

技术与方法

抗 HBsAg 碱性磷酸酶双功能抗体分子的构建*

高荣凯 王 琰 刘群英 化 冰 朱迎春 陈宇萍

(海军总医院中心实验室, 北京 100037)

摘要 为构建带有碱性磷酸酶活性的双功能基因工程抗体, 用 PCR 方法克隆大肠杆菌碱性磷酸酶基因, 通过酶切分析和 DNA 序列测定核实后, 将其重组到抗乙肝表面抗原 (HBsAg) Fab 段的 Fd 羧基端, 构建重组融合蛋白表达载体 pHBFAP, 转化大肠杆菌 XL1-Blue, 经异丙基硫代- β -D-半乳糖苷诱导表达后, 采用 ELISA 法检测到培养上清中存在与 HBsAg 的结合活性和碱性磷酸酶的催化活性, 显示抗 HBsAg-碱性磷酸酶双功能抗体分子在大肠杆菌中获得了表达.

关键词 抗 HBsAg Fab, 碱性磷酸酶, 双功能抗体

免疫酶技术在检测微量抗原或抗体上具有重要意义, 其标记酶一般是辣根过氧化物酶 (HRP) 和碱性磷酸酶 (AP), 酶标抗体都是采用化学交联方法制备, 需要交联、纯化等多步蛋白质操作, 易失活、成本高. 采用基因工程方法则将抗体基因和酶基因融合表达, 获得既有抗体的抗原结合活性又有酶的催化活性的双功能融合蛋白, 不仅易于大量制备、成本低, 而且提高其稳定性. 国外近几年进行了这方面的研究, 取得一定的进展^[1~3]. 本文克隆了大肠杆菌碱性磷酸酶基因, 并重组到抗乙肝表面抗原 (HBsAg) Fab 段的 Fd 羧基端, 获得了双功能抗体融合蛋白的表达, 为其应用奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: *E. coli* XL1-Blue 为本实验室保存菌株; 质粒 p3HHB, 由本实验室构建, 含抗 HBsAg Fab 段基因^[4,5].

1.1.2 酶和化学试剂: 限制性内切酶 Bgl II、Pvu II、Xho I、Spe I, T4 DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品; Taq DNA 聚合酶为芬兰

进口; 琼脂糖为 Promega 公司产品; 低熔点琼脂糖为 Sigma 公司产品; IPTG、X-gal、Tris 等其他有关化学试剂均为进口或国产分析纯试剂.

1.1.3 试剂盒: pGEM-T Vector Kit 为 Promega 公司产品.

1.1.4 引物合成: 参照已发表的大肠杆菌碱性磷酸酶基因 PhoA 序列, 设计合成两端特异引物, 5' 端引物为 5'-ACAAAACTAGTA-CACCAGAAATGCCTGTT-3', 引入了 Spe I 酶切位点; 3' 端引物为 5'-CCGGGCA-GATCTTTATTTTCAGCCCCAGAGC-3', 包含终止密码 TAA, 引入了 Bgl II 酶切点. 由美国 CyberSyn 公司合成.

1.2 方法

1.2.1 PCR 参照文献 [6] 方法. 反应体积为 100 μ l, 反应步骤: 在加入 Taq DNA 聚合酶前先 95 $^{\circ}$ C 10 min, 60 $^{\circ}$ C 10 min; 加入 Taq DNA 聚合酶后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min. 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min. 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min. 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.

* 国家科委 863 基金 (863-102-12-08) 和军队重点课题基金 (96Z004) 资助.

收稿日期: 1996-08-23, 修回日期: 1997-01-16

1.2.2 基因片段采用低熔点琼脂糖凝胶电泳法^[6]回收.

1.2.3 基因克隆、酶切、连接等基因工程操作均参照文献 [6] 方法进行.

1.2.4 SDS-琼脂糖凝胶电泳菌落快速筛选同参考文献 [4].

1.2.5 DNA 序列测定采用 Pharmacia 的 T7 测序套盒, 以³⁵S-dATP 进行标记, 双脱氧末端终止法进行测定.

1.2.6 双功能抗体分子在大肠杆菌中的表达: 以重组表达质粒转化大肠杆菌 XL1-Blue, 挑取单菌落接种含 100 mg/L Amp 的 LB 培养基 1 ml, 37℃ 振荡培养过夜; 取 30 μl 菌液接种含 100 mg/L Amp 的 SB 培养基 1.5 ml, 37℃ 振荡培养 3 h, 加入终浓度 1 mmol/L 的异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG), 于 30℃ 振荡培养诱导表达过夜. 离心收取上清.

1.2.7 抗 HBsAg-碱性磷酸酶融合蛋白活性测定: a. ELISA 检测融合蛋白的 Fab 段抗原结合活性. 以 HBsAg 包被板, 1% BSA 37℃ 封闭 1 h, 加 50 μl/孔样品 37℃ 反应 1 h, 0.05% Tween-20 PBS 洗三遍, 加 50 μl/孔 HRP-羊抗人 Fab (5 000倍稀释) 37℃ 1 h, 洗三遍, 加入 50 μl/孔邻苯二胺 (OPD) 底物显色, 加 50 μl/孔 20% H₂SO₄ 终止, 492 nm 处测吸光值 A; b. 直接法检测融合蛋白的碱性磷酸酶催化活性. 将 5 μl 培养上清直接加到 50 μl 碱性磷酸酶底物 (Sigma 104-105) 液中观察颜色变化; c. ELISA 法检测融合蛋白的双功能活性. 以 HBsAg 包被板, 1% BSA 37℃ 封闭 1 h, 加 50 μl 培养上清 37℃ 反应 1 h, PBS 洗三遍, 加 50 μl/孔碱性磷酸酶底物 (Sigma 104-105) 显色 1 h, 加 50 μl/孔 1 mol/L NaOH 终止反应, 于 405 nm 处测定吸光值 A.

1.2.8 双功能抗体对 HBsAg 的检测: 采用双抗体夹心法. 用本实验室制备的抗 HBsAg Fab 1 mg/L 50 μl/孔 4℃ 包被过夜; 1% BSA 37℃ 封闭 1 h; 加入待测标本 (从血液中纯化的 HBsAg), 自 500 mg/L 开始倍比稀释, 50 μl/孔, 37℃ 1 h; 加入 50 μl/孔表达的双功

能抗体反应 1 h; 加入 AP 底物液显色 1 h, 1 mol/L NaOH 终止反应, 于 405 nm 处测定吸光值 A. 以 A_{样品}/A_{阴性对照} > 2 时判为阳性.

2 结 果

2.1 大肠杆菌碱性磷酸酶基因的克隆

设计合成大肠杆菌碱性磷酸酶基因两端特异引物, 5' 端引物起始于 PhoA 成熟蛋白的第二个氨基酸, 3' 端引物终止于 PhoA 的终止密码子, 所扩增的 PhoA 基因应包含 1 347 个碱基, 编码 449 个氨基酸; 同时引入了一个 Spe I 酶切点, 相当于引入了两个丝氨酸. 以 *E. coli* HB101 全菌体为模板进行 PCR 扩增, 获得了预期大小的 DNA 扩增带, 低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物, 用专为克隆 PCR 产物设计的 pGEM-T 试剂盒克隆扩增的基因片段, 经过 SDS-琼脂糖凝胶电泳快速筛选及酶切分析, 获得了多个含有插入子的克隆 pGAP. 对所获克隆进行基因序列测定, 读取其 5' 端近 200 bp 的核苷酸序列, 发现其与已报道的基因序列相同.

2.2 抗体融合蛋白表达载体的构建

以 Spe I 和 Bgl II 双酶消化多个 pGAP 克隆的混合物, 用低熔点琼脂糖凝胶电泳法回收 PhoA 基因片段, 定向克隆到 p3HBB 的 Spe I 和 Bgl II 位点间, 构建成融合蛋白表达载体 pHBFP (图 1).

2.3 抗体融合蛋白的表达及其活性鉴定

将转化了重组质粒 pHBFP 的大肠杆菌 XL1-Blue 接种含 100 mg/L Amp 的 SB, 37℃ 振荡培养 2~3 h 至 A₆₀₀ > 0.4, 加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代-β-D-半乳糖苷 (IPTG), 于 30℃ 振荡培养诱导表达过夜, 离心收取培养上清; 菌体沉淀经反复冻融测重组蛋白在周质腔中的表达. 首先鉴定上清中是否存在 AP 活性, 吸取 5 μl 培养上清加到 50 μl AP 底物液中, 迅速变为黄色并随时间增长而加深, 而菌株 XL1-Blue (p3HBB) 诱导表达后的培养上清则不能使 AP 底物液改变颜色, 说明所表达的融合蛋白具有 AP 活性; 选择一个

活性最高的克隆, 用 ELISA 鉴定其抗原结合活性 (表 1), 显示所表达蛋白质具有良好 HBsAg 结合活性; 进一步检测所表达蛋白的双功能活性, 以 HBsAg 包被, 待测上清反应后

直接加入 AP 底物 (表 2), 显示二种功能活性存在于同一分子上. 周质腔表达的重组蛋白经稀释至培养体积测定其活性, 发现其表达量与分泌达到培养基的重组蛋白量基本相同.

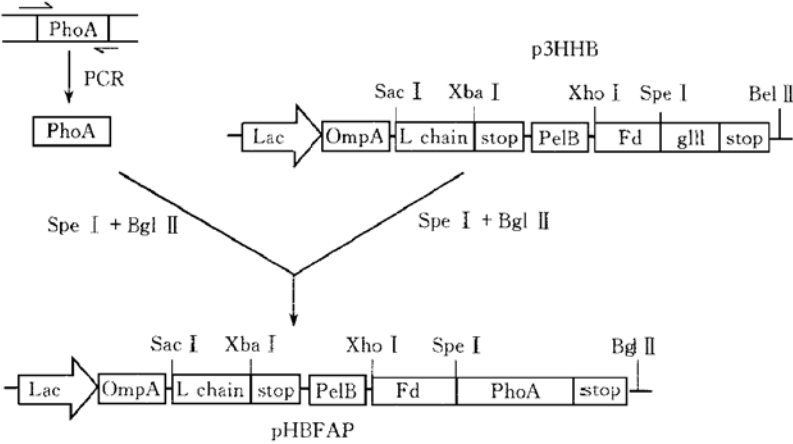


图 1 融合蛋白表达载体 pHBFP 的构建

表 1 ELISA 法检测融合蛋白的抗原结合活性

	样品 (稀释倍数)				对照	
	1	2	4	8	阳性 ¹⁾	阴性 ²⁾
A ₄₉₂	3.05 ± 0	3.05 ± 0	3.05 ± 0	3.05 ± 0	3.05 ± 0	0.10 ± 0.01

¹⁾ 抗 HBsAg Fab. ²⁾ 抗破伤风杆菌外毒素 Fab.

表 2 ELISA 法检测双功能抗体融合蛋白的双重活性

	样品 (稀释倍数)				对照	
	1	2	4	8	Ab ¹⁾	Ag ²⁾
A ₄₀₅	0.95 ± 0	0.82 ± 0	0.58 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0

¹⁾ 抗 HBsAg Fab. ²⁾ 人 IgG 作为抗原对照包被酶标板.

2.4 检测 HBsAg 的灵敏度

以本双功能抗体代替常规酶标抗体采用双抗体夹心法检测 HBsAg, 其敏感度可达 0.03 mg/L, 与现用试剂盒方法相近, 适当延长显色时间灵敏度会有所提高.

3 讨 论

碱性磷酸酶作为一种比较常用的标记酶, 与其他标记酶系统相比具有独特的优越性, 它的作用底物在无碱性磷酸酶的环境中, 不会因

显色时间长而出现假阳性, 适当延长显色时间可以检测微量的抗原或抗体, 在免疫酶技术中起着重要作用. 但常规的酶标记物都是通过化学交联方法制备的, 需要交联、纯化等多步蛋白质操作程序, 存在产量低、成本高等不足之处. 随着分子生物学技术和基因工程抗体技术的发展, 则可采用基因工程方法将酶基因和抗体基因融合表达, 获得既有抗体的抗原结合活性又有酶催化活性的双功能抗体融合蛋白, 不仅易于大量制备、成本低, 而且提高了稳定

性. 近几年国外有少数实验室进行了这方面的研究, 将大肠杆菌碱性磷酸酶基因与抗原或抗体基因重组, 形成融合蛋白在大肠杆菌中获得表达, 表现出双活性, 并成功地用培养上清检测抗原或抗体^[1~3, 7, 8]. 国内目前尚无此类工作的报道.

对碱性磷酸酶的生物化学和结构的分析数据表明, 天然碱性磷酸酶氨基端的前 9 个氨基酸残基对于其结构和催化活性是不重要的, 原则上讲, 将真核蛋白质融合于碱性磷酸酶的氨基端进行表达, 对酶的结构和活性影响不大. 许多实验研究报道, 在成熟碱性磷酸酶的第二、第六、第七氨基酸残基前进行重组, 不必设计合成连接肽, 在大肠杆菌中都获得了融合蛋白的双活性表达. 我们在克隆并成功表达了抗 HBsAg Fab 段的基础上, 克隆了大肠杆菌碱性磷酸酶基因, 并将其重组到抗 HBsAg Fab 段 Fd 的羧基端, 在大肠杆菌中表达了双活性的抗体融合蛋白. 考虑到为尽量保持碱性磷酸酶结构完整性及其酶活性, 克隆了从第二个氨基酸开始的编码序列, 没有设计合成连接肽, 只是为便于构建融合蛋白表达载体, 在其 5' 端设计了一个 Spe I 酶切点, 相当于引入了两个丝氨酸残基. 通过对表达产物的抗 HBsAg Fab 段的活性鉴定, 可以看出其活性表达与原始的抗 HBsAg Fab 的表达水平相当, 而且表达的碱性磷酸酶活性也较好, 实验结果说明本研究设计路线对双活性表达没有影响. 在做 ELISA 检测时, 上清样品倍比稀释后, 用间接法检测其抗 HBsAg 活性时, A₄₉₂一直处于平区 (表 1), 而在直接法以 AP 底物检测时, 随样品稀释 A₄₀₅值逐渐下降, 这可能因间接法用 HRP-抗 Fab 有放大效应, 较为灵敏之故, 如能构建抗 Ig-AP 融合蛋白, 则可望通过间接法, 增加检测敏感性.

本研究构建的双功能抗体融合蛋白表达载体, 是一个比较通用的融合表达载体, 它适用于采用本技术路线克隆的其他抗体分子. 通过对本双功能抗体融合蛋白活性的鉴定, 可见其具有较好的抗原结合能力和酶催化活性, 为其

实验室检测及临床诊断应用和构建更为实用的双功能抗体融合蛋白奠定了基础.

参 考 文 献

1 Carrier A, Ducancel F, Settiawan N B *et al.* Recombinant antibody-alkaline phosphatase conjugates for diagnosis of human IgG: application to anti-HBsAg detection. *J Immunological Methoads*, 1995, **181**: 177~ 186

2 Ducancel F, Gillet D, Carrier A *et al.* Recombinant colorimetric antibodies: construction and characterization of a bifunctional F (ab)₂/alkaline phosphatase conjugate produced in *Escherichia coli*. *Bio/Technology*, 1993, **11**: 601~ 605

3 Wels W, Harwerth I M, Zwickl M *et al.* Construction, bacterial expression and characterization of a bifunctional single chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to the human ERBB-2 receptor. *Bio/Technology*, 1992, **10**: 1128 ~ 1132

4 陈竞华, 王 琰, 刘群英等. 人源性噬菌体抗体库的构建及抗 HBsAg 人单抗的筛选. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, **15** (3): 158~ 162

5 王 琰, 刘群英, 徐建军等. 人抗 HBs Fab 段基因的序列分析及表达. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, **15** (5): 304~ 307

6 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 等. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992: 16~ 323

7 Gillet D, Ezan E, Ducancel F *et al.* Enzyme immunassay using a rat prolactin alkaline phosphatase recombinant tracer. *Anal Chem*, 1993, **65**: 1779~ 1784

8 Gillet D, Ducancel F, Pradel E *et al.* Insertion of disulfide-containing neurotoxin into *E. coli* alkaline phosphatase: the hybrid retains both biological activities. *Protein Engineering*, 1992, **5** (3): 273~ 278

Construction of Anti-HBsAg/alkaline Phosphatase Bifunctional Antibody Fusion Protein.

GAO Rongkai, WANG Yan, LIU Qunying, HUA Bing, ZHU Yingchun, CHEN Yuping (Navy General Hospital, Beijing 100037, China).

Abstract A bifunctional anti-HBsAg-alkaline phosphatase fusion protein expression vector pHBFAP was constructed by attaching the PCR cloned *E. coli* alkaline phosphatase gene to the C-terminal of the anti-HBsAg Fd fragment gene.