

乙型肝炎病毒 pre-S1 区中和抗体可变区的原核表达

管宝全 张军* 罗文新 陈敏 吴婷 程通 夏宁邵

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

摘 要 鼠源单克隆抗体 MA18/7 是特异识别乙型肝炎病毒(HBV)pre-S1 抗原的中和抗体。为表达 MA18/7 的小分子抗体,将 MA18/7 的重链可变区基因(V_H)和轻链可变区(V_L)基因分别克隆到原核表达载体 pTO-T7 进行原核表达。结果 V_H 和 V_L 均以包涵体的形式高效表达,包涵体经过变性、复性及金属离子亲和纯化后获得纯度 > 90% 的重组抗体片段。生物传感器、竞争 ELISA 和间接 ELISA 测定均显示, V_H 或 V_L 均不能结合相应抗原,但二者体外混合后可迅速非共价结合形成具有良好活性的可变区抗体 Fv,表明 MA18/7 的抗原结合活性区由重链可变区和轻链可变区共同组成。

关键词 乙型肝炎病毒,中和抗体,可变区,表达

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0901-05

由乙型肝炎病毒(HBV)感染引发的急性肝炎、慢性肝炎乃至肝硬化和肝癌已经成为人类所面临的最为严重的健康问题之一。HBV pre-S1 蛋白含有肝细胞结合位点,与侵入肝细胞有关^[1]。已有研究表明 pre-S1 的 aa21-47 肽段是 HBV 特异结合肝细胞的主要位点^[2]。部分乙肝患者能针对此肽段诱导保护性免疫反应^[3]。抗 pre-S1 aa21-47 抗体参与病毒的清除和中和,具有保护作用,被认为是预示乙肝患者康复的重要标志^[4]。Heermann 等^[5-7]获得的鼠源单克隆抗体 MA18/7,识别的抗原表位位于 aa21-47 区内,是具有体内中和能力的中和抗体。鼠源单抗直接应用于人体会导致人抗鼠抗体反应(HAMA),大大限制了其应用。通过基因工程的手段,对现有的鼠源单抗进行改造,研制能够保持亲本抗体特异性和亲和力的小分子可变区抗体,是降低 HAMA 的方法之一。抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)通过非共价键结合在一起(Fv),是抗体中具有完整抗原结合活性的最小功能片段。本研究利用大肠杆菌分别表达 MA18/7 的可变区抗体片段 V_H 和 V_L ,体外结合形成 Fv 片段,结果表明 MA18/7 抗体片段 V_H 或 V_L 均不具抗原结合活性,而 Fv 则具有良好的抗原结合活性,为进一步利用小分子抗体进行 HBV 的抗体治疗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 细胞、菌株和质粒

可分泌抗 HBV pre-S1 单克隆抗体 4D11 的鼠杂交瘤细胞系和可分泌抗戊型肝炎病毒(HEV)单克隆抗体 8C11 的鼠杂交瘤细胞系由本实验室制备;大肠杆菌 DH5 α 株和 ER2566 株由本室保存;质粒 pTO-T7 由本室构建保存^[8],载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程公司。

1.2 酶及其它生化试剂

限制酶购自大连宝生物工程公司,T4 DNA 连接酶购自华美生物工程有限公司,DNA 柱式胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司,PCR 用 Taq 酶、dNTP 购自上海生工生物工程公司。HBV pre-S1 抗原 CI 由本室表达纯化。基因合成、引物合成以及测序均由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.3 抗 HBV pre-S1 单克隆抗体 MA18/7 重链、轻链可变区基因的获得

根据 MA18/7 的重链可变区序列(GenBank 登录号:AJ002098)和轻链可变区序列(GenBank 登录号:AJ002099),分别合成两段可变区全基因。设计引物如表 1 所示。以合成基因片段为模板,分别扩增重链 V_H 和轻链 V_L 基因,扩增条件是 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,然后按照 94 $^{\circ}\text{C}$ 35s,55 $^{\circ}\text{C}$ 35s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40s 进行 30

收稿日期:2004-03-26,修回日期:2004-07-01。

基金项目:“863”计划海洋生物技术主题青年基金(No.2001AA628120)。

* 通讯作者。 Tel: 86-592-2184110; E-mail: zhangj@jingxian.xmu.edu.cn

个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。回收两种 PCR 产物,连接 pMD18-T 载体后用 *EcoR* I 单酶切筛选目的基因反向插入 pMD18-T 的阳性克隆并测序。

表 1 V_H 和 V_L 两端的引物

Table 1 The primers of V_H and V_L

Peptide	Primer sequence
VHF	5'-GAA TTC GAT GTG CAG CTT CAG GAG-3'
VHR	5'-AAG CTT TGC AGA GAC AGT GAC CAG-3'
VLF	5'-GAA TTC GAC ATT GAG ATG ACC CAG-3'
VLR	5'-AAG CTT TTT CAG CTC CAG CTT G-3'

* 画线部分为加入的酶切位点

1.4 MA18/7 重链可变区、轻链可变区原核表达载体的构建

取正确连入 pMD18-T 的阳性克隆质粒,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切,回收目的片段。将质粒 pTO-T7^[8] 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切并回收载体, T4 DNA 连接酶连接载体和目的片段。转化后小量提取质粒,用 *Bam* HI 和 *Hind* III 酶切鉴定,阳性克隆即为重组原核表达载体 pTO-T7-MA18/7-VH 和 pTO-T7-MA18/7-VL。

1.5 MA18/7 可变区抗体片段的表达与初步纯化

重组表达质粒 pTO-T7-MA18/7-VH 和 pTO-T7-MA18/7-VL 分别转化 *E. coli* ER2566 菌株,挑取单菌落于 3 mL LB(含 Kan 100 μg/mL)培养基中,37℃ 振荡培养过夜,转接菌液于 500 mL LB(含 Kan 100 μg/mL)培养基中,37℃ 振荡培养过夜,当菌液的 OD_{600} 值达 0.8 左右时加入 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导,诱导条件为 37℃,4h。离心收集菌体,超声破碎后再次离心以分离包涵体沉淀和上清。沉淀先后用 Buffer I(20 mmol/L Tris-Cl, pH 8.5, 100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA)和 2% Triton 洗涤后溶于含不同浓度尿素的 Buffer I 中。稀释至蛋白浓度约 100 μg/mL,用浓度较低的尿素透析并不断减少尿素含量直至将蛋白透析到 PBS 中,以 PEG20000 浓缩透析后样品,得抗体片段初步纯化产物。对纯化过程中各部分样品进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 抗体片段的金属离子亲和纯化

取适量 Talon His 树脂(Clontech 公司),以 10 倍柱体积的 PBS 平衡后加入抗体片段初步纯化产物,室温结合 1h 后收集穿透峰,加入洗涤缓冲液(含 5 mmol/L 咪唑的 PBS, pH 7.0)去除杂蛋白后加入洗脱缓冲液(含 150 mmol/L 咪唑的 PBS, pH 7.0)分部收集目的蛋白,对 PBS 透析后获得较高纯度的蛋白。

1.7 生物传感器测定抗体片段的抗原结合活性

应用 BIACORE X 生物传感器(BIAcore 公司)。在 CM5 芯片上偶联重组 HBV pre-S1 抗原^[9]。分别测定抗体片段 V_H 和 V_L 的浓度,经过计算调整使二者的摩尔浓度相同,等体积的 V_H 和 V_L 混合后在 37℃ 温育 4h。将等摩尔浓度的 V_H 、 V_L 及 V_H 和 V_L 的混合物等样本加入生物传感器,测定各样本与 pre-S1 抗原的结合活性。

1.8 竞争 ELISA 测定抗体片段的活性

以 HBV pre-S1 aa21-47 合成多肽 1 μg/mL 包被聚苯乙烯板,1% BSA 封闭非特异结合位点,每孔加入 50 μL 不同待测样本(抗体片段 MA18/7- V_H 、MA18/7- V_L 、或 V_H 和 V_L 等量混合物),以 PBS、4D11 和 8C11 为对照,再加上 50 μL 按 1:1000 稀释的 4D11-HRP,37℃ 温育 1h 后用 PBST 洗涤,加入显色底物显色,以酶标仪测定 $OD_{450/620}$ 。

1.9 间接法 ELISA 测定抗体片段的活性

将 MA18/7- V_H 和 MA18/7- V_L 等量混合后的混合物用 PBS 调整至浓度为 1 mg/mL 后进行梯度倍比稀释,分别加 100 μL 到以 aa21-47 多肽 1 μg/mL 包被的聚苯乙烯板中,37℃ 孵育 1h, PBST 洗 5 次后扣干,再每孔加入 100 μL 1:2500 稀释的 HRP 标记 anti-6His 抗体(Amersham Pharmacia),37℃ 孵育 0.5h,加入显色底物显色 15 min 后终止,以酶标仪测量 $OD_{450/620}$ 。

2 结果

2.1 MA18/7 重链可变区、轻链可变区原核表达载体的构建

通过引物在基因两端分别引入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点后,两段目的基因分别连接到同样酶切处理的载体 pTO-T7 中,即得到原核表达载体 pTO-T7-MA18/7- V_H 和 pTO-T7-MA18/7- V_L (图 1)。pTO-T7 在多克隆位点之后含有 6 个组氨酸(His)标签。测序结果证实全长为 348 bp 的 MA18/7 重链可变区基因和全长为 321 bp 的轻链可变区基因正确地克隆到 pTO-T7 载体中,与 GenBank 所载序列相符,且符合正确翻译 6 个 His 的读码框。

2.2 MA18/7 抗体可变区片段的表达与纯化

重组质粒 pTO-T7-MA18/7- V_H 和 pTO-T7-MA18/7- V_L 分别转化 *E. coli* ER2566,菌体经 IPTG 温度诱导后,15% 的 SDS-PAGE 显示在 14 kD 和 13 kD 的位置各有一条特异的表达带(图 2, lane 3, 6),即为 MA18/7 抗体片段 V_H 和 V_L 。所表达蛋白主要以包

涵体的形式存在,上清中表达量极低(图中未显示)。V_H、V_L 包涵体分别溶于含 8mol/L 尿素、4 mol/L 尿素的 Buffer I 中(图 2, lane 4,7)。经 His 柱纯化后纯度 > 90% (图 2, lane 5)。

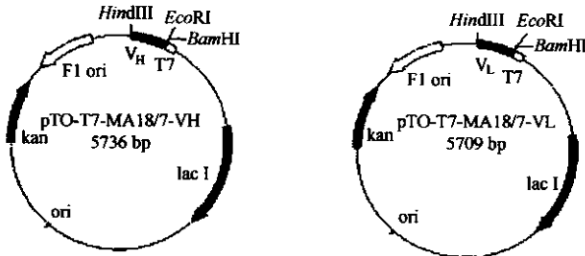


图 1 重组质粒 pTO-T7-MA18/7-V_H 和 pTO-T7-MA18/7-V_L

Fig.1 Recombinant plasmids of pTO-T7-MA18/7-V_H and pTO-T7-MA18/7-V_L

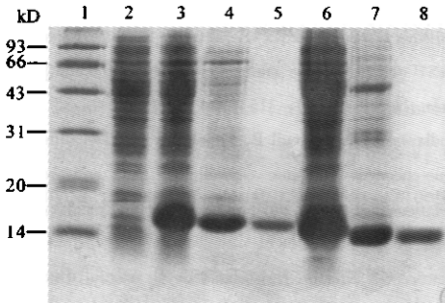


图 2 MA18/7 抗体可变区片段的 SDS-PAGE
Fig.2 SDS-PAGE of antibody variable domain fragments of MA18/7

1: molecular weight marker; 2: bacterial body of *E. coli* transformed by pTO-T7; 3: bacterial body of *E. coli* transformed by pTO-T7-MA18/7-V_H; 4: recombinant V_H in 8mol/L urea solution; 5: purified V_H; 6: bacterial body of *E. coli* transformed by pTO-T7-MA18/7-V_L; 7: recombinant V_L in 4mol/L urea solution; 8: purified V_L

2.3 生物传感器测定抗体片段的抗原结合活性

应用生物传感器检测重组小分子抗体与 pre-S1 抗原的结合,可见抗原抗体结合曲线在 V_H 或 V_L 单独进样后几乎不发生任何变化(图 3B、C),表明 MA18/7 单链抗体 V_H 和 V_L 单独均不具抗原结合活性。而 V_H 和 V_L 复性产物等量混合后的混合物进样后可发现一个迅速的结合过程(图 3A、D),说明 MA18/7 的轻链可变区抗体片段和重链可变区抗体片段在体外通过非共价键结合在一起,形成了具有完整抗原结合活性的最小抗体片段 Fv。此外,把混合物在 37℃ 温育 4h 后的产物(图 3A)与 V_H 和 V_L 混后即测(图 3D)比较未见明显差异,表明抗体片段 V_H 和 V_L 通过非共价键结合成 Fv 的过程是在短时间内完成的。

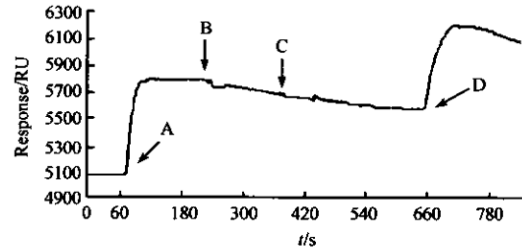


图 3 MA18/7 小分子抗体与 pre-S1 抗原的结合曲线

Fig.3 Binding curves of small molecular antibodies of MA18/7 with pre-S1 antigen
A: Mixture of V_L and V_H incubated for 4h on 37℃; B: V_H; C: V_L; D: mixture of V_L and V_H, no incubation

2.4 ELISA 测定小分子抗体的抗原结合活性

竞争 ELISA 发现单独 V_H 或 V_L 均不能竞争抗 pre-S1 单抗 4D11 与抗原的结合,而二者等量混合后形成的 Fv 段,竞争抑制率达 70% 以上(图 4),表明单抗 MA18/7 的抗原结合活性区域由重链可变区和轻链可变区共同组成。

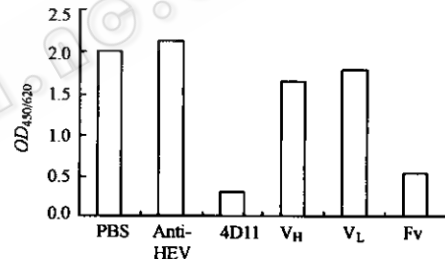


图 4 MA18/7 小分子抗体对抗 4D11 与抗原结合的竞争

Fig.4 Competition of antigenic binding of McAb 4D11 by small molecular antibodies of MA18/7

以抗 His 抗体为酶标抗体,间接法 ELISA 检测重组小分子抗体的抗原结合活性,结果与竞争法一致,单独的重链可变区或轻链可变区片段均无明显抗原结合活性,而混合后形成的 Fv 则能较好的结合抗原(图 5)。

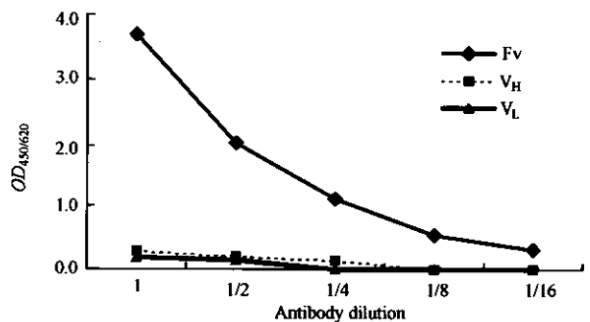


图 5 MA18/7 小分子抗体的间接 ELISA 结果
Fig.5 Indirect ELISA of recombinant small molecular antibodies of MA18/7

3 讨论

抗体活性依赖于其复杂的立体结构和某些化学修饰,因此除单链抗体外通常难以在原核中获得抗体活性片段。后来人们发现大肠杆菌的周质腔可将蛋白作一定程度的修饰,使应用细菌表达抗体片段(Fab或Fv)成为可能。Skerra^[10]等采用了先将Fv片段分泌到大肠杆菌的周质腔后再过亲和层析柱纯化,首次在大肠杆菌中获得了能够保持抗体的抗原结合活性的小分子抗体Fv。但周质分泌表达通常效率低下,严重抑制工程菌的生长,造成蛋白产量相对较低,很难扩大生产,难以满足对蛋白产量有一定要求的实验需求。本研究采用大肠杆菌原核表达系统,小分子抗体在细胞质中形成不溶的无活性的包涵体,经过尿素变性与透析复性过程而最终得到活性恢复的可变区抗体片段,等量的两种可变区抗体片段混合后获得的Fv片段较好的保持了亲本单抗的抗原结合活性,成为原核表达获得抗体活性片段的又一途径。

不少研究表明 V_H 对抗原的结合起主要作用^[11-13],不少单抗的 V_H 本身即可与抗原良好结合,但单独的轻链有时也能够与抗原结合^[14],甚至有单独的轻链可变区CDR3片段结合抗原的报道^[15]。本研究通过对抗体MA18/7的小分子抗体片段的研究显示,该单抗的 V_H 和 V_L 均无法与pre-S1抗原结合,只有二者相互结合形成Fv后才能保持亲本抗体MA18/7对特异抗原的结合活性。

HBV pre-S1中的aa21-47短肽是病毒附着细胞的部位,黑猩猩实验中已证明这一短肽疫苗可诱生出保护性抗体^[16]。中和抗体MA18/7识别pre-S1 aa31-35的DPAFR五肽,可能通过与HBV pre-S1的结合导致病毒表面蛋白构型的变化,病毒不能吸附并穿入肝细胞,从而起到中和作用,因此具有成为HBV特异性治疗抗体的可能。但由于MA18/7的鼠源性,应用于临床容易引发异源免疫反应,产生人抗鼠抗体(HAMA),影响治疗的效果,甚至引起严重的免疫损伤。本研究通过基因工程的方法,获得了重链可变区与轻链可变区结合而成的MA18/7的Fv片段。相对于完整单抗而言,Fv段仅保留了抗体重链和轻链的可变区,去掉了所有的恒定区,一方面分子量仅为完整抗体的1/6,大大降低了免疫原性,减少了HAMA发生的可能,另一方面由于无Fc段,不易与具有Fc受体的非靶细胞结合,减少了非特异结合的可能,此外小分子Fv参与血液循环和全身廓清的

速度比全抗体快,半衰期短,不易对全身正常组织产生不利的影响。研究中所获得的Fv片段具有较高的抗原结合活性,能够与HBV pre-S1抗原产生较为牢固的特异结合,有利于其发挥中和作用而达到清除血液中的病毒的目的,在体外疾病诊断、生物传感器、生物分离作用以及抗体的结构功能研究等方面均具有潜在的应用前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gerner PR, Friedt M, Oettinger R *et al.* The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children. *Virology*, 1998, 245(1): 163 - 172
- [2] Hui J, Mancini M, Li G *et al.* Immunization with a plasmid encoding a modified hepatitis B surface antigen carrying the receptor binding site for hepatocytes. *Vaccine*, 1999, 17(13 - 14): 1711 - 1718
- [3] Borisova G, Borschukova O, Skrastina D *et al.* Behaviour of a short preS1 epitope on the surface of hepatitis B core particles. *Biol Chem*, 1999, 380(3): 315 - 324
- [4] Budkowska A, Dubreuil P, Capel F *et al.* Hepatitis B virus pre-S gene-encoded antigenic specificity and anti-pre-S antibody: Relationship between anti-pre-S response and recovery. *Hepatology*, 1986, 6(3): 360 - 368
- [5] Kuttner G, Kramer A, Schmidtke G *et al.* Characterization of neutralizing anti-pre-S1 and anti-pre-S2 (HBV) monoclonal antibodies and their fragments. *Mol Immunol*, 1999, 36(10): 669 - 683
- [6] Sominskaya I, Pushko P, Dreilina D *et al.* Determination of the minimal length of preS1 epitope recognized by a monoclonal antibody which inhibits attachment of hepatitis B virus to hepatocytes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 1992, 181(4): 215 - 226
- [7] Germaschewski V, Murray K. Screening a monoclonal antibody with a fusion-phage display library shows a discontinuity in a linear epitope within PreS1 of hepatitis B virus. *J Med Virol*, 1995, 45(3): 300 - 305
- [8] Luo WX(罗文新), Zhang J(张军), Yang HJ(杨海杰) *et al.* Construction and application of an *Escherichia coli* high effective expression vector with an enhancer. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2000, 16(5): 578 - 581
- [9] Yang HJ, Chen M, Cheng T *et al.* Expression and immunoreactivity of chimeric particulate antigen of receptor binding site-core protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol*, 2004 (Accepted)
- [10] Skerra A, Pluckthun A. Assembly of functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 1988, 240(4855): 1038 - 1041
- [11] Jang YJ, Lecerf JM, Stoller BD. Heavy chain dominance in the binding of DNA by a lupus mouse monoclonal autoantibody. *Mol Immunol*, 1996, 33(2): 197 - 210
- [12] Davies J, Riechmann L. Antibody VH domains as small recognition units. *Biotechnology*, 1995, 13(5): 475 - 479

- [13] Ward ES, Fussow D, Griffiths AD *et al.* Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature*, 1989, 341: 484 - 485
- [14] Hu ZW(胡志伟), Duan ZJ(段招军), Zhu JG(朱建高) *et al.* V_H and shorter fragments with antigen-binding activities biopanned from human repertoire single-chain Fv libraries. *Chinese Journal of Immunology*(中国免疫学杂志), 1999, 4: 148 - 150
- [15] Li J(李竞), Wang Y(王瑛), Wang ZZ(王卓智) *et al.* Construction and expression of anti-human gastric cancer mAb 3H11 Fab. *Progress in Biochemistry and Biophysics*(生物化学与生物物理进展), 1999, 26(4): 369 - 373
- [16] Neurath AR, Seto B, Strick N. Antibodies to synthetic peptides from the preS1 region of the hepatitis B virus (HBV) envelope (eav) protein are virus-neutralizing and protective. *Vaccine*, 1989, 7(3): 234 - 236

Prokaryotic Expression of Variable Domain of Neutralizing Antibody Against Hepatitis B Virus pre-S1

GUAN Bao-Quan ZHANG Jun* LUO Wen-Xin CHEN Min WU Ting CHENG Tong XIA Ning-Shao
(The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The murine monoclonal antibody MA18/7 was a neutralizing antibody that specifically recognized the antigen of pre-S1 region of hepatitis B virus (HBV). To express small molecular antibody of MA18/7, the genes of the heavy chain variable domain (V_H) and the light chain variable domain (V_L) of MA18/7 were cloned respectively into prokaryotic expression vector pTO-T7 and expressed in *E. coli*. Both V_H and V_L were highly expressed in the form of inclusion body, which could attain over 90% pure by a process of denaturalization, renaturation and metal ion affinity chromatography. The results of biosensor, competitive inhibition ELISA and indirect ELISA demonstrated that the V_H or V_L fragment alone couldn't combine with HBV pre-S1 antigen, while the pre-S1 antigen and 37°C incubated equal molar mixture of V_H and V_L mixed could bind tightly to form the active variable domain Fv with good combining activity. Thus suggested that the antigen-binding region of MA18/7 consist of V_H and V_L together.

Key words hepatitis B virus, neutralizing antibody, variable domain, expression

Received: 03-26-2004

This work was supported by High Technology and Development Program of China ("863" Program, No. 819-Q-06, No. 2001AA628120).

* Corresponding author. Tel: 86-592-2184110; E-mail: zhangj@jingxian.xmu.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>