

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.04.002

单链抗体 scFv-GCN4 在大肠杆菌中的重组表达及活性检测*

齐洁琼 高红 庄婷婷 于文功 顾玉超[△]

(中国海洋大学医药学院 山东 青岛 266000)

摘要 目的: 重组表达融合 GST 或 MBP 标签的单链抗体 scFv-GCN4, 对其进行分离纯化, 并检测其生物学活性。**方法:** 构建 pBAD-MBP-scFv-GCN4 及 pBAD-GST-scFv-GCN4 表达载体, 使用大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 菌株表达并亲和纯化重组蛋白 MBP-scFv-GCN4 及 GST-scFv-GCN4。构建 pET30a-Nus-GCN4 载体, 使用 *E. coli* BL21(DE3) 菌株表达重组蛋白 Nus-GCN4 及 Nus。以重组的 GCN4 为特异性抗原, 通过 Pull-down 技术和 Western Blot 技术, 检测 MBP-scFv-GCN4 及 GST-scFv-GCN4 的抗体活性及特异性。**结果:** 重组菌株 *E. coli* Top10 可高效表达可溶性的 MBP-scFv-GCN4 和 GST-scFv-GCN4 蛋白, 通过亲和纯化, 均得到了高纯度的重组蛋白。重组菌株 *E. coli* BL21(DE3) 可高效表达可溶性的 Nus 与 Nus-GCN4 蛋白。Pull-down 及 Western Blot 结果显示, 重组蛋白 MBP-scFv-GCN4 及 GST-scFv-GCN4 均可以高效、特异地识别重组的 GCN4 抗原。**结论:** 重组抗体 GST-scFv-GCN4 及 MBP-scFv-GCN4 均可在 *E. coli* 中高效表达, 并且具有良好的抗体活性及特异性。

关键词: 单链抗体; scFv-GCN4; 重组表达; 大肠杆菌; 活性检测

中图分类号: R-33; Q78; Q93; R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)04-606-04

Expression of Recombinant Antibody scFv-GCN4 in *Escherichia coli* and Determination of its Biological Activity*

QI Jie-qiong, GAO Hong, ZHUANG Ting-ting, YU Wen-gong, GU Yu-chao[△]

(School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao, Shandong, 266000, China)

ABSTRACT Objective: To express and purify the single chain Fv antibodies against GCN4 (scFv-GCN4) which fused with GST-Tag or MBP-Tag, and to determine the characteristics of the recombinant antibody. **Methods:** Construct recombinant plasmids pBAD-MBP-scFv-GCN4 and pBAD-GST-scFv-GCN4, purify recombinant antibodies expressed in *E. coli* Top10. Construct recombinant plasmids pET30a-Nus-GCN4, express recombinant proteins Nus and Nus-GCN4 in *E. coli* BL21 (DE3). Identify the biological activity and specificity of the recombinant antibodies by Pull-down and Western Blot. **Results:** Recombinant antibodies MBP-scFv-GCN4 and GST-scFv-GCN4 could be expressed and purified efficiently. Nus and Nus-GCN4 could be expressed efficiently in *E. coli* BL21(DE3). The methods of Pull-down and Western Blot proved that recombinant antibodies could recognize GCN4 specifically and efficiently. **Conclusions:** Recombinant antibodies MBP-scFv-GCN4 and GST-scFv-GCN4 could be expressed efficiently in *E. coli*, and possessed high biological activity and specificity to GCN4.

Key words: Single-chain variable fragment; scFv-GCN4; Recombinant expression; *Escherichia coli*; Activity detection

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q78; Q93; R392 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)04-606-04

前言

单链抗体(Single-chain variable fragment, scFv), 由抗体重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)通过约 20 个氨基酸的短肽连接而成^[1]。scFv 具有天然抗体的特异性, 而分子大小只有完整抗体的 1/6, 根据这一优势, scFv 已经广泛应用于流式细胞术^[2,3]、免疫组化^[4,5]、CAR-T 技术^[6,7]及肿瘤治疗^[8-11]等领域。scFv 可以通过基因工程方法在 *E. coli* 中大量产生^[12], 这在很大程度上节约了时间和资金。但是, 在 *E. coli* 中表达 scFv 时, 经常遇到表达量或可溶性低的问题^[13], 例如, 王弘等^[14]在抗克伦特罗 scFv 的研究中, 袁若森^[15]在抗狂犬病毒糖蛋白 scFv 研究中, scFv 全

部存在于包涵体, 影响了其生物学活性。

课题组前期研究中, 在 *E. coli* 中重组表达酵母转录激活因子 GCN4 的一个肽段特异性单链抗体 (scFv-GCN4) 时, scFv-GCN4 表达量极低。为了解决这一问题, 我们选择了 GST^[16] 及 MBP^[17] 两种重组表达中常用的标签蛋白, 将其与 scFv-GCN4 融合, 得到高效表达并可溶的重组蛋白 GST-scFv-GCN4 和 MBP-scFv-GCN4。最后, 通过 Pull-down 和 Western Blot 证明, 重组抗体 scFv-GCN4 具有良好的生物学活性。

1 材料与方法

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81272264)

作者简介: 齐洁琼(1989-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 分子肿瘤, 电话: 0532-82031562, E-mail: jieqiong_qi@163.com

[△] 通讯作者: 顾玉超, 副教授, 博士, E-mail: guych@126.com

(收稿日期: 2016-03-27 接受日期: 2016-04-25)

1.1 试验材料与仪器

菌种及载体: 载体 pBAD、pET30a、pET30a-Nus, 菌株 *Escherichia coli* DH5 α 、Top10 和 BL21(DE3)均由中国海洋大学医药学院糖生物学实验室提供与保存。

试剂: Primer Star DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 均购于宝生物(大连)公司; IPTG 购于德国 Merck 公司; L-阿拉伯糖购于台湾生工; 质粒小提试剂盒购于康为世纪生物公司; Ni Sepharose 6 Fast Flow、Glutathione Sepharose 4B、Dextrin Sepharose High Performance 均购于美国 GE 公司; 蛋白 Marker、BCA 蛋白含量测定试剂盒均购于美国 Thermo 公司; GST 抗体、MBP 抗体、His 抗体、HRP 标记的羊抗鼠抗体均购于美国 Santa Cruz 公司。

仪器: PCR 仪(Thermo); 琼脂糖凝胶电泳仪(Pharmacia); 高速冷冻离心机(Sigma); 化学发光成像仪(GE 公司); 蛋白电泳仪(北京六一)引物及基因合成(由华大公司提供): 根据文献^[18]中的 scFv-GCN4 及 GCN4 的基因序列, 按照大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化, 合成 MBP-scFv-GCN4 以及 GCN4 基因, 图 1-A 为 MBP-scFv-GCN4 基因示意图, 图 1-B 为 GCN4 基因示意图。根据 GST 基因序列设计引物, 序列如下:

GST-F: 5'-ATAAGAATGCGGCCGAATGTCCCTATAC TAGGTTATT-3'

GST-R: 5'-CCCGGGATCCGATTTTGAGGATGGTC-3'

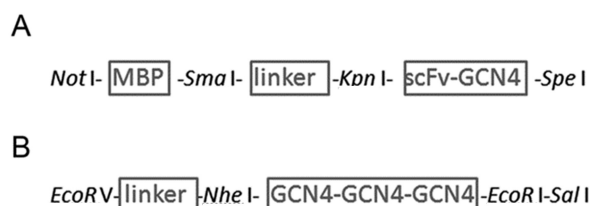


图 1 全基因合成示意图

Fig. 1 Schematic plot of gene synthesis

A: MBP-scFv-GCN4; B: GCN4

1.2 载体构建及鉴定

1.2.1 pBAD-MBP-scFv-GCN4 载体的构建 将通过 NotI 和 SpeI 双酶切后的回收产物 MBP-scFv-GCN4 与 pBAD 连接、转化, 随机挑取单克隆, 提取质粒, NotI 和 SpeI 双酶切鉴定, 将阳性克隆测序, 得到载体 pBAD-MBP-scFv-GCN4。

1.2.2 pBAD-GST-scFv-GCN4 载体的构建 使用引物 GST-F 及 GST-R, PCR 扩增 GST, 将用 NotI 和 SmaI 双酶切回收的 GST 与 pBAD-scFv-GCN4 连接、转化, 随机挑取单克隆, 提取质粒, NotI 和 SpeI 双酶切鉴定, 将阳性克隆测序, 得到载体 pBAD-GST-scFv-GCN4。

1.2.3 pET30a-Nus-GCN4 载体的构建 通过 EcoRV 和 SalI 双酶切后的回收产物 GCN4 与 pET30a 连接、转化, 随机挑取单克隆, 提取质粒, EcoRV 和 SalI 双酶切鉴定, 筛选得到阳性载体 pET30a-GCN4。通过 NdeI 和 KpnI 双酶切, 将回收产物 Nus 与 pET30a-GCN4 连接、转化, 挑取单克隆并提取质粒, NdeI 和 SalI 双酶切, 筛选阳性克隆并测序, 得到载体 pET30a-Nus-GCN4。

1.3 重组抗体 scFv-GCN4 的诱导表达及纯化

将带有重组质粒 pBAD-GST-scFv-GCN4 或 pBAD-MBP-scFv-GCN4 的 *E. coli* Top10 菌株于 37 °C 震荡培养至 OD600 达到 0.6, 加入终浓度为 0.1% 的 L-阿拉伯糖, 25 °C 诱导过夜。次日, 离心收集菌体, 加入 1/10 原始菌液体积的 PBS, 超声, 离心收集上清。

按照 Glutathione Sepharose 4B 说明书, 纯化 GST-scFv-GCN4 蛋白, 按照 Dextrin Sepharose High Performance 说明书, 纯化 MBP-scFv-GCN4。将纯化后的重组蛋白透析到 PBS 中, BCA 法测定蛋白含量。SDS-PAGE 电泳检测纯化得率及纯度。

1.4 重组抗原 GCN4 的诱导表达

将带有重组质粒 pET30s-Nus 或 pET30a-Nus-GCN4 的 *E. coli* BL21(DE3) 菌株于 37 °C 震荡培养直至 OD600 达到 0.6, 加入终浓度为 0.1 mM 的 IPTG, 25 °C 诱导过夜。次日, 离心收集菌体, 加入 1/10 原始菌液体积的 PBS, 超声、离心收集上清, 加入蛋白 Loading Buffer, 煮沸 5 min, SDS-PAGE 电泳检测蛋白的表达及可溶性。

1.5 重组抗体 scFv-GCN4 的活性检测

1.5.1 Pull-down 检测重组抗体 scFv-GCN4 的活性 按照重组抗体 scFv-GCN4 与 Nus-GCN4(或 Nus)的摩尔比为 1:1 的比例, 加入各组并混匀, 4 °C 摇床孵育 3 h。按照 Ni Sepharose 凝胶珠说明书, 纯化 Nus 或 Nus-GCN4。加入蛋白 Loading Buffer, 煮沸 5 min, SDS-PAGE 电泳检测。

1.5.2 Western Blot 检测重组 scFv-GCN4 的活性 使用 1.4 中得到的蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 电泳并将蛋白转到 PVDF 膜上, 封闭后加入终浓度为 5 μ g/mL 的 GST-scFv-GCN4 或 MBP-scFv-GCN4, 4 °C 孵育过夜。次日, 洗去未结合的蛋白, 加入 GST 抗体或 MBP 抗体, 37 °C 孵育 1 h, 洗去未结合的抗体, 加入 HRP 标记的羊抗鼠抗体, 37 °C 孵育 0.5 h, 用化学发光成像仪曝光。

2 结果

2.1 载体的构建及鉴定

载体 pBAD-MBP-scFv-GCN4、pBAD-GST-scFv-GCN4 及 pET30a-Nus-GCN4 阳性克隆的酶切鉴定结果如图 2 所示。图 2-A 中, 在 4100 bp 和 2100 bp 有两条带, 基因 MBP-scFv-GCN4 的长度约为 2100bp, 图 2-B 中, 在 4100 bp 和 1600 bp 有两条带, 基因 GST-scFv-GCN4 的长度约为 1600 bp, 图 2-C 中, 在 5400 bp 和 2000 bp 有两条带, 基因 Nus-GCN4 的长度约为 2000 bp, 结合测序结果, 说明三个载体均构建成功。

2.2 重组抗体 scFv-GCN4 的表达及纯化

重组蛋白 GST-scFv-GCN4 的理论分子量约为 52 kDa, MBP-scFv-GCN4 的理论分子量约为 67 kDa。图 3-A 的 SDS-PAGE 结果显示, 参照蛋白 Marker 和未加入诱导剂的菌体蛋白, L-阿拉伯糖诱导后, 重组菌株能高效表达可溶性重组抗体 GST-scFv-GCN4 及 MBP-scFv-GCN4, 并且, 通过亲和纯化可以得到高纯度的重组抗体。

2.3 重组抗原 GCN4 的诱导表达

重组蛋白 Nus 的理论分子量约为 75 kDa, Nus-GCN4 蛋白的理论分子量约为 87 kDa。图 3-B 的 SDS-PAGE 结果显示, 参

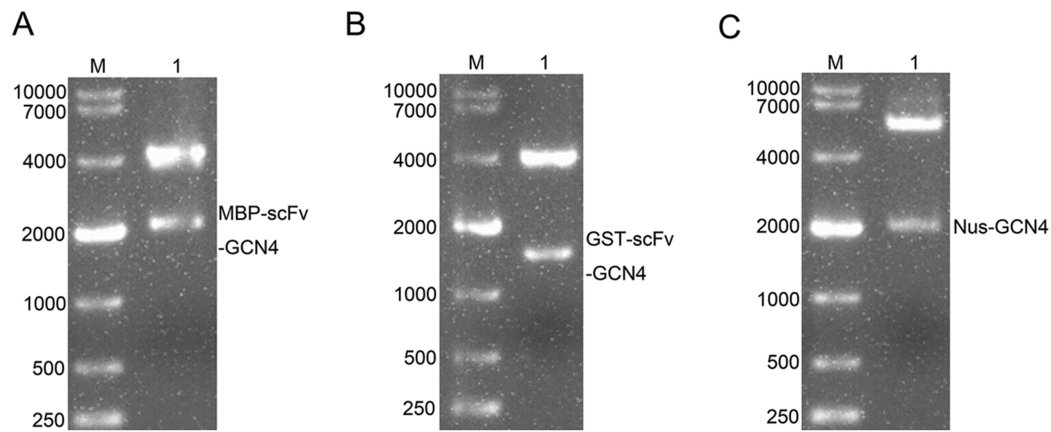


图2 载体酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids

M: DL10,000 DNA Marker; Line 1 in Fig. A: Production of pBAD-MBP-scFv-GCN4 plasmid digested by *Not*I and *Spe*I; Line 1 in Fig. B: Production of pBAD-GST-scFv-GCN4 plasmid digested by *Not*I and *Spe*I; Line 1 in Fig. C: Production of pET30a-Nus-GCN4 plasmid digested by *Nde*I and *Sal*I

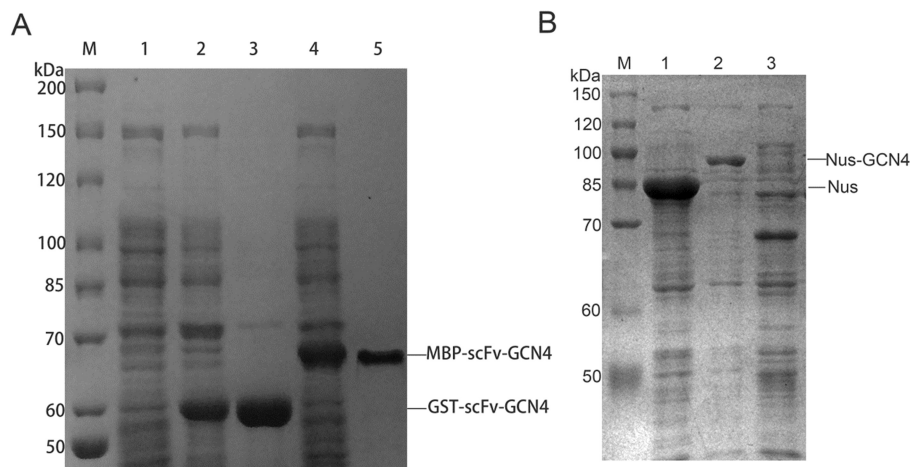


图3 重组蛋白的诱导表达及纯化

Fig. 3 Expression and purification of recombinant proteins

A: Expression and purification of recombinant scFv-GCN4 (M: Protein Marker; 1: Total protein of Top10; 2: Soluble protein of Top10 containing pBAD-GST-scFv-GCN4 plasmid; 3: Purified protein of GST-scFv-GCN4; 4: Soluble protein of Top10 containing pBAD-MBP-scFv-GCN4 plasmid; 5: Purified protein of MBP-scFv-GCN4) B: Expression of recombinant Nus-GCN4 and Nus (M: Protein Marker; 1: Soluble protein of BL21(DE3) containing pET30a-Nus plasmid; 2: Soluble protein of BL21(DE3) containing pET30a-Nus-GCN4 plasmid; 3: Total protein of BL21(DE3))

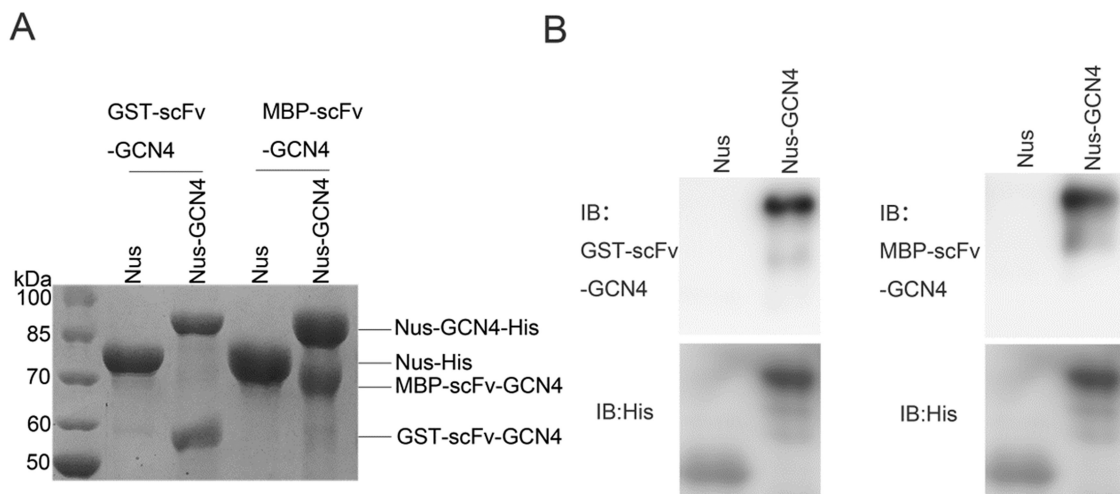


图4 重组抗体 scFv-GCN4 的活性检测

Fig. 4 Identification of the biology characteristics of recombinant scFv-GCN4

A: Identification of the biological characteristics of recombinant scFv-GCN4 by Pull-down and SDS-PAGE; B: Identification of the biological characteristics of recombinant scFv-GCN4 by Western Blot

照蛋白 Marker 和阴性对照,加入 IPTG 诱导后,重组菌株能高效表达可溶性 Nus 及 Nus-GCN4。

2.4 重组 scFv-GCN4 的活性检测

重组蛋白 Nus 及 Nus-GCN4 上都带有 His 标签,使用 His Pull-down 方法,通过检测重组 scFv-GCN4 与其抗原 GCN4 的相互作用,来检测重组 scFv-GCN4 的抗体活性。图 4-A 的 SDS-PAGE 结果显示,当使用 Ni Sepharose 凝胶珠纯化带有 His 标签的蛋白时,与 GCN4 特异性相互作用的蛋白 GST-scFv-GCN4 或者 MBP-scFv-GCN4 随着 Nus-GCN4 一起被纯化出来,而不能随着 Nus 被纯化出来。

将重组蛋白 GST-scFv-GCN4 或 MBP-scFv-GCN4 作为 GCN4 的抗体,用 Western Blot 检测其抗体活性与特异性。图 4-B 结果显示,诱导表达 Nus-GCN4 的泳道中,在 Nus-GCN4 分子量处有特异性信号,而诱导表达 Nus 的泳道中,在 Nus 分子量附近未检测到特异性信号。

Pull-down 和 Western Blot 实验结果均表明,在 *E. coli* 中表达的重组单链抗体 scFv-GCN4 可以特异识别其抗原 GCN4,证明其具有良好的生物学活性及特异性。

3 讨论

单链抗体 scFv 是目前研究最广泛的基因工程抗体。scFv 具有很多优点:分子小,易通过血管壁或实体瘤,可用于导向药物载体;免疫原性弱,不易引起排异反应;体内易清除,对周围组织损伤小;易于批量表达与制备等。因此,通过基因工程制备的重组单链抗体在疾病研究与治疗中展现了良好的前景^[9]。

但是,使用 *E. coli* 表达 scFv 时常遇到表达量低或不可溶等问题^[20]。为此,我们选择了 GST 及 MBP 两个常用的标签蛋白与 scFv-GCN4 融合,得到高效表达并高度可溶的重组抗体 GST-scFv-GCN4 和 MBP-scFv-GCN4。通过 Pull-down 和 Western Blot 方法,证明重组抗体 scFv-GCN4 具有良好的抗体活性及特异性。将标签蛋白与 scFv-GCN4 之间带上 Thrombin、SUMO protease 等常用的蛋白酶作用位点,通过蛋白酶切割,将标签蛋白去除,这一策略可以有效的获得大量可溶性 scFv-GCN4,可用于活性抗体的大量制备,对于抗体的工业化生产有重要的意义。

参考文献 (References)

- [1] Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(16): 5879-5883
- [2] Daugherty PS, Olsen MJ, Iverson BL, et al. Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface [J]. Protein Eng, 1999, 12(7): 613-621
- [3] Zhou Y, Xie ZG. High throughput screening of scFv antibodies against viral hemorrhagic septicaemia virus by flow cytometry [J]. J Virol Methods, 2015, 219: 18-22
- [4] Jain S, Aresu L, Comazzi S, et al. The Development of a Recombinant scFv Monoclonal Antibody Targeting Canine CD20 for Use in Comparative Medicine[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148366
- [5] Lu XH, Wang ZW, Cai Y, et al. Construction and identification of anti-HER2 phage display single chain fragment of variable region library in human breast cancer [J]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2014, 43(4): 434-440
- [6] Goldstein G. Overview of the development of Orthoclone OKT3: monoclonal antibody for therapeutic use in transplantation [J]. Transplant Proc, 1987, 19:1-6
- [7] Qian L, Li D, Ma L, et al. The novel anti-CD19 chimeric antigen receptors with humanized scFv (single-chain variable fragment) trigger leukemia cell killing. Cell Immunol[J]. 2016, [Epub ahead of print]
- [8] Chen P, Chen CQ, Yao LB, et al. Reconstruction and analysis of a Human small molecular antibody to tumor necrosis factor alpha[J]. Sheng wu Hua xue Yu Sheng wu Wu li Xue bao (Shanghai), 2001, 33(1): 71-76
- [9] Wuest T, Gerlach E, Banerjee D, et al. TNF-Selectokine: a novel prodrug generated for tumor targeting and site-specific activation of tumor necrosis factor[J]. Oncogene, 2002, 21(27): 4257-4265
- [10] Bremer E, Kuijlen J, Samplonius D, et al. Targetcel-I restricted and enhanced apoptosis induction by a scFv: sTRAIL fusion protein with specificity for the pancreatic carcinoma-associated antigen EGP2 [J]. Int J Cancer, 2004, 109(2): 281-290
- [11] Kim MG, Kim D, Suh SK, et al. Current status and regulatory perspective of chimeric antigen receptor-modified T cell therapeutics [J]. Arch Pharm Res, 2016, [Epub ahead of print]
- [12] Peterson E, Owens SM, Henry RL. Monoclonal antibody form and function: manufacturing the right antibodies for treating drug abuse [J]. AAPS J, 2006, 8(2): E383-390
- [13] Sina M, Farajzadeh D, Dastmalchi S. Effects of Environmental Factors on Soluble Expression of a Humanized Anti-TNF- α scFv Antibody in *Escherichia coli*[J]. Adv Pharm Bull, 2015, 5(4): 455-461
- [14] 王弘, 刘细霞, 梁艳, 等. 原核表达抗克伦特罗重组单链抗体及其纯化研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 45-50
- [15] 袁若森. 抗狂犬病毒糖蛋白单链抗体 scFv98H 的制备及应用研究 [D]. 吉林大学, 2014
- [16] Yuan Ruo-sen. Study on Preparation and Application of Humanized anti-Rabies Virus G Protein Single chain antibody antibody scFv98H [D]. Jilin University, 2014
- [17] Li H, Liu N, Wang WT, et al. Cloning and characterization of GST fusion tag stabilized large subunit of *Escherichia coli* acetohydroxyacid synthase I[J]. J Biosci Bioeng, 2016, 121(1): 21-26
- [18] Sluchanko NN, Tugaeva KV, Faletrov YV, et al. High-yield soluble expression, purification and characterization of human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) fused to a cleavable Maltose-Binding Protein (MBP)[J]. Protein Expr Purif, 2016, 119: 27-35
- [19] Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging [J]. Cell, 2014, 159(3): 635-646
- [20] Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, et al. scFv antibody: principles and clinical application [J]. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: 980250
- [21] Tiller KE, Tessier PM. Advances in Antibody Design [J]. Annu Rev Biomed Eng, 2015, 17: 191-216