

## 狂犬病人源二硫键稳定单链抗体融合蛋白的构建及活性检测

杨瑞梅<sup>1,2</sup>, 杨松涛<sup>2\*</sup>, 王承宇<sup>2</sup>, 高玉伟<sup>2</sup>, 单虎<sup>1</sup>, 夏咸柱<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109

<sup>2</sup>军事医学科学院军事兽医研究所, 长春军事兽医研究所, 长春 130062

**摘要:**【目的】构建、表达人源二硫键稳定单链抗体(scdsFv), 检测其生物活性, 以获得对狂犬病病毒有特异结合能力及中和活性的 scdsFv 蛋白。【方法】从 GenBank 上获得 RV 单抗 SO57 重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 序列, 在 VH44 和 VL100 位各突变一个氨基酸为半胱氨酸, 用 linker 连接形成 scdsFv, 人工合成此序列, 克隆入表达载体 pET22b(+), 在大肠杆菌中表达目的蛋白, 镍柱亲和层析法纯化, 并进行 SDS-PAGE、Western blot 鉴定。ELISA 法和鼠脑组织抹片方法检测 scdsFv 对 RV 的特异结合活性; 硫氰酸盐洗脱法测定 scdsFv 蛋白对 RV 的相对亲和力指数; 分别用荧光抗体病毒中和试验(FAVN)和小鼠体内中和试验测定 scdsFv 的体外和体内中和活性。【结果】成功获得 RV 人源二硫键稳定单链抗体序列, 大肠杆菌中表达得到 scdsFv 蛋白; 分子量约为 30.0 kDa, Western blot 表明此蛋白能与抗 His 单克隆抗体发生特异性反应。scdsFv 能与 RV Vero 疫苗特异结合, 且结合力随抗原浓度降低而降低; scdsFv 能与鼠脑组织中的 RV 结合。FAVN 法测得 scdsFv 的中和效价为 41 IU/mL; 小鼠体内中和试验表明 scdsFv 能保护 55.6% 鼠耐过强毒攻击。【结论】获得的 scdsFv, 具有良好的 RV 结合活性和体内外中和活性, 有可能被用于暴露后狂犬病的预防。

**关键词:**狂犬病毒, 二硫键稳定单链抗体, G 蛋白, 中和活性

**中图分类号:** Q939.97      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209(2011)01-0098-07

狂犬病是由狂犬病毒(Rabies virus, RV)引起的人兽共患传染病, 一旦发病病死率几乎 100%。对狂犬病暴露后的预防主要采用清水冲洗伤口和紧急注射狂犬病疫苗; 对严重暴露者, 同时注射抗狂犬病病毒免疫球蛋白等方法。目前临床使用的抗 RV 免疫球蛋白有两类: 人抗狂犬病病毒免疫球蛋白(HRIG)和马抗狂犬病病毒免疫球蛋白(ERIG)。由于 HRIG 成本高且产量少, 还有潜在传播血源传染病的危险; 而 ERIG 可能引起过敏反应, 因此急需有新的 RV 治疗药物来替代现有免疫球蛋白。研究表

明, 当狂犬病毒进入大脑后, 由于血脑屏障过滤作用, 使抗体不能进入脑内, 从而无法发挥作用<sup>[1-2]</sup>。如果有可通过血脑屏障的小分子抗体进入脑中, 病毒的复制就可能被阻止。到目前为止仅有 6 例狂犬病人发病后存活的报道, 其中 2004 年, 美国 Wisconsin 州一女孩出现狂犬病症状后, 经过多种抗病毒和镇静药物联合治疗后得以存活<sup>[3]</sup>, 提示我们狂犬病还是有救的, 但确实的药物仍需探索。

单链抗体(Single chain fragment of variants, scFv)由一段弹性连接链(linker)把抗体重链可变区

**基金项目:** 国家“863”计划(2006AA02Z456); 农业公益性行业项目(200803014)

\* 通信作者。杨松涛, Tel: +86-431-86985518; E-mail: yst610223@yahoo.com.cn; 夏咸柱, Tel: +86-431-86985808; E-mail: Xia\_xzhu@yahoo.com.cn

**作者简介:** 杨瑞梅(1975-), 女, 陕西长安人, 博士, 研究方向为动物病原生物学与免疫学。E-mail: yrm.cc@163.com

**收稿日期:** 2010-05-18; **修回日期:** 2010-08-27

(VH)与轻链可变区(VL)相连而成,是具有亲代抗体全部抗原结合特异性的最小功能结构单位。其分子小,易于穿过细胞膜和血脑屏障,并比完整抗体减少了引起炎症反应的危险<sup>[4]</sup>,可作为靶向治疗分子。另外,有研究表明 scFv 连接碱性磷酸酶后,可能成为检测狂犬病疫苗中病毒的一种快速简便方法<sup>[5]</sup>。因此特异性好的 RV 单链抗体是很有应用价值的。但 scFv 在血液中不稳定<sup>[6]</sup>,易于降解。研究表明在单链抗体中引入一个二硫键后,形成二硫键稳定单链抗体(scdsFv),具有更好的血浆生物稳定性和中和活性<sup>[7]</sup>。人源抗狂犬病病毒单克隆抗体 SO57 能够高效和广泛地中和狂犬病病毒,并可对狂犬病病毒攻击的实验啮齿动物起到保护作用<sup>[8]</sup>。为此本研究选用 SO57 做为母本抗体,用以合成人源二硫键稳定单链抗体,利用原核表达获得此蛋白,对其生物学活性进行研究,以期为新型 RV 治疗药物的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、毒株和载体:**大肠杆菌 DH5a 和 *E. coli* BL21(DE3) 购自 TaKaRa 公司;狂犬病病毒标准攻击毒 CVS-11、CVS-24 由本室保存;CVS-24 经小鼠肌肉滴定实验确定 LD<sub>50</sub> 为 10<sup>-2.3</sup>。表达载体 pET22b(+) 由本室保存。

**1.1.2 试剂:**胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen;各种限制性内切酶、pMD18-T vector、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;Ni-NTA 为 Genehealth 公司产品;兔抗鼠单克隆抗体购自北京普利莱公司;荧光标记狂犬病核蛋白单克隆抗体由本室制备;人用狂犬病疫苗(vero 细胞),使用 L 巴斯德固定毒 PV2061 毒株,为辽宁成大生物股份有限公司生产(200906030-1);HRIG 为兰州生物制品所生产的人狂犬病免疫球蛋白(200905028-1);Evans Blue 购自上海生工。

### 1.2 scdsFv 的表达纯化

**1.2.1 二硫键稳定单链抗体序列的获得和表达工程菌的构建:**根据已发表的人源 SO57 的 VL 和 VH 序列号,获得 VL 和 VH 序列,用(GGGGS)<sub>3</sub> 的 linker 序列连接起来,在 VH(44)及 VL(100)各突变一个氨基酸为半胱氨酸,在序列两端设计 *EcoRI* 和 *NcoI* 酶切位点,将此序列(774 bp)送大连 TaKaRa 公司

合成,并连于 Simple T 载体上。

将连于 T 载体上的目的片段,用 *EcoRI* 和 *NcoI* 双酶切,并将载体 pET22b(+) 用同样双酶切后,T4 DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* DH5a,PCR 和酶切鉴定、测序正确的质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)。

**1.2.2 scdsFv 的诱导表达:**接种 BL21(DE3)/pET-scdsFv 单菌落于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养过夜。按 1:50 将过夜培养物接种于新鲜 LB(含 100 mg/L Amp)培养基中,37℃ 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6-0.8,加入 IPTG 终浓度为 1 mmol/L 诱导,37℃ 振荡培养 7 h。12% SDS-PAGE 检测表达情况,并将蛋白转移至 NC 膜上,鼠抗 His 标签抗体为一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔多克隆抗体为二抗,DAB 显色后观察结果。

**1.2.3 scdsFv 蛋白纯化、复性:**离心收集菌体超声破碎后,分别用 1% Triton、2 mol/L 尿素、4 mol/L 尿素洗涤获得重组蛋白的包涵体。用 8 mol/L 尿素溶解变性,以 Ni-NTA 柱进行含 6 His 标签特异蛋白的亲层析纯化。收集纯化蛋白 PBS 稀释后装于透析袋中,在分别含有 6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L、1 mol/L 尿素的 0.02 mol/L PBS 溶液中进行梯度透析,最终透析至 pH7.4 0.02 mol/L PBS 中。复性蛋白进行 SDS-PAGE。PEG20000 浓缩纯化蛋白至 30 mL,并用 Bradford protein Assay 试剂测定其浓度。

### 1.3 scdsFv 蛋白的 RV 特异性结合活性检测

**1.3.1 ELISA 法检测 scdsFv 蛋白的抗原特异性结合活性:**将狂犬病毒 Vero 疫苗(L 巴斯德固定毒 PV2061 毒株)用包被液稀释成不同浓度,包被 96 孔板。3% BSA-PBS(pH 7.0)进行封闭后,加入用 PBS 稀释的纯化抗体 scdsFv,每孔 50 μL,HRP 标记的抗 His-Tag 抗体作二抗,以 OPD 为底物显色,加入 1 mol/L 硫酸终止反应后,在 492 nm 波长下测定 OD 值。BSA 作阴性对照。

**1.3.2 scdsFv 对鼠脑组织中狂犬病毒抗原特异性结合活性:**用狂犬病病毒 CVS-24 脑部组织攻毒,将 5 d 后死亡的小鼠脑组织做压印片,80% 冷丙酮固定后,用含 2% BSA 的 PBS 封闭,一抗为经诱导的 scdsFv 复性蛋白,经同样处理的 PBS 为阴性对照。二抗为兔抗 6His 抗体(1:1000 稀释),最后加 FITC-羊抗兔抗体(1:1000 稀释),观察结果。

### 1.4 抗狂犬病毒 scdsFv 的相对亲和力测定

参照 Macdonald 等<sup>[9-10]</sup>的方法进行,狂犬病病

毒 Vero 疫苗以 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释至 1 mg/L 包被酶联板, 50  $\mu$ L/孔, 4 $^{\circ}$ C 过夜; 次日弃包被液, 加 1% BSA 300  $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h; 弃封闭液, 加待测复性 scdsFv 50  $\mu$ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 用 PBST 洗 3 次后进行硫氰酸盐洗脱处理: 每孔加  $\text{NH}_4\text{SCN}$  溶液 60  $\mu$ L, 浓度依次为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5 和 6.0 mol/L, 室温静置 15 min; 用 PBST 洗 3 次, 加入 HRP 标记的抗 His-Tag 抗体, 每孔 50  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 2 h; PBST 洗涤 3 次, OPD 底物显色并读取  $OD_{490}$  值。经硫氰酸盐洗脱后每种抗体与抗原结合的  $OD_{490}$  值下降至原来的 50% 时其  $\text{NH}_4\text{SCN}$  浓度即为该抗体的亲和力指数, 以 mol/L 表示。

### 1.5 scdsFv 中和活性检测

**1.5.1** scdsFv 体外中和活性效价检测: 用荧光抗体病毒中和试验 (FAVN) 法<sup>[11]</sup> 进行狂犬病中和抗体的检测。标准品为 OIE 推荐的 0.5 IU/mL 的抗狂犬病毒免疫球蛋白。首先在 96 孔细胞培养板中倍比稀释待测 scdsFv 抗体及标准品, 同时设阴、阳性对照, 再在各孔中加入 50  $\mu$ L 100TCID<sub>50</sub> 的 CVS-11 病毒稀释液, 37 $^{\circ}$ C 感作 1 h, 然后每孔加入  $5 \times 10^4$  个 BHK-21 细胞, 37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h。弃培养液, PBS 洗 1 次, 冷丙酮固定 30 min, 干燥后, 加工作浓度的 FITC 标记抗 RV 核蛋白抗体, 37 $^{\circ}$ C 1 h 后, PBS 洗 3 次, 在荧光显微镜下观察, 记录每孔细胞荧光灶百分比, 获得能使荧光灶比病毒对照减少 50% 的 scdsFv 的稀释度, 并通过与标准品比较, 用 FAVN 计算软件, 计算出 scdsFv 效价 (IU)。

**1.5.2** 小鼠体内中和法测定 scdsFv 蛋白的中和活性: 用标准的小鼠模型体内中和分析法进行<sup>[12]</sup>。用人源高免血清 (HRIG) 作为对照血清, 将人源高免血清 (HRIG) 用 PBS 进行 1000 倍和 5000 倍稀释, 设立两个滴度的阳性对照。纯化后的 scdsFv 分别用原倍和 2 倍稀释两个滴度, 以上每个稀释度分别与 25LD<sub>50</sub> CVS-24 混合, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min, 然后立即在冰上致冷并保存于冰上。每组 10 只昆明鼠 (3-4 周龄, 13-16 g) 乙醚麻醉后, 脑内注射 25  $\mu$ L/只, 5 d 死亡只数不计。记录小鼠的存活和死亡只数。用 scdsFv 蛋白原倍并不注射病毒组检测 scdsFv 是否对小鼠有毒性作用。并用 PBS 注射组作阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 scdsFv 片段的克隆与表达载体的构建

构建 scdsFv-pET22b 酶切鉴定结果与预期结果完全一致, 即在 774 bp 和 5493 bp 处分别出现目的基因片段和载体片段 (见图 1)。

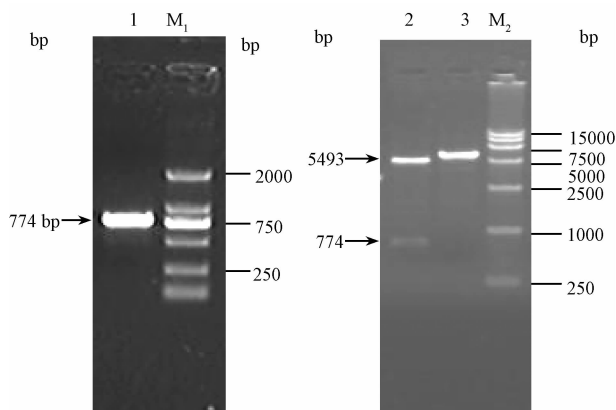


图 1 PCR 扩增 scdsFv (G) 和 pET22b-scdsFv 酶切产物电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of scdsFv (G) and identification of pET22b-scdsFv by enzyme digestion. 1. scdsFv (G); 2. EcoRI + NcoI; 3. BamHI; M<sub>1</sub>. DL2000 DNA Marker, M<sub>2</sub>. 250 bp DNA Ladder Marker.

### 2.2 工程菌的诱导表达、纯化、复性

BL21 (DE3) / pET22b-scdsFv 用 IPTG 诱导表达后收集菌体, 经处理后进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 在 30 kDa 处出现 1 条明显条带, 大小与预期相符 (见图 2-A), 表明 scdsFv 在工程菌中表达,

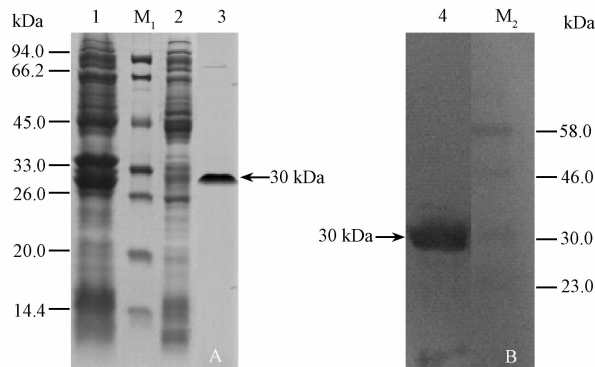


图 2 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 (A) scdsFv 蛋白表达 (B)

Fig. 2 Expression of scdsFv detected by Western blotting (A) and SDS-PAGE (B) 1. Crude extract of *E. coli* BL21 (DE3) / pET22b-scdsFv; 2. Inclusion bodies; 3. Purified scdsFv; 4. Western blot analysis of expression of scdsFv in BL21 (DE3); M<sub>1</sub>. Protein molecular weight markers; M<sub>2</sub>. Pre-stained protein.

且目的蛋白在沉淀中有较多表达,以包涵体形式存在。Western blot 分析蛋白为表达的目的蛋白(见图 2-B)。

8 mol/L 尿素将包涵体充分溶解,过 Ni-NTA 柱,收集洗脱蛋白,SDS-PAGE 为单一条带,透析复性后,经 Bradford protein Assay 试剂测定,纯化、复性后的重组蛋白浓度为 0.2 g/L,从粗提物中的回收率为 20%。

### 2.3 scdsFv 蛋白的 RV 特异性结合活性检测结果

**2.3.1** ELISA 检测 scdsFv 蛋白的抗原特异结合活性结果:以不同浓度狂犬病病毒疫苗包被,加入复性后抗狂犬病毒 scdsFv 抗体,并且加入的抗体量一致,BSA 作阴性对照。ELISA 检测结果显示,抗狂犬病病毒 scdsFv 可与狂犬病毒 Vero 疫苗特异结合,且随抗原浓度的降低而降低(见图 3)。

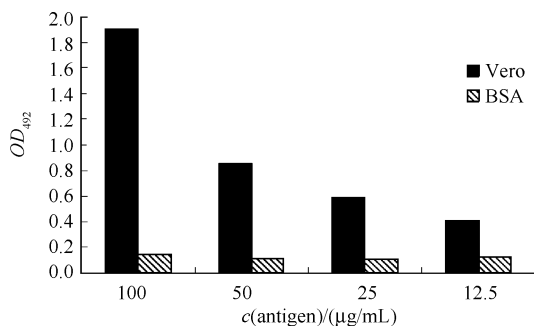


图 3 狂犬病毒 scdsFv 的抗原结合活性

Fig. 3 Specific binding of scdsFv to the antigen

**2.3.2** scdsFv 对小鼠脑组织中狂犬病病毒抗原特异结合活性检测结果:scdsFv 与感染 CVS-24 的小鼠脑组织作用后再用荧光抗体染色,可见明显荧光,而

阴性对照 BSA 则无亮绿色荧光点。说明 scdsFv 与小鼠脑组织中病毒有特异结合能力(见图 4)。

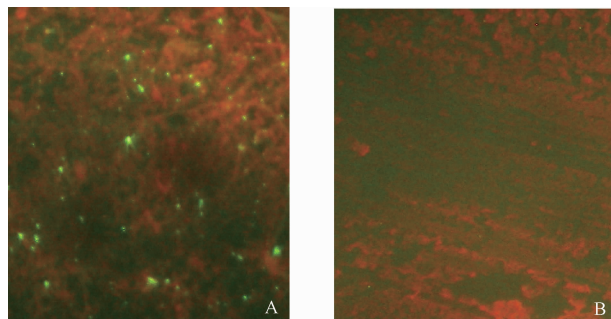


图 4 scdsFv 与感染 CVS 鼠脑印片荧光反应阳性(200 ×)

Fig. 4 The positive result of immunofluorescent staining of scdsFv (200 ×). A:scdsFv; B:BSA.

### 2.4 scdsFv 抗体相对亲和力测定

用硫酸盐洗脱法测定 scdsFv 对狂犬病毒的相对亲和力,亲和力指数为 2.0 mol/L。

### 2.5 scdsFv 中和活性检测

**2.5.1** scdsFv 体外中和活性效价检测结果:使用 OIE 推荐抗 RV 免疫球蛋白标准品为标准对照,用 FAVN 值计算软件,计算得到 scdsFv 抗体的中和效价为 41 IU/mL。

**2.5.2** 小鼠体内中和试验检测 scdsFv 中和活性结果:scdsFv 与 25LD<sub>50</sub> CVS-24 混合,37°C 90 min 后小鼠脑内注射。14 d 后原倍 scdsFv 组有 55.6% 鼠存活;2 倍稀释 scdsFv 有 30% 鼠耐过致死攻击,表明 scdsFv 能中和 CVS-24。用人源高免血清作阳性对照组中,1000 倍稀释可 100% 保护耐过致死攻击(见表 1)。scdsFv 蛋白注射后 0-14 d 小鼠精神、体重与正常对照无差别,说明 scdsFv 对小鼠无毒性。

表 1 小鼠体内 scdsFv 中和活性测定结果

Table 1 Data obtained in an in vivo neutralization assay to assess the neutralizing function of the fusion proteins

Groups	No. of mice alive after Day 5	No. of mice alive after Day 14	Percentage survival/%
25LD <sub>50</sub> CVS + HRIG			
1/1000 HRIG	10	10	100
1/5000 HRIG	10	9	90
25LD50 CVS + scdsFv			
scdsFv	9	5	55.6
1/2 scdsFv	10	3	30

## 3 讨论

构建单链抗体的基因,通常可采取抽取鼠源单

抗杂交瘤细胞的总 RNA,之后反转录成 cDNA 再以此 cDNA 为模板进行 VH 和 VL 扩增,用 linker 连接成单链抗体。针对 RV G 糖蛋白单抗相对于 N 蛋白

单抗制备难度大,不易获得。相对于鼠源单抗,人源单抗则更适合作为人狂犬病的治疗制剂。SO57 单克隆抗体是针对 RV G 蛋白的人源单抗, Dietzschold 等<sup>[8]</sup>发现 SO57 具有广泛中和活性,对大部分 RV 街毒和固定毒都有中和活性;贾茜等<sup>[13]</sup>证明 SO57 与 HRIG 具有相近的中和能力,能中和我国西部、北部、东部 RV 街毒代表株。为此本研究选用单抗 SO57 可变区序列作为单链抗体的序列,结果证明由 SO57 获得 scdsFv 有较好的 RV 结合活性和中和活性。

小分子形式的抗体如 scdsFv、Fab 等,从血管进入其他组织的能力,包括通过血脑屏障的能力均强于全抗体,这使得清除进入中枢神经系统,尤其脑组织中的狂犬病毒成为可能<sup>[14]</sup>。目前对中枢神经系统疾病如阿尔茨海默病、Prion 疾病等研究中,用 scFv 穿过血脑屏障已有较多研究报道,且在小鼠、恒河猴等动物上证实,scFv 可起到脑内治疗作用<sup>[15-18]</sup>。另外,用一株良好的 RV G 糖蛋白 scFv 识别感染细胞表面出芽的病毒,以此来识别感染细胞,将抑制病毒的药物(siRNA、反义核酸、毒素等)连于 scFv 之后,可靶向运送药物进入感染细胞。因此获得性质优良的 scFv 在 RV 和其它病毒病的新药治疗药物研究方面有重要意义。

本文采用针对 SO57 的二硫键稳定单链抗体,大肠杆菌原核表达 scdsFv 获得成功。ELISA 试验表明纯化复性后 scdsFv 蛋白能与 RV 特异结合;并能结合小鼠脑组织印片中的 RV 病毒;用 FAVN 法检测 scdsFv 对 RV 的中和效价为 41 IU/mL;小鼠体内中和试验表明 scdsFv 能部分保护(55.6%)小鼠对致死强毒攻击。以上结果表明由 SO57 来源的 scdsFv 具有良好识别 RV 能力,并在体内和体外显示中和活性,是一株良好 scdsFv。

抗体重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 通过 linker 就形成单链抗体(scFv),再在 VH 和 VL 之间通过一个空间二硫键臂连接起来形成单链二硫键稳定抗体(scdsFv)。scdsFv 有很多优势。与 IgG 比较,scdsFv 在非靶向组织中有更低的滞留时间,更好的肿瘤渗透作用<sup>[19]</sup>。与 scFv 比较,由于产生二硫键,便于异源二聚体形成,具有更高分子复性百分比,且更稳定,原核表达产量高,适合于大规模生产,预计 scdsFv 将成为在细菌中产生 Fv 的最重组体形式<sup>[5]</sup>。蔡昆等<sup>[20]</sup>对 RV scdsFv 研究也表明其具

有比 scFv 更好中和狂犬病病毒能力。

本研究证明用单抗 SO57 株获得的 scdsFv 能有效中和 CVS-11, FAVN 显示其中和活性 41 IU/mL,表明仅有 SO57 的可变区部分对 RV 仍具有较高结合力和中和活性,也说明当抗体 Fc 片段没有参与到此过程中时,单独的抗体可变区部分也能很好的中和病毒。在其它小分子抗体研究中也得到相同结论,Kalinke 等<sup>[21]</sup>证明 scdsFv 能中和水泡性口炎病毒,并能保护小鼠逃避致死病毒攻击;Muller 等<sup>[10]</sup>用 scFv 中和了 RV CVS 株。说明单链抗体仍具有与 RV 结合和中和的能力,可能在狂犬病的治疗上成为新型治疗分子。

综上所述,本研究设计合成了人源化 RV scdsFv 基因,原核表达后得到 scdsFv 蛋白;scdsFv 能与 RV 特异性结合;在细胞和小鼠体内试验证明具有中和活性,能保护小鼠免受致死攻击。scdsFv 可能成为 RV 新型治疗分子;同时为阿尔茨海默病等大脑及中枢神经系统疾病治疗提供借鉴;也为 scdsFv 进一步作为导向传递识别部分的应用奠定基础。

## 参考文献

- [1] Roy A, Phares TW, Koprowski H, Hooper DC. Failure to open the blood-brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissues leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection. *Journal of Virology*, 2007, 81(3): 1110-1118.
- [2] Roy A, Hooper DC. Lethal silver-haired bat rabies virus infection can be prevented by opening the blood-brain barrier. *Journal of Virology*, 2007, 81(15): 7993-7998.
- [3] Willoughby RE Jr, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, Chusid MJ, Rupprecht CE. Survival after treatment of rabies with induction of coma. *The New England Journal of Medicine*, 2005, 352(24): 2508 - 2514.
- [4] Robert R, Dolezal O, Waddington L, Hattarki MK, Cappai R, Masters CL, Hudson PJ, Wark KL. Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2009, 22(3): 199-208.
- [5] Mousli M, Turki I, Kharmachi H, Saadi M, Dellagi K. Recombinant single-chain Fv antibody fragment-alkaline phosphatase conjugate: a novel in vitro tool to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture.

- Journal of Virological Methods*, 2007, 146 (1 - 2) : 246-256.
- [ 6 ] Rajagopal V, Pastan I, Kreitman RJ. A form of anti-Tac (Fv) which is both single-chain and disulfide stabilized; comparison with its single-chain and disulfide-stabilized homologs. *Protein Engineering*, 1997, 10 ( 12 ) : 1453-1459.
- [ 7 ] Hao HJ, Jiang YQ, Zheng YL, Ma R, Yu DW. Improved stability and yield of Fv targeted superantigen by introducing both linker and disulfide bond into the targeting moiety. *Biochimie*, 2005, 87(8) : 661-667.
- [ 8 ] Dietzschold B, Gore M, Casali P, Ueki Y, Rupprecht CE, Notkins AL, Koprowski H. Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus. *Journal of Virology*, 1990, 64(6) : 3087-3090.
- [ 9 ] Macdonald RA, Hosking CS, Jones CL. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *Journal of Immunological Methods*, 1988, 106 (2) : 191-194.
- [ 10 ] Muller BH, Lafay F, Demangel C, Perrin P, Tordo N, Flamand A, Lafaye P, Guesdon JL. Phage-displayed and soluble mouse scFv fragments neutralize rabies virus. *Journal of Virological Methods*, 1997, 67(2) : 221-233.
- [ 11 ] Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *Journal of Immunological Methods*, 1998, 212 ( 1 ) : 79-87.
- [ 12 ] Flamand A, Raux H, Gaudin Y, Ruigrok RW. Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology*, 1993, 194(1) : 302-313.
- [ 13 ] 贾茜,徐葛林,赵伟,吴杰,郑新雄. 重组人抗狂犬病病毒单抗 SO57、SOJB 对不同狂犬病病毒毒株中和作用的研究. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*, 2006, 22(4) : 256-261.
- [ 14 ] Dietzschold B. Antibody-mediated clearance of viruses from the mammalian central nervous system. *Trends in Microbiology*, 1993, 1(2) : 63-66.
- [ 15 ] Boado RJ, Lu JZ, Hui EK, Pardridge WM. IgG-single chain Fv fusion protein therapeutic for Alzheimer's disease: Expression in CHO cells and pharmacokinetics and brain delivery in the rhesus monkey. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105 (3) : 627-635.
- [ 16 ] Boado RJ, Zhou QH, Lu JZ, Hui EK, Pardridge WM. Pharmacokinetics and brain uptake of a genetically engineered bifunctional fusion antibody targeting the mouse transferrin receptor. *Molecular Pharmaceutics*, 2010, 7 ( 1 ) : 237-244.
- [ 17 ] Campana V, Zentilin L, Mirabile I, Kranjc A, Casanova P, Giacca M, Prusiner SB, Legname G, Zurzolo C. Development of antibody fragments for immunotherapy of prion diseases. *The Biochemical Journal*, 2009, 418 (3) : 507-515.
- [ 18 ] Hackel BJ, Huang D, Bubolz JC, Wang XX, Shusta EV. Production of soluble and active transferrin receptor-targeting single-chain antibody using *Saccharomyces cerevisiae*. *Pharmaceutical Research*, 2006, 23 (4) : 790-797.
- [ 19 ] Yan L, Xiangwei M, Xiao L, Peng G, Chang L, Mingyao T, Encheng Y, Xiaohong X, Peng J, Shifu K, Zhongmei W, Ningyi J. Construction, expression and characterization of a dual cancer-specific fusion protein targeting carcinoembryonic antigen in intestinal carcinomas. *Protein Expression and Purification*, 2010, 69 (1) : 120-125.
- [ 20 ] 蔡昆,王慧,包士中,史晶,侯晓军. 人源抗狂犬病病毒单链二硫键稳定抗体的重组设计与表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(4) : 673-676.
- [ 21 ] Kalinke U, Krebber A, Krebber C, Bucher E, Plückthun A, Zinkernagel RM, Hengartner H. Monovalent single-chain Fv fragments and bivalent miniantibodies bound to vesicular stomatitis virus protect against lethal infection. *European Journal of Immunology*, 1996, 26(12) : 2801-2806.

# Construction and detection the bioactivity of human anti-rabies virus scdsFv

Ruimei Yang<sup>1,2</sup>, Songtao Yang<sup>2\*</sup>, Chengyu Wang<sup>2</sup>, Yuwei Gao<sup>2</sup>, Hu Shan<sup>1</sup>,  
Xianzhu Xia<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China

<sup>2</sup> Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China

**Abstract:** [ **Objective** ] The purpose of this study is to produce new antibody molecules to neutralize the rabies virus specifically by the way of constructing and expressing the human anti-rabies virus scdsFv ( disulfide stabilized single chain antibody ) gene, and characterizing its bioactivity. [ **Methods** ] We obtained the sequence of variable region of heavy chain ( VH ) and variable region of light chain ( VL ) of RV monoclonal antibody SO57 from GenBank, and it respectively mutated into cysteine in the gene loci VH44 and VL100. The scdsFv gene was synthesized and inserted into a prokaryotic expression vector pET22b( + ). Purified inclusion body scdsFv proteins were obtained by Ni-NTA His Bind Resin affinity chromatography and identified by SDS-PAGE gel and Western blot assay. The binding activity of scdsFv was identified by ELISA and mouse brain tissues infected with rabies virus CVS strain. The relative affinity of scdsFv was measured by ELISA using thiocyanate elution. The capacity of the scdsFv to neutralize the rabies virus CVS strains was determined by fluorescent antibody virus neutralisation test ( FAVN ). The fusion proteins neutralized the CVS strain in a standard in vivo neutralized assay where the virus was incubated with the scdsFv molecules before intracranial inoculation in mice. [ **Results** ] The fragment genes of scdsFv to rabies virus were constructed successfully. ScdsFv protein was expressed in *E. coli* with approximate molecular weight of 30.0 kDa, which could be recognized by anti-His mAb. ELISA results demonstrated that scdsFv could bind antigen specificity. It was found that the strong reactivity of scdsFv to the smear of RV infected mouse-brain was demonstrated by IFA. As determined by FAVN with a reference serum, the titer of scdsFv was 41IU/mL. In addition, scdsFv could be 55.6% protection of mice against lethal challenge with rabies virus CVS. [ **Conclusion** ] The scdsFv can bind antigen specificity and has neutralization capacity to the virus in vitro and in vivo. The anti-rabies scdsFv is potential for application in rabies post-exposure prophylaxis.

**Keywords:** Rabies virus, ScdsFv, Glycoprotein, Neutralization capacity

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National Program for High Technology Research and Development of China (2006AA02Z456)

\* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-431-86985518; E-mail: yst610223@ yahoo. com. cn; Tel/Fax: + 86-431-86985808; E-mail: Xia\_xzhu@ yahoo. com. cn

Received: 18 May 2010/ Revised: 27 August 2010