

## 全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体的制备及活性分析

高 畅<sup>1</sup>,张倩倩<sup>1</sup>,熊四平<sup>1</sup>,唐小军<sup>1</sup>,仇镇宁<sup>2</sup>,冯振卿<sup>1,2\*</sup>,朱 进<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学病理学系,<sup>2</sup>卫生部抗体技术重点实验室,江苏 南京 210029;<sup>3</sup>南京军区军事医学研究所,江苏 南京 210002)

**[摘要]** 目的:制备全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体,并分析其结合活性。方法:构建全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体原核表达载体,优化表达并纯化全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体。以纯化的灭活狂犬病病毒包板,对纯化的抗体进行结合活性分析。结果:构建全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc-pCold II 原核表达载体,经测序分析正确后,转入大肠杆菌 BL21 (DE3)进行表达,在加入浓度为 0.5 mmol/L IPTG 时,scFv-Fc 融合抗体的表达较高,其分子量大小为 57 000。纯化后的 scFv-Fc 融合抗体在 1:512 的条件下仍可以较好地结合狂犬病病毒。结论:构建全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc-pCold II 原核表达载体,表达并纯化了 scFv-Fc 融合抗体,为研发狂犬病暴露后预防治疗性抗体药物奠定了基础。

**[关键词]** 狂犬病病毒;全人源;scFv-Fc 抗体

**[中图分类号]** R392.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)06-741-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140609

## Preparation and activity analysis of a whole human scFv-Fc fusion antibody against rabies virus

Gao Chang<sup>1</sup>, Zhang Qianqian<sup>1</sup>, Xiong Siping<sup>1</sup>, Tang Xiaojun<sup>1</sup>, Qiu Zhenning<sup>2</sup>, Feng Zhenqing<sup>1,2\*</sup>, Zhu Jin<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, <sup>2</sup>Key Laboratory of Antibody Technique of Ministry of Health, NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare a human scFv-Fc fusion antibody against rabies virus and to analyze its binding activity. **Methods:** The human scFv-Fc prokaryotic expression vector was constructed. After optimizing prokaryotic expression system, the human scFv-Fc fusion antibody against rabies virus was expressed and purified. Purified humanized scFv-Fc antibody was confirmed its binding activity by binding to purified inactivated rabies virus. **Results:** After sequence analysis, the human scFv-Fc-pCold II prokaryotic expression vector was successfully established. Through transforming *E.coli*.BL21 (DE3), human scFv-Fc fusion antibody was expressed by optimized induction of IPTG at concentration of 0.5 mmol/L. The expression of scFv-Fc fusion antibody was increased and its molecular weight was 57 000. By purification, the human scFv-Fc fusion antibody was purified with excellent binding activity even in 512 times diluted concentration. **Conclusion:** We have successfully established a whole human anti-rabies virus scFv-Fc-pCold II prokaryotic expression vector, and expressed and purified scFv-Fc fusion antibody. This fusion antibody can lay a foundation for developing novel antibody-targeted drugs of rabies prophylaxis after exposure.

**[Key words]** rabies virus; whole human; scFv-Fc antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(06): 741-744, 749]

狂犬病是由狂犬病病毒引起的人畜共患病<sup>[1]</sup>,我国是受狂犬病危害最严重的国家之一,仅次于印

度,居全球第2位,狂犬病一直位于我国各类传染病报告死亡数的前3位。最新WHO推荐的狂犬病三级暴露后的预防方法主要是抗狂犬病病毒免疫球蛋白与狂犬病疫苗接种相结合<sup>[2-3]</sup>。马抗狂犬病病毒免疫球蛋白和人抗狂犬病病毒免疫球蛋白是临床上主要使用的两类免疫球蛋白。马抗狂犬病病毒免疫球蛋白会引起由异种蛋白所产生的严重不良反应;而

**[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项目(BE2011842)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: fengzhenqing@njmu.edu.cn; zhujin1968@njmu.edu.cn

人抗狂犬病病毒免疫球蛋白需要从接种了狂犬病疫苗的志愿者中提取并纯化,有感染肝炎病毒以及人免疫缺陷病毒等安全隐患。利用基因工程抗体技术,以全人源基因工程抗体取代目前大量使用的血源性抗体,则可解决目前狂犬病预防和治疗药物紧缺的难题<sup>[4-5]</sup>。本研究在单链抗体 scFv 的基础上构建含有人 IgG 恒定区(Fc)的全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体,该抗体的制备可更好地应用于狂犬病病毒暴露后的预防。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

全人源抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库由卫生部抗体技术重点实验室构建并保存<sup>[6]</sup>,大肠杆菌 BL21(DE3)购自美国 Invitrogen 公司;灭活的狂犬病病毒 CTN 株由武汉生物制品研究所提供;DNA 聚合酶、DL2000 Marker、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、T4DNA 连接酶均购自日本 TaKaRa 公司;蛋白 Marker 购自美国 Bio-Rad 公司。质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。HisTrap HP 镍亲和柱购自美国 GE 公司。兔抗 Fc 抗体购自美国 Lifespan Biosciences 公司,HRP-羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物的设计与合成

根据本实验室已筛选出的具有中和活性的 scFv 质粒及保存的 Fc 质粒,设计 2 对特异性引物。为了便于克隆,在上下游引物中引入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点,scFv 片段的上游引物 AF1 5'-GAATTCGCCGCCACCATGGAGTTCGGACTCAGTTGGCTGTTCTGTTGGCCATCTGAAGGGTGTGCA-GTGTGAAGTGCAGCTGGTGAAAGC-3',下游引物 AR1 为 5'-CACAAGATTTGGGCTCCAGCACGGTCACTTTGG-3';Fc 片段的上游引物 BF2 为 5'-C-CAAAGTGACCGTGCTGGAGCCCAAATCTTGTG-3',下游引物 BR2 为 5'-AAGCTTGGCGCCGCTCACAGGTCCTCCTGAGATCAGTTCTGTTCTTT-ACCCGGA-GACAGGGAG-3'。

#### 1.2.2 目的基因片段的扩增及表达载体的构建

以 scFv 质粒为模板,AF1、AR1 为特异性引物扩增 scFv 基因片段;以 Fc 质粒为模板,BF2、BR2 为特异性引物扩增 Fc 基因片段;再以 scFv 基因片段和 Fc 基因片段,AF1、BR2 为引物,重叠 PCR 法拼

接成为 scFv-Fc 目的基因片段。

原核表达载体的构建:以 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切 scFv-Fc 片段和 pCold II 载体,核酸电泳回收酶切片段,用 T4 连接酶 16℃连接过夜后,电转化至大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ ,加入液体 LB 培养基,37℃振荡培养 1 h;将菌液涂布固体 LB 平板(含 100 mg/L 氨苄青霉素),37℃孵育过夜。随机挑取多个菌落,经 PCR 检测验证后送上海美吉公司进行测序验证。

#### 1.2.3 重组抗体 scFv-Fc 的原核表达条件的优化

将 scFv-Fc-pCold II 重组表达载体转化到感受态大肠杆菌 BL21(DE3)中,涂布于 LB 琼脂培养平板(含 100 mg/L 氨苄青霉素),于细菌培养箱内 37℃培养过夜。挑取单个菌落接种于 3 ml LB 液体培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中,37℃过夜培养。次日按照 1:100 比例稀释后加入到 3 ml LB 培养基中振荡培养,至菌液 *D*(600 nm)值为 0.6 左右时,加入终浓度分别为 0、0.2、0.4、0.5、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG,16℃,220 r/min 培养 24 h,诱导目的蛋白表达。之后于 4℃以 12 000 r/m 离心 25 min,收集沉淀。PBS 重悬收集细菌,超声破碎细菌,4℃ 12 000 r/m 离心 25 min,分别收集上清和沉淀。

取超声上清,进行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,进行 Western blot 检测,比较表达量。SDS-PAGE 凝胶电泳,在 300 mA 恒流条件下,将经过 SDS-PAGE 分离的蛋白凝胶电转移到 PVDF 膜上。转印后将膜用 5 ml 5%脱脂奶粉缓冲液封闭 2 h。用 PBST 洗涤后,加入稀释的抗体工作液(兔抗 Fc 抗体,1:3 000)。37℃孵育 2 h 后,将膜用 PBST 洗涤 3 遍,再加入 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体(1:3 000)孵育 1 h,用 PBST 洗涤 3 遍。

#### 1.2.4 重组抗体 scFv-Fc 的纯化

将含有 scFv-Fc-pCold II 大肠杆菌 BL21(DE3)接种于 20 ml LB 液体培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中,37℃过夜培养。次日按照上述方法加入到 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 的 1 L LB 液体培养基中诱导表达。PBS 重悬收集细菌,超声破碎细菌,4℃ 12 000 r/m 离心 25 min,分别收集超声上清和沉淀。超声上清用 0.22  $\mu$ m 的膜过滤后储存在 4℃备用。将过滤后的超声上清用美国 GE 公司的 HisTrap HP 柱纯化,上样缓冲液为含有 200 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑,pH7.4 的磷酸缓冲液,洗脱缓冲液分别为 500 mmol/L 咪唑的上样缓冲液,收集洗脱蛋白,SDS-PAGE 电泳检测并进行 Western blot 分析。

#### 1.2.5 重组抗体 scFv-Fc 的结合活性分析

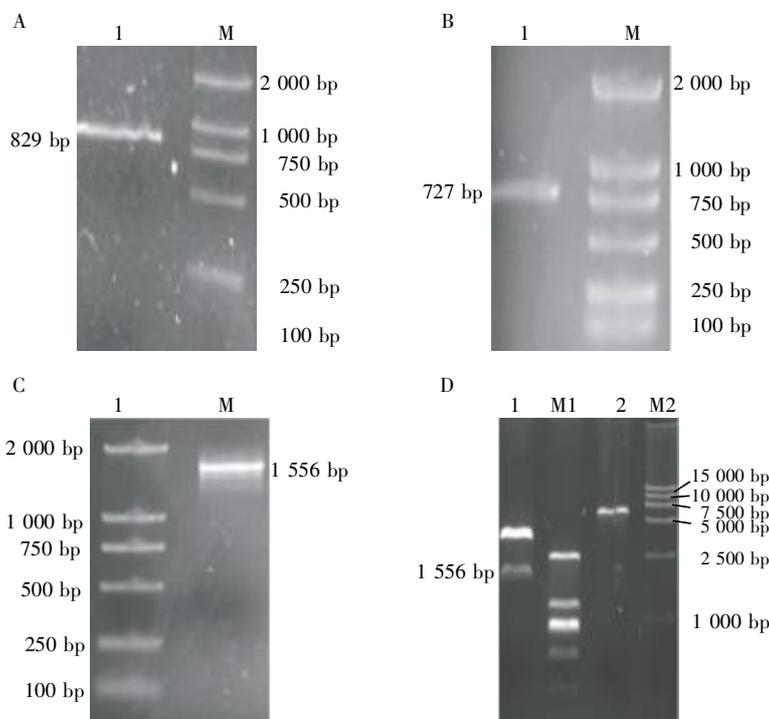
用纯化灭活的狂犬病病毒包被 ELISA 板(5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),1%BSA 封闭液,300  $\mu\text{l}/\text{孔}$ ,放置培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h;弃去封闭液,拍干加入经过 HisTrap HP 柱纯化的以梯度稀释(1:1、1:8、1:16、1:32、1:216、1:512)的 scFv-Fc 抗体,采用间接 ELISA 法测定抗体效价,以 PBS 为空白(阴性)对照,放置培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h;PBST 清洗 4 次,拍干;加入 HRP 标记的羊抗人 IgG(1:4 000),放置培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h;PBST 清洗 8 次,拍干;加入 TMB 底物和  $\text{H}_2\text{O}_2$  显色,室温 20 min 后,加入 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应,酶标仪读数测定 450 nm 的吸光值。

## 2 结 果

### 2.1 目的基因片段扩增及表达载体的构建

以特异性引物扩增出大小为 829 bp 的 scFv 基因片段(图 1A)以及大小为 727 bp 的 Fc 基因片段(图 1B),并通过 overlap PCR 扩增出大小为 1 556 bp 的目的基因 scFv-Fc(图 1C)。双酶切 scFv-Fc-PMD18T 质粒和 pCold II 载体(图 1D),随后以 T4 连接酶连接酶切后胶回收的片段,构建 scFv-Fc-pCold II 表达载体,测序验证载体构建正确。

### 2.2 重组抗体 scFv-Fc 的原核表达条件的优化



A:scFv 基因 PCR 扩增产物。M:Marker;1:scFv PCR 扩增产物。B:Fc 基因 PCR 扩增产物。M:Marker;1:Fc PCR 扩增产物。C:scFv-Fc 基因 Overlap PCR 扩增产物。M:Marker;1:scFv-Fc overlap PCR 扩增产物。D:双酶切 scFv-Fc-PMD18T 载体和 pCold II 载体。M1,M2:Marker;1:双酶切后的 scFv-Fc-PMD18T 载体;2:双酶切后的 pCold II 载体。

图 1 目的基因片段扩增及表达载体的构建

Figure 1 Amplification of aim gene fragments and construction of expression vector

将 scFv-Fc-pCold II 重组表达载体转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3) 中,当加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导表达时,分子量大小为 57 000 重组抗体 scFv-Fc 的表达量较高,且杂蛋白较少(图 2)。

### 2.3 重组抗体 scFv-Fc 的纯化

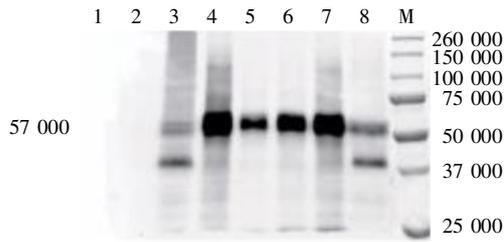
将诱导表达的超声上清用美国 GE 公司的 His-Trap HP 柱纯化,经 Western blot 分析,检测目的条带大小为 57 000(图 3)。所纯化出的抗体产量和纯度均较高,产量为 3 mg/L。

### 2.4 重组抗体 scFv-Fc 的结合活性分析

间接 ELISA 结果显示,纯化后的重组 scFv-Fc 抗体可与灭活的狂犬病病毒特异性结合,随着稀释倍数的增加,吸光度值逐渐下降,当稀释倍数为 1:512 时,仍能识别狂犬病病毒(图 4)。

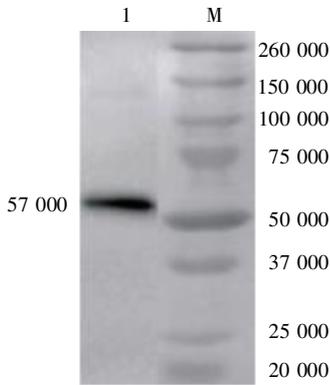
## 3 讨 论

本实验室前期已经成功构建了抗狂犬病病毒 scFv 噬菌体抗体库<sup>[6,10]</sup>,检测了阳性克隆株的中和



1:空菌大肠杆菌 BL21(DE3);2:空载 pCold II ;3:IPTG 为 0 mmol/L; 4:IPTG 为 0.2 mmol/L;5:IPTG 为 0.4 mmol/L;6:IPTG 为 0.5 mmol/L; 7:IPTG 为 0.8 mmol/L;8:IPTG 为 1 mmol/L;M:蛋白 Marker。

图 2 重组抗体 scFv-Fc 在不同 IPTG 浓度下进行诱导表达  
Figure 2 Inducible expression of recombinant antibody scFv-Fc in different IPTG concentrations



1:纯化后的 ScFv-Fc 重组抗体;M:蛋白 Marker。

图 3 抗狂犬病毒 scFv-Fc His-Trap 纯化后的 Western blot  
Figure 3 Western blot analysis of His-trap-purified anti-RV scFv-Fc antibody

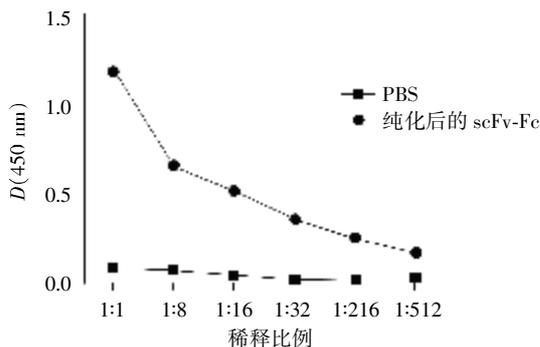


图 4 ELISA 检测重组抗体 scFv-Fc 与狂犬病病毒蛋白的结合活性

Figure 4 ELISA analysis of the binding activity of scFv-Fc to rabies virus protein

活性, 获得了具有较好中和活性的抗狂犬病病毒 scFv 单链抗体。但其为小分子抗体, 分子量较小, 分子稳定性不如完整的全分子抗体, 另外由于缺少 Fc 段, 不能发挥由 Fc 段所介导的抗体依赖细胞毒作用等生物学效应<sup>[7-9]</sup>。

本研究利用基因工程技术, 构建了全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体的原核表达载体, 在单链抗体 scFv 的基础上与人 IgG 的 Fc 段相融合<sup>[11]</sup>, 制备了全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体, 其分子量大小为 57 000。ELISA 检测结果显示它能够特异性结合灭活的狂犬病病毒 CTN 株, 提示本研究制备的 scFv-Fc 融合抗体较好地保留了 scFv 与狂犬病病毒特异性结合的免疫学活性。本研究获得的全人源抗狂犬病病毒 scFv-Fc 融合抗体, 在人源抗体库技术制备的 scFv 小分子抗体的基础上, 克服了小分子抗体在血清中半衰期短等缺陷, 另外该抗体可通过 Fc 段发挥抗体依赖的细胞毒作用等从而提高了抗体的中和能力, 能够更好地应用于狂犬病暴露后的预防, 为狂犬病免疫预防性抗体药物的研究奠定了基础。

本研究使用了大肠杆菌原核表达系统, 其为当前采用最多的原核表达体系, 合理地运用大肠杆菌这一表达媒介, 可以较为便利地获得具有一定生物活性的目的蛋白。然而与真核表达系统相比, 原核表达系统由于缺乏适当的翻译后加工机制, 表达的蛋白质不能适当折叠或进行糖基化修饰, 会对蛋白活性产生一定影响, 因此本研究所制备的 scFv-Fc 融合抗体的生物学活性可能会受到原核表达系统局限性的限制<sup>[12]</sup>, 今后可尝试在真核表达系统下制备全人源 scFv-Fc 抗体。此外, scFv-Fc 重组抗体的分子稳定性不如完整的全分子抗体。在真核表达重组抗体的基础上, 可以进一步表达全分子的抗狂犬病病毒抗体, 以便更好地应用于临床上狂犬病的防治<sup>[13-15]</sup>。

[参考文献]

[1] World Health Organization. WHO expert consultation on rabies. Second report [J]. World Health Organ Tech Rep Ser, 2013(982): 1-139  
 [2] 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  
 [3] Ando T, Yamashiro T, Takita-Sonoda Y, et al. Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus-neutralizing ability [J]. Microbiol Immunol, 2005. 49(4): 311-322  
 [4] Skerra A, Plückthun A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli* [J]. Science, 1988, 240(4855): 1038-1044  
 [5] 张夏玲, 孙见宇, 殷 珏, 等, 全人源抗狂犬病病毒单克

- [J]. *Inflammopharmacology*, 2012, 20(1): 1-18
- [5] Eksteen B, Liaskou E, Adams DH. Lymphocyte homing and its role in the pathogenesis of IBD[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2008, 14(9): 1298-1312
- [6] Kellermayer Z, Mihalj M, Balogh P. MAdCAM-1 independent lymphocyte homing to GALT of Nkx2.3(-/-) mice [J]. *Immunology*, 2012, 137(3): 390-397
- [7] Tlaxca JL, Rychak JJ, Ernst PB, et al. Ultrasound-based molecular imaging and specific gene delivery to mesenteric vasculature by endothelial adhesion molecule targeted microbubbles in a mouse model of Crohn's disease[J]. *J Control Release*, 2013, 165(3): 216-225
- [8] Eckelman WC, Reba RC, Kelloff GJ. Targeted imaging: an important biomarker for understanding disease progression in the era of personalized medicine [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13(17): 748-759
- [9] Khanicheh E, Mitterhuber M, Xu L, et al. Noninvasive Ultrasound molecular imaging of the effect of statins on endothelial inflammatory phenotype in early atherosclerosis [J]. *Plos one*, 2013, 8(3): 315-321
- [10] Vande Castele N, Feagan BG, Gils A, et al. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease: current state and future perspectives [J]. *Curr gastroenterol Rep*, 2014, 16(4): 378-389
- [11] Deban L, Correale C, Vetrano S, et al. Multiple pathogenic roles of microvasculature in inflammatory bowel disease: a Jack of all trades [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(6): 1457-1466
- [12] Neurath MF. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases [J]. *Mucosal Immunology*, 2014, 7(1): 6-19
- [13] Lobaton T, Vermeire S. Review article: anti-adhesion therapies for inflammatory bowel disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 39(6): 579-594
- [14] Di SA, Roveditti L, Rosado MM, et al. Increased expression of mucosal addressin cell adhesion molecule 1 in the duodenum of patients with active celiac disease is associated with depletion of integrin alpha4 beta7-positive T cells in blood [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(5): 699-704
- [15] Nobile S, Gionchetti P, Rizzello F, et al. Mucosal healing in pediatric Crohn's disease after anti-TNF therapy: a long-term experience at a single center [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2014, 26(4): 458-465
- [16] Bachmann C, Klibanov AL, Olson TS, et al. Targeting mucosal addressin cellular adhesion molecule (MAdCAM)-1 to noninvasively image experimental Crohn's disease [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(1): 8-16

[收稿日期] 2014-03-17

(上接第 744 页)

- 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
- [6] 李琛, 林红, 刘新建, 等. 人源抗狂犬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): 575-578
- [7] Li C, Zhang F, Lin H, et al. Generation and characterization of the human neutralizing antibody fragment Fab091 against rabies virus [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(3): 329-337
- [8] 汪楠, 唐小军, 熊四平, 等. 重组豹蛙酶的制备及其生物学特性分析 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(8): 1034-1038
- [9] World Health Organization. WHO expert consultation on rabies [J]. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 2005, 931: 1-88
- [10] 张倩倩, 赵茜, 张晓, 等. 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 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(7): 927-931
- [11] 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(7): 986-990
- [12] Ray K, Embleton MJ, Jaikhani BL, et al. Selection of single chain variable fragments (scFv) against the glycoprotein antigen of the rabies virus from a human synthetic scFv phage display library and their fusion with the Fc region of human IgG1 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2001, 125(1): 94-101
- [13] Repp R, Kellner C, Muskulus A, et al. Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC [J]. *J Immunol Methods*, 2011, 373(1-2): 67-78
- [14] Xu LD, Jin XF, Rainey GJ, et al. A mammalian expression system for high throughput antibody screening [J]. *J Immunol Methods*, 2013, 395(1-2): 45-53
- [15] Meng SL, Sun Y, Wu XF, et al. Evolutionary dynamics of rabies viruses highlights the importance of China rabies transmission in Asia [J]. *Virology*, 2011, 410(2): 403-409

[收稿日期] 2014-01-16