

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2015.11.12

抗鸡传染性法氏囊病病毒抗体 Fab 的表达及其中和活性的测定

张瑛杰¹, 尹杰超¹, 李天鹤², 周兵³, 徐鹏飞¹, 荆燕^{1,4}, 任桂萍^{1*}, 李德山^{1*}

(1. 东北农业大学 生命科学院生物制药教研室, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国科学院大学 生命科学院, 北京 100049;

3. 厦门大学 公共卫生学院, 福建 厦门 361005; 4. 东北农业大学 农业生物功能基因重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为表达抗鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)抗体 Fab 并检测其中和活性, 本研究将抗 IBDV 抗体的轻链(L)和重链片段(Fd)基因分别克隆于 pET-27b (+)载体中, 并转化于大肠杆菌 Rosetta (DE3)进行诱导表达。将 L 和 Fd 片段包涵体蛋白变性后等量混合于复性液中, 制备 Fab 并对其活性进行鉴定。结果显示 L 和 Fd 蛋白相对分子质量大小分别为 25 ku 和 28 ku。Western blot 和 ELISA 检测结果表明, 获得的抗体 Fab 大小约为 50 ku, 并且与 VP2 蛋白和不同病毒株均具有特异性结合能力。体外中和试验结果表明, 获得的 IBDV 抗体 Fab 具有中和活性, 可以有效阻断 IBDV (B87 株)对鸡胚成纤维细胞(DF1)的感染。本实验获得的 IBDV 抗体 Fab 有望成为治疗 IBD 的候选生物制剂, 为研制治疗 IBD 抗体制剂奠定了基础。

关键词: 鸡传染性法氏囊病病毒; Fab 抗体; 共复性; 中和活性; 治疗性抗体

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2015)11-0866-05

Expression and test of the neutralization Fab antibody against infectious bursal disease virus

ZHANG Ying-jie¹, YIN Jie-chao¹, LI Tian-he², ZHOU Bing³, XU Peng-fei¹, Jing Yan^{1,4},
REN Gui-ping^{1*}, LI De-shan^{1*}

(1. Laboratory of Biopharmaceutical, College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Life Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. College of Public Hygiene, Amoy University, Amoy 361005, China;

4. Key Laboratory of Agricultural Biological Functional Gene, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To express the neutralizing Fab antibody against infectious bursal disease virus (IBDV), the gene of light chain (L) or heavy chain fragment (Fd) against IBDV was cloned into the prokaryotic expression plasmid, respectively, and then the recombinant L or Fd was expressed in *E.coli* Rosetta (DE3), respectively, and purified through sole denaturation and co-renaturation of inclusion body. Western blot results showed that the Fab was approximately 50 ku. ELISA results showed that the Fab exhibited binding ability and specify to VP2 for different IBDV strains. The results of neutralization test *in vitro* showed that the Fab exhibited neutralizing activity to IBDV-B87 strain in chicken embryo fibroblast (DF1) cells. The Fab antibody prepared in this study is expected to become a candidate drug for treatment of IBD, which laid the foundation for the treatment of IBD.

Key words: infectious bursal disease virus; Fab; corenaturation; neutralizing activity; therapeutic antibody

*Corresponding author

收稿日期: 2015-05-26

基金项目: 黑龙江省应用技术研究与开发计划项目(GC13C104)

作者简介: 张瑛杰(1991-), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士研究生, 主要从事基因工程抗体药物研究。

* 通信作者: E-mail: deshanli@163.com; renguiping@126.com

传染性法氏囊病(Infectious bursal disease, IBD)是由 IBD 病毒(IBDV)引起的以损害雏鸡中枢免疫器官法氏囊为主要特征的急性接触性传染病,是危害养鸡业的重要传染病之一^[1]。该病除引起易感鸡发病死亡与产蛋性能下降外,还会造成严重的免疫抑制和免疫缺陷,增加鸡体对其他病原体的易感性,因而常继发和混合感染多种疾病。IBDV 属于双 RNA 病毒科双 RNA 病毒属^[2],主要结构蛋白有 4 种,其中 VP2 是最主要的宿主保护抗原,诱导机体产生中和抗体^[3-5],保护宿主免受 IBDV 的感染。随着生物工程制药技术的快速发展,具有高专一性、高亲和力、高效性和高可塑性的基因工程抗体被应用于疾病的临床诊断、预防、治疗及基础理论研究等各个领域^[6]。Fab 片段是由完整轻链(L)和重链(Fd)片段组成的异二聚体,大小为完整抗体的 1/3,具有较好的穿透力能够较快的达到组织病灶部位,并且能够较好地保留结合抗原的活性,因此成为应用较多的一种基因工程抗体^[7]。

本实验通过 PCR 扩增获得抗 IBDV 抗体 Fab 的 L 和 Fd 片段基因,将其分别克隆于 pET-27b(+)表达载体中,分别表达重组 L 蛋白和 Fd 蛋白后,利用变性液和复性液将其共复性获得具有中和活性的抗 IBDV 抗体 Fab。本研究为研制治疗 IBD 抗体制剂提供了新的方法和策略。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料 peedual-IRES 质粒(含抗 IBDV 全长抗体基因全序列)、IBDV 高免血清、VP2 蛋白均由本实验室制备;DF1 细胞、pET-27b(+)载体、*E.coli* DH5 α 及 Rosetta(DE3)株均由本实验室保存;不同 IBDV 疫苗株(1-65 株、MB 株、BJ836 株、NF8 株、Gt 株和 B87 株)购自不同的生物公司;限制性内切酶、T4 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体及 DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司;HRP 标记的兔抗鸡 IgG(IgG-HRP)购自 eBioscience 公司;引物由 Invitrogen 公司合成(表 1)。

1.2 抗 IBDV 抗体 Fab 重组表达质粒的构建及表达以 peedual-IRES 质粒为模板,采用引物 P1/P2 和 P3/P4 分别 PCR 扩增 L 和 Fd 基因,PCR 产物经测序正确后利用 *Nco* /*Bam*H 进行双酶切,并分别克隆于 pET-27b(+)载体中,构建重组质粒 pET-L 和

pET-Fd,将其分别转化于 Rosetta (DE3)株。重组菌经终浓度 0.25 mmol/L 的 IPTG 在 37 °C 下诱导培养 4 h。收集菌体经超声破碎后离心,分别取上清液和沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳检测。

表 1 目的片段扩增引物

Table 1 Primers used in the amplification of the target gene

Primers	Primer sequences (5'-3')
P1: Fab-L(F)	CCATGGGTGCGCTGACTCAGCCGTCCTCGGTGTC (<i>Nco</i>)
P2: Fab-L(R)	GGATCCATTAGCACTCGGACCTCTTCAGGGTCTTC (<i>Bam</i> H)
P3: Fab-Fd(F)	CCATGGGTGCCGTGACGTTGGACGAG (<i>Nco</i>)
P4: Fab-Fd(R)	GGATCCATTAGAGACCTGCACCTCTGGGG (<i>Bam</i> H)

1.3 包涵体 L 及 Fd 蛋白的变性复性 将 L 和 Fd 片段两种经变性液(8 mol/L 尿素, pH8.0)过夜变性的包涵体按等摩尔量的比例逐滴共同加入 10 倍体积的复性液(2 mol/L 尿素, pH8.0)中,4 °C 12 h 后置于 50 mmol/L 的 Tris-HCl 中透析 48 h。将 L 蛋白和 Fd 蛋白分别复性透析及共同复性透析后获得的样品于 4 °C 以 12 000 r/min 离心 15 min,取 20 μ L 上清,进行 SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝染色、脱色后观察结果。

1.4 重组抗体 Fab 的 western blot 检测 将 L、Fd、Fab 及 BSA 样品各 10 μ L 经 Native-PAGE 电泳并转印至 NC 膜上,在含 5 %脱脂乳的封闭液中 37 °C 封闭 2 h,洗膜后加入 VP2 蛋白(50 μ L/mL),37 °C 40 min,以 IBDV 高免血清为一抗(1:200),兔抗鸡 IgG-HRP 为二抗(1:7 500),利用显影仪曝光显影,检测各样品活性。

1.5 重组抗体 Fab 的亲和力和特异性检测 将抗 IBDV 的 Fab 抗体以浓度梯度 500 μ g/mL、100 μ g/mL、20 μ g/mL、4 μ g/mL 各 100 μ L 分别包被 96 孔板,检测其对 VP2 的结合能力;将浓度为 500 μ g/mL 的 Fab 抗体包被 96 孔板检测 Fab 抗体对不同 IBDV 株(1-65 株、MB 株、BJ836 株、NF8 株、Gt 株和 B87 株)的结合能力。设置 PBS 组作为背景对照 1,未加 VP2 蛋白或 IBDV 组为阴性对照 2,未加高免血清组为阴性对照 3,未加 HRP 标记兔抗鸡二抗组为阴性对照 4,利用 BSA 代替 VP2 蛋白或 IBDV 组为阴性对照 5,以及包被 L 蛋白组为阴性对照 6 和包被 Fd 蛋白组为阴性对照 7。样品及对照组均设置 3 个平行孔。4 °C 包被过夜,采用 5 %脱脂奶粉 37 °C 封闭 2 h,加入 VP2 蛋白(50 μ g/mL)或不同 IBDV 株(100 μ L),37 °C 1 h,以 IBDV 高免血清为一抗(1:200),兔抗鸡 IgG-HRP 为二抗(1:7 500),以 TMB 底物液

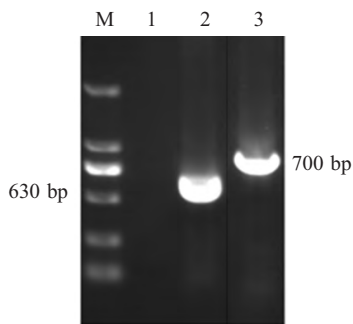
避光显色 5 min, 终止显色反应后, 酶标仪测定 OD_{450nm} 值。

1.6 IBDV 滴度的测定 将 IBDV 疫苗株 B87 经 10 倍倍比稀释(10⁻¹~10⁻¹²)后接种培养于 96 孔板中的 DF1 细胞单层中, 每个稀释度做 8 个复孔, 培养 5 d~7 d。根据细胞病变(CPE), 按照 Reed-Muench 方法计算病毒的 TCID₅₀。

1.7 重组抗体 Fab 中和活性的测定 将抗体 Fab 按 2 倍倍比稀释(500 μg/mL~0.977 μg/mL), 分别与 10⁰ TCID₅₀ 的 IBDV (B87 株)混合, 37 °C 孵育 1 h。混合液分别加至铺有单层 DF1 细胞的 96 孔板中, 对照组 1 加 10⁰ TCID₅₀ 的 IBDV, 对照组 2 加 DMEM, 对照组 3 加 L 蛋白和病毒混合液, 对照组 4 加 Fd 蛋白和病毒混合液, 实验组和对照组各 8 个复孔, 于 37 °C 5 % CO₂ 培养。逐日观察 CPE 并记录结果, 观察 5 d~7 d。

2 结果

2.1 抗 IBDV 抗体 Fab 重组表达质粒的构建及鉴定 以 pcedual-IRES 质粒为模板, P1/P2 和 P3/P4 为引物 PCR 分别扩增 L 和 Fd 基因, 测序正确后分别克隆于 pET-27b (+) 载体中, 构建重组质粒 pET-L 和 pET-Fd, PCR 鉴定结果显示, L 和 Fd 基因片段大小分别约为 630 bp 和 700 bp, 与预期结果相符(图 1)。

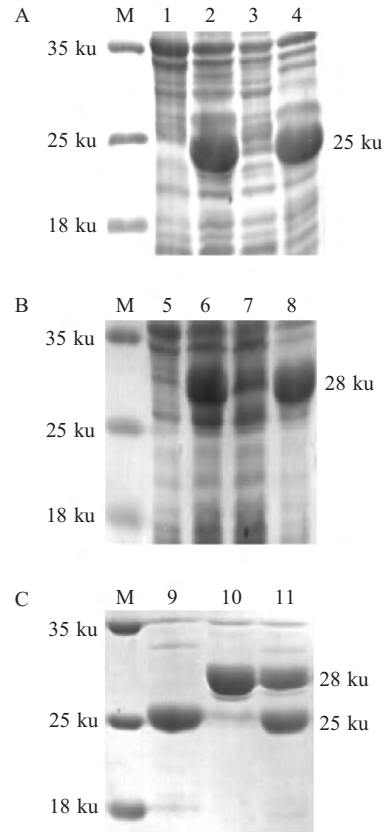


M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2: L PCR product; 3: Fd PCR product

图 1 重组质粒 pET-L 和 pET-Fd 的 PCR 鉴定
Fig. 1 PCR product of pET-L and pET-Fd plasmid

2.2 片段 L 及 Fd 的诱导表达及纯化 将构建的重组质粒 pET-L 和 pET-Fd 分别转化于 Rosetta(DE3)株进行诱导表达。诱导后菌体经超声破碎后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示, 重组 Rosetta (DE3)菌经诱导后分别在 25 ku 和 28 ku 处出

现目的蛋白条带, 与预期结果一致。并且 L 蛋白和 Fd 蛋白均以包涵体形式表达(图 2)。转化空载体的 Rosetta(DE3)菌无目的蛋白表达。



M: Protein Marker; 1, 5: Uninduced bacteria; 2, 6: Induced bacteria; 3, 7: Supernatant of induced bacteria; 4, 8: Precipitation of induced bacteria; 9: L protein; 10: Fd protein; 11: The corenaturation of Fab protein

图 2 重组 L (A)和 Fd (B)诱导表达及其纯化蛋白(C)的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 The expressions of L (A), Fd (B) and purification of the proteins (C) detected by SDS-PAGE

2.3 Fab 抗体的 western blot 检测 L、Fd、Fab 及 BSA 样品进行 Native-PAGE 后, 转膜封闭, 进行 western blot 检测, 结果显示共复性后的 Fab 大小约为 50 ku, 并且可与 VP2 蛋白特异性结合, 而单独复性获得的 L 蛋白、Fd 蛋白及 BSA 不能与 VP2 蛋白结合(图 3)。

2.4 重组抗体 Fab 的亲力和特异性检测 使用 VP2 蛋白和不同 IBDV 疫苗株对共复性获得的抗体 Fab 进行 ELISA 检测。结果显示, OD_{450nm} 值随抗体 Fab 浓度的递增呈现上升趋势, 具有剂量依赖性。样品组与 PBS 组及阴性对照组相比差异极显著($p < 0.01$), 表明抗体 Fab 对 VP2 蛋白和不同 IBDV 疫苗株均具有特异性结合能力, 并且抗体 Fab 对不同 IBDV 疫

苗株具有不同的结合能力(图 4)。

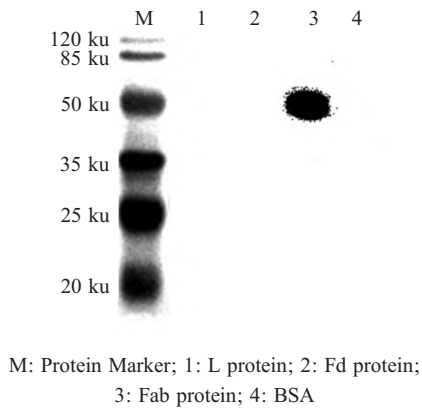


图 3 Fab 抗体的 western blot 分析

Fig. 3 The identification of Fab by western blot

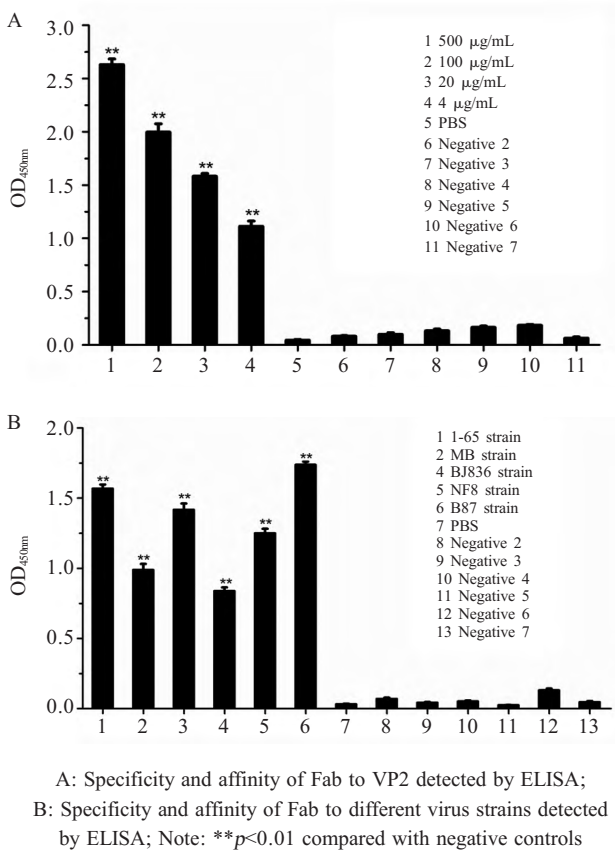


图 4 Fab 抗体的 ELISA 检测
Fig. 4 Fab detected by ELISA

2.5 重组抗体 Fab 中和活性的测定 将连续倍比稀释的抗体 Fab 与 10^0 TCID₅₀ (TCID₅₀= $10^{-8.4}/0.1$ mL) 的 IBDV(B87 株)混合孵育, 进行中和活性的测定, 结果显示, L 蛋白及 Fd 蛋白均无中和活性, 而抗体 Fab 具有中和活性, 其阻断病毒侵染 DF1 细胞的最小浓度为 3.906 μg/mL (表 2)。

表 2 抗 IBDV(B87 株)抗体 Fab 中和活性的检测
Table 2 Neutralization tests of the Fab antibody against IBDV (B87 strain)

Concentration of Fab (μg/mL)	The percent of CPE (%)				
	Fab and IBDV	IBDV	DMEM	L and IBDV	Fd and IBDV
500	0	100	0	100	100
250	0	100	0	100	100
125	0	100	0	100	100
62.5	0	100	0	100	100
31.25	0	100	0	100	100
15.625	0	100	0	100	100
7.813	0	100	0	100	100
3.906	0	100	0	100	100
1.953	100	100	0	100	100
0.977	100	100	0	100	100

3 讨论

近年来, 由于 IBDV 超强毒株和变异株的出现^[8-10], 使得 IBD 的发生和流行呈现出新的特点, 加大了诊断和防制的难度^[8]。目前, IBD 已遍布全球各地区, 成为威胁世界养禽业最重要的疾病之一^[11]。一般使用卵黄抗体和高免血清进行治疗, 然而, 因高免血清造价昂贵很少大规模使用, 而卵黄抗体也存在一些不可避免的弊端^[12], 如可能携带传染病病原体(如减蛋综合症、禽白血病、支原体等), 在应用时会产生过敏反应, 发病晚期应用疗效差等因素, 这些严重影响了卵黄抗体的应用。基因工程抗体作为以蛋白为基础的靶向诊断和治疗用生物制品, 在病毒性疾病预防方面备受重视^[13]。

本研究利用基因工程重组技术, 通过 PCR 扩增的方法获得了抗 IBDV 抗体 Fab 的 L 及 Fd 片段, 将它们分别克隆到表达载体 pET-27b(+)中进行表达, 共复性后获得了具有天然构象的重组抗体 Fab。Western blot 结果表明 L 蛋白与 Fd 蛋白能够通过共复性的方法利用链间二硫键结合在一起获得大小约为 50 ku 的抗 IBDV 抗体 Fab, 并且其可以与 IBDV VP2 蛋白特异性结合。ELISA 检测结果显示抗 IBDV 抗体 Fab 对 VP2 蛋白及不同 IBDV 疫苗株具有特异性结合能力, 而且其对不同病毒株具有不同的结合能力, 其结合能力大小依次为 B87 株 >1-65 株 >BJ836 株 >Gt 株 >MB 株 >NF8 株。体外中和试验结果表明获得的抗体 Fab 具有中和活性, 其能够阻断或抑制 IBDV (B87 株)对 DF1 细胞的侵染作用, 其阻断病毒的最小蛋白浓度为 3.906 μg/mL。

抗体 Fab 作为新型基因工程重组抗体之一, 有

望成为治疗病毒类疾病的候选药物^[14]。本研究首次获得了具有中和活性的抗IBDV抗体Fab,为后续研制IBD治疗性抗体提供了理论与技术支持。

参考文献:

- [1] Hermann M, Md R I, Rudiger R. Research on infectious bursal disease the past, the present and the future [J]. *Vet Microbiol*, 2003, 97(1-2): 153-165.
- [2] 陆承平. 最新脊椎动物病毒分类简介[J]. *中国兽医学报*, 1996, 16(1): 94-100.
- [3] Parry D A. Coiled-coils in a-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins [J]. *Bio Sci Rep*, 1982, 2(12): 1017-1024.
- [4] Engelman D M, Steitz T A, Goldman A. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins [J]. *Ann Rev Biophys Biophys Chem*, 1986, 15: 321-353.
- [5] 曾祥伟, 王笑梅, 高宏雷, 等. 传染性法氏囊病超强 Gx 株的致弱研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2003, 25(2): 140-144.
- [6] 刘向昕, 展德文, 张兆山. 细菌表面展示技术的应用研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2005, 33(2): 70-73.
- [7] 王小英, 林红, 张慧林, 等. 人源抗 Trop-2 抗体 Fab 的制备及条件优化[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(1): 35-39.
- [8] Brandt M, Yao Kun, Liu Mei-hong, et al. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus [J]. *J Virol*, 2001, 75 (24): 11974-11982.
- [9] 李德山, 武志强, 陈冠春, 等. 鸡传染性法氏囊病超强毒株德分离和初步鉴定[J]. *中国畜禽传染病*, 1996, 61(6): 3-6.
- [10] Brown M D, Skinner M A. Coding sequences of both genome segments of a European very virulent infectious bursal disease virus [J]. *Virus Res*, 1996, 40(1): 1-15.
- [11] Sapats S I, Heine H G, Trinidad L, et al. Generation of chicken single chain antibody variable fragments (scFv) that differentiate and neutralize infectious bursal disease virus (IBDV) [J]. *Arch Virol*, 2003, 148: 497-515.
- [12] Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review [J]. *J Med Food*, 2002, 5: 159-169.
- [13] 周兵, 李天鹤, 李宁, 等. 抗鸡传染性法氏囊病病毒单链抗体库的构建及其中和抗体的筛选[J]. *中国预防兽医学报*, 2014, 36(3): 227-231.
- [14] 刘美君, 高向东, 徐晨. Fab 类抗体的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2014, 41(3): 318-324.

(本文编辑: 彭永刚)