维普资讯 http://www.cqvip.com

第14卷第1期 中国病毒学 Vol.14 No.1
1999年3月 VIROLOGICA SINICA Mar 1999

抗 HBsAg 二硫键稳定性 Fv 抗体(dsFv)基因的构建与表达*

宁宏彬 毛春生** 陈 薇**
杜 勇** 徐德忠 王海涛**

(第四军医大学流行病学教研室,西安 710032)
**(军事医学科学院微生物流行病研究所,北京 100071)

R373.21
R512.620.2

摘 要 采用 PCR 定点突变方法,成功地构建了抗 HBsAg dsFv 抗体的轻、重链突变基因,NdeI 和 EcoRI 酶切后分别插入 pET20b 表达质粒,经测序证明在重链第 44 位氨基酸和轻链第 100 位氨基酸已突变形成半胱氨酸(Cys)。VH 和 VL 重组质粒分别转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,IPTG 诱导后,经 SDS-PAGE 电泳表明在 12 kD 处有包含体蛋白表达,表达蛋白含量分别为 28% 和 35%。VH 和 VL 包含体蛋白经 GuHCl 变性后,等量混合在复性折叠液中结合,形成了一个约 24 kD 并有一定活性的 dsFv 蛋白。抗 HBsAg dsFv 抗体表达及复性的成功,为今后基因工程抗体的研究及应用奠定了基础。

关键词 dsFv 抗体,HBsAg,PCR 定点突变,表达 2 乙型肝炎病毒

二硫键稳定性 Fv 抗体(disulfide stabilized Fv fragments, dsFv),是通过在重链的可变区(VH)和轻链的可变区(VL)之间形成二硫键来稳定 Fv 片段。和相应的 ScFv 相比,dsFv 的稳定性和亲和力都得到很大提高,并且也具有象 ScFv 小分子的优势,所以 dsFv 和 dsFv-免疫毒素在临床上具有很高的应用价值。自 1990 年 Glockshuber 等[1]第一次成功构建 MCP603 dsFv 抗体以来,dsFv 及 dsFv-免疫毒素的研究得到了突飞猛进的发展。我们采用 Jung 等[2]预测的通用突变位点,即重链的第 44 位氨基酸和轻链的第 100 位氨基酸(简写为 VH44/VL100),应用 PCR 定点突变方法,成功地构建了抗 HBsAg dsFv 轻、重链的突变基因,并分别在大肠杆菌中进行了表达,表达蛋白还正确还原折叠形成了 dsFv 蛋白,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 质粒 模板质粒是带有抗 HBsAg Fab 噬菌体抗体轻、重链基因的载体为本室构建,表达质粒 pET-20b 购自于 Novagen 公司。

1.2 引物 为将质粒中 Fd 基因突变成 dsFv VH 基因,设计了如下引物:

VH5:5'-GCGGAATTCATATGGTGAAACTGCTCGAACAGTCTGG-3'(位于 1～23 bp,划线处为 NdeI 酶切位点)

VHM:5'-TCCCATCCACTCAAGACACTGTCCAGGGGCCTGTCGCACC-3'(位于 108～147 bp,划线处为

收稿日期:1998-03-09,修回日期:1998-06-18
* 国家863计划重点资助项目 No.z18-01,此工作在军事医学科学院微生物流行病研究所完成

维普资讯 http://www.cqvip.com

突变位点)

VH3：5′-CGGAATTCATTATGACGAGACGGTGACCGTGGT-3′(位于340～360 bp，划线处为EcoRI酶切位点)

为将质粒中K链基因突变成dsFv VL基因，设计了如下引物：

VL5：5′-GCGGAATTCATATGGAGCTCGTGATGACCCAGT-3′(位于1～19 bp，划线处为NdeI酶切点)

VL3：5′-GGAATTCATTAAGTTCGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCACAGCCGAACGTCC-3′(位于293～333 bp，划实线为EcoRI酶切位点，划虚线处为突变位点)

VH和VL氨基酸位置(VH44/VL100)的选择，依据文献[3]。

1.3　构建dsFv VH突变基因的方法　采用Mega-primer PCR方法[4]。先用引物VH5和VHM以带有Fd基因的质粒为模板进行第一轮PCR：质粒DNA 5 ng，引物VH5和VHM各0.4 μg，Taq酶2 u，dNTP 1 μL，10×buffer 5 μL，加水至50 μL；扩增条件：94 ℃变性5 min，然后94 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30个循环，72 ℃ 3 min。PCR产物采用低熔点胶纯化回收，溶于50 μL TE中。以此纯化的PCR产物为Mega-primer引物(VH5-M)进行第二次PCR：质粒DNA 1 μg，引物VH5-M 3 μg，引物VH3 0.4 μg，Taq酶2 u，dNTP 1 μL，10×buffer 5 μL，加水至50 μL；扩增条件：94 ℃变性6 min，然后94 ℃ 2 min，55 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，循环30次，72 ℃ 5 min。扩增产物均在2%琼脂糖凝胶电泳，254 nm紫外灯下观察粉红色条带。采用第二次PCR产物进行测序。

1.4　构建dsFv VL突变基因的方法　采用常规PCR方法：质粒DNA 5 ng，引物VL5和VL3各0.4 μg，Taq酶2 u，dNTP 1 μL，10×buffer 5 μL，加水至50 μL，扩增条件同1.3第一次PCR。

1.5　突变基因的序列测定　VH和VL的PCR产物用NdeI和EcoRI双酶切，低溶点胶纯化回收后，与经NdeI和EcoRI双酶切的pET-20b载体连接，转化XL-1 blue细胞，用T7 promoter和T7 terminater引物进行双脱氧末端终止法测序。

1.6　VH和VL蛋白的表达　将上述1.5制备的重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)，用PCR法鉴定阳性克隆。将含重组质粒的单个菌落置于2 mL LB培养液(Amp 100 mg/mL)中，37 ℃振摇过夜。第二天，分别取30 μL菌液转种于2 mL LB培养液(Amp 100 mg/mL)中，37 ℃振摇3～4 h至OD_{600}=0.6～1.0，加IPTG至0.4 mmol/L，继续振摇3 h。诱导后菌液6000 r/min离心10 min，弃上清，加100 μL 1×上样缓冲液，95 ℃水浴5 min，12 000 r/min离心1 min。取上清加样于SDS-PAGE电泳，考马氏亮兰染色，脱色后观察结果。SDS-PAGE凝胶在双薄层扫描仪(Shimadzu CS-930)检测蛋白表达含量。

1.7　VH和VL包含体蛋白的分离　50 mL菌液按上述1.6进行诱导表达，6000 r/min离心5 min，弃上清，沉淀用5 mL 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0，2 mmol/L EDTA悬浮，加溶菌酶至100 μg/mL及0.5 mL 1% Triton X-100，30 ℃水浴15 min。置冰上，超声波粉碎细胞，4 ℃，12 000 r/min离心15 min，上清包含可溶性蛋白，取50 μL加等量2×上样缓冲液；沉淀包含水不可溶蛋白，加100 μL 1×上样缓冲液，加样于SDS-PAGE电泳，考马氏亮兰染色，脱色后观察结果。

1.8　VH和VL蛋白折叠形成dsFv蛋白　VH和VL包含体分别在GuHCl变性缓冲液中溶解，然后混合加入折叠缓冲液(0.1 mol/L Tris，HCl，0.5 mol/L L-arginine，8 mmol/L GSSG，2 mmol/L EDTA)中，10 ℃温育24～36 h，VH和VL折叠、结合形成dsFv。取折叠液100 μL，加1×上样缓冲液(不含β-巯基乙醇)，加样于SDS-PAGE电泳，考马氏亮兰染色，脱色后观察结果。具体方法参见文献[5]。

1.9　dsFv蛋白的纯化及活性检测　10 kD和30 kD超滤柱均购自美国Amicon公司。取10 mL折叠液加入30 kD超滤柱，4 ℃，4000 r/min离心4 h，去除未折叠的VH和VL，然后把未滤过的液体转入10 kD超滤柱，4 ℃，4 000 r/min离心4 h，进行浓缩。取100 μL浓缩后的折叠液进行SDS-PAGE电泳，观察纯化结果。以2 μg/mL的抗HBsAg的dsFv蛋白包被ELISA板孔，4 ℃过液，2%BSA封闭，分别加入适量的HBsAg和HCV C区重组抗原，再加入酶标抗HBsAg和酶标抗HCV，以底物邻苯二胺显色，在495 nm处测定吸光值(OD_{495})，重复三次计算其平均值。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2 结果

2.1 测序结果

VH和VL的PCR产物与pET-20 b载体连接，转化XL-1 blue细胞后，用T7 promoter和T7 terminater引物进行双脱氧末端终止测序。VH和VL的序列分别见图1和图2。

```
Sequence: VH  Length: 381
  GGAATTCAT ATG GTG AAA CTG CTC GAA CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT 54
            M   V   K   L   L   E   Q   S   G   A   E   V   K   K   P
            GGG TCC TCG GTG AAG GTC TCC TGC AGG GCT TCT GGA GAC ACC TTC 99
            G   S   S   V   K   V   S   C   R   A   S   G   D   T   F
            AAT ATC TAT GCT TTC AGC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAG TGT 144
            N   I   Y   A   F   S   W   V   R   Q   A   P   G   Q   C
            CTT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT TTC CTT GGT ACA GTA AAC 189
            L   E   W   M   G   G   I   I   P   F   L   G   T   V   N
            TAC GCA CAG AAC TTC CAG GGC AGA GCC ACA ATT ACC GCG GAC AAA 234
            Y   A   Q   N   F   Q   G   R   A   T   I   T   A   D   K
            TCC ACG AGC ACA GCC TAC ATG TAC CTG AGC AGC CTG AGA TTT GAC 279
            S   T   S   T   A   Y   M   Y   L   S   S   L   R   F   D
            GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CGA TAT ACA TAC TAT 324
            D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   D   R   Y   T   Y   Y
            TAT GGT ATG GAC GCC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCG 369
            Y   G   M   D   A   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S
            TCA TAA TGA ATT  381
            S   #   @   I
```

图1 抗HBsAg dsFv抗体重链可变区的基因序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 DNA and deduced amino acid sequences of VH of dsFv against HBsAg

从VH和VL序列，我们可以看出VH第44位氨基酸已由Gly(GGC)突变成Cys(TGT)，VL第100位氨基酸已由Gln(CAA)突变成Cys(TGT)。原序列及氨基酸位置分别参见文献[6]和[3]。

2.2 VH和VL蛋白的表达

SDS-PAGE检测可见VH和VL重组质粒分别在12 kD处有蛋白表达带，VL蛋白稍大，并且都是以包含体形式表达(图3)，密度扫描检测VH和VL蛋白表达量分别约为28%和35%。

2.3 VH和VL蛋白正确折叠形成dsFv

VH和VL包含体经GuHCl溶解后，等量混入折叠液中折叠36 h。SDS-PAGE检测可见VH和VL蛋白在24 kD处折叠形成了一个融合蛋白，此蛋白经β-巯基乙醇处理或者煮沸5～

维普资讯 http://www.cqvip.com


```
Sequence: VL  Length: 372
 GGAATTCAT ATG GAG CTC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC ACC CTG TCT TTG TCT 54
           M   E   L   V   M   T   Q   S   P   D   T   L   S   L   S
           CCA GAC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA ACA GCC ACC CTC TCC 99
           P   D   T   L   S   L   S   P   G   E   T   A   T   L   S
           TGC AGG ACC AGT CAG AGT ATT AGC AGC AAC TAC TTA GCC TGG TTC 144
           C   R   T   S   Q   S   I   S   S   N   Y   L   A   W   F
           CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATG TTT GCT ACA 189
           Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   M   F   A   T
           TCC TAC ATG ACC TCT GAC TTC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG 234
           S   Y   M   T   S   D   F   P   D   R   F   S   G   S   G
           TCT GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG CAG CCT GAA 279
           S   G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   Q   P   E
           GAT GTT GCA GTG TAT TAT TGT CAG CAG TAT GGT TAC TCA CCG TGG 324
           D   V   A   V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   Y   S   P   W
           ACG TTC GGC TGT GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA ACT TAA TGA 369
           T   F   G   C   G   T   K   V   E   I   K   R   T   #   @
           ATT  372
           I
```

图2　抗HBsAg dsFv抗体轻链可变区的基因序列及推导的氨基酸序列

Fig.2　DNA and deduced amino acid sequences of VL of dsFv against HBsAg

10 min均可还原为VH和VL两个蛋白,但此融合蛋白可耐受37 ℃ 15 min没有发生还原(图4)。

2.4　dsFv的活性检测

经DSD-PAGE分析,在24 kD处有一条经超滤柱纯化并浓缩的dsFv蛋白带。ELISA结果显示,在dsFv-HBsAg-酶标抗HBsAg反应系统中,OD_{495}平均为0.75,而在以dsFv-HCV C区抗原-酶标抗HCV反应系统中,OD_{495}平均为0.07,这说明我们表达的dsFv不仅对HBsAg有一定的亲和活性,还具有很好的特异性。

3　讨论

免疫球蛋白的Fv片段是由重链的可变区(VH)和轻链的可变区(VL)组成的异二聚体,Fv是针对特异性抗原具有高亲和力的最小功能分子。由于IgG或Fab片段是靠链间二硫键连接的,而Fv片段则不是,所以Fv很不稳定。1988年,Huston等[7]在VH和VL链之间通过一个连接肽(linker peptide)来增强其稳定性,称为单链抗体(ScFv),但ScFv在很多情况下,稳定性也不理想,容易解离形成多聚物沉淀,而dsFv抗体是靠链间二硫键连接的,和相应的ScFv相比,稳定性和亲和力都得到很大提高。我们采用PCR定点突变方法,成功地构建了抗HBsAg

维普资讯 http://www.cqvip.com

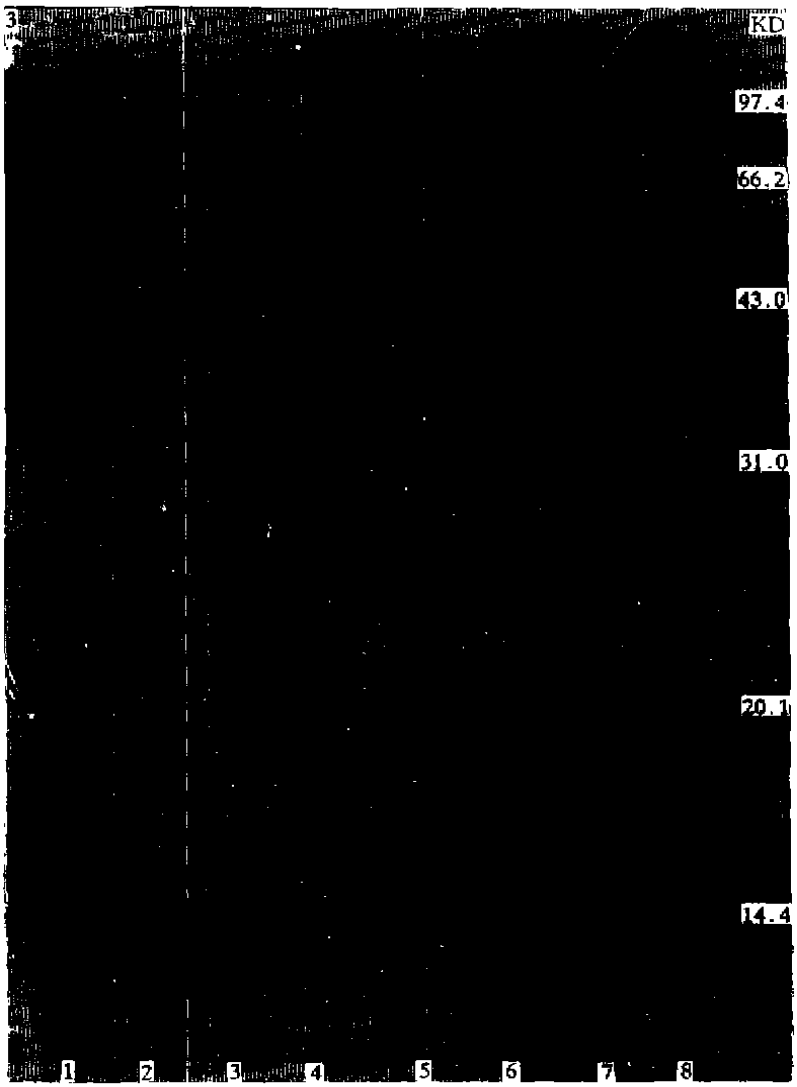

图3 VH和VL重组质粒表达产物SDS-PAGE分析(12%聚丙烯酰胺凝胶)

1. 全细胞裂解液(未诱导); 2. 转化VL表达质粒的细胞裂解液沉淀(IPTG诱导)

3. 转化VH表达质粒的细胞裂解液沉淀(IPTG诱导); 4. 转化VL表达质粒的细胞裂解液上清(IPTG诱导).

5. 转化VH表达质粒的细胞裂解液上清(IPTG诱导); 6. 转化VL表达质粒的全细胞裂解液(IPTG诱导).

7 转化VH表达质粒的全细胞裂解液(IPTG诱导); 8. 蛋白质分子量标准.

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed VH gene and VL gene of dsFv against HBsAg from *E. coli*.

1. Total cell protein; 2. Insoluble fractions of cell expressed VL gene.

3. Insoluble fractions of cell expressed VH gene;

4. Soluble fractions of cell expressed VL gene.

5. Soluble fractions of cell expressed VH gene;

6. Total fractions of cell expressed VL gene.

7. Total fractions of cell expressed VH gene; 8. Protein molecular weight markers.

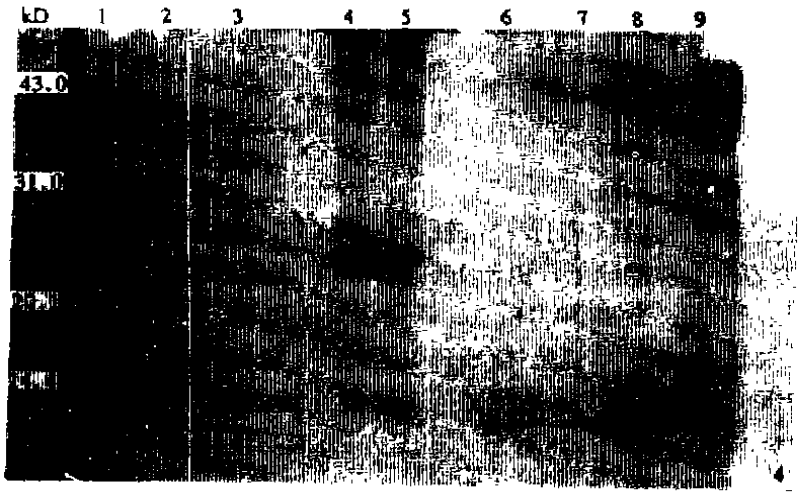

图4 VH和VL蛋白折叠形成dsFv蛋白SDS-PAGE分析(12%聚丙烯酰胺凝胶)

1. 蛋白分子量标准; 2 dsFv煮沸5 min.

3. dsFv煮沸10 min; 4. dsFv 37℃水浴10 min. 5. VH和VL折叠形成dsFv; 6. 折叠前VH和VL的混合物. 7. VL表达产物;

8. dsFv加β-巯基乙醇; 9. VH表达产物.

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of VH protein and VL protein folding into dsFv

1. Protein molecular weight markers; 2. dsFv boiled 5 min; 3. dsFv boiled 10 min; 4. dsFv incubated 10 min at 37℃; 5. VH protein and VL protein folding into dsFv; 6. VH protein and VL protein diluted into refolding buffer;

7. VL protein; 8. dsFv incubated with β-mercaptoethanol; 9. VH protein.

维普资讯 http://www.cqvip.com

dsFv轻重链的突变基因，分别在大肠杆菌中得到表达，表达产量分别为28%和35%。VH和VL蛋白通过在折叠液中复性，形成了一个融合蛋白dsFv，此蛋白不仅有很好的稳定性，还对HBsAg有一定的亲和活性，而且特异性也不错。

VH和VL重组蛋白以包含体形式存在细胞内，通过裂解细胞，包含体分离出来，溶解在6 mol/L的盐酸胍中，在复性溶液中还原，折叠过程需要用大量的氧化型谷胱甘肽，它会增加有活性dsFv蛋白的产量[8]。这是由于二硫键的形成需要氧化型谷胱甘肽参加，它的二硫键与重组蛋白中的半胱氨酸(Cys)的巯基之间产生交换，使其巯基转换成氧化的二硫键，谷胱甘肽还原成它的巯基形式。二硫键对稳定蛋白质的结构有重要作用，折叠的蛋白质分子通过二硫键的作用变得更加稳定。

参 考 文 献

1 Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I *et al*. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv fragments. Biochemistry, 1990, 29: 1362

2 Jung SH, Pastan I, Lee BK *et al*. Design of interchain disulfide bonds in the framework region of the Fv of the monoclonal antibody B3. Proteins: Structure, Function and Genetics, 1994, 18: 35

3 Kabat EA, Wu TT, Perry HM *et al*. Sequences of proteins of immunological interest. 5th ed. NIH publication, 1991: 91

4 Barik S, Galinski M. "Mega-primer" method of PCR: Increased template concentration improves yield. Bio Techniques, 1991, 11: 489

5 Webber KO, Reiter Y, Brinkmann U *et al*. Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog. Mol Immunol, 1995, 32: 249

6 王学，王海涛，陈万荣等. 人抗体组合文库的构建和抗HBsAg噬菌抗体的筛选. 生物化学与生物物理学报, 1997, 2: 183

7 Huston JS, Levinson D, Mudgett HM *et al*. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-dodoxigenin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 5879

8 Reiter Y, Brinkmann U, Lee B *et al*. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. Nature Biotech, 1996, 14: 1239

Construction, Expression and Folding of dsFv Mutated Gene of Human Antibody to HBsAg

Song Hongbin　Mao Chunsheng　Chen Wei　Du Yong　Xu Dezhong　Wang Haitao

(*Department of Epidemiology, The Fourth Military Medical University, Xi'an* 710032)

Abstract　The mutated gene of dsFv to HBsAg by PCR-based point mutagenesis method was constructed and sequenced. The mutated genes of VH and VL were cloned into plasmid pET-20 b and sequenced with the dideoxynucleotid method. The results showed that the cysteines were introduced into position 44 aa of VH and position 100 aa of VL. The recombinaint plasmids of VH and VL which were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) separately produced a 1.2 kD inclusion body protien upon induction with IPTG. The expression level of VH(and VL) protein was 28% (and 35%). VH and VL inclusion bodies were solubilized and combined in equal molar ratio in the refolding solution. Then, VH and VL were folded into a 24 kD protein—anti-HBs dsFv which showed strong binding to HBsAg. These have laid a fundation to apply the dsFv against HBsAg.

Key words　DsFv, HBsAg, PCR-based point mutagenesis method, Expression