

一种特异性识别斑马鱼卵黄蛋白原的噬菌体展示单链抗体的可溶性表达方案

饶瑜^{1,2}, 钟利桥^{1,2}, 张凤^{1,2}, 张晓华¹, 戴和平¹

1 中国科学院水生生物研究所 淡水生态和生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 为了实现特异性识别斑马鱼卵黄蛋白原的噬菌体展示单链抗体的可溶性表达, 将不能以可溶性蛋白形式表达的、只能以噬菌体展示形式特异性识别斑马鱼卵黄蛋白原的单链抗体 F5 的基因, 克隆到 pET 32a 载体并转化入大肠杆菌 ori DE3 中。结果表明, 通过诱导表达, 可获得可溶性的并且仍特异性识别斑马鱼卵黄蛋白原的单链抗体 32a-F5。噬菌体展示单链抗体不能可溶性表达是噬菌体展示技术应用中常见的问题, 该方法提供了一种表达可溶性单链抗体的可行性方案。

关键词: 噬菌体展示技术, 单链抗体, 可溶性表达, 大肠杆菌, 斑马鱼卵黄蛋白原

Strategy for soluble expression of phage-displayed scFv antibody specific for zebrafish vitellogenin

Yu Rao^{1,2}, Liqiao Zhong^{1,2}, Feng Zhang^{1,2}, Xiaohua Zhang¹, and Heping Dai¹

1 State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institution of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: We developed a new method for soluble expression of phage-displayed scFv antibody specific for zebrafish vitellogenin. The scFv antibody F5 could bind zebrafish vitellogenin specifically in phage-displayed form but not soluble form. The gene of scFv antibody F5 was cloned into vector pET 32a and transferred into *Escherichia coli* ori DE3. With inducible expression, soluble scFv antibody 32a-F5 was obtained successfully and could also specifically bind to zebrafish vitellogenin. The insoluble expression of phage-displayed scFv antibody was a common problem in the practical use of phage display. This study offered a feasible way to express soluble scFv antibodies with biological activity.

Keywords: phage display, scFv antibody, soluble expression, *Escherichia coli*, zebrafish vitellogenin

Received: March 26, 2011; **Accepted:** June 3, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 20977108), State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology (No. 2009FBZ08).

Corresponding author: Heping Dai. Tel/Fax: +86-27-68780716; E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 20977108), 淡水生态和生物技术国家重点实验室自主项目 (No. 2009FBZ08) 资助。

噬菌体展示单链抗体文库已广泛应用于靶分子的特异性抗体的淘选。噬菌体展示单链抗体文库中的抗体基因一般来源于真核生物(小鼠、骆驼、人等),受到稀有密码子、蛋白质修饰、蛋白质折叠和转运等方面的影响,有的抗体片段可能在原核生物大肠杆菌中难以正确表达、表达不完全或不能正确折叠等^[1-2]。在淘选数轮后,富集的噬菌体展示抗体片段不能可溶性表达,已成为噬菌体展示技术应用中经常遇到的问题。这个问题也经常困扰着本实验室,有时甚至阻碍实验的继续进行,但是鲜有文献报道该问题的解决方案。

本研究中的噬菌体单链抗体展示文库采用的是M13 丝状噬菌体展示系统^[3]。单链抗体克隆到噬菌粒载体 pCANTAB 5 E 上并在大肠杆菌 TG1 中表达。在噬菌粒 pCANTAB 5 E 中,单链抗体片段被插入到 M13 噬菌体外壳蛋白 p3 蛋白的信号肽和 p3 蛋白之间并带有识别标签。在插入的单链抗体与 p3 蛋白之间有一个琥珀终止子。TG1 为琥珀终止子抑制菌株,所表达的单链抗体有 20% 不与 p3 蛋白融合,在信号肽的引导下转运入周质空间,为可溶性蛋白形式的单链抗体 (Single-chain variable fragment antibody, scFv); 所表达的单链抗体 80% 与 p3 蛋白融合,并以 p3 蛋白为锚镶嵌在细胞膜上,当噬菌体进行组装的穿膜过程中,组装到成熟噬菌体表面,成为噬菌体展示形式的单链抗体 (Phage-displayed single-chain variable fragment antibody, phage-scFv)。在针对某一靶分子进行数轮淘选后,检测噬菌体展示形式的单链抗体或可溶性蛋白形式的单链抗体是否识别靶分子,鉴定出阳性克隆后进入下一步的分析与应用。

从理论上而言,每个 TG1 细菌都可以同时表达可溶性单链抗体和噬菌体展示形式的单链抗体,但实际上并非如此。本实验室在以斑马鱼卵黄蛋白原 (Zebrafish vitellogenin, z-Vtg) 为靶蛋白,利用鼠源噬菌体展示单链抗体文库进行 4 轮淘选后发现,所富集的噬菌体展示单链抗体均不能可溶性表达。在

探讨了不同表达条件的基础上,发现不能可溶性表达的单链抗体能够在载体 pET-32a 与大肠杆菌表达菌株 ori DE3 中实现可溶性表达,为上述问题提供了一可行性解决方案。

1 材料与amp;方法

1.1 质粒载体及菌种

库容量 1.3×10^{10} 的鼠源非免疫单链抗体噬菌体展示文库由本实验室构建^[4],噬菌体载体 pCANTAB 5 E 及其宿主菌大肠杆菌 TG1 购自 Pharmacia 公司。大肠杆菌表达载体 pET-32a 与大肠杆菌表达菌株 ori DE3 均购自 Novagen 公司。

1.2 实验试剂

限制性核酸内切酶 *Nco* I、*Not* I、*Eco*R I 和 *Xho* I 为 TaKaRa 公司产品, *Pyrobest* DNA 聚合酶为 TaKaRa 公司产品, T4 DNA 连接酶为 MBI 公司产品。HRP/Anti-M13 单克隆抗体购自 Novagen 公司,鼠抗 His tag 单克隆抗体为 Roche 公司产品,羊抗鼠 IgG/HRP conjugation 购自飞羿科技公司。DNA 胶回收试剂盒购自爱思进生物技术有限公司。大肠杆菌培养基 2YT、SOBAG、LB 配方见 Pharmacia 和 Novagen 公司说明书。PBSM 为含 4% 脱脂牛奶的 PBS 溶液, PBST 为含 0.1% Tween 20 的 PBS 溶液。Western blotting 反应底物 DAB 溶液组成: 10 mL Tris-HCl (pH 7.6, 浓度 50 mmol/L), 10 μ L H_2O_2 , 6 mg DAB。ELISA 底物 TMB 组成为: 0.1 mol/L 醋酸钠溶液 (pH 6), 1.5 mg TMB (溶于二甲亚砜), 10 μ L H_2O_2 , 加蒸馏水至终体积 25 mL。

1.3 淘选识别斑马鱼卵黄蛋白原 (z-Vtg) 的单链抗体

鼠源非免疫单链抗体噬菌体展示文库是以噬菌粒 pCANTAB 5 E 的形式保存在宿主菌中,在淘选前要将其拯救成 M13 噬菌体展示单链抗体形式的文库。拯救噬菌体文库的具体方法见 Barbas 等^[5]相关章节的叙述。纯化的 z-Vtg 由 Liao 等^[6]提供。将拯救的单链抗体噬菌体展示文库加入已包被有 50 μ g

纯 z-Vtg 且已用 PBSM 封闭过的免疫管中, 37 °C 保温 2 h。PBST 和 PBS 分别洗免疫管 20 次后, 加入新鲜制备的大肠杆菌 TG1 ($OD_{590}=0.5$) 于 37 °C 保温 1 h 后涂布 SOBAG 平板, 将平板置于 30 °C 生长过夜。第 2 天用 2YT-AG 培养基 (AG 表示含 100 mg/L 氨苄青霉素, 2% 葡萄糖) 刮下平板上的菌落, 拯救成噬菌体后进行下一轮淘选。

1.4 Dot blotting 检测

从每一轮淘选的平板上随机挑取 8 个单克隆至 96 孔细胞培养板培养, 诱导表达可溶性单链抗体, 可溶性单链抗体在大肠杆菌 TG1 中的诱导表达方法见文献[7]。该可溶性单链抗体带 6His-tag 标签。取诱导表达的可溶性单链抗体 4 μ L 点于硝酸纤维素膜上, 膜干后在 37 °C 用 4% PBSM 封闭 1 h; PBS 洗膜 3 次, 将膜浸入含有鼠抗 His-tag 单克隆抗体 (1:3 000) 的 PBSM 中, 37 °C 放置 1 h; PBST 和 PBS 分别洗膜 5 次, 将膜浸入含有羊抗鼠 Ig G/HRP (1:5 000) 的 PBSM 中, 37 °C 放置 1 h; PBST 和 PBS 分别洗膜 5 次, 将膜浸入到底物 DAB 溶液中显色。

同时, ELISA 鉴定这些单克隆抗体能否识别 z-Vtg, 方法同 1.5。

1.5 ELISA 鉴定阳性克隆

从最后一轮淘选的平板上随机挑取单克隆至 96 孔细胞培养板培养, 将其拯救为噬菌体展示单链抗体形式 (Phage-scFv)。ELISA 鉴定 phage-scFv 对 z-Vtg 的识别, 方法如下。将纯的 z-Vtg 用 PBS 稀释为 200 ng/mL, 加入 96 孔板, 每孔 100 μ L, 37 °C 包被 1 h; PBSM 封闭 1 h 后, 加入 100 μ L 含有待测 phage-scFv 的 PBSM, 37 °C 保温 1 h; PBST 和 PBS 分别洗 96 孔板 3 次后, 加入 100 μ L 含有 HRP/Anti-M13 单克隆抗体 (1:5 000) 的 PBSM, 37 °C 保温 1 h; PBST 和 PBS 再分别洗 96 孔板 3 次后, 加入 TMB 底物显色, 20 min 后用 25 μ L 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 酶标仪 450 nm 读数。

确定为阳性克隆后, 再诱导表达为可溶性单链抗体形式进行进一步分析, 可溶性单链抗体在大肠

杆菌 TG1 中的表达提取方法见文献[5]。

1.6 单链抗体 F5 基因的扩增

设计带有 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点的特异性引物, PCR 扩增单链抗体 F5 基因。引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 单链抗体 F5 基因 PCR 扩增引物

Table 1 PCR primers of scFv F5 gene

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward S1	CCG <u>G</u> AATTCATGGCCGAGGTGCAGCTGG
Reverse S2	CCG <u>C</u> TCGAGTTGCGGCCGCGCCTTGATTTC

The underline base is the site for restriction enzymes.

PCR 条件为: 94 °C 预变性 1 min; 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 1 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 切下目的带, DNA 胶回收试剂盒回收片段。

1.7 单链抗体 F5 的克隆与表达

将 PCR 扩增回收的 F5 片段经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后, 克隆到表达载体 pET-32a (带有 Trx Tag, His tag 和 S tag), 42 °C 热击转化到大肠杆菌 ori DE3 $CaCl_2$ 感受态中, 涂布 LB-AK 平板 (AK 表示含氨苄青霉素 50 μ g/mL, 卡那霉素 15 μ g/mL)。阳性克隆通过 PCR 和 DNA 测序确定。

将阳性克隆于 30 °C, 300 mL LB-AK 液体培养基中, 终浓度 1 mmol IPTG 诱导表达 10 h 后, 10 000 \times g 离心 10 min 收集菌液, 再用 6 mL 20 mmol Tris-HCl (pH 8.0) 重悬沉淀, 超声波破菌后, 10 000 \times g 离心收集上清。

1.8 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

将表达上清样品按常规方法进行 SDS-PAGE 分析, 分离胶浓度 12%, 浓缩胶浓度 5%, 恒定电压 160 V。将分离胶上蛋白电转移到硝酸纤维素膜上, 恒定电流 100 mA, 持续时间 1 h。转膜后将膜用 PBSM 在 37 °C 封闭 1 h; PBS 洗膜 3 次, 将膜浸入含有鼠抗 6His tag 单克隆抗体 (1:3 000) 的 PBSM 中, 37 °C 放置 1 h; PBST 和 PBS 分别洗膜 5 次, 将

膜浸入含有羊抗鼠 Ig G/HRP (1:5 000) 的 PBSM 中, 37 °C 放置 1 h; PBST 和 PBS 分别洗膜 5 次, 将膜浸入到底物 DAB 溶液中显色。

1.9 ELISA 检测 pET 32a 表达单链抗体 F5 识别 z-Vtg

将纯 z-Vtg 用 PBS 稀释为 25~20 000 ng/mL, 加入 96 孔板, 每孔 100 μ L, 37 °C 包被 1 h; PBSM 封闭 1 h 后, 加入 100 μ L 含有待测单链抗体的 PBSM, 37 °C 保温 1 h; PBST 和 PBS 分别洗 96 孔板 3 次后, 加入 100 μ L 含有鼠抗 6His-tag 单克隆抗体 (1:3 000) 的 PBSM, 37 °C 保温 1 h; PBST 和 PBS 分别洗 96 孔板 3 次后, 加入 100 μ L 含有羊抗鼠 Ig G (1:5 000) 的 PBSM, 37 °C 保温 1 h; PBST 和 PBS 再分别洗

96 孔板 3 次后, 加入 TMB 底物显色, 20 min 后用 25 μ L 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪 450 nm 读数。

2 结果

2.1 淘选识别斑马鱼卵黄蛋白原 (z-Vtg) 的单链抗体

每轮淘选完成后, 随机挑取阳性克隆, 进行单链抗体可溶性表达实验。然后提取周质空间, 检测可溶性单链抗体的表达量。Dot blotting 和 ELISA 结果表明 (图 1), 随着淘选轮数的增加, 能够识别 z-Vtg 的阳性克隆逐渐增加, 这说明淘选的过程是正常的; 但能够可溶性表达的单链抗体递减, 这说明所富集的 phage-scFv 均不易可溶性表达。

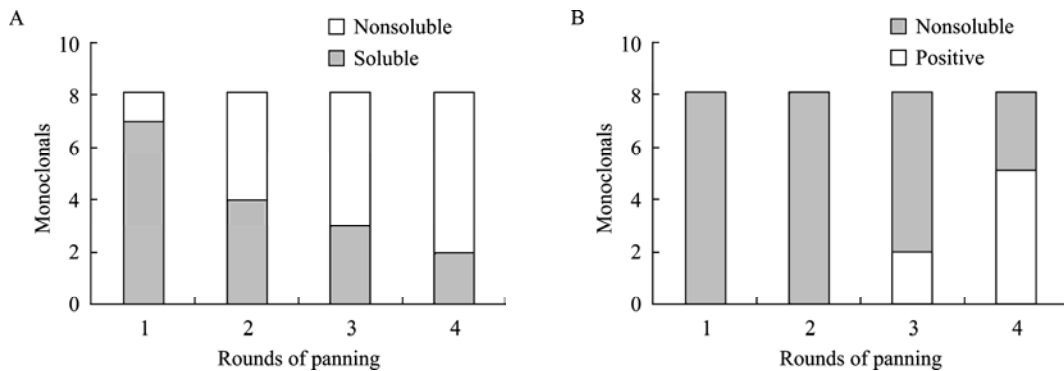


图 1 利用噬菌体单链抗体展示文库淘选 z-Vtg 特异性识别抗体

Fig. 1 Phage display scFv antibody was used to select antibody fragments for zebrafish vitellogenin detection. (A) The expression of scFv from each 4 rounds of panning. (B) The binding of z-Vtg with scFv from each 4 rounds of panning.

4 轮淘选后, ELISA 检测 phage-scFv 对 z-Vtg 的识别 (共检测 94 个), 阳性克隆率达到约 60%, 图 2 为 ELISA 检测时 OD₄₅₀ 高于 0.01 的 phage-scFv。将这些单链抗体在大肠杆菌 TG1 中进行可溶性表达, 发现周质空间中几乎没有可溶性单链抗体。选取 OD₄₅₀ 值较高的单链抗体 F5 作进一步分析, 如图 3 所示, SDS-PAGE 结果显示在 TG1 细胞质和包涵体中均有少量的单链抗体 F5, 这说明单链抗体 F5 在 TG1 中表达量很少、可溶性小且不能转移到周质空间进行正确的折叠 (形成二硫键)。ELISA 结果显示细胞质中的单链抗体 F5 不能识别 z-Vtg (结果未显示)。

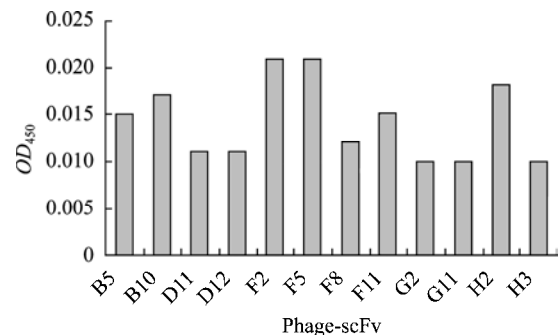


图 2 噬菌体展示单链抗体 (phage-scFv) 对斑马鱼卵黄蛋白原 (z-Vtg) 的识别

Fig. 2 Binding of the phage-scFv antibodies to zebrafish vitellogenin (z-Vtg).

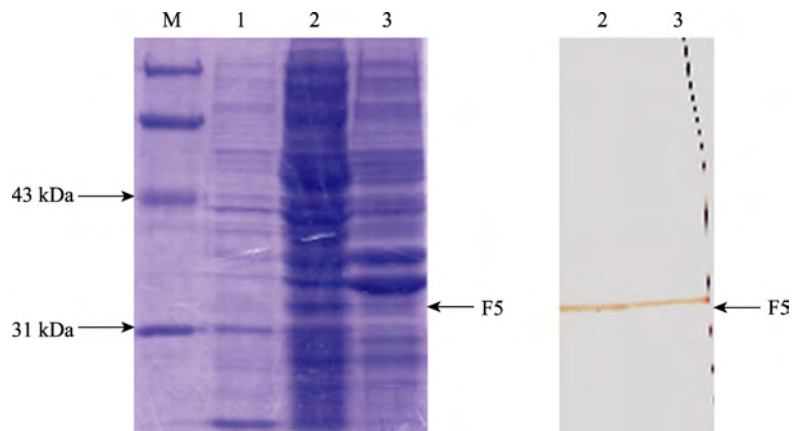


图 3 SDS-PAGE 与 Western blotting 分析在载体 pCANTAB 5 E 和大肠杆菌 TG1 中表达的单链抗体 F5
 Fig. 3 SDS-PAGE and Western blotting analysis of scFv F5 expressed in vector pCANTAB 5 E and *E. coli* TG1. M: protein marker; 1: periplasm; 2: cytoplasm; 3: inclusion bodies.

```

1   ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG
1   M A E V Q L V E S G G G L V K P G G S L

61  AAA CTC TCA TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AAT ACC TAC GCC ATG AAC TGG GTC CGC
21  K L S C A A S G F T F N T Y A M N W V R

121 CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTG GAA TGG GTT GCT CGC ATA AGA AGT AAA AGT AAT AAT TAT
41  Q A P G K G L E W V A R I R S K S N N Y

181 GCA ACA TAT TAT GCC GAT TCA GTG AAA GAC AGG TTC ACC ATC TCC AGA GAT GAT TCA CAA
61  A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S Q

241 AGC ATG CTC TAT CTG CAA ATG AAC AAC TTG AAA ACT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TAC TGT
81  S M L Y L Q M N N L K T E D T A M Y Y C

301 GTG AGA GGG GAT GGT AAA TGG GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTG
101 V R G D G K W A M D Y W G Q G T S V T V

361 TCG ACA GGT GGA GGC GGC TCT GGT GGC GGT GGC AGT GGC GGC GGA GGT TCT GAC GTC GTG
121 S T G G G G S G G G G S G G G G S D V V

421 ATG ACC CAG TCT CCA GCA TCC CTG TCC ATG GCT ATA GGA GAAAAA GTC ACC ATC AGA TGC
141 M T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C

481 ATA ACC AGC ACT GAT ATT GAT GAT GAT ATG AAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGG GAA CCT
161 I T S T D I D D D M N W Y Q Q K P G E P

541 CCT AAG CTC CTT ATT TCA GAA GGC AAT ACT CTT CGT CCT GGA GTC CCA TCC CGA TTC TCC
181 P K L L I S E G N T L R P G V P S R F S

601 AGC GGT GGC TAT GGC ACA GAT TTT GTT TTT ACA ATT GAA AAC ACG CTC TCA GAA GAT GTT
201 S G G Y G T D F V F T I E N T L S E D V

661 GCA GAT TAC TAC TGT TTG CAA AGT GAT AAC ATG CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC AAG
221 A D Y Y C L Q S D N M P L T F G A G T K

721 CTG GAA ATC AAG CGC GCG GCC GCA
241 L E I K R A A A
    
```

图 4 单链抗体 F5 的 DNA 序列 (GenBank Accession No. JF710268)
 Fig. 4 DNA sequence of scFv antibody F5 (GenBank Accession No. JF710268). The real line squares show the rare Arg codons. The dashed squares show the rare Ile codon.

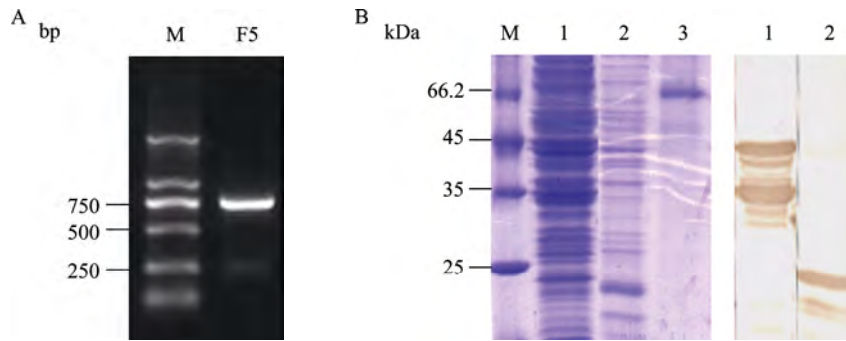


图5 单链抗体 F5 的克隆与表达

Fig. 5 Cloning and expression of scFv antibody F5. (A) DNA agarose gel electrophoresis of F5. (B) SDS-PAGE and Western blotting analysis of 32a-F5 protein expressed in *E. coli* ori DE3. M: protein marker; 1: 32a-F5; 2: 32a vector without any DNA insert; 3: 2.5 μ g BSA.

2.2 单链抗体 F5 基因的克隆与表达

DNA 测序得到单链抗体 F5 的编码序列如图 4。设计引物 PCR 扩增的 F5 基因片段 (744 bp) (图 5A), 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后插入 pET 32a 载体中, 转化到大肠杆菌 ori DE3 中进行表达。将诱导后破菌上清进行分析, 结果显示 32a-F5 在大肠杆菌 ori DE3 细胞质中以可溶性蛋白的形式大量表达 (图 5B)。利用生物学图像分析软件 Gel-Pro analyzer 对图 5B 中 SDS-PAGE 电泳图进行定性定量分析, 单链抗体 32a-F5 分子量为 45 kDa, 占细胞破菌上清总蛋白量约 6.8%, 表达量为 2.8 mg/L (蛋白含量/培养基体积)。Western blotting 结果显示, 45 kDa 条带下面同时有约 35 kDa 等杂带表达。这可能是由于稀有密码子导致的 32a-F5 未能完全表达的片段。

序列分析发现, 单链抗体 F5 基因中含有稀有密码子精氨酸 (R) 和异亮氨酸 (I) (图 4)。单链抗体 F5 片段的理论分子量为 27.5 kDa, 与单链抗体 F5 融合表达的 pET-32a 载体部分的理论分子量为 17 kDa。假设单链抗体 32a-F5 在表达时一旦遇到精氨酸稀有密码子就可能停止翻译, 那么所表达的蛋白片段的分子量依次为 23、24.7、25.3、28.3、34.5、41 kDa。假设单链抗体 32a-F5 在表达时一旦遇到异亮氨酸稀有密码子就可能停止翻译, 所表达的蛋白

片段的分子量依次为 24.5、33.9、34.9 kDa。可以看出, 位于单链抗体 F5 编码序列 159 位的精氨酸密码子 (AGA) 和 161 位的异亮氨酸密码子 (ATA), 两个紧密相连的稀有密码子对单链抗体 32a-F5 不能完全表达的影响较大, 富集了大量的不完全表达蛋白 (35 kDa)。

2.3 单链抗体 32a-F5 对 z-Vtg 的识别

单链抗体 32a-F5 可特异性识别 z-Vtg, 图 6 为 32a-F5 识别 z-Vtg 标准曲线。32a-F5 识别 z-Vtg 标准曲线公式为 $y=0.0002x-0.013$ ($R^2=0.9899$), 最低检测浓度为 65 ng/mL。

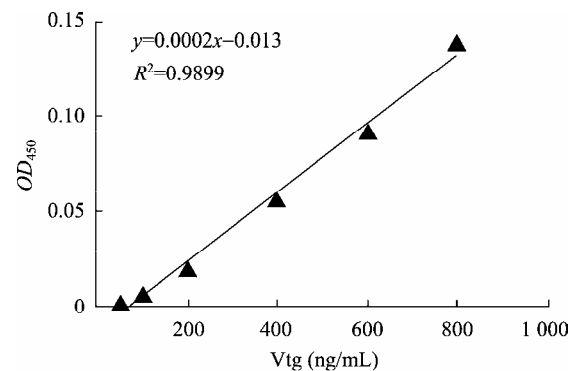


图6 单链抗体 32a-F5 识别 z-Vtg 标准曲线

Fig. 6 Standard curve of direct ELISA with scFv antibody 32a-F5 against purified z-Vtg. ScFv antibody 32a-F5 was 0.23 mg/mL.

3 讨论

噬菌体展示单链抗体不能可溶性表达是噬菌体展示技术应用中经常遇到的问题, 虽然与此相关的报道很少, 但却是单链抗体的发展和应用中不容忽视的问题。本研究中利用鼠源非免疫噬菌体展示单链抗体文库淘选特异性识别 z-Vtg 的单链抗体, 4 轮淘选后, 发现所富集的噬菌体展示单链抗体均不能在大肠杆菌 TG1 中可溶性表达。进一步研究发现, 识别 z-Vtg 的噬菌体展示单链抗体 F5 在大肠杆菌 TG1 细胞质中只有少量可溶性表达, 并且不能转移到周质空间进行正确的折叠 (形成二硫键)。鼠源的单链抗体 F5 基因中的 9 个稀有密码子是造成单链抗体表达量低的原因之一, 已有报道当含有超过 8~9 个精氨酸密码子, 蛋白质的表达将会减少甚至停止^[8-9]; 其次, 噬菌体展示单链抗体 F5 与 M13 噬菌体 p3 蛋白融合表达, 增加了可溶性; 当单链抗体 F5 单独表达时, 可溶性大大降低, 易形成包涵体; 另外, 单链抗体的空间结构中应该形成 4 个二硫键, 重链与轻链各两个。单链抗体在大肠杆菌细胞质的还原环境下, 不能形成二硫键, 影响了单链抗体的空间构象^[10], 导致胞内表达的单链抗体 F5 不能识别 z-Vtg (结果未出示)。

已有报道单链抗体表达有多种方法, 除在大肠杆菌中, 在哺乳动物细胞^[11]、昆虫^[12]、酵母^[13]、植物细胞^[14]和真菌^[15]中都可表达, 但大肠杆菌表达单链抗体最简单快速和产量高, 仍被认为是表达抗体片段的最佳选择^[16-17]。常见的在大肠杆菌中表达单链抗体的载体有 pET-22b^[18]、pET-25b^[19]、pET-26b^[20]等, 表达菌株一般为大肠杆菌 BL21。单链抗体 F5 曾尝试克隆到载体 pET-22b 中并在菌株 BL21 中表达 (结果未显示), 但没有得到可溶性的、且有活性的单链抗体, 这可能是因为 pET-22b 载体仅有 His-tag 与单链抗体 F5 融合表达, 不能提高其可溶性。还未有报道在载体 pET32 和大肠杆菌 ori DE3 中表达单链抗体。

本研究将单链抗体 F5 基因克隆到载体 pET-32a 并转化入大肠杆菌 ori DE3 中。通过诱导表达, 获得了可溶性的、并且仍可特异性识别斑马鱼卵黄蛋白原的单链抗体 32a-F5。pET 质粒载体上, 受噬菌体 T7 强转录及翻译信号控制, 充分诱导时, 几乎所有的细胞资源都用于表达目的蛋白; 诱导表达几小时后, 目的蛋白通常可以占到细胞总蛋白的 50% 以上 (方法参见 pET 系统操作手册)。pET-32a 载体带有硫氧还蛋白 (Trx-tag), his-tag 和 S-tag 融合与单链抗体 N 端融合表达。硫氧还蛋白能够增加融合蛋白的可溶性, 并且具有伴侣蛋白的功能, 能够驱动二硫键形成, 特别是在 trxB 和 trxB/gor 宿主菌中。ori DE3 菌株细胞质二硫化物还原途径有 2 个突变位点 (即 trxB 和 trxB/gor), 增加了大肠杆菌细胞质中二硫键的形成机率。因此, pET-32a 载体和大肠杆菌 ori DE3 是表达可溶性的、并且能够正确形成二硫键的单链抗体的理想组合, 适用于各种单链抗体的诱导表达。本研究提供了一种表达可溶性单链抗体的新方法。

REFERENCES

- [1] Arbabi-Ghahroudi M, Tanha J, MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metast Rev*, 2005, 24(4): 501-519.
- [2] Tiwari A, Sankhyan A, Khanna N, et al. Enhanced periplasmic expression of high affinity humanized scFv against Hepatitis B surface antigen by codon optimization. *Protein Expres Purif*, 2010, 74(2): 272-279.
- [3] Dai HP, Gao H, Zhao XY. Phage display technology principle and method. *Acta Hydrobiol Sin*, 2002, 26(4): 400-409.
戴和平, 高宏, 赵新颜. 噬菌体展示技术的原理和方法. *水生生物学报*, 2002, 26(4): 400-409.
- [4] Rao Y, Zhong LQ, Liao T, et al. Novel recombinant monoclonal antibodies for vitellogenin assays in cyprinid fish species. *Dis Aquat Organ*, 2010, 93(1): 83-91.
- [5] Barbas CF III, Burton DR, Scott JK, et al. *Phage Display-A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 9.23-9.35.

- [6] Liao T, Jin SW, Yang FX, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for rare minnow (*Gobiocypris rarus*) vitellogenin and comparison of vitellogenin responses in rare minnow and zebrafish (*Danio rerio*). *Sci Total Environ*, 2006, 364(1/3): 284–294.
- [7] Zhang XH, Dai LF, Dai HP. Studies on expression and biochemical characteristics of single chain fragment variable A1 against White Spot Syndrome Virus of shrimp. *Acta Hydrobiol Sin*, 2006, 30(2): 141–145.
张晓华, 戴玲芬, 戴和平. 抗对虾白斑综合症病毒的单链抗体 A1 的表达和生物化学特性. *水生生物学报*, 2006, 30(2): 141–145.
- [8] Wakagi T, Oshima T, Imamura H, et al. Cloning of the gene for inorganic pyrophosphatase from a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7, and overproduction of the enzyme by coexpression of tRNA for arginine rare codon. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1998, 62(12): 2408–2414.
- [9] Schenk PM, Baumann S, Mattes R, et al. Improved high-level expression system for eukaryotic genes in *Escherichia coli* using T7 RNA polymerase and rare Arg tRNAs. *Biotechniques*, 1995, 19(2): 196–198.
- [10] Xiong S, Zhang MY, Qian CW, et al. Influence of the reductase deficient *Escherichia coli* on the solubility of recombinant proteins produced in it. *Chin J Biotech*, 2003, 19(6): 686–691.
熊盛, 张美英, 钱垂文, 等. 还原酶缺陷型大肠杆菌对重组蛋白溶解性的影响. *生物工程学报*, 2003, 19(6): 686–691.
- [11] Jones D, Kroos N, Anema R, et al. High-level expression of recombinant IgG in the human cell line PER.C6. *Biotechnol Prog*, 2003, 19(1): 163–168.
- [12] Zhu Y, Zhen FF, Chen YJ, et al. Construction of anti-CD28 single chain antibodies genes and expression of the ScFv in BmN cells and the larvae of *Bombyx mori*. *Chin J Biotech*, 2007, 23(4): 577–583.
朱艳, 郑峰丰, 陈永井, 等. 抗人 CD28 单链抗体基因的构建及在 BmN 细胞和家蚕中的表达. *生物工程学报*, 2007, 23(4): 577–583.
- [13] Yang Y, Zhang M, Yuan L, et al. Expression of single chain fragment variable PID3 antibody against shrimp white spot syndrome virus in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2006, 22(6): 973–978.
杨毅, 张敏, 袁丽, 等. 抗对虾白斑综合症病毒单链抗体 PID3 基因在毕赤酵母中的分泌表达. *生物工程学报*, 2006, 22(6): 973–978.
- [14] Bakker H, Bardor M, Molthoff JW, et al. Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(5): 2899–2904.
- [15] Axford J, Gerngross T. Production of complex human glycoproteins in yeast// *Glycobiology and Medicine*. Netherlands: Springer, 2005, 564: 139.
- [16] Andersen DC, Reilly DE. Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments. *Curr Opin Biotech*, 2004, 15(5): 456–462.
- [17] Miller KD, Weaver-Feldhaus J, Gray SA, et al. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. *Protein Express Purif*, 2005, 42(2): 255–267.
- [18] Tiwari A, Sankhyan A, Khanna N, et al. Enhanced periplasmic expression of high affinity humanized scFv against Hepatitis B surface antigen by codon optimization. *Protein Express Purif*, 2010, 74(2): 272–279.
- [19] Levy R, Molineux IJ, Iverson BL, et al. Isolation of *trans*-acting genes that enhance soluble expression of scFv antibodies in the *E. coli* cytoplasm by lambda phage display. *J Immunol Methods*, 2007, 321(1/2): 164–173.
- [20] Wu S, Ke A, Doudna JA. A fast and efficient procedure to produce scFvs specific for large macromolecular complexes. *J Immunol Methods*, 2007, 318(1/2): 95–101.