

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00001

IgA亲和体随机组合噬菌体文库的构建和体外分子进化

温宗梅^{1,2}, 曹洁¹, 陈秋莉¹, 贾建安¹, 蒋少华¹, 潘卫^{1*}

1. 第二军医大学基础部微生物学教研室, 上海 200433

2. 同济大学医学院附属上海市肺科医院麻醉科, 上海 200433

[摘要] **目的** 构建 IgA 亲和体随机组合文库并进行体外分子进化, 研究 IgA 亲和体分子结构与功能的关系。 **方法** 基因合成两个 IgA 亲和体片段。3' 端引入 3 个随机连接肽序列随机连接, 克隆于噬菌粒展示载体 pCANTAB5S, 构建噬菌体展示随机组合分子文库。以人 IgA 为靶分子对该文库进行 4 轮亲和筛选。制备阳性筛选克隆的单克隆噬菌体, 用 ELISA 鉴定 IgA 结合活性。 **结果** 成功构建噬菌体展示 IgA 亲和体随机组合分子文库, 库容量为 3.4×10^7 , 滴度为 1.6×10^{12} TU/L, 阳性克隆占 79% 以上, 序列分析 IgA 亲和体随机连接, 随机连接肽序列呈随机分布。在人 IgA 分子诱导的分子进化过程中, 展示多个 IgA 亲和体串联体的噬菌体比例明显增加, 获得 3 种新型 IgA 亲和体组合分子结构形式: IgA 亲和体二联体、三联体和四联体。ELISA 结合实验表明 IgA 亲和体三联体和四联体的 IgA 结合能力远大于单体和二联体。 **结论** 通过构建 IgA 亲和体噬菌体展示随机组合文库和体外分子进化的方法, 获得多种新型组合分子, 其中 IgA 亲和体三联体和四联体的 IgA 结合能力明显增加, 提示通过有效的分子进化成功地获得了高亲和力的 IgA 结合分子。

[关键词] 肽库; 免疫球蛋白 A 亲和体; 串联重复序列; 亲和力; 分子进化

[中图分类号] Q 78

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)01-0001-06

Construction of phage-displayed random combinatorial library of IgA affibodies and its directed *in vitro* evolution

WEN Zong-mei^{1,2}, CAO Jie¹, CHEN Qiu-li¹, JIA Jian-an¹, JIANG Shao-hua¹, PAN Wei^{1*}

1. Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Anesthesiology, Shanghai Pulmonary Hospital, School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To construct a phage-displayed random combinatorial library of IgA affibodies and to analyze its directed *in vitro* evolution, so as to study the relationship of IgA affibody structure with its function. **Methods** The coding sequences of two affibodies, ZA1 and ZA2, were generated by overlapping PCR. The affibodies with a random linking peptide coding sequence in the 3' terminal were randomly ligated and cloned into the *Kpn* I site of the phagemid pCANTAB5S to construct a combinatorial phage library. Totally four rounds of *in vitro* human IgA directed evolution were conducted, and selected phage clones were prepared individually to test the IgA binding activity by ELISA technology. **Results** The combinatorial phage library was successfully constructed; it contained about 3.4×10^7 clones with a titer of 1.6×10^{12} TU/L, and the positive clones accounted for more than 79%. Sequence analysis showed that the two single affibodies were randomly linked by random linking peptides. The composition of the phage clones displaying three or four affibodies in tandem increased remarkably along with the rounds of selection, which indicated the successful IgA directed evolution. Three new arrangements of two, three or four affibodies in tandem were obtained. ELISA results demonstrated a significantly enhanced IgA binding activity of three or four affibodies in tandem. **Conclusion** A series of new IgA binding recombinants have been obtained by directed *in vitro* evolution of combinatorial phage library displaying randomly linked IgA affibodies. The three or four affibodies in tandem have much higher IgA binding activity than others, indicating that the *in vitro* molecular evolution is an effective way to produce IgA binding proteins with high activity.

[Key words] peptide library; immunoglobulin A affibody; tandem repeat sequences; affinity; molecular evolution

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1): 1-6]

[收稿日期] 2009-08-10 **[接受日期]** 2009-11-18

[基金项目] 国家自然科学基金(30872246, 30872405, 30972632), 国家科技重大专项基金(2009ZX10004-105). Supported by National Natural Science Foundation of China(30872246, 30872405, 30972632) and Major Project of National Science and Technology(2009ZX10004-105).

[作者简介] 温宗梅, 硕士, 主治医师. E-mail: wzm1103@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81870988, E-mail: pwpanwei@yahoo.com.cn

IgA 是人体重要的免疫球蛋白,是黏膜免疫的重要分子,研发高效特异性 IgA 结合分子对 IgA 的检测、纯化和医学研究具有重要的应用价值。IgA 亲和体(affibody)是国外学者利用定向分子进化技术从金黄色葡萄球菌 A 蛋白(SPA)Z 结构域为骨架的突变体文库中筛选获得的特异性结合 IgA 的一类结合分子^[1]。然而,许多天然的细菌 Ig 结合蛋白如 SPA、SPG 和 ppL 等包含多个重复串联的高度同源的 Ig 结合单结构域^[2-3],而 IgA 亲和体只存在一个 IgA 结合位点。另有研究表明,多个结合结构域的串联可产生明显高于单结构域的结合活性^[4-7]。然而,IgA 亲和体分子串联是否能实质性地提高 IgA 结合活性?需要多少个亲和体分子串联才能实质性地提高 IgA 结合活性?为了回答这些问题,本研究以两个 IgA 亲和体分子为基本功能单位,构建了噬菌体展示的 IgA 亲和体随机连接组合文库,并在各 IgA 亲和体之间引入随机连接肽序列以保证其结合功能的正常发挥^[8];应用人 IgA 对该文库进行亲和和筛选,获得几种 IgA 结合能力大大提高的 IgA 亲和体串联体,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 质粒载体和菌株 pMD-18T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司;pCANTAB5S 噬菌粒载体由第二军医大学微生物学教研室保存;pET32a⁽⁺⁾载体购自 Novagen 公司;*E. coli* Top10F、*E. coli* TGI、*E. coli* BL21 (DE3)和辅助噬菌体 M13K07 为本室保存。

1.2 抗体和酶 人 IgA、IgG、IgM 抗体购于 Sigma 公司;基因工程抗体 IgG1Fc 分子由上海复旦张江生物医药股份有限公司提供;生物素购于上海生物制品研究所;鼠抗噬菌体酶联单抗 anti-M13mAb-HRP 购自 Amersham Pharmacia 公司。限制性内切酶 *Kpn* I, Ligation High 连接液和碱性磷酸酶购于 TaKaRa 公司。

1.3 引物序列 根据文献[1]发表的 IgA 亲和体序列,设计编码 IgA 亲和体 ZA1、ZA2 序列的 8 条引物(引物序列见表 1)。引入 *Kpn* I 酶切位点(GGT ACC)的上游引物 UB1-K:5'-GCT TGT GCG AAT GTG ACC AGC GTA CGC ACG GGT ACC GTT GAC AAC AAA TTC AAC-3';引入 *Kpn* I 酶切位点和随机连接肽编码序列(NNS NNS NNS)的下游引物 DB1-K:5'-ACG CTC TGT GCA CTC ACA TCT AGA GGT ACC SNN SNN SNN TTT CGG AGC CTG AGC GTC-3'。用于噬菌粒展示载体 pCANTAB5S 中克隆片段的 PCR 扩增及测序的上游引物 pCANTAB5S-1:5'-CAA CGT GAA AAA ATT ATT ATT CGC-3',下游引物 pCANTAB5S-6:5'-GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GC-3'。用于克隆在 pET32a⁽⁺⁾表达载体上的上游引物 B-S-U1:5'-GGA TCC GAG CTC AGG CCT GTC GAC GGT ACC GTT-3',下游引物 S-H-D:5'-GAG CTC AAG CTT ACC AGA TCC ACC ACC GCC GGT ACC-3'。以上引物均委托上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 合成 IgA 亲和体的引物

Tab 1 Primers for PCR amplification of two IgA affibodies

Name	Description	Sequence(5'-3')
Up-1	Sense terminal primer of A1/A2	GGG TCT AGA GTT GAC AAC AAA TTC AAC AAA GAA
A2-U-2	Sense terminal primer of A2	CGT GAA ATC CGT GAA CTG CCG AAC CTG AAC CAC CAG CAG AAA CTG GCT TTC
A1-D-1	Anti-sense terminal primer of A1	GGC AGC AGA CGG ATT TCC TGA GAA GCC TGG ATG GTT TCT TTG TTG AAT TTG TTG T
A1-U-2	Sense terminal primer of A1	CAG GAA ATC CGT CTG CTG CCG AAC CTG AAC GGT CGT CAG AAA CTG GCT TTC
A2-D-1	Anti-sense terminal primer of A2	GGC AGT TCA CGG ATT TCA CGA GAA GCG ATG ATT TTT TCT TTG TTG AAT TTG TTG T
A1/2-U-3	Sense terminal primer of A1/A2	ACC CGT CTC AGT CTG CTA ACC TGC TGG CTG AAG CTA AAA AAC TGA ACG ACG CTC A
A1/2-D-2	Anti-sense terminal primer of A1/A2	GTT AGC AGA CTG AGA CGG GTC GTC CAG CAG AGA GTG GAT GAA AGC CAG TTT CTG C
Down-3	Anti-sense terminal primer of A1/A2	GGG TCT AGA TTT CGG AGC CTG AGC GTC GTT CAG TTT TTT

1.4 IgA 亲和体的基因合成 以表 1 所示的 8 条引物为模板,Overlap PCR 的方法扩增制备 IgA 亲和体 ZA1 和 ZA2 片段,各片段 PCR 产物回收纯化

后分别插入 pMD-18T 载体,试剂盒提取质粒,鉴定阳性单克隆,委托上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

1.5 噬菌体展示 IgA 亲和体随机组合文库的构建 以克隆于 pMD-18T 载体上的测序鉴定正确的 ZA1、ZA2 为模板,以 UB1-K、DB1-K 为引物,扩增携带 *Kpn* I 酶切位点和随机连接肽的 ZA1、ZA2 片段,PCR 产物回收纯化后行 *Kpn* I 酶切回收纯化;噬菌粒载体 pCANTAB5S 质粒用 *Kpn* I + 碱性磷酸酶线性化处理;取 ZA1、ZA2 酶切回收片段和线性化 pCANTAB5S 按 1:1:2 的比例用 Ligation High 连接液按操作说明书进行连接反应。连接产物转化 *E. coli* TGI 感受态细胞,辅助噬菌体 M13K07(2.0×10^{12} TU/L)拯救,制备噬菌体展示 IgA 亲和体随机组合文库,测定库容量和噬菌体滴度。

1.6 重组 IgA 亲和体噬菌体文库的体外分子进化 人 IgA 用 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液 200 μ l 包被(浓度为 10 mg/L)于排条板上,用含 10% 脱脂奶粉、0.01% NaN_3 、0.1% Triton X-100 的 PBS 封闭液室温封闭 1 h 后用 0.01% PBS 洗涤 5 次。排条板上每孔先加 100 μ l 封闭液,再加 100 μ l IgA 亲和体噬菌体文库,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 3 h 后洗涤 30 次。每孔加入 100 μ l 生长至对数生长期的 *E. coli* TGI,37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 h,收集菌液,分别取 10、1、0.1 μ l 涂布于氨苄青霉素(Amp)抗性平皿计数,测定噬菌体的 Ig 结合情况。其余菌液扩增至 50 ml $2 \times \text{YT}$ (含 Amp 100 mg/L)培养液,37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 h 后加入 10^{10} TU 的辅助噬菌体 M13K07,再培养 1 h 后加入卡那霉素至 15 mg/L,37 $^\circ\text{C}$ 培养过夜。培养液上清经 0.22 μm 滤膜过滤,即为 IgA 亲和筛选后的 IgA 亲和体噬菌体库。设空白对照(不加噬菌体)作同步筛选。上述筛选过程重复 4 轮。

1.7 单克隆噬菌体的制备及 ELISA 鉴定 随机挑取不同筛选轮次的单克隆菌落 20 个接种于 10 ml $2 \times \text{YT}$ (含 Amp 100 mg/L)培养液,37 $^\circ\text{C}$ 培养 1 h 后加入 10^{10} TU 的辅助噬菌体 M13K07,培养 1 h 后加入卡那霉素至 15 mg/L,37 $^\circ\text{C}$ 培养过夜。PEG 沉淀的噬菌体复悬于 2 ml $2 \times \text{YT}$ 中,分别测定单克隆噬菌体的滴度。设 LD3 噬菌体和 pCANTAB5S 噬菌体分别作阳性对照和阴性对照。将待检测的噬菌体滴度调整至 10^{12} TU/ml 后各取 100 μ l 加入 IgA 包被的 ELISA 板条中,37 $^\circ\text{C}$ 放置 2 h 后用 PBST 洗 5 次,加入鼠抗噬菌体酶联单抗结合,TMB 显色后读取 D_{490} 数值,检测这些单克隆噬菌体的 IgA 结合活性。同样的方法检测 IgG 结合活性。

1.8 阳性克隆的序列分析 挑取经 ELISA 鉴定的

阳性单克隆,用 DNA 抽提试剂盒抽提纯化重组噬菌粒,委托上海申能博彩生物科技有限公司分别用上游测序引物 pCANTAB5-S1 及下游测序引物 pCANTAB5-S6 进行正、反向序列测定,测序结果用 DNASTAR 软件分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件对 ELISA 检测数据进行统计学处理,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 IgA 亲和体的基因合成 用 Overlap PCR 的方法合成 IgA 亲和体 ZA1、ZA2 片段,IgA 亲和体大小理论值为 174 bp,电泳检测显示合成的 ZA1、ZA2 大小与理论值相符。将两个片段分别克隆于 pMD-18T 载体进行序列分析,结果与文献[1]提供序列完全一致。

2.2 噬菌体展示 IgA 亲和体随机组合文库的构建 以 ZA1、ZA2 片段为模板,以 UB1-K、DB1-K 为引物,制备两端携带 *Kpn* I 酶切位点(GGT ACC)和 3' 端带有 3 个随机连接肽(NNS NNS NNS)的 ZA1、ZA2 片段,大小为 195 bp,见图 1 的第 1、3 条带;*Kpn* I 酶切后片段大小为 183 bp,见图 1 的第 2、4 条带。通过与 DNA 标记物比较,ZA1、ZA2 片段酶切前后的大小与理论值相符。ZA1、ZA2 片段酶切回收,与线性噬菌粒载体 pCANTAB5S 连接,转化,辅助噬菌体拯救,构建 IgA 亲和体随机组合噬菌体展示文库。经测定库容量为 3.4×10^7 ,滴度为 1.6×10^{12} TU/L,无菌试验为 0,PCR 检测显示组合文库包含有 0、1、2 倍大小的 IgA 亲和体插入片段,阳性克隆比例总计达 79%(图 2)。序列分析显示 IgA 亲和体被随机连接,随机连接肽序列呈随机分布。

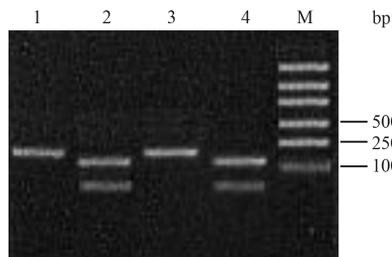


图 1 IgA 亲和体 *Kpn* I 酶切电泳图

Fig 1 IgA affibodies with a random linking peptide digested by *Kpn* I

1,3:ZA1/ZA2 affibody; 2,4:ZA1/ZA2 affibody digested by *Kpn* I; M:DL2000 marker

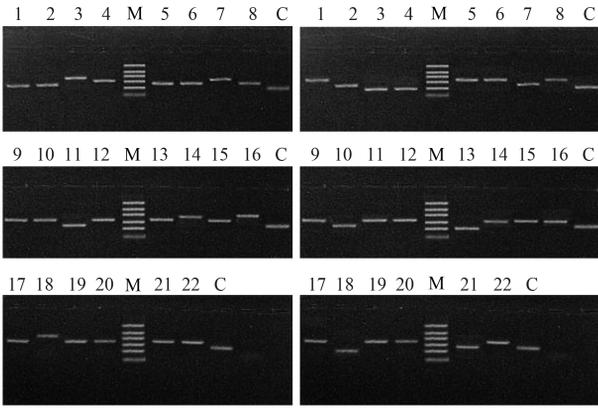


图2 IgA亲和体组合文库插入片段的分布
Fig 2 Composition of phage displayed random recombinant library of IgA affibodies

1-22: Clones in the library; C: pCANTAB5S; M: DL2000 marker

2.3 IgA亲和体组合文库的体外分子进化 用人IgA对IgA亲和体随机组合噬菌体文库进行4轮亲和筛选,每轮筛选中均设阴性对照。为了能动态展示筛选效果,我们对每轮筛选文库的IgA结合菌落计数、噬菌体滴度、各种大小插入片段在文库中的组成情况进行动态检测,在每轮筛选文库中随机挑取48个单克隆进行PCR扩增检测各种大小插入片段(由不同数目的单结构域连接而成)在文库中的组成情况,从表2可以明显地看到,随着筛选轮次增加,阳性克隆和大片段克隆(≥ 2 domain)所占的比例持续稳定地增加;阴性克隆(为载体自连,无插入片段)及单个亲和体克隆所占的比例不断降低。这些显示了进化过程的有效性。

表2 IgA亲和体噬菌体文库各代筛选文库中阳性克隆的计数和百分比

Tab 2 Counts and percents of positive clones with insertion of different sizes in each post-selection

Selection round	0 domain	1 domain	2 domain	3 domain	4 domain	Total positive clones
F0	8(18)	26(59)	10(23)	0	0	36(82)
F1	5(10)	24(50)	19(40)	0	0	43(90)
F2	2(4)	20(42)	17(35)	9(19)	0	46(96)
F3	0	2(4)	8(17)	16(33)	22(46)	48(100)
F4	0	0	0	6(12)	42(88)	48(100)

[n(%)]

F: Phage library; 0 domain: Negative clones; 1 domain: Positive clones with single affibody; 2 domain: Positive clones with two affibodies in tandem; 3 domain: Positive clones with three affibodies in tandem; 4 domain: Positive clones with four affibodies in tandem

2.4 IgA亲和体阳性克隆代表分子的IgA结合活性测定 从筛选文库中挑选1、2、3和4倍大小的单克隆各4个,分别制备单克隆噬菌体,ELISA检测这些单克隆噬菌体的IgA结合活性,所设的阳性对照LD3为本室前期研究^[8]中制备获得的对IgA、IgG、IgM均有较强结合能力的结合分子,阴性对照pCANTAB5S为空的噬菌粒载体,检测结果进行统计学处理。分别对1、2、3、4倍大小的单克隆分子分组进行比较,结果显示:1倍和2倍大小的IgA亲和体单克隆分子的IgA结合活性间差异无统计学意义($P=0.284$);3倍和4倍大小的IgA亲和体单克隆分子的IgA结合活性无明显差别,差异无统计学意义($P=0.089$);3倍和4倍大小的IgA亲和体单克隆分子的结合活性明显高于1倍和2倍IgA亲和体单克隆分子,差异有统计学意义($P<0.01$,图3A)。同样的方法检测这些单克隆噬菌体的IgG结合活性,结果发现这些IgA亲和体分子的单克隆噬菌体均无IgG结合活性,各组间差异均无统计学意义($P>0.05$,图3B)。

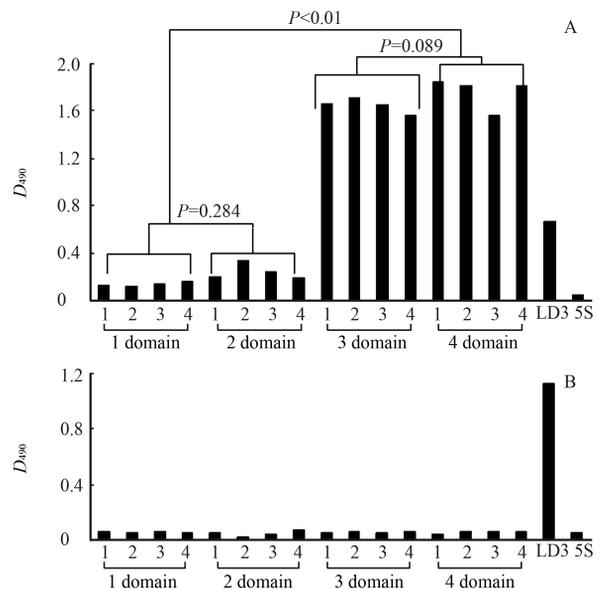


图3 IgA亲和体代表分子的IgA(A)和IgG(B)结合活性鉴定
Fig 3 Binding activity of representative molecules for human IgA(A) and IgG(B)

1, 2, 3, 4 domain: Represents single affibody, two affibodies in tandem, three affibodies in tandem, and four affibodies in tandem, respectively. LD3: Positive control; 5S: pCANTAB5S, negative control

2.5 阳性克隆的序列分析 从各轮筛选文库中分别挑取 2、3 和 4 倍大小的单克隆共 22 个进行序列测定, 测序结果用 DNASTAR 软件分析, 发现有 2 种 2 个 IgA 亲和体串联体的组合分子构成形式: A2-A2 和 A1-A2, 每种构成形式具有各自独特的连接肽序列; 1 种 3 个 IgA 亲和体串联体的组合分子构成形式: A1-A1-A1, 但其随机连接肽的氨基酸序列有 2 种不同形式; 1 种 4 个 IgA 亲和体串联体的组合分子构成形式: A2-A1-A2-A1, 并且其随机连接肽也完全一致(表 3)。

表 3 IgA 亲和体阳性克隆代表分子的序列分析

Tab 3 Sequence analysis of representative molecules of positive IgA antibodies

(N=22)

Size	Number	Arrangement	Random linking peptide
2 domain	1	A2-A2	NPS-TCQ
2 domain	3	A1-A2	QIT-ICM
3 domain	2	A1-A1-A1	RSH-AGR-TGH
3 domain	6	A1-A1-A1	VKD-MKT-ADA
4 domain	10	A2-A1-A2-A1	RHG-NLN-TKD-SRH

3 讨论

亲和体是 Nygren^[9]从 protein A 单结构域-Z 结构域的 13 个表面氨基酸残基随机化形成的文库中用分子进化手段筛选获得的各种人工结合蛋白, 其中包括可结合 VIII 因子、呼吸道合胞病毒 G 蛋白、人表皮生长因子受体胞外区和人 CD28 等分子的结合分子, 这些结合分子被命名为亲和体。IgA 亲和体作为一种亲和体, 失去了原骨架 Z 结构域的 IgG 结合活性, 形成了对 IgA 很高的结合能力。然而, protein A 包含有 5 个串联重复的结合结构域, 其他细菌 Ig 结合分子如 ppL 也有 5 个串联重复的结合结构域, SPG 有 3 个串联重复的结合结构域。因而, 能否通过串联重复提高 IgA 亲和体对 IgA 的结合能力成了本研究的主要探索焦点。

为了上述研究目的, 本实验构建的 IgA 亲和体随机串联组合噬菌体展示文库具有以下特点: (1) 从多个 IgA 亲和体中选择结合活性最高的 A1 和 A2 作为建库的结构单元, 可以确保产生高活性的重组分子; (2) 各亲和体的 3' 端引入 3 个氨基酸大小的随机连接肽, 既扩大文库中重组分子的数量, 且亲和体之间的连接具有更多的自由度和更好的适应性, 保证高结合活性串联分子的产生。 (3) 随机连接肽密码子设计为 NNS(N 为 A/T/C/G 4 种核苷酸中任

意一种核苷酸, S 为 G/C 2 种核苷酸之一), 可以避免终止密码子的出现, 保证文库的有效性和多样性^[10]。本研究所构建的随机组合文库库容量达到 3.4×10^7 , 阳性克隆比例总计达 79%, A1 和 A2 都存在并呈随机连接, 随机连接肽序列也显示良好的随机性, 完全可以满足本体外分子进化研究的要求。

体外定向分子进化筛选^[11-12]是一个靶分子亲和力筛选的生物淘洗 (biopanning) 过程, 本实验在严格控制实验操作过程的基础上, 通过监测每轮筛选文库的结合菌落计数、噬菌体滴度和无菌结合实验来对体外分子进化过程进行质量监控。4 轮筛选文库的结合菌落计数都达到 10^7 以上, 噬菌体滴度均达到 10^{12} , 无菌结合实验均为 0, 说明整个分子进化过程的正确无误, 结果真实可靠。在进化过程中, 噬菌体文库所展示插入片段大小也发生了明显的规律性变化, 由原代和第 1、2 代文库的 1 个和 2 个亲和体串联体分子为主进化成第 3、4 代文库的 3 个和 4 个亲和体串联体分子。

为了检测噬菌体文库所展示插入片段大小的变化是否有意义, 我们从筛选文库中挑选 1、2、3 和 4 倍大小的单克隆各 4 个, 分别制备单克隆噬菌体, 比较其 IgA 结合活性是否存在差异。ELISA 检测结果的统计学分析显示: 1 倍与 2 倍大小的 IgA 亲和体噬菌体克隆的 IgA 结合活性相对较低, 两者之间无明显差别; 3 倍和 4 倍大小的 IgA 亲和体的结合活性相对较高, 相互之间也无统计学意义, 却明显高于 1 倍和 2 倍 IgA 亲和体 ($P < 0.01$)。这一结果不仅说明了噬菌体文库所展示插入片段大小所发生的规律性变化具有生物学的意义, 而且提示 3 个以上 IgA 亲和体分子的串联可能存在与单个亲和体分子相比更强的新的 IgA 结合机制。目前, 我们正在对这一可能的新的 IgA 结合机制进行进一步的深入研究。

为了进一步了解亲和体分子结构与功能的关系, 对筛选出的 2 倍、3 倍和 4 倍大小的 IgA 亲和体阳性克隆进行序列分析。结果显示: 2 个 IgA 亲和体串联体的组合分子构成形式有 2 种, 分别为 A2-A2 和 A1-A2, 每种构成形式具有各自独特的连接肽序列; 而所有 3 个亲和体串联体分子均为同一构成形式 A1-A1-A1, 其分子之间的连接肽也只有 2 种形式; 所有 4 个亲和体串联体分子也均为同一构成形式 A2-A1-A2-A1, 分子间均由同一种连接肽连接。序列分析结果说明上述分子是经过了严格、高

效的筛选所获得的。

通过有效的体外定向分子进化,我们获得了 IgA 结合能力明显增强的亲和体串联体 A1-A1-A1 和 A2-A1-A2-A1,这些高亲合力的 IgA 结合分子可在 IgA 纯化、IgA 检测和其他 IgA 相关的一些研究中发挥重要作用。目前,我们正在原核克隆、表达上述的新分子,以系统研究其所增强的 IgA 结合特性、引起结合力增强的可能的分子机制及应用潜力。

[参考文献]

- [1] Rönmark J, Grönlund H, Uhlén M, Nygren P A. Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 2647-2655.
- [2] Ibrahim S. Immunoglobulin binding specificities of the homology regions (domains) of protein A[J]. *Scand J Immunol*, 1993, 38: 368-374.
- [3] Housden N G, Harrison S, Roberts S E, Beckingham J A, Graille M, Stura E, et al. Immunoglobulin-binding domains; protein L from peptostreptococcus magnus [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31: 716-718.
- [4] Dincbas-Renqvist V, Lendel C, Dogan J, Wahlberg E, Härd T. Thermodynamics of folding, stabilization, and binding in an engineered protein-protein complex[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 11220-11230.
- [5] Lendel C, Dincbas-Renqvist V, Flores A, Wahlberg E, Dogan J, Nygren P A, et al. Biophysical characterization of Z(SPA-1)-a phage-display selected binder to protein A [J]. *Protein Sci*, 2004, 13: 2078-2088.
- [6] Jiang S H, Wang J F, Xu R, Liu Y J, Wang X N, Cao J, et al. Alternate arrangement of PpL B3 domain and SpA D domain creates synergistic double-site binding to VH3 and Vkappa regions of fab[J]. *DNA Cell Biol*, 2008, 27: 423-431.
- [7] Yang H, Cao J, Li L Q, Zhou X, Chen Q L, Liao W T, et al. Evolutional selection of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged various single domains of immunoglobulin (Ig)-binding proteins (IBPs) with four kinds of Ig molecules [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 137.
- [8] 徐蓉, 沈毅珺, 邓松华, 蔡春晓, 陈秋莉, 贾建安, 等. 噬菌体展示 protein A 及 protein L Ig 结合单结构域随机组合文库及 Ig 亲和筛选[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32: 535-543.
- [9] Nygren P A. Alternative binding proteins; affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold[J]. *FEBS J*, 2008, 275: 2668-2676.
- [10] Chan L A, Phillips M L, Wims L A, Trinh K R, Denham J, Morrison S L. Variable region domain exchange in human IgGs promotes antibody complex formation with accompanying structural changes and altered effect or functions[J]. *Mol Immunol*, 2004, 41: 527-538.
- [11] To R, Hiramata T, Arbabi-Ghahroudi M, MacKenzie R, Wang P, Xu P, et al. Isolation of monomeric human V(H)s by a phage selection[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 41395-41403.
- [12] 沈毅珺, 潘卫, 许燕, 王征, 杨彤, 谭靖伟, 等. 噬菌体展示重组人淋巴毒素突变体库及受体亲和筛选[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32: 75-80.

[本文编辑] 尹茶

· 消息 ·

我校东方肝胆外科医院国家肝癌样本库及共享数据库建设取得阶段性成果

第二军医大学东方肝胆外科医院国家肝癌样本库及共享数据库建设取得阶段性成果,现已基本完成肝脏组织样本库的实体建设,并完成了样本库基础网络环境的构建。

以周伟平教授为首的课题组经过一年多的努力,顺利完成所承担的重大专项中“病毒性肝炎相关肝癌样本库及其相关信息共享数据库的建设及维护”课题,组建了一支专业化样本取材分装管理的队伍,建立了肝脏肿瘤样本采集管理的标准化流程(SOP),基本完成位于东方肝胆外科医院内的肝脏组织样本库的实体建设,建立了包括血样品、尿样和手术标本(含部分活检样本)在内的2000余例,以及位于复旦大学附属中山医院的1000余例完整临床样本库;同时建立了完整的样本库登记随访系统。在合作单位江苏南通启东肝癌研究所也已完成约3000例HBsAg阳性高危人群的队列建设并开始随访。

在共享数据库建设方面,已完成样本库基础网络环境的构建,建立了需求分析、概要设计、详细设计、各数据库结构与接口标准、开放数据规范与标准等5套基础数据字典。建立了肝癌样本信息库的数据管理与统计分析SOPs系统、样本库管理信息系统、患者信息随访管理信息系统,并实现了系统间的数据共享。为确保信息数据的安全,还建立了一套数据安全与隐私保护的访问策略。肝癌样本库的窗口网站 <http://www.nltb.org>。

平台目标是建立国际上领先的规模化临床肝癌标本库,具备完整临床资料、实验研究资料和组织及体液样本,为今后的生物学研究及为国内外各科研和医疗机构提供平台服务。同时也可带动分子流行病学、临床科研等学科的发展,培养一批肝癌临床研究的人才,推动建立国家级一体化的肝癌防治诊疗体系。