

柑橘溃疡病菌二硫键稳定 Fv 抗体基因的构建 及表达产物的生物学活性分析

王中康¹, 李泮志¹, 袁青², 于红¹, 李蒙¹, 殷幼平¹

(¹重庆大学生物工程学院/重庆大学基因工程研究中心/重庆市基因功能与调控重点实验室, 重庆 400030; ²四川省泸州医学院免疫学教研室, 四川泸州 646000)

摘要:【目的】构建鼠源抗柑橘溃疡病菌二硫键稳定 Fv 抗体(dsFv)片段基因, 原核表达并将其复性为具有免疫活性的 dsFv 抗体。【方法】采用 PCR 定点突变的方法构建 dsFv 重链(VH)及轻链可变区(VL)基因, 分别将其连接入表达载体中, 于 *E. coli* BL21(DE3)中诱导表达, 表达产物溶解后稀释入复性缓冲液中使其重折叠为 dsFv 抗体并纯化。SDS-PAGE 及 Western-blot 分析表达及复性产物, BIAcore 检测 dsFv 与 Xac-LPS 的亲合力, ELISA 验证 dsFv 的特异性及稳定性。【结果】测序结果表明在 VH 的 44 位和 VL 的 100 位成功引入了半胱氨酸突变位点, 实现了高效的原核表达, 表达产物主要以包涵体的形式存在。SDS-PAGE 分析显示 VH 和 VL 的大小为 23 kD, 并将其成功复性, 复性后大小为 46 kD。BIAcore 分析表明 dsFv 对 Xac-LPS 保持了很高的亲合力, 亲和常数(K_D)达到 3.40×10^{-10} M。ELISA 证明 dsFv 具有较高的抗原特异性并且热稳定性较 scFv 提高近 20℃。【结论】成功表达并复性了 dsFv 抗体, 为柑橘溃疡病菌的免疫诊断提供了高效优质的重组抗体。

关键词:柑橘溃疡病菌; 二硫键稳定 Fv 抗体; 包涵体; 复性; BIAcore 分析

Gene Construction, Expression and Biological Activity Analyses of Disulfide Stabilized Fv Fragment Against Xac

WANG Zhong-kang¹, LI Pan-zhi¹, YUAN Qing², YU Hong¹, LI Meng¹, YIN You-ping¹

(¹Bioengineering College of Chongqing University/Gene Engineering Research Center/Key Laboratory of Gene Function and Regulation of Chongqing, Chongqing 400030; ²Department of Immunology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan)

Abstract:【Objective】To construct the gene of mouse anti-Xac disulfide stabilized Fv fragments(dsFv), express and refold to the form of dsFv with biological activity.【Method】The genes of VH and VL raised against Xac were mutated by the method of PCR-based mutagenesis, and then cloned into expression plasmid. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3) strain and these two genes were expressed. The inclusion body proteins of VH and VL were harvested and dissolved, and then diluted into refolding solution pro rata to form dsFv antibody which was further purified by HisTrap HP column. The products of expression and renaturation were analyzed by SDS-PAGE and western-blot. The affinity of dsFv to Xac-LPS was determined by BIAcore. The specificity and stability were detected by ELISA.【Result】Sequence analysis proved that cysteines were introduced into VH44 and VL100, and the genes expressed in *E. coli* BL21(DE3). Most of the protein existed in the form of inclusion body, the expression products were refolded successfully. SDS-PAGE showed that the molecular masses were 23 kD for VH and VL, and 46 kD for dsFv. BIAcore analysis showed that dsFv retained high affinity to Xac-LPS with an affinity constant (K_D) of 3.40×10^{-10} M. ELISA indicated that dsFv had a high specificity to Xac. Compared with scFv's, the thermal stability of dsFv elevated nearly 20℃.【Conclusion】dsFv was expressed and refolded successfully, which maintained high affinity, specificity and stability. This research established a solid basis for rapid diagnosis of Xac.

Key words: Xac; dsFv; inclusion body; renaturation; BIAcore analysis

收稿日期: 2008-12-11; 接受日期: 2009-03-09

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD47B03-5)、国家“863”计划项目(2006AA10Z434)

作者简介: 王中康(1956—), 男, 四川雅安人, 教授, 研究方向为微生物分子生物学。Tel: 023-65120489; Fax: 023-65120489; E-mail: zkwang646@sina.com。通信作者殷幼平(1955—), 女, 重庆长寿人, 教授, 研究方向为微生物分子生物学。Tel: 023-65120489; Fax: 023-65120489; E-mail: ypy128@vip.sina.com

0 引言

【研究意义】柑橘溃疡病 (citrus bacterial canker disease, CBCD) 是严重影响全球柑橘产业发展的细菌性病害,也是国内外重大植物检疫性病害。它是由黄单胞杆菌柑橘致病变种 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac) 引起的,能够侵染多种芸香科植物,包括柑橘属中的绝大多数商品化栽培品种。病菌主要随罹病种苗等繁殖材料远距离传播,生产上常用的铜基杀菌剂和抗生素制剂对其防效不佳^[1]。目前中国正在实施的柑橘非疫区建设和维护迫切需要一种快速简便的病害现场诊断方法,而现常用的常规和定量 PCR 等分子生物学检测技术^[2-3]虽灵敏但都需要在实验室完成,不能满足这一要求,而基于胶体金标记重组抗体的层析试纸条或速测卡具有快捷实用的优点,能够满足该要求。本研究旨在为其提供一种稳定可靠的重组抗体,为柑橘溃疡病菌的现场诊断提供一种新技术。【前人研究进展】免疫球蛋白的 Fv 段是由重链可变区和轻链可变区组成的异二聚体,是针对特异性抗原的最小功能单位,但 Fv 很不稳定。Husten 等^[4]通过一个连接肽 (linker) 来增强其稳定性,称为单链抗体 (single chain variable fragment, scFv),但是 scFv 在很多情况下仍不稳定,容易聚集,难以获得足够量的高浓度抗体^[5-6]。Glockshuber 等^[7]通过在 VH 和 VL 间引入二硫键替代 linker,第一次构建了二硫键稳定 Fv (disulfide stabilized Fv fragments, dsFv) 抗体,dsFv 抗体更加稳定,通常具有完整的抗原结合活性,甚至有时具有比 scFv 更高的亲和力^[8-10]。Jung 等^[11]利用分子模型技术成功的预测了两组氨基酸突变位点,即 VH 的 44 位/VL 的 100 位和 VH 的 105 位/VL 的 43 位,成为 dsFv 抗体构建的通用位点。【本研究切入点】重庆大学基因工程研究中心利用核糖体展示技术成功地筛选到一株亲和力高、特异性强的抗柑橘溃疡病菌 scFv 抗体,其亲和力达到了 $5.06 \times 10^{-10} \text{M}$ ^[12],并进行了高效原核表达^[13],但同样存在抗体不稳定的问题,影响实际应用,需要对其结构进行改造以提高其稳定性。【拟解决的关键问题】在 scFv 基础上利用 PCR 定点突变的方法在其 VH 的 44 位和 VL 的 100 位分别引入一个半胱氨酸突变位点取代 linker,分别原核表达后,复性使之形成 dsFv 抗体,并对其亲和力、特异性和稳定性进行研究。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 和表达载体 pET30a (+) 购自 Novagen 公司; *E. coli* JM109 由重庆大学基因工程研究中心保存;带有 Xac-scFv 基因的质粒模板由重庆大学基因工程研究中心利用核糖体展示技术筛选得到。

1.1.2 试剂及耗材 内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 及 T₄DNA 连接酶购自 NEB 公司; *pfu*DNA 聚合酶和抗 His-tag 抗体购自天为时代公司;碱性磷酸酶标记的马抗鼠抗体、OPD、NBT/BCIP 购自鼎国公司; IPTG、溶菌酶、L-Arg、氧化型谷胱甘肽 (GSSG)、二硫苏糖醇 (DTT) 购自罗氏公司;蛋白纯化预装柱 HiTrap Desalting 和 HisTrap HP 购自 GE 公司,HPA 芯片购自 BIAcore 公司,凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自上海生工,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物 为在 VH 的 44 位引入半胱氨酸突变位点设计以下引物: VHA 5'-CGGAATTCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGGGGCCTGGGGCTTCA-3' (划线部分为 *EcoR*I 酶切位点), VH1 5'-IGCCTTGAGTGGATTGGGGAT-3' (划线部分为突变位点), VH2 5'-CCAGGTATTGGATGTACT GGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAATGCCTTGAGTGGA TGGG-3' (划线部分为突变位点), VH3 5'-GCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCCGCAAGGCTTCTGGCTACGCCTTACCAGGTATT-3', VHB 5'-CCCAAGCTTTCATGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCATAGTGACTACCGT-3' (划线部分为 *Hind* III 酶切位点)。为在 VL 的 100 位引入半胱氨酸突变位点设计以下引物: VLA 5'-CGGAATTCCGACACTGAGCTCACCCAGTCTCCAG-3' (划线部分为 *EcoR* I 酶切位点), VL1 5'-GCAACCGAACGTCGGTG-3' (划线部分为突变位点), VLB: 5'-CCCAAGCTTTCACGCACCTGCGGCCGCTGCAGCATCAGCCGTTTGATTTCAGCTTGTTGCCGCAACCGAACGT-3' (划线部分分别为 *Hind* III 酶切位点和突变位点)。引物由上海生工合成。

1.2 VH 及 VL 突变基因的构建

采用 PCR 定点突变法,利用带有 Xac-scFv 基因的质粒为模板,VHB 和 VH1、VLB 和 VL1 为引物进行 VH 及 VL 的第一轮 PCR 扩增,PCR 条件为 94℃ 4 min,一个循环;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 8 min。分别回收其 PCR 产物,以回收产物为模板,利用 VHB 和 VH2、VLB 和 VLA 为引物进行第二轮 PCR 扩增。回收其 PCR 产物,此时

得到了完整的 VL 突变基因, 重链以回收产物为模板以 VHB 和 VH3 为引物进行第三轮 PCR 扩增, 再以其 PCR 产物为模板, VHB 和 VHA 为引物进行第四轮 PCR 扩增, 回收得到完整的 VH 突变基因。

1.3 VH 及 VL 表达工程菌的构建

将 VH 和 VL 基因分别利用 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切, 与经过 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切的 pET30a (+) 载体连接。转化克隆菌株 *E.coli* JM109 经 PCR 和酶切验证后测序, 测序正确后提取质粒转化表达菌株 *E.coli* BL21 (DE3)。

1.4 VH 和 VL 的表达及包涵体的提取

将含有 pET30a (+) -VH 及 pET30a (+) -VL 的 BL21 (DE3) 菌株分别接种到含有 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 卡那霉素的液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 次日按照 1 : 100 的比例接种到新鲜的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 $\text{OD}_{600}=0.6\sim 0.8$, 加入终浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 IPTG 继续诱导表达 4 h^[8]。诱导完成后在冰上放置 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 3 500 g 离心 5 min 收集菌体, 将收集到的菌体用 PBS (137 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 2.7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2HPO_4 , 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 ; pH 7.4) 重悬洗涤 3 次。然后将菌体用 10 ml 裂解缓冲液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 溶菌酶及 0.1% TritonX-100; pH 8.0) 重悬, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min。置冰上超声波破碎细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 g 离心 15 min 收集分离到的 VH 及 VL 的包涵体并保留上清。用 20 ml 包涵体洗涤液 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.5% TritonX-100, 2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素; pH 8.0) 洗涤 3 次^[4]。将菌体裂解后的上清及包涵体进行 SDS-PAGE 分析。对于包涵体进行 western-blot 检测, 一抗为抗 His-tag 抗体, 二抗为碱性磷酸酶标记的马抗鼠抗体, NBT/BCIP 显色。

1.5 dsFv 的复性及纯化

VH 及 VL 包涵体分别溶解在变性缓冲液中 (6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸胍, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ DTT; pH 8.0) 室温放置 3 h。VH 和 VL 按摩尔比 1 : 1 的比例稀释入复性缓冲液 (0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-Arg, 0.9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GSSG, 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA; pH 8.0) 中, 10 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h, 然后将 GSSG 浓度加至 9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 10 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 10 h^[14]。将复性液加入 30 kD 超滤管, 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 000 g 超滤浓缩。复性后蛋白分别进行还原性和非还原性 SDS-PAGE (后者上样缓冲液不含 β -巯基乙醇) 分析。用脱盐柱 HiTrap Desalting 将复性后蛋白的缓冲液置

换为结合缓冲液 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑; pH 7.4), 上 HisTrap HP 柱。用洗脱缓冲液 (20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 , 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑; pH 7.4) 进行梯度洗脱, 先用 40% 结合缓冲液和 60% 的洗脱缓冲液洗脱下 VH 和 VL, 再用 100% 的洗脱缓冲液洗下 dsFv。超滤浓缩, 非还原 SDS-PAGE 分析, Western-blot 检测纯化抗体。

1.6 dsFv 的亲合力测定

由于脂多糖 (LPS) 是 Xac 表面主要致病相关抗原决定簇, 且母本 scFv 是由 LPS 做抗原筛选得到, 因此本研究亦采用 LPS 做抗原, 用基于表面等离子共振的 BIAcore 生物传感器测定 dsFv 的亲合力。LPS 提取参照 Albrecht 报道^[15]。用 HEPES 缓冲液 (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.4) 将 LPS 稀释成 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, 并以 2 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过 HPA 芯片表面, 持续 0.5~1 h, 让 LPS 固定在芯片上, 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 短暂洗涤芯片, 洗去未结合的 LPS。0.1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 BSA 以 20 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速通过芯片 5 min, 检测芯片表面的非特异性结合。将纯化后的 dsFv 抗体用 HEPES 缓冲液分别稀释成 2, 4, 8, 16 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。30 μl 各浓度的抗体分别以 20 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过芯片表面, 每个浓度重复 3 次, 每次用 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 再生芯片。观察抗原抗体的结合和解离情况, 并用 BIAcore evaluation 软件分析结果。

1.7 dsFv 抗体抗原结合活性及特异性检测

将培养的 Xac 及 10 种对照菌: 甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、番茄青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、番茄溃疡病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) 和 4 种柑橘叶片分离腐生黄单胞细菌, 分别配成 10⁷ cfu $\cdot\text{ml}^{-1}$ 的菌悬液包被 96 孔板, 3% BSA-PBS 封闭后每孔加入 100 μl PBS 稀释的纯化 dsFv 抗体, 浓度 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。加入用 PBS 1 000 倍稀释的抗 His-Tag 抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。加入用 PBS 1 000 倍稀释的碱性磷酸酶标记的马抗鼠抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h^[12]。OPD 显色, 酶标仪 492 nm 读数。

1.8 dsFv 抗体稳定性检测

用抗柑橘溃疡病菌 scFv 抗体作对照, 将用 PBS 稀释后的 dsFv 和 scFv 抗体分成 2 组, 分别做如下的预处理: 第一组分别在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0, 12, 24~72 h,

第二组分别在 25, 35, 45~75°C 下孵育 3 h。ELISA 测定 2 组在处理后的 A_{492} 值的变化, 将各 A_{492} 值与未做任何处理的 dsFv 和 scFv 的 A_{492} 值作比值, 分析 2 种抗体亲和力的相对变化趋势^[16-17]。

2 结果与分析

2.1 VH 和 VL 突变基因及工程菌的构建

通过设计的引物, 重链经过 4 轮 PCR 扩增, 轻链经过 2 轮 PCR 扩增, 均成功的扩增出了 360 bp 左右的目标片段, 与预期结果相符 (图 1)。连接 pET30a (+) 载体转化克隆菌 *E.coli* JM109 后测序, 结果表明 VH 的 44 位氨基酸及 VL 的 100 位氨基酸成功的突变为半胱氨酸。

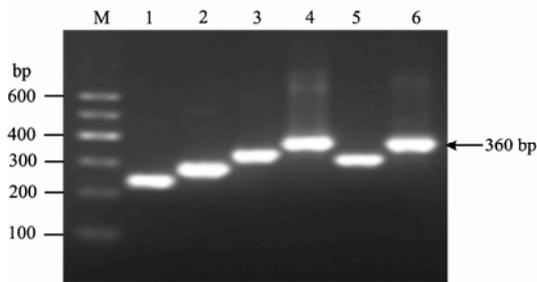


图 1 VH 和 VL 基因的 PCR 定点突变扩增产物电泳分析
Fig. 1 Products analyses of VH and VL amplification

M: DNA marker; 1~4: VH 的 4 轮 PCR 扩增片段; 5~6: VL 的 2 轮 PCR 扩增片段

M: DNA marker; 1-4: Four turns PCR of VH; 5-6: Two turns PCR of VL

2.2 VH 及 VL 的表达及产物分析

将重组质粒 pET30a (+)-VH 和 pET30a (+)-VL 分别转化表达菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达。离心收集细胞并破碎后对上清及沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果 VH 和 VL 的沉淀在 23 kD 处出现一明显的条带, VL 上清在同一位置亦有条带, VH 上清无。说明 VL 有部分为可溶性表达, VH 完全为包涵体表达。对 VH 和 VL 包涵体进行 Western-blot 检测, 均出现清晰条带, 说明表达产物正确 (图 2)。

2.3 dsFv 的复性及纯化

盐酸胍溶解后的包涵体按比例稀释入复性缓冲液中, 复性并超滤浓缩后用还原和非还原性 SDS-PAGE 进行分析, 结果在非还原 SDS-PAGE 泳道中 46 kD 和 23 kD 处分别出现一条带, 分别为复性后的 dsFv 抗体条带和未复性的 VH 和 VL 的条带。其中 46 kD 条带

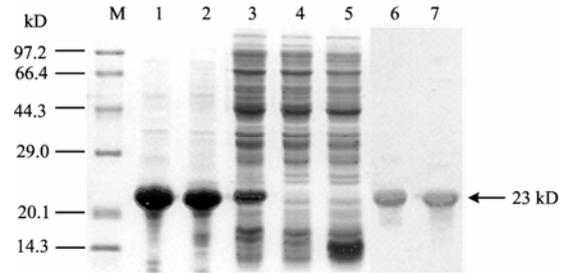


图 2 VH 和 VL 的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析
Fig. 2 Analyses of expressed VH and VL by SDS-PAGE and Western-blot

M: 低分子量蛋白 marker; 1: VL 包涵体; 2: VH 包涵体; 3: VL 表达菌裂解液上清; 4: VH 表达菌裂解液上清; 5: IPTG 诱导后的 pET30a (+)/BL21 细菌裂解液; 6: VL 包涵体的 western-blot 检测; 7: VH 包涵体的 western-blot 检测

M: Protein marker (low); 1: Inclusion body of VL; 2: Inclusion body of VH; 3: Supernatants of VL; 4: Supernatants of VH; 5: Total pET30a (+)/BL21 protein after induced by IPTG; 6: Analyses of VL inclusion body by western-blot; 7: Analyses of VH inclusion body by western-blot

图 2 VH 和 VL 的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析
Fig. 2 Analyses of expressed VH and VL by SDS-PAGE and Western-blot

在还原剂处理后消失 (图 4-A)。HisTrap HPF 柱纯化 60% Elution buffer 和 100% Elution buffer 处分别检测到一紫外吸收峰 (图 3), SDS-PAGE 分析前者为 VH 和 VL 单体, 后者为 dsFv 抗体, Western-blot 检测到目的条带 (图 4-B), 灰度分析表明纯化后 dsFv 纯度达到 83.27%, 说明纯化后的复性产物正确, 且纯化效果良好。

2.4 dsFv 的亲合力检测

用 BIAcore 生物传感器检测 dsFv 的亲合力, 并进

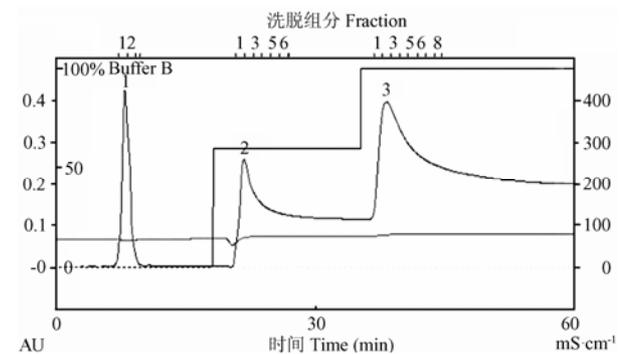


图 3 复性后 dsFv 抗体的 HisTrap HP 柱纯化紫外吸收分析
Fig. 3 UV absorption analyses of dsFv purification

吸收峰 1: 未与 HisTrap HP 柱结合的蛋白组分; 吸收峰 2: 60%洗脱液洗脱下的蛋白组分; 吸收峰 3: 100%洗脱液洗脱下的蛋白组分

Peak 1: Fraction of non-binding with HisTrap HP column; Peak 2: Fraction of eluting by 60% elution buffer; Peak 3: Fraction of eluting by 100% elution buffer

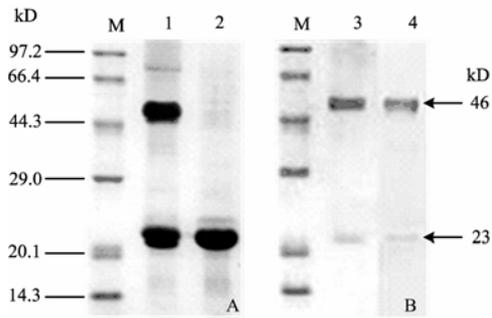


图 4 复性与纯化后 dsFv 的 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析

Fig. 4 Analyses of dsFv after renaturation and purification by SDS-PAGE and Western-blot

行实时监测。让 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 LPS 流经 HPA 芯片表面, 当 RU 值达到 1 000 时停止注入, 当用 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 BSA 通过芯片 5 min RU 值仅上升 50 个单位, 说明 LPS 在芯片表面被良好。监测显示, 不同浓度的 dsFv 抗体经过芯片表面时都与 LPS 有很好的亲和力 (图 5)。BIAcore evaluation 软件分析 dsFv 与 Xac-LPS 的作用常数, 结果表明其结合常数 (k_a) 为 $5.95 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 解离常数 (k_d) 为 $2.02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 亲和常数 (K_D) 为 $3.40 \times 10^{-10} \text{ M}$ 。说明复性后 dsFv 依然保持了较高的抗原亲和力。

2.5 dsFv 的活性及特异性检测

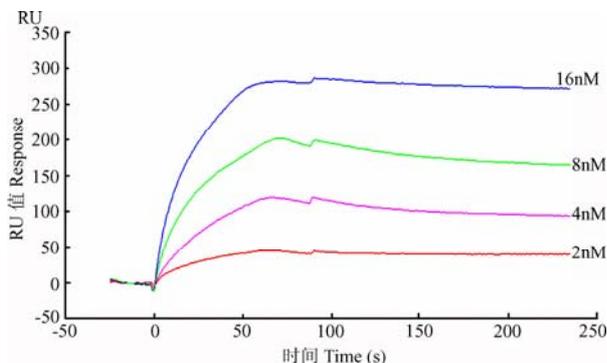


图 5 BIAcore 检测 dsFv 抗体的亲和力

Fig. 5 Affinity analysis of dsFv by BIAcore

为验证复性后的 dsFv 抗体的抗原结合活性及特异性, 将抗原 Xac 及其它 10 种对照菌分别包被到 96 孔板上, 采用间接 ELISA 的方法进行检测。结果显示, dsFv 抗体对抗原 Xac 结合活性良好, 对其它 10 种细菌均无结合活性, 说明复性后的 dsFv 抗体较好地恢复了活性并保持了较高的抗原特异性 (图 6)。

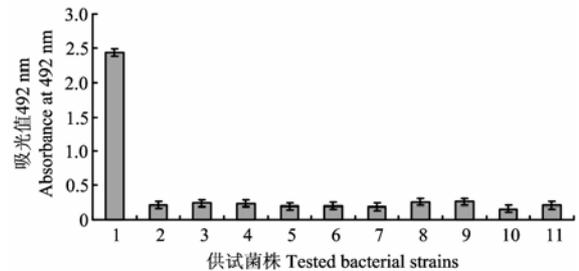


图 6 ELISA 检测 dsFv 抗体特异性

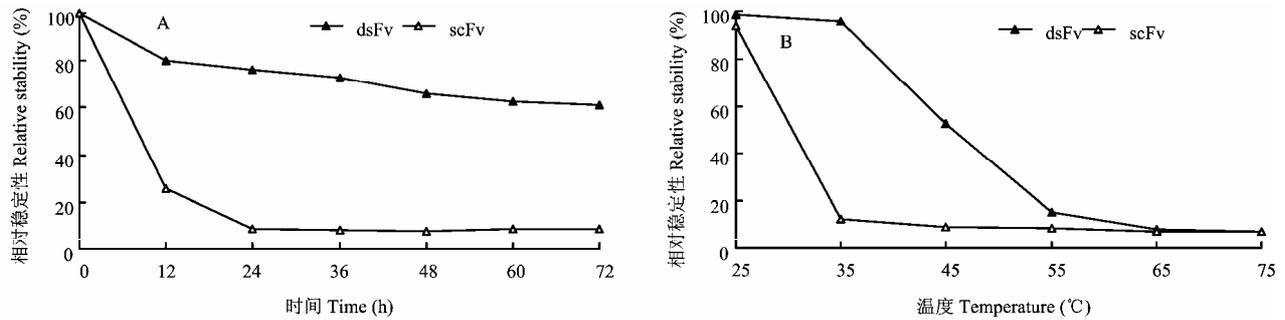
Fig. 6 Specificity test of dsFv by ELISA

2.6 dsFv 的稳定性检测

稳定性是影响抗体生物学功能的重要特性之一, 以抗柑橘溃疡病 scFv 抗体为对照, 检测了 dsFv 抗体在 PBS 中, 37°C 孵育不同时间和相同的时间孵育在不同的温度中抗原结合活性的变化。结果表明, 在 37°C 条件下, scFv 在最初的 12 h 内, 活性急剧下降到最初活性的 25.6%, 24 h 后已经基本检测不到活性。而 dsFv 在 12 h 后活性略有下降 80.2%, 在其后一直保持相对稳定, 并在 72 h 后仍然保持最初活性的 61.3% (图 7-A)。scFv 在 35°C 孵育 3 h 活性下降到最初的 12.5%, 在 45°C 时活性完全丧失, 而 dsFv 在 45°C 仍具有 52.6% 的活性, 55°C 基本丧失活性 (图 7-B)。说明 dsFv 抗体的稳定性与 scFv 相比有了明显的提高。

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 抗体由于具有分子量小、免疫源性低、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^[18], 但是由于其在稳定性方面存在的缺陷, 人们倾向于将其改造位更为稳定的 dsFv 抗体。提高稳定性的



A: dsFv 和 scFv 在 PBS 中 37°C 条件下孵育不同时间相对稳定性比较; B: dsFv 和 scFv 在 PBS 中不同温度下孵育 3 h 后的相对稳定性比较
A: Relative stability of dsFv and scFv at 37°C in PBS; B: Relative stability of dsFv and scFv at various temperatures after 3 h in PBS

图 7 ELISA 检测 dsFv 抗体的稳定性

Fig. 7 Stability test of dsFv by ELISA

原因在于 VH 和 VL 间的连接更加紧密, 结构域之间不容易解离, 而 scFv 结构域之间容易解离而发生聚合。医学领域在该方面已有较多研究, 但在植物病害的诊断和鉴定方面应用尚不广泛, 而且 dsFv 抗体在植物病害防治方面的应用尚未见报道^[19-23]。

本研究选取 VH 的 44 位和 VL 的 100 位氨基酸为突变位点, 这 2 个位点分别位于 VH 的第 2 框架区和 VL 的第 4 框架区内, 突变后不会影响抗体的功能。采用 PCR 定点突变引入突变位点, 简单易操作, 避免了通过筛选带尿嘧啶的模板而进行基因突变的繁琐^[24], 而且 PCR 扩增时采用了高保真的 *pfu* 酶, 保证了基因构建的准确性。突变基因置于 pET30a (+) 载体内, 于 *E.coli* BL21 (DE3) 内高效表达, 目的蛋白绝大多数以包涵体形式存在, 易于分离。复性是获得功能性 dsFv 抗体的关键环节, 本研究采用 L-Arg 防止蛋白的聚集, 同时 GSSG 与 DTT 联合作用, 使复性液为氧化还原交替的环境, 促使正确二硫键的形成, 抑制错误二硫键的形成, 并且在复性过程中使用大量的 GSSG 有利于增加有活性 dsFv 的产量^[25]。笔者采用基于 His-Tag 的方法进行蛋白纯化, 本研究中 dsFv 带有两个 His-Tag 而 VH 和 VL 带有一个 His-Tag, 通过优化洗脱液中咪唑的浓度使 dsFv 与 VH 和 VL 得以较好的分离。

BIAcore 技术是一种基于表面等离子共振的生物传感技术, 它可以精确的检测到在其芯片表面发生的大分子之间的相互作用, 成为研究生物分子间相互作用的理想工具^[26-27]。本研究采用能够固定脂类分子的 HPA 芯片, 并将 Xac-LPS 固定于其上作为固定相, 抗体作为流动相检测其相互作用, 为得到更精确的亲

常数我们将 dsFv 抗体做了 4 个浓度梯度分别检测, 软件分析得到 dsFv 抗体的亲和力为 3.40×10^{-10} M, 与母本 scFv 相比变化不大, 说明笔者的改造没有影响到抗体的功能。特异性试验为使结果具有代表性选用了与 Xac 亲缘关系较近的橄榄黑腐病菌和水稻白叶枯病菌, 环境中常见的枯草芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌, 其它植物的两种致病菌以及柑橘叶片分离的非致病菌, 结果 dsFv 与之均无交叉反应, 说明其特异性良好。同时其稳定性比 scFv 有了明显的提高, 在 PBS 中 37°C 条件下可稳定存在 72 h 以上, 热失活温度较 scFv 提高了近 20°C。并且 dsFv 抗体的产量无论较分泌性表达的 scFv 抗体还是包涵体表达后复性的 scFv 抗体都有了较大幅度的提高, 可达到复性前蛋白量的 20% 以上。

目前, 中国柑橘产品进出口以及种苗、种质资源的调运和交换日趋频繁, 柑橘溃疡病人为传播的危险性加大, 而现在国内外主要沿用的挖除病树、集中烧毁的措施损失巨大, 因此开展 Xac 的诊断及防控措施的研究具有重要的意义。在本研究基础上开发的胶体金试纸条业已初步取得了理想的效果, 详细的研究将做进一步的报道。

4 结论

本研究成功获得了具有较高抗原结合活性及特异性的抗柑橘溃疡病菌 dsFv 抗体, 其稳定性较其母本 scFv 有了明显的提高, 为柑橘溃疡病菌的现场快速免疫学检测奠定了坚实的基础。

References

- [1] Graham J H, Gottwald T R, Cubero J, Achor D S. *Xanthomonas*

- axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, 2004, 5(1): 1-15.
- [2] 王中康, 孙宪昀, 夏玉先, 周常勇, 殷幼平. 柑橘溃疡病菌 PCR 快速检验检疫技术研究. *植物病理学报*, 2004, 31(1): 14-20.
Wang Z K, Sun X Y, Xia Y X, Zhou C Y, Yin Y P. Rapid detection of citrus bacterial canker disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) with polymerase chain reaction (PCR). *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, 34(1): 14-20. (in Chinese)
- [3] 殷幼平, 黄冠军, 赵云, 刘红光, 王中康. 柑橘溃疡病菌实时荧光定量 PCR 检测与应用. *植物保护学报*, 2007, 34(6): 607-614.
Yin Y P, Huang G J, Zhao Y, Liu H G, Wang Z K. Establishment and application of real time fluorescent PCR approaches for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2007, 34(6): 607-614. (in Chinese)
- [4] Huston J S, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai M S, Novotný J, Margolies M N, Ridge R J, Bruccoleri R E, Haber E, Crea R, Opermann H. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-doxigenin single chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1988, 85(16): 5879-5883.
- [5] Buchner J, Pastan I, Brinkmann U. A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins: single-chain immunotoxins from renaturation of bacterial inclusion bodies. *Analytical Biochemistry*, 1992, 205(2): 263-270.
- [6] Reiter Y, Kurucz I, Brinkmann U, Jung S H, Lee B, Segal D M, Pastan I. Construction of a functional disulfide-stabilized TCR Fv indicates that antibody and TCR Fv frameworks are very similar in structure. *Immunity*, 1995, 2(3): 281-287.
- [7] Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Plückthun A. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv fragments. *Biochemistry*, 1990, 29(6): 1362-1367.
- [8] Webber K O, Reiter Y, Brinkmann U, Kreitman R J, Pastan I. Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog. *Molecular Immunology*, 1995, 32(4): 249-258.
- [9] Brinkmann U, Reiter Y, Jung S H, Lee B, Pastan I. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1993, 90(16): 7538-7542.
- [10] Reiter Y, Brinkmann U, Kreitman R J, Jung S H, Lee B, Pastan I. Stabilization of the Fv fragments in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. *Biochemistry*, 1994, 33(18): 5451-5459.
- [11] Jung S H, Pastan I, Lee B K. Design of interchain disulfide bonds in the framework region of the Fv of the monoclonal antibody B3. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 1994, 19(1): 35-47.
- [12] Yuan Q, Xia Y, Nian S, Xia Y X, Wang Z K. Selection of single chain fragments against the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by ribosome display. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(3): 383-389.
- [13] 陈刚, 殷幼平, 袁青, 夏玉先, 王中康. 柑橘溃疡病重组单链体的高效表达及活性检测. *微生物学报*, 2007, 47(6): 1066-1069.
Chen G, Yin Y P, Yan Q, Xia Y X, Wang Z K. High efficient expression and bio-activity assay of recombinant antibody for citrus bacterial canker disease. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(6): 1066-1069. (in Chinese)
- [14] Cai K, Wang H, Bao S Z, Shi J, Hou X J, Gao X, Liu H, Yin J. Novel human 3-domain disulfide-stabilized antibody fragment against glycoprotein of rabies virus. *Microbes and Infection*, 2008, 10(5): 548-555.
- [15] Albrecht M T, Wang W, Shamova O, Lehrer R I, Schiller N L. Binding of protegrin-1 to *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Respiratory Research*, 2002, 3: 18.
- [16] Perrin P, Versmisse P, Delagneau J F, Lucas G, Rollin P E, Sureau P. The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA; advantages of purified glycoprotein over whole virus. *Journal of Biological Standardization*, 1986, 14(2): 95-102.
- [17] 蔡昆, 王慧, 包士中, 史晶, 侯晓军. 人源抗狂犬病毒单链二硫键稳定抗体的重组设计与表达. *微生物学*, 2007, 47(4): 673-676.
Cai K, Wang H, Bao S Z, Shi J, Hou X J. Recombinant design and expression of human anti-rabies virus ScdsFv. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(4): 673-676. (in Chinese)
- [18] Verma R, Boleti E, George A J. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *Journal of Immunology Methods*, 1998, 216(1-2): 165-181.
- [19] Fecker L F, Koenig R, Obermeier C. Nicotiana benthamiana plants expressing beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) coat proteinspecific scFv are partially protected against the establishment of the virus in the early stages of infection and its pathogenic effects in the late stages of infection. *Archives of Virology*, 1997, 142(9): 1857-1863.
- [20] Griep R A, Prins M, van Twisk C, Keller H J, Kerschbaumer R J, Kormelink R, Goldbach R W, 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.
- [21] Schillberg S, Zimmermann S, Zhang M Y, Fischer R. Antibody-based resistance to plant pathogens. *Transgenic Research*, 2001, 10(1): 1-12.
- [22] Saldarelli P, Keller H, Dell'Orco M, Schots A, Elicio V, Minafra A. Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B. *Journal of Virological Methods*, 2005, 124(1-2): 191-195.
- [23] Wang S H, Zhang J B, Zhang Z P, Zhou Y F, Yang R F, Chen J, Guo Y C, You F, Zhang X E. Construction of single chain variable fragment (ScFv) and biscFv-alkaline phosphatase fusion protein for detection of bacillus anthracis. *Analysis Chemistry*, 2006, 78(4): 997-1004.
- [24] Ho M, Kreitman R J, Onda M, Pastan I. *In vitro* antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(1): 607-617.
- [25] Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, Pastan I. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nature Biotechnology*, 1996, 14(10): 1239-1245.
- [26] Wilson W D. Analyzing bimolecular interaction. *Science*, 2002, 295(5562): 2103-2105.
- [27] 陈媛媛, 李永进, 毕利军. 基于表面等离子共振的新型传感技术及其在生命科学中的应用. *生物物理学报*, 2006, 22(2): 82-88.
- Chen Y Y, Li J J, Bi L J. Biomolecular interaction analysis technique and its applications in life science. *Acta Biophysica Sinica*, 2006, 22(2): 82-88. (in Chinese)
- (责任编辑 毕京翠, 李 莉)

欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术期刊,创刊于1962年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究简报、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,被中国科学引文数据库 Chinese Science Citation Database 等多家重要数据库收录。《园艺学报》2005年荣获第三届国家期刊奖,2008年获中国科技信息所“中国精品科技期刊”称号及武汉大学中国科学评价研究中心“中国权威学术期刊”称号。2007年《园艺学报》总被引频次4213次,影响因子1.323。

《园艺学报》为月刊,每月25日出版。2010年每期定价40.00元,全年480.00元。国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号82-471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号M448。漏订者可直接寄款至本编辑部订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街12号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部(邮政编码:100081)
电话:010-82109523; E-mail: yuanyixuebao@126.com; 网址: <http://www.ahs.ac.cn>