

盐酸克伦特罗生物素化单链抗体在大肠埃希氏菌中的表达^{*}

马巍娜¹, 刘雪林², 宋宏彬², 沈建良¹, 黄友章¹, 刘毅¹, 向丹¹

(1. 中国人民解放军海军总医院血液科, 北京 100037;

2. 中国人民解放军军事医学科学院十所, 北京 100039)

摘要:目的 提取盐酸克伦特罗(CLB)生物素化抗体片段蛋白进行表达,为下一步纯化及农兽药快速检测奠定基础。

方法 确定一株生物素化 CLB 噬菌体抗体“pHEN1-BHNS-CLB1”对其进行蛋白表达,即从噬菌粒“PHEN1-BHNS-CLB1”切下 scFv 基因片段,亚克隆至能引导可溶性表达的载体 pCANTAB5E 上,完成了重组质粒的构建,将所构质粒转化大肠埃希氏菌感受态细胞 BL21。命名“5E-BHNS-CLB1”,并对“5E-BHNS-CLB1”进行 PCR 及酶切鉴定后,测序分析。**结果** ELISA 结果证明其具有较好的亲和性,竞争抑制 ELISA、与 gp120 蛋白及三聚氰胺的交叉反应 ELISA 结果均证明其具有很好的特异性,片段大小与预想目的片段大小一致,SDS-PAGE 及 Western blotting 的结果显示,其分子量大小与目的一致,并能与抗 E-tag 标签抗体结合显色。**结论** 说明表达的蛋白能与表达载体 5E 后带有 E-Tag 标签的短肽作用,含有 E-Tag 标签,是我们要表达的目的蛋白,为下一步纯化蛋白创造了条件。

关键词:噬菌体表面展示技术;筛选;盐酸克伦特罗;生物素;表达

中图分类号:R378.21;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)04-044-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.011

Expression of Clenbuterol Biotinylated ScFv in *Escherichia Coli*

MA Wei-na¹, LIU Xue-lin², SONG Hong-bin², SHEN Jian-liang¹, HUANG You-zhang¹,
LIU-Yi¹, XIANG Dan¹ (1. Department of Hematology, General Hospital of PLA Navy,
Beijing 100037, China; 2. PLA Disease Control and Prevention, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective to extract clenbuterol hydrochloride (CLB) biotinylated antibody fragments of protein expression, purification and lay the foundation for the rapid detection of pesticide and veterinary drug next. **Methods** Determined biotinylated phage antibodies to CLB “pHEN1 BHNS CLB1” for protein expression. The scFv gene was cut from the phagemid “PHEN1-BHNS-CLB1”, cloned into the vector pCANTAB5E can guide the soluble expression, completed the construction of recombinant plasmid, the plasmid was transformed into *E. coli* competent cells BL21. Named “5E-BHNS-CLB1”, and “5E-BHNS-CLB1” by PCR and enzyme digestion, sequencing. **Results** The ELISA results proved that it had better affinity, competitive inhibition of ELISA, ELISA and gp120 cross reaction results indicated that the protein and melamine had good specificity, the scFv gene was cut from the phagemid “PHEN1-BHNS-CLB1”, cloned into the vector pCANTAB5E could guide the soluble expression, completed the construction of recombinant plasmid, the plasmid was transformed into *E. coli* competent cells BL21. Named “5E-BHNS-CLB1”, and “5E-BHNS-CLB1” by PCR and enzyme digestion, sequencing, fragment size and expected fragment size consistent, SDS-PAGE and Western blotting results showed that consistency in their molecular size and purpose, and with the label of anti e-tag antibody combined with color. **Conclusion** Protein expression and expression vector 5E with e-tag label short peptide, containing the E-tag label is we want to table of the target protein, as a purified protein to create the conditions.

Keywords: phage display technology; screening; CLB; biotin; expression

在噬菌体表面不仅可以展示小肽,还可以把蛋白质展示在 gⅧ蛋白,或常常展示在 gⅢ蛋白并以融合蛋白质出现,当融合到 gⅢ蛋白上时,需辅助噬菌体提供野生型的 gⅢ蛋白互补组装病毒颗粒。直接从抗体库中获得单链抗体是在噬菌体头部以 scFv-g3p 融合蛋白的形式存在。大多数成熟的具有抗原结合能力的噬菌体都带有一个拷贝的 scFv-g3p 融合蛋白,2~4 个拷贝的 g3p 蛋白,当然也有

带多拷贝融合蛋白的重组噬菌体。但其在单位体积培养基中的数量极其有限,远远满足不了科研和实际应用的需要,因此为获得足够的抗体进行下一步研究,必须高效表达特异抗体^[2,13]。

对于单链抗体而言,由于不需要糖基化,不需要组装成多聚体,因此可以选用易于基因操作、成本低、繁殖速度快的大肠埃希氏菌表达系统进行表达^[5],故本实验选取了前期实验中特异性较好的一

* 基金项目:国家 863 计划科学基金资助项目(项目编号:2006BAK02A09)。

作者简介:马巍娜(1983—),女,硕士研究生,微生物控制技术, Tel:010-66958485, E-mail:mv4477@sina.com。

株生物素化盐酸克伦特罗抗体片段,提取蛋白进行表达,结果显示,其分子量大小与目的一致,并能与抗 E-tag 标签抗体结合显色,是我们表达的目的蛋白,为下一步纯化及农兽药品检测奠定基础,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒载体: *E. coli* 菌株 BL21 感受态细胞(天根生化科技有限公司,本实验室保存),培养于 LB 培养基中。pCANTAB5E 质粒为本室保存菌株。

1.1.2 主要试剂:鼠抗-M13 噬菌体,四甲基联苯胺(TMB),SDS,IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖吡喃糖苷),丙烯酰胺(Sigma, USA);96 孔酶联免疫板(Becton Dickinson USA);HRP-E tag 标签 IgG(abcam, England);限制性内切酶 Not I, Sfi I, 蛋白分子量标记, T4 DNA Ligase(TakaRa, 日本);其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 表达菌株的选取:针对前期实验数据及结果,最后确定一株生物素化的噬菌体抗体,进行表达鉴定,命名为“pHEN1-CLB1”。(ELISA 鉴定:阴性对照:设单独包有链亲和素孔,单独包有生物素孔,单独包有 BSA 孔;空白对照设:水, PBS)。

1.2.2 “pHEN1-CLB1” pCANTAB5E 空载体质粒的提取:挑取“pHEN1-CLB1”噬菌体、pCANTAB5E 菌液抗体克隆,接种到 5 ml 的含有氨苄青霉素的 2 \times YT 培养液中,培养至对数期后,按试剂盒标注方法分别提取质粒。

1.2.3 连接产物的转化及鉴定:将“pHEN1-CLB1”从 pHEN1 载体亚克隆入 pCANTAB5E 表达载体,将回收的 CLB1 与 pCANTAB5E 片段的酶切产物用 T4DNA 连接酶连接。重组子命名为“5E-BHNS-CLB1”根据其表达载体 pCANTAB5E 的序列位置,用 ARTEMIS 软件提取出 pHEN1-CLB1 基因两侧的序列,设计扩增引物并鉴定。

PCR 扩增引物:上游引物 5'-CgTgAAAA AATTATTATTCgC-3';下游引物 5'-gTAAAT-gAATTTTCTgTATgAgg-3'。

1.2.4 重组子“5E-BHNS-CLB1”的测序:分别用位于重组子“5E-BHNS-CLB1”质粒上的测序引物 M13F 和 M13R 对插入的 N 端和 C 端进行测序,并确定其序列的正确性。将质粒送奥科生物技术有限公司进行测序,测序结果与基因组数据库和设计的序列进行比对分析。

1.3 单链抗体的表达与电泳鉴定

1.3.1 “5E-BHNS-CLB1”蛋白的表达:见图 1。

目的蛋白的表达:接种“5E-BHNS-CLB1”菌液 150 μ l 于培养液 37 $^{\circ}$ C 过夜培养,加入诱导剂 IPTG,离心。收集菌沉淀。

1.3.2 电泳鉴定:SDS-PAGE 检测:丙烯酰胺凝胶的制备:积层胶:1 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 30 g/dl 丙烯酰胺(丙烯酰胺:N,N-亚甲基双丙烯酰胺=29:1), 10 g/dl SDS, 10 g/dl 过硫酸胺和 0.01 g/dl TEMED。分离胶:1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8), 0.04 g/dl TEMED 上。电泳:取少量样品,加等体积的 2 \times 样品缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸,5 μ l 上样。通电,取凝胶并脱色。

“5E-BHNS-CLB1”蛋白的 Western Blotting:见图 3。用转移缓冲液漂洗胶块,封闭 2 h。PBS-T 洗三次,盐酸克伦特罗抗原稀释液为一抗 37 $^{\circ}$ C 作用 2 h。洗三次,加 HRP-Etag 标签 IgG 二抗,37 $^{\circ}$ C 作用 2h 后,显色、终止,水漂洗后阴干。

2 实验结果

2.1 鉴定表达菌株的选定及结果 鉴定表达菌株“pHEN1-BHNS-CLB1”的选取与鉴定:确定一株菌株,抑制前值为 1.023 \pm 0.277,抑制后值为 0.579 \pm 0.152 进行鉴定表达,名为“pHEN1-BHNS-CLB1”(以下简称 P-B-1),为保证选取的表达菌株“pHEN1-BHNS-CLB1”良好的特异性:与 gp120 蛋白,三聚氰胺竞争抑制 ELISA 结果数据见表 1,证明其只与包有盐酸克伦特罗的免疫孔相结合,而不会与其它抗原发生反应,再次验证了“pHEN1-BHNS-CLB1”具有一定特异性。空白对照 ddH₂O 均值:0.098。

2.2 酶切鉴定 挑取 PCR 扩增阳性的克隆,用 1 g/dl 的琼脂糖凝胶电泳,电泳结果显示酶切下来的条带大小约为 750 bp,与预期大小一致,结果表明,P-B-1 正确插入到了 pCANTAB5E 载体中(图 1)。

2.3 序列分析 对 PCR 和酶切验证结果都阳性的克隆培养物由北京奥科生物公司进行了测序。判断测序结果的开放读码框架(ORF)。将获得的推断的氨基酸序列经 BLAST 软件在 GenBank 数据库-抗体库中进行同源性序列比较,最终判定物的性质、cDNA 核酸序列、基因组序列以及该基因在染色体中定位。该 DNA 序列片段约为 729 bp,由 320 bp 重链可变区(VH),308 bp 轻链可变区(VL)和 101 bp 连接基因组成。但是它们具有不同的互补决定区。重链属于 IGHV1 型,轻链属于 IGLV3。

2.4 重组质粒 5E-BHNS-CLB1 诱导表达 含有重组质粒 5E-BHNS-CLB1 的大肠杆菌 BL21 (DE3)经 IPTG 诱导后,离心取菌体,上清做 SDS-

PAGE 检测;将“5E-BHNS-CLB1”进行 SDS-PAGE 电泳,然后将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,用盐酸克伦特罗抗原作为一抗,HRP 标记 E-Tag IgG 作为二抗,加入 DAB 显色后,可见预期大小的免疫印迹条带(图 3),其能与抗 E-tag 标签抗体结合显色,说明表达的蛋白能与表达载体 5E 后带有 E-tag 标签的短肽作用,含有 E-tag 标签,是我们表达的目的蛋白。

表 1 “pHEN1-BHNS-CLB1”的 ELISA、交叉反应鉴定数据表

包被抗原	ELISA 数值	竞争抑制 ELISA 数值
CLB	0.789±0.112	0.330±0.099
Gp120	0.102±0.003	0.144±0.078
三聚氰胺	0.100±0.025	0.107±0.100

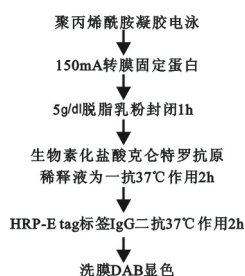
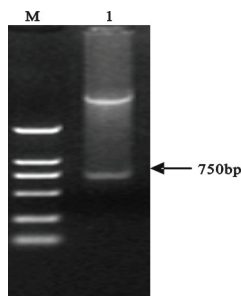
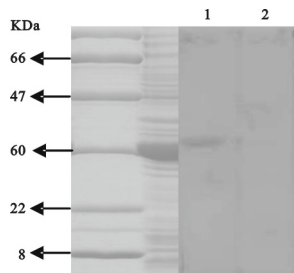


图 1 Western Blotting 操作示意图



M: makerDL2000; 1: 重组质粒双酶切, 对应片段大小约 750 bp。

图 2 粒 NotI/SfiI 酶切鉴定电泳图



左: SDS-PAGE, 右: WB; 1 为样品, 2 为对照。

图 3 融合蛋白表达的 Western Blotting 检测

3 讨论 噬菌体展示蛋白质最重要的应用在于抗体筛选和抗体工程领域^[1~5], 其原因是: 抗体在医学和临床诊断上具有特殊重要作用^[3~9]。如: 在疾

病的诊断和治疗上的应用, 亲和层析配体, 以及近年发展起来的在抗体方面的应用, 目前, 抗体有多种表达系统, 如细菌、酵母和哺乳动物细胞, 每种表达系统都有各自的优缺点。对于单链抗体, 由于不需要糖基化, 不需要组装成多聚体, 因此可以选用易于基因操作, 成本低, 繁殖速度快的大肠埃希氏菌表达系统进行表达^[10~19]。

本试验经前期试验分析鉴定确定一株生物素化噬菌体抗体“pHEN1-BHNS-CLB1”对其进行蛋白表达, ELISA 结果证明其具有较好的亲和性, 竞争抑制 ELISA、与 gp120 蛋白及三聚氰胺的交叉反应 ELISA 结果均证明其具有很好的特异性, 从噬菌粒“PHEN1-BHNS-CLB1”切下 scFv 基因片段, 亚克隆至能引导可溶性表达的载体 pCANT-AB5E 上, 完成了重组质粒的构建, 将所构质粒转化大肠埃希氏菌感受态细胞 BL21, 命名“5E-BHNS-CLB1”, 并对“5E-BHNS-CLB1”进行 PCR 及酶切鉴定后, 测序分析, 片段大小与预想目的片段大小一致。SDS-PAGE 及 Western blotting 的结果显示, 其分子量大小与目的一致, 并能与抗 E-tag 标签抗体结合显色, 说明表达的蛋白能与表达载体 5E 后带有 E-tag 标签的短肽作用, 含有 E-tag 标签, 是我们表达的目的蛋白, 纯化等工作也在后续进行中…为研制高效的农兽药以及食品添加剂检测相关试剂盒创造条件。

参考文献:

- [1] 颜春荣, 刘贤进, 余向阳, 等. 氟虫腈单克隆抗体制备及其性能分析[J]. 江苏农业学报, 2003, 19(3): 166-169.
Yan CR, Liu XJ, Yu XY, et al. Monoclonal antibody preparation and its property analysis for fipronil[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2003, 19(3): 166-169.
- [2] 赵肃清, 孙远明, 张春艳. 甲胺磷单克隆抗体制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2003, 19(2): 142-145.
Zhao SQ, Sun YM, Zhang CY. Production and identification of anti-methamidophos monoclonal antibodies [J]. Immunology Journal, 2003, 19(2): 142-145.
- [3] 何继红, 沈建忠. 磺胺二甲嘧啶单克隆抗体的研制[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(1): 8-11.
He JH, Shen JZ. Development of monoclonal antibodies against sulfamethazine[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2003, 39(1): 8-11.
- [4] 何方洋, 邱阳生, 杨根海, 等. 克伦特罗单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(6): 30-32.
He FY, Qiu YS, Yang GH, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies clenbuterol [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2001, 31(6): 30-32.

(下转 50 页)

- [11] 陈鑫苹,符 征,符生苗,等.海南地区非综合征遗传性耳聋四个常见基因突变的分析[J].现代检验医学杂志,2014,29(5):34-37.
Chen XP, Fu Z, Fu SM, et al. Study the mutation screening of GJB3, GJB2, mtDNA, SLC26A4 gene in Hainan population with non-syndromic hearing impairment[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5):34-37.
- [12] 江凌晓,凌月仙,蔡桂君,等.遗传性耳聋基因芯片检测的临床应用研究[J].分子诊断与治疗杂志,2011,3(3):170-172.
Jiang LX, Ling YX, Cai GJ, et al. Research on the clinical application of DNA microarray on deafness gene mutations[J]. Journal of Molecular Diagnosis and Therapy, 2011, 3(3):170-172.
收稿日期:2016-04-28 修回日期:2016-05-25
- (上接 46 页)
- [5] Shelver WL, Smith DJ, Berry ES. Production and characterization of a monoclonal antibody against the beta-a drenergic agonist ractopamine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(9):4020-4026.
- [6] Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, et al. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries[J]. EMBO J, 1993, 12(2):725-734.
- [7] Mcelhiney J, Lawton LA, Porter AJR. Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a native human phage display library [J]. FEMS Microbiology Letter, 2000, 193(1):83-88.
- [8] Nissim A, Hoogenboom HR, Tomlinson IM, et al. Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents [J]. EMBO J, 1994, 13(3):692-694.
- [9] Tomlinson IM, Walter G, Marker JD, et al. The repertoire of human germline VH sequences reveals about fifty groups of VH segments with different hypervariable loops[J]. J Mol Biol, 1992, 227(3):776-798.
- [10] Sun Y, Li WJ, Ma JS, et al. Soluble expression, purification and characterization of single-chain Fv catalytic antibody (sFv-2F3) [J]. Chemical Research in Chinese Universities, 2004, 20(3):317-322.
- [11] Tordsson JM, Ohlsson LG, Abrahmsen LB, et al. Phage-selected primate antibodies fused to superantigens for immunotherapy of malignant melanoma [J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 48(12):691-702.
- [12] Walewski JL, Gutierrez JA, Branch-Elliman W, et al. Mutation master: profiles of substitutions in hepatitis C virus RNA of the core: alternate reading frame, and NS2 coding regions [J]. RNA, 2002, 8(5):557-571.
- [13] 乔媛媛,王 琰,陈晓穗,等.大容量噬菌体抗体库的构建及鉴定[J].中华微生物学与免疫学杂志,2004,24(3):194-197.
Qiao YY, Wang Y, Chen XS, et al. Construction of a large singlechain phage antibody library[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(3):194-197.
- [14] 张建琼,谢 维,张雪萍,等.人源抗丙型肝炎病毒噬菌体抗体库的构建、筛选及表达[J].上海免疫学杂志,2000,20(5):304-307.
Zhang JQ, Xie W, Zhang XP, et al. Construction, screening and expression of hepatitis C virus specific phage antibody combinatorial library [J]. Shanghai Journal of Immunology, 2000, 20(5):304-307.
- [15] 傅 蓉,刘 刚,戴红梅,等.利用 HER2/neu 胞外配体结合区 2 从噬菌体抗体库中筛选抗体及其初步鉴定[J].生物技术通讯,2006,17(4):574-576.
Fu R, Liu G, Dai HM, et al. Screening and identifying of anti-RLDS antibodies from phage antibody libraries [J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(4):574-576.
- [16] 葛晓冬,刘友生,王晓东,等.人源噬菌体抗体库的构建及抗人 NH-LBP 抗体的筛选与鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2005,21(2):180-184.
Ge XD, Liu YS, Wang XD, et al. Construction of human phage antibody library and screening and characterization of phage antibodies against N terminal fragment of human lipopolysaccharide binding protein [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2005, 21(2):180-184.
- [17] Meulemans EV, Slobbe R, Wastervall P, et al. Selection of phage-displayed antibodies specific for a cytoskeletal antigen by competitive elution with a monoclonal antibody [J]. J Mol Biol, 1994, 244(4):353-360.
- [18] 马巍娜,刘雪林,宋宏彬,等.抗甲硝唑人源 scFv 抗体筛选与鉴定[J].现代检验医学杂志,2010,25(4):7-10.
Ma WN, Liu XL, Song HB, et al. Screening and characterization of human phage antibody to metronidazole [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2010, 25(4):7-10.
- [19] 马巍娜,刘雪林,宋宏彬,等.三聚氰胺人源 scFv 抗体筛选与鉴定[J].现代检验医学杂志,2012,27(3):10-13.
Ma WN, Liu XL, Song HB, et al. Screening and characterization of human phage antibody to melamine [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2012, 27(3):10-13.
收稿日期:2016-01-10 修回日期:2016-03-28