

基于细胞的抗单增李斯特菌单域重链抗体的筛选及鉴定

陈奇¹ 万翠香^{1,2} 涂追^{1*} 谭强来¹ 熊勇华^{1,2} 陶勇²

(1. 南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室 江西 南昌 330047)

(2. 南昌大学 中德联合研究院 江西 南昌 330047)

摘要:【目的】获得针对单增李斯特菌的特异性单域重链抗体,并对筛选过程中特异性克隆的富集规律进行分析,为筛选具有种属特异性的噬菌体展示抗体提供参考。【方法】采用固相筛选技术,以热灭活的单增李斯特菌菌体为抗原,通过四轮常规筛选和一轮消减筛选,从驼源天然噬菌体展示文库中筛选针对单增李斯特菌的单域重链抗体。采用 Phage-ELISA 法,对后四轮筛选洗脱物中随机挑选的噬菌体进行鉴定,阳性克隆进行基因测序及结合特异性分析。通过多序列比对分析将获得的基因序列进行分组和统计。【结果】成功筛选到 2 株单增李斯特菌特异性的单域重链抗体。【结论】在优化的筛选条件下,基于全细胞的筛选方法能够获得特异性识别单增李斯特菌的单域重链抗体,消减筛选对于去除非特异性克隆是有效的和必要的。

关键词: 噬菌体抗体库, 单增李斯特菌, 消减筛选法, 单域重链抗体

Cell-based panning and characterization of single-domain heavy chain antibody for *Listeria monocytogenes*

CHEN Qi¹ WAN Cui-Xiang^{1,2} TU Zhui^{1*} TAN Qiang-Lai¹
XIONG Yong-Hua^{1,2} TAO Yong²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

(2. Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330047, China)

Abstract: [Objective] To obtain anti-*Listeria monocytogenes* specific single-domain heavy chain antibody by subtractive panning, and to analyse the enrichment rules of specific phage clones in biopanning against composition diversity and complex antigens. [Methods] The whole cell of heat inactivated *Listeria monocytogenes* was used as antigen to screen specific single-domain heavy chain antibodies from an alpaca non-immune phage displayed library by solid panning technique. After 4 rounds of conventional panning and 1 round of subtractive panning, a total number of 384 phage clones randomly picked from each round were characterized by Phage-ELISA, the positive clones were sequenced and the binding specificity was analyzed by Phage-ELISA. [Results] Two anti-*Listeria monocytogenes* specific single-domain heavy chain antibodies were obtained. [Conclusion] Whole cell-based panning strategy was feasible for isolation anti-*Listeria*

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31271863); 江西省自然科学基金项目(No. 20122BAB214010); 江西省教育厅青年科学基金项目(No. GJJ12142)

*通讯作者: Tel: 86-791-88304447-9432; ✉: tuzhui@ncu.edu.cn

收稿日期: 2013-11-08; 接受日期: 2013-12-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

monocytogenes specific phage display antibodies under the optimized conditions in this study. Subtractive panning was efficient and necessary to eliminate non-specific clones.

Keywords: Phage antibody library, *Listeria monocytogenes*, Subtractive panning, Single domain heavy chain antibody

单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)是一种常见的食源性致病菌,是李斯特菌属中唯一能引起人患病的病原菌,可引起严重的感染疾病^[1],感染后致死率高^[2]。单增李斯特菌已列为必检的食源性致病菌^[3]。与传统的生理生化鉴定相比,免疫学方法具有操作简便、检测时间短、判读简单等优点,适合于现场快速检测^[4]。

单增李斯特菌表面缺乏特异性抗原,或特异性抗原在小鼠体内不能进行有效的加工及呈递^[5],难以获得高特异性的抗单增李斯特菌抗体^[6-9]。单域重链抗体是由存在于骆驼科动物中重链抗体的可变区组成。重链抗体没有轻链,CDR3的平均长度比传统抗体长,可以形成一个暴露的凸环结构,能够插入到抗原空间构象上的空腔或裂隙中^[10],从而可能识别传统抗体无法识别的隐秘位点,获得特异性抗体。

噬菌体展示抗体库广泛应用于基因工程抗体制备^[11],选择适当的筛选方法对于获得特异性强、亲和性高的克隆至关重要^[12]。根据筛选过程中使用的抗原类型,可分为基于细胞的和非细胞的筛选。在基于细胞的噬菌体文库筛选过程中,靶抗原处于天然状态、无需提纯,可以对未知抗原进行筛选。本研究通过方阵滴定优化单克隆抗体和单增李斯特菌细胞的浓度,在酶标孔中形成由单增李斯特菌组成的细胞层,经四轮常规筛选和一轮消减筛选,从驼源天然噬菌体抗体库 NA-PDL 中成功获得了2个针对单增李斯特菌的单域重链抗体,为筛选具有种属特异性的噬菌体展示抗体提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及噬菌体:大肠杆菌(*Escherichia coli*) TG1, 大肠杆菌(*Escherichia coli* O157:H7)

NCTC12900, 单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC13932, 格氏李斯特菌(*Listeria grayi*) ATCC25401, 英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*) NCTC11288, 威尔李斯特菌(*Listeria welshimeri*) ATCC35897, 绵羊李斯特菌(*Listeria ivanovii*) ATCC19119, 西尔李斯特菌(*Listeria seeligeri*) ATCC35967, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CMCC26003, 宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*) CMCC51334, 阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) CMCC45401, 肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) ATCC13076, 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) JDZ102Y, 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) CMCC10104, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) CGMCC1.1997 均为本实验室保藏;驼源天然噬菌体展示抗体文库 NA-PDL^[13]、抗单增李斯特菌鼠单克隆抗体 4A7 和兔多克隆抗体均为本实验室制备^[9];辅助噬菌体 M13K07 由英国剑桥医学研究委员会 MRC 分子生物学实验室的 Greg Winter 博士惠赠。

1.1.2 试剂:辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的 M13 单克隆抗体购自 GE 公司;牛血清蛋白(BSA)及卵清蛋白(OVA)购自上海生物工程有限公司;李斯特菌增菌培养基(GB4789.30-2010)^[14]购自北京陆桥技术有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 单增李斯特菌的培养:参考国家标准“单核细胞增生李斯特氏菌检验 GB4789.30-2010”^[14]对单增李斯特菌进行增菌,培养菌液通过平板法进行计数,90℃水浴5min灭活,8 000×g离心5min收集菌体,无菌PBS洗涤菌体2次,最后用10 mL的无菌PBS重悬菌体。

1.2.2 最佳抗体及菌体包被浓度的确定: 方阵滴定确定最佳抗体及菌体包被浓度, 用无菌 PBS 将抗单增李斯特菌鼠单抗 4A7 分别稀释到 5.000 0、2.500 0、1.250 0、0.625 0、0.312 5 mg/L, 将其包被在 ELISA 板上, 4 °C 过夜, 洗涤后加封闭液于 37 °C 条件下封闭 2 h, 洗涤后加入浓度分别为 2×10^9 、 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 CFU/mL 的单增李斯特菌孵育 1 h, 洗涤后加入抗单增李斯特菌的兔多抗, 工作浓度为 5 mg/L, 37 °C 孵育 1 h, 洗涤后加入 5 000 倍稀释的山羊抗兔酶标二抗, 37 °C 孵育 30 min, 洗涤后加入 A/B 显色液, 37 °C 避光反应 15 min, 之后加入终止液终止反应, 并测定 OD_{450} 值, 根据数值选取最佳抗体及菌体包被浓度。

1.2.3 噬菌体文库的筛选: 以最佳浓度的 4A7 单抗包被酶标板(首轮 3 个孔, 后续包被 1 个孔), 100 μ L/孔, 4 °C 过夜; PBST (含 0.1% Tween 20) 洗板 3 次, 加入封闭液(3% BSA、3% OVA 交替使用), 300 μ L/孔, 37 °C 2 h; PBST 洗涤 3 次, 加入 2×10^9 CFU/mL 的单增李斯特菌, 100 μ L/孔, 37 °C 1 h; PBST 洗涤 3 次, 加入噬菌体文库(1×10^{12} CFU/mL), 100 μ L/孔, 37 °C 1.5 h; PBS 洗涤 10 次, PBST 洗涤 4 次(随筛选次数增加而增加洗脱的次数), 然后加入 100 μ L 洗脱液(Gly-HCl 0.1 mol/L, pH 2.2), 37 °C 孵育 8 min, 吸出洗脱液与 50 μ L 中和液(Tris-HCl 1 mol/L, pH 8.5)混匀, 取 10 μ L 的混合液进行滴度测定, 其余的混合液进行扩增, 用于下一轮的亲和筛选。

1.2.4 噬菌体文库的消减: 取一支灭菌的 1.5 mL 离心管, 加满 3% BSA, 4 °C 封闭过夜; PBS 洗涤 5 次; 加入等量混合的消减菌, 并加入 6×10^{11} CFU (Colony Forming Unit)的第四轮扩增后的噬菌体文库, 进行 37 °C 孵育 1.5 h; $6\ 000 \times g$ 离心 2 min, 取上清进行下轮筛选。

1.2.5 噬菌体的扩增、纯化和滴度测定: 噬菌体的扩增、纯化以及滴度测定依据参考文献[15]进行。

1.2.6 Phage-ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆: 用无菌 PBS 稀释单增李斯特菌致菌浓度为 2×10^9 CFU/mL,

100 μ L/孔, 4 °C 包被过夜。PBST 洗涤 3 次, 用封闭液(3% BSA:3% OVA=1:1)进行封闭, 300 μ L/孔, 37 °C 2 h。PBST 洗涤 3 次, 加入扩增的噬菌体, 100 μ L/孔, 37 °C 1.5 h。PBST 洗涤 3 次, 加入 5 000 倍稀释的 HRP/anti-M13 单抗, 100 μ L/孔, 37 °C 30 min。PBST 洗涤 6 次, 加入等体积混合的 A/B 显色液, 100 μ L/孔, 37 °C 15 min。2 mol/L 硫酸终止反应, 并于 450 nm 处测定吸光值。将 OD_{450} 值高于阴性结果 2 倍的噬菌体克隆作为阳性并进行序列测定。

1.2.7 序列测定与分析: 将阳性克隆送至上海生工进行测序, 采用 ClustalW 软件对测序结果进行多序列比对分析^[16], 并根据编码氨基酸序列相似度进行分组及确定进行后续特异性分析的噬菌体。

1.2.8 阳性噬菌体的特异性分析: 单增李斯特菌(*Listeria monocytogenes*) ATCC13932, 格氏李斯特菌(*Listeria grayi*) ATCC25401, 英诺克李斯特菌(*Listeria innocua*) NCTC11288, 威尔李斯特菌(*Listeria welshimeri*) ATCC35897, 绵羊李斯特菌(*Listeria ivanovii*) ATCC19119, 西尔李斯特菌(*Listeria seeligeri*) ATCC35967, 大肠杆菌(*Escherichia coli* O157:H7) NCTC12900, 肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*) ATCC13076, 蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) JDZ102Y, 阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) CMCC45401 培养后平板计数, 90 °C 水浴 5 min 灭活, $8\ 000 \times g$ 离心 10 min 收集菌体, 无菌 PBS 重悬。将所有的菌体浓度调整为 2×10^9 CFU/mL, 作为抗原直接包被 ELISA 板, Phage-ELISA 法检测阳性噬菌体与其它菌体细胞的交叉反应性。

2 结果与分析

2.1 确定最佳抗体及菌体包被浓度

通过方阵滴定结果可知, 当单抗浓度为 0.625 mg/L, 单增李斯特菌菌体浓度为 2×10^9 CFU/mL 时, 吸光值最高(图 1), 选定该包被浓度为文库筛选时的包被条件。

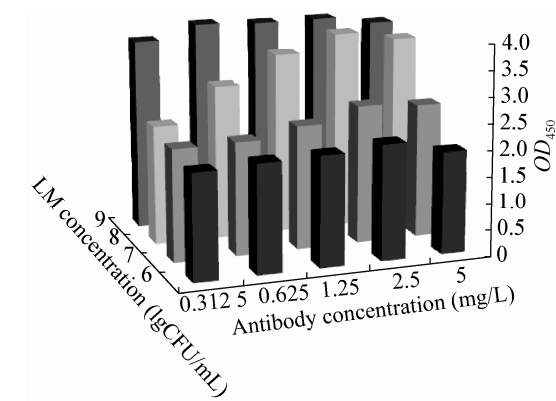


图 1 方阵滴定确定最佳抗体及菌体包被浓度
Figure 1 Optimization the concentration of antibodies and bacterium-coated by phalanx titration

2.2 特异性单域重链抗体的富集

文库筛选共进行 5 轮,其中前 4 轮为常规筛选,第 5 轮为消减筛选,为了提高筛选的特异性,每轮的洗脱强度逐渐加大,然而洗脱下来的噬菌体的滴度明显增加,说明在筛选过程中可与抗原结合的噬菌体得到了富集(表 1)。

2.3 特异性噬菌体的富集

从每轮洗脱噬菌体的扩增产物中取等量 (10^8 CFU)的噬菌体进行 Phage-ELISA 分析,结果显示吸光值随着筛选次数的增加而增加(图 2),提示随着筛选的进行,能与单增李斯特菌结合的噬菌体得到了富集。

2.4 Phage-ELISA 鉴定阳性噬菌体克隆

由于原始天然噬菌体展示抗体文库中每种噬菌体抗体的拷贝数很低,为防止能特异性结合靶标的噬菌体在筛选过程中丢失,在第一轮筛选时采取的洗脱条件较为温和,因此第一轮筛选的洗脱产物

中阳性克隆通常较少且很难挑选到高亲和力的克隆。不过第一轮筛选洗脱产物经过扩增后,每种单个噬菌体抗体数目大幅提高,之后随着每轮洗涤条件的加强,特异性强及亲和力高的噬菌体会得到富集。因此从第 2、3、4、5 轮洗脱噬菌体测定滴度平板上分别随机挑选 96 个单菌落,经过噬菌体的救援后,离心取上清进行 Phage-ELISA 测定,结果显示随着筛选的进行,阳性克隆数及检测信号分别有增多增强的趋势(图 3)。

2.5 阳性克隆的序列分析

将 Phage-ELISA 鉴定阳性的 118 个克隆进行序列测定,按照氨基酸密码子翻译得到阳性克隆的氨基酸序列,采用 ClustalW 软件进行多序列比对,根据序列相似性得到了 A、B、C、D 四组氨基酸序列,阳性克隆序列分布情况见表 2。四组序列在筛选过程中呈现出不同的富集规律(图 4),A 组在文库中的丰度很低,经过 3 轮筛选后才出现;B 组克隆的比例随筛选轮次交替起伏;C 组克隆的比例保

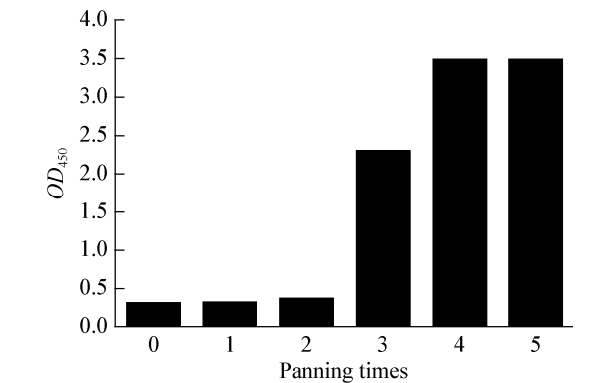


图 2 扩增噬菌体 Phage-ELISA 监测富集效果
Figure 2 The enrichment effect tested by Phage-ELISA

| 表 1 亲和筛选对噬菌体的富集 Table 1 Enrichment of phage in five rounds panning | | | | | | | |
|---|--|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---|---|
| 轮次 Rounds | 单抗浓度 Antibody concentration (mg/L) | 封闭液 Blocking solution | 菌体浓度 LM concentration (CFU/mL) | 噬菌体投入量 Input phage (CFU) | 噬菌体洗脱量 Output phage (CFU) | 回收率 ^a Recovery ratio ^a | 富集度 ^b Enrichment ^b |
| 1 | 0.625 | 3% BSA | 10^9 | 6.67×10^{11} | 6.84×10^5 | 1.02×10^{-6} | — |
| 2 | 0.625 | 3% OVA | 10^9 | 6.00×10^{11} | 3.36×10^5 | 5.60×10^{-7} | 0.549 |
| 3 | 0.625 | 3% BSA | 10^9 | 8.00×10^{11} | 3.88×10^6 | 4.85×10^{-6} | 8.660 |
| 4 | 0.625 | 3% OVA | 10^9 | 2.40×10^{11} | 9.32×10^7 | 3.88×10^{-4} | 80.000 |
| 5 | 0.625 | 3% BSA | 10^9 | 6.00×10^{11} | 7.20×10^{11} | 1.20×10^{-4} | 0.310 |

Note: a: Recovery ratio=Output phage particles/Input phage particles; b: Enrichment=The later round of recovery ratio/The former round of recovery ratio.

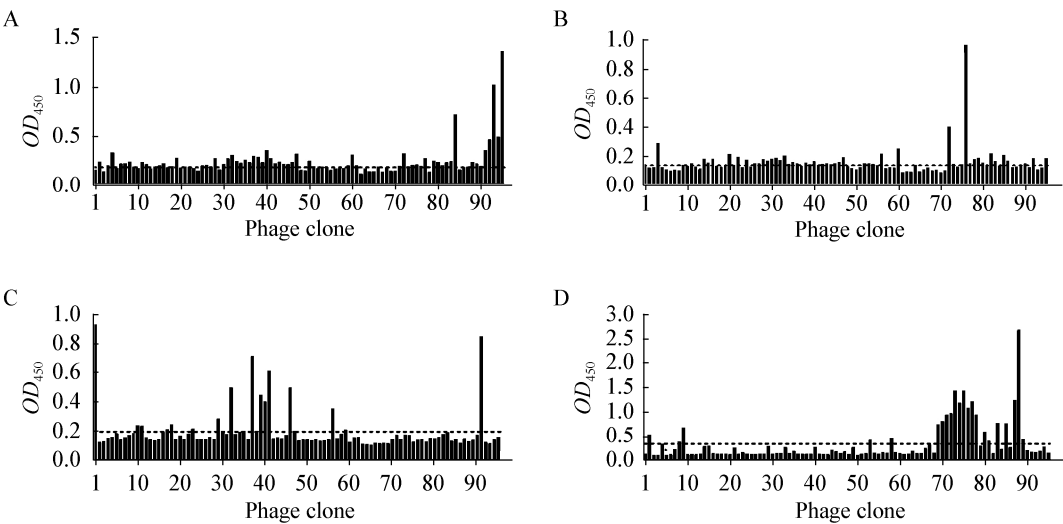


图 3 Phage-ELISA 鉴定噬菌体阳性克隆

Figure 3 Phage-ELISA for phage clones randomly picked

Note: A: Phage from second round panning; B: Phage from third round panning; C: Phage from fourth round panning; D: Phage from fifth round panning; An OD_{450} greater than 0.2 (two folds of NC, dotted line) was considered positive.

| 表 2 筛选过程中阳性噬菌体序列分析 | | | | | | | |
|--|--------------------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------------|----|----|----|
| Table 2 Sequence analysis of positive phage in panning process | | | | | | | |
| 轮数 Rounds | 鉴定单克隆数 Number of identified phage | 阳性结果 Positive phage | 阳性率 Positive rate (%) | 氨基酸序列类型 Amino acid sequence type | | | |
| | | | | A | B | C | D |
| 第二轮 Second round | 96 | 44 | 46.875 | 0 | 10 | 5 | 29 |
| 第三轮 Third round | 96 | 14 | 11.458 | 0 | 6 | 1 | 7 |
| 第四轮 Fourth round | 96 | 22 | 22.917 | 5 | 5 | 2 | 10 |
| 第五轮 Fifth round | 96 | 38 | 39.580 | 8 | 19 | 3 | 8 |
| 合计 Total | 384 | 118 | | 13 | 40 | 10 | 54 |

持稳定；D 组克隆比例一直减少，在第 3 轮和第 4 轮筛选后该组克隆比例变化不大，第五轮消减筛选后比例大幅度降低，提示该组克隆中存在较多可与消减菌交叉反应的克隆。

2.6 阳性噬菌体的特异性分析

从不同氨基酸序列类型中，挑选显色值较高的阳性克隆进行救援、纯化以及滴度测定，取 5×10^8 CFU 的纯化噬菌体进行 Phage-ELISA，测定其与李斯特属内菌及常见致病菌的交叉反应，得到了两个能特异性识别单增李斯特菌的克隆 L5-78 及 L5-79 (图 5)。这两个克隆来源于第五轮筛选产物，氨基酸序列分别属于 B 组和 D 组。

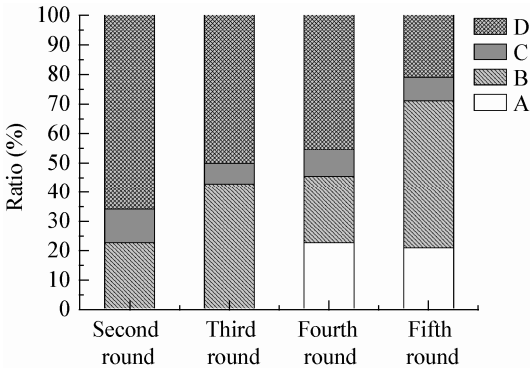


图 4 四组氨基酸序列的分布
Figure 4 The distribution of four groups of amino acid sequences

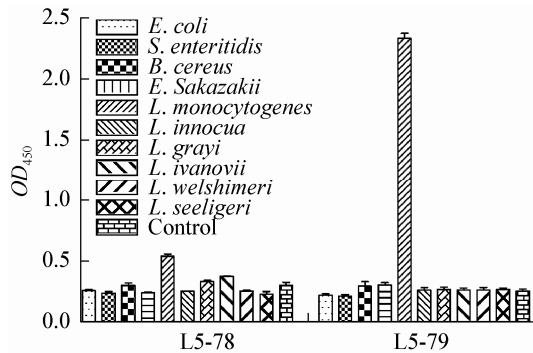


图5 阳性噬菌体特异性分析

Figure 5 The specific analysis of positive phage

3 讨论

随着噬菌体抗体库技术在生物和医学领域中的广泛应用,针对不同类型靶分子的筛选技术也在不断地完善^[17-18]。由于细胞表面的抗原种类复杂、含量低且存在共有表位,造成在以全细胞为靶标筛选噬菌体抗体库时,通常会存在噬菌体富集难度大、非特异性结合率高及背景值大等问题^[19-20]。与常用的液相悬浮细胞筛选针对微生物的噬菌体展示抗体不同,本研究采用前期试验获得的抗单增李斯特菌单克隆抗体固定热灭活的靶细胞,并对包被条件进行了优化,使其在酶标孔中形成均匀的细胞层,有利于对筛选条件进行有效控制,减少非特异性结合,获得的抗体理论上可直接与原有的单克隆抗体组合,建立夹心 ELISA 检测方法。

每轮筛选鉴定克隆的阳性率并不是逐渐提高(表 2),这可能是由于在筛选的过程中,采用了不同的封闭蛋白进行封闭,提示交替使用不同的封闭蛋白(特别是在前两轮筛选中)可以有效去除非特异性克隆。第三轮和第四轮筛选产物中,四组氨基酸序列的比例趋于稳定(图 4),提示固相筛选已不能继续富集。第五轮消减筛选后,四组氨基酸序列的比例发生变化,说明消减筛选可有效去除非特异性克隆。

本研究对传统筛选方案进行了改善和优化,可为复杂靶分子特异性抗体的筛选提供借鉴和参考。天然抗体库 NA-PDL 经四轮常规筛选,可以与靶细胞结合克隆得到有效富集之后,引入消减筛选,有效地去除了非特异性克隆,最终从第五轮筛选产

物中鉴定得到了两个可以与单增李斯特菌特异结合的克隆(L5-78 和 L5-79),为建立基于免疫学的单增李斯特菌快速检测方法奠定了基础。

参考文献

- [1] 柳增善. 食品病原微生物学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 258.
- [2] Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2010, 1(16): 16-23.
- [3] Goulet V, Hedberg C, Monnier A. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries[J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14: 734-740.
- [4] 刘雅莉, 刘芳, 韩舜愈, 等. 九种单核细胞增生李斯特菌检测技术效果比较及评价[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(6): 84-92.
- [5] George C, Jeffrey D. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Immunological Methods, 2004, 289: 147-155.
- [6] Shim WB, Choi JG, Kim JY, et al. Production of monoclonal antibody against *Listeria monocytogenes* and its application to immunochromatography strip test[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17: 1152-1161.
- [7] Marianne S, Jeppe B. Evaluation of a monoclonal antibody able to detect live *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2000, 57: 219-224.
- [8] Heo SA, Nan R, Story RP, et al. Characterization of new hybridoma clones producing monoclonal antibodies reactive against both live and heat-killed *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of Food Science, 2007, 72(1): 8-15.
- [9] 董香梅, 孙吉昌, 刘春梅, 等. 单核细胞增生李斯特菌单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2013, 33(5): 56-61.
- [10] Ghassabeh HG, Nick D, Pieter DP, et al. Nanobodies and their potential applications[J]. Nanomedicine, 2013, 8(6): 1013-1026.
- [11] 潘博, 童贻刚. 噬菌体抗体库技术及其应用研究进展[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(4): 581-585.
- [12] 刘夏, 许杨, 涂追, 等. 抗 AFB1 单域重链抗体文库筛选方法的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(6): 950-955.
- [13] 涂追, 许杨, 刘夏, 等. 驼源天然单域重链抗体的构建及鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(4): 31-36.
- [14] 食品安全国家标准食品微生物学检验 单核细胞增生李斯特氏菌检验[S]. GB4789.30-2010.
- [15] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [16] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23: 2947-2948.
- [17] 毕司英, 毛晓燕. 噬菌体抗体库筛选技术研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(1): 70-73.
- [18] 高鹏, 胡立勇, 钱钰, 等. 噬菌体抗体库筛选技术[J]. 现在生物医学进展, 2012, 23(12): 4577-4583.
- [19] 尹长城, 黄华樑, 阎锡蕴, 等. 基于细胞的噬菌体抗体库筛选技术[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(12): 82-88.
- [20] 张娜, 满来, 孙坚萍, 等. 利用细胞筛选法从噬菌体抗体库鉴定人源 HIV-1 单克隆中和抗体[J]. 病毒学报, 2013, 5(29): 471-479.