

单链抗体 2F3 表达条件的优化及其提纯和性质研究

罗元明 车颖 魏景艳 阎岗林 罗贵民*

(吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130023)

摘要 将构建好的单链抗体 2F3 表达载体 pTMF2F3ScFv 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)。先挑选出表达量高的单克隆, 然后让其在 37℃ 进行表达, 并将表达时的培养条件进行优化。实验结果表明: 最佳诱导条件为开始诱导时的菌体密度 $OD_{590nm} = 1.0 \sim 1.8$, 所加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)的浓度为 0.3 ~ 0.5 mmol/L, 诱导时间 7h, 优化后目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 20%, 并用发酵罐成功地进行了扩大培养, 筛选了洗涤包涵体的最佳条件。采用两步法对包涵体复性进行了研究, 用 Western blotting 及 ELISA 法检测了所表达的单链抗体及其生物活性, 并成功制备了含硒单链抗体酶。

关键词 单链抗体, 包涵体, Western blotting, ELISA, 抗体酶

中图分类号 Q554 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)01-0074-05

利用单克隆抗体治疗实体瘤受许多因素的限制, 包括标记 IgG 不易穿透肿瘤细胞, 不能足量到达肿瘤, 达不到应有的毒理效果, 一种改变单抗性质的方法就是使用小分子量的抗体片段——单链抗体(ScFv)。单链抗体是用短肽将抗体的轻链和重链可变区连接后形成的单链分子。这类分子的分子量小, 免疫原性低, 在体细胞上无特异性受体, 因而穿透组织能力优于全抗体, 在体内显像和体内治疗效果好^[1]。目前已经获得了针对几十种不同半抗原、蛋白质、受体及肿瘤抗原的单链抗体(ScFv), 而且, 单链抗体酶也被成功制备^[2]。

我们曾成功制备了几种单克隆含硒抗体酶^[3-5], 但由于全抗分子量大, 在作为药物开发方面具有不易运输及不易被机体细胞吸收等缺点, 故开发分子量小的单链含硒抗体酶势在必行。为了提高表达量, 可利用基因工程技术表达单链抗体, 除了使用合适的高表达宿主及启动子等因素外, 高表达克隆的筛选, 培养条件的优化及表达产物包涵体的洗涤、纯化及复性也是提高目的产物产量和生物活性的关键, 本文就单链抗体表达及纯化条件进行了广泛而深入的研究。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

表达载体 pTMF2F3ScFv 及大肠杆菌 BL21(DE3)

由中国科学院遗传研究所提供; 其它试剂均为国产分析纯; 标准分子量蛋白及 DNA 购于华美生物工程有限公司; 50L 发酵罐(Model: MSJ-U3)为日本 TOKYO B. E. MARUBISHI Co., Ltd. 产品。

1.2 方法

1.2.1 感受态细菌的制备, 连接产物的转化及重组子的筛选与酶切鉴定等分子生物学操作均参考文献[6]。

1.2.2 高表达克隆的筛选: 用质粒 pTMF-2F3ScFv 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 从转化平板上挑取不同的单菌落, 分别接种于 5mL 的 LB 培养基中(含卡那霉素 80 μ g/mL), 在 37℃, 250r/min 摇床培养过夜。取过夜培养物按 1:40 的比例分别接种于新鲜的 LB 培养基中(含卡那霉素 80 μ g/mL), 在 37℃ 的摇床振荡培养。当菌体的密度(OD 值)达到一定值时, 向培养基中加入不同浓度的 IPTG, 继续进行诱导表达, 取 1.0mL 的菌体培养物, 离心(12 000r/min, 30s)收集菌体。用 pH7.0, 20mmol/L 的磷酸缓冲液(PBS)洗涤菌体, 然后加入 200 μ L, pH7.0, 20mmol/L 的 PBS 悬浮菌体, 取菌体 30 μ L, 并加入 30 μ L 的 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液, 用 12% SDS-PAGE 检测不同克隆中目的蛋白的表达量。

1.2.3 单链抗体的发酵罐生产: 取 20% 甘油保存的工程菌 pTMF-2F3ScFv BL21(DE3) 1mL, 接种于 1000mL 新鲜的 LB 培养基中(80 μ g/mL 的卡那霉素), 37℃ 过夜培养, 用作发酵的种子菌。将 50L 的

收稿日期: 2001-07-12, 修回日期: 2001-10-23。

基金项目: 国家 863 高技术研究发展计划项目(No. 103-13-01-05)、国家自然科学基金项目(No. 20072010)和吉林大学博士后人员科研启动基金资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-431-8923189 ext 3698; Fax: 86-431-8923907; E-mail: gmluo@public.cc.jl.cn

发酵罐加入 350g 胰蛋白胨、350g NaCl、175g Yeast Extract, 配成 35L 的 LB 培养基, 加入约 7.0mL 的 5mol/L NaOH 调 pH7.0, 然后 121℃ 灭菌 25min, 冷却至 37℃, 加入 2.8g 卡那霉素, 接入 1L 过夜培养的种子菌, 在 37℃, 通气量为 1L(O₂)/L(培养基)/min, 搅拌速度 200r/min 进行发酵。依据 1.2.2 中优化后的条件进行发酵, 即当菌体密度 OD_{590nm} 为 1.0 ~ 1.8 时, 加入 IPTG 3.34g(终浓度约为 0.4mmol/L), 继续培养 7h 后, 停止发酵, 离心(6000r/min, 20min), 收集菌体, 并用 pH8.0, 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗涤菌体 1 次, 将菌体分别放于 -70℃ 冰箱和室温作冻融处理。

1.2.4 包涵体的洗涤:在冻融后的菌体中加入适量的 pH8.0, 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液、溶菌酶(每克湿菌加入 10mg/mL 溶菌酶 80μL)及 PMSF(每克湿菌加入 50mmol/L 对甲苯磺酰氟(PMSF)4μL), 室温放置 20min 后, 进行超声波破碎(时间 90s), 通过观察溶液的粘性以确定核酸的剪切程度, 并用显微镜检测菌体的破碎效果。将彻底破碎的菌体离心(12000r/min, 20min), 收集包涵体, 并用以下两种方法洗涤包涵体:(1)依次用以下几种洗涤液洗涤(pH 值均为 8.0):含 2mmol/L 二巯苏糖醇(DTT)的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液;含 0.1% Triton X-100 的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液;含 3mol/L 尿素的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液;含 1mol/L 尿素和 2mmol/L DTT 的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液;以及含 2% 有脱氧胆酸的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液;(2)依次用以下几种洗涤液洗涤(pH 值均为 8.0):含 2% 的脱氧胆酸的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液;含 1mol/L 尿素和 2mmol/L DTT 的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液及含 3mol/L 尿素的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液。洗涤时每克湿包涵体加入约 10mL 的洗涤缓冲液, 50℃ 加热 10min, 并搅拌 1h, 离心(12 000r/min, 20min), 取上清和沉淀, 用 SDS-PAGE 检测洗涤效果。

1.2.5 表达产物的鉴定(Western blotting):用含 8mol/L 尿素的 20mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)将洗涤后的包涵体溶解, 然后做 SDS-PAGE, 将凝胶上的样品电转移至硝酸纤维素薄膜上, 该膜置于印迹缓冲液(5% 脱脂奶粉溶于 PBS)中, 37℃ 保温 1h, 在室温下用 PBS 缓冲液洗涤, 将膜装入杂交袋, 加入 1% 的牛血清白蛋白溶液(于 150mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris-HCl, pH7.5)5mL 及 25μL 抗(His)₆ 单克隆抗体, 于 37℃ 轻摇 1h, 取出膜, 用 PBS 洗涤 3 次, 换 150mmol/L NaCl 溶液(50mmol/L Tris-HCl, pH7.5)洗 1 次, 洗涤后装入另一杂交袋, 加入 5mL

1% 的牛血清白蛋白溶液及 10μL HRP-羊抗鼠 IgG 抗体, 37℃ 下避光轻摇 1h, 洗涤 3 次后放入刚加入 0.03% H₂O₂ 的四氨基联苯胺(TMB)底物溶液, 于室温振荡至褐色区带充分显现, 将膜放入重蒸水中冲洗, 终止显色反应, 转入 100mL PBS 中保存拍片。

1.2.6 表达产物的纯化、复性及生物活性的鉴定:

(1)包涵体变性及复性:将洗涤后的包涵体 1.6g 用 30mL 8mol/L 尿素溶液溶解, 同时加入 80mg SDS, 在搅拌下加热至 75℃, 维持 10min, 冷却至室温, 离心(12000r/min 10min), 将上清用 pH8.0, 40mmol/L Tris-HCl 缓冲液稀释 10 倍, 加入 1.36g β-环糊精(约 4mmol/L), 轻微搅拌并放置过夜, 用 0.3μm 的膜过滤除去蛋白聚集体, 将滤液经分子量为 10000 的超滤器超滤, 除去 SDS 和 β-环糊精形成的复合物等小分子, 最后得到 20mL 复性后的样品。

(2)用 ELISA 鉴定 ScFv2F3 对底物 GSH 的亲合力:以 100μL/孔 GSH 溶液(18μg/mL)包被酶标板, 4℃ 冰箱放置过夜, 次日取出, 甩同孔中残留液体后, 用 PBS-0.1% Tween-20 洗涤 3 次, 向孔中加入经复性后的 ScFv2F3(10μg/mL)或经复性并硒化的 ScFv2F3(Se-ScFv2F3, 10μg/mL)100μL, 37℃ 温浴 1h, 经洗涤后加入 100μL anti-(His)₆ 单克隆抗体, 37℃ 温浴 1h, 洗涤后, 加入 100μL HRP-羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 37℃ 温浴 1h, 洗涤后用底物进行显色(0.2mg/mL TMB + 0.03% H₂O₂), 在 450nm 测定光吸收值;同时, 分别以不加 ScFv2F3 或不加 anti-(His)₆ 单抗的孔作为阴性对照, 以 anti-(His)₆ 单抗直接包被酶标板, 加入 HRP-羊抗鼠 IgG 酶标二抗, 并用底物显色作为阳性对照。

(3)硒化 ScFv2F3 的制备:取复性后的 ScFv2F3 2mL, 加入 40μL PMSF(20mg/mL 乙腈溶液), 于 25℃ 温浴 3h, 通氮气 10min, 加入 20μL NaHSe(NaHSe 按 Klaymen D L 的方法制备^[7]), 在氮气保护下 40℃ 温浴 36h, 取出于空气中氧化, 离心, 除去硒, 经 G-25 柱除盐后, 即得硒化的 2F3ScFv, 用 Wilson 等人的方法^[8]测定其谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活力。

2 结果和讨论

2.1 表达条件的优化

因为构建的工程菌在不断传代的过程中质粒分配不均匀, 以及对培养条件变化不适应而引起的质粒丢失等, 从而使不同单克隆表达目的蛋白的量不同。故我们从 50 个单克隆中挑选了 4 个表达量较

高的单克隆用作目的蛋白表达的工程菌。实验表明,采用摇床上培养时,*E. coli* BL21(DE3)表达单链抗体的最佳实验条件为:开始诱导时的菌体密度 $OD_{590nm} = 1.0 \sim 1.8$ (图 1);诱导时间为 7h (图 2);IPTG 的浓度对目的蛋白表达量没有明显影响,0.1 ~ 1.0mmol/L IPTG 时有一定量的表达,0.3 ~ 0.5mmol/L IPTG 时表达量稍高,故采用 0.4mmol/L IPTG 进行诱导 (图 3);在优化后的条件下,菌体用发酵罐发酵 (见图 5) 比摇瓶培养 (见图 4) 目的蛋白的表达量要高,这可能在使用发酵罐发酵时使用了搅拌器及加大通气量有关,而且当用 SDS-PAGE 检测时,在目的蛋白带附近的杂蛋白带减少,经过洗涤后,目的带附近杂带消失,有利于后期的纯化和复性。在最佳条件下,目的蛋白的表达量占菌体总蛋白的 20%。SDS-PAGE 检测显示,目的蛋白 ScFv 的分子量为 30kD。

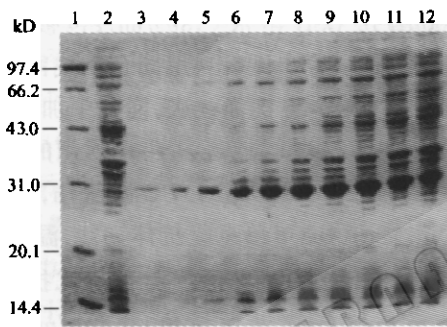


图 1 不同菌体密度对 2F3ScFv 的表达量的影响

Fig.1 The effect of the bacteria concentration on the expression amount of 2F3ScFv

1. Low molecular weight markers; 2. Protein from *E. coli* BL21(DE3) with pTMF; 3 - 12. pTMF-2F3ScFv induced at different OD_{590nm} , from 3 to 12, OD_{590nm} are 0.15, 0.25, 0.36, 0.54, 1.02, 1.26, 1.77, 1.95, 2.25, and 2.50 respectively

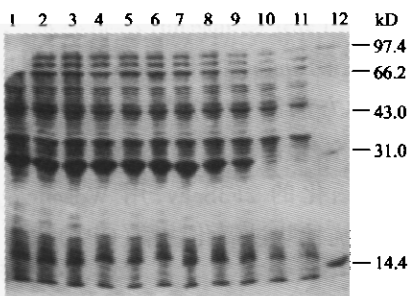


图 2 不同诱导时间 2F3ScFv 表达量的影响

Fig.2 The effect of the induction time on the expression amount of 2F3ScFv

1 - 10. pTMF-2F3ScFv induced for different hours, from 10 to 1, the induced time are 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 h respectively; 11. Protein from *E. coli* BL21(DE3) with pTMF as a control; 12. Low molecular weight markers

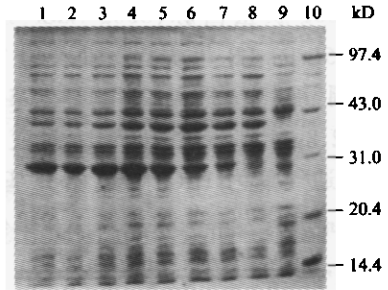


图 3 不同 IPTG 浓度对 2F3ScFv 表达量的影响

Fig.3 The effect of IPTG concentration on the expression amount of 2F3ScFv

1 - 8. pTMF-2F3ScFv induced by IPTG at different concentration, from 8 to 1, the concentration of IPTG are 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 and 1.1 mmol/L respectively; 9. Protein from *E. coli* BL21(DE3) with pTMF; 10. Low molecular weight markers

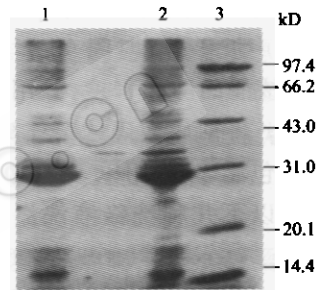


图 4 2% 的脱氧胆酸钠对摇瓶培养菌体的包涵体的洗涤效果

Fig.4 Effect of 2% Deoxycholic acid on the inclusion bodies washing

1. 2F3ScFv inclusion body by washing with 2% Deoxycholic acid; 2. 2F3ScFv inclusion body after sonication; 3. Low molecular weight markers

2.2 表达产物包涵体的洗涤

对于表达产物包涵体的洗涤,方案一的洗涤效果优于方案二。即采用离子型的去污剂 2% 的脱氧胆酸(DOC)的洗涤效果较好,1 次洗涤便能洗去大部分的杂蛋白(图 5),包涵体的纯度达到 52% (根据凝胶成像系统分析结果),2 次后包涵体的纯度达到 65%,3 次洗涤后包涵体的纯度达到 70% 以上。而采用一般的变性剂、非离子型去污剂,如 Triton X-100,洗涤效果(图 6)不如前者,1 次洗涤后包涵体的纯度仅达到 30%,2 次后包涵体的纯度达到 36%,3 次后包涵体的纯度达到 45%,4 次后包涵体的纯度达到 50%。洗涤时,50℃ 加热 10min,2% DOC 便能很好地溶解杂蛋白,DOC 和杂蛋白结合成复合物而被除去;也可采用 SDS 洗涤,但有将目的蛋白包涵体溶解的危险,造成目的蛋白的损失,因包涵体的溶

解常采用尿素溶液加 SDS 的方法^[9],故采用 2% DOC 配合其它的变性剂及去污剂洗涤,一般能达到较好的洗涤效果,使包涵体的纯度达到 70% 以上(见图 5 中洗涤第 3 次后的包涵体纯度)。

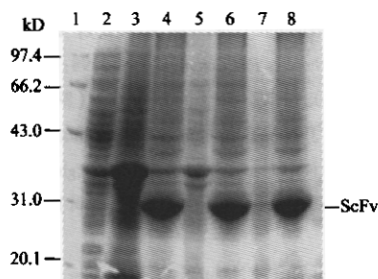


图 5 洗涤方案二对包涵体的洗涤效果

Fig.5 Effect of project 2 on the inclusion body washing

1. Low molecular weight markers; 2. Protein from *E. coli* BL21(DE3) transformed with pTMF as a control; 3. Supernatant of inclusion body washed by 2% Deoxycholic acid for the first time;
4. Inclusion body washed by 2% Deoxycholic acid for the first time;
5. Supernatant of inclusion body washed by 1 mol/L urea + 2 mmol/L DTT for the second time; 6. Inclusion body washed by 1 mol/L urea + 2 mmol/L DTT for the second time; 7. Supernatant of inclusion body washed by 3 mol/L urea for the third time; 8. Inclusion body washed by 3 mol/L urea for the third time

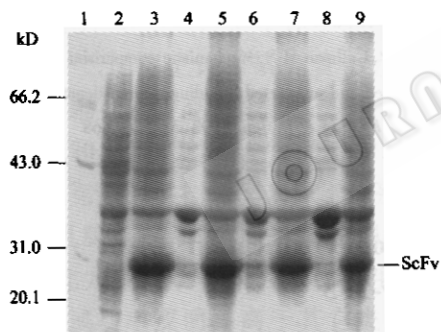


图 6 洗涤方案一对包涵体的洗涤效果

Fig.6 The effect of project 1 on washing the inclusion bodies

1. Low molecular weight markers; 2. Protein from *E. coli* BL21(DE3) with pTMF; 3. Inclusion body of the fourth washing with 2% Deoxycholic Acid;
4. Supernatant of the fourth washing with 2% Deoxycholic Acid;
5. Inclusion body of the third washing with 1 mol/L urea + 2 mmol/L DTT;
6. Supernatant of the third washing with 1 mol/L urea + 2 mmol/L DTT;
7. Inclusion body of second washing with 3 mol/L urea;
8. Supernatant of the first washing with 3 mol/L urea;
9. Inclusion body of the first washing with 0.1% Triton X-100

2.3 表达产物的鉴定及生物活性的测定

2.3.1 表达产物的 Western blotting 测定:用标准 Western blotting 法,检测了表达产物 N-末端确实有 (His)₆ 的 Tag(图 7)序列,因为抗 (His)₆ 抗体能和表达产物单链抗体 2F3 进行特异性结合,同时,也便于

用整合柱进行目的产物的纯化。

2.3.2 包涵体复性:用两步法^[10]研究了变性包涵体的重折叠,复性后的 ScFv2F3 经硒化后的酶活力并不是很高,仅为 600u/ μ mol,而天然谷胱甘肽过氧化物酶的活力为 5780u/ μ mol,和含硒单克隆抗体酶相比,酶活性差距更大^[5],其原因是单链抗体缺少 Fc 片段,与底物 GSH 结合时,结合部位的构象不稳定,从而降低了对底物的亲和力,而含硒单克隆抗体酶含有 Fc 片段,形成稳定的底物结合部位及微环境,故酶活力较高,甚至超过了天然酶的水平^[5]。另外,复性后产品的收率也不是很高,从包涵体溶解到最后诱变成有活力的含硒单链抗体酶,仅回收了 2%,这些损失主要发生在复性的稀释过程中出现严重的聚集现象,如果采用分步稀释,复性效果或许好些。其次,复性过程中加入了变性剂 SDS,以防止溶解后的包涵体在稀释时发生聚集,然而除去 SDS 时采用了 β -环糊精 (β -CD),效果不好,因为按照 Peter E Hanson 的方法^[11],若采用 SDS 防止变性的蛋白聚集,除去 SDS 的最好试剂应该是甲基化的 β -环糊精 (me β -CD),因为甲基化的 β -CD 比 β -CD 的溶解性要好,从而能提高复性产物的收率。

2.3.3 复性产物的 ELISA 测定:以谷胱甘肽过氧化物酶 GPX 的底物之一 GSH 为抗原,用 ELISA 法检测了 ScFv2F3 对 GSH 的亲和力(表 1)。以 GSH 溶液包被 ELISA 板,先后加入 ScFv2F3 或 Se-ScFv2F3, anti-(His)₆ 单抗及酶标二抗和底物进行反应,显色结果表明,此 ScFv2F3 和 Se-ScFv2F3 对 GSH 具有一定的亲和力,硒化后的 Se-ScFv2F3 对 GSH 的亲和力要比没硒化的 ScFv2F3 要强,可能催化部位的硒氢基有

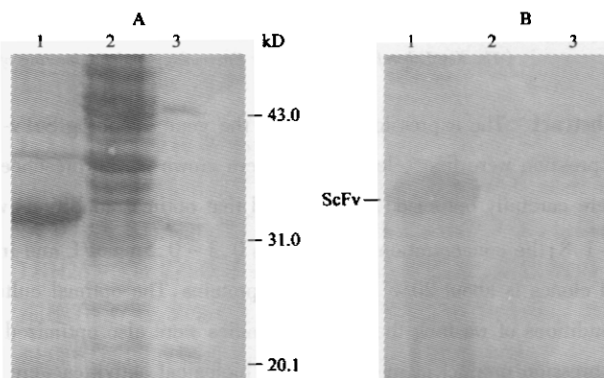


图 7 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)分析 2F3ScFv 蛋白表达

Fig.7 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) of 2F3ScFv protein

1. Inclusion body of 2F3ScFv by washing with 2% DOC only once;
2. Protein from *E. coli* BL21(DE3) transformed with Ptmf;
3. Low molecular weight markers

利于结合部位对底物的结合;而不加 anti-(His)₆ 单抗的阴性对照不显色,因为 ScFv 没有 Fc 片段,不能直接和酶标二抗结合。不加 ScFv2F3 的阴性对照不显色,因为 anti-(His)₆ 单抗对 GSH 没有亲和力,只有 ScFv2F3 特异地和 GSH 亲和。

表 1 ELISA 分析的吸光度(A_{450nm})

Table 1 Absorbency of ELISA assay(A_{450nm})

Positive control	Negative control without ScFv2F3	Negative control without anti(His) ₆	ScFv2F3	Se-ScFv2F3
0.403	-	-	0.178	0.277

2.3.4 硒化产物的活性测定:将复性后的单链抗体 ScFv2F3 按先前的方法硒化^[7],制得含硒单链抗体酶,测得其 GPX 活力为 600u/μmol,其它相关性质正在研究中。含硒单链抗体酶的成功制备表明,先用基因工程法制备具有底物结合部位的单链抗体,再用化学突变法引入催化基团硒代半胱氨酸,从而成功地模拟了 GPX。

REFERENCES(参考文献)

[1] Goldenberg D M, Larson S M, Reisfeld R A. Target cancer with radio-labelled antibodies. *Immunol Today*, 1995, **16**(6): 261 ~ 163
 [2] Gibbs R A, Posner B A, Filipula D R. Construction and characterization of a single-chain catalytic antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 4001 ~ 4004

[3] DING L(丁兰), ZHU Z Q(朱振齐), LUO G M(罗贵民), SUN Q A(孙启安), YANG T S(杨同书), SHEN J C(沈家骥). Artificial imitation of glutathione peroxidase by using chemical mutation method. *Chin Biochem J*(生物化学杂志), 1994, **10**: 296 ~ 299
 [4] Luo Guimin, Zhu Zhenqi, Ding Lan, Sun Qian, Liu Zhi, Shen Jiacong. Generation of selenium-containing abzyme by using chemical mutation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **198**: 1240 ~ 1247
 [5] DING L(丁兰), LIU Z(刘子), LUO G M(罗贵民), ZHAO D Q(赵大庆), NI J Z(倪嘉瓚). A selenium-containing abzyme, the activity of which surpassed the level of native glutathione peroxidase. *Science in China (Series B)*(中国科学 B 辑) 1997, **27**(4): 295 ~ 300
 [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp. 50 ~ 55
 [7] Klaymen D L, Griffin T S. Reaction of selenium with sodium borohydride in protic solvents. *J Am Chem Soc*. 1973, **95**: 197 ~ 199
 [8] Wilson S R, Sucker P A, Hung R C, Specter A. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *J Am Chem Soc*, 1989, **111**: 5936 ~ 5939
 [9] Couthon F, Clottes E, Vial C. Refolding of SDS- and Thermally Denatured MM-Creatin Kinase Using Cyclodextrins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996, **227**: 854 ~ 860
 [10] Rozema D, Gellman H S. Artificial Chaperones: Protein Refolding Via Sequential Use of Detergent and Cyclodextrin *J Am Chem Soc*. 1995, **117**: 2373 ~ 2374
 [11] Hanson E P, Gellman H S. Mechanistic comparison of artificial-chaperone-assisted and unassisted refolding of urea-denatured carbonic anhydrase B. *Folding & Design*, 1998, **3**: 457 ~ 468

Studies on the Optimal Expression Condition, Purification and Its Characterization of ScFv-2F3

LUO Yuan-Ming MU Ying WEI Jing-Yan YAN Gang-Lin LUO Gui-Min*

(The Key Laboratory of Molecular Enzymology and Engineering of Educational Ministry, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract The expression vectors of the gene encoding ScFv-2F3 were transformed into *E. coli* BL21(DE3). Clones of higher expression were first selected, then were grown in the presence of IPTG at 37°C to induce its expression. The culture conditions were carefully optimized. It was found that optimal conditions were as follows: the induction was started as OD₅₉₀ reached to 1.0 ~ 1.8; the concentration of IPTG was 0.3 ~ 0.5 mmol/L and induction time is 7h. The yield of ScFv-2F3 expressed in the selected clones is about 20% of the total proteins. The optimal culture conditions were successfully applied to fermenter of 50 L. The conditions of washing the inclusion bodies were also optimized. A two-step method was used to renature the inclusion body. The expression product of interest and its biological activities were characterized with Western blotting and ELISA. A novel selenium-containing single-chain abzyme with GPX activity was prepared.

Key words ScFv, inclusion body, Western blotting, ELISA, abzyme

Received: 07-12-2001

This work was supported by a grant from the State 863 High Technology R&D Project of China (No. 103-13-01-05) and the National Natural Science Foundation of China (No. 20072010) and Postdoctoral Fellow Scientific Research Start-up Foundation of Jilin University.

* Corresponding author. Tel: 86-431-8923189 ext 3698; Fax: 86-431-8923907; E-mail: gmluo@public.cc.jl.cn