

西维因单链抗体同源建模及与西维因对接模拟研究

何扩^{1,2}, 张秀媛², 杜欣军¹, 王俊平¹, 周晓楠¹

(1. 天津科技大学教育部食品营养与安全重点实验室, 天津 300457) (2. 河北北方学院, 河北张家口 075000)

摘要: 抗体的结构决定其功能, 由于目前没有西维因抗体结晶结构的解析导致其与抗原结合机理不清楚, 严重影响 ELISA 检测技术中对抗体特异性能的改造。本研究应用分子模拟与对接技术预测西维因单链抗体的三维结构及其与西维因分子的结合模式, 采用同源建模方法首先获得西维因单链抗体的三维结构, 然后采用分子对接技术将三维结构模型与西维因分子进行对接。结果表明, 结合过程中 H-CDR2、H-CDR3 和 L-CDR2 形成一个疏水型的凹槽, 疏水型的凹槽助推西维因分子与之结合并将西维因分子牢固地卡在里面, 可能的结合位点由 Ala51、Ser52、Ile51、Gly 54、Ser56、Arg98、Gly 100 等氨基酸残基组成。为深入认识西维因分子与其抗体相互作用机理提供了理论指导, 并为下一步西维因单链抗体体外亲和力的成熟奠定基础。

关键词: 西维因单链抗体; 西维因; 同源建模; 分子对接

文章编号: 1673-9078(2014)6-59-63

Homology Modeling of Anti-carbaryl ScFv and Molecular Simulation Study between ScFv and Its Antigen Carbaryl

HE Kuo^{1,2}, ZHANG Xiu-yuan², DU Xin-jun¹, WANG Jun-ping¹, ZHOU Xiao-nan¹

(1. Ministry of Education Key Laboratory of Food Nutrition and Safty, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China) (2. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Functions of antibody are determined by its structure. However, the interaction mechanism is still not known since no carbaryl antibody crystallization was analyzed, which severely affects its application in ELISA detection. This study aimed to predict the 3D structure and binding mode of anti-carbaryl scFv with antigen. The molecular modeling and docking technology were employed by utilizing relative bioinformatics tools and on-line resources. The results showed a hydrophobic groove was formed by H-CDR2, H-CDR3 and L-CDR2, which block in carbaryl firmly. The binding site was composed of Ala51, Ser52, Ile51, Gly54, Ser56, Arg98 and Gly100, etc. These data highlighted the mechanism of interaction between anti-carbaryl antibody and antigen. Furthermore, it provides guidance for *in vitro* affinity maturation of anti-carbaryl antibody.

Keywords: anti-carbaryl scFv; carbaryl; homology modeling; molecular docking

西维因 (carbaryl), 又名胺甲萘, 是世界上使用最为广泛的氨基甲酸酯类杀虫剂之一, 广泛应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物等的害虫防治。它是一种接触性杀虫剂, 兼有内吸活性, 如残留在体内, 能抑制胆碱酯酶, 使乙酰胆碱在组织中蓄积, 进而导致流涎、恶心、流泪、瞳孔缩小、视力模糊、痉挛等, 甚至造成致畸、慢性神经中毒等严重危害, 其在作物、蔬菜和环境残留会对人体健康造成较大的危害^[1-2]。

西维因在食品和环境中的残留已引起世界各国的重视, 很多国家已经制定了其在食品中的残留标准, 西维因的检测方法更是食品学科研究的热点。目前用于检测西维因残留的方法很多, 常用的检测方法包括气

相色谱、高效液相色谱以及色谱与质谱联用等技术^[3-4], 但是这些检测方法的样品前处理技术复杂、耗时、耗力, 必须有专业人员在专门的实验室操作, 大大影响了实时性, 导致市场监测的滞后因此它们的应用受到限制。而酶联免疫分析技术作为一种较为先进的小分子物质检测方法, 以其灵敏度高、适合于检测大量样品以及成本低、无需大型昂贵仪器设备等优点, 近年在国内外已被广泛应用。

目前还没有关于农兽药抗体的结晶结构的解析的报道, 西维因抗体与其抗原的结合机理了解甚少。导致在 ELISA 检测技术中小分子半抗原的设计存在很大误差以及对抗体的改造存在困难, 从而影响抗体的特异性。本研究中, 我们从特异性的西维因杂交瘤细胞中提取 mRNA, 以针对鼠源重链可变区 (VH) 及轻链可变区 (VL) 基因的兼并引物扩增获得 VH 和

收稿日期: 2014-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20905058)

作者简介: 何扩 (1978-), 男, 在读博士, 研究方向: 抗体免疫检测技术

VL 可变区基因, 采用重叠延伸 PCR 拼接为全长 scFv (单链抗体) 基因片段并测序; 根据 scFv 基因序列寻找合适的建模模板, 采用 SwissModel 软件进行同源建模, 获得的西维因 scFv 的三维结构通过 PROCHECK 软件进行模型评价; 最后将评价合理的西维因 scFv 建模结构与西维因分子通过分子对接来阐述抗原抗体结合机理, 以期今后为增强西维因抗体特异性奠定基础。



图 1 西维因的分子结构

Fig.1 The structure of carbaryl

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞株

西维因杂交瘤细胞本实验室制备; pGEM-T-Easy 质粒购买于 Promega 公司; pCANTAB5E 购自北京宝科维安生物技术有限公司; 大肠杆菌 JM109 购自 Takara。

1.1.2 主要试剂

Sfi I 限制性内切酶、Not I-HF 限制性内切酶购自 NEB 公司; GoScript 反转录系统购自 Promega 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、RNeasy Midi kit、Oligotex mRNA Mini Kit、QIA quick PCR Purification Kit 购自 Qigen 公司; 质粒提取试剂盒购自康为世纪; 氨苄青霉素钠购自 BBI 公司。

1.1.3 引物合成

本实验扩增所用引物是参考 NCBI 网站上的小鼠抗体基因数据和在王俊平^[5]所用引物的基础上利用 Primer5 和 Mega 软件设计的兼并引物, 并由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 西维因单链抗体扩增引物

Table 1 Anti-carbaryl scFv amplification primers

引物名称	引物序列
VH-Back	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG
VH-For	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCC
VK-Back	GACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA
MJK1-FONX	CCGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC
MJK2-FONX	CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC
MJK4-FONX	CCGTTTTATTTCCAACCTTGTCCC
MJK5-FONX	CCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC
VH-BACK-sfi	GTCCTCGCAACTGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTSMA RCTGCAGSAGTCWGG
JK1-NotI	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTGTATTCCAGCTTGGTGCC
JK2-NotI	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTTCCAGCTTGGTCCC
JK4-NotI	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTATTTCCAACCTTGTCCC
JK5-NotI	GAGTCATTCTGCGGCCGCCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC
Linker	GGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTACAGGC GGAGGTGGCTCTGGCGTGGCGGATCGGACATTGAGCTCACCCAGTCTCCA
pCANTAB5E-R1	CCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC
pCANTAB5E-R2	CGATCTAAAGTTTTGTCTGCTTTCC

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取

将西维因杂交瘤细胞培养至取 $10^6 \sim 10^7$, 1000 rpm, 5 min 离心沉淀细胞, 弃尽残液, 利用 RNeasy Midi kit 试剂盒提取总 RNA^[6]。

1.2.2 VH、VL 基因扩增与鉴定

采用 promega 公司的 GoScript Reverse Transcription System 进行反转录合成第一链 cDNA, 以 cDNA 为模板, 以 VH、VL 的前后游引物 PCR 扩增 VH 和 VL 基因。反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。

反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶回收目的片段。

1.2.3 全长 scFv 基因拼接及 PCR 扩增

通过两步法将 VH、VL 进行重叠延伸连接为一条单链可变区抗体 scFv 基因片段。取 50 ng 的 VH、VL 片段互为模板，重叠延伸 PCR 反应将 VH、VL 随机拼接成 scFv，第一次 PCR 反应条件为：94 °C 1 min，63 °C 1 min，68 °C 1 min，反应进行 20 个循环；随后以 scFv (Back)和 scFv (For)为引物，第二次 PCR 扩增 scFv，反应条件为：94 °C 1 min，53 °C 1 min，72 °C 1 min，循环 30 次。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶回收目的片段。

1.2.4 scFv 连接 pCANTAB5E

将胶回收片段 scFv 和载体质粒 pCANTAB5E 分别采用 *Sfi* I、*Not* I 限制性内切酶双酶切，PCR 产物回收后，采用 T4DNA 连接酶将 scFv 和 pCANTAB5E 连接起来，转化大肠杆菌 JM109^[7]，筛选阳性克隆后送北京金唯智生物科技有限公司测序。

1.2.5 西维因单链抗体的同源建模

西维因单链抗体采用 ExPASy 系统中 SOMPA 软件分析该抗体二级结构，采用 SwissModel 软件进行单链抗体同源建模，采用 PROCHECK 软件进行模型评价^[8~9]。

1.2.6 单链抗体与西维因分子对接

采用分子对接软件 Discovery Studio（天津医药联合研究院提供使用）将单链抗体模型与西维因进行分子对接，用 ChemDraw 软件画出西维因分子结构，用 ChemDraw3D 软件^[10]转换为 .pdb 文件格式后用于对接，首先对单链抗体进行除水加氢等处理，设置球半径为 9，其他参数为默认值。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

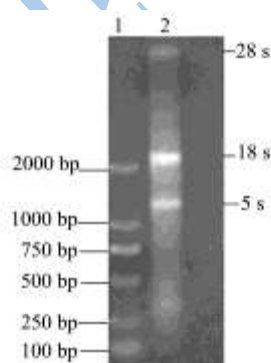


图 2 西维因特异性杂交瘤细胞总 RNA

Fig.2 Total RNA from carbaryl specific hybridoma

注：1：Marker 2000；2：西维因杂交瘤细胞总 RNA

使用 RNA 提取试剂盒从西维因杂交瘤细胞中提取总 RNA，1%琼脂糖凝胶由 DEPC 水处理，在无 RNA 酶的电泳槽中进行 RNA 电泳检测检测，如图 2 所示，可观察到清晰的 28 s、18 s、5 s 三条带。通过电泳检测，说明提取的总 RNA 完整度较好。

2.2 VH 和 VL 片段扩增

总 RNA 经过纯化获得 mRNA，以 mRNA 为模板，反转录获得 cDNA，又以 cDNA 为模板，利用设计的兼并引物扩增 VH 和 VL，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测，结果如图 3，扩增的 VH 片段大小 360 bp 左右，扩增的 VL 片段大小约为 320 bp，与预期结果相符。

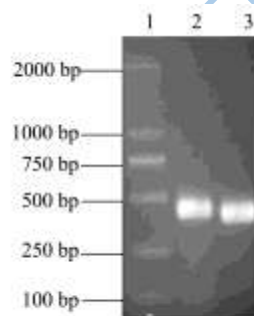


图 3 西维因抗体的 VH 和 VL 片段的 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification of VH and VL

注：1：D2000 marker；2：西维因抗体 VH 片段；3：西维因抗体 VL 片段。

2.3 PCR 扩增 scFv

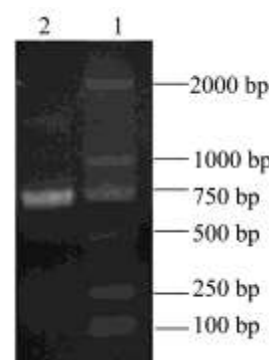


图 4 西维因 scFv 的扩增

Fig.4 PCR amplification of scFv gene

注：1：D2000 marker；2：西维因 scFv 片段

经 PCR 扩增获得 VH 和 VL 的 PCR 产物经胶回收，通过重叠延伸 PCR 技术将 VH 与 VL 通过 linker 连接获得 scFv 片段，结果如图 3 所示。scFv 片段大小约为 750 bp 左右且条带清晰，与预期结果相符。

2.4 阳性克隆筛选及测序

将胶回收的 scFv 进行 Sfi I、Not I 限制性内切酶双酶切，与同样双酶切的 pCANTAB5E 载体连接，再转化大肠杆菌 JM109，筛选阳性克隆后测序，阳性克隆筛选结果 5 所示，阳性克隆采用 pCANTAB5E-R1 和 pCANTAB5E-R2 作为引物鉴定片段大小约为 1000 bp 即为阳性克隆，挑取的 10 个单克隆 9 个为阳性克隆，计算阳性率为 90%。测序与单链抗体分区结果如图 6 所示。

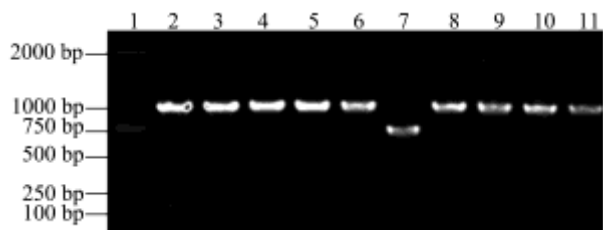


图 5 scFv-pCANTAB5E 菌落 PCR 检测

Fig.5 PCR detection of scFv-pCANTAB5E positive clones

注：1：D2000 marker；2~11：单克隆菌落 PCR 产物。

```

VH
QVNLQESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHVVRQAPEKGLIEWVAIVISSPSTLHYADTVKGRFT
          CDR1                      CDR2
ISRDNPKNLFLQMTLSRSEDATMYICARWGNYPHYAMDYWGQGISVTYSS
          CDR3
VL
DIVLTQSPKMSMSVSGREVLTICKASENYVYTYVSWYQQKPEQSPKLLTVGASNRYTGVPRDFTGSGSAT
          CDR1                      CDR2
DETLTISSVQAEDLADYHCGQQYSPYTFGGGT
          CDR3
    
```

图 6 阳性克隆的序列与分区

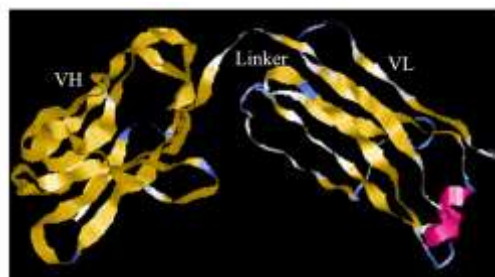
Fig.6 The sequence of positive clones and partition

2.5 三维建模及空间结构预测

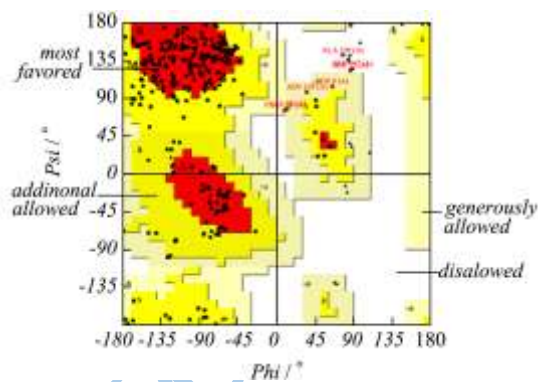
采用 SwissModel 软件进行建模，IIGY 作为同源建模的模板分子，然后采用 PROCHECK 软件进行合理性验证，得到的模型和评价如图 7 所示。该抗体由 α 螺旋 16 处； β 折叠 93 处； β 转角 23 处；随机卷曲 90 处；抗氧氟沙星单链抗体三维结构模拟图如图 7a 所示，其结构由 VL、VH 和 Linker 三部分组成，符合典型 scFv 的三维结构，PROCHECK 程序对三维模型中主链构型中的 Φ -二面角的分布进行分析，结果如图 7b 显示，在可信区间(Most favored regions)内有 89.7% 的氨基酸残基；在不可信区间(Disallowed regions)内有 2.5% 氨基酸残基，以上结果表明，所得的西维因单链抗体三维结构合理^[11~12]。

2.6 分子对接

在同源建模所得西维因单链抗体三维结构的基础上，将西维因分子与该模型进行分子对接计算，结果如图 8a 和 b 所示。



a



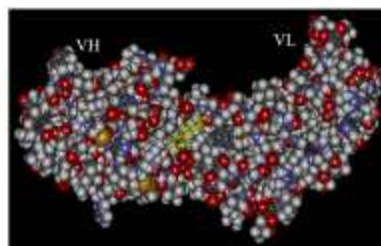
b

图 7 氧氟沙星单链抗体三维结构及 Ramachandran 图

Fig.7 Three-dimensional model of Scfv and Ramachandran plot



a



b

图 8 西维因单链抗体与西维因分子对接结果

Fig.8 Docking results of small molecules and their scFv

VH 和 VL 的 H-CDR2、H-CDR3 和 L-CDR2 形成一个疏水型的凹槽，形成的疏水型环境推动配体西维因分子与其结合；凹槽性的口袋将西维因分子两端牢固地斜卡在在里面，西维因的萘基端与单链抗体的 VH

作用,左端苯环基本完全被埋在 VH 里, H-CDR2 中的 Arg98 和 Gly100 与其相结合,特别是 Arg98 是一个长链残基,它的 C-C 与 C-N 键可以随意翻转而改变构象,从而影响西维因单链抗体的亲和力。右端苯环裸露平躺在凹槽中, H-CDR3 中 Ile51、Gly54、Ser56 与其相互作用;西维因的甲基氨基甲酸酯端与 VL 作用,其 N1 与 Ala51 作用, C11 与 Ser52 作用, C12 和 O2 被扭曲裸露出凹槽。此外,对接显示除了氢键和分子间疏水相互作用是影响其识别及结合稳定性重要因素。

3 结论

以苯巴比妥抗体晶体结构 (ID:1IGY) 为模板,采用同源建模方法首次建模了西维因单链抗体的三维结构,模型结构经 Ramachandran 图验证合理精确。采用分子对接技术找到了抗体的活性位点,并定位了活性位点的重要功能残基,可能的活性结合位点由 Ala51、Ser52、Ile51、Gly54、Ser56、Arg98、Gly100 等残基组成。结合过程中 H-CDR2、H-CDR3 和 L-CDR2 形成一个疏水型的凹槽推动西维因分子并牢固地卡在里面,本研究为深入认识西维因分子与其抗体相互作用机理提供了理论指导,并为下一步西维因单链抗体体外亲和力的成熟奠定基础。

参考文献

- [1] 张一宾,张悱,等.农药[M].北京:中国物质出版社,1997
ZHANG Yi-bin, ZHANG Yi, et al. Pesticide [M]. Beijing: Material of china publishinghouse, 1997
- [2] Alcocer M J, Dillon P P, Manning B M, et al. Use of phosphonic acid as a generic hapten in the production of broad specificity anti-organophosphate pesticide antibody [J]. J. Agric. Food Chem., 2000, 48(6): 2228-2233
- [3] Brooks M W, Tessier D, Soderstrom D, et al. A rapid method for the simultaneous analysis of chlorpyrifos, isofenphos, carbaryl, iprodion and triadimenfon in groundwater by solid-phase extraction [J]. J. Chromatogr. Sci., 1990, 28: 487-489
- [4] Strait J R, Thornwall G C, Ehrich M. Sensitive high performance liquid chromatography analysis for toxicological studies with carbaryl [J]. J. Agric. Food Chem., 1991, 38: 710-713
- [5] 王俊平,张伟伟,王硕,等.西维因单链抗体基因克隆、表达及活性分析[J].食品工业科技,2010,11:161-164
WANG Jun-ping, ZHANG Wei-wei, WANG Shuo, et al. Cloning, expression and activity analysis of single chain variable fragment (scFv) against carbaryl [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 11: 161-164
- [6] DONG Jie-xian, LI Zhen-feng, LEI Hong-tao, et al. Development of a single-chain variable fragment-alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of ractopamine in pork [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 736: 85-91
- [7] XU Zhen-lin, DONG Jie-xian, WANG Hong, et al. Production and characterization of a single-chain variable fragment linked alkaline phosphatase fusion protein for detection of o, o-diethyl organophosphorus pesticides in a one-step enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60: 5076-5083
- [8] Ginalski K, Grishin N V, Godzik A, et al. Practical lessons from protein structure prediction [J]. Nucleic. Acids Res., 2005, 33: 1874-1891
- [9] Tramontano A, Morea V. Assessment of homology-based predictions in CASP5 [J]. Proteins, 2003, 53(Suppl 6): 352-368
- [10] 涂追,许杨,付金衡,等.抗DON单域重链抗体序列分析及三维建模与对接[J].江苏农业学报,2011,27(4):893-898
TU Zhui, XU Yang, FU Jin-heng, et al. Sequence analysis, 3-D modeling and molecular docking of anti-deoxynivalenol single-domain heavy chain antibody [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Science, 2011, 27(4): 893-898
- [11] Petey D, Hong B. Protein structure prediction: inroads to biology [J]. Mol Cell, 2005, 20(6): 811-819
- [12] Clark L A, Ganesan S, Papp S, et al. Trends in antibody sequence changes during the somatic hypermutation process [J]. J. Immunol., 2006, 177(1): 333-340