

408-413

18

噬菌体表面表达抗汉坦病毒衣壳蛋白单链抗体的研究*

李光富¹, 唐家琪¹, 陈宇萍², 王琰², 操敏¹, 李先富¹, 潘秀珍¹¹(南京军区军事医学研究所 南京 210002)²(海军总医院 北京 100037)

关键词: 单链抗体; 肾综合征出血热病毒; 噬菌体表面表达

中图分类号: Q939.48 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2000)04-0409-05

2939.48
278

噬菌体展示表达(Phage display expression)的主要特点是将特定分子的基因型和表型统一在同一噬菌体颗粒内,其基因组中含有表达蛋白基因,在噬菌体表面进行特定的表达。该技术为研制工程抗体提供一新的途径,在九十年代逐渐被人们认识并得到极其广泛的应用^[1,2]。噬菌体表面表达技术适于表达Fv和Fab分子片段,当表达的抗体基因与噬菌体外壳蛋白基因Ⅲ融合时,在噬菌体颗粒表面呈现单价表达,与噬菌体外壳蛋白基因Ⅳ融合时,呈现多价表达。本文将克隆的鼠抗汉坦病毒衣壳蛋白抗体轻、重链可变区基因^[3],经PCR扩增后,插入载体pscMH中构建成噬菌体单链抗体表达载体,转化大肠杆菌表达出噬菌体单链抗体,使基因型和表型统一在同一噬菌体病毒颗粒内。并通过ELISA测定了抗体与HV的结合活性,为进一步构建用于快速诊断HV的双特异基因工程抗体打下基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株、抗原及主要试剂

噬菌体抗体表达载体 pscMH 为 phagemid,由海军总医院中心实验科在 pComb3His 基础上改建。大肠杆菌菌株 XL-Blue 购自美国 Stratagene 公司, HV 毒株系预防医学科学院杭长寿研究员惠赠, HRP-羊抗 M13 噬菌体抗体购自瑞典 Pharmacia 公司, HRP-anti-HVMcAb 系本室标记并保存,各种工具酶、细菌培养试剂均购自 Promega 公司, PCR 试剂盒购自上海生工生物工程公司。

1.2 寡核苷酸引物

为将鼠源抗 HV 抗体轻、重链可变区基因插入表达载体 pscMH,设计合成了寡核苷酸引物,扩增重链可变区(VH)基因的引物为: VH51 CAGCTGCTCGAGGGCGCAGGTCCAGCTGCAG,下划线处为 Xho I 酶切部位; VH31 GGCCACTAGTTGCAGAGAGACAGTCACCAGGGTCCCTTGGCCCCAGTA,下划线处为 Spe I 酶切部位。扩增轻链可变区(Vk)基因的引物为: VK51 为 CGGCCGAGCTCATGATTGAGCTCACCCAGTC,下划线处为 Sac I 酶切部位; VK31 为 CGCAGCCTCTAGACCGTTTGATTTCAG,下划线处为 Xba I 酶切位置。

收稿日期:1999-08-30,修回日期:1999-10-26

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670654)

作者简介:李光富(1964年-),男,皖籍,助理研究员,硕士,从事分子免疫学研究。

1.3 PCR反应

分别以载有抗HV抗体重链及轻链可变区基因的质粒为模板^[3],分别加入重链引物VH51 4 μL、VH31 4 μL和轻链引物VK51 4 μL、VK31 4 μL, 10×buffer 10 μL, 10 mM dNTP 1.25 μL, 25 mM MgCl₂ 2 μL, 用双蒸水补充体积至100 μL,各自进行PCR扩增。反应参数如下:94℃变性2 min;94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 70℃ 1 min,共循环30次,最后一次循环后,72℃延伸10 min。

1.4 噬菌体 scFv 表达载体的构建

将PCR扩增的Vk基因经Sac I + Xba I双酶切后克隆到载体pscMH中的相应酶切位点,扩增后提取质粒,酶切鉴定后获得阳性重组质粒DNA。再将PCR扩增的VH基因以Xho I + Spe I双酶切,与相同内切酶消化的轻链重组质粒连接,电穿孔转化XL-Blue,提取质粒后酶切鉴定。

1.5 DNA序列测定

采用Sanger双脱氧链终止法在ABI377全自动序列分析仪进行序列测定。

1.6 噬菌体 scFv 的制备

挑取含有scFv基因的重组XL-Blue菌落,接种于含氨苄青霉素的SB培养液2 mL中,37℃培养至A₆₀₀约为0.2~0.4时,加入30 μl辅助病毒VCSM13,37℃培养过夜,离心收集上清。

1.7 噬菌体 scFv 的 ELISA 检测

参照文献^[4]进行,以1 μg/mL HV抗原包被ELISA板,4℃过夜,3%BSA封闭1 h,将噬菌体scFv培养上清与等体积的1%BSA混合,室温静置15 min后加样,孵育洗涤,加入HRP-羊抗M13抗体进行结合反应,以OPD显色。在酶标仪上读取A₄₉₀值。试验以辅助病毒为阴性对照。

1.8 竞争抑制 ELISA

HV抗原(1 μg/mL)溶于0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中,100 μL/孔包被酶标板,4℃过夜。PBS洗涤,加满1%BSA,37℃孵育1 h,0.05% Tween-PBS洗涤三次,加入噬菌体scFv:HRP-anti-HV McAb混合物(1:1)100 μL/孔,37℃孵育1 h,使两者竞争与HV结合,洗涤,以OPD显色,测定吸光度。以加入辅助噬菌体VCSM13上清:HRP-anti-HV McAb混合物(1:1)为阴性对照。抑制率计算公式:抑制率%=(阴性对照A值-待测样本A值)/阴性对照A值×100%。

2 结果与讨论

2.1 噬菌体 scFv 表达载体的构建

将PCR扩增的Vk和VH基因,先后通过相应酶切位点组装到表达载体pscMH中(图1),经电穿孔转化XL-Blue细菌后,随机挑取单个克隆,进行内切酶图谱分析,证实获得了阳性重组克隆。噬菌体抗体(phage antibody)技术是近年来发展起来的重要工程抗体技术,王琰等^[5]将表达Fab的载体改造成表达scFv的载体,并已成功地表达多种抗体^[6,7]。表达的scFv

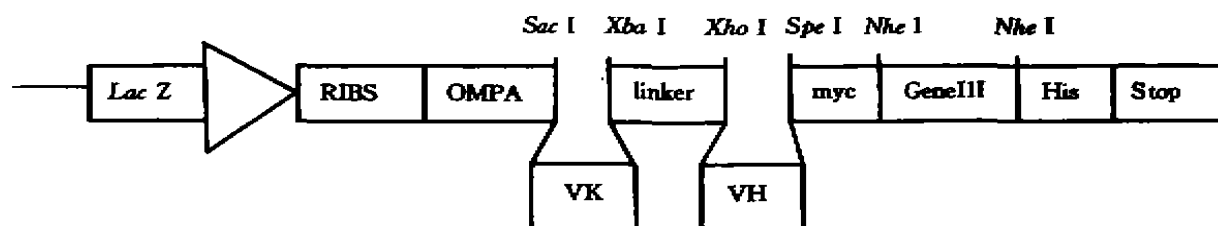


图1 噬菌体 scFv 表达载体 pscHV 的构建

Fig.1 The construction of phage scFv expression vector

Vk
 GAGCTCATGATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCCTTA TCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAGTCTC
 GluLeuMetIleGluLeuThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerLeuGlyGluArgValSerLeu
 ACTTGTCCGGCAAGTCAGGAAATTAGTGGTTACTTAAGCTGGCTTCAGCACAAACCAGATGGA ACTATT
 ThrCysArgAlaSerGlnGluIleSerGlyTyrLeuSerTrpLeuGlnHisLysProAspGlyThrIle
 AAACGCTGATCTACGCCGCATCCACTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGTT CAGTGGCAGTAGGTCT
 LysArgLeuIleTyrAlaAlaSerThrLeuAspSerGlyValProLysArgPheSerGlySerArgSer
 GGGTCAGATTACTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAA
 GlySerAspTyrSerLeuThrIleSerSerLeuGluSerGluAspPheAlaAspTyrTyrCysLeuGln
 TATGCTAGTTATCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCGGCC
TyrAlaSerTyrProTrpThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGluIleLysArgAlaAspAlaAlaAla
 GCTGGATCC
 AlaGlySer
 VH
 CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTGGTGAGGCTGGAGCTTCAGCGAAGCTGTCTGCAAG
 GlnValGlnLeuGlnGluSerGlyProSerLeuValArgProGlyAlaSerAlaLysLeuSerCysLys
 GCTTCTGGCTACGCCTTCACCAGCTCCTGGATGCACTGGGCGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAG
 AlaSerGlyTyrAlaPheThrSerSerTrpMetHisTrpAlaLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGlu
 TGGATTGGAGAGATTCACTAATAGTGGTAATACTAACAATGAGAGGTTCCAGGGCAAGGCCACA
 TrpIleGlyGluIleHisProAsnSerGlyAsnThrAsnTyrAsnGluArgPheGluGlyLysAlaThr
 CTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACGTGGATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGC
 LeuThrValAspThrSerSerSerThrAlaTyrValAspLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAla
 GTCTATTACTGCGCAAGATCGGGAACTACGGTAGTAGCGTGCTCTGGTTTCTTACTGGGGCCAAGGG
 ValTyrTyrCysAlaArgSerGlyAsnTyrGlySerSerValLeuTrpPheAlaTyrTrpGlyGlnGly
 ACCCTGGTCACTGTCTCTCTGCAA
 ThrLeuValThrValSerLeuGln

图 2 抗 HV-F₃ 株 scFv 的 DNA 序列和氨基酸序列

Fig. 2 DNA and amino acid sequences of the anti-HFRSV F3 strain scFv

Amino acids were shown by three letters code. CDRs were indicated by underline

系由接头(GGGS)^[8]将 Vk 和 VH 连接到一起,该接头具有一定的长度、柔软性和亲水性,使表达出的 scFv 与其亲本 Fab 具有相同的抗体结合活性。

2.2 DNA 序列分析

选取 4 个克隆,测定其 Vk 和 VH 的 DNA 序列,证实 Vk 基因含有 354 个碱基,编码 118 个氨基酸;VH 有 369 个碱基,编码 123 个氨基酸(图 2)。

2.3 噬菌体 scFv 的活性检测

以噬菌体 scFv 表达载体 pscHV 转化 XL-Blue 菌株,制备噬菌体 scFv,用 ELISA 检测,证明噬菌体 scFv 具有 HV 结合的活性(表 1)。说明 scFv 已成功地在噬菌体颗粒表面表达,且具

有克隆抗体基因表达产物的特异性,可作为进一步构造诊断 HV 用双特异抗体的基础。亲本 F₃ 株单抗 McAb 在 1:200 以上稀释度时与特异抗原反应,值为 1.0。对比表明噬菌体 scFv 与 HV 虽有较高的结合活性,但与亲本单抗相比仍有一定的差异。此外,我们在研究中还发现,原核细胞对鼠源抗体基因表达水平较低。

表 1 ELISA 检测噬菌体 scFv 结合 HV 活性结果

Table 1 Detection of binding of phage scFv to HFRSV by ELISA

	Phage-scFv	Ab control	Ag control
A490	1.12 ± 0.02	0.1 ± 0.02	0.06 ± 0.01

Ab control: Helper phage; Ag control: HBsAg was used as coating Ag

表 2 竞争性 ELISA 测定噬菌体 scFv 活性

Table 2 phage scFv activity determined by competition ELISA

Coating	The percentage of inhibition of the competitor (%)		
	BSA	HBsAg - Fab	HFRSV - scFv
Ag			
HV	0	5	42

2.4 竞争 ELISA 测定的噬菌体 scFv 活性

竞争 ELISA 结果见表 2,进一步证明噬菌体 scFv 具有结合抗原活性。目前,王琰等已从噬菌体抗体库中克隆到抗人 RBC 单链抗体基因,其表达出的 scFv 抗体与 ABO 血型抗原无反应,可与所有人 RBC 结合。我们将该基因与抗 HV-scFv 基因串联构建了双特异抗体(Diabody)表达系统^[8],其产物可通过血凝反应,快速检测 HV 抗原。

参 考 文 献

- [1] Winter G, Geriffiths AD, Hawkins RE, *et al*. Making antibodies by phage display technology[J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12:433-437
- [2] Wright A, Shin SU, Morison SI. Genetically engineered antibodies: progress and prospects[J]. *Crit Rev Immunol*, 1992, 12:125.
- [3] 李光富,唐家琪,操敏,等.鼠抗 HFRSV 衣壳蛋白 Mc-AbF3 株可变区基因的获取及特性[J]. *微生物学免疫学进展*, 1999, 27(2):1-11
- [4] 陈竞华,王琰,刘群英,等.人源性噬菌体抗体库的构建及 HBsAg 人单抗的筛选[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, 15(3):158
- [5] 张光发,王琰,王雅明,等.噬菌体抗体库的构建及抗肿瘤单抗的筛选[J]. *中华肿瘤学杂志*, 1995, 17(4):258
- [6] 王琰,刘群英,高军凯,等.单链抗体(ScFv)表达载体的构建及抗 HBsScFv 的表达[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1997, 17(1):168
- [7] Huston JS, Mudgett-Hunter M, Tai MS, *et al*. Protein engineered of single chain Fv analogus and fusion proteins[J]. *Methods in Enzymol*, 1991, 203:46
- [8] Holliger P, Prosper T, Winter G. "Diobodies": small bivalent and bispecific antibody fragment[J]. *Proc Natl Sci, USA*, 1995, 90:6444-6448

Study on the Phage Display Expressing Anti-Hantavirus Capsid Protein scFv

LI Guang-fu¹, TANG Jia-qi¹, CHEN Yu-ping², WANG Yan², CAO Min¹,
LI Xian-fu¹, PAN Xiu-zheng¹

¹(*Institute of Military Medicine, Nanjing Military Command, PLA, Nanjing 210002, China*)

²(*Navy General Hospital, Beijing 100037, China*)

Abstract: The expression vector of anti-Hantavirus(HV) capsid protein scFv was constructed by DNA recombination and PCR technique, and expressed in *E. coli*. The expressed scFv was fused with the phage Gene III protein, and located on the surface of phage. The sequencing of scFv demonstrated that the sequence of scFv is consistent with that of cloned antibody variable region from F3 strain hybridoma against HV capsid protein. The expressed scFv was proved to be able to bind HV antigen by ELISA.

Key word: scFv; Hantavirus; Phage display expression