

应用噬菌体随机肽库研究抗溶藻弧菌及其外膜蛋白单抗识别的特异性表位^{*}

黄志坚，何建国

(中山大学生命科学学院，广东 广州 510275)

摘 要：用噬菌体随机七肽库筛选制备的抗溶藻弧菌及其外膜蛋白的纯化单抗，经 3 轮淘洗，获得较高程度富集的噬菌体，效价较高，第 3 轮淘洗比第 1 轮淘洗的产量高出近百倍。同时获得的阳性噬菌体经 ELISA 检测能与 V a 抗原发生强的阳性反应，确证了淘洗筛选的结果。

关键词：噬菌体随机肽库；溶藻弧菌；外膜蛋白；单克隆抗体；表位

中图分类号：S941 **文献标识码：**A **文章编号：**0529 6579 (2006) 05 0067 04

病原体的蛋白质抗原表位分析既是研究抗原分子的结构和功能、抗原—抗体反应机制的基础，又可为多肽疫苗研制、药物筛选以及特异血清学诊断方法的建立提供重要的线索和依据。分析抗原表位的传统方法主要是利用抗血清筛选重叠合成肽，但此方法存在多方面的缺陷。近年来，一种新的生物技术—噬菌体递呈随机肽库 (Random Peptide Libraries RPLs)，逐渐被用于蛋白质抗原表位分析。这种技术弥补了合成肽筛选的不足，在研究线性短肽，折叠的蛋白质，甚至非蛋白分子等受体的相应配体时，噬菌体递呈的随机肽库被认为是配体的“万能库”^[1-2]。

溶藻弧菌 *Vibrio alginolyticus* 是沿海地区食物中毒和腹泻的重要病原菌，广泛存在于世界各地海水和海产品中，同时溶藻弧菌也是许多水产动物特别是海水养殖品种的致病菌。目前对弧菌病的防治主要是利用抗生素、抗血清或灭活、减毒疫苗等^[3-5]。近年来，科学家尝试利用先进的生物学技术研究生产安全高效的鱼用疫苗，未见有关用噬菌体随机肽库筛选抗溶藻弧菌及其外膜蛋白纯化单抗的报道。本研究尝试用制备的抗溶藻弧菌及其外膜蛋白的单抗为筛选配基，从随机噬菌体七肽库中筛选抗体识别的表位，以期寻找与该单抗特异结合的七肽表位。

1 材料和方法

1.1 材料

随机噬菌体七肽库试剂盒 (Ph.D. - 7TM Phage

Display Peptide Library Kit) 来源于美国 New England BioLabs 公司，由中山大学基础医学院寄生虫研究室周东明博士赠送。受体菌为 *E. coli* ER2738。Detection module recombinant phage antibody system 来源于 Amersham Pharmacia Biotech 公司，由广东省人民医院魏惠永博士赠送。

LB 培养基：细菌用胰蛋白胨 10 g 细菌用酵母浸出膏 5 g NaCl 5 g H₂O 1 000 mL，高压灭菌。**琼脂糖顶层培养基：**胰蛋白胨 10 g 酵母浸出膏 5 g NaCl 5 g MgCl₂ · 6H₂O 1 g 琼脂糖 7 g H₂O 1 000 mL，高压灭菌分装保存。**LB /IPTG X-gal 平板培养基：**LB 培养基中加入 15 g/L 琼脂，高压灭菌，冷却至 70 ℃ 以下，加入 1 mL IPTG X-gal 倒平板，4 ℃ 避光保存。**TBST：**TBS + w = 0.1% Tween 20 TBS 50 mmol/L TrisHCL (pH 7.5)，150 mmol/L NaCl，高压灭菌，室温保存。**生物淘洗洗涤液：**0.2 mol/L 甘氨酸—盐酸 (pH 2.2)，1 mg/mL BSA。PEG NaCl w = 20% PEG - 8000 2.5 mol/L NaCl 高压灭菌，室温保存。**HRP 结合的抗 M13 抗体：**HRP-conjugated antiM13 antibody Amersham Pharmacia Biotech 公司。**ABTS (Amersham Pharmacia Biotech 公司) 贮存液：**将 22 mg ABTS 溶于 100 mL 50 mol/L 柠檬酸钠 (pH 4.0) 中，过滤，4 ℃ 保存。

1.2 抗溶藻弧菌及其外膜蛋白单克隆抗体的制备
参照文献 [6] 制备抗原、免疫 BALB / C 小鼠、融合和进行克隆化筛选，按常规方法采用 Protein A-Sepharose 亲和层析柱 (Pharmacia Biotech Swe

^{*} 收稿日期：2005 12 08
基金项目：国家“863”计划基金资助项目 (2001AA 622020)；广东省科技厅资助项目 (A 3050201)
作者简介：黄志坚 (1970 年生)，男，博士，讲师；通讯联系人：何建国；E-mail: lshrc05@zsu.edu.cn
(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

den) 进行纯化, SDS-PAGE 电泳检验纯度, 间接 ELISA 测定效价。制备的单抗于本室保存 (另文报道)。

1.3 噬菌体效价测定

(1) 接种 ER2738 单个菌落于 5~10 mL LB 中, 振荡培养直至半对数期 ($A_{600} \sim 0.5$)。

(2) 细胞在生长时, 用微波炉熔解琼脂糖顶层, 分装 3 mL 于无菌培养管中, 每支试管对应于 1 个稀释度的噬菌体稀释液, 45 °C 平衡试管备用。

(3) 每个稀释度对应一个在 37 °C 预温的 LB / IPTG X-gal 平板, 于 37 °C 备用。

(4) 用 LB 10 倍系列稀释噬菌体。

(5) 一旦培养液达到半对数期, 吸取 200 μ L 培养液加入到管中, 每管对应 1 个噬菌体稀释度。

(6) 每管中加入各稀释度的稀释液 10 μ L, 快速振荡, 室温培养 1~5 min

(7) 同时, 将感染的细胞转到含有 45 °C 琼脂糖顶层的培养管中, 快速振荡摇匀, 立即倾倒入预温的 LB / IPTG X-gal 平板上, 倾斜平板以均匀分布琼脂糖顶层。

(8) 冷却平板 5 min 37 °C 倒置培养过夜。

(9) 次日观察平板, 计数有约 100 个噬菌斑的平板, 计算每 10 μ L 中 pfu (噬菌体形成单位), 从而计算噬菌体效价。

1.4 随机噬菌体七肽库的生物淘洗 (Biopanning)

(1) 选取抗 Va-Va-OMP 的纯化单抗 2b₆ 用 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 8.6) 稀释至 100 μ g/mL, 以 150 μ L 孔加入酶标条孔内, 反复旋转使表面完全湿润。置湿盒中轻微振荡, 4 °C 过夜培养后, 倒去包被液, 拍干。

(2) $w=5\%$ 脱脂奶粉封闭 1.5~2 h, 倒去封闭液, 用 TBST 洗 6 次。倒掉洗涤液, 拍干。

(3) 每孔加入用 100 μ L TBST 稀释的 2×10^{11} 噬菌体 (10 μ L 原始肽库)。室温轻微振荡 10~60 min, 倒去未结合的噬菌体, 用 TBST 洗涤 10 次, 拍干。

(4) 100 μ L 孔的洗涤液洗脱结合的噬菌体。室温轻微振荡 10~60 min, 吸取洗脱液于微量离心管中。用 15 μ L 孔 1 mol/L Tris-HCL (pH 9.1) 中和。测定少量约 1 μ L 洗脱液的效价。

(5) 剩余洗脱液的扩增。加入洗脱液于 20 mL ER2738 培养液中 (最好是早期), 37 °C 剧烈振荡培养 4.5 h, 将培养物转移到离心管中, 10 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 将上清转至干净管中再离心。吸取 80% 的上清至干净管中, 加入 1/6 体积的 PEG NaCl, 让噬菌体在 4 °C 沉淀 60 min, 最好

过夜。4 °C, 10 000 r/min 离心 PEG 沉淀。倾去上清, 再离心, 吸取剩余上清。用 1 mL TBS 悬浮沉淀, 将悬浮液转到微量离心管, 4 °C 离心 5 min, 沉淀剩余的细胞。将上清转至干净微量离心管中, 重新用 1/6 体积 PEG NaCl 沉淀。冰上放置 15~60 min, 4 °C 微量离心 10 min, 去除剩余上清。200 μ L TBS $w=0.02\%$ NaN₃ 悬浮沉淀, 离心 1 min 沉淀剩余不溶物。上清转至干净管中, 从而获得扩增的洗脱液。在 LB / IPTG X-gal 平板上测定扩增的洗脱液的效价。

(6) 按上述步骤进行第 2 轮、第 3 轮淘洗。

1.5 噬菌体的 ELISA 检测

(1) 在 20 mL LB 中以 1:100 稀释 ER2738 的过夜培养物, 加入 5 μ L 噬菌体上清, 37 °C 剧烈振荡培养 4.5 h。将培养物转入离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清转入干净管中再离心。吸取 80% 上清于干净管中, 加入 1/6 体积的 PEG NaCl, 4 °C 沉淀至少 1 h 或过夜。4 °C, 10 000 r/min 离心 PEG 沉淀 15 min, 轻轻倒出上清再离心, 用吸头吸取剩余上清。1 mL TBS 悬浮沉淀。将悬液转至干净管中离心 5 min, 4 °C 沉淀剩余细胞。将上清转至干净管中重新用 1/6 体积的 PEG NaCl 沉淀。冰上放置 15~60 min, 4 °C 微量离心 10 min, 弃上清, 再离心, 吸去剩余上清。用 50 μ L TBS 悬浮沉淀。测定效价。4 °C 保存。

(2) 将抗溶藻弧菌及其外膜蛋白的单克隆抗体 2b₆ 用 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 8.6) 以 100 μ g/mL 的量包被酶联板, 100~200 μ L 孔。湿盒中 4 °C 过夜培养。甩掉包被液, 拍干。

(3) $w=5\%$ 脱脂奶粉封闭 1.5~2 h, 倒去封闭液。1×TBS Tween 洗 6 次, 拍干。

(4) 每孔加入 200 μ L 用 TBS Tween 系列稀释的扩增的噬菌体, 室温振荡培养 1~2 h, 1×TBS Tween 洗 6 次, 拍干。

(5) 在封闭缓冲液中以 1:5 000 稀释 HRP 结合的抗 M13 抗体。每孔加入 200 μ L 稀释液, 室温振荡培养 1 h, 1×TBS Tween 洗 6 次。

(6) 准备 HRP 底物溶液: 预先配制 ABTS 检测前, 每板在 21 mL ABTS 贮存液中加入 36 μ L $\varphi=30\%$ H₂O₂。每孔加入 200 μ L 底物液, 室温培养 10~60 min

(7) 在 405~415 nm 波长下用酶标仪读数。

2 结 果

2.1 抗溶藻弧菌及其外膜蛋白单抗的制备及特异性检测

按常规方法制备抗溶藻弧菌及其外膜蛋白的单克隆抗体, 共获得六株稳定的单克隆抗体: 2b₁、2b₆、2d₆、3c₆、2b₆₋₁、3b₅。采用 Protein A-Sepharose 亲和层析柱进行纯化, 紫外可见蛋白核酸分光光度计 (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 UV / Visible Spectrophotometer) 测定纯化的抗体含量约为 2.228 5 mg/mL。用间接 ELISA 法测定获得的纯化单抗, 发现均能与抗原发生强烈的阳性反应。

2.2 抗溶藻弧菌及其外膜蛋白单抗的纯度及效价

抗溶藻弧菌及其外膜蛋白单抗的 Western-blot 显示, 呈现单一的带, 获得的单抗可特异识别 Va 膜表面蛋白。有两株单抗 (2b₁ 和 2b₆) 特异识别 VaOMP₈, 呈现单一的带 (见图 1), 因此获得的

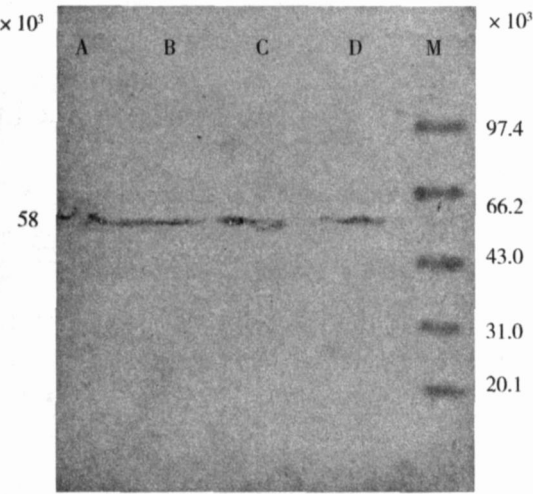


图 1 VaM cAb 和 VaOMP cAb 与 Va VaOMP 的 Western blot 图谱

Fig. 1 Immunoblot spectrum of Va and

VaOMP with VaM cAb and VaOMP-M cAb

A、B: 2b₁ 检测 Va 和 VaOMR; C、D: 2b₆ 检测 Va 和 VaOMR; M: 蛋白质相对分子质量标准

单抗为特异识别 Va 膜表面 58 000 蛋白表位的特异性抗体。用间接 ELISA 法检测六株单抗培养上清及腹水效价, 腹水效价较高, 达到 1:32 000 以上, 培养上清的效价较低, 为 1:128 ~ 1:1 024。本实验选取纯化的单抗 2b₆ 用于实验。

2.3 阳性噬菌体克隆的筛选

每次淘洗均加入 2×10^{11} 的噬菌体, 并测定洗脱下的噬菌体效价。表 2 显示, 淘洗中有较高程度的富集, 第 1 轮淘洗的噬菌体效价为 2.5×10^6 , 产量为 1.25×10^{-5} , 第 2 轮淘洗和第 3 轮淘洗的噬菌体效价分别为 4.8×10^7 和 3.4×10^8 , 产量分别为 2.4×10^{-4} 和 1.7×10^{-3} 。因此, 第 3 轮淘洗比第 1 轮淘洗的产量高出近百倍。

2.4 筛选富集的检测

抗溶藻弧菌单抗对七肽噬菌体随机肽库经 3 轮筛选后, 选取 P1 ~ P6 共 6 个阳性克隆, 用 ELISA 法检测富集的噬菌体。其中检测 P1、P2、P3 和 P4 为阳性, 检测 P5、P6 为阴性。结果见表 1。

3 讨 论

随机噬菌体肽库技术是国际上近年发展的一项潜力极大的新技术, 广泛应用于与分子识别有关的领域, 如抗生素筛选、酶抑制剂筛选、小分子药物设计、重组疫苗设计及病毒高亲和力的抗体、肿瘤治疗及免疫治疗等方面^[7-11], 特别是在研究抗原表位和疫苗研究发明方面具有广阔的前景。国内对于随机肽库在水产基础研究中较少。王冰等^[12]从噬菌体随机九肽表位库中筛选出草鱼出血病毒颗粒特异性结合的短肽分子, 为人工合成抗草鱼出血病毒的多肽奠定了基础, 同时也为抗病毒多肽制剂的研制提供了依据。

表 1 ELISA 法检测筛选富集的效果

Tab. 1 Detection of enrichment with ELISA method

阳性克隆编号	P1	P2	P3	P4	P5	P6	阳性对照	阴性对照
A ₄₁₀	1.673	1.677	1.779	1.752	0.986	0.964	1.804	0.763
结果	+	+	+	+	-	-	+	-

我们从患病鲢点石斑鱼分离了数株细菌, 确认溶藻弧菌能引起鲢点石斑鱼细菌性疾病^[13-15], 并且制备了溶藻弧菌的外膜蛋白并研究其免疫保护性, 制备该菌及其外膜蛋白的单克隆抗体, 以寻找能针对不同血清型的具有共同保护性抗原的成分, 研制能保留免疫原性, 而无副作用的亚单位疫苗。本研究采用噬菌体随机七肽库筛选制备的抗溶藻弧菌及其

外膜蛋白的纯化单抗, 经 3 轮淘洗, 获得较高程度富集的噬菌体, 效价较高, 第 3 轮淘洗比第 1 轮淘洗的产量高出近百倍。同时获得的阳性噬菌体经 ELISA 检测能与 Va 抗原发生强的阳性反应, 确证了淘洗筛选, 为进一步进行 DNA 测序和计算机模拟分析以获得抗原表位的研究打下了良好的基础。本研究为研制开发新型高效鱼用疫苗开辟了新的思

维, 同时也为深入开展相关领域的研究进行了有意义的探索性的工作。

参考文献:

- [1] DAN ELS D A, LAN E D F. Phage peptide libraries [J]. *Methods Enzymol* 1996 9: 494 – 507.
- [2] SMITH G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface [J]. *Science* 1985 228: 1315 – 1317.
- [3] MUTHARIA L W, RAYMOND B T, DEKLEVIT R, et al. Antibody specificities of polyclonal rabbit and rainbow trout antisera against *Vibrio anguillarum* [J]. *Can J Microbiol* 1993 39 (5): 492 – 499.
- [4] PEDERSEN K, TIANER T, LARSEN J I. Antibiotic resistance of *Vibrio anguillarum* in relation to serovar and plasmid contents [J]. *Acta Vet Scand* 1995 36 (1): 55 – 64.
- [5] TORANZE A E, SANTOS Y, BARJA J L. Immunization with bacterial antigens *Vibrio* infections [J]. *Dev Biol Stand* 1997 90: 93 – 105.
- [6] ZOLA H. Monoclonal Antibodies [M]. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 2000.
- [7] ANDERSEN P S, STRYHN A, HANSEN B E, et al. A recombinant antibody with the antigen specific major histocompatibility complex restricted specificity of T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 93: 1820 – 1824.
- [8] HOUGHTEN R A, PINILLA G, BLONDELIE S E, et al. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery [J]. *Nature* 1991 354: 84 – 86.
- [9] KELLER P M, ARNOLD B A, SHAW A R, et al. Identification of HIV vaccine candidate peptide by screening random phage epitope libraries [J]. *Virology* 1993 193: 709 – 716.
- [10] PERHAM R N, THIRRY T D, WILLIS A E, et al. Engineering a peptide epitope display system on filamentous bacteriophage [J]. *FEMS Microbiology Reviews* 1995 17: 25 – 31.
- [11] PASQUALINI R, RUOSLAHTI E. Organ targeting *in vivo* using phage display peptide libraries [J]. *Nature* 1996 380: 364 – 366.
- [12] 王冰, 柯丽华, 江红, 等. 从随机噬菌体肽库中筛选抗草鱼出血病病毒多肽的研究 [J]. *中国病毒学* 1998 13 (4): 351 – 357.
- [13] 何建国, 林鑫, 黄志坚. 海水鱼类溶藻弧菌致病性的初步研究 [J]. *华南师范大学学报: 自然科学版* 1998 (增刊): 53 – 55.
- [14] 朱传华, 何建国, 黄志坚. 网箱养殖石斑鱼爆发性溃疡病原菌分离、鉴定及致病性研究 [J]. *中山大学学报: 自然科学版* 2000 39 (增刊): 278 – 282.
- [15] 黄志坚, 何建国. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性 [J]. *中山大学学报: 自然科学版* 2002 41 (5): 64 – 67.

Epitope Identification of Monoclonal Antibody Against *Vibrio alginolyticus* and Outer Membrane Proteins of *Vibrio alginolyticus* with Phage – displayed Random Peptide Library

HUANG Zhijian, HE Jinguo

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract A 7-mer random peptide library displayed on M13 phage was used for screening the epitope of monoclonal antibody against *Vibrio alginolyticus* and outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus*. Three rounds of biopanning were carried out and Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to estimate the enrichment. The phages with high titer of enrichment can be harvested. Yields of the third round biopanning were above one hundred times more than those of the first round biopanning. The selection result of biopanning was further ensured by ELISA using the positive phage and Va antigen. Detection results indicated that the positive phage can specifically bind to Va antigen. Further studies are being carried out to map antigen epitope using DNA sequencing and computer analysis.

Key words random peptide libraries; *Vibrio alginolyticus*; outer membrane protein; monoclonal antibody; epitope