性 BXC 的单链抗体。以 BXC 为抗原免疫 BALB/C 小鼠,从脾脏提取总 RNA,用 RT-PCR 技术扩增小鼠抗体重链(V_H)和轻链(V_L)可变区基因。经重叠 PCR(SOE PCR)在体外将 V_H 和 V_L 连接成单链抗体(scFv)基因,并克隆到噬菌粒载体 pCANTAB5E 中,电转化至大肠杆菌 TG1,经辅助噬菌体超感染,成功构建了库容为 5×10^4 的 Anti-BXC 单链抗体库,并从该抗体库中初步筛选到了特异性识别 BXC 的噬菌体单链抗体 scFv。将表面展示单链抗体的单克隆噬菌体转化大肠杆菌 HB2151 进行可溶性表达,SDS-PAGE 及 Western blot 分析结果显示,可溶性 scFv 获得表达,且与 BXC 具有结合活性,为松材线虫的检验检疫以及病理学研究奠定了基础。

关键词 松材线虫, 纤维素酶, 单链抗体, 噬菌体抗体库, 筛选

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0900-06

Abstract A phage display single-chain variable fragment(scFv) library against *Bursaphelenchus xylophilus* cellulase(BXC) was constructed and used to screen the specific antibodies binding to BXC. The total RNA was extracted from fresh spleens of BALB/C mice immunized with BXC. Gene fragments encoding V_H and V_L were amplified by RT-PCR and assembled into a single chain by overlapping PCR with a linker DNA encoding the peptide(Gly4Ser) β . The recombinant fragments were cloned into the phagemids(pCANTAB5E) and electroporated into *E. coli* TG1. The recombinant phagemids were rescued by reinfection of helper phage M13K07. The repertoire of the phage display antibody was about 5×10^4 . The specific antibodies against BXC were obtained after five rounds of affinity selection. The positive phage clone was used to infect *E. coli* HB2151. SDS-PAGE and western blot analysis showed that the soluble scFv antibodies expressed bound specifically to BXC. The studies laid foundation for quarantine and pathological study of *Bursaphelenchus xylophilus*.

Key words *Bursaphelenchus xylophilus* cellulase single chain antibody phage display antibody library screen

松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)是松树的一种灾难性病害的病原生物,是引发松树萎蔫病的主要原因,为林木检疫的重要对象之一^[1]。研究表

明,侵入松树体内的松材线虫所分泌的松材线虫纤维素酶(*Bursaphelenchus xylophilus* cellulase, BXC)能分解细胞壁的纤维素,并且能破坏木质部,在松木早

期致病过程中起到了关键作用,是导致松树死亡的重要致病物质之一^[2,3]。因此近年来对松材线虫纤维素酶的研究一直为松材线虫病病理学研究的一个热点。

噬菌体抗体库技术是20世纪90年代初发展起来的基因工程抗体技术。采用基因克隆技术将抗体可变区克隆出来,组装到表达载体内,并在噬菌体表面表达形成噬菌体抗体库。通过几轮“吸附、洗脱、扩增”重复的过程,从中筛选到特异性的噬菌体抗体。该技术为抗体的筛选提供了一种简便高效的方法^[4,5]。本实验以经BXC免疫的小鼠的脾脏总RNA为材料,构建Anti-BXC的噬菌体单链抗体库,筛选获得特异性识别BXC的单链抗体(scFv),为松材线虫的检验检疫以及病理学研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

噬菌粒载体PCANTAB5E、辅助噬菌体M13KO7、大肠杆菌*E. coli* TG1和*E. coli* HB2151以及HRP标记anti-Etag单抗为Pharmacia公司产品,RNA抽提试剂盒、M-MLV逆转录酶、Oligo(dT)₅为Promega公司产品,T4连接酶、*Sfi*I和*Not*I限制酶以及DNA purification system为大连宝生物公司产品,Taq DNA聚合酶为上海生工产品。

PCR引物为Pharmacia公司产品,其中Heavy primer1和Heavy primer2分别为V_H基因5'端和3'端引物,用来扩增鼠V_H基因;Light primer mix为10种V_L基因5'端和3'端引物的混合物,用来扩增鼠V_L基因;Linker primer mix为含有两条互补各有93个碱基、并带有Linker(G₄S)₃序列的V_H基因3'端和V_L基因5'端引物的混合物,该引物两端的各24个碱基分别与V_H和V_L基因的3'端和5'端互补,从而可将V_H和V_L基因片段拼接成scFv基因;RS primer mix为带有*Sfi*I位点的重链基因5'端引物和带有*Not*I位点的轻链基因3'端引物的混合物,用来扩增scFv基因片段同时可引入克隆位点。

1.2 方法

1.2.1 松材线虫纤维素酶(BXC)的分离纯化 按照文献[6]进行。

1.2.2 动物免疫及脾细胞总RNA的提取 取6周龄的雌性BALB/C小鼠,腹腔注射20μg经弗氏完全佐剂乳化的BXC,每2周以等量抗原加弗氏不完全佐剂加强免疫1次,每次免疫后的第3天采血,检测

血清抗体的效价。免疫10周后,取高滴度的小鼠,摘除脾脏,迅速提取总RNA。

1.2.3 V_H和V_L基因的扩增 以总RNA为模板,Oligo(dT)₅为引物,在M-MLV逆转录酶作用下反转录合成cDNA第一条链。以cDNA第一条链为模板,Heavy primer1、Heavy primer2和Light primer mix为引物分别扩增鼠的重链和轻链可变区基因。PCR条件为95℃预变性5min,94℃ 1min,55℃ 2min,72℃ 2min,共进行30个循环,72℃延伸10min。将PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,用DNA purification system纯化回收目的片段。

1.2.4 V_H和V_L基因的拼接及PCR扩增 将纯化回收的V_H和V_L片段与编码(Gly₄Ser)₃的linker以等摩尔浓度混合,经重叠延伸法将V_H、linker和V_L随机连接成scFv,并用RS primer mix为引物进行二次PCR,在scFv 5'端引入*Sfi*I酶切位点,3'端引入*Not*I酶切位点。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离后回收目的片段。

1.2.5 噬菌体抗体库的构建 用*Sfi*I和*Not*I酶切scFv基因片段,并与经同样双酶切的PCANTAB5E载体在T4 DNA连接酶作用下进行连接。连接产物经纯化后电转化感受态*E. coli* TG1细胞。转化产物立即加入至37℃预热的2mL 2×YTG(20% Glucose)培养基中,37℃培养1h,取少部分转化菌经梯度稀释后铺SOBAG琼脂板,进行菌落计数测定库容。其余的菌液涂布于SOBAG琼脂板,30℃培养24h。用2×YT培养基收集细菌集落,取一部分悬于10mL 2×YTAG(100 μg/mL Ampicillin, 20% Glucose)培养基中,稀释细胞至OD₆₀₀约为0.3,37℃ 250 r/min振荡培养1h。至对数生长期后,加入5×10¹⁰ pfu的M13KO7辅助噬菌体进行超感染,继续振荡培养1h,离心,菌体重悬于2×YTAK(50 μg/mL Kanamycin, 20% Glucose)培养基中,过夜培养。次日离心收集上清,加入1/5体积的PEG/NaCl溶液沉淀噬菌体,冰浴1h,离心,以1mL PBS重悬沉淀,即为噬菌体scFv抗体库,4℃储存备用。取10μL经梯度稀释的噬菌体scFv库加入到100μL OD₆₀₀为1.0的TG1菌中,37℃放置30min后铺LBAG平板,37℃过夜培养,次日计算菌落形成单位(cfu)。

1.2.6 噬菌体抗体库的重组率及多样性分析 从SOBAG平板上随机挑取18个单菌落,用PCANTAB5E中的S1和S6为引物进行PCR扩增,用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测相应扩增条带,测定抗体

库的重组率。随机挑取抗体库中的 10 个单克隆, PCR 扩增 scFv 后用 *Bst*NI 酶切, 琼脂糖电泳分析酶切图谱。

1.2.7 噬菌体 scFv 抗体库的筛选 :取 10 μ g/mL 的 BXC 100 μ L 包被酶标板, 经 2% BSA 封闭后, 加入 100 μ L 噬菌体抗体库 (约 10¹¹ cfu), 37 °C 温育 1h。PBS 洗涤 10 次, PBST (含 0.05% Tween-20) 洗涤 10 ~ 20 次后, 加入 500 μ L 洗脱液 (0.1mol/L 甘氨酸-盐酸, pH2.2), 室温放置 10min, 立即加入 2mol/L Tris-HCl (pH9.1) 30 μ L 中和, 再加入对数期的 *E. coli* TG1 菌液 2mL, 37 °C 放置 30min 进行感染。取 10 μ L 测定 cfu, 其余菌液继续培养 1h, 按照 1.2.5 的方法制备次级噬菌体抗体库。重复上述操作进行下一轮筛选, 共进行 5 次。

1.2.8 ELISA 法鉴定噬菌体抗体的特异性 :从筛选后的平板上随机挑取单菌落, 制备单克隆噬菌体 scFv, 以 10 μ g/mL BXC 包被的酶标板, 经 1% BSA 封闭后, 加入 100 μ L (1 \times 10¹¹ pfu/mL) 上述扩增的噬菌体, 室温放置 2h, PBST 洗涤 5 次, 加入 1:10000 稀释的 HRP 标记羊抗 M13 抗体 100 μ L, 室温放置 1h; PBST 洗涤 6 次, OPD 显色 5min, 加入 1 mol/L 硫酸终止反应, 490nm 测定吸光度, 采用 ELISA 法检测噬菌体 scFv 的结合活性。

1.2.9 DNA 序列测定与分析 :测定阳性克隆 scFv 的基因序列, 测序引物为噬菌粒载体 PCANTAB5E 中的 S1, S6 引物 (S1 5'-CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC-3', S6 5'-GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG-3')。

1.2.10 scFv 基因的表达及表达产物的鉴定 :用 ELISA 法检测呈阳性的噬菌体来感染 *E. coli* HB2151 细胞。铺板生长后, 再挑取单克隆接种到 2 \times YTAG 培养基中培养至对数生长期, 离心, 菌体重悬于 2 \times YT 培养基中, 加入 IPTG 至 1mmol/L 诱导表达 4h, 以 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定 scFv。

1.2.11 SDS-PAGE 及免疫印迹分析 :采用 SDS-PAGE 电泳 (10% 分离胶, 浓缩胶 3%) 分离粗酶液 (或纯化后 BXC), 电泳后分别进行考马斯亮蓝染色和免疫印迹分析鉴定 scFv 与 BXC 的结合活性。采用半干式电转移方法将电泳分离的线虫蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 经封闭液 (含 5% 羊血清的 PBS 缓冲液) 封闭后, 加入诱导表达的 scFv, 室温反应 3h, 以 PBST 充分洗涤后, 加入 1000 倍稀释的 HRP-anti E-tag 抗体, 室温继续反应 1h, 充分洗涤, 加入 DAB 底物显色液显色, 洗涤后摄影保存。

1.2.12 纤维素酶的酶染分析 :将上述 SDS-PAGE 分离的线虫蛋白质凝胶采用半干式电转移, 转移至一块含有 0.2% CMC 的 SDS-PAGE 凝胶上, 45 °C 温育 2h, 加入 2% KI-0.2% I₂ 混合液反应 10min 后, 用 30% 硫酸显色至适宜, 立即摄影保存^[7]。

2 结果

2.1 V_H 和 V_L 基因的扩增和 scFv 基因的拼接

提取免疫后小鼠脾脏总 RNA, 以此为模板反转录合成 cDNA 第一条链, 并用轻、重链可变区引物分别扩增出约 340bp 的 V_H 和 320bp 的 V_L 基因片段 (图 1)。将 V_H 和 V_L 基因与 linker 基因片段混合后经重叠延伸拼接法随机连接成 scFv。二次 PCR 后, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增的 scFv 产物大小约为 750bp (图 1) 与文献报道相符^[8]。

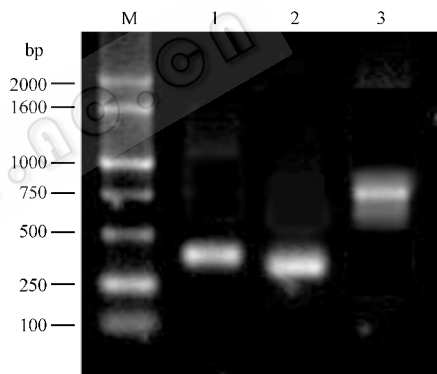


图 1 V_H 和 V_L 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of V_H and V_L gene
M: DNA maker; 1: V_H gene; 2: V_L gene; 3: scFv.

2.2 噬菌体单链抗体库的构建及鉴定

scFv 基因片段经 *Sfi*I 和 *Not*I 双酶切后连接 pCANTAB5E 载体。连接产物纯化后电转化感受态 *E. coli* TG1 细胞, 构建噬菌体单链抗体库。随机挑取 18 个单菌落, 用 S1 和 S6 引物进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测均含有单一的 750bp scFv 全长基因片段 (图略), 推算库容量约为 5 \times 10⁴。随机挑取文库中的 10 个单克隆, PCR 扩增 scFv 基因片段后, 以 *Bst*NI 进行单酶切。如图 2 所示, 酶切片段经琼脂糖凝胶电泳检测呈现多条泳带, 表明构建的抗体文库具有较好的多样性。菌液经 M13K07 辅助噬菌体超感染, PEG/NaCl 沉淀浓缩后得到噬菌体 scFv 抗体库, 测定噬菌体滴度为 2 \times 10¹¹ cfu/mL。

2.3 噬菌体单链抗体库的筛选

以 BXC 为抗原对上述噬菌体 scFv 抗体库进行了 5 轮筛选。结果表明, 噬菌体抗体的收率显示了

增加的趋势,第5轮比第1轮收率增加了约100倍,ELISA法检测也显示了同样的结果,每轮扩增后的噬菌体 scFv 的吸光度随着筛选轮数的增加而增强(表1),证明特异性的噬菌体 scFv 得到了有效富集。

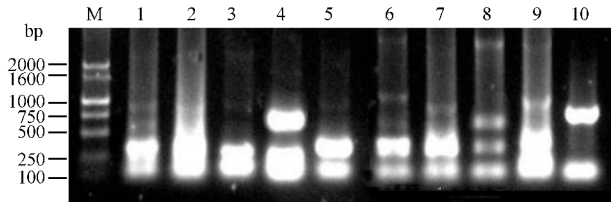


图2 scFv 基因的 BstN I 酶切图谱

Fig. 2 BstN I fingerprinting of scFv genes
M : DNA maker ; 1-10 : scFv of randomly selected clones .

表1 噬菌体抗体库的富集

Table 1 Selected enrichment of phage antibodies against cellulase from the library

Panning Round	Input(cfu)	Output(cfu)	Yield/ %	ELISA(OD ₄₉₀)
1	1.2 × 10 ¹⁰	1.6 × 10 ⁴	4.5 × 10 ⁻⁶	0.038
2	9.5 × 10 ¹⁰	2.4 × 10 ⁵	2.5 × 10 ⁻⁶	0.155
3	1.7 × 10 ¹¹	6.0 × 10 ⁶	3.5 × 10 ⁻⁵	1.025
4	1.3 × 10 ¹¹	2.9 × 10 ⁷	2.2 × 10 ⁻⁴	1.587
5	1.2 × 10 ¹¹	6.3 × 10 ⁷	5.0 × 10 ⁻⁴	1.862

2.4 噬菌体 scFv 的特异性鉴定

从第5轮筛选后抗体库中随机挑取96个单菌落,制备噬菌体 scFv ,以 BXC 为靶标进行 ELISA 检

表2 抗纤维素酶单链抗体的氨基酸序列

Table 2 Amino acid sequences of scFv against cellulase

Heavy chain	Light chain
FR1 QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKAFGYTFT	ELTQSPAILSASPGEKVTMTC
CDR1 NHHIN	RASSVSYP
FR2 WVKQRPGQGLDWIGY	WYQQKPGSSPKPWIY
CDR2 INPYNDYTSYNQKFKG	ATSNLAS
FR3 KATLTVDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQ	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC
CDR3 QLRSFMDY	QQWSSNPLT
FR4 WGQCTTVTVSS	FGAGTKLELKR

2.6 scFv 的表达及鉴定

将阳性的噬菌体 scFv D5 感染 E. coli HB2151 ,经 IPTG 诱导后,以 SDS-PAGE 鉴定菌体可溶性蛋白。考马斯亮蓝染色后,经凝胶成像分析在相对分子量约 32.0kD 处出现了一条表达带(图4,A)。电转印后,以 HRP-anti Etag 抗体进行 Western blot 分

析,以 BSA 为阴性对照,检测噬菌体 scFv 的特异性。其中10个克隆有较好的特异性,P/N 值大于3(图3)。

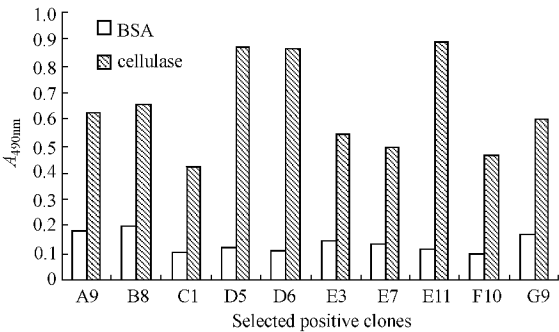


图3 BXC 噬菌体单链抗体的特异性考察

Fig. 3 Binding specificity of the selected BXC phage scFv

2.5 序列分析

挑取反应特异性较好的 D5、D6 和 E11 克隆测定 DNA 序列,测序结果显示,3 个克隆的 scFv 基因完全一致。提交 NCBI 数据库进行登记,序列号为: AY907550。通过 BLAST 软件在 NCBI 数据库检索后发现,该基因与数据库中其它的鼠单链抗体基因同源性均不高。DNAPLOT 在线分析的结果表明,该单链抗体的重链可变区属于 VH1 家族,轻链可变区为 κ 型。根据其核酸序列推导出的氨基酸序列及其骨架区(FR)和互补决定区(CDR)如表2所示。

析,在相同分子量处也检测出特异性的条带,确为 scFv-Etag 融合蛋白,与文献报道相符^[9],证明 scFv 在 E. coli HB2151 中实现了可溶性表达(图4,B)。

2.7 scFv 与 BXC 的结合活性检测

取纯化的松材线虫纤维素酶^[6]经 SDS-PAGE 及纤维素酶的酶染分析,结果显示 BXC 在 58.9kD 处

呈现单一蛋白条带,并具有纤维素酶的活性(图 1, A, C);在 BXC 所对应的位置免疫印迹结果也呈现了单一条带,表明所表达的 scFv 与 BXC 具有特异性的结合能力(图 5, B)。

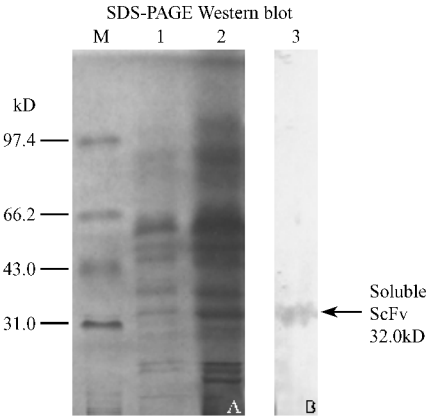


图 4 scFv 表达蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析
Fig. 4 SDS-PAGE and Western blot analysis of scFv protein
M: low molecular weight makers; 1: uninduced *E. coli* HB2151; 2: induced *E. coli* HB2151 by IPTG; 3: The total protein expressed in *E. coli* HB2151 after induction by IPTG.

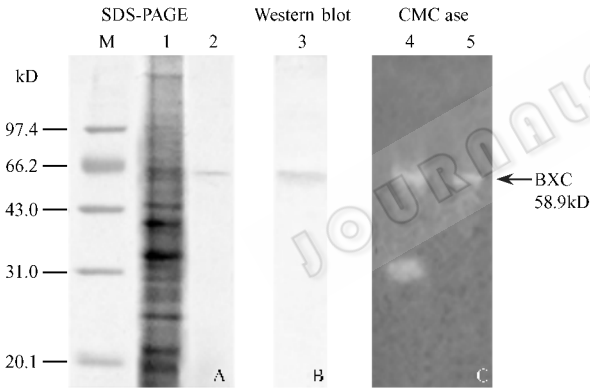


图 5 松材线虫纤维素酶 SDS-PAGE、免疫印迹及酶染分析
Fig. 5 SDS-PAGE, Western blot analysis and cellulase staining of *B. xylophilus* cellulase
M: low molecular weight makers; 1, 3, 4: *B. xylophilus* total protein extract; 2, 5: purified BXC.

3 讨论

单链抗体是具有抗原结合活性的最小单位,只有完整抗体分子的 1/6,具有分子量小、穿透力强、免疫原性低、半衰期短、易于基因工程制备和改造等优点^[10]。噬菌体抗体库技术是将全套抗体可变区基因表达在噬菌体表面,使表型和基因型联合在一起,把识别抗原的能力和进行再扩增的能力结合在一起,建立了绕过杂交瘤技术制备单克隆抗体的崭新技术,使得抗体的制备、筛选变得方便、快捷^[11]。

理论上库容越大,筛选得到高亲和力抗体的机会就越高。本实验构建的噬菌体抗体库的库容(5×10^4)虽然比常规的 10^6 要低一些,但本实验是采用免疫后的脾细胞来构建噬菌体抗体库,这可以增加特异性抗体的表达,有利于筛选。由于所用小鼠的血清抗体滴度较高($> 10^5$),目标抗体在体内经过了亲和力成熟的过程,因此弥补了库容较低的不足,实验结果也证明,从较低库容的抗体库中也能筛选到与目的抗原特异性结合的噬菌体抗体。此外,通过重叠 PCR 的方法将扩增出的重、轻链可变区以 linker 连接成 scFv,是整个抗体库构建过程中关键环节之一^[12],其成功关键在于重叠 PCR 反应所用模板系统(V_H , V_L 和 linker)的纯化程度及各模板间适当的等摩尔比。

在抗体库的筛选过程中,最常用的洗脱方法采用酸或碱进行非特异性洗脱,也可采用特异的洗脱方式,包括用抗原或单克隆抗体,进行竞争性洗脱^[13]。本文采用了较常用的酸洗脱方法,此法能够将与抗原结合的噬菌体抗体全部洗脱下来,因此得到的噬菌体抗体的亲和力强弱各异。本实验中我们从 96 个克隆中筛选到了 10 个特异性和亲和力较理想的克隆(图 3),阳性率偏低。在进一步研究中,将尝试竞争性洗脱方法,希望能获得更高亲和力的噬菌体抗体。

BXC 的纯化程度对于整个筛选过程至关重要,直接影响到筛选的效率。纯化程度高,筛选获得与 BXC 特异性结合的噬菌体抗体的机会大,相反则有可能筛选到与其它杂蛋白结合的噬菌体抗体。SDS-PAGE 显示本实验所用 BXC 得到了初步的纯化(图 5, A),为能够筛选出特异性单链抗体奠定了基础。纤维素酶酶染的结果显示,在松材线虫全蛋白中至少含有两种分子量不同的纤维素酶(图 5, lane 4),事实上我们对两种酶分别进行了纯化。但动物免疫实验表明,分子量相对较小的纤维素酶产生抗体的能力较弱,因此本文只选取了分子量相对较大的纤维素酶进行了研究。

松材线虫为重要的松树病害之一,如何能够快速、准确的检测松树中是否存在松材线虫一直为研究者所关注。同时松材线虫所分泌的纤维素酶导致松树的死亡,可作为检测的重要指标^[14]。本文成功构建了 Anti-BXC 的噬菌体单链抗体库,并利用该抗体库筛选出特异性识别 BXC 的噬菌体单链抗体。这不仅对松材线虫病的病理学研究有着重要意义,同时也为进一步探索和寻求松材线虫新的防治途径

提供了检测和监控手段。

REFERENCES(参考文献)

[1] Mori T ,Inoue T. Pine-wood nematode-induced ethylene production in pine stems and cellulase as an inducer. *J Jpn For Soc* ,1986 ,**68** (2):43 – 50

[2] Odani K. Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematode cellulose as a possible candidate of the pathogen. *J Jpn For Soc* ,1985 ,**67**(9): 366 – 372

[3] Yamamoto N. Cellulase exudation by the pine wood nematode & detection of activity in its crawling track. *J Jpn For Soc* ,1986 ,**68** : 237 – 240

[4] Mc Cafferty J , Griffiths AD , Winter G *et al.* Phage antibodies : filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* , 1990 ,**348** :552 – 554

[5] Clackson T , Hoogenboom HR , Griffiths AD *et al.* Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* ,1991 ,**352**(15): 624 – 628

[6] Zhang Q(张 奇) , Ma HZ(马洪周) , Yang WH(杨文博) *et al.* Purification and application of *Bursaphelenchus Xylophilus* cellulase for immunological determination. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*(南开大学学报) , Received

[7] Jiang LY(蒋丽雅) ,Wang XY(王晓芸). Qualitative detection of

cellulase in *Bursaphelenchus xylophilus* extract and secretion. *Forest Pest and Disease*(森林病虫害通讯) ,1995 ,**3** :9 – 11

[8] Duanpen S , Sumalee T , Manae T *et al.* Construction and high cytoplasmic expression of a tumoricidal single-chain antibody against hepatocellular carcinoma. *BMC Biotechnology* ,2002 ,**2**(16):1 – 8

[9] Yasuko S , Kimiyo K , Hisashi T *et al.* Construction of a functional single-chain variable fragment antibody against hemagglutinin from *porphyromonas gingivalis*. *Infecton and Immunity* , 1998 ,**66**(5): 2207 – 2212

[10] Andrew RM , Bradbury , James D. Antibodies from phage antibody libraries. *Journal of Immunological Methods* ,2004 ,**290** :29 – 49

[11] Hans de H , Paula H , Hennie R *et al.* Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* ,1998 ,**31** :5 – 31

[12] Hoogenboom H R. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol* , 1997 ,**15** :62 – 70

[13] Patrick C , Daniel B. Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization. *FEMS Microbiology Letters* ,2000 ,**189** :1 – 8

[14] Kojima K , Kamijyo A , Masumori M *et al.* Cellulase activities of pine wood nematode isolates with different virulences. *J Jpn For Soc* ,1994 ,**76** :258 – 262

积极开发研究人乳铁蛋白(lactoferrin ,Lf)

在非洲 ,人们发现 约有 85% 的患有艾滋病的孕妇 ,在分娩后并没有将病毒传给婴儿 ,逃脱了最容易患病的母婴传播渠道。这是为什么呢?为什么有的人不易受艾滋病病毒(HIV)的感染呢?

科学家们研究发现 ,这可能有两方面的原因 :一是母乳免疫细胞(T 细胞)识别 ,并有效捕获了 HIV 蛋白(指病毒外壳蛋白) ,这对保护孩子免受 HIV 感染或传染极为有利 ;二是母乳含有丰富的乳铁蛋白(lactoferrin , Lf)直接喂养起抗病毒、抗癌作用 ,保护孩子健康成长 ,不发生恶性病症。乳铁蛋白是由约 700 个氨基酸残基构成的 8kD 的单体糖蛋白 ,不仅存在于哺乳动物乳汁中 ,而且在机体外分泌物中的眼泪、唾液和精液中也有甚微的含量 ,而在人的初乳中 Lf 含量较高 ,达到 6 ~ 8mg/mL ,它具有广谱抗菌、增强机体免疫能力 ,防治感染性疾病以及抗氧化活性功能。牛奶中的 Lf 对“ 丙肝 ”患者也有一定的辅助治疗效果。那么 ,如何开发和利用 Lf 呢?在日本 ,从植物方面考虑 ,通过基因工程技术将人的母乳中所含多功能蛋白基因组入番茄“ 秋玉 ”品种取得成功 ,此“ 工程番茄 ”有效表达 Lf ,不仅在果实中生产 Lf ,而且淇叶、根组织中也能生产 Lf ,据测定番茄果实每 100g 可产出 Lf 2.5 ~ 3.3mg。这就给研究者以重要启示 :1)可否将 Lf 蛋白基因转入其他直接食用果实的植物中呢?(如香蕉) ,或粮食作物如水稻、小麦、马铃薯等 ,如此直接食用即可起到防病治病的目标 ;其次 ,若能将 Lf 的基因引入受体微生物如毕赤酵母中获得有效表达的话 ,则可通过微生物发酵途径大量生产 Lf 产品 ,实现产业化 ,这必将带来巨大的商机 ,造福于民。

(柯 为)