

抗 HEV 中和抗体 13D8 的单链抗体的构建及表达

李利峰¹, 罗文新^{1,2}, 顾颖¹, 朱子恒¹, 王颖彬¹, 张军¹, 夏宁邵^{1*}

(厦门大学: 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室; 海洋与环境科学学院, 福建 厦门 361005)

Construction and expression of single-chain antibody of neutralizing monoclonal antibody 13D8 against hepatitis E virus

LI Lifeng¹, LUO Wenxin^{1,2}, GU Ying¹, ZHU Ziheng¹, WANG Yingbin¹, ZHANG Jun¹, XIA Ningshao^{1*}

¹The Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering; ²College of Oceanography and Environmental Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract

AIM: To weaken the immunogenicity of the neutralizing monoclonal antibody (mAb) 13D8 against hepatitis E virus and express its scFv. **METHODS:** The V_L and V_H genes were cloned by RT-PCR from hybridoma cells producing mouse mAb. And then V_H-linker-V_L fragment (scFv) was constructed and cloned into vector pTG-T7. The scFv protein was expressed in *E. coli*. The activity of expressed scFv was detected by ELISA and Western blot. **RESULTS:** SDS-PAGE analysis showed that the scFv was highly expressed mostly in the form of inclusion body in *E. coli*, and the yield was up to 26.8% of the total bacteria protein. The results of indirect ELISA and Western blot showed that the expressed scFv could bind specifically to a recombinant protein in ORF2 region of HEV (NE2). The result of competitive ELISA demonstrated that the epitope recognized by the scFv was the same as that by mAb 13D8. **CONCLUSION:** The scFv constructed from V_H and V_L genes of mAb 13D8 with immunological activity was successfully expressed.

Keywords: HEV; single-chain antibody; prokaryotic expression

摘要

目的: 降低 HEV 中和性单抗(mAb)13D8 的鼠源性, 表达其单

链抗体(scFv)。方法: 从分泌 13D8 鼠 mAb 的杂交瘤细胞中, 通过 RT-PCR 克隆 mAb 的 V_L、V_H 基因, 并进一步组装成 V_H-linker-V_L 型的 scFv 片段。将 scFv 片段克隆到 pTG-T7 载体中, 在大肠杆菌中进行表达。用 ELISA、Western blot 检测 scFv 的活性。结果: SDS-PAGE 表明, 13D8 的 scFv 在 *E. coli* 中得到高效表达, 表达量达菌体总蛋白的 26.8% 左右, 表达产物主要以包涵体的形式存在。间接 ELISA 和 Western blot 检测表明, 表达的 13D8 的 scFv 能与 HEV ORF2 区中一段重组蛋白(NE2) 特异结合。竞争 ELISA 表明, scFv 与原鼠 mAb 识别的为同一表位。结论: 成功地表达出具有免疫学活性的 13D8 的 scFv。

关键词: HEV; 单链抗体; 原核表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A

戊型肝炎是由戊型肝炎病毒(HEV)引起的一种胃肠道传播的急性肝炎, 主要流行于亚洲、非洲和中美洲发展中国家, 是一种世界性的危害严重的传染病^[1]。近年来, 陆续在猪、鼠和鸡等与人类关系密切的动物中发现 HEV 的感染, 使人们对于戊肝的重要性又有了新的认识^[2]。HEV 基因组含 3 个开放读码框架(ORF), 其中 ORF2 编码病毒结构蛋白, 组成病毒衣壳。本课题组表达了 HEV ORF2 区中一段重组蛋白 NE2, 证明 NE2 蛋白可较好地模拟 HEV 病毒衣壳蛋白的天然立体结构, 并正确形成重要的中和表位^[3-6]。我们在此基础上, 用 NE2 蛋白免疫小鼠制备出 3 株具有中和活性的单克隆抗体(mAb), 其中 mAb 13D8 与 8C11 可识别 HEV ORF2 上的同一个构象型中和表位区域^[7,8]。本实验在 13D8 杂交瘤细胞的基础上, 研制出其单链抗体(scFv), 该抗体能与 NE2 特异结合, 与原鼠 mAb 识别的为同一表位, 为 HEV 感染机制的研究、戊肝的抗体治疗研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 可分泌抗 HEV mAb 13D8 的鼠杂交瘤细胞系, 由本实验室制备。大肠杆菌菌株 DH5 α 、ER2566 由本室保存。pTG-T7 由本室构建^[9]。pMD18-T 载体、各种限制酶及 T4 DNA ligase 均购自大连 Takara 公司。Trizol 购自 Roche 公司。Oligo(dT)、AMV 及

收稿日期: 2003-09-17; 修回日期: 2003-10-27

基金项目: 福建省科技重大项目基金资助(No. 2002F013); 国家“十五”创新药物博士基金资助(No. 2003AA2Z3539); 福建省自然科学基金资助项目(No. C0310005)

作者简介: 李利峰(1978-), 男, 湖南汨罗人, 硕士生。

* Corresponding author, Tel: (0592)2184110

Email: msxia@jingxian.xmu.edu.cn

Rnasin 购自 Promega 公司。PCR 回收试剂盒购自上海华舜公司。NE2 抗原由本室表达纯化。HEV-IgG 的

ELISA 试剂盒购自北京万泰生物药业有限公司。所用引物均由上海博亚公司合成(见表 1)。

表 1 PCR 引物的名称和序列

Tab 1 Names and sequences of PCR primers

Name of primer	Sequence
MKCR1	5'-TCT AGA ATT AAC ACT CAT TCC TGT TGA A-3'
MuIgk V _L 5'-G3	5'-ATG GT(C/T) CT(C/T) AT(A/C/G) TT(A/G) CTG CTG CTA TGG-3'
MuIgG V _H 5'-C2	5'-CGA CAT GG(A/C/G) TTG G(C/G)T GTG GA(A/C) CTT GC(C/T) ATT CCT-3'
MuIgG V _H 3'-2	5'-CCC AAG CTT CCA GGG (A/G)CC A(A/G)(G/T) GGA TA(A/G) AC(A/G/C/T) G(A/G)T GG-3'
13D8HF1	5'-GAA TTC GAT GTA CAA CTT CAG G-3'
13D8HR1	5'-GCT ACC ACC CCC TCC AGA TCC GCC ACC TCC TGA AGA TAC GGT GAC CGT GGT GCG-3'
13D8KF1	5'-A TCT GGA GGG GGT GGT AGC GGT GGA GGC GGG AGT GAC ATC CAG ATG ACT CAG-3'
13D8KR1	5'-GTC GAC CCG TTT GAT TTC CAG G-3'

1.2 方法

1.2.1 抗体可变区基因的分离 半贴壁培养 10^7 个 13D8 鼠源杂交瘤细胞,用 Trizol 法提取总 RNA,并以 poly(T) 为引物反转录成 cDNA。采用 PCR 法分离抗体可变区基因;使用根据 Novagen 公司的 Ig Prime kit 合成的引物,以及另外设计合成的 1 条下游引物 MKCR1 进行扩增,结果用 MuIgk V_L 5'-G3/MKCR1 引物对经以下条件扩增,获得 1 条单一的约 700 bp 的 DNA 片段。PCR 条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 40 s, 53℃ 1 min, 72℃ 50 s, 共 35 个循环,再于 72℃ 延伸 15 min。回收 PCR 产物并克隆至 pMD 18-T 载体中,送上海博亚公司测序,序列在 NCBI 网 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 经 Blast 比对后,确定为 mAb 13D8 完整轻链序列。用 MuIgG V_H 5'-C2/ MuIgG V_H 3'-2 引物对,在以下条件扩增,获得 1 条单一的约 400 bp 的 DNA 片段。PCR 条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 40 s, 53℃ 1 min, 72℃ 40 s, 共 35 个循环,再于 72℃ 延伸 15 min。回收 PCR 产物并克隆至 pMD 18-T 载体中,送上海博亚公司测序,序列经 blast 比对后确定为 mAb 13D8 的 V_H 基因序列。

1.2.2 scFv 表达载体的构建 以 13D8HF1/13D8HR1 为引物对,可扩增出 13D8 的 V_H 基因片段,以 13D8KF1/13D8KR1 为引物对,可扩增出 13D8 的 V_L 基因片段。分别回收两个片段,再以这两个片段互为引物及模板,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。然后以完整片段为模板,以 13D8HF1/13D8KR1 为引物进行大量扩增。将回收的 scFv 基因片段经 EcoR I/Sal I 双酶切,克隆到 pTO-T7 原核表达载体中,得到表达质粒 pF-D8-scFv。

1.2.3 scFv 在大肠杆菌中的表达及初步纯化 以得到的重组质粒 pF-D8-scFv 转化 ER2566 大肠杆菌菌

株,挑取单菌落于 500 mL LB(含 Kan 100 mg/L)培养基中,于 37℃ 振荡培养过夜。菌液的 A_{600} 值达 0.8 左右,以 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导。在 30℃ 表达 6 h 后收获菌体,超声破碎,以 15 000 r/min 离心 10 min,取沉淀溶于与上清等体积的 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6) 中。取等量上清和沉淀溶液进行 SDS-PAGE。堆积胶的浓度为 5%,分离胶浓度为 12%。超声沉淀用 20 mL/L Triton X-100 洗涤两次后,溶解于 8 mol/L 尿素中。将 8 mol/L 尿素中的蛋白稀释到 50 mg/L,加入 100 mmol/L 的巯基乙醇轻微振荡 5 h,逐步对 pH 8.0 的 PBS 透析后,以 12 000 r/min 离心 10 min 去除沉淀,最终即得到 scFv 的初纯品。

1.2.4 scFv 活性的间接 ELISA 法检测 将以上单链抗体的初纯品进行倍比稀释后,各取 100 μ L 加入已包被 NE2 的 96 孔板中,37℃ 孵育 1 h。加入 1:2 500 稀释的 HRP 标记抗 6 His 抗体 100 μ L,于 37℃ 孵育 30 min,显色 15 min 并终止反应后,测定 $A_{450/620}$ 的值。

1.2.5 scFv 活性的 Western blot 检测 将纯化的 NE2 进行常规 SDS-PAGE,并电转移至硝酸纤维素膜上,以浓缩 20 倍的初步纯化的 scFv 与之反应,以 HRP 标记的鼠抗 His 标签抗体为二抗进行显色。

1.2.6 scFv 抗原特异性的竞争 ELISA 法检测 以 97.5 μ g/L 的 NE2 抗原包被酶标板。每孔各加入 50 μ L 倍比稀释的 13D8 的 scFv,各孔再加入 50 μ L 1:500 稀释的 HRP 标记鼠 mAb 13D8。并分别以原鼠 mAb 13D8 及 PBS 为阳性及阴性对照,混匀后于 37℃ 孵育 1 h,显色 15 min,反应终止后测定 $A_{450/620}$ 值,并按下列公式计算其竞争抑制率。竞争抑制率(%) = (mAb 13D8- HRP $A_{450/620}$ - 13D8 的 scFv $A_{450/620}$) / (mAb 13D8- HRP $A_{450/620}$) \times 100%。

2 结果

2.1 mAb 13D8 V 区基因的分离 根据 Novagen 公司的 Ig Prime kit,合成了 15 条 V_H 基因特异的简并上

游引物, 16 条 V_L 基因特异的简并上游引物, 3 条 C_H 基因特异的简并下游引物及 2 条 C_L 基因特异的下游引物。采用 PCR 法, 分离 mAb 的 V 区基因, 结果获得编码 mAb 13D8 基因可变区的核苷酸序列。mAb 13D8 的 V_H 和 V_L 基因分别长 351 和 324 bp, 分别编码 117 个和 108 个氨基酸(图 1)。

```

GAT CTA CAA CTT CAG CAG TGA GGA CTT GGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG TCT CIG TCT CTC 60
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Bro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu 20

TCC TGC TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGT TAT TAC TGG AAC TGG ATC CGG CAG120
Ser Gs Ser Val Thr Clu Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln 40

TTT CCA GGA AAC AAA CIG GAA TGG ATG GGC TAC ATA GGC TAC GAC GGT AGC AAT AAG TAC180
Phe Pro Gly Asn Lys Leu Gln Trp Met Gly Tyr Ile Gly Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr 60

AAG CCA TCT CTC AAA AAT GGA ATG TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT AAG AAC CAG TTT TTC240
Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe 80

CTG AAGTTG ACT TCT GTG ACT ACT GGG GAC ACA GGT ACA TAT TAG TGT GGA AGA GAT GTT300
Leu Lys Leu Thr Ser Val Thr Thr Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Val 100

AAGTAC TAC TTT GAC TAC TGG GGT CAA GGC ACC ACG GTC ACG GTA TCT TCA GGA GGT GGC360
Lys Tyr Tyr Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly 120

GGA TCT GGA GGG GGT GGT AGC GGT GGA GGC GGG AGT GAC ATC CAG ATG ACT CAG TCT CCA420
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro 140

GCC TCC CTA TCT GAA TCT GTG GGA GAA ACT GTC ACC ATC ACA TGT GCA GGA AGT GAG AAT480
Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Gln Thr Val Thr Ile Thr Gln Ag Ala Ser Gln Asn 160

ATT TAC AGT AAT TTA GCA TGG TAT CAG CAG AAA CAG GGA AAA TCT CCT CAG CIG CTC GTC540
Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Bro Gln Leu Leu Val 180

TAT GCT CCA ACA AAC TTA GCA GAT GGT GTC CCA TGA ACG TTC AAT GGC ACT GGA TGA GG600
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly 200

ACA GAG TAT TCC CTC AAG ATC AGC ACG CTG CAG TCT GAA GAT TTT GGG ACT TAT TAC TGT660
Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ser Gln Asp He Gly Ser Tyr Tyr Cys 220

CAA GAT TTT TGG GGT TCT CCG TGG AGT TTC GGT GGA GGC ACG AAG CTG GAA ATC AAA CCG720
Gln His He Trp Gly Ser Pro Trp Thr He Gly Gly Gly Thr Lys Lau Gln He Lys Arg 240

```

图 1 来自 mAb 13D8 基因的 scFv DNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of scFv DNA from mAb 13D8 gene

Note: Italics stand for linker.

2.2 scFv 基因表达载体的构建 将 mAb 13D8 的 V_H 和 V_L 基因通过 (GGGGS) 3 短肽连接成 scFv DNA 片段。经 *EcoR* I/*Sal* I 双酶切后, 克隆到 pTGT7 原核表达载体中, 得到表达质粒 pT-D8-scFv(图 2)。此载体表达出的 scFv 即带有 6 个 His 的标签。

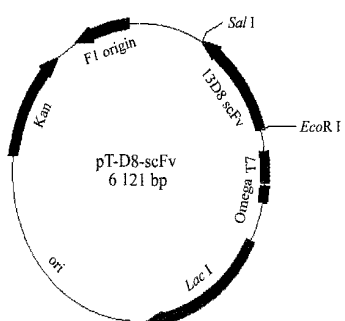


图 2 pT-D8-scFv 质粒的构建

Fig 2 Constructed plasmid pT-D8-scFv

2.3 scFv 基因在大肠杆菌中的表达 以重组质粒 pT-D8-scFv 转化大肠杆菌 ER2566 菌株表达 mAb 13D8 的 scFv。SDS-PAGE 结果表明, 在 M_r 约 32 000 处有

表达条带, 表达的 scFv 占菌体总蛋白量的 26.8% 左右, 且主要以不溶性的包涵体形式存在, 溶解于 8 mol/L 尿素中(图 3)。

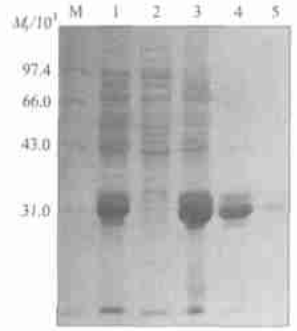


图 3 13D8 的 scFv 在大肠杆菌中的表达的 SDS-PAGE

Fig 3 Analysis of the expression of scFv in *E. coli* by SDS-PAGE
M: Protein marker; 1: Lysate of *E. coli* ER2566 expressing scFv; 2: Supernatant; 3: Supernatant precipitate; 4: scFv in 8 mol/L urea; 5: scFv after dialysis.

2.4 scFv 与 NE2 抗原结合活性的 ELISA 测定 将溶于 8 mol/L 尿素中的 scFv 蛋白透析复性后, 最终得到 scFv 的初纯品(图 3)。间接 ELISA 检测结果表明, scFv 在 1:1 稀释时的 $A_{450/620}$ 值为 2.04 ± 0.01 , 1:8 稀释时为 0.30 ± 0.02 , 而且随着 scFv 浓度的下降, $A_{450/620}$ 值逐渐降低, 说明表达的 scFv 能与 NE2 抗原特异性结合。

2.5 scFv 与 NE2 抗原结合活性的 Western blot 测定 将纯化的 NE2 抗原进行 SDS-PAGE, 并电转移至硝酸纤维素膜上, 滴加初步纯化并浓缩 20 倍的 scFv 与之反应, 再以 HRP 标记的鼠抗 His tag 抗体作为二抗进行显色。结果在 M_r 为 50 000 左右处出现显色条带, 表明 scFv 可特异性地与 NE2 起反应(图 4)。

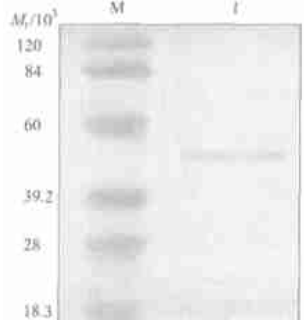


图 4 scFv 与 NE2 结合的 Western blot 分析

Fig 4 Analysis of the binding of scFv to NE2 by Western blot
M: Protein marker; 1: Reactive band for binding of scFv to NE2.

2.6 scFv 的抗原特异性检测 采用竞争 ELISA 法检测初步纯化出的 scFv 的抗原结合特异性。当将 HRP 标记 mAb 13D8 的浓度固定为 1:500 时, 其与 scFv 混

合反应的 $A_{450/620}$ 值随着 scFv 浓度的减少而逐步增大。当 scFv 做 1:1 稀释时, 竞争抑制率达到 72.95%, 表明表达的 scFv 与原 mAb 13D8 结合的为同一抗原表位, 二者具有相同的抗原结合特异性。

3 讨论

病毒性疾病的预防主要以病毒疫苗为主, 治疗上除特异性的抗病毒抗体外, 尚无其他特异性的治疗药物。本实验室制备的鼠 mAb 13D8 与 mAb 8C11 识别同一构象型表位, 都是 HEV 的中和抗体, 具有中和和阻断病毒感染的功能, 为潜在的 HEV 治疗性抗体药物。但异源抗体对于人体具有免疫原性, 会引起强烈的抗抗体免疫反应。scFv 含有完整抗原结合位点, 但其具有 M_r 小、免疫原性低和穿透力强等优点, 作为一种治疗制剂应用于临床优于完整抗体。

本研究中, 我们从分泌 mAb 13D8 的杂交瘤细胞中获得其 V_L 、 V_H 基因序列, 组装成 V_H -linker- V_L 型的 scFv 后, 在大肠杆菌中获得了高效表达(表达量达菌体总蛋白的 26.8% 左右)。但与多数 scFv 一样, 该 scFv 的表达主要以包涵体的形式存在。以这种形式表达的 scFv 虽产量高、速度快、成本低, 并可避免表达产物在细胞内降解, 但须经复性才能恢复其活性。现已有不少良好复性的方法^[10-12], 其中将包涵体经 8 mol/L 尿素变性和稀释透析复性后, 可得到具有免疫学活性的 scFv。我们用间接 ELISA 和 Western blot 分析表明, 复性的 scFv 能很好地与 NE2 抗原特异结合, 并表明其与原 mAb 13D8 识别同一表位。

目前, 基因工程抗体有细菌、酵母、哺乳动物细胞和昆虫细胞 4 个表达系统, 各有利弊。且不同的抗体在同一系统或同一抗体在不同系统的表达都会有所差异, 没有一个通用的表达模式^[13]。我们将在本研究的基础上, 继续探索 scFv 在其他表达系统中的表达, 通过寻找最佳的表达方式, 获得最高水平、最佳活性的表达, 为将其作为戊肝的诊断试剂和治疗性抗体药物提供可能性。

参考文献:

- [1] Wang YZ, Li H, Gu Z, *et al.* Detection of sporadic hepatitis E in China using immunoassays based on recombinant ORF2 and 3 polypeptides from HEV genotype 4[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 4370- 4379.
- [2] Meng XJ. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis[J]. *J Hepatol*, 2000, 33: 842- 845.
- [3] Zhang JZ, Ng MH, Xia NS, *et al.* Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein[J]. *J Mol Virol*, 2001, 64: 125- 132.
- [4] 李少伟, 张军, 夏宁邵, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18(4): 463- 467.
- [5] Im S, Zhang JZ, Zhuang H, *et al.* A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus[J]. *Vaccine*, 2001, 19: 3726- 3732.
- [6] 葛胜祥, 张军, 夏宁邵, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 多肽对恒河猴的免疫保护研究[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 35- 42.
- [7] 顾颖, 张军, 夏宁邵, 等. 生物传感器对戊型肝炎病毒单克隆抗体部分特性的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(6): 617- 620.
- [8] 顾颖, 葛胜祥, 黄果勇, 等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定[J]. 病毒学报, 2003, 19(3): 217- 223.
- [9] 罗文新, 张军, 杨海杰, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5): 53- 57.
- [10] 朱迎春, 王琰, 高荣凯, 等. 大肠杆菌表达的单链抗体柱复性的研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(2): 169- 172.
- [11] Jessica R, Sinacola, Anne S. Robinson. Rapid refolding and polishing of single-chain antibodies from *Escherichia coli* inclusion bodies[J]. *Protein Expr Purif*, 2002, 26: 301- 308.
- [12] Tsumoto K, Shinoki K, Kondo H, *et al.* Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent-application to a human single chain Fv fragment[J]. *J Immunol Meth*, 1998, 219: 119- 129.
- [13] Verma R, Boleti E, George AJT. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems[J]. *J Immunol Meth*, 1998, 216: 165- 181.