

不同培养条件对抗 α 毒素 ScFv 基因表达的影响

赵宝华¹ 许崇波^{2*}

(河北师范大学生命科学院 石家庄 050016)¹ (宁夏大学生物工程系 银川 750021)²

摘要: 将 ScFv 基因片段与 pHOG21 载体连接后, 转化至受体菌 XL1-Blue 中, 得到重组菌株 XL1-Blue (pHOG2E3)。随后研究了培养基中无机盐成分、温度、诱导时间、IPTG 和蔗糖浓度对 ScFv 基因表达的影响。经 SDS-PAGE 分析表明, 重组菌株 XL1-Blue (pHOG2E3) 在 LB 培养基中加入 0.5 mmol/L IPTG 和 0.4 mol/L 蔗糖, 37℃ 诱导 6h, 其目的蛋白的表达量较高, 表达的 ScFv 蛋白主要以包含体的形式存在, 分子量为 31, 000D, 在重组菌株的培养上清和菌体裂解上清液中, 通过 ELISA 法也检测到了 ScFv 的存在, 且具有中和 α 毒素的活性。

关键词: 产气荚膜梭菌 α 毒素, 单链抗体, 基因表达, 中和活性

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 02-0008-05

* 通讯作者

收稿日期: 2000-12-12, 修回日期: 2001-02-20

THE INFLUENCE OF DIFFERENT CULTURAL CONDITIONS ON EXPRESSION OF ScFv GENES AGAINST ALPHA-TOXIN OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TYPE A

ZHAO Bao-Hua¹ XU Chong-Bo²

(College of life sciene, Heibei Normal University, shijiazhuang 050016)¹

(Department of Biotechnology, Ningxia University, Yinchuan 750021)²

Abstract: The ScFv gene containing *Nco* I and *Bam* HI was amplified by PCR, and inserted into the prokaryotic expression vector pHOG21 with *Nco* I and *Bam* HI digestion. After screening, high-level expression recombinant XL1-Blue (pHOG2E3) were obtained, and the different expression levels of ScFv were detected by SDS-PAGE and ELISA. When the strain was induced by 0.5 mmol/L IPTG and 0.4mol/L sucrose in the culture medium LB at 37℃ for 6 hours, the high level production of ScFv protein was obtained. The molecular weight of the expressed ScFv is 31, 000 D. The ScFv was mainly in the form of inclusion body, but it could also be in the culture medium and soluble periplasmic content. Above all, the ScFv protein could neutralize the phospholipase C activities of alpha-toxin of *Clostridium perfringens* type A.

Key words: Alpha-toxin of *Clostridium perfringens*, ScFv, Gene expression, Neutralization effect

A 型产气荚膜梭菌是引起家畜猝死症和人类创伤性气性坏疽的主要致病菌, 菌体产生的 α 毒素是主要的致病因子, 至今尚无有效的治疗方法。许崇波等研制了抗 α 毒素的单克隆抗体 (McAb), 其中 McAb-2E3 具有中和 α 毒素活性的作用^[1~3]。但这种单克隆抗体是鼠源性的, 难以用于临床, 为此在上述研究的基础上, 从分泌具有中和 α 毒素活性的 McAb-2E3 杂交瘤细胞中克隆了单链抗体基因 ScFv-2E3^[4]。本研究将单链抗体基因 ScFv-2E3 克隆到 pHOG21 载体中, 并采用 SDS-PAGE 初步检测了不同诱导条件下单链抗体基因的表达情况及其中和活性, 为将来用于 α 毒素的大量制备与纯化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

受体菌 XL1-Blue 及表达载体 pHOG21 由本室保存。

1.2 试剂

限制性内切酶 *Pst* I、*Nco* I 和 *Bam* HI, DL 2000 DNA markers 购自 Takara 公司, T4 DNA 连接酶以及 Wizard PCR Preps DNA Purification System 购自 Promega 公司, RNase A 购自 Calbiochem 公司, Protein Markers 购自上海丽珠东风生物技术有限公司, 考马斯亮蓝 R250 购自 Fluka 公司, 十二烷基硫酸钠 (SDS)、溴化乙锭 (EB)、过硫酸铵、巯基乙醇等均购自华美生物公司。

1.3 重组表达载体的构建

按 RNagents Total RNA Isolation System 和 PolyATract mRNA Isolation System IV 提供的方法提取细胞总 RNA 和分离纯化 mRNA。按 Mouse ScFv Module/Recombinant Phage Antibody System 提供的方法, 在反转录酶作用下合成 cDNA。分别取上述合成 cDNA 产物 33 μ L, 分别加入 VL、VH 基因引物, 以 “94℃ 1min, 55℃ 2min, 72℃ 2min”, 在 PCR 仪上作用 30 个循环。采用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 回收 V_H 和 V_L 可变区基因产物。取回收的 V_H 和 V_L 基因片段加 Linker Primer Mix 进行 7 次 PCR 循环 (94℃ 1min, 63℃ 4min), 将 V_H 和 V_L 基因拼接为 ScFv 基因。在上述反应体系中, 再加入 RS Primer Mix 进

行 30 次 PCR 循环 (94℃ 1 min, 55℃ 2min, 72℃ 2min), 采用 Wizard PCR Preps DNA Purification System 回收 ScFv 基因产物。利用 pGEM-T 载体系统, 在 T₄ DNA 连接酶的作用下, 将 ScFv 基因片段与载体连接, 并转化至受体菌 JM105 中。转化菌经 IPTG/X-gal 琼脂平板蓝白菌落筛选, 挑取白菌落, 提取质粒并进行酶切鉴定, 然后将克隆的 ScFv 基因质粒用 ABI 377 全自动荧光 DNA 序列分析仪进行测序后, 通过 T₄ 连接酶与 pHOG21 载体进行粘性末端连接, 并转化至受体菌 XL1-Blue 中, 提取质粒并进行酶切鉴定及序列分析。

1.4 重组菌株的诱导表达

挑取阳性重组菌株, 接种于 5mL LB 培养基中, 37℃ 振荡培养至 $OD_{600} = 0.8 \sim 1.0$, 置 4℃ 冰箱中 14~16h, 4℃ 5000 r/min 离心 5min 收集菌体, 用 2mL LB 重悬沉淀, 然后将其加入 50 mL LB + 0.1 mmol/L 葡萄糖的培养基中, 37℃ 200 r/min 振荡培养至 $OD = 0.8 \sim 1.0$, 4℃ 5000r/min 离心 5min 收集菌体, 再用 50 mL LB 不同处理的培养基培养, 在不同温度下 280 r/min 振荡培养, 于不同时间取样, 4℃ 10000 r/min 离心 5 min 收集菌体。

1.5 单链抗体基因表达条件的优化^[5]

1.5.1 不同 IPTG 浓度对 ScFv 基因表达的影响: 按照方法 1.4, 在 LB 培养基中加入终浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol/L 的 IPTG, 诱导 4 h, 采用 SDS-PAGE 及 CS-900 薄层扫描仪检测 ScFv 占菌体总蛋白的含量^[6]。

1.5.2 添加无机盐对 ScFv 基因表达的影响: 按照方法 1.4, 选择 LB 培养基和 LB 培养基加入 KH₂PO₄ 等无机盐两种培养基, 在 0.5mol/L IPTG 诱导 4 h, 检测方法同 1.5.1。

1.5.3 不同蔗糖浓度对 ScFv 基因表达的影响: 按照方法 1.4, 在 LB 培养基中加入终浓度为 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 的蔗糖, 以 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 检测方法同 1.5.1。

1.5.4 不同温度对 ScFv 基因表达的影响: 按照方法 1.4, 在 LB 培养基中加入 0.5 mol/L IPTG 和 0.1 mol/L 蔗糖时, 在 37℃ 培养 4 h, 检测方法同 1.5.1。

1.5.5 不同诱导时间对 ScFv 基因表达的影响: 按照方法 1.4, 在 LB 培养基中加入 0.6 mol/L IPTG 和 0.2 mol/L 蔗糖, 在 37℃ 培养, 诱导时间设为 1、2、3、4、5、6 h 共 6 个处理, 检测方法同 1.5.1。

1.6 ScFv 粗提液的制备与鉴定

将重组菌培养物 4℃ 10000 r/min 离心 5 min, 培养上清采用聚乙二醇浓缩 10 倍, 菌体裂解采用超声处理法处理, 15, 000 r/min 离心 10 min 分别收集沉淀和上清, ScFv 的鉴定参照文献 [7]。

1.7 ScFv 中和活性的测定^[7]

按照方法 1.4, 在 0.5mL 的 ependorf 管中, 加入 100μL α 毒素和 300μL ScFv 粗提液, 混匀后于 37℃ 感作 2h, 然后加入 100μL 卵黄稀释液, 37℃ 孵育 24h, 观察是否有浑浊环出现。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体 pHOG2E3 的构建

将回收的 ScFv 片段, 与酶切后回收的载体 pHOG21 进行连接反应, 转化至大肠杆

菌 XL1-Blue 中, 提取质粒并用 *Pst* I, *Nco* I 和 *Bam* HI 进行酶切鉴定, 如图 1 所示, 酶切结果与预期的结果一致, 说明构建的表达质粒中含 ScFv 基因, 重组质粒命名为 pHOG2E3, 经序列分析表明测序结果与原序列一致。

2.2 不同培养条件对 ScFv 基因表达的影响

2.2.1 不同 IPTG 浓度对 ScFv 基因表达的影响: 结果如表 1 所示, 按照方法 1.5.1, 在 LB 培养基中加入 0.5 mmol/L IPTG 时, ScFv 的表达量为高。因此选择 0.5 mmol/L IPTG 作为诱导菌体表达的适宜浓度, 实验重复 3 次以上, 表 1 列出的是一次典型的结果。

2.2.2 添加无机盐对 ScFv 基因表达的影响: 按照方法 1.5.2, 经 SDS-PAGE 和 CS-900 薄层扫描分析, 在 LB 培养基中加入 0.5 mol/L IPTG 不另加无机盐时, ScFv 的表达量占菌体总蛋白的 15.5%, 加入 KH_2PO_4 等无机盐时, ScFv 的表达量占菌体总蛋白的 15.7%, 因此添加无机盐与否对 ScFv 的表达量没有影响。

表 1 不同 IPTG 浓度对 ScFv 表达的影响

IPTG 浓度 (mmol/L)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
表达 ScFv 的相对含量 (%)	4.2	4.4	6.3	7.5	14.2	10.5

2.2.3 不同蔗糖浓度对 ScFv 基因表达的影响: 如图 2 所示, 经 SDS-PAGE 和 CS-900 薄层扫描分析, 在 LB 培养基中加入 0.5 mol/L IPTG 时, 再添加 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L 蔗糖时, ScFv 的表达量分别占菌体总蛋白的 3.8%、3.7%、5.8%、6.2%、13.6% 和 9.5%, 因此添加 0.4 mol/L 蔗糖时, ScFv 的表达量为高。

2.2.4 不同温度对 ScFv 基因表达的影响: 如图 3 所示, 经 SDS-PAGE 和 CS-900 薄层扫描分析, 在 LB 培养基中加入 0.5 mol/L IPTG 和 0.1mol/L 蔗糖时, 在 37℃、28℃和 20℃培养时 ScFv 的表达量分别为 22.5%、18.6%和 7.5%, 因此, 在 37℃培养时, ScFv 的表达量为高。

2.2.5 不同诱导时间对 ScFv 基因表达的影响: 如图 4 所示, 在 LB 培养基中加入 0.5 mol/L IPTG 和 0.1mol/L 蔗糖, 在 37℃诱导时间为 1、2、3、4、5 和 6h 时, ScFv 的表达量占菌体总蛋白的 4.5%、5.2%、7.3%、9.5%、8.3%和 14.5%, 因此诱导时间为 6 h 时, ScFv 的表达量为高。

2.3 表达产物 ELISA 鉴定

结果见表 2。可以看出重组菌株的培养上清及菌体裂解上清中含有抗 α 毒素的 ScFv。实验重复 3 次, 结果一致。

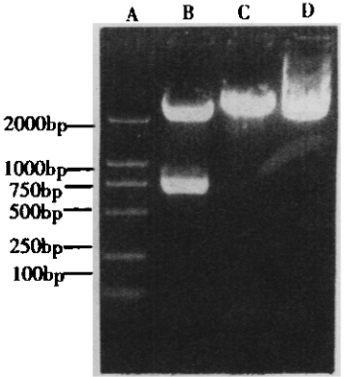


图 1 重组质粒 pHOG2E3 的酶切鉴定结果

A DL2000 DNA markers, B pHOG2E3/*Nco*I + *Bam*HI, C pHOG2E3/*Pst*I, D pHOG2E3

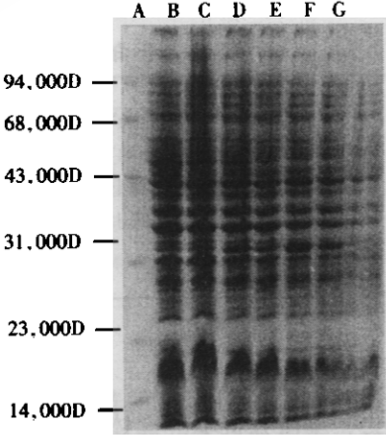


图 2 加入不同蔗糖浓度对 ScFv 表达的 SDS-PAGE 分析结果

A 标准蛋白分子量 marker, B 0.5mol/L 蔗糖处理, C 0.4mol/L 蔗糖处理, D 0.3mol/L 蔗糖处理, E 0.2mol/L 蔗糖处理, F 0.1mol/L 蔗糖处理, G 0mol/L 蔗糖处理, H 空白对照

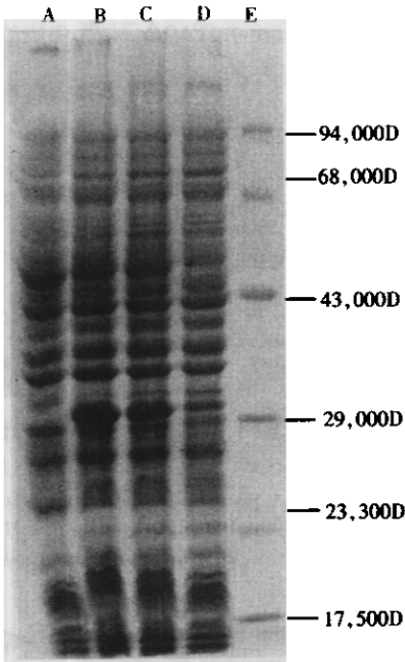


图 3 不同温度诱导时 ScFv 的 SDS-PAGE 分析结果
A 空白对照, B 37℃诱导, C 28℃诱导, D 20℃诱导, E 标准蛋白分子量 marker

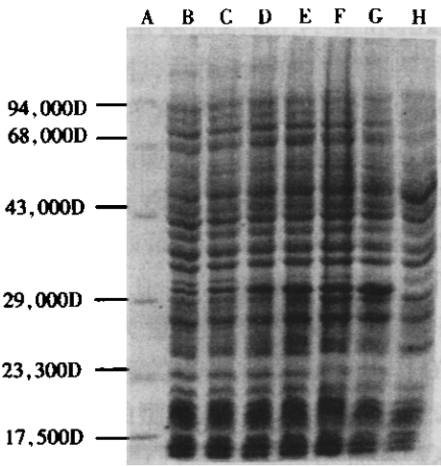


图 4 不同诱导时间的 ScFv 的 SDS-PAGE 分析结果

A 标准蛋白分子量 marker, B 诱导 1h, C 诱导 2h, D 诱导 3h, E 诱导 4h, F 诱导 5h, G 诱导 6h, H 空白对照

2.4 表达产物中和和活性的测定

结果见表 3。重组菌株的培养上清及菌体裂解上清中含有中和 α 毒素活性的 ScFv。实验重复 3 次, 结果一致。

表 2 ScFv 的 ELISA 测定结果

样 品	ELISA 测定结果
XL1-Blue (pHOG2E3) 培养上清	++
XL1-Blue (pHOG2E3) 裂解上清	+++
XL1-Blue (pHOG21) 培养上清	-
XL1-Blue (pHOG21) 裂解上清	-
2E3 单克隆抗体	++++
0.85% 生理盐水	-

表 3 ScFv 中和活性测定结果

样 品	中和活性
XL1-Blue(pHOG2E3)培养上清	+++
XL1-Blue(pHOG2E3)裂解上清	++++
XL1-Blue(pHOG21)培养上清	-
XL1-Blue(pHOG21)裂解上清	-
2E3 单克隆抗体	++++
0.85% 生理盐水	-

3 讨论

本研究将单链抗体基因克隆到 pHOG21 表达载体中, 并转化至大肠杆菌 XL1-Blue 中, 初步进行了表达条件的优化与筛选。结果表明: 添加无机盐对蛋白的表达量没有明显的影响, 而 IPTG 浓度、蔗糖浓度、温度和诱导时间对表达蛋白的产量有较明显的影响, 并且表达的目的蛋白具有中和 α 毒素的活性, 综合分析表达蛋白的相对含量和绝对含量, 我们确定了较为理想的表达条件是: 在 LB 培养基中加入 0.5 mol/L IPTG 和 0.4mol/L 蔗糖, 37℃诱导时间为 6h, 目的蛋白的表达量较高。这为进一步研究 ScFv 的生物学活性及 ScFv 的纯化打下了基础, 为将来临床治疗 α 毒素中毒开辟新的途径。

参 考 文 献

[1] 许崇波, 朱 平, 姚湘燕, 等. 中国兽医学报, 1998, 18 (2): 140~143.
[2] 许崇波, 朱 平, 姚湘燕, 等. 中国兽医学报, 1999, 19 (1): 29~32.

- [3] 许崇波, 朱 平, 马丛林, 等. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15 (1): 62 ~ 63.
- [4] 许崇波, 赵宝华, 马丛林, 等. 中国兽医学报, 2000, 20 (3): 246 ~ 248.
- [5] 朱杰华, 张志明, 丁明亚, 等. 微生物学通报, 2000, 32 (5): 317 ~ 320.
- [6] Sambrook J, Fristch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [7] 赵宝华, 许崇波, 朱 平, 等. 中国兽医学报, 2000, 20 (4): 367 ~ 371.