

人源抗 A 型肉毒毒素单链抗体的体外亲和筛选*

王 慧** 蒯 俊

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘要:以重组制备的 A 型肉毒毒素保护性抗原为配体, 对人源噬菌体免疫抗体文库进行体外定向亲和筛选, 获得特异结合子, 其中与抗原高亲和力结合的抗体克隆 B17 基因全长 750 bp, 可编码 250 个氨基酸, 抗体可变区基因同源分析表明, 分属 VH4 和 κ chain II 家族, 是一株人源特异单链抗体基因。人源单链抗体 B17 在大肠杆菌中获得了重组表达, 表达产物可以竞争特异肉毒抗毒素马血清与抗原的结合, 是国内首次获得的抗 A 型肉毒毒素保护性抗原的人源单链抗体, 可以在肉毒毒素检测和治疗研究中发挥作用。

关键词: A 型肉毒毒素, 噬菌体文库, 人源单链抗体, 表达

中图分类号: Q786 R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0022-04

Affinity Selection of Human ScFv Against Botulinum Neurotoxin Serotype A

WANG Hui** YIN Jun

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract: In this work, rare specific binders to botulinum neurotoxin antigen were selected from human phage immunized library through three rounds of panning in vitro. Of them, clone ScFvB17 is of high affinity and specificity to target antigen. B17 is of 750bp encoding 250 amino acid. Analysis results of gene structure showed V-genes of B17 belonging respectively to VH4 and κ chain II family are new antibody Fv genes. More important result showed that recombinant ScFvB17 expressed in *E. coli* could bind specific for neurotoxin competing with antiserum. Successful selection of human phage antibody library and obtaining specific ScFv against botulinum neurotoxin serotype A provide useful materials for further study on detection of neurotoxin and human engineering therapeutic antitoxin.

Key words: Botulinum neurotoxin serotype A, Phage library, Human ScFv, Expression

肉毒毒素是一种强神经毒剂, 通过作用神经突触感受器, 抑制兴奋性神经递质的释放, 引起弛缓性神经麻痹。肉毒中毒是一种威胁生命、致死率很高的疾病。应用抗毒素提供被动免疫是毒素中毒的有效治疗手段。由于传统马血清抗毒素存在制备安全性和 9% 临床病例过敏反应的问题, 研究制备高亲和性的人源抗毒素已经受到越来越多的重视^[1]。应用噬菌体展示技术和重组噬菌体单链抗体表达系统^[2], 首先构建人源抗体基因库和噬菌体抗体免疫文库, 通过体外模拟 B 淋巴细胞的选择和抗体亲和力成熟过程, 筛选获得对 A 型肉毒毒素有特异性的高亲和力抗体克隆, 并对其基因结构进行分析。特异的抗体基因在大肠杆菌中进行重组表达, 对表达产物的抗原结合活性和竞争抑制活性进行测定, 在国内首次获得抗 A 型肉毒毒素保护性抗原的人源单链抗体, 为进一步肉毒中毒的基因工程治疗性抗体研制准备有效的实验材料。

* 国家重点基础研究 973 项目资助 (No. 2002CB513205)

** 联系人 Tel: 010-66948532, E-mail: geno0109@vip.sina.com

收稿日期: 2004-03-05, 修回日期: 2004-06-03

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体: 辅助噬菌体 M13K07 购自 Biolab 公司; 噬菌体重组表达载体 pCANTAB-5E; 宿主菌 *E. coli* TG1 由中国科学院微生物研究所阎锡蕴教授惠赠; 大肠杆菌 M15 为本室保存, 表达载体 pQE30 为 QIAGEN 公司产品。

1.1.2 试剂和溶液: 限制性内切酶为 Promega 公司产品; PCR 扩增试剂为 TAKARA 公司产品; antiM13-HRP 为 Pharmacia 公司产品; BSA (牛血清白蛋白组分 V) 为 GIBCO 公司产品; 重组毒素抗原 BoNTaHc468 自行制备 (已另文发表)。

1.2 人源抗 A 型肉毒毒素噬菌体抗体的亲和筛选

1.2.1 重组噬菌体 ScFv 抗体文库的扩增: 用自己构建的噬菌体抗体文库 (已另文发表) 感染对数生长期 TG1 细胞, 经 2×10^{10} M13K07 辅助噬菌体超感染后, 培养过夜, 加入 4% PEG8000 和 2.5 mol/L NaCl 沉淀噬菌粒, 以 2 mL PBS 重悬沉淀, 建立单链噬菌体抗体扩增库。

1.2.2 噬菌体抗体库的富集筛选: 噬菌体单链抗体库的富集筛选选择微量孔板筛选方法^[3]。将抗原 BoNTaHc468 包被 96 孔板, 然后进行吸附-洗脱-富集增生过程, 最后一轮洗脱下来的噬菌体保存于 -20°C 以待用于下一轮的筛选。

1.2.3 噬菌体结合子的特异结合活性鉴定 (ELISA): 从最后一轮筛选所获得的噬菌体抗体克隆中, 选择 OD_{450} 较高的克隆进行抗体特异性鉴定。以 $2 \mu\text{g}/\text{孔}$, 分别用重组 BNaHc468、类毒素 BoNTa、BoNTb 和 Tet 包被 96 孔板, ELISA 检测所挑选克隆的结合活性。

1.2.4 阳性噬菌体结合子 ScFv 基因的克隆与序列分析: 克隆 ScFv 基因, 测定的序列与 Kabat 数据库中已知基因序列比较, 确定家族定位, 结合相关软件分析, 推导 ScFv 基因编码的氨基酸序列。

1.3 ScFvB17 在大肠杆菌中的表达

依引物 01/02, 从重组噬菌粒中扩增 ScFv 基因, 不同酶点引入 ScFv 5' 和 3' 端, 以对应亚克隆入原核表达载体 pQE30。

01: 5' - CGCGGATCC gat gtt gtg atg act cag tet cc - 3' (含 *Bam*HI)

02: 5' - CCCAAGCTT ctt ggt gga ggc tga gga gac ggt gac cag - 3' (含 *Hind*III)

重组表达质粒 pQE-ScFv 转化大肠杆菌 M15 进行 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析有无外源基因表达。

1.4 重组 ScFvB17 的竞争抑制结合活性

竞争 ELISA: 抗原包被 96 孔, 用 3% BSA - PBS (含 0.02% NaN_3) 封闭, 加入重组 ScFv 蛋白质, 37°C 温育 2 h, 0.05% Tween20-PBS (PBST) 洗板 3 次, 加入抗 A 型肉毒毒素马血清, 37°C 温育 1 h, PBST 洗板, 加 HRP 标记的抗马抗体, 37°C 温育 1 h 后, 对 TMB 底物显色, 酶标仪上读取 A_{450} 。

2 结果

2.1 重组噬菌体单链抗体文库的扩增与富集筛选

原噬菌体抗体库容量约为 10^8 。噬菌体文库经过 M13K07 超感染后, 产生的重组噬菌粒可释放于细菌培养上清中, 经噬斑计数, 滴度为 $2.5 \times 10^{14}/\text{L}$ 。以纯化的 A 型肉毒

毒素重组抗原 BoNTaHc468 为配体, 对噬菌体抗体库进行 3 轮亲和筛选, 计算每轮筛选的产出率, 第 3 轮筛选的产出率比第一轮高出近 150 倍, 结合活性 (OD_{450}) 范围从首轮的 0.242 ~ 0.358 明显提高至第 3 轮的 0.402 ~ 1.462, 见表 1。

表 1 每轮筛选出的阳性克隆数

Cycle	Output ratio	Rate of positive clones	ELISA (OD_{450})
1	8.50×10^{-9}	0/94	0.242 ~ 0.358
2	1.82×10^{-7}	0/94	0.298 ~ 0.541
3	1.20×10^{-6}	122/188	0.402 ~ 1.462

2.2 噬菌体呈现型 ScFv 克隆的特异结合活性

表 2 结果显示, 3 株噬菌体抗体克隆可以很好的识别和特异结合重组毒素和 A 型肉毒类毒素, 与 B 型肉毒类毒素基本不结合, 而与破伤风类毒素略有结合。

表 2 阳性噬菌体克隆的抗原特异结合活性

ScFv clone	Antigen				control
	BNaHc468	BNa	BNb	Tet	
B17	0.702	0.661	0.085	0.120	0.059
B108	0.574	0.558	0.079	0.170	0.071
B148	0.473	0.510	0.107	0.205	0.066

2.3 ScFv 基因的克隆与序列分析

噬菌体克隆 ScFvB17 全长 750 bp, 编码 250 氨基酸。其中 VH 基因长 369 bp, 编码 123 个氨基酸, 属于 VH4 免疫球蛋白家族, 同源性高达 95%; V_K 基因长 336 bp, 编码 112 个氨基酸, 属于 κ chain II 家族, 同源性为 93%。V_K 基因与 VH 基因之间由编码 (SerGly₄)₃ 的 DNA Linker 正确连接。推测基因编码的氨基酸序列为:

```

1 MQVQLQESGP GLVKPSETLS LTCTVSGGSI SSGSYWGW I RPPGKCLEW I GSIYYSGST 60
      FWR1          CDR1          FWR2          CDR2
61 YYNPSLKSRV TISVDTSKNQ FSLMLSSVTA ADTAVYYCAR QGSSGYQYNW FDPWGQGTILV 120
      FWR3          CDR3          FWR4
121 TVXSSTGGGGS GGGCSCGGGM DVVMTQSPCT LSLSPGERAT LSCRASQSVS NSYLAWYQQK 180
      Linker          FWR1          CDR1
181 PCQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSSSGSGT DFTLTISRPE PEDFAVYYCQ QPGFTFGPCT 240
      FWR2          CDR2          FWR3          CDR3          FWR4
241 KVEIKRTVAA
  
```

2.4 ScFvB17 的可溶性表达与竞争抑制结合活性

ScFvB17 以 pQE30 为表达载体, 在 *E. coli* M15 细胞中实现了重组表达。SDS-PAGE 分析显示, 目的蛋白分子量约为 26kD, 与预期结果一致 (图 1), 重组蛋白以可溶形式存在于胞浆。

表 3 的竞争 ELISA 测定结果表明, 重组 ScFvB17 在体外具有良好活性, 可竞争抗肉毒马血清与肉毒毒素的特异结合。

表 3 ScFvB17 的竞争抑制活性 (竞争 ELISA)

Antigens	BoNTaHc468		BoNTa		Control
Antibody	ScFvB17	BSA	ScFvB17	BSA	BSA
A_{450}	0.326	0.776	0.543	0.969	0.045

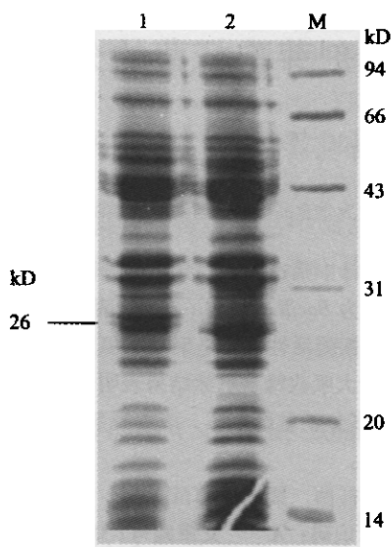


图 1 SDS-PAGE 分析 ScFv B17 在大肠杆菌中的可溶性表达

1 诱导的 pQE-ScFv B17/M15 全菌蛋白, 2 诱导的 pQE30/M15 全菌蛋白, 3 低分子量蛋白标准

3 讨论

在噬菌体抗体文库的筛选中, 抗原靶标的选择决定了筛选所获得抗体的特异性和靶向。多项研究表明, A 型肉毒毒素重链 C 端片段是毒素神经细胞受体结合区, 为保护性抗原, 具有型特异性。以此为亲和靶标可以筛选到有效阻断毒素分子与其受体特异结合的中和抗体, 具有检测和治疗应用前景。

研究中采用微孔板固相筛选和酸洗脱法, 进行 3 轮定向筛选, 筛选产出率和阳性克隆计数的结果证明, 在筛选过程中毒素抗原对噬菌体抗体起到了有效的富集作用, 相伴随的是抗体亲和力的提高。通过噬菌体抗体抗原结合活性、特异性测定以及抗体基因的克隆测序, 结果证实我们从自行构建并扩增制备的人源噬菌体抗体文库中, 筛选获得了针对 A 型肉毒毒素的噬菌体抗体, 其中克隆 ScFvB17 基因全长 750 bp, 编码 250 氨基酸, 基因家族分类和基因同源性分析表明, 可变区基因分属 VH4 和 κ chain II 家族, 具有 VH4 家族倾向性^[4,5]。其编码的呈现型抗体产物能特异识别和结合 A 型肉毒毒素, 可应用于相应毒素的检测; 其在大肠杆菌中的可溶性重组表达产物可以有效识别靶抗原, 并竞争肉毒抗毒素马血清与毒素的特异结合, 具有良好竞争抑制活性。目前, 有关抗 A 型肉毒毒素的人源单链抗体研究国内尚无报道。

参考文献

- [1] Peter A, Cindy W, Steven CH, *et al.* Infect Immun, 1997, **65** (9): 3743 ~ 3752.
- [2] Winter G, Griffith A D, Hawkins R E, *et al.* Immunol, 1994, **12** (4): 433 ~ 455.
- [3] Menestrina G, Schiavo G, Montecucco C. Mol Aspects Med, 1994, **15** (3): 179 ~ 193.
- [4] Marks J D, Hoogenboom H R, Bonnert T P, *et al.* J Mol Biol, 1991, **222** (5): 581 ~ 597.
- [5] Vaughan T, Osbourn J K, Tempest P. Nat Biotech, 1998, **16** (6): 535 ~ 539.