

抗 H5 亚型禽流感病毒单链抗体在毕赤酵母中的分泌型表达和生物活性分析

何芳萍, 林庆山, 李少伟*, 魏旻希, 陈振钦, 罗文新, 陈毅歆, 张军, 夏宁邵

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 生命科学学院

细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘要: 在本实验室研制出的多株针对 H5N1 亚型禽流感血凝素单抗中, 13D4 单抗对所有 H5 亚型病毒均有血凝抑制和中和活性, 具有特异性高、反应性强和识别广的特点, 且在小鼠实验中显示了对各种代表株禽流感的感染和发病均具有良好的治疗效果。在此研究基础上, 本实验通过基因工程构建含有 13D4 单链抗体(scFv)基因的毕赤酵母表达载体, 实现目的蛋白的分泌性表达和纯化。经过竞争法和血凝抑制检测其活性, 表明获得的单链抗体具有与原始鼠源抗体相近的反应活性和相同的识别表位。H5N1 广谱中和单抗 13D4 的单链抗体的成功构建, 为进一步研制针对 H5N1 禽流感病毒的治疗性抗体奠定了基础。

关键词: 高致病性禽流感病毒; 单链抗体; 血凝抑制; 毕赤酵母

中图分类号: Q786 R373.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2011)03-0202-05

高致病性禽流感(Highly pathogenic avian influenza, HPAI)病毒, 属于甲型流感病毒, 可感染禽类引起高致病性禽流感暴发。高致病性禽流感具有突发、症状严重及病程短的特征, 其死亡率接近 100%。自 2003 年以来, 高致病性 H5N1 禽流感病毒从东南亚地区逐渐扩散到欧洲、中东等地区并持续流行, 不仅使疫区养禽业蒙受巨大损失, 而且还不断发生病毒突破种间屏障直接传染人并致死事件, 造成全球社会恐慌^[1-3]。

血凝素蛋白(Hemagglutinin, HA)是禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)病毒, 最主要的表面抗原蛋白, 在禽流感疫苗、治疗性抗体及诊断试剂的开发中具有重要的意义^[4-5]。血凝素基因是禽流感病毒基因组中变异最大的基因, 其突变常常导致禽流感病毒的抗原转移或抗原漂移。由于血凝素在很大程度上决定了禽流感病毒的抗原性和致病性, 因此, 寻找能够识别多个 H5N1 变异株血凝素蛋白的广谱中和性单克隆抗体, 对于禽流感的预防、诊断和治疗的研究均具有重要的意义。

本实验室已经通过杂交瘤技术和血凝抑制试验(Hemagglutination inhibition test, HI)筛选出针对 H5 亚型血凝素的多株特异性单克隆抗体^[6], 其中 13D4 鼠单抗对全部 H5 亚型病毒毒株均显示血凝抑制活性和中和活性^[7], 具有特异性高、反应性强、识别广的特点。动物实验结果显示, 经 13D4 治疗的实验动物存活率可达 100%^[7]。这种治疗性单克隆抗体可能成为人类对付禽流感病毒高变异性的一个重要突破口。但是, 鼠源单抗对人类为异源蛋白质, 其体内的半衰期短, 存在诱发超敏反应的风险, 并且在重复给药的情况下有可能在体内产生抗鼠抗体, 从而导致临床疗效减弱或消失。针对鼠源单抗的这些缺陷, 本研究尝试利用小分子抗体技术体系中单链抗体技术改造 13D4 鼠源单抗并在毕赤酵母中表达重组单抗, 以探讨利用重组表达的单链抗体替代鼠源单抗用于治疗高致病性禽流感的可能性。

材料与方 法

1 材料

1.1 菌株和载体 大肠杆菌菌株 DH5 α 为本实验室保存; 单抗及分泌 13D4 单抗的鼠杂交瘤细胞系由本实验室制备。毕赤酵母菌株 GS115 (His⁻, Mut⁺) 和毕赤酵母分泌表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。实验中的所有病毒株均由香港大学微生物系惠赠。

1.2 工具酶及主要生化试剂 限制性内切酶, Tag

收稿日期: 2010-10-21; 修回日期: 2011-03-23

基金项目: 国家高技术研究发展计划重点项目(863 计划)(No. 2006AA020905); 国家自然科学基金项目(No. 30901077, 30972826); 重大传染病专项及新药创制(No. 2008ZX10004-006, 2009ZX09102-230, 2009ZX10004-704)资助。

作者简介: 何芳萍(1983)女, 硕士研究生, 主要从事生物化学研究, Tel: 0592-2184110; E-mail: hefanging@xmu.edu.cn

通讯作者: 李少伟, E-mail: shaowei@xmu.edu.cn

DNA 聚合酶以及 T4 DNA 连接酶都购自 TaKaRa 公司。PCR 产物回收试剂盒、胶回收试剂盒、酵母基因组提取试剂盒购自天根公司。YNB 为 BBI 公司产品; -His Do Supplement 为 BD 公司产品; 其余常用试剂均为分析纯。LB 培养基、RDB 培养基、YPD 培养基、BMGY 培养基和 BMMY 培养基成分参考 Invitrogen 公司操作手册。

2 方法

2.1 鼠单抗 13D4 轻重链可变区基因的克隆 收集半贴壁培养的 10^7 个 13D4 鼠杂交瘤细胞, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 并以 Oligo (dT) (12~18) (Promega) 为引物反转录成 cDNA。根据 Novagen 公司的 Ig Prime 试剂盒的引物序列设计合成 33 条引物, 通过 RT-PCR 法分离抗体可变区基因。用 MuIgVH5'-B1/MVHR 引物对扩增出抗体重链可

表 1 PCR 引物名称及其序列

Table 1 Names and sequences of PCR primers used in the study

Primer	Sequence
MuIgVH5'B1	5'ATG(A/C)AATG(C/G)A(C/G)CTGGGT(C/T)(A/T)T(C/T)CTCTT-3'
MVHR	5'CCAGGG(A/G)CCA(A/G)(G/T)GGATA(A/G)ACTG(A/G)TGG-3'
MuIgkVL5'F2	5'CGACATGGT(A/G)TCC(A/T)CA(C/G)CTCAGTTCCTTG-3'
MVKR	5'ACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3'
13D4 VHF	5'GAATTCATGCAGGTT CAGCTGCAGG-3'
13D4 VHR	5'CGCTACCACCCCTCCAGATCCGCCACCTCCGGAGGACACGGTCAAG-3'
13D4 VKF	5'CTGGAGGGGGTGGTAGCGGTGGAGGGGGAGTGACATTGTGATGACCCAGT-3'
13D4 VKR	5'CGCGCCGCTTACCGTTTATTTCCAGCTT-3'

2.3 scFv 蛋白的表达 按 Invitrogen 公司 Multi Copy Pichia Expression Kit 所述方法制备酵母菌 GS115 感受态细胞。取 80 μ l 感受态细胞与 5~20 μ g 经 Sal I 内切酶线性化的重组表达载体 pPIC9K-13D4scFv 混合, 转入预冷的 2mm 电转杯, 冰浴 5min 后, 在 1.5kV、25 μ F、200 Ω 条件下, 用 Bio-Rad Gene Pulser 电转仪进行电击转化, 随后立即加入 800 μ l 1mol/L 预冷的山梨醇。将电转后的混合物吸出并涂布 RDB 筛选培养基平板, 于 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3d, 观察转化体的生长情况。

挑取重组菌株的单菌落并接种到 100 ml BM-GY 培养基中, 于 28 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 6.0, 然后 3 000 \times g 离心 5 min 收集菌体, 用 BMMY 培养基重悬细胞至 OD₆₀₀ 为 2.0, 在 28 $^{\circ}$ C 培养诱导 72 h; 每天补加 100% 甲醇到该培养基以维持甲醇的终浓度为 1%。用 pPIC9K 空载体转化的 GS115 菌株以上述的相同条件培养并诱导作为阴性对照。

2.4 重组蛋白的纯化 培养上清液在 4 $^{\circ}$ C 以 20 000g 离心 30min 收集, 经 45%v/v 饱和硫酸铵溶

液沉淀处理, 随后在 4 $^{\circ}$ C 以 20 000g 离心 30 min 收集沉淀。沉淀重悬于 100ml 1 \times PBS 中, 离心收集上清液。将溶于上清液的 scFv 蛋白用 20mM PB pH 8.0 缓冲液透析, 随后进行 DEAE FF 阴离子交换层析。

2.2 scFv 表达载体的构建 通过在重链反向引物和轻链正向引物设计具有部分重叠的连接区域, 进行轻链重链基因的融合^[8]。首先, 分别用引物 13D4VHF/13D4VHR、13D4VKF/13D4VKR 扩增出 VH、VL 片段, 回收, 再以这两个片段互为引物和模板, 在新的 PCR 系统中进行重叠延伸, 得到少量完整的 scFv 基因片段。再以此完整基因为模板, 13D4VHF/13D4VKR 为引物进行大量扩增。回收大小 700bp 左右的扩增产物, 经限制性内切酶 EcoRI / Not I 处理后, 连接到已经用相同限制性内切酶处理的 pPIC9K 载体中 (PCR 引物名称及序列见表 1)。

2.5 血凝抑制实验(HI) 从正常健康经静脉取血方式获得正常鸡血, 添加千分之一肝素, 摇匀置 4 $^{\circ}$ C 保存。收获的抗凝血以生理盐水洗涤 3 次, 每次以 2 000 r/min 离心 10min。获得的红细胞用生理盐水配成 1% 浓度。灭活的病毒液在微孔血凝板中用生理盐水按 1:2 比例倍比稀释, 每孔加入 50 μ l 稀释的病毒液并随后添加等体积的 1% 鸡血红细胞悬液, 摇匀, 室温静置 30 min 后观察。以出现完全血凝的血凝素最高稀释度为其血凝效价。将实验样品用生理盐水做系列倍比稀释, 在微孔血凝板上每孔加入 25 μ l, 再加入 25 μ l 稀释好的灭活病毒稀释液, 孵育 30min, 后每孔加入 25 μ l 的 1% 鸡红细胞, 摇匀并置室温 30 min 后观察。以出现完全抑制的样品最高稀释度的倒数为样品中抗体的效价。所有实验

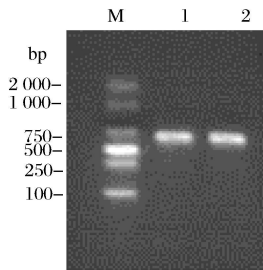
都重复进行 3 次。

2.6 竞争阻断法鉴定 13D4 scFv 蛋白与 13D4 单抗的作用位点 以捕获包被法把 Ck/HK/Yu22/02 病毒包被于 96 孔板,进行 13D4 scFv 与其它 H5 亚型病毒株鼠源单抗的竞争阻断,鼠源单抗用 HRP 标记。每孔加入 50μl 稀释后的各株酶标鼠单抗和 50μl 13D4 scFv,以 H1 亚型病毒株单抗作为对照。37℃孵育 1h,PBST 洗涤 5 次,于 37℃显色 15min。在酶标仪上读取 OD_{450/620nm} 的值,计算竞争阻断率(竞争抑制率=(未竞争平均 OD 值-竞争平均 OD 值)/未竞争平均 OD 值×100%),竞争阻断率 ≥50% 判为阳性。

结 果

1 VH、VL 序列的获得与 scFv 基因的构建

从 13D4 鼠源杂交瘤细胞提取细胞总 RNA 并反转录成 cDNA。以获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将目的扩增产物连接至 pMD18-T 载体并经过测序确认。通过 NCBI 序列比对确认所得 369 bp 与 324 bp 的目的序列为抗体的 VH 和 VL 基因抗体互补决定区(Complementary determinant region, CDR)。随后, VH 与 VL 经过重叠 PCR 扩增而使 VH 的 3 端与 VL 的 5 端经扩增引物的接头序列连接成完整的 scFv 基因(图 1 和图 2)。



M. DNA Maker DL 2000; Lane 1 and 2 amplified fragments of interest

图 1 13D4 单链抗体基因 PCR 扩增电泳图

Figure 1 The electrophoresis analysis of the 13D4 scFv gene by PCR amplification

2 13D4 scFv 的诱导表达与纯化

重组酵母菌株经甲醇诱导表达 72h 后,培养上清液经过 45%(v/v) 饱和硫酸铵溶液沉淀后,用 1×PBS 缓冲液重悬,对 20mM PB pH 8.0 缓冲液透析,并进行阴离子交换层析。纯化蛋白质的纯度大于 90%(图 3)。

3 血凝抑制实验鉴定 13D4 scFv 活性

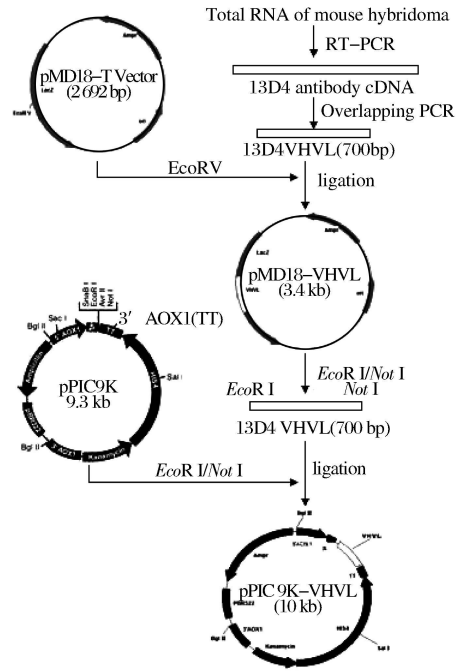
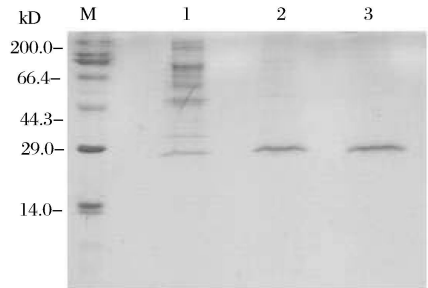


图 2 13D4 单链抗体基因克隆与表达载体构建流程图

Figure 2 Schematic diagram of 13D4 scFv cloning and construction into the yeast expression vector



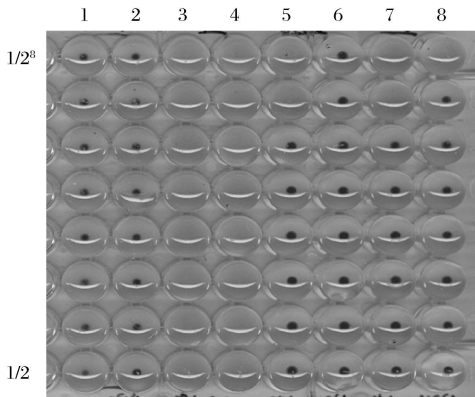
M. Molecular weight marker; 1 scFv in culture medium; 2 scFv prepared with amino sulfide precipitation; 3 scFv purified with DEAE anion ion exchange chromatography

图 3 13D4 scFv 的表达和纯化的 SDS PAGE

Figure 3 SDS PAGE analysis of expressed and purified 13D4 scFv

以 13D4 鼠源单克隆抗体作为阳性对照,以无关单抗隆抗体样品和 1×PBS 缓冲液作为阴性对照。鼠单抗与 scFv 均稀释至初始浓度约 50 μg/mL。随机选择 H5N1 亚型毒株 A/Commom Magpie/HK/2256/06 及 A/Shenzhen/406H/06 与一株 H1 亚型病毒 A/DUCK/ST/1734/03 进行实验。结果如图 4 所示,对于 H5 亚型病毒株,13D4 鼠单抗的 HI 滴度分别为大于 256 和 128 倍(图 4,泳道 6、8),13D4 scFv 的 HI 滴度均为 64 倍(图 4,泳道 5、7)。而对于 H1 亚型毒株,鼠源单抗与 scFv 均没

有抑制活性(图 4,泳道 3、4)。实验表明 13D4 scFv 具有与原鼠单抗一致的与 H5N1 亚型 AIV 特异结合的活性。



Virus strains: 1 to 2, Control: 3 to 4, A/DUCK/ST/1734/03(H1N1); 5 to 6, A/Commom Magpie/HK/2256/06(H5N1); 7 to 8, A/Shenzhen/406H/06(H5N1); Antibodies: 4, 6, 8, 13D4 mAb; 3, 5, 7, 13D4 scFv

图 4 13D4 单链抗体与鼠单抗对三株病毒的血凝抑制实验

Figure 4 Hemagglutination inhibition assay with

3 virus strains using 13D4 mAb and scFv

4 13D4 scFv, mAb 13D4 与多株禽流感单抗的相互竞争抑制作用

13D4 scFv、mAb 13D4 分别与针对 H5N1 亚型禽流感病毒广谱中和表位的鼠源单抗进行禽流感病毒的竞争结合测定,包括 mAb 1A6、2F2、3C8、8G9、8H5、10F7 和 13D4 等 7 株单抗,分析 13D4 scFv 与 mAb 13D4 在天然 H5N1 禽流感病毒上所识别的表位之间的关系。结果如图 5 显示,13D4 scFv 与 mAb 13D4 对各株的 HRP mAb 的抑制结果高度一致,提示酵母分泌表达的 13D4 scFv 单链抗体较好地模拟了 mAb 13D4 抗原识别区的构象,具有相同的抗原识别表位。

讨 论

H5N1 禽流感病毒在禽类中的持续流行和不断发生的人类感染事件使人们担心 H5N1 禽流感病毒可能持续进化成引发人类流感大流行的流感病毒株。目前,传统的抗病毒治疗药物(离子通道抑制剂和神经氨酸酶抑制剂)对 H5N1 禽流感的疗效一般,且疗效的发挥依赖于病毒感染前或病毒感染早期用药^[9-11]。但病人通常都在发病中后期才到医院就诊,已错过该药的最佳治疗时机^[12-13]。近年来,被动免疫治疗方法越来越多地运用于治疗传染病^[14]

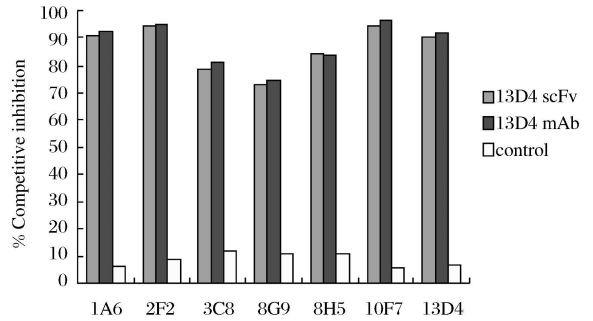


图 5 不同 HRP mAb 对 13D4 scFv、mAb 13D4 与 H5N1 亚型禽流感病毒结合的竞争抑制

Figure 5 Competitive inhibition of 7 HRP mAbs binding to the 13D4scFv, mAb13D4 against native H5N1AIV control: anti H1N1 mAb

利用 H5N1 禽流感病毒感染病人的恢复期血清治疗禽流感患者已经得到多次有益的尝试并取得较好的效果^[15-16],这使得利用抗体治疗 H5N1 禽流感感染成为一个新的研究热点。

本研究选择改造的鼠源单抗 13D4,是通过以同源性最保守的代表性 H5N1 病毒株 Ck/HK/YU22/02 作为免疫源得到的,对 34 株 H5N1 病毒代表株均具有良好的中和活性。虽然该株单抗具有较好的广谱性和中和活性,但仍局限于其鼠源性,即为异种蛋白而具有免疫原性和在人体中常不能有效地活化补体和 Fc 受体相关的效应系统。

单链抗体,是表现出具有抗原结合能力的多肽,极易构建与表达。在性状方面,虽然只有完整抗体的 1/6,但其保留了亲本单克隆抗体结合抗原的特异性,同时又使其抗原性大大降低,其药物动力学优于 Fab 抗体或 IgG 等完整抗体,能有效进入完整抗体无法到达的靶部位,故是一种值得推广研究应用的治疗性抗体。

在酵母系统中分泌表达的可溶性的 13D4 scFv 在 HI 和竞争实验中均显示了较好的活性与特异性。虽然相同量的 scFv 与病毒的结合活性仍然不如完整的鼠源单抗,但是我们可以直接将其进一步改造成嵌合抗体或人源化抗体,得到完整的治疗性抗体,为高致病性 H5N1 禽流感疾病的治疗及禽流感大规模流行的控制奠定基础。

参考文献:

- [1] Li K S, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia[J]. Nature, 2004, 430(6996): 209-213.
- [2] Ligon B L. Avian influenza virus H5N1: a view of its

- history and information regarding its potential to cause the next pandemic[J]. *Semin Pediatr Infect Dis*, 2005, 16(4): 326-335.
- [3] Peiris J S, de Jong M D, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health[J]. *Clin Microbiol Rev* 2007, 20(2): 243-267.
- [4] Kawaoka Y, Bean W J, Webster R G. Evolution of the hemagglutinin of equine H3 influenza viruses[J]. *Virology*, 1989, 169: 283-292.
- [5] Webster R G. Wet markets a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza[J]. *Lancet*, 2004, 363: 234-236.
- [6] Chen Y X, Luo H F, Ge S X, et al. Development and characterization of MAbs against haemagglutinin of highly pathogenic H5 avian influenza virus[J]. *Chin J Virol*, 2005, 21(6): 421-427.
- [7] Chen Y X, Qin K, Wu W L, et al. Broad cross-protection against H5N1 avian influenza infection by means of monoclonal antibodies that map to conserved viral epitopes[J]. *J Infect Dis*, 2009, 199: 45-98.
- [8] Horton R M, Hunt H D, Ho S N, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension[J]. *Gene*, 1989, 77: 61-68.
- [9] Leneva I A, Roberts N, Govorkova E A, et al. The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza viruses[J]. *Antiviral Res*, 2000, 48(2): 101-115.
- [10] Gubareva L V, Webster R G, Hayden F G. Comparison of the activities of zanamivir, oseltamivir, and RWJ 2702 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor resistant variants[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(12): 3403-3408.
- [11] Sugaya N, Mitamura K, Yamazaki M, et al. Lower clinical effectiveness of oseltamivir against influenza B contrasted with influenza A infection in children[J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(2): 197-202.
- [12] Abdel Ghafar A N, Chotpitayasunondh T, Gao Z, et al. Update on avian influenza A(H5N1) virus infection in humans[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(3): 261-273.
- [13] Schunemann H J, Hill S R, Kakad M, et al. WHO rapid advice guidelines for pharmacological management of sporadic human infection with avian influenza A (H5N1) virus[J]. *Lancet Infect Dis*, 2007, 7(1): 21-31.
- [14] Marasco W A, Sui J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(12): 1421-1434.
- [15] Luke T C, Kilbane E M, Jackson J L, et al. Meta-analysis: convalescent blood products for Spanish influenza pneumonia: a future H5N1 treatment? [J]. *Ann Intern Med*, 2006, 145(8): 599-609.
- [16] Zhou B, Zhong N, Guan Y. Treatment with convalescent plasma for influenza A (H5N1) infection[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(14): 1450-1451.

Secretory Expression and Biological Activity Analysis of an Anti-H5 Single-chain Antibody from *Pichia Pastoris*

HE Fang-ping, LIN Qing-shan, LI Shaowei, WEI Muxi, CHEN Zhenqin,
LUO Werrxin, CHEN Yixin, ZHANG Jun, XIA Ning-shao

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Life Science, Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: In our previous study, a panel of 52 broadly cross-reactive H5-specific monoclonal antibodies (MAbs) were generated and characterized. The 13D4, one of these MAbs, has been demonstrated to protect mice against lethal challenge by 4 strains of H5N1 avian influenza virus representing the currently prevailing genetic populations, clades 1, 2.1, 2.2, and 2.3. Here, we further cloned the gene of the 13D4 MAbs and constructed a single-chain variable fragment. Then, the 13D4 single-chain antibody (scFv) was expressed in secretory manner in *Pichia pastoris*. The supernatant of the culture was concentrated and subjected to ammonium sulfate precipitation. The purity of the 13D4 scFv was around 90% in SDS-PAGE following ion exchange chromatography. We further investigated its binding property using hemagglutination inhibition (HI) test and blocking ELISA. The results indicated that the 13D4 scFv shared the same binding sites and comparable HI titer with the prototype murine 13D4 MAbs. In conclusion, an anti-H5 single-chain wide-spectrum neutralizing antibody is prepared successfully in yeast system.

Key words: H5N1 avian influenza virus; single-chain antibody; hemagglutinin inhibition; *Pichia pastoris*