

抗微囊藻毒素单链抗体基因的构建、表达及初步鉴定^①

宋丽敏^② 张 维^{③*} 陈 明* 林 敏* 潘家荣^{③*}

(中国农业科学院农产品加工研究所 北京 100193)

(* 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘 要 利用 RT-PCR 方法从抗微囊藻毒素-LR(MC-LR)单克隆抗体的杂交瘤细胞中扩增出抗体的 V_H 和 V_L 基因,构建了抗 MC-LR 分子的单链抗体(scFv)基因。SDS-PAGE 和 Western blot 分析结果显示,该单链抗体基因在大肠杆菌 Origami 2 中特异性表达出分子量约为 30kD 的融合蛋白。通过 Ni-NTA 金属亲和层析法对可溶性表达产物进行纯化,获得的目的蛋白浓度为 0.115mg/mL。ELISA 反应结果表明该单链抗体能与 MC-LR 特异性结合。此研究为制备多价高亲和力抗 MC-LR 抗体奠定了基础。

关键词 微囊藻毒素(MC),单链抗体,原核表达,ELISA

0 引 言

微囊藻毒素(microcystins, MC)是水华发生时水体中蓝藻爆发性繁殖产生的次生代谢产物。MCs 是一个结构相似的环七肽家族,已知有 60 余种异构体,其中 MC-LR 是目前已知的毒性最强的、急性危害最大的一种淡水蓝藻毒素^[1]。它是一种肝毒素,这种毒素是肝癌的强烈促癌剂,能导致肝坏死、出血或凋亡^[2]。目前,水体中 MCs 的检测大多采用高效液相色谱(HPLC)、液相色谱/质谱(LC/MS)、气-液色谱(GC)等方法,这些方法前处理复杂,所需的仪器设备也较昂贵,因而不适合推广应用。近年来,免疫分析法以其价格低廉、灵敏度高、操作简单等众多优点,成为 MCs 检测方法的发展方向和研究热点^[3]。然而,传统的单克隆抗体的制备过程较复杂且成本较高,使其应用受到限制。目前世界范围内仅有少数几个实验室获得了微囊藻毒素的单克隆抗体^[4-6],其他很多酶联免疫吸附试验(ELISA)检测多采用多抗^[7,8]。随着生物技术的发展,重组抗体技术为抗微囊藻毒素抗体的制备提供了一条简单、经济的途径。McElhiney 等从人噬菌体库中筛选出一株抗 MC-LR 单链抗体,能够检测出低于世界卫生组织所规定饮用水标准的指导值(1 μ g/L)^[9]。将该抗体固定在亲和层析介质后用于 HPLC 检测前对水中痕迹量的 MC-LR 进行浓缩,方便了对该毒素的检测和定

量^[10]。本研究通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术从一株分泌抗微囊藻毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞中扩增出轻链可变区 V_L 及重链可变区 V_H 的基因序列,并采用重叠延伸 PCR 克隆到完整的单链抗体(scFv)基因,将携带该基因的表达载体转化大肠杆菌 Origami 2,获得的重组菌株能产生具有活性的微囊藻毒素单链抗体。本研究为制备多价高亲和力抗体奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

分泌抗微囊藻毒素(MC-LR)抗体的杂交瘤细胞株 G5 由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所提供。克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司;表达载体 pET-28a(+)和 JM109 由本实验室保存。OrigamiTM2 购自 Novagen 公司。

RNAiso Reagent、ExTaq、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;M-MLV 反转录酶、dNTPs 和 RNA 酶抑制剂购自 Promega 公司;微囊藻毒素标准品为美国 Beacon 公司产品;MC-BSA 抗原的合成由北京博奥森生物技术有限公司完成;鼠抗 His 抗体和羊抗鼠 IgG-HRP 购自天根公司;BCA 法蛋白浓度定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

① 863 计划(2006AA10Z449)资助项目。

② 女,1980 年生,博士生;研究方向:食品安全检测技术。

③ 通讯作者, E-mail: zhwmm@caas.net.cn; panjr@263.net
(收稿日期:2008-05-27)

1.2 引物

引物设计参见文献[8]中的描述,引物序列见

表 1。所有引物序列均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
IgR	5'-GCG AGC TCC GCG GCC GCG GTT TTT TTT TTT T-3'
Anchor	5'- GCG AGC TCC GCG GCC GCG-3'
HFR1	5'-SAR GTN MAG CTG SAG SAG TCW GG-3'
LFR	5'-GAY ATT GTG MTS ACM CAR WCT MCA-3'
V _H -B	5'-GGG AAT TCC ATA TGG AGG TTA AGC TGC AGG AGT C-3' (划线部分为 <i>Nde</i> I 位点)
V _H -F	5'-CCG CTA CCA CCC CCT CCA GAT CCG CCA CCT CCT GAG GAG ACG GTG ACC GT-3'
V _L -B	5'-CTG GAG GGG GTG GTA GCG GTG GAG GCG GGA GTG ATA TTG TGA TGA CAC AGT C-3'
V _L -F	5'-GGT CTC GAG TTA CCG TTT GAT TTC CAG CTT GG-3' (划线部分为 <i>Xho</i> I 位点)。

1.3 抗 MC 抗体重链和轻链部分序列的克隆及测序

从液氮罐中取出冻存的杂交瘤细胞株 G5,复苏后用含 15% 小牛血清的 RMPI-1640 培养至细胞总量为 10×10^6 , 采用 RNAiso Reagent 试剂盒提取细胞总 RNA。以总 RNA 为模板, 采用引物 IgR 进行反转录。然后以 cDNA 为模板, 分别用 HFR1, Anchor 和 LFR, Anchor 为引物扩增抗体的重链和轻链基因。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 回收目标 DNA 片段后, 连接到 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 JM109。用碱裂解法提取转化子质粒, 用酶切和 PCR 验证, 并进行 DNA 序列测定, 以确定阳性重组子中携带所克隆的目标基因。

1.4 V_H 和 V_L 的拼接及单链抗体表达载体的构建

根据测定的序列重新设计引物 V_H-B、V_H-F、V_L-B 和 V_L-F, 以上述提取的质粒为模板, 分别扩增出 V_H 和 V_L。PCR 产物经纯化后, 采用重叠延伸拼接法将 V_H 和 V_L 拼接成 scFv 基因片段。具体过程如下: 首先在没有外加引物的情况下, 将纯化的 V_H 和 V_L 混匀, PCR 反应扩增 7 个循环 (94℃ 30s, 52℃ 30s, 72℃ 1min); 然后补加 V_H-B 和 V_L-F, 在同样的反应条件下, 再扩增 30 个循环。扩增获得预期大小的 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳和胶回收后, 连接到 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切的表达载体 pET-28a (+) 上, 将构建的重组质粒转化大肠杆菌 JM109。提取的质粒经酶切和 PCR 验证, 并将筛选的阳性重组子送公司测序。

1.5 scFv 的表达及 SDS-PAGE 分析

将经测序验证无误的重组质粒转化大肠杆菌 Origami 2, 挑取单菌落于 3mL LB 液体培养基中 37℃ 培养过夜, 按 1:100 稀释到新鲜的 LB 液体培养基中, 振荡培养至培养物的 OD₆₀₀ 值达 0.4~1.0 时, 加

入终浓度为 0.1mM 的诱导剂——异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 于 15℃ 继续培养 3~4h, 进行 scFv 诱导表达。离心收集菌体, 经超声波破碎并离心后取上清进行 12% SDS-PAGE 电泳, 检测表达的蛋白条带。

1.6 scFv 的 Western blot 检测及其纯化、定量

经超声波破碎细胞后, 分离的上清液用 Ni-NTA 纯化和回收可溶性表达产物。以鼠抗 His 抗体为一抗, 羊抗鼠 IgG-HRP 为二抗, 用 TMB (四甲基联苯胺) 底物显色对表达产物进行 Western blot 检测。利用 BCA 法蛋白浓度定量试剂盒对纯化产物进行定量, 并且用 BandScan 软件计算目的蛋白纯度。

1.7 scFv 的 ELISA 反应活性测定

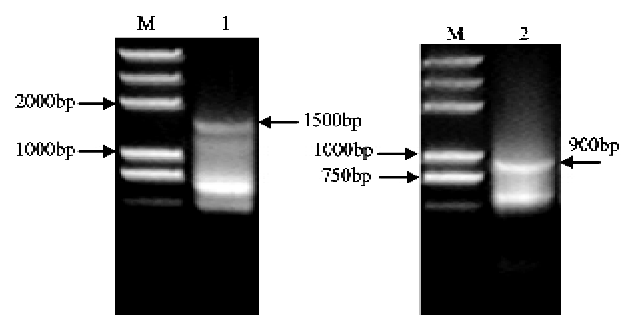
在 96 孔酶标板中, 每孔加入 100μL 0.5μg/mL 的 MC-BSA, 经 37℃ 孵育 2h, PBST 洗涤 4~6 次, 用 2% 的脱脂奶粉封闭 1h, 上述包被的酶标板经洗板后, 分别加入 100μL 倍比稀释的纯化蛋白提取液, 经 37℃ 孵育 2h, 洗板后, 加入 100μL 1:1500 稀释的鼠抗 His 抗体, 再经 37℃ 孵育 2h, 洗板后, 再加入 100μL 1:2500 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP, 37℃ 孵育 2h, 洗板后加底物 TMB 于 37℃ 显色, 用 2mol/L 的硫酸终止显色, 并在 450nm 波长下测定各孔吸光值。以转化空质粒的菌株粗提液作阴性对照, 抗 MC-LR 单克隆抗体为阳性对照。每个处理 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 抗 MC 抗体重链和轻链部分序列的克隆

从杂交瘤细胞株 G5 中提取总 RNA, 经 RT-PCR 分别扩增出大小约 1500bp 和 900bp 的片段 (图 1)。序列分析表明, 扩增的大片段 (1473bp) 为抗体重链的 DNA 序列, 包括部分重链可变区 (V_H), 完整的

CH1、CH2、CH3 三个恒定区和 3'端非编码区,其中 V_H 大小为 360bp,编码 120 个氨基酸;扩增到较小的大片段为 880bp 为轻链 DNA 序列,包括部分轻链可变区(V_L),完整的恒定区和 3'非编码区,其中 V_L 大小为 339bp,编码 113 个氨基酸。 V_H 和 V_L 符合小鼠免疫球蛋白可变区基因特征,均含有 4 个框架区(FR)、3 个抗原互补决定区(CDR)及抗体特征性的 2 个半胱氨酸残基,且基因内无终止密码子^[9],表明所克隆的序列与小鼠抗体基因序列相符。

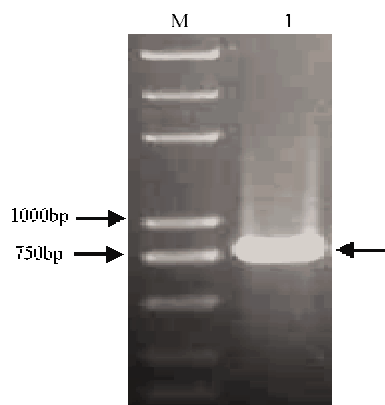


M: DL2000 plus marker; 1: 重链基因的 PCR 扩增; 2: 轻链基因的 PCR 扩增

图 1 重链和轻链基因的 PCR 扩增

2.2 V_H 和 V_L 的拼接及单链抗体表达载体的构建

通过重叠延伸拼接 V_H 和 V_L , 获得大小约为 750bp 的片段(图 2)。将该片段连接到 pET-28a(+) 表达载体,转化大肠杆菌 JM109,获得的阳性重组子命名为 pET-MC。测序结果显示,该片段全长 744bp,包括 V_H 、 V_L 和 Linker 序列($GGGGS$)₃,且阅读框架正确,为预期的 scFv 基因。



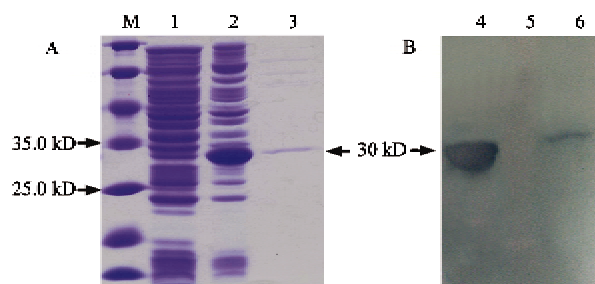
M: DL2000 plus marker; 1: V_H 和 V_L 的拼接产物

图 2 V_H 和 V_L 的拼接

2.3 scFv 基因的表达和融合蛋白的纯化

将含有 scFv 基因的 pET-28a(+) 表达载体转化

大肠杆菌 Origami 2, 构建的重组子命名为 pScFv。由图 3A 所示,经 IPTG 诱导后,重组子 pScFv 中 scFv 基因被诱导表达,在 SDS-PAGE 电泳胶上显示出一条大小约为 30kD 的蛋白,而含空质粒的菌株蛋白粗提液中没有相应的蛋白条带(图 3A)。Western blot 结果分析表明,鼠抗 His 抗体能与此 30kD 的表达产物进行特异结合反应,而与其它条带均无结合反应(图 3B),证明此蛋白即为目的蛋白。通过对可溶性表达的单链抗体进行 Ni-NTA 回收,用 BCA 法蛋白浓度定量试剂盒测定纯化的蛋白浓度,并结合 Band-Scan 软件计算出 scFv 抗体的蛋白浓度达 0.115mg/mL。



M: 蛋白 Marker; 1 与 5: 转化 pET-28a 的 Origami 2 菌液; 2 与 4: 转化 pET-MC 的 Origami 2 菌液; 3 与 6: 回收的 scFv

图 3 微囊藻毒素 scFv 的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)结果

2.4 scFv 的抗原结合活性测定

为了确定纯化 scFv 抗体的活性,我们通过 ELISA 方法检测分析其抗体与单链抗体的抗原(MC-BSA)之间特异识别能力。测定结果(表 2)显示 scFv 抗体与 MC-BSA 呈阳性反应,而且随 scFv 抗体浓度的降低,反应样品在 450nm 处的吸光值逐渐下降,相比,对照样品呈阴性反应。试验数据表明该单链抗体可以与微囊藻毒素发生特异性结合。

表 2 scFv 的 ELISA 反应结果

scFv 浓度(mg/mL)	OD ₄₅₀
0.1	1.168 ± 0.03
0.05	0.556 ± 0.002
0.025	0.422 ± 0.006
0.0125	0.348 ± 0.013
阴性	0.13 ± 0.003
阳性	1.136 ± 0.045

$\bar{x} \pm s$, n=3

3 讨论

随着工业化进程的加快,水华发生的频率和幅

度逐年增加,由此产生的毒素对水环境及生物安全的威胁已经成为一个全球性的问题。对于 MC-LR 的检测,免疫分析法以其特异性强,灵敏度高,前处理简单等特点而越来越受到重视。但是由于微囊藻毒素是半抗原,其单克隆抗体的制备非常复杂,且成本较高,因而极大地限制了 ELISA 方法应用于微囊藻毒素的检测。本研究采用 RT-PCR 技术首次从分泌抗微囊藻毒素-LR 单克隆抗体的杂交瘤细胞中扩增出抗体的 V_H 和 V_L 基因。将得到的 V_H 和 V_L 基因以由 Huston 等^[13]根据 Fab 片段 X 线晶体衍射分析资料设计出的具有刚性结构的 15 肽(Gly4Ser)₃作为连接肽,通过重叠延伸 PCR 获得了抗 MC-LR 单链抗体基因,并在大肠杆菌 Origami(DE3)中表达出具有活性的 scFv 融合蛋白。纯化的蛋白能与微囊藻毒素抗原结合,具有特异的抗原识别能力。本研究所获得的结果为进一步制备多价高亲和力抗体奠定了基础,并为基因工程抗体在半抗原类物质检测方面的应用提供技术支持。

参考文献

- [1] 韩志国,郑解生,谢隆初等. 淡水水体中的蓝藻毒素研究进展. 暨南大学学报, 2001, 22 (3):129-135
- [2] Liu B H, Yu F Y, Huang X, et al. Monitoring of microcystin-protein phosphatase adduct formation with immunochemical methods. *Toxicon*, 2000, 38: 619-632
- [3] 赵晓联,孙秀兰,汤坚. 藻毒素的危害及分析方法进展. 食品科学, 2005, 26(3): 257-261
- [4] Sheng J W, He M, Shi H C. A highly specific immunoassay for microcystin-LR detection based on a monoclonal antibody. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 603: 111-118
- [5] Nagata S, Soutome H, Tsutsumi T, et al. Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity. *Nat Toxins*, 1995, 3: 78-86
- [6] 李楠,计融,韩春卉等. 抗微囊藻毒素单克隆抗体的研制. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(6): 525-527
- [7] Metcalf J S, Bell S G, Codd G A. Production of novel polyclonal antibodies against the cyanobacterial toxin microcystin-LR and their application for the detection and quantification of microcystins and nodularin. *Water Res*, 2000, 34: 2761-2769
- [8] Sheng J W, He M, Shi H C, et al. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 572: 309-315
- [9] World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality. Geneva: World Health Organization, 1998
- [10] McElhiney J, Drever M, Lawton L A, et al. Rapid isolation of a single-chain antibody against the cyanobacterial toxin microcystin-LR by phage display and its use in the immunoaffinity concentration of microcystins from water. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5288-5295
- [11] Wang Z D, Raifu M, Howard M, et al. Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 233: 167-177
- [12] Martin A C R. Accessing the kabat antibody sequence database by computer. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 1996, 25: 130-133
- [13] Huston J S, Leuinson D, Mudgett-Honter M, et al. Protein engineering of an antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85 (16): 5879-5883

Construction, expression and identification of scFv against microcystin-LR

Song Limin, Zhang Wei*, Chen Ming*, Lin Min*, Pan Jiarong*

(Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

(* Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081)

Abstract

The V_H and V_L genes were amplified by RT-PCR from hybridoma cell secreting anti-microcystin-LR monoclonal antibody, and the scFv gene was spliced by sequence overlap extension PCR with V_H and V_L SDS-PAGE and Western blot analysis confirmed the expression of scFv with the molecular weight of about 30kD. The recombinant protein was purified by metal affinity chromatography using Ni-NTA, and the concentration of purified scFv was 0.115mg/mL. The ELISA assay revealed that the scFv protein could bind specifically to MC-LR. The results provide a basis for the application of genetic engineering methods in the preparation of multivalent antibodies with high affinity.

Key words: microcystins (MC), single chain variable fragment, prokaryotic expression, ELISA