

食源性诺如病毒单克隆抗体可变区 基因克隆及结构特征分析

高珺珊, 吴清平*, 梁燕惠, 雍天乔, 李贻静, 张菊梅, 薛亮*

(广东省科学院微生物研究所, 华南应用微生物国家重点实验室, 广东省微生物安全与健康重点实验室, 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东广州 510070)

摘要: 食源性诺如病毒是引发全球食品安全事件的重要病原, 近年来新冠疫情的持续肆虐, 更突显了加强食品领域病毒安全研究的紧迫性。该研究以实验室前期获得的食源性诺如病毒高效单克隆抗体为对象, 克隆并系统分析了其重链和轻链可变区基因序列。从分泌食源性诺如病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1E3 中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增单克隆抗体 1E3 的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 的 DNA 序列。将产物克隆到 PMD19-T 载体, 测序并分析其可变区氨基酸序列。通过 NCBI blast 比对, 显示扩增的 VH 和 VL 序列为小鼠抗体可变区序列, 进一步利用 Vbase2 数据库对测序结果进行基因结构分析, 定位了 VH 和 VL 上的高变区域互补决定区 CDR 和骨架区域 FR, 各包含 3 个 CDR 和 4 个 FR 区域, 其中 VH 片段为 360 bp, 编码 120 个氨基酸, 属于 IGHV3-2*02 家族; VL 片段为 339 bp, 编码 113 个氨基酸, 属于 IGKV1-135*01 家族。通过分子对接表明抗体重链上位点 D108 与病毒衣壳 P 蛋白上 N195 形成氢键, 为关键氨基酸残基。食源性诺如病毒单克隆抗体 VH 和 VL 片段的成功扩增促进了基因工程抗体的发展及其在食品安全新型检测与控制技术的应用。

关键词: 食品安全; 食源性诺如病毒; 单克隆抗体; 可变区; 基因克隆

文章编号: 1673-9078(2022)01-29-35

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1331

Gene Cloning and Structural Analyses of the Variable Regions of a Monoclonal Antibody against Foodborne Norovirus

GAO Junshan, WU Qingping*, LIANG Yanhui, YONG Tianqiao, LI Yijing, ZHANG Jumei, XUE Liang*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510070, China)

Abstract: Foodborne norovirus is an important pathogen that has triggered food safety incidents worldwide. The continued outbreak of COVID-19 has highlighted the urgency of viral safety research in the food sector. In this study, a highly efficient monoclonal antibody against foodborne norovirus obtained by our team was selected and the variable regions of its heavy chain (VH) and light chain (VL) were cloned and analyzed. Total RNA was extracted from the hybridoma cell line 1E3 secreting monoclonal antibodies against foodborne norovirus, and the DNA sequences of the VH and VL genes of the monoclonal antibody 1E3 were amplified by RT-PCR. The fragments were cloned into the PMD19-T vector and sequenced, and the primary amino acid sequences of both variable regions were then analyzed. An NCBI BLAST

引文格式:

高珺珊, 吴清平, 梁燕惠, 等. 食源性诺如病毒单克隆抗体可变区基因克隆及结构特征分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 29-35, +363

GAO Junshan, WU Qingping, LIANG Yanhui, et al. Gene cloning and structural analyses of the variable regions of a monoclonal antibody against foodborne norovirus [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 29-35, +363

收稿日期: 2021-11-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31872912); 广东省自然科学基金杰出青年基金项目(2019B151502065); 广东省重点领域研发计划项目(2019B020209001); 国家重点研发计划项目(2018YFC1602500)

作者简介: 高珺珊(1990-), 女, 硕士研究生, 研究实习员, 研究方向: 食源性病毒免疫检测方法, E-mail: gaojs1011@qq.com

通讯作者: 吴清平(1962-), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 微生物安全与健康, E-mail: wuqp203@163.com; 共同通讯作者: 薛亮(1982-),

男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食源性病毒危害机制与防控关键技术, E-mail: xueliang@gdim.cn

comparison confirmed that the amplified VH and VL sequences were of mouse antibody variable regions. Using the VBASE2 database to analyze the variable region-encoding gene structures further, the positions of the three amplified complementarity-determining regions and four amplified framework regions on VH and VL were confirmed to be complete. The VH gene was 360 bp long, encoded 120 amino acids, and belonged to the IGHV3-2*02 family. The VL gene was 339 bp long, encoded 113 amino acids, and belonged to the IGV1-135*01 family. Through molecular docking experiments, it was found that D108 (the key amino acid residue) of the antibody VH chain bonded to N195 of the viral capsid P protein through hydrogen bonding. The successful amplification of the VH and VL fragments of this monoclonal antibody against foodborne norovirus has promoted the development of genetically engineered antibodies and the application of new microbial detection and control technologies for ensuring food safety.

Key words: food safety; foodborne norovirus; monoclonal antibody; variable region; gene cloning

食源性诺如病毒 (Norovirus, NoV) 是全球引起贝类、浆果、沙拉等多类食品安全事件的重要微生物污染物。据世界卫生组织统计 (2007~2015), 诺如病毒在全球引发食源性疾病的各类病原中列首位 (占总病例数 20.7%)^[1], 尤易引起群体性食品安全事件的暴发, 社会与经济损失巨大^[2,3]。我国是诺如病毒流行和导致食品安全事件的重要地区之一, 在大多数省市被证实是引发食源性疫情的主要病原, 对广大民众的健康造成了极大危害^[4-7], 已成为当今食品安全研究中的最薄弱环节之一。

抗体是食源性诺如病毒检测和控制技术的重要基础。在食品安全检测领域, 诺如病毒抗体被广泛用于开发新型的免疫检测技术。例如, Alhadrami 等^[8]利用金纳米标记诺如病毒特异性抗体开发了一种棉签可视化纳米检测方法, 可用于多种食品样品 (黄瓜、生菜和鸡肉) 中诺如病毒的检测。Baek 等^[9]使用特异性多肽作为识别元件, 开发了一种高灵敏度的电化学生物传感器, 可用于牡蛎中诺如病毒的检测, 最低检测限为 1.7 copies/mL。其中单克隆抗体 (mAb) 在生物医学领域对感染性疾病的诊断和治疗都发挥了重要作用^[10]。由于诺如病毒变异快且缺乏稳定的体外细胞培养体系及小动物感染模型, 使其特异性抗病毒治疗的发展远远落后于其他食源性病毒病原体^[11]。但研究者建立了一种受体阻断试验, 通过检测抗体是否具有阻断诺如病毒样颗粒 VLP 与组织血型抗原 HBGAs 结合的能力, 从而确定是否为中和抗体, 该方法已被证明是体外中和试验的一种有效的替代方法^[12-14]。因此诺如病毒抗体的研究对抗体改造具有重要作用。

每个抗体分子由两条相同的重链和轻链组成, 包括三个功能结构域。两个抗原结合域 (Fabs) 决定高亲和力地结合特定的分子靶标, 而可结晶区域 (Fc) 则与细胞受体结合来激发生物功能。Fab 上的重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL) 包含三个互补决定区 (CDR), 为抗原结合域的高变序列, 决定抗体可以特异性针对靶抗原。单链抗体 (ScFv) 就是由 VH、

VL 和链间二硫键组成。在结构上, 其具有一定的弹性及蛋白酶抗性, 存在抗原结合位点, 利用重组蛋白表达系统可以实现抗体低成本快速生产^[15,16]。

本团队前期在对我国食源性诺如病毒遗传多样性研究的基础上, 成功制备了针对 GII.4、GII.17 等主要流行基因型的高效单克隆抗体^[17,18]。然而单克隆抗体基因的克隆是人工设计和制备改造抗体的关键环节。因此在本研究中, 以食源性诺如病毒 GII.17 型 1E3 高效单克隆抗体为对象, 克隆并系统分析了其重链和轻链可变区基因序列和结构特征, 以期制备可应用于食品安全检测和控制领域基因工程抗体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 细胞株、载体及细胞

分泌食源性诺如病毒 GII.17 型单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1E3 为本实验室制备并保存, PMD19-T 克隆载体及 DH5 α 感受态细胞购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 主要试剂

细胞总 RNA 提取试剂盒及单组份 TMB 显色液, 北京天根生化科技有限公司; 凝胶 DNA 小量回收试剂盒, 美基生物有限公司; 高糖 DMEM 及南美胎牛血清, 美国 Gibco 公司; PBS 缓冲液、PBST 缓冲液、ELISA 包被液及 ELISA 终止液, 北京索莱宝科技有限公司; 辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠 IgG 抗体, 北京博奥森生物有限公司; PrimeSTAR Max DNA Polymerase、Extaq Polymerase、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 大连宝生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养

取出一支液氮冻存的分泌 GII.17 型诺如病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株 1E3, 37 °C 水浴使其融化, 150

r/min 离心 10 min, 弃上清, 细胞沉淀用含有 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的高糖 DMEM 完全培养基重悬, 细胞悬液铺于 96 孔细胞板传代培养, 再将传代的细胞转移至 24 孔板, 每孔补充上述培养基至 1 mL, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2.2 杂交瘤细胞分泌抗体评价

利用间接 ELISA 方法测定上述 24 孔板内复苏培养的 1E3 细胞上清是否正常分泌 GII.17 型诺如病毒单克隆抗体, 首先取 96 孔 ELISA 板用 1 μg/mL 的 GII.17 P 颗粒 100 μL 于 4 °C 包被 12 h, 然后用 PBST 洗板 3 次, 每次 5 min。再用现配的 5%脱脂牛奶 200 μL/孔于 37 °C 静置封闭 2 h, PBST 洗板 3 次, 每次 5 min。取孔板内杂交瘤细胞长至 70%左右的细胞上清稀释 100 倍, 稀释液以 100 μL/孔加入 96 孔板中, 同时以加入 100 μL PBS 缓冲液作为阴性对照孔, 在 37 °C 下静置孵育 1 h。用 PBST 洗板 4 次, 每次 5 min。加入 3000 倍稀释的辣根过氧化物酶偶联山羊抗小鼠 IgG 抗体, 在 37 °C 静置孵育 30 min, 然后洗板 4 次, 每次 5 min。每孔加入单组份 TMB 显色液 100 μL, 避光条件下孵育 10 min, 每孔加入 50 μL ELISA 终止液。酶标仪读取光密度 (OD) 在 450 nm 处的值, 以 P (样品 OD₄₅₀ 值) / N (阴性对照 OD₄₅₀ 值) ≥ 2.1 判定为阳性。

1.2.3 总 RNA 提取及反转录

取一瓶细胞总数大于 5×10⁶ cells 300 r/min 离心 10 min, 弃除全部培养基上清, 并用 PBS 缓冲液清洗两次, 再次 300 r/min 离心 10 min 收集细胞沉淀, 然后按照细胞总 RNA 提取试剂盒说明书操作步骤提取杂交瘤细胞总 RNA, 取 5 μL 总 RNA 为模板, 使用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 进行反转录, 反应条件为: 30 °C 10 min, 42 °C 60 min, 70 °C 15 min, 最终得到 cDNA。

1.2.4 VH 和 VL 基因的扩增及克隆

取两支 PCR 管, 各加入 1.2.1 中 1 μL 的 cDNA 作为模板, 取 25 μL 高保真酶 PrimeSTAR Max DNA

Polymerase, VH 和 VL 的上下游组合引物由上海捷瑞公司合成 (体系中包含每个引物 200 nmol/L) [19], 最终体系用 ddH₂O 补到 50 μL。反应条件为: 95 °C 3 min; 98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 1 min; 72 °C 5 min, 共 30 个循环, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定及胶回收。用 Extaq 将回收产物末端加腺嘌呤后连接至 PMD19-T 载体, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 涂布于加入氨苄、IPTG、X-gal 的琼脂平板, 培养皿倒置于 37 °C 培养箱过夜培养, 挑取白色单菌落进行菌落 PCR 验证, 选取阳性菌落摇菌后送至北京六合华大基因科技有限公司测序验证。

1.2.5 序列比对分析

首先利用 NCBI 数据库 Ig Blast 对测序结果进行比对分析确定 VH 和 VL 基因核苷酸序列, 再利用 IMGT 及 Vbase2 数据库对 VH 和 VL 的氨基酸序列进行分析, 确定 VH 和 VL 基因所属家族, 标识 VH 和 VL 的氨基酸序列高变区域互补决定区 CDR、骨架区域 FR 及关键氨基酸组成。

1.2.6 VH 及 VL 同源建模及分子对接

以诺如病毒衣壳 P 蛋白与本研究获得的单克隆抗体 VL 及 VH 序列为基础, 选择 PDB 数据库中同源性最高的晶体结构为模板, 使用 Modeller 10.2 软件 [20] 进行三维结构模拟, 以及 ZDOCK 2.3.2 软件 [21] 进行分子对接。

2 结果与讨论

2.1 杂交瘤细胞 1E3 分泌诺如病毒抗体检测

杂交瘤细胞具有不稳定性, 长期冻存后复苏、从小孔扩大到大孔的传代过程以及更换新的条件培养, 均有可能导致杂交瘤细胞发生染色体丢失, 从抗体分泌阳性变为阴性。因此要避免对杂交瘤细胞频繁操作, 长期冻存的杂交瘤细胞需要定期复苏筛选阳性克隆后继续冻存, 为满足本实验单克隆抗体可变区扩增需求, 首先必须确定杂交瘤细胞的分泌情况。

表 1 间接 ELISA 方法测定杂交瘤细胞 1E3 细胞上清分泌抗体情况

Table 1 Determination of antibody secreted in the supernatant of hybridoma cell 1E3 of by indirect ELISA method

| No. | OD ₄₅₀ value | | | | | | | |
|-----|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A | 1.202 | 1.206 | 1.177 | 0.087 | 0.098 | 1.294 | 1.099 | 1.124 |
| B | 1.078 | 0.084 | 0.084 | 1.192 | 0.095 | 0.091 | 0.091 | 0.703 |
| C | 0.764 | 0.098 | 0.085 | 0.088 | 0.081 | 0.493 | 0.589 | 0.091 |

取实验室冻存的杂交瘤细胞 1E3 进行分泌抗体情况测定, 利用间接 ELISA 方法, 包被抗原为 GII.17 型诺如病毒单克隆抗体免疫原 P 蛋白, 经测定阴性对照孔 OD₄₅₀ 值为 0.085, 24 孔板稀释 100 倍的杂交瘤

细胞上清与 GII.17 型 P 蛋白反应情况如表 1 所示, 其中 41.67% (10/24) 的孔检测结果为阴性, 包括 A4、B2、B3、B5、B6、B7、C2、C4、C5、C8, 取 OD₄₅₀ 的值大于 1 的阳性孔细胞混合后扩大培养, OD₄₅₀ 的

值大于 1 表明分泌抗体活性较好,将部分细胞冻存后,剩余细胞扩大至单瓶 T25,培养至细胞数大于 5×10^6 cells,可用于细胞总 RNA 提取。

2.2 诺如病毒单克隆抗体 1E3 VH 和 VL 基因的扩增

以反转录的杂交瘤细胞 cDNA 为模板,通过 PCR 对单克隆抗体 1E3 的 VH 和 VL 片段进行扩增,分别得到 360 bp 和 339 bp 的扩增产物,经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果如图 1 所示,两个扩增产物均在 300 bp 左右可见一条清晰条带。单克隆抗体 Ig 分子重链和轻链可变区为近 N 端氨基酸变化较大的区域,每个可变结构域长度从 100 个氨基酸残基到 120 个氨基酸残基不等,故表明扩增产物大小均与预期相符,VH 和 VL 片段均扩增成功。

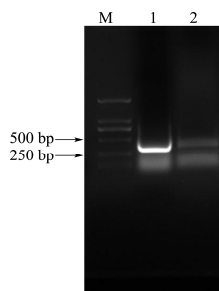


图1 食源性诺如病毒单克隆抗体 1E3 重链可变区及轻链可变区基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification results of VL and VH genes of anti-foodborne NoV mAb 1E3

注: M: DNA marker; 1: IE3 轻链可变区; 2: IE3 重链可变区。

2.3 诺如病毒单克隆抗体 1E3 VH 和 VL 基因的克隆及鉴定

将目的基因回收后,连接至 PMD-19T 载体,连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 后过夜培养,从 LB 抗性平板中挑选阳性克隆进行重组质粒菌落 PCR 鉴定。结果如图 2,菌落 PCR 产物经电泳鉴定后,可见在目的片段大小有特异性条带,各取 3 个阳性菌落摇菌培养过夜后,送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序验证。

表 2 食源性诺如病毒单克隆抗体 1E3 的重链可变区和轻链可变区基因序列在 IMGT 数据库中的比对结果

Table 2 Results for alignment of VH and VL domains of anti-foodborne mAb 1E3 in IMGT database

| 片段名称 | 长度/bp | V segment | Dsegment | J segment |
|------|-------|----------------|--------------|------------|
| VH | 360 | IGHV3-2*02 F | IGHD2-1*01 F | IGHJ4*01 F |
| VL | 339 | IGKV1-135*01 F | / | IGKJ1*01 F |

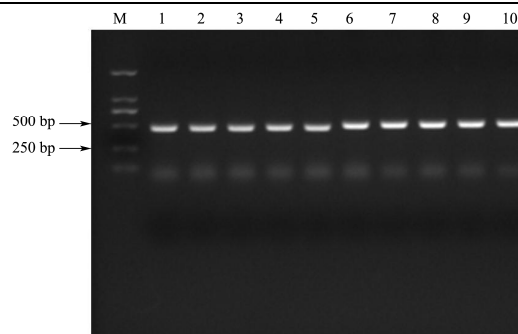


图2 食源性诺如病毒单克隆抗体 1E3 轻链和重链可变区基因菌落 PCR 鉴定

Fig.2 Colony PCR identification of light chain and heavy chain variable region genes of anti-foodborne NoV mAb 1E3

注: M: DNA marker; 1~5: IE3 轻链可变区; 6~10: IE3 重链可变区。

2.4 诺如病毒单克隆抗体 1E3 VH 和 VL 的结构特征

根据测序结果的 IgBlast 比对,确定了 VH 和 VL 结构域的核苷酸序列。VH 基因全长均为 360 bp,编码 120 个氨基酸,属于 IGHV3-2*02 家族;VL 基因全长为 339 bp,编码 113 个氨基酸,属于 IGKV1-135*01 家族。Ig 轻链有两型:k 型与 λ 型,不同种属两型轻链比例不同,小鼠的两型比例为 20:1,1E3 轻链属于 k 型。Ig Blast 数据库基因进行同源性比对,结果发现 VH 基因与小鼠重链可变区基因同源性最高为 97%,VL 基因与小鼠轻链可变区基因同源性最高为 97%,从而确定克隆得到的目标序列为小鼠重链及轻链可变区基因序列。

单克隆抗体中负责高亲和力和特异性的结合抗原的序列在 VH 和 VL 链上,这些序列在抗体与抗原之间差异很大。在可变区内有 6 个环(VH 和 VL 各 3 个),称为 CDR,它们主要负责结合抗原靶标。这些 CDR 平均总计大约 60 个氨基酸残基,长度一般从 7 个氨基酸残基到 25 个残基不等。利用 Ig BlastIMGT 及 Vbase2 数据库分析 1E3 的 VH 和 VL 的氨基酸序列,确定了单克隆抗体 1E3 的 CDR 区域和 FR 框架区域,两者均含有 4 个 FR 区和 3 个 CDR 区,表明序列结构完整。V 基因、D 基因和 J 基因与 IMGT 数据库中最相似的胚系基因如表 2 所示。

```

<-----FR1-IMGT-----><-----CDT1-IMGT-----><--
E S G P G L V K P S Q S L S L T C T V T G Y S I T S D Y A W
GAGTCGGGACCTGGCCTGGTAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACTGCCTGCTACTCAATCACCAGTGATTATGCCTGG
-----FR2-IMGT-----><-----CDR2-IMGT-----><-----
N W I R Q F P G N K L E W M G Y I K Y S G S T S Y N P S L K
AACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAAATACAGTGGTAGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAA
-----FR3-IMGT-----
S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L T S V T T E D T A T Y Y
AGTGGAACTCTATCACTCGAGACATCCAAGAACCAGTCTCTCTGCACTGACCTCTGTGACGACTGAGGACACAGCCACATATTAT
--><-----CDR3-IMGT-----><-----FR4-IMGT----->
C V R Y G N L Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S
TGTGTAAGATATGGTAACCTATATTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA
    
```

图3 食源性诺如病毒单克隆抗体 1E3 重链可变区基因序列、氨基酸序列及 CDR、FR 区域

Fig.3 CDR and FR regions of nucleotide and amino acid sequences of VH gene of anti-foodborne mAb 1E3

```

<-----RF1-IMGT-----><-----CDR1-IMGT-----
T Q S P L T L S V T I G Q P A S I S C K S S Q S K L D S D
TGACTCAGTCTCCAGTCACTTTGTCGGTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTGCAAGTCAAGTCAGAGCAAGTTACATAGTGATG
-----><-----RF2-IMGT-----><CDR2-IM-----
G K T Y L N W L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D S G V
GAAAGACATATTTGAATGGTTGTTACAGAGGCCAGCCAGTCTCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAACTGGACTCTGGAGTCC
-----RF3-IMGT-----><
P D R F T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C
CTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCT
-----CDR3-IMGT-----><-----RF4-IMGT----->
W Q K T H F P Q T F G G G T K L E I K
GGCAAAAACACATTTTCTCAGACGTTTCGGTGGAGGCCAAGCTGAAATAAAAC
    
```

图4 食源性诺如病毒单克隆抗体 1E3 轻链可变区基因序列、氨基酸序列及 CDR、FR 区域

Fig.4 CDR and FR regions of nucleotide and amino acid sequences of VL gene of anti-foodborne NoV mAb 1E3

2.5 影响单克隆抗体功能的关键氨基酸组成分析

单抗分子的氨基酸序列鉴定，二硫键及糖基化位点的确认对于抗体分子的质量十分重要^[22,23]。1E3 的 VH 和 VL 的氨基酸组成如图 5 所示，丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸是 VH 中含量最丰富的氨基酸，分别占 14.2%、12.5%和 10.0%；丝氨酸、亮氨酸和甘氨酸是 VL 中含量最丰富的氨基酸，分别占 12.4%、11.5%和 9.7%。单抗肽链分子中的天冬酰胺残基可以与糖链的还原端连接形成不同糖链结构的糖基化蛋白，也就是 N-糖基化修饰^[24,25]。1E3 的 VH 和 VL 中分别包含 5 个和 1 个天冬氨酸，这些位置可以用于设计嵌合式结构。此外，还需要进一步的研究来确定其他重要的翻译后修饰位点，例如谷氨酸也是一种重要的翻译后修饰的氨基酸，聚谷氨酰化是抗体的可逆修饰，对抗体亲和力和其他生物学特性有一定的影响^[26,27]。

二硫键是一种共价键，抗体分子内均存在链内和链间二硫键，轻链与重链就是由二硫键连接形成得四肽链分子，链内二硫键折叠成球形区域就是抗体的功能区，该区域的氨基酸具有高度的同源性。二硫键是稳定蛋白空间结构的重要因素，同时可以利用二硫键稳定重组抗体来实现其高效表达^[28-30]。VH 和 VL 分子结构中潜在的二硫键位点如表 3 所示，这些残基

可以参与天然分子内和分子外二硫键的形成，并可用于构建含有重、轻链可变区的重组载体。

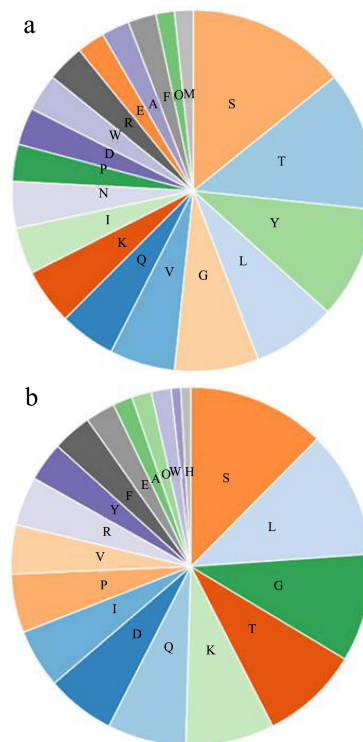


图5 食源性诺如病毒单克隆抗体 1E3 轻链(a)和重链(b)的氨基酸组成

Fig.5 Amino acid compositions of light chain (a) and heavy chain (b) of anti-foodborne NoV mAb 1E3

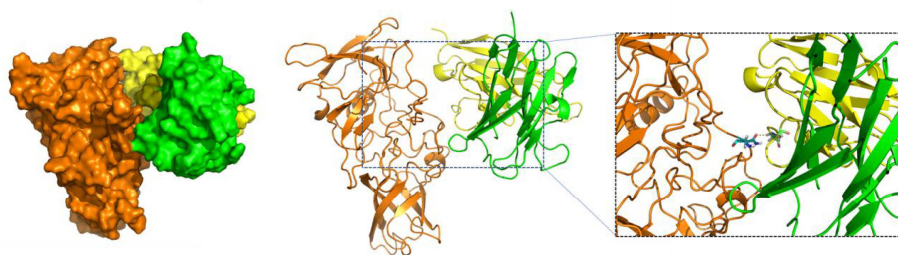


图6 食源性诺如病毒单克隆抗体 1E3 可变区与衣壳 P 蛋白分子对接

Fig.6 Molecular docking between the variable region of anti-foodborne NoV mAb 1E3 and the capsid P protein

表3 食源性诺如病毒单克隆抗体 1E3 的重链可变区分子中的二硫键

| 片段名称 | 氨基酸位置 | 对应序列 |
|------|-------|-------------------------|
| VH | 22-96 | SLSLTCTVTGY-TATYYCVRYGN |
| VL | 23-93 | PASISCKSSQS-LGVYYCQWKTH |

2.6 诺如病毒衣壳 P 蛋白与 VH 和 VL 分子对接

根据数据库比对结果, GII.17 型 P 蛋白、1E3 的 VL 链和 VH 链分别采用 6EWB^[31]的 D、L 和 H 链为模板, P 蛋白与抗体 VH 和 VL 分子对接结果如图 6 所示, 可见 GII.17 P 蛋白抗原结合在 VH 和 VL 形成的腔体内。分子对接分析表明抗原-抗体作用能为 -885.0 kcal/mol, 其中范德华相互作用能为 -20.6 kcal/mol, 静电相互作用能为 -864.5 kcal/mol。抗体重链位点 D108 通过氢键与病毒衣壳 P 蛋白上 N195 结合固定了抗原与抗体的结合构像, 为抗体识别 P 蛋白抗原的关键氨基酸残基。

3 结论

3.1 食源性诺如病毒是全世界非细菌性胃肠炎和食源性疾病的重要病因, 贝类、浆果、生菜、水产品都是其传播媒介。但目前无论是减缓病毒在人群中的传播, 还是预防或治疗免疫缺陷者的感染, 都没有有效的抗病毒疗法。此外, 目前还没有进行正式的抗诺如病毒药物临床试验。人工改造抗体药物是目前的研究热点, 其中以柔性接头连接单克隆抗体重链和轻链可变区的 ScFv 可以实现在体外稳定高效的表达, 因此抗体的测序分析至关重要。本研究以分泌食源性诺如病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞 1E3 为基础, 成功扩增并克隆了 1E3 的重链可变区和轻链可变区序列。通过 Ig blast 中 IMGT 数据库比对测序结果, 证明扩增的 VH 和 VL 序列为小鼠抗体可变区序列, 其中 VH 基因全长均为 360 bp, 编码 120 个氨基酸; VL 基因全长为 339 bp, 编码 113 个氨基酸。进一步确定了 VH 和 VL 基因具有完整的 CDR 和 FR 区域, 两者均有含

有 4 个 FR 区和 3 个 CDR 区, 其中 VH 属于 IGHV3-2*02 家族, VL 属于 IGKV1-135*01 家族。

3.2 通过关键氨基酸组成分析, 确定苏氨酸和酪氨酸是 VH 中含量最丰富的氨基酸, 分别占 14.2%、12.5% 和 10.0%; 丝氨酸、亮氨酸和甘氨酸是 VL 中含量最丰富的氨基酸, 分别占 12.4%、11.5% 和 9.7%。适合设计嵌合式结构的关键位点天冬氨酸, 1E3 的 VH 和 VL 中分别包含 5 个和 1 个。VH 和 VL 分子结构中各还有一个潜在的二硫键位点, 并可用于构建含有重、轻链可变区的重组载体。GII.17 型 P 蛋白与 1E3 抗体可变区分子对接结果表明抗体重链上位点 D108 通过氢键与病毒衣壳 P 蛋白上 N195 结合, 为抗体识别 P 蛋白抗原的关键氨基酸残基。综上所述, 食源性诺如病毒单克隆抗体 VH 和 VL 片段基因序列的分析对食源性诺如病毒单链抗体的克隆表达及抗体的精准改造具有重要意义。

参考文献

- [1] Organization W H. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015 [J]. World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/199350>
- [2] Bartsch S M, O'shea K J, Lee B Y. The clinical and economic burden of norovirus gastroenteritis in the United States [J]. Journal of Infectious Diseases, 2020, 222(11): 1910-1919
- [3] Van Beek J, De Graaf M, Al-Hello H, et al. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network [J]. Lancet Infectious Diseases, 2018, 18(5): 545-553
- [4] Zhou H, Zhen S, Wang J, et al. Burden of acute gastroenteritis caused by norovirus in China: a systematic review [J]. Journal of Infection, 2017, 75(3): 216-224
- [5] Xue L, Cai W, Gao J, et al. The resurgence of the norovirus GII.4 variant associated with sporadic gastroenteritis in the post-GII.17 period in south China, 2015 to 2017 [J]. BMC Infectious Diseases, 2019, 19(1): 696-696

- [6] Patel M M, Widdowson M A, Glass R I, et al. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(8): 1224-1231
- [7] Ahmed S M, Hall A J, Robinson A E, et al. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14(8): 725-730
- [8] Alhadrami H A, Al-Amer S, Aloraij Y, et al. Development of a simple, fast, and cost-effective nanobased immunoassay method for detecting norovirus in food samples [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(21): 12162-12165
- [9] Baek S H, Kim M W, Park C Y, et al. Development of a rapid and sensitive electrochemical biosensor for detection of human norovirus via novel specific binding peptides [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2019, 123: 223-229
- [10] Gao Y, Huang X, Zhu Y, et al. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2018, 39(4): 351-364
- [11] Richardson C, Bargatze R F, Goodwin R, et al. Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2013, 12(2): 155-167
- [12] Harrington P R, Lindesmith L, Yount B, et al. Binding of Norwalk virus-like particles to ABH histo-blood group antigens is blocked by antisera from infected human volunteers or experimentally vaccinated mice [J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(23): 12335-12343
- [13] Bernstein D I, Atmar R L, Lyon G M, et al. Norovirus vaccine against experimental human GII.4 virus illness: a challenge study in healthy adults [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2015, 211(6): 870-878
- [14] Atmar R L, Bernstein D I, Lyon G M, et al. Serological correlates of protection against a GII.4 Norovirus [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2015, 22(8): 923-929
- [15] Han D H, Wu J H, Han Y H, et al. A novel anti-PSMA human scFv has the potential to be used as a diagnostic tool in prostate cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 59471-59481
- [16] Dong S, Bo Z, Zhang C, et al. Screening for single-chain variable fragment antibodies against multiple Cry1 toxins from an immunized mouse phage display antibody library [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(7): 3363-3374
- [17] 高珺珊,薛亮,蔡伟程,等.基于 GII.4 型诺如病毒 P 蛋白的 GII 型广谱单克隆抗体制备及应用[J].*病毒学报*,2020,47:1-9
- GAO Junshan, XUE Liang, CAI Weicheng, et al. Preparation and application of GII norovirus broad-spectrum monoclonal antibody based on GII.4 norovirus P protein [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2020, 47: 1-9
- [18] 高珺珊,薛亮,左月婷,等.诺如病毒常见流行株胶体金免疫层析快速检测方法[J].*微生物学通报*,2020,47(8):2665-2672
- GAO Junshan, XUE Liang, ZUO Yueting, et al. Colloidal gold immunochromatographic assay for rapid detection of Norovirus epidemic strains [J]. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2665-2672
- [19] Bialon M, Schellenberg L, Herzog N, et al. Cloning murine antibody V-genes with non-degenerate primers and conversion to a recombinant antibody format [J]. *Monoclonal Antib Immunodiagn Immunother*, 2014, 33(6): 369-377
- [20] Fiser A, Do R K, Sali A. Modeling of loops in protein structures [J]. *Protein Science*, 2000, 9(9): 1753-1773
- [21] Chen R, Weng Z. A novel shape complementarity scoring function for protein-protein docking [J]. *Proteins-structure Function and Genetics*, 2003, 51(3): 397-408
- [22] Panina A A, Aliev T K, Shemchukova O B, et al. New monoclonal antibodies to the Ebola virus glycoprotein: Identification and analysis of the amino acid sequence of the variable domains [J]. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2016, 467(1): 117-120
- [23] Wang S H, Kaltashov I A. Identification of reduction-susceptible disulfide bonds in transferrin by differential alkylation using O-16/O-18 labeled iodoacetic acid [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2015, 26(5): 800-807
- [24] Rugmani, Padmanabhan, Iyer, et al. N-Glycosylation influences transport, but not cellular trafficking, of a neuronal amino acid transporter SNAT1 [J]. *Biochemical Journal*, 2016, 473(22): 4227-4242
- [25] Phillips J J, Buchanan A, Andrews J, et al. Rate of asparagine deamidation in a monoclonal antibody correlating with hydrogen exchange rate at adjacent downstream residues [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(4): 2361-2368
- [26] Janke C, Rogowski K, Van Dijk J. Polyglutamylolation: a fine-regulator of protein function? Protein modifications: beyond the usual suspects' review series [J]. *Embo Reports*, 2008, 9(7): 636-641
- [27] Behrens C R, Liu B. Methods for site-specific drug conjugation to antibodies [J]. *MAbs*, 2014, 6(1): 46-53