[20] Martin-Latil S, Hennechart-Collette C, Guillier L, et al. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control[J]. Int J Food Microbiol, 2012, 157(2): 167 – 173.
[21] Di Pasquale S, Paniconi M, Auricchio B, et al. Comparison of different concentration methods for the detection of hepatitis A virus and calicivirus from bottled natural mineral waters[J]. J Virol Methods, 2010, 165(1): 57 – 63.
[22] Mattison K, Brassard J, Gagné MJ, et al. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborne RNA viruses[J]. Int J Food Microbiol, 2009, 132(1): 73 – 77.
[23] Coyne KP, Christley RM, Pybus OG, et al. Large-scale spatial and temporal genetic diversity of feline calicivirus[J]. J Virol, 2012, 86(20): 11356 – 11367.
[24] 孙士鹏, 刘贵建. MS2 噬菌体衣壳蛋白与包装位点结合特异性及其生物学应用进展[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(2): 259 – 262.
[25] Blaise-Boisseau S, Hennechart-Collette C, Guillier L, et al. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control[J]. J Virol Methods, 2010, 166(1 – 2): 48 – 53.
[26] Rolfe KJ, Parmar S, Mururi D, et al. An internally controlled, one-step, real-time RT-PCR assay for norovirus detection and genogrouping[J]. J Clin Virol, 2007, 39(4): 318 – 321.
[27] Shulman LM, Hindiyeh M, Muhsen K, et al. Evaluation of four different systems for extraction of RNA from stool suspensions using MS-2 coliphage as an exogenous control for RT-PCR inhibition[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e39455.

收稿日期: 2016 – 07 – 06　　(吴少慧编辑　郭薇校对)

· 检验技术 ·

鼠源抗烟曲霉单链抗体库制备及鉴定*

李新鸣[1,2], 孙冶[1,2], 海晓欧[1,2], 黄天龙[1], 杜歌[1], 王凤杰[1], 齐金萍[1], 肖纯凌[2]

摘　要: 目的　构建鼠源抗曲霉菌单链抗体(scFv)噬菌体展示文库并进行初步鉴定, 为制备用于侵袭性曲霉感染实验室诊断的特异性抗体提供新的方法。**方法**　利用噬菌体展示技术构建鼠源抗烟曲霉半乳甘露聚糖(GM) ScFv 库, 经过 4 轮"吸附 – 洗脱 – 扩增"淘选富集, 随机挑选克隆进行可变区基因测序确定文库多样性, 并用 phage-ELISA 筛选烟曲霉特异性结合的克隆。**结果**　构建的 scFv 噬菌体表达文库, 库容量约为 1.8×10^7; 经 4 轮富集筛选, 洗脱的表达 scFv 噬菌体滴度渐增; 随机挑选出 4 轮筛选后的 20 个克隆, 其可变区基因序列不同; 随机挑选出 4 轮筛选后的 90 个克隆, 其中 6 个克隆与烟曲霉 GM 特异性结合, 而与对照的白假丝酵母菌无结合。**结论**　构建并初步鉴定了抗曲霉菌单链抗体库, 库容量大, VH 和 VL 区具备多样性; 筛选的 scFv 与曲霉菌 GM 特异性结合, 提供了快速制备、筛选 GM 高特异性抗体分子的新方法。

关键词: 单链抗体(scFv); 噬菌体表达文库; 烟曲霉; 半乳甘露聚糖(GM)
中图分类号: R 33　**文献标志码:** A　**文章编号:** 1001-0580(2016)11-1590-04　DOI: 10.11847/zgggws2016-32-11-38

Preparation and characterization of a murine single chain antibody library against *Aspergillus fumigatus*

LI Xin-ming*, SUN Ye, HAI Xiao-ou, et al (* *Institute of Basic Medicine, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning Province* 110034, China)

Abstract: Objective　To construct a murine single chain antibody (scFv) library against galactomannan (GM) of *Aspergillus fumigatus* with phage display technique and to enrich and select specific anti-GM single chain antibodies and to identify the antibody library. **Methods**　The total RNA was extracted from the spleen of mice immunized with *Aspergillus fumigatus* GM. The antibody VH and VL genes were amplified with real-time reverse transcription PCR (RT-PCR), and the VH and VL fragments were linked by overlapping PCR. The linked scFv fragments were transformed into pCANTAB5E phage display system, and the phage display library of scFv was constructed with the assistance of the helper phage. Immunotubes coated with gradient GM antigens were used for the screening of the murine natural source scFv phage antibody library. After four rounds of "absorption-elution-amplification" panning, positive clones obtained were sequenced and binding activity of scFv clones were detected with phage-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results**　The phage display library of scFv against *Aspergillus* GM was constructed, which was about 1.8×10^7 clones in capacity. Using *Aspergillus* GM coated immune test tubes, the phage titers were increased after 4 rounds of panning.

* **基金项目:** 辽宁省科学事业公益研究基金(GY2014 – A – 007); 沈阳市科学技术项目计划 (F14 – 181 – 1 – 00); 沈阳医学院科研立项项目 (20141022)
作者单位: 1. 沈阳医学院基础医学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 辽宁省环境污染与微生态重点实验室
作者简介: 李新鸣(1973 –), 女, 辽宁沈阳人, 副教授, 博士, 研究方向: 呼吸道微生态及抗感染免疫。
通讯作者: 肖纯凌, E-mail: xiaochunling@symc.edu.cn
数字出版日期: 2016 – 11 – 4 14:40
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20161111.1440.004.html

Twenty clones with different gene sequence of variable region were randomly selected after 4 rounds of panning. The diversity of VH and VL was confirmed in the single chain antibody library. Ninety clones were tested for binding specificity to *Aspergillus* GM. Phage-ELISA results showed that 6 clones have specific binding reactions only with *Aspergillus* GM, while no binding reaction with *Candida albicans*. **Conclusion**　A murine scFv phage display library was constructed and identified preliminarily. The antibody library constructed presents a high connection rate of variable fragments, good diversity and large storage capacity. ScFv clones have specific binding activity with *Aspergillus* GM. The study provides a base for further screening of high specific antibody against galactomannan of *Aspergillus fumigatus*.

Key words: single chain Fv fragment; phage display library; *Aspergillus fumigatus*; galactomannan

由于大气污染日益严重以及广谱抗菌药物、免疫抑制剂等的应用,侵袭性曲霉菌病(invasive Aspergillosis, IA)呈上升趋势[1-2]。由于缺乏特异的临床依据,IA 诊断困难,死亡率高[3-4],早期明确诊断是解决 IA 的关键[3-5]。半乳甘露聚糖(galactomannan, GM)是曲霉菌细胞壁多糖蛋白,在宿主内侵袭生长及体外培养时均可释放[5-6]。IA 患者的血清等体液中存在曲霉菌 GM,有效检出 GM 是 IA 早期诊断的研究热点[5-7]。本研究利用噬菌体展示技术,构建鼠源抗烟曲霉 GM 的单链抗体(single chain antibody, scFV)库,富集、筛选结合 GM 的特异性 scFv,为制备曲霉菌特异性抗体提供新的方法,有利于进行呼吸道烟曲霉菌的检出。

1　材料与方法

1.1　烟曲霉菌 GM 的纯化及小鼠的免疫　烟曲霉菌 GM 的制备及纯化参考 Latgé JP 等[8]的方法,烟曲霉菌株 293 培养滤液经乙醇沉淀,沉淀部分经洗涤后,重悬于水中并冻干。可沉淀部分重悬起后经阴离子交换层析进一步纯化 GM,其纯度经质谱法分析测定,分析测定由美国 University of Georgia 测试中心完成(报告编号:XL100510)。以纯化 GM 为免疫原对 4 ~ 5 周龄 BALB/C 雌鼠(SCXK 京 - 2010 - 0002,北京维通利华公司)进行免疫接种,首免后 1 周按同剂量进行第 2 次免疫,再隔 10 d 加倍剂量进行第 3 次免疫。用 ELISA 方法检测抗体效价。

1.2　RT-PCR 扩增 VH 和 VL 片段及重叠 PCR 扩增获得 scFv 片段　取 3 只免疫小鼠脾脏混合,提取总 RNA, RT-PCR 扩增可变区片段。PCR 反应程序为:97 ℃预变性 2 min,继以 94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 1 min,共 32 个循环。取 5 μL PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察。以扩增得到的 VH 和 VL DNA 片段为模板,经重叠扩增 PCR 合成 VH - 连接序列 - VL 片段(scFv)。

1.3　抗 GM scFv 突变克隆噬菌体展示文库的构建　scFv 产物连接到载体 pCANTAB5E 上 酶切位点 Sfi I 和 Not I 之间,电转化到感受态大肠杆菌 TG1。得到的完整噬菌体 scFv 文库加入甘油冻存。取一小部分悬于 10 mL 2 × YTAG 培养基(OD_{600} = 0.8),加入 8×10^{11} pfu 的辅助性噬菌体 M13KO7, 37 ℃温育 90 min,离心并以 15 mL 2 × YTAK 重新悬细胞,37 ℃培养 6 h,离心收集上清,加入 1/5 体积的 PEG/NaCl 溶液以沉淀噬菌体。冰浴 30 min 以上,10 000 r/min 4 ℃离心 20 min,以 2 mL 含 1% BSA 的 PBS 重悬沉淀,13 000 r/min 离心 5 min 得到的上清即为噬菌体 scFv 表达展示文库。

1.4　scFv 噬菌体抗体库的富增与生物淘筛　以纯化的曲霉菌 GM 10 ~ 100 μg/mL 包被 Nunc 免疫反应试管,经 PBS 洗涤,加入 1 mL 含 2% 脱脂奶的 PBS 静置 30 min(以下操作均在室温下进行)。加入 300 μL scFv 文库噬菌体上清(滴度约 2×10^{11} pfu),放置 90 min, PBST(含 0.05% Tween 20 的 PBS)洗 15 次后离心沉淀细胞后加入 500 μL 洗脱液(0.1 mol/L 甘氨酸/HCl, pH = 2.5, 含 0.1% 牛血清白蛋白 BSA),加入 2 mol/L 的 Tris-HCl 中和溶液 pH 值。洗脱下来的噬菌体加到 5 mL 对数生长期的 TG1 菌液中,37 ℃静止感染 30 min 后,取一定量涂 2 × YTAG,平板测定所洗脱下来的噬菌体滴度(cfu)。进行四轮吸附 - 洗脱 - 富集的生物筛选。

1.5　scFv 噬菌体抗体库的初步鉴定

1.5.1　滴度测定　每轮生物筛选中,对从曲霉菌 GM 包被免疫试管上洗脱下来的噬菌体颗粒进行滴度测定,洗脱判断下来的噬菌体量逐渐升高,是否有特异性的富集。

1.5.2　多样性分析　经过 4 轮生物筛选后,随机挑取平板上的文库单个克隆提取质粒,并对其所携带的 VH 和 VL 片段部分进行基因测序分析。

1.6　GM 亲和性 scFv 克隆的筛选　单个克隆 phage-ELISA:随机挑取筛选 4 轮后的 90 个单个克隆,按前述方法获得在噬菌体表面展示有 ScFv 的单个克隆的噬菌体抗体上清,直接用于细胞 ELISA 检测;细胞 ELISA(室温下操作):以 100 μg/mL 曲霉菌 GM 100 μL/孔包被 96 孔酶标板,2% 脱脂奶的 PBS 阻断后,加入单个克隆的噬菌体抗体上清(2 ~ 3) $\times 10^9$/孔,孵育 2 h, PBST 洗涤 8 次后用 HRP - 抗 M13 抗体(美国 GE Healthcare Life Sciences 公司)检测结合的噬菌体颗粒,四氨基联苯胺为底物,显色 8 min,测定 450 nm 的光吸收值(A_{450})。阴性

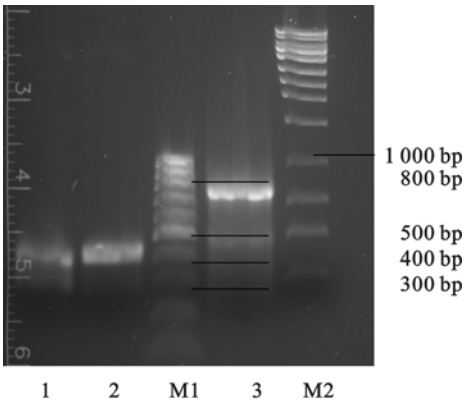
对照以胎牛血清 BSA 作为抗原,特异性对照以白假丝酵母菌培养滤液经乙醇沉淀粗提物作为抗原(方法同上),包被到 96 孔酶标板,进行与上述相同实验操作。

1.7　统计分析　采用 SAS 8.1 统计分析软件进行数据分析。考察的主要指标为曲霉菌 GM、BSA 及白假丝酵母菌多糖分泌抗原分别包被酶标板与 90 个克隆的噬菌体抗体进行 ELISA 反应,测定光吸收值(A_{450});组间比较采用χ^2 检验,显著性水准 $\alpha = 0.05$;两两比较采用χ^2 检验,显著性水准 $\alpha = 0.05$。

2　结　果

2.1　VH 和 VL 基因的扩增及重叠 PCR 扩增结果(图 1)　提取小鼠脾脏总 RNA,RT-PCR 扩增 VH 和 VL 片段,于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分别可见约 430 bp 和 350 bp 的 DNA 片段。以 PCR 方法从总 RNA 中经多次反应获得 VH 和 VL 的 DNA 片段为模版,经重叠 PCR 扩增得到单链抗体可变区基因片段(scFv),产物大小约为 780 bp。

2.2　scFv 噬菌体抗体库的构建　将 scFv 基因克隆到噬菌粒载体 pCANTAB5E,电转化感受态大肠杆菌 TG1,辅助噬菌体 M13KO7 超感染得到上清液即为噬菌体抗体库。梯度稀释法测得噬菌体库库容约为 1.8×10^7,噬菌体滴度为 10^{12} cfu。在感染辅助性噬菌体 M13KO7 救助下,可以于噬菌体表面表达重组的 scFv 抗体融合蛋白,经过 PEG 沉淀去除噬菌体,所得的上清为噬菌体表达文库。



注:Lane1:VL 片段;Lane2:VH 片段;Lane3:重叠 PCR 扩增 scFv 基因片段;M1:100 bp DNA marker;M2:1kb DNA marker。

图 1　VH 和 VL 基因的扩增及重叠 PCR 扩增结果

2.3　scFv 噬菌体抗体库的富增(表 1)　以曲霉菌 GM 做为固相抗原包被免疫试管,进行 4 轮吸附 – 洗脱 – 富集的生物筛选,显示洗脱下来的噬菌体量逐渐升高,提示 GM 在淘选过程中能有效富集单链抗体。

表 1　scFv 噬菌体抗体库的富增结果

淘筛人数	加入的噬菌体(cfu)	洗脱的噬菌体(cfu)
1	2.4×10^{11}	2.10×10^3
2	2.2×10^{11}	4.00×10^4
3	1.2×10^{11}	1.80×10^4
4	1.2×10^{11}	1.18×10^5

2.4　scFv 噬菌体抗体库多样性分析　随机检测 20 个克隆,基因测序显示,*E. coli* TG1 中转化 DNA 与预期相符,呈现多样性。抗体重链各区域组合正确,VH 和 VL 之间有柔性多肽编码基因相连。提示单链抗体库的容量和多样性满足后续筛选分离目的基因的需要。

2.5　phage-ELISA 法进行 scFv 噬菌体抗体库的亲和性鉴定(表 2)　用曲霉菌 GM 和 BSA、白假丝酵母菌多糖分泌抗原分别包被酶标板,与 90 个克隆的噬菌体抗体进行 ELISA 检测,结果显示,6 个克隆呈现 GM 的特异性结合,其中 2 个克隆 4C2 和 3D3 特异性结合较强。

表 2　scFv 噬菌体抗体克隆于曲霉菌特异性结合结果

分组	样本量	$\bar{x} \pm s$
克隆		
　3G2 | 5 | 0.121 ± 0.003 2 |
　1A7 | 5 | 0.128 ± 0.001 0 |
　1G4 | 5 | 0.180 ± 0.053 1 |
　6D2 | 5 | 0.248 ± 0.001 5 |
　4C2 | 5 | 0.606 ± 0.005 2 |
　3D3 | 5 | 0.724 ± 0.002 1 |
对照 | | |
　空白 | 5 | 0.058 ± 0.003 8 |
　BSA | 5 | 0.062 ± 0.004 9 |
白假丝酵母 | 5 | 0.074 ± 0.002 9 |

3　讨　论

本研究采用噬菌体展示技术构建的 scFv 抗体库,具有传统的杂交瘤抗体制备技术所无法比拟的优越性[9]。通过载体将目的基因引入大肠杆菌菌中进行表达,操作简便,能够快速、有效的筛选到针对纯化的烟曲霉 GM 抗原分子的抗体片段。同时,scFv 分子量小,仅仅保留了与抗原分子特异性结合的抗体可变区部分,最大程度的降低了鼠源性的成分,以避免人抗鼠源抗体的反应。以往认为侵袭性曲霉菌病主要发生在免疫抑制人群。急性白血病、骨髓移植、实体器官移植、糖皮质激素应用,糖尿病以及艾滋病均为侵袭性曲霉菌感染的危险因素[3-4,10]。随着抗肿瘤治疗的进步、器官移植的普及,多种临床有创操作包括大型呼吸机等的使用,使得深部真菌感染在院内感染范畴中所占的比例越来越重要,烟曲霉菌在临床深部真菌感染中的地位日益重要,其发生率明显增高。最近研究显示,健康成

中国公共卫生 CPH

人大量接触曲霉菌孢子时,如接触发霉的干草、树皮碎片,溺水或吸入蘑菇种植区的粉尘,也会导致 IA 的发生[10-12]。IA 的发病率逐年上升,因为缺乏特异的临床表现,仅仅依赖分离培养和组织活检这些金标准诊断,往往会延误了治疗,患病后的死亡率高达 50% ~90%[10,13-14]。因此早期诊断及时开展治疗,包括抢先治疗是临床解决 IA 感染的关键。而曲霉菌 GM 可能做为 IA 的生物标志物,在早期诊断方法的研究中成为热点[10,15-16]。因此,制备、筛选高亲和性的抗曲霉菌 GM 抗体分子,并且有效的检出曲霉菌 GM,对于 IA 早期明确诊断有重要意义。曲霉菌 GM 属于多糖蛋白类抗原,国内外文献报道中关于制备针对多糖类抗原的基因工程抗体的制备比较少[17-18]。我们在对构建的单链抗体库的筛选过程中,用渐次增强的洗涤条件以期提高特异性噬菌体抗体的富集效率,经 4 轮淘筛后,洗脱的噬菌体滴度的渐增提示利用纯化的曲霉菌 GM 的淘筛筛选过程是有效的。随机挑选出 4 轮筛选后的 20 个克隆,进行可变区基因序列分析,证实了单链抗体库中 VH 和 VL 区的多样性。Phage-ELISA 结果显示,随机挑选出 4 轮筛选后的 90 个克隆,结果其中 6 个克隆能够特异性检测曲霉菌 GM,而与对照的 BSA、白假丝酵母菌分泌多糖抗原无结合反应。提示构建的抗体库中可以筛选获得用于曲霉菌 GM 特异性结合 scFv 克隆。本研究构建并初步鉴定了曲霉菌 GM 鼠源 scFv 噬菌体抗体库,构建的抗体库可变区片段连接率较高,多样性较好。可以快速、简便地获得特异性小分子抗体,可用于进一步制备曲霉菌 GM 高特异性抗体。同时也为开发 GM 抗体诊断试剂奠定了研究基础,从而更有利于进行 IA 的早期诊断。

由于烟曲霉菌的孢子主要是通过呼吸道吸入而进入患者体内,曲霉菌感染的部位主要在肺部,约占曲霉菌感染的 90%。由于其诊断方法有限和临床表现缺乏特异性,从而导致诊断困难[5,19]。scFv 分子分子量小,组织穿透力强,体内清除快,不易与具有 Fc 受体的非靶细胞结合[16-18]。此外 scFv 还可与毒素、放射性同位素、细胞因子等效应分子构建成多种双功能抗体分子。应用曲霉菌 GM 直接筛选噬菌体展示 ScFv 抗体文库,经 phage-ELISA 得到阳性克隆,这些结果将为进一步构建针对 GM 的双功能抗体分子奠定基础,并有可能为研究肺曲霉菌定位诊断提供有价值的依据。

参考文献

[1] Schmiedel Y, Zimmerli S. Common invasive fungal diseases: an overview of invasive candidiasis, aspergillosis, cryptococcosis, and *Pneumocystis* pneumonia[J]. Swiss Med Wkly, 2016, 22(146): w14281.

[2] 翁国虎,周波. 神经重症监护病房肺部感染致病菌及耐药性分析[J]. 中国公共卫生,2013,29(8):1245-1246.

[3] Baddley JW, Stephens JM, Ji X, et al. Aspergillosis in intensive care unit(ICU) patients: epidemiology and economic outcomes[J]. BMC Infect Dis, 2013, (23): 13-29.

[4] Cornberg M, Schlevogt B, Rademacher J, et al. Specific infections in organ transplantation[J]. Internist(Berl), 2016, 57(1): 38-48.

[5] Khan ZU, Ahmad S, Theyyathel AM. Detection of *Aspergillus fumigatus*-specific DNA, (1-3)-beta-D-glucan and galactomannan in serum and bronchoalveolar lavage specimens of experimentally infected rats[J]. Mycoses, 2008, 51(2): 129-135.

[6] Dufresne SF, Datta K, Li X, et al. Detection of urinary excreted fungal galactomannan-like antigens for diagnosis of invasive aspergillosis[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42736.

[7] Pfaller MA, Woosley LN, Messer SA, et al. Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeasts and moulds in a global antifungal surveillance programme[J]. Mycopathologia, 2012, 174(4): 259-271.

[8] Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*[J]. Infect Immun, 1994, 62(12): 5424-5433.

[9] Sidhu SS, Koide S. Phage display for engineering and analyzing protein interaction interfaces[J]. Curr Opin Struct Biol, 2007, 17(4): 481-487.

[10] Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis[J]. Thorax, 2015, 70(3): 270-277.

[11] Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals[J]. mBio, 2015, 6(2): e00037-00115.

[12] 刘金忠,马英顺,纪璎伦,等. 辽宁省 2008—2012 年公共场所空调通风系统污染现状[J]. 中国公共卫生,2013,29(6):936.

[13] Stopiglia CD, Arechavala A, Carissimi M, et al. Standardization and characterization of antigens for the diagnosis of aspergillosis[J]. Can J Microbio 1, 2012, 58(4): 455-462.

[14] Khalilzadeh S, Goudarzipour K, Hassanzad M, et al. Bronchoalveolar galactomannan in invasive pulmonary aspergillosis: a prospective study in pediatric patients[J]. Med Mycol, 2015, 53(7): 709-716.

[15] Brownback KR, Pitts LR, Simpson SQ. Utility of galactomannan antigen detection in bronchoalveolar lavage fluid in immunocompromised patients[J]. Mycoses, 2013, 56(5): 552-558.

[16] 金欣,陈建魁,尹秀云. 侵袭性真菌感染实验室诊断研究进展[J]. 中国公共卫生,2007,23(10):1231-1233.

[17] Feldwisch J, Tolmachev V. Engineering of antibody molecules for therapy and diagnostics[J]. Methods Mol Biol, 2012, (899): 103-126.

[18] Weisser NE, Hall JC. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics[J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(4): 502-520.

[19] Buchheidt D, Reinwald M, Spiess B, et al. Biomarker-based diagnostic work-up of invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised pediatric patients-is *Aspergillus* PCR appropriate?[J]. Mycoses, 2016, 59(2): 67-74.

收稿日期: 2016-02-04　　(刘铁编辑　郭薇校对)