

人源抗狂犬病毒单链二硫键稳定抗体的重组设计与表达

蔡 昆, 王 慧*, 包士中, 史 晶, 侯晓军

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘 要: 以人源抗狂犬病毒糖蛋白母本单链抗体 ScFv 为模板, 利用 PCR 点突变分别在重链 FR 可变区 VH(44) 和轻链 FR 可变区 VI(100) 分别引入一个半胱氨酸, 成功构建了重组单链二硫键稳定抗体基因。连接 pET22b(+) 载体, 转化入 *E. coli* BL21(DE3) 得到工程菌, IPTG 诱导表达。体外复性并经 Ni-NTA 亲和层析对目的蛋白 ScdsFv 进行纯化, 利用荧光抗体实验和 ELISA 检测抗体活性及稳定性。结果表明重组 ScdsFv 蛋白实现了原核高效表达, 通过体外复性和 Ni-NTA 柱纯化获得纯度大于 90% 的 ScdsFv 蛋白。荧光抗体实验和 ELISA 结果表明 ScdsFv 具有特异的抗原结合活性, 与母本 ScFv 比较, 稳定性有明显提高。这种具有特异抗原结合活性的稳定 ScdsFv 蛋白的获得为其进一步的功能研究提供了材料。

关键词: 狂犬病毒; 单链二硫键稳定抗体; 表达

中图分类号: Q936; R373.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0673-04

众所周知, 狂犬病一旦出现症状几乎是百分之百死亡^[1], 因此唯一的预防措施就是在被疯动物致伤前或致伤后注射狂犬疫苗。由于狂犬病发病目前还无法医治, 所以研究狂犬病的预防制品是非常必要的。本室已经成功表达了抗狂犬病毒单链抗体 ScFv^[2]。但是有在血液中不稳定的缺点^[3]。因此, 需要对其进行结构改造以提高其稳定性。本文在母本抗体分子 ScFv 的基础上, 利用 PCR 点突变分别在重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的框架区(FR)各引入一个半胱氨酸, 以 15 个氨基酸的(SerGly4)₃ 作为连接肽, 构建单链二硫键稳定抗体基因^[4-6]。在大肠杆菌中表达、纯化、体外复性并检测其特异抗原结合活性及稳定性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、毒株和载体: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 购自天根生化公司; 狂犬病毒 CVS 株由军事医学科学院夏咸柱院士惠赠, 表达载体 pET22b(+) 为本室保存。

1.1.2 试剂: 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自天根; *Nde* I、*Not* I 购自 NEB 公司; pMD18-T vector、限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; Ni-NTA 为 Pharmacia 产品, 过氧化物酶(HRP)标记抗

His 抗体购自 Pierce 公司, 荧光标记抗狂犬病毒核衣壳抗体购自吉泰公司; Evans Blue 购自 Sigma 公司; 人用狂犬病纯化疫苗为法国维尔博公司产品。

1.2 ScdsFv 表达工程菌的构建

引物两端分别引入 *Nde* I、*Not* I 酶切位点, 以母本单链抗体为模板, 利用 PCR 点突变在重链 FR 可变区 VH(44) 及轻链 FR 可变区 VI(100) 各突变一个氨基酸为半胱氨酸并分别扩增突变后的 VH 和 VL, 同时合成 15 个氨基酸的(SerGly4)₃ 连接肽。利用 PCR 技术将 VH 和 VL 用连接肽连接。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 60 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min30s; 72 $^{\circ}$ C 10min。产物连接 pMD18-T vector 转化 *E. coli* DH5 α 。阳性克隆提取质粒并用 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切, 与经同样双酶切的 pET22b(+) 载体连接后, 转化 *E. coli* DH5 α , PCR 和酶切鉴定, 测序。正确克隆质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)。

1.3 ScdsFv 在大肠杆菌中的表达及 Western blot

将已转化单链二硫键稳定抗体表达的 *E. coli* BL21(DE3) 阳性克隆接种于 LB 培养液(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素)中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。按 1% 比例转接新鲜 LB 培养液培养至 A_{600} 值约为 0.6, 加终浓度 0.1mmol/L IPTG 诱导表达 5h, 离心收集菌体, SDS-PAGE 分析。将蛋白转移至 NC 膜上, 过氧化物酶(HRP)标记抗 His 抗体为一抗, DAB 显色后观察

* 通讯作者。Tel: 86-10-66948532; E-mail: geno0109@vip.sina.com

作者简介: 蔡 昆(1981-)男, 湖北恩施人, 硕士研究生, 研究方向为基因工程抗体。E-mail: ckreal@163.com

其它作者: 蒯 俊

收稿日期: 2006-11-27; 接受日期: 2007-01-19; 修回日期: 2007-03-26

结果。

1.4 包涵体的体外复性及纯化

离心收集菌体超声破碎菌体后分别用 1% Triton、2mol 脲素、纯水洗涤获得重组蛋白的包涵体。用 6mol/L 盐酸胍溶解变性,以 Ni-NTA 柱进行含 6His 标签特异蛋白的亲和层析纯化。纯化收集蛋白装于透析袋中,在分别含有 6mol/L、4mol/L、2mol/L、1mol/L 脲素的 0.03mol/L PBS 溶液中进行梯度透析,最终透析至 0.03mol/L PBS 中。复性蛋白在含有 DTT 变性和没有 DTT 的条件下进行 SDS-PAGE。

1.5 荧光抗体实验检测 ScdsFv 的结合活性

荧光抗体实验用来检测抗体与病毒的特异结合^[7]。将过量目的蛋白 ScdsFv 与适量 CVS 株狂犬病毒孵育后加入单层 BSR 细胞继续培养 24h, PBS 洗涤后,细胞单层用冷丙酮固定, Evans Blue 染色,并加入 1:200 稀释至工作浓度的荧光标记抗核衣壳抗体染色,荧光镜下观察细胞。对照组为抗狂犬病毒马血清、抗破伤风马血清以及 BSA。

1.6 相对亲和力测定

采用硫氰酸盐洗脱法对 ScFv 和 ScdsFv 的相对亲和力进行比较。以人用狂犬病纯化疫苗(Vero 细胞, Wistar 株)为抗原包被 96 孔板, 3% BSA 封闭,加入相同浓度的 ScFv 和 ScdsFv, 37℃ 孵育 1h。洗涤后,加入含不同浓度 NH₄SCN (0.2 ~ 2.0mol/L) 的 0.1 MPBS, 每孔 100μL, 洗后加入 HRP 标记的抗 His-Taq 抗体。显色并检测 A₄₅₀。

1.7 ELISA 检测 ScdsFv 的结合稳定性

以人用狂犬病纯化疫苗(Vero 细胞, Wistar 株)为抗原包被双复孔,分别以 30μg ScFv 和 ScdsFv 为一抗, HRP 标记抗组氨酸抗体为二抗,间接 ELIS 方法^[8,9]检测 37℃ 在人血清中孵育不同时间段(0、12、24、36、48、60、72h)以及在不同温度条件下 ScFv 和 ScdsFv 的抗原结合活性。

2 结果

2.1 单链二硫键稳定抗体表达质粒的构建

以通用连接肽(SerGly4)₃连接半胱氨酸点突变的 VH 与 VL 成功构建单链二硫键稳定抗体。PCR 扩增得到约 780bp 的片段,符合设计大小。测序结果表明,构建的 ScdsFv 基因序列与设计完全一致。

2.2 ScdsFv 重组表达及 Western blot 分析

将重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3),经 0.1mmol/L IPTG 诱导培养 6h,离心收集菌体后 SDS-PAGE 分析。在相对分子质量约 30kDa 处有一空载

体 pET22b(+) 转化子所没有的明显条带(图 1),这与预期的目的蛋白大小一致。以过氧化物酶(HRP)标记抗 His 抗体为一抗进行 Western blot 分析。结果显示,在相应位置 30kDa 处有特异条带(图 1),说明表达产物正确。

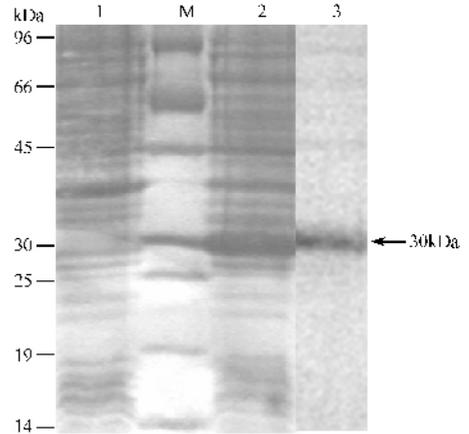


图 1 ScdsFv 的 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析

Fig. 1 Analysis of expressed ScdsFv by SDS-PAGE and Western blot. 1. Total pET22b(+) / BL21 protein after induced; 2. Total pET22b(+) / ScdsFv/BL21 protein after induced; M. Low molecular weight protein makers; 3. Analysis of expressed ScdsFv by Western blot.

2.3 ScdsFv 体外复性及 Ni-NTA 纯化

超声破碎菌体后获得重组蛋白的包涵体。经变性以及 Ni-NTA 柱纯化后,在相对分子质量约为 30000 处得到纯度大于 90% 的目的蛋白(图 2),与设计蛋白大小一致。体外脲素梯度复性。复性蛋白在非还原电泳的不同迁移速率表明在轻、重链间形成了二硫键。

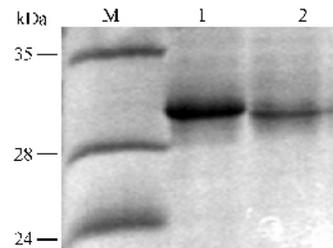


图 2 纯化 ScdsFv 的 native 蛋白电泳分析

Fig. 2 Analysis of purified ScdsFv by SDS-PAGE. 1. Reduced ScdsFv after purified; 2. Non-reduced ScdsFv after purified; M. Low molecular weight protein makers.

2.4 荧光抗体实验检测 ScdsFv 的结合活性

如果样品具有中和抗体的作用,足够量的样品将能完全中和病毒,则无病毒感染细胞,镜下检测不出荧光抗体,如果样品没有中和作用,病毒感染不受影响,固定后荧光抗体能标记在感染的细胞上,镜下能观察到荧光。结果显示,ScdsFv 与病毒孵育后不

能被标记上荧光抗体(图 3-D),说明 ScdsFv 与马血清一样(图 3-C)能中和病毒。而 PBS(图 3-A)与抗 TET 马血清(图 3-B)均能被标记上荧光,说明不能中和病毒。

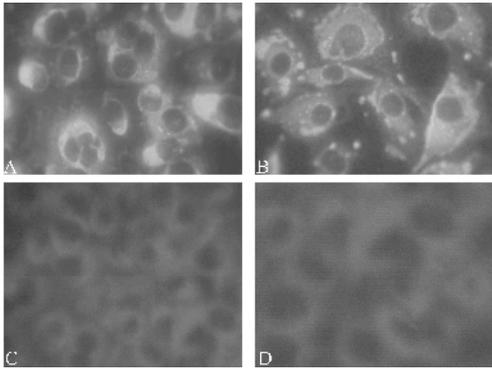


图 3 ScdsFv 的荧光抗体实验检测

Fig.3 Analysis of specific binding activity of ScdsFv by Fluorescent antibody test (FAT). A. PBS; B. TET anti-sera; C. Rabies anti-sera; D. ScdsFv.

2.5 相对亲和力测定

采用硫氰酸盐洗脱法比较 ScFv 和 ScdsFv 的相对亲和力。纵坐标为各样品 A_{450} 值占未加硫氰酸盐样品 A_{450} 值的百分比,当 A_{450} 下降为未加 NH_4SCN 时样品的 50% 时,对应的 NH_4SCN 浓度即为相对亲和力指数。从图 4 中可以看出,ScFv 的相对亲和力指数为 0.8mol/L,而 ScdsFv 为 1.5mol/L,表明改构后的 ScdsFv 的相对亲和力要高于 ScFv。

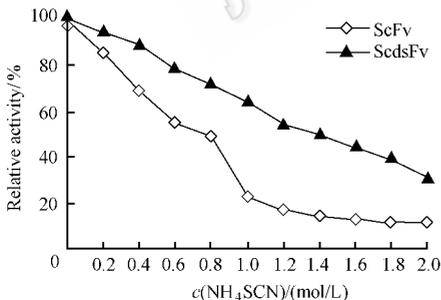


图 4 硫氰酸盐洗脱法比较 ScFv 和 ScdsFv 的相对亲和力

Fig.4 Measurement of relative affinity of ScFv and ScdsFv by ELISA using thiocyanate elution.

2.6 ScdsFv 的稳定性

ELISA 结果显示目的蛋白具有特异的抗原结合活性。ELISA 测定的 A_{450} 数值作为抗体的结合活性指标^[8,9],温育各时间段及各温度时的样品 A_{450} 数值相对未温育目的蛋白 A_{450} 数值的百分比作图,反映结合活性下降的趋势。可以看出,在 12h,母本单链抗体 ScFv 结合活性只有最初的 20.92%,而目的蛋白 ScdsFv 能保持 84.31% 的活性。并且在第 72h 仍

能检测到 52% 的活性(A)。在热稳定性实验中,ScFv 在 35℃ 时已基本无活性,而 ScdsFv 能保持 50% 以上的活性,在 55℃ 才降到 20%(B)。可见,ScdsFv 的结合稳定性相比母本单链有明显提高(图 5)。

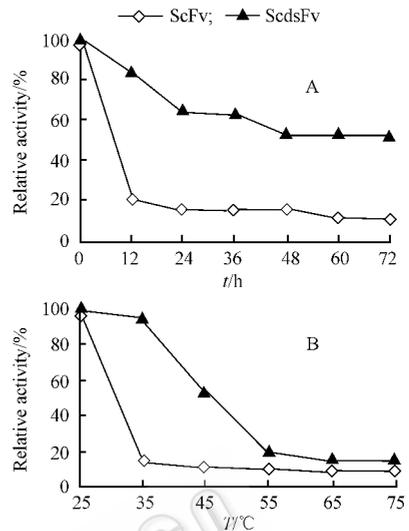


图 5 目的蛋白稳定性 ELISA 检测

Fig.5 Analysis of the binding activity and stability of ScdsFv by ELISA. A: Stability in serum in various times at 37°C; B: Stability at various temperatures.

3 讨论

单链抗体(single chain fragment of variants, ScFv) 是现在研究最多的小分子抗体,它由一段弹性连接链(linker)把抗体重链可变区(VH)与轻链可变区(VL)相连而成,是具有亲代抗体全部抗原结合特异性的最小功能结构单位^[3]。但是它存在在血液中不稳定的缺点。因此,需要对其进行改构提高其稳定性。有报道称在轻、重链之间具有肽链 linker 和二硫键的 ScdsFv 在人血浆(37°C)条件下至少能保持 7d 的生物活性,比 dsFv 具有更高的中和活性^[10]。

本试验选用母本 ScFv 中的连接肽(SerGly4)₃^[11]。同时分别在轻、重链框架区引入半胱氨酸突变位点,使其在折叠过程中形成二硫键,成功表达了单链二硫键稳定抗体。经 Ni-NTA 纯化得到目的蛋白,并由 ELISA 及荧光抗体试验验证了其结合活性及稳定性。改构的 ScdsFv 与母本抗体相比,具有相同的抗原结合特异性,说明引入二硫键的位置不影响抗体的活性。同时稳定性得到较大提高。为进一步对其进行功能性研究提供了试验材料。但在本试验中还仍然存在原核系统变性的工艺问题。复性效率不高影响到其作为抗体的大量制备和应用。我们可以尝试通过融合蛋白表达的方式,从

而提高其变复性效率。

综上所述, ScdsFv 是一个重要的稳定性改构策略, 它的制备为将来的功能性研究及稳定性研究提供了材料并奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Wilkerson JA. Rabies update. *Widness Environ. Medicine*, 2000, **11**(1) 37 - 39.
- [2] 赵小玲, 蔺俊, 王慧, 等. 人源抗狂犬病毒单链抗体库的构建及体外亲和筛选. *细胞与免疫学杂志*, 2004, **20**(2) 243 - 247.
- [3] Rajagopal V, Pastan I, Kreitman RJ. A form of anti-Tac (Fv) which is both single-chain and disulfide stabilized : comparison with its single-chain and disulfide-stabilized homologs. *Protein Eng*, 1997, **10**(12) :1453 - 1459.
- [4] Jian-li W, Bao-ling Z, Ru M, *et al.* Disulfide-stabilized single-chain antibody-targeted superantigen : construction of a prokaryotic expression system and its functional analysis. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**(31) 4899 - 4903.
- [5] Young NM, Makenzie CR. The stabilization of a single-chain Fv antibody fragment by introduction of a disulphide bond. *FEBS Lett*, 1995, **377** :135 - 139.
- [6] Kobayashi H, Han ES, Kim IS, *et al.* Similarities in the biodistribution of Indine-labeled anti-Tac single-chain disulfide-stabilized Fv fragment. *Nucl Med Biol*, 1998, **25** 387 - 393.
- [7] Meslin FX, Kaplan MM, Kooprowski H. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva : WHO press, 1996 88 - 95.
- [8] Perrin P. The influence of the type of immunosorbant on rabies antibody EIA ; advanced of glycoprotein over whole virus. *J Biol Stand*, 1996, **14** 95 - 102.
- [9] 鲁晓知, 徐葛林, 朱家鸿, 等. 应用间接混合夹心酶免疫试验法检测人血清中狂犬病毒抗体. *中国人兽共患病杂志*, 1996, **12**(4) 42 - 44.
- [10] Bera TK, Onda M, Brinkmann U, *et al.* A bivalent disulfide-stabilized Fv with improved antigen binding to erbB2. *J Mol Biol*, 1998, **281** 475 - 483.
- [11] Huston JS, Levinson D, Mudgett HM, *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 USA*, 1988, **85** 5879 - 5883.

Recombinant design and expression of human anti-rabies virus ScdsFv

CAI Kun, WANG Hui*, BAO Shi-zhong, SHI Jing, HOU Xiao-jun

(State Key Laboratory of Pathogens and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract : To constructed the recombinant human anti-rabies virus ScdsFv, cys sites were introduced into framework region (FR) of VH and VL genes which were amplified from human anti-rabies virus ScFv respectively using genetic point mutation technology. Cloned the ScdsFv gene into expression vector pET22b(+) and transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The target protein was expressed by inducing with IPTG. Followed by renaturation in vitro and purified by Ni-NTA. The binding activity of ScdsFv was identified by Fluorescent antibody test (FAT) and ELISA. Results showed that recombinant ScdsFv were expressed at high level. Purity of the protein > 90% after purified by Ni-NTA and renaturation in vitro. FAT and ELISA results demonstrated that ScdsFv could binding antigen specificity and was more stable than ScFv. Recombinant ScdsFv provided experiment materials for further functional study.

Keywords : Rabies virus ; ScdsFv ; expression

* Corresponding author. Tel : 86-10-66948532 ; E-mail : geno0109@vip.sina.com

Other author : YIN Jun

Received 27 November 2006 / Accepted : 19 January 2007 / Revised : 26 March 2007