

人免疫缺陷病毒 I 型膜糖蛋白 gp160 人单链抗体

阎锡蕴¹ 李秀玲¹ 王凤彩¹ 何红霞² 貌盼勇²

¹(中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

²(解放军 302 医院病毒室 北京 100039)

关键词 人免疫缺陷病毒, 糖蛋白 gp160, 人单链抗体

分类号 Q511 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0252-54

人获得性免疫缺陷综合症(Acquired Immunodeficiency Syndrome, 简称 AIDS)主要是由人免疫缺陷病毒 I 型(HIV-1)引起的严重危害人类健康的传染病。HIV 研究的最新进展揭示了膜糖蛋白 gp120 与其受体和中和抗体复合物晶体结构^[1-2]。它解释了 HIV 与体液免疫系统的相互关系,为 HIV 中和抗体及新型疫苗的研究提供了结构模型。

在 HIV 中和抗体研究方面,目前面临的主要挑战是应付抗原变异,制备多种具有中和病毒作用的人抗体^[3]。以往报道的 HIV 抗体大多是鼠源单克隆抗体,这些抗体在研究抗原表位结构和功能以及指导 HIV 疫苗设计等方面发挥了重要作用。然而由于免疫原性问题,它们在 AIDS 的治疗方面受到了限制。本文介绍一株特异识别 HIV 包膜糖蛋白 gp160 基因工程人单链抗体。由于该抗体为人源抗体,因此它不仅能够用于抗原表位及抗体保护作用相互关系的研究,而且将可能成为爱滋病的免疫治疗药物。

1 材料和方法

1.1 材料

噬菌体半合成抗体文库^[4]由英国剑桥大学 MRC 中心赠送;抗噬菌体抗体购自 Pharmacia Biotech 公司;辣根过氧化物酶标羊抗鼠 IgG 购自北京中预卫科生物工程公司;gp160 由解放军 302 医院提供;Nunc-免疫管和 ELISA 板购自 Gibco BRL 公司;一般试剂为分析纯。

1.2 方法

噬菌体人抗体库经过培养扩增后,用 M13K07 辅助噬菌体超感染,收集上清。用 10~100 μ g/mL gp160 作为抗原,按文献[5]的方法对噬菌体抗体库进行 6 轮“亲和-洗脱-感染-扩增”免疫筛选。从最后一轮洗脱下来的噬菌体抗体中挑选 60 个单菌落进行 ELISA 鉴定。把其中结合 gp160 最强的阳性克隆扩增,纯化噬菌体抗体,感染大肠杆菌 HB2151。用 2 \times YT 培养基(含 1 mmol/L IPTG),在 30 $^{\circ}$ C 诱导培养 20h 后,收集培养上清。

ELISA:用 1~10 μ g/mL gp160 溶液包被 96 孔板 4 $^{\circ}$ C 过夜。经过 2% BSA 封闭后,加入重组噬菌体抗体或可溶性单链抗体温育 2h。前者直接用过氧化物酶标记的抗噬菌体抗体显色,后者分别用鼠抗 c-myc 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体,温育 2h 后进行显色反应。在 490 nm 处读每孔的光吸收值。

Dot-blot:在硝酸纤维素膜上分别点 2 μ g/ μ L gp160 和其它蛋白溶液。对膜进行封闭和洗涤后,与可

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39470661)。

收稿日期:1998-04-08, 修回日期:1998-08-10。

溶性抗体 XY160 温育 2h,用鼠抗 c-myc 抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体温育 2h。最后加入底物进行显色反应。

2 结 果

本实验选用半合成成人抗体库^[4]。该库中的抗体结构是由人抗体重链和轻链可变区组成,其中重链可变区的 CDR3 是由 4~12 个氨基酸随机排列人工合成的。各种抗体展示在噬菌体的表面,库容量大于 10⁸。我们用重组 HIV 包膜糖蛋白 gp160 多肽作为抗原,对人抗体库进行 6 轮“亲和-洗脱-感染-扩增”免疫筛选,从中挑选出 4 株与 gp160 结合较强的抗体。其中免疫活性最高的一株命名为 XY160(图 1)。

为了获得可溶性单链抗体,我们把含有抗体 XY60 基因的重组质粒转化琥珀突变非抑制型菌株 HB2151。由于在重组质粒 pHEN1-XY160 中,单链抗体 3' 末端与噬菌体外壳蛋白 p III 基因之间有一琥珀终止密码子。该密码子在抑制菌株中,被读作谷氨酰胺;而在非抑制菌株 HB2151 中,被识别为终止信号。从而使单链抗体与噬菌体外壳蛋白 g3p 分离,以可溶性抗体的形式表达并渗入培养上清中。

为了便于检测,在单链抗体 XY160 基因的 3' 末端插入一段编码 c-myc 小肽的基因,作为标志物表达在可溶性单链抗体的末端,用于可溶性单链抗体的鉴定。

含单链抗体的培养上清经过硫酸铵 5 倍浓缩后,用 SDS-PAGE 凝胶分离,转移到硝酸纤维素膜上,用抗 c-myc 抗体识别尾部含有 c-myc 的单链抗体 XY160,分子量为 28kD(图 2)。说明可溶性单链抗体在菌株 HB2151 中获得了分泌表达。

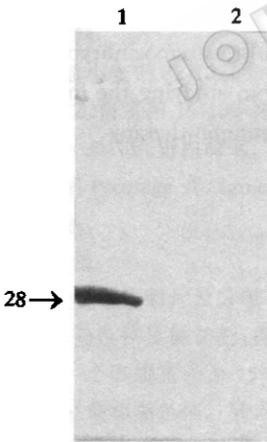


图 2 免疫印迹鉴定可溶性单链抗体 XY160

1. scFv XY160 in induced culture supernatant; 2. Non-induced culture supernatant. The number in the left showing protein molecular weight(kD)

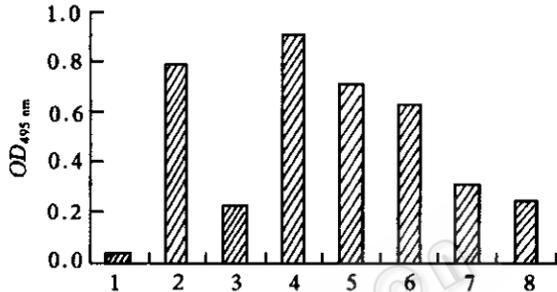


图 1 ELISA 分析重组噬菌体抗体与 gp160 的结合活性 1. Negative control(wild type phage M13); 2~8. Selected phage antibodies bound to gp160; 4. Showing antibody XY160

ELISA 和点免疫印迹分别用于单链抗体 XY160 的免疫活性鉴定。结果均表明,单链抗体 XY160 能够与重组 gp160 多肽结合,而不与人血清白蛋白、乙肝病毒表面抗原、癌胚抗原 CEA 以及促血管内皮细胞生长因子等发生交叉反应(图 3),表明抗体 XY160 特异识别 gp160 多肽。

3 讨 论

本实验采用的重组 gp160 含有 140 个氨基酸,包括 gp120 的羧基端和 gp41 的抗原表位,是 HIV 膜蛋白分子变异较小的区域。我们研制出的 2 种不同形式人单链抗体,即噬菌体单链抗体和可溶性单链抗体均能够识别该抗原,其抗原表位需要进一步定位。单链抗体 XY160 将作为 HIV 结构与功能研究的辅助工具,用于研究抗原表位与抗体中和作用的关系;由于该抗体是人源抗体,经过进一步改良后有可能用于 AIDS 的免疫治疗。它将避免鼠抗体在临床应用时所引起的人抗鼠抗体反应。

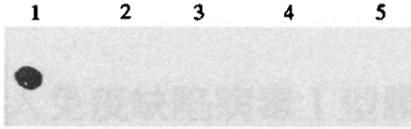


图3 点免疫印迹分析单链抗体 XY160 的特异性

(1)HBV surface antigen; (2)Carcinoembryonic antigen; (3)Vascular endothelial growth factor And human albumin (4)

由于影响 HIV 中和作用的主要因素是抗原变异、抗原构象变化以及抗原表位被遮盖,因此需要制备多种具有中和病毒作用的人抗体。作者最近还研制出了针对 gp120 V3 环的人单链抗体并对这些识别不同抗原表位的抗体进行了分析(另作报道)。有关抗体 XY160 的高效表达和病毒中和作用正在进行中。

参 考 文 献

- [1] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson. *Nature*, 1998, **393**: 648~659.
- [2] R. Wyatt, P. D. Kwong, E. Desjardins. *Nature*, 1998, **393**: 648~659.
- [3] P. Pognard, P. J. Klasse, J. Sattentau. *Immunology Today*, 1996, **17**: 239~246.
- [4] J. Kruijff. *J. Mol. Biol.*, 1995, **248**: 97~105.
- [5] 阎锡堃, 田 波等. 中国科学, B 辑, 1994, **24**: 937~941.

Human Single-chain Antibody to HIV-1 gp160*

Yan Xiyun¹ Li Xiuling¹ Wang Fengcai¹ He Hongxia² Mao Panyong²

¹(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

²(Hospital of PLA 302, Beijing 100039)

Abstract We have generated a human single-chain antibody to HIV-1 gp160 from the semi-synthetic antibody library. The engineered antibody, referred as XY160, bound to recombinant gp 160 specifically, but not to other proteins, for instance, human albumin, HBsAg, carcinoembryonic antigen, and vascular endothelial growth factor. The antibody will be applied in studying the interaction of HIV and neutralizing antibody. It may also have potential for AIDS immuno-therapy.

Key words HIV-1, gp160, human single-chain antibody

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No.39470661)