

日本血吸虫未成熟卵单链抗体库的构建、筛选及初步应用*

何卓¹⁾ 汪世平^{1)**} 肖小芹¹⁾ 曾少华²⁾ 刘明社³⁾ 李林¹⁾ 周帅锋¹⁾

¹⁾中南大学湘雅医学院寄生虫学系, 长沙 410078; ²⁾湖南师范大学第三附属医院, 长沙 410006;

³⁾山西省长治医学院寄生虫学教研室, 长治 046000)

摘要 运用噬菌体展示技术构建日本血吸虫未成熟虫卵可溶性抗原(SIEA)单链抗体(scFv)表达文库, 以天然分子候选疫苗 SIEA26~28 ku 为靶抗原筛选 SIEA 单链抗体库, 获得特异性单链抗体。并将该 scFv 基因亚克隆至原核高效表达载体 PET32a, 诱导 SIEA26~28 ku 特异性 scFv 大量表达。随后以此为探针筛选日本血吸虫尾蚴 cDNA 文库, 以期获得 SIEA26~28 ku 天然分子候选疫苗相关的编码基因。结果显示, 所获得的 SIEA26~28 ku 特异性 scFv, 表达量高, 采用该探针初步筛选出相关基因核糖体蛋白 S4。SIEA26~28 ku 特异性 scFv 的获得, 为进一步筛选、分析鉴定抗日本血吸虫病天然分子候选疫苗 SIEA26~28 ku 的编码基因奠定了基础。

关键词 日本血吸虫, 未成熟虫卵可溶性抗原(SIEA), 单链抗体(scFv), 噬菌体展示抗体库, cDNA 文库
学科分类号 R383

血吸虫病是一种危害严重的人兽共患病。化疗与疫苗的联合应用, 为长远有效控制日本血吸虫病的传播带来了希望^[1]。成熟卵是血吸虫病的主要致病因素和传播血吸虫病的唯一因子。如采用免疫方法使雌虫产卵量降低或虫卵发育受阻, 从而减少虫卵的排出, 对控制血吸虫病传染源的传播具有重要意义。因此, 抗生殖、抗卵疫苗的研究一直受到 WHO/TDR 的重视^[2]。

近十多年来, 我们课题组多年的研究已经证实: SIEA 具有抗虫卵胚胎发育和抗雌虫生殖产卵的作用^[3,4], 随后的研究发现, SIEA26~28 ku 抗原分子是其中的主要效应成分之一^[5~8], 可诱导产生较高滴度的体液免疫应答。免疫组化定位研究发现, 抗卵抗体不仅可以直接作用于虫卵胚胎, 导致胚胎期死卵的增加和组织中成熟卵的下降, 而且还与雌虫卵黄腺和紧邻卵黄腺的肠腔内膜组织有高度的亲和性^[4,9]。因此, 大量制备这种特异性抗体, 对于筛选、分析鉴定天然分子候选疫苗相应的编码基因, 为解决天然分子分离纯化与制备的难题, 提供一条可能的途径。近几年来, 噬菌体单链抗体技术的发展, 为我们快速获得具有与完整抗体相同抗原结合功能的单链抗体(scFv)提供了方便。

为此, 我们通过构建 SIEA 噬菌体单链抗体

库, 用 ELISA 筛选获得 SIEA26~28 ku 特异性 scFv, 随后构建高效表达质粒 PET32a/SIEA26~28 ku-scFv, 诱导 SIEA26~28 ku 特异性 scFv 的大量表达。进一步以此为探针, 对日本血吸虫尾蚴 cDNA 文库进行了初步筛选。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 质粒, 菌种, 噬菌体和文库

噬菌体载体 pCANTAB5E, 大肠杆菌 TG1、HB2151, 辅助噬菌体 M13K07 购自 Amersham Pharmacia 公司; 载体 PET32a, 大肠杆菌 BL21 (DE3)、XL1-Blue、BM25.8 由中南大学湘雅医学院寄生虫学系保存; 日本血吸虫尾蚴 cDNA 文库由南方医科大学陈晓光教授构建、惠赠。

1.2 动物

6 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自武汉东湖区疾病

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2007CB513108), 国家高技术研究发展计划(863)(2004AA2Z3530), 湖南省“十一·五”重大专项(2006SK1001), 湖南省“十一·五”重点学科建设专项经费(07-985-2)联合资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-2355001, E-mail: wsp4373383@126.com

收稿日期: 2008-01-08, 接受日期: 2008-03-25

控制中心.

1.3 主要试剂

SIEA、电泳纯 SIEA26~28 ku 由中南大学湘雅医学院寄生虫学系制备, 方法参见文献[3,10]; RPAS detection module、HRP/anti-E tag 抗体购自 Amersham Pharmacia 公司; RT 试剂盒、蛋白质质量标准购自 Fermentas 公司; His-tag 抗体、DNA Marker 购自 Tiangen 公司; HRP/anti-mouse IgG 购自 DAKO 公司; *Bst*N I 限制性内切酶购自 NEB 公司; 其他限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、胶回收、质粒提取试剂盒购自 Takara 公司; 其他试剂为国产分析纯.

1.4 引物

VH、VL 简并引物设计参考文献[11~13], 并经适当修改. $VH_{(back)}$ 含 *Sfi* I 酶切位点, $VH_{(for)}$ 含 $(Gly_4Ser)_3$ 连接肽部分序列; $VL_{(for)}$ 含 *Not* I 酶切位点, $VL_{(back)}$ 含 $(Gly_4Ser)_3$ 连接肽部分序列, 其中 21 个碱基与 $VH_{(for)}$ 部分序列重叠. $VH_{(back)}$: 5' TTACTCGCGGCCAGCCGGCC ATGCGCCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3' (*Sfi* I), $VH_{(for)}$: 5' GCCAGAGCCACCTCCGCCTGA ACCGCCTCCACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTGCC 3', $VL_{(back)}$: 5' TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGAGGCTCGGACATTGAGCTCACCCAGTCTC 3', $VL_{(for)}$: 5' GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTBAKYTC-CARCTTKGTSCC 3' (*Not* I). B = T, C, G; K = T, G; M = A, C; R = A, G; S = G, C; W = A, T; Y = C, T. H1、H2 为扩增 SIEA26~28 ku 特异性 scFv 引物, *Eco*R I、*Sal* I 酶切位点代替 *Sfi* I、*Not* I 酶切位点. H1: 5' CGGAATTCATGGCCAGGTGCA-GC 3' (*Eco*R I), H2: 5' ACGCGTCGACCCGTTTGATTCCA 3' (*Sal* I).

1.5 方法

1.5.1 动物免疫及总 RNA 提取. SIEA 与弗氏完全佐剂混匀, 每只鼠腹腔注射 100 μ g SIEA, 2 周后, 改用弗氏不完全佐剂, 每 2 周加强 1 次, 共 4 次. 末次免疫后第 7 天, 取小鼠尾静脉血 ELISA 测定效价, 取效价达 10 000 以上的小鼠脾脏, Trizol 试剂提取脾脏总 RNA, 凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 比值.

1.5.2 cDNA 第一链的合成及全套 VH 和 VL 基因片段的扩增. 以 RNA 为模板, oligo(dt)₁₈ 为引物, M-mulv 逆转录酶反转录合成 cDNA 第一链. 以 cDNA 第一链为模板, 分别用 VH、VL 上下游引

物, 扩增全套 VH、VL 基因. PCR 条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环后 72℃ 延伸 7 min. 纯化 VH、VL 片段 PCR 产物.

1.5.3 重叠 PCR 法拼接扩增 scFv 片段. 以 VH、VL 片段互为模板、引物, 重叠 PCR 法随机拼接 VH、VL 片段成 scFv, PCR 扩增条件同 1.5.2. 7 个循环后 72℃ 延伸 3 min. 在 50 μ l 反应体系中补加 $VH_{(back)}$ 、 $VL_{(for)}$ 各 1 μ l, 10 $\times$ 缓冲液 0.5 μ l, 双蒸水 2.5 μ l, 继续 PCR, 扩增条件同前. 30 个循环 72℃ 延伸 7 min 后纯化 PCR 产物. 以 scFv 为模板, $VH_{(back)}$ 、 $VL_{(for)}$ 为引物, PCR 扩增并纯化 scFv.

1.5.4 单链抗体库的构建及鉴定. *Sfi* I、*Not* I 双酶切 scFv 片段、pCANTAB5E 载体并纯化, 16℃ 连接过夜后电转化至感受态 TG1 菌, 加入 2 $\times$ YT-AG 液, 37℃, 250 r/min 培养 1 h. 测定库容. 涂布菌液于 SOBAG 板, 30℃ 培养过夜. 随机挑取多个菌落, 碱裂解法提取质粒, 以质粒为模板, $VH_{(back)}$ 、 $VL_{(for)}$ 为引物, PCR 扩增检测是否含插入子. *Bst*N I 酶切质粒, 观察酶切片段差异来鉴定多样性. 2 $\times$ YT 液洗下其他菌落, -70℃ 保存.

1.5.5 全套 scFv 基因噬菌体表面呈现. 取单链抗体库液按 1:20 置于 2 $\times$ YT-AG 液中, 37℃ 振荡培养至对数期, M13K07 拯救使单链抗体基因表面呈现, 离心弃上清, 2 $\times$ YT-AK 液重悬, 37℃ 培养过夜. 离心取上清, 用 1/5 体积 PEG/NaCl 沉淀重组噬菌体, 2 $\times$ YT 液悬浮沉淀.

1.5.6 SIEA26-28 ku 单链抗体的富集及筛选. 20 mg/L SIEA26~28 ku 包被硝酸纤维膜, 用 5% 脱脂奶粉(MPBS), 4℃ 封闭过夜, 加入重组噬菌体, 37℃ 温育 1 h, PBS、PBST 各洗 5 次(第 2~4 轮富集, 各洗 10 次), 0.1 mol/L Gly-HCl (pH2.2) 洗脱吸附的重组噬菌体, 然后用 1 mol/L Tris-HCl (pH8.0) 中和. 将洗脱的噬菌体加入对数期 TG1 菌中, 37℃ 温育 15 min, 250 r/min 培养 45 min. 离心弃上清, 2 $\times$ YT-AG 液重悬, 振荡培养至对数期, M13K07 拯救生成富集克隆的噬菌体表面呈现文库. 共富集 4 轮. 取 4 轮富集后再感染的库液涂布 SOBAG 板, 30℃ 培养过夜. 挑取单菌落经 M13K07 拯救获得单个重组噬菌体, 用等体积 2% MPBS, 室温封闭 10 min, 加到包被 SIEA26~28 ku 的酶标板中, 37℃ 温育 2 h, 加入 HRP 标记 M13 抗体, 37℃ 温育 1 h, TMB-H₂O₂ 显色, 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测 A_{450} 值.

1.5.7 可溶性 scFv 的表达与分析. 将阳性克隆感染琥珀终止密码子非抑制表型菌 HB2151, E-tag 与 g3 基因之间琥珀终止密码子被识别, 抗体以可溶性形式表达. 于 2×YT-AI 液中, 30℃, 250 r/min 诱导 20 h, 离心收集沉淀, 分别提取细菌周质及胞质内可溶性 scFv. SDS-PAGE、免疫印迹分析可溶性单链抗体的表达及其特异性. 抗体为 HRP 标记 E-tag 抗体, DAB-H₂O₂ 显色.

1.5.8 特异性 scFv 序列测定. 提取特异性 SIEA26~28 ku-scFv 菌质粒, 以 pCANTAB5E 载体两端固定序列 R1、R2 为引物测序. R1: 5' CCA-TGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC 3'; R2: 5' C-GATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCC 3'. 将序列登录 NCBI 进行核苷酸序列 Blast 分析, 与 Kabat 数据库中免疫球蛋白序列进行 Blast 分析.

1.5.9 重组质粒 PET32a/SIEA26~28 ku-scFv 的构建. 依据 SIEA26~28 ku-scFv 的 ORF 设计引物 H1、H2, 以 1.5.8 提取的质粒为模板, PCR 扩增 scFv 基因并纯化, 条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环后 72℃ 延伸 7 min. 纯化 scFv PCR 产物, EcoR I、Sal I 双酶切 scFv 片段、PET32a 载体并纯化, 16℃ 连接过夜后转化至感受态 BL21(DE3) 菌中, 涂布含氨苄青霉素的 LB 平板, 37℃ 过夜培养后挑取菌落, PCR 及酶切鉴定确定阳性克隆.

1.5.10 单链抗体的表达与分析. 接种阳性菌于 LB 液中, 37℃ 培养过夜, 1:100 转种至 LB 液, 继续培养至 A₆₀₀ 约 0.6, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 诱导 3h 后离心, PBS 重悬后冰浴超声, 4℃, 超速离心 10 min 收集上清. SDS-PAGE、免疫印迹鉴定可溶性 scFv, 一抗为鼠抗 His-tag 抗体, 二抗为 HRP 标记兔抗鼠 IgG, DAB-H₂O₂ 显色.

1.5.11 筛选 cDNA 文库. 将文库稀释至适当浓度, 与 XL1-Blue 菌于 37℃ 孵育 20 min, 加入顶胶铺板, 37℃ 培养至噬斑针尖大小, 覆盖 IPTG 浸泡的 NC 膜, 培养 6 h 后揭膜, 5%MPBS, 4℃ 封闭过夜, PBST 洗涤, 加入可溶性 scFv, 4℃ 过夜, PBST 洗涤, 加入鼠抗 His-tag 抗体, 37℃ 孵育 2 h, PBST 洗涤, 加入 HRP 标记兔抗小鼠 IgG, 37℃ 孵育 2 h, DAB-H₂O₂ 显色. 挑取 3 轮筛选持续阳性噬斑, 与 BM25.8 菌液 31℃ 孵育 30 min, 加入 LB 液, 31℃, 225 r/min 培养 1 h, 取上清涂布 LB-Amp 平板, 31℃ 培养过夜, 挑取单菌落, 提取质粒.

1.5.12 PCR 扩增与序列分析. 根据 cDNA 文库定

向克隆入 λTriplex2/BM25.8 系统的 Sfi I A 和 Sfi I B 位点附近序列, 设计引物 P1、P2(P1: 5' CTCCG-AGATCTGGACGAGC 3'; P2: 5' TAATACGAC-TCACTATAGGG 3'), PCR 扩增阳性克隆, 条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后 72℃ 延伸 7 min. 取长度超过 691 bp 的克隆(空载体上测序引物间序列长 191 bp)测序. 去除 5'端 Sfi I A 及之前序列和 3'端 Sfi I B 及之后序列, 将编辑后的 EST 通过 NCBI 的 Blastn、Blastp 程序进行核苷酸和蛋白质水平的同源性分析.

2 结 果

2.1 RNA 质量分析

RNA 完整性好, 有 28 S, 18 S, 5 S 三条带(图 1), A₂₆₀/A₂₈₀ 比值为 1.898.

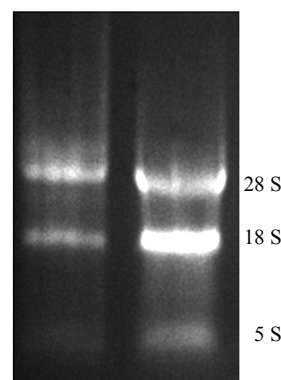


Fig. 1 Total RNA extracted from spleens of mice immunized with SIEA

2.2 全套 VH 和 VL 基因的扩增及 scFv 基因的随机拼接

PCR 扩增出抗 SIEA 全套 VH、VL 基因, VH 片段约 420 bp, VL 片段约 360 bp (图 2a). VH 和 VL 片段随机拼接成约 780 bp 的 scFv 片段(图 2b).

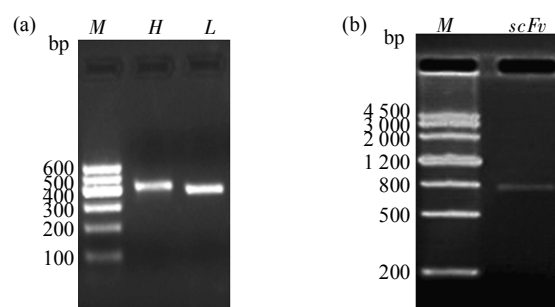


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of VH, VL and scFv fragment

(a) M: DNA marker; H: VH PCR products; L: VL PCR products; (b) M: DNA marker; scFv: scFv PCR products.

2.3 库容, 重组率及多样性

SIEA 单链抗体库库容为 2.27×10^9 , 随机挑选多个菌落均能扩出大小约 780 bp 片段, 重组率较高(图 3), 多样化的 *Bst*NI 酶切图谱证实单链抗体库多样性好(图 4).

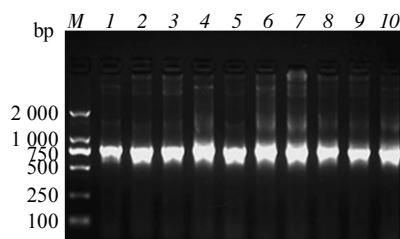


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products of recombinant clones

M: DL2000 ladder marker; 1~10: PCR products of 10 clones from scFv library.

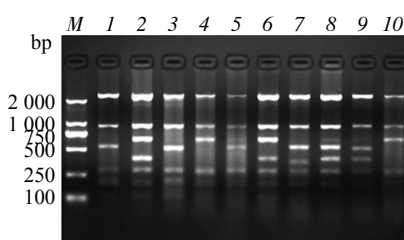


Fig. 4 Fingerprint analysis of scFv genes digested with *Bst*NI

M: DL2000 ladder marker; 1~10: 10 clones from scFv library.

2.4 富集和筛选

4 轮富集后, 针对 SIEA26~28 ku 的噬菌体抗体收率呈增加趋势, 比第 1 轮增加约 1 300 倍(表 1). 从第 4 轮富集后的抗体库中随机挑取 90 个菌落, ELISA 筛选获得 5 个与 SIEA26~28 ku 反应的阳性克隆.

Table 1 Selection of scFv displaying phage binding to SIEA26~28 ku

Panning rounds	1st	2nd	3rd	4th
Total input phage(CFU)	10^{12}	10^{12}	10^{12}	10^{12}
Total output phage(CFU)	2.5×10^3	1.95×10^5	1.15×10^6	3.25×10^6
Ratio(output phage/input phage)	2.5×10^{-9}	1.95×10^{-7}	1.15×10^{-6}	3.25×10^{-6}

2.5 SDS-PAGE、免疫印迹分析可溶性 scFv 表达

阳性克隆表达约 32 ku 的 g3p-scFv-E tag 融合蛋白, 能被 HRP/anti E-tag 抗体识别, 阴性对照 *E. coli* HB2151 未见融合蛋白表达(图 5, 6). 其中有一阳性克隆表达的可溶性 scFv 识别 SIEA 于

26~28 ku 的位置, 条带单一, 为 SIEA26~28 ku 特异性 scFv(图 7).

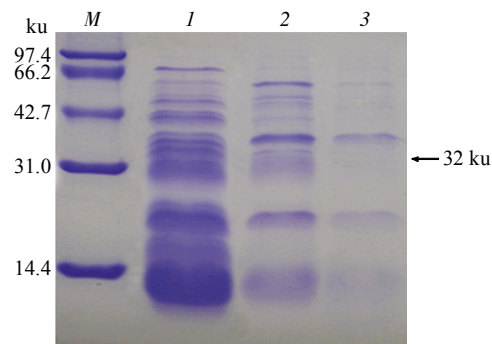


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of positive scFv

M: Protein marker; 1: Whole cell extract of positive clone; 2: Periplasmic extract of positive clone; 3: Periplasmic extract of negative control (*E. coli* HB215).

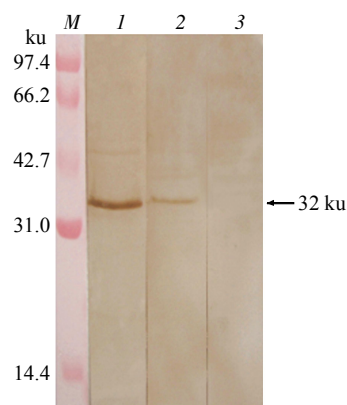


Fig. 6 Western blot analysis of positive scFv

M: Protein marker; 1: Whole cell extract of positive clone; 2: Periplasmic extract of positive clone; 3: Periplasmic extract of negative control (*E. coli* HB215).

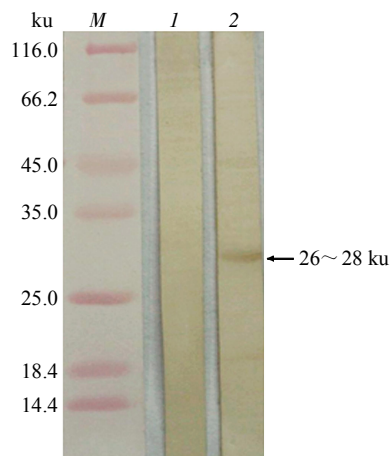


Fig. 7 Western blot analysis of specific SIEA26~28 ku scFv reacting with SIEA

M: Protein marker; 1: Negative control (*E. coli* HB215); 2: Specific SIEA26~28 ku scFv.

2.6 SIEA26~28 ku特异性 scFv DNA 序列分析

SIEA26~28 ku特异性 scFv DNA 长 726 bp, 编码 242 个氨基酸. VH 基因长 363 bp, 编码 121 个氨基酸, VL 基因长 318 bp, 编码 106 个氨基酸, VH 和 VL 通过短肽(Gly₄Ser)₃ 连接. 将 VH、VL 基

因序列登录 NCBI 进行核苷酸序列 Blast 分析, VH 的同源序列均为鼠 Ig 重链同变区基因, 同源性 98%, 属于 γ 链类型; VL 同源序列均为鼠 Ig V κ 基因, 同源性 97%; VH、VL 均具有 4 个框架区 (FRs) 和 3 个抗原互补决定区 (CDRs)(图 8).

```

1 atggcccaggtgcagctgcaggagtcaggggctgaactggcaaacctggggcctcagtgagatgtcctgc
  M A Q V Q L Q E S G A E L A K P G A S V K M S C
73 aagccttctggtacacctttactagctactgtagcactgggtataaacagaggcctggacagggtctggaa
  K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G Q G L E
                                VH-CDR1
145 tggattggatacattaatcctagcactgggttatactgagtacaatcagaagttcaaggacaaggccacattg
  W I G Y I N P S T G Y T E Y N Q K F K D K A T L
                                VH-CDR2
217 actgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactgagcagcctgacatctgaggactctgcagctctat
  T A D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y
289 tactgtgcaagacgcgactatgattacgacggatacttcgatgtctggggcgaggcaccacgggtcaccgtc
  Y C A R R D Y D Y D G Y F D V W G A G T T V T V
                                VH-CDR3
361 tcctcaggtggaggcgggttcaggcggaggtggctctggcggtggaggctcggacattgagctcaccagctct
  S S G G G G S G G G S G G G G S D I E L T Q S
                                Linker
433 ccagcactcatgtctgcactctccaggggagaaggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgttaagttac
  P A L M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y
                                VL-CDR1
505 atgtactggtaccagcagaagccaggatcctccccagactcctgatttatgacacatccaacctggtcttc
  M Y W Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S N L A S
                                VL-CDR2
577 ggagtcctctgctcgttcagtgaggcagtggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagcatggaggct
  G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A
649 gaagatgctgccacttattactgccatcagcggagtagttacagcttcggagggggacaaagctggaatc
  E D A A T Y Y C H Q R S S Y T F G G G T K L E I
                                VL-CDR3
721 aaacgg
  K R

```

Fig. 8 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of specific SIEA26~28 ku scFv

2.7 PET32a/SIEA26~28 ku-scFv 重组质粒的鉴定

以 PET32a/SIEA26~28 ku-scFv 质粒为模板, PCR 扩增得到与目的片段大小一致的产物, *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切得到 5.9 kb 和约 730 bp 两个片段, 空载体 PET32a 酶切后仅有一 5.9 kb 左右片段(图 9).

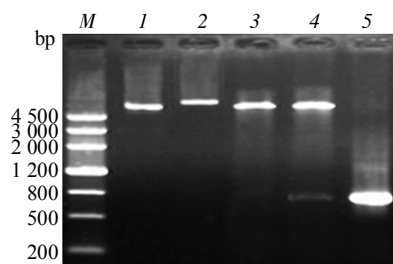


Fig. 9 Restriction and PCR identification of the recombinant plasmid PET32a/SIEA26~28 ku-scFv

M: DNA marker; 1: PET32a plasmid; 2: PET32a/SIEA26~28 ku-scFv plasmid; 3: PET32a digested by *EcoR* I and *Sal* I; 4: PET32a/SIEA26~28 ku-scFv digested by *EcoR* I and *Sal* I; 5: PCR products of PET32a/SIEA26~28 ku-scFv plasmid.

2.8 SDS-PAGE、免疫印迹分析可溶性 scFv

结果显示, PET32a/SIEA26~28 ku-scFv 重组菌表达约 46 ku 的可溶性单链抗体融合蛋白 Trx-scFv, IPTG 诱导 3h 后表达量达峰值, 且能被 His-tag 抗体识别. 空载体 PET32a 菌未见该融合蛋白表达(图 10, 11).

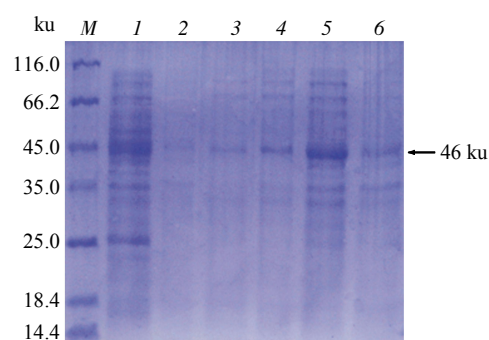


Fig. 10 SDS-PAGE analysis of soluble Trx-scFv

M: Protein marker; 1: PET32a induced at 3h; 2~6: PET32a/SIEA26~28 ku-scFv induced at 0, 1, 2, 3, 4 h respectively.

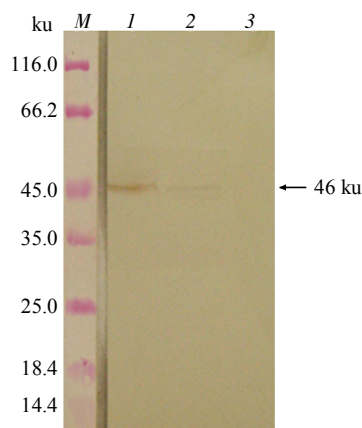


Fig. 11 Western blot analysis of soluble Trx-scFv

M: Protein marker; 1, 2: PET32a/SIEA26~28 ku-scFv induced at 3, 0 h respectively; 3: PET32a uninduced.

2.9 cDNA 文库的筛选

以 SIEA26~28 ku 特异性 scFv 为探针, 筛选获得 8 个阳性克隆. PCR 扩增可见插入的 cDNA 分子片段大小分布于 0.5~2.0 kb 之间(图 12).

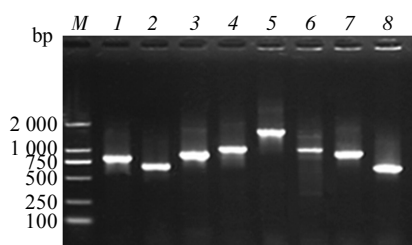


Fig. 12 Agarose gel electrophoresis of PCR products of positive clones

M: DL2000 ladder marker; 1~8: Positive clones.

2.10 测序结果与分析

选取强阳性克隆测序, 获得分子质量约为 28 ku 阳性克隆一个, 初步分析鉴定为日本血吸虫核糖体蛋白 S4 基因(RPS4). 基因全长 871 bp, 开放阅读框 795 bp, 编码 264 个氨基酸, 理论分子质量约 28 ku, 等电点(pI)为 10.39. RPS4 是小亚基核糖体蛋白的一种, 定位于 40 S 和 60 S 亚基连接处^[14], 同起始因子 eIF-3 相互作用^[15], 可能参与了核糖体与 mRNA 的结合, 被认为是更直接地涉及核糖体功能的小亚基蛋白, 该部分缺失将抑制蛋白质的合成.

3 讨 论

单抗抗体作为诊断、治疗手段被应用于许多疾病, 如癌症^[16]、病毒性疾病^[17]、寄生虫病^[18]等. 近年来, 血吸虫病研究领域研制出了一些具有治疗和诊断价值的单抗抗体^[19~22]. SIEA 单抗抗体库的构建为抗日本血吸虫病天然分子候选疫苗的研发提供了新的途径. 我们为了获得抗日本血吸虫病天然分子候选疫苗 SIEA26~28 ku 的特异性 scFv, 在传统筛选方法的基础上, 用具有较强抗原结合能力的 NC 膜替代常规筛选方法所用的固相载体, 并加强洗涤力度去除非特异性 scFv, 获得了较高阳性率. 同时, 为了提高可溶性 scFv 的表达量, 将 scFv 片段克隆至含硫氧还蛋白(Trx)的表达载体 PET32a, 原来以不溶形式存在的蛋白质当与 N 端硫氧还蛋白(Trx·Tag)序列融合后, 硫氧还蛋白驱动二硫键形成, 促进 scFv 以可溶性形式大量表达, 为其进一步分析应用提供了可能.

研究发现, SIEA26~28 ku 天然分子候选疫苗特异性 scFv 具有与完整抗体相同的抗原结合功能. 以此为探针筛选日本血吸虫 cDNA 文库, 获得天然分子候选疫苗相应的编码基因, 可为 SIEA26~28 ku 天然分子候选疫苗的大量制备提供可能. 免疫印迹分析证明, 未成熟虫卵可溶性抗原 26/28 ku(SIEA26~28 ku)可被血吸虫尾蚴感染血清特异识别^[5]; 同时发现 SIEA26~28 ku 天然分子候选疫苗和致弱尾蚴均能诱导宿主产生明显的抗生殖、抗卵胚发育的免疫效应^[23, 24]; 李华等^[25]比较了紫外线照射前后尾蚴抗原的变化, 发现紫外线照射致弱尾蚴在约 26 ku 的蛋白质浓度明显高于正常尾蚴, 与正常尾蚴抗原反应比较, 紫外线照射尾蚴免疫猪血清与照射尾蚴抗原反应, 在 26 ku 处出现一条明显的强反应条带. 研究结果提示, SIEA26-28 ku 天然分子与致弱尾蚴疫苗抗原之间可能存在起免疫保护作用共同抗原. 我们采用高效天然分子疫苗免疫的猪血清筛选尾蚴抗原, 也获得了一些与 SIEA 共同抗原的类似结果^[26].

我们以 SIEA26~28 ku 特异性 scFv 为探针, 初步筛选了日本血吸虫尾蚴 cDNA 文库. 获得了核糖体蛋白 S4 基因(RPS4), 在日本血吸虫研究中尚未见对该基因的深入报道. 有研究发现 RPS4 除具有看家基因的功能外, 很可能参与生物系统的发育调控, 其表达水平随细胞的类型和生长状况不同出现明显的差异表达. 有人发现核糖体 S4 蛋白参与

了黄鳝性别分化发育,在不同性腺中也存在差异表达^[27]。溴氰菊酯抗性蚊中,核糖体 S4 蛋白就存在着差异表达,而这种差异表达的结果与溴氰菊酯的抗药性和敏感性抗性有关^[28]。在利什曼原虫病疫苗的研究中,核糖体蛋白 S4 基因作为疫苗应用的潜在价值已被肯定^[29]。RPS4 在血吸虫不同阶段是否存在差异表达及其作为疫苗的潜在价值,有待进一步深入研究。此外,特异性 SIEA26~28 ku 单链抗体的制备成功也为抗血吸虫病理的治疗性疫苗研究提供了基础。

参 考 文 献

- Bergquist R, Al-Sherbiny M, Barakat R, *et al.* Blueprint for schistosomiasis vaccine development. *Acta Trop*, 2002, **82**(2):183~192
- UNDP/World Bank/WHO/TDR. Meeting on strategies for the development of a schistosomiasis vaccine. TDR/SCH/VAC-DEV, 1991, **3**: 1~11
- 汪世平, 赵慰先, 易新元, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵可溶性抗原诱导抗卵免疫初步研究. 湖南医科大学学报, 1995, **20**(3): 193~196
Wang S P, Zhao W X, Yi X Y, *et al.* Bulletin of Human Medical University, 1995, **20**(3): 193~196
- 汪世平, 赵慰先, 周汨波, 等. 日本血吸虫卵的体外培养与抗卵胚发育研究. 中华医学杂志, 1996, **76**(3): 218~221
Wang S P, Zhao W X, Zhou M B, *et al.* Natl Med J Chin, 1996, **76**(3): 218~221
- 汪世平, 赵慰先, 易新元, 等. 日本血吸虫未成熟卵可溶性抗原的初步分析. 中国人兽共患病杂志, 1995, **11**(4): 35~37, 封底
Wang S P, Zhao W X, Yi X Y, *et al.* Chinese Journal of Zoonoses, 1995, **11**(4):35~37, back cover
- 汪世平, 周汨波, 张顺科, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵对小鼠肝肉芽肿形成的免疫学影响. 中华医学杂志, 1997, **77**(10): 768~770
Wang S P, Zhou M B, Zhang S K, *et al.* Natl Med J Chin, 1997, **77**(10): 768~770
- 汪世平, 周汨波, 沈国励, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵 26/28 ku 抗原诱导抗雌虫生殖和抗卵胚发育免疫的研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1997, **15**(2):79~83
Wang S P, Zhou M B, Shen G L, *et al.* Chin J Parasitol Parasit Dis, 1997, **15**(2): 79~83
- 汪世平, 周汨波, 曾宪芳, 等. 抗日本血吸虫生殖及卵胚发育免疫的研究. 中国血吸虫病防治杂志, 1998, **10**(疫苗研究专辑):7~12
Wang S P, Zhou M B, Zeng X F, *et al.* Chin J Schisto Control, 1998, **10**(Suppl): 7~12
- 汪世平, 周汨波, 曾庆仁, 等. 抗日本血吸虫未成熟虫卵部分纯化抗原免疫血清的制备及定位观察. 中华传染病杂志, 1997, **15**(3): 155~156
Wang S P, Zhou M B, Zeng Q R, *et al.* Chin J Infect Dis, 1997, **15**(3):155~156
- 汪世平, 周汨波, 李 华, 等. 日本血吸虫未成熟虫卵 26/28 ku 抗原的分离与纯化. 中国血吸虫病防治杂志, 1996, **8** (3):270~273
Wang S P, Zhou M B, Li H, *et al.* Chin J Schisto Control, 1996, **8**(3):270~273
- 王 弘, 潘 科, 雷红涛, 等. 抗克伦特罗单链抗体噬菌体展示文库的构建、初步筛选及鉴定. 农产品加工学刊, 2005 (9, 10): 124~127
Wang H, Pan K, Lei H T, *et al.* Academic Periodical of Farm Products Processing, 2005(9, 10):124~127
- 田 旺, 张 奇, 杨文博, 等. 抗松材线虫纤维素酶单链抗体库的构建及筛选. 生物工程学报, 2005, **11**(6): 900~905
Tian W, Zhang Q, Yang W B. *et al.* Chinese Journal of Biotechnology, 2005, **11**(6): 900~905
- Orlandi R, Güssow D H, Jones P T, *et al.* Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 3833~3837
- Uchiumi T, Kikuchi M, Ogata K. Cross-linking study on protein neighborhoods at the subunit interface of rat liver ribosomes with 2-iminothiolane. *J Biol Chem*, 1986, **261**(21): 9663~9667
- Westermann P, Nygård O. The spatial arrangement of the complex between eukaryotic initiation factor eIF-3 and 40S ribosomal subunit. Cross-linking between factor and ribosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1983, **741**(1): 103~108
- Von Minckwitz G, Harder S, Hövelmann S, *et al.* Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv (FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Cancer Res*, 2005, **7**(5): 617~626
- Zuber C, Knackmuss S, Rey C, *et al.* Single chain Fv antibodies directed against the 37 ku/67 ku laminin receptor as therapeutic tools in prion diseases. *Mol Immunol*, 2008, **45**(1): 144~151
- Yoshida S, Ioka D, Matsuoka H, *et al.* Bacteria expressing single-chain immunotoxin inhibit malaria parasite development in mosquitoes. *Mol Biochem Parasitol*, 2001, **113**(1): 89~96
- 徐 劲, 吴忠道, 陈守义, 等. 抗日本血吸虫卵单抗 33F5 可变区轻、重链基因的串联及克隆. 中国血吸虫病防治杂志, 2002, **14** (3): 173~175
Xu J, Wu Z D, Chen S Y, *et al.* Chin J Schisto Control, 2002, **14**(3): 173~175
- 宋晓彤, 冯振卿, 王祝鸣, 等. 日本血吸虫单克隆抗独特型抗体 NP30 单链抗体基因的构建和表达. 中国寄生虫学和寄生虫病杂志, 2002, **20**(3): 152~154
Song X T, Feng Z Q, Wang Z M, *et al.* Chin J Parasitol Parasit Dis, 2002, **20**(3): 152~154
- 俞小淙, 蒋 欣, 黄浩旻, 等. 抗日本血吸虫膜蛋白特异性单链抗体的构建及表达. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2001, **19**(3): 135~140
Yu X C, Jiang X, Huang H M, *et al.* Chin J Parasitol Parasit Dis, 2001, **19**(3): 135~140
- Chen D X, He A, Zhan X M, *et al.* Schistosoma japonicum: construction of phage display antibody library and its application in the immunodiagnosis of infection. *Chinese Medical Journal*, 2004, **117**(11):1679~1703
- Shi Y E, Jiang C F, Han J J, *et al.* Immunization of pigs against

- infection with *Schistosoma japonicum* using ultraviolet-attenuated cercariae. *Parasitol*, 1993, **106**: 459~462
- 24 沈际佳, 蒋作君, 汪学龙, 等. 紫外线减毒尾蚴疫苗预防 BALB/C 小鼠日本血吸虫病的研究. *中国公共卫生*, 1998, **14**(1):16~17
Shen J J, Jiang Z J, Wang X L, *et al.* *Chin J Public Health*, 1998, **14**(1):16~17
- 25 李 华, 陈晓光, 杨培梁, 等. 紫外线照射前后日本血吸虫尾蚴抗原的初步分析. *第一军医大学学报*, 2002, **22**(8): 697~699
Li H, Chen X G, Yang P L, *et al.* *J First Mil Med Univ*, 2002, **22**(8): 697~699
- 26 刘雪琴, 汪世平, 曾少华, 等. 高效天然分子疫苗免疫猪血清筛选尾蚴抗原的结果分析. *寄生虫与医学昆虫学报*, 2007, **14**(3): 141~144
Liu X Q, Wang S P, Zeng S H, *et al.* *Acta Parasitol Med Entomol Sin*, 2007, **14**(3): 141~144
- 27 商 璇, 何 焱, 张 雷, 等. 黄鳍性腺高表达的核糖体蛋白基因. *遗传*, 2005, **27**(2):227~230
Shang X, He Y, Zhang L, *et al.* *Hereditas (Beijing)*, 2005, **27**(2): 227~230
- 28 王卫杰. 淡色库蚊核糖体蛋白 S4 基因克隆及其在溴氰菊酯抗性作用中的初步研究.[学位论文]. 南京: 南京医科大学病原生物学系, 2007
Wang W J. [thesis]. Nanjing: Department of Pathogen Biology, Nanjing Medical University, 2007
- 29 Probst P, Stromberg E, Ghalib H W, *et al.* Identification and characterization of T cell-stimulating antigens from *Leishmania* by CD4 T cell expression cloning. *J Immunol*, 2001, **166**(1): 498~505

Construction, Screening and Application of Single-chain Fv Antibody Library Against Immature Egg of *Schistosoma japonicum**

HE Zhuo¹⁾, WANG Shi-Ping^{1)**}, XIAO Xiao-Qin¹⁾, ZENG Shao-Hua²⁾,
LIU Ming-She³⁾, LI Lin¹⁾, ZHOU Shuai-Feng¹⁾

¹⁾ Department of Parasitology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China;

²⁾ The Third Affiliated Hospital, Hunan Normal University, Changsha 410006, China;

³⁾ Department of Parasitology, Shanxi Province Changzhi School of Medicine, Changzhi 046000, China)

Abstract Single-chain Fv (scFv) antibody library against SIEA (soluble immature egg antigen) of *Schistosoma japonicum* was constructed by phage display technology. Specific SIEA26~28 ku scFv was obtained by screening the SIEA scFv library using the natural molecular candidate vaccine, SIEA26~28 ku. The specific scFv fragment was subcloned to prokaryotic expression vector PET32a and induced the expression of soluble specific scFv in high level. Subsequently, specific scFv as a probe was used to screen the cercaria cDNA library of *Schistosoma japonicum* to get the coding genes of SIEA26~28 ku molecules. Results showed that specific SIEA26~28 ku scFv with high level expression was achieved. The corresponding gene, ribosomal protein S4 was obtained by initially screening the cercaria cDNA library with the specific SIEA26~28 ku scFv. The obtaining of specific SIEA26~28 ku scFv lays the foundation for further screening and identification of the coding genes of SIEA26~28 ku, the natural molecular candidate vaccine against schistosomiasis.

Key words *Schistosoma japonicum*, soluble immature egg antigen (SIEA), single-chain Fv antibody (scFv), phage display antibody library, cDNA library

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China(2007CB513108), Hi-Tech Research and Development Program of China(2004AA2Z3530), Hunan Province "Eleventh Five-Year Plan" Important Special Program (2006SK1001) and Hunan Province "Eleventh Five-Year Key Xueke Plan" (07-985-2).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-2355001, E-mail: wsp4373383@126.com

Received: January 8, 2008 Accepted: March 25, 2008