

抗 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素单链抗体基因的克隆和表达

赵宝华¹ 许崇波²

¹(河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016)

²(解放军军需大学军事兽医研究所, 长春 130062)

摘 要 应用 RT-PCR 技术, 从分泌具有中和活性的抗 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素单克隆抗体的杂交瘤细胞中, 扩增出抗体 V_H 和 V_L 基因, 连接成 ScFv 基因, 并将其克隆至 pGEM-T 载体中构建了重组质粒 pXScFv-2E3。经序列分析证实, V_H 和 V_L 基因及 linker 基因拼接正确, 基因全长为 726bp, 编码 242 个氨基酸。随后将其定向克隆于表达载体 pHOG21, 转化至大肠杆菌 XL1-BLUE 筛选出表达菌株 XL1-BLUE(pHOG-2E3)。经 ELISA 和 SDS-PAGE 分析表明, 在 20℃ 用 IPTG 诱导培养时, 表达的 ScFv 蛋白占菌体总蛋白的 25%。并且 ScFv 基因表达产物能够中和 α 毒素的磷酸酯酶 C 活性。

关键词 A 型产气荚膜梭菌, α 毒素, 单链抗体, 基因克隆, 基因表达, 中和效应

中图分类号 Q503 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0543-05

α 毒素是 A 型产气荚膜梭菌所致创伤性气性坏疽的主要致病因子, 至今尚无有效的防治方法。许崇波等^[1,2] 在克隆和高效表达 α 毒素保护性抗原基因基础上, 又制备了具有中和 α 毒素活性的单克隆抗体(McAb)2E3^[3], 但由于这种 McAb 是鼠源性的, 难以用于临床。因此本文在上述研究的基础上, 从分泌具有中和 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素活性的 McAb 杂交瘤细胞株 2E3 中克隆了其抗体可变区 V_H 和 V_L 基因, 组装成单链抗体(ScFv)基因, 并构建了 ScFv 基因高效表达载体, 其表达产物能够中和 α 毒素活性, 这为将来用于临床 α 毒素中毒的治疗开辟了一条新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞株、菌株与质粒: 分泌具有中和活性的抗 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素 McAb 杂交瘤细胞株 2E3, 系许崇波等构建^[3]; 载体 pHOG21 由 Melvyn Little 博士惠赠^[4]; 受体菌 XL1-BLUE 由本室保存。限制酶和 DL2000 DNA marker 购自 TaKaRa 公司; pGEM-T 载体, Taq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、dNTPs、RNA-gents Total RNA Isolation System、RANGents Total RNA

Isolation System、Wizard PCR Preps DNA Purification System 等购自 Promega 公司; Mouse ScFv Module/Recombinant Phage Antibody System 购自 Pharmacia 公司。

1.2 方法

1.2.1 杂交瘤细胞总 RNA 的提取: 收集培养的杂交瘤细胞按 RNAgents Total RNA Isolation System 和 PolyAtract mRNA Isolation System IV 提供的方法提取细胞总 RNA 和分离纯化 mRNA。

1.2.2 cDNA 第一条链的合成: 按 Mouse ScFv Module/Recombinant Phage Antibody System 提供的方法, 在反转录酶作用下合成 cDNA。

1.2.3 V_H 和 V_L 基因的 PCR 扩增及其产物纯化: 分别取上述合成 cDNA 产物 33 μ L, 然后在第 1 个管中加入 V_L 基因引物 2 μ L, 双馏水 64 μ L; 在第 2 个管中加入 V_H 基因引物 1 和 2 各 2 μ L, 双馏水 62 μ L; 在 2 管中分别加入 100 μ L 石蜡油, 于 95℃ 变性 5min, 在油面下加入 1 μ L Taq DNA 聚合酶(3u/ μ L), 以“94℃ 1min \rightarrow 55℃ 2min \rightarrow 72℃ 2min”的 PCR 方式, 作用 30 个循环, 以 2% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增效果。采用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 回收 V_H 和 V_L 可变区基因产物。

收稿日期: 2001-02-30, 修回日期: 2001-05-20。

基金项目: 全军医药卫生科研基金资助(98Q076)

* 通讯作者。Tel: 86-0431-7973911-66756; Fax: 86-0431-7997187; E-mail: xcb921@sohu.com

1.2.4 ScFv 基因的组装和扩增:取回收的 V_H 和 V_L 基因片段各 $18.5\mu\text{L}$, 加 Linker Primer Mix $4\mu\text{L}$, 10 mmol/L dNTP $6\mu\text{L}$, 25 mmol/L MgCl_2 $6\mu\text{L}$, 10 倍 PCR buffer $6\mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶 $1\mu\text{L}$, 进行 7 次 PCR 循环 (94°C 1 min, 63°C 4min), 将 V_H 和 V_L 基因拼接为 ScFv 基因。在上述反应体系中, 再加入 RS Primer Mix $4\mu\text{L}$, 10 mmol/L dNTP $2\mu\text{L}$, 25 mmol/L MgCl_2 $5\mu\text{L}$, 10 倍 PCR buffer $5\mu\text{L}$, Taq DNA 聚合酶 $1\mu\text{L}$, 进行 30 次 PCR 循环 (94°C 1min \rightarrow 55°C 2min \rightarrow 72°C 2min), 可在 ScFv 基因两端分别加入 *Sfi*I 和 *Not*I 酶切位点。采用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 回收 ScFv 基因产物。

1.2.5 ScFv 基因的克隆及序列测定:利用 pGEM-T 载体系统, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 将 ScFv 基因片段与载体连接, 并转化受体菌 DH5 α ^[5]。提取质粒并进行酶切鉴定, 然后将克隆的 ScFv 基因质粒用 ABI 377 全自动荧光 DNA 序列分析仪进行测定。

1.2.6 PCR 设计程序:根据实验目的, 设计了 2 条引物。

上游引物序列: 5'-CATGCCATGGCCCAGGTGAAGCTGCAG-3'

下游引物序列: 5'-CGCGGATCCTTCCAGCTTGCTCCCC-3'

在 2 条引物上分别设计了限制性酶切位点 (*Nco*I 和 *Bam*HI), 以便于定向克隆, PCR 实验按常规方法进行。

1.2.7 ScFv 基因表达载体的构建:按分子克隆手册的方法进行^[5]。

1.2.8 表达产物的分析:①重组菌株的诱导表达。分别挑取重组菌株的单菌落, 接种于 5 mL LB 培养基中, 37°C 振荡培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$, 然后接种于含 0.1 mg/L 氨苄青霉素 LB 培养基中, 37°C 200 r/min 振荡培养至 $OD_{600} = 0.8$, 加入终浓度 1 mmol/L IPTG, 在 20°C 200 r/min 振荡培养 10 h , 4°C 10000 r/min 离心 5 min 分别收集菌体和上清。②表达产物的间接 ELISA 法检测和 SDS-PAGE 分析。参照文献介绍的方法进行^[6]。③表达产物的中和活性测定。在 0.5 mL Eppendorf 管中加入 $300\mu\text{L}$ 培养上清液或菌体裂解上清液, 再加 $100\mu\text{L}$ α 毒素混匀后, 于 37°C 作用 2 h , 然后加入 $100\mu\text{L}$ 卵黄稀释液, 再于 37°C 保温 24 h 后, 观察是否有浑浊环出现。

2 结 果

2.1 抗 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素 ScFv 基因的克隆

2.1.1 V_H 和 V_L 基因的扩增:

从杂交瘤细胞中提取总 RNA, 并分离出 mRNA, 以此作为模板合成了 cDNA。并以合成的 cDNA 为模板, 用 PCR 扩增出 V_H 和 V_L 基因, 各取 $5\mu\text{L}$ PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 得到了 390 bp 左右的 V_H 基因带和 350 bp 左右的 V_L 基因带 (见图 1), 与以往相关报道相符。

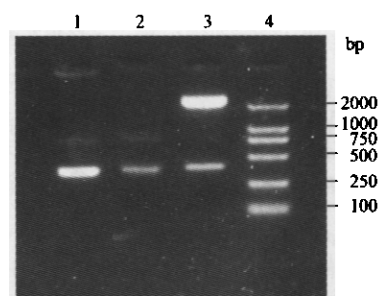


图 1 V_H 和 V_L 基因扩增产物的鉴定

Fig.1 Identification of amplified products of V_H and V_L genes

1. V_L gene PCR product; 2. V_H gene PCR product;
3. pUC18/ V_H marker; 4. Marker

2.1.2 ScFv 基因的组装与扩增:将回收的 V_H 和 V_L 基因用 Linker 连接成 ScFv 基因, 以此为模板加入 RS Primer Mix 进行 PCR 扩增, 扩增的产物大小为 750 bp 左右 (见图 2), 表明可能获得了完整的 ScFv 基因并引入了 *Sfi*I 和 *Not*I 酶切位点。

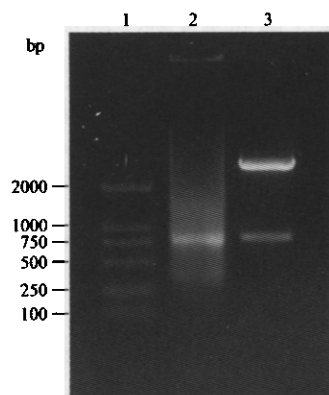


图 2 ScFv 基因的 PCR 扩增产物鉴定

Fig.2 Identification of amplified products of ScFv gene

1. DL2000 DNA marker; 2. ScFv gene PCR product;
3. pUC18/ScFv marker

2.1.3 ScFv 基因的克隆:采用 pGEM-T 载体与 ScFv 基因连接, 转化受体菌 JM105, 用 IPTG/X-gal 琼脂平板蓝白菌落筛选, 随机挑取白色菌落, 提取质粒后进行 *Sfi*I 和 *Not*I 双酶切鉴定, 结果切出 730 bp 左右的外源基因片段, 表明克隆质粒中含有 ScFv 基因片段 (见图 3), 并将其命名为 pXScFv-2E3。

2.2 ScFv 基因的序列分析

如图 4 所示, ScFv 基因全长为 726 bp , 包括预期

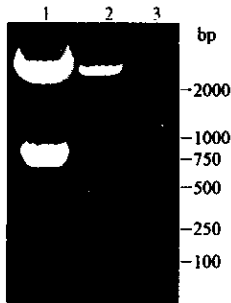


图 3 重组质粒 pXScFv-2E3 的酶切鉴定
Fig.3 Identification of pXScFv-2E3 by restriction
endonucleases-digested DNAs

1. pXScFv/ *Sfi*I + *Not*I; 2. pUC18/ScFv marker;
3. DL2000 DNA marker

CAG GTG AAG CTG CAG GAG ACT GGA CCT GAA GTG GTA AAG CCT GGG GCT TCA GTG AAG TTG 60
Gln Val Lys Leu Gln Glu Thr Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu

TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ATC TTC ACA AGT TAT GAT ATA AAC TGG GTG AGG CAG ACG 120
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Thr
V_H-CDR1

CCT GAA CAG GGA CTT GAG TGG ATT GGA TGG ATT TTT CCT GGA GAG GGG AGT ACT GAA TAC 180
Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Ile Phe Pro Gly Glu Gly Ser Thr Glu Tyr
V_H-CDR2

AAT GAG AAG TTC AAG GGC AGG GCC ACA CTG AGT GTA GAC AAG TCC TCC AGC ACA GCC TAT 240
Asn Glu Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

ATG GAG CTC ACT AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCT GTC TAT TTC TGT GCT AGA GGC GAC 300
Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp

TAC TAT AGG CGC TAT TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GGT 360
Tyr Tyr Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
V_H-CDR3

GGA GGC GCT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC GAG CTC ACT CAG 420
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln
Linker

TCT CCA GCT TCC TTA GCT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC ACC ATC TCA TAC AGG GCC AGC 480
Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Ser

AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAT AGT TAT ATG CAC TGG AAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG 540
Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln
V_L-CDR1

CCA CCC AGA CTC CTC ATC TAT CTT GTA TCC AAC CTA GAA TCT GGA GTC CCT GCC AGG TTC 600
Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
V_L-CDR2

AGT GGC AGT GGG TCT GGC ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT 660
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp

TAC TGT GCT TAT GCA ACC CAG CAC ATT AGG GAG CTT ACA CGT TCG GAG GGG GGA CCA AGC 720
Ala Ala Thr Tyr Tyr Gln Gln Gln Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser Glu Gly Gly Pro Ser
V_L-CDR3

TGG AAA 726
Trp Lys

图 4 抗 α 毒素 ScFv 基因的核苷酸序列及预测的氨基酸序列

Fig.4 Nucleotide sequences and estimated amino acid sequences of ScFv gene against alpha-toxin

*Pst*I 和 *Nco*I + *Bam*HI 进行酶切鉴定,结果切出了 730bp 片段,表明已构建的表达质粒含 ScFv 基因。

重组质粒命名为 pHOG-2E3。经序列测定表明与原序列一致。

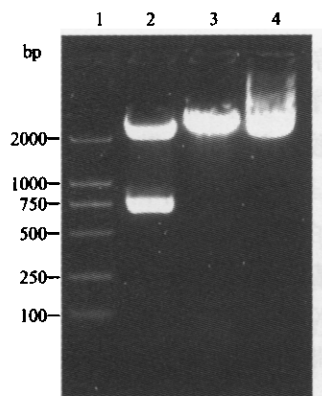


图 5 重组表达质粒 pHOG-2E3 的酶切鉴定
Fig.5 Identification of pHOG-2E3 by restriction
endonucleases-digested expression plasmid
1. DL2000 DNA marker; 2. pHOG-2E3/*Nco*I + *Bam*HI;
3. pHOG-2E3/*pst*I; 4. pHOG-2E3

2.4 ScFv 基因表达产物的分析

2.4.1 间接 ELISA 检测表达产物:以 α 毒素为抗原,抗 α 毒素单克隆抗体作阳性对照,分别将培养上清和菌体裂解上清进行 ELISA 检测,结果如表 1 所示。可初步判定表达的蛋白存在于重组菌株 XL1-BLUE(pHOG-2E3)的菌培养上清及胞周质中。

表 1 表达产物的 ELISA 测定结果

Treatment samples	ELISA results(OD)
2E3 McAb	0.67
Culture supernatant of XL1-BLUE(pHOG-2E3)	0.56
Soluble periplasmic content of XL1-BLUE(pHOG-2E3)	0.33
Culture supernatant of XL1-BLUE(pHOG21)	0.02
Soluble periplasmic content of XL1-BLUE(pHOG21)	—

2.4.2 表达产物的 SDS-PAGE 方法分析:分别将经 IPTG 诱导的重组菌株 XL1-BLUE(pHOG-2E3)和对照菌株 XL1-BLUE(pHOG21)与标准分子量作对照,进行 SDS-PAGE 分析,结果发现重组菌株 XL1-BLUE(pHOG-2E3)表达的 ScFv 蛋白主要形成了包含体;但在重组菌株的胞周质中出现了 31kD 的特异带,如图 6 所示,用薄层扫描仪分析结果表明重组菌株表达的目的蛋白占菌体总蛋白的 25%,其中在胞周质中表达的 ScFv 蛋白占菌体可溶性蛋白的 4%。

2.4.3 表达产物中和活性的测定:结果见表 1,进一步说明重组菌株的菌体裂解上清及培养上清中含有中和 α 毒素活性的 ScFv。

3 讨 论

A 型产气荚膜梭菌 α 毒素中毒,至今尚无有效

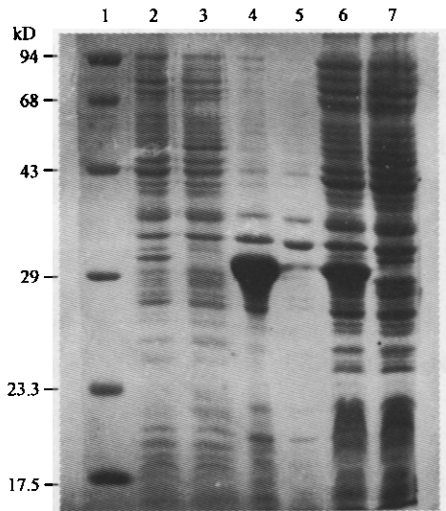


图 6 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of the expressed products

1.Low molecular protein marker;2.Soluble periplasmic content of XL1-BLUE (pHOG-2E3); 3. Soluble periplasmic content of XL1-BLUE (pHOG21);4.Precipitation of lysate of XL1-BLUE(pHOG-2E3);5. Precipitation of lysate of XL1-BLUE(pHOG21);6. Total cell lysate of XL1-BLUE(pHOG-2E3);7.Total cell lysate of XL1-BLUE(pHOG21)

表 2 表达产物的中和活性实验结果

Table 2 Detection results of neutralization activities
of the expressed products

Treatment samples	Neutralization activities of phospholipase C
Culture supernatant of XL1-BLUE (pHOG-2E3)	+
Soluble periplasmic content of XL1-BLUE (pHOG-2E3)	+
Culture supernatant of XL1-BLUE (pHOG21)	-
Soluble periplasmic content of XL1-BLUE (pHOG21)	-
2E3 McAb	+
saline water	-

+ : With turbid ring; - : Without turbid ring

的治疗方法,许崇波等在克隆了 α 毒素保护性抗原的基础上,利用杂交瘤细胞技术成功地研制了抗 α 毒素的单克隆抗体。但这种单克隆抗体是鼠源性的,难以用于临床,为解决这一问题,我们从具有中和 α 毒素活性的杂交瘤细胞株 2E3 克隆了其单链抗体基因。结果表明: V_H 和 V_L 基因及 linker 基因拼接正确,ScFv 基因全长为 726bp,编码 242 个氨基酸, V_H 基因序列位于 Linker 的上游,大小为 357bp,编码 119 个氨基酸残基; V_L 基因序列位于 Linker 的下游,含有 324bp,编码 108 个氨基酸残基;Linker 基因大

小为45bp,编码15个氨基酸残基(Gly₄Ser)₃;ScFv基因的V_H和V_L基因分别属于鼠免疫球蛋白重链II(B)和轻链 κ III家族。本研究将单链抗体基因克隆到pHOG21载体中,转化至大肠杆菌中,分别用间接ELISA方法和SDS-PAGE方法检测了单链抗体基因的表达产物,经IPTG诱导后,表达的ScFv蛋白占菌体总蛋白的25%,表达在重组菌株菌胞周质和培养上清中的目的蛋白ScFv具有中和磷脂酶C的活性,这为进一步研究ScFv的纯化及其生物学活性打下了基础,为将来临床治疗 α 毒素中毒开辟了新途径。

REFERENCES(参考文献)

- [1] XU CB(许崇波),ZHU P(朱平),YAO XY(姚湘燕) *et al.* Cloning and nucleotide sequence of protective antigen gene for alpha-toxin of *Clostridium perfringens*. *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报),1998,18(2):140~143.
- [2] XU CB(许崇波),ZHU P(朱平),YAO XY(姚湘燕) *et al.* Optimized expression in *E. coli* of protective antigen gene for alpha-toxin of *Clostridium perfringens*. *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报),1998,18(2):140~143.
- [3] XU CB(许崇波),ZHU P(朱平),Ma CL(马丛林) *et al.* Establishment of hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against alpha-toxin of *Clostridium perfringens* type-A and neutralization effect of produced McAbs. *Journal of Cellular and molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志),1999,15(1):62~66.
- [4] Sergey M K, Gerhard M, Little M. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale *Escherichia coli* cultures. *Journal of Immunological Methods*.1997,200:63~69.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York, 1989.
- [6] SONG LX(宋林霞),YU WY(俞炜源). Construction and expression of Anticolonic Cancer ScFv Fragment. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报),2000,16(1):82~85.

Cloning and Expression of ScFv Gene Against Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* Type A

ZHAO Bao-Hua¹ XU Chong-Bo^{2*}

¹(College of life science, Hebei Normal university, shijiazhuang 050016, China)

²(The Military Veterinary Institute, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract The V_H and V_L genes from a hybridoma cell line producing mouse McAb against alpha-toxin of *Clostridium perfringens* type A were amplified by RT-PCR. The V_H and V_L genes were connected through a flexible linker (Gly₄Ser)₃ and the V_H-linker-V_L(ScFv) gene was cloned into a vector pGEM-T. The ScFv gene consists of 726bp encoding 242 amino acid residues. Both V_H and V_L genes were confirmed as functionally rearranged mouse immunoglobulin variable region. According to kabat classed method, the V_H and V_L gene segments belong to mouse Ig heavy chain subgroup II(B) and κ light chain subgroup III respectively. The ScFv gene was amplified inserted the expression vector pHOG21 and transformed into *E. coli* XL1-BLUE. The ScFv protein was highly expressed in recombinant strain XL1-BLUE (pHOG-2E3) and the expression level of the ScFv was about 25% of total bacteria protein by SDS-PAGE. The neutralization assay showed that the expressed ScFv protein could neutralize the phospholipase C activities of alpha-toxin.

Key words *Clostridium perfringens* type A, alpha-toxin, ScFv, gene cloning, gene expression, neutralization effect

Received: February 26, 2001

This work was supported by Grant from the Ministry of Public Health of PLA(98Q076).

* Corresponding author. Tel: 86-431-7973911 ~ 66756; Fax: 86-431-7997187; E-mail: xcb921@sohu.com