

丙型肝炎病毒包膜蛋白 E2 可溶性单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达*

成军,施双双,钟彦伟,夏小兵,王刚,王琳,刘妍,陈菊梅

(解放军第三〇二医院传染病研究所基因治疗研究中心,北京 100039)

Expression of Soluble Human ScFv Against Envelope Protein E2 of Hepatitis C Virus Antigen in *E. coli*.CHENG Jun, SHI Shuang-shuang, ZHONG Yan-wei, XIA Xiao-bing,
WANG Gang, WANG Lin, LIU Yan, CHEN Ju-mei

(Gene Therapy Research Center, Institute of Infectious Diseases, The 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract: To construct expressive vector for human ScFv against E2 protein of hepatitis C virus (HCV-E2-ScFv), and express soluble HCV-E2-ScFv in *E. coli* JM109, using phage display technique, the recombinant phages were panned by recombinant E2 antigen which was coated in a microtiter plate, after five rounds of biopanning, 46 clones were identified specific to E2 antigen. 750 bp fragment could be released from the plasmid of positive phage colonies, and the sequenle analysis indicated that we have got the ScFv BNA fragment. And then DNA fragment was inserted into expressive vector pCANTAB5E and *E. coli* host JM109 was transformed and induced by IPTG. The specificity of ScFv in the culture medium was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The molecular weight of expressed HCV-E2-ScFv is 28kD by SDS-polyacrymide gel electrophoresis (PAGE). The expressed HCV-E2-ScFv will be useful in the immunohistochemical study of liver tissue and gene therapy against HCV infection.

Key words: HCV; E2; Single chain Fv antibody; Expression

摘要: 利用分子生物学技术,构建表达丙型肝炎病毒(HCV)包膜蛋白 E2 的人源单链可变区抗体(ScFv)的原核表达载体,并在大肠杆菌 JM109 中表达可溶性的 HCV-E2-ScFv。以重组的 HCV E2 蛋白为包被抗原,利用噬菌体抗体库的表面展示技术,筛选到含有 HCV-E2-ScFv 基因的噬菌体克隆,从噬菌体抗体阳性克隆中提取质粒,经 *Nco* I/*Not* I 酶切鉴定后,该 ScFv 基因由 750bp 组成,将其亚克隆到 pCANTAB5E 载体中,转化大肠杆菌 JM109,提取质粒进行 DNA 序列测定,符合 ScFv 的基因结构特点。IPTG 诱导转化的大肠杆菌 JM109,在其培养上清中获得了可溶性 HCV E2 单链可变区抗体的表达。酶联免疫吸附法(ELISA)证实表达的 HCV-E2-ScFv 具有与重组 HCV E2 蛋白的反应活性和特异性,对转化的 JM109 大肠杆菌上清中表达的 HCV-E2-ScFv 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),证实表达的 HCV-E2-ScFv 的分子量为 28kD。为应用 HCV-E2-ScFv 进行肝组织免疫组织化学和细胞内免疫基因治疗研究奠定了基础。

关键词: 丙型肝炎病毒;包膜蛋白;单链可变区抗体;表达

中国分类号: R335 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2001)03-0220-04

收稿日期:2000-07-17,修回日期:2000-10-12

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900130)

作者简介:成军(1963-),男,山东省高青县籍,副教授,博士,主要研究方向为传染病的基因治疗。

丙型肝炎病毒(HCV)感染的抗病毒治疗,目前除了部分病人对重组干扰素 α (IFN α)具有一定的治疗反应以外,还没有更为确切的抗病毒治疗方法^[1]。从抗人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)治疗研究进展中可以看出,利用基因工程人源化单链可变区抗体(ScFv)的细胞内表达进行细胞内免疫的基因治疗,可发挥一定的抗病毒治疗作用^[2]。HCV E2 是 HCV 包膜糖蛋白的重要组成部分,近年来的研究表明,HCV E2 蛋白与靶细胞膜上的 CD81 分子之间的结合,可能是 HCV 感染靶细胞的重要机制^[3,4]。HCV E2 蛋白分子结构中的高变区(HVR)是 HCV 诱发中和性抗体的重要抗原结构域,因而 HCV E2 蛋白 HVR 区的变异,与 HCV 的免疫逃逸机制和形成慢性感染的机制有关^[5]。除此之外,不同结构的 HCV E2 蛋白与干扰素诱导的抗病毒蛋白,如双链 RNA 激酶 PKR 等结合形成二聚体形式,影响 HCV 感染者对于干扰素的疗效^[6]。因而推测寻找 HCV E2 蛋白的抑制剂可能是一个探索抗 HCV 治疗方法的重要研究方向。单克隆抗体虽然具有识别和结合病毒抗原的特异性,但其鼠源蛋白的抗原性以及具有较大分子量,难以进入病毒感染的细胞,因而很难用于细胞内感染的抗病毒的治疗。ScFv 是具有抗原结合位点的最小抗体片段^[7,8],由连接肽把抗体重链可变区和轻链可变区连接起来,由于没有 Fc 片段,免疫原性小,能利用基因工程技术进行大量生产等特点,具有较好的应用前景。我们利用噬菌体抗体库筛选表达了人源 HCV-E2-ScFv,并对其免疫活性和特异性进行了鉴定,为进行抗 HCV 的细胞内免疫的基因治疗研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

HCV E2 抗原为大肠杆菌表达的全长重组纯化抗原蛋白,纯度在 95% 以上,购于美国 Virostat 公司;人噬菌体抗体文库为轻链可变区和重链可变区经甘氨酸接头(Gly₄Ser)₃ 连接的抗体文库^[9-11]。Wizard DNA 质粒提取纯化试剂盒购于美国 Promega 公司;DNA 质粒回收试剂盒购于美国 BIO 101 公司。酶标羊抗鼠 E tag IgG 抗体购于瑞典 Pharmacia 公司;大肠杆菌 JM109 为本研究中心保藏菌株。

1.2 特异性 HCV E2 人源单链可变区噬菌体抗体的筛选与鉴定

将单链可变区噬菌体抗体库扩增活化,浓缩噬

菌体。用 HCV E2 抗原(80 μ g/mL)包被 Nunc 培养板,包被液为 0.05mol/L NaHCO₃, pH9.6 缓冲液,以 2% 小牛血清蛋白(BSA)37 $^{\circ}$ C 封闭 2h 后加入浓缩的噬菌体,以 0.1mol/L 三乙胺洗脱已吸附在平皿上的噬菌体,然后用 1 mol/L This(pH7.4)中和,再感染对数生长期的大肠杆菌 TG₁,培养扩增使表达单链可变区抗体的噬菌粒得到富集。继续重复 5 次上述“吸附、洗脱、扩增”过程^[9-11]。将最后一轮筛选得到的重组菌涂平皿,从中挑选 36 株单克隆菌株,置 2 \times TY(氨苄青霉素 100 mg/L)中,将加入辅助噬菌体侵染后的培养上清液用于酶联免疫吸附法(ELISA)检测。对吸光度(A 值)较高的克隆重复 ELISA 检测过程,并进行与牛血清白蛋白(BSA)的交叉反应实验。对筛选得到的阳性克隆菌株按照 Wizard 质粒 DNA 纯化试剂盒方法提取质粒,进行 *Nco* I/*Not* I 酶切和 DNA 序列测定。

1.3 E2 单链抗体表达载体 pCANTAB5E 的构建

由大肠杆菌 TG₁-E2-ScFv 提取质粒 pHENI-E2-ScFv,加入 *Nco* I/*Not* I 37 $^{\circ}$ C 酶切 3h,经琼脂糖凝胶电泳分析,按照 DNA 质粒回收试剂盒方法回收单链抗体基因片段,同样方法 *Nco* I/*Not* I 酶切 pCANTAB5E 质粒,经琼脂糖凝胶电泳分析,回收载体片段;在 T₄ DNA 连接酶催化下,连接 E2-ScFv 基因片段及载体片段,将连接物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞;提取质粒,*Nco* I/*Not* I 酶切鉴定。

1.4 可溶性抗体的表达与 ELISA 和 PAGE 鉴定

表达可溶性 HCV E2 人源单链可变区抗体的载体为 pCANTAB5E-E2-ScFv。将筛选得到的 HCV E2 噬菌体抗体阳性克隆重组质粒转化至大肠杆菌 JM109 中,加入终浓度为 1.5 mmol 的 IPTG,30 $^{\circ}$ C 诱导表达 20h,12 000r/min 离心 10 min,收集上清液,用于 ELISA 和 PAGE 检测。

用 HCV E2 抗原包被酶联免疫板(1 μ g/孔),以含 2% 牛血清白蛋白的 PBS 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,加入诱导及未诱导的单链抗体上清,37 $^{\circ}$ C 温育 2h,用 PBST 洗板后,加入 100 μ L 用 1% 牛血清白蛋白/PBS 稀释的 HRP/Anti-E Tag 抗体,37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后,加入显色底物显色,测 450nm 波长的 A 值。转化的 JM109 培养上清 5mL,以三氯乙酸进行沉淀,以 90% 乙醇洗涤,干燥后以 40 μ L 水溶解,取 10 μ L 煮沸 10min,进行 PAGE 鉴定。

2 结果

2.1 具有免疫活性的可溶性 HCV-E2-ScFv 抗体的

筛选

抗体库经5轮筛选后,选定一株活性高的克隆提取质粒,酶切后亚克隆到 pCANTAB5E 上。对亚克隆到 pCANTAB5E 载体的阳性克隆菌株提取质粒进行 *Nco*I/*Not*I 双酶切鉴定,并进行 DNA 序列测定,酶切鉴定结果如图 1。

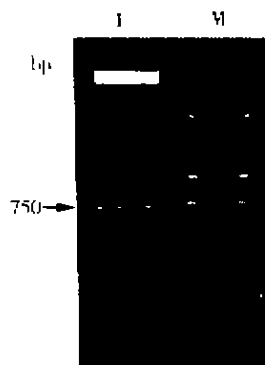


图1 pCANTAB5E-E2-ScFv 的 *Nco*I/*Not*I 酶切鉴定结果
1, HCV E2 ScFv DNA 片段; M, DNA 分子量标志。

Fig.1 *Nco*I/*Not*I restriction map of pCANTAB5E-E2-ScFv

1, DNA fragment of HCV E2 ScFv; M, DNA molecular weight marker.

2.2 HCV-E2-ScFv 表达载体的构建与鉴定

为了表达可溶性的 HCV-E2-ScFv, 从免疫检测阳性的噬菌体集落提取 pCANTAB5E-HCV-E2-ScFv 质粒 DNA, 转化大肠杆菌 JM109, 获得表达型菌株。重组表达载体 pCANTAB5E-HCV-E2-ScFv 上具有 *PlacZ* 启动子, 使外源基因的表达可用 IPTG 诱导, 在 IPTG 诱导下表达的 ScFv 带有 pCANTAB5E 载体上 *PelB* 序列编码的短肽, 使单链抗体可以分泌到细胞外, 同时 pCANTAB5E *Not*I 位点后有一编码 E-tag 小肽的基因, 表达可溶性的单链抗体可通过结合此短

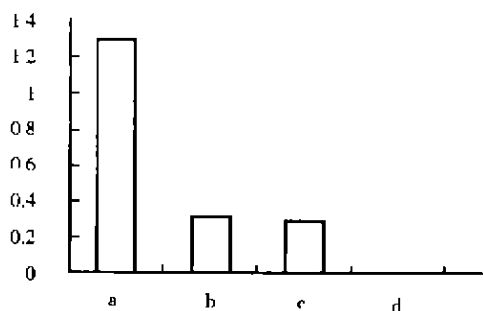


图2 E2-ScFv 酶联免疫吸附法检测结果

a, 诱导上清; b, 未诱导上清; c, 阴性对照; d, 空白对照。

Fig.2 Absorbance of HCV-E2-ScFv binding to E2 antigen by ELISA
a, supernatant from induced JM109; b, supernatant from non-induced JM109; c, supernatant from untransduced JM109; d, negative control.

肽的抗体进行检测。

2.3 可溶性抗体的特异性测定

我们对诱导表达的可溶性单链抗体进行了 ELISA 检测。检测结果显示, 诱导表示上清液与抗原结合呈阳性反应, 未诱导的上清液与抗原结合的则呈阴性, 如图 2 所示。

取诱导上清液的三氯乙酸沉淀物进行 12% 的 PAGE 分析, 证实表达的 HCV-E2-ScFv 蛋白的分子量为 28kD。如图 3 所示。

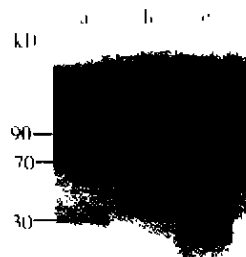


图3 JM109 表达的 HCV-E2-ScFv 蛋白的 PAGE 分析

a, 蛋白分子量标志; b, 未诱导的含 HCV-E2-ScFv 的 JM109 培养上清; c, IPTG 诱导表达的 HCV-E2-ScFv 的 JM109 细菌的培养上清。

Fig.3 PAGE analysis of expressed HCV-E2-ScFv protein in supernatant of transduced JM109

a, protein molecular weight marker; b, protein in supernatant of non-induced JM109; c, protein in supernatant of induced JM109.

3 讨论

丙型肝炎病毒非结构蛋白 E2 是 HCV 基因组编码的一种重要的结构蛋白质之一^[1]。其最为重要的功能就是作为 HCV 的包膜蛋白, 包裹在 HCV 病毒颗粒的表面, 通过与感染靶细胞膜上的特异性受体, 介导 HCV 进入到 HCV 感染的靶细胞中^[3]。E2 蛋白也是 HCV 感染发生以后, 诱导机体产生保护性体液免疫应答的主要抗原成分。同时, HCV E2 蛋白保护性抗原决定簇编码区的核苷酸序列有高度的变异性, 本文筛选鉴定了人源化单链可变区抗体的编码基因, 并实现了可溶性抗体的表达, 为进一步进行丙型肝炎患者肝组织的病毒抗原免疫组织化学研究和细胞内免疫基因治疗研究奠定了基础。

从蛋白酶的抑制剂在抗人免疫缺陷病毒 1 (HIV-1) 感染的治疗中具有十分重要的作用和地位的研究结果^[2], 推测通过寻找 HCV E2 蛋白的抑制剂, 可能是探索抗 HCV 治疗方法的重要途径。事实

上,在 HCV 单链抗体细胞内免疫基因治疗的研究中,Dimasi 等^[12]应用噬菌体展示肽库技术,筛选到了最小抗体样蛋白,又称微抗体(minibody),对 HCV NS3 的丝氨酸蛋白酶活性具有很强的阻断作用。这些微抗体在微摩尔浓度的条件下即表现出很强的 NS3 丝氨酸蛋白酶的特异性体外抑制作用。Martin 等^[13]也从噬菌体展示肽库中筛选到了可变区抗体片段,对于 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶活性也具有很强的特异性抑制作用。由于通过杂交瘤技术生产人-人单克隆抗体十分困难,噬菌体抗体库能在体外通过相应筛选而获得特异性的人单链抗体,解决了杂交瘤技术不易生产人单抗的问题。从噬菌体抗体库中筛选出的 HCV E2 人源单链可变区抗体,具有较强的 HCV E2 抗原结合活性,且该方法具有简便、快速、经济等特点,避免了利用杂交瘤技术制备该抗体周期长,尤其是存在鼠源性蛋白反应的问题^[14]。除此之外,设计病毒基因核苷酸序列特异性的反义 RNA(antisense RNA),核酶(ribozyme)和多靶位核酶的表达载体,进行细胞内免疫的基因治疗也取得了显著的进展^[15]。利用显性负性突变体的构建与表达、分子诱饵(decoy)的构建与表达等,也能实现细胞内免疫的基因治疗策略^[1]。进行细胞内免疫的抗病毒基因治疗研究虽然有许多途径可以实现,其中以人源化单链可变区抗体的细胞内表达为最有前景的手段。因此,噬菌体展示肽库的亲亲和筛选程序,在 HCV E2 蛋白抑制剂的筛选过程中具有重要的应用前景。通过逆转录病毒载体腺病毒载体,可以将这种 HCV E2 单链抗体的编码基因导入到细胞中进行抗 HCV 的细胞内免疫策略的基因治疗。

参考文献

- [1] 成军,杨守纯.现代肝炎病毒分子生物学.北京:人民军医出版社,1997,44-46.
- [2] Rondon JJ, Marasco WA. Intracellular antibodies(intrabodies) for gene therapy of infectious diseases[J]. *Annu Rev Microbiol*, 1997, 51: 257-283.
- [3] Petracca R, Falugi F, Galli G, et al. Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding[J]. *J virol*, 2000, 74(10): 4824-30.
- [4] Meola A, Sbardellati A, Brunì Ercole B, et al. Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection[J]. *J virol*, 2000, 74(13): 5933-8.
- [5] Ray SC, Mao Q, Lanford RE, et al. Hypervariable region 1 sequence stability during hepatitis C virus replication in chimpanzees[J]. *J Virol*, 2000, 74(7): 3058-66.
- [6] Sarrazin C, Kometzky I, Ruster B, et al. Mutations within the E2 and NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response[J]. *Hepatology*, 2000, 31(6): 1360-70.
- [7] Hoogenboom HR, Brue AP, Hufton SE, et al. Antibody phage display technology and its application[J]. *Immunotechnology*, 1998, 4: 1-20.
- [8] Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, et al. By-passing immunization, human antibodies from V-gene libraries displayed on phage[J]. *J Mol Biol*, 1991, 222: 581-597.
- [9] 钟彦伟,成军,刘妍,等. HCV 非结构蛋白 NS3 人源单链抗体的筛选与鉴定[J]. *中华传染病杂志*, 2000, 18(2): 84-87.
- [10] 钟彦伟,成军,刘妍,等.可溶性 HCV 非结构蛋白 NS5A 人源单链可变区抗体在大肠杆菌中的表达[J]. *肝脏*, 1999, 4(2): 73-76.
- [11] 钟彦伟,成军,刘妍,等.丙型肝炎病毒 NS3 蛋白人源基因工程单链抗体的高效表达[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(3): 171-173.
- [12] Dimasi N, Martin F, Volpari C, et al. Characterization of engineered hepatitis C virus E2 protease inhibitors affinity selected from human pancreatic secretory trypsin inhibitor and minibody repertoires[J]. *J Virol*, 1997, 71(10): 7451-7469.
- [13] Martin F, Volpari C, Steinkuhler C, et al. Affinity selection of a camouflaged V(H) domain antibody inhibitor of hepatitis C virus E2 protease[J]. *Protein Eng*, 1997, 10(5): 607-614.
- [14] 钟彦伟.体外突变提高单链抗体亲和力的研究进展[J]. *国外医学流行病学传染病学分册*, 1999, 66(3): 100-102.
- [15] Kumar PKR, Machida K, Urvil PT, et al. Isolation of RNA aptamers specific to the E2 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA[J]. *Virology*, 1997, 237: 270-282.