

# 氧氟沙星单链抗体库的构建、筛选及蛋白结构模拟

何扩<sup>1,2</sup>, 张秀媛<sup>2</sup>, 杜欣军<sup>1</sup>, 王俊平<sup>1</sup>, 杨青<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学, 教育部食品营养与安全重点实验室, 天津 300457)

(2. 河北北方学院, 河北张家口 075000)

**摘要:** 利用噬菌体展示技术构建兽药氧氟沙星单链抗体(scFv)库, 从中筛选氧氟沙星特异性噬菌体scFv以及模拟其三维结构。将从氧氟沙星杂交瘤细胞提取的总RNA, 用RT-PCR反转录合成第一链cDNA, 设计以针对鼠源重链可变区(VH)及轻链可变区(VL)基因的兼并引物, 通过PCR扩增获得VH和VL可变区基因, 采用重叠延伸PCR技术将VH和VL拼接为全长scFv基因片段, 将经内切酶EcoR I和HindIII双酶切后的scFv基因片段插入到T7噬菌体中, 经包装蛋白体外包装后转化宿主菌BLT5403, 成功构建库容量为 $3 \times 10^5$  pfu/ml氧氟沙星单链抗体库, 经过4轮吸附-洗脱-扩增的富集后, 采用直接竞争ELISA筛选得到4个特异性噬菌体scFv, 经测序最后运用Epcasy软件模拟特异性scFv的三维结构和物理化学性质。为进一步大量表达氧氟沙星单链抗体奠定了坚实的基础。

**关键词:** 氧氟沙星; 单链抗体; 噬菌体展示; ELISA

文章编号: 1673-9078(2014)3-108-113

## Construction, Screening and Protein Structure Simulation of Single Chain Antibody Fragment Library against Ofloxacin

HE Kuo<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiu-yuan<sup>2</sup>, DU Xin-jun<sup>1</sup>, WANG Jun-ping<sup>1</sup>, YANG Qing<sup>1</sup>

(1. Tianjin University of Science and Technology, Ministry of Education Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin 300457, China) (2. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract:** Single chain antibody fragment (scFv) libraries were constructed for Ofloxacin by the phage display technology. Specific anti-Ofloxacin scFv was screened and its three-dimensional structure was simulated. Total RNA was abstracted from hybridoma cell of the Ofloxacin and used to amplify VH and VL gene by RT-PCR by degenerate primers. VH and VL were joined by overlap extension PCR to form the single chain variable fragment (scFv) gene, then scfv was inserted into Phage T7 after incision enzyme EcoR I and Hind III double digestion and was transformed by host bacteria BLT5403. Phage single chain antibody libraries consisting of  $3 \times 10^5$  pfu/ml were successfully constructed. After four times of enriched procedure in the order of adsorption-elution-amplification, four Ofloxacin positive phage scFv clones were screened by direct competitive ELISA. The structure of specific scFv and physicochemical property were also simulated. This research lays a solid foundation for the further expression of anti-Ofloxacin scFv.

**Key words:** Ofloxacin; single chain antibody; phage display ELISA

氧氟沙星(Ofloxacin)为第三代喹诺酮类抗菌药, 抗菌谱广, 对革兰阳性菌及阴性菌均有强大的抗菌作用。对厌氧菌和肺炎支原体也有良好作用。广泛应用于畜牧业生产中, 喹诺酮类药物的对人体有一定副作用, 包括对胃肠道不良反应, 中枢神经系统不良反应, 心脏的毒性作用<sup>[1]</sup>。故在牲畜体内的残留毒性会对环境生物及人体健康造成严重的危害。

酶联免疫技术作为一种先进的小分子物质检测方法, 具有检测速度快、特异性强灵敏度高优点, 目

收稿日期: 2013-09-29

基金项目: 国家863计划科学基金资助项目(2006AA10Z448); 国家自然科学基金资助项目(20905058)

作者简介: 何扩(1978-), 男, 在读博士, 副教授, 抗体免疫检测技术

前被广泛应用于食品中有毒有害物质的检测。但在抗体制备过程中小分子有害物质的半抗原不易合成、抗体制备的周期长、动物的选择要求较高, 且由于动物个体差异导致批次间稳定性差, 不易于大量制备, 这些缺点大大限制了其应用的范围。单链抗体作为第三代抗体, 应用DNA重组技术及蛋白质工程技术将抗体基因进行加工、改造和重新装配, 然后克隆到合适的表达载体中, 在适当的宿主细胞中表达并正确折叠成具有生物学功能的一种抗体分子。由于其具有分子小、免疫原性低、可塑性强及不需免疫动物可大批生产等优点, 在酶联免疫技术检测食品中抗菌素残留方面显示出前两代抗体无法比拟的优点。

目前还没有关于氧氟沙星噬菌体抗体库构建的相

关报道,本研究利用噬菌体表面呈现技术,构建抗氧氟沙星噬菌体单链抗体库,从中筛选出具有抗原结合活性的抗氧氟沙星单链抗体噬菌体阳性克隆,并获得抗氧氟沙星特异性单链抗体的基因序列,为进一步实现氧氟沙星免疫法快速检测提供一种获得抗氧氟沙星特异性抗体的新途径<sup>[7]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌株及细胞株

氧氟沙星杂交瘤本实验室制备;实验所用供试 T7 噬菌体购于 Novagen 公司; pGEM-T-Easy 质粒购买于 Promega 公司; 本实验所用的大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、

BLT5403 均为实验室保种。

#### 1.1.2 主要试剂

卵清蛋白、牛血清蛋白羊购 Sigma 公司; HindIII 限制性内切酶、EcoR I 限制性内切酶购自 Promega 公司; T7-Tag HRP 购自 BBI; Unizol 购自上海 BioStar; GoScript 反转录系统购自 Promega 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、Oligotex mRNA Mini Kit、QIA quick PCR Purification Kit 购自 Qigen 公司; 质粒提取试剂盒购自康为世纪; T7 select 10-3 cloning kit 购自 Novagen。

#### 1.1.3 引物合成

本实验扩增轻链 VL 和重链 VH 所用引物是参考 NCBI 网站上的小鼠抗体基因数据和在 Imai S<sup>[2]</sup>所用引物的基础上利用 Primer5 和 Mega 软件设计的兼并引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 PCR 扩增的引物

Table 1 Oligonucleotide primers used for PCR amplification

引物名称	Primer sequence (5'-3')
V <sub>L</sub> -Forward	cctttctatgcgcccagccggGAATTCtGAYATTGTWTCWCCCARTC
	cctttctatgcgcccagccggGAATTCtGAYATTSTGMTSACYCAGTC
	cctttctatgcgcccagccggGAATTCtGAYATTGTGMTMACTCAGTC
	cctttctatgcgcccagccggGAATTCtGAYATTGTRATGACMCAGTC
V <sub>L</sub> -Reverse	accagagccgcccgcgctaccaccaccCCGTTTGATTTCCARCTTKG
	accagagccgcccgcgctaccaccaccCCGTTTTATTTCAGCTTGG
	accagagccgcccgcgctaccaccaccCCGTTTSAGCTCCAGCTTGG
V <sub>H</sub> -Forward	agcggcggcggcggctctggtggtggtgatccGAKGTRMAGCTTCAGGAGYC
	agcggcggcggcggctctggtggtggtgatccGAGGTNCAGCTBCAGCAGTC
	agcggcggcggcggctctggtggtggtgatccCAGGTGCAGCTGAAGSASTC
	agcggcggcggcggctctggtggtggtgatccCAGSTBCAGCTGCAGCAGTC
V <sub>H</sub> -Reverse	cggcaccggcgacactAAGCTTYGAGGAAACGGTGACCGTGGT
	cggcaccggcgacactAAGCTTYGAGGAGACTGTGAGAGTGGT
	cggcaccggcgacactAAGCTTYGAGGAGACGGTGACTGAGRT
scFv-EcoRI-Forward	cctttctatgcgcccagccgg
scFv-HindIII-Reverse	cggcaccggcgacactAAGCTT
T7 Select up Primer	ggagctgtcgtattccagtc
T7 Select down Primer	aaccctcaagaccgttta

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取

将氧氟沙星杂交瘤细胞培养至 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>, 1000 r/min, 5 min 离心沉淀细胞, 弃尽残液, 利用 Unizol 试剂盒提取总 RNA。

#### 1.2.2 VH、VL 基因扩增与鉴定

采用 promega 公司的 GoScript Reverse Transcription System 进行反转录合成第一链 cDNA, 以 cDNA 为模板, 以 VH、VL 的前后游引物 PCR 扩

增 VH 和 VL 基因。反应条件为: 95 °C, 5 min; 95 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, 共 35 个循环; 72 °C, 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶回收目的片段。

#### 1.2.3 全长 scFv 基因拼接及 PCR 扩增

通过两步法将 VH、VL 进行重叠延伸连接为一条单链可变区抗体 scFv 基因片段。取 50 ng 的 VH、VL 片段互为模板, 重叠延伸 PCR 反应将 VH、VL 随机拼接成 scFv, 第一次 PCR 反应条件为: 94 °C, 1 min; 63 °C, 1 min; 68 °C, 1 min, 反应进行 20 个循环;

随后以 scFv (Back) 和 scFv (For) 为引物, 第二次 PCR 扩增 scFv, 反应条件为: 94 °C, 1 min; 53 °C, 1 min; 72 °C, 1 min, 循环 30 次。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶回收目的片段。

#### 1.2.4 噬菌体单链抗体库的构建

将纯化后 scFv 片段用内切酶 EcoR I 和 HindIII 双酶切, T7 噬菌体使用内切酶 EcoR I 和 HindIII 进行酶切处理, 将纯化获得的 scFv 基因片段插入 T7 噬菌体臂, 取包装蛋白 25 μL/管, 从 -80 °C 冰箱中取出后, 迅速置于冰上, 并在使其冰上融化。待包装蛋白融化后, 用移液枪小心吸出与 5 μL 连接反应产物混匀, 混匀后 22 °C 孵育 2 h。2 h 后在反应产物中加入 270 μL 灭菌的 TB 培养基, 终止反应。包装完成的噬菌体感染宿主菌 BLT5403 后扩增即可得到初级抗体库, 用噬菌斑数测定重组噬菌体滴度即该抗体库的库容。

#### 1.2.5 抗体库淘选

利用 ELISA 方法对重组单链抗体进行亲和性筛选, 包被原为氧氟沙星与载体蛋白 OVA 的连接产物。洗脱下的噬菌体文库立即进行滴度的测定及液体的扩增, 用于下一轮的淘选。1% SDS 将特异性吸附在结合在酶标板上的包被原上的噬菌体洗脱下来, 但是噬菌体在 SDS 中不稳定, 长时间放置会造成噬菌体丢失, 因此洗脱后马上进行滴度的测定及液体的扩增, 用于下一轮的淘选。共进行四轮淘选。

#### 1.2.6 淘选后阳性率验证

从第四轮淘选的平板中挑取 138 个噬菌斑单克隆, 放入 200 L 提取缓冲液中, 在 4 °C 的条件下静置过夜。以浸取液为模板, T7-up-primer 与 T7-down-primer 为引物 PCR 扩增验证, PCR 条件为: 95 °C, 5 min; 95 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 2 min; 共 35 个循环; 72 °C, 10 min。对淘选的重组克隆进行 PCR 验证。

#### 1.2.7 直接 ELISA 鉴定阳性克隆的特异性

利用直接竞争 ELISA 方法, 对 PCR 验证的阳性重组噬菌体克隆与半抗原的亲和结合力进行测定, 通过计算得到的抑制率选出相对特异性高的克隆进行测序。

#### 1.2.8 抗氧氟沙星 scFv 结构和性质分析

##### 1.2.8.1 抗氧氟沙星 scFv 性质

根据推导抗氧氟沙星单链抗体氨基酸全序列, 采用 ExPASy Proteomics tools 中的 ProtParam 子程序对抗体蛋白的氨基酸组成、分子量、等电点等物理化学参数进行理论计算。

##### 1.2.8.2 抗氧氟沙星 scFv 结构预测

根据测序推导出抗氧氟沙星单链抗体氨基酸全序

列, 采用 ExPASy Proteomics tools 中的 SOPMA 子程序对抗体蛋白二级结构进行预测, 采用 ExPASy Proteomics tools 中的 Swiss Model 子程序对抗体分子的三维结构进行模拟。

## 2 实验结果与分析

### 2.1 氧氟沙星单克隆抗体细胞总 RNA 的提取

使用 RNA 提取试剂盒从细胞中提取氧氟沙星总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶由 DEPC 水处理, 在无 RNA 酶的电泳槽中进行 RNA 电泳检测检测, 如图 1 所示, 可观察到清晰的 28 S、18 S、5 S 三条带。通过电泳检测, 说明提取的总 RNA 完整度较好。

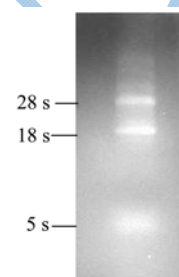


图 1 氧氟沙星特异性杂交瘤总 RNA

Fig.1 Total RNA from hybridoma of specific antibody against Ofloxacin

注: M: Marker 2000; 1: 氧氟沙星细胞总 RNA。

### 2.2 氧氟沙星重链 VH 基因和轻链 VL 基因片

段的扩增

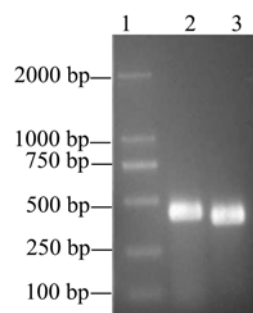


图 2 氧氟沙星抗体基因 VH 和 VL 片段的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of VH and VL

注: 1: D2000 marker; 2: 氧氟沙星抗体基因 VH 片段; 3: 氧氟沙星抗体基因 VL 片段。

将总 RNA 经过反转录获得第一链 cDNA, 以 cDNA 为模板分别扩增 VH 及 VL 基因片段, 扩增的 VH 和 VL 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收, 如图 2 所示, 结果显示扩增的 VH 基因片段为 350 bp 左右, 扩增的 VL 基因片段大小为 340 bp 左右, 与预期结果



相符。

### 2.3 氧氟沙星单抗细胞 scFv 片段的扩增

经 PCR 扩增获得 VH 和 VL 的 PCR 产物经胶回收, 将轻链与重链片段进行重叠延伸 PCR, 通过 linker 连接得到 scFv 片段, 结果如图 3 所示。scFv 片段约为 750 bp 左右且条带清晰, 与预期相符。

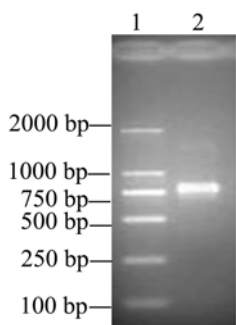


图3 氧氟沙星 scFv 的扩增

Fig.3 PCR amplification of scFv gene

注: 1: D2000 marker; 2: 氧氟沙星 scFv 基因。

### 2.4 噬菌体单链抗体库的构建

将纯化的 scFv 片段分别用 HindIII 和 EcoR I 进行

双酶切, 纯化回收之后取 3 μL 与 T7 噬菌体臂相连接, 经体外包装获得 300 L 的氧氟沙星噬菌体原始抗体库。根据库容计算公式: 库容=10×稀释倍数×对应稀释倍数的噬菌斑数×菌体抗体库的体积, 得出噬菌体原始库容为  $3 \times 10^5$ , 滴度为  $1.5 \times 10^{12}$ 。

### 2.5 噬菌体抗体库的淘选

用本实验保存的氧氟沙星包被原 OFL-OVA 包被酶标板来淘选特异性重组抗体, 分别使用 5% BSA、5%脱脂奶粉和 10%脱脂奶粉作为封闭液, 淘选过程及结果如表 1 所示, 通过表中结果可以得出 5% BSA 封闭效果最好, 能够筛得最大量的特异性重组噬菌体抗体, 并且数据更加可信; 每次都测定液体扩增后的滴度, 以便固定下一轮淘选的投入量为  $10^{10}$ ; 洗脱方法分别用 1% SDS 进行洗脱和用对数期宿主大肠杆菌 BLT5403 进行原位洗脱; 淘选之后涂平板和测定液体扩增后滴度都做两种不同浓度并做两组平行对照; 在四轮的淘选过程中, 噬菌体的回收率基本呈现升高趋势, 说明在第四轮淘选后, 特异性的噬菌体得到了富集; 第四轮淘选之后, 通过 PCR 验证阳性直接保种, 不做液体扩增。

表 2 氧氟沙星抗体库特异性重组抗体的淘选

Table 2 Panning of ofloxacin specific scFv antibody from the library

淘选轮数	封闭液	包被量 (μg/well)	噬菌体投 入量/pfu	噬菌体产 出量/pfu	回收率	液体扩增后 滴度/pfu
第一轮	5%BSA	1	$1 \times 10^{10}$	$1.9 \times 10^4$	$1.9 \times 10^{-6}$	$5.12 \times 10^{12}$
	5%脱脂奶粉	1	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^{-7}$	$7.36 \times 10^{12}$
	10%脱脂奶粉	1	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^{-7}$	$10^{12}$
第二轮	5%BSA	1	$1 \times 10^{10}$	$4 \times 10^3$	$4 \times 10^{-7}$	$2.8 \times 10^{12}$
	5%脱脂奶粉	1	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^{-7}$	$1.7 \times 10^{12}$
	10%脱脂奶粉	1	$1 \times 10^{10}$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^{-7}$	$5.3 \times 10^{11}$
第三轮	5%BSA	1	$1 \times 10^{10}$	$2 \times 10^4$	$2 \times 10^{-6}$	$1.8 \times 10^{12}$
	5%脱脂奶粉	1	$1 \times 10^{10}$	$8 \times 10^3$	$1 \times 10^{-7}$	$1.2 \times 10^{13}$
	10%脱脂奶粉	1	$1 \times 10^{10}$	$3.3 \times 10^3$	$3.3 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{13}$
第四轮	5%BSA	0.5	$1 \times 10^{10}$	$1.8 \times 10^5$	$1.8 \times 10^{-5}$	
	5%脱脂奶粉	0.5	$1 \times 10^{10}$	$1.5 \times 10^5$	$1.5 \times 10^{-5}$	
	10%脱脂奶粉	0.5	$1 \times 10^{10}$	0	0	

### 2.6 淘选之后的 PCR 验证

从第四轮淘选的平板上随机挑选 138 个的噬菌斑单克隆并用 Extraction Buffer 浸泡, 以浸泡出的噬菌体为模板做 PCR 筛选, 将重组阳性的噬菌斑进行液体扩增。用 PCR 验证, 得到 114 个阳性克隆, 显示 83% 的克隆含有正确长度的 scFv (750 bp) 片段。表明通过淘选, 特异性克隆得到了有效富集。结果如图 4 所

示。

### 2.7 直接竞争噬菌体 ELISA

结果通过公式:

$$IC\% = \left[ 1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \right] \times 100\%$$

得出有 4 个克隆抑制率较高, 分别是 3 号抑制率为 31%, 4 号抑制率为 35%, 32 号抑制率为 33%,

41 号抑制率为 78%。

在实验中首先使用的是间接 ELISA，但是实验中发现 T7-HRP 对包被原也存在吸附，因此改用直接 ELISA 就不存在该问题。

经过序列测定，特异性相对较高的单链抗体测序结果序列基本一致，重链由 117 个氨基酸构成，轻链由 108 个氨基酸构成（图 5）。

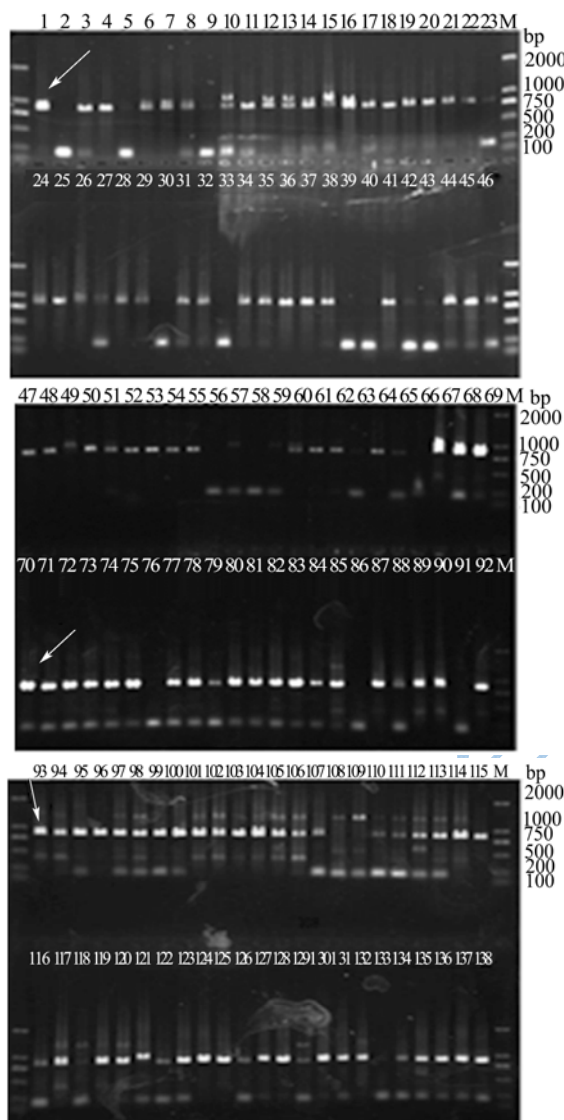


图 4 氧氟沙星噬菌体库淘选后部分单克隆的 PCR 检测

Fig.4 Ofloxacin-specific scFv amplified from random plaques after four rounds of panning

注：1~138：随机挑选单克隆噬菌斑的 PCR 产物；M：D2000 marker。

## 2.8 抗氧氟沙星 scFv 结构和性质分析

### 2.8.1 抗氧氟沙星 scFv 性质

抗氧氟沙星单链抗体理化性质的预测结果表明该抗体分子量为 24826.7；分子式为  $C_{1097}H_{1685}N_{289}O_{351}S_9$ ；等电点为 6.78；Arg+Lys 酸性氨基酸残基为 20 个；

Asp+Glu 碱性氨基酸残基为 20 个；消光系数为 1.898。

V<sub>H</sub>:

```
caggt gcagc tgaaggagt ctggggcagagc t t gt gaagccagggcct cagtcaagt tg
Q V Q L K E S G A E L V K P G A S V K L
tctt gcacagct t t t ggct tcaacat taaagacacc tatatgacct gggt gaagc agagg
S C T A F G F N I K D T Y M H W V K Q R
cctgaacagggcct ggagt ggat t ggaaggat tgatcctgcaat ggtaat actaaat at
P E Q G L E W I G R I D P A N G N I K Y
gacccgaagt tccagggcaaggccactataacagcagacacatcctccaacacagcctac
D P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y
ctgcagctcagcagcctgacatctgaggacactgccgtctattactgtgctagatggata
L Q L S S L T S E D T A V Y Y C A R W I
acgacagctatggactactgggtcaaggaaacctcagtcaccgtctcctcg
T T A M D Y W G Q G T S V T V S S
```

V<sub>L</sub>:

```
gacgt gct gatgaccagct ctcaaaaat tcat gtccac atcagtaggcagcagggtcagc.
D V L M T Q S Q K F M S T S V G D R V S
atcaaatgcaaggccagtcagaatgtggactgctgctgctgctatcaacagaaaacca.
I T C K A S Q N V G T A V A W Y Q Q K P
ggacaatcctaactactgatttactcggatccaatcggtacactggagtcctgct.
G Q S P K L L I Y S A S N R Y T G V P D
cgcttcacagggcagtgatctgggacagatttcaactcacacatcagcaaatatgagctt.
R F T G S G S G T D F T L T I S N M Q S
gaagacctggcagattttctgccaatataagcagctatcctgacacgttcggaggg.
E D L A D Y F C Q Q Y S S Y P Y T F G G
gggaccaagctggaaattgaacgg
G T K L E I E R
```

图 5 氧氟沙星单链抗体测序结果

Fig.5 Sequence of the ofloxacin specific scFv

### 2.8.2 抗氧氟沙星 scFv 结构分析

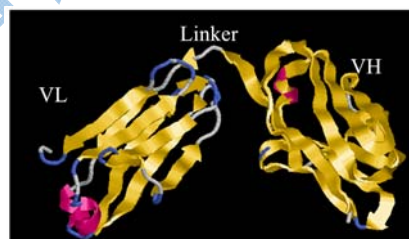


图 6 抗氧氟沙星单链抗体三维结构模拟图

Fig.6 Three-dimensional structure of ofloxacin scFv

注：Red:α 螺旋；Yellow:β 折叠；Blue:转角；White:随机卷曲。

根据软件预测分析抗氧氟沙星单链抗体的二级结构含 α 螺旋 11 处；β 折叠 92 处；β 转角 20 处；随机卷曲 102 处；抗氧氟沙星单链抗体三维结构模拟图如图 6 所示，其结构由 VL、VH 和 Linker 三部分组成，符合典型 scFv 的三维结构，可变区的 6 个环区 CDR 和 Linker 共同形成一个疏水型“口袋”，该“口袋”为抗原结合区。

## 3 讨论

近年来对构建噬菌体抗体库的研究是食品安全检测领域研究的热点。但目前所获得的噬菌体抗体大部分亲和力较低，因此科学家试图通过提高噬菌体抗体库的库容和多样性、优化淘选方法及淘选所用抗原等

途径,来获得特异性强的噬菌体抗体。

本实验利用 T7 噬菌体构建噬菌体抗体库,与 M13 噬菌体相比, T7 噬菌体转化宿主过程中不需要电击,也不需要辅助噬菌体,操作较为简便,但利用 T7 噬菌体构建噬菌体抗体库的库容相对较小,在本研究过程中构建的抗体库,库容都在  $10^5$  pfu/mL 左右。本实验设计合成多条轻链兼并引物和重链兼并引物,得到的序列可以反映出免疫过程中抗体分子的多样性,为构建高丰富度抗体库奠定良好的基础,另外限制性内切酶的选择对噬菌体单链抗体库的构建也至关重要,要尽量确保使用的内切酶的切点不会或极少出现在可变区,以防止在酶切过程中 scFv 被切断。在双酶切过程中,内切酶 HindIII 最佳缓冲液是 Buffer E,活性为 100%; EcoR I 在 Buffer E 中的活性为 75~100%。因此用共用缓冲液 E 同时进行酶切效果好。实验中淘选的特异性抗体与其单克隆抗体在亲和力上还存在一定的差距。

本实验运用同源建模法对筛选的特异性单链抗体的三维结构进行模拟,应用信息学技术所获得的预测和分析结果为抗氧氟沙星单链抗体的进一步表达、纯化和活性研究提供了大量的信息,主要包括单链抗体的一些理化性质、模拟的三维结构图和抗原结合区的简单构成,但这些信息功能有限,特别是对抗原结合区提供的信息量较少,有待于进一步运用分子对接等方法获得更多抗体抗原结合的信息,下一步将根据目前实验优化的条件结合抗体三维结构信息重新设计半抗原,优化建库条件等措施筛选出更好的单链抗体。

#### 4 结论

本研究通过噬菌体展示技术,成功构建了抗氧氟沙星单链抗体噬菌体展示文库,库容为  $3 \times 10^5$ 。经过 4 轮的亲和富集后,采用直接竞争 ELISA 法筛选到 4 个噬菌体 scFv 阳性克隆,经鉴定具有较好的抑制率,运用 EXPASY 软件模拟了特异性抗氧氟沙星 scFv 的三维结构,为进一步大量制备可溶性抗氧氟沙星的 scFv 奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 董进和,董峰,赵宪荣.喹诺酮类药物的不良反应[J].中国药物滥用防治杂志,2002,41(6):13-1  
Dong Jing-he, Dong Feng, Zhao Xian-rong. Untoward effect of quinolones [J]. Chinese Journal of Drug Abuse Prevention and Treatment, 2002, 41(6): 13-1
- [2] Imai S, Mukai Y, Nagano K, et al. Quality enhancement of the non-immune phage scFv library to isolate effective antibodies [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006. 29(21): 1325-1330
- [3] 苗向阳,丁淑燕.噬菌体抗体库的构建及抗猪脂肪细胞膜单抗的筛选[J].中国农业科学,2005,38(6):1260-1263  
Miao Xiang-yang, Ding Shu-yan. Construction of Phage Antibody Library and Screening of Monoclonal Antibodies Specific for Porcine Adipocytes [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(6): 1260-1263
- [4] Poul M A, Becerril B, Nielsen U B. Selection of tumor-specific interm alizing human antibodies from phage libraries [J]. Microbiol Methods, 2000, 301(5): 1149-1161
- [5] Levinson H J S, Mudget t-Hunter M. Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an antidigoxin single chain Fv an al oqu e produced in Escherichia coli [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1988, 85(20): 5879-5883
- [6] Brichta J, Hnilova M, Viskovic T. Generation of hapten-specific recombinant antibodies: antibody phage display technology: a review [J]. Veterinarni Medicina, 2005, 50(6): 231-252
- [7] 潘科,王弘,张宏斌,等.抗克伦特罗噬菌体单链抗体库的构建、筛选及鉴定[J].华南理工大学学报,2005,11(33):51-54  
Pan Ke, Wang Hong, Zhang Hong-bin, et al. Construction, Screening and Identification of Phage scFv Library Against Clenbuterol [J]. Journal of South China University of Technology, 2005, 11(33): 51-54
- [8] Li Tie-jun, Zhang Qi, Liu Yan. Production of Recombinant ScFv Antibodies against Methamidophos from a Phage-Display Library of a Hyperimmunized Mouse [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006, 54(21): 9085-9091
- [9] Abigail V J C, Adam P B, Andrew C R M. Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen [J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 325(45): 337-354