

抗对虾白斑综合症病毒单链抗体 A1 基因在酵母中表达及其与抗原结合活性

曹 宏^{1, 2, 3} 周亚凤¹ 张晓华² 张先恩¹ 戴和平²

(1. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 通过 PCR 从噬菌粒载体上扩增一种抗对虾白斑综合症病毒(WSSV)的单链抗体 A1(ScFvA1) 基因, 并构建于大肠杆菌 酵母穿梭质粒载体 pPIC9K 上。经 PCR, 酶切, 测序鉴定重组克隆, 发现重组成功。将重组质粒 pPIC9K-ScFvA1 转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 中, 利用甲醇诱导, 将单链抗体 A1 在酵母中进行了初步表达。经 SDS PAGE 电泳, 发现其大小约为 32KD, 通过 ELISA 实验, 证明表达上清液中的单链抗体具有很高的 WSSV 结合活性。

关键词: 毕赤酵母; 对虾白斑综合症病毒(WSSV); 单链抗体; 克隆; 表达

中图分类号: S945.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)05-0531-04

对虾白斑综合症病毒(White spot syndrome virus WSSV)及其引起的死亡率, 是目前对虾养殖业所面临的最紧迫的问题。自该病 1993 年爆发性流行以来, 每年造成巨额的经济损失, 已成为了水产工作者关注的焦点之一^[1-3]。随着抗体工程技术日益成熟, 利用分子克隆技术制备小分子抗体为该病的诊断和治疗提供了新的思路。其中, 单链抗体(Single chain fragment variable, ScFv)在保持抗原结合活性的同时, 具有分子小, 穿透性强, 易于基因操作和易于大规模生产等优点^[4]。为此, 利用噬菌体抗体展示技术筛选到一系列能够特异识别 WSSV 的单链抗体^[5]。本实验将其中的一个单链抗体 A1 的基因通过 PCR 从噬菌粒载体上扩增, 并构建到大肠杆菌-酵母穿梭质粒载体, 再将重组质粒转化毕赤酵母 GS115(*Pichia pastoris* GS115)中, 通过甲醇诱导, 实现高效表达, 这将为进一步商业化制备抗 WSSV 抗体及抗病毒对虾饲料提供基本数据。

1 材料与方法

1.1 质粒 含单链抗体 A1 基因的噬菌粒载体 pCANTAB5E-ScFvA1-Etag 由戴和平^[5]构建, 穿梭质粒载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司, 表达载体 pPIC9K-

ScFvA1-Etag 由本实验构建。

1.2 菌种及试剂 大肠杆菌 TG1 用于噬菌体的感染和扩增, 大肠杆菌 DH5 α 用于一般基因克隆实验, 毕赤酵母 GS115(*Pichia pastoris* GS115) 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶, Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶为 Takara 公司产品。PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司, 质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司, 小鼠 Antr Etag/HRP conjugation 购自 Amersham Pharmacia Biotech。

1.3 单链抗体 A1 基因的扩增 根据已知的单链抗体 A1 基因序列, 设计并合成用于该基因扩增的引物。为了便于克隆和表达, 分别在其上游引物和下游引物中设置了 SnaBI 和 EcoRI 酶切位点。引物序列如下:

上游引物 P1: 5'-TTCCT TACGTA G TTC CTT
SnaBI
TCT ATG CG-3'

下游引物 P2: 5'-TA GC GAATTC A TCT AAA GTT
EcoRI
TTG TCG TCT-3'

PCR 反应体系为: 模板质粒(3.7ng/ μ L) 1 μ L, 上下游引物(10 μ mol/ μ L) 各 10 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 10 μ L, 5mmol/L dNTP 4 μ L, Taq DNA 聚合酶 1 μ L, 补加蒸馏水至 100 μ L。

收稿日期: 2003-06-18; 修订日期: 2004-05-25

基金项目: 中国科学院方向性创新[KSCX2-SW-302-5]; 国家自然科学基金[30170727]资助

作者简介: 曹 宏(1978-), 男, 湖北武汉人; 硕士; 研究方向: 生物化学和分子生物学. caohongcn@hotmail.com

通讯作者: 戴和平 Tel: 027-87647716; E-mail: hpdai@ihb.ac.cn

PCR 反应条件为: 先 94℃加热 5min。然后 94℃变性 60s, 42℃复性 90s, 72℃延伸 90s。经 5 个循环后, 改为 94℃变性 60s, 57℃复性 90s, 72℃延伸 90s。经 25 个循环后, 72℃延伸 10min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定效果。

1.4 单链抗体 A1 基因的克隆及鉴定 将纯化的单链抗体 A1 基因用 *Sna*b I / *Eco*R I 双酶切, 经琼脂糖凝胶电泳和 DNA 纯化后, 克隆于经同样酶切的 pPIC9K 中, 具体反应条件见 Takara 公司产品使用说明书。重组子的 PCR 鉴定及酶切鉴定方法同上。并将初步鉴定出的重组子交由博亚公司测序。

1.5 重组子的转化及表达 将含有目的基因的重组子先用 *Bgl* II 限制性内切酶进行线性化处理, 然后通过原生质体转化法转化酵母 GS115, 具体操作方法见 Invitrogen 公司产品使用说明书或文献^[6]。转化涂平板后, 经 4—5d 可得到转化子, 从这些转化子中筛选出高表达的转化子, 先将其在 BMGY 培养基中生长至 OD₆₀₀= 1.2—1.5 时, 离心收集菌体, 转入 BMMY 培养基中生长诱导蛋白生成, 每隔 24h 补加 2% 甲醇, 生长 3—4d 收获。

1.6 单链抗体 A1 的 SDS-PAGE 分析 分离胶的浓度为 10%, 浓缩胶的浓度为 3.9%。按常规方法在 Bio Rad 小型电泳仪上进行恒流电泳, 以 10mA 的电流电泳至分离胶后, 增加电流至 15mA 继续电泳。电泳结束后, 取出凝胶置于考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 20—30min, 脱色液脱色后, 用数码相机(富士-2800)拍照。

1.7 ELISA 将上清液中的表达产物通过 ELISA 实验来鉴定活性, 具体操作方法如下: 用纯化后的 WSSV 病毒包被 96 孔 ELISA 板, 分为 A, B, C, D, E, F 六组, 其中 C, D 两组是阳性对照; E, F 两组是阴性对照。A, C, E 组为每孔加入 100μL WSSV (0.5μg WSSV 蛋白/100μL PBS), B, D, F 组为每孔加 100μL WSSV (1.0μg WSSV 蛋白/100μL PBS), 4℃过夜。12h 后, 将各孔液体吸出, 用 PBS (pH7.4) 洗 3 次, 用新鲜配置的 4% 脱脂奶粉/PBS (PBST) 室温下封闭各孔 2h。2h 后, 将 A-D 组各孔 PBST 吸出, 用 0.05% Triton/PBS (PBST) 洗 3 次, 然后 PBS 洗 3 次, 向 A, B 两组各孔中加入表达上清液各 100μL, 室温, 2h。向 C, D 两组各孔中加入大肠杆菌 TG1 表达的 A1 100μL 室温, 2h。2h 后, 将各孔液体吸出, 用 PBST 洗 3 次, 然后用 PBS 洗 3 次, 向 A, B, C, D, E, F 六组中每孔加入 100μL 1: 2000 稀释的小鼠 Anti Etag/HRP conjugation, 室温, 2h。用 PBST 洗 3 次, 再用 PBS 洗 3 次。

每孔加入 100μL TMB 底物溶液[2.5mL 1mol/L 的醋酸钠溶液 (pH6.0), 22.0mL H₂O, 250μL 100mg/mL TMB(溶于 50% 二甲基亚砷), 10μL H₂O₂], 37℃, 15min 或 30min 后分别用 2mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定 OD₄₅₀吸收值。

2 结果

2.1 单链抗体 A1 基因的获取

以戴和平构建的 pCANTAB5E-ScFvA1-Etag 为模板, 以带有 *Sna*b I 和 *Eco*R I 酶切位点的 P1、P2 为引物, 通过双循环 PCR, 获得了 ScFvA1-Etag 全长基因, 共 903bp(图 1)。

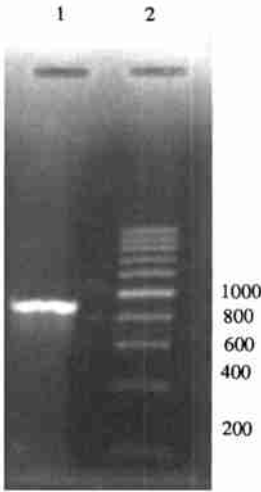


图1 PCR 扩增 ScFvA1-Etag 基因

Fig 1 The PCR production of ScFvA1-Etag

1. ScFvA1-Etag PCR 产物 Lane1, PCR production

2 200bp 分子量标志物 Lane2, 200bp ladder marker

2.2 单链抗体 A1 基因的克隆及验证

PCR 产物和 pPIC9K 空载体经 *Sna*b I / *Eco*R I 双酶切后连接, 转化大肠杆菌 DH5α, 挑单菌落经 PCR 鉴定阳性克隆 4 个, *Bgl* II 酶切验证其中 1 个, *Bgl* II 酶切验证如上图所示(图 2)。*Bgl* II 酶切产生 2.4kb 和 7.6kb 两个片段, 与推测值一致。将该基因进行测序, 测序结果与预期完全相同。

2.3 单链抗体 A1 基因的初步表达

将构建好的 pPIC9K-ScFvA1-Etag 重组载体用 *Bgl* II 限制性内切酶进行线性化处理, 然后通过原生质体转化法转化酵母 GS115 (*Pichia pastoris* GS 115) 后, 筛选出阳性重组子, 先将其在 BMGY 培养基中生长, 当到 OD₆₀₀= 1.2—1.5 时, 将其离心, 将菌体转入 BMMY 培养基中生长, 30℃, 200r/min, 每隔 24h 补加 2% 甲醇, 生长 3—4d 收获。



图 2 表达载体 pPIC9K-ScFvA1-Etag 的双酶切验证
Fig 2 The BglII digestion of ScFvA1-Etag
1. λ DNA HindIII 分子量标志物
Lane1, λ DNA HindIII marker
(23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027)
2 ScFvA1-Etag 经 BglII 酶切后产物 Lane 2, BglII digestion of ScFvA1-Etag

从 SDS PAGE 结果(图 3)可以看出,表达产物出现在预期的 32KD 处,说明目的蛋白 ScFvA1-Etag 成功地在重组菌株 GS115-pPIC9K-ScFvA1-Etag 中进行了分泌表达。



图 3 ScFvA1-Etag 在 GS115 中的诱导表达
Fig 3 Expression of ScFvA1-Etag in GS115
1. GS115 pPIC9K-ScFvA1-Etag 表达上清
Lane1, ScFvA1-Etag induced by methanol, 72h, 30℃
2 低分子量标准蛋白 Lane2, marker(97, 66, 43, 31, 20, 14)
3 空载体 GS115-pPIC9K 的表达上清
Lane3, GS115-pPIC9K induced by methanol, 72h, 30℃

2.4 表达产物的抗原结合活性鉴定

ELISA 测定由表 1 可见表达产物的检测值平均高出阴性对照 6-7 倍以上,表明其具有抗原结合活性。具体结果见表 1

表 1 ScFvA1 与 WSSV 结合活性的 ELISA 测定				
Tab.1 ELISA assay for activity of ScFvA1 binding to WSSV				
A ₄₅₀ 检测值	0.5 μ g WSSV 包被		1.0 μ g WSSV 包被	
	15min	30min	15min	30min
阴性对照	0.072	0.060	0.053	0.060
阳性对照	0.426	0.541	0.704	0.721
表达产物	0.117	0.425	0.374	0.414

3 讨论

工程抗体在疾病的诊断和防治中已应用得越来越广泛。ScFv 是近年来研究最多的一种工程抗体,它利用人工合成连接肽序列(Linker)将抗体重、轻链可变区基因共价连接起来,形成 ScFv 基因,然后在合适的表达载体中表达出活性片段。本研究将抗 WSSV 的单链抗体基因 A1 克隆到 pPIC9K 载体中,转化至毕赤酵母,毕赤酵母作为外源基因表达的宿主菌,具有生长快,易发酵,能大批量生产,以及可以对表达产物进行翻译后修饰等优点,因而使其成为大量获取重组蛋白,尤其是真核蛋白的简便的表达系统。而载体 pPIC9K 由于具有信号肽,故可以将重组基因进行分泌表达,这样既大大降低了成本又有利于目的蛋白的纯化。本文构建了能分泌表达的工

程菌株 GS115-pPIC9K-ScFvA1-Etag。甲醇诱导后,经 SDS-PAGE 和 ELISA 检测了单链抗体基因的表达产物,结果表明:表达的目的蛋白主要是分泌到胞外,其相对分子量约为 32KD;表达产物具有很高的抗原结合活性。这为今后生产抗对虾白斑综合症病毒的抗体及抗病毒饲料,打下了坚实的基础。

参考文献:

[1] Song X L, Huang J, Kathy F L T, *et al.* The construction and analysis for cDNA clones of white spot syndrome virus of shrimp[J], *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(5): 444-451. [宋晓玲, 黄捷, Kathy F L T, 等. 对虾白斑综合症病毒重组 cDNA 克隆的构建与分析. 水生生物学报, 2002, 26(5): 444-451]

[2] Miao H Z, Tong S L, Xu B, *et al.* Multiplication of the shrimp baculovirus HHNBV with primary cell cultures from lymphoid organ of *Penaeus chinensis* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, 16(2): 221-224. 苗宏

志, 童裳亮, 徐斌等. 利用对虾原代细胞增殖对虾杆状病毒 HHNBV 的研究. 生物工程学报, 2000, 16(2): 221—224]

- [3] Lei Z W, Huang J, Kou Y T, *et al.* Review on research of molecular epidemiology of white spot syndrome(WSS) in prawn[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(3): 260—264 雷质文, 黄捷, 寇运同, 等. 对虾白斑综合症(WSS)的分子流行病学研究进展. 中国水产科学, 2002, 9(3): 260—264]
- [4] Hoogenboom H R, de Bruine A P, Hufton S E, *et al.* Antibody phage

display technology and its applications[J]. *Immunotechnology*, 1998, 4: 1—20

- [5] Dai H, Gao H, Zhao X, *et al.* Construction and characterization of a novel recombinant single chain variable fragment antibody against white spot syndrome virus from shrimp [J]. *J. Immun. Methods*, (2003) in press
- [6] Gregg J M, Baringer K J, Hessler A Y, *et al.* *Pichia pastoris* as a host system for transformations[J]. *Mol. Cell. Biol.* 1985, 5: 3376—3385

EXPRESSION OF ScFv-A1 OF AGAINST WHITE SPOT SYNDROME VIRUS(WSSV) IN YEAST *PICHIA PASTORIS*

CAO Hong^{1,2,3}, ZHOU YaFeng¹, ZHANG XiaoHua², ZHANG XianEn¹ and DAI HePing²

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Hubei, Wuhan 430071;

2 Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Hubei, Wuhan 430072;

3 Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: White spot syndrome virus(WSSV) from shrimp was first found in Taiwan in 1992. Since 1993, white spot syndrome disease of shrimp caused by this virus was widely spread throughout China, Asia and Pan-Pacific Ocean. It is a great harm to the aquaculture of shrimp. Unfortunately, we still haven't found a powerful method to protect or treat shrimp from this disease. So it is important to detect this virus in short time. In our research, a gene of ScFv-A1 against White spot syndrome virus(WSSV) from shrimp was amplified by PCR from phagemid vector pCANTAB5E and cloned into the E. Coli yeast shuttle vector-pPIC9K, yielding expression vector pPIC9K-ScFv-Etag. The correct inserting was confirmed by PCR, BglII enzyme digestion and DNA sequencing. Then the recombinant vector pPIC9K-ScFv-Etag was transformed into the yeast strain GS115(*Pichia pastoris* GS115) by spheroplasting and the ScFvA1 was expressed under the control of the AOX1 promoter. After induced by 2% methanol every 24 hours for 96 hours, the ScFvA1 could be secreted into the supernatant. From the SDS-PAGE we found that the molecular weight of the protein was about 32KD. Its WSSV binding activity could be detected by ELISA. And we found that its WSSV binding was 6—7 times higher than negative comparison. The result suggests that the genetically engineered single chain antibody can be expressed in the eucaryotic system successfully. It means that we can use yeast as a expression system to produce the antibody to detect, prevent, and inhibit the White spot syndrome virus in the near future.

Key words: *Pichia pastoris*; White Spot Syndrome Virus(WSSV); Single chain Fv(ScFv); Cloning; Expression