

抗有机磷农药单链抗体 cDNA 文库的构建与鉴定

罗义辉¹, 罗天培²

(1. 重庆科技学院 化学化工学院, 重庆 401331; 2. 重庆大学 城市建设与环境工程学院, 重庆 400045)

摘要: 为了获得针对不同有机磷农药的单链抗体, 以人工合成的 2 种有机磷农药(杀螟硫磷和毒死蜱)抗原免疫小鼠, 测定抗血清效价后, 提取小鼠脾细胞总 RNA, 设计引物, 通过 RT-PCR 扩增得到片段大小分别约为 400 bp 和 700 bp 的小鼠重链、轻链可变区基因, 再利用融合 PCR 连接重链、轻链可变区, 构建抗有机磷的单链抗体 cDNA 文库, 片段约为 1 100 bp。将构建的 cDNA 文库与 pMD18-T 载体连接并转化大肠杆菌 DH5 α , 测序分析表明, 所构建的文库片段互补决定区序列变化明显, 多样性好, 为进一步筛选抗有机磷的高特异性、高亲和力单链抗体奠定了基础。

关键词: 有机磷农药; 抗原; 单链抗体; cDNA 文库

中图分类号: S482.3⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)05-0097-05

Construction and Identification of cDNA Library of Single Chain Fragment against Organophosphorus Pesticides

LUO Yi-hui¹, LUO Tian-pei²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China; 2. Faculty of Urban Construction and Environmental Engineering, Chongqing University, Chongqing 400045, China)

Abstract: In order to obtain single chain variable fragment (ScFv) to different organophosphorus pesticides, mice were immunized with two artificial organophosphorus pesticide (fenitrothion and chlorpyrifos) antigens, and then the spleen of the mouse with the highest titer was isolated and RNA was extracted to construct the ScFv cDNA library. The size of amplified variable heavy chain (VH) was 400 bp and that of variable light chain (VL) was 700 bp. The VH and VL were ligated together with a linker by fusion PCR and the assembled ScFvs were about 1 100 bp. The ScFv cDNA was cloned into pMD18-T, and clones were selected randomly for sequencing. The result demonstrated that each complementarity-determining region (CDR) of ScFvs was different. It indicated that the constructed library possessed diversity and could be used to select ScFvs with high specificity and high affinity to organophosphorus pesticides.

Key words: organophosphorus pesticides; antigen; ScFv; cDNA library

有机磷农药能有效控制害虫、杂草及病菌生长, 提高农作物产量。但农药中有些物质在一定环境条件下能长时间保持其毒性, 若长时间摄取残留农药则会影响人类的健康^[1]。因而必须对农产品中的有机磷等农药残留进行严格检测。目前, 通常采用气相色谱、高效液相色谱等仪器分析法对残留在农产品中的有机磷农药进行分析检测。这些方法均要求对样品中的有机磷进行提取、富集、纯化等, 这些过

程不适合现场操作, 而且操作人员必须经过严格的专业训练才能完成。由于免疫分析技术灵敏快速, 在农药残留分析领域的应用逐渐受到重视。国际权威学术刊物将其列为近年来首位优先发展的新分析技术, 目前已被广泛应用于农残检测^[2-3]。

免疫分析的关键是获得高特异性和高亲和力的抗体, 单克隆抗体相对多克隆抗体(抗血清)具有特异性强、亲和力高、质地均一等特点, 因而在农残检

收稿日期: 2013-10-11

基金项目: 教育部博士点基金项目(20090191110031)

作者简介: 罗义辉(1966-), 男, 四川武胜人, 讲师, 博士, 主要从事有害化学品快速检测研究。E-mail: 383620115@qq.com

测中应用较多,但它由于必须使用复杂的杂交瘤技术而使其难以得到广泛应用。单链抗体(single chain variable fragment, ScFv)因为具有较小的分子量、低或无免疫原性、较强的组织穿透力、较低的生产成本等特点,已在医学领域得到广泛应用。目前也有关于有机磷 ScFv 的报道^[4],但只获得了 1 种有机磷的 ScFv,本研究通过复合免疫建立抗有机磷的 ScFv cDNA 文库,能够在接下来的核糖体展示技术中筛选到多种针对不同有机磷的 ScFv,为获得廉价而高效的抗体提供新思路。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

杀螟硫磷和毒死蜱购自国家标准物质中心;琼

脂糖 DNA 胶回收试剂盒购自博亚公司;牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司;M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、RNA 提取试剂盒、DNA 聚合酶、oligo(dT)引物购自 Promega 公司。

1.2 试验动物

BALB/c 小鼠购自第三军医大学。

1.3 试验方法

1.3.1 抗原合成 选择目前较常使用的有机磷农药杀螟硫磷和毒死蜱,分别与牛血清白蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA)偶联合成抗原。杀螟硫磷抗原的合成参考文献^[4],毒死蜱抗原的合成参考文献^[5],合成路线如图 1 所示。并将合成抗原、载体蛋白和半抗原(有机磷分子)进行紫外光谱鉴定。

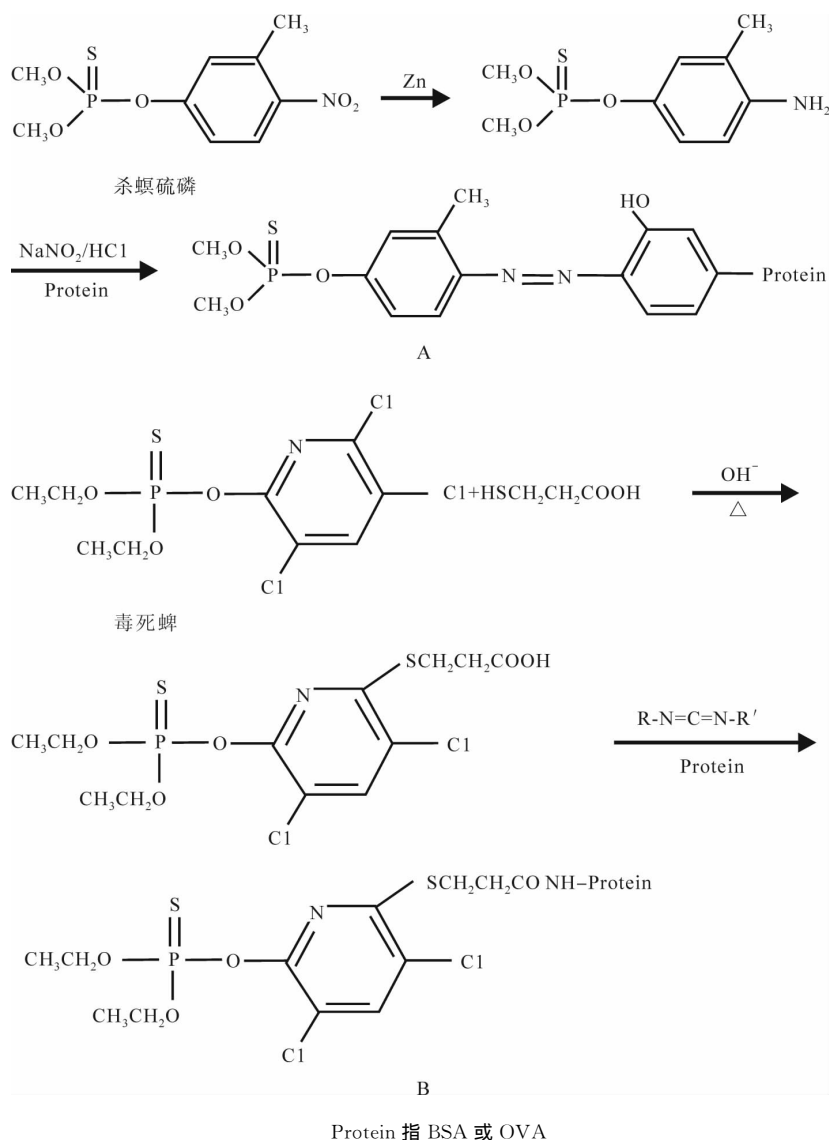


图 1 杀螟硫磷(A)和毒死蜱(B)抗原合成路线

1.3.2 免疫小鼠 选取 6 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠用于免疫。首次免疫时,每只小鼠用

含 60 μg 抗原(杀螟硫磷-BSA 和毒死蜱-BSA)的 100 μL PBS(磷酸盐缓冲液)和等体积的弗氏完全

佐剂混合物注射。1周后进行第2次免疫,用免疫抗原与弗氏不完全佐剂形成的混合物。一般需免疫3~5次,从第3次免疫起,每次免疫2~3d后,采用断尾取血法获得小鼠抗血清,并用间接酶联免疫法测其效价,若效价达2 000以上,则进行下一步试验,否则继续免疫。

1.3.3 总RNA的提取及cDNA第一链的合成

取抗血清效价最高的小鼠,处死后取脾脏,用RNA提取试剂盒提取RNA,以oligo(dT)为引物进行反转录获得其cDNA第一链,反应程序为:25℃ 10 min, 42℃ 60 min, 70℃ 15 min。反应产物保存于-20℃备用。

1.3.4 全套重链(VH)、轻链(VL)基因的扩增

设计4种引物,重链可变区上游引物为VH/back: 5'-GCAGCTAATACGACTCACTATAGGAACAGAC-CACCATGAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3',其中ATG为起始密码子,后面的序列(斜体)为简并引物;重链可变区下游引物为VH/for: 5'-CGATCCGC-CACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTC-CACCGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCC-3';轻链可变区上游引物为VL/back: 5'-GGTGGAG-GCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTG-GCGGATCGGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA-3';轻链可变区下游引物为VL/for: 5'-GCTCTAGAA-CACTCATTCCTGTTGGAGCT-3'。VL/back和VH/for的下划线部分均为连接肽片段,二者部分反向互补,以便在下面的连接反应完成后形成完整的连接肽。

将反转录产物分为2份(每份5 μL),分别加入轻链或重链可变区上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL, 10×缓冲液2.5 μL, DNA聚合酶0.2 μL, dNTPs至终浓度0.1 mmol/L,用去离子水补至25 μL。扩增程序为: 95℃ 预变性5 min; 然后进行30个循环: 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min; 最后72℃ 保温10 min。采用2%琼脂糖凝胶进行电泳并回收VH、VL扩增产物。

1.3.5 VH、VL的随机拼接及全套ScFv基因的扩增

将近等摩尔(约 1×10^{-12} mol)的VH、VL扩增产物混合,加dNTPs至终浓度0.1 mmol/L,加入2.5 μL 10×缓冲液和0.8 μL DNA聚合酶,用去离子水补至25 μL,进行随机拼接,反应条件: 94℃ 1 min, 63℃ 4 min, 8个循环。然后立即加入重链上游引物和轻链下游引物各1 μL,进行30个循环: 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min; 最后72℃ 保温10 min。采用2%琼脂糖凝胶进行电泳并回收ScFv连接产物。

1.3.6 单链抗体cDNA文库鉴定

将单链抗体cDNA文库与载体(pMD18-T)相连接,连接产物转入大肠杆菌DH5α,培养约12~16 h,随机挑取10个转化子,用VH上游引物和VL下游引物进行菌落PCR检测,将阳性转化子进行DNA测序。然后在线工具IMGT(international immunogenetics)和Kabat软件分析所测序列,对构建的cDNA文库进行分析鉴定。

2 结果与分析

2.1 抗原合成与鉴定结果

采用重氮化法合成了杀螟硫磷的免疫抗原(SA-BSA)和包被抗原(SA-OVA),用碳二亚胺法合成了毒死蜱的免疫抗原(AR-BSA)和包被抗原(AR-OVA),对紫外扫描图谱(图2)进行分析,新合成抗原的扫描曲线与BSA、OVA或小分子的半抗原均不相同,而且SA-BSA和SA-OVA在350 nm, AR-BSA和AR-OVA在320 nm处均有相同吸收峰,说明它们分别有相同的化学键形成。

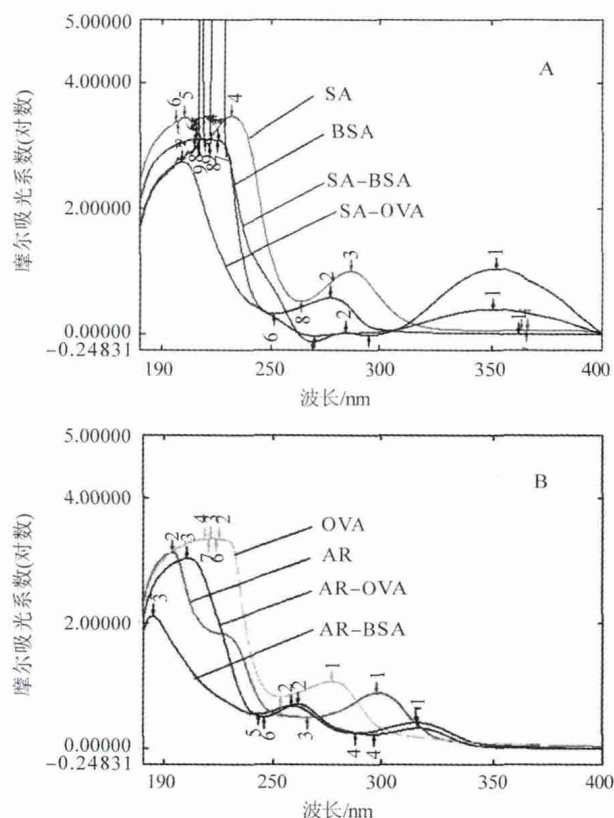
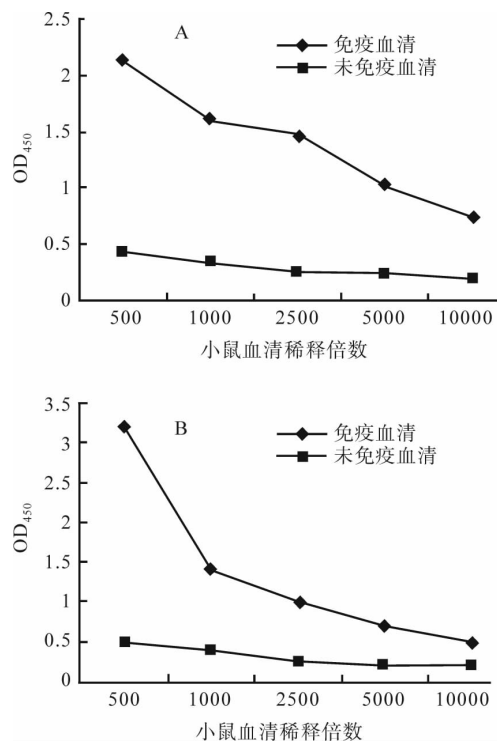


图2 杀螟硫磷(A)和毒死蜱(B)的半抗原、载体蛋白和抗原的紫外扫描图谱

2.2 抗血清效价测定结果

用免疫抗原(SA-BSA和AR-BSA)免疫小鼠3次后,通过间接酶联免疫法测定抗血清效价,包被抗原分别采用SA-OVA和AR-OVA。从图3可知,当抗血清稀释倍数为500~2 500时,抗血清与

OVA 和 AR-OVA 均有很强的结合;当稀释倍数为 2 500~5 000 时,抗血清与 SA-OVA 和 AR-OVA 的结合明显减弱;当稀释倍数为 5 000~10 000 时,抗血清的结合力与未免疫的血清非常接近。说明用 2 种免疫抗原(SA-BSA 和 AR-BSA)免疫小鼠后,小鼠体内对 2 种有机磷小分子均产生了抗体,效价大约是 2 500。



A. 包被抗原为 SA-OVA; B. 包被抗原为 AR-OVA

图 3 间接 ELISA 测定的免疫后小鼠抗血清效价

2.3 RNA 的提取与质量分析

抗血清效价最好的小鼠脾细胞总 RNA 被提取后,用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳测定其质量,分光光度计测得 OD_{260}/OD_{280} 为 1.95,且从电泳图谱上可以清晰地看到 28S、18S 和 5S 3 条带,并且 28S 的亮度大约是 18S 的 2 倍(图 4)。说明所得到的 RNA 质量较好,无蛋白污染,也无明显降解。

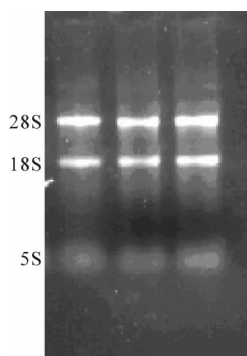
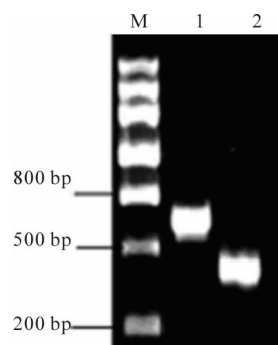


图 4 小鼠脾细胞总 RNA 电泳图谱

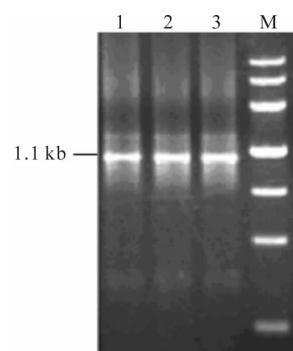
2.4 单链抗体 cDNA 文库的构建

以反转录所获得的 cDNA 为模板,以轻链、重链上下游保守序列为特异引物,扩增的轻链可变区文库大小约 700 bp,扩增的重链可变区文库大小约 400 bp(图 5),再通过融合 PCR 将这 2 个片段连接起来得到单链抗体的 cDNA 文库,大小为 1.1 kb(图 6)。通常 VH、VL 大小在 350 bp 左右,本试验为了将所构建的单链抗体 cDNA 文库用于下一步的核糖体展示筛选,在 VL 的 3'端引入了一段轻链的恒定区,因而其比只有可变区的片段长。



M, Marker; 1. VL; 2. VH

图 5 VL 与 VH 扩增结果

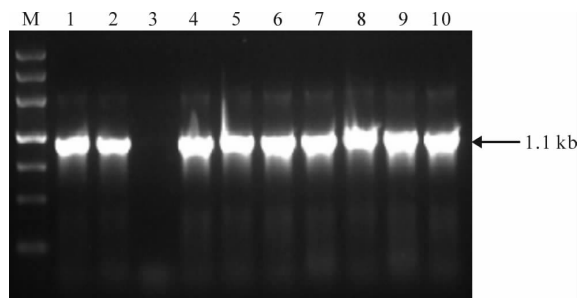


M, Marker; 1-3. 扩增产物

图 6 单链抗体 cDNA 文库片段扩增结果

2.5 单链抗体 cDNA 文库的鉴定

随机挑取 10 个克隆子,经菌落 PCR 验证,其中有 9 个呈阳性(图 7),再将这 9 个克隆子测序,对 DNA



M, Marker; 1-10. 扩增产物

图 7 转化子的 PCR 检测结果

序列进行分析发现:9 条单链抗体的 cDNA 序列均完整,且内部无终止密码子。

利用在线工具 IMGT 对 9 条 DNA 序列进行分析,结果表明:9 条 ScFv 序列的轻链分别属于 VKI、VKII 2 个亚基因家族,重链分别属于 VH4、VH2、VH1 3 个不同的基因家族。再用 Kabat 软件分析重链和轻链互补决定区(complementarity determining region,CDRs),结果显示:9 条序列的轻链 CDRs 氨基酸序列变化相对较少,而重链 CDRs 则有较大变化。尤其是重链 CDR3 的变化很大,每条序列的重链 CDR3 变化程度都非常高。由于重链 CDR3 在与抗原特异性结合方面具有重要作用,因此,重链 CDR3 的多样性意味着不同抗体特异性的多样性,说明构建的文库可用于特异性抗体的筛选。

3 讨论

有机磷农药的快速检测是目前人们研究的热点,免疫分析方法快速、简单、灵敏,适合大批量样本和现场的检测。自 20 世纪 80 年代初开始利用免疫化学技术进行化学农药残留分析以来,国内外已成功制备了多种农药的多克隆、单克隆抗体和重组抗体,并成功应用于这些农药的检测^[6-7]。然而,目前都是采用单个免疫原制备单克隆抗体,本研究通过建立抗有机磷的单链抗体 cDNA 文库,在下一步试验中便能筛选到高亲和力和高特异性的抗不同有机磷农药的单链抗体,为有机磷农

药的免疫分析提供廉价高效的抗体。

参考文献:

- [1] Ivrtitskii D M, Rishpon J. A potentiometric biosensor for pesticides based on the thiocholine hexacyanoferrate(Ⅲ) reaction[J]. *Biosens Bioelectron*, 1994, 9(8): 569-576.
- [2] Schenek F J, Wagner R, Hennessy M K, *et al.* Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in eggs using a solid-phase extraction cleanup and gas chromatographic detection[J]. *J AOAC Int*, 1994, 77(4): 1036-1040.
- [3] Gui W J, Liu Y H, Wang C M, *et al.* Development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for parathion residue in food samples[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 393(1): 88-94.
- [4] 郭剑平, 刘云霞, 高增林, 等. 对硫磷人工抗原合成及其鉴定[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(9): 1069-1071.
- [5] 朱国念, 吴刚, 吴慧明. 有机磷杀虫剂毒死蜱人工抗原的合成与鉴定[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(6): 657-662.
- [6] 吴芸茹, 王利民, 姜旻, 等. 复合免疫制备 3 种有机磷农药单克隆抗体的技术研究[J]. *南京农业大学学报*, 2009, 32(4): 94-99.
- [7] Luo Y H, Xia Y X. Selection of single-chain variable of fragment antibodies against fenitrothion[J]. *Analytical Biochemistry*, 2012, 421(1): 130-137.