

利用抗原结合多肽嫁接抗体技术制备抗 hCG 单域抗体

彭静, 王琼, 程小玲, 刘梦雯, 王美, 辛化伟

武汉科技大学 生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430065

彭静, 王琼, 程小玲, 等. 利用抗原结合多肽嫁接抗体技术制备抗 hCG 单域抗体. 生物工程学报, 2018, 34(4): 569–577.

Peng J, Wang Q, Cheng XL, et al. Preparation of anti-hCG single domain antibody by antibody grafting technique using an antigen-binding peptide. Chin J Biotech, 2018, 34(4): 569–577.

摘要: 本研究旨在人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 的结合多肽的基础上应用嫁接抗体技术制备抗 hCG 单域抗体, 简化单域抗体制备过程, 提高多肽生化稳定性。利用单域抗体通用骨架 (cAbBCII10), 以 hCG 结合多肽取代互补决定区 CDR1 或 CDR3, 合成 cAbBCII10 嫁接抗体全基因序列并与 sfGFP 基因序列融合后, 插入到带有 His 标签的原核表达载体 pET30a(+) 中, 成功构建了 pET30a-(His6)-cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP 与 pET30a-(His6)-cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 融合蛋白表达质粒。将重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 用 IPTG 诱导表达融合蛋白, 得到高表达量的可溶性融合蛋白。利用 Ni-NTA 亲和柱纯化得到纯蛋白, 应用 SDS-PAGE 鉴定纯化的蛋白为正确表达的目标蛋白。通过抗原抗体结合实验, 发现 hCG 结合多肽嫁接到单域抗体通用骨架的互补决定区 CDR1 或 CDR3 后都有抗原结合活性, 具有相似的抗体滴度, 且嫁接到 CDR3 后的抗原结合活性比 CDR1 要高 (2–3 倍)。嫁接抗体基本保留了所用单域抗体框架较为稳定的生化特性, 具有一定的热稳定性和较好的碱耐受性, 同时, 所接入的 hCG 结合片段对 hCG 具有较特异的结合活性, 为进一步优化抗原结合多肽嫁接抗体技术制备抗 hCG 单域抗体提供了可靠的实验基础。

关键词: hCG, 单域抗体, 嫁接抗体, CDR1, CDR3, 融合蛋白, 表达纯化

Received: September 21, 2017; **Accepted:** December 27, 2017

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31371385).

Corresponding authors: Huawei Xin. Tel: +86-27-68893368; E-mail: xinhuaWei@wust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31371385) 资助。

网络出版时间: 2018-01-10

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180109.0849.002.html>

Preparation of anti-hCG single domain antibody by antibody grafting technique using an antigen-binding peptide

Jing Peng, Qiong Wang, Xiaoling Cheng, Mengwen Liu, Mei Wang, and Huawei Xin

College of Life Science and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei, China

Abstract: We used the antibody grafting technology to prepare anti-hCG single-domain antibodies on the basis of antigen-binding peptide to simplify the single-domain antibody preparation process and improving the biochemical stability of peptide. By using a universal single-domain antibody backbone (cAbBCII10), CDR1 or CDR3 was replaced by the hCG-binding peptide, and the grafted antibody gene sequences were synthesized and cloned into the prokaryotic expression vector pET30a(+) in fusion with a C-terminal sfGFP gene, i.e. pET30a-(His6)-cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP and pET30a-(His6)-cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3), and the fusion proteins were induced by IPTG. Highly soluble recombinant fusion proteins were obtained and purified by Ni-NTA affinity column. SDS-PAGE confirmed the purified protein as the target protein. The antigen-antibody binding assay showed that both the CDR1 and CDR3 grafted antibodies have hCG-binding activities. While the titers of the two grafted antibodies were similar, the binding affinity of CDR3 grafted antibody was higher than that of CDR1 grafted protein (about 2–3 times). The grafted antibodies retained the relatively high biochemical stability of the single-domain antibody backbone and were relatively thermostable and alkaline tolerant. The obtained antibodies also had a relatively high antigen-binding specificity to hCG. This study provided a reliable experimental basis for further optimization of anti-hCG single domain antibody by antibody grafting technology using antigen-binding peptide.

Keywords: hCG, single domain antibody, grafted antibody, CDR1, CDR3, fusion protein, expression and purification

单域抗体是由天然缺乏轻链的重链抗体改造而来的一类小型化抗体,具有结构简单、分子量小、易于异源表达、同时与抗原结合的特异性和亲和力高等优点^[1-3]。近年来单域抗体在生物工程技术领域受到人们的重视,其应用在逐渐推广。经典的单域抗体制备过程包括应用驼科动物等可天然产生重链抗体的动物作为免疫宿主、通过抗原免疫、然后进行抗体基因库构建、特异抗体筛选和克隆、大肠杆菌等异源表达等步骤^[4-5]。改进的方案包括利用非免疫动物来源的抗体基因库或半合成、全合成抗体基因库进行抗原靶标的抗体筛选^[6-7]。这两种方法均存在步骤繁琐、费时费力等缺点。

hCG 分子是人妊娠过程中产生的重要的标志性激素分子,在某些肿瘤中也发现存在过表达^[8-9]。其蛋白结构已经通过晶体结构解析等方法得到较深入的了解。应用单域抗体技术制备 hCG 单域抗体的工作也开始有人进行尝试^[10]。本研究结合过

去人们在 hCG 结合多肽筛选工作和对单域抗体的通用骨架的选择、测试工作的成果基础上^[11-12],尝试将 hCG 结合多肽嫁接到单域抗体通用骨架的互补决定区 CDR1 或 CDR3,测试改造后的单域抗体结合抗原的活性,为建立结合多肽嫁接抗体技术制备抗原特异单域抗体的方法提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 材料

pET30a(+) 质粒、pET30a(+)-sfGFP 质粒、DP-GFP(一种 GFP 结合蛋白,本实验室制备)、LHB(促黄体生成素 β 亚基)+hCG- α 转染 293T 细胞分泌上清、大肠杆菌 BL21 (DE3) 均为本实验室保存。Taq 酶、各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR Clean up 试剂盒购自 Axygen 公司。Ni-NTA 亲和柱购自生工生物工程(上海)股份有限公司。IPTG、考马斯亮蓝 R-250 购自 AMRESCO 公司。T4 DNA 连接酶、蛋

白 marker 购自 Thermo Scientific 公司。DNA marker 购自东盛生物公司。基因合成由杭州金唯智公司完成。DNA 测序由武汉擎科有限公司完成。BCA 蛋白含量检测试剂盒购自碧云天。JEG-3 细胞购于武汉普诺赛生命科技有限公司。酶标板购自 BIOFIL 公司。小牛血清购自四季青公司。SpectraMax i3x 多功能酶标仪购自 Molecular Devices。

1.2 质粒的构建

全基因合成 anti-hCG- α 基因片段^[13]在其上、下游分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 将其与 pET30a(+) 质粒均用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 然后用 T4 DNA 连接酶将酶切后经胶回收纯化的 anti-hCG- α 和 pET30a(+) DNA 于 22 °C 连接 2 h, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)。挑取单菌落培养后提取质粒进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 并将双酶切鉴定正确的阳性克隆进行 DNA 测序鉴定。

全基因合成 cAbBCII10-CDR1/hCGBP1、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3 的基因片段^[14-15]在其上、下游分别引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点, 将其与 pET30a-sfGFP 质粒均用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切, 然后用 T4 DNA 连接酶将酶切后经胶回收纯化的 cAbBCII10-CDR1/hCGBP1、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3 和 pET30a-sfGFP 于 22 °C 连接 2 h, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)挑取单菌落培养后提取质粒进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 与 *Bam*H I 和 *Hind* III 两种双酶切鉴定, 并将双酶切鉴定正确的阳性克隆进行 DNA 测序鉴定。

1.3 抗体融合蛋白的诱导表达

将 DNA 测序正确的阳性克隆菌于 37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L, 诱导上述 3 种融合蛋白表达。取诱导后的菌液, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清收集菌体沉淀, 一部分菌体直接加入 SDS-PAGE 电泳样品处理液, 用于检测全菌蛋白; 另一部分加入 9 倍体

积的缓冲液 Buffer H (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mol/L NaCl, 10% 甘油, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 30 mmol/L 咪唑) 冰浴超声破碎 30 min, 然后 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清和沉淀进行电泳检测。用 12% SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测菌体全蛋白与超声破碎上清和沉淀中的融合蛋白。

1.4 抗体融合蛋白的纯化与鉴定

在最佳诱导条件下 (16 °C, 120 r/min) 诱导融合蛋白的表达。收集诱导后菌体超声破碎的上清液, 利用 Ni-NTA 亲和柱, 按照产品说明书进行纯化。分别收集亲和柱穿透峰和洗脱峰, 进行 12% 的 SDS-PAGE。然后收集洗脱峰透析去除咪唑。

1.5 抗体融合蛋白浓度的测定

取 1.2 mL 蛋白标准配制液加入到一管蛋白标准 (30 mg BSA) 中, 充分溶解后配制成 25 mg/mL 的蛋白标准溶液。取 20 μ L 25 mg/mL 蛋白标准加入 980 μ L 稀释液即可配制成 0.5 mg/mL 蛋白标准。PBS 稀释标准品。根据样品数量和标准曲线所用孔数 12 个, 按 50 体积 BCA 试剂 A 加 1 体积 BCA 试剂 B (50:1) 配制适量 BCA 工作液, 充分混匀。将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20 μ L 加到 96 孔板的标准品孔中, PBS 补足到 20 μ L。加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中, 加 PBS 到 20 μ L。各孔加入 200 μ L BCA 工作液, 37 °C 放置 30 min 后测定吸光度。

1.6 抗体融合蛋白的抗原结合活性测定

包被: 用 PBS 与含 5% 的小牛血清配置成包被缓冲液, 用 PBS 包被缓冲液将 anti-hCG- α 稀释至蛋白质含量为 1 μ g/mL。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加 0.1 mL, 4 °C 过夜。次日, 弃去孔内溶液, 用 PBS 洗涤缓冲液洗 3 次, 每次 3 min (简称洗涤, 下同)。

加样: 加一定梯度稀释 JEG-3 细胞分泌上清 0.1 mL 于上述已包被之反应孔中, 37 °C 孵育 1 h。然后洗涤。同时空白孔作对照。

加抗体-sfGFP 融合蛋白：于各反应孔中，分别加入同浓度的 cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP 和 cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 0.1 mL，37 °C 孵育 0.5–1 h，洗涤 3 次。

测定 GFP 荧光强度：于各反应孔中，加入 0.2 mL 的 PBS，于酶标仪上测定，激发光波长为 488 nm，荧光检测波长为 525 nm。

1.7 抗体融合蛋白的稳定性试验

分别将 cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP 和 cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 与足量的 DP-GFP（一种 GFP 结合蛋白）混匀，保证 GFP 标签的稳定性。

取等份的上述混合物分别置于 4 °C、16 °C、37 °C、42 °C、65 °C、80 °C 的水浴中保温 30 min，取出待恢复至室温。各取 100 μ L 上清于聚苯乙烯板中，测定其荧光强度，分析抗体融合蛋白的热稳定性。

分别取等份上述混合物，用伯瑞坦-罗宾森（Britton-Robinson）广泛缓冲液调 pH 至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0，4 °C 放置 30 min，取出待恢复至室温。各取 100 μ L 于聚苯乙烯板中，测定其荧光强度，分析抗体融合蛋白的酸碱稳定性。

1.8 抗体融合蛋白的滴度测定

包被后，加一定相同浓度 JEG-3 细胞分泌上清 0.1 mL 于上述已包被的反应孔中，37 °C 孵育 1 h，然后洗涤，同时空白孔作对照。于各反应孔中，分别加入一定稀释的 cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP 和 cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 0.1 mL，37 °C 孵育 0.5–1 h，洗涤 3 次。测定 GFP 荧光强度。

1.9 抗体融合蛋白的抗原结合特异性测定

包被后，分别加一定稀释浓度 JEG-3 细胞分泌上清和 LHB+hCG- α 转染 293T 细胞分泌上清 0.1 mL 于上述已包被的反应孔中，37 °C 孵育 1 h，然后洗涤，同时空白孔作对照。加抗体-sfGFP 融合蛋白。测定 GFP 荧光强度。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建

pET30a-anti-hCG- α 重组子经酶切鉴定后得到两条目的带，大小约为 5.3 kb 和 400 bp；pET30a-cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 重组子经 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切鉴定后得到两条目的带，大小约为 6.1 kb 和 400 bp，pET30a-cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 重组子经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切鉴定后得到两条目的带，大小约为 5.3 kb 和 1.2 kb，分别与质粒和抗体基因及抗体融合蛋白基因片段的预期分子量一致（图 1）。将酶切鉴定正确的质粒进行 DNA 测序鉴定，测序结果与预期的序列一致，证明 3 个重组质粒构建成功。

2.2 融合蛋白的诱导表达分析

将 pET30a-anti-hCG- α 、pET30a-cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP、pET30a-cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-cAbBCII10-sfGFP 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)，在 IPTG 诱导前后收集细菌进行

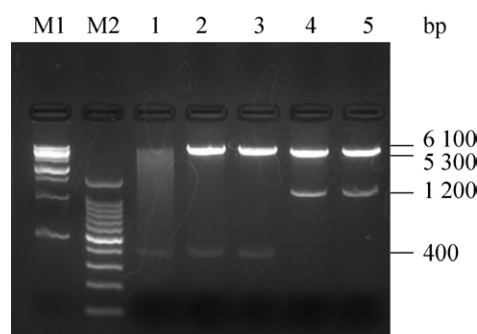


图 1 重组质粒 pET30a-anti-hCG- α 和 pET30a-cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 的构建

Fig. 1 Construction of pET30a-anti-hCG- α and pET30a-cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP recombinant plasmids. M1: 1 kb DNA marker; M2: 100 bp DNA marker; 1: pET30a-anti-hCG- α digested with *Bam*H I and *Hind* III; 2,3: pET30a-cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP digested with *Bam*H I and *Sal* I; 4,5: pET30a-cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP digested with *Bam*H I and *Hind* III.

SDS-PAGE 分析,结果如图 2 所示。经 IPTG 诱导后,在 3 组样品中均获得了目标蛋白的高表达,并且大部分存在于细菌裂解液的上清中,为可溶性蛋白,仅有少量在沉淀中。

2.3 融合蛋白的纯化与鉴定

pET30a-anti-hCG- α 、pET30a-cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP、pET30a-cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-cAbBCII10-sfGFP 大量表达菌超声破碎后,收集上清,使用 Ni-NTA 亲和柱纯化后,最终得到高纯度的融合蛋白,结果如图 3 所示。通过计算,

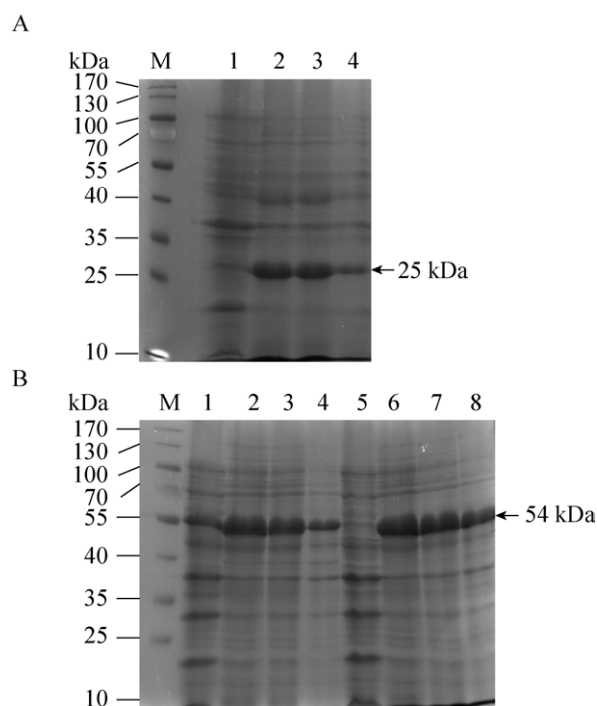


图 2 anti-hCG- α 和 cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 融合蛋白的表达

Fig. 2 Expression of anti-hCG- α and cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP fusion proteins. (A) Expression of anti-hCG- α fusion proteins. M: protein marker; 1: before induction; 2: after induction; 3: supernatant; 4: precipitate. (B) Expression of cAbBCII10-hCGBP1-sfGFP fusion proteins. M: protein marker; 1: before induction; 2: after induction; 3: supernatant; 4: precipitate. Expression of cAbBCII10-hCGBP3-sfGFP fusion proteins. 5: before induction; 6: after induction; 7: supernatant; 8: precipitate.

可知图 3 中 anti-hCG- α 融合蛋白实际分子量约为 25 kDa,蛋白理论分子量为 22 kDa 左右,二者基本相符;cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 融合蛋白实际分子量约为 54 kDa,蛋白理论分子量为 55 kDa 左右,二者基本相符。

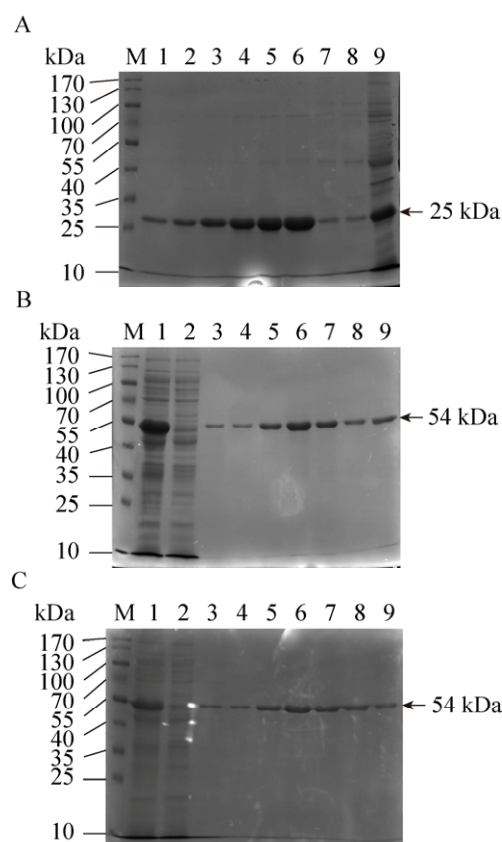


图 3 anti-hCG- α 和 cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 融合蛋白的纯化

Fig. 3 Purification of anti-hCG-a and cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP fusion proteins. (A) Purification of anti-hCG-a fusion proteins. M: protein marker, 1-6: eluates of Ni-NTA affinity chromatography resin; 7-8: flow-through of Ni-NTA affinity chromatography resin; 9: total protein. M: protein marker. (B) Purification of cAbBCII10-hCGBP1-sfGFP fusion proteins. M: protein marker; 1: total protein; 2: flow-through of Ni-NTA affinity chromatography resin; 3-9: eluates of Ni-NTA affinity chromatography resin. (C) Purification of cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP fusion proteins. 1: total protein; 2,3: flow-through of Ni-NTA affinity chromatography resin; 4-9: eluent of Ni-NTA affinity chromatography resin.

2.4 融合蛋白的浓度测定及抗体融合蛋白的抗原结合活性分析

通过 BSA 蛋白测定法可以得出 pET30a-anti-hCG- α 、pET30a-cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP、pET30a-cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 三个融合蛋白的浓度分别为 0.65、2.43、3.60 mg/mL。

以 anti-hCG- α 蛋白作为捕获抗体,以 cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP 或 cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 为探测抗体测定与 hCG 的结合活性,结果如图 4 所示。二者对 hCG 皆有一定结合活性,CDR3 嫁接抗体 (hCGBP3) 的抗原结合活性比 CDR1 嫁接抗体 (hCGBP1) 约高 2–3 倍。

2.5 抗体融合蛋白的稳定性

通过图 5A 可以看出,温度对两种抗体融合蛋白 cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 的稳定性均有很大影响。其稳定性在 42 °C 以内基本不变,在 65 °C 时几乎完全丧失稳定性。

同样的,通过图 5B 可以看出,pH 对两种抗体融合蛋白 cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 也有很大影响。融合蛋白的稳定性在 pH<7 的范围内随 pH 的降低而降低,在 pH 4 时几乎丧失稳定性,在 pH 8–10 的范围内稳定性只有少量下降 (10%–20%)。

2.6 抗体融合蛋白的滴度

以梯度稀释的 cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP 或 cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 为探测抗体测定与 hCG 的结合活性,结果如图 6 所示,cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 这两种抗体融合蛋白的滴度约为 1:15。

2.7 抗体融合蛋白的抗原结合特异性

以 JEG-3 培养细胞上清液或 LHB+hCG- α 转染的 293T 细胞上清液作为抗原,以 cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP 或 cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 为探测抗体,测定、比较对两种相似抗原 (hCG

和 LH) 的结合特异性,结果如图 7 所示,两种抗体融合蛋白对 hCG 的结合活性都高于对 LH 的结合活性,对 LH 有一定的交叉结合活性,cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 对 hCG 的结合特异性较高。

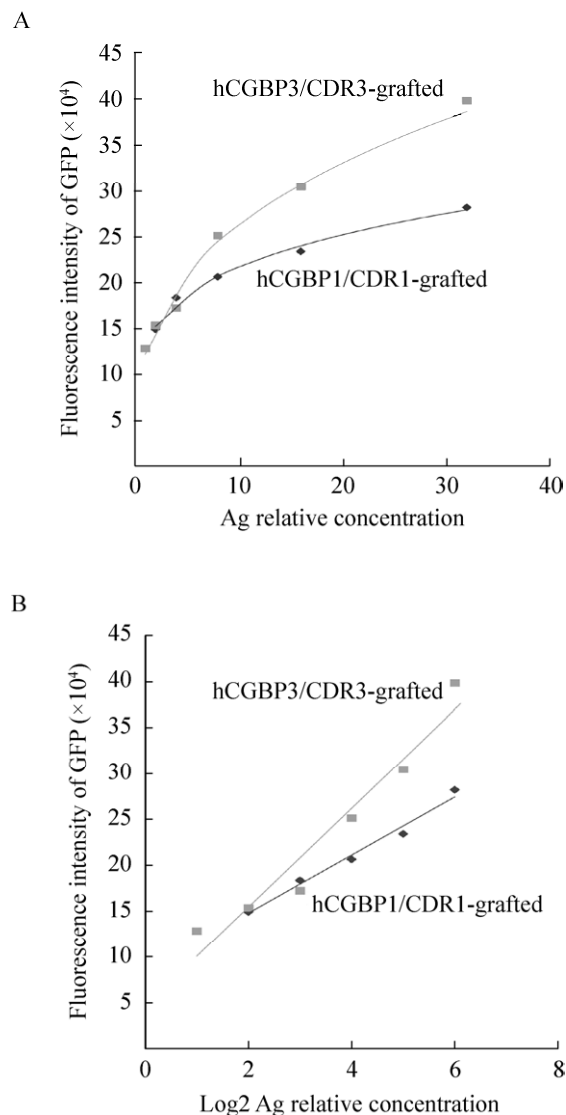


图 4 融合蛋白 cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP 结合 hCG 的活性测定

Fig. 4 Determination of hCG-binding affinity of cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP fusion proteins. (A) HCG-binding curve against Ag relative concentration. (B) HCG-binding curve against log₂ of Ag relative concentration.

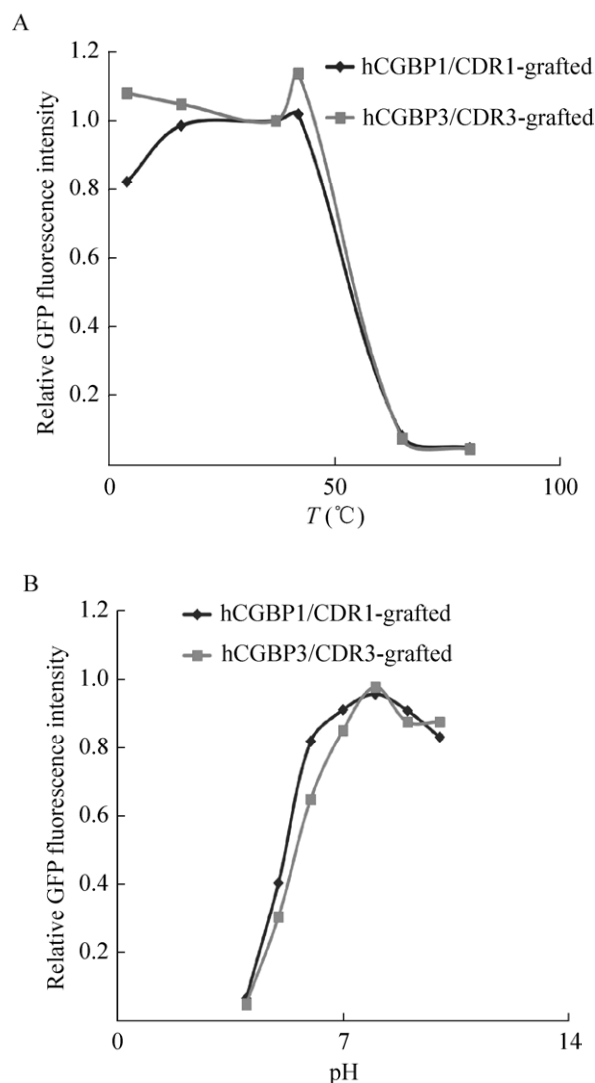


图5 抗体融合蛋白的稳定性测定

Fig. 5 Determination of the stability of cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP fusion proteins. (A) Relative protein stability at different temperatures. (B) Relative protein stability at different pH.

3 讨论

应用单域抗体骨架、抗原结合肽取代 CDR 可变区的方法制备新嫁接抗体的技术是一种改善结合多肽的生化性能的重要手段。近年来已有相关的研究报道,嫁接后的抗体分子比游离多肽具有更好的生化稳定性,可胜任多种细胞内外应用^[16-17]。

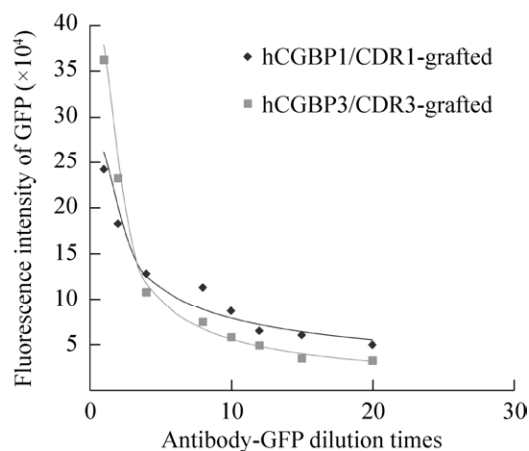


图6 抗体融合蛋白的滴度测定

Fig. 6 Determination of the titers of cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP fusion proteins.

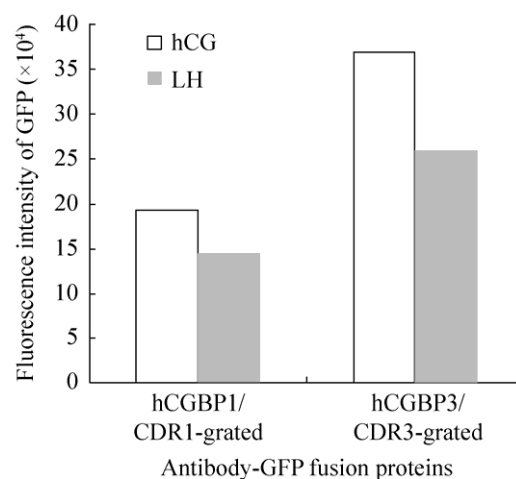


图7 抗体融合蛋白的抗原结合特异性测定

Fig. 7 Determination of antigen-binding specificity of cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP fusion proteins. Binding affinities of cAbBCII10-hCGBP1/3-sfGFP fusion proteins to hCG and LH were compared.

单域抗体骨架具有结构简单、CDR 区易于进行改造操作的优点,作为嫁接抗体的骨架逐渐受到人们的重视。在本研究中,我们应用单域抗体的一个通用骨架 cAbBCII10^[15],通过将 hCG 分子的结合多肽嫁接到 CDR1 或 CDR3 区,检测其对抗原分子的结合活性,获得了具有一定亲和力的 CDR1 或 CDR3 嫁接抗体形式,其中,CDR3 比

CDR1 嫁接抗体结合抗原的效果好。

CDR3 通常是抗体分子结合抗原的主要决定区域,因此被作为人工改造抗体的首选区域。如有文献报道,通过 CDR3 区随机化,筛选获得了可结合重要医药靶标的抗体分子^[11];Inoue 等通过类似筛选方法获得了针对不同抗原的 CDR3 改造抗体分子^[18],本研究也显示 CDR3 嫁接抗体的抗原结合活性强。但是也有少数例外的情况,如 Hattori 等在用无机分子的结合多肽制备的嫁接抗体时,发现 CDR3 嫁接抗体不能结合抗原分子,而 CDR1 嫁接抗体具有很高的抗原结合活性,推测是由于多肽链的构象不适当所致^[16]。

嫁接到抗体 CDR 区的多肽的构象与游离多肽相比通常会发生改变,由于抗体骨架的刚性限制,嫁接多肽的空间活动受到限制,从而使其在某一构象或动态构象区域活动,这可能会增强或减弱其对抗原的识别与结合^[19]。我们注意到 cAbBCII10 通用骨架的 CDR1 区的周边有较多的 GGS 序列,可能会赋予 CDR1 多肽更大的活动空间;而 CDR3 可能受到更多的限制从而获得更加稳定的构象。哪一个更适合多肽结合抗原,应视结合多肽空间构象是否与抗原表面更加契合决定。

我们所采用的通用骨架的 CDR2 区域对于抗体分子的骨架稳定性起着重要作用,已有实验显示,如将 CDR2 区的氨基酸残基改变后,其蛋白质的稳定性下降^[16],因此,在本研究中我们没有重复这一尝试。CDR1 或 CDR3 嫁接的抗体分子稳定性较好。单域抗体通常具有较好的生化特性,并易于进行异源表达,可溶性好。我们用大肠杆菌表达的嫁接抗体均表现出较高的可溶性,同时有少量包涵体形成,其中 CDR1 嫁接抗体较 CDR3 嫁接抗体有较多的包涵体。尽管嫁接抗体与大多数天然单域抗体相比,有少量包涵体形成,但与其他类型的抗体如单链抗体 ScFV 相比,其表达量和可溶性的差异都非常显著。我们的嫁接抗体的可

溶性的变化应是受嫁接多肽的结构与构象影响,嫁接改造的 CDR 区域通常因缺乏与抗体框架区或 CDR 区等其他区域的关联(如形成二硫键)^[20-21],从而可能影响了其可溶性等生化性能。我们获得的嫁接抗体具有一定的热稳定性和较好的碱耐受性,在一定程度上保留了所用单域抗体框架较为稳定的特性。

嫁接抗体对抗原的结合活性由所接入的多肽片段决定,在本研究中,我们所接入的 hCG 结合片段对 hCG 具有较特异的结合活性,但同时与相似抗原 LH 有一定的交叉结合活性,仍需进一步优化以提高其对 hCG 的结合特异性,在以后的工作中可通过结合多肽的突变扫描等方法进行尝试。

REFERENCES

- [1] Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol*, 2001, 74(4): 277-302.
- [2] Cui HQ, Wang QM. Progress in single-domain antibody derived from heavy chain antibody. *Chin J Biotech*, 2005, 24(3): 497-501 (in Chinese).
崔华清, 王清明. 基于重链抗体构建的单域抗体研究进展. *生物工程学报*, 2005, 24(3): 497-501.
- [3] Liu S, Li J, Liang XG, et al. Research advance in single-domain antibody. *Qianren Biol*, 2015, 2(3): 26-38.
- [4] Tanaka T, Rabbitts TH. Intracellular antibody capture (IAC) methods for single domain antibodies. *Methods Mol Biol*, 2012, 911: 151-173.
- [5] Broekgaarden M, van Vught R, Oliveira S, et al. Site-specific conjugation of single domain antibodies to liposomes enhances photosensitizer uptake and photodynamic therapy efficacy. *Nanoscale*, 2016, 8(12): 6490-6494.
- [6] Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM, et al. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Dis*, 2010, 9(10): 767-774.
- [7] Chi XY, Yu CM, Chen W. Single B cell monoclonal antibody technologies and applications. *Chin J Biotech*, 2012, 28(6): 651-660 (in Chinese).
迟象阳, 于长明, 陈薇. 单个 B 细胞抗体制备技术及应用. *生物工程学报*, 2012, 28(6): 651-660.
- [8] Chan JK, Tian CQ, Teoh D, et al. Survival after

- recurrence in early-stage high-risk epithelial ovarian cancer: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol*, 2010, 116(3): 307–311.
- [9] Kugasia IR, Alkayem M, Patel JB. A rare case of beta-hCG production by a solitary fibrous tumor of the pleura. *Am J Case Rep*, 2014, 15: 518–522.
- [10] Nand KN, Gupta JC, Panda AK, et al. Development of a recombinant hCG-specific single chain immunotoxin cytotoxic to hCG expressing cancer cells. *Protein Expr Purif*, 2015, 106: 10–17.
- [11] Yan JR, Li GH, Hu YH, et al. Construction of a synthetic phage-displayed nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J Trans Med*, 2014, 12(1): 343.
- [12] Yan JR, Wang PY, Zhu M, et al. Characterization and applications of nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naïve nanobody phage display library. *J Nanobiotechnol*, 2015, 13(1): 33.
- [13] Bond CJ, Marsters JC, Sidhu SS. Contributions of CDR3 to VHH domain stability and the design of monobody scaffolds for naïve antibody libraries. *J Mol Biol*, 2003, 332(3): 643–655.
- [14] Ding XK, Yang KL. Antibody-free detection of human chorionic gonadotropin by use of liquid crystals. *Anal Chem*, 2013, 85(22): 10710–10716.
- [15] Saerens D, Pellis M, Loris R, et al. Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J Mol Biol*, 2005, 352(3): 597–607.
- [16] Hattori T, Umetsu M, Nakanishi T, et al. High affinity anti-inorganic material antibody generation by integrating graft and evolution technologies: potential of antibodies as biointerface molecules. *J Biol Chem*, 2010, 285(10): 7784–7793.
- [17] Li HN, Yan JR, Ou WJ, et al. Construction of a biotinylated cameloid-like antibody for label-free detection of apolipoprotein B-100. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 111–118.
- [18] Inoue H, Suganami A, Ishida I, et al. Affinity maturation of a CDR3-grafted VHH using *in silico* analysis and surface plasmon resonance. *J Biochem*, 2013, 154(4): 325–332.
- [19] Haidar JN, Yuan QA, Zeng L, et al. A universal combinatorial design of antibody framework to graft distinct CDR sequences: a bioinformatics approach. *Proteins*, 2012, 80(3): 896–912.
- [20] Govaert J, Pellis M, Deschacht N, et al. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *J Biol Chem*, 2012, 287(3): 1970–1979.
- [21] Zabetakis D, Anderson GP, Bayya N, et al. Contributions of the complementarity determining regions to the thermal stability of a single-domain antibody. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e77678.

(本文责编 郝丽芳)