

网络出版时间:2014-04-25 15:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.024

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.024.html>

HIV-1 可溶性单链抗体 b12-scFv 的表达与活性分析

杨 雄, 刘秀侠, 南 昊, 许晓东, 陈红英

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**合成并克隆 HIV-1 单克隆抗体 b12 的单链抗体基因,在大肠杆菌中诱导表达,并分析表达产物的活性。**【方法】**以单抗 b12 的重链和轻链全基因为模板,分别扩增其可变区基因片段后,用重叠 PCR 的方法将二者拼接起来,形成 scFv-VL-Linker-VH 结构,并将其插入 pET28a 载体,构建原核表达载体 pETb12-scFv。将 pETb12-scFv 转入大肠杆菌 BL21 StarTM(DE3),经 IPTG 诱导表达,对表达产物进行 SDS-PAGE 分析;用 Ni-NTA 金属螯合层析柱对表达产物进行分离纯化,用酶联免疫吸附试验(ELISA)、荧光显微镜和流式细胞仪(FCM)检测纯化蛋白与 HIV-1 gp120 的结合活性。**【结果】**得到了 b12 的单链抗体基因 *b12-scFv*,长度为 768 bp;SDS-PAGE 电泳结果显示,*b12-scFv* 表达量较高,蛋白质分子质量约为 29 ku,主要以可溶性蛋白的形式存在,但也有部分形成不溶的包涵体;纯化后蛋白的产量约为 2 mg/L;活性检测结果表明,*b12-scFv* 对分泌表达和锚定在细胞膜表面的 HIV-1 gp120 都具有良好的特异性结合活性。**【结论】**单链抗体 *b12-scFv* 可以用于 HIV-1 受体结合位点的表位检测。

[关键词] HIV-1;单链抗体;b12;载体构建;亲和纯化;抗原结合活性

[中图分类号] Q785;Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)05-0205-06

Expression and characterization of soluble single-chain antibody b12-scFv against HIV-1

YANG Xiong, LIU Xiu-xia, NAN Hao, XU Xiao-dong, CHEN Hong-ying

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The objective of this study was to synthesize, clone, express, purify, and characterize the *scFv* gene of antibody b12 against HIV-1 in *Escherichia coli*. **【Method】**The variable regions of the heavy and light chains of broadly neutralization antibody b12 were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The two regions were linked together as scFv-VL-Linker-VH by over-lap PCR and cloned into a prokaryotic expression vector pET28a to construct pET28a-b12-scFv, which was then transformed into *E. coli* BL21 StarTM(DE3) cells for inducible expression by IPTG. The expression products were analyzed by SDS-PAGE and the protein was purified by affinity chromatography using Ni-NTA His Bind Resin. Then its binding activity with HIV-1 gp120 was examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence and flow cytometry (FCM). **【Result】**The soluble single-chain antibody *b12-scFv* (768 bp) was obtained. SDS-PAGE showed that the expression of *b12-scFv* was high with a molecular weight of 29 ku. The *b12-scFv* was mainly soluble with an insoluble part aggregated in inclusion body. The production of purified soluble *b12-scFv* was about 2 mg/L. The *b12-scFv* was shown to have specific and good reactivity with both secreted and membrane anchored HIV-1 gp120. **【Conclusion】**The

[收稿日期] 2013-04-18

[基金项目] 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-09-0652)

[作者简介] 杨 雄(1987—),男,甘肃武山人,在读硕士,主要从事 HIV 广谱中和性抗体的体外表达研究。

E-mail: yangxiong503845@126.com

[通信作者] 陈红英(1970—),女,四川仁寿人,教授,博士生导师,主要从事分子病毒学研究。E-mail: chenhy@nwsuaf.edu.cn

obtained single-chain antibody b12-scFv could be potentially applied in probing the receptor binding site on HIV-1 gp120.

Key words: HIV-1; scFv; b12; vector construction; affinity purification; antigen binding activity

艾滋病(AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(HIV-1)引起的一种病毒性传染病。自1981年发现以来,该病已经肆虐全球,严重危害到人类生命与健康。目前普遍采用联合使用抗逆转录病毒药物来控制AIDS的进程,延长病人的存活时间,但这些药物不能彻底清除感染者体内的病毒,而且治疗费用昂贵,存在不同程度的副作用。加上HIV-1具有变异率高的特点,为了控制病毒突变体的产生和积累,需要换用不同的药物,增加了艾滋病治疗的成本与难度。因此,迫切需要研制一种安全、有效、廉价并能广泛使用的HIV-1疫苗,来预防和控制HIV-1的流行^[1]。一些具有广谱中和性作用的抗体的发现、分离及其相应抗原表位的鉴定,为HIV-1疫苗的研究带来了新的希望。近年来,人们发现了几种广谱中和性抗体,如b12、2F5、4E10、2G12、PG9和PG16,以及最近发现的VRC01、VRC02和VRC03等,能够识别HIV-1病毒包膜蛋白上相对保守的表位,在体外能有效中和HIV-1病毒各亚型的毒株^[2]。这些广谱中和性单抗的发现为研制可诱导中和性抗体产生的疫苗提供了思路^[3]。对这些抗体分子进行深入研究,阐明其识别的HIV-1抗原表位,对于可诱发保护性抗体的抗原表位设计具有重要意义。

b12是第1个被证明具有广谱中和活性的单抗,它的Fab片段来源于噬菌体展示文库^[4],为人源化的单抗,其可识别HIV-1 gp120上与CD4受体分子结合部位部分重叠的高度保守的构象依赖型表位^[5]。b12可以通过伸出的较长的CDRH3(18aa)环结合HIV-1 gp120的CD4识别位点,阻止HIV-1与靶细胞上受体的结合,表现出病毒中和作用,从而抑制HIV-1的感染。b12可以中和约75%的B亚型的HIV-1分离株^[5],是目前已知的在体内和体外均能特异性结合HIV-1 gp120保守区域的广谱中和性抗体^[6]。

单链抗体(Single chain variable fragments, scFv)是一种基因工程抗体,是用一段连接肽将抗体轻链可变区(VL区)和重链可变区(VH区)连接而成的重组蛋白,它保留了亲本抗体的全部抗原结合特异性,连接肽通常使用3次重复的GlyGlyGlyGlySer[(G₄S)₃]。与完整抗体相比,scFv具有分子质

量小、免疫原性低、组织穿透性好、易与靶点结合等优点^[7]。Jiang等^[8]和Mason等^[9]的研究证明,scFv与完整单克隆抗体一样具有中和病毒的能力。

基因从头合成技术已经成熟,该技术是目前快速获得已知基因序列的可靠方法。本研究根据文献^[10]报道的b12抗体的轻链和重链氨基酸序列,依照大肠杆菌密码子偏爱性,将氨基酸序列转换、优化成DNA序列,再设计2对引物Ncob12L-F、G4SLight-R和G4SH-F、XhoH-R,分别扩增其轻链和重链可变区基因,然后用引物Ncob12L-F和XhoH-R通过重叠PCR的方法将二者人为拼接起来,并克隆到原核表达载体上,在大肠杆菌中诱导表达,并用Ni-NTA金属螯合层析柱的方法从大肠杆菌细胞破碎液的上清中纯化获得了可溶性的b12单链抗体,检测其与HIV-1 gp120的结合活性,以期深入研究b12单链抗体与HIV-1抗原分子的相互作用及设计新型有效的HIV-1疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 原核表达载体pET28a、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10、大肠杆菌BL21 StarTM(DE3)来自Novagen公司。Sf9细胞来自Invitrogen公司。b12抗体轻链和重链全基因由上海旭冠生物科技发展有限公司合成。

1.1.2 工具酶及生化试剂 *Pfu*高保真DNA聚合酶、dNTPs、限制性内切酶*Nco*I和*Xho*I,均购自Fermentas公司;T4 DNA连接酶和SDS-PAGE电泳标准蛋白,为Takara公司产品;凝胶回收试剂盒、PCR产物纯化试剂盒和质粒DNA小量抽提试剂盒、ELISA显色试剂盒,均购自生工生物工程(上海)有限公司;Ni-NTA金属螯合层析柱,购自Merck公司;抗组氨酸(His)标签鼠单克隆抗体、HRP和FITC标记的山羊抗鼠IgG,购自康为世纪生物公司;PVDF膜,购自Millipore公司;DNA Marker,购自Biomed公司。

1.2 方法

1.2.1 b12-scFv基因片段的合成 依据b12的轻链及重链基因序列,设计2对引物,交由生工生物工程(上海)有限公司合成。轻链上游引物Ncob12L-

F;5'-TTGT CCATGG AGATCGTGCTGACCCAATC-3',5'端下划线部分为引入的 *Nco* I 酶切位点;下游引物 G4SLight-R;5'-GCTCCCGCCACCTCCAGAGCCTCCGCCACCAGATGGTGC GGCCAC-3'。重链上游引物 G4SH-F;5'-GGAGGTGGCGG-GAGCGGCGGTGGAGGGTCTCAGGTGCAGCTGGTGCAG-3';下游引物 *Xho*H-R;5'-TTGT CTCG AGAGAGGCGCTGCTCACGATCAC-3',5'端下划线部分为引入的 *Xho* I 酶切位点。分别用对应引物从合成的轻链与重链基因上扩增出其可变区基因片段,通过 G4SLight-R 和 G4SH-F 引物在轻链和重链之间引入编码(G₄S)₃ 间隔序列基因(Linker),最后通过重叠 PCR 的方法拼接得到完整的 *b12-scFv* 基因序列。PCR 反应体系为 20 μ L,内含 2 μ L 10 $\times$ Buffer,2 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTP,上、下游引物各 0.2 μ mol/L,模板 DNA 20 ng 和 1 U 的 *Pfu* 高保真 DNA 聚合酶。PCR 扩增轻链和重链可变区的反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,46 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。重叠 PCR 扩增单链抗体全长基因时,延伸时间为 90 s,其他反应条件与可变区片段的扩增条件相同。PCR 产物用试剂盒纯化后,用限制性内切酶 *Nco* I (10 U/ μ L)和 *Xho* I (10 U/ μ L)进行双酶切,酶切体系为 50 μ L,其中 10 $\times$ Buffer R 5 μ L、PCR 产物 25 μ L、*Nco* I 0.5 μ L、*Xho* I 0.5 μ L、双蒸水 19 μ L,混匀后于 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 4 h。取全部酶切产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,按照凝胶回收试剂盒说明书回收目的基因片段,即得 *b12-scFv* 基因,其结构表示为:scFv-VL-Linker-VH。

1.2.2 重组质粒 pETb12-scFv 的构建 用限制性内切酶 *Nco* I (10 U/ μ L)和 *Xho* I (10 U/ μ L)对载体 pET28a 进行双酶切,电泳回收大片段。将 *b12-scFv* 基因片段与载体 pET28a 大片段按照物质的量比约为 3:1 混合,在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。用 1 μ L 的连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,在含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定。将鉴定结果为阳性的菌落接种到含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中过夜培养,按照质粒 DNA 小量抽提试剂盒说明书提取质粒,进行 *Nco* I /*Xho* I 双酶切鉴定,酶切产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,同时对质粒进行测序,测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。将测序结果与设计的 DNA 序列进行比对分析。将获

得的阳性重组质粒命名为 pETb12-scFv。

1.2.3 重组 b12-scFv 蛋白的诱导表达 将重组质粒 pETb12-scFv 转化至大肠杆菌 BL21 StarTM (DE3)原核表达宿主感受态细胞中,将转化产物涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取阳性克隆至含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养过夜。将过夜菌液按体积比 1:50 转接入含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基,扩大培养,37 $^{\circ}$ C、250 r/min 条件下培养至菌液 OD₆₀₀=0.6~1.0 (大约需要 2.5 h),留取部分菌液做未诱导对照,其余菌液加入 IPTG 使其终浓度为 0.5 mmol/L,在室温下诱导 4 h。诱导表达后将菌液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,收集菌体,用 PBS (pH 7.4) 缓冲液悬浮。

用超声破碎仪在冰浴条件下破碎悬浮菌体,超声功率为 30 W,超声时间 5 s,间隔时间 5 s,破碎 10 min。超声破碎后,将裂解的菌液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,分别收集上清液和沉淀(沉淀用 1/6 上清液体积的 PBS 缓冲液重悬),加入 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液,进行 100 g/L SDS-PAGE 电泳,检测蛋白表达及分布情况。

1.2.4 重组 b12-scFv 蛋白的亲和纯化 取 1 mL 固化 Ni-NTA 树脂装入层析柱中,树脂沉降后的体积定义为 1 个柱床体积。用 3 倍柱床体积的无菌水冲洗树脂,再加 3 倍柱床体积的结合缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠,500 mmol/L 氯化钠,pH 7.8)平衡树脂,然后将超声波处理的细胞裂解液上清上柱,依次用 6 倍柱床体积的结合缓冲液、4 倍柱床体积的洗涤缓冲液(20 mmol/L 磷酸钠,500 mmol/L 氯化钠,pH 6.0)分别洗柱,最后用 50,100,200 和 300 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱结合蛋白,分步收集,每个浓度梯度收集约 1.5 mL。将纯化获得的蛋白做梯度稀释后,与已知浓度的蛋白分子质量标准对比估测浓度,计算纯化蛋白的产量。

1.2.5 重组 b12-scFv 蛋白与 HIV-1 gp120 结合活性的 ELISA 检测 真核分泌表达的 HIV-1 gp120 蛋白的制备方法如文献[11]所述。用包被缓冲液(0.05 mol/L Na₂CO₃,0.05 mol/L NaHCO₃,pH 9.6)稀释 HIV-1 gp120 蛋白(稀释度 1:10),将稀释的 HIV-1 gp120 蛋白溶液加入 96 孔酶标板中,每孔 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 包被过夜。TBST(含 1 mL/L Tween-20 的 TBS)洗板 3 次,每次 5 min;每孔加入 100 μ L 含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST,于 37 $^{\circ}$ C 封闭

2 h, TBST 洗板 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 100 μ L 2 倍倍比稀释 (从 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 总共 8 个质量浓度梯度, 初始蛋白质量浓度为 250 μ g/mL) 的待测 b12-scFv, 每个稀释度做 2 个复孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 同时设立不加单链抗体的阴性对照, TBST 洗板 3 次, 每次 5 min。然后加入 100 μ L 抗组氨酸 (His) 标签鼠单克隆抗体 (稀释度 1 : 1 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 再加入 100 μ L HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (稀释度 1 : 2 000), 室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。最后加入 TMB 显色底物, 显色 5 min 后, 加 2 mol/L H₂SO₄ 终止显色, 450 nm 测定吸光值 (OD₄₅₀)。

1.2.6 重组 b12-scFv 蛋白与 HIV-1 gp120 结合活性的荧光显微镜观察和流式细胞仪 (FCM) 检测
细胞表面锚定表达有 HIV-1 gp120 的 Sf9 细胞的获得方法参见文献 [12], 以不表达 HIV-1 gp120 的 Sf9 细胞作为阴性对照。1 000 r/min 离心 15 min 收集细胞, 用重组 b12-scFv 蛋白 (稀释度 1 : 50) 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 然后加入抗组氨酸 (His) 标签鼠单克隆抗体 (稀释度 1 : 200), 室

温孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 再加入 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG (稀释度 1 : 100), 室温孵育 2 h, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 最后加入 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min 后, 1 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀, 用 PBS (pH 7.4) 缓冲液悬浮, 在荧光显微镜下观察。

流式细胞分析使用 CyFlow[®] Cube 6 型流式细胞仪, 激发波长 488 nm, 绿色荧光信号在 FL1 通道检测 (发射波长 530 nm), 收集数据使用 CyView 8.5 软件。每个样品至少使用 4 $\times$ 10⁴ 个细胞收集数据, 离线数据分析用 FCS Express 4 软件。

2 结果与分析

2.1 b12-scFv 基因的合成

PCR 扩增获得的轻链和重链基因片段经琼脂糖凝胶电泳后, 得到约 400 bp 的特异性条带 (图 1-A, B), 片段长度与预期结果相符。重叠 PCR 产物的电泳检测结果发现, PCR 产物有非特异扩增条带和拖尾现象, 但最主要的扩增条带长约 768 bp (图 1-C), 与预期的 b12-scFv 基因全长相符。

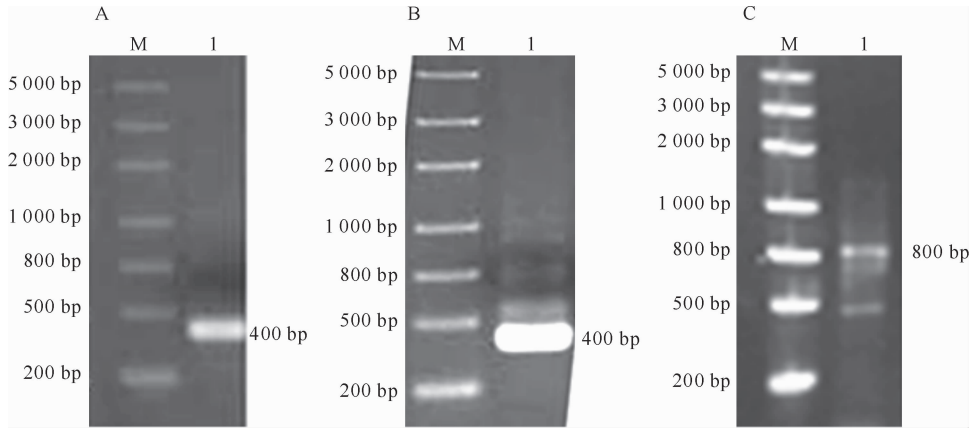


图 1 b12-scFv 基因的 PCR 扩增

A. 轻链可变区基因片段的扩增; B. 重链可变区基因片段的扩增; C. 重叠 PCR 扩增结果;
M. DNA Marker IV; 1. PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification of b12-scFv gene

A. Amplification of the light chain variable region; B. Amplification of the heavy chain variable region;
C. Product of overlapping PCR; M. DNA Marker IV; 1. PCR product

2.2 重组质粒 pETb12-scFv 的鉴定

重组质粒经 Nco I 和 Xho I 双酶切后, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 可检测到除载体片段外, 还有 1 条约 800 bp 的插入片段 (图 2), 长度与预期相符, 表明目的基因已成功插入表达载体中。测序结果证实, pETb12-scFv 的大小、读码框均正确, 表明克隆得到了正确的重组质粒。

2.3 b12-scFv 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

用重组质粒 pETb12-scFv 转化 BL21 StarTM (DE3) 菌, 经 IPTG 诱导表达 4 h 后, 超声破碎, 100 g/L SDS-PAGE 电泳分析, 结果 (图 3) 表明, 破碎全菌、破碎上清液和沉淀均出现 1 条分子质量约为 29 ku 的条带, 其大小与 b12-scFv 蛋白理论值相符, 而未诱导对照则没有该条带, 表明目的蛋白得到了表

达,且表达产物大部分在上清液中,以可溶性蛋白形式存在,也有少部分以包涵体的形式存在。

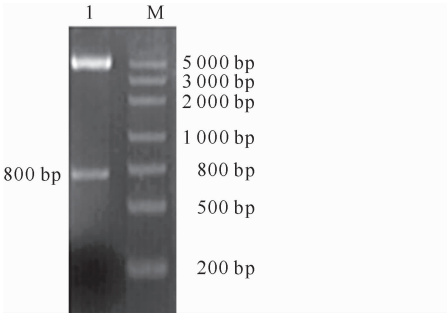


图 2 重组质粒 pETb12-scFv 的 *Nco* I /*Xho* I 双酶切鉴定
M. DNA Marker IV; 1. pETb12-scFv 的 *Nco* I /*Xho* I 双酶切产物

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pETb12-scFv by restriction enzyme digestion
M. DNA Marker IV; 1. pETb12-scFv digested by *Nco* I and *Xho* I

2.4 b12-scFv 蛋白的亲纯化

采用 Ni-NTA 亲和柱纯化上清液中的可溶性蛋白,依次用 50,100, 200 和 300 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱结合蛋白,分步收集,取部分洗脱蛋白样品加入 2×蛋白上样缓冲液,100 g/L SDS-PAGE 电泳分析,结果(图 4)显示,大量目的蛋白存在于 200 和 300 mmol/L 咪唑洗脱组分中。将这 2 个洗脱组分合并,从 300 mL 培养液菌体中纯化获得了总体积为 3 mL 的 b12-scFv 蛋白;取纯化蛋白小样进行梯度稀释,与已知浓度的蛋白标准对比,估测其质量浓度约为 0.2 mg/mL。通过计算得出纯化蛋白的产量约为 2 mg/L。

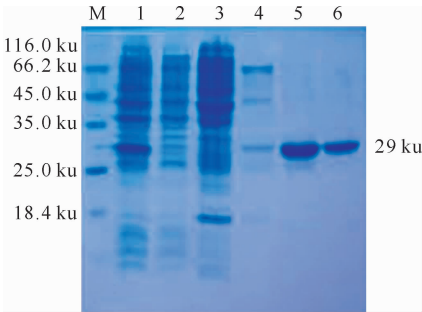


图 4 单链抗体 b12-scFv 表达产物的纯化
M. Protein Marker; 1. 诱导的裂解上清液; 2. 过柱流穿液; 3~6. 分别为用 50,100,200 和 300 mmol/L 咪唑洗脱组分

Fig. 4 Purification of b12-scFv protein
M. Protein Marker; 1. Induced protein in the supernatant; 2. Flow through fraction; 3~6. Elute with 50,100,200 and 300 mmol/L imidazole, respectively

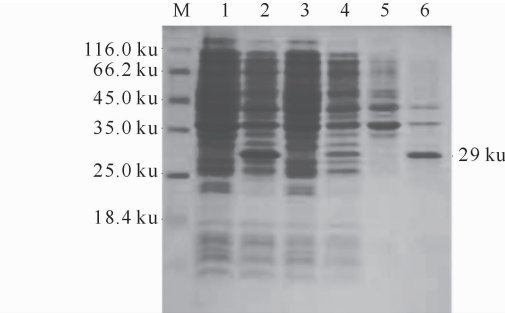


图 3 重组 b12-scFv 蛋白在大肠杆菌中的表达
M. Protein Marker; 1. 未诱导的全菌裂解液; 2. 诱导的全菌裂解液; 3. 未诱导的裂解上清液; 4. 诱导的裂解上清液; 5. 未诱导表达产物的沉淀; 6. 诱导表达产物的沉淀

Fig. 3 Expression of b12-scFv in *E. coli*
M. Protein Marker; 1. Non-induced whole cell lysate; 2. Induced whole cell lysate; 3. Non-induced protein in the supernatant; 4. Induced protein in the supernatant; 5. Non-induced protein in the pellet; 6. Induced protein in the pellet

2.5 b12-scFv 与 HIV-1 gp120 结合活性的 ELISA 检测

ELISA 检测结果(图 5)表明,当 b12-scFv 的稀释度达到 1/64,即蛋白质量浓度约为 4 μg/mL 时,其 OD₄₅₀ 数值仍为阴性对照的 2.1 倍以上,可以认为其为阳性,表明 b12-scFv 与 HIV-1 gp120 具有较强的结合活性。

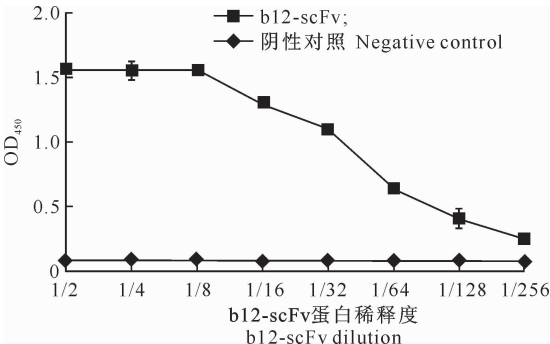


图 5 b12-scFv 与 HIV-1 gp120 结合活性的 ELISA 检测
Fig. 5 Reaction of b12-scFv with HIV-1 gp120 by ELISA

2.6 b12-scFv 与 HIV-1 gp120 蛋白结合活性的荧光观察及流式细胞仪检测

在荧光显微镜下可观察到,表达 HIV-1 gp120 的细胞表面发绿色荧光(图 6-A,B)。FCM 检测结果显示,表达 HIV-1 gp120 的细胞荧光强度明显高于不表达 HIV-1 gp120 的对照细胞(图 6-C),说明 b12-scFv 可以特异性地识别细胞膜表面的 HIV-1 gp120。

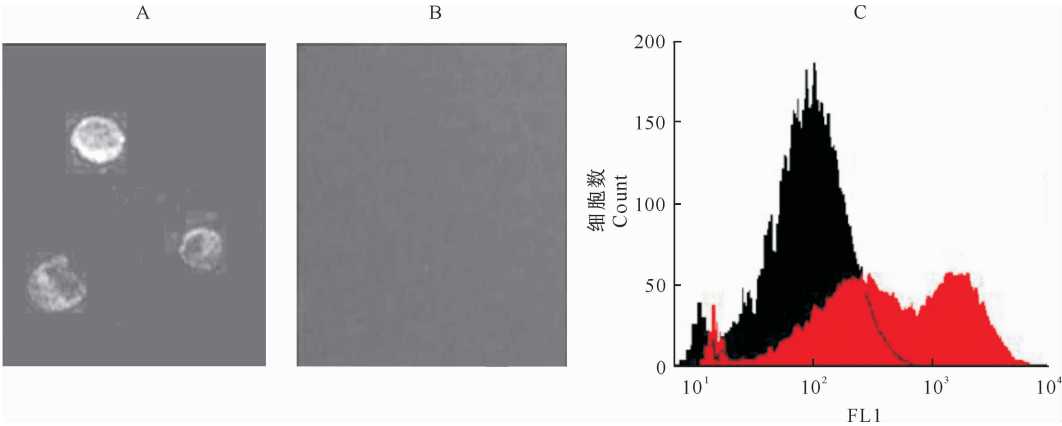


图 6 b12-scFv 与细胞膜表面表达的 HIV-1 gp120 蛋白结合活性的检测

A. 表达 HIV-1 gp120 蛋白的 Sf9 细胞的免疫荧光检测结果;B. 未表达 HIV-1 gp120 蛋白的阴性对照细胞的免疫荧光检测结果;
C. 流式细胞仪分析结果,黑色的峰代表没有表达 HIV-1 gp120 的对照细胞,灰色的峰代表表达有 HIV-1 gp120 的细胞

Fig. 6 Binding of b12-scFv to membrane anchored HIV-1 gp120

A. Immuno-fluorescence analysis of Sf9 cells with HIV-1 gp120 expression;B. Immuno-fluorescence analysis of Sf9 cells without HIV-1 gp120;C. Flow cytometry analysis of Sf9 cells,peak in black means control cells without HIV-1 gp120;peak in grey means cells with HIV-1 gp120 expression

3 讨 论

用原核表达系统表达蛋白具有成本低、表达效率高等特点^[12],scFv 一般都采用原核表达系统获得。尽管大肠杆菌不能进行糖基化修饰,但这对 scFv 的表达没有影响,因为 scFv 没有抗体稳定区,不需要糖基化来获得生物学活性。但是由于 scFv 是将抗体轻链和重链可变区人为拼接获得的重组蛋白,在高效的原核表达系统中往往以不溶性的包涵体形式存在,需要在变性剂存在的条件下溶解、纯化,然后经复性才能得到可溶性的具有抗原结合能力的单链抗体蛋白,而经过变性、复性过程获得的单链抗体一般产量较低,活性也会受到影响。已有的文献报道,b12 的 scFv 也是从包涵体中经溶解、纯化和复性获得的^[13]。本研究采用化学合成的方法获得了 b12 抗体重链和轻链的基因序列,用重叠 PCR 的方法拼接得到了 *b12-scFv* 基因,利用原核表达系统,在室温和 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 的条件下,诱导表达的 b12-scFv 主要以可溶性蛋白的形式存在,从 1 L 培养液中能纯化获得大约 2 mg 可溶性蛋白。纯化的蛋白具有良好的 HIV-1 gp120 结合活性。降低诱导温度与 IPTG 的浓度,延长表达时间,可能有助于增加可溶性蛋白的产量,最佳的表达条件有待于进一步研究。

本研究中报道的 b12 单链抗体可溶性较好,表达量较高,纯化过程简单,抗原结合能力好。用基因工程的方法在体外大量制备该抗体,可用于艾滋病

的被动免疫防治^[14];在基于包膜蛋白的 HIV-1 重组疫苗的设计中,可用于 b12 抗原表位的检测,在 HIV-1 的被动免疫治疗和免疫原检测中具有一定的应用前景。

[参考文献]

[1] Fauci A S. 25 years of HIV [J]. Nature,2008,453(7193):289-290.
[2] D’Souza M P,Livnat D,Bradac J A,et al. Evaluation of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by neutralization assay;Performance criteria for selecting candidate antibodies for clinical trials [J]. J Infect Dis,1997,175(5):1056-1062.
[3] 曹志亮,何玉先. HIV-1 中和抗体和基于抗体的疫苗设计 [J]. 中国生物工程杂志,2010,30(12):105-110.
Cao Z L,He Y X. Neutralizing antibodies and antibody-based HIV-1 vaccine design [J]. China Biotechnology,2010,30(12): 105-110. (in Chinese)
[4] Burton D R,Barbas C F,Persson M A,et al. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus form combinatoriallibraries of asymptomatic seropositive individuals [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1991,88(22): 10134-10137.
[5] Burton D R,Pyati J,Koduri R,et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody [J]. Science,1994,266(5187):1024-1027.
[6] Saphire E O,Parren P W,Pantophlet R,et al. Crystal structure of a neutralizing human IgG against HIV-1: A template for vaccine design [J]. Science,2001,293(5532):1155-1159.

- lex quinquefasciatus* and possible mechanisms for resistance [J]. Pest Management Science, 2005, 61(11): 1096-1102.
- [8] 宋深伟, 刘永香, 肖平阔, 等. 昆虫抗药性遗传的研究进展 [J]. 农药研究与应用, 2007, 11(5): 17-19.
Song S W, Liu Y X, Xiao P K, et al. Insect resistance genetic research progress [J]. Agrochemicals Research & Application, 2007, 11(5): 17-19. (in Chinese)
- [9] Denholm I, Devine G J, Williamson M S. Insecticide resistance on the move [J]. Science, 2002, 297(5590): 2222-2223.
- [10] Liu N N, Liu H Q, Zhu F, et al. Differential expression of genes in pyrethroid resistant and susceptible mosquitoes, *Culex quinquefasciatus* [J]. Gene, 2007, 39(4): 61-68.
- [11] Liu H Q, Liu N N, Zhang L, et al. Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus* [J]. Med Entomol, 2004, 41(5): 946-952.
- [12] 刑剑飞, 刘 艳, 颜冬云. 昆虫对拟除虫菊酯的抗性研究进展 [J]. 环境科学与技术, 2010, 33(10): 68-74.
Xing J F, Liu Y, Yan D Y. Progress on insect resistance to pyrethroid insecticides [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 33(10): 68-74. (in Chinese)
- [13] 滕 达, 李秀兰, 公茂庆, 等. 淡色库蚊抗溴氰菊酯品系 CYP4 家族新成员基因克隆及序列分析 [J]. 中国寄生虫病防治杂志, 2004, 17(2): 65-67.
Teng D, Li X L, Gong M Q, et al. *Culex pipiens* deltamethrin resistance strain CYP4 family new member gene cloning and sequence analysis [J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Parasitic Diseases, 2004, 17(2): 65-67. (in Chinese)
- [14] 郭 丽, 沈孝兵. 病媒昆虫抗药性产生的分子机制 [J]. 中国媒介生物学及控制, 2005(16): 232-234.
Guo L, Shen X B. Disease medium insect resistance produce molecular mechanism [J]. Chinese Media Biology and Control, 2005(16): 232-234. (in Chinese)
- [15] Hu X B, Sun Y, Wang W J, et al. Cloning and characterization of NYD-OP7, a novel deltamethrin resistance associated gene from *Culex pipiens pallens* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, 88: 82-91.
- [16] 翁景然, 张 宏, 耿美英. 真核基因起始与终止密码子旁侧序列特征分析 [J]. 生物信息学, 2004(4): 10-14.
Weng J R, Zhang H, Geng M Y. Characteristic analysis of flanking sequence of start codon and stop codon in eukaryotic genes [J]. China Journal of Bioinformatics, 2004(4): 10-14. (in Chinese)
- [17] Rosenbaum D M, Rasmussen S G, Kobilka B K. The structure and function of G-protein-coupled receptors [J]. Nature, 2009, 459: 356-363.
- [18] 林元震, 张志毅, 林善枝, 等. 运用基因组和 EST 数据库进行电子克隆分离杨树功能基因的策略 [J]. 分子植物育种, 2007, 5(4): 583-587.
Lin Y Z, Zhang Z Y, Lin S Z, et al. Strategies for in silico cloning populus functional genes based on populus genome sequence and EST database [J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(4): 583-587. (in Chinese)
- [19] Oldham W M, Hamm H E. Heterotrimeric G-protein activation by G-protein-coupled receptors [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2008, 9: 60-71.
- [20] Gong Z J, Zhou W W, Yu H Z, et al. Cloning expression and functional analysis of a general odorant-binding protein 2 gene of the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) [J]. Insect Molecular Biology, 2009, 18(3): 405-417.

(上接第 210 页)

- [7] Blazek D, Celer V. The production and application of single-chain antibody fragments [J]. Folia Microbiol, 2003, 48(5): 687-698.
- [8] Jiang W, Bonnert T P, Venugopal K, et al. A single-chain antibody fragment expressed in bacteria neutralized tick-borne flaviviruses [J]. Virol, 1994, 200(1): 21-28.
- [9] Mason P, Berinstein A, Baxt B, et al. Cloning and expressing of a single chain antibody fragment specific for foot-and-mouth disease virus [J]. Virol, 1996, 224(2): 548-554.
- [10] Zhou T Q, Xu L, Barna D, et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120 [J]. Nature, 2007, 445(7129): 732-737.
- [11] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli* [J]. Postepy Biochem, 2006, 52(4): 448-456.
- [12] Chen H Y, Xu X D, Bishop A, et al. Reintroduction of the 2G12 epitope in an HIV-1 clade C gp120 [J]. AIDS, 2005, 19(8): 833-835.
- [13] Klein J S, Gnanapragasam P N, Galimidi R P, et al. Examination of the contributions of size and avidity to the neutralization mechanisms of the anti-HIV antibodies b12 and 4E10 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(18): 7385-7390.
- [14] West A P J, Galimidi R P, Gnanapragasam P N, et al. Single-chain Fv-based anti-HIV proteins: Potential and limitations [J]. J Virol, 2012, 86(1): 195-202.