

• 论 著 •

人源抗-HBs Fab 与 IFN- α 融合蛋白的克隆与原核表达

陆慧琦, 韩煥兴*, 安 峰, 叶伟民, 曾万杰, 薛 菡

(第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 构建人源单克隆抗-HBs Fab-IFN- α 表达载体, 探讨该融合蛋白原核表达的可行性及其生物学活性。**方法:** 用 PCR 体外扩增目的基因 IFN- α , 单酶点插入已含人源抗-HBs Fab 基因的载体, 插入点位于轻链基因 3' 末端, 利用酶切、PCR 鉴定筛选正确插入的阳性克隆, 转化大肠杆菌, 挑选单克隆表达、纯化目的蛋白, 用 ELISA 方法检测融合蛋白 IFN- α 的抗原性及其抗体亲和性, 用 WISH 细胞检测 IFN- α 生物学活性。**结果:** 利用插入了人源抗-HBs Fab 基因及 IFN- α 基因的 pBAD/g III A 原核表达系统, 成功表达了具生物活性的 λ 轻链与 IFN- α 的融合蛋白, 其既具有与抗-HBs Fab 相近的 HBsAg 的亲和力, 又具有干扰素的活性。**结论:** λ 轻链与 IFN- α 融合蛋白的成功表达表明, 应用原核系统能够同时表达某些特异抗体和其介导的部分生物活性因子, 是一种经济、有效的方法, 为特异抗体及其介导融合蛋白的制备和临床应用提供了线索。

[关键词] 干扰素 α ; 抗 HBs 抗体; 融合蛋白

[中图分类号] R 575.1

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1299-04

Construction and prokaryotic expression of fusion protein consisting of IFN- α and Fab of antibody against HBsAg

LU Hui-Qi, HAN Huan-Xing*, AN Feng, YE Wei-Min, ZENG Wan-Jie, XUE Chang (Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct the expression vector for the fusion protein of anti-HBs Fab fragment and IFN- α , and to discuss the prokaryotic expression feasibility of the fusion protein and its biology activity. **Methods:** The gene fragment of IFN- α with corresponding endonuclease sites and artificial linker at 5', 3' termini was amplified with PCR, and the products were recombined with the vector containing anti-HBs Fab gene in correct endonuclease sites at 3' terminus of the Lc gene. The positive clones were chosen by endonuclease cleavage and PCR and were then transformed into E. coli Top10. The fusion protein was amplified and its antigenicity and binding activity to HBsAg were detected with ELISA and the bioactivity of IFN- α was detected with WISH cells. **Results:** The fusion protein consisting λ light chain and IFN- α was successfully expressed with the prokaryotic expression system, which had the HBsAg affinity similar to that of HBs-Fab fragment. **Conclusion:** The successful expression of fusion protein shows that the prokaryotic expression system can effectively express some specific antibodies and biology active factor at the same time, which provide a clue to the preparation and clinical applications of specific antibodies and their fusion proteins.

[KEY WORDS] IFN- α ; human antibody of HBsAg; fusion protein

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12): 1299-1302]

IFN- α 是一组能够诱导一系列细胞内蛋白表达, 继而发挥抗病毒作用的细胞因子, 具有抗病毒、抑制或阻断肝脏纤维化、降低原发性肝癌的发生率的作用和免疫调节活性。IFN- α 的作用靶位点是 HBV DNA, 它不仅抑制 HBV DNA 的复制, 还可抑制病毒蛋白的表达。自 80 年代初生产重组 IFN- α 以来, 其用于大量乙肝患者的治疗经验渐趋成熟^[1,2], 是目前国内外公认的治疗慢性乙肝的有效药物, 但仍存在着一些局限性。人源单克隆抗体具有较高的抗原亲和力和特异性, 如将其与 IFN- α 在分子水平重组构建融合蛋白表达质粒, 表达 IFN- α 与抗体融合蛋白, 则可利用抗体为 IFN- α 起导向作用, 降低 IFN- α 的应用剂量及减少不良反应。本研究利用重

组了的抗-HBs Fab 片段基因及 IFN- α 基因的 pBAD/g III A 的原核表达系统, 探讨表达双重生物活性的抗-HBs Fab/IFN- α 融合蛋白的可行性, 并检测融合蛋白的生物学活性。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌株 IFN- α Am 质粒(简称 IFN- α), TOP10 菌株本室保存, 重组人抗-HBs Fab 基因载体(pBAD-Fab)由本室构建^[3](图 1)。它含有抗 HBsAg

[基金项目] 上海市科委基金(004319208)。

[作者简介] 陆慧琦(1969-), 女(汉族), 硕士, 助理研究员。

*Corresponding author. E-mail: hanhuanxing@sohu.com

重链 N 段基因(Fd)及 λ 轻链基因(Lc),分别受控于一阿拉伯糖启动子,基因前端与启动子间有g $\equiv$ 信号

肽序列, λ 轻链 3'端带有 6 个组氨酸的尾。

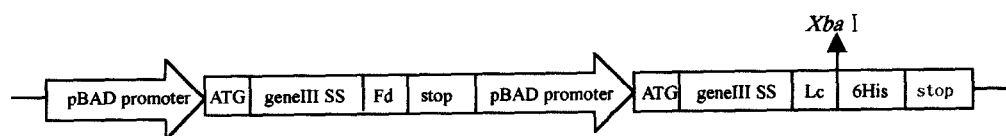


图 1 Fab/pComb3 重组质粒图谱

Fig 1 Scheme for recombinant plasmid of Fab/pComb3

1.2 其他试剂 工具酶为 New England 公司产品,PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司,阿拉伯糖为 Sigma 公司产品,IFN- α ELISA 检测试剂盒购于上海森雄科技有限公司,HBsAg(一级纯)由北京肝炎制品研究所惠赠,抗人 IgG 酶标抗体为 Sigma 公司产品,其余试剂皆为国产分析纯。

1.3 IFN- α 的扩增 以 IFN- α 质粒为模板设计一对引物为:正向 5'-ATG CTC TAG AAG GAG GCG GTG GCT CGA TGT GCG ACC TTC CTC AAA CT-3',反向 5'-ACG CTC TAG ACG TTC CTT ACT TCT TAA ACT TTC TTG-3'。利用模板扩增出 5'端带有一个 5 个氨基酸柔性连接肽的目的基因。

1.4 克隆及筛选 将重组了人源抗 HBsAg 抗体 Fab 基因的 pBAD/g $\equiv$ A 载体用 Xba I 单酶切,胶回收后作去磷酸化处理,与经同样由 Xba I 单酶切的 IFN- α 目的基因以 1:1 混合,T₄ 连接酶连接,将连接产物转化大肠杆菌 TOP10,选取单克隆,抽提质粒为模板,用扩增 IFN- α 基因的引物作 PCR 鉴定插入了 IFN- α 的阳性克隆。再以 Fab 基因上游的 18 个碱基序列合成一段正向筛选引物,序列为 5'-TTC GCG ATT CCG CTG GTG-3',用此引物与扩增 IFN- α 的反向引物组合,以正确插入的 IFN- α 的阳性质粒为模板,进行 PCR 反应,扩增出一包含 Fab 基因及 IFN- α 的长约 2 kb 的基因序列。重组后载体图谱见图 2。

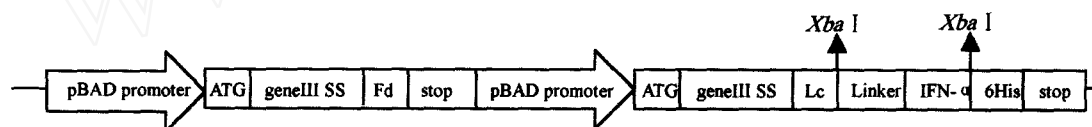


图 2 Fab-IFN- α /pComb3 重组质粒图谱

Fig 2 Scheme for recombinant plasmid of Fab-IFN- α /pComb3

1.5 融合蛋白的表达及纯化 选取筛选的阳性克隆,转化 TOP10 大肠杆菌,挑选单个克隆,接种于 20 ml LB 中(含 50 mg/ml 氨苄)37℃,225 r/min 振荡过夜,按 2%比例转接入 1 000 ml LB 中(含 50 mg/ml 氨苄)37℃,225 r/min 振荡 4 h,加入阿拉伯糖诱导表达,6 h 后离心收菌,取一定量菌体按 1:10(W/V)加入 10 倍体积冰 1×PBS 液,超声裂解,功率 300~400 W 10 次,每次 10 s,间隔 10 s,裂解后 4 500 r/min 离心,收集上清,用 Ni-NTA Agarose 柱进行亲和层析纯化,经过上柱结合,洗涤,洗脱几个步骤,收集洗脱液,用 Beckman Du640 核酸及蛋白分析仪,测量蛋白含量。

1.6 纯化蛋白中 IFN- α 抗原性检测 将 IFN- α / λ 稀释至浓度为 10 μ g/ml,并依次作 5 次倍比稀释,最后得到 6 个浓度 10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 (μ g/ml);将上述 6 个浓度依次加入到 IFN- α 检测

试剂盒的微孔板中,各孔 100 μ l,每个浓度加 2 个孔,并以 PBS 为阴性对照,37℃温育 90 min,洗板 5 次,加入酶联工作液 37℃温育 60 min,洗板 5 次,显色,终止后测 450 nm 光密度值(D)。

1.7 检测融合蛋白中抗体生物学活性 以去离子水清洗微孔板后将 HBsAg(一级纯)以 PBSN 稀释至浓度为 5、2.5、1.25、0.625(μ g/ml)4 个浓度;将上述 4 个浓度 HBsAg 依次加入微孔板中,各孔 50 μ l,同时以 1×PBS 作对照;洗板及封闭后将纯化的 IFN- α / λ 以 PBSN 倍比稀释成 20、10、5、2.5、1.25(μ g/ml)等共 8 个梯度,各 100 μ l 加入包板的抗原孔中,以倍比稀释成 2、1、0.5、0.25、0.125(μ g/ml)等共 8 个浓度的抗-HBs Fab 为对照,每浓度 2 孔,室温下孵育 16 h,同时 200 r/min 振荡;其余步骤同 1.5。

1.8 融合蛋白中 IFN- α 生物学活性检测 将新鲜

传代 24~48 h 的 WISH 细胞以 $2 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度加入到 96 孔细胞培养板上, 每孔 100 μl , 于含 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 孵箱中培养 4~6 h。弃培养板上的上清液, 将纯化后的 IFN- α/λ 融合蛋白 1 000 倍稀释后, 以 4 倍体积连续稀释 6 个梯度, 每孔 100 μl 加入培养板, 每个稀释度做 2 孔。于含 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 孵箱中培养 18~24 h。以 100 $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 的浓度加入水泡性口炎病毒(VSV), 每孔 100 μl , 于含 5% CO_2 的 37 $^\circ\text{C}$ 孵箱中培养 18~24 h。显微镜下观察细胞病变和死亡情况, 按“Reed-muench”法计算。以国家标准品校正, 单位用“IU”表示。

2 结果

2.1 人源抗-HBs Fab 基因与 IFN- α 重组载体的构建及筛选 利用 PCR 技术扩增出人 IFN- α 基因(图 3), 并成功克隆入 pBAD-Fab 载体(图 4), 进一步筛选出插入方向正确的阳性克隆(图 4)。

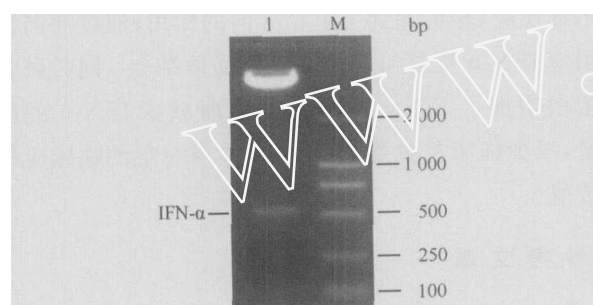


图 3 IFN- α 的阳性载体的酶切鉴定结果
Fig 3 Identification of positive vector with IFN- α
1: Identification of positive vector with IFN- α ; M: Marker

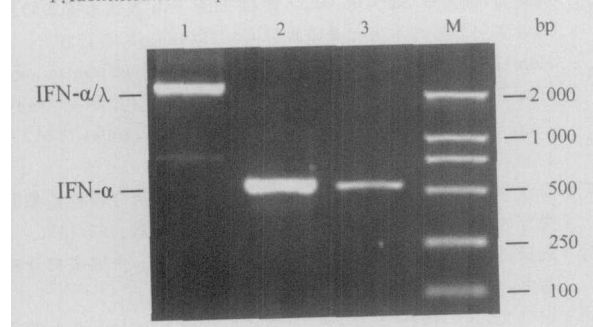


图 4 IFN- α 及插入方向正确的载体 PCR 鉴定结果

Fig 4 IFN- α and identification of positive vector with IFN- α

1: Identification of positive vector with IFN- α ;
2, 3: IFN- α ; M: Marker

2.2 人抗 HBs λ 轻链与 IFN- α 融合蛋白的表达及纯化 表达培养后离心收取菌体, 经裂解获取上清, 以 Ni-NTA Agarose 柱纯化后, 获得了仅 λ 轻链与

IFN- α 的融合蛋白(以 IFN- α/λ 表示)。见图 5。

2.3 融合蛋白中 IFN- α 抗原性检测 用人 IFN- α ELISA 检测试剂盒检测融合蛋白中 IFN- α 的抗原性, 显色终止后测 D_{450} 表明, IFN- α/λ 融合蛋白有较好的抗原结合活性(图 6)。

2.4 融合蛋白中抗体亲和性检测 人源基因工程抗体 IFN- α/λ 的抗体亲和性比抗-HBs Fab 仅仅小约 1 个数量级, 说明该基因工程抗体抗原结合能力较强(图 7)。

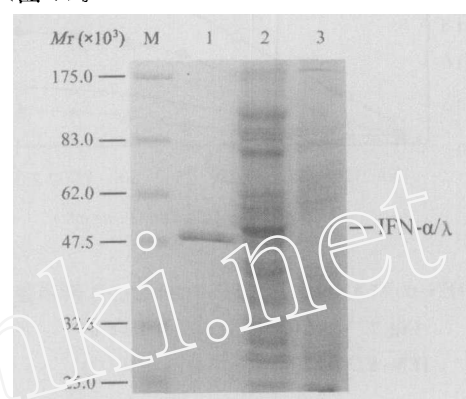


图 5 SDS-PAGE 分析 IFN- α/λ 融合蛋白表达

Fig 5 Analysis of fusion protein containing IFN- α/λ by SDS-PAGE

M: Marker; 1: Fusion protein of IFN- α/λ ;
2: Unpurified supernatant containing IFN- α/λ ;
3: Supernatant without inducer

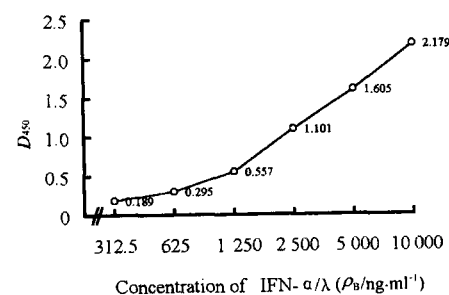


图 6 IFN- α 抗原性检测曲线

Fig 6 Detection curve of IFN- α antigenicity

2.5 融合蛋白中 IFN- α 生物学活性测定 应用 WISH 细胞法检测显示, 20 个克隆表达的 IFN- α 均有活性, 有 5 个克隆的表达产物 IFN- α 生物活性达到 10^5 IU/ml 以上, 其中最高可达 5×10^5 IU/ml。

3 讨论

免疫治疗的独特优势是它的高度特异性, 抗体的治疗作用有两个方面, 一是抗体的直接免疫效应, 如毒素中和、抗原清除、免疫调理等; 二是抗体的特异介导作用。如果将某些生物活性因子或治疗物质

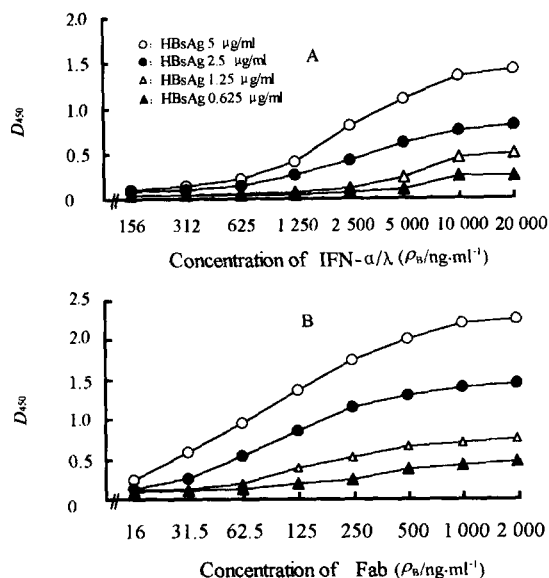


图 7 IFN- α/λ (A)和抗-HBs Fab(B)的抗体亲和性曲线
Fig 7 Antibody affinity curve of
IFN- α/λ (A) and anti-HBs Fab (B)

与抗体相结合,利用抗体的靶组织特异性和介导的复合作用,将会大大提高治疗效果。近年来,人源化生物工程抗体介导治疗再度成为肿瘤、病毒感染、自身免疫病等领域的热点并已获肯定结果^[4~6]。随着抗体导向治疗的飞速发展,直接从分子水平构建载体,表达融合蛋白成为一种迫切需要又具实际意义的工作。

本实验中,为了保证表达融合蛋白的空间构型和相应的生物活性,干扰素基因连接在抗体轻链基因的羧基端,在抗体轻链与 IFN- α 之间加入了一个由 5 个氨基酸(甘氨酸和丝氨酸)构成的柔性连接肽,构建了抗-HBs Fab 片段与 IFN- α 融合蛋白的表达载体,由于是单酶点插入,故先用 PCR 方法筛选插入方向正确的克隆,简单易行。由于重链 Fd 基因与轻链基因分别处于 2 个阿拉伯糖启动子控制下,故两者之间的装配须在质周腔中经正确折叠后以链间二硫键连接,但轻链基因后连接了 IFN- α 基因,翻译产生的轻链与 IFN- α 的融合蛋白影响了这种连接,故表达产物为 λ 轻链与 IFN- α 融合蛋白和一条单独未装配的 Fd 蛋白。

在纯化过程中,仅有融合蛋白带有 6 组氨酸,故只纯化出相对分子质量约 47 000 大小的片段。因选用的是原核表达系统,翻译后蛋白的修饰作用较有限,故在轻链蛋白连接了 IFN- α 后不能与重链 Fd

段组装,但本研究同时发现轻链与 IFN- α 融合蛋白就已经有较好的抗原结合活性,这与以往的报道^[7,8]相似。此融合蛋白的相对分子质量比 Fab 与 IFN- α 融合形式更小,有更好的穿透性,且更易保存 IFN- α 的生物学活性。运用原核表达系统发酵表达更易获得高表达量的活性蛋白,为广泛临床应用打下了基础。

本实验初步检测了融合蛋白的双重活性,在对融合蛋白中 IFN- α 抗原性检测时,由于所测的蛋白为 IFN- α 与轻链融合蛋白,其与酶联工作液中 IFN- α 抗体结合能力有所变化,不能简单以 D 值进行定量,只作为一定性指标。有关融合蛋白与单纯 IFN- α 对 HepG2. 2. 15 细胞以及在乙肝转基因动物中的疗效观察我们在以后的实验中会进一步研究。

抗体导向治疗有重要的应用价值^[7,8],本实验获得了有双重功能的融合蛋白,即抗体的导向性及抗不良反应,轻链起到了生物导向的作用,通过导向作用使 IFN- α 更易与靶细胞表面受体结合。同时融合蛋白增加了 IFN- α 的半衰期从而减少 IFN- α 的用量,减少临床花费及不良反应,具有一定的临床应用价值。

[参考文献]

- [1] Yuen MF, Lai CL. Treatment of chronic hepatitis B[J]. *Lancet Infect Dis*, 2001, 1(4): 232-241.
- [2] Hoofnagle JH. Therapy of viral hepatitis[J]. *Digestion*, 1998, 59(5): 563-578.
- [3] 韩焕兴, 陆慧琦, 郑大勇, 等. 人源抗-HBs Fab 表达系统的转换与效果[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(12): 1338-1340.
Han HX, Lu HQ, Zheng DY, et al. Modification of human anti-HBs Fab expression system and the results[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Ssc Mil Med Univ)*, 2004, 25(12): 1338-1340.
- [4] 李永华, 谭林, 秦绍明, 等. 乙肝导向干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效观察[J]. 中国实用内科杂志, 1997, 17(3): 145-146.
- [5] 刘康达, 汤钊猷. 肝癌导向治疗的应用体会[J]. 中国实用外科杂志, 1996, 16(10): 581-582.
- [6] 田文, 郑伟, 逮好英, 等. 重组融合蛋白 Fab/IFN- α A 的表达及其抗乙型肝炎病毒的作用[J]. 解放军医学杂志, 2000, 25(3): 204-206.
- [7] Song MK, Oh MS, Lee JN, et al. Light chain of natural antibody plays a dominant role in protein antigen binding[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268(2): 390-394.
- [8] Xu X, Clarke P, Szalai G, et al. Targeting and therapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors in transgenic mice with an antibody-interleukin 2 fusion protein[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(16): 4475-4484.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-11-22

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群