

研究简报

抗克伦特罗单链抗体表达载体的构建与鉴定

王弘¹, 梁艳¹, 杨金易¹, 刘细霞¹, 张宏斌², 雷红涛¹, 沈玉栋¹, 孙远明¹

1 广东省高等学校食品质量安全重点实验室/华南农业大学食品质量安全研究所, 广州 510640

2 广州军区广州总医院医学实验中心, 广州 510010

摘要: 为构建克伦特罗(Clenbuterol, CBL)单链抗体(scFv)表达载体, 实现其在大肠杆菌中的表达。以 pCANTAB5E-CBL 质粒为模板, 扩增 CBL 的 scFv 基因, 与 pPICZαA 载体重组, 然后以重组质粒 pPICZαA-scFv 为模板扩增 scFv 及其相连的 6 个组氨酸(6×His)片段, 再与载体 pBV220 连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 阳性克隆质粒经酶切和 PCR 鉴定后进行目的片段的序列测定。重组菌经温度诱导表达重组单链抗体, 并通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 对其鉴定。采用竞争 ELISA 检测重组单链抗体的抗原结合活性。结果表明重组质粒 pBV220-scFv 含有插入片段, 与原序列的同源性达 99.8%。重组蛋白的分子量接近 37 kD, 能够被抗 His 标签单克隆抗体特异性识别且可被游离的 CBL 竞争性抑制, IC₅₀ 值为 4.55 ng/mL。这说明我们成功构建了重组质粒 pBV220-scFv 并实现了其在大肠杆菌中的表达, 为进一步进行 CBL 免疫法快速检测奠定了一定的基础。

关键词: 克伦特罗, 重组单链抗体, 原核表达

Construction and Expression of Anti-clenbuterol Single Chain Fv Recombinant Vector

Hong Wang¹, Yan Liang¹, Jingyi Yang¹, Xixia Liu¹, Hongbin Zhang², Hongtao Lei¹, Yudong Shen¹, and Yuanming Sun¹

1 The Higher Education Key Laboratory of Food Quality and Safety of Guangdong Province /Research Institute of Food Quality and Safety of SCAU, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China

2 Guangzhou Army General Hospital, Guangzhou 510010, China

Abstract: To construct the recombinant vector pBV220-scFv and express anti-clenbuterol (CBL) scFv antibody in *Escherichia coli*, we amplified the scFv gene using plasmid pCANTAB5E-CBL as a template, recombined it with pPICZαA, then amplified the scFv-His-tag gene from plasmid pPICZαA-scFv and linked it with expression plasmid pBV220. We identified the recombinant plasmid by restrictive enzyme digestion, PCR amplification and sequence analysis. Finally, we transformed the recombinant vector into *E. coli* DH5α that was temperature-induced and expressed recombinant protein. We identified the recombinant protein by SDS-PAGE, Western blotting and indirect competitive ELISA. The results show that recombinant plasmid pBV220-scFv contained the inserted fragment with highest homology about 99.8%. The expression of scFv induced by temperature show 37 kD Mw and

Received: December 11, 2007; **Accepted:** March 7, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (Nos. 30400354 and 20477012), the National High-Tech Research, Development Program of China ("863"Program) (No. 2007AA10Z437), Guangdong Natural Science Foundation (No. 06025825), the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20050564011).

Corresponding author: Hong Wang. Tel: +86-20-85288279; Fax: +86-20-85280270; E-mail: gzwhongd@163.com

国家自然科学基金资助 (Nos. 30400354 and 20477012), 国家“863”计划 (No. 2007AA10Z437), 广东省自然科学基金 (No. 06025825), 高等学校博士点基金 (No. 20050564011)资助。

anti-His-tag mAb recognized-activity by SDS-PAGE and Western blotting respectively, and could competitively combine with CBL, the IC_{50} is 4.55 ng/mL. The recombinant plasmid pBV220-scFv is constructed and expresses the scFv gene of CBL in *E. coli* successfully. This study suggests the corresponding immunoassay methods could be set up by the recombinant scFv.

Keywords: clenbuterol (CBL), recombinant scFv, prokaryotic expression

克伦特罗(Clenbuterol, CBL)是一种禁用的动物促长剂, 俗名“瘦肉精”。CBL 通过食物链可进入人体, 造成食物中毒。目前克伦特罗违法使用的现象仍然存在, 由此引起的食物中毒事件时有发生。为有效控制其滥用情况的发生, 有必要对其进行持续的监控检测。

免疫分析法作为一种高通量的初筛方法, 具有分析快速、灵敏等优点, 目前在 CBL 的快速检测上受到许多研究者的关注^[1-5]。基因工程抗体技术的运用, 使快速获得具有高亲和性及特异性的抗体成为可能, 同时其可以通过工程菌的发酵大量表达, 且周期短、成本低, 有利于在实际中应用^[6]。

pBV220 是一种高效原核表达载体, 具有 PL 强启动子, 强转录终止信号序列, 极佳的 Shine-Dalgarno (SD)序列和多克隆位点以及可高效表达外源基因等优点^[7]。本研究利用基因工程技术实现了重组载体 pBV220-scFv 的构建及其在大肠杆菌中的表达, 为进一步实现 CBL 免疫法快速检测提供了一种获得抗 CBL 特异性抗体的新途径。

1 材料

1.1 质粒和菌株

pPICZαA 载体系广州中医药大学董燕老师惠赠, *E. coli* DH5α菌株和表达载体 pBV220 系广州军区总医院武婕老师惠赠, pCANTAB5E-CBL 克隆质粒(含 CBL scFv 片段)为本室构建。

1.2 酶和主要试剂

内切酶 *EcoR* I、*Xba* I、*Bam*H I 和 T4 DNA 连接酶及 Primer Star 为 TaKaRa 公司产品, 酵母提取物和蛋白胨为 Oxoid 公司产品, 氨苄青霉素、Zeocin 购于广州威佳生物科技公司, 抗 His 标签单克隆抗体购于广州佰路公司。质粒提取试剂盒购于上海博彩生物工程有限公司, 培养基 LB 的配方按分子克隆操作指南^[8]。

2 方法

2.1 PCR 引物的设计

PCR 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

引物序列如下:

PSH1(Back)(5'-3'): GCGGAATTCATGGCCCAGGTCAAAC (下划线为 *EcoR* I 酶切位点);

PSH2(For)(5'-3'): CTCTAGATACTTGTTCATCGTCATCCCGTTTATTTCACG (下划线为 *Xba* I 酶切位点);

PSH3(For)(5'-3'): CGCGGATCCCAAATGGCATTCTGAC (下划线为 *Bam*H I 酶切位点)。

2.2 pBV220-scFv 的构建

首先构建重组载体 pPICZαA-scFv。以质粒 pCANTAB5E-CBL 为模板, 以 PSH1(Back)、PSH2(For)为引物, PCR 扩增抗 CBL scFv 基因片段。反应体系为 50 μL, 反应条件为: 94°C 变性 5 min; 94°C, 30 s, 60°C, 30 s, 72°C, 80 s, 34 个循环, 72°C 延伸 10 min, 所得产物经琼脂糖凝胶电泳及凝胶回收纯化。获得的 scFv 片段和载体 pPICZαA 经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后连接转化大肠杆菌 TOP10, 以含 Zeocin (25 mg/mL)的 LB 低盐平板筛选重组克隆, 提取质粒 DNA, PCR、酶切鉴定。然后以重组载体 pPICZαA -scFv 为模板, 以 PSH1(Back)、PSH3(For)为引物, PCR 扩增 scFv-His 基因片段。反应体系为 50 μL, 反应条件为: 94°C 变性 5 min; 94°C, 30 s, 68.5°C, 30 s, 72°C, 80 s; 34 个循环, 72°C 延伸 10 min, 所得产物经琼脂糖凝胶电泳及凝胶回收纯化, 获得的 scFv-His 片段和载体 pBV220 经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后连接转化大肠杆菌 DH5α, 抗性 (100 μg/mL Amp)筛选重组克隆, 提取质粒 DNA, PCR、酶切鉴定, 并测序。

2.3 抗 CBL scFv 的表达及鉴定

2.3.1 抗 CBL scFv 的表达

挑取阳性克隆, 接种于 5 mL 含 Amp 的 LB 培养基中, 30°C, 250 r/min 培养过夜; 过夜菌按 10%的接种量转接至 25 mL LB 中, 30°C, 250 r/min, 培养至 A_{600} 为 0.7~0.8 时, 42°C 诱导表达 6 h。

2.3.2 抗 CBL scFv 的鉴定

(1) SDS-PAGE 鉴定: 按照分子克隆操作指南^[8], 采用 SDS-PAGE 蛋白电泳对表达的 scFv 进行

鉴定。

(2) Western blotting 鉴定: 按照分子克隆操作指南^[8], 采用 Western blotting 对表达的 scFv 进行鉴定。

(3) ELISA 鉴定: 以 CBL-OVA 为包被抗原, 采用间接竞争 ELISA 法对 scFv 的抗原结合活性进行鉴定^[9]。CBL 标准品系列浓度为: 0 ng/mL、0.01 ng/mL、0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL。取 50 μ L CBL 标准溶液加到包被好的酶标板上, 加入等体积用 PBS 适当稀释的 scFv, 混匀。37°C 温育 60 min。温育结束后, 弃去孔中液体, 用 PBST 洗涤 4 次, 加入 100 μ L 用 PBS1: 30 000 稀释的鼠抗 His 单克隆抗体, 37°C 温育 30 min。温育结束后, 弃去孔中液体, 用 PBST 洗涤 4 次, 加入 100 μ L 用 PBS 1: 20 000 稀释的羊抗鼠-IgG 抗体, 37°C 温育 30 min。温育结束后, 弃去孔中液体。TMB 显色, 测定 A_{450} 值。

3 结果

3.1 pBV220-scFv 的构建

3.1.1 CBL-scFv 基因的扩增与重组载体 pPICZ α A-scFv 的构建

以含有 scFv 基因的 pCANTAB5E-CBL 质粒为模板, PCR 扩增得到约 759 bp 的目的基因片段, 其大小与预期相符。对重组质粒进行酶切、PCR 鉴定, 可以看出, 经 *EcoR* I 或 *Xba* I 单酶切后均见 4279 bp 的 DNA 片段, 大小与载体 pPICZ α A(3593 bp)和 scFv 片段(759 bp)之和相符。而经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后, 得到两条大小分别为 750 bp 和 3593 bp 的 DNA 片段, 分别与 scFv 片段和 pPICZ α A 骨架片段大小相符。同样, 以该重组载体为模板进行 PCR 扩增, 也得到了约 750 bp 的 DNA 片段。

3.1.2 scFv-His 基因的扩增与重组载体 pBV220-scFv 的构建

以重组质粒 pPICZ α A-scFv 为模板, PCR 扩增得到 921 bp 的 DNA 片段, 大小与 scFv 和 His 基因片段之和相符。对重组质粒 pBV220-scFv 进行酶切、PCR 鉴定, 可以看出, 经 *EcoR* I 或 *Bam*H I 单酶切后均见 4587 bp 的 DNA 片段, 大小与载体 pBV220(3666 bp)和 scFv-His 片段(921 bp)之和相符。而经 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 看到了两条大小分别为 1000 bp 和 3666 bp 的 DNA 片段, 分别与 scFv-

His 片段和 pBV220 骨架片段大小相符。同样, 以该重组载体为模板进行 PCR 扩增, 也得到了 1000 bp 的 DNA 片段。对插入片断进行序列测定, 结果表明该片段与原序列的同源性达 99.8%。

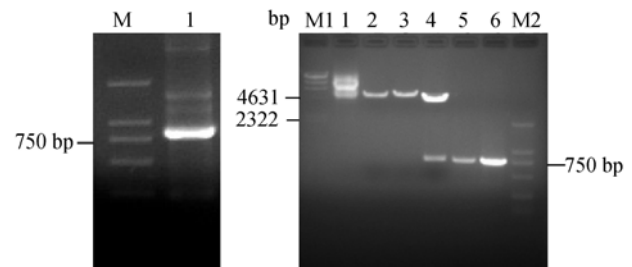


图 1 PCR 扩增 scFv 片段及重组质粒 pPICZ α A-scFv 的鉴定

Fig. 1 Amplification of scFv gene and identification of recombinant vector pPICZ α A-scFv

(A) M: DL2000 maker; 1: PCR products of scFv
(B) M1: λ -Hind III DNA marker; 1: pPICZ α A-scFv; 2: pPICZ α A-scFv/*EcoR* I; 3: pPICZ α A-scFv/*Xba* I; 4: pPICZ α A-scFv/*EcoR* I+*Xba* I; 5: scFv/*EcoR* I+*Xba* I; 6: PCR production of scFv; M2: DL2000 marker

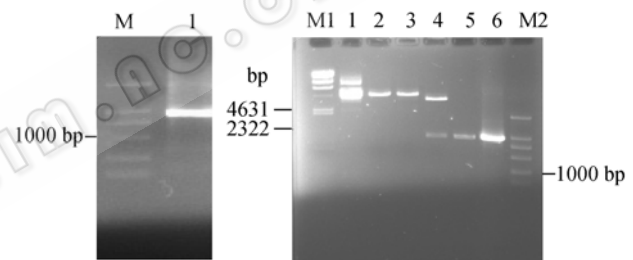


图 2 PCR 扩增 scFv-His 片段及重组质粒 pBV220-scFv 鉴定

Fig. 2 Amplification of scFv-His gene and identification of recombinant vector pBV220-scFv

(A) M: DL2000 maker; 1: PCR product of scFv-His
(B) M1: λ -Hind III DNA marker; 1: pBV220-scFv; 2: pBV220-scFv/*EcoR* I; 3: pBV220-scFv/*Bam*H I; 4: pBV220-scFv/*EcoR* I+*Bam*H I; 5: scFv-His/*EcoR* I+*Bam*H I; 6: PCR production of scFv-His; M2: DL2000 marker

3.2 抗 CBL scFv 的表达与鉴定

3.2.1 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定

SDS-PAGE 电泳结果显示, 表达产物中有一条相对分子质量为 37 kD 的新蛋白带, 约占菌体总蛋白的 16.1%。Western blotting 分析表明, 该条带可与鼠抗 His 标签单抗发生特异性的结合反应(见图 3)。

3.2.2 ELISA 鉴定

以 CBL-OVA 为包被抗原, 采用间接竞争 ELISA 法对 scFv 的抗原结合活性进行鉴定。以 CBL 浓度为横坐标, 抑制率为纵坐标(抑制率= $A_{\max} - A/A_{\max} \times 100\%$), 按 Logistic 四参数对数方程^[9]绘制

曲线, 计算 IC_{50} 值, 以 IC_{50} 值反映抗体的抗原结合活性。结果表明, 表达的单链抗体可被游离的 CBL 竞争性抑制, IC_{50} 值为 4.55 ng/mL(见图 4)。这说明 scFv 具有很好的抗原结合活性, 可用于 CBL 的检测。

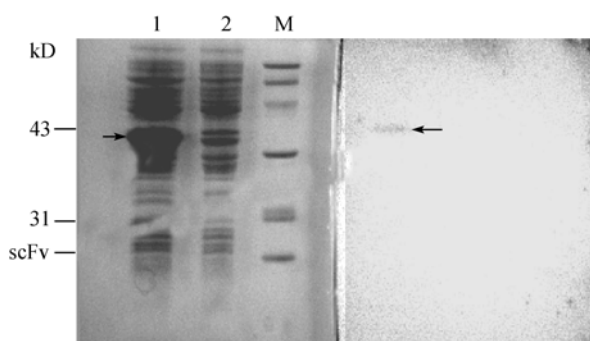


图 3 抗 CBL scFv 的 SDS-PAGE(A)和 Western blotting(B) 分析鉴定

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of CBL-scFv expression

1: induced *E. coli* strain of pBV220-scFv; 2: induced *E. coli* strain of pBV220; M: molecular weight marker; the arrow indicated the scfv protein

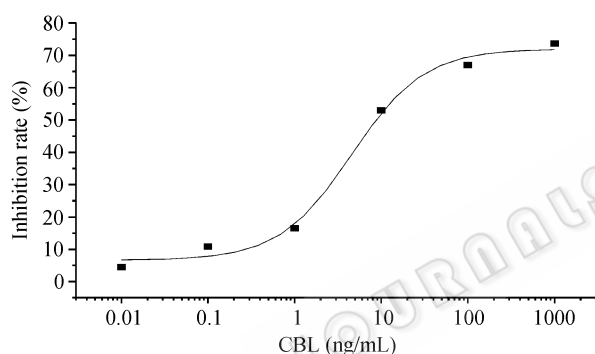


图 4 抗 CBL scFv 的抑制曲线

Fig. 4 Inhibition curve of anti-CBL scFv by competitive ELISA

4 讨论

本研究以 *E. coli* DH5 α 作为宿主菌, 采用温敏型高效表达载体 pBV220 成功表达了重组抗 CBL 的单链抗体。据本实验室前期的研究表明^[9], 通过构建噬菌体抗体库获得的抗 CBL 单链抗体可以较好地识别抗原, 本实验拟通过构建高表达载体以制备抗 CBL 的单链抗体。所选择的 pBV220 表达载体, 表达时仅需温度诱导, 经济方便^[10], 已被很多实验证明是表达外源蛋白的优良载体。另外, 我们在重组表达载体构建过程中, 借助载体 pPICZaA 引入了 6 个组氨酸^[11,12], 与上游的表达序列形成融合蛋白, 该

序列可作为蛋白标签用于目的蛋白的纯化和检测, 同时不影响表达产物的生物学活性^[13]。

从理论上讲 pBV220 可以高效表达目的基因, 但本研究中, 通过 SDS-PAGE 蛋白电泳分析表明, 抗 CBL scFv 的表达量并未达到如文献报道的预期值 20%以上^[7], 只达到菌体总蛋白的 16.1%左右。提示细菌或质粒的增殖可能受到外源基因及其产物的影响^[14], 也就是说抗 CBL 的单链抗体重组蛋白可能抑制宿主菌的某些活性。据杨慧龄^[15]等人报道, 外源基因中若含有脯氨酸、酪氨酸、丝氨酸等大肠杆菌使用频率较低的密码子, 会导致重组抗体蛋白表达量降低。我们在对抗 CBL scFv 全长基因序列进行分析后发现, 插入的 scFv 基因片段中含有 40 个编码丝氨酸的密码子, 在重组单链抗体氨基酸组成中含量最高, 达 16.7%, 而酪氨酸也有 15 个, 占重组单链抗体氨基酸组成的 6.2%。另外, 宿主菌抑制重组载体中外膜蛋白基因增殖和表达, 也可能导致重组抗体蛋白表达量降低^[16]。因此, 通过选择其他宿主菌, 优化工程菌的发酵表达条件, 可能改善抗 CBL 单链抗体的表达量。该方面的研究工作我们将另文报道。

REFERENCES

- [1] Haughey SA, Baxter GA, Elliott CT, *et al.* Determination of clenbuterol residues in bovine urine by optical immunobiosensor assay. *J AOAC Int*, 2001, **84**, 1025-1030.
- [2] Roda A, Manetta AC, Piazza F, *et al.* A rapid and sensitive 384-microtiter wells format chemiluminescent enzyme immunoassay for clenbuterol. *Talanta*, 2000, **52**, 311-318.
- [3] Vanoosthuyze KEI, Arts CJM, Peteghem CHV. Development of a fast and simple method for determination of β -agonists in urine by extraction on empore membranes and detection by a test strip immunoassay. *J Agric Food Chem*, 1997, **45**, 3129-3137.
- [4] Bacigalupo MA, Ius A, Meroni G, *et al.* Comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and immunoenzymometric assay for clenbuterol. *Analyst*, 1995, **120**, 2269-2271.
- [5] Degand G, Bernes-Duyckaerts A, Maghuin-Rogister G. Determination of clenbuterol in bovine tissue and urine by enzyme immunoassay. *J Agric Food Chem*, 1992, **40**, 70-75.
- [6] Itoh K, Suzuki K, Ishiwata S, *et al.* Application of a recombinant Fab fragment from a phage display library for sensitive detection of a target antigen by an inhibition ELISA system. *J Immunol Methods*, 1999, **223**(1): 107-114.

- [7] Zhang ZQ, Yao LH, Hou YD. Construction and application of a high level expression vector containing PRPL promoter. *Chin J Viro*, 1990, **6**(2): 111-114.
张智清, 姚立红, 侯云德. 含 PRPL 启动子的原核高效表达载体的组建及其应用. 病毒学报, 1990, **6**(2): 111-114.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] Pan K, Wang H, Zhang HB, *et al.* Production and characterization of single chain Fv directed against β -Agonist clenbuterol. *J Agric Food Chem*, 2006, **54**: 6654-6659.
- [10] Xiong SH, Yu L, Tan HY, *et al.* Expression of recombinant human BMP-71 in *Escherichia coli* and its purification. *J First Milit Med Univ*, 2002, **22**(5): 413-416.
熊绍虎, 余磊, 谭海燕, 等. 重组人骨形态蛋白-2 在大肠杆菌中的表达及纯化. 第一军医大学学报, 2002, **22**(5): 413-416.
- [11] Ljungquist C, Breitholtz A, Brink Nilsson H. Immobilization and affinity purification of recombinant proteins using histidine peptide fusions. *Eur J Biochem*, 1989, **186**: 5631.
- [12] Jia ZY, Fu XM, Jin AH, *et al.* cDNA cloning of human leptin and its expression. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(4): 476-479.
贾振宇, 伏晓敏, 金爱华, 等. 人 Leptin 基因的 cDNA 的克隆和表达. 生物工程学报, 2003, **19**(4): 476-479.
- [13] Chen S, Rao Q, Wang JX, *et al.* Construction and expression of single chain variable fragments (ScFv) against human CD19 antigen. *Chin J Biotech*, 2005, **21**(5): 686-691.
陈森, 饶青, 王建祥, 等. 抗人 CD19 单链抗体基因的构建、表达及功能测定. 生物工程学报, 2005, **21**(5): 686-691.
- [14] Dong M, Lu XQ, Chen XW, *et al.* Structural conformation of prokaryotic plasmid expressing the gp41 of HIV21 SF2 strain. *J Shanxi Med Univ*, 2001, **32**(6): 481-483.
董梅, 鲁晓青, 陈向伟, 等. HIV-1SF₂ 株 env 基因(gp41)的克隆构建及其原核表达. 山西医科大学学报, 2001, **32**(6): 481-483.
- [15] Yang HL, Xiao JH, Liang Y, *et al.* Cloning, sequencing and expressing of microneme protein 1 partial gene in *Toxoplasma gondii* ZS2 isolate. *Chin J Prev Med*, 2003, **37**(1): 29-32.
杨慧龄, 肖建华, 梁瑜, 等. 弓形虫微线体蛋白 1 部分基因的克隆、测序及表达. 中华预防医学杂志, 2003, **37**(1): 29-32.
- [16] An YQ, Liu Q, Ke Y, *et al.* Construction of pBV-BPI600 recombinant expression vector and its expression in *E. coli*. *J Capital Med Sci Univ*, 2001, **22**(1): 1-5.
安云庆, 刘箐, 柯岩, 等. PBV-BPI600 重组表达载体的构建及其在 *E. coli* 中的表达. 首都医科大学学报, 2001, **22**(1): 1-5.

第 13 届国际生物技术大会暨展览会即将在大连举行

始于 1960 年, 每四年举办一届、各大洲轮流举办并首次登陆中国的第 13 届国际生物技术大会暨展览会(IFS-2008)将于 2008 年 10 月 13 日在大连举行。(IFS-2008)是生物技术领域公认的规模最大、学术水平最高、社会影响最强的国际盛会, 堪称是生物技术领域的奥林匹克大会。本次大会邀请生物技术领域取得突出成就而享誉全球的一百五十多位科学家做学术报告, 包括 3 位诺贝尔奖获得者, 数十位各国科学院和工程院院士及多位国际上著名的生物技术公司 CEO 和的研发部门 CTO 等。更多详情请登录: <http://cn.ifs2008.org/exhibition.html>。