

抗 A 型肉毒毒素人源单链抗体融合蛋白的重组设计*

王 慧 史 晶 孟露露 李佩真 白 瑜 荫 俊

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘要: 以获得的抗 A 型肉毒毒素单链抗体为模板, 进行融合改构, 将人 IgG1 的 Fc 片段连接到 ScFv 的 C 端, 在大肠杆菌中实现抗体融合蛋白 ScFv-Fc 的表达, 表达量 30% 以上, 蛋白以包含体形式存在, 经过体外变性的抗体融合蛋白 ScFv-Fc, 进行 Protein G Sepharose 柱亲和层析纯化, 纯度达 90% ~ 95%。体外活性检测结果表明, 重组抗体融合蛋白 ScFv-Fc 可以特异结合 A 型肉毒毒素抗原, 其相对亲和力近似于母本单链抗体, 其稳定性高于母本单链抗体。

关键词: A 型肉毒毒素, 单链抗体融合蛋白, 相对亲和力, 稳定性

中图分类号: Q786, R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 04-0011-04

Recombinant Design of Fc Fusion Protein of Human ScFv Against BoNTa*

WANG Hui SHI Jing MENG Lu-Lu LI Pei-Zhen BAI Yu YIN Jun

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

Abstract: Human ScFv against botulinum neurotoxin serotype A (BoNTa) was modified by fusing human IgG1 Fc to C terminal of ScFv. ScFv-Fc fusion protein was expressed at high level over 30% of total host cell proteins in *E. coli*. Recombinant protein existed in inclusion body form. Renatured ScFv-Fc was purified to 90% ~ 95% by Protein G Sepharose column. *In vitro* ScFv-Fc could bind specific to toxoid BoNTa in ELISA. Recombinant ScFv-Fc had similar relative affinity to parent ScFv and had improved stability.

Key words: Botulinum neurotoxin serotype A, ScFv fusion protein, Relative affinity, Stability

在完整的抗体分子中, 抗体恒定区可以维持抗体结合位点的结构, 保证构象的正确, Fc 融合蛋白可以增加蛋白的分子量, 提供能支持抗体功能和稳定性的结构。Ray K 通过单链抗体融合 Fc 的方式, 明显提高了抗体的稳定性和检测敏感性^[1]。本文在已经筛选和制备的人源抗 A 型肉毒毒素 ScFv 抗体分子的基础上^[2,3], 将人 IgG1 的 Fc 片段融合到特异 ScFv 的 C 端, 构建 ScFv 融合蛋白, 实现 ScFv 融合蛋白的重组制备, 研究其抗原结合活性、抗体稳定性, 以及亲和力等。

1 材料与方法

1.1 载体和菌株

pGEM-ScFv 为已构建的重组质粒、人源重组 ScFv 抗体实验室制备 (论文另行发表)。

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 为本室保存, 表达载体 pET22b 为 Novagen 产品,

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

十五总后指令性课题 (No. IL033)

通讯作者 Tel: 010-66948532, E-mail: geno0109@vip.sina.com

收稿日期: 2004-09-03, 修回日期: 2004-12-28

重组质粒 pEF-Fc 由阮成迈博士惠赠。

1.2 试剂

过氧化物酶 (HRP) 标记抗 Protein A/G 抗体购自 Pierce 公司, 限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司, Sephacryl S-100 为 Pharmacia 产品。其它试剂均为国产分析纯。

1.3 pET-ScFv-Fc 表达质粒的构建

以重组质粒 pGEM-ScFv 作模板, 扩增 ScFv 基因; 以重组质粒 pEF-Fc 为模板扩增 Fc 基因 (引物 01/02), 01: 5' - aag ggc cca tcg gtc ttc ccc - 3'; 02: 5' - aat gcg gcc gct tat tta ccc gga gac agg gag agg ct - 3' (含 *Not* I)。分别回收扩增产物, 以基因融合方式获得 ScFv-Fc 基因。ScFv-Fc 基因经 *Nco*I 和 *Not*I 酶切, 与经同样双酶切的 pET22b 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 和酶切鉴定重组子。即 pET-ScFv-Fc 表达质粒。

1.4 ScFv-Fc 在大肠杆菌中的表达

将在 DH5 α 中构建成功的重组 pET-ScFv-Fc 及空载体 pET22b 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 在 LB-Amp 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} = 0.5$, 然后加 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达 4h, 用 SDS-PAGE 分析 ScFv-Fc 的表达。对比空载体和重组质粒转化子的蛋白条带, 观察有无外源基因表达。

1.5 包含体的制备和 ScFv-Fc 亲和层析纯化

提取重组蛋白的包含体, 进行尿素的变复性, ScFv-Fc 复性蛋白以 Protein G Sepharose 柱为介质进行特异结合蛋白的亲和层析纯化, 收集的蛋白进行定量和 SDS-PAGE 分析。

1.6 ELISA 检测 ScFv-Fc 的抗原结合活性

ELISA: 肉毒类毒素包被 96 孔, 以 HRP 标记的抗 Protein A/G 抗体直接检测梯度稀释 ScFv-Fc 蛋白的抗原结合活性, 酶标仪上读取 A_{450} , 结果绘图表示。

1.7 ScFv-Fc 与母本抗体 ScFv 相对亲和力的比较

抗原抗体的结合过程中, 加入不同浓度 NH_4SCN 溶液, 以 A_{450} 下降 50% 时相应的 NH_4SCN 浓度作为相对亲和力的指数, 比较融合蛋白 ScFv-Fc 和单链抗体 ScFv 针对肉毒毒素抗原相对亲和力的大小。

1.8 ScFv-Fc 与母本抗体 ScFv 稳定性的比较

比较不同结构 2 种重组抗体分子在 37 $^{\circ}$ C PBS 缓冲液 pH7.2 和 37 $^{\circ}$ C 血清条件下保持抗体结合活性的时间, 对变性剂尿素的稳定性, 以及 3h 热稳定性。

2 结果

2.1 单链抗体融合蛋白 ScFv-Fc 的设计

原母本单链抗体核苷酸序列已登录 GenBank (Accession No. AY816193)。本实验中, 设计引物扩增了 IgG1 Fc 基因^[4], 长 981bp。通过基因融合方式获得的 ScFv-Fc 基因可编码单链融合蛋白, 共 577 个氨基酸, 其中 ScFv 是 250 个氨基酸 (1~250), IgG1 Fc 长 327 个氨基酸 (251~577)。分子量为 62.2kD, 理论等电点 pI 7.57, 在大肠杆菌中的半衰期大于 10h。

2.2 重组表达质粒 pET-ScFv-Fc 的构建及 ScFv-Fc 的重组表达

构建完成的 pET-ScFv-Fc 表达载体如图 1 所示。重组质粒转化大肠杆菌 BL21

(DE3), 挑取单菌落进行 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析显示, 在大约 62kD 处有一空载体 pET22b 转化子所没有的条带, 与预测的 ScFv-Fc 分子量相同。优化表达条件, 结果显示 0.3mmol/L ~ 1.0mmol/L IPTG 诱导下, ScFv-Fc 的表达量相当; 诱导 2.5h 后, ScFv-Fc 的表达量基本稳定。凝胶薄层扫描结果显示, ScFv-Fc 表达量占菌体总蛋白质的 30% 以上, 超声破碎后, 经洗涤, 获得的包含体纯度达 60% ~ 70% (图 2)。

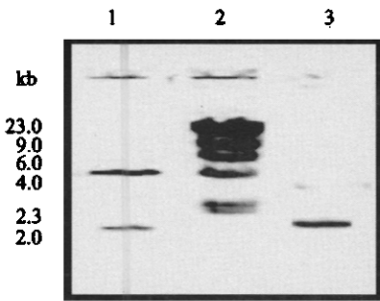


图 1 pET-ScFv-Fc 重组表达质粒的构建

1 Product of pET-ScFv-Fc digested by *NcoI/Not I*,
2 marker λ DNA/*Hind III*, 3 PCR product of ScFv-Fc

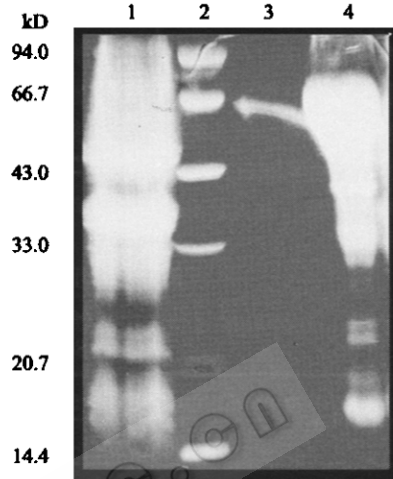


图 2 SDS-PAGE 检测包含体和 ScFv-Fc 纯化

1 Induced pET22b/BL21, 2 Relative molecular weight (Mr) marker (97.4, 66.2, 43.0, 31.0, 20.1, 14.4kD), 3 Purified ScFv-Fc, 4 ScFv-Fc inclusion

2.3 ScFv-Fc 包含体的复溶和亲和层析纯化

结果显示 pH7.5 ~ 8.0 蛋白质的回收率最高, pH 小于 7.0 时, 大部分蛋白质沉淀下来; pH 大于 9.0 时, 蛋白质在复性液中能稳定存在, 但透析后出现部分蛋白质沉淀, 各 pH 值下复性的 ScFv-Fc 都具有肉毒抗原结合活性, 因此合适的复性 pH 值为 pH7.5 ~ 8.0。复性蛋白经过 Protein G 柱亲和层析纯化, 获得纯度 90% ~ 95% 的纯化蛋白, 见图 2。Bradford 法定量测定蛋白^[5]。

2.4 单链抗体融合蛋白 ScFv-Fc 的抗原结合活性

图 3 显示不同浓度 ScFv-Fc 复性蛋白质与抗原的结合曲线。随 ScFv-Fc 浓度升高, 曲线接近平台, 它与抗原的结合渐趋饱和。

2.5 ScFv-Fc 与母本抗体 ScFv 的相对亲和力比较

对于 ScFv-Fc 复性蛋白质, 当纵轴数值下降为 0.85, 即 OD_{450} 下降为不加硫氰酸铵时的 50% 时, 相应的硫氰酸铵浓度是 0.85, 即 ScFv-Fc 的相对亲和力指数是 0.85。而 ScFv 的相对亲和力指数是 0.90。说明大肠杆菌表达的重组 ScFv-Fc 对毒素抗原的亲和力与原 ScFv 母本抗体相似。

2.6 ScFv-Fc 与 ScFv 稳定性的比较

表 1 中列出了 ScFv 及 ScFv-Fc 的相对稳定性, 包括生物半衰期、抗变性和热稳定性等数据。结果显示, 比较 ScFv, ScFv-Fc 的生理稳定性和热稳定性都有提高。

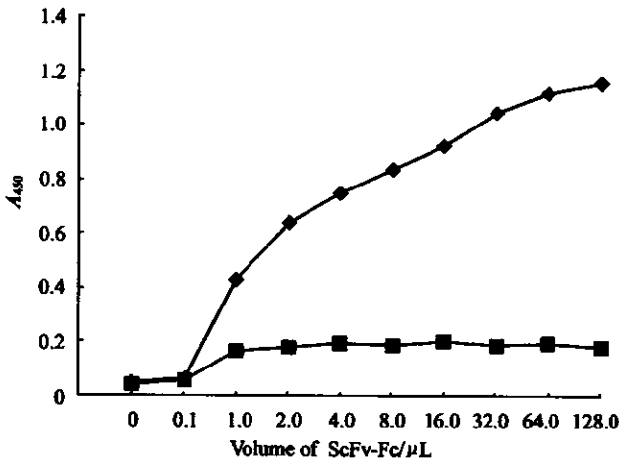


图3 重组 ScFv-Fc 与 A 型肉毒类毒素的结合曲线

◆ Ag: A 型肉毒类毒素, ■ Ag: B 型类毒素

表1 ScFv 及其融合蛋白 ScFv-Fc 的稳定性

Stability	Conditions			
	PBS (37℃)	Serum (37℃)	Urea *	Temperature (3h) **
ScFv	1.0 ~ 3.0h	1.5 ~ 3.0h	1mol/L	25℃ ~ 37℃
ScFv-Fc	5.0h	3.0 ~ 5.0h	1mol/L	40℃

注: * 测定抗体仍保留活性时耐受尿素的浓度表示抗体的抗变性稳定性, ** 测定抗体保留活性所耐受 3h 的温度

3 讨论

母本人源重组 ScFv 具有特异肉毒毒素抗原结合活性和竞争抑制活性,但稳定性不好,本研究将人 IgG1 的 Fc 片段连接到抗 A 型肉毒毒素 ScFv 的 C 端,构建了 ScFv-Fc 融合蛋白。实验中单链抗体融合蛋白在大肠杆菌中的重组表达水平达到 30% 以上, Protein G 柱亲和层析一步纯化,可获得纯度 90% ~ 95% 的重组蛋白。在体外, ScFv-Fc 融合蛋白保持了母本抗体原有的特异抗原结合活性和相似的相对亲和力,而稳定性得到了一定程度的改善,体现在其 37℃ 生理稳定性和耐热稳定性有所提高。

对于不同的 ScFv, 添加 Fc 进行融合, 会有不尽相同的结果。而选择不同大小的 Fc 片段, 或 Fc 的不同功能区域与抗体可变区融合, 也会有不同的效果, 针对特定的抗体需要在实验研究中验证^[6,7]。

参考文献

- [1] Troels W, Brian S G, Svend K, *et al.* J Immunol Methods, 1997, **209**: 75 ~ 83.
- [2] 王 慧. 微生物学通报, 2005, **32** (1): 22 ~ 25.
- [3] 王 慧, 荫 俊. 军事医学科学院院刊, 2004, **28** (5): 414 ~ 416.
- [4] Walls M A, Hsiao K C, Harris L J. J Nucleic Acids Res, 1993, **21** (12): 2921 ~ 2929.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛编著. 生化实验方法和技术 (第二版). 北京: 高等教育出版社, 1996. 138 ~ 140.
- [6] Ray K, Embleton M J, Laikhan B L, *et al.* Clin Exp Immunol, 2001, **125**: 94 ~ 101.
- [7] Andrade E V, Albuquerque F C, Moraes L M, *et al.* J Biochem. 2000, **128** (6): 891 ~ 895.