

网络出版时间:2012-12-21 17:31

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20121221.1731.033.html>

HIV VRC01 单链抗体的构建、原核表达及纯化

王瑞琴, 杨 雄, 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、克隆 HIV 单克隆抗体 VRC01 的单链抗体基因, 在大肠杆菌中诱导表达并进行纯化。**【方法】**根据 GenBank 上公布的 VRC01 抗体可变区的氨基酸序列合成引物, 运用基因从头合成和重叠延伸 PCR 方法, 克隆抗体 VRC01 的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)基因; 用 15 肽 Linker (Gly4Ser)₃ 将 VH 和 VL 基因相连, 得到单链抗体基因 *scFv-VH-Linker-VL* 和 *scFv-VL-Linker-VH*, 并分别将两者克隆到原核表达载体 pET28a 中, 构建重组质粒后转入大肠杆菌 BL21 (DE3+) 中诱导表达, 对表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析; 将重组蛋白进行变性处理后, 利用 Ni-NTA 金属螯合层析柱对表达产物进行初步纯化。**【结果】**得到了 VRC01 的 2 种单链抗体的基因 *scFv-VH-Linker-VL* 和 *scFv-VL-Linker-VH*, 其大小分别为 770 和 768 bp。SDS-PAGE 电泳结果显示, *scFv-VH-Linker-VL* 在大肠杆菌中不表达或表达量极低; 而 *scFv-VL-Linker-VH* 表达量较高, 蛋白质分子质量约为 29 ku, 且主要以包涵体形式存在。Western blot 检测结果证实, *scFv-VL-Linker-VH* 可与 His-Tag 融合表达, 并通过亲和层析法成功纯化获得了该单链抗体。**【结论】**成功构建、表达并纯化出了 VRC01 单链抗体, 为进一步研究 VRC01 单链抗体的生物学特性奠定了基础。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒(HIV); 单链抗体; VRC01; 重叠 PCR; 原核表达; 纯化

【中图分类号】 Q786

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)01-0177-06

Cloning, prokaryotic expression and purification of single-chain variable fragment(scFv) of antibody VRC01 against HIV-1

WANG Rui-qin, YANG Xiong, 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, and purify the scFv gene of antibody VRC01 to HIV-1 in *E. coli*. **【Method】** The primers were synthesized according to the amino acid sequences of the variable regions of antibody VRC01 in GenBank. The DNA coding for the variable regions of antibody VRC01 was obtained by *de novo* gene synthesis using overlap PCR. To construct scFv-VH-Linker-VL and scFv-VL-Linker-VH, the VH and VL were linked with (Gly4Ser)₃ linker by gene splicing using overlap PCR. The two constructed scFvs were cloned into pET28a and transformed into *E. coli* strain BL21(DE3+) for inducible expression. The expression products were analyzed by SDS-PAGE and Western blot and scFv was purified from the inclusion bodies by Ni-NTA chromatography. **【Result】** The DNA constructs of *scFv-VH-Linker-VL* (770 bp) and *scFv-VL-Linker-VH* (768 bp) were obtained. The expression of *scFv-VH-Linker-VL* was not detectable using SDS-PAGE, whereas expression of *scFv-VL-Lin-*

【收稿日期】 2012-04-28

【基金项目】 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-09-0652); 西北农林科技大学人才专项

【作者简介】 王瑞琴(1987—), 女, 甘肃景泰人, 在读硕士, 主要从事 HIV 中和性抗体基因克隆和体外表达研究。
E-mail: WRQABC965@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

ker-VH was high in the form of inclusion body, with a molecular weight of 29 ku. Western blot result showed that scFv-VL-Linker-VH was purified successfully. 【Conclusion】 The scFv VRC01 was constructed, expressed and purified successfully, and it benefited further studies on the biological function of scFv VRC01.

Key words: HIV; single-chain variable fragment of an antibody; VRC01; overlap PCR; prokaryotic expression; purification

艾滋病 (Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 是由人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 感染引起的疾病, 是危害人类健康最严重的病毒性疾病之一。艾滋病被发现至今的 31 年里, 尽管人们还没有研制出有效的疫苗来防治此病, 但是已经发现了几种具有广谱中和性的单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAb), 如 b12^[1]、2G12^[2]、2F5^[3] 和 4E10^[4] 等。2010 年, Wu 等^[5] 和 Zhou 等^[6] 利用人工设计构建的 HIV 主要抗原, 从艾滋病病毒感染者的大量血细胞中发现了一种新的 HIV 单克隆抗体 VRC01, 它可结合于 HIV 包膜蛋白 gp120 的 CD4 结合位点上, 该位点是受体结合的保守位点, 在不同的病毒株中均无变化, 所以 VRC01 能抑制全球流行的约 90% 艾滋病毒株, 具有广谱、强效中和 HIV 的活性。单独或联合使用这些单克隆抗体, 能有效阻断病毒的感染^[7]。制备 HIV 单克隆抗体并将其用于诊断和治疗, 对预防和控制 AIDS 具有十分重要的意义, 其中单链抗体 (Single-chain variable fragment of an antibody, scFv) 作为新兴抗体已经成为该研究领域的热点。

scFv 是一种基因工程抗体, 是用一段连接肽 (Linker) 将抗体重链可变区 (VH) 与轻链可变区 (VL) 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。与完整抗体相比, scFv 具有很多优点, 如分子量小、免疫原性低、组织穿透性好、易于基因工程操作等^[8]。Jiang 等^[9] 和 Mason 等^[10] 研究证明, scFv 与完整单克隆抗体一样具有中和病毒的活性; Jiang 等^[11] 证实, scFv 具有基因治疗功能; Yokata 等^[12] 指出, scFv 对治疗肿瘤很有帮助。

本研究根据 GenBank 中公布的 VRC01 抗体可变区的氨基酸序列设计引物, 合成、克隆了 VRC01 抗体 VH 和 VL 基因, 在大肠杆菌中表达并初步纯化, 获得了 VRC01 单链抗体, 以期深入研究 VRC01 单链抗体与 HIV 抗原分子的相互作用, 以及设计新型有效的 HIV 疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体与感受态细胞 质粒 pET28a、大肠杆菌 Top10 (*Escherichia coli* Top10)、大肠杆菌 BL21(DE3+) (*E. coli* BL21), 皆为西北农林科技大学生命科学院分子病毒学实验室所保存。

1.1.2 工具酶与主要试剂 Pfu 高保真 DNA 聚合酶、dNTPs、限制性内切酶 *Esp*3 I、*Nco* I 和 *Xho* I, 均购自 Fermentas 公司; T4 DNA 连接酶, 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, 均购自生工生物工程(上海)有限公司; eCL Western Blot Kit 高灵敏度化学发光检测试剂盒 (ECL), 购自康为世纪公司 (CW-BIO); 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 标记的山羊抗鼠 IgG (Goat Anti-Mouse IgG, HRP), 购自康为世纪生物公司; PVDF 膜, 购自 Millipore 公司; DNA Marker, 购自 Biomed 公司; SDS-PAGE 电泳低分子量标准蛋白, 为 Takara 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上发布的抗体 VRC01 可变区的氨基酸序列 (VL ID 为 294875849, VH ID 为 94875839), 考虑到大肠杆菌密码子偏爱性, 将氨基酸序列翻译、优化成基因序列。参考 Lei 等^[13] 和 Niu 等^[14] 的方法设计引物 (序列见表 1), 引物覆盖了 VH 和 VL 全序列, 其中引物 LF1~LF5 用于克隆 VL 基因, 引物 HF1~HF5 用于克隆 VH 基因。引物 *Nco*LF 含有 *Nco* I 酶切位点 (表 1 划线处), 引物 *Esp*3 I HF 含有 *Esp*3 I 酶切位点 (表 1 划线处), 引物 *Xho*LR 和 *Xho*HR 皆含有 *Xho* I 酶切位点 (表 1 划线处), 引物 G4SLR、G4SHF、G4SHR、G4SLF 含有连接肽 (Linker) 序列, 可将 VH、VL 以不同顺序连接起来以构建 scFv。连接肽采用的是应用最广泛的 15 肽 Linker (Gly4Ser)3。引物均由生工生物工程(上海)有限公

司合成。因的合成方法与此相似,不同之处在于连接 *VH* 与 *VL* 时采用的是 *Nco*LF 和 *G4*SLR、*G4*SHF 和 *Xho*-HR 2 对引物。

单链抗体 *scFv-VH-Linker-VL* 基因的合成方法如图 1 所示。单链抗体 *scFv-VL-Linker-VH* 基

表 1 本研究所用引物的名称和序列

Table 1 Names and sequences of primers in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
LF1	GAAATCGTATTGACGCAAAGTCCTGGAACCTCTATCCCTCTCCCCAG
LR1	TGGCTCGTGCGACACGAGATGATGCGGGTCTCACCTGGGGAGAG
LF2	GCACGAGCCAGTACGGTTTCGTTGGCTTGGTACCAGCAGCGAC
LR2	AGAGTAGATGACCAGTCTAGGGGCTTGTCAGGTCGCTGCTG
LF3	CATCTACTCTGGAAGTACGCGCGCGGGGTATTCCCGACCGGTTTTTC
LR3	TCAAGTTGTAGTCCGGTCCCCATCTTGACCCGAAAAACCGGTC
LF4	TACAACTTGACCATTTCTAATCTCGAAAAGTGGTGATTTTGGAG
LR4	CTTGACCGAAGAATTTCGTACTGCTGGCAGTAATAAACTCCAAAATC
LF5	TTCTTCGGTCAAGGCACCAAGGTCCAGGTGGACATTAAGCGTACGGTGG
HF1	TGCAGCTGGTGCAGTCAGGAGGCCAGATGAAGAAACCAGGTGAATCC
HR1	CGATGAATTTCATAGCCGCTAGCGCGACAAGATATCCTCATGGATTACCTG
HF2	TGAATTCATCGACTGTACCCTGAATTGGATCAGACTGGCGCCTGAAAAACG
HR2	CTCCACCACGCGGTTTGAGCCAGCCCATCCACTCAGGGCGTTTTCCAG
HF3	CGTGGTGGAGCAGTCAACTACGCAAGACCGCTGCAAGGACGCGTAAC
HR3	CCAAGAAAAGCTGTATCAGAATACACGTCACGCGTCATAGTTACGCGTC
HF4	GCTTTCTTGGAATTGCGATCTCTTACTGTAGATGATACGGCTGTTTAC
HR4	CGAAGTCCAGTTGTAATCGCAATTCTTGCCCTGGTACAAAAGTAAACAGCC
HF5	TGGGACTTCGAGCACTGGGGCCGGGGCACACCTGTGATCGTGAGCAGCCCCTC
Esp3 I HF	TTGTCTCGTCTCCCATGCAGGTGCAGCTGGTGCAG
G4SHR	GCTCCCGCCACCTCCAGAGCCTCCGCCACCAGAGGCGCTGCTCACGATC
G4SLF	GGAGGTGGCGGGAGCGGCGGTGGAGGGTCTGAAATCGTATTGACGCAAAG
XhoLR	TTGTCTCGAGAGATGGTGCGGCCAC
NcoLF	TTGTCCATGGAAAATCGTATTGACGCAAAG
G4SLR	GCTCCCGCCACCTCCAGAGCCTCCGCCACCAGATGGTGCGGCCAC
G4SHF	GGAGGTGGCGGGAGCGGCGGTGGAGGGTCTCAGGTGCAGCTGGTGCAG
XhoHR	TTGTCTCGAGAGAGGCGCTGCTCACGATCAC

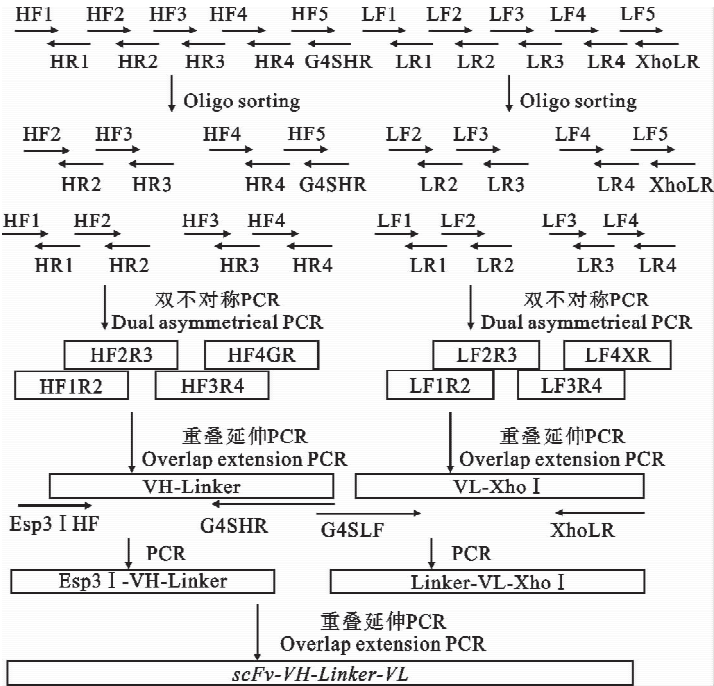


图 1 HIV VRC01 单链抗体 *scFv-VH-Linker-VL* 基因合成方法的示意图
Fig. 1 Schematic diagram of the *scFv-VH-Linker-VL* gene synthesis method

1.2.2 原核表达质粒的构建、酶切鉴定及测序

(1)单链抗体 *scFv-VH-Linker-VL* 基因原核表达质粒的构建。用限制性内切酶 *Esp3* I (10 U/ μ L)、*Xho* I (10 U/ μ L),分别对质粒 pET28a 和单链抗体基因 PCR 产物 *scFv-VH-Linker-VL* 进行同步双酶切,酶切体系为:10 $\times$ Buffer Tango 10 μ L,质粒 pET28a 或 PCR 产物 40 μ L,*Esp3* I 1 μ L,*Xho* I 1 μ L、双蒸水 48 μ L,混匀后于 37 $^{\circ}$ C 水浴酶切 4 h。取酶切产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,按照胶回收试剂盒说明书切胶回收目的片段。将酶切回收的目的基因与表达载体按照不同的物质的量比(1:3~1:10)混和,用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。用 2 μ L 连接产物转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,在含有 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆菌落进行菌落 PCR 鉴定,将鉴定为阳性的菌落接种到含有 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中培养,提取质粒,送生工生物工程(上海)有限公司测序。将获得的阳性重组质粒命名为 pET28a-*scFv-VH-Linker-VL*。

(2)单链抗体 *scFv-VL-Linker-VH* 基因原核表达质粒的构建。用限制性内切酶 *Nco* I (10 U/ μ L)、*Xho* I (10 U/ μ L),分别对质粒 pET28a 和单链抗体基因 PCR 产物 *scFv-VL-Linker-VH* 进行同步双酶切,具体操作方法同 1.2.2(1)。将获得的阳性重组质粒命名为 pET28a-*scFv-VL-Linker-VH*。

1.2.3 单链抗体基因在大肠杆菌 BL21(DE3+)中的诱导表达 将构建好的表达载体 pET28a-*scFv-VH-Linker-VL* 和 pET28a-*scFv-VL-Linker-VH*,分别转化至大肠杆菌 BL21(DE3+)原核表达宿主感受态菌中,转化产物分别涂布于含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。分别挑取阳性克隆接种至含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6,加 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 诱导表达 3 h。以不加 IPTG 诱导的培养物为阴性对照。

1.2.4 原核表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 将菌液于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min,收集菌体。菌体用 PBS (pH 7.4)悬浮后,以超声破碎仪破碎。破菌条件为:功率 200 W,超声时间 5 s,间隔时间 5 s,超声次数 3 次,循环 6~7 次。超声破碎后,4 000 r/min 离心 30 min,分别收集上清液和沉淀,加入 2 $\times$ 蛋白上样缓冲液,用体积分数 12% SDS-PAGE 电泳检测。用半干转印法将蛋白质转移至 PVDF 膜上。在含质量分数 5%脱脂奶粉

的 TBST 溶液中封闭,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。再以抗组氨酸 (His)标签鼠单克隆抗体为一抗(稀释度 1:10 000),室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。再以 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(稀释度 1:5 000)为二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。最后用 ECL 显色 5 min,用化学发光仪照相检测。

1.2.5 重组蛋白的纯化与复性 用 8 mol/L 尿素变性包涵体,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min 后收取上清液。将变性溶解的蛋白质液经 Ni-NTA 金属螯合层析柱纯化,分别用 50,100,500 mmol/L 咪唑缓冲液进行洗脱,收集洗脱液,用体积分数 12% SDS-PAGE 电泳检测。将 500 mmol/L 咪唑洗脱的产物在 PBS 溶液中透析去除变性剂,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min 去除沉淀中的蛋白质,收集上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 *scFv-VH-Linker-VL* 和 *scFv-VL-Linker-VH* 基因的 PCR 扩增结果

将 *scFv-VH-Linker-VL* 和 *scFv-VL-Linker-VH* 基因的 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,分别得到 770 和 768 bp 的特异性条带(图 2),片段长度与预期结果相吻合。

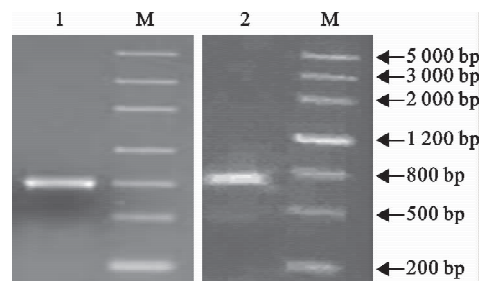


图 2 *scFv-VH-Linker-VL* 和 *scFv-VL-Linker-VH* 基因的 PCR 扩增结果

M. DNA Marker;1. *scFv-VH-Linker-VL* 基因的 PCR 扩增产物;
2. *scFv-VL-Linker-VH* 基因的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR products of *scFv-VH-Linker-VL* and *scFv-VL-Linker-VH* gene

M. DNA Marker;1. PCR product of *scFv-VH-Linker-VL* gene;
2. PCR product of *scFv-VL-Linker-VH* gene

2.2 重组质粒 pET28a-*scFv-VH-Linker-VL* 和 pET28a-*scFv-VL-Linker-VH* 的双酶切鉴定 重组质粒 pET28a-*scFv-VL-Linker-VH* 经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切后,结果(图 3)显示,在接近 800 bp 处有明亮条带出现,与预期一致,表明目的基因已成功插入载体中;pET28a-*scFv-VH-Linker-*

VL 在外源基因插入后 *Nco* I 位点丢失,从菌落 PCR 筛选出的阳性克隆中提取质粒后,直接进行测序鉴定。测序结果证实,*scFv-VH-Linker-VL* 和 *scFv-VL-Linker-VH* 基因的位置、大小和读码框均正确。

2.3 原核表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

2.3.1 SDS-PAGE 检测 导入了 pET28a-*scFv-VL-Linker-VH* 的 *E. coli* BL21 (DE3+) 重组菌经

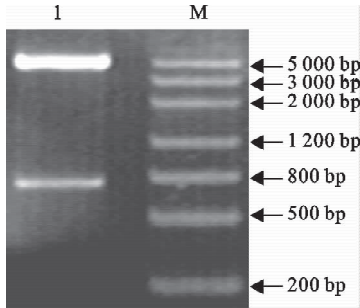


图 3 重组质粒 pET28a-*scFv-VL-Linker-VH* 的 *Nco* I / *Xho* I 双酶切鉴定结果

M. DNA Marker;1. pET28a-*scFv-VL-Linker-VH* 的 *Nco* I / *Xho* I 双酶切产物

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET28a-*scFv-VL-Linker-VH* by restriction enzyme digestion

M. DNA Marker;1. pET28a-*scFv-VL-Linker-VH* digested by *Nco* I and *Xho* I

2.3.2 Western blot 检测 Western blot 免疫印迹分析结果(图 5)显示,*scFv-VL-Linker-VH* 融合蛋白可与抗组氨酸 (His) 标签的鼠单克隆抗体特异性结合,在约 29 ku 处出现了特异性反应条带,说明 *scFv-VL-Linker-VH* 基因与 His-Tag 融合表达,与预期结果相符。

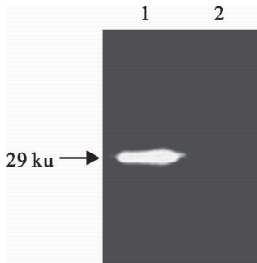


图 5 *scFv-VL-Linker-VH* 表达产物的 Western blot 检测结果

1. IPTG 诱导表达产物;2. 未诱导(对照)

Fig. 5 Western blot analysis of the expression of *scFv-VL-Linker-VH*

1. Induced protein;2. Non-induced control

2.4 重组蛋白的纯化与复性

尿素溶解的包涵体蛋白先经 Ni-NTA 金属螯

IPTG 诱导 3 h 后,将菌体超声破碎后,进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果(图 4)显示,与未诱导菌相比,产物中出现了 1 条分子质量约 29 ku 的诱导表达条带,并主要出现在沉淀中。说明单链抗体基因 *scFv-VL-Linker-VH* 获得了特异性表达,并主要以包涵体形式存在。在单链抗体 *scFv-VH-Linker-VL* 中未检测到相应的表达产物,可能是由于其表达量太低所致。

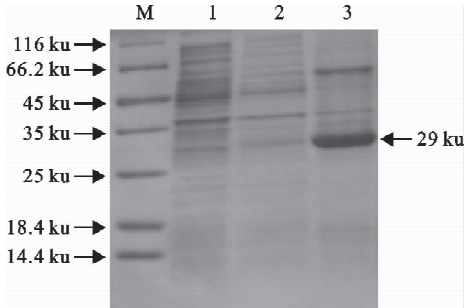


图 4 重组蛋白 *scFv-VL-Linker-VH* 的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 低分子量蛋白 Marker;1. 阴性对照;
2. IPTG 诱导表达产物的上清液;
3. IPTG 诱导表达产物的沉淀

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of *scFv-VL-Linker-VH* protein

M. Low molecular protein Marker;1. Non-induced protein in the supernatant;2. Induced protein in the supernatant;
3. Induced protein in the precipitant

合层析柱纯化后,再用 50~500 mmol/L 咪唑洗脱可从层析柱上解离下来,从而得到了初步纯化的蛋白质(图 6)。将 500 mmol/L 咪唑洗脱下来的产物在 PBS 溶液中透析后,在上清液中检测到了复性的 *scFv-VL-Linker-VH* 蛋白(图 6)。

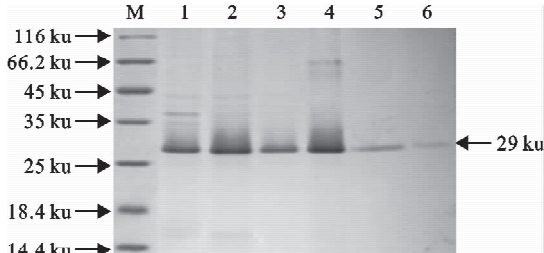


图 6 *scFv-VL-Linker-VH* 的纯化

M. 低分子量蛋白 Marker;1. 包涵体蛋白;
2. 8 mol/L 尿素溶解包涵体;3. 50 mmol/L 咪唑洗脱产物;
4. 100 mmol/L 咪唑洗脱产物;5. 500 mmol/L 咪唑洗脱产物;
6. PBS 溶液中复性的蛋白

Fig. 6 Purification of *scFv-VL-Linker-VH*

M. Low molecular protein Marker;1. Proteins in the inclusion body;
2. Proteins dissolved in 8 mol/L urea;3. Elute with 50 mmol/L imidazole;4. Elute with 100 mmol/L imidazole;5. Elute with 500 mmol/L imidazole;6. Protein refolded in PBS

3 讨 论

由于 HIV 具有变异快,尤其膜蛋白 Env 在宿主免疫系统压力下变异更快,亚型多、与宿主细胞基因组整合造成持续感染等特点,HIV 疫苗的研究遇到了极大的困难和挑战^[15]。研究发现,HIV 中和性抗体对预防和控制 HIV 感染确实有一定的作用^[16]。但完整的单克隆抗体存在分子量大、穿透力弱等缺点,使得小分子抗体的研究备受青睐。一些 HIV 单链抗体的构建及其活性研究为 HIV 疫苗的研究带来了新的希望^[17]。

Luo 等^[18]和 Kurucz 等^[19]研究表明,单链抗体中 VL 与 VH 的连接方式对其表达量和活性有重要影响,其中 VL-Linker-VH 连接方式的表达量高,但抗体活性较低;VH-Linker-VL 连接方式的表达量与 VL-Linker-VH 相比较低,但该连接方式减少了对抗原结合位点的干扰,从而提高了抗体活性^[20]。本研究中,VL-Linker-VH 连接方式得到了高效表达,未检测到 VH-Linker-VL 的表达产物,这也进一步证实了前人的研究结果。

连接肽的选择在 scFv 构建中非常重要^[21],它承担着使 VL 和 VH 进行自由折叠以及稳定 VL 与 VH 之间构象的双重作用^[22]。15 肽 Linker (Gly4Ser)₃ 目前应用最广泛,它是 Huston 等^[23]依据 X 射线晶体衍射分析及计算机辅助分析结果设计的,其由 4 个甘氨酸(Gly)和 1 个丝氨酸(Ser)重复 3 次而成,其中 Gly 是分子量最小且侧链最短的氨基酸,可增加侧链的柔性;Ser 是亲水性最强的氨基酸,可增加 Linker 的亲水性。(Gly4Ser)₃ 使 scFv 既保持了抗原结合区域的完整性,又不易发生解离,因此本研究选择 (Gly4Ser)₃ 作为连接肽序列,成功获得了 VL-Linker-VH 的表达产物,经 PBS 溶液中透析后获得了复性的蛋白,但其抗原结合活性尚待检测。

4 结 论

本研究运用基因从头合成和重叠延伸 PCR 方法,得到 HIV 单克隆抗体 VRC01 的 2 种单链抗体基因 *scFv-VH-Linker-VL* 和 *scFv-VL-Linker-VH*,其大小分别为 770 和 768 bp。成功构建了表达载体 pET28a-scFv-VH-Linker-VL 和 pET28a-scFv-VL-Linker-VH,将其在大肠杆菌诱导表达后,前者没有检测到表达带,推测原因可能是表达量太低所致;后者成功表达,SDS-PAGE 检测结果显示,其分子质

量约为 29 ku,并主要以包涵体形式存在。Western blot 检测结果显示,scFv-VL-Linker-VH 蛋白能与抗组氨酸 (His) 标签鼠单克隆抗体特异性结合,说明其与 His-Tag 融合表达。纯化结果显示,重组蛋白 scFv-VL-Linker-VH 在变性剂中溶解,经 Ni-NTA 金属螯合层析柱纯化后,得到了纯化的单链抗体,且能在 PBS 溶液中复性。

[参考文献]

- [1] Burton D R, Desrosiers R C, Doms R W, et al. HIV Vaccine design and the neutralizing antibody problem [J]. Nat Med, 2004, 5(3): 233-236.
- [2] Susan Z P. Identifying epitope of HIV-1 that induce protective antibodies [J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(3): 199-210.
- [3] Parker C E, Deterding L J, Christine H B, et al. Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody-2F5 [J]. J Virol, 2001, 75: 10906-10911.
- [4] Zwick M B, Labrijn A F, Meng W, et al. Broadly neutralizing antibodies targeted to the membrane-proximal external region of human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp41 [J]. J Virol, 2001, 75: 10892-10905.
- [5] Wu X L, Yang Z Y, Li Y X, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1 [J]. Science, 2010, 329: 856-861.
- [6] Zhou T, Georgiev I, Wu X, et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01 [J]. Science, 2010, 329: 811-817.
- [7] Veazey R S, Shattock R J, Pope M, et al. Prevention of virus transmission to macaque monkeys by a vaginally applied monoclonal antibody to HIV-1 gp120 [J]. Nat Med, 2003, 9(3): 343-346.
- [8] Blazek D, Celer V. The production and application of single-chain antibody fragments [J]. Folia Microbiol, 2003, 48(5): 687-698.
- [9] Jiang W, Bonnert T P, Venugopal K, et al. A single-chain antibody fragment expressed in bacteria neutralized tick-borne flaviviruses [J]. Virology, 1994, 200: 21-28.
- [10] 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]. Virology, 1996, 224: 548-554.
- [11] Jiang W, Venugopal K, Gould E. Intracellular interference of tick-borne flavivirus infection by using a single-chain antibody fragment delivered by recombinant sindbis virus [J]. J Virol, 1995, 69(2): 1044-1049.
- [12] Yokata T, Milenic D E, Whitlow M, et al. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms [J]. Cancer Research, 1992, 52: 3402-3408.