

陆 辉,左伟勇,王 健,等. 抗氯霉素单链抗体基因扩增与序列测定[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):28-30.

# 抗氯霉素单链抗体基因扩增与序列测定

陆 辉,左伟勇,王 健,洪伟鸣,王永娟

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室,江苏泰州 225300)

**摘要:**以抗氯霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株的总 RNA 为模板,利用 RT-PCR 法扩增全套抗体轻链、重链基因;经重叠延伸反应,以编码柔性多肽 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 基因为接头,将轻链、重链基因组装为完整的单链抗体 (ScFv) 基因,并克隆到 pGEMT-Easy 载体中测序分析。结果表明,所克隆的氯霉素 ScFv 基因全长为 726 bp,为 VH-Linker-VL 结构,VH 基因为 345 bp,Linker 为 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 多肽的核酸序列,VL 基因为 336 bp。本研究首次成功构建抗氯霉素的单链抗体基因,为进一步用于氯霉素的残留检测奠定基础。

**关键词:**氯霉素;单链抗体;测序

**中图分类号:** R978.1<sup>+</sup>3;Q785

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2013)10-0028-03

氯霉素 (chloramphenicol, CAP) 作为一种抗菌效果明显、价格低廉的高效广谱抗生素,曾被用于临床疾病治疗,但临床研究表明,即便是微量氯霉素残留也会给人或动物机体构成很大威胁<sup>[1]</sup>。美国食品与药物管理局 (FDA) 指出,氯霉素对人体的影响无法控制,所以不能制定安全标准。在美国、加拿大、欧盟,氯霉素被禁用于产肉动物及动物饲料中,并被列入法定禁用兽药;2002 年我国农业部也将氯霉素列入禁用药,在进出口常规检测中被列为必检项目<sup>[2]</sup>。探究快速、灵敏、准确的检测氯霉素残留手段十分必要。

免疫学检测方法是药物残留快速检测的一种主要手段,该技术的关键在于获得可用于检测的抗体,目前以单链抗体为代表的基因重组抗体技术为抗体制备提供了新途径。单链抗体 (single-chain antibody) 即单链抗体可变区片段 (single-chain antibody variable fragment, ScFv),由抗体重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 通过一段 10~25 个氨基酸的连接肽 (Linker) 连接而成<sup>[3]</sup>,分子量为 27 000~30 000 u,是亲代抗体全部抗原结合特异性的最小功能结构单位。单链抗体免疫原性比原来单克隆抗体小得多,具备高特异性特点,而且在制备过程中能较为容易地控制抗体的亲和力和特异性,因此在免疫学检测和医学方面得到了广泛应用<sup>[4]</sup>。本研究利用基因工程方法制备抗氯霉素的 ScFv 基因,并进行克隆及测序鉴定,以期为今后建立以单链抗体技术为支撑的氯霉素类药物残留快速筛检方法奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要生物材料

限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、RevertAid M-MuLV

收稿日期:2013-04-01

基金项目:安徽省科技攻关计划 (编号:1201c0602006);江苏农牧科技职业学院重点项目 (编号:ZD1204)。

作者简介:陆 辉 (1975—),男,江苏南通人,硕士,副教授,主要从事生物工程技术研究。E-mail:smluhui@163.com。

通信作者:王永娟,博士,副教授,主要从事动物疫病防控研究。E-mail:cpfaf@sohu.com。

Reverse Transcriptase、Taq DNA 聚合酶、1 kb DNA Ladderr、RNase Inhibitor 购自 Fermentas 公司;pGEMT-easy 载体、Wizard DNA Clean-up System 购自美国 Promega 公司;Es-Taq MasterMix、DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞购自康为世纪公司;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;Yeast Extract、Tryptone 为 OXID 公司产品;其他生化试剂均为国产分析纯;分泌抗 CAP 单克隆抗体杂交瘤细胞株由本实验室保存。

### 1.2 引物及 Linker 设计

参照文献[5]的方法设计鼠源抗体重链及轻链可变区的扩增引物,连接肽 Linker 采用 Huston 等介绍的 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 形式<sup>[6]</sup>,两端根据重链及轻链序列分别添加互补序列,所有序列由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成 (表 1)。

表 1 扩增鼠源 ScFv 单链抗体基因的引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
VH-B	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
VH-F	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGCCCC
VL-B	GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA
VL-F1	CCGTTTGATTTCAGCTTGGTGCC
VL-F2	CCGTTTATTTCCAGCTTGGTCCC
VL-F3	CCGTTTATTTCCAATTGTCCC
VL-F4	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC
全-B (sf)	GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGCCATGGCCCA CGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
全 F1 (Not I)	GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTGATTTCAGCT TGGTGCC
全 F2 (Not I)	GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTATTTCCAGCT TGGTCCC
全 F3 (Not I)	GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTATTTCCAATT TTGTCCC
全 F4 (Not I)	GAGTCATTCTGCGGCCGCCCGTTTCAGCTCCAGCT TGGTCCC
Linker	GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGG TGGAGCCGCTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT GGCGGATCGGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA

### 1.3 杂交瘤细胞总 RNA 提取

培养抗氯霉素单克隆抗体杂交瘤细胞株至对数生长期,细胞计数大约为 8×10<sup>7</sup> 个时收集细胞,在无 RNA 酶条件下

按 TRIzol 试剂盒操作说明书提取总 RNA, 取少量 RNA 用紫外分光光度计鉴定其纯度和浓度。

#### 1.4 *VH* 基因、*VL* 基因的扩增

以提取的 RNA ( $>1 \mu\text{g}$ ) 为模版, 参考反转录酶说明书, 利用随机引物进行 cDNA 第一链的合成。以 cDNA 为模板, 分别以 *VH* 基因上游、下游引物 (*VH*-B、*VH*-F) 和 *VL* 基因上游、下游引物 (*VL*-B 和 *VL*-F1~4) 扩增全套 *VH* 基因和 *VL* 基因。PCR 反应体系按常规比例配成  $50 \mu\text{L}$ , 反应程序为  $95^\circ\text{C}$ 、 $5 \text{ min}$ →( $95^\circ\text{C}$ 、 $30 \text{ s}$ → $55^\circ\text{C}$ 、 $30 \text{ s}$ → $72^\circ\text{C}$ 、 $30 \text{ s}$ ),  $30$  个循环→ $72^\circ\text{C}$ 、 $10 \text{ min}$ , 取  $5 \mu\text{L}$  PCR 产物于  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳鉴定, 切胶回收获得 *VH* 基因和 *VL* 基因。

#### 1.5 *Linker*-*VL* 基因片段的扩增

以纯化的 *VL* 片段为模板, 以等物质的量的 *Linker* 与 *VL* 上游引物混合物 (*VL*-F1~4 等量混合) 为引物扩增 *Linker*-*VL* 基因片段。PCR 反应体系按常规比例配成  $50 \mu\text{L}$ , 反应程序为:  $95^\circ\text{C}$ 、 $5 \text{ min}$ →( $95^\circ\text{C}$ 、 $1 \text{ min}$ → $55^\circ\text{C}$ 、 $3 \text{ min}$ → $72^\circ\text{C}$ 、 $2 \text{ min}$ ),  $30$  个循环→ $72^\circ\text{C}$ 、 $10 \text{ min}$ , 取  $5 \mu\text{L}$  PCR 产物于  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳鉴定, 切胶回收获得 *Linker*-*VL* 基因片段。

#### 1.6 全长 ScFv 的扩增

取纯化的 *VH*、*Linker*-*VL* 各  $150 \text{ ng}$  通过 PCR 法完成 *VH*-*Linker*-*VL* 片段的预拼接, 预拼接程序为:  $94^\circ\text{C}$ 、 $2 \text{ min}$ →( $94^\circ\text{C}$ 、 $1 \text{ min}$ → $60^\circ\text{C}$ 、 $1 \text{ min}$ → $72^\circ\text{C}$ 、 $1 \text{ min}$ ),  $30$  个循环→ $72^\circ\text{C}$ 、 $10 \text{ min}$ 。以预拼接产物的  $50$  倍稀释液为模板, 进行 *VH*-*Linker*-*VL* 全长基因的拼接, 上游、下游引物为全长基因的整套引物 (全-B 与全-F1~4 等物质的量混合), 拼接 PCR 程序为:  $94^\circ\text{C}$ 、 $1 \text{ min}$ →( $94^\circ\text{C}$ 、 $20 \text{ s}$ → $55^\circ\text{C}$ 、 $35 \text{ s}$ → $72^\circ\text{C}$ 、 $1 \text{ min}$ ),  $35$  个循环→ $72^\circ\text{C}$ 、 $10 \text{ min}$ , 取  $5 \mu\text{L}$  PCR 产物于  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳鉴定, 切胶回收获得 *VH*-*Linker*-*VL* 基因片段, 即为全长 ScFv。

#### 1.7 ScFv DNA 片段的克隆与序列测定

将全长 ScFv 纯化回收后与 pGEMT-easy 载体连接, 连接体系与程序参考载体说明书进行。将连接产物按照常规方法转化筛选鉴定, 获得经 *Sfi* I 与 *Not* I 酶切鉴定正确的重组质粒 pGEMTeasy-CAPScFv, 进行测序。

## 2 结果与分析

#### 2.1 *VH* 基因、*VL* 基因扩增鉴定

提取对数生长期抗氯霉素单克隆抗体杂交瘤细胞的总 RNA, 用 NanDrop 软件测定 RNA 浓度, 结果表明 RNA 浓度约为  $1100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,  $D_{260 \text{ nm}}/D_{280 \text{ nm}}$  为  $2.01$ 。以此 RNA 为模板扩增全套 *VH* 基因和 *VL* 基因, 扩增产物经  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳分析可见预期约  $340 \text{ bp}$  的 *VH* 基因和约  $325 \text{ bp}$  的 *VL* 基因 (图 1, 含酶切位点)。

#### 2.2 *Linker*-*VL* 基因片段的扩增

将 *Linker* 与纯化的 *VL* 基因等物质的量混合后, 以 *VL* 上游引物为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳鉴定可得约  $420 \text{ bp}$  左右的 *Linker*-*VL* 基因 (图 2)。

#### 2.3 全长 ScFv 的组装鉴定

将等量 *VH* 与 *Linker*-*VL* 混合液在 PCR 反应中完成 *VH*-*Linker*-*VL* 片段的预拼接, 以预拼接产物的  $50$  倍稀释液

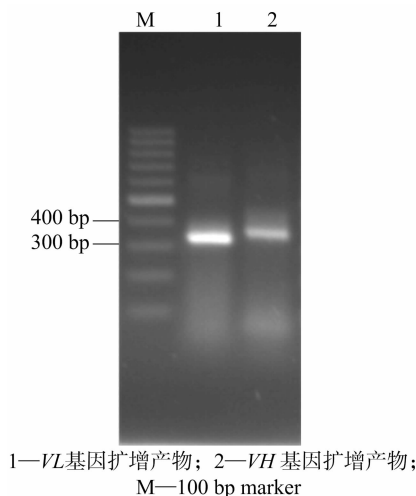


图1 氯霉素 *VH* 基因、*VL* 基因扩增鉴定

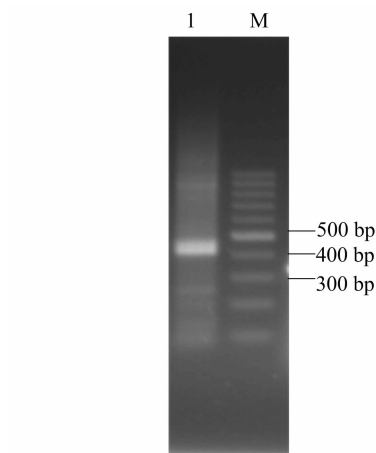


图2 氯霉素 *Linker*-*VL* 基因片段扩增鉴定

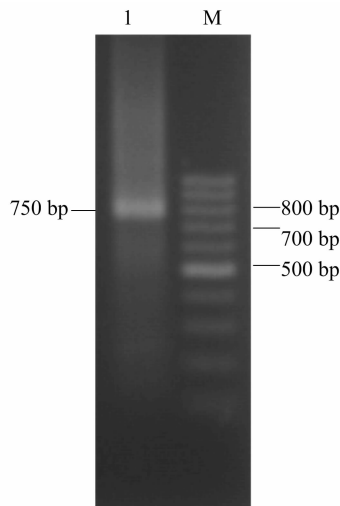
为模板, 进行 *VH*-*Linker*-*VL* 全长基因的拼接扩增, 扩增产物于  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳鉴定, 获得预期 *VH*-*Linker*-*VL* 基因片段, 即全长约  $750 \text{ bp}$  的全长 ScFv (图 3)。

#### 2.4 ScFv DNA 片段的克隆与序列测定

将全长 ScFv 克隆入 pGEMTeasy 载体中, 用 *Not* I 和 *Sfi* I 限制性内切酶对重组质粒 pGEMTeasy-CAPScFv 进行酶切鉴定, 可释放出预计大小的插入片段 (图 4)。随机挑取 2 个重组质粒进行序列测定, 结果显示所克隆的氯霉素 ScFv 阅读框全长为  $726 \text{ bp}$ , 为 *VH*-*Linker*-*VL* 结构, *VH* 基因为  $345 \text{ bp}$ , *Linker* 为  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$  多肽的核酸序列, *VL* 基因为  $336 \text{ bp}$ , 序列如图 5。

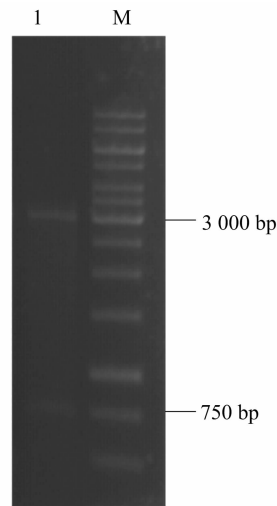
## 3 结论与讨论

链接单链抗体 *VH* 和 *VL* 的连接肽 *Linker* 设计在单链抗体制备中起重要作用, 要求不能干扰 *VH*、*VL* 的空间构象, 不能阻碍抗原结合部位, 不引起分子动力学改变, 尽可能减少蛋白酶攻击及防止 ScFv 聚集<sup>[7]</sup>, 被最广泛应用的 *Linker* 为本研究选取的重复出现的 4 个甘氨酸和 1 个丝氨酸  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 。单链抗体的取向既可以是 *VH*-*Linker*-*VL*, 也可以是 *VL*-*Linker*-*VH*, 2 种方式都不影响 ScFv 的特异性, 但



M—100 bp marker; 1—全长 ScFv 扩增产物

图3 氯霉素 ScFv 全长扩增鉴定



1—Not I、Sfi I 双酶切 pGEMTeasy-CAPScFv; 2—1 kb DNA marker

图4 pGEMTeasy-CAPScFv 酶切鉴定

ATGGCCAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTG  
AAGCTGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACTCCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGC  
AGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTA  
AATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAG  
CCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGA  
CTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGAC  
GGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGT  
CTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACAT  
GCACTGGTACCAGCAGGAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGTATTATGACACATCCAAA  
CTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCAC  
AATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTAC  
CCACCCACGTTCCGGTGCTGGGACAAAAGTTGGAATAAAACGGGCGCCGAGAATGA

图5 氯霉素 ScFv 基因阅读框全长序列

VH-Linker-VL 比 VL-Linker-VH 的亲合力高 10 倍以上,而 VL-Linker-VH 比 VH-Linker-VL 的表达量高 20 倍<sup>[8-9]</sup>,本研究选取了亲合力较好的 VH-Linker-VL 方式。

获得特异性好、亲合力高的抗体是建立免疫学检测方法和免疫治疗的前提。单链抗体具有单一结合位点、分子量小、免疫原性低以及易在大肠杆菌中表达等特点<sup>[10]</sup>,因此是目前报道较多的一类小分子抗体,但以往研究多集中于疾病诊断和治疗方面,对于农药、兽药残留检测方面的研究较少。本研究从抗氯霉素的杂交瘤细胞株中提取总 RNA,并利用重组 DNA 技术获得氯霉素的全长 ScFv 基因,为今后建立以单链抗体技术为支撑的氯霉素类药物残留快速筛检方法奠定基础。由于多个单链抗体基因可以借助分子生物学方法得以串联表达,从而避开传统单克隆抗体检测目标单一的缺点,为建立多特异性单链抗体为基础的药物残留检测方法开辟新思路。

#### 参考文献:

- [1] Li P, Qiu Y, Cai H, et al. Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry[J]. Se Pu, 2006, 24(1): 14-18.
- [2] 吴永宁, 邵兵, 沈建忠. 兽药残留检测与监控技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 379.

- [3] Blazek D, Celer V. The production and application of single-chain antibody fragments[J]. Folia Microbiol, 2003, 48(5): 687-698.
- [4] 秦丽莉, 张春明. 单链抗体研究进展及其在医学中的应用[J]. 国外医学: 放射医学核医学分册, 2005, 29(6): 255-257.
- [5] 郑志明, 金社胜, 肖希龙, 等. 抗诺氟沙星噬菌体单链抗体库的构建与筛选[J]. 动物医学进展, 2010, 31(增刊): 36-41.
- [6] Huston J S, Mudgett-Hunter M, Tai M S, 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1988, 85(16): 5879-5883.
- [7] Takkinen K, Laukkanen M L, Sizmann D, et al. An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*[J]. Protein Engineering, 1991, 4(7): 837-841.
- [8] Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system[J]. Journal of Immunological Methods, 1997, 201(1): 35-55.
- [9] Gu X, Jia X, Feng J, et al. Molecular modeling and affinity determination of scFv antibody: proper linker peptide enhances its activity[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2010, 38(2): 537-549.
- [10] 秦海艳, 毛晓燕, 乔玉玲, 等. 单链抗体的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(4): 795-797, 771.