

# 不同亚类小鼠 IgG 对 SpA 和 SpG 单结构域构成的随机组合噬菌体文库的体外进化研究

徐文竹<sup>1</sup>, 丁莹莹<sup>2</sup>, 吴莉莉<sup>1</sup>, 张婧<sup>1</sup>, 冯娇娇<sup>2</sup>, 王锦红<sup>2</sup>, 潘卫<sup>2</sup>, 邓松华<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 判断不同亚类小鼠 IgG Fc 段构像及与 SpA 或 SpG 的结合特点, 采用不同亚类小鼠 IgG 对 SpA 和 SpG 单结构域构成的随机组合噬菌体展示文库进行亲和筛选。方法 不同亚类小鼠 IgG 对噬菌体文库进行亲和筛选, 获得具有结合优势的单结构域排列组合, 噬菌体 ELISA 法来比较其与不同亚类小鼠 IgG 的结合特性, 优势组合分子经原核表达蛋白, HRP 标记后, ELISA 法进一步来比较其与小鼠不同亚类 IgG 的结合特性。结果 小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 分别经过 5、4、5 和 5 轮亲和筛选后, 其文库的展示片段大小均为 2 个 domain, 表明进化完全。测序分析显示: 小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 筛选得到的具有结合优势组合分子分别是 D-D、D-D、A-C 和 D-C。噬菌体 ELISA 验证结合优势组合分子对小鼠不同亚类 IgG 的结合能力; 蛋白经 HRP 标记后的 ELISA 结果和筛选不完全一致, 但其结合强弱具有一致性, 均为: IgG3 > IgG2a > IgG2b > IgG1。结论 得到 3 种不存在于天然 SpA、SpG 分子中, 分别与不同亚类小鼠 IgG 具有较强结合作用的新型组合分子 D-D、A-C 和 D-C, 为进一步研究 IgG Fc 段构像及与 SpA 或 SpG 的结合特点提供了新的参考分子。

**关键词** 噬菌体文库; 定向进化; 亚类; 新型免疫球蛋白结合分子

中图分类号 R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1227-07

金黄色葡萄球菌蛋白 A (Staphylococcal protein A, SpA)<sup>[1]</sup> 和链球菌蛋白 G (Streptococcal protein G, SpG)<sup>[2]</sup> 是研究最多的细菌免疫球蛋白结合蛋白<sup>[3]</sup>, 其中 SpA 的分子量大约 57 ku, 含有 5 个具有 Ig 结

合功能且重复串联的结构域, 为 E、D、A、B、C<sup>[4]</sup>。SpG 分子量为 65 ku, 包含 3 个具有 Ig 结合功能且重复串联的结构域, 为 B1、B2、B3<sup>[5-6]</sup>。SpA 和 SpG 均可结合于哺乳动物 IgG-Fc 的 CH2 $\gamma$  和 CH3 $\gamma$  间的分界且与 IgG-Fc 的结合强, 已被广泛用于制备、纯化与检测抗体、免疫沉淀试验和免疫吸附治疗, 在科研、检测和治疗方面成为了重要的工具<sup>[7-10]</sup>。为进一步研究 SpA 和 SpG 与 Fc 的结合特性, 在实验室应用噬菌体展示技术对细菌免疫球蛋白结合分子 SpA、SpG、PpL<sup>[11]</sup> 中单结构域构成的随机组合文库进行体外进化亲和筛选, 获得了 A-L<sup>[11]</sup> (PpL 的 B3 结构域)、A-G2<sup>[11]</sup>、LD3<sup>[12]</sup>、LD5<sup>[12-13]</sup>、E-B-B3<sup>[14]</sup> 以及 D-A-B3-B3<sup>[14]</sup> 等多种新型进化免疫球蛋白结合分子 (novel evolved Ig-binding molecules, NEIBMs) 基础上, 该研究采用不同亚类小鼠 IgG 抗体 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 对以 SpA 和 SpG 单结构域构成的随机组合噬菌体展示文库进行体外进化亲和筛选, 获得了与小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 具有结合活性的新型组合分子: D-D、D-D、A-C 和 D-C, 分别在噬菌体水平上和经亲和素 HRP 标记蛋白后比较与不同亚类小鼠 IgG 的结合特性, 为进一步研究不同亚类小鼠 IgG Fc 段构像及与 SpA 或 SpG 的结合特点提供了新的参考分子。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 噬菌体展示细菌免疫球蛋白结合分子单结构域随机组合文库** 由第二军医大学微生物教研室构建, 由 SpG 的 B2、B3 及 SpA 的 E、D、A、B、C (库总)<sup>[15]</sup>; SpG 的 B2、B3 及 SpA 的 E、D、A、B、C (库 C)<sup>[14]</sup>; SpG 的 B2、B3 及 SpA 的 E、D、A、B (库 D) 等比例混合组成, 该混合文库在库容、随机性、多样性方面均达到了筛选的标准。

**1.1.2 质粒载体和菌株** 噬菌粒载体 pCANT-AB5S、表达载体 pET32a(+), 辅助噬菌体 M13K07、大肠杆菌 Top10、TG1, BL21-TRXB (DE3) 为本实验室保存。

**1.1.3 试剂** 限制性内切酶 Sal I 和 BamH I、Taq

2014-04-08 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目 (编号: KJ2010A117); 国家自然科学基金 (编号: 30872405、30872246、30972632、30972799)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup>第二军医大学病原生物学教研室, 上海 200433

<sup>3</sup>安庆医药高等专科学校, 安庆 246052

作者简介: 徐文竹, 女, 硕士研究生;

潘卫, 男, 博士生导师, 责任作者, E-mail: weipan@163.com;

邓松华, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: desoh@126.com

酶均购自于宝生物工程(大连)有限公司; Ligation high 连接液购自日本 TOYOBO 公司; 氨苄青霉素 (Amp) 与卡那霉素 (Kana) 均购自华美生物公司; 亲和素 Streptavidin - HRP conjugate (ZyMax) 购自美国 Invitrogen 公司; 质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 抗噬菌体酶联单抗 (mouse anti-M13mAb-HRP) 购自美国 Amersham Pharmacia 公司; HRP-SpA 购自武汉博士德生物工程有限公司; 人 IgG、小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 均为本实验室制备。

1.2 方法

1.2.1 以不同亚类小鼠 IgG 为诱饵的体外分子进化亲和筛选 因原代噬菌体文库中空噬菌体比例很少, 作者将原代库噬菌体与空噬菌体在相同滴度下等体积混合做为筛选的初始文库(经 PCR 鉴定, 空噬菌体占 21.7%, 展示插入 1 个结构域的噬菌体占 69.6%, 展示插入多结构域噬菌体占 8.7%)。以小鼠 IgG1 包板牛奶封闭后加入原代噬菌体文库 100 μl 37 °C 温箱孵育 3 h 后 PBS-tween 快速洗 8 次, 加入对数期 TG1 100 μl 37 °C 温箱孵育 1 h 后取 1 μl 划 LB 平板 (Amp), 挑单克隆鉴定, 其余的全部扩大培养到对数期后按 1 : 100 加入辅助噬菌体 M13K07 拯救, 1 h 后按 1 : 1 000 加入 Kana 制备成下一次筛选的噬菌体文库。同样的方法以小鼠 IgG2a、IgG2b 和 IgG3 对原代噬菌体文库进行亲和筛选。

1.2.2 ELISA 法检测不同亚类小鼠 IgG 与筛选获得的优势组合分子噬菌体的结合活性 将筛选获得的优势组合 D-D、A-C 和 D-C, 划 LB 平板 (Amp) 37 °C 过夜培养。为保证得到真实可靠的结果, 随机挑取单克隆菌落 8 个分别接种于 8 管 2 × YT 培养基 (Amp) 中, 经辅助噬菌体 M13K07 拯救, 制备成 8 管来自不同单克隆但具有相同展示物的单克隆噬菌体, 测定滴度后用平行组实验。同样的方法制备 pCANTAB-5S、pCANTAB5S-SpA 噬菌体, 分别作为实验阴性和阳性对照。小鼠 IgG1 4 °C 包被过夜, 10% 牛奶 37 °C 封闭 2 h 过的 ELISA 板条中分别加入 100 μl 单克隆噬菌体 37 °C, 45 min 后用 PBST 洗 5 次, 加入抗噬菌体酶联单抗 37 °C, 45 min 后 PBST 洗 10 次, TMB 显色后读取 OD<sub>450</sub> 数值, 检测小鼠 IgG1 与各单克隆噬菌体的结合活性。同样的方法检测小鼠 IgG2a、IgG2b 和 IgG3 与各单克隆噬菌体的结合活性。

1.2.3 构建重组表达质粒 分别以 D-D、A-C、D-C/pCANTAB5S 3 种代表分子为模板, 用合成的上、

下游(见表 1, 由上海生工生物工程科技服务有限公司合成)引物进行扩增, PCR 的反应体积为 50 μl。反应条件: 94 °C 30 s; 56 °C 30 s; 72 °C 45 s; 35 个循环, 反应结束前 72 °C 延伸 5 min, 1.2% 琼脂糖电泳检测, 切胶后试剂盒回收纯化 3 种 PCR 产物。pET-32a 和上述 PCR 纯化产物均用 BamH I 和 Sal I 双酶切, 试剂盒回收酶切产物后 16 °C 连接 16 h 转化 TOP10 感受态后, 根据 PCR 检测结果, 在转化 3 种重组质粒的平板上分别挑取 5 个阳性克隆菌种, 委托杰李基因科技股份有限公司进行序列测定, 测序引物为 S. Tag。测序结果用 DNAssis 软件分析。获得 3 种重组质粒 D-D、A-C、D-C/pET32a。

表 1 各代表序列克隆表达引物

引物名称	引物序列(5'-3')	大小 (bp)
uAC	GGCCCGG <i>GGATCCTTCTATGCGGCCAGCCG</i>	31
dAC	GCGCCG <u>GTCGACCTATCTAGACACGTACTT</u>	30
uDD	GGCCCGG <i>GGATCCTATGCGGCCAGCCGGCC</i>	31
dDD	GCGCCGGT <u>GACCTACTCTCTAGACTCGAGCCG</u>	33
uDC	GCGCCG <i>GGATCCTCTAGA GCTGATCGCCAAC</i>	31
dDC	GCGCCGGT <u>GCACTTATCTAGAGGACAACATTT</u> TTGCTGCTTGAGCA	46

斜体部分为 BamH I 酶切位点; 划线部分为 Sal I 酶切位点

1.2.4 表达及纯化融合蛋白 将上述 3 种重组质粒 D-D、A-C、D-C/pET32a 转化表达菌 BL21, IPTG 少量诱导表达 DD、AC、DC 蛋白, 经 SDS-PAGE 鉴定后大量表达, 并用 Ni-NTA 柱亲和层析纯化。

1.2.5 ELISA 法鉴定不同亚类小鼠 IgG 及人 IgG 与优势组合分子蛋白进行 HRP 标记的结合活性 经 SDS-PAGE 鉴定正确后进行 HRP 标记, 制备 HRP-DD、HRP-AC、HRP-DD。小鼠 IgG1 4 °C 包被过夜, 10% 牛奶 37 °C 封闭 2 h 过的 ELISA 板条中, 将 HRP-AC、HRP-DD、HRP-DC 以及 HRP-SpA 分别作为酶标二抗倍比稀释, 用 ELISA 法检测小鼠 IgG1 与 HRP-AC、HRP-DD、HRP-DC、HRP-SpA 在不同稀释度下的结合活性。同样的方法检测小鼠 IgG2a、IgG2b 和 IgG3 与其结合活性。

1.3 统计学处理 采用 SAS 9.3 统计软件对不同亚类小鼠 IgG 与各单克隆噬菌体 ELISA 检测结果 OD<sub>450</sub> 进行统计学处理, 两两比较采用非参数检验的 Nemenyi 法。

2 结果

2.1 以不同亚类小鼠 IgG 为诱饵的体外分子进化

亲和筛选 根据本实验室同类文库的体外进化亲和筛选经验,在不同亚类小鼠 IgG 进化筛选中,展示插入两个结构域片段克隆所占的比例持续增加而零插入和插入单个结构域片段克隆所占比例不断降低,最后被淘汰消失,这种变化显示了文库进化完全,见图 1。

**2.2 以不同亚类小鼠 IgG 为诱饵的体外分子进化亲和筛选结果测序** 从小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 进化筛选完全的第 5、4、5、5 代文库中随机挑选 10 个插入两个结构域片段的单克隆进行序列测定。测序结果显示:① 小鼠 IgG1 诱导的进化筛选统一为正向插入的组合分子 D-D;② 小鼠 IgG2a 诱导的进化筛选统一为正向插入的组合分子 D-D;③ 小鼠 IgG2b 诱导的进化筛选统一为正向插入的组合分子 A-C;④ 小鼠 IgG3 诱导的进化筛选统一为正向插入的组合分子 D-C。

**2.3 ELISA 法检测不同亚类小鼠 IgG 与筛选获得的优势组合分子噬菌体的结合活性** 将 D-D、A-C、D-C、SpA/pCANTAB5S 和 pCANTAB5S 共 5 组分别制备 8 个单克隆噬菌体,在调整滴度均约为  $1.0 \times 10^{12}$  TU/ml 后,ELISA 法比较不同亚类小鼠 IgG 与筛选获得的优势组合分子噬菌体的结合活性。结果

显示:① IgG1 与 4 种分子 DD、AC、DC、SpA 噬菌体结合活性的比较,DD 与 SpA 差异有统计学意义( $\chi^2 = 21.3179, P = 0.0003$ );② IgG2a 与 4 种分子 DD、AC、DC、SpA 噬菌体结合活性的比较,DD 与 SpA 差异有统计学意义( $\chi^2 = 17.2165, P = 0.0018$ );③ IgG2b 与 4 种分子 DD、AC、DC、SpA 噬菌体结合活性的比较,AC 与 SpA 差异有统计学意义( $\chi^2 = 21.1765, P = 0.0003$ );④ IgG2b 与 4 种分子 DD、AC、DC、SpA 噬菌体结合活性的比较,DC 与 SpA 差异有统计学意义( $\chi^2 = 10.8042, P = 0.0289$ ),见图 2。

**2.4 构建重组表达载体** 为了进一步检测不同亚类小鼠 IgG 与 D-D、A-C、D-C 在蛋白水平上的结合活性,将 D-D、A-C 和 D-C 分别克隆于原核表达载体 pET32a(+) 中,构建了重组表达载体 pET32a-DD、pET32a-AC 和 pET32a-DC,见图 3。

**2.5 诱导表达及纯化融合蛋白** 将重组表达载体 pET32a-DD、pET32a-AC 和 pET32a-DC 转化表达菌 BL21 感受态细胞,成功表达并纯化,得到融合蛋白后进行 HRP 标记,用于结合特性分析,见图 4。

**2.6 ELISA 法鉴定不同亚类小鼠 IgG 及人 IgG 与优势组合分子蛋白进行 HRP 标记的结合活性**

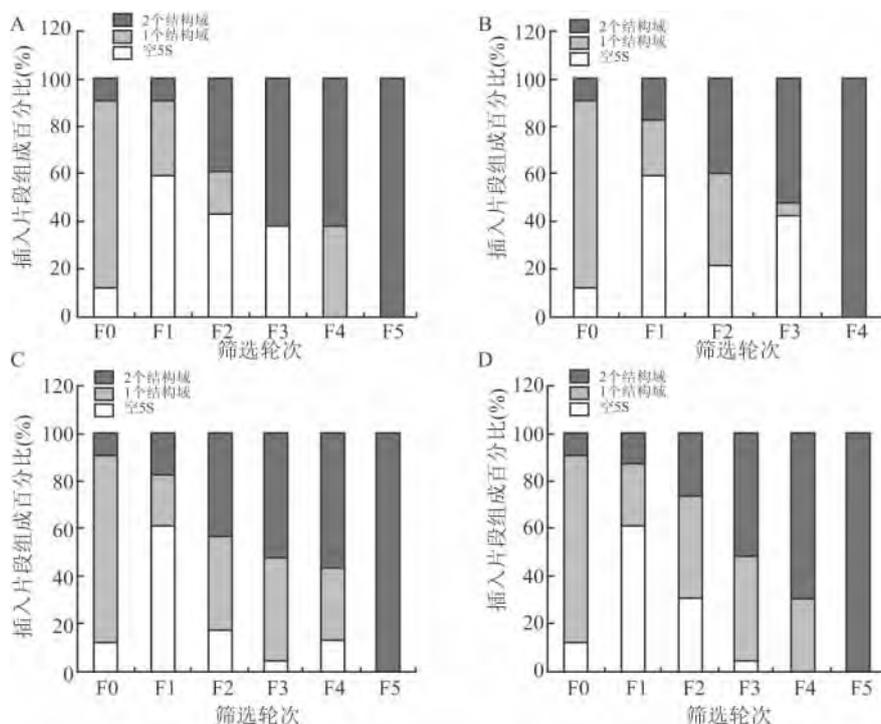


图 1 经不同亚类小鼠 IgG 筛选后各代噬菌体文库中 23 个单克隆噬菌体插入片段的组成变化

A: 小鼠 IgG1 对文库进行筛选的片段组成变化; B: 小鼠 IgG2a 对文库进行筛选的片段组成变化; C: 小鼠 IgG2b 对文库进行筛选的片段组成变化; D: 小鼠 IgG3 对文库进行筛选的片段组成变化

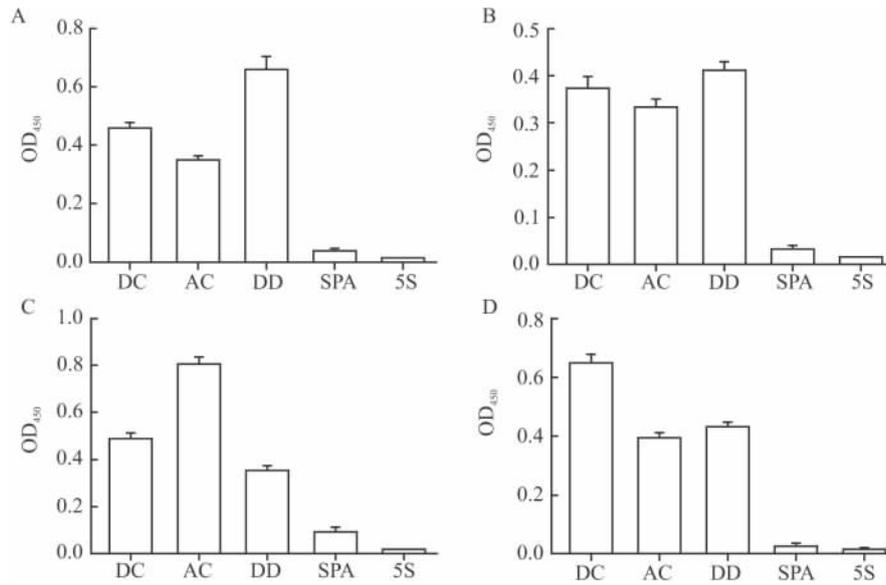


图2 ELISA 法比较筛选各组合分子和 SpA、5S 噬菌体对不同亚类小鼠 IgG 结合活性

A: 各组合分子与小鼠 IgG1 结合活性检测结果; B: 各组合分子与小鼠 IgG2a 结合活性检测结果; C: 各组合分子与小鼠 IgG2b 结合活性检测结果; D: 各组合分子与小鼠 IgG3 结合活性检测结果

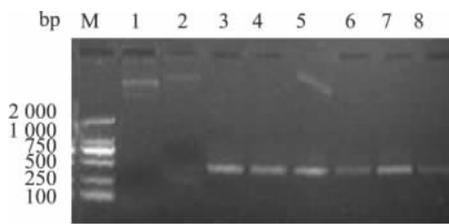


图3 琼脂糖凝胶电泳图

M: DNA Marker (DL2 000); 1: PET32a 酶切前; 2: PET32a 酶切后; 3: D-D PCR 产物纯化后酶切前; 4: D-D PCR 产物纯化后酶切后; 5: A-C PCR 产物纯化后酶切前; 6: A-C PCR 产物纯化后酶切后; 7: D-C PCR 产物纯化后酶切前; 8: D-C PCR 产物纯化后酶切后

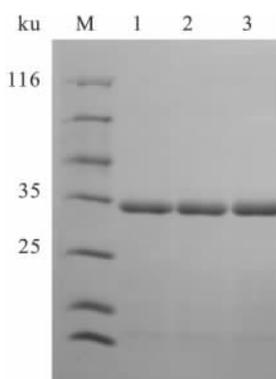


图4 融合表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

M: Marker; 1: PET32a-AC 蛋白; 2: PET32a-DD 蛋白; 3: PET32a-DC 蛋白

ELISA 法结果如图 5 所示,从图中可知:① 人 IgG、小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 与 HRP-SpA 结合活性都很强;② 5 组均值两两比较均有差异,其中人 IgG

与 HRP-SpA、HRP-DD、HRP-AC、HRP-DC 4 种酶标蛋白的结合活性最强,其次依次是小鼠 IgG3、IgG2a、IgG2b 和 IgG1。

### 3 讨论

噬菌体展示技术是 1985 年首次由 Smith 建立起来的一种新的生物技术<sup>[16]</sup> 将外源多肽基因插入噬菌体外壳蛋白 P III 基因中,外源多肽可展示于噬菌体表面,并能够保持相对独立的空间构像和原有的生物活性<sup>[17]</sup>。本实验采用不同亚类小鼠 IgG 对 SpA、SpG 单结构域所构成的随机组合噬菌体展示文库进行体外进化亲和筛选,获得对各亚类具有结合的 NEIBMs,判断不同亚类小鼠 IgG Fc 段构像及与 SpA 或 SpG 的结合特点。

不同亚类小鼠 IgG 的筛选进化中,展示插入两个结构域噬菌体的比例随着筛选的进行不断增多,筛选到第 4、5 代时,文库已全部进化为两个结构域组合分子,这种变化显示文库进化筛选完全。从最终筛选达到统一小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 的第 5、4、5 和 5 代中,随机挑选 10 个单克隆进行序列测定,结果显示小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 筛选得到的具有结合优势的组分子分别是 D-D、D-D、A-C 和 D-C。噬菌体 ELISA 的结果与筛选结果是一致的,但是蛋白原核表达后经 HRP 标记后的 ELISA 结果却与筛选不完全一致:① 在噬菌体水平上,各组合分子与不同亚类小鼠 IgG 的结合活性均

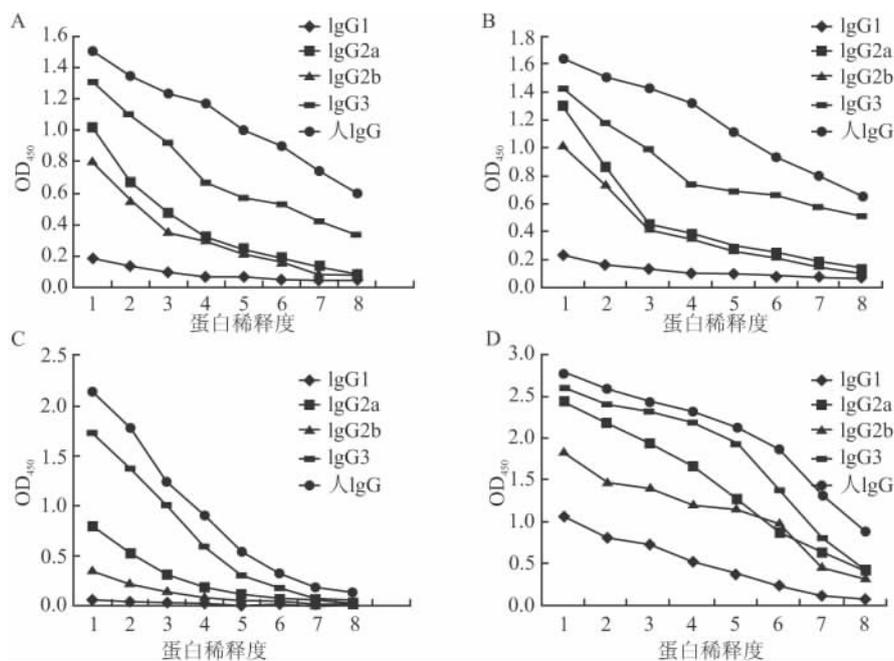


图5 ELISA法检测不同亚类小鼠IgG及人IgG与优势组合分子蛋白进行HRP标记的结合活性结果

A: HRP-DD与不同亚类小鼠IgG及人IgG结合活性检测结果;B: HRP-AC与不同亚类小鼠IgG及人IgG结合活性检测结果;C: HRP-DC与不同亚类小鼠IgG及人IgG结合活性检测结果;D: HRP-SpA与不同亚类小鼠IgG及人IgG结合活性检测结果蛋白稀释度:1:1:500;2:1:1000;3:1:2000;4:1:4000;5:1:8000;6:1:16000;7:1:32000;8:1:64000

强于SpA;②在蛋白水平上,经HRP标记后SpA与不同亚类小鼠IgG的结合活性均强于各组合分子。

上述结果的产生可能是因为:①在噬菌体水平上,SpA由于分子量较大未被充分展示而被筛选的优势组合分子因分子量小被充分展示;②对蛋白进行HRP标记时,是被标蛋白的氨基与HRP表面的糖分子氧化生成醛基相结合,这个过程对目的蛋白分子的构象和功能有影响,SpA由于蛋白分子量大虽被破坏但影响较小,而被筛选的组合分子由于蛋白分子量小被破坏后对其蛋白的影响较大。

不同亚类小鼠IgG与经HRP标记的蛋白的结合特性与筛选结果不完全一致,但是其结合的强弱是有一致性的:不同亚类小鼠IgG与不同亚类人IgG的Fc段构象差异越小,其与HRP标记的蛋白结合越强。小鼠IgG2a、IgG3的氨基酸序列与人IgG四亚类差异最小,均与经HRP标记的蛋白结合较强,小鼠IgG2a、IgG3第308、309、436位氨基酸分别是I、Q、H,推测这些氨基酸都影响了小鼠IgG2a、IgG3的Fc构象及与SpA的结合活性,小鼠IgG3均与经HRP标记的蛋白结合能力相对IgG2a更强,可能是除结合位点外小鼠IgG3氨基酸序列与人IgG四亚类差异相对小鼠IgG2a小;小鼠IgG2b与SpA

结合位点的氨基酸序列与人IgG四亚类差异次之,与经HRP标记的蛋白结合活性也次之,小鼠IgG2a第308、309、433、435位分别是I、Q、K、Y,推测这些氨基酸虽都影响了小鼠IgG2b的Fc构象及与SpA的结合活性,但其中K、Y对其影响较大;小鼠IgG1与SpA结合位点的氨基酸序列与人IgG四亚类差异最大,与经HRP标记的所有蛋白结合最弱,小鼠IgG1第252、254、308、309、436位分别是T、T、I、M、H,推测这些氨基酸虽都影响了小鼠IgG1的Fc构象及与SpA的结合活性,但可能T和M对其影响较大。

本研究中,采用ELISA法鉴定经过HRP标记的优势组合分子蛋白与不同亚类小鼠IgG的结合活性时加入总人IgG作为对照,因人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4与SpA结合位点的氨基酸序列除IgG2第309位是V,IgG3第435、436位分别是R、F外,其余结合位点均相同,所以在这里选用总人IgG作为对照。

本研究以4种不同亚类小鼠IgG为诱饵对SpA和SpG单结构域构成的随机组合噬菌体展示文库的体外进化亲和筛选,得到了天然SpA、SpG分子中不存在的具有较强结合活性的,且分别与小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3具有不同结合优势的新

型组合分子 D-D、D-D、A-C 和 D-C, 这些 NEIBMs 为进一步研究 IgG Fc 段构像及与 SpA 的结合特点提供新的参考分子。

### 参考文献

- [1] Kumar A, Tassopoulos A M, Li Q, et al. *Staphylococcus aureus* protein A induced inflammatory response in human corneal epithelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354(4): 955–61.
- [2] Nomellini J F, Duncan G, Dorociuz I R, et al. S-Layer-mediated display of the immunoglobulin G-binding domain of streptococcal protein G on the surface of *Caulobacter crescentus*: development of an immunoactive reagent[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(10): 3245–53.
- [3] Goward C R, Scawen M D, Murphy J P, et al. Molecular evolution of bacterial cell-surface proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 1993, 18(4): 136–40.
- [4] Ramsland P A, Willoughby N, Trist H M, et al. Structural basis for evasion of IgA immunity by *Staphylococcus aureus* revealed in the complex of SSL7 with Fc of human IgA1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(38): 15051–6.
- [5] Hober S, Nord K, Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 848(1): 40–7.
- [6] Yang H, Cao J, Li L Q, 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.
- [7] Zhou J, Liao Y X, Chen Z, et al. Development of a SPA-ELISA method for detecting anti-coronavirus IgG antibodies in serum samples from fulvous fruit bats[J]. *J South Med Univ*, 2008, 28(5): 736–8.
- [8] Hober S, Nord K, Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 848(1): 40–7.
- [9] Dickson C. Protein techniques: immunoprecipitation, *in vitro* kinase assays, and Western blotting[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 461: 735–44.
- [10] Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 424: 349–64.
- [11] Yang H, Cao J, Li L Q, 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(1): 137.
- [12] Jiang S H, Wang J F, Xu R, 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(8): 423–31.
- [13] Cao J, Chen Q L, Zhang H Q, et al. Novel evolved immunoglobulin (Ig) – binding molecules enhance the detection of IgM against hepatitis C virus[J]. *PLoS One*, 2011, 6(4): e18477.
- [14] 吴莉莉, 祁培培, 章萍萍, 等. 人和羊 IgG 对噬菌体展示细菌免疫球蛋白结合分子单结构域随机组合文库的体外进化筛选[J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(8): 867–72.
- [15] 祁培培, 丁莹莹, 吴莉莉, 等. 人 IgG 四亚类对噬菌体展示 Ig 结合蛋白单结构域随机组合文库的体外进化筛选[J]. *生物工程学报* 2012, 28(9): 1093–105.
- [16] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985, 228(4705): 1315–7.
- [17] Tikunova N V, Morozova V V. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection[J]. *Acta Naturae*, 2009, 1(3): 20–8.

## ***In vitro* evolutionary selection of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged various binding domains of SpA and SpG with four mouse IgG subclasses**

Xu Wenzhu<sup>1</sup>, Ding Yingying<sup>2</sup>, Wu Lili<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Pathophysiology Anhui Medical University Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Pathogen Biology, The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

**Abstract Objective** In order to study the different subclasses of mouse IgG Fc and the binding properties with the SpA or SpG, the *in vitro* molecular evolution of the library was conducted with four mouse IgG subclasses as the baits, respectively. **Methods** The *in vitro* molecular evolution of the library by four mouse IgG subclasses respectively were used to generate novel evolved immunoglobulin binding molecules (NEIBMs) with special binding advantages. The binding activity of the NEIBMs with the four mouse IgG subclasses were compared by phage ELISA.

## 9.4 T 磁共振弥散张量纤维束成像对 SD 大鼠 C6 胶质瘤模型肿瘤生长特点随时间变化的影像学分析

马璐, 余永强

**摘要** 目的 探讨 9.4 T 磁共振弥散张量纤维束成像 (DTT) 对 SD 大鼠 C6 胶质瘤模型皮质纤维束 (CST) 随着肿瘤发展所致的一系列影像学变化, 并通过相关病理检验验证影像诊断中的意义。方法 ① 使用立体定向法对 20 只成年雄性的 SD 大鼠的右脑尾状核注入体积为 10  $\mu$ l 含  $10^6$  个的 C6 胶质瘤细胞悬浮液。② 运用 9.4 T 行常规磁共振 (MRI)、弥散张量成像 (DTI) 和 DTT 检查后, 运用 Function tool 软件处理, 得到各向异性分数图 [纤维束重组成像 (FA)] 图和方向编码彩色图及双侧 CST 3D 纤维束重建图。对肿瘤病灶区域及肿瘤周边水肿区及正常白质区进行 FA 值及平均弥散系数 (MD) 值测量, 进行 FA 图像信号强度及对比度的分析, 并且观察分析不同时期的 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤对皮质脊髓束解剖关系的影响, 然后行 HE 染色进行病理证实。结果 所有 SD 大鼠 C6 脑胶质瘤模型均完成 3D 纤维束 FA 图像重建。测量的 FA 值在 3 个区域比较差异 (肿瘤实质区、周围水肿带、正常脑白质区) 均有统计学意义

( $P < 0.05$ )。水肿带和肿瘤实质区测量的 FA 值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。而 3 个部位的测量的 MD 值差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。DTT 显示随着时间的推移, 脊髓纤维束容易受到脑肿瘤占位、浸润、瘤周水肿带等的影响, 纤维束可出现破坏和移位。结论 9.4 T 磁共振 DTT 能对不同时期 SD 大鼠 C6 胶质瘤模型做出直观观察, 能较好显示皮质纤维束解剖关系的改变, 病理上的改变也证实影像上的分析。

**关键词** 9.4 T 磁共振; DTT; DTI; MRI; C6 胶质瘤模型; SD 大鼠; FA 值

中图分类号 R 338; R 739.41; R 445

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1233-05

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤, 致死率高, 术后容易复发, 平均存活期仅为 9~12 个月。由于脑胶质瘤生长的显著特点是浸润性和侵袭性, 其与周围正常组织分界不清, 即使在手术显微镜下, 也难以完全切除, 根治困难, 目前随着磁共振 (magnetic resonance imaging, MRI) 技术的发展, 人们对肿瘤及其周围变化的认识尤其是肿瘤对脑白质纤维完整性影响及对瘤周浸润程度的影响更加深入, 利用 MRI 弥散张量纤维束成像序列 (diffusion tensor tractograph, DTT) 技术重建立体脑白质纤维束在影像学上的研究逐渐成为热点<sup>[1]</sup>。随着影像

2014-04-24 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 99044530); 安徽省教育厅自然科学基金 (编号: 001kj137)

作者单位: 安徽医科大学第四附属医院放射科, 合肥 230022

作者简介: 马璐, 女, 硕士研究生;

余永强, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shenyuxi@mail.hf.ah.cn

To further compare the binding activity of NEIBMs with the four mouse IgG subclasses, ELISA was conducted with HRP-labeled NEIBMs. **Results** After five, four, five and five rounds molecular evolution of the phage library directed by mouse IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3, the control phages and one inserted the library was all two inserted domains phages, suggesting that the evolution of the library was finished. Sequence analysed by the software showed that DD, DD, AC and DC were obtained by the mouse IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 respectively. The phage binding assays confirmed that the three molecules possessed binding advantages with the four mouse IgG subclasses. The results of ELISA with HRP-labeled NEIBMs were not completely consistent with the *in vitro* molecular evolution of the library by four mouse IgG subclasses, but the binding strength was consistent, all were: IgG3 > IgG2a > IgG2b > IgG1. **Conclusion** In this work, three novel evolved immunoglobulin binding molecules D-D, A-C and D-C are obtained from the *in vitro* molecular evolution of a combinatorial phage library displaying randomly-rearranged various binding domains, and they have special binding advantages with the four mouse IgG subclasses that don't exist neither in SpA nor SpG. The three molecules provide the new molecules for the purification and detection of the four mouse IgG subclasses.

**Key words** phage library; directed molecular evolution; subclass; NEIBM