

一种抗对虾白斑综合症病毒(WSSV)线性抗原表位单链抗体的筛选

王玉珍^{1,2}, 张晓华¹, 肖因¹, 张敏^{1,2}, 戴和平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

摘要: 对虾白斑综合症病毒(WSSV)是全世界对虾养殖业最主要的病原体之一, 虽然对该病毒的研究已较为深入, 但目前仍无有效的防治方法。本研究应用噬菌体展示技术, 构建了抗变性 WSSV 的单链抗体噬菌体展示文库, 分别以 WSSV 病毒粒子和原核表达的囊膜蛋白 VP28 为靶分子对该文库进行淘选。经过数轮淘选后, 得到 5 个能特异识别 WSSV 的单链抗体, 且首次获得了能特异识别 WSSV 线性抗原表位的单链抗体 P75E8。并通过免疫胶体金电镜分析, 对 5 种单链抗体对应病毒粒子上的表位进行了定位。为获取识别多种 WSSV 抗原的抗体提供了新的方法路线, 也为获取特异性识别线性表位的单链抗体提供了一种新的淘选技巧。

关键词: 对虾白斑综合症病毒(WSSV), 噬菌体展示技术, 单链抗体(scFv), 线性抗原表位

Selection of a Novel Single-chain Variable Fragment Antibody Specifically Against a Linear Epitope of White Spot Syndrome Virus

Yuzhen Wang^{1,2}, Xiaohua Zhang¹, Nan Xiao¹, Min Zhang^{1,2}, and Heping Dai¹

1 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

2 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract: White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most important pathogens in shrimp farm throughout the world. Many researches on WSSV have been done, but no efficient approach has been gained to protect and cure the disease. In this study, we constructed a single-chain fragment variable (scFv) antibody library displayed on phage using spleen cells from mice immunized with denatured WSSV. After several rounds of panning respectively against purified intact WSSV virions and purified VP28 expressed in *Escherichia coli*, five novel scFv antibodies specifically against WSSV were selected, one of which, clone P75E8, recognized a linear epitope. The location in virions of the epitopes recognized by the five scFv clones was determined by immunoelectron microscopy. This study provides a new way to obtain more different antibodies specifically binding to WSSV, and especially provides a new strategy to obtain scFvs against linear epitopes.

Keywords: white spot syndrome virus (WSSV), phage display, single-chain variable fragment (scFv), linear epitope

Received: December 11, 2007; **Accepted:** March 17, 2008

Supported by: the National Natural Science Fund of China (No. 30700618).

Corresponding author: Heping Dai. Tel: +86-27-68780716; E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

国家自然科学基金(No. 30700618) 资助。

对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是90年代初被发现的,自发现以来迅速扩展到世界各地对虾养殖地区,目前已成为最大的危害对虾养殖业的病原之一^[1]。WSSV 是一类具囊膜的无包涵体杆状病毒,完整的病毒粒子大小约380~250 nm × 150~70 nm^[3,4]。该病毒是一种双链DNA病毒,大小约为300 kb,推测有180多个开放阅读框(ORF)编码功能蛋白^[5,6]。因为其独特的遗传学特点和形态特征,该病毒已被归为一类新的病毒家族, Nimaviridae 科, *whispovirus* 属^[7]。WSSV 的宿主范围广^[8],感染的对虾死亡率高达100%^[2]。目前虽然对该病毒的基因组和蛋白质组有较深入的研究,但仍无有效的防治措施。

噬菌体展示技术是90年代发展起来的一种基因筛选技术。该技术是将外源蛋白或多肽与噬菌体表面蛋白偶联,从而将外源蛋白或多肽展示在噬菌体表面。该技术是一种高效的、高通量的筛选技术,已应用于生物学的各个领域,如,蛋白质的结构和功能的研究,蛋白质间相互作用的研究,抗原决定簇的研究,疫苗和抗体的研究等。本实验室一直致力于应用噬菌体展示技术来研究对虾白斑综合症病毒的诊断和防治,已成功构建了抗WSSV的单链抗体噬菌体展示文库,并得到了一些能特异识别WSSV的单链抗体^[9,10],但所得到的阳性单链抗体中绝大部分是同一种基因序列编码的单链抗体 B7 (GenBank Accession No. AAY88909)^[11],而且所获得的单链抗体都是识别构象表位的,没有淘选到能识别线性表位的单链抗体,因此无法应用于 Western blotting 分析中。为了能够得到更多识别WSSV上不同抗原表位的单链抗体和识别WSSV线性表位的单链抗体,我们构建了抗变性WSSV的单链抗体噬菌体展示文库,并采用2种类型的抗原,即完整WSSV病毒粒子和重组表达的VP28^[12]为淘选对象,得到5种基因序列编码不同的单链抗体,和实验室已经淘选到的单链抗体进行比对发现其中有4种单链抗体为新的,并且第一次获得了能识别线性抗原表位的单链抗体 P75E8 (GenBank Accession No.: EU439591)。通过免疫胶体金电镜分析,对这些单链抗体对应应在WSSV病毒颗粒上的抗原进行了定位。这些研究结果为获取识别多种WSSV抗原的抗体提供了新的方法路线,也为获取识别特异性线性表位

的单链抗体提供了一种新的淘选技巧。

1 材料和方法

1.1 材料

Hind III、*Eco*R V、*Sfi* I、*Not* I均购自NEB公司, T4 Ligase 购自 Fermentas 公司; HRP/Anti E-Tag conjugate 购自 Amersham 公司; IPTG、完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂购自 Sigma 公司; Trizol 购自 Gibco 公司; cDNA 合成试剂盒购自 BD 公司; mRNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司; Tag DNA polymerase 购自 Biostar 公司; His-Bind Resin 购自 Novagen 公司; Bal b/c 购自湖北省卫生防疫站; 载体 pET 32a(+)、宿主菌 *origami*(DE3)购自 Novagen 公司; *pCANTAB 5E* 载体来源于原 Pharmacia 公司; 大肠杆菌 TG1、NM522 由本实验室保存。

1.2 WSSV 病毒粒子及病毒核衣壳的制备

本研究中所用到的WSSV病毒来源于广东省汕头市南奥岛对虾养殖场感染的对虾(*Penaeus monodon*)。病毒在克氏螯虾(*Procambarus clarkia*)中扩增。按照 Xie 等^[13]所提供的方法经改进后提取病毒。取1只病虾的鳃于预冷的研钵中,加入10 mL 预冷的TNE缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L 苯甲脒(Benzamidine)和1 mmol/L Na₂S₂O₅, pH 8.5]。将鳃磨碎后,4°C, 3500 g 离心5 min, 再将上清转入EP管中,4°C, 20000 g 离心30 min。白色沉淀即为纯化的病毒粒子,将其重悬于1 mL TM 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂, pH 7.5)。取一部分纯化的WSSV病毒粒子参照 Xie 等^[14]所提供的方法制备病毒核衣壳。纯化好的病毒粒子和病毒核衣壳通过电镜观察检测。

1.3 VP28 的克隆、表达和纯化

载体 pET 32a(+)用于VP28的克隆、表达。以WSSV基因组为模板,完整的VP28基因被扩增并克隆到pET32a(+)载体中,命名为32aVP28。PCR的上游引物为(5'-3'): CCGGATATCGATCTTTCTTT CACTCTTTC, 包含有 *Eco*R V 酶切位点; 下游引物为(5'-3'): CCCAAGCTTCTCGGTCTCAGTGCCA GAG, 包含有 *Hind* III 酶切位点。以酶切和测序确定克隆是否正确。

32aVP28 质粒被转入表达宿主菌 *origami*(DE3)。

挑取一个 32aVP28 单克隆于 5 mL LB 培养基中(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素钠盐), 37°C 摇床培养过夜。第二天, 按 1:10 的比例接种培养过夜的菌液于 50 mL 新鲜的 LB 培养基中(含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素钠盐), 37°C 摇床培养至 $OD_{600}=0.6$, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达。在 20°C 诱导 20 h 后, 菌液以 1500 g, 4°C 离心 15 min。去上清, 沉淀重悬于 5 mL 20 mmol/L Tris-HCL(pH 7.5)中, 超声波破菌。裂解液, 14 000 g, 4°C 离心 10 min。上清转入新的容器, 以 His·Bind Resin(Novagen)纯化目的蛋白。将所制备的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析。

1.4 抗变性 WSSV 单链抗体噬菌体展示 cDNA 文库的构建

WSSV 的变性: 取纯化的 WSSV 于沸水中保温 5 min。以变性的 WSSV 免疫 6 周的雌性 Bal b/c 小鼠。第一次, 以变性 WSSV 与等体积完全弗氏佐剂(Sigma)混合注射小鼠, 每只 50 μg WSSV。2 周后, 以变性 WSSV 与等体积的不完全弗氏佐剂(Sigma)的混合物免疫小鼠, 每只 50 μg WSSV, 共 3 次。第四次免疫后第四天, 取小鼠脾脏及血清, 脾脏保存于 Trizol 中, 血清用于抗体效价测定。

以 Trizol 试剂提取小鼠脾脏总 RNA。用 Promega 公司的 mRNA 纯化试剂盒从总 RNA 中分离 mRNA。将 mRNA 反转录成 cDNA, 以此为模板, 分别扩增重链可变区基因(V_H)和轻链可变区基因(V_L)。 V_H 、 V_L 以 Linker(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)基因连接起来。再以连接好的 V_H -Linker- V_L 为模板扩增 scFv 片断, 并在两端加上酶切位点: *Sfi* I、*Not* I。将经 *Sfi* I、*Not* I 双切的 scFv 片断连入相应酶切过的载体 *pCANTAB 5E*, 电转化转入宿主菌 NM522。建好的单链抗体噬菌体展示 cDNA 文库于 -80°C 保存。

1.5 淘选

噬菌体抗体文库的拯救: 取 1 mL 原始文库于 300 mL 2 \times YT-AG(2YT, 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素钠盐, 2%葡萄糖)中, 37°C 摇床培养。当 $OD_{600} = 0.5\sim 0.8$ 时, 加入辅助噬菌体 M13K07。37°C 摇床培养 1 h 后, 以 5000 r/min, 4°C 离心 10 min。去上清, 沉淀重悬于 200 mL 2YT-AK(2YT, 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素钠盐, 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), 37°C 摇床培养过夜。过夜培养物以 10 000 g、4°C 离心 20 min。以 1/5 体积的 PEG/NaCl (20% PEG8000, 2.5 mol/L NaCl)沉淀上

清中拯救出来的噬菌体。冰浴 1 h 后, 以 10 000 g, 4°C 离心 20 min, 沉淀的噬菌体重悬于 5 mL 2YT 中, 备用。

淘选: 分别以 PBS 稀释的 50 μg 纯化的 WSSV 和纯化 32aVP28 包被免疫管, 4°C 过夜。第二天, 倾掉免疫管中的包被液, 以 PBS 洗 3 次, 除去未结合的蛋白。以 10% PBSM 封闭免疫管, 于 30°C 保温 1 h。倒掉封闭液, 以 PBS 洗 3 次, 将上述制备好的噬菌体与 10%PBSM 按 1:1 加入到免疫管。30°C 静置 1 h 后, 分别以 PBST、PBS 洗 20 次。然后将新鲜制备的大肠杆菌 TG1($OD_{600}=0.3\sim 0.5$)加入到免疫管中, 37°C 静置 1 h。将感染的菌液涂布 SOBAG 平板, 30°C 倒置培养过夜。第二天刮下平板上的菌落用于下一轮噬菌体扩增。WSSV 对抗变性 WSSV 噬菌体展示文库的淘选只进行了一轮。32aVP28 对该噬菌体展示文库的淘选一共进行 4 轮, 前三轮以 32aVP28 为靶蛋白, 第四轮以纯化的 WSSV 为靶蛋白。

1.6 scFv 的 ELISA 检测

从最后一轮淘选的平板上随机挑取单克隆于 96 孔细菌培养板中, 每孔加入 200 μL 2YT-AG, 30°C 培养过夜。第二天, 从每孔中吸取 25 μL 菌液于一新的细菌培养板中, 并补足培养基至 200 μL /孔。30°C 培养 3 h 后, 3500 r/min 离心 10 min。去上清, 菌沉淀重悬于 200 μL 2YT-AI(2YT, 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素钠盐, 1 mmol/L IPTG), 30°C 诱导过夜。第二天, 将细菌培养板以 3500 r/min 离心 10 min, 取上清备用。将 100 μL 纯化的 WSSV 病毒以 0.5 μg /孔加入到 ELISA 板中, 4°C 包被过夜。第二天倾掉包被液后, 用 PBS 洗 3 次, 然后以 4% PBSM 封闭 1 h。用 PBS 洗 1 次后, 每孔加入 50 μL 单链抗体上清液和 50 μL 4% PBSM, 于 30°C 保温 1 h。用 PBS 和 PBST 各洗 3 次后, 每孔加入 100 μL 的 HRP/Anti E-Tag conjugate (以 4% PBSM 按 1:10000 稀释), 30°C 保温 1 h。再用 PBST 和 PBS 洗 3 次后, 每孔加入 100 μL TMB 底物溶液[22.5 mL H_2O , 2.5 mL 1 mol/L 醋酸钠溶液 (pH6.0), 250 μL 60 mg/mL TMB, 10 μL H_2O_2], 显色 10 min 后, 每孔加入 25 μL 2 mol/L H_2SO_4 中止反应, 酶标仪测定 OD_{450} 值。或者用 32aVP28 包被 ELISA 板, 按同样方法进行分析。

1.7 单链抗体测序分析

将 ELISA 鉴定为阳性的部分单链抗体送北京奥

科测序公司进行测序, 并对测序结果应用 DNAsclub、DNAsstar 等软件进行分析。

1.8 可溶性单链抗体的表达

将鉴定为阳性并序列分析为不同的单链抗体进行诱导表达, 表达方法参照张晓华等^[15]文中所描述的制备单链抗体 A1 的方法。将制备的单链抗体进行 12% SDS-PAGE 分析, Western blotting 分析。

1.9 Western blotting 分析

先将纯化的 WSSV 和 32aVP28 抽提液跑 12% SDS-PAGE 电泳, 然后将分离好的蛋白电转移到硝酸纤维素(NC)膜上。经立春红染色后, 标出标准分子量蛋白条带的位置。清水洗净染料后, 以 4% PBSM 在室温封闭 1 h。用 PBS 洗 3 次后, 将 NC 膜放入以 4% PBSM 按 1:40 稀释的单链抗体溶液中, 室温反应 1 h 后, 再用 PBST、PBS 各洗 3 次。然后将 NC 膜放入 HRP/Anti E-Tag conjugate(以 4% PBSM 按 1:10000 稀释)溶液中, 室温保温 1 h 后, PBST、PBS 各洗 3 次, 然后以 DAB 底物溶液显色。

1.10 胶体金免疫电镜分析

分别将镍网倒浮在含有新鲜制备的 WSSV 病毒粒子或 WSSV 核衣壳的液滴表面, 于室温静置 10 min。PBS 洗 1 次后, 以 3% BSA 室温封闭 10 min。再用 PBS 洗 1 次后, 将镍网倒浮在含有各种单链抗体的液滴表面, 室温下保温 30 min。用 PBST、PBS 分别洗 3 次后, 再将镍网倒浮在含胶体金标记的 Anti E-Tag conjugate 液滴表面, 室温孵育 20 min。PBST 和 PBS 洗 3 次后, 以 2% 磷酸钨酸固定 1 min, 干燥后电镜观察。

2 结果

2.1 完整病毒粒子及核衣壳的制备

病虾组织切片电镜观察发现感染 WSSV 的对虾鳃中病毒粒子很多, 为了简化提纯步骤, 缩短提纯时间, 减少对病毒粒子的损伤, 我们只取感染病毒螯虾的鳃用于病毒纯化。具体纯化方法参照 Xie 等^[11]所提供的方法, 但比原方法更加简化。在我们实验中提取病毒只需要 1 只染病克氏螯虾, 只需一个低速离心和一个高速离心, 整个过程 1 h 内就可完成, 所提取的病毒浓度和完整性都很好[图 1. (A)]。同时, 参照 Xie 等^[12]所提供的提取病毒核衣壳的方法制备了一批病毒核衣壳, 电镜观察显示所提取的病毒核衣壳纯度很高[图 1. (B)]。

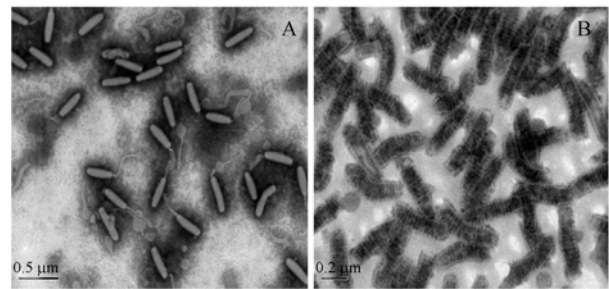


图 1 (A) 纯化的完整 WSSV 病毒粒子的电镜照片; (B) WSSV 病毒粒子核衣壳的电镜照片

Fig. 1 Electron microscopy of purified WSSV virions(A); WSSV nucleocapsids(B)

2.2 VP28 的克隆、表达和纯化

以 WSSV 基因组为模版扩增 vp28 基因, 经 *EcoR* V、*Hind* III 双酶切后连入 pET-32a 载体相应两酶切位点间, 并转入克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α 。将经酶切鉴定含有重组质粒的菌液送北京奥科测序公司测序, 测序结果显示 VP28 连入载体相应位置, 且方向和阅读框正确(结果未显示)。

将鉴定正确的重组质粒转入表达宿主菌 *E. coli* origami(DE3), 经 IPTG 诱导表达后, 菌体进行超声波破碎, 离心后上清经 His \cdot bind resin 亲和层析柱纯化。将诱导前菌体、诱导后菌体、经亲和柱纯化后的蛋白跑 12% SDS-PAGE, 结果如图 2 所示, 在约 42 kD 处有明显的目的条带, 与理论分子量大小一致, 经柱纯化后的目的蛋白纯度达 90%以上。

2.3 抗变性 WSSV 单链抗体展示 cDNA 文库的构建

以变性后的纯化 WSSV 免疫小鼠, 免疫后小鼠

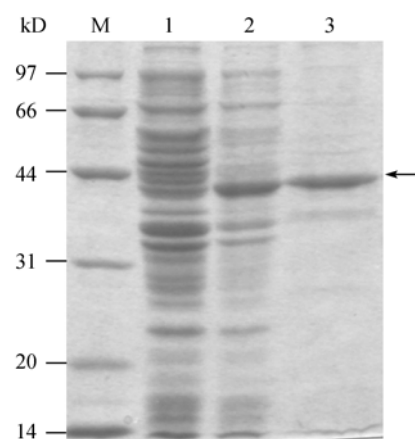


图 2 表达及纯化产物的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 Analysis of expressed and purified protein by SDS-PAGE

1: *E. coli* cells with 32aVP28 before induced; 2: *E. coli* cells with 32aVP28 induced; 3: purified 32aVP28; the arrow indicated the location of recombinant 32aVP28; M: marker

血清用 ELISA 方法进行效价测定, 测定结果显示所制备血清的效价为 1:4000(结果未显示), 满足实验需要。取免疫小鼠脾脏, 提取 mRNA, 以反转录的 cDNA 为模版, PCR 扩增抗体 V_H 和 V_L 基因。以 Linker DNA 连接 V_H 和 V_L 基因, 再用带有 *Sfi* I、*Not* I 酶切位点的引物扩增 scFv 基因, 并连入噬菌粒载体 *pCANTAB 5E*, 电转入大肠杆菌 NM522。根据转化后在抗性平板上的菌落数确定库容量为 8.5×10^6 个克隆。从该库中随机挑选 5 个克隆进行 DNA 测序, 结果分析显示 5 个克隆插入片段都具有不同的基因序列(结果未显示), 表明所构建文库的多样性较好。

2.4 淘选结果

在之前的实验中, 我们发现仅以纯化的 WSSV 为靶标对抗体库进行淘选, 淘选进行到第二轮时阳性克隆率就可达 50%, 而且阳性克隆中单链抗体 B7 占 90%以上。为了减少淘选过程中的这种偏好性, 增加识别不同抗原表位的抗体获得的几率, 在本研究中采取了两种淘选方法: (1)减少淘选轮数; (2)以不同的抗原为靶标。以纯化的 WSSV 对抗变性 WSSV 噬菌体展示文库只进行一轮淘选, 用 ELISA 分析, 从 384 个单菌落中鉴定出 11 个菌株能表达特异识别 WSSV 的单链抗体($OD_{450} > 0.05$)[图 3. (A)]。同时以纯化的 32aVP28 为靶标对抗变性 WSSV 噬菌体展示文库进行淘选, 进行 3 轮后, 再以 WSSV 为靶标进行一轮淘选, 用 ELISA 分析, 从 192 个单菌落中鉴定出 28 个能表达特异识别 WSSV 的单链抗体($OD_{450} > 0.05$), 其中有 2 个单链抗体既能识别 WSSV 也能识别 32aVP28[图 3. (B)]。

2.5 阳性单链抗体测序分析

从以 WSSV 为靶标进行淘选得到的阳性克隆中挑选 5 个单链抗体送测序公司进行 DNA 测序; 从以 32aVP28 为靶标进行淘选得到的阳性克隆中挑选 6 个(包含 2 个既能识别 WSSV 也能识别 32aVP28 的单链抗体, P75F1 和 P75E8, 其他为随机挑选)送测序公司进行测序。应用 DNAClub、DNASTar 等软件对测序结果进行分析。分析结果显示一共有 5 组单链抗体(如表 1), 第一组(Group 1)的单链抗体基因序列与单链抗体 B7 的基因序列^[11]完全一致, 其他 4 组为新的、具有不同基因序列的单链抗体。其中以 WSSV 为靶标得到的单链抗体中有 3 个(P44E1, P44E8, P45G3)基因序列与 B7 一致, 另外 2 个 P45G12 (GenBank

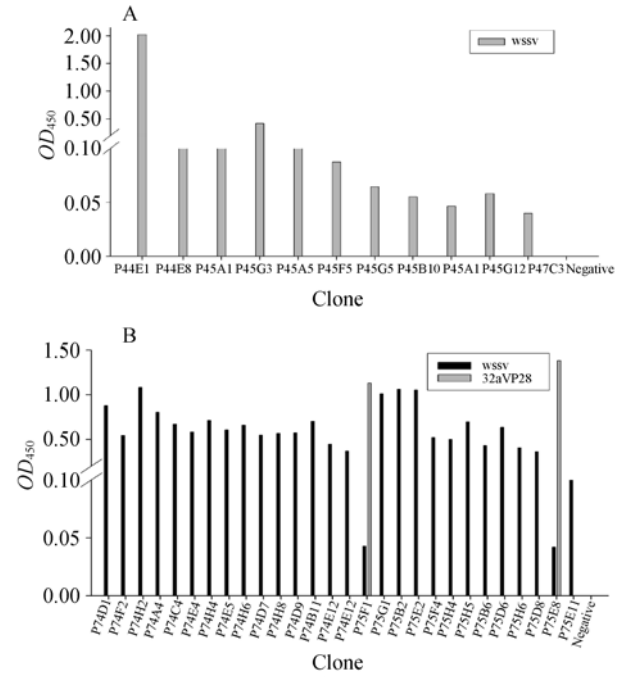


图 3 阳性克隆的 ELISA 值

Fig. 3 The ELISA value of the positive clones (A): The positive clones isolated using purified WSSV as target in panning; (B): The positive clones isolated using purified 32aVP28 as target in panning. The 2YT culture medium was used as negative control. The binding was detected with HRP/Anti-E tag conjugate

表 1 阳性克隆的单链抗体测序分析结果

| Table 1 Results of scFv sequencing of positive clones | |
|---|---|
| Group | Clones |
| Group 1 | P44E1, P45G3, P44E8, P74D1, P74A4, P75B2, P75D6 |
| Group 2 | P45G12 |
| Group 3 | P47C3 |
| Group 4 | P75F1 |
| Group 5 | P75E8 |

Accession No. EU439594) 和 P47C3 (GenBank Accession No. EU439593)为新的; 以 32aVP28 为靶标得到的单链抗体中只识别 WSSV 的(P74D1, P74A4, P75B2, P75D6)都是 B7, 既能识别 WSSV 也能识别 32aVP28 的单链抗体 P75F1 (EU439592)和 P75E8 为新的。在本研究选中 P74D1 (与 B7 相同)作为 group 1 的代表, 对 5 组单链抗体的氨基酸序列进行比对分析, 发现它们最大的差异位于重链 CDR3 区域, 而这个区域对抗体识别抗原表位的特异性有重要意义, 如图 4。根据其氨基酸序列预测理论分子量大小约为 31 kD。

2.6 可溶性单链抗体的诱导表达

为了进一步分析淘选到的单链抗体, 从这 5 组中分别挑选一个单链抗体(Group 1 中以 P74D1 作为代表)

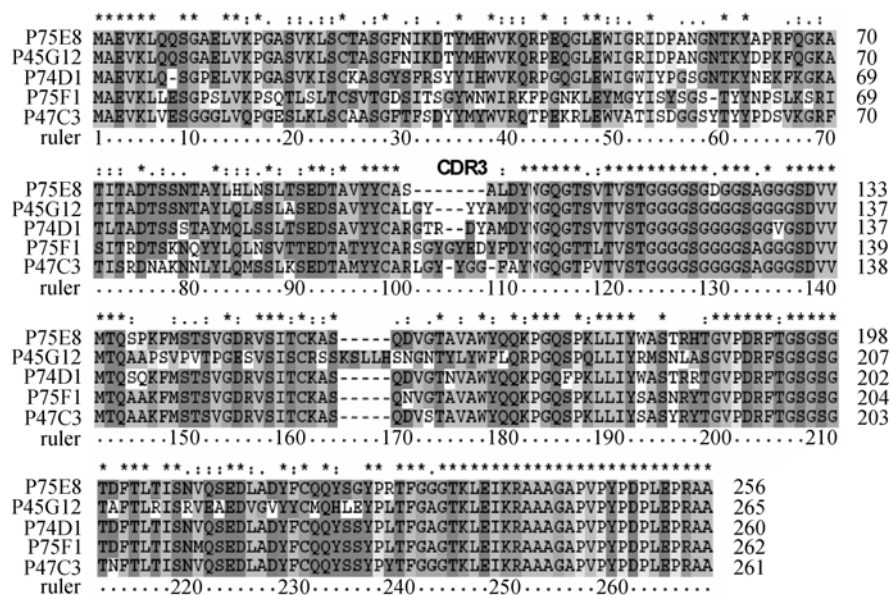


图4 阳性克隆的单链抗体氨基酸序列比对

Fig. 4 Comparison of scFv amino acid sequences of the positive clones

进行 IPTG 诱导表达, 可溶性的单链抗体通过信号肽分泌到大肠杆菌周质空间中, 并带有 E-tag 标签。提取表达后菌体的周质空间蛋白即为可溶性单链抗体的粗提液, 对粗提液进行 12% SDS-PAGE 电泳, 然后将分离的蛋白转 NC 膜, 以 HRP/Anti E-Tag conjugate 为抗体检测, 显色后在大约 31 kD 处有条带, 与理论大小相一致, 如图 5 所示。

2.7 Western blotting 分析结果

将纯化的 WSSV 和 32aVP28 抽提液分别与等体积的上样缓冲液混合, 沸水浴 5 min 后, 进行 12% SDS-PAGE, 将分离开的蛋白电转到 NC 膜上, 以制备的可溶性单链抗体为一抗, 再以 HRP/Anti E-Tag conjugate 为二抗, 检测淘选到的能特异识别天然 WSSV 的单链抗体能否识别变性后的 WSSV。如图 6, Western blotting 结果显示只有单链抗体 P75E8 能识别变性后的 WSSV 的蛋白条带, 此条带正是 WSSV 囊膜蛋白 VP28。此结果表明单链抗体 P75E8 能够识别线性抗原表位。P75F1、P47C3、P45G12 和 P74D1 只能结合天然的 WSSV, 在 Western blotting 中不能识别变性后的 WSSV(结果未显示), 表明这 4 种单链抗体识别的为构象表位。

2.8 免疫胶体金电镜分析结果

为了确定这 5 种单链抗体识别的抗原表位在 WSSV 上的位置, 我们进行了胶体金免疫电镜分析。分别以纯化的完整 WSSV 病毒粒子和 WSSV 核衣壳



图5 可溶性单链抗体诱导表达后的 Western blotting 分析

Fig. 5 Analysis of expressed soluble scFvs in Western blotting

Lanes: 1, P75F1; 2, P75E8; 3, P74D1; 4, P45G12; 5, P47C3; detected with HRP/Anti-E Tag conjugate

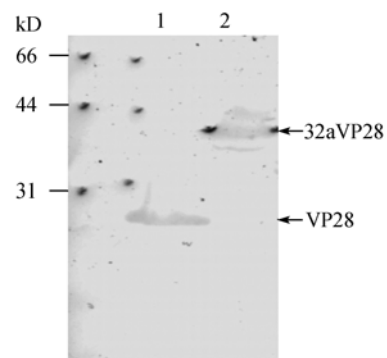


图6 单链抗体 P75E8 与 WSSV 结构蛋白条带特异性结合的 Western blotting 分析

Fig. 6 Western blotting analysis of scFv P75E8 specifically binding to structure protein band of WSSV

Lanes: 1, purified WSSV; 2, extraction of 32aVP28. The binding was detected with HRP/anti-E Tag conjugation

吸附镍网, 然后以制备的可溶性单链抗体为一抗, 以胶体金标记的 Anti-E tag 单克隆抗体为二抗, 电镜观察进行检测。电镜结果如图 7。在单链抗体 P74D1 的胶体金定位分析中, 金颗粒既存在于病毒囊膜也存在于病毒核衣壳, 推测 P74D1 识别的抗原表位可能

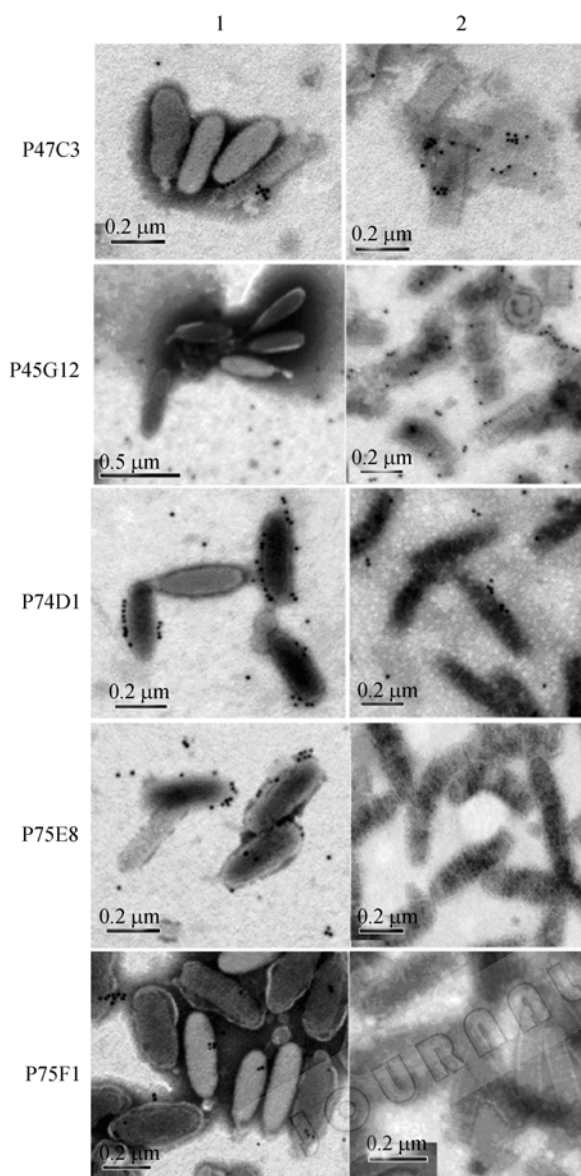


图7 单链抗体免疫胶体金电镜分析

Fig. 7 Immunoelectron microscopy of purified WSSV virions with scFvs followed by colloidal gold-labeled second antibody

Column1: purified intact WSSV virions were mounted onto carbon-stabilized nickel grids; column 2: WSSV nucleocapsids were mounted onto carbon-stabilized nickel grids. The scFvs were used as the primary antibodies and mouse anti-E tag monoclonal antibody conjugated with 5-10nm colloid gold particles was as second antibody

存在于不止一种病毒蛋白表面, 或者与 P74D1 相互作用的蛋白既存在于囊膜上也存在于核衣壳上。结合单链抗体 P45G12 和 P47C3 的胶体金抗体复合物只存在于病毒核衣壳上, 推测这两个单链抗体识别的蛋白位于病毒核衣壳上。单链抗体 P75E8 和 P75F1 识别的是病毒囊膜蛋白 VP28, 胶体金电镜结果也显示金颗粒只结合在病毒囊膜上而不结合核衣壳, 与其他研究者的结果一致^[16,17]。

3 讨论

对虾白斑综合症病毒(WSSV)是目前对虾养殖业中危害最大的病原之一, 严重影响了对虾养殖业的发展, 同时也严重威胁了世界水环境。但是因为该病毒是一种新的病毒, 和目前已知的病毒同源性很低, 没有已成功的、可借鉴的信息。另外, 对虾的细胞系到目前也没有建立起来, 传统的用于研究病毒的方法不能或很难用于对该病毒的研究。所以到现在仍然没有找到能有效防治对虾白斑综合症的方法。

噬菌体展示技术是 90 年代初发展起来的一种高效、高通量的筛选技术, 本实验室一直致力于应用该技术来研究对虾白斑综合症病毒, 希望能找到有效防治该病的途径。在先前的研究中, 本实验室已成功构建了抗 WSSV 的单链抗体展示文库, 并从该文库中筛选到了几个能特异识别 WSSV 的单链抗体, 但这些单链抗体都只能识别构象表位, 所获得的抗体多样性也很低。分析其原因, 可能是在免疫小鼠的过程中, WSSV 病毒粒子上许多蛋白没有完全暴露, 导致不能产生针对这些抗原表位的抗体, 特别是针对线性抗原表位的抗体。为了克服抗天然 WSSV 单链抗体展示文库的缺陷, 得到更多新的、识别不同表位的单链抗体, 我们构建了抗变性 WSSV 的单链抗体噬菌体展示文库。另外, 因为在以前的研究中我们发现, 以完整的 WSSV 病毒粒子为靶标对构建的文库进行筛选, 到第二轮时阳性克隆 90%以上为同一种基因编码的单链抗体(B7)。所以, 为了增加阳性克隆的多样性, 减少淘选的偏好性, 以新鲜制备的完整 WSSV 病毒粒子为靶标时, 只进行了一轮淘选。ELISA 鉴定结果表明只需要一轮淘选我们也能得到阳性克隆, 测序结果发现阳性克隆中大部分还是 B7, 但我们得到了 2 个新的特异识别 WSSV 的单链抗体, P45G12 和 P47C3。从 ELISA 值中我们可以看出 P45G12、P47C3 和 WSSV 病毒粒子的结合力较低, 可能就是因为这点, 它们在接下来的淘选中丢失了, 所以在我们以前的淘选中从未淘到这两种单链抗体。而 B7 具有很高的亲和力, 且融合有单链抗体 B7 的噬菌体可能在感染宿主菌或噬菌体拯救过程中具有某种偏好性, 使得这种单链抗体的克隆株很容易成为优势种, 其结果是 B7 在淘选过程中得到极大富集。此外, 我们还用改变靶标的方法对该文库进行淘选。我

们先以原核表达的 WSSV 囊膜蛋白 VP28(32aVP28)为抗原进行淘选, 淘选进行了 3 轮后, 再以纯化的 WSSV 病毒粒子为抗原对第 3 轮的淘选产物进行一轮淘选。从最后一轮淘选产物中我们鉴定出 28 个能识别 WSSV 的阳性克隆, 其中有 2 个(P75F1, P75E8)还能特异识别 VP28, 且 P75F1 只能识别构象表位, 而 P75E8 却可识别线性表位。测序分析发现 28 个阳性克隆大部分与 B7 完全一致, 只有 2 个还能识别 VP28 的单链抗体为新的单链抗体。从 ELISA 值我们可以看出, 单链抗体 P75E8 和 P75F1 与完整 WSSV 病毒粒子的结合力也较弱。我们还尝试过以变性的 WSSV 为靶分子对抗体库进行淘选, 但是因为变性后的 WSSV 很难以常规的方法固相化, 所以淘选失败。对于这种淘选方法, 我们有必要作进一步探索。

本研究的成功之处在于, 我们终于从新构建的抗变性 WSSV 的单链抗体噬菌体展示文库中获得了一株识别线性表位的单链抗体 P75E8, 说明为获取识别线性表位单链抗体所设计的技术路线是可行的, 也为进一步获取更多种类的识别线性表位的单链抗体打下了基础。识别线性表位单链抗体的获取为研究病毒蛋白的性质和功能提供了更为方便的研究工具, 例如单链抗体 P75E8 可以通过 ELISA、Western blotting 和免疫电镜对病毒蛋白的性质、分子量和定位进行较全面的研究。而其他只能识别构象表位的单链抗体由于不能进行 Western blotting 分析, 无法对所结合的病毒蛋白进行直接的鉴定, 限制了其研究范围。因此更多识别 WSSV 病毒蛋白线性表位单链抗体的获得将会为更多病毒结构蛋白的鉴定提供方便的研究工具和方法。

本研究探讨了增加识别 WSSV 单链抗体多样性的淘选方法和技巧, 为以后能得到更多识别 WSSV 的单链抗体, 特别是识别线性表位的单链抗体奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Lightner DV. A Hand Book of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Disease of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, 1996.
- [2] Durand S, Lightner DV, Redman RM, *et al.* Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus (WSSV). *Dis Aquat Organ*, 1997, **29**: 205–211.
- [3] Wang YG, Hassan MD, Shariff M, *et al.* Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Dis Aquat Organ*, 1999, **39**(1): 1–11.
- [4] Van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, *et al.* The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 2001, **286**(1): 7–22.
- [5] Yang F, He J, Lin X, *et al.* Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol*, 2001, **75**(23): 11811–11820.
- [6] Mayo MA. Names of viruses and virus species—an editorial note. *Arch Virol*, 2002, **147**(7): 1463–1464.
- [7] Lo CF, Ho CH, Peng SE, *et al.* White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis Aquat Org*, 1996a, **27**: 215–225.
- [8] Dai H, Gao H, Zhao X, *et al.* Construction and characterization of a novel recombinant single-chain variable fragment antibody against white spot syndrome virus from shrimp. *J Immunol Methods*, 2003, **279**(1–2): 267–275.
- [9] Yuan L, Zhang X, Xiao N, *et al.* Identification of a WSSV neutralizing scFv antibody by phage display technology and *in vitro* screening. *Dis Aquat Organ*, 2006, **72**(2): 93–99.
- [10] Zhao XY, Wei C, Dai LF, *et al.* Research on the prokaryotic expression and characteristics of VP28, a structure protein of *penaeus monodon* white spot syndrome virus. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, **28**(3): 234–239.
- [11] van Hulten MC, Westenberg M, Goodall SD, *et al.* Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*, 2000, **266**(2): 227–236.
- [12] Xie X, Li H, Xu L, *et al.* A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res*, 2005, **108**(1–2): 63–67.
- [13] Xie X, Xu L, Yang F. Proteomic analysis of the major envelope and nucleocapsid proteins of white spot syndrome virus. *J Virol*, 2006, **80**(21): 10615–10623.
- [14] Zhang XH, Dai LF, Dai HP. Studies on expression and biochemical characteristics of single chain fragment variable A1 against white spot syndrome virus of shrimp. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(2): 141–145.
- [15] Tang X, Wu J, Sivaraman J, *et al.* Crystal structures of major envelope proteins VP26 and VP28 from white spot syndrome virus shed light on their evolutionary relationship. *J Virol*, 2007, **81**(12): 6709–6717.
- [16] Zhang X, Huang C, Xu X, *et al.* Identification and localization of a prawn white spot syndrome virus gene that encodes an envelope protein. *J Gen Virol*, 2002, **83**(pt5): 1069–1074.