

噬菌体抗体库技术在水产养殖中的研究进展

贾圆圆, 冯建军*, 关瑞章 (集美大学水产学院, 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心/农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建厦门 361021)

摘要 噬菌体抗体库技术是将目的基因克隆到噬菌体的外壳蛋白基因组中, 转染宿主菌后, 使目的基因编码蛋白和外壳蛋白以融合蛋白的形式表达, 呈现在噬菌体表面, 通过一系列的筛选获得特异性噬菌体抗体分子。介绍了噬菌体抗体库技术在水产养殖过程中的疾病防控、水环境监测、水产品安全控制以及与抗体芯片结合研究等方面的研究进展。

关键词 噬菌体抗体库; 水产养殖; 研究进展

中图分类号 S941 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)33-11740-03

Research Progress of Phage Antibody Library Technology in Aquaculture

JIA Yuan-yuan, FENG Jian-jun*, GUAN Rui-zhang (Eel Modern Industry Technology Engineering Research Center of Ministry Education, Key Lab of East China Sea Water Healthy Aquaculture of Ministry of Agriculture, Fishery College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361061)

Abstract Target gene are displayed on the surface of filamentous bacteriophage by genetic fusion to a coat protein of phage is the basic principle of phage antibody library technology. The most characteristic of it is a direct physical link from genotype to phenotype and the specific antibody of the Phage could be obtained by screening of enrichment. In this paper, recent research progress on disease control, water environment monitoring, aquatic products safety control, and combination with the antibody microarray in the aquaculture industry has been reviewed.

Key words Phage antibody library; Aquaculture; Research progress

抗体库 (Antibody library) 技术主要是通过 PCR 技术克隆全套抗体重链和轻链可变区基因, 重组、构建到特定的表达载体中, 在原核或真核生物体内表达出具有生物学功能的抗体分子, 并通过亲和和筛选获得特异性抗体^[1]。噬菌体抗体库 (Phage antibody library) 技术是迄今为止发展最成熟、应用最广泛的制备抗体的技术, 它是一种将 PCR 技术和噬菌体展示技术相结合, 并在噬菌体表面表达、分泌, 经过筛选后获得特异性抗体的技术^[2]。噬菌体抗体库技术的基本原理是将外源 DNA 片段插入噬菌体编码蛋白基因组中, 使外源 DNA 片段的表达产物与噬菌体的外壳蛋白融合, 展示于噬菌体表面^[3], 具有操作简单、低成本以及技术成熟等特点, 在商业生产中被成功应用^[4]。目前, 噬菌体抗体库分为 Fv、Fab、单链抗体 (Single-chain antibody fragment)、单区抗体 (Single domain antibody) 和双链抗体 (Diabody) 等类型。单链抗体主要通过 15 个氨基酸序列 (Gly₄Ser)₃ linker 将重链和轻链连接起来, 具有体积小、免疫原性低的特点, 不易引起人体或动物排斥反应。因其无抗体 Fc 段, 不易与具有 Fc 受体的非靶细胞结合, 由于片段分子量较低, 能够有效穿透致密的组织屏障达到病灶部位, 在医疗诊断和疾病治疗等方面具有广泛的应用前景, 成为现代生命科学、生物医学领域的一大热点, 被认为是 21 世纪的阳光产业^[5-7]。

近年来, 噬菌体抗体库技术已逐步应用到水产养殖领域, 在养殖病害防治、药物残留检测、水体水质监测以及食品安全控制等方面已经有不少报道。另外, 也有学者将抗体库技术与抗体芯片结合对多种水体病原菌进行高通量检测, 为

抗体库在水产养殖领域的应用提供了更广阔的前景。

1 噬菌体抗体库在水产病害防控中的研究

1.1 细菌性疾病的防治 我国是水产养殖大国, 水产品年总量约占世界总量的 70%。由于环境的污染及水产养殖业本身的高密度、集约化生产, 导致养殖病害时有发生, 每年造成近百亿元的经济损失, 其中细菌性疾病造成的危害和损失尤为严重^[8]。

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种食源性的病原微生物, 广泛存在于浮游生物及海产品中, 不仅能够引发海产品的败血症, 还会导致人的食物性中毒, 引起恶心、呕吐和腹泻等肠胃炎疾病^[9]。目前对于副溶血弧菌的致病机理尚不清楚, 缺乏有效的预防与治疗手段。三型分泌系统 (T3SS) 是已知副溶血弧菌致病的主要因子之一^[10], 而 T3SS 毒力因子的运输管道 Needle 在其致病过程中起着决定性作用^[11]。方遂等^[12]通过 Overlap-PCR 将 VH、Linker 和 VL 组装成完整的 *scFv* 基因, 同时将 *scFv* 基因克隆到噬菌体载体 pCANTAB-5E 上, 成功构建了噬菌体单链抗体文库, 测得该文库库容量约为 1.4×10^7 cfu/ml。经过富集、淘洗得到 2 株验证无误的单链抗体, 经氨基酸序列分析发现 2 株菌株可视为 1 株单链抗体, ELISA 检测结果表明所筛选的单链抗体具有较高的抗体特异性。由于副溶血弧菌具有多个治病因子, 将筛选到的单链抗体与副溶血弧菌的其他致病因子抗体结合, 可制备多功能抗体, 控制和治理副溶血弧菌的发生和扩散。

鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 是海水鱼及淡水鱼中的重要致病菌, 可以感染虹鳟、鳗鲡、鲈鱼、黄鱼、石斑鱼等几十种鱼类, 致死率较高, 在我国十分流行。夏永娟等^[13]成功构建了抗鳗弧菌独特型单克隆抗体 *dsFv* 基因, 并使其准确的在 M13 噬菌体表面获得了呈现。通过 ELISA 检测发现抗鳗弧菌独特型 *dsFv* 噬菌体能够与抗原特异性结合, 抗独特型抗体能

基金项目 福建省海洋与渔业厅项目 (201212140006); 福建省教育厅项目 (JA11150); 集美大学创新团队基金项目 (2010A001)。

作者简介 贾圆圆 (1990 -), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向: 鱼类疾病防控。* 通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事鱼类疾病防控研究。

收稿日期 2014-10-11

够模拟抗原表位,可以作为疫苗使用^[14-15],而抗鳃弧菌独特型 dsFv 噬菌体可以通过细菌繁殖大量获得,降低了疫苗的成本。该 dsFv 噬菌体有望成为用于预防鱼类鳃弧菌感染的新一代基因工程疫苗。

1.2 病毒性疾病的防治 草鱼呼肠孤病毒(Reovirus of grass carp, GCRV)是我国分离的第 1 株鱼类病毒^[16-17],是引起我国草鱼幼鱼出血病大面积暴发的主要病原体,这种疾病一旦爆发,其死亡率可高达 85%^[18]。陈丛琳等^[19]从已构建的小鼠天然噬菌体展示抗体文库中淘选并获得了可以特异性识别草鱼 IgM 的单链抗体,并在已鉴定的单链抗体阳性克隆中,筛选出对草鱼 IgM 有较好的特异性结合的单链抗体 C1B3。结果表明,相对于病毒的其他结构蛋白而言,VP7 在草鱼中能产生更强的免疫反应,由此推导 VP7 应是用于疫苗设计的首选抗原。该研究通过单链抗体,为草鱼呼肠孤病毒及其他鱼类病原体重组疫苗的研发提供了重要的分析手段和策略。张晓华等^[20]利用实验室构建的大容量天然噬菌体展示单链抗体文库成功获取了能够识别 GCRV VP7 的单链抗体,此抗体将成为后面进一步研究病毒与细胞相互作用的有效工具。

对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)为已知基因组最大的动物病毒^[21],严重危害水生甲壳动物养殖业。王晓洁等^[22]从抗 WSSV 单抗的细胞株中,采用间接荧光检测法筛选出 8 株分泌较强的抗 WSSV 单抗的细胞株,可用于白斑综合症病毒快速检测试剂盒的研制。试验采用双抗夹心免疫层析法,制成快速检测、诊断 WSSV 的试纸条,整个反应只需 5 min,与以前检测 WSSV 较快的斑点免疫印迹法需要 3 h 相比,在很大程度上提高了检测速度。白斑综合症病毒检测试纸条是一种快速、简便、准确、适合于现场使用的 WSSV 检测、诊断试纸条,且无假阳性。此试纸条尤其适于养殖人员现场、时事跟踪、监控、检测,可为白斑症的预防提供可靠的监测依据。

2 噬菌体抗体库在水环境监控的研究

2.1 药物残留检测 目前,用化学药物和抗生素治疗鱼类细菌性疾病是常用且较为有效的方法,但同时具有很多弊端,如药物和抗生素在水产品中的残留、病原生物耐药性增强、水域生态污染等。在寻求病害防治的其他方法时,传统的杂交瘤技术获得的抗体不仅费时费力,而且制备过程较为复杂,无法满足高通量的需要,噬菌体抗体库技术获得的抗体具有简单、快速、高通量的优点。

磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)为化学合成抗菌药,由于其具有广谱抗菌活性,且价格低廉,应用广泛,在医学和动物的感染性疾病防治中具有重要地位,但不合理的使用容易引起过敏反应^[23],造成耐药菌增加,且动物性食品中残留的药物可能对人们的健康造成潜在的危害^[24]。赵琳等^[25]成功构建斑点叉尾鲟天然 Fab 噬菌体抗体库,最终得到的库容量约为 5.67×10^7 cfu/ml。在此抗体库的基础上,闫晓敏等^[26]以偶联卵血清蛋白的磺胺甲氧嘧(OVA-SMP)和磺胺甲恶唑(OVA-SMZ)为固相包被抗原,筛选并获得了特异性较强的

Fab 抗体。王辉等^[27]成功建立了斑点叉尾鲟单链抗体(ScFv)抗体库,并测定其库容为 5.8×10^5 cfu/ml。以 OVA-SMZ 为包被抗原,筛选到针对 OVA-SMZ 的抗体。

2.2 水质监测 在养殖过程中,投入过量的营养物质、大量施肥和投饵等可导致水体中的氮、磷超标,从而引起藻类和浮游生物过度繁殖,严重影响养殖的成活率。微囊藻素是从蓝藻水华中分离出来的多肽毒素,能够强烈抑制蛋白磷酸酶的活性,对水产养殖和水体环境的危害比较严重。已有大量文献报道微囊藻素对鱼类的危害,微囊藻素主要危害鱼类鳃、肝、肾、消化器官、循环系统和免疫系统等^[28]。Zhao 等^[29]利用噬菌体抗体库技术以微囊藻素为包被抗原,从构建的噬菌体抗体库中成功筛选到特异性目标抗体,得到的目标抗体可以快速简单地在水体中微囊藻素进行监测,在水体水质检测上具有广阔的应用前景。

3 噬菌体抗体库在水产品安全控制的研究

长久以来,河豚鱼被认为是东亚以及东南亚居民餐桌上的一道美味的鱼类食物,但由于河豚毒素有剧毒,因此每年都会发生 30 ~ 50 例河豚鱼中毒的事件^[30]。河豚毒素(Tetrodotoxin, TTX)是河豚鱼中最主要的一种毒素成分。刘立才等^[31]成功构建抗河豚毒素(TTX)的重组的单链抗体(scFv)展示文库,库容量为 1.5×10^6 cfu/ml,经过 6 轮的淘选过程,获得了与河豚毒素特异性结合的抗体,该抗体库的构建为快速检测河豚毒素提供了基础。

在热带和亚热带海域珊瑚礁的附近,有 400 多种鱼因食用毒藻类而被毒化,其中包括梭鱼、黑鲈和真鲷等重要海洋经济鱼类,这些鱼类统称为雪卡鱼。这些雪卡鱼体内都含有雪卡毒素,是一种可引起人类中毒的珊瑚鱼毒素,毒性极强,比河豚毒素的毒性强 20 倍^[32]。雪卡毒素主要存在于肌肉、内脏和生殖腺中,可引发神经性中毒。Nagumo 等^[33]通过噬菌体抗体库技术成功筛选出抗雪卡鱼毒素的特异性抗体,为今后雪卡鱼毒素的研究及其检测奠定了基础。

4 噬菌体抗体库与抗体芯片结合的研究

抗体芯片(Antibody microarrays)是一种特殊的蛋白质芯片,又称抗体微阵列,具有高特异性、高灵敏性、高通量及多样品或多指标平行分析的优点,是免疫学研究的一种新技术,已被应用到许多领域^[34]。王欣欣等^[35]用抗体芯片成功的对海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)、迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella bacterium*)、杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、海洋分支杆菌(*Nontuberculoaus mycobacteria*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、海洋分支杆菌(*Nontuberculoaus mycobacteria*)等 6 种细菌进行了准确检测。在此试验中,应用硫酸铵分级沉淀法进行兔抗血清的纯化,这能有效去除免疫血清中的非特异性抗体和杂蛋白,降低兔抗血清的非特异性吸附,从而使其与其他菌株的交叉反应降到最低。通过 ELISA 对 6 种细菌与各菌株兔抗血清之间的交叉反应,分析发现纯化后交叉反应明显减小,用吸附纯化后的抗体构建的病原菌检测抗体芯片的特异性显著增强,因此可用于水产养殖病原菌的准确检测。廖玮

等^[36]利用 pVIII 展示系统成功改进噬菌体抗体芯片,由于 pVIII N 端有多个带电氨基酸,会增加非特异性吸附,这些带电氨基酸会被阳性噬菌体上的融合抗体分子屏蔽,减少对蛋白质的吸附,从而降低了背景。降低 pVIII 的非特异吸附,不仅可以提高芯片的灵敏度,而且可以降低非特异结合的背景,提高淘选效率,大幅度提高了噬菌体抗体芯片的灵敏度和信噪比,同时可为抗体库在水产养殖领域的应用提供了新途径。

5 展望

综上所述,随着生物技术的不断发展,噬菌体抗体库技术展现出了巨大的应用前景,已成为解决生物学和医学等问题的重要手段。同时随着水产养殖业的日益发展,噬菌体抗体库技术在水产养殖中的应用也具有广阔的前景。但是,由于抗体库技术在水产领域上的应用处于初步发展阶段,因此需要投入大量的人力和物力来开拓、优化可用的抗体库。总之,抗体库技术作为一项新兴的技术,必将在水产养殖中的基础研究及其实际应用上产生深远的影响。

参考文献

- [1] 邢佑尚,汪琳,赵胤泽,等.噬菌体抗体库及其在检验检疫中的应用[J].检验检疫学刊,2012,22(5):53-57.
- [2] 蔡家利,孙加燕,扈国达,等.噬菌体抗体库技术应用研究进展[J].重庆理工大学学报:自然科学版,2012(12):22-27.
- [3] WINTER G, MILSTEIN C. Man-made antibodies[J]. Nature, 1991, 349(6307):293-299.
- [4] THIE H, MEYER T, SCHIRRMANN T, et al. Phage display derived therapeutic antibodies[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008, 9(6):439-446.
- [5] WINTER G, GRIFFITHS A D, HAWKINS R E, et al. Making antibodies by phage display technology[J]. Annual Review of Immunology, 1994, 12(1):433-455.
- [6] SHEN Z, YAN H, ZHANG Y, et al. Engineering peptide linkers for scFv immunosensors[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(6):1910-1917.
- [7] MCCAFFERTY J, GRIFFITHS A D, WINTER G, et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains[J]. Nature, 1990, 348:552-554.
- [8] 江兴龙,关瑞章,刘爱原.论我国水产养殖业的发展方向[J].中国水产,2008(1):19-20.
- [9] 齐小保,熊燕,陈智,等.武汉市6起食物中毒溶血弧菌分子特征研究[J].中国卫生检验杂志,2008,18(2):234-235.
- [10] PARK K S, ONO T, ROKUDA M, et al. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(11):6659-6665.
- [11] CORDES F S, KOMORIYA K, LARQUET E, et al. Helical structure of the needle of the type III secretion system of *Shigella flexneri*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(19):17103-17107.
- [12] 方遂.抗溶血弧菌 Needle 单链抗体的制备与鉴定[D].福州:福建农林大学,2012.
- [13] 夏永娟,黄宝成,温伟红,等.抗噬菌体独特型单克隆抗体 dsFv 的构建及其噬菌体表面呈现[J].中国生物化学与分子生物学报,2004,20

(6):719-724.

- [14] BONA C A. Internal image concept revisited[J]. Experimental Biology and Medicine, 1996, 213(1):32-42.
- [15] TRIPATHI P, QIN H, DENG S, et al. Antigen mimicry by an anti-idiotypic antibody single chain variable fragment[J]. Molecular Immunology, 1998, 35(13):853-863.
- [16] 陈燕桑,江育林.草鱼出血病病毒形态结构及其理化特性的研究[J].科学通报,1983,28(18):1138-1140.
- [17] 柯丽华,方勤,蔡宜权.一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性[J].水生生物学报,1990,14(2):153-159.
- [18] ZHANG L, LUO Q, FANG Q, et al. An improved RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of grass carp reovirus[J]. Journal of Virological Methods, 2010, 169(1):28-33.
- [19] 陈从琳,孙小云,廖兰杰,等.利用抗草鱼 IgM 的单链抗体分析草鱼呼肠孤病毒的免疫原性[J].中国科学:生命科学,2012(12):986-992.
- [20] 张晓华,袁丽,方勤,等.利用噬菌体展示技术淘选草鱼呼肠孤病毒的单链抗体[J].水生生物学报,2014,38(3):430-437.
- [21] 马晓燕,李鹏,严洁,等.对虾白斑综合症病毒的概述[J].南京师大学报:自然科学版,2013,35(4):90-100.
- [22] 王晓洁.对虾白斑病毒快速检测试剂盒的研制及其应用[D].青岛:中国海洋大学,2005.
- [23] 王翠华.正确使用磺胺类药物[J].四川畜牧兽医,1995(4):46.
- [24] 杜玉玲,常迪,吴国英,等.磺胺母核单克隆抗体的制备及其免疫学特性研究[J].中国食品学报,2013(12):139-145.
- [25] 赵琳.斑点叉尾鲴天然 Fab 噬菌体抗体库的构建[D].武汉:华中农业大学,2009.
- [26] 闫晓敏.鱼源 Fab 噬菌体抗体库的筛选,鉴定及抗 SAs 抗体的可溶性表达[D].武汉:华中农业大学,2010.
- [27] 王辉.斑点叉尾鲴天然单链噬菌体抗体库的构建及初步鉴定[D].武汉:华中农业大学,2011.
- [28] PALÍKOVÁ M, KOVÁŘ Ů F, NAVRÁTIL S, et al. The effect of Pure Microcystin LR and Biomass of Blue-Green Algae on Selected Immunological Indices of Carp (*Cyprinus Carpio* L.) and Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.)[J]. Acta Veterinaria Brno, 1998, 67(4):265-272.
- [29] ZHAO S, SHEN P, ZHOU Y, et al. Selecting peptide ligands of microcystin-LR from phage displayed random libraries[J]. Environment International, 2005, 31(4):535-541.
- [30] NOGUCHI T, EBESU J S. Puffer poisoning: epidemiology and treatment[J]. Toxin Reviews, 2001, 20(1):1-10.
- [31] 刘立才.抗河豚毒素的基因工程单链抗体的制备[D].福州:福建农林大学,2012.
- [32] 赵肃清,张焜,方岩雄,等.雪卡毒素中毒的现状与检测分析概况[J].南方水产科学,2006,2(2):68-70.
- [33] NAGUMO Y, OGURI H, TSUMOTO K, et al. Phage-display selection of antibodies to the left end of CTX3C using synthetic fragments[J]. Journal of Immunological Methods, 2004, 289(1):137-146.
- [34] INGVARSSON J, LINDSTEDT M, BORREBAECK C A, et al. One-step fractionation of complex proteomes enables detection of low abundant analytes using antibody-based microarrays[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(1):170-176.
- [35] 王欣欣,绳秀珍,战文斌.降低交叉反应的鱼类病原菌检测抗体芯片初步研究[J].海洋湖沼通报,2013(1):23-28.
- [36] 廖玮,洪龙,魏芳,等.利用 pVIII 展示系统改进噬菌体抗体芯片[J].物理化学学报,2005,21(5):508-511.

(上接第 11729 页)

本及防治效果,在吉林省玉米螟卵孵化盛期(7月初),田间应用 24% 甲氧虫酰肼悬浮剂防治 1 代玉米螟的推荐使用剂量为 375 ml/hm²。在该地区,8 月初可根据危害情况再喷施一次 24% 甲氧虫酰肼悬浮剂来防治 2 代玉米螟。

参考文献

- [1] 夏志红,潘惠康,张新兰,等.玉米穗腐病与蛀穗螟虫发生的关系[J].华北农学报,1995,10(1):88-91.
- [2] 任龙,徐希宝,张靖,等.甲氧虫酰肼对棉铃虫解毒酶活力的亚致死效应研究[J].农药学报,2013,15(3):273-278.
- [3] 朱丽梅.一个新的蜕皮激素拮抗剂:甲氧虫酰肼[J].世界农药,2001,23(6):50-52.
- [4] 李照民,赵小凡,李斐雪,等. RH-2485 对棉铃虫的室内药效试验[J].植物保护学报,2002,29(1):78-82.