

抗柑桔溃疡病菌可溶性单链抗体的表达及鉴定*

袁青² 年四季³ 殷幼平¹ 李泮志¹ 王中康^{1**}

(¹重庆大学生物工程学院基因工程研究中心 重庆 400044)

(²四川省泸州医学院免疫学教研室 四川 646000)

(³四川省泸州医学院病原生物教研室 四川 646000)

摘要 前期采用核糖体展示技术筛选了抗柑桔溃疡病菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac) 高亲和力单链抗体 (Single chain variable fragment, scFv) GX13、GX44和GX95, 为高效表达具有生物活性的单链抗体, 本研究将前期筛选的高亲和力单链抗体基因转入大肠杆菌HB2151中进行可溶性表达, 点印迹和Western印迹检测可溶性单链抗体的表达水平, 亲和层析纯化表达的单链抗体, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测纯化单链抗体的抗原结合活性。结果显示, 3株抗柑桔溃疡病菌可溶性单链抗体在大肠杆菌HB2151中均获得成功表达, 表达产物分子量 (M_r) 约为 32.0×10^3 , 主要集中于细菌周质腔中。ELISA检测纯化的单链抗体都具备抗原结合活性, 可进一步应用于柑桔溃疡病菌的免疫诊断和病害防治。图4 参14

关键词 柑桔溃疡病菌; 单链抗体; 可溶性表达; 抗原结合活性

CLC S436.661.1 : Q78

Expression and Identification of Soluble Single Chain Variable Fragments Against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri**

YUAN Qing², NIAN Siji³, YIN Youping¹, Li Panzhi¹ & WANG Zhongkang^{1**}

(¹Genetic Engineering Research Centre, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

(²Department of Immunology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China)

(³Department of Pathogenic Biology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China)

Abstract The single chain variable fragments (scFvs) GX13, GX44 and GX95 against *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) had been selected by ribosome display in previous research. In order to express the scFvs with bio-activity efficiently, the genes of the selected scFvs were transformed into *Escherichia coli* HB2151 for expressing resolvable antibodies. The expression levels of scFvs were detected by dot blotting and Western blotting, and the expressed scFvs were purified by affinity chromatography, and then the activity of the purified scFvs was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the three scFvs specific for Xac were successfully expressed in *E. coli* HB2151. The molecular weight (M_r) of expressed products was about 32.0×10^3 and the products were mainly located in the periplasm. All the purified scFvs had the antigen-binding activity by ELISA and could be further used for immunoassay and disease control for citrus bacterial canker disease. Fig 4, Ref 14

Keywords *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; single chain variable fragment; resolvable expression; antigen-binding activity

CLC S436.661.1 : Q78

柑桔溃疡病 (Citrus bacterial canker disease, CBCD) 是影响全球柑桔产业发展的重大顽固性病害, 也是国内外重点检疫对象。其病原菌为地毯草黄单胞柑桔致病变种 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), 它危害数十种芸香科植物, 包括柑桔属中的绝大多数商品化栽培品种。该病分布于世界各地约30多个国家, 以亚洲国家发生较为普遍。我国是柑桔产业大国, 栽培面积超过 146.5×10^4 hm², 居世界首位, 柑桔溃疡病的发生严重影响和阻碍了我国柑桔产业的发展,

目前还没有根除该病的最佳方法。为控制病害的蔓延, 目前很多国家仍然沿用挖除病树集中烧毁的方法。因此, 发展有效的柑桔溃疡病诊断及防治新途径对于我国柑桔产业的发展具有重要意义。

近年来, 基因工程单克隆抗体在植物病害的诊断与防治方面已有所应用。其中, 由抗体重链可变区和轻链可变区通过一接头 (Linker) 连接而组成的单链抗体 (Single chain variable fragment, scFv) 结构简单, 具备完整单克隆抗体与抗原特异结合的特性, 而分子量 (M_r) 大小为完整抗体的1/6, 灵活性和组织穿透力得到增强, 还便于体外重组并大量表达。已有报道应用传统的杂交瘤技术或噬菌体展示技术制备抗马铃薯Y病毒、马铃薯卷叶病毒、番茄斑萎病毒、柑桔衰退病毒及黄瓜花叶病毒等植物病原菌的scFv [1-8]用于免疫诊断。另外, 应用scFv抑制植物病原菌的生长或致病性还是新近发展的植物病害防治新途径 [9-13]。

收稿日期: 2008-09-22 接受日期: 2009-02-17

*国家“十一五”科技支撑计划项目 (No. 2007BAD47B03-5) 和重庆市科委 (No. CSTC 2007AA1024) 资助 Supported by the Project of the National 11th Five-year Plan Science & Technology Pillar Program of China (No. 2007BAD47B03-5) and the Science and Technology Committee of Chongqing, China (No. CSTC 2007AA1024)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zkwang646@sina.com)

高效表达并具有生物学活性是scFv有效应用的关键。目前,有多种表达系统适于scFv的表达,但尚无普适性的表达系统能确保scFv高水平的分泌型表达。大肠杆菌(*Escherichia coli*)具有易于操作、遗传背景清楚、发酵成本低以及生产和研究周期短等优点,是其最常用的表达系统。scFv在一些*E. coli*菌株中表达,其产物为不溶性的包涵体(Inclusion body),虽产量较高,但需要变性及复性,有时复性较困难;另外在一些*E. coli*菌株中也可进行分泌型表达成为可溶性蛋白,优点是具有抗原结合活性,无需变性和复性过程,且可简化包括纯化在内的技术流程,已成为制备scFv的首选策略。

项目前期应用核糖体展示技术筛选出了抗Xac特异性scFv基因^[14],本研究将筛选的scFv基因由*E. coli* TG1细胞转入HB2151细胞中进行可溶性表达,并进行纯化及抗体生物学活性鉴定,为后期柑桔溃疡病的诊断及防治工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

E. coli TG1、*E. coli* HB2151、Anti E Tag抗体、噬菌体载体pCANTAB-5E、辅助噬菌体M13K07及Anti E Tag亲和层析柱均为Pharmacia公司产品;AP标记山羊抗小鼠IgG、pNPP显色试剂盒、底物BCIP/NBT均为北京鼎国生物有限公司产品。低分子量标准蛋白为日本TaKaRa公司产品,NC膜、PVDF膜为美国基因有限公司产品。

1.2 噬菌体转染*E. coli* HB2151细胞

项目前期构建了scFv文库,采用核糖体展示技术从构建的scFv文库中筛选了3株抗Xac特异性高亲和力单链抗体(scFv GX13、GX44和GX95),具体步骤见Yuan等^[14]。为提高scFv的表达量,将筛选scFv基因通过辅助噬菌体M13K07从*E. coli* TG1细胞转染入表达量高的*E. coli* HB2151细胞中进行可溶性表达。具体步骤为:分别将含有相应抗体基因的TG1克隆子挑出至2×YT-AG(2×YT培养基中含100 μg mL⁻¹氨苄青霉素,2%葡萄糖)液体培养基中30℃培养过夜。次日,取饱和培养的培养液40 μL于新鲜配制的400 μL 2×YT液体培养基中(含100 μg mL⁻¹氨苄青霉素,2.5×10⁸ M13K07辅助噬菌体),37℃、250 r/min培养2 h,离心,重悬沉淀于400 μL 2×YT液体培养基中(含100 μg mL⁻¹氨苄青霉素,50 μg mL⁻¹卡那霉素),30℃培养过夜。次日,离心取上清液,上清液中即含有噬菌体表达。取噬菌体抗体克隆上清液2 μL加入400 μL对数生长的*E. coli* HB2151中,于37℃中速摇30 min,然后划线接种于SOBAG-N平板上,30℃培养至长出单菌落。

1.3 单链抗体可溶性表达

挑取转染了scFv基因的*E. coli* HB2151单克隆子分别接种于5 mL 2×YT-AG液体培养基中,于30℃以250 r/min培养过夜。将5 mL过夜培养菌加到50 mL新鲜的2×YT-AG培养基中,于30℃以250 r/min培养1 h,室温下3 500 r/min离心20 min,弃上清液。将沉淀重悬于50 mL新鲜的2×YT-AI液体培养基中(2×YT培养基中含100 μg mL⁻¹氨苄青霉素,1 mmol L⁻¹ IPTG),于30℃以250 r/min培养5 h。把培养物分至两个不同的离心管中,室温下3 500 r/min离心20 min,取上清液超滤浓缩5倍后4℃保存备用。沉淀分两管分别采用两种方法处理,

其中一管沉淀用0.5 mL冰冷的1×TES(0.2 mol L⁻¹ Tris-HCl [pH 8.0], 0.5 mmol L⁻¹ EDTA, 0.5 mol L⁻¹蔗糖)重悬,然后加入0.75 mL冰冷的1/5×TES进行涡旋,继而冰浴30 min,10 000 r/min离心10 min,取上清液4℃备用(即周质提取物);另一管沉淀用0.5 mL PBS悬浮,煮沸5 min,10 000 r/min离心10 min,取上清液4℃备用(即全菌提取物),制备的样品若短期内不用,则于-20℃储存。由于噬菌体载体pCANTAB5E的Not I位点后有一编码E-tag小肽的基因,表达的可溶性scFv可通过结合此短肽的抗体(Anti E Tag抗体)进行检测和纯化。

1.4 点印迹检测可溶性scFv的表达

将上述制备的超滤浓缩5倍的培养基上清液、周质提取物 and 全菌提取物各取2 μL点于NC膜上,待膜彻底干燥后,于封闭缓冲液PBSB(PBS含5% BSA)中室温封闭2 h;用PBST(PBS中含0.05% Tween 20)洗涤后,将膜与PBSB稀释的Anti E Tag抗体(终浓度为8 μg mL⁻¹)室温振荡温育1 h;PBST洗涤后,将膜与PBSB稀释的AP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5000)室温振荡温育1 h;PBST洗涤后,用BCIP/NBT显色,阴性对照为空质粒菌株周质提取物。

1.5 单链抗体的纯化及Western印迹鉴定

采用Anti E Tag亲和层析柱对表达的scFv进行纯化,具体步骤见纯化试剂盒说明书。纯化后的产物分两份于12%分离胶和6%浓缩胶进行SDS-PAGE电泳,电泳后一份用于银染鉴定纯化效果,另一份将蛋白从胶上转移至PVDF膜上,进行Western印迹鉴定(后续步骤同点印迹)。

1.6 ELISA鉴定纯化scFv的抗原结合活性

用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将Xac菌悬液(1×10⁷ CFU mL⁻¹)固定在酶标板上,用封闭缓冲液PBSB于37℃封闭2 h后,加入PBSB稀释的纯化单链抗体(5 ng mL⁻¹)37℃孵育1 h;PBST洗涤后,加入PBSB稀释的Anti E Tag抗体(1 μg mL⁻¹)37℃孵育1 h;PBST洗涤后,再加入PBSB稀释AP标记的山羊抗小鼠IgG(1:5000)37℃孵育1 h;PBST洗涤后,pNPP底物显色,于酶标仪上在405 nm处读数,阴性对照为空质粒菌株表达产物,P/N>2为阳性。

2 结果与分析

2.1 点印迹检测

分别将scFv GX13、GX44和GX95基因通过噬菌体转染从*E. coli* TG1转入高效表达菌株HB2151中进行可溶性表达。表达5 h后,分别将周质提取物、培养基上清液5倍浓缩液和全菌提取物点于NC膜上进行点印迹检测scFv的表达情况。结果如图1所示,HB2151菌株中表达的3株scFv在全菌提取物中无检测信号,在上清液浓缩物中为弱阳性,而周质提取物中则呈阳性信号,说明3株scFv加入IPTG诱导表达5 h后,其表达产物主要集中于周质提取物中,阴性对照为表达的空质粒菌株周质提取物。

2.2 Western印迹检测

将表达在周质提取物的scFv GX13、GX44和GX95蛋白用Anti E Tag亲和层析柱进行纯化后,SDS-PAGE电泳后银染结果显示,在蛋白分子量约为32.0×10³处有单一条带产生,其大小与预计的可溶性scFv的分子量大小相符,并且无其他杂带产生(图2),说明采用Anti E Tag亲和层析柱纯化效果

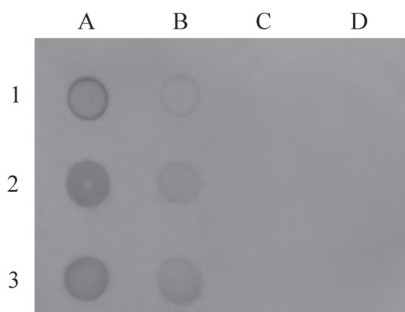


图1 点印迹检测表达的可溶性scFv在各组分中的分布

Fig. 1 Analysis of soluble scFvs in different fractions by dot blotting
1A~3A. 克隆子GX13、GX44和GX95的周质提取物; 1B~3B. 克隆子GX13、GX44和GX95的培养基上清液浓缩物; 1C~3C. 克隆子GX13、GX44和GX95的全菌提取物; 1D~3D. 阴性对照
1A~3A. Periplasmic fractions derived from clone GX13, GX44 and GX95; 1B~3B. Concentrated culture supernatants derived from clone GX13, GX44 and GX95; 1C~3C. Whole cell extracts derived from clone GX13, GX44 and GX95; 1D~3D. Negative control

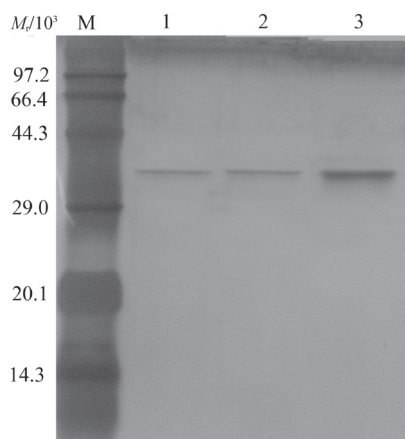


图2 SDS-PAGE鉴定纯化后的scFvs

Fig. 2 Identification of the purified scFvs by SDS-PAGE
M. 低分子量蛋白质marker Low molecular weight protein marker. 1. scFv GX13; 2. scFv GX44; 3. scFv GX95

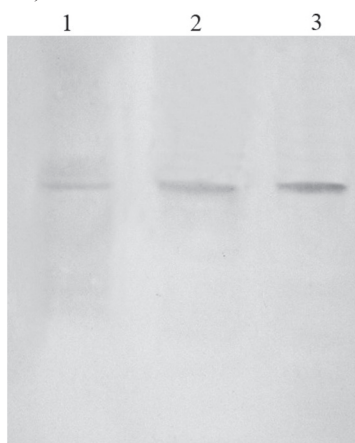


图3 Western印迹鉴定纯化后的scFvs

Fig. 3 Identification of the purified scFvs by Western blotting
1. scFv GX13; 2. scFv GX44; 3. scFv GX95

好。为验证表达产物的正确性,将纯化的scFv GX13、GX44和GX95蛋白进行SDS-PAGE电泳后,Western印迹检测,结果显示,在蛋白分子量约为 32.0×10^3 处同样有单一条带产生,与纯

化后的scFv SDS-PAGE电泳条带一致,如图3所示。说明scFv GX13、GX44和GX95在*E. coli* HB2151中得到了表达,并且表达产物正确。

2.3 可溶性scFv的生物学活性检测

为了验证在*E. coli* HB2151中表达的scFv GX13、GX44和GX95具备抗原结合活性,将抗原Xac固定于酶标板上,加入纯化后的scFv进行ELISA测试。结果显示,在HB2151中表达的3株scFv都具备生物学活性,与抗原Xac结合良好,如图4所示。

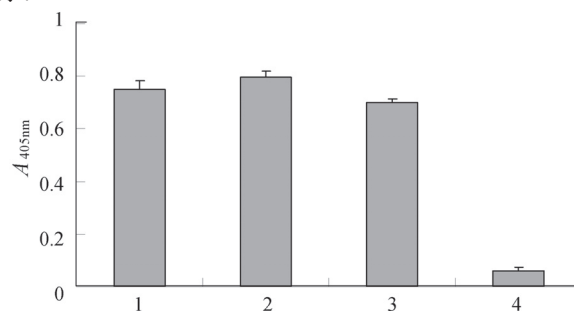


图4 ELISA检测纯化scFv的抗原结合活性

Fig. 4 Analysis of the antigen-binding activity of the purified scFvs by ELISA

1. scFv GX13; 2. scFv GX44; 3. scFv GX95. 4. 阴性对照 Negative control

3 讨论

近20年来抗体工程的发展经历了多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程重组抗体3个阶段,其中scFv由于具有分子量小、免疫原性低、组织穿透力强并且可以在多种宿主中表达的特点,成为医学领域研究的热点。近年来,scFv在植物病害的诊断和防治方面也有所应用^[1-13]。但其应用在植物病毒病方面较多,关于抗植物细菌scFv的报道较少。对于抗Xac抗体方面的研究,只有胡春华等制备了柑桔溃疡病致病基因pthA核定位信号肽抗血清并发现其对Xac致病力有一定的抑制作用^[13]。本研究将前期筛选的抗Xac单链抗体进行可溶性表达,表达的具备生物学活性的scFv不但可应用于柑桔溃疡病的免疫诊断,还可为柑桔溃疡病的防治提供新途径。

scFv可通过噬菌体展示或核糖体展示技术筛选获得,获得的scFv基因可在*E. coli* TG1或HB2151中进行表达,基于实验中所使用的噬粒载体pCANTAB-5E的特性,当宿主菌为抑制型菌株TG1时,翻译可通过琥珀密码子,使scFv与噬菌体基因Ⅲ编码的蛋白融合,共同呈现于噬菌体表面;在换用非抑制型菌株HB2151时,琥珀终止密码子被识别,蛋白的合成终止于scFv基因下游的E-Tag序列。在这种情况下,所产生的携带E-Tag的scFv为可溶性形式,它不断被转运到周质间隙,并且随着培养时间的延长而渗透到培养上清液中。本研究利用此原理,选用抑制性菌株HB2151为宿主菌,成功地表达了抗柑桔溃疡病菌Xac的可溶性scFv片段。

在*E. coli* HB2151中成功表达的scFv通过点印迹及Western印迹检测表明为正确的产物,各表达克隆的可溶性抗体均在细菌周质提取物中含量最高,其次为培养上清液。这种结果可能与诱导培养时间有关,如果延长诱导时间,上清液中的scFv浓度可能会增加。然而,可溶性抗体富集于周质提取物中更有利于制备高浓度的可溶性抗体,其原因在于周质

提取物是从离心沉淀后的细菌中制备而来, 其中不含培养基成分, 并且制备体积可人为控制, 所以本项目经过摸索, 以在30 ℃诱导表达5 h时, 可溶性scFv在周质腔中的浓度最高. 在对scFv表达产物进行纯化时, 由于表达的scFv携带有E-tag标签, 所以采用了Anti E Tag亲和层析柱进行纯化, 结果显示纯化的效果好, 银染后只有目的靶带产生, 无其他蛋白杂带. ELISA检测结果表明, 纯化的scFv具备与抗原结合的生物学活性.

综上所述, 抗Xac单链抗体在*E. coli* HB2151菌株中成功得到了表达, 表达的scFv集中于细菌周质提取物中, 并具备抗原结合活性. 表达纯化的scFv可用于柑桔溃疡病的诊断, 还可进一步用于防治柑桔溃疡病的研究.

References

- 1 Boonham N, Barker I. Strain specific recombinant antibodies to potato virus Y potyvirus. *J Virol Methods*, 1998, **74** (2): 193~199
- 2 Toth RL, Harper K, Mayo MA, Torrance L. Fusion proteins of single-chain variable fragments derived from phage display libraries are effective reagents for routine diagnosis of potato leafroll virus infection in potato. *Phytopathology*, 1999, **89** (11): 1015~1021
- 3 Harper K, Toth RL, Mayo MA, Torrance L. Properties of a panel of single chain variable fragments against potato leafroll virus obtained from two phage display libraries. *J Virol Methods*, 1999, **81** (1~2): 159~168
- 4 Harper K, Kerschbaumer RJ, Ziegler A, Macintosh SM, Cowan GH, Himmler G, Mayo MA, Torrance L. A scFv-alkaline phosphatase fusion protein which detects potato leafroll luteovirus in plant extracts by ELISA. *J Virol Methods*, 1997, **63**: 237~242
- 5 Griep RA, Prins M, van Twisk C, Keller HJ, Kerschbaumer RJ, Kormelink R, Goldbach RW, Schots A. Application of phage display in selecting tomato spotted wilt virus-specific single-chain antibodies (scFvs) for sensitive diagnosis in ELISA. *Phytopathology*, 2000, **90** (2): 183~190
- 6 Terrada E, Kerschbaumer RJ, Giunta G, Galeffi P, Himmler G, Cambra M. Fully "Recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 2000, **90** (12): 1337~1344
- 7 Ziegler A, Torrance L, Macintosh SM, Cowan GH, Mayo MA. Cucumber mosaic cucumovirus antibodies from a synthetic phage display library. *Virology*, 1995, **214** (1): 235~238
- 8 Rouis S, Lafaye P, Jaoua-Aydi L, Sghaier Z, Ayadi H, Gargouri-Bouid R. Cloning and expression of functional single-chain Fv antibodies directed against NIa and coat proteins of potato virus Y. *J Virol Methods*, 2006, **137** (1): 1~6
- 9 Rouis S, Traincard F, Gargouri R, Darteville S, Jeannequin O, Mazié JC, Ayadi H. Inhibition of potato virus Y NIa activity: Preparation of monoclonal antibody directed against PVY NI protein that inhibits cleavage of PVY polyprotein. *Arch Virol*, 2001 **146** (7): 1297~306
- 10 Gargouri-Bouid R, Jaoua L, Rouis S, Saïdi MN, Bouaziz D, Ellouz R. PVY-resistant transgenic potato plants expressing an anti-NIa protein scFv antibody. *Mol Biotechnol*, 2006, **33** (2):133~140
- 11 Villani ME, Roggero P, Bitti O, Benvenuto E, Franconi R. Immunomodulation of cucumber mosaic virus infection by intrabodies selected in vitro from a stable single-framework phage display library. *Plant Mol Biol*, 2005, **58** (3): 305~316
- 12 Malembic S, Saillard C, Bové JM, Garnier M. Effect of polyclonal, monoclonal, and recombinant (single-chain variable fragment) antibodies on in vitro morphology, growth, and metabolism of the phytopathogenic mollicute *Spiroplasma citri*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (5): 2113~2119
- 13 Hu CH (胡春华), Xu L (徐磊), Ma XF (马先锋), Long GY (龙桂友), Liu KY (刘昆玉), Deng ZN (邓子牛). Preparation of antiserum of the recombinant pthA-NLS and its inhibition effect on citrus canker disease. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 2008, **35** (6): 811~818
- 14 Yuan Q, Xia Y, Nian S, Yin Y, Cao Y, Wang Z. Selection of single chain fragments against the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by ribosome display. *Enzyme & Microbial Technol*, 2007, **41**: 383~389