

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.15.005

模拟表位结合夹心化学发光法检测抗 A 和抗 B 效价 *

周水梅¹ 沈长新^{1,2} 宋晶晶¹ 王 娇¹ 林晨瑶¹ 黄 爽¹ 贺学宇^{3Δ}

(1 武汉大学中南医院基因诊断中心 湖北 武汉 430071; 2 武汉大学中南医院输血科 湖北 武汉 430071;

3 武汉大学中南医院肝胆研究院 湖北 武汉 430071)

摘要 目的:获得 A/B 血型抗原的模拟多肽,并将其与夹心化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA)相结合,以开发更有效的方法来测量 A/B 抗体的效价。**方法:**分别用 NaM87-1F6 和 HEB-29 对噬菌体 12 肽库进行三轮淘选。对经酶联免疫吸附实验(ELISA)确定的阳性菌斑进行测序分析,根据其氨基酸组成合成模拟多肽,并通过竞争性 ELISA、凝集抑制等方法检测其抗原性。随后将获得的模拟多肽与 CLIA 结合,检测 A、B 抗体效价,制作标准曲线以及现有的微柱凝胶法(CAT)进行相关性对比。**结果:**经过三轮淘选和相关鉴定后得到 13 个与抗 A 抗体和 19 个与抗 B 抗体特异性相互作用的噬菌体克隆,其中分别有 9 个(MTRIQLRMMRLH)和 12 个(PQMSRHRMRMLP)展示相同的氨基酸序列,据此合成的多肽分别命名为 MTR 和 PQM。竞争性 ELISA 结果表明,MTR 能够特异性拮抗 A 抗体和 A 抗原的替代多肽的免疫结合;PQM 能够特异性拮抗 B 抗体和 B 抗原的替代多肽的免疫结合。凝集抑制实验表明 MTR/PQM 可以特异性抑制 A/B 型红细胞与抗 A/B 之间的相互作用。结合模拟肽的夹心 CLIA 具有较宽的线性范围(2-2048)和良好的线性相关系数(对于 A 抗体 $R^2=0.9566$,对于 B 抗体 $R^2=0.9762$)。基于 CLIA 方法和 CAT 测得的抗体滴度结果高度相关($P<0.001$)。**结论:**MTR 和 PQM 有良好的 A 或 B 抗原性,具有成为其人工替代品的潜能。模拟多肽与夹心 CLIA 相结合能够实现对 A、B 抗体滴度的定量检测,且其结果准确可靠。

关键词:噬菌体展示;A、B 抗体;化学发光;血型 A、B 抗原

中图分类号:R-33;R446.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)15-2822-07

Development of Mimotopes Combined with Sandwich Chemiluminescence Immunoassay for the Determination of Anti-A and Anti-B Titers*

ZHOU Shui-mei¹, SHEN Chang-xin^{1,2}, SONG Jing-jing¹, WANG Jiao¹, LIN Chen-yao¹, HUANG Shuang¹, HE Xue-yu^{3Δ}

(1 Genetic Diagnosis Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430071, China;

2 Department of Blood Transfusion, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430071, China;

3 Institute of Hepatobiliary, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430071, China)

ABSTRACT Objective: The aim of this study was to acquire the mimic peptides of A/B antigen and combined it with sandwich chemiluminescence immunoassay (CLIA) to develop more effective way to measure the titer of A/B antibody. **Methods:** Three-round of biopanning was performed on the phage 12 peptide library with NaM87-1F6 and HEB-29 as targets, respectively. Positive plaques determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were then sequenced, and the mimetic peptides were synthesized according to their amino acid sequences. Competitive ELISA and agglutination inhibition were carried out to confirm the interaction between anti-A/B and the synthesized peptides. The mimetic peptides was then combined with CLIA to detect A and B antibody titers. Standard curves were prepared and the results obtained by the method based on CLIA and the micro-column agglutination technique (CAT) method were compared and the correlation between them was analyzed. **Results:** After three rounds of panning and related identification, 13 and 19 phage clones that specifically interacted with anti-A and anti-B antibodies were obtained, of which 9(MTRIQLRMMRLH) and 12 (PQMSRHRMRMLP) showed the same amino acid sequences, respectively. The synthesized peptides were named MTR and PQM, respectively. The results of competitive ELISA indicated that MTR can specifically antagonize the binding of anti-A and the replacement polypeptide of the A antigen; PQM can specifically antagonize the immunological binding of anti-B and the replacement polypeptide of the B antigen. Agglutination inhibition experiments showed that MTR/PQM could specifically inhibit the interaction between group A/B red blood cells and anti-A/B. The synthesized peptides combined with CLIA method proposed here had a broad linear range (2-2048) and a good linear correlation coefficient (for A antibody $R^2=0.9566$, for B antibody $R^2=0.9762$). The results obtained by the method based on CLIA were highly correlated with the results obtained by the CAT method ($P<0.001$). **Conclusion:** MTR and PQM have good A or B antigenicity

* 基金项目:湖北省卫生计生委采供血专项基金项目(WJ2015CB005)

作者简介:周水梅(1991-),硕士研究生,主要研究方向:血型免疫,电话:15927458562, E-mail: zsm201106@163.com

Δ 通讯作者:贺学宇,硕士,主管护师,主要研究方向:血型免疫, E-mail: 1097422706@qq.com

(收稿日期:2018-12-07 接受日期:2018-12-28)

and have the potential to be the artificial replacements of them. The method based on the combination of mimic peptides and the CLIA can quantitatively detect the titer of A and B antibodies, and the results are accurate and reliable.

Key words: Phage display; A, B antibody; Chemiluminescence; Blood group A,B antigen

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R446.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)15-2822-07

前言

ABO 新生儿溶血病 (ABO hemolytic disease of the newborns, ABO HDN) 是中国新生儿的常见疾病。一项荟萃分析表明,母体 IgG 抗 A/B 滴度是预测 ABO HDN 发病风险的重要因素^[1]。目前,常用的抗 A/B 滴度测定方法是微柱凝胶法 (Column agglutination technique, CAT), 但对结果的主观解释可能导致显着的观察者间变异和实验室内变异^[2]。除了 CAT 之外, 试管法, 酶联免疫吸附测定 (ELISA), 流式细胞术等也用于测定抗 A/B 水平^[3]。然而, 试管法难以自动化和标准化^[3]; ELISA 方法耗时且重复性差; 流式细胞术对于检测血型抗体是高度准确和可重复的, 但由于红细胞的组成复杂, 在测定中易受其他血清抗体的影响^[4]。因此, 建立一种可重复的自动化方法来检测抗 A/B 效价是十分必要的。本研究拟通过噬菌体展示技术获得 A/B 抗原的模拟多肽, 并将其与夹心化学发光免疫分析 (chemiluminescence immunoassay, CLIA) 相结合, 以开发一种更有效的测量 A/B 抗体效价的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

抗 A 单克隆抗体 NaM87-1F6, 抗 B 单克隆抗体 HEB-29, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的噬菌体 M13 抗体, 抗人 IgG 抗体以及 Ph.D.-12 噬菌体展示肽库分别源于美国 BD 公司, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司, 美国 GE Healthcare 公司, 美国 Ray-Biotech 公司和美国 NEB 公司; ELISA 试剂盒购自德国 EUROIMMUN 公司; 抗人球蛋白微柱凝胶卡 (Coombs 卡) 购自 DiaMed AG 公司。其他试剂购自国药集团。

收集武汉大学中南医院 2016 年 9 月至 2017 年 11 月接受产前抗 A/B IgG 滴度检测的 100 例排除溶血、脂血的 O 型血孕妇 (经过血清学检测证实, 这些孕妇体内含有抗 A/B) 的血清样本, 储存于 -20 °C 直至使用。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体展示 Ph.D.-12 肽库的生物淘选 分别以 NaM87-1F6 (BD Biosciences, United States) 和 HEB-29 (SIGMA-ALDRICH, USA) 作为 A 抗原和 B 抗原的靶分子包被微孔板 (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)。将微孔板置于湿润的容器中并在 4 °C 下轻轻摇动过夜。次日, 加入封闭缓冲液, 在 4 °C 下封闭 1 h。用 TBST 快速冲洗每个孔 6 次, 然后, 向每个孔中加入 100 μL 用 TBST 稀释的噬菌体原始文库或前一轮获得的噬菌体。在室温下轻轻摇晃孵育 1 h。用 TBST 洗板 10 次之后加入洗脱缓冲液 (0.2 M 甘氨酸-HCl, pH 2.2) 轻轻摇晃孵育 10 min。接着将洗脱液转入 EP 管中并用 Tris 盐酸中和。根据试剂盒说明书扩增和滴定洗脱液。

总共进行 3 轮淘选, 其中包被单抗的总量从第 1 轮至第 3

轮分别为 10 μg, 7.5 μg, 5 μg; 第 1 轮淘选时 TBST 洗涤缓冲液内所含 Tween-20 的浓度是 0.1 %, 后两轮是 0.5 %; 在第 1 轮淘选中, 噬菌体和包被的抗体的孵育时间为 1 h, 其余两轮为 30 min。三轮淘选中所用的封闭剂分别是牛血清白蛋白、明胶和脱脂奶粉。在每轮淘选中留一个未包被抗体的孔作为阴性对照。

1.2.2 选择和扩增阳性噬菌体克隆 在第 3 轮生物淘选后, 分别从滴定板中随机选择靶向每种抗体的 35 个阳性克隆, 并将它们在大肠杆菌 ER2738 中单独扩增。

1.2.3 ELISA 检测阳性噬菌体克隆 用扩增后的噬菌体上清液包被 ELISA 板, 并用含 1 % BSA 的 TBS 进行封闭。向每个孔加入 100 μL 含抗 A 或抗 B 的血清试剂, 并在 37 °C 孵育 1 h。用含 0.5 % Tween-20 的 TBST 洗涤板 6 次, 并向每个孔中加入 HRP 标记的抗人 IgG 抗体, 37 °C 震荡反应 1 h。将板用含 0.5 % Tween-20 的 TBST 洗涤 6 次, 然后向每个孔中加入四甲基联苯胺 (TMB), 37 °C 避光孵育 10 min。加入 H₂SO₄ 溶液终止反应, 用分光光度计检测每个孔在 A450 处的吸光度。用 TBS 包被的孔作空白对照, 用原始噬菌体文库包被的孔作阴性对照。实验重复三次, 取三者平均值进行统计学分析。

1.2.4 DNA 测序以及多肽合成 判定为阳性的噬菌体被扩增。离心取上清液, 加入 PEG/NaCl 孵育使噬菌体 DNA 析出, 经碘化物缓冲液再次溶解, 最后用乙醇二次沉淀并离心弃上清。沉淀物干燥后溶于 30 μL TE 缓冲液内贮存。移取 5 μL 上述模板悬液, 标记克隆序号, 并将其送至上海生工公司完成测序工作。测序引物为 5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'。根据测序结果推导出模拟多肽的氨基酸序列, 然后由 Shine-Gene 公司 (中国上海) 合成多肽用于进一步研究。

1.2.5 竞争性 ELISA 检测合成多肽 竞争性 ELISA 的操作过程与噬菌体 ELISA 基本类似, 除了将所选噬菌体克隆的扩增悬浮液加到对应单抗包被的微孔中, 并在每个孔中加入浓度逐渐降低的合成肽。用 HRP 标记的 M13 抗噬菌体抗体和底物 H₂O₂、TMB 作为检测固化合肽的显示剂。用原始肽库替换合成肽作阴性对照。每个孔设置两个副孔。

1.2.6 红细胞凝集抑制实验 通过盐水倍比稀释法测定抗 A 和抗 B 单克隆抗体的滴度。将按照此效价稀释好的 30 μL 抗体和 30 μL 合成肽混合均匀并于 37 °C 孵育 30 min。加入 30 μL 洗涤 A 型或 B 型红细胞, 37 °C 孵育 1 h。用 0.9 % 生理盐水洗涤 3 次后移入 Coombs 卡中, 900× g 离心 10 min。用盐水, 单克隆抗体和红细胞进行的红细胞凝集抑制试验作为空白对照, 用原始噬菌体文库 (30 μL/柱), 单克隆抗体和红细胞进行的红细胞凝集抑制试验作为阴性对照。

1.2.7 化学发光免疫分析 用模拟多肽肽包被磁珠以捕获 A、B 抗体。然后将模拟多肽包被的磁珠, 生物素化的抗人 IgG 抗体和吖啶酯标记的链霉亲和素加入反应杯。最后加入预激发液 H₂O₂ (pH<2.0) 和激发液 NaOH (pH>13.0), 并用 UMIC 制造的

全自动化学发光免疫分析仪检测其化学发光值。

1.2.8 微柱凝胶法 取 11 支试管依次标记序号备用。第 1 支试管内加入 100 μL 血清和 100 μL 可以灭活 IgM 的二硫苏糖醇 (DTT), 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 分钟。剩余 10 支试管分别加入 100 μL 0.9% 生理盐水。孵育完成后取 100 μL 第 1 支试管内的混合物转移到第 2 支试管并混合均匀。之后取 100 μL 第 2 支试管内的混合物转移到第 3 支试管并混合均匀。依此类推以制备一系列倍比稀释液。

将 50 μL 0.8% A/B 组红细胞悬浮液和 25 μL 稀释的血清加入到 Coombs 卡的各微柱 (根据试管标记) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 后 85 $\times$ g 离心 10 min。由两名医疗技术人员读取结果。滴度为最高稀释度的倒数。

1.2.9 标准曲线 在由 CAT 确认的已知抗体滴度为 2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024 和 2048 的 11 个标准点各进行三次实验, 取均值后绘制成 CLIA 的标准曲线。对临床样本的

检测中, 用全自动化学发光免疫分析仪测定每孔的化学发光值, 再依据该标准曲线计算得到待测样品的抗体滴度。

1.3 统计分析

采用 SPSS 21.0 和 GRAPHPAD PRISM 5.0 进行数据处理和统计学分析。每个组别噬菌体滴度以及每孔 OD 值的差别用单因素方差分析判定。CLIA 和 CAT 抗体滴度之间的相关性用线性回归和 Pearson 相关两种方法判定。 $P < 0.05$ 被认为差别具备统计学意义。

2 结果

2.1 特异性噬菌体淘选的富集率

测定各轮淘选前后的滴度, 从而获得富集率 (产出 / 投入值)。在本实验中, 富集率 (产出 / 投入值) 呈逐渐增加的趋势 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 噬菌体的三轮生物筛选

Table 1 Enrichment of phage for three rounds of biopanning

Cycle	Antibody ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration of Tween 20 (v/v)	Input (pfu/mL)	Output (pfu/mL)		Recovery (output/input)	
				A mimic peptide	B mimic peptide	A mimic peptide	B mimic peptide
I	100	0.1	1.0×10^{11}	4.0×10^2	6.0×10^2	4.0×10^{-9}	6.0×10^{-9}
II	75	0.5	1.0×10^{11}	7.5×10^4	2.7×10^3	7.5×10^{-7}	2.7×10^{-8}
III	50	0.5	1.0×10^{11}	1.6×10^5	1.0×10^5	1.6×10^{-6}	1.0×10^{-6}

Note: Pfu: plaque-forming unit.

2.2 噬菌体克隆与对应单抗的亲合力

使用 ELISA 方法来评估三轮淘选的噬菌体洗脱物与对应抗体之间的结合能力。结果表明, 扩增的洗脱物对对应单抗的

亲合力在每轮淘选后均逐渐增加, 且明显高于原始肽库的噬菌体对抗 A/B 的亲合力 (图 1)。

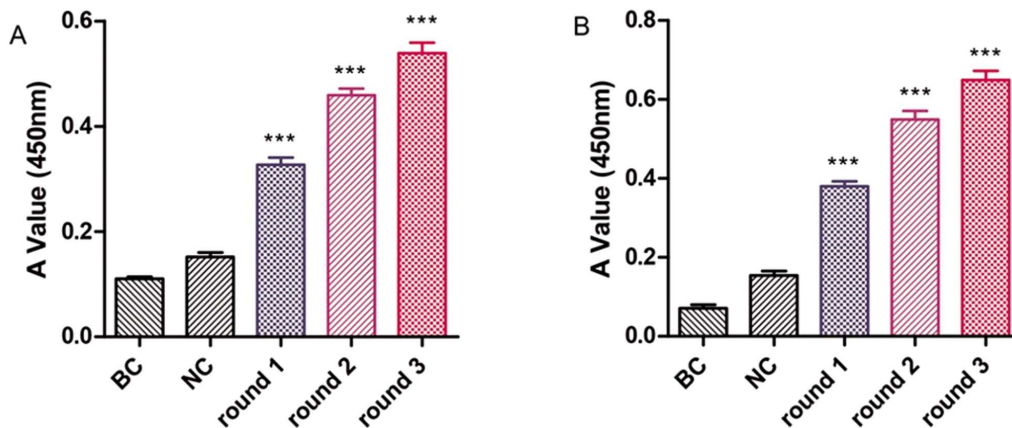


图 1 扩增洗脱液与抗 A(A) 或抗 B(B) 的亲合力

Fig.1 Affinity of amplification eluate with anti-A or anti-B antibodies

Note: Abbreviations: BC: blank control; NC: negative control. ***: $P < 0.001$. (A) A antigen mimic peptides, (B) B antigen mimic peptides.

在三轮淘洗后, 从滴度测定板中分别随机挑选 35 个蓝色噬菌斑进行扩增。扩增后的噬菌体克隆溶于 TBS 中作为被检试剂, 用 ELISA 法判定其与对应单抗的亲合力。结果显示, 分别有 13 个和 19 个噬菌体克隆对抗 A 和抗 B 抗体显示出高亲合力, 且其 A450 吸光度值高过阴性对照 3 倍, 从而被认为是阳性噬菌体克隆, 阳性率分别为 37.14% 和 54.29% (图 2)。

2.3 测序结果

对阳性噬菌体克隆的 ssDNA 进行测序, 结果表明, 分别有 9 个 (分别为 A2, 8, 13, 22, 26, 27, 29, 30, 31) 和 12 个 (分别为 B4, 6, 9, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 28, 30, 35) 阳性噬菌体克隆呈现相同的 DNA 序列, 推导出相应的氨基酸序列为 MTRIQLR-MMRLH 和 PQMSRHRMRMLP (表 2)。其中 A2 和 B4 的序列图如图 3 所示。将 MTRIQLRMMRLH 和 PQMSRHRMRMLP 送至上海生工公司合成多肽, 分别命名为 MTR 和 PQM。

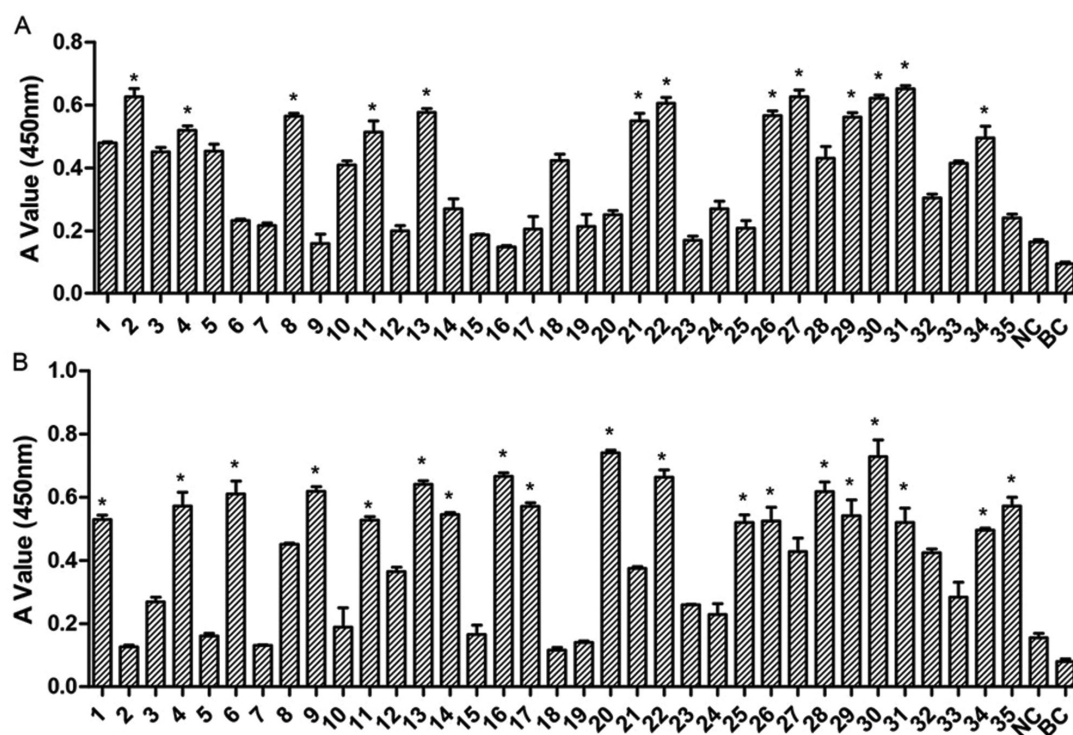


图 2 阳性噬菌体的 ELISA 测定结果

Fig.2 Binding of monoclonal antibody to selected phage clones

Note: 1-35 given on the x-axis mean thirty-five phage clones. *: positive phage (A) 2, 4, 8, 11, 13, 21, 22, 26, 27, 29, 30, 31, 34 clone were defined as positive clones of A mimic peptide. (B) 1, 4, 6, 9, 11, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 34, 35 were defined as positive clones of B mimic peptide

表 2 展示肽的氨基酸序列和频率

Table 2 Sequences and frequency of displayed peptides

Mimic antigen	Clone number	Sequence	Frequency
A	A4	TRRRRSTHSLRM	1
	A11	QSLLRINLPRRP	1
	A21	SSHRPRLRLKLM	1
	A34	RTNIRHTPRNHK	1
	A2, 8, 13, 22, 26, 27, 29, 30, 31	MTRIQLRMMRLH	9
B	B1	RNNPMHTIHKQR	1
	B11	RPSTIIQRKTMR	1
	B31	LKIKIRTMPHKM	1
	B25, 29	NPLSHRQSIPMS	2
	B26, 34	IPKSSMRSPRMT	2
	B4, 6, 9, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 28, 30, 35.	PQMSRHRMRMLP	12

2.4 合成多肽与天然 A,B 抗原具有相同的抗原性

竞争性 ELISA 分析表明,随着合成多肽含量的增加,该合成多肽对其相应的阳性噬菌体克隆与对应单克隆抗体(mAb)之间的抑制能力急剧增加(图 4)。

2.5 合成抗原能够抑制红细胞与对应抗体的结合

红细胞凝集抑制实验表明,MTR 能够抑制抗 A 与 A 型红细胞的凝集作用,不抑制抗 B 与 B 型红细胞的反应,也不影响 O 型红细胞与抗 H 的作用。PQM 仅能抑制 B 型红细胞和抗 B

抗体之间的凝集作用,而对其他血型的红细胞和对应抗体之间的反应没有影响(图 5)。

2.6 化学发光方法

绘制标准曲线时取的 11 个参考点滴度分别为 2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024 和 2048。检测到的化学发光强度与抗 A、抗 B 抗体滴度在 2~2048 范围内成正比。对于 A 抗体,标准曲线为 $y=0.0453 \times \log_2(x) + 0.5675$, $R^2=0.9566$; 对于 B 抗体,标准曲线为 $y=0.0447 \times \log_2(x) + 0.6189$, $R^2=0.9762$ (图 6 A、B)。

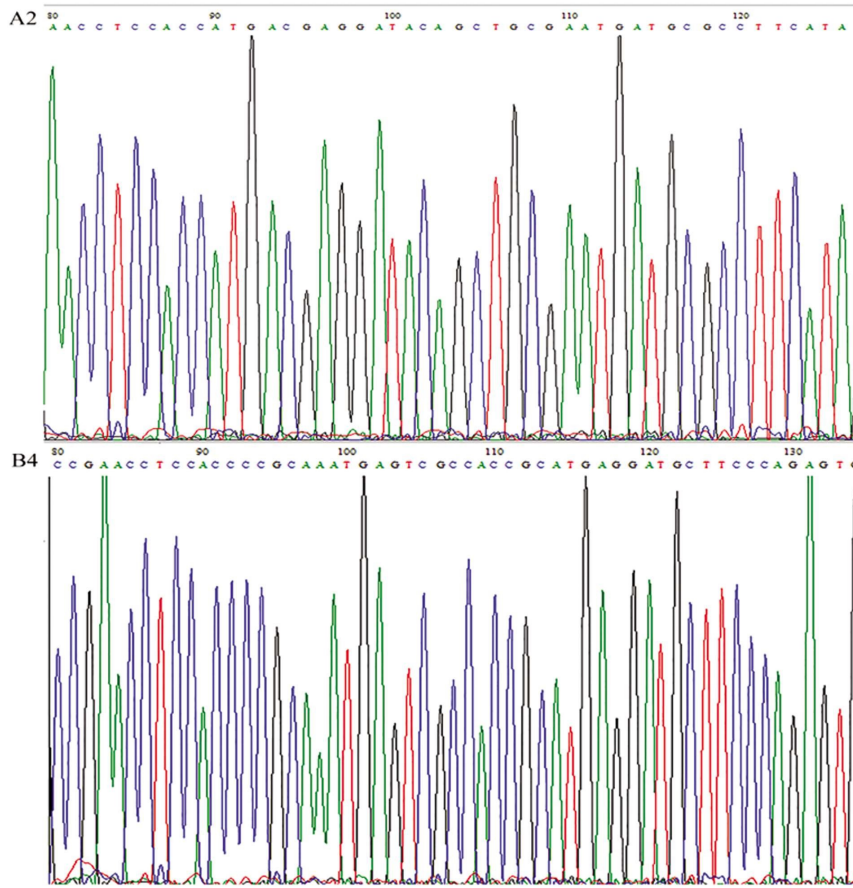


图3 阳性噬菌体克隆的DNA序列图

Fig. 3 DNA sequence map of positive phage clone

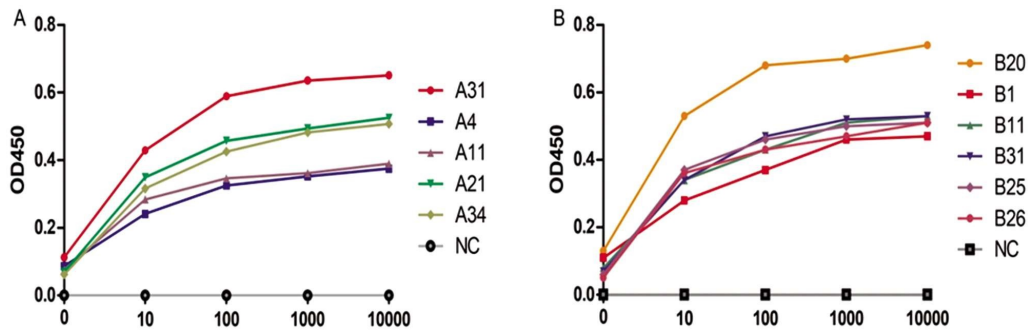


图4 竞争性ELISA检测结果

Fig.4 The results of Competitive ELISA test results

Note: The x-axis represents the dilution ratio of synthetic peptide with the original concentration 0.5 g/L. (A) The sequence of synthetic peptide is MTR. It was shown that A31 as the representative of phages with the same sequence of MTR has the highest affinity; (B) The sequence of synthetic peptide is PQM. It was shown that B20 as the representative of phages with the same sequence of PQM has the highest affinity.

2.7 CLIA 与 CAT 结果的相关性

基于 CLIA 的方法与 CAT 方法的结果呈高度相关(图 6 C)。对于 A 抗体 $r=0.889, P<0.001$, 回归方程为 $\log_2(\text{CLIA 效价}) = 0.9665 \times \log_2(\text{CAT 效价}) + 0.4332, R^2=0.9261$; 对于 B 抗体 $r=0.944, P<0.001$, 回归方程为 $\log_2(\text{CLIA 效价}) = 0.9521 \times \log_2(\text{CAT 效价}) + 0.6973, R^2=0.9302$ 。

3 讨论

抗 A/B 滴度的测定可以提供血清中存在的抗体相对量的信息, 这些信息在 ABO 新生儿溶血病和 ABO 不相容的骨髓

和实体器官移植等情况下是非常重要的^[3]。HDN 是由母体和胎儿之间的血型不相容引起的同种免疫疾病, 其中新生儿的红细胞被母体抗体破坏。它由母体 IgG 抗 A 或抗 B 诱导, 并且几乎仅在 O 型血母亲的 A 或 B 型血婴儿中发现。绝大多数的 ABO HDN 严重程度较低, 可用光疗法治疗^[5]。然而, 严重的 ABO HDN 可能导致胆红素脑病, 从而影响婴儿的智力发育。由于母体 IgG 抗 A/B 水平与 ABO HDN 的发病风险显著相关^[1], 因此, 需要一种令人满意的化方法来检测那些丈夫属于非 O 型血的 O 型血孕妇的母体 IgG 抗 A/B 水平。但目前的方法存在一些局限性, 例如重复性差, 自动化和标准化困难等。在这项

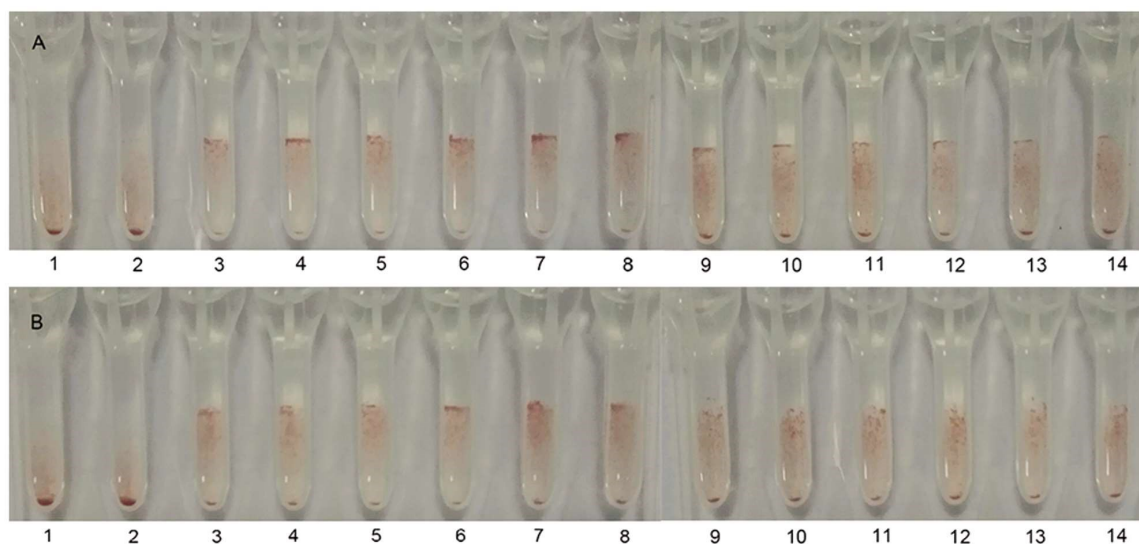


图5 合成抗原可特异性抑制对应抗体诱导的血凝反应

Fig.5 The synthetic antigen materials inhibited the hemagglutination of erythrocytes induced by the corresponding antibody

(A) Peptide MTR inhibited the bonding between group A erythrocyte and anti-A. Microcolumns labeled 1-6 were the reaction system based on anti-A, group A erythrocyte and inhibitor (named as A type reaction system): labeled 1, 2 with the peptide MTR, labeled 3, 4 with original phage library used as negative control, labeled 5, 6 with the same amount of saline as blank control. Microcolumns labeled 7-10 were the B type reaction system: labeled 7, 8 with MTR, labeled 9, 10 with saline. Microcolumns labeled 11-14 were the O type reaction system: labeled 11, 12 with MTR, labeled 13, 14 with saline. (B) Peptide PQM inhibited the bonding between group B erythrocyte and anti-B. Microcolumns labeled 1-6 were the B type reaction system: labeled 1, 2 with PQM, labeled 3, 4 with original phage library, labeled 5, 6 with saline. Microcolumns labeled 7-10 were the A type reaction system: labeled 7, 8 with PQM, labeled 9, 10 with saline. Microcolumns labeled 11-14 were the O type reaction system: labeled 11, 12 with PQM, labeled 13, 14 with saline.

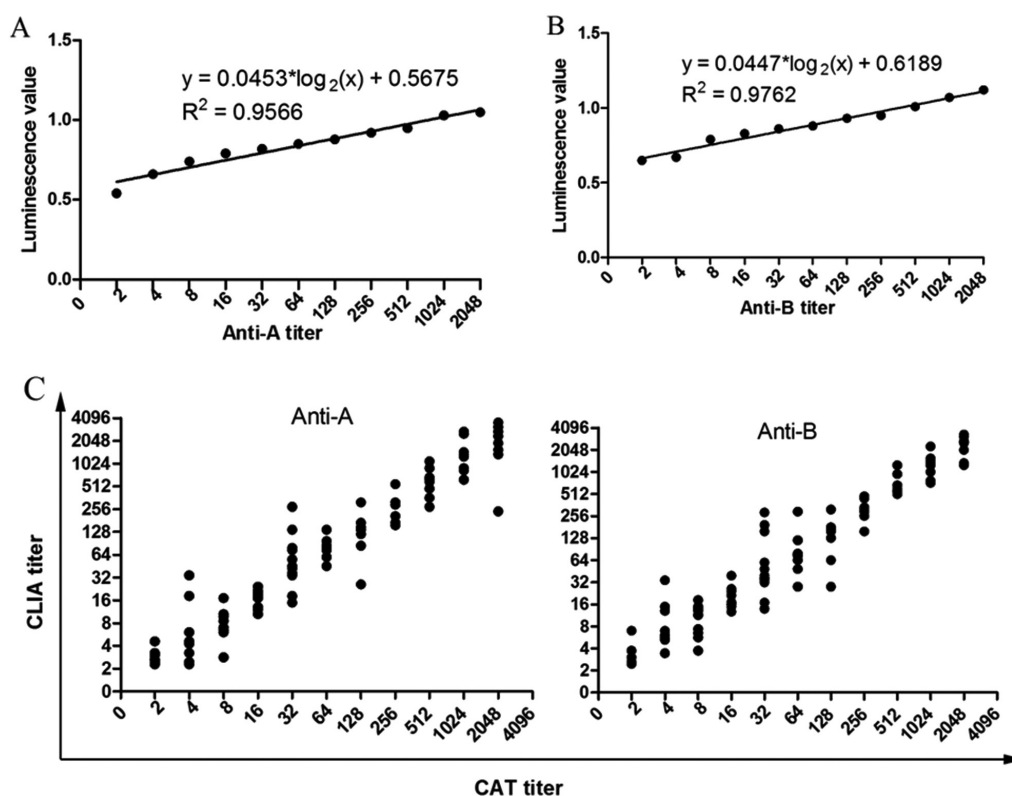


图6 CLIA 的标准曲线(A、B)及与 CAT 的相关性分析(C)

Fig.6 The performance of the proposed CLIA assay

(A) Standard curve of the proposed CLIA assay for anti-A. (B) Standard curve of the proposed CLIA assay for anti-B. (C) Correlation of the results between CLIA and CAT.

研究中,我们将通过噬菌体展示技术获得的 A/B 血型抗原的模拟肽与 CLIA 相结合,开发出一种测定抗 A/B 滴度的新方法。

天然血型 A/B 抗原在确定抗 A/B 水平中起到重要的作

用,但它们是由难以合成且成本非常高的低聚糖组成的^[6]。由于肽更便宜且更容易合成,因此作为抗原模拟物的特定肽可以为天然抗原提供有效的替代品。噬菌体展示是一种被广泛使用的

体外选择技术,具有高度的灵活性,可在噬菌体表面展示外源蛋白质或多肽^[6-8]。自该技术发展以来,其在医学领域已取得了众多成就^[9-13]。在噬菌体展示中,通过将外源性随机 DNA 融合到噬菌体基因组中,可由此编码的变体肽呈现于噬菌体颗粒的表层^[14]。根据相关文献报道,具有明确表位的单克隆抗体可以为研究蛋白质结构提供强有力的工具,并且已被广泛用于诊断和治疗各种疾病^[15,16]。本研究采用噬菌体展示的技术,分别以 NaM87-1F6 和 HEB-29 为靶分子对噬菌体 12 肽库进行淘选,以获得 A/B 血型抗原的模拟肽。

噬菌体的产出/投入值是监测淘选是否成功的有用指标,随着淘选次数的增加,该值应逐渐增加^[17-19]。在我们的研究中,经过三轮淘选后,产出/投入值分别从第一轮 的 4.0×10^{-9} 和 6.0×10^{-9} 增加到 1.6×10^{-6} 和 1.0×10^{-6} , 该数据表明我们成功地淘选到了对靶标具有高亲和性的噬菌体。但生物淘选过程可能存在非特异性噬菌体富集,我们通过增加 TBST 中 Tween-20 的浓度、降低相应抗体的浓度以及缩短抗体与噬菌体肽库孵育的时间的方式来降低非特异性富集,以便获得高亲和力和高特异性的阳性噬菌体。

三轮淘选后,采用 ELISA 实验我们初步鉴定出了阳性噬菌体克隆。利用竞争性 ELISA 分析相应抗体与合成多肽以及阳性噬菌体克隆三者之间的特异性相互作用,结果显示合成多肽可与阳性噬菌体竞争结合相应抗体。红细胞凝集抑制实验表明,MTR 和 PQM 分别能够抑制红细胞与抗 A 和抗 B 的结合。此外,MTR 含有 8 个极性氨基酸(T2,R3,Q5,L6,R7,R10,L11,H12);PQM 含有 7 个极性氨基酸(Q2,S4,R5,H6,R7,R9,L11)。由于极性氨基酸是亲水性的并且易于分布在抗原物质的外表区域,因此它可能参与表位的组成。由此得出,合成肽 MTR,PQM 可能分别是血型 A,B 抗原的替代品。

近年来,CLIA 已被用于多种抗原和抗体的检测,具有均匀,重复性高,动态范围宽的优点^[20]。在本研究开发的 CLIA 实验中,我们引入血型 A,B 抗原的模拟多肽 MTR 和 PQM 做为捕获试剂。所提出的基于模拟肽的 CLIA 测定的强度与 2-2048 范围内的抗 A/B 滴度成正相关。将 CAT 结果作为"金标准对照",我们提出的基于模拟肽的 CLIA 的方法测试的抗体滴度与通过常用的 CAT 方法测量的抗体水平高度相关($P < 0.001$),这表明我们的方法具有良好的可靠性。与 CAT 方法相比,我们提出的方法是可重复的和主观的,并且具有适合制造用于自动化学发光分析仪的商业试剂盒的优点。

总之,我们成功建立了一种新的检测抗 A/B 水平的方法,其使用血型 A,B 抗原的模拟肽结合 CLIA 来检测血清中的抗 A,抗 B。在新方法的开发中用模拟肽代替传统的天然血型抗原可能具有更普遍的价值。

参考文献(References)

- [1] Li P, Pang LH, Liang HF, et al. Maternal IgG Anti-A and Anti-B Titer Levels Screening in Predicting ABO Hemolytic Disease of the Newborn: A Meta-Analysis[J]. Fetal and pediatric pathology, 2015, 34(6): 341-350
- [2] Tanabe K. Interinstitutional variation in the measurement of anti-A/B antibodies: the Japanese ABO-Incompatible Transplantation Committee survey[J]. Transplantation, 2007, 84(12Suppl): S13-6
- [3] Park ES, Jo KI, Shin JW, et al. Comparison of total and IgG ABO antibody titers in healthy individuals by using tube and column agglutination techniques [J]. Annals of laboratory medicine, 2014, 34 (3): 223-229
- [4] Yung GP, Valli PV, Starke A, et al. Flow cytometric measurement of ABO antibodies in ABO-incompatible living donor kidney transplantation[J]. Transplantation, 2007, 84(12Suppl): S20-23
- [5] Metcalf RA, Khan J, Andrews J, et al. Severe ABO Hemolytic Disease of the Newborn Requiring Exchange Transfusion [J]. Journal of pediatric hematology/oncology, 2018
- [6] Tan Y, Tian T, Liu W, et al. Advance in phage display technology for bioanalysis[J]. Biotechnology journal, 2016, 11(6): 732-745
- [7] Rahbarnia L, Farajnia S, Babaei H, et al. Evolution of phage display technology: from discovery to application [J]. Journal of drug targeting, 2017, 25(3): 216-224
- [8] Frenzel A, Schirrmann T, Hust M. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy [J]. mAbs, 2016, 8(7): 1177-1194
- [9] Ammous-Boukhri N, Mosbah A, Sahli E, et al. Phage-display screening identifies LMP1-binding peptides targeting the C-terminus region of the EBV oncoprotein[J]. Peptides, 2016, 85: 73-79
- [10] Zou X, Chen C, Huang X, et al. Phage-free peptide ELISA for ochratoxin A detection based on biotinylated mimotope as a competing antigen[J]. Talanta, 2016, 146: 394-400
- [11] Guo G, Cao Y, Zhu G, et al. Screening, tandem expression and immune activity appraisal of Deinagkistrodon acutus (pit viper) venom mimotopes from a phage display 12-mer peptide library [J]. Biotechnology letters, 2016, 38(11): 1867-1873
- [12] Omidfar K, Daneshpour M. Advances in phage display technology for drug discovery[J]. Expert opinion on drug discovery, 2015, 10(6): 651-669
- [13] Yuan Q, Wu Y, Wang Y, et al. Protective efficacy of a peptide derived from a potential adhesin of Pseudomonas aeruginosa against corneal infection[J]. Experimental eye research, 2016, 143: 39-48
- [14] Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, et al. Phage display as a promising approach for vaccine development [J]. Journal of biomedical science, 2016, 23(1): 66
- [15] Larralde O, Petrik J. Phage-displayed peptides that mimic epitopes of hepatitis E virus capsid [J]. Medical microbiology and immunology, 2017, 206(4): 301-309
- [16] Wang L, Deng X, Liu H, et al. The mimic epitopes of Mycobacterium tuberculosis screened by phage display peptide library have serodiagnostic potential for tuberculosis[J]. Pathogens and disease, 2016,74(8)
- [17] Owens GP, Shearer AJ, Yu X, et al. Screening random peptide libraries with subacute sclerosing panencephalitis brain-derived recombinant antibodies identifies multiple epitopes in the C-terminal region of the measles virus nucleocapsid protein [J]. Journal of virology, 2006, 80(24): 12121-12130
- [18] Li Y, Ning YS, Wang YD, et al. Production of mouse monoclonal antibodies against Helicobacter pylori Catalase and mapping the antigenic epitope by phage display library [J]. Vaccine, 2008, 26 (9): 1263-1269
- [19] Houimel M, Dellagi K. Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity[J]. Vaccine, 2009, 27(34): 4648-4655
- [20] Chang Y, Xu J, Zhang Q. Microplate magnetic chemiluminescence immunoassay for detecting urinary survivin in bladder cancer[J]. Oncology letters, 2017, 14(4): 4043-4052