

中图分类号:R965;R978.7 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2023)21-0050-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.21.012



噬菌体展示库筛选冠状病毒刺突蛋白抗体*

范能全¹,张玲¹,钟亚东²,严大军³,王琳⁴,彭兰⁵△

(1. 重庆市食品药品检验检测研究院,重庆 401121; 2. 重庆市中药研究院,重庆 400060; 3. 重庆圣华曦药业股份有限公司,重庆 401336; 4. 西南医科大学药学院,四川 泸州 646000; 5. 重庆医药高等专科学校,重庆 401331)

摘要:目的 筛选特异性结合冠状病毒刺突蛋白(简称S蛋白)抗原的特异性抗体。方法 根据冠状病毒S蛋白家族数据库,合成保守序列,分子克隆连接到pet-22原核表达载体,纯化蛋白免疫小鼠产生相应的多克隆抗体,利用噬菌体展示技术提取免疫后小鼠脾脏制备噬菌体抗体scfv展示库,经过高通量筛选得到对S蛋白抗原具有高亲和力和强特异性的抗体片段。结果 通过合成的冠状病毒S蛋白糖蛋白亚基CoV_Spike_S1-S2_S2制备了抗体scfv噬菌体展示库,筛选出能与冠状病毒S蛋白特异性结合的单克隆抗体scfv片段。结论 构建的小鼠抗Cov-Spike的抗体scfv库可筛选到特异性结合冠状病毒S蛋白抗原的特异性抗体,为进一步筛选、鉴定具有潜在防治冠状病毒感染的抗体系列药物提供了可行的方法。

关键词:冠状病毒;刺突蛋白;噬菌体展示技术;中和抗体

Phage Display Library - Based Screening of Anti - Coronavirus Spike Protein Antibodies

FAN Nengquan¹,ZHANG Ling¹,ZHONG Yadong²,YAN Dajun³,WANG Lin⁴,PENG Lan⁵

(1. Chongqing Institute for Food and Drug Control,Chongqing,China 401121; 2. Chongqing Academy of Traditional Chinese Medicine,Chongqing,China 400060; 3. Chongqing Shenghuaxi Pharmaceutical Co.,Ltd.,Chongqing,China 401336; 4. School of Pharmacy,Southwest Medical University,Luzhou,Sichuan,China 646000; 5. Chongqing Medical and Pharmaceutical College,Chongqing,China 401331)

Abstract: Objective To screen specific antibodies that bind specifically to coronavirus spike protein (S protein) antigen. **Methods** According to the coronavirus S protein family database, conserved sequences were synthesized and molecular cloning was linked to the pet-22 prokaryotic expression vector, and the purified protein was immunized mice to produce the corresponding polyclonal antibody. Phage display technology was used to extract the immunized mouse spleen to prepare phage antibody scfv display library, and after high-throughput screening, several antibody fragments with high affinity and strong specificity for S protein antigen were obtained. **Results** The scfv phage display library was prepared by the synthesis of CoV_Spike_S1-S2_S2 glycoprotein subunit of coronavirus S protein, and scfv fragment was screened for monoclonal antibody specific to coronavirus S protein. **Conclusion** The constructed mouse anti-Cov-Spike antibody scfv library can screen specific antibodies that specifically bind to coronavirus S protein antigen, which can provide a feasible method and strategy for further screening and identification of antibody series drugs with potential treatment and prevention of coronavirus infection.

Key words: coronavirus; spike protein; phage - display technology; neutralizing antibody

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的结构主要有单股正链核酸(ssRNA)、刺突蛋白(简称S蛋白)、膜蛋白、包膜蛋白、核衣壳蛋白(简称N蛋白)。S蛋白形成三聚体结构,可识别并结合宿主细胞表面的受体,诱导机体产生中和抗体,在病毒感染的第一步发挥重要作用^[1-2]。目前,已研发多个病毒抗体,对其Fc片段进行

*基金项目:重庆市自然科学基金面上项目[cstc2020jcyj-msxmX0934]。

第一作者:范能全,男,硕士,正高级工程师,研究方向为药理学,(电子信箱)2297846993@qq.com。

△通信作者:彭兰,女,硕士,副教授,研究方向为临床医学,(电子信箱)pl2007pl@sohu.com。

药物分析杂志,2008,28(2):337-340.
[11] 肖小河,肖培根,王永炎. 中药科学研究的几个关键问题[J]. 中国中药杂志,2009,34(2):119-123.
[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:488-489.
[13] 李寒冰,鄢丹,武彦舒,等. 基于抗病毒活性检测的板蓝根质量生物评价方法及优化研究[J]. 中草药,2011,42(8):1560-1565.
[14] 魏伟,吴希美,李元建,等. 药理学实验方法学(第4版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:71,742-774.
[15] 顾进华,段文龙,胡元亮. 《中华人民共和国兽药典》(2010年版)二部解读[J]. 中国兽药杂志,2011,45(9):4-9.
[16] 欧阳迎光. 基于生物活性测定方法的黄连素固体制剂体外溶出度研究[J]. 中国药师,2016,19(4):642-646.
[17] 高媛. 妇炎舒胶囊对醋酸致痛小鼠的镇痛作用及其机制的研究[D]. 成都:成都中医药大学,2019.
[18] 吴丽,王丽丽,费文婷,等. 芍药苷和芍药内酯苷对小鼠疼痛模型的镇痛作用及对β-EP、PGE₂的影响[J]. 中华中医药杂志,2018,33(3):915-918.
(收稿日期:2023-01-05;修回日期:2023-08-21)

修饰和改造,用于单株抗体或多株抗体治疗。对于冠状病毒的急性感染及预防,需利用抗体治疗配合人体的免疫,阻断病毒复制,防止病情恶化。已知抗体对于快速突变的病毒靶点具有局限性^[3-7],如何高效、快速地产生多种针对不同病毒突变形式的抗体是研究的重点。本研究中对比了各种冠状病毒S蛋白的保守区域,合成蛋白抗原,通过对小鼠免疫,制备了针对冠状病毒的抗体scfv展示库,筛选出了COVID-19特异性抗体,建立了冠状病毒抗体筛选方法,为进一步修饰和改造抗原片段、筛选冠状病毒感染抗体提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:T100型PCR仪,ChemiDoc™ Touch型凝胶成像仪,1652660型Gene Pulser Xcell电穿孔仪,均购于美国Bio-Rad公司;Legend Micro21R型超速离心机,Varioskan Flash型多功能酶标仪,均购于美国Thermo公司;AKTA pure25型蛋白纯化仪(美国通用公司);K5600/C型微量分光光度仪(北京凯奥科技有限公司);G26-SN48型全自动电泳系统(INTERLAB CO., LTD.);TE77XP型蛋白电转仪(美国Hofer公司);JY-JX5型电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);INCO153型细胞恒温培养箱(德国Mettler公司)。

试剂:PET-22克隆载体(英国Novagen公司,批号为220507101);冠状病毒保守蛋白结构域cDNA合成片段(上海生工生物工程技术有限公司,批号为2203040541);大肠杆菌BL21感受态细胞(北京全式金生物技术有限公司,批号为83041021);异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG,批号为623045),Tris(批号为524896),Tryptone(批号为632510),均购于美国Sigma公司;Yeast Extract(BBI生命科学有限公司,批号为202205162034);6×His Ni亲和层析预装柱(美国Cytiva公司);预染Marker(批号为2807315),大肠杆菌菌株TG1(批号为2445872),辅助噬菌体颗粒VCM13(批号为2752874),质粒pComb3XSS(批号为2325681),Trizol试剂(批号为2235698),蛋白预制胶(批号为2145671),均购于美国Thermo Fisher Scientific公司;cDNA合成试剂盒(Invitrogen细胞,批号为2589741);聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(日本Takara Bio公司,批号为2145893);磷酸盐缓冲液(PBS,批号为22060501),聚乙二醇(PEG)溶液(批号为22100607),均购于北京索莱宝科技有限公司。

动物: BALB/c雌性小鼠,6周龄,购于北京斯贝福有限公司,动物生产合格证号为110324230100220937,动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0010。饲养于

SPF环境中,饲养设施符合SPF实验动物的饲养要求,动物使用许可证号为SYXK(渝)2020-0002。

1.2 方法

1.2.1 冠状病毒S蛋白体外表达

根据冠状病毒S蛋白家族数据库,合成保守序列,分子克隆连接到pet-22原核表达载体。IPTG诱导重组质粒融合蛋白表达:1)按1:100接种于5 mL LB(Kana+)培养液中,振摇(温度为37℃,转速为220 r/min)至菌体在600 nm波长处的吸光度(OD_{600})为0.6~0.8。2)取出1 mL菌液作为未诱导菌液,在剩余菌液中加入IPTG至终浓度为0.5 mmol/L,振摇(温度为37℃,转速为150 r/min)20 h,诱导融合蛋白表达。3)未诱导菌液室温离心(转速为10 000 r/min)1 min,弃上清液,用300 μL PBS重悬菌体沉淀。4)取出1 mL诱导菌液,室温离心(转速为10 000 r/min)1 min,弃上清液,用300 μL 1×PBS重悬菌体沉淀。剩余诱导菌液离心(转速为10 000 r/min)1 min,弃上清液,用1 mL 1×PBS重悬菌体沉淀;重悬液进行超声波破碎,分别取上清液与沉淀液加入1×PBS重悬。5)进行12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测分析,考马斯亮蓝染色显带。

1.2.2 重组蛋白的6×His Ni柱亲和纯化

1)准备1 mL填料柱子,置4℃展示柜中操作。2)用3~5倍柱体积的去离子水冲洗出储存缓冲液,使用10倍柱体积的Lysis buffer(8 mol/L尿素-PBS)平衡柱子。3)上样,孵育5 min,用容器收集流穿液。4)用10倍柱体积的Lysis buffer平衡1次柱子,再上样1遍。5)待上样结束后,加入20倍柱体积包涵体Wash buffer(50 mmol/L咪唑-PBS-8 mol/L尿素)洗柱子,用5 mL离心管收集洗脱液。6)除杂结束后用5倍柱体积不同咪唑浓度分别为100,250,500 mmol/L咪唑-PBS-8 mol/L尿素的包涵体Elution Buffer洗脱柱子,用5 mL离心管收集洗脱液,再加入10倍柱体积的Elution buffer洗脱,收集洗脱液。7)进行12% SDS-PAGE分析。

1.2.3 细胞培养

人293T细胞系培养于DMEM高糖培养基(含有10%胎牛血清和1%双抗),以及37℃、5% CO₂细胞培养箱中。

1.2.4 脾脏总RNA提取

将脾脏用剪刀剪碎,切成50 mg碎片,置含1.5 mL RNase free的EP管中,并加入1 mL Trizol试剂,匀浆;在上述样品中加入200 μL三氯甲烷,上下颠倒混匀,室温静置5 min,离心(温度为4℃,转速为12 000 r/min)15 min;将上清液转移至含RNase free的EP管中,加入500 μL异丙醇,颠倒数次后放置10 min,离心10 min;倒掉上清液,加入1 mL焦磷酸二乙酯(DEPC)水配置的75%乙醇

洗涤沉淀,离心(温度为4℃,转速为12 000 r/min) 5 min;吸除上清液,室温晾干,加入30~60 μL DEPC水溶解RNA,测定RNA浓度和纯度。

1.2.5 抗体展示库构建

用invitrogen first strand试剂盒合成cDNA:参考文献[8],引物合成小鼠抗体轻链和重链可变区VL和VH,采用overlap PCR以12氨基酸接头GGGSGGGSGG将VL和VH连成1条基因片段;选用Sfi1限制性内切酶,将获得的基因片段克隆入pComb3XSS载体;用电转仪重组质粒,转入大肠杆菌TG1感受态细胞;扩大培养TG1细胞,利用M13辅助VCM13噬菌体感染TG1大肠杆菌,感染后用PEG沉淀噬菌体颗粒,溶于BSA溶液中,待用。

VH和VL PCR扩增体系:5 μL ExTaq DNA polymerase, 0.5 U dNTP mixture, 0.25 mmol/each primers, 10 nmol/each ultrawater至50 μL。

重叠延伸PCR体系:VH产物100 ng,VL产物100 ng,各种引物10 nmol/each 10×buffer, 5 μL ExTaq DNA polymerase, 0.5 U dNTP mixture, 0.25 mmol/each ultrawater至50 μL。

Mouse VL forward primers: MVL - F1为5 - cg-gcatttcgctGAATTCcGAYATTGTDHTVWCHCAGTC - 3, MVL - F2为5 - cg-gcatttcgctGAATTCcGAYATTNWKMTVAHDCAGTC - 3, MVL - F3为5 - cg-gcatttcgctGAATTCcGAYRTYBWRMTSACMCARWC - 3, MVL - F4为5 - cg-gcatttcgctGAATTCcGAYATYSWGMTGACNCARBC - 3, MVL - F5为5 - cg-gcatttcgctGAATTCcGAYRYTGTKRTRMYMRGDW - 3。

Mouse VL reverse primers: MVL - R1为5 - tcctct-gagcgcgcgcgcagaaccaccaccaccCCGTTYNAKYTCCA - RCTTDG - 3, MVL - R2为5 - tcctctgagcgcgcgcgcagaaccaccaccaccMCSTWBNABHKYCAVYYTDG - 3。

Mouse VH forward primers: MVH - F1为5 - ggtggtg-gtggttctggcggcggcggctcaggaggaSAKGTBMAGCTBMAG - SASTC - 3, MVH - F2为5 - ggtggtggtggttctggcggcggc-gctcaggaggaSAGGTYCARCTBCARCARTC - 3, MVH - F3为5 - ggtggtggtggttctggcggcggcggctcaggaggaSAVGTSMWSBTGRWGSARTC - 3, MVH - F4为5 - ggtggtggtg-gttctggcggcggcggctcaggaggaGAKGTGMAVSKGRTG - GAR TC - 3, MVH - F5为5 - ggtggtggtggttctggcggcggc-gctcaggaggaGARGTRMARSTTSWBGAGTC - 3, MVH - F6为5 - ggtggtggtggttctggcggcggcggctcaggaggaSAKGT-BMMNYTVVWVSWRYS - 3。

Mouse VH reverse primers: MVH - R1为5 - ttctatg-cgcAAGCTTtaYGARGARACDSTGASMRKRGT - 3, MVH - R2为5 - ttctatg-cgcAAGCTTtaYGARGARRMSK-

KKASWGWGRT - 3, MVH - R3为5 - ttctatg-cgcAAGCTTtaYGAGGAGACKGTGASHGDGGH - 3。

Primers for generation of scFv genes in SOE - PCR: MscFv - F为5 - cg-gcatttcgctGAATTCc - 3, MscFv - R为5 - ttctatg-cgcAAGCTTta - 3。

1.2.6 冠状病毒特异性结合抗体 scfv 的富集

1)抗原包被。纯化抗原或人293T细胞总蛋白分别用包被液稀释至1~20 μg/mL;每孔以50~100 μL的量加入酶标板孔中,置4℃过夜或37℃吸附2 h;弃去孔内的液体,同时用洗涤液洗3次,每次3~5 min,拍干。2)人293T细胞总蛋白和冠状病毒S蛋白包被孔每孔加200 μL封闭液,37℃封闭1 h。3)封闭完成后,人293T细胞总蛋白包被孔每孔加入100 μL封闭后的噬菌体液孵育1 h。4)同时封闭用于筛选的冠状病毒S蛋白包被孔1 h。5)将孵育过人293T细胞总蛋白的噬菌体液转移至冠状病毒S蛋白包被孔上进行孵育。6)扩大培养大肠杆菌TG1,37℃摇床至OD₆₀₀为0.5左右。7)用PBS清洗液多次反复清洗冠状病毒S蛋白包被孔。8)用100 μL 0.1 mol/L三乙胺洗脱结合到冠状病毒S蛋白上的噬菌体颗粒。9)吸入400 μL Tris - HCl,汇同三乙胺移入EP管。10)吸取2 μL中和的噬菌体液,加入PBS 198 μL,制备成连续的梯度溶液。用于估算每轮筛选后噬菌体的滴度,滴度 = 菌落个数 × 菌液稀释倍数 / 梯度稀释倍数 × 涂平板体积。11)每个梯度的200 μL噬菌体加入800 μL准备好的TG1大肠杆菌37℃孵育30 min,振荡(转速为250 r/min)30 min。取10 μL铺平板,培养过夜。12)洗脱剩余的噬菌体,与15 mL TG1进行37℃孵育30 min。13)洗脱后的冠状病毒S蛋白抗原孔板,用100 μL TG1孵育30 min,通过噬菌体感染TG1,回收可能和切片紧密结合三乙胺无法洗脱的噬菌体,且与回收剩余噬菌体的TG1混合,4 500 g离心5 min,弃上清液,用200 μL培养液重新悬浮,全部涂板于15 cm大培养板,37℃过夜培养。14)加入1.5 mL培养液,将第1轮回回收得到的TG1菌落完全刮下,用-80℃甘油保存。15)经过3轮生物学筛选,能特异结合冠状病毒S蛋白的噬菌体得到富集。

1.2.7 酶联免疫吸附试验(ELISA)确认 scfv 亲和力与特异性

裂解细胞,得到蛋白裂解液,抗原包被稀释液稀释,过夜包被微孔板,加入噬菌体颗粒孵育,洗脱,加入带有辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗M13抗体孵育,洗脱,加入底物显色液,读取OD值,判断抗原抗体结合情况。

2 结果

2.1 体外表达冠状病毒S蛋白糖蛋白亚基 CoV_Spike_S1 - S2_S2

根据保守结构域数据库2020版及蛋白数据库

cd22378,合成冠状病毒S蛋白亚基中的保守区域,其中包括S1亚基碳端结构域、S1/S2断裂区、S2融合亚基。这段保守序列为高度致病性的CoV-2019和严重急性呼吸综合征(SARS)的共同保守序列。S蛋白是一种病毒包膜糖蛋白,在病毒黏附、融合及进入宿主细胞的过程中起到了关键性作用,故被选作中和抗体、抗病毒抑制剂、疫苗等的首选靶点。S蛋白以前体形式合成,断裂为N端S1亚基(约700氨基酸)和C端S2亚基(约600氨基酸),分别介导与宿主细胞的黏附和融合。3对S1/S2二聚体组装成一个从病毒外膜伸出的三聚体棘突。S1亚基含有受体结合结构域(RBD);S2亚基含有冠状病毒的融合结构域,主要由 α 螺旋组成。S1亚基包括两个独立的结构域,即N端结构域和C结构域,由亚结构域SD-1和SD-2链接到一起。根据不同的冠状病毒类型,虽然N端结构域和C结构域都能作为RBD,但大多数的冠状病毒包括SARS-CoV-2,SARS-CoV,MERS-CoV均使用C结构域与受体结合。S2亚基由含有酶解位点S2的融合肽、内部融合肽,以及2个7种必需氨基酸重复的结构域HR1,HR2及跨膜结构域组成。一旦病毒表面S1亚基的RBD与宿主细胞的受体结合,HR1和HR2两个结构域彼此相互作用形成六螺旋融合核心(6-HB),使病毒和细胞膜拉近到利于融合和感染的紧密位置。为了催化膜融合过程,S蛋白需通过在S1/S2之间的位点进行断裂,从而启动激发S蛋白。尤其是SARS-CoV-2在S1和S2亚基之间具有明显的碱性插入序列,这一点有别于其他冠状病毒。将合成的冠状病毒保守DNA序列(图1)克隆到pet-22表达载体,进行体外诱导表达,发现主要以包涵体的形式进行表达(图2)。通过8 mol/L尿素溶解后,上样6 \times His Ni柱纯化,用梯度咪唑洗脱,得到高纯度溶解的S蛋白抗原片段(图3)。

2.2 蛋白片段免疫BALB/c小鼠,制备抗体scfv噬菌体展示库

将体外表达的溶解抗原以1:1与弗氏完全佐剂完全乳化后,按每只小鼠50 μ g剂量皮下注射免疫,2周后再次同法乳化,按每只小鼠50 μ g剂量皮下注射二次免疫;2周后腹腔注射加强免疫,处死,取脾脏前再腹腔注射加强免疫,眼后静脉丛取血,纯化的蛋白包被微孔板,进行ELISA测定,发现免疫后的小鼠抗体应答明显,滴度与购买标准抗体滴度相当,而未免疫的小鼠并无交叉抗体,证实S蛋白抗原诱导产生抗血清的特异性(图4)。取效价较高的小鼠脾脏,提取总RNA,根据小鼠抗体重链轻链引物^[8-9],分别扩增抗体DNA重链和轻链片段,用overlap PCR将轻重链合并成1条连续的序列,通过克隆连接入pComb3XSS质粒载体,电转化入TG1大肠杆菌感受态后,借助辅助噬菌体颗粒VCM13

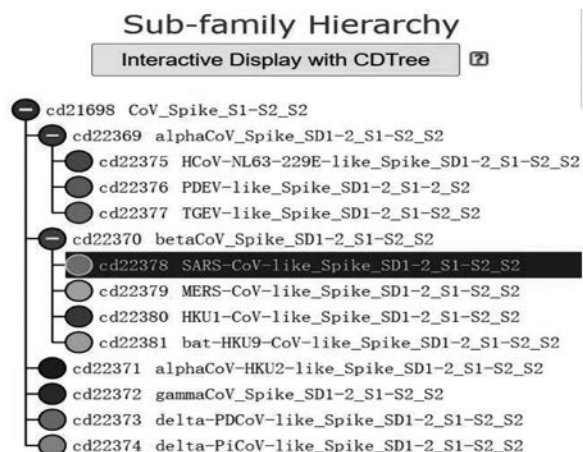
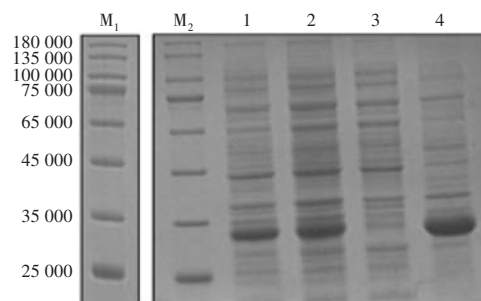


图1 冠状病毒S蛋白家族

Fig. 1 Coronavirus S protein family

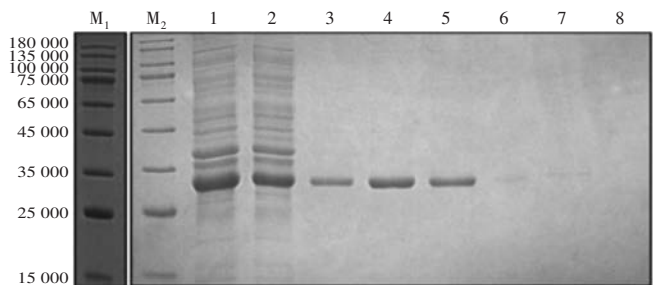


M₁. 内参 M₂. Marker 1. 未诱导菌液 2. 诱导菌液 3. 诱导菌液破碎上清液 4. 诱导菌液破碎沉淀

图2 聚丙烯酰胺凝胶电泳体外表达的S蛋白

M₁. Internal reference M₂. Marker 1. Uninduced bacterial solution 2. Induced bacterial solution 3. Crushing supernatant of induced bacterial solution 4. Crushing precipitation of induced bacterial solution

Fig. 2 S protein expressed by polyacrylamide electrophoresis *in vitro*

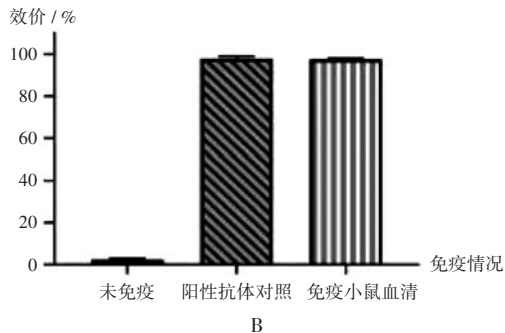
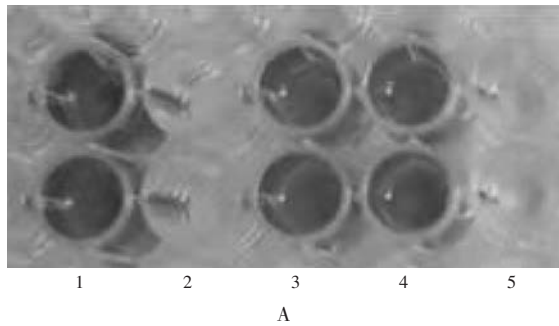


M₁. 内参 M₂. Marker 1. 上样前 2. 上样后 3-4. 100 mmol/L咪唑 - PBS - 8 mol/L尿素 5-7. 250 mmol/L咪唑 - PBS - 8 mol/L尿素 8. 500 mmol/L咪唑 - PBS - 8 mol/L尿素

图3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测6 \times His Ni柱子纯化后S蛋白抗原
M₁. Internal reference M₂. Marker 1. Before loading sample 2. After loading sample 3-4. 100 mmol/L imidazole - PBS - 8 mol/L urea 5-7. 250 mmol/L imidazole - PBS - 8 mol/L urea 8. 500 mmol/L imidazole - PBS - 8 mol/L urea

Fig. 3 S protein antigen was detected by polyacrylamide electrophoresis after purification by 6 \times His Ni column

感染TG1,通过噬菌体外壳包装得到抗冠状病毒S蛋白的抗体噬菌体展示库(图5)。



1. 阳性抗体对照 2. 未包被抗原 3 - 5. 免疫小鼠血清

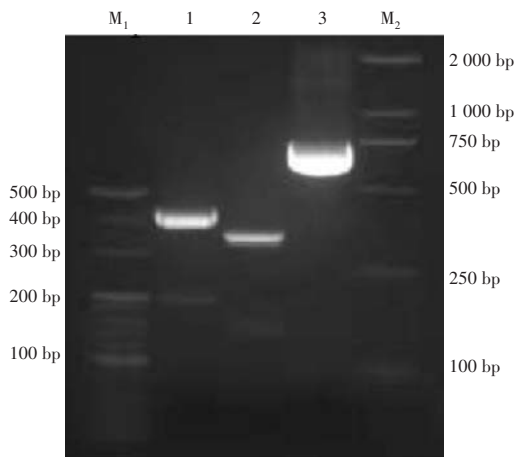
A. 抗体滴度测定结果 B. 统计数据

图4 小鼠免疫后抗体滴度测定结果

1. Positive antibody control 2. Uncoated antigens 3 - 5. Serum of immunized mouse

A. Results of antibody titer determination B. Statistical data

Fig. 4 Determination results of antibody titer in mice after immunization



M₁. DNA 标记 Hiclear 20 bp 1. 重链可变区扩增片段 2. 轻链可变区扩增片段 3. 重叠PCR将重链轻链合并为1条DNA序列

M₂. DNA 标记 DL2000

图5 冠状病毒S蛋白抗体的一段序列

M₁. DNA Marker Hiclear 20 bp 1. Amplified fragment of the variable heavy chain 2. Amplified fragment of the variable light chain

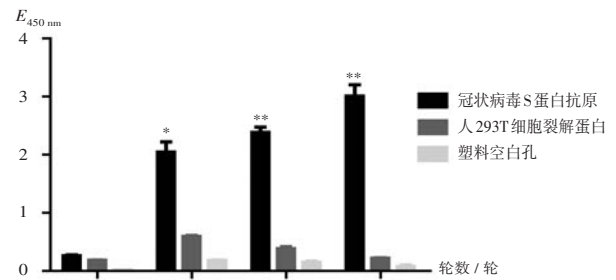
3. Synthesized one DNA sequence of heavy and light chains by SOE-PCR M₂. DNA Marker DL2000

Fig. 5 A sequence of the antibody fragment of coronavirus S protein

2.3 富集能与冠状病毒S蛋白特异性结合的抗体 scfv 片段

培养人293T细胞系,提取总蛋白,测定浓度后,包被孔板作为噬菌体展示库的扣除背景,吸附去除能非

特异性结合人细胞成分的抗体片段,孵育合成的冠状病毒S蛋白抗原,重复3轮,每次用非特异性蛋白扣除后,调整相等的噬菌体滴度,用ELISA测定噬菌体展示库对冠状病毒S蛋白的特异性和亲和力。结果显示,冠状病毒S蛋白特异性结合的scfv噬菌体颗粒得到了极大富集,其结合S蛋白抗原的特异性增强、亲和力提高。通过几轮以正常人细胞蛋白成分为背景,反复去除消耗能与细胞成分结合的抗体scfv片段,明显提高了目标scfv片段的特异性,即只与冠状病毒S蛋白抗原结合而不与正常细胞成分结合。能与人体细胞组织免疫亲和结合的抗体片段多次扣除后,依然结合在冠状病毒S蛋白上,其丰度显著提高,显著提高了多克隆抗体片段的亲和结合能力(图6)。



注:与塑料空白孔比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图6 多克隆噬菌体ELISA的结合分析结果

Note: Compared with those of plastic blank holes, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

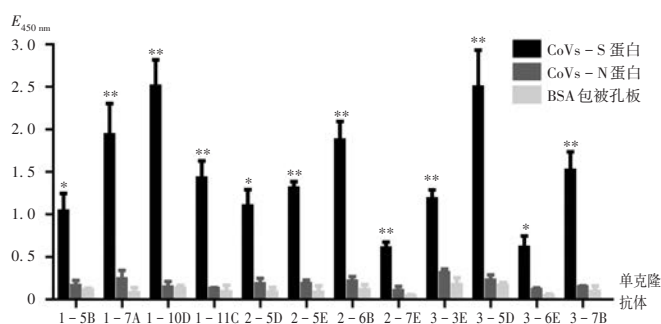
Fig. 6 Binding analysis in a polyclonal phage ELISA

2.4 冠状病毒S蛋白特异性单克隆抗体 scfv 筛选

挑选最后一轮由S蛋白抗原富集后的scfv抗体片段展示噬菌体颗粒,感染TG1大肠杆菌,涂板后挑取单克隆250个,接种至96孔板进行过夜扩大,得到单克隆的scfv噬菌体颗粒,用于结合筛选。分别选取合成的S蛋白抗原、人293T细胞系总蛋白裂解物及合成的冠状病毒N蛋白作为筛选的目标抗原和对照。经单克隆筛选,发现9个scfv克隆,对癌细胞和对照有明显差异,用于进一步特异性鉴定(图7)。结果显示,1-10D,2-6B,3-5D等单克隆抗体的特异性和亲和力差异更显著,可选取用于进一步实验,体内外验证其是否具备中和冠状病毒与宿主细胞受体相互作用的能力。

3 讨论

通过合成冠状病毒S蛋白保守序列,成功表达冠状病毒S蛋白抗原,不仅能和市面上已知的抗体相互作用,且用于筛选潜在抗体。本研究中选用了VCM13辅助噬菌体,感染TG1菌株,将克隆到菌株中pComb3XSS里的抗体片段表达且包装到噬菌体表面,用于固相筛选。同时,pComb3XSS里的抗体片段可诱导表达成可溶性抗体片段,利于ELISA等技术分析。经多轮筛选,得到的



注:与BSA包被孔板比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图7 特异性结合肝癌组织的多克隆抗体scfv片段

Note:Compared with those of BSA coated orifice plates,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

Fig.7 The scfv fragment of polyclonal antibody specifically binding to liver cancer tissue

抗体片段对于冠状病毒S蛋白的特异性增强,亲和力提高,为最终单克隆筛选奠定了基础。虽然制备出结合病毒的多种抗体片段,但有待进一步体内中和实验的验证。同时,可加大筛选力度,得到更多特异性更强的结合冠状病毒S蛋白的抗体scfv片段,为新的医学诊疗方案提供广泛的靶向抗体。由于冠状病毒中nsp14的3'-5'外核糖核酸酶(ExoN)可参与RNA校对,提高保真度,在疫情早期,其复制具有高保真性^[10],导致在疫苗设计及单抗被动治疗中,易忽略病毒结构的变异性。利用VSV-eGFP-SARS-CoV-2嵌合病毒(VSV糖蛋白被S蛋白取代)作为模型进行实验,发现目前单克隆抗体(简称单抗)普遍靶向的RBD结构域中的RBM基序具有很大的容纳突变的可塑性。因此,临床采用多种非竞争性的靶向RBM的单抗进行“鸡尾酒”治疗^[11-12]。对S蛋白RBD结构域的深度分析发现,RBM突变容纳率非常高,某些突变不但不会削弱其与宿主细胞ACE受体的结合,反而会增强这一过程^[13]。这解释了几种单抗治疗发生病毒逃逸的原因,就是RBD中的RBM能发生突变而躲避单抗,同时还保持甚至加强了RBD与宿主ACE受体结合的能力^[14-19],这也解释了目前疫苗所产生的抗体应答绝大多数都是产生的针对抗RBM的抗体^[20]。后续研究中还可在表达菌中引入提高目的表达抗原随机突变的功能元件,以便获得更广泛、多样的抗原片段。另外,随着抗体工程的发展,也可在具有潜力的scfv基础上进行各种修饰,改造抗体的半衰期及调控下游免疫事件的发生,达到控制冠状病毒细胞间传播的目的。

本研究中运用冠状病毒S蛋白保守性片段作为免疫抗原,成功诱导小鼠产生了抗冠状病毒S蛋白的特异性抗体,且构建了小鼠抗CoV-Spike的抗体scfv库,通过扣除非特异性结合细胞成分的抗体,筛选到特异性结合冠状病毒S蛋白抗原的特异性抗体,为进一步筛

选、鉴定具有潜在防治冠状病毒感染的抗体系列药物提供了可行的方法。

参考文献

- [1] MANDEEP K, AKANKSHA S, SANTOSH K, et al. SARS-CoV-2: Insights into its structural intricacies and functional aspects for drug and vaccine development [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 179: 45-60.
- [2] POLLET J, CHEN WH, STRYCH U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2021, 170: 71-82.
- [3] CHEN RE, ZHANG XW, CASE JB, et al. Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies [J]. Nat Med, 2021, 27(4): 717-726.
- [4] COLLIER DA, DE MARCO A, FERREIRA IATM, et al. Sensitivity of SARS-CoV-2 B. 1. 1. 7 to mRNA vaccine-elicited antibodies [J]. Nature, 2021, 593(7857): 136-141.
- [5] DAVIES NG, ABBOTT S, BARNARD RC, et al. Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B. 1. 1. 7 in England [J]. Science, 2021, 372(6538): eabg3055.
- [6] TEGALLY H, WILKINSON E, LESSELLS RJ, et al. Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa [J]. Nat Med, 2021, 27(3): 440-446.
- [7] WIBMER CK, AYRES F, HERMANUS T, et al. SARS-CoV-2 501Y. V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma [J]. Nat Med, 2021, 27(4): 622-625.
- [8] OKAMOTOI T, MUKAI Y, YOSHIOKA Y, et al. Optimal construction of non-immune scFv phage display libraries from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs efficiently binding to antigen [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(2): 583-591.
- [9] LEDSGAARD L, KILSTRUP M, KARATT-VELLATT A, et al. Laustsen (2018) Basics of Antibody Phage Display Technology [J]. Toxins (Basel), 2018, 10(6): 236.
- [10] DENISON MR, GRAHAM RL, DONALDSON EF, et al. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity [J]. RNA Biol, 2011, 8(2): 270-279.
- [11] WEISBLUM Y, SCHMIDT F, ZHANG FW, et al. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants [J]. eLife, 2020, 9: e61312.
- [12] LIU ZM, VANBLARGAN LA, BLOYET LM, et al. Identification of SARS-CoV-2 spike mutations that attenuate monoclonal and serum antibody neutralization [J]. Cell Host Microbe, 2021, 29(3): 477-488.
- [13] STARR TN, GREANEY AJ, HILTON SK, et al. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding [J]. Cell, 2020, 182(5): 1295-1310.
- [14] DONG J, ZOST SJ, GREANEY AJ, et al. Genetic and structural