

· 基础研究 ·

HEV 保护性基因工程抗体的制备及功能研究

李冰¹, 杨婷婷², 唐奇², 冯振卿², 杨永林^{2,3*}, 陈宇^{1*}¹南京医科大学第一附属医院麻醉科, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学国家卫健委抗体技术重点实验室, 江苏 南京 211166; ³南京医科大学附属南京医院感染性疾病科, 江苏 南京 210006

[摘要] 目的: 制备抗戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)的人鼠嵌合基因工程抗体并研究其中和保护作用及特性。方法: 将已获得的抗HEV鼠源单克隆抗体基因序列进行优化, 设计人鼠嵌合的工程化抗体基因序列, 将其克隆入真核表达载体; 表达载体共转染293F细胞进行表达优化, 高效制备基因工程化抗体; 通过酶联免疫反应(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫荧光及HEV细胞感染模型, 研究工程化抗体的结合能力及中和活性。结果: 成功构建基因工程化人鼠嵌合HEV保护性抗体表达载体, 在293F表达系统中实现高效表达。抗体表达产率达30 mg/L, 亲和力为 1.202×10^{-8} mol/L。免疫荧光检测结果显示抗体能够灵敏、特异地与已感染HEV的Kernow细胞结合, 实时荧光定量PCR检测结果显示抗体可保护易感的C3A细胞不被HEV感染。结论: 基因工程化抗体具有高效的HEV结合能力及中和作用, 能有效阻断HEV感染, 并实现低成本高效表达。

[关键词] HEV; 人鼠嵌合基因工程抗体; 单克隆抗体**[中图分类号]** R392.11**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)03-342-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200308

Preparation and function study of the protective HEV genetically engineered antibody

LI Bing¹, YANG Tingting², TANG Qi², FENG Zhenqing², YANG Yonglin^{2,3*}, CHEN Yu^{1*}

¹Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ²Key Laboratory of Antibody Technology, National Health Commission, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ³Department of Infectious Diseases, the Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to prepare the genetically engineered human-mouse chimeric antibody against hepatitis E virus (HEV) and investigate its protective neutralization and properties. **Methods:** To optimize the obtained anti-HEV murine monoclonal antibody gene sequence, the human-mouse chimeric engineered antibody gene sequences were designed and cloned into the antibody eukaryotic expression vectors; vectors were co-transfected into 293F cells for optimal expression, and the genetically engineered antibody was efficiently prepared. The binding ability and neutralizing activity of the engineered antibody was studied by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence and HEV cell infection model. **Results:** The engineered human-mouse chimeric HEV protective antibody expression vectors were constructed successfully, and the engineered human-mouse chimeric HEV protective antibody was expressed in the 293F expression system efficiently. Antibody expression yield reached 30 mg/L, binding affinity of the antibody was 1.202×10^{-8} mol/L. Immunofluorescence results showed that the antibody could sensitively and specifically bind to Kernow cells infected by HEV. The results of quantitative real-time PCR showed that the antibody could protect susceptible C3A cells from HEV infection. **Conclusion:** Gene engineering antibody has high HEV binding capacity and efficient neutralization protection, which can effectively block HEV infection and be achieved with low-cost and high-efficiency.

[Key words] HEV; recombinant engineered human-mouse chimeric antibody; monoclonal antibody

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(03): 342-347]

[基金项目] 中国博士后科学基金(1851); 南京市医学科技发展项目(ZKX15051)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: easing@163.com; chenyu020219@163.com

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是引起人类肝脏疾病的重要病原体之一,更是急性肝功能损害的最主要原因,全世界超过20亿人感染过HEV,每年有近30万人因此死亡^[1].特别是孕妇在孕晚期感染HEV后更易发生严重肝功能衰竭,病死率高达30%^[2]. HEV属于肝炎病毒科的单股正链RNA无包膜病毒,其基因大小为7.2 kb^[3].与人类HEV感染相关的基因型主要有4型,其中I、II型仅感染人类,是发展中国家的主要流行基因型,III、IV型为人畜共患型,不仅感染人类也感染动物,如猪、鹿等,其感染率相当高,是发达国家目前发生感染流行的主要基因型^[4].传统的粪口途径是发展中国家的主要传染方式.发达国家的传播途径主要为输入型或动物源性^[5],由于猪等动物发生HEV感染的比例较高,因此经肉类食物链感染成为重要途径.血液产品输注后HEV感染的病例也已有报道^[5],器官移植后发生持续感染的报道更是屡见不鲜^[6].

HEV感染后可产生保护性抗体而避免发生再次感染,我国首先研制的疫苗也已获批上市,并取得良好的免疫保护效果^[7],说明了HEV保护性抗体的重要性.随着人群及医疗技术的改变和提高,HEV感染的慢性化和经非粪口途径传播等问题越来越受到关注^[5],在免疫功能不健全的个体中,HEV持续感染时有报道^[8],其主动免疫应答也较难实现.目前在HEV暴露后,或慢性肝病、器官移植等特殊患者中均缺乏有效可用的被动保护方法.

本研究采用基因工程技术和抗体工程技术,制备重组人鼠嵌合HEV保护性基因工程抗体,通过优化表达系统获得HEV基因工程抗体,为大量获得HEV保护性基因工程抗体和临床应用奠定基础,报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料

分泌抗HEV单克隆抗体的鼠源杂交瘤细胞株由本实验室制备,C3A细胞株和HEV感染的Kernow细胞株为本实验保存,重组HEV衣壳蛋白为东南大学孟继鸿教授惠赠.293F细胞株、IgG表达质粒pFUSE-CHIg-hG1、pFUSE-CLIg-hk(Invitrogen公司,美国),RNA提取试剂盒、胶回收试剂盒(Qiagen公司,德国),逆转录试剂、In-Fusion DNA重组试剂、质粒提取试剂盒(大连TaKaRa公司),无内毒素质粒提取试剂盒(Omega公司,美国).

1.2 方法

1.2.1 抗体基因扩增测序

常规培养杂交瘤细胞株,进行计数并获得 1.0×10^7 个细胞,参照说明书,提取细胞总RNA.简述如下:离心弃上清获取细胞,加入600 μ L裂解液,进行均质化,加入RNA结合柱,离心,加入洗液700 μ L,去离子水洗脱.随后取10 μ L RNA逆转录为cDNA,扩增抗体基因,电泳鉴定后送上海生工生物工程股份有限公司进行PCR产物直接测序.

1.2.2 基因工程抗体优化及克隆

对所获得的轻链、重链可变区序列进行分析,针对293F细胞表达系统进行序列优化,基因序列送南京金斯瑞生物科技有限公司进行基因的合成.设计克隆用引物,序列参照表1.

表1 In-Fusion重组引物序列

Table 1 In-Fusion recombinant primer sequences

名称	序列(5'→3')
VHF	GGTGTCCTCCGCTAGAGGTCAGCTGCAA
VHR	GCCCTTGGTGGATGCTGAAGAGACAGTGAC
VKF	ACAGACGCTCGCTGCGACATTGTGTATGACCCAG
VKR	TGCAGCCACCGTACGTTTTATTTCAGCTT

采用Pfu酶进行扩增,并回收目的条带.扩增体系及条件如下:Pfu酶5 U、10 \times 缓冲液5 μ L、引物(VHF+VHR或VKF+VKR)共16 μ L(2.5 μ mol/L)、合成基因模板0.1 μ L,补齐50 μ L后进行扩增;扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s,共25个循环.将抗体表达质粒pFUSE-CHIg-hG1、pFUSE-CLIg-hk采用EcoR I和Nhe I限制性内切酶37 $^{\circ}$ C酶切过夜,随后切胶回收载体片段.与扩增的PCR条带进行重组.反应体系及条件:载体片段1 μ L、PCR回收产物4 μ L、重组预混缓冲液5 μ L,50 $^{\circ}$ C反应30 min,随后进行转化、筛选及测序.

1.2.3 HEV保护性基因工程抗体表达优化

常规悬浮培养293F细胞, 1.0×10^5 个/mL进行接种,120 r/min、37 $^{\circ}$ C、8%CO₂进行培养,3 d后调整细胞密度为 1.0×10^6 个/mL,活性达98%以上,随后进行聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)常规转染.方法简述如下:取质粒于Opti-MEM培养基中,总质量为100 μ g,phG1-HEV与phk-HEV的比例分别为3:2、1:1、2:3、1:2、1:3,定容至1.5 mL,混合均匀,同时取100 μ L的转染试剂PEI加入1.4 mL的Opti-MEM培养基中,混合均匀,5 min后将两者混匀并室温静置20 min;取 1.0×10^8 个细胞于培养瓶中,用293F Ex-

pression 培养基定容至 47 mL;静置 20 min 后将 3 mL 的质粒 DNA、PEI 的复合物加入准备好的 293F 细胞中;将细胞放在摇床培养箱中培养,120 h 后收集细胞上清。确定最佳表达质粒比例后,PEI 和质粒的比例分别为 2:1、5:2、3:1、7:2,方法同上。在最优表达体系下分别收集 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 表达上清进行 HEV 抗体效价检测。

1.2.4 HEV 基因工程抗体检测和纯化

0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释重组 HEV 衣壳蛋白至 2 μg/mL,包被 EIA 高亲和力 96 孔板,每孔加入 100 μL,4 °C 过夜;弃去液体,PBST (PBS 含 0.5% Tween20) 洗涤 5 次,5% BSA 室温封闭 2 h。检测时每孔加入 100 μL 样本,37 °C 孵育 1 h;常规洗涤后,每孔加入 100 μL 羊抗人二抗 (1:5 000),37 °C 孵育 1 h;最后加入过氧化物酶底物显色液,37 °C 显色 15 min 后中止,450 nm 波长检测吸光度值。

工程化抗体纯化采用 Protein A 在 AKTA 纯化仪进行亲和纯化,简要过程如下:收集 293F 细胞转染 72 h 的培养上清,离心及过滤去除细胞碎片,培养上清经 1:3 稀释后进行上样,常规监测过程,最后洗脱后进行超滤浓缩并测定蛋白浓度。

纯化抗体及流穿液、超滤下液处理后分别加入到 SDS-PAGE 凝胶上样孔中,以未转染的 293F 细胞培养上清作为阴性对照,电泳完成后采用考马斯亮蓝染色液进行染色,考马斯亮蓝脱色液进行脱色,使用 Tanon 凝胶成像系统进行成像及 TanonGis 分析软件进行半定量分析。

1.2.5 HEV 基因工程抗体的亲和力检测

采用 Biacore T100 对抗体进行亲和力检测,选择磷酸盐缓冲液 (PBS) 作为偶联稀释缓冲液。用此

缓冲液稀释 HEV 基因工程抗体至 25 μg/mL,然后偶联到 CM5 芯片 (GE #BR100012) 上,同样分别稀释重组 HEV 衣壳蛋白浓度至 5、10、20、40、80 nmol/L。设置进样时间为 180 s,解离时间 10 min,采用缓冲液 (50 mmol/L pH2.2 Glycine-HCl) 进行再生。

1.2.6 HEV 免疫荧光检测

将 HEV 感染的 Kernow 细胞进行爬片培养,细胞汇合度达 90% 时,使用冰丙酮溶液固定;PBST 洗去丙酮溶液,加入 100 μL 基因工程抗体 (1:5 000),37 °C 孵育 1 h,用 PBST 漂洗 5 次,加入 100 μL TRITC 标记羊抗人抗体 (1:5 000),37 °C 孵育 1 h,用 PBST 漂洗 5 次,加入含 DAPI 染料的封片液,共聚焦显微镜在相应波长下检测。

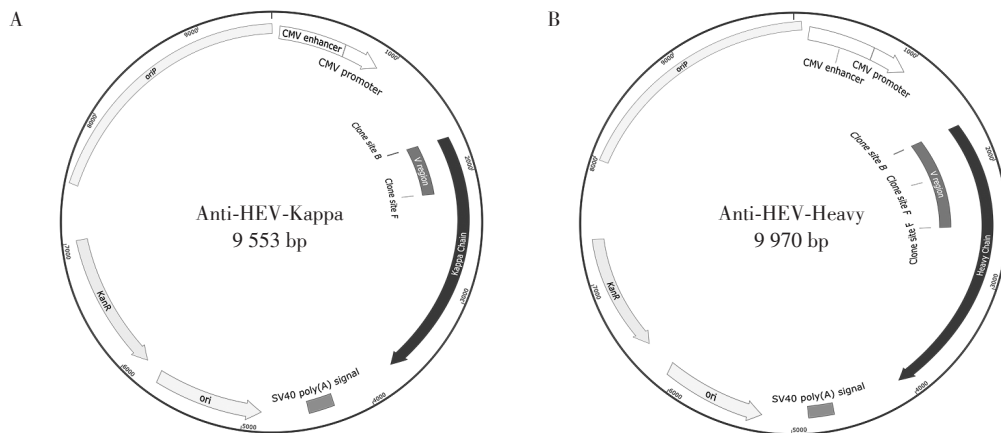
1.2.7 中和试验及 HEV 定量 PCR 检测

收集 HEV 感染的 Kernow 细胞的培养上清,超滤浓缩 100 倍后进行病毒定量,调整病毒载量为 1.0×10⁶ copies/mL 后备用;取 200 μL 浓缩病毒液,加入纯化抗体 20 μL (1 μg/μL),37 °C 共孵育 2 h,设立不加抗体处理的对照组以及鼠源 HEV 抗体处理组。常规培养细胞株 C3A,接种细胞至 24 孔板中,加入准备好的病毒样品,每孔加 220 μL 病毒-抗体混合液及 1.78 mL 的完全培养基,37 °C 培养 8 h 后,更换培养基;常规换液及传代,第 8 天收集细胞上清,采用本实验建立的 HEV 实时荧光定量 PCR 方法进行 HEV RNA 检测,具体见参考文献 [9]。

2 结果

2.1 基因工程抗体表达载体

克隆重组及测序确认成功构建 HEV 特异性基因工程抗体表达载体 (图 1),分别命名为: phG1-



A: Anti-HEV-Kappa 带有工程化抗体轻链基因,命名为 phk-HEV; B: Anti-HEV-Heavy 带有工程化抗体重链基因,命名为 phG1-HEV。

图 1 基因工程抗体表达载体结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of genetically engineered antibody expression vectors

HEV、phk-HEV。

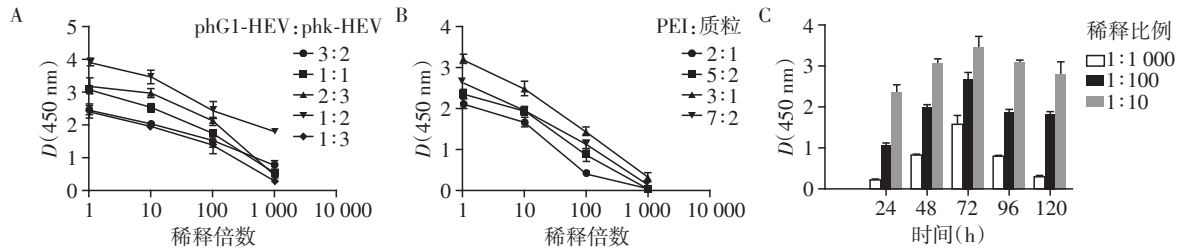
2.2 基因工程抗体表达条件

采用PEI转染常规293F细胞株,检测两表达载体不同比例时HEV保护性基因工程抗体的效价。结果提示,phG1-HEV与phk-HEV的比例在1:2时抗体滴度最高(图2A)。同时PEI和总质粒的比例对表达效果也有显著影响,PEI与质粒的质量比为3:1时表达效果最佳(图2B)。

phG1-HEV与phk-HEV比例为1:2及PEI与质粒质量比为3:1的条件下进行抗体表达,分别于24 h、48 h、72 h、96 h、120 h收集表达上清,进行HEV抗体效价检测,结果显示在72 h时抗体表达水平达到高峰,随后上升不明显(图2C)。

2.3 基因工程抗体纯化

采用Protein A在AKTA纯化仪亲和纯化抗HEV全分子IgG,得到纯化的嵌合anti-HEV IgG,SDS-



A:不同比例phG1-HEV与phk-HEV时的HEV抗体效价,培养上清10倍梯度稀释后进行抗体的效价检测($n=3$);B:PEI与表达质粒在不同比例下的HEV抗体效价,培养上清10倍梯度稀释后进行抗体的效价检测($n=3$);C:不同时间的抗体表达效价,分别在转染后24 h、48 h、72 h、96 h、120 h采集培养上清,10倍梯度稀释后进行抗体效价检测($n=3$)。

图2 基因工程抗体表达条件的优化

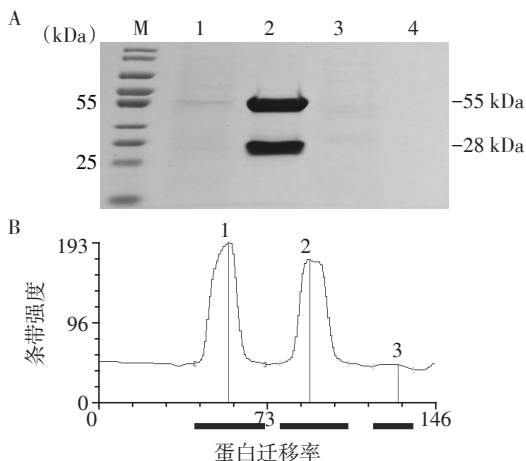
Figure 2 Optimization of expression conditions of genetically engineered antibody

PAGE鉴定并使用Tanon Gis软件进行半定量分析,以未转染的293F细胞培养上清作为阴性对照,结果显示抗体高效表达,该抗体重、轻链分子量分别为55 kDa及28 kDa(图3),纯度大于99%,表达产率达30 mg/L。

2.4 纯化后的嵌合anti-HEV IgG效价滴度检测

采用ELISA对纯化后的嵌合anti-HEV IgG进行

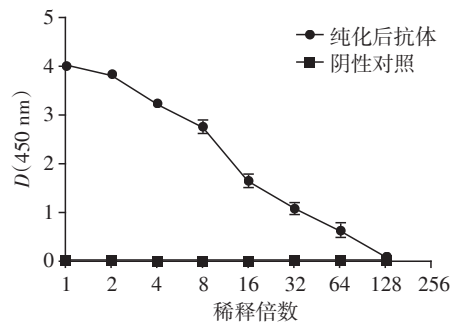
效价滴度检测,以未转染的293F细胞培养上清作为阴性对照,最终检测滴度达到1:1 280 000(图4)。



A:SDS-PAGE鉴定嵌合anti-HEV IgG。M:蛋白Marker;1:流穿液;2:纯化抗体;3:超滤下液;4:阴性对照。B:Tanon Gis软件进行半定量分析嵌合anti-HEV IgG抗体纯度,峰1百分数为56.78%;峰2百分数为42.56%;峰3百分数为0.66%。

图3 SDS-PAGE鉴定纯化后的嵌合anti-HEV IgG

Figure 3 SDS-PAGE analysis of purified chimeric anti-HEV IgG antibody



嵌合anti-HEV IgG抗体经20 000倍稀释后,再进行2倍连续稀释,Cut-off值设定为0.115($n=3$)。

图4 纯化后的嵌合anti-HEV IgG的滴度检测

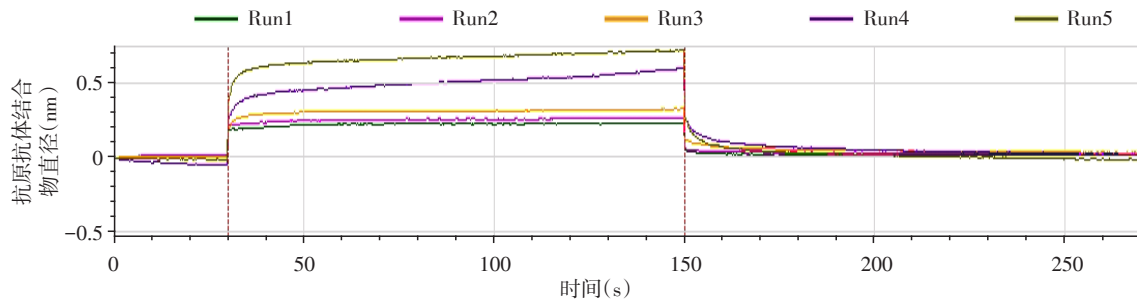
Figure 4 Titer detection of purified chimeric anti-HEV IgG antibody

2.5 嵌合anti-HEV IgG的亲合力检测

按照Biacore T100 software的标准操作步骤进行上机检测。经分析检测后得抗体亲合力Kd值为 1.202×10^{-8} mol/L(图5)。

2.6 HEV免疫荧光检测结果

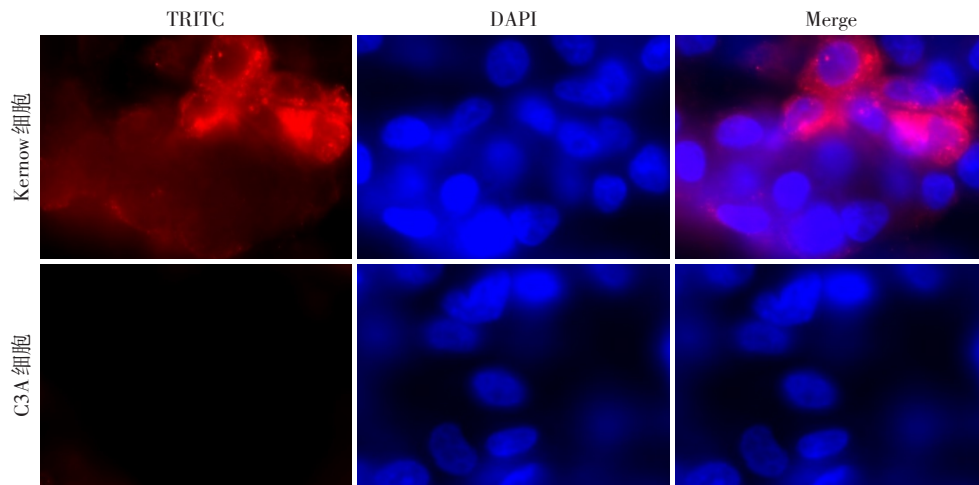
免疫荧光检测本研究制备的嵌合anti-HEV IgG与HEV感染的Kernow细胞的结合,结果表明嵌合anti-HEV IgG能有效结合HEV蛋白,且有良好的特异度和灵敏度(图6)。



Run1~Run5 HEV 衣壳蛋白抗原浓度分别为 5、10、20、40、80 nmol/L。

图5 Biacore T100 抗体亲和力检测

Figure 5 Antibody affinity detection by Biacore T100



嵌合 anti-HEV IgG 可与 HEV 感染的 Kernow 细胞特异性结合,与 C3A 细胞无特异性结合。

图6 免疫荧光检测结果

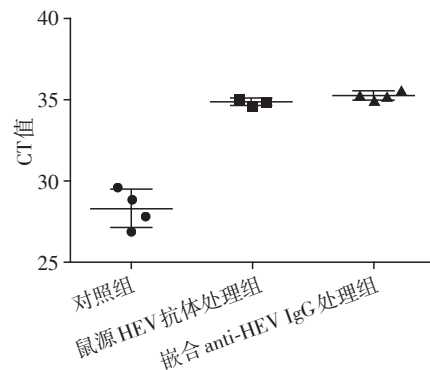
Figure 6 Results of immunofluorescence assay

2.7 嵌合 anti-HEV IgG 的 HEV 中和作用

HEV 病毒与嵌合 anti-HEV IgG 预先进行结合处理后,再与 C3A 细胞共培养,在第 8 天收集细胞上清进行 HEV RNA 实时荧光定量 PCR 检测,结果提示未加嵌合 anti-HEV IgG 的对照组有较高水平的 HEV RNA (图 7),嵌合 anti-HEV IgG 处理组及鼠源抗体处理组 C_t 值均在荧光检测上限(本研究均按 35 个 C_t 计)。

3 讨论

戊型肝炎是目前全球常见的公共卫生问题之一,无论发达国家还是发展中国家 HEV 人群感染率均较高^[10],最主要原因之一就是戊型肝炎是人畜共患型疾病,HEV 基因型的 III 和 IV 型均可感染人类和动物并致病^[4]。HEV 通常被认为是经粪口途径传播的无包膜病毒,但近年来关于 HEV 经输血传播的病例陆续出现,2002 年和 2004 年,日本北海道分别发现新鲜冷冻血浆输注治疗^[11]和经血小板输注治



处理组 C_t 均大于 35 (以 $C_t=35$ 计)($n=3$)。

图7 实时荧光定量 PCR 检测结果

Figure 7 Results of quantitative real-time PCR detection

疗后^[12]感染 HEV 的病例。2006 年和 2007 年,欧洲的英国^[13]和法国^[14]也分别报道了 HEV 输血后感染的病例。且已证实通过血浆灭活技术无法完全灭活 HEV^[15]。

目前急性 HEV 感染主要以对症支持治疗为主,严重急性和慢性 HEV 感染的患者试用利巴韦林等药

物进行治疗^[16]。然而利巴韦林在临床使用过程中可发生严重不良反应^[17],并且其治疗效果有限^[18]。在发生HEV暴露后或慢性肝病、器官移植等特殊患者中,均无法采用主动免疫进行预防,因此,寻求更加有效可用的被动保护治疗手段非常必要。

本研究通过基因工程技术克隆鼠源单克隆抗体基因并进行优化,对抗体Fc端进行修改,替换成人源IgG的Fc端,避免了鼠源抗体在人体运用时产生异种免疫应答的问题^[19],优化完成后使用293F真核细胞系统^[20]进行抗体表达。抗体的表达效率和结合能力的保持是工程化抗体的核心,本研究有效保持了原有抗体的特性,同时通过表达优化实现了抗体的高表达。

综上所述,本课题成功制备出的重组人鼠嵌合抗HEV保护性全分子IgG,可有效识别HEV并可用于HEV的检测,保护细胞株不被HEV感染,为临床应用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] PÉREZ-GRACIA M T, LINDEMANN M L, VILLALBA M C M. Hepatitis E: current status[J]. *Rev Med Virol*, 2013, 23(6):384-398
- [2] PRIMADHARSINI P P, NAGASHIMA S, OKAMOTO H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus [J]. *Viruses*, 2019, 11(5):456
- [3] KAMAR N, BENDALL R, LEGRAND-ABRAVANEL F, et al. Hepatitis E[J]. *Lancet*, 2012, 379(9835):2477-2488
- [4] KAMAR N, PISCHKE S. Acute and persistent hepatitis E virus genotype 3 and 4 infection: clinical features, pathogenesis, and treatment [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019, 9(7):1-12
- [5] MARANO G, VAGLIO S, PUPELLA S, et al. Hepatitis E: an old infection with new implications [J]. *Blood Transfus*, 2015, 13(1):6-17
- [6] DE NIET A, ZAAIJER H L, TEN BERGE I, et al. Chronic hepatitis E after solid organ transplantation [J]. *Neth J Med*, 2012, 70(6):261-266
- [7] ZHANG J F, HUANG S J. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(10):914-922
- [8] KAMAR N, LEGRAND-ABRAVANEL F, IZOPET J, et al. Hepatitis E virus: what transplant physicians should know [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(9):2281-2287
- [9] 许纪玲,蔡杰,何苗,等. HEV保护性抗体的制备与功能研究[J]. *中国输血杂志*, 2017, 30(5):459-462
- [10] YRONDI A, SALLES J, PÉRON J M, et al. The prevalence of hepatitis E in a patient cohort presenting with addictive injection behavior[J]. *Front Psychiatry*, 2019, 10:832
- [11] MATSUBAYASHI K, NAGAOKA Y, SAKATA H, et al. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan [J]. *Transfusion*, 2004, 44(6):934-940
- [12] MATSUBAYASHI K, KANG J H, SAKATA H, et al. A case of transfusion - transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food - borne route [J]. *Transfusion*, 2008, 48 (7) : 1368-1375
- [13] BOXALL E, HERBORN A, KOCHETHU G, et al. Transfusion - transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country[J]. *Transfus Med*, 2006, 16(2):79-83
- [14] COLSON P, COZE C, GALLIAN P, et al. Transfusion-associated hepatitis E, France[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(4):648-649
- [15] YUNOKI M, TANAKA H, TAKAHASHI K, et al. Hepatitis E virus derived from different sources exhibits different behaviour in virus inactivation and/or removal studies with plasma derivatives[J]. *Biologicals*, 2016, 44(5):403-411
- [16] DEBING Y, NEYTS J. Antiviral strategies for hepatitis E virus[J]. *Antiviral Res*, 2014, 102:106-118
- [17] ANANG S, KAUSHIK N, SURJIT M. Recent advances towards the development of a potent antiviral against the hepatitis E virus [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2018, 6(3) : 310-316
- [18] MIYOSHI M, KAKINUMA S, TANABE Y, et al. Chronic hepatitis E infection in a persistently immunosuppressed patient unable to be eliminated after ribavirin therapy [J]. *Intern Med*, 2016, 55(19):2811-2817
- [19] 王晓蕾,朱进,哈卓,等. 全人源抗狂犬病病毒糖蛋白抗体的制备及鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(2):160-164
- [20] 陈雅,熊四平,唐奇,等. 人源抗H7N9血凝素中和抗体IgG的制备及鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(7):874-879

[收稿日期] 2019-09-17