

抗黄曲霉毒素 B1 单链抗体在大肠杆菌中的表达及优化

杨炼, 张艳红, 丁虎生, 王丽云, 陈卫, 张灏*

江南大学食品学院, 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡 214122)

摘要: 【目的】继杂交瘤技术后, 重组抗体技术是新一代的抗体制备技术。然而如何用原核系统中较多地表达具有生物活性的单链抗体, 避免包涵体形成仍是一个需要探讨的问题。【方法】将目的基因 *scFv-H4* 克隆到载体 pET22b 上, 分别转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 Origami (DE3) 中, 通过改变诱导温度和 IPTG 浓度, 比较具有生物活性的蛋白量以及包涵体的量。【结果】在 BL21 (DE3) 中, pET22b 能产生大量表达 *scFv-H4*, 而 BL21 (DE3) 的含有 *trxA* 和 *gor* 双突变的衍生菌 Origami (DE3) 表达的 *scFv-H4* 的总量较少, 但是具有生物活性的蛋白量较多 (5 mg/L 培养物), 具有生物活性的蛋白比例也较 BL21 (DE3) 高。另外 IPTG 的浓度对 *scFv-H4* 表达没有显著影响, 而较高的诱导温度会促使表达的蛋白形成包涵体。【结论】在较低的温度下, pET22b 能在 Origami (DE3) 能较好地表达具有生物活性的 *scFv-H4*, 减少包涵体的比例, 为后续的抗体性质研究和改造奠定了基础。

关键词: 黄曲霉毒素; 单链抗体; 表达; BL21 (DE3); Origami (DE3); pET22b

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 07-0880-09

黄曲霉毒素 (aflatoxins) 是一类黄曲霉产生的次级代谢产物, 包括黄曲霉毒素 B1 (AFB1)、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1 和黄曲霉毒素 G2, 以及经体内代谢后的衍生物黄曲霉毒素 M1 和黄曲霉毒素 M2。黄曲霉毒素是强致癌物质, 其中黄曲霉毒素 B1 的致癌性最强。黄曲霉毒素 B1 与乙肝病毒被认为是肝癌的最主要的两大诱因^[1]。

免疫化学分析法非常适用于建立便捷、准确、有公信力 AFB1 检测方法。而免疫学方法的建立很大程度上依赖于高质量的抗体。过去十多年, 分子生物学的进展大大促进了抗体片段的基因操作。重组抗体的基因操作不仅加深了人们对免疫球蛋白结构和功能的理解, 而且通过基因融合、基因突变、重组基因表达开发了大量可用于研究、诊断和治疗的工

程抗体。同时, 通过基因操作可以获得常规技术不能得到的抗体形式, 使之更适合于检测和治疗。到 2004 年初, 经美国 FDA 批准的抗体药物已有了 17 种, 其中 80% 是重组抗体^[2]。重组抗体也应用在一些检测领域, 如: 农药莠去津^[3]和油菜核盘菌^[4]等。

在此前的工作中, 我们已经采用噬菌体展示技术从 Tomlinson I + J 抗体文库筛选到了一些能够识别 AFB1 的单链抗体 (single chain fragment variable, scFv) 克隆^[5], 其中克隆 *scFv-H4* 有较高的亲和力。但是, 我们发现 *scFv-H4* 在原来的筛选系统 (HB2151/pIT2) 中表达存在一些问题, 例如: 表达量较少 (3.6 mg/L 培养物)、表达不够稳定、目标蛋白不易纯化等, 所以我们考虑用一个专门的表达系统来表达目标蛋白。在比较了酿酒酵母、毕赤酵母和大

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-06-0482)

* 通信作者。Tel: +86-510-85912155; Fax: +86-510-85912155; E-mail: zhanghao@jiangnan.edu.cn

作者简介: 杨炼 (1978-), 男, 四川犍为人, 博士研究生, 食品生物技术方向。E-mail: yanglian27@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-03-09; 修回日期: 2009-04-23

肠杆菌对人源 scFv 的表达结果后, Miller 等人认为大肠杆菌表达是最为快速、稳定的表达方式^[6], 而其他的表达系统如动植细胞对实验条件要求又比较高。而 Santala 用 pAK400c 在 *E. coli* Origami B 中表达抗垂体促甲状腺激素单链抗体, 细胞质中具有生物活性蛋白的表达量达到 13.6 mg/L 培养物^[7]; Jurado 等在含 *gor* 和 *trxB* 突变的 *E. coli* FA113 的细胞质中表达抗 *Pseudomonas putida* 中的 σ^4 蛋白的单链抗体, 具有生物活性的蛋白表达量为 0.3 mg/L 培养物^[8]; 抗黄曲霉毒素 B1 的单链抗体的表达量未见报道。我们选择高效且易于调控的 pET 系统表达 scFv-H4。在 pET 载体的选择中, 我们使用过 pET20b, pET22b, pET28a 和 pET32a 分别在 *E. coli* BL21 (DE3) 和 Origami (DE3) 表达 scFv-H4。实验发现无论是在 BL21 (DE3) 还是 Origami (DE3) 中, pET28a, pET32a 表达的 scFv-H4 都不具有生物活性的; pET20b 在 BL21 (DE3) 中表达的 scFv-H4 仅少量具有生物活性; 而 pET22b 的能较高地表达具有生物活性的 scFv-H4。在本文中, 我们将目的基因转入到的 pET22b 载体中进行表达, 获得了比较高的表达量, 并研究了 *E. coli* BL21 (DE3) 和 Origami (DE3) 表达 scFv-H4 的特点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 基因文库、菌株与培养基: 抗黄曲霉毒素 B1 的 scFv-H4 克隆 (GenBank accession No. 1176324) 筛选自 Tomlinson J 单链抗体文库 (英国剑桥 Geneservice 公司)。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* Origami (DE3) 由 Novagen 公司 (北京) 提供。本实验采用的培养基为 LB 培养基 (10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 5 g NaCl 溶于 1000 mL 去离子水); 在 LB 培养基中添加 1.5% 的琼脂粉即为 LB 平板培养基。

1.1.2 试剂与仪器: 黄曲霉毒素 B1-牛血清白蛋白复合物 (AFB1-BSA) 是 Sigma 公司 (上海) 的产品。蛋白 A-辣根过氧化氢酶复合物 (Protein A-HRP) 购于 GE Healthcare 公司 (上海)。异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG)、四甲基联苯胺 (TMB)、氨苄青霉素 (amp) 和卡那霉素由上海生工生物工程技术有限公司提供。胰蛋白胨, 酵母提取物是 Oxoids 公司 (上海) 产品。DNA 聚合酶为 Promega 公司 (北京) 的 *pfu* 酶, 限制性内切酶和 T4 连接酶为 NEB 公司 (北京) 所产。其他药品均为上海生工所提供的 BR 级试剂。

镍离子亲和树脂 Ni-Chelating Sepharose Fast Flow 购于 GE Healthcare (上海)。酶标仪是 Thermo 公司的 Multiscan MK3。凝胶成像系统是伯乐公司 (南京) 的 GelDoc XR。

1.2 scFv-H4 基因的克隆与转化

以含有 scFv-H4 基因的 pIT2 噬菌粒为模板通过聚合酶链式反应 (PCR) 获得 scFv-H4 基因, 引物为: CAGGAAACAGCTATGAC 和 CTATGCGGCCCATTC A。用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳纯化和胶回收后, 在 37°C 用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Not* I 双酶切 scFv-H4 基因与载体 pET22b。再经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳纯化和胶回收后, 用 T4 连接酶将内切酶酶切后的目的基因和载体在 16°C 连接 24 h。

将连接产物 10 μ L 热激转入感受态的 *E. coli* DH5 α , 将该 *E. coli* DH5 α 涂布 LB 平板培养基 (含 amp)。20 h 后, 挑取单克隆用 LB 培养基 (含 amp) 培养, 提取质粒后, 用限制性内切酶酶切验证, 另测序验证 (上海生工)。然后将成功构建的 pET22b/H4 转入感受态的 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 在 LB 平板培养基 (含 amp) 上涂布, 并挑取单克隆, 用 LB 液体培养基 (含 amp) 培养过夜, 提取质粒酶切验证后, 将甘油加入剩余的菌液中至终浓度 8%, 分装于 -20°C 冻存。

在将 scFv-H4 基因克隆转化入 Origami (DE3) 的实验中, 引物为 TACATATGCGCCGAGGTGCAGCT 和 CTATGCGGCCCATTC A, 限制性酶切位点为 *Nde* I 和 *Not* I, 其余过程与 BL21 (DE3) 的实验相同。

在克隆转化过程中, 将 pET22b 同时转化到 DH5 α 、BL21 (DE3) 和 Origami (DE3) 作为对照。

1.3 *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b/H4 的诱导表达与优化

将冻存的菌株接入 5 mL LB 液体培养基 (含 amp) 中, 37°C 活化至 OD_{600} 为 0.5 左右。将活化的菌 2 mL 加入 100 mL LB 培养基 (含 amp) 中, 37°C 培养至 OD_{600} 0.6~0.8 后, 加入诱导物 IPTG, 在 30°C 继续诱导 20 h。

在上述条件的基础上, 我们对 IPTG 终浓度 (0 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L 以及 2 mmol/L) 和诱导的温度 (16°C、20°C、25°C 和 30°C) 做了一定的优化。

在 Origami (DE3) 的发酵过程中, 培养基中还添加卡那霉素以维持 Origami (DE3) 的 *trxB* 突变。

1.4 发酵液各部分蛋白的提取

全细胞蛋白: 取培养物 1 mL, 在 11600 \times g 条件

下离心 15 min, 所得沉淀用 100 μL 2 \times 上样缓冲液溶解。

培养基上清: 取 40 mL 培养物, 14000 \times g 离心, 富集菌体; 上清用于活性分析。

细胞周质组分: 将富集的菌体重悬于 10 mL 30 mmol/L 的 Tris-HCl, 20% 的蔗糖溶液 (pH8) 中, 加入 20 μL 0.5 mol/L EDTA, 室温缓慢震荡 10 min, 10000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心收集细胞, 弃上清。将处理后的细胞重悬于 10 mL 冰冻的 5 mmol/L MgSO_4 , 在冰上缓慢震荡 10 min, 此时周质蛋白被释放到缓冲液中。4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 \times g 离心收集细胞, 上清用于活性分析。

细胞质可溶组分: 提取周质后的细胞沉淀, 用 10 mL PBS 重悬, 冰浴上超声 200 w, 1 s 工作, 9 s 间歇) 1 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 \times g 离心, 上清用于生物活性分析。

1.5 蛋白的纯化

将发酵液 100 mL, 3300 \times g 离心 15 min 后收集菌体沉淀, 用 10 mL 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4, PBS) 重悬菌体。重悬的菌体用超声破碎仪 (Sonic, Vibracell) 在 200 W (1 s 工作, 9 s 间歇) 超声 60 个循环, 将菌体破碎液 11600 \times g 离心 15 min。上清加入螯合有 NiSO_4 的 Sepharose Fast Flow 凝胶上, 用 50 mmol/L 的咪唑溶液 (含 0.5 mol/L NaCl, pH7.7) 洗去杂蛋白后, 用 10 mL (约 2 个柱程), 不同浓度的咪唑的 Tris 缓冲溶液 (含 0.5 mol/L NaCl, pH7.7) 梯度洗脱目标蛋白。取 50 μL 洗脱液与 50 μL 2 \times 上样缓冲液混合, 用以蛋白电泳分析。洗脱下的蛋白溶液在磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中透析 6 遍。

取超声破碎液 1 mL 于一个干净的 EP 管中, 11600 \times g 离心 15 min 后, 用 1 mL 含 2% 曲拉通的 PBS 洗涤沉淀 3 次, 再 11600 \times g 离心 15 min, 沉淀用 100 μL 2 \times 上样缓冲液溶解, 用以分析包涵体。

1.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

将 5 μL 样品 (按 1.4 制备) 在 12% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 80 V 浓缩 25 min, 再 150 V 分离 60 ~ 80 min。用考马斯亮蓝染色和醋酸-乙醇溶液脱色, 在凝胶成像系统上分析蛋白分布与浓度。

1.7 蛋白质浓度

将镍离子层析纯化后的得到的 scFv-H4 进过透析后, 用 Peterson 法测定蛋白含量^[9]。

1.8 酶联免疫检测法 (ELISA)

25 μL 0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AFB1-BSA 平铺于酶标板孔底 (Costar 2592), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h, 用 PBS 洗涤 2 次

后, 用 2% 的 BSA 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭酶标板 2 h, 再用 PBS 洗涤 2 次。将待测样 50 μL 与 100 μL 2% BSA 溶液一起加入酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h, 用含有 0.1% Tween 20 的 PBS (PBST) 洗板 5 次, 加入 1:5000 稀释于 2% 的 BSA 的 Protein A-HRP 100 μL , 再 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h, 用 PBST 洗板 5 次。加入含 H_2O_2 (0.006%) 和 TMB (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的醋酸钠缓冲溶液 (pH5.5) 100 μL , 室温下反应 15 min 后, 用 50 μL 1 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应, 在酶标仪上读取 OD_{450} 和 OD_{650} , ELISA 的信号值为 $OD_{450} - OD_{650}$ 。

在竞争 ELISA 中, 50 μL 纯化后的抗体, 100 μL , 2% 的 BSA 和不同浓度的黄曲霉毒素 B1 至黄曲霉毒素 B1 的终浓度为 0 ~ 2 ng/mL, 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 1 h, 取 100 μL 混合液加入上述包被并封闭好的 96 孔板, ELISA 剩余过程如上所述。

2 结果

2.1 pET22b/H4 的构建与转化

从克隆宿主 *E. coli* DH5 α 中抽提的质粒 pET22b 和 pET22b/H4, 经用 *Nco* I - *Not* I 双酶切后, pET22b/H4 得到了一个大小约为 730 bp 的片段, 大小与 *H4* 基因片段相符, 而 pET22b 经过同样的酶切后没有该片段。将 pET22b/H4 测序, 其中 *scFv-H4* 序列与我们先前筛选到的噬菌体载体 pIT2 中的 *scFv-H4* 序列相同。由此可知, 我们已经将 *scFv-H4* 基因成功克隆入 pET22b 载体。将 pET22b/H4 转入表达宿主 BL21 (DE3) 和 Origami (DE3) 中, 菌中所含的质粒同样经过酶切检验。

pET22b 采用 T7lac 类型的启动子, 在紧邻 T7 启动子的下游还有一个 *lac* 操纵子序列, T7lac 和 *lacI* 启动子位置交错。采用这种载体及 DE3 溶原菌, *lac* 阻遏蛋白可以作用于宿主染色体 *lacUV5* 启动子, 抑制宿主聚合酶转录 T7 RNA 聚合酶, 也作用于载体 T7lac 启动子, 阻断由 T7 RNA 聚合酶导致的目的基因的转录, 达到在没有诱导物的情况下, 严谨控制毒性外源基因表达效果, 避免了对宿主生长的负面效应。根据实验结果, 我们可以看出表达 scFv-H4 对宿主的生长有一定的抑制作用 (表 1 和表 2), 所以采用的 T7lac 启动子, 可以较为严谨地控制 scFv-H4 的在未诱导时的本底表达。另外 pET22b 还编码 *pelB* 信号肽, 该信号肽有助于 scFv 穿过 BL21 (DE3) 细胞内膜, 释放到周质腔中。而周质腔的氧化性环境是 scFv-H4 正确折叠之必须, 特别对于分别存在

于重链可变区和轻链可变区中 2 个二硫键的形成至关重要。而在 Origami (DE3) 中, 我们将 pET22b 上的信号肽去掉, 让 scFv-H4 在胞内折叠。

2.2 scFv-H4 在 E. coli BL21 (DE3) 中的表达

由于 scFv-H4 的表达, BL21 (DE3) 的生长受到了一定影响; 我们对其生长曲线做了考察 (图 1)。24 h 后, BL21 (DE3) 的生物量在诱导条件下仅为未诱导条件下的一半, 生长受到了抑制。一般来说, 外源蛋白的表达对宿主都是一种代谢负担 (metabolic burden), 会降低宿主本身的代谢活动, 宿主需要耗

费原料和能量去维持和表达外源基因。图 2 是 BL21 (DE3) 在诱导和未诱导情况下全细胞蛋白的对比, 在 IPTG 存在的情况下, 在 31 kDa 处出现目标条带; 在加入 IPTG 1 h 时后, 全细胞电泳图上目标蛋白条带就出现了, 且随着诱导时间的增加而逐渐增浓 (数据未给出)。在诱导和未诱导条件下, 我们对具有生物活性的 scFv-H4 表达量也做了对比。在诱导条件下, 具有生物活性的 scFv-H4 表达量迅速上升。未诱导的对照组未发现 scFv-H4 活性, ELISA 的信号一直处于非常低的水平, 这也显示 T7lac 启动子能

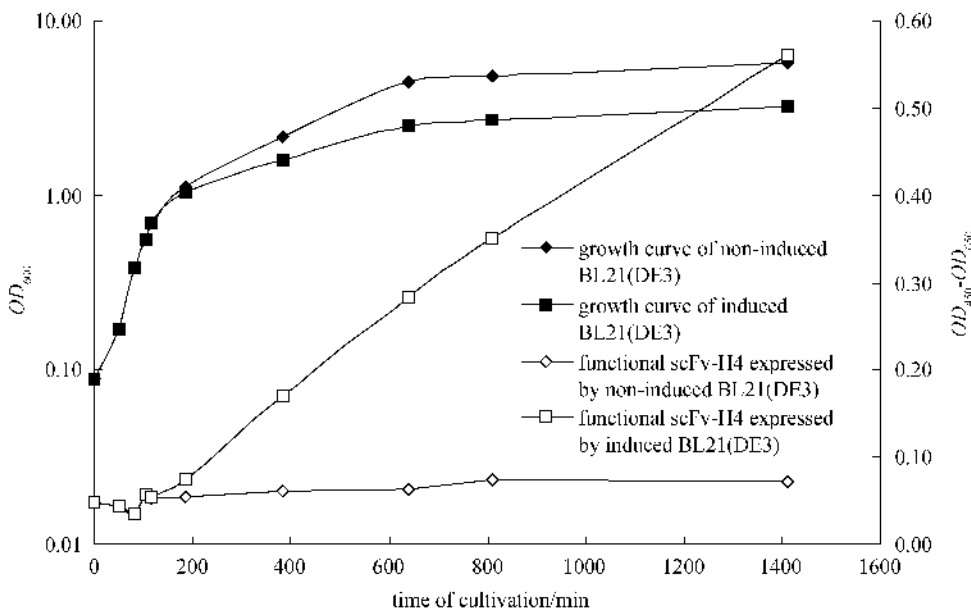


图 1 在 IPTG 诱导和未诱导的条件下, E. coli BL21 (DE3) 的生长曲线和表达有生物活性的 scFv 情况
 Fig.1 The growth curve and the functional production of scFv-H4 of induced E. coli BL21 (DE3). The non-induced BL21 (DE3) was presented for a comparison (induction condition: 30°C, 1 mmol/L IPTG).

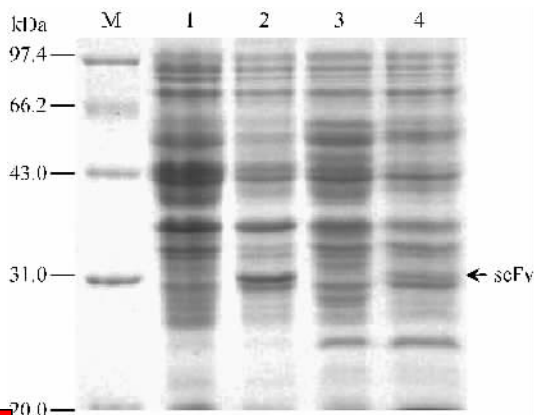


图 2 在诱导或未诱导条件下, E. coli BL21 (DE3) 和 E. coli Origami (DE3) 的全细胞蛋白电泳图的比较
 Fig.1 The SDS-PAGE of total cell protein of induced and non-induced BL21 (DE3) and Origami (DE3), respectively (induction condition: 1.0 mmol/L IPTG, 20°C). M. protein Marker; 1. non-induced BL21 (DE3); 2. induced BL21 (DE3); 3. non-induced Origami (DE3); 4. induced Origami (DE3).

严谨地控制 scFv-H4 表达。我们还发现: 具有生物活性的 scFv-H4 主要存在于周质腔中 (ELISA 信号值: 0.723 ± 0.043), 细胞质部分也有一定的活性 (ELISA 信号值: 0.453 ± 0.028), 而培养基上清中没有检测到明显的活性 (ELISA 信号值: 0.097 ± 0.046)。当大肠杆菌生长到一定状态后^[10]或向培养基中添加 Triton X100 等后^[11], 周质腔中的蛋白可能渗漏到培养基上清中。24 h 的培养过程中, 培养基上清一直未检测出明显的 scFv-H4 的生物活性。

另外在 BL21 (DE3) 的菌体内有大量不溶的包涵体存在 (图 3)。根据统计学模型 Wilkison- Harrison 模型预测^[12]: 当在大肠杆菌中过量表达时, scFv-H4 有高达 96.5% 的倾向以不溶的状态聚集, 形成包涵体, 此形式的蛋白一般都是没有活性的。根据电泳图估算, BL21 (DE3) 在 20°C 诱导表达时, 包涵体的量约占 scFv-H4 总表达量的 76%。

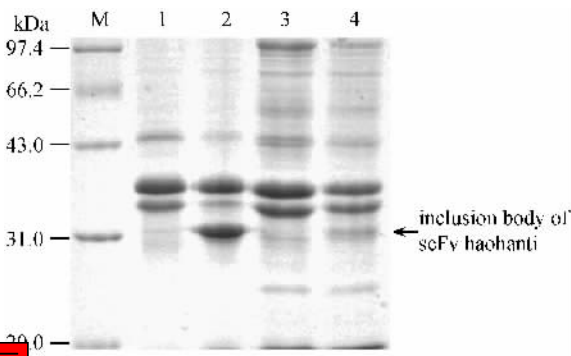


图3 在诱导或未诱导条件下, *E. coli* BL21 DE3)和 *E. coli* Origami DE3)产生的包涵体电泳图的比较

Fig.3 The SDS-PAGE of inclusion body in induced and non-induced *E. coli* BL21 DE3) and Origami DE3), respectively (induction condition: 1.0 mmol/L IPTG, 20°C). M, protein marker; 1, non-induced BL21 DE3); 2, induced BL21 DE3); 3, non-induced Origami DE3); 4, induced Origami DE3).

2.3 *E. coli* BL21 DE3)表达 scFv H4 的条件优化

在用 BL21 DE3)诱导表达 scFv-H4 的过程中,我们对诱导温度和 IPTG 浓度对 scFv-H4 表达的影响做了考察。正确折叠的、具有生物活性的 scFv-H4 用 ELISA 的信号来表征 (表 1),而不正确折叠的、不可溶的 scFv 用包涵体电泳图来表征 (图 4)。

在诱导温度为 20°C, IPTG 浓度分别为 0、0.5、1.0 和 2.0 mmol/L 的条件下, IPTG 添加与否对 scFv-H4 的表达影响很大,但是 IPTG 的添加量对 scFv-H4 的表达影响并不显著,在所讨论的 3 个 IPTG 浓度,无论是具有生物活性的 scFv-H4 还是 scFv-H4 包涵体都没有明显的差别 (图 4),而且菌体的生物量也相当 (表 1)。相比较而言,诱导温度对 scFv-H4 的影响更加明显。在 16°C 诱导时,菌生长缓慢;诱导结束时,生物量也明显低于其他诱导温度,包涵体也比较少。当温度上升到 20°C 时,具有生物活性的 scFv-H4 的量有一定的增加 (表 1),但是同样伴随着大量包涵体出现。在较高的诱导温度,细菌的新陈代谢增加,外源蛋白的合成速度也加快了,使大量蛋白来不及转运和正确折叠,只能以包涵体的形式存在。当温度进一步升高时,包涵体反而有所减少,而具有生物活性的 scFv-H4 的量也有所下降。在高温下,由于疏水相互作用,蛋白质分子容易发生聚集;诱导温度较高时,部分热激蛋白酶也产生了活性,水解了一部分蛋白;另外在较高的温度条件下,大肠杆菌中的分子伴侣的数量和活性都有所减少。这三点也许是在低温诱导时,可溶的、具有生物活性的 scFv-H4 更多一些的原因 [3]。

表 1 在不同的诱导条件下, *E. coli* BL21 DE3)的生长情况与具有生物活性的 scFv-H4 表达量 (数据为两次平行实验的均值加标准差)

Table 1 The functional scFv-H4 production by *E. coli* BL21 DE3) induced at different conditions (data were presented as the average of duplicates with standard deviations)

Code	Temperature/°C	IPTG/μmol/L	Biomass (OD ₆₀₀)	ELISA signal (OD ₄₅₀ -OD ₆₅₀)
1	20	0	5.58 ± 0.15	0.063 ± 0.013
2	20	0.5	2.72 ± 0.22	0.887 ± 0.090
3	20	1.0	2.50 ± 0.16	0.810 ± 0.050
4	20	2.0	2.76 ± 0.28	0.793 ± 0.104
5	16	1.0	1.38 ± 0.02	0.558 ± 0.108
6	25	1.0	2.48 ± 0.32	0.746 ± 0.007
7	30	1.0	2.54 ± 0.16	0.546 ± 0.013

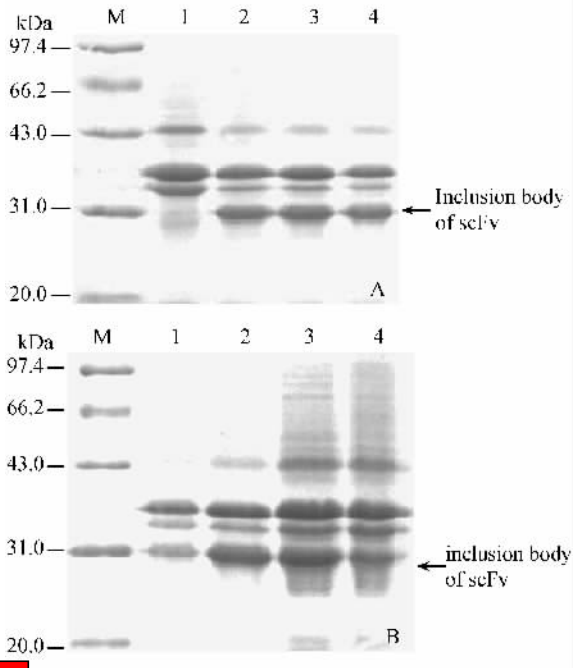


图4 在不同诱导条件下, scFv-H4 在 *E. coli* BL21 DE3)中形成的包涵体的电泳图。A: 在不同 IPTG 浓度下诱导的结果 (诱导温度为 20°C); B: 在不同温度下诱导的结果 (IPTG 浓度为 1 mmol/L)

Fig.4 The SDS-PAGE of the inclusion body (indicated by the arrow) formed in *E. coli* BL21 DE3) induced at various conditions. A: induced by various IPTG concentrations (at 20°C); B: induced at various temperatures (by 1 mmol/L IPTG). M, protein marker; 1, 0 mmol/L IPTG; 2, 0.5 mmol/L IPTG; 3, 1.0 mmol/L IPTG; 4, 2.0 mmol/L IPTG; 5, 16°C; 6, 20°C; 7, 25°C; 8, 30°C.

2.4 scFv-H4 在 *E. coli* Origami DE3)中的表达

在免疫球蛋白超家族结构域中,反平行的 β 片层之间的二硫键对于形成正确的天然空间结构十分重要,而 scFv-H4 的重链可变区和轻链可变区都是免疫球蛋白超家族的成员,一个 scFv-H4 分子中含有 2 个二硫键。大肠杆菌细胞质中还原性的氧化还

原势不利于 scFv-H4 中半胱氨酸的巯基氧化成二硫键, 这也许是 scFv-H4 不能在细胞质中正确折叠的主要原因, 所以 BL21 (DE3) 中含有较多的包涵体。包涵体易于纯化, 但是体外正确折叠的效率较低, 而且折叠过程中还可能会影响蛋白的完整性, 所以我们更倾向于将 scFv-H4 以可溶形式表达。Origami (DE3) 菌株带有硫氧还原蛋白还原酶 (*trxB*) 突变和谷胱甘肽还原酶 (*gor*) 双突变, 细胞质呈氧化性, 能促进细胞质中蛋白二硫键的形成。因此我们也将 scFv-H4 基因连到除去了信号肽的 pET22b 载体上, 转入 Origami (DE3) 中。pelB 信号肽是一种 Sec 途径的信号肽, 它能引导未折叠的蛋白质采取“穿线”的方式穿过细胞内膜, 不适合已折叠好的蛋白质的跨膜运输^[4]。我们考察了 scFv-H4 的表达对 Origami

(DE3) 生长情况的影响 (图 5): 与 BL21 (DE3) 类似, scFv-H4 的表达对菌体生长有不利影响。另外 Origami (DE3) 本身生长比较缓慢, 诱导结束时 20 h 后) 菌体的密度也较 BL21 (DE3) 低, 但是 ELISA 的信号值较高, 这可能意味着产生的具有生物活性的 scFv-H4 的量较多。根据全细胞蛋白电泳图 (图 2): Origami (DE3) 表达的 scFv-H4 量比较少, 包涵体现象也比较少 (图 3), 仅占 scFv-H4 总表达量的 11%。另外, 用 ELISA 对 Origami (DE3)/pET22b/H4 的培养基上清、周质和可溶细胞质中的具有生物活性的 scFv-H4 进行了分析: 上清的信号为 0.097 ± 0.021 , 周质的信号为 0.117 ± 0.034 , 可溶细胞质的信号为 1.651 ± 0.047 ; 由此确认具有生物活性的 scFv-H4 主要分布在细胞质中。

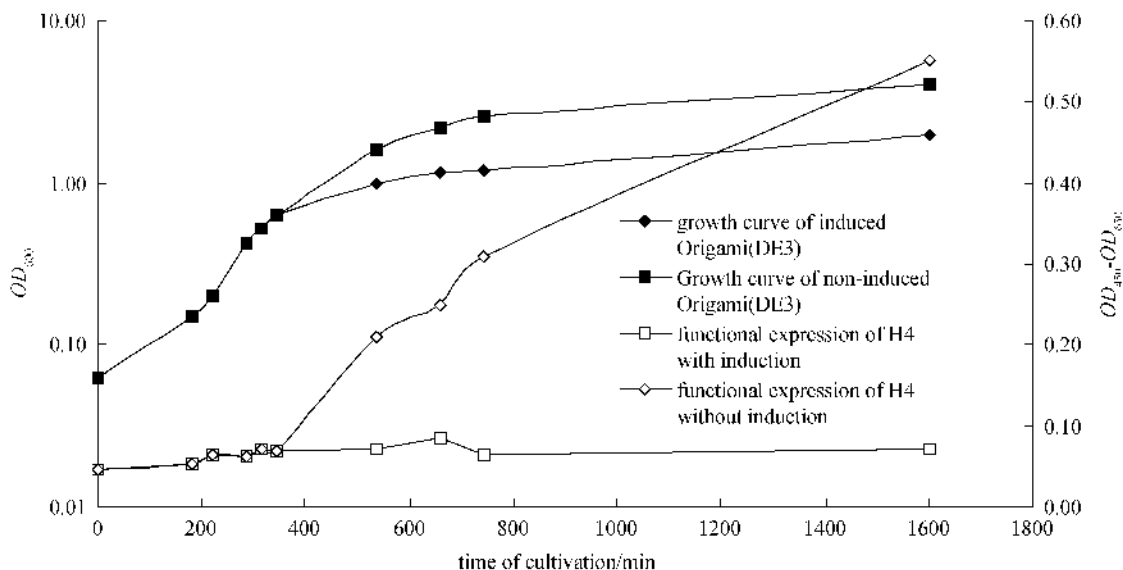


图 5 在 IPTG 诱导和未诱导的条件下, *E. coli* Origami (DE3) 的生长曲线和表达活性 scFv 情况

Fig.5 The growth curve and the functional production of scFv-H4 of induced *E. coli* Origami (DE3). The non-induced Origami (DE3) was presented for a comparison (induction condition: 30°C, 1 mmol/L IPTG).

2.5 *E. coli* Origami (DE3) 表达 scFv-H4 的条件优化

与 BL21 (DE3) 的优化过程类似, 我们也考察了诱导温度和诱导物浓度对 Origami (DE3) 表达 scFv 的影响。在相同的诱导条件下 Origami (DE3) 的生物量比 BL21 (DE3) 低很多 (50%) 左右, 但是具有生物活性的 scFv 的量却有较大的增加 (表 2), 说明氧化性的胞内环境对 scFv-H4 的正确折叠有利, 能大大提高具有生物活性的 scFv-H4 的比例。

在添加了 IPTG 后, 具有生物活性的 scFv-H4 的表达量和包涵体的量随 IPTG 浓度的变化不大, 而温

度对 scFv-H4 的表达影响就比较显著 (表 2 和图 6)。在温度低于 25°C 时, 具有生物活性的 scFv-H4 表达量随着温度升高, 没有形成明显的包涵体; 当温度增加到 25°C, 具有生物活性的 scFv 的量没有明显增加, 但是包涵体却大量形成; 当温度达到 30°C 时, 具有生物活性的 scFv 表达量显著下降, 而包涵体也有所减少。所以用 Origami (DE3) 表达具有生物活性的 scFv, 诱导温度不宜过高, 在 20°C 比较合适, 这样既能够有大量的具有生物活性的 scFv-H4 产生, 又能避免包涵体的形成。

表 2 在不同的诱导条件下, *E. coli Origami DE3* 的生长情况与具有生物活性的 scFv-H4 的表达量 数据为 2 次平行实验的均值加标准差)

Table 2 The functional scFv-H4 production by *E. coli Origami DE3* induced at different condition (data were presented as the average of duplicates with standard deviation)

Code	Temperature/ °C	IPTG/ mmol/L)	Biomass (OD_{600})	ELISA signal ($OD_{450} - OD_{650}$)
1	20	0	2.32 ± 0.16	0.036 ± 0.013
2	20	0.5	1.45 ± 0.19	1.579 ± 0.030
3	20	1.0	1.45 ± 0.21	1.719 ± 0.023
4	20	2.0	1.49 ± 0.03	1.663 ± 0.014
5	16	1.0	1.29 ± 0.09	0.800 ± 0.058
6	25	1.0	1.66 ± 0.13	1.227 ± 0.007
7	30	1.0	1.25 ± 0.10	0.538 ± 0.015

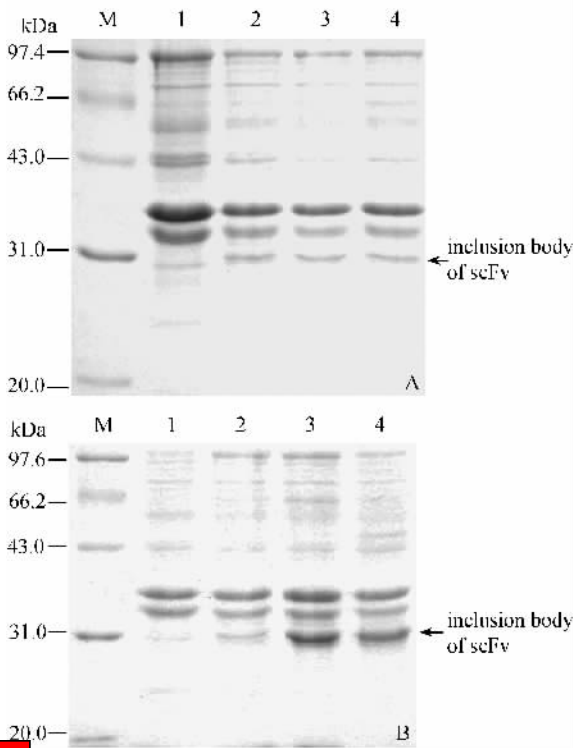


图 6 在不同诱导条件下, scFv-H4 在 *E. coli Origami DE3* 中形成的包涵体的电泳图。A: 在不同 IPTG 浓度下诱导的结果 (诱导温度为 20°C); B: 在不同温度下诱导的结果 (IPTG 浓度为 1 mmol/L)

Fig.6 The SDS-PAGE of the inclusion body (indicated by the arrow) formed in *E. coli Origami DE3* induced at various conditions. A: induced by various IPTG concentrations (at 20°C); B: induced at various temperatures (by 1 mmol/L IPTG). M. protein marker; 1.0 mmol/L IPTG; 2.0.5 mmol/L; 3.1.0 mmol/L IPTG; 4.2.0 mmol/L IPTG; 5.16°C; 6.20°C; 7.25°C; 8.30°C.

2.7 scFv-H4 的亲纯化与含量测定

将诱导结束的菌体超声破壁,我们用镍亲和柱将上清中的可溶 scFv-H4 纯化出来。固定在 Sepharose Fast Flow 凝胶柱上的 Ni^{2+} 能与 scFv-H4 中

所含的多聚组氨酸标签特异性结合。由 *E. coli* HB2151/pIT2/H4 表达的 scFv-H4 不易纯化 (图 7),这可能是因为筛选载体 pIT2 上 scFv 与下游的 pIII 蛋白之间由一个琥珀抑制子 TAG 分隔,在大肠杆菌中,所有的琥珀抑制子都具有反密码子,能通读琥珀抑制子,并将其翻译成为丝氨酸、谷氨酸或酪氨酸^[5],这样有一部分 scFv 可能以 scFv-pIII 融合蛋白的形式存在。scFv-pIII 融合蛋白也能与 Ni^{2+} 结合,所以继续留存在洗脱液中。而将 scFv 基因转入 pET22b 后,避免了融合蛋白的出现,所以由 pET22b/H4 表达的 scFv-H4 更容易纯化。

用 15 mL 含 200 mmol/L 的咪唑的 Tris 缓冲液将吸附在镍柱上的 scFv-H4 洗脱,然后在 PBS 中透析 6 遍除去咪唑。然后用 Peterson 法测定蛋白含量,用 BL21 (DE3) 诱导表达的可溶的、具有生物活性的 scFv-H4 是 8 mg/L 培养物,而用 Origami (DE3) 诱导表达的可溶 scFv-H4 是 35 mg/L 培养物。

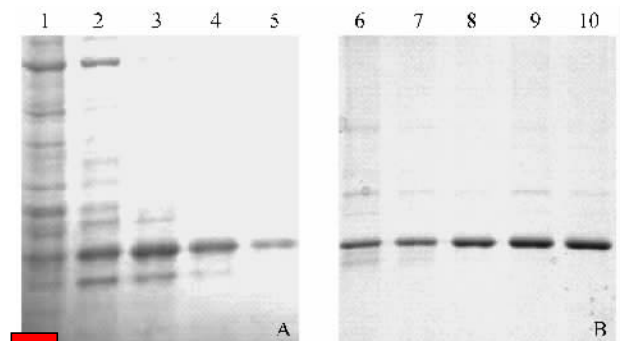


图 7 用含有不同浓度的咪唑的 Tris 缓冲液梯度洗脱吸附在 Ni 亲和柱上的 scFv-H4 的电泳图

Fig.7 The SDS-PAGE of gradient elution of scFv from Ni chelating column with Tris buffer containing different concentrations of imidazole. A: Gradient elution of scFv expressed by HB2151/pIT2/H4; B: Gradient elution of scFv expressed by BL21 (DE3)/pET22b/H4. 1.100 mmol/L imidazole; 2.110 mmol/L imidazole; 3.120 mmol/L imidazole; 4.130 mmol/L imidazole; 5.200 mmol/L imidazole; 6.100 mmol/L imidazole; 7.110 mmol/L imidazole; 8.120 mmol/L imidazole; 9. mmol/L imidazole 130 mmol/L imidazole; 10.200 mmol/L imidazole.

2.8 scFv-H4 亲和特性的测定

我们还研究 scFv-H4 与 AFB1-BSA 和 AFB1 的结合能力。首先,我们采用棋盘法来确定竞争 ELISA 所用抗体的浓度和酶标板上包被 AFB1-BSA 的浓度 (数据未给出)。根据棋盘法测定的结果在竞争 ELISA 中,我们选用 52.8 ng/mL AFB1-BSA 来包被酶标板。图 8 是抗体经过等倍梯度稀释后,ELISA 的实验结果。我们在竞争 ELISA 实验中采用的抗体浓度为 0.5 μ g/mL,这样可以使 ELISA 的信号值大约在

1 左右,在此范围内 ELISA 信号对 scFv-H4 浓度变化最为敏感。

在竞争 ELISA 中,抗体与浓度为 0.05 ~ 2 ng/mL 的游离 AFB1 在 37°C 预先温浴 1 h,让 scFv-H4 与游离的 AFB1 能充分结合,然后将混合液转入包被了 AFB1-BSA 的酶标板孔中。竞争 ELISA 的实验结果如图 9 所示,scFv-H4 的半抑制率 (IC_{50}) 在 0.4 ng/mL。Moghaddam 等人从未免疫过的文库中通过竞争洗脱筛选到的单链抗体 IC_{50} 为 400 ng/mL^[6],而 Daly 等人从免疫过的小鼠单链抗体文库中筛选到的克隆,其 IC_{50} 为 16 ng/mL^[7]。相比较而言,我们抗体对 AFB1 更为敏感,能检测到更低浓度的 AFB1,所以这个抗体具有一定的应用价值。

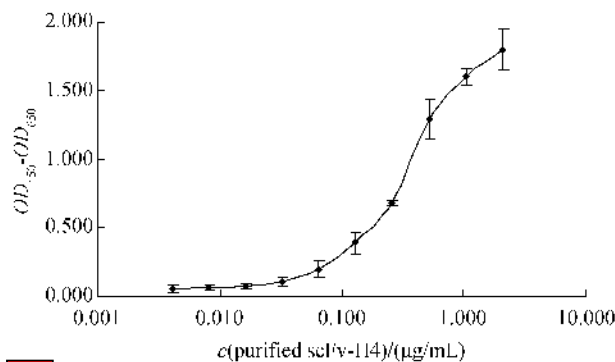


图8 在用以包被 AFB1-BSA 浓度为 52.8 ng/mL 条件下,等体积稀释抗体后用 ELISA 测定抗体滴度

Fig.8 Dose-dependent binding of purified scFv-H4. Purified scFv-H4 was serially diluted before the quantification for binding by ELISA. (The AFB1-BSA used in coating was 52.8 ng/mL and ELISA results were presented as the average of triplicates with standard deviation).

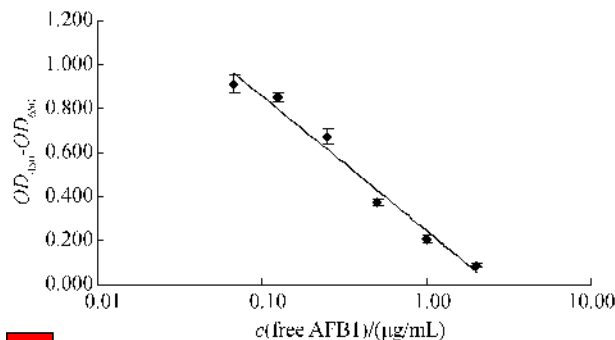


图9 scFv-H4 用于竞争 ELISA 的实验结果

Fig.9 Binding of scFv-H4 to free AFB1 in a competition assay. Purified scFv was preincubated with various concentration of AFB1 before transferring to AFB1-BSA coated microtitre wells and quantified for binding by ELISA. (The control without preincubation had a signal of 1.251 ± 0.035 and data were presented as the average of triplicates with standard deviation).

3 讨论

本文叙述了采用 pET22b 载体在宿主 BL21 (DE3)和 Origami (DE3)表达抗黄曲霉毒素 B1 的单链抗体蛋白 scFv-H4 的实验。

针对筛选中采用的 pIT2 载体在表达 scFv-H4 过程出现的表达不稳定,表达量较少,表达产物不易纯化等问题,我们采用了 pET22b 载体来表达 scFv-H4。在 BL21 (DE3)/pET22b 组合中,scFv-H4 能够大量表达,但多以不溶性的包涵体形式存在。于是,我们采用了胞内呈氧化性环境的 Origami (DE3)作为宿主。Origami (DE3)/pET22b 在 20°C,1.0 mmol/L IPTG 条件下能够较高地表达具有生物活性的 scFv-H4,达到 35 mg/L 培养物。根据本文的结果,我们认为 pET22b 是比较适宜表达 scFv-H4,而 Origami (DE3)是较优的宿主,在较低的诱导温度 (20°C)能较多的获得具有生物活性的蛋白,而且比较容易纯化。

参考文献

- [1] Smela ME, Currier SS, Bailey EA, et al. The chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2001, 22 (4): 535 - 545.
- [2] 沈倍奋,陈志南,刘民培. 重组抗体. 北京: 科学出版社, 2005.
- [3] Grant SD, Porter AJ, Harris WJ. Comparative sensitivity of immunoassays for haptens using monomeric and dimeric antibody fragments. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, 47 (1): 340 - 345.
- [4] Yajima W, Rahman MH, Das D, et al. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* using a monomeric and dimeric single-chain fragment variable (scFv). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56 (20): 9455 - 9463.
- [5] 王铁斌,丁虎生,杨炼,等. 抗黄曲霉毒素 B1 单链抗体的筛选和鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49 (1): 135 - 140.
- [6] 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 Expression and Purification*, 2005, 42 (2): 255 - 267.
- [7] Santala V, Lamminmaki U. Production of a biotinylated single-chain antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Immunology Methods*, 2004, 284 (1-2): 165 - 175.

- [8] Jurado P, Ritz D, Beckwith J, et al. Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320 (1): 1 – 10.
- [9] 孙雪奇, 刘仲义, 陈奇英. Peterson 法测定视网膜注射液中微量多肽的含量. 药物分析杂志 (*Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*), 2005, 25 (1): 104 – 106.
- [10] Brichta J, Vesela H, Franek M. Production of scFv recombinant fragments against 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid hapten using naïve phage library. *Vet Med-Czech*, 2003, 48 (9): 237 – 247.
- [11] Yang J, Moyana T, MacKenzie S, et al. One hundred seventy-fold increase in excretion of an FV fragment-tumor necrosis factor alpha fusion protein (scFv/TNF-alpha) from *Escherichia coli* caused by the synergistic effects of glycine and triton X-100. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (8): 2869 – 2874.
- [12] Smialowski P, Martin-Galiano AJ, Mikolajka A, et al. Protein solubility: sequence based prediction and experimental verification. *Bioinformatics*, 2007, 23 (19): 2536 – 2542.
- [13] Sorensen HP, Mortensen KK. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbiological Cell Factory*, 2005, 4 (1): 1 – 8.
- [14] Berks BC, Palmer T, Sargent F. The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Advances in microbial physiology*, 2003, 47: 187 – 254.
- [15] 本杰明·卢音. 基因 V II. 余龙, 等译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [16] Moghaddam A, Lobersli I, Gebhardt K, et al. Selection and characterisation of recombinant single-chain antibodies to the hapten Aflatoxin-B1 from naïve recombinant antibody libraries. *Journal of Immunological Methods*, 2001, 254 (1 – 2): 169 – 181.
- [17] Daly SJ, Dillon PP, Manning BM, et al. Production and characterization of murine single chain Fv antibodies to Aflatoxin B1 derived from a pre-immunized antibody phage display library system. *Food and Agricultural Immunology*, 2002, 14 (4): 255 – 274.

Expression and optimization of anti-AFB1 scFv in *Escherichia coli*

Lian Yang, Yanhong Zhang, Husheng Ding, Liyun Wang, Wei Chen, Hao Zhang*

State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [Objective] A drawback of the expression of single chain antibody fragment (scFv) in prokaryotic system is the protein accumulation in the cytoplasm as inclusion body. We aimed at high-level production of an anti-aflatoxin B1 scFv in functional form. [Methods] The gene of scFv-H4 was cloned into pET22b vector and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and Origami (DE3), respectively. The amount of functional scFv-H4 was optimized in terms of IPTG concentration and induction temperature. [Results] scFv-H4 could be expressed in both BL21 (DE3) and Origami (DE3). Compared with BL21 (DE3), Origami (DE3) could express multifunctional scFv-H4 (5 mg/mL) and less in inclusion body (1% of the total expression). The expression of scFv-H4 was significantly affected by induction temperature rather than IPTG concentration. [Conclusion] The pET22b could be used for high-level expression of the functional scFv-H4 in Origami (DE3), which has an oxidative cytoplasm. In addition, the induction at low temperature avoided the formation of inclusion body.

Keywords: aflatoxin; scFv; expression; BL21 (DE3); pET

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)