

УДК 577.27

ИСКУССТВЕННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ КАРБАРИЛА, СОЗДАННЫЕ НА ОСНОВЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО ВАРИАБЕЛЬНОГО ФРАГМЕНТА (scFv): ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С АНТИГЕНОМ

© 2015 Женг Ксиюан^{1*}, Хуанг Жихонг¹, Венг Ликсиа¹,
Лиу Ксяюан²

¹ Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;
E-mail: zhangxiuyuan917@163.com

² Tianjin University, Tianjin 300457, China

Поступила в редакцию 20.11.14

После доработки 12.03.15

Карбарил – инсектицид (низкомолекулярное соединение), ингибирующий холинэстеразу насекомых. Присутствие остаточного количества карбарила в пище и окружающей среде наносит вред здоровью людей. Высокоспецифические scFv мини-антитела, с помощью которых можно было бы идентифицировать карбарил, пока не созданы. В представленной работе сконструировали ген, кодирующий антикарбарил scFv мини-антитела. Предварительно были клонированы гены *VL* и *VH*, кодирующие переменные районы молекул иммуноглобулинов, из генома гибридных клеток (гибридом) мышей, секретирующих моноклональные антитела против карбарила. Далее эти гены были объединены между собой ПЦР методом сплайсинга перекрывающимися расширениями (SOE (splicing by overlap extension)-ПЦР) последовательностью, кодирующей гибкий олигопептидный линкер (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃. Сконструированная после этого рекомбинантная плазмида (scFv-pET-26b) была экспрессирована в клетках *E. coli* BL21. Экспрессию рекомбинантного белка проверяли методом Ds-Na-ПААГ электрофореза и иммуоферментного анализа (ИФА). Построена компьютерная модель трехмерной структуры антикарбарил scFv мини-антитела, и путем молекулярного докинга была смоделирована структура комплекса карбарила с мини-антителом. При анализе модели установлено, что карбарил-связывающий участок образован следующими аминокислотными остатками: Ala51, Ser52, Ile51, Gly54, Ser56, Arg98 и Gly100. Дальнейшее изучение этой модели может помочь установлению механизма взаимодействия карбарила с его специфическими антителами. Кроме того, эта модель может служить целям *in vitro* повышения аффинности антител к карбарилу.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карбарил, антикарбарил scFv мини-антитела, ИФА, комплекс антиген–антитело.

Карбарил (C₁₂H₁₁ O₂N, 1-нафтил-N-метилкарбамат) (рис. 1) – это инсектицид карбаматной природы контактного и желудочного действия, оказывающий также системное воздействие на зерновые и древесные культуры. Подобно фосфорорганическим соединениям, карбарил обратимо ингибирует холинэстеразу насекомых [1]. У высших животных он вызывает появление типичных симптомов отравления: усиление слезотечения и слюноотделения, миоз, в тяжелых случаях судороги и смерть [2]. Остаточные количества карбарила в пище и окружающей среде могут представлять опасность для человека.

В течение последних лет большое внимание уделяется мониторингу карбарила в пище, поч-

ве и т.д. Законодательством Евросоюза (директива 396/2005) установлено требование к максимальному уровню остаточного карбарила в пищевых продуктах – 0,05 мг/кг [3]. Для специфического тестирования этого инсектицида требуется чувствительный метод с простой и быстрой процедурой определения. Существующие общепотребительные методы основаны на хроматографическом или спектрофотометрическом определении предварительно модифицированного карбарила путем ТСХ или ЖХВД [4]. Для выполнения анализа этими методами требуется длительная процедура подготовки образцов и наличие специализированного лабораторного оборудования. В настоящее время все большую популярность завоевывает метод иммуоферментного анализа (ИФА), позволяющий выполнять экспресс-тестирование большого количе-

* Адресат для корреспонденции.

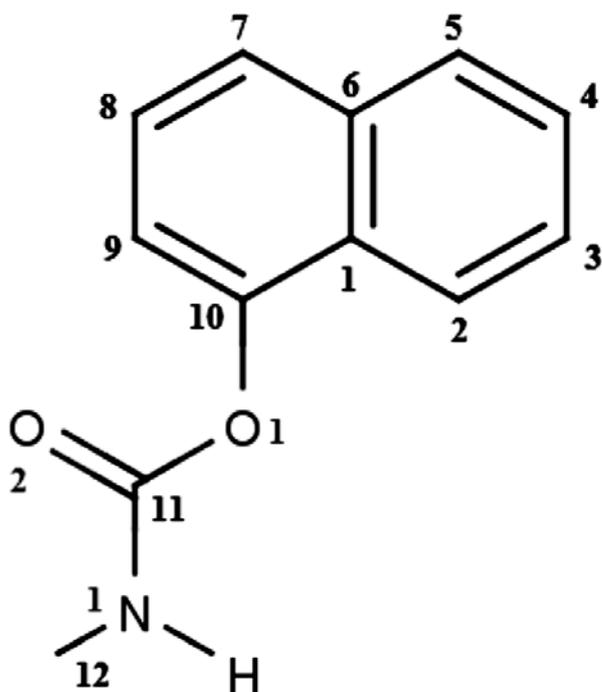


Рис. 1. Структурная формула молекулы карбарила

ства образцов с высокой чувствительностью и низким пределом обнаружения [5].

Мини-антитела на основе одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv) относятся к антителам третьего поколения. В последние годы появилась возможность получать scFv мини-антитела с использованием ДНК-гибридизационной технологии и продуцировать эти рекомбинантные белки в бактериальной культуре. Стоимость производства таких искусственных антител значительно ниже, чем стоимость поликлональных или моноклональных. Кроме того, scFv могут быть получены большими партиями и эффективно конъюгированы с маркерными молекулами для иммунологического тестирования [6]. В соответствии с этим, одной из целей нашей работы явилось конструирование высокоаффинного миниантитела scFv против карбарила и подтверждение его специфического детектирования.

Аффинность scFv мини-антител по отношению к низкомолекулярным антигенам обычно бывает более низкой, чем к макромолекулам. Изучение механизмов связывания scFv с антигенами могло бы помочь выяснить причины этого и увеличить аффинитет мини-антител. Сейчас механизм связывания антигена с антителом изучен мало, поэтому конструирование гаптенных для получения антител сопровождается массой проб и ошибок и представляет значи-

тельные трудности. Обычно связывание белка и лиганда изучается на основании данных о кристаллической структуре комплекса белок–лиганд и занимает много времени и сил. Поэтому другой целью нашего исследования явилось конструирование с помощью биоинформационных подходов виртуальной модели комплекса scFv мини-антитело–карбарил, изучение которой могло бы помочь в будущем увеличению аффинитета антител к карбарилу.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки, материалы и реактивы. Использовали плазмиды PGEM-T-Easy («Promega», США), pET-26b («Beijing Bao Covey food safety Biological Technology», Китай) и культуру *Escherichia coli* линии JM109 («TaKaRa Biotechnology», Китай). Олигонуклеотидные праймеры ([7] и табл. 1) синтезированы фирмой «Invitrogen» (США). Рестриктазы *EcoRI* и *XhoI* – фирмы «TaKaRa» (Китай), ДНК полимеразы Pfu ДНК и лигаза T4 – «TransGen Biotechnology» (Китай). Использовали набор для обратной транскрипции GoScript reverse transcription system фирмы «Promega» (США), наборы DNA gel extraction kit, RNeasy Midi kit, Oligotex mRNA Mini Kit и QIA quick PCR Purification Kit – фирмы «Qiagen» (США). Клон гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела против карбарила, был ранее получен в нашей лаборатории. Все химические реагенты были аналитической чистоты. ПЦР выполняли с помощью прибора DNA Engine thermal cycler, а анализ гелей и фотопленок проводили на системе Gel Doc XR (все «BioRad», США).

Экстракция РНК. Суммарную фракцию РНК экстрагировали из гибридных клеток-продуцентов моноклональных антител (из $\sim 10^6$ – 10^7 клеток) с использованием набора RNeasy Midi kit в соответствии с инструкцией производителя («Qiagen», США).

Клонирование генов VL и VH. Синтез кДНК из РНК осуществляли путем обратной транскрипции и ПЦР с использованием соответствующего набора реагентов для ОТ-ПЦР. Эта кДНК служила матрицей для амплификации генов последовательностей VL и VH, кодирующих варибельные районы обеих цепей Ig; ПЦР выполняли с использованием соответствующих прямых и обратных праймеров (VL-back, VL-forward и VH-back, VH-forward). Режим проведения ПЦР: начальная денатурация 95° 5 мин, затем 35 циклов при 95° по 1 мин, далее 53° в течение 1 мин и 72° по 1 мин, наконец, 72° в течение 10 мин. Продукты ПЦР были очищены электро-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные при клонировании и получении искусственного гена, кодирующего scFv

Название праймера	Олигонуклеотид
VH-Back	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
VH-For	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC
VK-Back	GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA
MJK1-FONX	CCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC
MJK2-FONX	CCGTTTTATTTCAGCTTGGTCCC
MJK4-FONX	CCGTTTTATTCCAACCTTGTCCC
MJK5-FONX	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC
VH-Back- <i>EcoRI</i>	TACTCAGAAATTCGCAGGTCCAACCTGCAGGAGTC
VL-For- <i>XhoI</i>	TACTACTCGAGCCGTTTTATTTCAGCTTGGT
Линкер	GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTG-GCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATTGAGTCTCACCCAGTCTCCA

Примечание. Подчеркнуты участки рестрикции *EcoRI* и *XhoI*; S, M, R и W – вырожденные основания, означающие (G, C), (A, C), (A, G) и (A, T) соответственно.

форезом в агарозном геле с использованием набора agarose gel DNA purification kit.

Конструирование гена *scFv* методом SOE (сплайсинг перекрывающимися расширениями)-ПЦР. Полученные (как описано выше) фрагменты ДНК, соответствующие генам *VH* и *VL*, были объединены путем SOE-ПЦР с целью создания искусственного гена *scFv*. Фрагмент *VL* был использован в качестве матрицы для амплификации последовательности, несущей ген *VL*, участок рестрикции *XhoI* и часть последовательности, кодирующей олигопептидный линкер; амплификацию проводили в отсутствие праймеров *VL-For-XhoI* и *VL-back-linker*. Фрагмент *VH* служил матрицей для амплификации последовательности, составленной геном *VH*, участком рестрикции *EcoRI* и другой частью последовательности олигопептидного линкера; амплификацию проводили в отсутствие праймеров *VH-Back-EcoRI* и *VH-forward-linker*. ПЦР выполняли в режиме, описанном выше. Полученные в результате амплификации последовательности были затем объединены путем SOE-ПЦР в единый ген *scFv*, в котором фрагменты *VH* и *VL* соединены между собой генной последовательностью, кодирующей полипептидный линкер (Gly₄-Ser)₃. SOE-ПЦР проводили в следующем режиме: начальная денатурация при 94° 5 мин, затем 10 циклов при 94° 45 с, 50° 1 мин, 72° 1 мин и, наконец, 72° 10 мин. После этого

амплифицировали ген *scFv*, несущий участки *EcoRI* и *XhoI*; амплификация была проведена с использованием праймеров *VL-For-XhoI* и *VH-Back-EcoRI* в соответствии с приведенным выше протоколом для ПЦР генов *VL* и *VH*. Продукты амплификации были очищены электрофорезом в агарозном геле с использованием набора для очистки ДНК (agarose gel DNA purification kit) [8, 9].

Конструирование рекомбинантной плазмиды pET-26b-scFv. Генная последовательность *scFv*, описанная выше, была расщеплена по соответствующим участкам рестриктазами *EcoRI* и *XhoI* и встроена в плазмиду pET-26b. Рекомбинантная плазида была трансфицирована в компетентные клетки *E. coli* JM109. Колонии трансформированных клеток были выявлены с помощью ПЦР. Рестрикционный анализ плазмид из позитивных колоний и генное секвенирование были выполнены фирмой «Genewiz Biological Technology» (Китай).

Экспрессия и характеристика рекомбинантного белка антикарбарил scFv. Рекомбинантные плазмиды из трансформированных клеток позитивных колоний экстрагировали и трансфицировали в компетентные клетки *E. coli* BL21. Клетки выращивали в 2^x среде YT в присутствии 100 мкг/мл ампициллина до достижения суспензией оптической плотности 0,8–1,0 при 600 нм. Продукцию рекомбинантного белка индуцировали 1 mM ИПТГ (изопропил βD-1-тиогалакто-

пиранозид) при 25°. Клетки инкубировали в течение ночи при 25° на шейкере (200 об/мин), а затем осаждали центрифугированием при 5000 g в течение 10 мин. Экстракцию антикарбарил scFv мини-антител из периплазматического пространства проводили путем разрушения клеток осмотическим шоком. Для этого клетки ресуспендировали в 1 мл ледяного буфера TES (0,2 М Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ сахараза), добавляли 1/5* буфер TES и после 30 мин инкубации центрифугировали при 12 000 об/мин 10 мин при 4°. Осадок и супернатант, содержащий растворимый рекомбинантный белок scFv мини-антитела, анализировали методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза.

Определение специфичности антикарбарил scFv мини-антител проводили методом непрямого конкурентного ИФА. Карбарилловый антиген (конъюгат карбарила с овальбумином) вносили в 96-луночные планшеты (1 мкг/мл, 100 мкл/в лунку) и инкубировали при 4° в течение ночи. Блокирование проводили 0,5%-ным обезжиренным молоком в буфере TES. Затем в лунки добавляли scFv мини-антитела и инкубировали 1 ч при 37°. В качестве конкурентного ингибитора использовали свободный карбарил; в качестве вторичных антител – конъюгаты козьих поликлональных анти(His)_n антител к His tag группе с пероксидазой в разведении 1 : 5000 в фосфатном солевом буфере (по 50 мкл/в лунку). В качестве субстрата добавляли ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) и после инкубации 20 мин при комнатной температуре определяли поглощение в лунках при 450 нм.

При последующей оценке специфичности scFv мини-антител использовали различные пестициды в качестве конкурирующих агентов и определяли показатель конкурентного ингибирования (CR) по следующей формуле:

$$CR, \% = \frac{IC_{50}(\text{карбарил})}{IC_{50}(\text{ингибитор})} \times 100\%,$$

где IC₅₀ – концентрация вещества, необходимая для 50%-ного ингибирования связывания scFv с конъюгатом карбарил–овальбумин.

Гомологическое моделирование. Используя программу SWISS–MODEL Workspace [10], мы подобрали подходящую матрицу для гомологического моделирования 3D-структуры белка scFv. На основе 3D-структуры этой матрицы с помощью программы Modeller 9 v. 2 [11] были созданы три различные виртуальные модели трехмерной структуры антикарбарил scFv мини-антитела. Эти модели были оптимизированы путем добавления в структуру молекулы вирту-

альных атомов водорода при pH 7,0, после чего использовали процедуру CHARMM all-atom минимизации энергии взаимодействия всех атомов без рассмотрения растворителя. Энергия системы была минимизирована за ~1000 последовательных шагов, пока ее градиент не снизился до величины 0,5 ккал/моль. При этом был использован самый быстрый из доступных в Discovery Studio способ понижения свободной энергии системы, позволяющий устранять какие-либо стерические затруднения с целью энергетической стабилизации исследуемых моделей. Для последующей минимизации была использована оценка модели по методу Рамачандрана в соответствии с вебсервером SAVES [12]; для дальнейшего исследования была выбрана модель с наилучшим показателем Рамачандрана [13].

Молекулярный докинг. Виртуальное совмещение антигена (карбарила) с полученной оптимизированной моделью молекулы мини-антитела (scFv) выполняли с помощью программного обеспечения Discovery Studio, являющегося одним из самых широко используемых биоинформатических инструментов, позволяющих быстро и автоматически осуществлять совмещение молекулярных структур. Структура карбарила была построена с использованием программы ChemDraw 3D. При этом из виртуальной молекулы scFv были удалены все молекулы воды и добавлены атомы водорода. Для осуществления докинга центр связывания антигена с антителом был определен как набор атомов в молекуле белка в области радиусом 6,5 Å вокруг места локализации ко-кристаллизуемого лиганда, для чего были использованы параметры по умолчанию из программного модуля Discovery Studio [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование рекомбинантной плазмиды pET-26b-scFv. Экстракцию общей фракции РНК из клона гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела против карбарила, проводили с использованием набора RNeasy Midi kit в соответствии с инструкцией производителя. Результаты анализа этой фракции методом электрофореза в агарозном геле представлены на рис. 2, А. Как следует из рисунка, полосы на геле, соответствующие 28-, 18- и 5-S РНК, были четкими и свидетельствовали о целостности полученного нами препарата рибонуклеиновой кислоты.

Аmplификация генов VH и VL. Фрагменты ДНК, соответствующие различным генам VH и

VL, были успешно амплифицированы путем гнездовой ПЦР с использованием праймеров для различных подгрупп этих генов. Размеры полученных фрагментов составляли около 340 п.о. для *VH* и около 320 п.о. для *VL* (рис. 2, В).

Конструирование scFv методом SOE. Фрагменты *VH* и *VL*, несущие перекрывающиеся последовательности линкера, были объединены между собой методом SOE-ПЦР. Методом электрофореза было установлено, что размеры гена *scFv* составляли около 750 п.о. (рис. 2, С), что соответствовало теоретически ожидаемой величине.

Отбор, идентификация и секвенирование ДНК позитивных клонов. Последовательность *scFv* и плазмидный вектор pET-26b были расщеплены рестриктазами *EcoRI* и *XhoI*, а продукты рестрикции были очищены с использованием набора для очистки (PCR product purification kit) и затем сшиты между собой с помощью ДНК лигазы T4. Продукты лигирования были трансфицированы в компетентные клетки *E. coli* линии JM109. Позитивные клоны трансформированных клеток были идентифицированы (рис. 2, D и E), ген *scFv* секвенирован и его выведенные из нуклеотидной структуры аминокислот

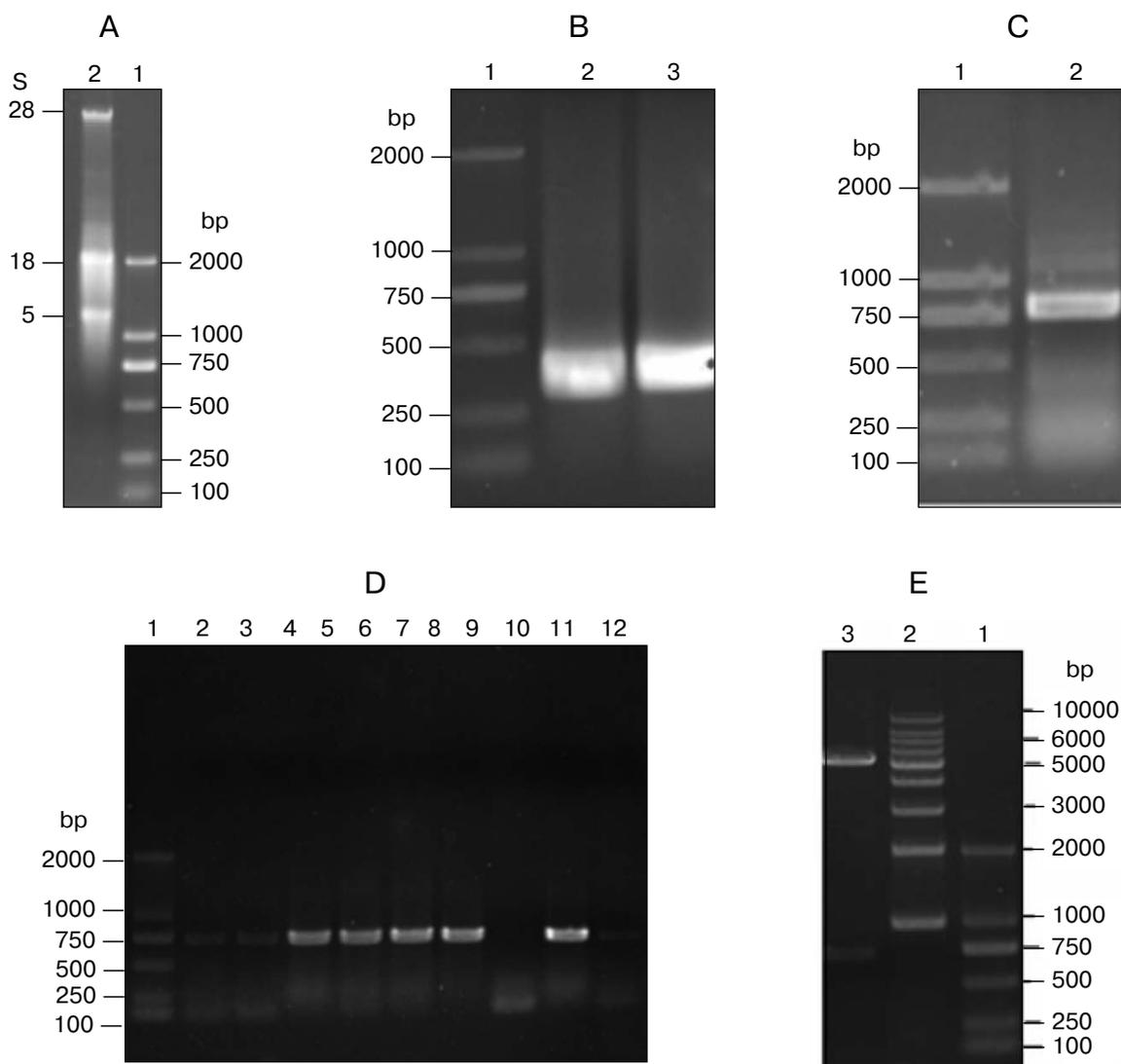


Рис. 2. Конструирование рекомбинантной плазмиды scFv-pET-26b. А – Общая фракция РНК из гибридных клеток-продуцентов антикарбариловых мини-антител (1); набор маркеров (2); В – амплификация генов *VH* (2) и *VL* (3); набор маркеров (1); С – амплификация гена *scFv* (2); набор маркеров (1); D – детектирование позитивных клонов, несущих плазмиду scFv-pET-26b, методом ПЦР (2–12); набор маркеров (1); E – двойное ферментативное подтверждение; п.о. – пар оснований

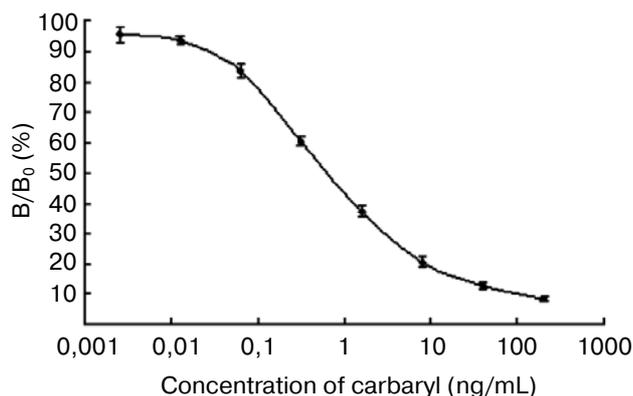


Рис. 5. Градуировочная кривая ингибирования связывания scFv мини-антитела с карбариловым антигеном под действием свободного карбарилла (метод непрямого конкурентного ИФА)

остальных протестированных соединений <0,1%. Все это свидетельствовало о высокой специфичности полученных нами синтетических scFv мини-антител к карбарилу.

Гомологическое моделирование. Трехмерная структура антикарбарил scFv мини-антител была построена методом гомологического моделирования с использованием в качестве матрицы кристаллической структуры антител к фенобарбиталу (PDB код: 1IGY). Полученные с помощью программы Modeller 9 v. 2 модели были оптимизированы и оценены; оптимальная модель белка scFv и соответствующая ей диаграмма Рамачандрана представлены на рис. 6. Белок scFv состоит из VH и VL доменов и соединяющего их линкера, что соответствует типичной структуре одноцепочечного антитела. В соответствии с расчетами с помощью программы PROCHECK, 89,7% аминокислотных остатков располагаются в предпочитаемых областях диаграммы и лишь 2,5% — в запрещенных областях. Вторичная структура scFv мини-антитела составлена 16 α -спиралями, 93 β -тяжами, 23 β -витками и 90 неупорядоченными спиралевидными структурами (анализ выполнен на вебсайте: <http://swissmodel.expasy.org/>).

Молекулярный докинг. Результаты центрирования молекулы карбарилла (лиганда) в карбарил-связывающем участке молекулы scFv мини-антитела (рецептора) представлены на рис. 7. Видно, что неполярная часть молекулы карбарилла как бы вдавлена внутрь гидрофобной полости активного центра антитела, втянута в него благодаря гидрофобным взаимодействиям. Лиганд-связывающий центр scFv мини-антитела сформирован, главным образом, следующими

аминокислотными остатками: Ser52, Ile51, Gly54, Ser56, Arg98, Gly100 и некоторыми другими. Arg98 и Gly100 принадлежат району VH-CDR2, Ile51, Gly54 и Ser56 — VH-CDR3, а Ala51 и Ser52 — району VL-CDR2 молекулы scFv. Нафтиловая часть молекулы карбарилла взаимодействовала с VH, причем левое бензольное кольцо было погружено в глубь белка и взаимодействовало с Arg98 и Gly100. (Остаток Arg98 содержит длинную боковую цепь со свободно вращающимися C—C- и C—N-связями. Конформационные изменения, вызванные этими вращениями, определяют сродство и специфичность scFv мини-антитела.) Правое бензольное кольцо также располагается в полости активного центра и взаимодействует с Ile51, Gly54 и Ser56. Метилкарбаматная часть карбарилла взаимодействовала с VL: атом N1 — с Ala51, C11 — с Ser52, C12 и O2 — расположены в стороне и за пределами полости активного центра.

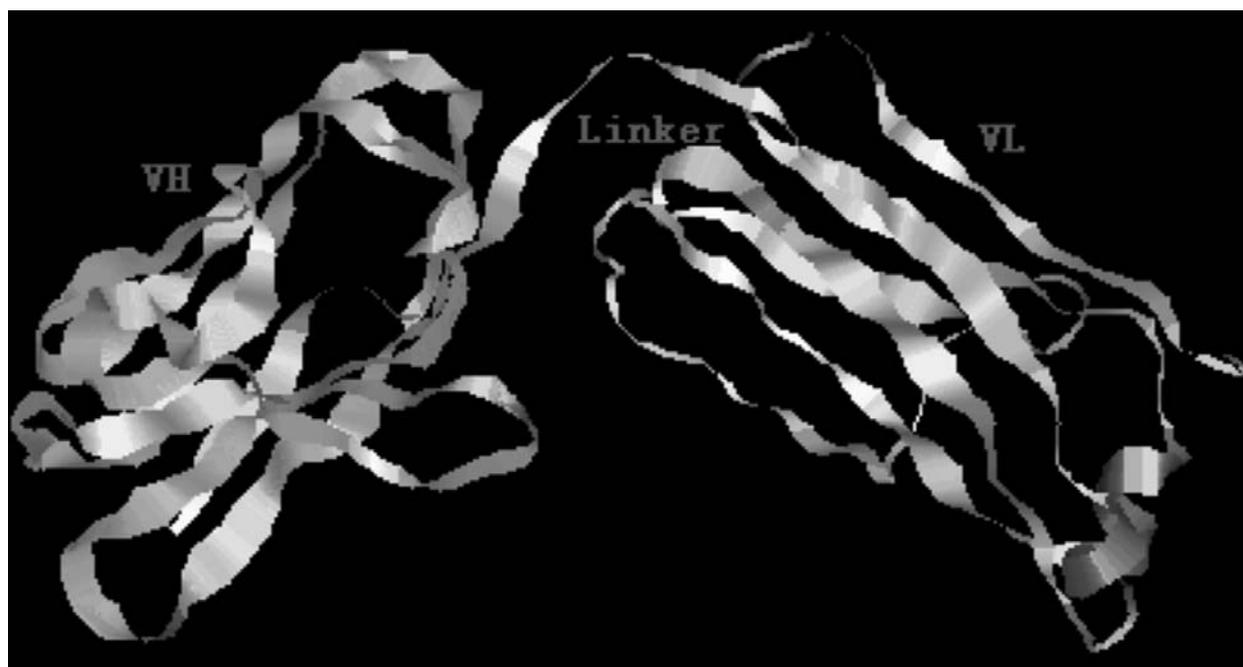
Гены варибельных цепей VH и VL иммуноглобулинов против карбарилла были клонированы и объединены в единый ген scFv посредством линкерной последовательности, кодирующей олигопептид (Gly₄-Ser)₃. Рекомбинантный гибридный белок (антикарбарил scFv мини-антитело) был экспрессирован в клетках *E. coli* линии BL21 путем индукции с помощью ИПТГ. Методом непрямого конкурентного ИФА было установлено, что полученные мини-антитела обладали высоким сродством и специфичностью к карбарилу и не давали перекрестных реакций с другими исследованными инсектицидами.

Поскольку кристаллическая структура антикарбарилловых антител не известна, то для компьютерного моделирования структуры молекулы scFv мини-антитела мы использовали в качестве

Таблица 2. Перекрестная реакция антикарбарил scFv с другими пестицидами (метод непрямого ИФА)

Соединение	IC ₅₀ , нг/мл	CR, %
Карбарил	0,73	100,00
1-Нафтил	125,27	0,58
Карбофуран	185,31	0,39
Метомил	>1000	<0,10
Альдикарб	>1000	<0,10
Изопрокарб	>1000	<0,10
Фосфат	>1000	<0,10
Пиретрин	>1000	<0,10

A



B

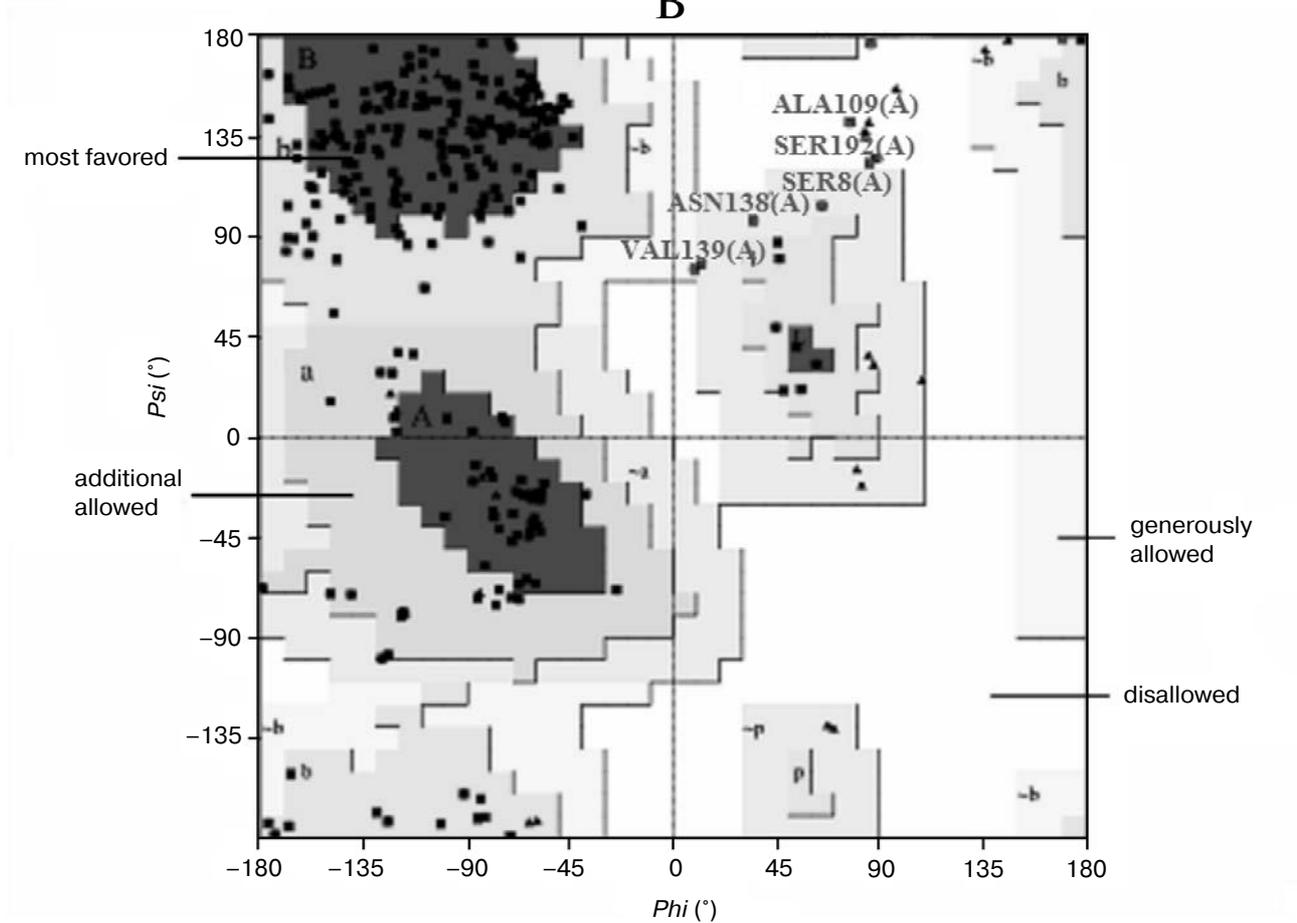


Рис. 6. 3D-модель структуры антикарбарил scFv мини-антитела (A) и карта Рамачандрана для этой модели (B)

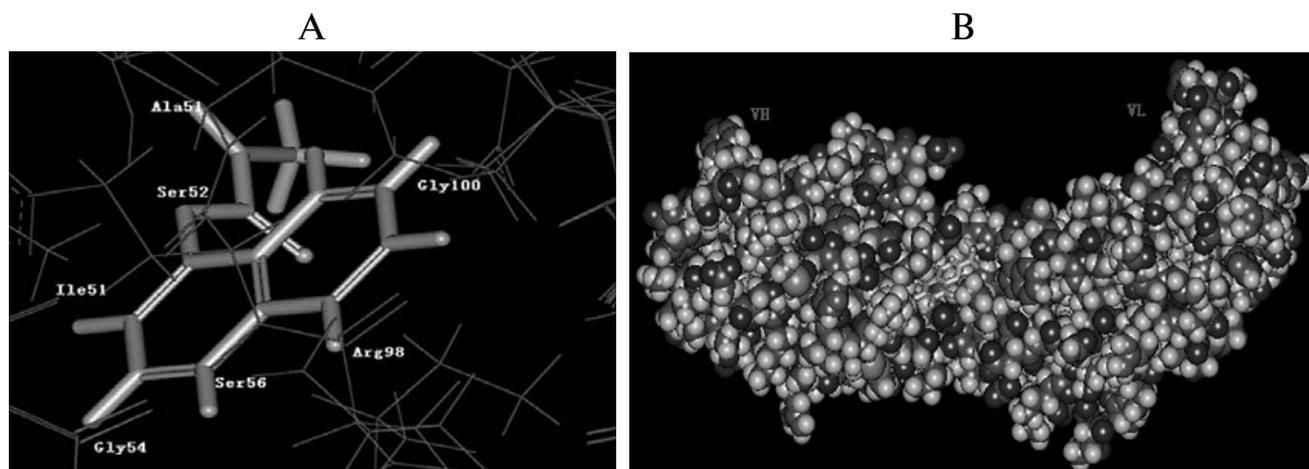


Рис. 7. А – 3D-структура карбарил-связывающего участка scFv мини-антитела. Аминокислотные остатки, образующие этот участок, обозначены толстыми палочками, карбарил – черными линиями, остатки карбарил-связывающего участка подписаны белыми буквами; В – общая структура комплекса карбарил-scFv мини-антитела. Молекула карбарила показана палочками (в центре), scFv – шары (от темно- до светло-серого цвета)

исходной матрицы кристаллическую структуру антител к фенобарбиталу (PDB ID:1IGY). Проведенное виртуальное центрирование карбарила в предполагаемом лиганд-связывающем участке молекулы scFv методом молекулярного докинга показало, что лиганд прочно связывается в гидрофобной щели, образованной остатками Ser52, Ile51, Gly54, Ser56, Arg98, Gly100 и некоторыми другими, расположенными в районах VH-CDR2, VH-CDR3 и VL-CDR2 молекулы scFv. Мы полагаем, что проведенная нами работа может быть полезна для дальнейшего экспериментального анализа механизмов взаимодействия карбарила

с антикарбарильными антителами с целью увеличения аффинности антител.

Эта работа была профинансирована Национальным фондом по естественным наукам Китая (грант 20905058) и Китайской научно-технологической программой Женгджякоу (грант 1311018С-3).

Авторы признательны Тянджинскому международному объединенному научно-исследовательскому институту фармацевтической биологии за возможность использования программного модуля Discovery Studio.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- O'Malley, M. (1997) Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings, *Lancet*, **349**, 1161–1166.
- Casida, J.E., and Augustinsson, K.B. (1959) Reaction of plasma albumin with 1-naphthyl N-methyl-carbamate and certain other esters, *Biochem. Biophys. Acta*, **36**, 411–426.
- Abad, A., Moreno, M.J., and Pelegri, R. (2001) Monoclonal enzyme immunoassay for the analysis of carbaryl in fruits and vegetables without sample cleanup, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1707–1712.
- Raminderjit, S.B., and Kousik, M. (2012) Direct estimation of carbaryl by gas liquid chromatography with nitrogen phosphorus detection, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **89**, 15–20.
- Jeanne, A.I., Eric, G.O., and James, R.F. (1993) Validation of a paramagnetic particle-based ELISA for the quantitative determination of carbaryl in Water, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **51**, 260–267.
- Frame, K.K., and Hu, W.S. (1990) The loss of antibody productivity in continuous culture of hybridoma cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 469–476.
- Wang, S.H., Zhang, J.B., and Zhang, Z.P. (2006) Construction of single chain variable fragment (ScFv) and bisScFv-alkaline phosphatase fusion protein for detection of *Bacillus anthracis*, *Anal. Chem.*, **78**, 997–1004.
- Dong, J.X., Li, Z.F., and Lei, H.T. (2012) Development of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of racotopamine in pork, *Anal. Chim. Acta*, **736**, 85–91.
- Xu, Z.L., Dong, J.X., and Wang, H. (2012) Production and characterization of a single-chain variable fragment linked alkaline phosphatase fusion protein for detection of o,o-diethyl organophosphorus pesticides in a one-step enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 5076–5083.
- Arnold, K., Bordoli, L., and Kopp, J. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling, *Bioinformatics*, **22**, 195–201.

11. Sali, A., and Blundell, T.L. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.*, **234**, 779–815.
12. NIH MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics SAVES (Structural Analysis and Verification Server) <http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES>.
13. Adeel, M., Ahmad, F., and Vivekanand, J. (2010) Modeling the three-dimensional structures of an unbound single-chain variable fragment (scFv) and its hypothetical complex with a *Corynespora cassicola* toxin, cassicolin, *J. Mol. Model.*, **16**, 1883–1893.
14. Tu, Z., Xu, Y., and Fu, J.H. (2011) Sequence analysis, 3D modeling and molecular docking of anti-deoxyvalenol single-domain heavy chain antibody, *Jiangsu J. Agricult. Sci.*, **27**, 893–898.
15. Sun, J.W., Dong, T.T., Zhang, Y., and Wang, S. (2010) Development of enzyme linked immunoassay for the simultaneous detection of carbaryl and metolcarb in different agricultural products, *Anal. Chim. Acta*, **666**, 76–82.
16. Abad, A., and Montoya, A. (1995) Application of a monoclonal antibody-based ELISA to the determination of carbaryl in apple and grape juices, *Anal. Biochem.*, **311**, 365–370.

CONSTRUCTION OF A SINGLE CHAIN VARIABLE FRAGMENT ANTIBODY (scFv) AGAINST CARBARYL AND ITS INTERACTION WITH CARBARYL

Zhang Xiuyuan^{1*}, Huang Zhihong¹, Wang Lixia¹,
Liu Xiaonan²

¹ Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;
E-mail: zhangxiuyuan917@163.com

² Tianjin University, Tianjin 300457, China

Received November 20, 2014
Revision received March 12, 2015

Carbaryl is a low molecular weight insecticide that inhibits cholinesterase. The residues of carbaryl in food and the environment have damaged human health. A high specificity scFv that can identify carbaryl is still lacking. In the present study, the anti-carbaryl scFv gene was prepared by cloning VL and VH genes from hybridoma cells secreting monoclonal antibody, then VH and VL were fused by splice overlap extension (SOE) PCR with flexible polypeptide linker connector (Gly₄Ser)₃, and then the scFv-pET-26b recombinant plasmid was constructed and transformed into *E. coli* BL21 for expression using IPTG as the inducer. The expressed recombinant protein was identified by SDS-PAGE and ELISA. The three-dimensional structure of the anti-carbaryl scFv was constructed by computer modeling, and carbaryl was docked to the scFv model to obtain the structure of the binding complex. The binding site was composed of Ala51, Ser52, Ile51, Gly54, Ser56, Arg98, and Gly100. This helps to understand the mechanism of interaction between anti-carbaryl antibody and antigen. Furthermore, it provides guidance for *in vitro* affinity maturation of anti-carbaryl antibody.

Key words: anti-carbaryl scFv, ELISA, construction, binding complex