

## 全人源抗狂犬病病毒 G 蛋白单链抗体制备及中和活性鉴定

张倩倩<sup>1,2</sup>, 赵 茜<sup>3</sup>, 张 晓<sup>1</sup>, 丁贵鹏<sup>1,2</sup>, 金 秋<sup>1</sup>, 高 畅<sup>2</sup>, 熊四平<sup>2</sup>, 陈玉平<sup>4</sup>, 朱 进<sup>5</sup>, 冯振卿<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室,<sup>2</sup>病理学系, 江苏 南京 210029;<sup>3</sup>杭州市红十字会医院结核科, 浙江 杭州 310003;<sup>4</sup>江阴力博医药生物技术有限公司, 江苏 江阴 214400;<sup>5</sup>南京军区军事医学研究所, 江苏 南京 210002)

**[摘要]** 目的:构建全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库,筛选针对狂犬病病毒 G 蛋白不同表位的单链抗体(scFv)并鉴定其中和活性。方法:分离 130 例经狂犬病疫苗免疫接种志愿者的外周血淋巴细胞,提取总 RNA,逆转录制备 cDNA,构建全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库。以纯化的狂犬病病毒 G 蛋白包板筛选,对阳性克隆进行可溶性表达,并鉴定中和活性。结果:构建全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库,库容为  $5.0 \times 10^7$ ,经核酸序列分析,证实插入片段为 scFv。经过 5 轮筛选,从富集的次级抗体库中随机挑出 140 个克隆,通过 phage-ELISA 鉴定得到 4 株核酸序列不同的 scFv 抗体。经 His-Trap 纯化后进行中和活性鉴定,获得 1 株具有中和活性的 scFv,其中和效价为 0.13 IU/mg。结论:构建全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库,获得 1 株具有中和活性的抗狂犬病病毒 G 蛋白 scFv 抗体,为进一步研发狂犬病治疗性抗体药物奠定了基础。

**[关键词]** 狂犬病病毒 G 蛋白;噬菌体抗体库;单链抗体(scFv);中和活性

**[中图分类号]** R392.12

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)07-927-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130715

## Screening and preparation of a human single chain antibody(scFv)against Rabies Virus G protein from a phage display library and identification of the neutralizing activity

Zhang Qianqian<sup>1,2</sup>, Zhao Qian<sup>3</sup>, Zhang Xiao<sup>1</sup>, Ding Guipeng<sup>1,2</sup>, Jin Qiu<sup>1</sup>, Gao Chang<sup>2</sup>, Xiong Siping<sup>2</sup>, Chen Yuping<sup>4</sup>, Zhu jin<sup>5</sup>, Feng Zhenqing<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Key Lab of Antibody Technique of Ministry, <sup>2</sup>Department of Pathology, NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Department of Tuberculosis, Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou 310003; <sup>4</sup>Jiangyin Libo Medicine Biotechnology Co Ltd, Jiangyin 214400; <sup>5</sup>Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China)

**[Abstract]** **Objective:**To construct a human scFv phage antibody library against rabies virus G protein, selected the single chain antibody against rabies virus G protein for different epitopes, and identified its neutralizing activity. **Methods:**The human scFv phage antibody library against rabies virus G protein was constructed by using peripheral blood lymphocytes from 130 Rabies vaccine immune volunteers. Screening by the purified rabies virus G protein, the positive clones were identified and expressed, identified neutralizing activity by AMMS. **Results:**Through the prokaryotic expression system and purification of rabies virus G protein, the human anti rabies virus G protein scFv phage antibody library was constructed with about  $5.0 \times 10^7$  size. The nucleic acid sequence analysis confirmed the insertion of a fragment is scFv. After 5 rounds of screening, we randomly picked 140 clones by phage-ELISA, and obtained 4 nucleic acid sequences in different scFv antibodies, purified and identified activity. We finally obtained 1 scFv antibody with neutralizing activity. **Conclusion:**We have successfully constructed a whole human anti-rabies virus G protein scFv antibody library, and obtained a whole human anti-rabies virus G protein scFv antibody with neutralizing activity from the library. It is established foundation of the new type of rabies virus vaccine for human immunization.

**[Key words]** protein G of rabies virus; phage antibody library; single-chain antibody(scFv); neutralizing activity

**[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7): 927-931]**

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81273325);江苏省科技支撑计划资助(BE2011842)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn

狂犬病是由狂犬病病毒引起的人兽共患疾病,一旦发病死亡率几乎是100%<sup>[1]</sup>。全球每年死于狂犬病的人数超过5.5万人,主要集中于亚洲和非洲国家。目前我国狂犬病流行正处于第3次高峰,并且呈现不断增长的趋势<sup>[2]</sup>。对狂犬病病毒暴露后的治疗,主要采用抗狂犬病病毒免疫球蛋白(RIG)结合狂犬病疫苗接种的方法。目前临床使用的免疫球蛋白是马抗狂犬病病毒免疫球蛋白(ERIG)和人抗狂犬病病毒免疫球蛋白(HRIG)两类。由于HRIG需要从狂犬病疫苗接种者血清中提取,抗体品质无法保证,成本高、产量低,难以满足临床用药需求;而ERIG则存在易引起异种蛋白过敏反应等问题,用药安全性得不到保证。应用全人源基因工程抗体取代目前使用的血源性抗体,则可解决狂犬病预防及临床治疗中存在的问题<sup>[3-4]</sup>。本研究应用噬菌体抗体库技术筛选针对狂犬病病毒G(rabies virus G, RVG)蛋白的全人源单链抗体(scFv)并进行中和活性鉴定,为研发新型狂犬病治疗性抗体药物奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 Top10 F', XL1-Blue 和辅助噬菌体 VCSM13 由南京医科大学卫生部抗体技术重点实验室保存;130 例狂犬病疫苗接种后的志愿者外周血由南京市第二医院提供;限制性内切酶 *Bam*H I、*Kpn* I、*Sfi* I、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、DL2000 Marker 及蛋白 Marker(日本 TaKaRa 公司);质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒(杭州爱思进生物技术有限公司);HRP-羊抗小鼠 IgG 抗体(武汉博士德生物技术有限公司);HRP-Anti-M13 抗体(美国 Amersham 公司);HisTrap HP 镍亲和柱(美国 GE 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RVG 蛋白的制备

根据 GenBank 收录的狂犬病病毒 CVS-11 株 G 蛋白基因序列设计特异性引物,以 cDNA 为模版 PCR 扩增目的基因,PCR 产物纯化后与质粒载体连接,连接产物送基因公司测序。测序正确的重组质粒转染大肠杆菌 Top10 F',IPTG 诱导表达、纯化,蛋白质谱分析鉴定。

#### 1.2.2 人源抗体可变区基因的扩增

从经狂犬病疫苗免疫者外周血中分离淋巴细胞,提取总 RNA。以纯化的 RNA 为模版,用 Oligo-dT 引物通过逆转录酶逆转录合成 cDNA。用一组扩增

人源抗体  $V_H$  和  $V_L$  基因的顺向和反向引物,对  $V_H$  和  $V_L$  基因进行 PCR 扩增。扩增条件为:95℃ 1 min, 56℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后鉴定,切胶回收纯化 DNA。

#### 1.2.3 构建全人源抗狂犬病病毒 scFv 抗体库

将纯化的  $V_H$  和  $V_L$  基因为模板,用引物 RSF-F/RSC-B 经重叠延伸 PCR 合成 scFv 基因,扩增产物纯化回收,将纯化后 scFv 片段及 pComb3xss 载体 *Sfi* I 酶切,再以 T4 DNA 连接酶连接。将连接产物通过电转化导入 *E.coli* XL1-Blue 感受态细菌(电转化条件:0.2 cm 电转杯,电压 2.5 kV,电阻 300  $\Omega$ ,电容 25  $\mu$ F),加入培养基、抗生素、VCSM13 过夜培养,PEG8000 沉淀收集上清中的噬菌体即得到全人源狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库,测定库容,-70℃ 保存。

#### 1.2.4 抗狂犬病病毒 scFv 抗体库的富集筛选

将构建的全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库,进行 1 次原库扩增后得到次级噬菌体抗体库。在筛选过程中先将次级抗体库加到 RVG(1  $\mu$ g/孔)包板的 8 孔 ELISA 板中,37℃ 孵育 2 h, PBST 洗 5~10 遍。每孔加入 100  $\mu$ l 甘氨酸-盐酸溶液(pH2.1)洗脱 10 min,洗脱液中加入 1 mol/L Tris 中和,使 pH 值保持在 7.0 左右,将洗脱液加入对数生长期的 *E.coli* XL1-Blue 细菌中,进行下一轮筛选,共重复筛选 5 轮。

#### 1.2.5 筛选抗 RVG 蛋白表位的噬菌体阳性克隆

从第 5 轮筛选后的集落中,随机挑取 140 个克隆,用 phage-ELISA 测定噬菌体抗体的结合活性。以纯化后的 RVG 包被 96 孔板(0.1  $\mu$ g/孔),phage 上清为一抗,HRP-Anti-M13 为二抗,设阴性对照孔及空白对照孔,筛选阳性克隆。ELISA 操作过程按常规进行,酶标仪(Multiskan Spectrum Microplate Thermo 公司,美国)测  $D(450\text{ nm})$  吸光度值。测量时以空白对照组调零。

#### 1.2.6 scFv 可溶性表达、鉴定

取 ELISA 阳性克隆进行测序,感染 *E.coli*.Top10 细菌。挑取单克隆接种至 SB 培养基中过夜培养,转接过夜菌,待吸光度值为 0.4~0.6 时,加入 IPTG,25℃ 诱导表达 24 h。细菌进行超声裂解,经 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝初步鉴定。以 RVG 包被 96 孔板(0.1  $\mu$ g/孔),将纯化的 scFv 抗体(1 mg/ml)按照 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600 稀释后作为一抗,加入 RVG 包被的 96 孔板,ELISA 检测,读取 450 nm 处吸光度值。

### 1.2.7 scFv 中和活性鉴定

中和活性由军事医学科学院兽医研究所鉴定。RFFIT 和 FAVN 分别为 WHO 和 OIE 推荐的狂犬病病毒中和抗体检测方法,实验原理均为采用一定量的病毒与不同稀释倍数的细胞培养上清混合,在单层细胞上接种一定时间后,丙酮固定,以 FITC 标记的抗狂犬病病毒糖蛋白抗体检测,最后通过 Reed-Muench 法计算 ED<sub>50</sub>,计算出样品的狂犬病中和抗体的效价。

## 2 结果

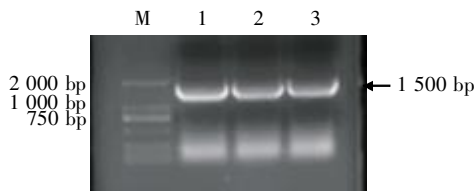
### 2.1 RVG 蛋白基因扩增、蛋白表达、纯化及鉴定

根据 GenBank 收录的狂犬病病毒 CVS-11 株 G 蛋白基因序列,设计特异性引物(表 1),以 cDNA 为模版扩增目的基因(图 1),PCR 产物纯化后与质粒载体连接,测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌 Top10 F',IPTG 诱导表达,纯化得到 G 蛋白,大小为 67 000,SDS-PAGE 和 Western blot 结果见图 2、3。

表 1 实验设计引物序列

Table 1 The sequences of primers

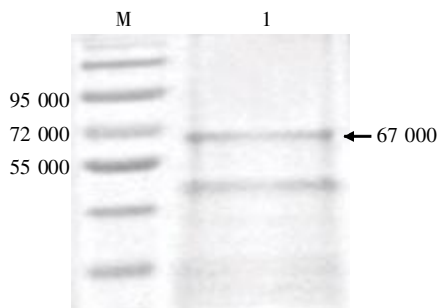
引物名称	引物序列
RVG F( <i>Bam</i> H I)	5'-CGGGATCCATGGTTCCTCAGGCTCTCTCCT-3'
RVG R( <i>Kpn</i> I)	5'-CGGGGTACCCCTAATGGTGGTGATGGTGCAGTCYGGTCTCACCCCACT-3'



M:DNA Marker; 1-3:PCR 扩增产物。

图 1 RVG 基因 PCR 扩增产物

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of RVG gene



M:蛋白 Marker; 1:RVG 蛋白。

图 2 RVG 蛋白纯化后 SDS-PAGE

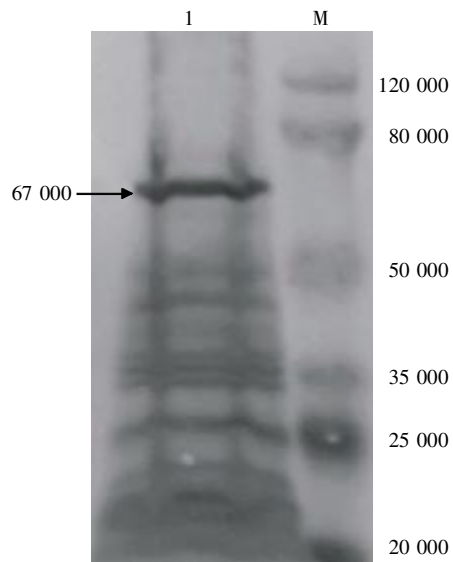
Figure 2 SDS-PAGE purification of rabies virus G protein

### 2.2 全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库的建立

以逆转录得到的 cDNA 为模版,PCR 扩增 V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub> 基因(图 4、5),再通过 overlap PCR 获得 scFv 基因,大小为 750 bp(图 6、7)。scFv 基因和载体 pComb3xss 连接后电转化感受态细菌 XL1-Blue,获得初级单链抗体库,计算库容为 5.0 × 10<sup>7</sup>。

### 2.3 全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库的筛选

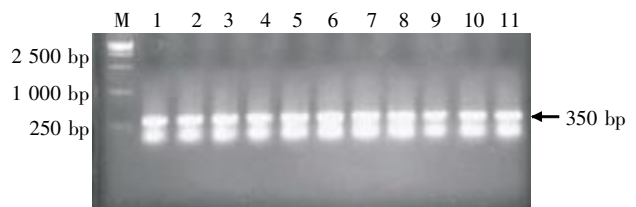
以 RVG 蛋白为抗原对噬菌体抗体库进行 5 轮富集,对经次级抗体库制备的噬菌体进行 ELISA 筛选,在随机挑取的 140 个克隆中有 10 个克隆 ELISA



M:蛋白 Marker; 1:RVG 蛋白。

图 3 RVG 蛋白纯化后 Western blot

Figure 3 Western blot of purification of rabies virus G protein



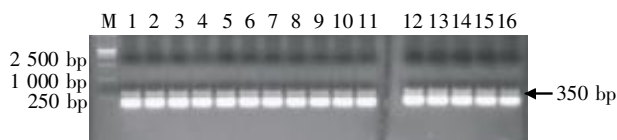
M:DNA Marker ;1~11:PCR 产物。

图 4 轻链可变区基因扩增

Figure 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products of VL gene

阳性(图 8)。经测序分析 4 株有正确的单链抗体基因,克隆编号分别为 28、70、44、42。

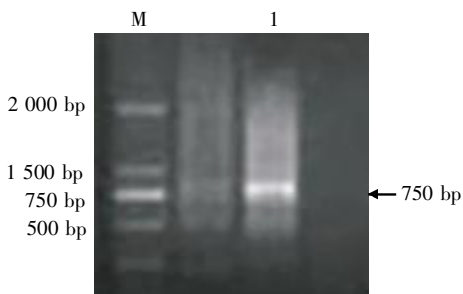
### 2.4 全人源抗 RVG 蛋白 scFv 的可溶性表达、鉴定



M: DNA Marker; 1~16: PCR 产物。

图 5 重链可变区基因扩增

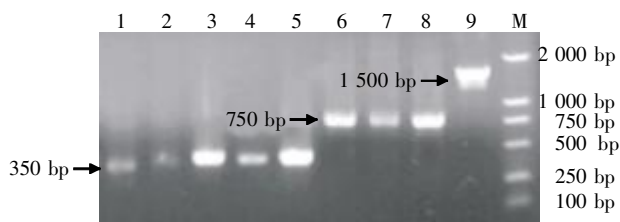
Figure 5 Agarose gel electrophoresis of PCR products of VH gene



M: DNA Marker ; 1: scFv overlap-PCR PCR 产物。

图 6 overlap-PCR 扩增 scFv 基因

Figure 6 Agarose gel electrophoresis of overlap-PCR products of scFv



M: DNA Marker; 1~2: V<sub>H</sub>; 3~5: V<sub>L</sub>; 6~8: scFv; 9: RVG。

图 7 scFv 抗体基因扩增

Figure 7 Agarose gel electrophoresis of PCR products of scfv gene

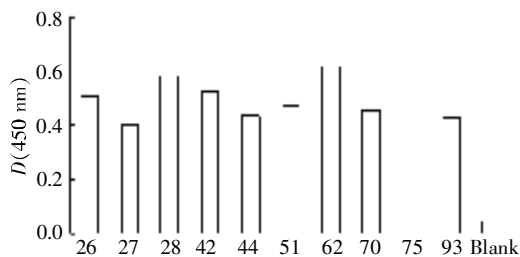
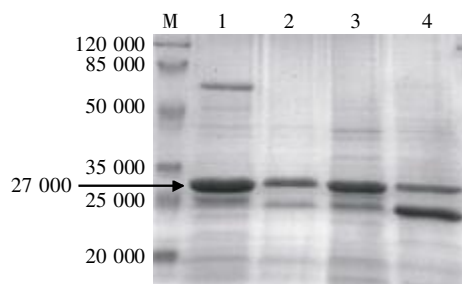


图 8 phage-ELISA 鉴定特异性抗体

Figure 8 phage-ELISA analysis the specific of scFv

将 4 株测序分析正确的克隆感染 Top10 F, IPTG 诱导表达,离心收集细菌沉淀,8 mol/L 尿素变复性后利用 His-Trap 亲和层析柱进行纯化,SDS-PAGE 检测目的条带大小为 27 000(图 9)。ELISA 结果显示(图 10),4 株 scFv 随着稀释倍数的增加, D(450 nm) 值逐渐降低,表明该 scFv 抗体能够与 RVG 蛋白特异性结合,scFv 浓度稀释至 1:1 600 时,



M: 蛋白 Marker; 1: scFv28; 2: scFv70; 3: scFv44; 4: scFv42。

图 9 4 株 scFv 抗体纯化后 SDS-PAGE

Figure 9 SDS-PAGE analysis of the purified scFv antibodies

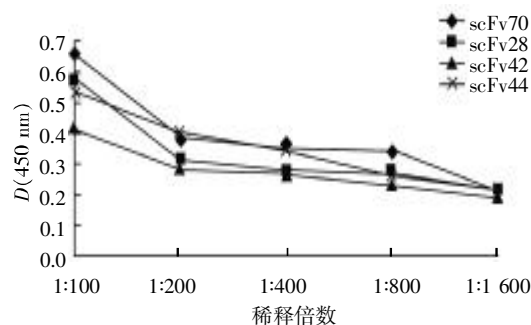


图 10 ELISA 检测 scFv 抗体与 RVG 蛋白的结合活性

Figure 10 ELISA analysis the binding specific of scFv to RVG

在 ELISA 中检测仍可较好识别 RVG。

### 2.5 中和活性鉴定

军事医学科学院兽医研究所鉴定结果显示,4 株 scFv 中 scFv42 具有中和活性,其中和效价为 0.13 IU/mg,而 scFv28、scFv70 和 scFv44 的中和效价较低。

### 3 讨论

RVG 蛋白是狂犬病病毒唯一有效的保护性抗原,能够诱导中和抗体产生并介导细胞免疫反应,与病毒毒力、致病性关系密切。因此制备针对 RVG 蛋白抗体,不仅可进一步探讨狂犬病病毒的致病机制,也为狂犬病抗体药物的研发提供技术储备<sup>[5]</sup>。20 世纪 90 年代初,噬菌体抗体库技术的建立为制备高亲和力的全人源小分子抗体提供了更为便捷、高效的途径<sup>[6]</sup>。全人源小分子抗体具有较高的特异性及亲和力,并且由于具有通过血脑屏障的功能,有可能取代 RIG 用于狂犬病的被动免疫治疗<sup>[7]</sup>。

本研究应用噬菌体抗体库技术,以 130 例狂犬病疫苗免疫后的健康志愿者外周血淋巴细胞,构建了全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库,并以纯化的 RVG 蛋白为抗原进行噬菌体抗体库的富集、筛选,得到 1 株具有中和活性的全人源抗 RVG 蛋白的

scFv,命名为scFv42,其中和效价为0.13 IU/mg。采用噬菌体抗体库技术,获得全人源的scFv抗体,并且所取外周血的免疫志愿者人数较多,保证了构建的免疫型噬菌体抗体库的库容多样性<sup>[8]</sup>。scFv抗体由于分子量相对较小,更容易穿透组织,特异性较高,所获scFv抗体经体外实验证实具有中和活性,为进一步制备新型抗狂犬病病毒抗体新药奠定了基础<sup>[9]</sup>。噬菌体抗体库筛选scFv能够不经过免疫动物而获得所需的抗体,并且筛选出的抗体具有较高的特异性。但噬菌体抗体库技术能否筛选出所需的人源抗体还存在很多影响因素,如在筛选过程中要不断对抗体库进行扩增,无效克隆扩增的效率远远大于有效克隆,因此筛选工作量巨大,阳性克隆获得率比较低<sup>[10]</sup>,所以如条件允许可继续筛选,即能够获得更多针对不同表位具有中和活性的scFv抗体。

分析本实验所获得的单链抗体中和活性较低的原因可能主要是由于纯化过程采用His-Trap亲和层析柱纯化,所以纯化后产生一些杂蛋白,降低了目的蛋白的浓度<sup>[11]</sup>;还因scFv为单价小分子抗体,其分子量较小(仅为正常抗体的1/6),其分子稳定性不如完整抗体<sup>[12]</sup>,因此在纯化过程中有蛋白的降解,造成中和效价较低。因此今后可进一步探索其与人IgG Fc分子融合,并在真核表达系统内表达scFv-Fc分子,进一步增强其分子稳定性及其中和活性<sup>[13]</sup>。另外scFv42为单链抗体,因此可能仅针对狂犬病病毒G蛋白上的一个中和表位,因此中和活性不如多克隆抗体,可进一步多筛选一些针对不同表位的scFv,将不同scFv混合使用,有可能提高中和活性,增强其中和狂犬病病毒的能力<sup>[14]</sup>。

#### [参考文献]

[1] 徐 兰,郭增柱,张永振,等.狂犬病毒糖蛋白研究进展[J].中国人兽共患病学,2006,22(9):876-879  
[2] 张夏玲,孙见宇,殷 珏,等.全人源抗狂犬病病毒单克隆抗体的制备与鉴定[J].南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(6):739-744

[3] 冯晓敏,卞颖华,徐 伟,等.狂犬病毒G蛋白基因的克隆、表达及生物活性鉴定[J].南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(07):986-990  
[4] Liu X,Feng X,Tang Q,et al. Characterization and potential diagnostic application of monoclonal antibodies specific to rabies virus [J]. J Biomed Res, 2010,24(5):395-403  
[5] 李 琛,林 红,刘新建,等.人源抗狂犬病病毒免疫型抗体库的构建及特异性抗体筛选与鉴定[J].南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(5):575-616  
[6] 张慧林,焦永军,朱 进,等.大容量天然人源Fab抗体库的构建及日本血吸虫抗独特型抗体的筛选、鉴定[J].南京医科大学学报:自然科学版,2006,26(9):737-740  
[7] Muller BH,Chevrier D,Boulain JC, et al. Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate for one-step immunodetection in molecular hybridization [J]. J Immunol Methods,1999,227(1-2):177-185  
[8] Rubinstein JL,Holt LJ,Walker JE, et al. Use of phage display and high-density screening for the isolation of an antibody against the 51-kDa subunit of complex I [J]. Anal Biochem, 2003,314(2):294-300  
[9] 庭 华,李官成,Zhou XF.抗体理论与技术 [M].北京:科学出版社,2005:110-135  
[10] 万佳艺,孙 慧,焦永军,等.人源天然Fab噬菌体抗体库的构建及抗c-Met抗体的筛选、鉴定[J].南京医科大学学报:自然科学版,2008,28(6):697-701  
[11] Cliquet F,Aubert M,Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody [J]. J Immunol Methods,1998,212(1):79-87  
[12] 扈荣良.狂犬病理论、技术与防治[M].北京:科学出版社,2007:290-320  
[13] 余永新.狂犬病和狂犬病疫苗[M].2版.北京:中国医药科技出版社,2009:332-341  
[14] Orum H,Andersen PS,Oster A,et al. Efficient method for constructing comprehensive murine Fab antibody libraries displayed on phage [J]. Nucleic Acids Res,1993,21(19):4491-4498

[收稿日期] 2013-02-13