

# 人源抗狂犬病毒二硫键稳定性 Fv 抗体的生物学特性研究 Improved Biochemical Characteristics of Human Disulfide-stabilized Fv Fragment to Rabies Virus

赵小玲<sup>1,3</sup>, 荫俊<sup>1</sup>, 张素娟<sup>2</sup>, 陈伟强<sup>3\*</sup>

ZHAO Xiao-Ling<sup>1,3</sup>, YIN Jun<sup>1</sup>, ZHANG Su-Juan<sup>2</sup> and CHEN Wei-Qiang<sup>3\*</sup>

1. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071

2. 解放军第 254 医院, 天津 300142

3. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050

1. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

2. The 254 Hospital of PLA, Tianjin 300142, China

3. Institute of Health and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Science, Tianjin 300050, China

**摘要** 对抗狂犬病毒 scFv 进行稳定性重构, 纯化制备有活性的人源抗狂犬病毒二硫键稳定性 Fv 抗体片段(dsFv), 然后对其生物学活性进行研究。将 dsFv  $V_H$ 、 $V_L$  基因在原核表达系统 pET22b(+)/BL21(DE3)中表达, 将其包涵体分别在变性缓冲液中溶解, 稀释后加入折叠缓冲液使其折叠形成有活性的 dsFv 抗体片段, 上 Ni-NTA 柱进行纯化。然后以其亲本 scFv 作为对照, 对 dsFv 的亲合力、稳定性以及体外中和活性进行评价。结果显示, 与其母本抗体 scFv 相比, 重构后的抗狂犬病毒 dsFv 保持了对狂犬病毒 Vero 疫苗的特异性识别能力, 而且其亲和力明显提高; 抗狂犬病毒 dsFv 在血清和 BSA 中的稳定性有明显的改进, 而且其热稳定性和抵抗尿素化学变性的能力亦大大改进; 蚀斑减少中和实验显示, 抗狂犬病毒 dsFv 抗体片段能特异中和狂犬病毒, 阻止狂犬病毒对 Vero 细胞的吸附, 抑制狂犬病毒对靶细胞的感染, 从而导致蚀斑减少甚至消失; scFv 抗体片段仅可部分抑制蚀斑的形成, 但不能全部抑制。这为进一步研究抗狂犬病毒 dsFv 基因工程抗体的免疫保护作用及其在临床的应用奠定了基础。

**关键词** 狂犬病毒, 稳定性, 二硫键稳定性 Fv 抗体

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0265-05

**Abstract** This study is (1) to improve the stabilization of human scFv to rabies virus; (2) to prepare active human dsFv fragment; and (3) to evaluate the biological activities of dsFv. The dsFv  $V_H$  and  $V_L$  were separately expressed in PET22b(+)/BL21 (DE3), solubilized and combined in appropriate molar ratio in refolding solution. The resultant dsFv fragments were evaluated for its protection against rabies virus, its affinity and stability, in reference to the cognate scFv. The dsFv was found to bind specifically to Vero vaccine of rabies virus. Compared to the scFv, the dsFv was more stable, had higher affinity, and was able to inhibit the infection of Rabies virus to Vero cell. This established a solid basis for the clinical application of dsFv to rabies virus.

**Key words** rabies virus, stability, disulfide-stabilized Fv

免疫球蛋白的 Fv 片段是由重链可变区( $V_H$ )和轻链可变区( $V_L$ )组成的异二聚体, Fv 是针对特异性

抗原并具有高亲和力的最小功能分子。IgG 或 Fab 片段是靠链间二硫键连接的, 而 Fv 片段则不是, 所

Received: August 20, 2004; Accepted: October 18, 2004.

\* Corresponding author. Tel: 86-22-84655333; E-mail: tjchenwq@sohu.com

以 Fv 很不稳定。Huston 等<sup>[1]</sup>在  $V_H$  和  $V_L$  链之间通过一个连接肽(linker peptide)来增强其稳定性,称为单链抗体(scFv)。尽管很多例子表明 scFv 具有良好的结合活性,但有时 scFv 比其亲本抗体的亲和力明显降低,并常常显示聚集倾向,尤其在 37℃ 时 scFv 的稳定性较差,这与轻重链可变区由作用力较弱的非共价键连接在一起有关。为了改善这一缺点,有人在  $V_H$  和  $V_L$  之间引入了一个链间二硫键,构建了 dsFv<sup>[2,3]</sup>。迄今已有十余个 dsFv 见诸报道,与相应 scFv 相比,其稳定性有非常明显的改进<sup>[4]</sup>。

与许多报道一致,本实验室经噬菌体抗体库技术筛选获得的抗狂犬病毒 scFv 虽然具有较好的抗原特异性和亲和力,但其稳定性不理想<sup>[5]</sup>,因此我们对其进行了稳定性改构,即应用 PCR 定点突变法在 scFv 的  $V_E$  的 44 位氨基酸和  $V_L$  的 100 位氨基酸各引入了一个半胱氨酸,构建了抗狂犬病毒 dsFv  $V_H$ 、 $V_L$  突变基因。本研究在此基础上将 dsFv  $V_H$ 、 $V_L$  基因分别在原核系统中表达,制备并纯化有活性的抗狂犬病毒 dsFv 抗体片段,并以其母本抗体 scFv 作为对照,对其生物学活性进行了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人源抗狂犬病毒 scFv 的制备参见文献[6];携带抗狂犬病毒 dsFv  $V_H$ 、 $V_L$  突变基因的克隆由本室制备;金葡菌肠毒素 B、Anti-Lewis<sup>x</sup> dsFv(简称 Ly-dsFv)由军事医学科学院五所姜永强老师惠赠;狂犬病毒鸡卵黄抗体 IgY 为本室制备;狂犬病毒 PM 株 Vero 疫苗为法国维尔博公司产品;狂犬病毒的细胞适应株 aG 为中国药品生物制品鉴定所保存毒株;Vero 细胞为军事医学科学院五所病毒室保存。

### 1.2 dsFv $V_H$ 和 $V_L$ 表达质粒的构建及表达

将携带抗狂犬病毒 dsFv  $V_H$ 、 $V_L$  突变基因的质粒用 *Nde* I 和 *Not* I 进行双酶切,分别与经同样双酶切回收好的 pET22b(+)载体用 T4 连接酶连接,转化 *E. coli* BL21(DE3),IPTG 诱导,重组蛋白以包涵体形式表达。

### 1.3 dsFv 重组蛋白的折叠和纯化

$V_H$  和  $V_L$  包涵体分别在变性缓冲液中溶解,稀释后加入折叠缓冲液中<sup>[7]</sup>, $V_H$  和  $V_L$  比例为 1.5:1,加入折叠缓冲液中的稀释度为 1:100。10℃ 中进行折叠 16h。

将经过折叠的溶液加入 30kD 超滤柱,4℃,

4000r/min 离心 4h,去除未折叠的  $V_H$  和  $V_L$ ,然后把未滤过的液体上 Ni-NTA 柱纯化<sup>[8]</sup>,收集洗脱峰的流出液,取少量与等体积的 2×SDS 样品缓冲液混合,煮沸 5min 后离心,取上清进行 15% SDS-PAGE 电泳分析。其余收集的重组蛋白在 4℃ 对 PBS 透析过夜,将纯化的重组蛋白冻存于 -70℃ 备用。

### 1.4 抗狂犬病毒 dsFv 的抗原特异结合活性 (ELISA 检测)

将狂犬病毒 Vero 疫苗用包被液稀释成不同浓度,包被 96 孔板,用金葡菌肠毒素 B 和 BSA 做对照。3% BSA-PBS(pH 7.0)进行封闭后,加入用 PBS 稀释的纯化抗体(scFv, dsFv),每孔 70μL,HRP 标记的抗 His-Tag 抗体作二抗,以北京耀华公司的 A 液和 B 液为底物,在 450nm 波长下测定 OD 值。

### 1.5 抗狂犬病毒 dsFv 的相对亲和力测定

抗狂犬病毒人源抗体的相对亲和力采用硫氰酸盐洗脱法进行比较<sup>[9,10]</sup>,狂犬病毒 Vero 疫苗包被 96 孔板,3% BSA-PBS 封闭,加入相同浓度的上述纯化人源化抗体,37℃ 孵育 1h。PBS-T 洗板,加入含不同浓度  $NH_4SCN$ (0.2~2 mol/L)的 0.1mol/L PBS 溶液(pH 6.0),每孔 100μL 室温放置 15min, PBS-T 洗板,加入 HRP 标记的抗 His-Tag 抗体,每孔 50μL,37℃ 1h。以 A 液和 B 液为底物,显色,加入 1mol/L 硫酸终止反应后,检测  $OD_{450}$ 。以  $OD_{450}$  下降 50% 时相应的  $NH_4SCN$  的浓度作为相对亲和力指数。

### 1.6 抗狂犬病毒 dsFv 的相对稳定性检测

稳定性是影响抗体功能的最重要的生物学特性之一。抗体的相对稳定性比较方法参见文献[4,11]。用人血清、PBS 与纯化抗体在 37℃ 共同孵育,以比较二者的稳定性。热稳定性的比较通过将纯化抗体与 PBS 在不同温度下共同孵育 3h 来检测。抵抗尿素变性能力的比较通过与不同浓度的尿素在 PBS 中于 10℃ 孵育 3h 来检测。

### 1.7 抗狂犬病毒 dsFv 的蚀斑减少中和实验<sup>[12]</sup>

将制备的 scFv 和 dsFv 抗体片段用 MEM 培养基调整为 400μg/mL,并用 MEM 培养基作梯度稀释。取一定量各稀释度的抗体加入 24 孔细胞培养板内,再加入等量中和用狂犬病毒 aG 株病毒悬液,要求每孔的狂犬病毒蚀斑数为 10~60 个,用抗狂犬病毒 Vero 疫苗 IgY 抗体作阳性对照, Ly-dsFv 作阴性对照。每稀释度接种 4 孔,放置 37℃ 水浴 1h。再将准备好的 Vero 细胞悬液接种于上述 24 孔细胞培养板内,每孔接种 1mL。置于 5%  $CO_2$  34℃ 温箱内静置培

养 8~9d 后,去培养液后用含 0.1% 结晶紫的 10% 甲醛蒸馏水染色 5~8min,流水冲后于低倍光学显微镜下计数空斑。

## 2 结果

### 2.1 抗狂犬病毒 dsFv 重组蛋白的制备

$V_H$  和  $V_L$  包涵体分别在变性缓冲液中溶解,稀释后按比例混合在折叠缓冲液中折叠 36h,SDS-PAGE 分析结果见图 1。 $V_H$  和  $V_L$  蛋白在约 25kD 处形成了一个融合蛋白(见泳道 5),此蛋白在还原剂和煮沸 5~10min 后均可还原为  $V_H$  和  $V_L$  两个蛋白(见泳道 4),而在 37℃ 10min 则没有发生还原。

### 2.2 抗狂犬病毒人源抗体与抗原结合的 ELISA 检测结果

以不同稀释浓度的狂犬病毒和 Vero 疫苗包板,金葡菌肠毒素 B 和 BSA 做空白对照,加入的抗体量一致。ELISA 检测结果见图 2 和图 3。

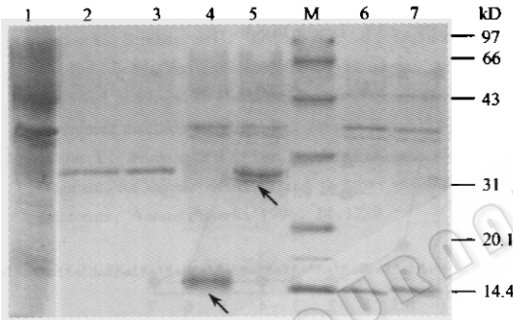


图 1 抗狂犬病毒 dsFv 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of dsFv to rabies virus

M: protein markers; 1: total cellular proteins (control); 2,3: purified dsFv; 4: dsFv after 10min in boiling water; 5:  $V_H$  protein and  $V_L$  protein after folding; 6: denatured  $V_L$  protein; 7: denatured  $V_H$  protein.

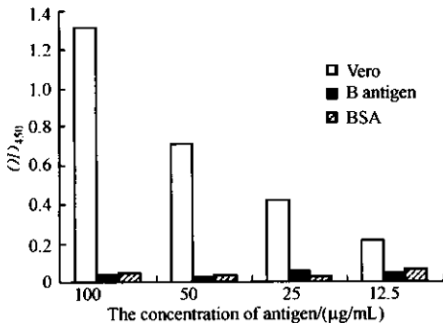


图 2 抗狂犬病毒 scFv 的抗原特异结合活性

Fig. 2 Specific binding of scFv to the antigen

结果显示,抗狂犬病毒 dsFv 与其母本抗体 scFv 一样可以与狂犬病毒 Vero 疫苗特异结合,且 ELISA 值随抗原浓度的降低而呈梯度降低。

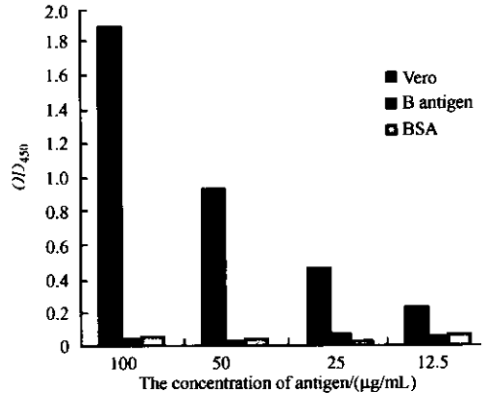


图 3 抗狂犬病毒 dsFv 的抗原特异结合活性

Fig. 3 Specific binding of dsFv to the antigen

### 2.3 抗狂犬病毒人源抗体的相对亲和力测定

用硫氰酸盐洗脱法比较改构抗体 dsFv 与母本抗体 scFv 对狂犬病毒的相对亲和力(图 4)。纵轴值为 1.69 即  $A_{450}$  下降为未加  $NH_4SCN$  时的 50% 时,scFv 对应的  $NH_4SCN$  浓度即相对亲和力指数,为 0.8mol/L,而 dsFv 是 1.4mol/L。这表明改构后的 dsFv 对狂犬病毒的相对亲和力要高于 scFv。

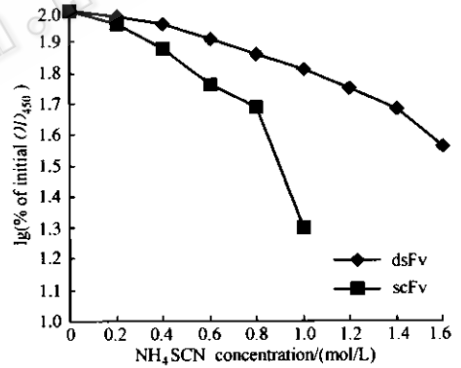


图 4 硫氰酸盐洗脱法比较 scFv 和 dsFv 对狂犬病毒的亲和力

Fig.4 ELISA measurement of relative affinity of scFv and dsFv using thiocyanate elution

### 2.4 抗狂犬病毒人源抗体的相对稳定性比较

稳定性是影响抗体功能的最重要的生物学特性之一,我们检测了抗狂犬病毒的 scFv 和 dsFv 在血清和 PBS 中的稳定性、热稳定性以及抵抗尿素变性的能力,结果见图 5。

结果显示,在 PBS 中 37℃ 1h 后,scFv 的活性急剧降低,2h 后已基本没有活性。而 dsFv 仅在 3h 后活性稍有降低,以后一直较稳定,到第 6 天时仍然可以检测到。在血清中,2h 时 scFv 的活性迅速降低,而 dsFv 的活性在第 10 天还可检测到。

热稳定性的比较结果显示,35℃ 时 scFv 的活性

开始降低,40℃时其活性全部丧失。而 dsFv 在 41℃ 时活性才开始下降,42℃ 还有活性。在抵抗尿素变性的实验中,scFv 在 0.5mol/L 尿素中就全部丧失活性,dsFv 暴露于 5mol/L 尿素中,37℃ 3h 后仍然保持活性。

### 2.5 抗狂犬病毒 dsFv 的蚀斑减少中和实验

将制备的抗狂犬病毒 scFv 和 dsFv 抗体片段作梯度稀释后,对 aG 株狂犬病毒蚀斑进行抑制实验,在蚀斑形成的高峰期倒掉培养液进行染色,光学显微镜下清晰可见不染色的蚀斑区。结果表明抗狂犬病毒 dsFv 抗体片段和抗狂犬病毒 Vero 疫苗 IgY 抗

体一样可以完全抑制形成蚀斑的活病毒颗粒,且抑制程度与抗体片段的浓度成正比,dsFv 片段的浓度为 32 $\mu$ g/mL 时被完全抑制。而其母本抗体 scFv 在一定程度上可抑制蚀斑的形成,但不能全部抑制。而 Ly-dsFv 对 aG 株狂犬病毒蚀斑形成无抑制作用。这说明所制备的抗狂犬病毒 dsFv 抗体片段能特异中和狂犬病毒,阻止狂犬病毒对 Vero 细胞的吸附,抑制了狂犬病毒对靶细胞的感染,从而导致蚀斑减少,甚至消失。scFv 抗体片段亦可抑制蚀斑的形成,但不能全部抑制,可能与其稳定性差有关。

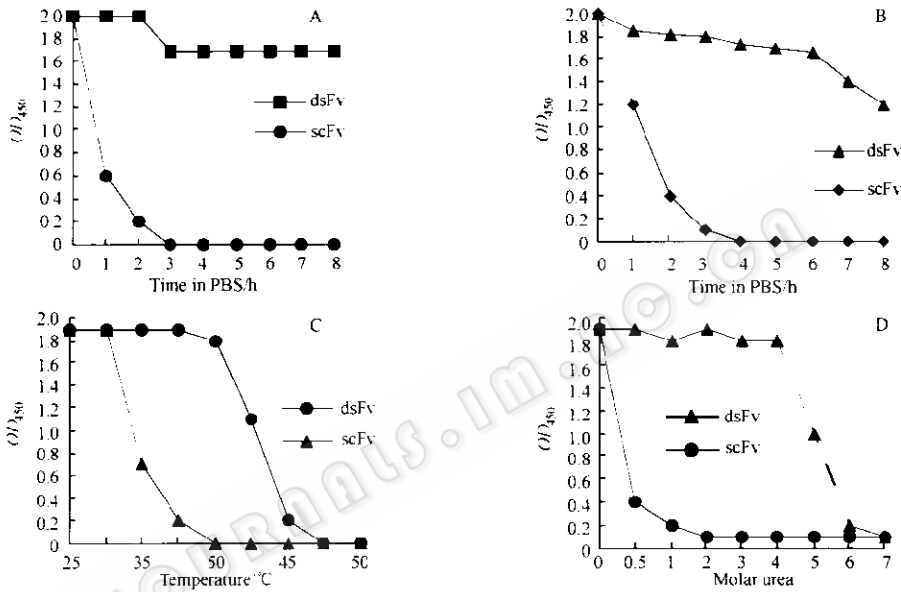


图5 dsFv 和 scFv 的稳定性比较

Fig.5 The stability of scFv and dsFv

A: stability of scFv and dsFv at 37°C in PBS; B: stability of scFv and dsFv in human serum at 37°C; C: thermostability of scFv and dsFv at various temperatures after 3h in PBS; D: stability of scFv and dsFv incubated for 3h at 10°C in PBS containing various concentrations of urea.

## 3 讨论

本研究将抗狂犬病毒 dsFv  $V_H$ 、 $V_L$  突变基因分别在原核系统中表达,然后在折叠液中共同复性,成功制备了有活性的抗狂犬病毒 dsFv 抗体片段。改构后 dsFv 的抗原特异性和结合活性与其母本抗体没有明显区别,表明引入二硫键的位置不影响抗体的特异性和抗原结合活性。相对亲和力检测结果显示改构后 dsFv 对狂犬病毒 Vero 疫苗的相对亲和力指数要高于 scFv,分析原因可能是由于 dsFv 的稳定性改进后,抵抗  $NH_4SCN$  变性的能力提高,从而导致相对亲和力指数升高。

抗狂犬病毒 dsFv 与其母本抗体 scFv 相比,最大

的改进在于其稳定性的提高。在血清和 PBS 中 37℃ 孵育 2~4h, scFv 常常聚集而失去其全部或大部分的活性,而 dsFv 却非常稳定,在 PBS 中第 6 天时仍然具有活性,在人血清中 37℃ 孵育 10d 以上还可以检测到活性。而且从结果可看出,dsFv 的热稳定性和抵抗尿素化学变性的能力亦大大改进,35℃ 时 scFv 的活性开始降低,40℃ 时其活性全部丧失,而 dsFv 在 41℃ 时活性才开始下降,42℃ 还具有活性。scFv 在 0.5mol/L 的尿素中就会失活,而 dsFv 在 5mol/L 的尿素中仍可保持天然状态而不变性。分析其原因,可能是因为 dsFv 中的链间二硫键加强了  $V_H$  和  $V_L$  的结合,从而阻止二者的解离,避免了抗体分子的聚集。

与其它药物一样,稳定性是抗体是否可用于临床的重要特性之一。本研究结果表明改构后的抗狂犬病毒 dsFv 与其母本抗体 scFv 相比,其抗原特异性未发生改变,而其亲和力和稳定性均有明显提高,并且抗狂犬病毒 dsFv 可特异性地中和狂犬病毒,阻止病毒对 Vero 细胞的吸附,从而抑制了狂犬病毒对靶细胞的感染,这为抗狂犬病毒基因工程抗体在临床的应用奠定了基础。另一方面,dsFv 突变基因的构建技术成熟、简便,而且由于其稳定性的改进,使其产率比相应 scFv 的产率大大提高<sup>[13]</sup>,因此是抗体稳定性改构的一种有效途径。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Huston JS, Levinson D, Mugdett HM *et al*. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-dioxigenin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**:5879
- [2] Brinkmann U, Reiter Y, Jung SH *et al*. A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**:7538 - 7542
- [3] Reiter Y, Brinkmann U, Webber K *et al*. Engineering interchain disulfide bonds into conserved framework regions of Fv fragments: improved biochemical characteristics of recombinant immunotoxins containing disulfide-stabilized Fv. *Protein Eng*, 1994, **7**:697 - 704
- [4] Reiter Y, Brinkmann U, Lee B *et al*. Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nature Biotech*, 1996, **14**:1239
- [5] Zhao XL (赵小玲), Yin J (荫俊), Wang H (王慧) *et al*. Construction of human phage-displayed scFv library and selection of the scFv against rabies virus. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2004, **20**(2):243 - 247
- [6] Zhao XL (赵小玲), Yin J (荫俊). The construction of prokaryotic expression plasmid and high-level expression of the human single chain Fv fragment gene to rabies virus. *Letters in Biotech*(生物技术通讯), 2004, **15**(2):115 - 117
- [7] Webber KO, Reiter Y, Brinkmann U *et al*. Preparation and characterization of a disulfide-stabilized Fv fragment of the anti-Tac antibody: comparison with its single-chain analog. *Mol Immunol*, 1995, **32**:249
- [8] Colangeli R. Three-step purification of lipopolysaccharidefree polyhistidine-tagged recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Chromatography B*, 1998, **714**:223 - 235
- [9] Macdonald RA, Hosking CS, Jones CL. The measurement of relative affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods*, 1988, **106**:191 - 194
- [10] Muller BH, Lafay F, Demangel C *et al*. Phage-displayed and soluble mouse scFv fragments neutralizes rabies virus. *J Virol Methods*, 1997, **67**(2):221 - 233
- [11] Reiter Y, Brinkmann U, Kreitman RJ *et al*. Stabilization of the Fv fragment in recombinant immunotoxins by disulfide bonds engineered into conserved framework regions. *Biochemistry*, 1994, **33**:5451 - 5459
- [12] Yu YX (俞永新), Zhu JH (朱家鸿), Xie SH (谢世宏). Rabies and Vaccine to Rabies Virus. The Medical Press of China(中国医药出版社), 2001
- [13] Reiter Y, Pai LH, Brinkmann U *et al*. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of a recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Cancer Res*, 1994, **54**:2714 - 2718