

# 基于 ELISA 克罗诺杆菌单链抗体制备与鉴定

张秀媛, 黄智鸿, 王丽霞, 陈一, 赵瑞平

(河北北方学院农林科技学院, 河北北方学院食品安全研究中心, 河北张家口 075000)

**摘要:** 利用基因工程技术制备克罗诺杆菌特异性单链抗体 (scFv)。从克罗诺杆菌单克隆抗体的杂交瘤细胞中提取总 RNA, 利用 RT-PCR 反转录合成第一链 cDNA 后再扩增出抗体的重链可变区(VH)和轻链变区(VL)基因片段, 采用重叠延伸 PCR 的方法, 用柔性多肽 Linker 接头 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> 将 VH 基因和 VL 基因拼接成 scFv 基因片段, Xho I、EcoR I 限制性内切酶双酶切 scFv 后克隆到原核表达载体 pET-26b 中构建重组质粒 scFv-pET-26b, 挑取阳性克隆提取重组质粒后转入大肠杆菌 BL21 中进行诱导表达, 通过 His 柱进行亲和层析, 最后利用 ELISA 检测单链抗体的活性。成功构建了表达克罗诺杆菌单链抗体的基因工程菌株, 通过 SDS-PAGE 和 ELISA 试验结果表明, 诱导表达的罗诺杆菌单链抗体分子量约为 30 kDa, 其能与罗诺杆菌特异性结合, 可作为免疫检测罗诺杆菌的候选抗体分子。

**关键词:** 克罗诺杆菌; scFv; ELISA

文章编号: 1673-9078(2015)5-169-174

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.027

## Preparation and Identification of *Cronobacter* Single-chain Variable Fragment Antibody using ELISA

ZHANG Xiu-yuan, HUANG Zhi-hong, WANG Li-xia, CHEN Yi, ZHAO Rui-ping

(College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University; Food Safety Research Centre of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract:** Specific single-chain variable fragment (scFv) against *Cronobacter* was generated using genetic engineering. Genes coding for variable regions of the heavy and light chains (VH and VL) were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) of total RNA from hybridoma cells secreting *Cronobacter* monoclonal antibody. VH and VL were fused together by Splice Overlap Extension (SOE)-PCR with flexible polypeptide linker (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> to construct the scFv genetic fragment. The scFv-pET-26b recombinant plasmid was constructed by double-digestion with restriction endonucleases XhoI and EcoRI, followed by cloning into plasmid vector pET-26b. Positive clones were selected for extraction of scFv-pET-26b, which was transformed into *Escherichia coli* BL21 for expression using IPTG as an inducer. The expressed recombinant protein was purified by His affinity chromatography and identified by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Genetically engineered strains expressing *Cronobacter* scFv were successfully constructed. SDS-PAGE and ELISA results showed that the molecular weight of the expressed scFv was approximately 30 kDa and that the obtained scFv could specifically bind to *Cronobacter* and is a potential candidate antibody for the detection of *Cronobacter*.

**Key words:** *Cronobacter*; single-chain variable fragment antibody; enzyme-linked immunosorbent assay

克罗诺杆菌(*Cronobacter*)原来称为阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*), 属于肠杆菌科。在人和动物肠道内寄生, 是一种周生鞭毛、无芽孢、能运动的革兰氏阴性细菌。一直被称为黄色阴沟肠杆菌。克罗诺杆菌作为一种新兴的食源性致病菌, 与其它食源性致病菌相比, 感染人群范围狭窄, 感染率低, 但婴幼儿是克罗诺杆菌感染的高危人群, 感染后主要引起菌血

症、脑膜炎、坏死性小肠结肠炎等, 致死率高达 40%~80%。克罗诺杆菌在婴幼儿奶粉、肉类、水、蔬菜等多种食品中被检测到, 其中奶粉是该菌的主要感染渠道。因此克罗诺杆菌的检测与控制已经成为影响婴儿食品安全的重要因素<sup>[1-2]</sup>。

目前, 由于克罗诺杆菌污染来源、污染途径尚不明确, 因此建立快速检测、溯源、致病性方法对其有效控制具有重要的意义。针对克罗诺杆菌的检测, 免疫学方法一直是必不可少的, 尤其是在快速简便方面, ELISA、免疫磁珠、免疫层析试纸条等技术已经成为

收稿日期: 2014-09-14

基金项目: 张家口科技攻关重点资助项目 (1311018C-3)

作者简介: 张秀媛 (1982-), 女, 讲师, 研究方向: 食品安全与营养

目前检测技术的主流方向。传统的微生物培养和生理生化检测技术,费时费力,不利于在克罗诺杆菌暴发时,进行准确、快速地溯源和控制,克罗诺杆菌传统检测方法已经在很多领域逐渐被免疫学的技术方法所替代<sup>[1]</sup>。

单链抗体(single chain variable fragment, scFv)作为第三代抗体,应用DNA重组技术及蛋白质工程技术把抗体分子的V区基因进行扩增、连接,然后克隆到合适的表达载体中,在适当的宿主细胞中表达并正确折叠成具有生物学功能的一种小分子抗体分子。由于其具有分子小、免疫原性低、可塑性强及不需免疫动物可大批生产等优点,在酶联免疫技术检测食品中污染物方面显示出多克隆抗体与单克隆抗体无法比拟的优点<sup>[4]</sup>。

目前国内外还没有关于克罗诺杆菌单链抗体制备的相关文献报道,本研究利用基因工程技术成功构建了表达克罗诺杆菌单链抗体的基因工程菌株,诱导表达的罗诺杆菌单链抗体具有与其抗原特异性结合活性,并获得克罗诺杆菌特异性单链抗体的基因序列,为进一步实现克罗诺杆菌免疫法快速检测提供一种获得克罗诺杆菌特异性抗体的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、菌株及细胞株

克罗诺杆菌杂交瘤细胞,本实验室制备;克隆载体 pET-26b 质粒,德国 Novagen 公司;大肠杆菌 JM109、BL21,本实验室保存。

#### 1.1.2 主要试剂

卵清蛋白、牛血清白蛋白, Sigma 公司; Xho I、EcoR I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, Promega 公司; GoScript 反转录系统, Promega 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、Oligotex mRNA Mini Kit、QIA quick PCR Purification Kit, Qigen 公司; 质粒提取试剂盒, 康为世纪公司。His-Tag HRP、卡那霉素(kana), BBI 公司; LB 培养基, 北京诺博莱德公司;  $\beta$ -巯基乙醇, 上海生工; PBS、PBST、显色液, 实验室配制; 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 北京凯森莱医药公司; DNA Maker 2 000、DNA Maker 1 KB, 天根生化科技公司。

#### 1.1.3 引物合成

表 1 克罗诺杆菌单链抗体扩增引物

Table 1 Primers used for scFv gene

引物名称	引物序列
VH-Back	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
VH-For	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTGGCCCC
VL-Back	GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA
MJK1-FONX	CCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC
MJK2-FONX	CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC
MJK4-FONX	CCGTTTTATTTCCAACITTTGTCCC
MJK5-FONX	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC
VH-Back-EcoR I	TACTCAGAAATTCGCAGGTCCAACGCAGGAGTC
VL-For-Xho I	TACTCACTCGAGCCGTTTTATTTCCAGCTTGGT
Linker	GGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCG GAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA

本实验扩增轻链 VL 和重链 VH 所用通用引物是参考 NCBI 网站上的小鼠抗体基因数据和在 Imai S 所用引物的基础上设计; 扩增 scFv 的引物根据载体 pET-26b 的酶切位点和通用引物扩增的 VH 和 VL 的测序结果设计。利用的软件为 Primer5 和 Mega, 并由上海生工生物工程技术有限公司合成。

#### 1.1.4 主要仪器

DNA 电泳仪, 北京六一仪器厂; PCR 仪、SDS-PAGE 电泳装置、凝胶成像仪, BIO-RAD 公司; 生化培养箱 LRH-250-A, 广东省医疗器械厂;

DNM9026 全自动酶标仪, 北京普朗新技术有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取

将克罗诺杆菌杂交瘤细胞培养至取  $1 \times 10^7$  个细胞, 5 000 r/min, 5 min 离心沉淀细胞, 吸弃上清, 严格按照 RNeasy Midi kit 试剂盒操作提取罗诺杆菌杂交瘤细胞总 RNA。

#### 1.2.2 VH 和 VL 的克隆

采用 promega 公司的 GoScript Reverse

Transcription System 进行反转录合成第一链 cDNA, 以 cDNA 为模板, 以 VH、VL 的前后引物 PCR 扩增 VH 和 VL 基因。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶回收目的片段<sup>[5-6]</sup>。

### 1.2.3 全长 scFv 基因拼接及 PCR 扩增

将 VH、VL 进行重叠延伸法连接为一条单链可变区抗体 scFv 基因片段。取 100 ng 的 VH、VL 片段互为模板, 重叠延伸 PCR 反应将 VH、VL 随机拼接成 scFv, 第一次 PCR 反应条件为: 94 °C 变性 1 min, 63 °C 退火 1 min, 68 °C 延伸 1 min, 反应进行 20 个循环; 随后以 VH(Back) 和 VL(For) 为引物, 第二次 PCR 扩增 scFv, 反应条件为: 94 °C 变性 1 min, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶回收目的片段<sup>[5-6]</sup>。

### 1.2.4 克罗诺杆菌 scFv 重组质粒的构建

将回收 scFv 片段和载体质粒 pET-26b 分别采用 Xho I、EcoR I 限制性内切酶双酶切, PCR 产物回收后, 采用 T4DNA 连接酶将双酶切后的 scFv 和 pET-26b 在 16 °C 连接 16 h, 连接片段转化大肠杆菌 JM109, 筛选出的阳性克隆进行双酶切验证后送北京金唯智生物科技有限公司测序<sup>[7-8]</sup>。

### 1.2.5 scFv 的诱导表达及 SDS-PAGE 鉴定

将阳性重组质粒转入表达菌大肠杆菌 BL21 中, 将克罗诺杆菌 scFv-pET-26b-BL21 菌株接种于含有 100 μg/mL Kana(卡那霉素)的 5 mL LB 培养液中 37 °C 过夜振荡培养。取 50 μL 过夜培养液, 按 1:100 比例转接到新的 5 mL LB 培养液(含 100 μg/mL Kana)里, 培养 3 h 左右至菌液浓度的 OD<sub>600</sub> 达到 0.8~1.0 左右时, 取出 500 μL 菌液作为对照, 剩余部分加入终浓度为 0.1 mM 的 IPTG 进行诱导, 继续培养 5 h。利用 His 蛋白纯化柱纯化后进行 12% SDS-PAGE 分析, 检测目的蛋白。

### 1.2.6 scFv 与抗原(克罗诺杆菌) 结合测定

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{OD}_{450\text{nm}}(\text{阴性对照}) - \text{OD}_{450\text{nm}}(\text{不同浓度的scFv})}{\text{OD}_{450\text{nm}}(\text{阴性对照})} \times 100\%$$

## 2 实验结果与分析

### 2.1 克罗诺杆菌单克隆抗体细胞总 RNA 的提取

使用 RNeasy Midi kit 试剂盒从细胞中提取克罗诺杆菌单克隆抗体细胞总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶由 DEPC

克罗诺杆菌新鲜菌液用浓度 1% 的福尔马林灭活过夜后, 无菌的 PBS 洗板 3 次, 5000 r/min 离心后菌体为所制备的抗原。在 96 孔微板中, 菌体(1.5 mg/mL) 按 100 μL/孔的量, 4 °C 包被过夜, 用 PBS 洗板 3 次后, 200 μL/孔加入 0.5% 脱脂乳粉 37 °C 封闭 1 h 后, 再用 PBST 洗板 3 次, 将纯化后单链抗体溶液(2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 μg/mL) 按照 100 μL/孔的量加入, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗板 4 次, 100 μL/孔加入 1:5000 稀释过的抗 His-tag-HRP 二抗, 37 °C 孵育 1 h, PBST 洗板 5 次, 按照 100 μL/孔的量加入新鲜配制的显色液, 37 °C 避光孵育 20 min 后加入 50 μL/孔的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) 终止反应, 于 450 nm 的波长下测吸光值。以转化空质粒的菌株超声波破碎后上清液作为阴性对照<sup>[9-10]</sup>。

按照上述方法制备分别制备 4 株克罗诺杆菌(ATCC29544、IQCC10459、ENS5329、ENS6309-4)、大肠杆菌(ATCC8739)、奇异变形杆菌(ATCC12453)、都柏林克洛诺斯氏菌(BJCIQ4061)的抗原。在 96 孔微板中, 将纯化得到的单链抗体溶液(2 μg/ml) 100 μL/孔的量其它按照上述 ELISA 的方法进行交叉反应测定, 每株菌做三个平行。

### 1.2.7 克罗诺杆菌 scFv 与其单克隆抗体竞争 ELISA 反应

在 96 孔微板上, 添加(1.5 mg/mL)100 μL/孔克罗诺杆菌菌体, 4 °C 包被抗原过夜, 无菌 PBS 洗板 3 次, 200 μL/孔加入 0.5% 脱脂乳粉 37 °C 封闭 1 h, 再用 PBST 洗板 3 次, 100 μL/孔(1: 10000)的克罗诺杆菌单克隆抗体, 然后在每孔中加入加入不同稀释度(1~5 μg/mL)的克罗诺杆菌 scFv, 以没添加克罗诺杆菌 scFv 作为阴性对照, 37 °C 孵育 1 h 后用 PBST 板 4 次后, 加入抗 His 的酶标单抗, 37 °C 孵育 30 min 后用 PBST 洗板 5 次, 按照 100 μL/孔的量加入新配制的显色液, 37 °C 避光孵育 20 min 后加入 50 μL 的 10% 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 于 450 nm 的波长下酶标仪测 OD 值, 抑制率按下面公式计算。

水处理, 在无 RNA 酶的电泳槽中进行 RNA 电泳检测, 如图 1 所示, 可观察到清晰的 28 S、18 S、5 S 三条带。通过电泳检测, 说明提取的总 RNA 无降解。

### 2.2 克罗诺杆菌抗体重链 VH 和轻链 VL 基因

#### 片段的扩增

将总 RNA 经过反转录获得第一链 cDNA, 以

cDNA 为模板分别扩增 VH 及 VL 基因片段, 扩增的 VH 和 VL 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收, 如图 2 所示, 结果显示扩增的 VH 基因片段大小为 350 bp 左右, 扩增的 VL 基因片段大小为 310 bp 左右, 条带较单一, 且重链片段长度略大于轻链片段, 符合文献报道。

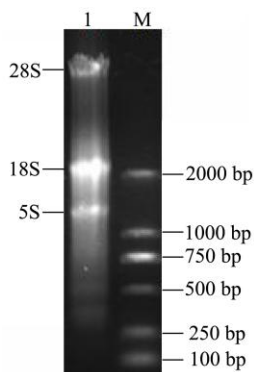


图 1 克罗诺杆菌杂交瘤细胞总 RNA

Fig.1 Total RNA from hybridoma secreting specific antibody against *Cronobacter*

注: M-Marker 2000; 1-克罗诺杆菌细胞总 RNA。

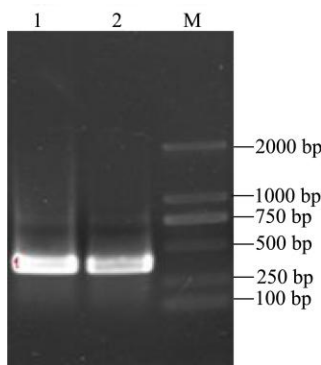


图 2 克罗诺杆菌抗体基因 VH 和 VL 片段的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of VH and VL

注: M-marker 2000; 1: 克罗诺杆菌抗体基因 VH 片段; 2- 克罗诺杆菌抗体基因 VL 片段。

### 2.3 克罗诺杆菌单抗细胞 scFv 片段的扩增

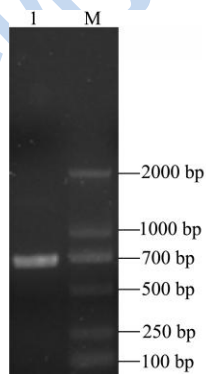


图 3 克罗诺杆菌 scFv 的扩增

Fig.3 PCR amplification of scFv gene

注: M-2000 marker; 1-克罗诺杆菌 scFv 基因。

经 PCR 扩增获得的 VH 和 VL 用胶回收试剂盒回收, 将轻链、重链片段与 linker 进行重叠延伸 PCR, 连接得到 scFv 片段, 结果如图 3 所示, scFv 片段大小约为 750 bp 且条带清晰, 与预期相符。胶回收目的片段, 用于后续重组质粒的构建。

### 2.4 重组质粒阳性克隆筛选、鉴定及测序

将胶回收的 scFv 进行 Xho I、EcoR I 限制性内切酶双酶切, 与同样双酶切的 pET-26b 载体连接, 再转化大肠杆菌 JM109, 筛选出的阳性克隆进行双酶切验证并测序, 阳性克隆双酶切验证结果 4 所示, 从结果可以看出有约 750 bp 单一条带被切下, 证明片段已成功插入质粒, 重组成功。阳性克隆测序结果如图 5 所示, 单链抗体蛋白共 239 个氨基酸。其中重链基因长 351 bp, 编码 117 个氨基酸; 轻链基因长 297 bp, 编码 99 个氨基酸。

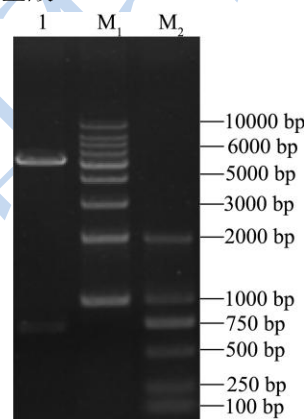


图 4 克罗诺杆菌质粒酶切验证

Fig.4 Enzyme-digested products of the *Cronobacter* monoclonal antibodies plasmid

注: M<sub>1</sub>-marker 1 KB; M<sub>2</sub>-marker 2000; 1-克罗诺杆菌 scFv 酶切片段。

scFv 氨基酸序列:

1	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly
16	Ala	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Leu	Thr
31	Gly	Tyr	Tyr	MET	His	Trp	Leu	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu
46	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Tyr
61	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Asp	Lys	Ser
76	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	MET	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp
91	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Asn	Phe	Asp	Tyr	Gly	Asp
106	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
121	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Tly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu
136	Leu	Tsr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys
151	Val	Tsr	MET	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr	Ile	His
166	Trp	Tyr	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr
181	Ala	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
196	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Arg	Val	Glu
211	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Trp	Ile	Ile	Asn
226	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	

图 5 克罗诺杆菌 scFv 的氨基酸序列

Fig.5 The amino acid sequence of *Cronobacter* scFv

### 2.5 scFv 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将阳性重组质粒转入表达菌大肠杆菌 BL21 中,

经 IPTG 诱导、融合表达产物经 His 蛋白纯化柱纯化后, SDS-PAGE 结果见图 6, 图中只有一条约为 30 kDa 的条带, 说明 ScFv 被成功纯化, 将用于后面的 ELISA 实验。

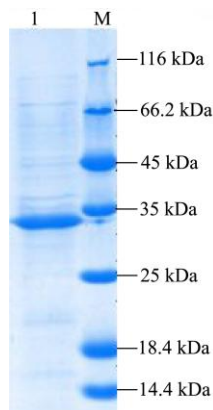


图 6 融合蛋白 scFv 的 SDS-PAGE 检测结果

Fig.6 SDS-PAGE analysis of scFv

注: M-makers 116 kDa; 1-纯化的scFv。

## 2.6 scFv 与克罗诺杆菌菌体结合的测定

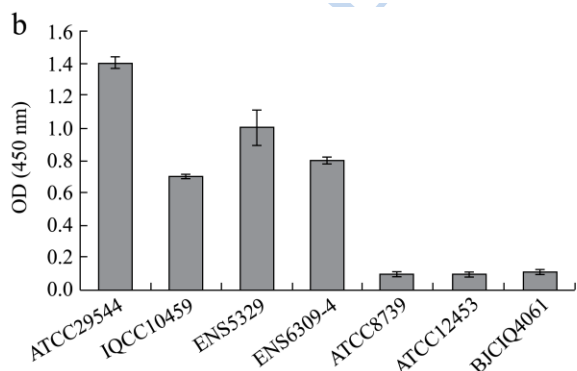
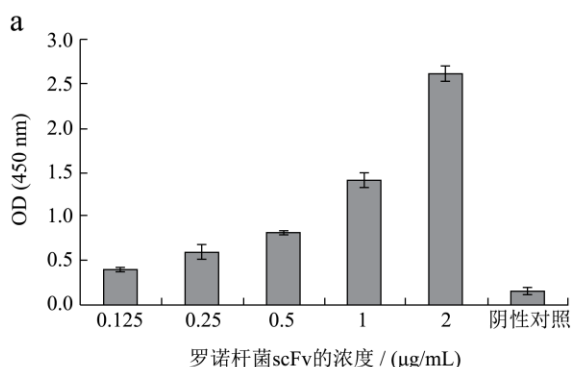


图 7 (a) 克罗诺杆菌 scFv 的 ELISA 反应结果; (b) 克罗诺杆菌 scFv 交叉反应结果

Fig.7 (a) ELISA results for scFv; (b) Cross reaction results for scFv

利用 ELISA 方法检测 scFv 与克罗诺杆菌之间的结合能力, 如图 7a 所示, 随着克罗诺杆菌 scFv 浓度的增加其相应 OD 值也随着增加。表明制备克罗诺杆菌 scFv 与能克罗诺杆菌发生特异性结合, 两者的结合

能力与克罗诺杆菌 scFv 浓度呈正相关。检测与其他四种克罗诺杆菌和属外的常见食源性治病菌的交叉反应结果如图 7b 所示, 此 scFv 还能与克罗诺杆菌 (IQCC10459、ENS5329、ENS6309-4) 结合, 但弱于克罗诺杆菌 (ATCC29544), 不与大肠杆菌 (ATCC8739)、奇异变形杆菌 (ATCC12453)、都柏林克洛诺斯氏菌 (BICIQ4061) 结合, 原因是前者属于克罗诺杆菌属, 能与克罗诺杆菌 scFv 发生交叉反应, 而后者与不属于克罗诺杆菌属, 不能发生交叉反应。

## 2.7 克罗诺杆菌 scFv 竞争 ELISA 的测定

为了测定克罗诺杆菌 scFv 与单克隆抗体与抗原之间的竞争性结合, 试验选择不同浓度克罗诺杆菌 scFv (1、2、3、4、5 µg/mL), 采用竞争 ELISA 来检测不同浓度的 scFv 抗体对单克隆抗体的竞争性结合, 从图 8 可以看出随着克罗诺杆菌 ScFv 浓度的增加, 其相应抑制率也增加大。抑制率与克罗诺杆菌 scFv 浓度呈正相关, 表明制备的克罗诺杆菌单链抗体能特异性结合克罗诺杆菌。

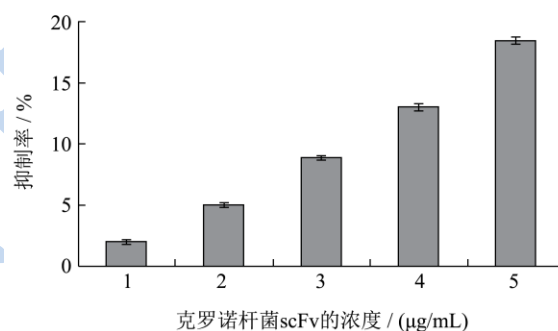


图 8 克洛诺杆菌 scFv 竞争 ELISA 测定

Fig.8 Determination of Cronobacter scFv by competitive ELISA

## 3 讨论

单克隆抗体的制备一般采用的是小鼠腹腔接种法, 将杂交瘤细胞注射到小鼠腹腔从而获得腹水, 或者将杂交瘤细胞在体外培养, 在培养液中分离出单克隆抗体。上述两种方法都费时费力, 且成本昂贵。单链抗体的制备由传统的细胞表达转变为细菌发酵, 易于大量生产, 并可用基因工程方法构建与其他效应分子连接的多功能抗体, 大大提高了生产效率<sup>[11]</sup>。

实验中采用的是 His 标签融合表达克罗诺杆菌单链抗体, 此技术提供了单链抗体纯化和检测的标签, 而且促进了其在 BL21 中的可溶性表达量。石凌超<sup>[12]</sup>等表达的单链抗体主要以包涵体的形式存在, 需要对其进行变性和复性步骤, 不仅造成产量减少, 而且在变性复性过程中改变单链抗体的空间结构, 复性后的

单链抗体的生物活性受到很大影响。我们使用融合表达技术,使制备的单链抗体的很大一部分处于水溶性上清液中,以可溶性蛋白形式存在,通过实验表明其生物活性号。如果进一步优化发酵条件,或连接上信号肽,可进一步增大产量,具有较好的应用价值。

#### 4 结论

本研究运用基因工程技术,成功构建了克罗诺杆菌表达载体 PET-26b-scFv,通过 IPTG 将其在大肠杆菌 BI21 中成功诱导表达,SDS-PAGE 电泳检测结果显,诱导表达的克罗诺杆菌 scFv 分子量大小约为 30 kDa,并主要以可溶性蛋白形式存在。ELISA 检测结果显示表达的克罗诺杆菌 scFv 与能克罗诺杆菌发生特异性结合,两者的结合能力与克罗诺杆菌 scFv 浓度呈正相关。

#### 参考文献

- [1] 陈雅衡,周帼萍.食品工业中克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)的污染与控制[J].中国酿造,2013,32(7):16-18
- [2] 周巍,张薇,刘亮,等.婴儿配方乳粉中阪崎克罗诺杆菌解旋酶恒温基因扩增检测方法的建立[J].食品科学,2014,35(4):155  
ZHOU Wei, LIU Liang, et al. Detection of cronobacter sakazakii in infant formula powder by helicase-dependent isothermal DNA amplification assay [J]. Food Science, 2014, 35(4): 155
- [3] 董晓晖,吴清平,莫树平,等.克罗诺杆菌检测方法研究进展[J].华中农业大学学报,2013,32(1):130-136
- [4] Bird R E, Hardman K D, Jacobson J W, et al. Single chain antigen-binding proteins [J]. Science, 1988, 242(4877): 423
- [5] 何扩,张秀媛,杨青,等.氧氟沙星单链抗体库的构建、筛选及蛋白结构模拟[J].现代食品科技,2014,30(3):108-113  
HE Kuo, ZHANG Xiu-yuan, YANG Qing. Construction, screening and protein structure simulation of phage ScFv library against ofloxacin [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(3): 108-113
- [6] Joosten V, Lokman C, Van Den Hondel C A, et al. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi [J]. Microbial Cell Factories, 2003, 2(1): 1
- [7] Sonoda H, Kumada Y, Katsuda T, et al. Functional expression of single-chain fv antibody in the cytoplasm of escherichia coli by thioredoxin fusion and co-expression of molecular chaperones [J]. Protein Expression and Purification, 2010, 70(2): 248-253
- [8] Jurado P, Ritz D, Beckwith J, et al. Production of functional single-chain fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia Coli [J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 320(1): 1-10
- [9] 王报贵,武晓丽,董素琴,等.抗肠炎沙门氏菌单链抗体制备及其特异性分析[J].中国生物工程杂志,2013,33(5):62-67  
WANG Gui-wu, WU Xiao-li, DONG Su-qing, et al. Preparation and specificity analysis of ScFv aganinst Salmonella Enteritidis [J].China Biotechnology, 2013, 33(5): 62-67
- [10] 杨柳,苏明权,马越云,等.免疫磁珠与荧光定量PCR联合检测乳制品中阪崎肠杆菌的实验研究[J].现代预防医学, 2011, 38(6):1086-1089  
YANG Liu, SU Ming-quan, MA Yue-yun, et al. Rapid detection of enterbacter sakazakii in dairy using immunomagnetic bead combined with real time fluoescence quantitative PCR [J]. Modern Preventive Medicine, 2011, 38(6): 1086-1089
- [11] Ward E S, Ggussow D, Ggriffths A D, et al. Binding of arepertoire of single immunoglobulin variable domains secreted form Schcerzchza Colz [J]. Natmre, 1989, 34(1): 544-546
- [12] 石凌超,韩红辉,唐喆伟,等.抗苏丹红单链Fab 抗体的构建,表达及功能鉴定.现代免疫学,2009, 4:274-278  
SHI Ling-chao, HAn Hong-hui, TANG Jie-wei, et al. Anti-sudan single chain antibody fab construction, expression and identification [J]. ModernImmunology, 2009, 4: 274-278