

抗 A 型肉毒毒素人源三结构域抗体的重组设计与表达

王 慧 荫 俊 史 晶 孟 露 露 李 佩 真

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘 要:以获得的抗 A 型肉毒毒素人源单链抗体 ScFv B17 为模板,PCR 扩增抗体 ScFv 基因的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),以重链恒定区(KCH1)5'端 12 个氨基酸的序列作为连接肽,构建成三结构域抗体分子:VH-连接肽-VL(VH/VL)。重组 VH/VL 抗体分子在大肠杆菌中得到高效表达,其表达量占菌体总蛋白质的 34% 以上。表达的蛋白质在菌体内形成包含体,采用镍柱金属螯合层析法对该包含体进行纯化,得到了纯度高达 95% 的 VH/VL。ELISA 等实验结果显示,重组设计并制备的三结构域抗体蛋白 VH/VL 不但可以特异识别毒素抗原,具有与原母本单链抗体 ScFv 相同的抗原特异性,而且具有了更高的相对亲和力和稳定性。

关键词:A 型肉毒毒素,三结构域抗体,表达,中和活性

中图分类号:Q786;R392.11 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)02-0223-03

Damian 的研究结果认为,单链抗体中连接肽序列的长短和电荷严重影响抗体的特性。使用不同的 Linkers 序列连接抗体可变区构建而成的单链抗体,其功能性抗体蛋白的重组产量会不同^[1]。不同 Linkers 序列组装成的单链抗体具有不同的可溶分泌表达能力(可以相差 5 倍以上),并具有不同的特异抗原结合能力。优化的 Linker 序列可以提高在尿素中的复性单链抗体的稳定性,增加蛋白的可溶性,帮助抗体可变区进行正确折叠。ScFv B17 是我们利用噬菌体表面展示抗体文库技术^[2-4]筛选获得的一株对 A 型肉毒毒素特异的人源单链抗体,其在肉毒中毒被动免疫治疗应用方面具有一定应用前景。本文在母本抗体分子 ScFv 的基础上,以人重链 CH1 的 5'序列 12 个氨基酸,替换母本 ScFv 中的通用连接肽(SerGly₄),与重链可变区和轻链可变区重新组装成新型三结构域抗体,进行重组制备,观察其抗原结合活性,并在抗体分子的相对亲和力和稳定性方面与母本 ScFv 进行比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 载体和菌株:pGEM-ScFv B17 为已构建的重组质粒、人源重组 ScFv 抗体实验室制备(另文发表),大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、BL21(DE3)为本室保存,表达载体 pET22b 为 Novagen 产品。

1.1.2 试剂:过氧化物酶(HRP)标记的抗 His-Tag 抗体购自 Pierce 公司。限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。Ni-NTA 为 Pharmacia 产品。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 三结构域抗体设计和重组表达质粒构建

以重组质粒 pGEM-ScFv 作模板,扩增重链可变区(VH)轻链可变区(VL),并合成 CH1 区的前 36 个核苷酸(连接肽基因)。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 25 个循环。分别回收扩增片段。以基因融合方式获得 VH/VL 基因。Nco I 和 Not I 酶切 VH/VL 基因,与经同样双酶切的 pET22b 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,PCR 和酶切鉴定重组子,即 pET-VH/VL 表达质粒。

1.3 三结构域抗体在大肠杆菌中的表达

重组表达质粒 pET-VH/VL 及空载体 pET22b 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3),在 LB-Amp 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5,然后加 0.5mmol/L IPTG 诱导表达 4h,SDS-PAGE 分析 VH/VL 的表达。对比空载体和重组质粒转化子的蛋白条带,观察有无外源基因表达。

1.4 包含体的制备和亲和层析纯化

提取重组蛋白的包含体,将尿素溶解的包涵体溶液逐滴滴入复性液(50mmol/L Tris-HCl pH7.2, 10mmol/L CysH, 1.5mmol/L Cys, 2mmol/L EDTA, Cys 微溶于水,用前滤去未溶的 Cys)中,至终浓度约

基金项目:国家 973 项目(2002CB513205)

作者简介:王 慧(1971-),女(满),北京人,助理研究员,博士,从事分子微生物学和免疫学研究。Tel:86-10-66948532;E-mail:igeno0109@vip.sina.com

收稿日期:2004-08-06,修回日期:2004-09-30

50 μ g/mL, 4 $^{\circ}$ C 静置 48h 以上。然后用 0.01mmol/L PBS pH7.2 对样品进行透析。复性蛋白以 Ni-NTA 柱为介质进行含 6His 标签特异蛋白的亲和层析纯化, 收集蛋白进行定量和 SDS-PAGE 分析。

1.5 ELISA 检测 VH/V κ 的抗原结合活性

以肉毒类毒素包被 96 孔, 以 HRP 标记的抗 His-Tag 抗体直接检测梯度稀释 VH/V κ 蛋白的抗原结合活性, 酶标仪上读取 A_{450} 结果绘图表示。

1.6 VH/V κ 与抗体 ScFv 相对亲和力的比较

在抗原抗体结合过程中, 加入不同浓度 NH_4SCN 溶液, 以 A_{450} 下降 50% 时相应的 NH_4SCN 浓度作为相对亲和力的指数, 比较抗体分子 VH/V κ 和单链抗体 ScFv 针对肉毒毒素抗原相对亲和力的大小。

1.7 VH/V κ 与母本抗体 ScFv 稳定性的比较

比较不同结构 2 种重组抗体分子在 37 $^{\circ}$ C PBS 缓冲液 pH7.2 和 37 $^{\circ}$ C 血清条件下保持抗体结合活性的时间, 对变性剂尿素的稳定性, 及 3h 热稳定性。

2 结果

2.1 三结构域抗体 VH/V κ 的设计

依据原 CH1 5' 端基因序列, 合成连接肽序列, 其对应氨基酸序列为 AKTTAPSVYPLA, 置换原母本单链抗体中的通用连接肽 (SerGly₄)₃, 构建三结构域抗体 VH/V κ , 原母本单链抗体核苷酸序列已登录 GenBank (Accession No. AY816193)。PCR 扩增后, 胶上可见分子量约 300 ~ 500bp 的 VH 和 V κ , 然后将 VH 和 V κ 用新连接肽连接, 插入高效表达载体 pET22b。

VH/V κ 共 247 个氨基酸, 其中 VH 共 123 个氨基酸 (1 ~ 123), V κ 长 112 个氨基酸 (136 ~ 247), 连接肽 12 个氨基酸 (124 ~ 135)。ProtParam tool 软件分析结果显示, VH/V κ 可编码分子量 26722.7Da 的蛋白, 理论等电点 pI 5.15, 蛋白不稳定系数 II 38.19, 蛋白质稳定。

2.2 重组表达质粒 pET-VH/V κ 的构建及 VH/V κ 的重组表达

构建的重组质粒 pET-VH/V κ 经 PCR 可以扩增出约 750bp 的特异产物, *Nco* I 和 *Not* I 酶切鉴定, 可以获得同样大小的 VH/V κ 基因片段以及大的载体片段, 表明重组表达质粒 pET-VH/V κ 构建成功。重组 pET-VH/V κ 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 随机挑取单菌落进行 IPTG 诱导表达 4h, 经 SDS-PAGE 分析, 各重组子在大约 27kD 处有一空载体 pET22b 转

化子所没有的条带 (图 1); 这与预测的 VH/V κ 分子量相同。目标表达蛋白占菌体蛋白的 34% 以上。重组蛋白定位分析结果显示, VH/V κ 以包含体形式存在, 超声破碎后, 经洗涤, 获得的包含体纯度达 60% ~ 70%。

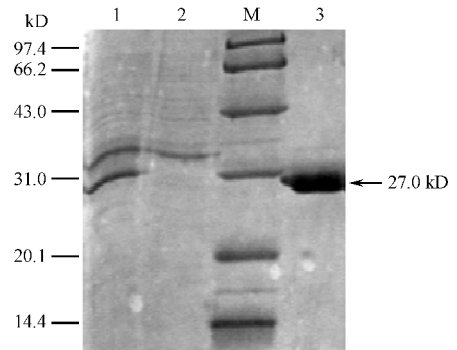


图 1 SDS-PAGE 检测 VH/V κ 的表达和纯化

Fig. 1 Analysis of expressed and purified VH/V κ by SDS-PAGE

1. Induced pET-VH/V κ /BL21 total protein; 2. Induced pET22b/BL21 total protein; M. Relative molecular weight marker; 3. Purified VH/V κ .

2.3 重组蛋白 VH/V κ 的复性与金属离子亲和层析纯化

采用稀释法复性 VH/V κ 变性蛋白, 复性后可溶蛋白质回收率约 60%。应用 Ni-NTA 柱纯化的重组蛋白纯度高达 95% (图 1), Bradford 法定量测定蛋白^[5]。

2.4 重组蛋白 VH/V κ 的抗原结合活性

用 ELISA 检测重组 VH/V κ 是否可与抗原结合。图 2 显示不同浓度 VH/V κ 复性蛋白质与抗原的结合曲线。随 VH/V κ 浓度升高, 曲线接近平台, 它与毒素抗原的结合渐趋饱和。

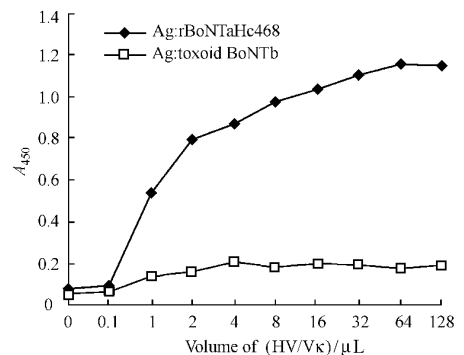


图 2 重组 VH/V κ 与 A 型肉毒类毒素的结合曲线

Fig. 2 Binding curve of recombinant VH/V κ and BoNTa toxoid

2.5 VH/V κ 与 ScFv 的相对亲和力比较

结果显示, 对于 VH/V κ 复性蛋白质, 当 OD 值下降为不加硫氰酸氨时的 50% 时, 相应的硫氰酸氨浓度是 1.4, 即 VH/V κ 的相对亲和力指数是 1.4。而对于

ScFv 相应的硫氰酸氨浓度是 1.0,其相对亲和力指数是 1.0。说明大肠杆菌表达的重组三结构域抗体对肉毒毒素抗原的亲和力高于原母本单链抗体。

2.6 ScFv-Fc 与母本抗体 ScFv 稳定性的比较

表 1 中列出了 ScFv 及 VH/V_K 的相对稳定性,包括生理半衰期、抗变性能力和热稳定性等数据。结果显示,比较 ScFv, VH/V_K 的生理稳定性和热稳定性都有提高。

表 1 重组 VH/V_K 及其母本 ScFv 的稳定性

Table 1 Stability of recombinant VH/V_K and its parent ScFv

Antibodies	PBS(at 37°C)	Serum(at 37°C)	Urea *	Temperature (for 3h)**
ScFv	1 ~ 3h	1.5 ~ 3h	1mol/L	25 ~ 37°C
VH/V _K	5h	3 ~ 5h	1mol/L	40°C

* Stability of antibody molecules against denaturing agent ; ** Temperature at which antibody molecules remain their binding activity for 3 hours.

3 讨论

目前最常见的连接肽是(SerGly₄)^[6],母本 ScFv 中的连接肽就是这种。设计优化的 Linker 序列考虑的基本因素:一是要有一定的长度保证其柔性,又要有一定的刚性维持抗体结构;二是要低免疫原性,无毒性。因此本实验设计中采用的连接肽来自人免疫球蛋白重链 CH1 的 5' 序列,共有 12 个氨基酸,由此连接肽构成的 VH/V_K 的理论和实际生物稳定性得到了提高,从 VH/V_K 的蛋白参数分析中可以看到, VH/V_K 的不稳定系数为 38.19,为稳定蛋白,而母本 ScFv 为不稳定蛋白质。VH/V_K 的重组表达水平(> 34%)亦高于母本 ScFv(另文发表),均为包涵体形

式。有文献报道, *E. coli* 分泌表达的抗孕酮 VH/V_K 可在细胞周质腔中通过二硫键形成(VH/V_K)双体结构。本实验在重组表达和复性纯化过程中未检测到双体结构,推测大肠杆菌分泌表达的 VH/V_K 在细胞周质腔中相对浓度较高,有利于分子间相互作用形成双体,而体外复性时,蛋白质浓度相对较低,不利于分子间二硫键的形成。

实验结果表明重组蛋白 VH/V_K 不但可以特异识别毒素抗原,具有与原母本单链抗体 ScFv 相同的抗原特异性,而且具有了更高的相对亲和力和稳定性。说明新的连接肽不但不影响原抗体的抗原结合能力,而且使抗原抗体的结合更稳定,连接肽的设计与使用是成功的。该连接肽有可能作为独立的“组件”,用于构建其它单链抗体。

参 考 文 献

- [1] Damian J T, Mary A R, Andrew J T G. Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments: optimization of peptide sequence using phage display technology. *J Immunol Methods*, 1997, 205: 43 - 54.
- [2] Winter G, Griffith A D, Hawkins R E, et al. Making antibodies by phage display technology. *Immunology*, 1994, 112(2): 433 - 455.
- [3] Marks J D, Hoogenboom H R, Bonnett T P, et al. By-passing immunization human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*, 1991, 222(5): 581 - 597.
- [4] Vaughan T, Osbourn J K, Tempest P. Human antibodies by design. *Nat Biotech*, 1998, 16(6): 535 - 539.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛编著. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1996, 138 - 140.
- [6] Huston J S, Levinson D, Mudgett H M, et al. Protein engineering of antibody binding site: recovery of specific activity in an antidigoxin single-chain Fv analogue produced by *E. coli*. *Prot Natl Acad USA*, 1988, 85: 5879 - 5883.

Recombinant design and expression of human three-domain antibody against BoNTa

WANG Hui* YIN Jun SHI Jing MENG Lu-lu LI Pei-zhen

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: VH and V_K genes were amplified from human ScFv B17 specific against botulinum neurotoxin serotype A (BoNTa). Gene sequence encoding 5'-terminal 12 amino acid of heavy chain constant region CH1, as a linker, linked VH and V_K to construct a new three-domain antibody molecule VH/V_K. VH/V_K was expressed at high level over 34% of total host cell proteins in *E. coli*. Recombinant protein were purified up to 95% by affinity column. As a result, recombinant VH/V_K could recognize and bind specific to BoNTa in ELISA. However, comparing with its parent ScFv, VH/V_K has higher relative affinity and stability.

Key words: Botulinum neurotoxin serotype A, Three-domain antibody, Expression, Affinity and stability