DOI号: 10.3724/SP.J.1000.2008.40568

圆形碘孢虫单链抗体库的筛选与阳性克隆特征分析

章晋勇[1] 汪建国[1] 李 明[1,2] 顾泽茂[1,2,3] 龚晓宁[1]
(1.中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2.中国科学院研究生院, 北京 100039; 3.华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要: 噬菌体抗体库已成为单克隆抗体生成的重要技术之一。本文通过用圆形碘孢虫相关抗原对已构建的鼠源免疫噬菌体展示单链组合抗体文库进行生物淘选, 并对几株相对亲和力较高的阳性单克隆序列特征、相对亲和力及热稳定性等进行了分析。ELISA、间接免疫荧光及免疫印迹等进行特征鉴定。结果表明, 噬菌体抗体库技术对于分离抗圆形碘孢虫不同表位抗原是可行的, 将为粘体动物的抗原物质及分布、寄生虫-宿主相互关系等研究提供丰富的抗体来源。

关键词: 圆形碘孢虫; 粘体动物; 噬菌体单链抗体; 生物淘选
中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)04-0568-11

自 1825年 Jurine首次报道粘体动物(粘孢子纲)引起鱼类病害以来, 尽管人们在其分类、起源、系统发育、生活史、病理、寄生虫-宿主相互关系、诊断、防治等诸多方面取得了很大的成就[1-5], 但粘体动物引起的病害依然是限制鱼类养殖业发展的重要因子之一, 如寄生于鲫鱼(Carassius auratus auratus)的圆形碘孢虫(Myxobolus rotundus Nemeczek, 1911)[1,6]。抗体(多克隆/单克隆抗体)由于其良好的特异性和高亲和力的特性[7], 是病原的诊断、特征分析及病害防治的良好试剂, 在粘体动物引起的病害方面也得到了广泛的应用[8-28]。多克隆抗体由于识别多个表位, 在具体分析单一抗原性质有其内在局限性, 而且用作诊断试剂不易控制本底值。而单克隆抗体识别单一靶位点, 是粘体动物病原诊断的良好试剂, 并有望应用于防治。迄今, 国内外报道的抗粘体动物单克隆抗体数量十分有限[2,23,26], 这与其制备技术-杂交瘤技术的操作困难、周期长、成本高、一次融合收获克隆数低的内在缺陷有关。另外, 所获得的单抗分泌细胞株长期保存易丢失活性。

诞生于 20世纪 90年代初的噬菌体抗体库技术已成为单克隆抗体生成的主要技术手段之一, 被誉为第三代抗体生成技术, 将抗体生成从细胞工程(杂交瘤技术)时代引入了基因工程时代。由于其操作简单、制备周期短、成本低、易大量表达、保存方便等特点, 大有取代杂交瘤技术的趋势。噬菌体抗体库技术最显著的特点就是将抗体的基因型与表型有机的结合起来, 使得获得抗体的同时得到其编码基因, 从而将抗体的性能改造, 如亲和力提高、增加热稳定性、分子量及效价的改变等变成简单的基因工程操作[7,29]。单链抗体(Single chain fragment variable, scFv)是有一条柔性链接肽将抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)连接在一起形成的两个首尾相接的单一肽链, 通过正确的折叠, 从而使两个可变区由非共价键形成完整的抗原结合区, 这样既增加了抗体可变区的稳定性, 又有利于遗传操作, 是目前报道与应用最广泛的一种小分子抗体[29]。为深入研究圆形碘孢虫的抗原性物质分布及其性质、寄生虫-宿主相互关系, 我们首次构建了抗圆形碘孢虫相关抗原的鼠源噬菌体单链抗体免疫文库[30], 以求筛选出更多的单克隆抗体用于该粘体动物的抗原性质分析, 得到其抗原谱系。本文利用圆形碘孢虫(Myxobolus rotundus)相关抗原对构建的组合单链抗体文库进行数轮生物淘选, 并对 4株相对亲和力较高的单抗克隆进行了特征分析, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

所用抗体文库为本实验室采用 Amersham Bio-

收稿日期: 2007-05-24; 修订日期: 2008-01-19
基金项目: 国家自然科学基金课题(30271028); 中国科学院知识创新工程课题(KSCX-221-04)资助
作者简介: 章晋勇(1980-), 男, 江西临川人; 博士; 主要从事水产动物病原与分子生态学研究。E-mail: zhangjy@ihbl.ac.cn
通讯作者: 汪建国, E-mail: wangjg@ihbl.ac.cn

sciences公司 RAPS系统构建, 菌株 TG1(K12, v (lac2pro) supE thi hsdv 5(Fp trav 36 pro A$^+$ B$^+$ lacI^q lacZv M15))用于文库构建, HB2151(K12, v (lac2pro) ara Na l^r thi(Fp proA$^+$ B$^+$ lacI^q lacZ v M15))用于文库扩增[30]。HB2151不含琥珀抑制基因, 从而可以识别噬菌粒 pCANTAB5E上 scFv与噬菌体外壳蛋白 III之间的琥珀终止密码子, 从而可应用于可溶性 scFv的分泌表达。由于三组分抗原都为杂和抗原, 筛选过程均参照哺乳动物完整细胞淘选法和 Hegmans, et all[31]建立的针对杂和抗原的筛选模型优化筛选条件进行。三组分抗原参照章晋勇等[32]方法制备, 完整成熟孢子、孢子可溶性抗原及孢子发育前期三组分抗原依次命名为 G1、G2、G3。

111 噬菌体抗体库的扩增　取一支甘油保存的原始库用于扩增噬菌体抗体库, 方法参照 RPAS系统及 Marks, et all报道进行, 简述如下: 100LL甘油菌接种于 1L 2@YT2AG培养基中, 37e、250r/min培养至 OD_{600}约为 0.15)0.17。用 4@10^{13}辅助噬菌体 M13KO7进行营救, 方法同第四章的噬菌体抗体库的构建。取 10mL噬菌体上清, 加入 2mL PEG/NaCl, 充分混匀至冰上 30)60min, 4e、11000 r/min离心 20min, 尽量将上清弃尽后, 用 16mL新鲜配置的 2@YT重悬沉淀, 立即用于淘选。取 10LL悬液指数级稀释, 铺 SOBAK板计算重组噬菌体滴度, 用 2@YT培养基调整其滴度至 2@10^{13}备用。

112 生物淘选(Biopanning)　淘选采用固相法进行[30], 每组分抗原根据章晋勇等[32]确定的最佳包被浓度进行, 每组分抗原淘选条件, 包括筛选轮数、每轮筛选抗原浓度、洗板次数等(表 1)。抗原包被液为 0.05 mol/L $NaCO_3$, pH 9.6, 封闭液为含 10%脱脂奶的 PBS, 洗涤液为含 0.2% Tween^{TM} 20的 PBS液, 洗脱液为 100mmol/L的三乙胺, 中和液为 Tris2HCl pH 7.5。洗脱的结合噬菌体颗粒取 10LL用于计算洗脱的噬菌粒滴度及各轮淘选的富集率, 另取 10LL用于制备多克隆噬菌体展示抗体(Phage displayed antibodies, Phabs), Phage ELISA测定其特异性, 每轮通过随机挑起 50个单克隆制备单克隆 Phab以计算各轮筛选后阳性率。选取阳性率不再增加的轮次作为最后一轮, 从最后一轮所得克隆中随机挑选相对亲和力最高的 10个, 先用限制性内切酶 BstNI酶切分析其酶切谱带。选取差异条带克隆提取质粒送测序公司测序, 所得序列经 NCBI IgBLAST和 IMGT网站的 V2QUEST模块[33]进行序列比对以证实其为小鼠免疫球蛋白基因并找出其胚系基因来源及所属免疫球蛋白基因家族。所得 scFv基因序列经 ExPASy网站(http://expasy.org/tools)Translate软件推导出其氨基酸序列, 免疫球蛋白框架区(FR)及互补决定区(CDR)的确定根据 Kabat的经典定位法则[34]进行。

表 1　各组分抗原淘选轮次及条件

Table 1　The conditions of biopanning the specific clones from the phage display scFv library

	1		2		3		4	
	抗原溶度 Concentration of antigens	洗板次数 Times of washing (次)	抗原溶度 Concentration of antigens	洗板次数 Times of washing (次)	抗原溶度 Concentration of antigens	洗板次数 Times of washing (次)	抗原溶度 Concentration of antigens	洗板次数 Times of washing (次)
G1	20Lg/mL	3+3[a]	10Lg/mL	10+10	10Lg/mL	20+20	5Lg/mL	20+20
G2	10^8个/mL	3	10^8个/mL	5+5	10^6个/mL	10+15	)[b]	)
G3	20Lg/mL	6+6[b]	10Lg/mL	10+10	10Lg/mL	20+20	5Lg/mL	20+20

注: a表示先 PBS洗板后用 PBST洗板次数; b表示未进行

Note: a) PBST was followed by PBS for washing the tissue culture flask; b) not conducted

113 阳性克隆的噬菌体及可溶性形式的特征分析

11311 可溶性单链抗体的表达　利用 RPAS系统的优点, 将筛选出的相对亲和力较高的克隆分别感染新鲜制备的对数生长期 HB2151, 过程详见 RAPS系统说明书。单链抗体在菌体中的表达分布采用 ELSAS鉴定, 检测二抗为辣根过氧化物酶标记的鼠抗 E2tag IgG(Amersham Biosciences公司产品), TMB用于颜色反应。阳性克隆的噬菌体形式制备同 111噬菌体抗体文库的扩增。

11312 相对亲和力测定　所有阳性克隆的噬菌体形式及可溶性形式单链抗体的相对亲和力参照文献报道的硫氰酸盐洗脱法测定[35]。

11313 热稳定性测定 将新鲜制备的 Phabs或 scFv分别放置于 - 20e、4e、25e, 37e, 2h、4h、6h、8h、12h、24h、48h、64h、一周后 ELISA测定其亲和力变化, 所用 Phabs滴度位 10^{12}, scFv浓度为 0.2Lg/mL, 小鼠阳性抗血清、正常血清、辅助噬菌体 M13KO7分别用作阳性、阴性对照。

11314 免疫印记分析 Western2blot和 dot2blot均参照文献[1]方法进行, 可溶性抗原及圆形碘孢虫完整成熟孢子用 4%积层胶、12%的分离胶走 SDS2PAGE变性电泳, 还原剂为二硫苏醇糖 DTT, 然后用 Bio2Rad电转移装置将蛋白转至 PVDF膜上, 分别用新鲜制备的 Phabs或可溶性 scFv检测其特异性, 对应的二抗分别为 HRP标记的 anti2M13单抗和 anti2Etag单抗, 显示剂为 DAB。

11315 间接免疫荧光及免疫组织化学 间接免疫荧光(IFAT)参照文献[16]方法进行。免疫细胞或组织化学参照文献[14, 28]报道的方法进行。图片由 Zeiess Axioplan 2 imaging and Axiophot 2显微照相。为避免噬菌体颗粒造成的透入困难及空间位阻, 免疫荧光及组化均采用可溶性 scFv进行。

11316 抗圆形碘孢虫成熟孢子阳性克隆的特异性分析 以阳性克隆的可溶性 scFv或 Phabs为检测一抗, 以圆形碘孢虫、关桥碘孢虫(M.guanqiaoensis spl.nov)、塔形碘孢虫(M.pyramidalis)、武汉单极虫(Thelohanellus wuhanensis)、多格里尾胞虫(Hen2neguya dogieli)成熟孢子为包被抗原, 石斑鱼格留虫(Glugea epinephelus spl.nov)作为外源种对照检测各自的交叉反应能力, 所用抗体及抗原浓度调为一致, 有反应记为 +, 无反应记为 - 。

2 结 果

211 抗圆形碘孢虫孢子可溶性蛋白噬菌体单链抗体库的筛选与特异性抗体特征

Phage ELISA用于验证抗圆形碘孢虫孢子可溶性蛋白的噬菌体单链抗体库四轮连续筛选的富集指数及阳性率(图 1a, 表 2)。结果显示, 各轮淘选后的多抗 Phabs均能特异性识别圆形碘孢虫孢子可溶性蛋白。四轮筛选后, 特异性噬菌体颗粒得到明显富集。另外, 尽管每轮淘选所用抗原浓度不断降低, 洗脱强度不断增加, 但所得洗脱噬菌体滴度乃明显增加, 各轮筛选后富集指数及阳性克隆率均呈上升趋势, 表明阳性克隆得到了有效的富集。其中三、四轮之间富集指数趋于稳定, 故而没有继续增加筛选轮数。第四轮筛选后, 用小鼠阳性血清进行竞争 ELISA验证其特异性富集效果, 结果表明原始文库和第四轮富集后的多抗 Phabs都能有效抑制小鼠阳性血清与圆形碘孢虫孢子可溶性蛋白的结合(图 2a)。从第四轮筛选后得到的富集文库中, 随机挑选 50个克隆, 单克隆 Phage ELISA测得各克隆与圆形碘孢虫孢子可溶性蛋白的特异性结合, 估计其亲和力(图 3a)。阳性率达 98%, 进一步表明通过优化淘选条件, 特异性克隆得到有效富集。从中选取亲和力较高的 10个克隆, DNA指纹图谱分析克隆多样性, 结果显示所得阳性克隆其基因型只有两种(结果未给出), 测序结果也证实这点, 分别命名为 pCAN26H 和 pCAN27J。中竞争性 ELISA表明它们对小鼠抗圆形碘孢虫孢子可溶性蛋白阳性血清的明显抑制效果, 抑制率分别为 111.83%和 3108% (图 2a)。

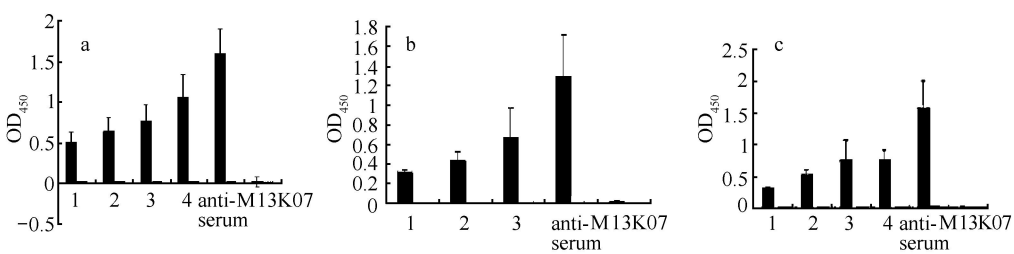


图 1 多克隆噬菌体颗粒 ELISA验证各组分抗原筛选对应噬菌体展示 scFv文库的富集效果

Fig.1 Polyclonal Phage ELISA on three antigen group of Myxobolus rotundus after three or four biopanning rounds

a, b, c分别对应 G1, G2, G3, 下同

a, b and c representing G1, G2 and G3 respectively, the same as follows

Anti2serum, M13KO7 and BSA were used as positive, negative and blank control respectively. The binding signal were analyzed at OD_{450}

表 2　三组分经过 3、4轮筛选后特异性单链抗体的富集指数及阳性克隆率

Tabl 2　The enrichment factor and rate of specific positive clones, detected by polyclonal and monoclonal phage ELISA

	1				2				3				4			
	起始量 Initial	收获量 Outcome	富集指数 Enrichment factor	阳性率 Rate of positive clones	起始量 Initial	收获量 Outcome	富集指数 Enrichment factor	阳性率 Rate of positive clones	起始量 Initial	收获量 Outcome	富集指数 Enrichment factor	阳性率 Rate of positive clones	起始量 Initial	收获量 Outcome	富集指数 Enrichment factor	阳性率 Rate of positive clones
G1	$2@10^{13}$	$115@10^{5}$	$0185@10^{-8}$	20%	$2@10^{13}$	$112@10^{6}$	$016@10^{-7}$	30%	$2@10^{13}$	$617@10^{6}$	$3135@10^{-7}$	9313%	$2@10^{13}$	$619@10^{6}$	$3145@10^{-7}$	98%
G2	$2@10^{13}$	$615@10^{4}$	$3125@10^{-9}$	1313%	$2@10^{13}$	$712@10^{5}$	$316@10^{-8}$	3617%	$2@10^{13}$	$217@10^{6}$	$1135@10^{-7}$	90%				
G3	$2@10^{13}$	$115@10^{5}$	$0185@10^{-8}$	20%	$2@10^{13}$	$116@10^{6}$	$018@10^{-7}$	30%	$2@10^{13}$	$616@10^{13}$	$313@10^{-7}$	7617%	$2@10^{13}$	$711@10^{6}$	$3155@10^{-7}$	8617%

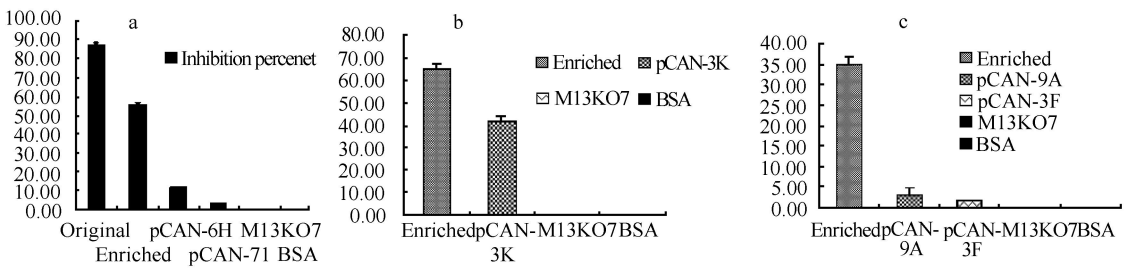


图 2　抗圆形碘孢虫孢子可溶性蛋白 (a)、完整成熟孢子 (b)及孢子发育前期与包囊原始文库、富集文库与特异性克隆的竞争 ELISA 分析

Figl 2　Analyisis of specificity of original, enriched and specific clones by competition ELISA, as competitor of corresponding positive mouse anti2serum

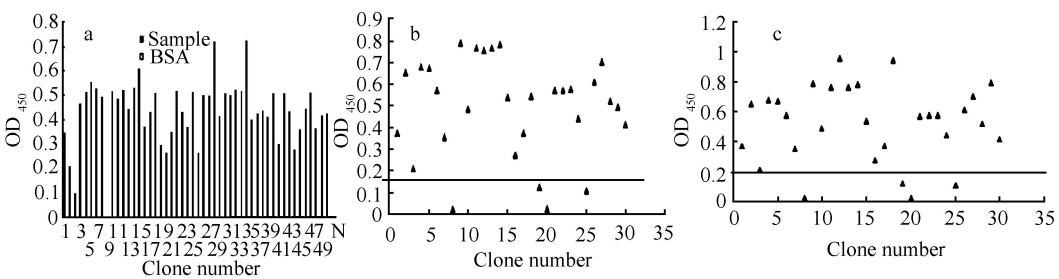


图 3　抗圆形碘孢虫三组分抗原最后最终富集文库中随机挑选克隆的特异性分析

Figl 3　Analysis of specificity of randomly selected clones from the last enriched phage displayed scFv library against Myxobolus rotundus related antigen

序列分析发现, pCAN26H scFv基因含 768bp, 编码 256个氨基酸, 其中 128个为重链可变区, 113个为轻链可变区。pCAN26H VH 属于小鼠 IGHV1亚类, 由胚系基因 IGHV1、IGH J3、IGHD2SP2发育而来。pCAN 26H VL属于 Kappa族, VK21亚类, 由胚系基因 IGKV1、IGK J1发育而来, 其氨基酸序列(图 6)。pCAN27JscFv可能识别圆形碘孢虫孢子极丝蛋白从而可用于研究粘体动物萌发机制的研究, 工作正在进行中, 将另文发表。Dot2blot及 Western2bolt显示, pCAN26H 能特异性与圆形碘孢虫成熟孢子可溶性蛋白反应, 其识别的抗原在 Western印记中为单一条带, 大小分别为 34kD, 对应一条主抗原带(图 4a)。间接免疫荧光极免疫细胞化学均表明 pCAN26H 能特异性的识别圆形碘孢虫孢子质抗原成分(图 5a)。硫氰酸盐洗脱法测得其 Phabs和可溶性 scFv的相对亲和力分别为 110M和 0183M。热稳定性分析表明, 噬菌体形式和可溶性 scFv均能在 - 20e 保持活性一周以上, 4e 条件下抗体活性在 64h内基本不变, 随后活性开始降低, 在 25e 和 37e 条件下抗体活性仅可维持 12h左右, 其后活性迅速降低, 一周后活性降至新鲜制备时的 10%左右, 但 scFv形式较 Phab形式在较高温度下活性下降更慢些。

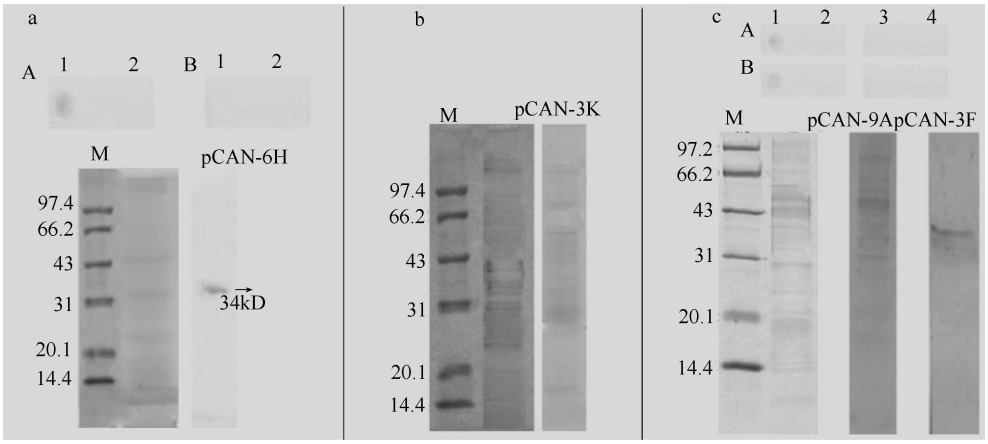


图 4 斑点印记及 western2blot分析 pCAN26H(a)、pCAN23K(b)、pCAN29A及 pCAN23F(c)的特异性

Fig. 4 Characterization of specificity of pCAN26H(a), pCAN23K(b), pCAN29A and pCAN23F by dot2blot and western2blot

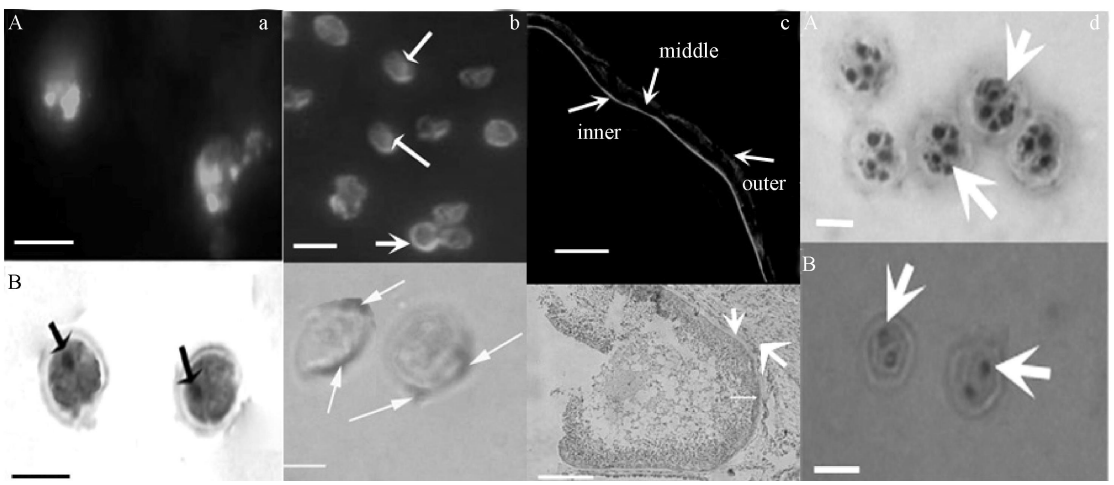


图 5 间接免疫荧光及免疫组织与细胞化学分析 pCAN26H(a)、pCAN23K(b)、pCAN29A(c)及 pCAN23F(d)的特异性

Fig. 5 Characterization and localization of antigens recognized by pCAN26H(a), pCAN23K(b), pCAN29A and pCAN23F by indirect fluorescence immunological technique, immunohistochemistry and immunocytochemistryl The scale bar(a) = 10Lm, (b) = 5Lm, (c) = 45Lm, (d) = 10Lm

212 抗圆形碘孢虫孢子表面抗原的噬菌体单链抗体库的筛选与特异性抗体特征

抗圆形碘孢虫完整孢子表明抗原分子的噬菌体单链抗体库三轮筛选后, 各轮的富集效果及阳性克隆率(图 1b、图 2b)。全孢子 ELISA显示各轮淘选后的 Phabs均能特异性的与圆形碘孢虫孢子反应, 三轮筛选后, 特异性噬菌体颗粒得到明显富集。尽管淘选所用抗原浓度不断降低, 洗脱强度不断增加, 但收获的洗脱噬菌体滴度依然明显增加, 各轮筛选后富集指数及阳性克隆率呈上升趋势, 表明抗圆形碘孢虫完整孢子表面抗原分子的阳性克隆得到有效富集。从第三轮淘选后的文库中, 随机挑选 30个克隆, 选取亲和力较高的 10株进行 DNA指纹图谱分析, 发现它们基因型一致, 命名为 pCAN23K, 测序结果也证明它们为同一基因型。竞争 ELISA发现, 三轮筛选后的富集文库与原始文库及 pCAN23K均能显著抑制属抗圆形碘孢虫完整孢子血清与孢子表面抗原分子的结合, 抑制率分别为 87113%、6419%和 41183% (图 2b)。

序列分析发现 pCAN23K scFv基因长 732bp, 编

码 244个氨基酸, 其中 119个为重链可变区, 110个为轻链可变区, VH 属于小鼠 IGHV4亚类, 由胚系基因 IGHV4、IGH J2、IGHD2FL16发育而来; VL 属于 Kappa族, VK24, 由胚系基因 IGKV 4、IGK J4发育而来, 其氨基酸序列 (图 6)。W estem2b lot显示 pCAN2 3K识别的抗原带谱非常宽, 大小位于 1716kD至 107kD之间 (图 4b)。全孢子间接免疫荧光及孢子细胞组织化学显示 pCAN23K所识别的抗原物质分布于孢子表面, 包括壳瓣和缝脊, 尤其是缝脊开口部, 而不与孢子内部结构包括极囊和孢子质发生反应 (图 5b)。硫氰酸盐洗脱法测得 pCAN23K Phabs和 scFv的相对亲和力分别为 01712M 和 01483M。pCAN23K Phabs和 scFv的热稳定性大致与 pCAN2 6H 相同, 在低温环境远比高温环境稳定。交叉反应显示 pCAN23K能和所有检测的粘孢子虫反应, 但不与石斑鱼格留虫孢子反应 (表 3)。

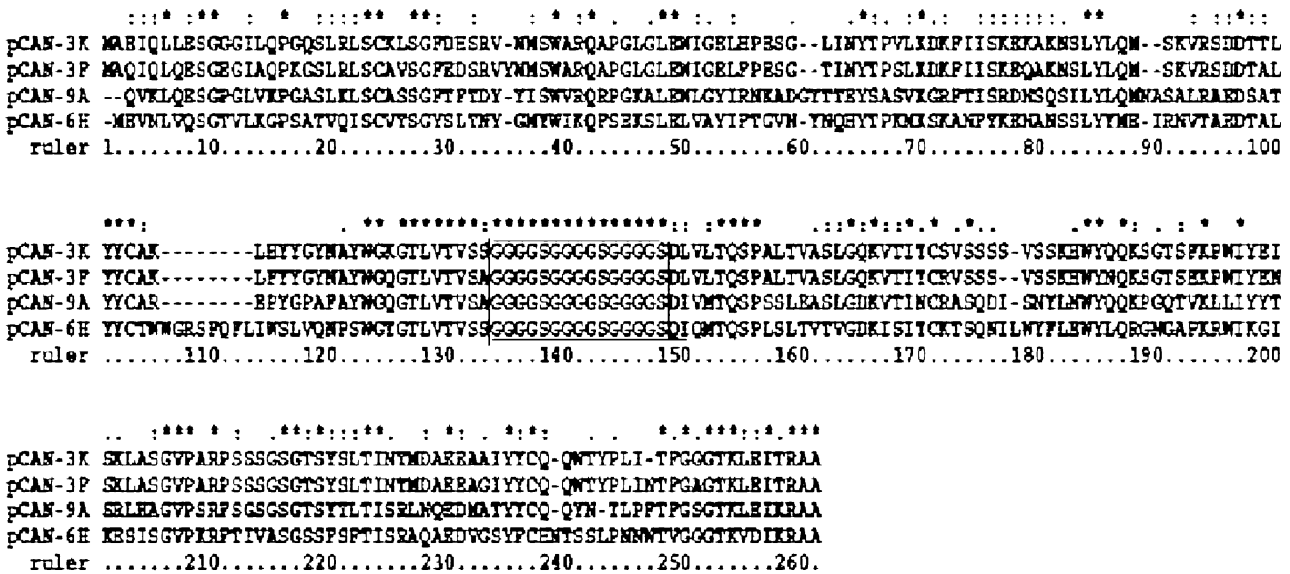


图 6　pCAN26H、pCAN23K、pCAN29A及 pCAN23F氨基酸系列比对

F igl 6　A lignment of am ino acid sequences of pCAN26H, pCAN23K, pCAN29A and pCAN23F

框出部分为 linker peptide序列 The linker peptide of scFv was framed

表 3　pCAN23K与其他粘孢子虫的交叉反应

Tabl 3　The cross2reactivity of pCAN23K reacted with surface antigen molecules of Myxobolus rotundus spores with other available fresh myxosporean mature sporesl Reactions are designated as positive(+), negative(-) lGlugea epinephelus spl nov was used as outgroup

检测种 Detected species	pCAN23K
圆形碘孢虫 Myxobolus rotundus	+
关桥碘孢虫 Myxobolus quanqiaoensis spl nov	+
武汉单极虫 Thelohanellus wuhanensis	+
多格里尾胞虫 Henneguya dogieli	+
塔形碘孢虫 Myxobous pyram idis	+
石斑鱼格留虫 Glugea epinephelus spl nov	-

213　抗圆形碘孢虫前孢子期及包囊噬菌体单链抗体库的筛选与特异性抗体特征

抗圆形碘孢虫前孢子期及包囊噬菌体单链抗体库四轮连续淘选的富集指数及阳性克隆率 (图 1c, 图 2c), 结果表明特异性噬菌体颗粒得到有效富集, 各轮筛选后阳性克隆率分别为 20%、30%、7617%和 8617%。从第四轮筛选后的富集文库中随机挑取 30个克隆, 单克隆 Phage ELISA比较各克隆亲和力相对大小。选取亲和力较高的 10个克隆, 进行 DNA指纹图谱分析, 得到两种基因型克隆, 分别命名为 pCAN29A和 pCAN23F。pCAN29A scF v基因长 744bp, 编码 247个氨基酸, 其中 122个为重链可变区, 110个为轻链可变区, VH 属于小鼠 IGHV7亚类, 由胚系基因 IGHV 7、IGH J3、IGHD2Q52发育而

来; VL属于 Kappa族, 245个氨基酸, 其中 120个为重链可变区, 110个为轻链可变区, VH 属于小鼠 IGHV4亚类, 由胚系基因 IGHV4、IGH J3、IGHD2SP2发育而来; VL属于 Kappa族, VK24亚类, 由胚系基因 IGKV4、IGKJ4发育而来, 其氨基酸序列 (图 6)。竞争 ELISA结果显示第四轮富集文库和所得的两株较高亲和力单抗均能有效抑制鼠抗血清与圆形碘孢虫孢子前期及孢囊混合抗原的结合, 抑制率分别为 3419%、2183%、1156% (图 3c)。Dot2blot及 Western2blot显示 pCAN29A和 pCAN23F均能和圆形碘孢虫孢子前期和孢囊混合抗原反应, 前者识别从约 1712kD到 91kD多条带, 而后者较特异性识别大小约为 40kD的单一条带 (图 4c)。间接免疫荧光和免疫组织化学都证实 pCAN29A特异性的识别圆形碘孢虫孢囊内膜, 而 pCAN23F不仅仅能识别圆形碘孢虫前孢子期阶段抗原, 还能和成熟孢子孢囊发生反应 (图 5c)。硫氰酸盐洗脱法测得 pCAN29A Phabs和 scFv的相对亲和力分别为 01922M 和 01784M, pCAN23F Phabs和 scFv的相对亲和力分别为 1136M和 1121M, pCAN23F热稳定性较 pCAN29A高, 但同样表现出低温条件下较高温条件稳定的趋势, 结果未给出。

3 讨 论

多克隆抗体和单克隆抗体是重要的实验和应用试剂, 在诸多行业均得到普遍应用[7, 29, 30, 34]。但制备抗体的技术在 20世纪 90年代初以前主要还是通过动物免疫得到多克隆抗体或杂交瘤技术制备单抗, 尽管这种方法已制备了数以千计的单抗, 但其内在的缺陷限制了其应用效果, 尤其是在作为治疗抗体方面[34]。抗体技术, 尤其是噬菌体抗体库技术诞生于 20世纪 80年代末、90年代初, 经过 20年的发展已成为抗体获得的有效途径之一, 由于其较杂交瘤技术具备的多项优势, 大有取而代之的势头[7, 29, 30, 34]。噬菌体抗体库技术的主要优势体现在: (1)可以不经过动物免疫直接制备抗体 (Bypassing immunization), 如全合成噬菌体抗体文库; (2)能较好模拟动物体内抗体亲和力成熟的过程, 并通过体外分子进化技术人为改造, 获得较自然抗体更高亲和力的抗体; (3)可以生产全人源化的抗体; (4)在获得抗体的同时获得编码抗体基因, 有利于后续的基因工程改造抗体性, 并利于保存, 避免了杂交瘤细胞株稳定性不好的弊端; (5)免疫亲和筛选简易、高效, 解决了杂交瘤技术阳性克隆率低、周期长等问题[34]。世界上众多实验室及药物公司正利用这项伟大的技术筛选出大量有用抗体或抗体分子, 取得了良好的结果。从诞生至今, 学界专门就噬菌体展示及抗体库技术举行了多次国际研讨会。可以说这项技术的诞生在抗体史上的意义绝不亚于杂交瘤技术, 将抗体制备从细胞工程时代引入了基因工程时代[34]。

由于其对对应配体的良好识别能力, 抗体也已广泛运用于粘体动物, 尤其是对渔业生产造成严重危害种类的抗原性、免疫原性及其诊断研究工作中, 如 Ceratomyxa Shasta[13]、C. labracis[23]、Kudoa thyrsites[25]、PKX[14, 16, 17, 36]、Sphaerospora spp.[36]、S. testicularis[23]、S. dicentrarchi[21, 24]、Myxobolus cerebralis[8) 10]。所用的免疫学技术涉及 ELISA、IFAT、Dot2blot、Western2blot、免疫组织化学、免疫细胞化学及免疫电镜等。我们近年来也利用制备的多抗和单抗对圆形碘孢虫抗原性做了一些工作。抗原性方面认为圆形碘孢虫既具有种特异性抗原又具有碘孢虫属共有的保守抗原, 并提出了其成熟孢子可能具有对称抗原表位的假说; 免疫原性方面, 从天然感染的鲫鱼血清中检测出抗该寄生虫的循环抗体, 而且感染强度与抗体水平不相关[1 6, 26, 27, 29, 30]。但在应用过程中, 除了碰到了其本身内在的技术限制外, 还面临杂交瘤技术在数量上不能适应粘体动物病害研究需要的问题[30]。因为迄今为止, 我们对圆形碘孢虫整个生活史时期的抗原及抗原变化所知甚少, 而圆形碘孢虫的后生动物性质决定了其抗原成分的复杂性及为逃避宿主特异性免疫应答的高变性。杂交瘤技术筛选效率低的问题在这方面表现的就尤为突出。特别是最近国际粘体动物协作联盟 (http://www1.iatsl.csic.es/~patolog2/index1.htm) 提出运用组织微矩阵技术 (Tissue Microarray, TMAs) 于粘体动物研究中, 对特异性抗体的需求量远非传统杂交瘤技术所能满足。而抗体库技术可能是目前唯一能满足高通量对抗体数量需求的技术, 这在功能基因组及蛋白质组学研究中已得到证实[7, 29, 31, 34]。另外, El2Matbouli& Soliman[37]成功构建了 Myxobolus cerebralis放射孢子虫期的 cDNA文库, 从中筛选具有保护性及诊断价值的目的抗原基因也依赖于数量众多单抗的获得。由于圆形碘孢虫的完整生活史尚未搞清楚, 我们无法获得生活史各个时期的抗原, 故而本实验只能利用可以获得的生活史部分阶段的抗原构建鼠源免疫噬菌体抗体文库。尽管杂合抗原, 尤其是完整细胞的筛选对从噬菌体抗体文库中获得目的

抗体是一个挑战, 但随着筛选技术的不断改进[29, 31, 34], 尤其是针对杂和抗原筛选模式的建立及筛选条件的优化[31, 34], 数量不菲的抗体已能用复杂抗原, 包括复合抗原、细胞裂解物、完整动植物细胞、病毒颗粒及细菌颗粒等从不同的噬菌体抗体库中成功获得[7, 29, 31, 34]。本实验根据已报道的复杂抗原筛选模型成功获得抗圆形碘孢虫不同组分抗原的目的抗体也证明了小容量的免疫文库是获得单抗的有效来源之一。用孢子可溶性蛋白作为筛选抗原, 共筛选出 2株亲和力较高的 scFv, pCAN26H 能特异性的和圆形碘孢虫孢子质蛋白反应, pCAN27J能特异识别圆形碘孢虫极丝蛋白, 而非孢子极囊壁, 说明极囊壁和极丝蛋白存在抗原异质性。两者均不与孢子表面抗原分子反应, 这可能是由于发育过程中壳瓣来源于壳瓣源细胞, 而孢子质、极囊来源于孢子质原细胞、极囊原细胞, 说明孢子发育过程中出现了抗原的极大变异和分化。如果圆形碘孢虫完整生活史建立, 这两株单链抗体对于阐明其发育过程中抗原物质的分化无疑将发挥重要作用。利用成熟孢子作为筛选抗原, 我们鉴定了一株亲和力较高的特异性识别孢子表面抗原分子的单抗, 它不与孢子内部结构包括极囊和孢子质发生反应, 再次说明圆形碘孢虫孢子发育过程中出现抗原物质的分化。这是粘体动物粘孢子虫纲种类孢子壳单克隆抗体的首次报道。传统观点一直认为, 其壳瓣是一类几丁质物质[1], 不具有免疫原性[1, 6], 而本文报道的结果似乎进一步证实了粘孢子虫成熟孢子是一类抗原性物质, 具有免疫原性, 这与用鼠抗血清得出的结论一致[32]。此外, 交叉反应结果显示粘孢子虫孢子壳成分抗原性存在共性, 而与微孢子虫壳瓣存在差异, 这可能是由于两者亲缘关系决定。有证据表明微孢子与真菌有较近亲缘关系, 而越来越多的证据支持粘体动物为后生动物[2, 5, 32]。抗圆形碘孢虫前孢子期单抗能同时识别孢子极囊的发现, 证实了圆形碘孢虫具有种特异性抗原, 这与 Lu, et all[1, 26]的结果一致, 并证明极囊可能是粘孢子虫的保守抗原。Munoz, et all[21, 23]也证实极囊是粘孢子虫纲最为保守的结构, 但究竟极丝蛋白是否保守尚需进一步证实。另外, 我们首次发现了圆形碘孢虫包囊内外膜的异质性, 内膜可能是虫体分泌的物质构成, 这与 Martyn, et all[38] 对寄生于白鲑鳃弓膜的碘孢虫 M1pendula 的研究结果一致, 推测这种异质性可能在组织寄生, 形成孢囊的组织寄生粘体动物中普遍存在。但 Morris, et all[19] 用抗 Tetracapsuloides bryosalmonae 单抗对 M1cerebralis 发育过程分析显示该碘孢虫前孢子期发育过程中存在严重的抗原泄露, 在宿主其他组织中检测出虫体抗原。由于本文研究的 M1rotundus 及 Martyn, et all[38]报道的 M1pendula 生活史、感染机制及传播模式等均未阐明, 是否不同发育传播模式的粘体动物存在不同的与宿主的相互作用需要进一步的验证。至于免疫荧光中出现抗孢囊外膜的非特异性反应, 可能是由于内外膜的某些共同碳水化合物残基造成的。

尽管单抗在诊断方面无法同分子诊断方法一样能检测到虫体的生活史各个时期, 但由于免疫学诊断的临床操作性强, 尤其是对未受过专业培训的渔民具有较分子诊断更大的优势, 所以一直以来都是水产病害工作者的努力方向[1, 27]。由于粘体动物病害目前尚未有有效药物能够控制, 一旦到成熟孢子形成我们就毫无办法, 故而发展简单、快速的早期诊断方法对于控制粘体动物病害显得尤为重要。而寻找粘孢子虫的早期保守抗原作为候选诊断抗原是建立早期免疫诊断粘体动物病害的前提。在本实验中, 除了鉴定了的几株较高亲和力的抗体外, 还得到为数不少的低亲和力抗体, 通过体外分子进化技术提高它们的性能现实可行。如果圆形碘孢虫的人工感染模型、完整生活史及传播模式能够建立, 从已构建的噬菌体抗体文库中筛选得到的单抗鉴定该碘孢虫的早期保守抗原可能是一条有效途径。另外, 大量单链抗体的获得对研究粘体动物生活史中抗原变化及与宿主相互作用也是一种有用工具。

参考文献:

[1] Lu Y S. The myxosporadiosis caused by Myxobolus rotundus and phylogeny of some species and genera of myxosporeans reported in China [D]. Thesis for Ph. D. of Science, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan. 2003. [鲁义善. 2003. 圆形碘孢虫病和我国粘孢子虫部分属种的系统分类. 博士学位论文, 中国科学院水生生物研究所, 武汉. 2003.]

[2] Kent M L, Andree K B, Bartholomew J L, et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa [J]. Journal of Eukaryotic Microbiology, 2001, 48(4): 395) 413.

[3] Yokoyama H. A review: gaps in our knowledge on myxozoan parasites of fishes [J]. Fish Pathology, 2003, 38(3): 125) 136.

[4] Okamura B & Canning E U. Orphan worms and homeless parasites enhance bilaterian diversity [J]. Trends in Ecology and Evolution, 2003, 18(2): 633) 639.

[5] Canning E U & Okamura B. Biodiversity and evolution of the Myxozoa [J]. Advances in Parasitology, 2004, 56: 43) 131

[6] Wu Y S& Wang J G. Structure of the spores ofMyxobolus rotun2dus andMyxobolus quanqiaoensis under optical and scanning elec2tron microscopy [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(3): 264) 268 [吴英松, 汪建国. 圆形碘孢虫和关桥碘孢虫孢子的光镜及扫描电镜观察. 2003, 水生生物学报, 27(3): 264) 268]

[7] Hayhurst A, Georgiou G. High throughput antibody isolation [J]. Current Opinion in Chemistry Biology, 2001, 5: 683) 689

[8] Pauley G B. Fish sporozoa: extraction of antigens from Myxosoma cerebralis spores which mimic tissue antigens of rainbow trout (Salmo gairdneri) [J]. Journal of Fish Research Board Canada, 1974, 31: 1481) 1484

[9] Griffin B R & Davis E M. Myxosoma cerebralis detection of circu2lating antibodies in infected rainbow trout(Salmo gairdneri) [J]. Journal of Fish Research Board Canada, 1978, 35: 1186) 1190

[10] Hamilton A J& Canning E U. The production ofmouse anti2Myx2osoma cerebralis antiserum from Percoll) 2purified spores and its use in immunofluorescent labeling ofHistoresin) 2embedded cart2tilage derived from infected rainbow trout, Salmo gairdneri Rich2ardson [J]. Journal of Fish Diseases, 1988, 11: 185) 190

[11] Markiw M. Salmonid whirling disease: Myxosporean and actins2porean stages cross2react in direct fluorescent antibody test [J]. Journal of Fish Diseases, 1989, 12: 137) 141

[12] Bartholomew J L, Rodriguez R J, Fryer J L. Development, charac2terization, and use ofmonoclonal and polyclonal antibodies against the Myxosporean, Ceratomyxa Shasta [J]. Journal of Protozoolo2gy, 1989, 36: 397) 401

[13] Bartholomew J L, Smith C E, Rohovec J S, et al. Characterization of a host response to themyxosporean parasite, Ceratomyxa Shasta (Noble), by histology, scanning electron microscopy and immuno2logical techniques [J]. Journal of Fish Diseases, 1989, 12: 509) 522

[14] Adams A, Richards R H & Marin de Mateo M. Development of monoclonal antibodies to - PKX., the causative agent of prolifera2tive kidney diseases [J]. Journal of Fish Diseases, 1992, 15: 515) 521

[15] Furuta T, Ogawa K & Wakabayshi H. Humoral immune response of carp Cyprinus carpio toMyxobolus artus (Myxozoa: Myxoboli2dae) infection [J]. Journal of Fish Biology, 1993, 43: 441) 450

[16] Sauhnier D & de Kinkelin P. Antigenic and biochemical study of PKX, the myxosporean causative agent of proliferative kidney dis2ease of salmonid fish [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1996, 27: 103) 114

[17] Morris D J, Adams A & Richards R H. Studies of the PKX in rain2bow trout via immunohistochemistry and immunoglod electron mi2croscopy [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1997, 9: 265) 273

[18] Morris D J, Adams A, Feist SW, et al. Immunohistochemical and PCR studies of wild fish for Tetracapsula bryosalmonae (PKX), the causative organism of proliferative kidney disease [J]. Jour2nal of Fish Diseases, 2000, 23: 129) 135

[19] Morris D J, El2Matbouli M & Adam A. Extensive release of an an2tigen associated with the sporogonic stages ofMyxobolus cerebralis (Myxozoa, Myxosporea) is detected by a heterologous antibody raised toTetracapsuloides bryosalmonae (Myxozoa, Malacosporea) [J]. Folia Parasitologica, 2004, 51: 215) 220

[20] Morris D J, Molnar K, Longshaw M, et al. Immunostaining of spores and plasmodia of disparatemyxozoan genera with comments on the properties of the sporular mucus envelope [J]. Parasitolo2gy, 2006, 132(6): 781) 790

[21] Munoz P, Sitja2Bobadilla A & Alvarez2Pellitero P. Antigenic charac2terization of Sphaerospora dicentrarchi (Myxosporea: Bivalvulida), a parasite from European sea bass Dicentrarchus labrax (Teleostei: Ser2ranidae) [J]. Diseases of Aquatic Organism, 2000, 40: 117) 124

[22] Munoz P, Sitja2Bobadilla A, Alvarez2Pellitero P. Ultrastructural lo2calization of carbohydrates in four myxosporean parasites: Para2site, 2000, 7(3): 185) 191

[23] Mul˙oz P, Palenzuela O, Sitj2Bobadilla A, et al. Immunohisto2chemical reactivity of polyclonal antibodies against Sphaerospora testicularis and Ceratomyxa labracis (Myxosporea: Bivalvulida), with other myxosporean parasites [J]. International Journal for Parasitology, 1999, 29: 521) 525

[24] Mul˙oz P, Sitj2Bobadilla A, Alvarez2Pellitero P. Immunohisto2chemical characterization of a polyclonal antibody against Spha2erospora dicentrarchi (Myxosporea: Bivalulida), a parasite from sea bass(Dicentrarchus labrax L.) (Teleostei: Serranidae) [J]. Para2sitology Research, 1998, 84(9): 733) 740

[25] Chase J C, Booy M H, Dawson2Coates J A, et al. Immunological detection ofKudoa thyrsites spores in muscle tissues of farmed At2lantic salmon, Salmo salar L. [J]. Journal of Fish Diseases, 2003, 26: 427) 431

[26] Lu Y S, Li M, Wu Y S, et al. Antigenic study ofMyxobolus rotun2dus(Myxozoa: Myxosporea) using monoclonal antibodies [J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25: 307) 310

[27] Lu Y S, Nie P, Sun B J. Detection ofMyxobolus rotundus(Myxo2zoa: Myxosporea) in skin mucus of naturally infected crucian carp Carassius auratus auratus by using a monoclonal antibody [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, 54: 171) 173

[28] Sitja2Bobadilla A, Redondo M J, Macias M A, et al. Development of immunohistochemistry and enzyme2linked immunosorvent as2says for the detection of circulating antibodies against Enteromyx2um scophthalmi (Myxozoa) in turbot(Scophthalmus maximus L.) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17: 335) 345

[29] Zhang J Y, Wu Y S& Wang J G. Progress of phage antibody li2brary technique and its application prospect in aquaculture [J]. Journal of Fisheries of China, 2003, 28(3): 329) 333 [章晋勇, 吴英松, 汪建国. 噬菌体单链抗体库技术及其在水产养殖的应用前景. 水产学报, 2003, 28(3): 329) 333]

[30] Zhang J Y, Wang J G, Wu Y S, et al. A combined phage display scFv library againstMyxobolus rotundus infecting crucian carp, Carassius auratus auratus (L.), in China [J]. Journal of Fish Diseases, 2006, 29: 1) 7

[31] Hegmans J P, Radosevic K, Voerman J S A, et al. A model system for optimizing the selection of membrane antigen2specific human antibodies on intact cells using phage antibody display technology [J]. Journal of Immunological Methods, 2002, 262: 191) 204

[32] Zhang J Y, Wang J G, Wu Y S, et al. Establishment of an ELISA against mature intact Myxobolus rotundus myxosporean spores [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(2): 133) 137 [章晋勇, 汪建国, 吴英松, 等. 原型碘孢虫完整孢子ELISA的建立. 中国水产科学, 2005, 12(2): 133) 137]

[33] Lefranc M P. IMGT2ONTOG and IMGT databases, tools and web resources for immunogenetics and immunoinformatics [J]. Molec2ular Immunology, 2004, 40: 647) 660

[34] Kontermann R & Dubel S. Antibody Engineering [M]. Springer Verlag Heidelberg, 2001

[35] Wang G & Wang Y. Relative affinity measurement of phage anti2bodies by ELISA using thiocyanate elution [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2000, 20(4): 355) 357 [王刚, 王琰. 硫氰酸盐洗脱法测定噬菌体抗体的相对亲和力. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20(4): 355) 357]

[36] deMateo M M, McGeorge J, Morris D, et al. Comparative studies of PKX and Sphaerosporea spp. from salmonids using lectin and monoclonal antibody staining techniques [J]. Journal of Fish Diseases, 1996, 19: 55) 63

[37] El2Matbouli M, Soliman H. Construction and screening of a cDNA library from the triactinomyxon spores of Myxobolus cerebralis, the causative agent of salmonid Whirling Diseases [J]. Parasitology, 2006, 132(4): 467) 477

[38] Martyn A A, Hong H, Ringutte M J, et al. Changes in host and parasite2derived cellular and extracellular matrix components in developing Cysts of Myxobolus pendula (Myxozoa) [J]. Journal of Eurkaryotic Microbiology, 2002, 49(2), 175) 182

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SPECIFIC CLONES REACTED WITH MYXOBOLUS ROTUNDUS RELATED ANTIGEN FROM A COMBINATORIAL PHAGE DISPLAYED SCFV LIBRARY

ZHANG Jin2Yong[1], WANG Jian2Guo[1], LI Ming[1 2], GU Ze2Mao[1 2 3] and GONG Xiao2Ning[1]

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039; 3. College of Fisheries, Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract Polyclonal and monoclonal antibodies, especially the latter were extensively applied in diagnosis and treatment of fish diseases because of their high specificity and affinity. Hybridoma cells are pure source of monoclonal antibody (MAb) of desired specificity and present excellent promise in clinical implication. However, the potential have been mostly limited in theory since the establishment of hybridoma technology was made by Kohler & Milstein in 1975 for some intrinsic problematic limitations, especially Human Anti2Mouse Antibody responses (HAMA). In additional, hybridoma technology was labor2extensive and can not be satisfied with requirement of monoclonal antibodies in post2genomic era. The recombinant antibody or engineering antibody technology, especially phage display antibody library, developed in 1990 show great advantage over hybridroma technology in production of monoclonal antibodies. For parasitic diseases caused by Myxozoans, a worldwide constraint factor for development of aquaculture industry and many techniques based on the antibodies were developed to diagnose and studied the immunogenicity and antigenicity of different myxozoan species to find the candidate antigen molecules to control the severe diseases. Significant advances in our understanding of the Myxozoa have been achieved in recent years, however, diagnosis, prophylaxis and therapy of myxosporadiosis have not been thoroughly resolved. Myxobolus rotundus Nemezek, 1911, is a serious pathogen for the farming of crucian carp, Carassius auratus (L.), allogynogenetic gibel carp and Carassius auratus gibelio (Bloch) in China. Establishment of practical early diagnosis strategy and searching the protective antigen molecules are vital to control the parasitic myxosporean disease. Two strains monoclonal antibodies were previously screened by hybridroma technology, but the low diversity and difficulty of storing limited their application. In the present work, four strains phage displayed monoclonal scFv with better affinity were isolated from previously constructed combinatorial pahge displayed scFv antibody library using M. rotundus related antigen. Their characters were analyzed by ELISA, dot2blot, western2blot, IFAT and immunohistochemistry. The sequence analysis and alignment displayed that the heavy and light chain of four clones were originated from different mouse germ line gene families. Among them, pCAN26H could specially react with the soluble protein of M. rotundus spores and recognize antigen with a molecular

weight of about 34kD. The antigens recognized by pCAN26H were located in sporoplasm ofM. rotundus spores. The pCAN23K could specially react with the surface antigen molecules of intact matureM. rotundus spores, especially in the openings of sutural ridge, but no response with polar capsule and sporoplasm. The molecular weight reacted by pCAN23K ranged from about 17. 6kD to 107kD. The pCAN29A could specially react with the inner membrane of plasmodia, but no response with the middle and outer membrane which indicate probably the heterogenicity of plasmodia membrane and the antigens with molecular weight ranged from about 17. 2 kD to 91 kD. The pCAN23F could react with both antigens of the presporogonic stages and polar capsules which indicate the existence of species2specific antigen forM. rotundus, with molecular weight of about 40kD.

K ey words Myxobolus rotundus; Myxoza; Phage displayed scFv; Biopanning