

柑桔溃疡病菌重组单链抗体的高效表达及活性检测

陈 刚 殷幼平 袁 青 夏玉先 王中康*

(重庆大学生物工程学院 重庆市基因功能与调控重点实验室 重庆 400030)

摘 要 运用 PCR 方法扩增利用核糖体展示技术筛选的抗柑桔溃疡病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, XAC)的单链抗体(ScFv 95)基因片段,将单链抗体基因重组到原核表达载体 pET30a(+)中,构建单链抗体高效表达载体 pET30a(+)XAC-ScFv。再将 pET30a(+)XAC-ScFv 质粒转化进大肠杆菌 BL21(DE3)后诱导表达,并对表达产物进行纯化、复性及活性检测。获得了抗 XAC 单链抗体的高效表达蛋白,以包涵体形式存在的表达蛋白大小约 32kDa。包涵体蛋白经过变性、纯化和复性后,初步获得有功能的单链抗体。同时用 Biacore 分析 XAC-ScFv-95 与 XAC LPS 作用,结果表明复性后的 XAC-ScFv-95 具有较高的亲和力,从而为柑桔溃疡病菌 XAC 的免疫诊断和防治研究提供了新的工具和途径。

关键词 :XAC 表达,包涵体,单链抗体,复性,Biacore 分析

中图分类号 :Q933 **文献标识码** :A **文章编号** :1001-6209(2007)06-1066-04

柑桔溃疡病是由地毯草黄单胞杆菌柑桔致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)引起的一种国内外重大检疫性病害,给世界柑桔产业带来了巨大经济损失。目前国内外除了烧毁病树外并无其他切实可行的根除方法,探索柑桔溃疡病的防治新途径在目前和将来都具有重大意义。

基因工程重组单抗兼具治疗和诊断双重功能,利用抗原-抗体特异性结合原理,可用于人类疾病、植物病害的诊断、治疗和预防。单链抗体(single chain variable fragment, ScFv)是利用基因工程的方法用一连接肽将抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)拼接在一起的重组蛋白。近几年,国内外相继出现了单链抗体应用于医学领域的研究报道^[1,2]。但是,单链抗体 ScFv 应用于植物病害方面的研究报道寥寥无几^[3~6],且抗柑桔溃疡病菌的重组基因工程抗体的研究尚未见报道。抗柑桔溃疡病菌单链抗体 ScFv 是本基因中心实验室自主研制的 DNA 重组单克隆抗体,这种小分子抗体在病原微生物的快速鉴定和病害诊断预防等方面具有灵敏度高、特异性强、使用简便等优点。

前期工作中,已从构建的核糖体展示文库中筛选到高亲和力、专一性强的抗柑桔溃疡病菌重组单链抗体(ScFv 95)^[7],针对其分泌型表达存在表达量低、不易纯化等问题,故本研究将筛选的单链抗体进

行高效原核表达、复性及功能验证。可为柑桔溃疡病菌的早期免疫诊断提供新型检测试剂,并为植物病害的防治提供新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 基因操作材料:核糖体展示技术筛选的高亲和力、专一性强的单链抗体 ScFv 95 由本实验室构建和保存,pET30a(+)表达载体为 Novagen 公司产品,大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)由本室保存。限制性内切酶(*Eco*RI、*Hin*dIII)、T4 连接酶、*Taq*DNA 聚合酶等均购自 TaKaRa 公司,凝胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒为天为时代公司产品。

1.1.2 蛋白纯化和复性材料:Ni-NTA His Bind 树脂购自 MERCK 公司,Sephacryl-200 为 Pharmacia 公司产品,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、溶菌酶、PMSF、EDTA、DTT、L-Arg、Triton X-100、Urea、氧化型谷胱甘肽(GSSG)及还原型谷胱甘肽(GSH)为 Sigma 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物:由上海生物工程公司合成,上游引物:5'-AGAATTCAGGTCAAGCTGCAGC AGTCAG-3';下游引物:5'-CCCAAGCTTTTATGCAGCATCAGCCG TTT-3'。

1.2 ScFv 基因的克隆

基金项目 科技部创新基金项目(05C262151113999);农业部重大专项资助(2006-003)

* 通讯作者。Tel/Fax:86-23-65120489;E-mail:zkwang646@sina.com.

作者简介 陈 刚(1982-)男,山东省烟台人,硕士研究生,主要从事分子微生物学的研究。E-mail: kudongdong-007@163.com

收稿日期 2007-02-02 接受日期 2007-07-13 修回日期 2007-09-04

PCR 扩增核糖体展示技术筛选的单链抗体 ScFv 95 基因片段 ,PCR 扩增程序为 94℃ 2min ,1 个循环 ; 94℃ 30s ,60℃ 30s ,72℃ 1min ,30 个循环 ;72℃ 延伸 8min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳 ,凝胶成像系统成像 (VersaDoc 1000 ,BioRad ,USA) ,鉴定 PCR 扩增的 DNA 片段 ,凝胶回收后与提取的 pET30a(+)表达载体一起经 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切 ,载体去磷酸化在 16℃ 连接过夜 ,连接产物转化进 BL21(DE3)大肠杆菌 ,挑取阳性克隆并测序。

1.3 ScFv 基因的表达

将含 pET30a(+)-ScFv 的 BL21(DE3)菌株接种到含 100mg/L 卡那霉素的 LB 培养液中 ,于 37℃ 过夜培养 ,次日 ,按 1 :100 的比例接种到新鲜的 LB 培养液中 ,放于 37℃ 中 250r/min 震荡培养到 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 时 ,加入终浓度 1mmol/L 的 IPTG ,于 30℃ 下继续培养 4h。

1.4 包涵体的提取和变性

诱导完成后 ,将培养瓶于冰上放置 5min ,然后在 4℃ 以 5000r/min 离心 15min ,收集菌体。用超声缓冲液 (50mmol/L Tris-HCL , 5mmol/L EDTA , 0.15mol/L NaCL ,1mg/mL 溶菌酶 pH 8.0)重悬 (10mL/1g 菌体) ,于 4℃ 放置 45min ,然后加入 15mmol/L 的 PMSF 超声破碎 ,破碎后于 4℃ ,10000r/min 离心 10min 收集沉淀 ,用 40mL 洗涤液 (50mmol/L Tris-HCL , 5mmol/L EDTA ,0.15mol/L NaCL pH 8.0)洗涤 ,离心弃上清 ,沉淀分别先后用含 3mol/L 尿素和含 0.5% Triton X-100 洗 3 遍后 ,溶解于变性液 (50mmol/L Tris-HCL ,8mol/L urea ,0.1mol/L DTT pH 8.0)中 ,在室温下裂解 12h ,以 12000r/min 离心 10min 取上清并经 0.45μm 滤膜过滤。

1.5 XAC-ScFv 的纯化和鉴定

因表达的 ScFv 融合蛋白含 6-His-tag ,因此用 Ni-NTA His Bind 树脂对其进行纯化 ,具体操作参照试剂盒说明书。表达后未纯化蛋白和纯化蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定 ,以考马斯亮蓝染色后 ,观察结果。并做 Western blot 验证目的蛋白 ,一抗采用抗 His-tag 抗体 ,二抗采用碱性磷酸酯酶标记羊抗鼠 IgG。

1.6 XAC-ScFv 的复性与亲和力鉴定

复性采用凝胶 (Sephacryl-200HR)柱上在位复性 ,柱子用平衡液 (50mmol/L Tris-HCL , 5mmol/L EDTA ,0.15mol/L NaCL pH 8.0)平衡后 ,按柱床体积 5% 上载纯化样品 ,用洗脱液 (50mmol/L Tris-HCL , 5mmol/L EDTA ,0.15mol/L NaCL ,1.25mmol/L GSH , 0.25mmol/L GSSG , 0.5mol/L L-Arg pH 8.0)洗脱 ,流

速控制为 0.5mL/min ,每管收集 1mL。收集 XAC-ScFv 蛋白峰 ,将复性后的样品 4℃ 下透析 24h (50mmol/L Tris-HCL ,50mmol/L NaCL pH 8.0)以除去 L-Arg 及残留 DTT ,最后过截流 M_r 为 10000 的超滤器浓缩。复性后的抗体用 Biacore 检测其亲和力。将纯化的 10μg/mL ScFv 95 按厂家说明书提供的方法固定在 CM5 芯片上。由于 ScFv 95 是用 XAC 的脂多糖作为抗原筛选的 ,所以根据 Albrecht 报道^[8]的 LPS 提取方法分别提取柑桔溃疡病菌 LPS 及柑桔溃疡病菌近源种甘蓝黑腐病菌 (XCC)LPS、水稻条斑病菌 (XO)LPS、水稻白叶枯 (XOo)LPS ,LPS 用 HEPES 缓冲液 (10mmol/L HEPES ,100mmol/L NaCL pH 7.4)稀释成 5μg/mL ,以 30μL/min 注入。用 Biacore evaluation 软件分析单链抗体亲和常数。

2 结果

2.1 ScFv 基因的扩增及克隆

将扩增的单链抗体 ScFv-95 基因片段与 pET30a (+)表达载体连接并转化进大肠杆菌 BL21(DE3) ,挑取并验证阳性克隆。将克隆构建的质粒送上海生工测序表明 ,ScFv 基因与载体连接后 VH、VL 和 Link 序列均正确 (GenBank 登陆号 :EF121857)。

2.2 ScFv 基因表达和纯化

将含 pET30a(+)-ScFv 的 BL21(DE3)菌株经 IPTG 诱导并初步纯化包涵体 ,变性后的包涵体经过 Ni-NTA His Bind 树脂纯化后进行 SDS-PAGE 分析。结果显示包涵体表达量很高 ,并且经 Ni-NTA His Bind 树脂纯化后的蛋白纯度达 98% 以上。将表达的 XAC-ScFv 抗体做 western blot 验证。如图显示在 32kDa 位置出现了明显的目标蛋白条带 (图 1)。

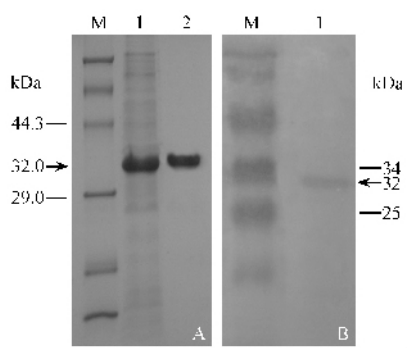


图 1 XAC-ScFv 基因表达与纯化的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.1 Analysis of expressed and purified XAC-ScFv with SDS-PAGE and Western blot. A : SDS-PAGE. M : protein marker (low) ; 1 : expressed protein as inclusion bodies ; 2 : purified protein. B : Western blot. M : pre-dye protein marker ; 1 : expressed protein.

2.3 XAC-ScFv 的复性和活性鉴定

纯化后的蛋白上 Sephacryl-200HR 分子筛进行柱上在位复性,结果收获到了单一的蛋白峰(图 2)。将收集的蛋白透析并经过超滤处理后,固定于蛋白芯片 CM5 上,分别提取了 XAC LPS、XCC LPS、XOOc LPS 和 XOO LPS 与 ScFv95 相作用。结果显示,只有 XAC LPS 与 XAC-ScFv-95 相作用,而 XCC、XOOc 和 XOO 的 LPS 与 XAC-ScFv-95 没有结合能力。一方面说明复性的 XAC-ScFv-95 具备抗体生物活性,能与 XAC 的 LPS 相结合,另一方面说明 XAC-ScFv-95 具有较高的特异性,不与 XAC 近源种 XCC、XOOc、XOO 的 LPS 相互作用(图 3)。Biacore evaluation 软件分析 XAC-ScFv-95 与 XAC LPS 作用常数,结果显示其结合常数为 k_a 为 5.17×10^5 ,解离常数为 k_d 为 1.90×10^{-2} ,亲和常数 K_A (k_a / k_d) 为 $2.72 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 。从而表明复性后的 XAC-ScFv-95 具有较高的亲和力。

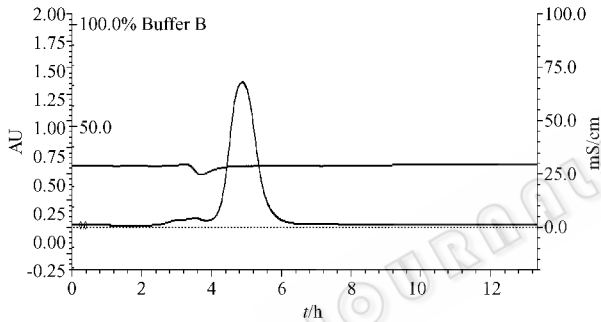


图 2 Sephacryl-200HR 分子筛层析复性抗体
Fig. 2 Renaturation of antibody by Sephacryl- 200HR gel-filtration chromatography.

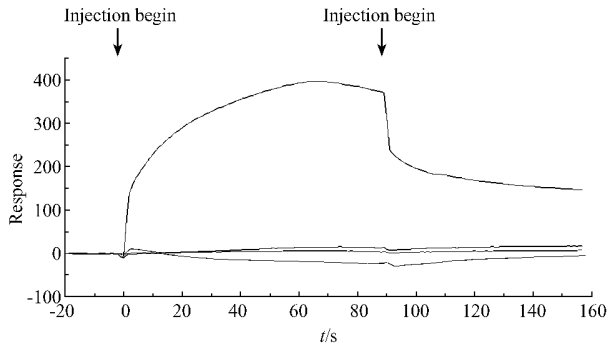


图 3 Biacore 测定 ScFv 亲和力
Fig. 3 Analysis of the affinity and specificity of the renatured ScFv using Biacore system.

3 讨论

随着基因工程技术不断发展,ScFv 等小分子抗

体以其不含 Fc 段,免疫源性低,相对分子质量小,穿透力强以及可在大肠杆菌等原核体系表达,易于进一步基因工程改造等优点而受到重视^[9],单链抗体 ScFv 应用于植物病害的检测与防治等方面还是一项新开展的领域,由于其特异性强、灵敏度高的特点势必成为研究的热点。

本研究采用了以 pET 作为载体的 T7 表达系统,载体内含 T7 启动子,在 T7RNA 聚合酶的存在下,受其控制的基因可成高水平转录,载体克隆位点的上游有一个能够编码 6 个组氨酸的 His-tag 序列,该序列可作为蛋白标签来进行目的蛋白的检测和纯化^[10]。利用基因重组技术构建了 XAC 的单链抗体(ScFv)基因的表达载体 pET30a(+)-ScFv。该质粒在大肠杆菌中高效表达 XAC 的单链抗体(XAC-ScFv)。为了制备足够的具有免疫活性的抗体,对单链抗体(XAC-ScFv)的复性方法进行了探索,复性是一个非常复杂的过程,除与蛋白质复性的过程控制相关外,还很大程度上与蛋白质本身的性质有关,因此复性后的抗体活性不如分泌表达那么高,但是包涵体表达具有产量高,易于分离纯化等优点,如果复性成功,便可为实际应用提供所需的大量抗体。近年来凝胶柱层析复性是采用较多,效果较好的复性方法^[11],本研究采用 Sephacryl-200HR 分子筛作为填料,成功地获得了(XAC-ScFv)功能性抗体。本文是国内外关于核糖体展示技术制备筛选的作用于植物病原细菌单链抗体高效表达方面的首次报道,可以预计单链重组抗体在植物病原菌的诊断和防治等方面都具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] 唐彩华,肖锡宾. BAC5-scFv 的表达、复性及活性检测. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(1): 67-70.
[2] Kou G, Shi S, Wang H, *et al.* Preparation and characterization of recombinant protein ScFv(CD11c)-TRP2 for tumor therapy from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2007, 52(1): 131-138.
[3] Saldarelli P, Keller H, Dell'Orco M, *et al.* Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B. *J Virol Methods*, 2005, 124(1-2): 191-5.
[4] Griep RA, Prins M, van Twisk C, *et al.* Application of Phage display in selecting *Tomato spotted wilt virus* Specific Single-Chain Antibodies (scFvs) for sensitive diagnosis in ELISA.

- [5] Fecker LF, Koenig R, Obermeier C. *Nicotiana benthamiana* plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat protein-specific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Arch Virol*, 1997, **142**(9):1857–63.
- [6] Schillberg S, Zimmermann S, Zhang MY, Fischer R. Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Res*, 2001, **10**(1): 1–12.
- [7] Yuan Q, Xia Y, Nian S, Yin Y, *et al.* Selection of single chain fragments against the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by ribosome display. *Enzyme and Microbial technology*, 2007, **41**(33):383–389.
- [8] Albrecht MT, Wang W, Shamova O, *et al.* Binding of protegrin-1 to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Respir, Res*, 2002, **3**:18–28.
- [9] 董志伟, 王 琰. 抗体工程. 第一版. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 89–94.
- [10] Hashimoto Y, Ikenaga T, Tanigawa K, *et al.* Expression and characterization of human rheumatoid factor single-chain Fv. *Biol Pharm Bull*, 2000, **23**(8):941–945.
- [11] Werner MH, Clore GM. Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett*, 1994, **345**(2–3):125–130.

High efficient expression and bio-activity assay of recombinant antibody for citrus bacterial canker disease

CHEN Gang, YIN You-ping, YUAN Qing, XIA Yu-xian, WANG Zhong-kang*

(Key Laboratory of Gene Function and Regulation at Chongqing, College of Bioengineering at Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Citrus bacterial canker disease caused by the gram negative bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (XAC) is a severe bacterial disease of most commercial citrus species and cultivars around the world. Single chain variable fragment (ScFv) is artificial construction small molecular antibody produced by genetic engineering which may be used to identify target pathogens and prevent plant diseases including XAC. To express ScFv against XAC and obtain functional ScFv, single-chain antibody fragments (ScFv 95) selected by ribosome display was amplified using an assembly of polymerase chain reaction (PCR), and a recombinant plasmid pET30a(+)–XAC-ScFv was constructed by inserting the single chain Fv gene into bacterial expression vector pET30a(+). pET30a(+)–XAC-ScFv was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and expressed which was induced by IPTG. Products were purified through Ni-NTA His Bind resin. The collected antibodies were refolded by gel filtration chromatography, and activity assaying process was done. The results showed that ScFv recombinant antibody of XAC with a molecular of 32kDa was expressed successfully as inclusion bodies and the functional ScFv was obtained through purification and renaturation. Meanwhile, the Biacore analysis indicates that XAC-ScFv-95 showed significant affinity to LPS of Xac, which paves a new way for immunization diagnosis and exploration of integrated control of citrus bacterial canker disease.

Keywords: XAC; expression; inclusion body; single-chain antibody; renaturation; Biacore analysis

Foundation item: Ministry of Science & Technology Innovation Fund and Projects (05C262151113999); The Major Program of the Ministry of Agriculture (2006-003)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-23-65120489; E-mail: zkwang646@sina.com

Received: 2 February 2007/Accepted: 13 July 2007/Revised: 4 September 2007