

• 医学与免疫生物技术 •

狂犬病病毒糖蛋白表达及纯化及其记忆性 B 细胞结合能力的分析

严丽蔚, 巩蔚, 朱文兵, 张雪梅, 徐婧雯, 吴忠香, 卢孔杰, 孙明, 董少忠

中国医学科学院 北京协和医学院 医学生物学研究所 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 云南 昆明 650118

严丽蔚, 巩蔚, 朱文兵, 等. 狂犬病病毒糖蛋白表达及纯化及其记忆性 B 细胞结合能力的分析. 生物工程学报, 2017, 33(11): 1840–1849.

Yan LW, Gong W, Zhu WB, et al. Expression and purification of rabies virus glycoprotein and analysis of its specific binding capacity to memory B cells. Chin J Biotech, 2017, 33(11): 1840–1849.

摘要: 表达纯化不同标签、不同大小 3 个狂犬病病毒糖蛋白, 分析其结合功能后, 得到具备高亲和力的、可特异性结合记忆性 B 细胞的狂犬病病毒糖蛋白。本实验通过基因工程的方法, 采用不同的原核表达系统分别表达带有不同标签的、全长和膜外区的 RVG, 纯化蛋白并分析比较其结合功能, 荧光标记候选蛋白, 结合 CD19 及 CD27 的抗体, 流式细胞术检测狂犬疫苗免疫后 PBMCs 中抗狂犬病病毒特异性记忆性 B 细胞的情况, 确认候选蛋白与抗狂犬病病毒特异性记忆性 B 细胞的结合功能。本实验成功构建了 3 个表达载体 pGEX-5X-1-RVG、pET28a-RVG 和 pET30a-G, 优化表达纯化条件成功获得了糖蛋白 GST-RVG、His-RVG 和 His-G。纯化后的 GST-RVG、His-RVG 和 His-G 经 Western blotting 和 ELISA 鉴定均有抗原特异性; 由竞争 ELISA 法测得 3 个纯化后糖蛋白与抗狂犬病病毒抗体的亲和力。通过流式细胞术可以检测到狂犬疫苗免疫后阳性志愿者 PBMCs 中的抗狂犬病病毒特异性记忆性 B 细胞, 从而获得了高亲和力、可用于分选抗原特异性的记忆性 B 细胞的狂犬病病毒糖蛋白。

关键词: 狂犬病病毒糖蛋白, 抗原特异性记忆性 B 细胞, 流式细胞术

Received: February 21, 2017; **Accepted:** May 8, 2017

Supported by: CAMS Innovation Fund for Medical Sciences Program (No. 2016-I2M-1-019).

Corresponding authors: Shaozhong Dong. Tel: +86-871-68335116; E-mail: dsz@imbcams.com.cn

Ming Sun. Tel: +86-871-68339287; E-mail: sunming@imbcams.com.cn

中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (No. 2016-I2M-1-019) 资助。

网络出版时间: 2017-05-17

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170517.1457.003.html>

Expression and purification of rabies virus glycoprotein and analysis of its specific binding capacity to memory B cells

Liwei Yan, Wei Gong, Wenbing Zhu, Xuemei Zhang, Jingwen Xu, Zhongxiang Wu, Kongjie Lu, Ming Sun, and Shaozhong Dong

Yunnan Provincial Key Laboratory for Development of Vaccines Against Major Infectious Diseases, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, Yunnan, China

Abstract: We aimed to express and purify three rabies virus glycoproteins with different tags and sizes. After analyzing their binding function, we wish to obtain a rabies virus glycoprotein with higher affinity and ability to specifically bind memory B cells. Experiments were carried out to express full length, as well as the ectodomain RVG by gene engineering method. Combined with the antibody of CD19 and CD27, the candidate protein labeling with fluorescence was used to analyze its binding function. Flow cytometry was used to detect the anti-rabies virus specific memory B cells in PBMCs, and confirm the binding ability between the candidate proteins and anti-rabies virus-specific memory B cells. We successfully constructed three expression vectors pGEX-5X-1-RVG, pET28a-RVG and pET30a-G. Three glycoproteins GST-RVG, His-RVG and His-G were obtained by optimized expression and purification conditions. The antigen specificity of purified GST-RVG, His-RVG and His-G were identified by Western blotting and ELISA. The affinity of these three purified glycoproteins to anti-rabies virus antibody were detected by competitive ELISA. Anti-rabies virus specific memory B cells in positive PBMCs gained from people who had ever been injected with the vaccine can be detected by flow cytometry. Thus, we got a recombinant rabies virus glycoprotein that had high-affinity and could sort antigen specific memory B cells.

Keywords: rabies virus glycoprotein, antigen specific memory B cells, flow cytometry

狂犬病病毒糖蛋白 (RVG) 是一种典型的跨膜糖蛋白, 作为唯一暴露在病毒颗粒表面并诱导产生病毒中和抗体的抗原^[1], 其介导病毒与细胞表面受体的结合^[2-3], 与病毒毒力直接相关, 是有效的保护性抗原^[4]。目前, 主要运用不同表达系统对 RVG 基因全长进行表达, 表达系统包括大肠杆菌、酵母^[5-6]和昆虫细胞^[7-8]等。但大多数情况下表达产量较低且纯度不高, 不利于后续的研究应用^[9]。鉴于狂犬病毒糖蛋白膜外区是决定抗原性、组织嗜性及毒力的最重要部分, RVG 上第 II 和第 III 抗原部位是病毒与中和抗体的主要结合部位^[10], 因此, 也有研究尝试采用截断的 RVG 基因片段进行表达和纯化^[11]。

抗体是由浆细胞分泌产生, 记忆性 B 细胞在机体再次感染同一抗原时, 可以快速分化为分泌抗体的浆细胞, 介导迅速的记忆性免疫应答^[12], 故对特异性记忆性 B 细胞进行分析, 也是对机体产生免疫评价的一个重要补充。同时, 单个 B 细胞分选单抗技术要求具备高亲和力结合记忆 B 细胞特异性抗原^[13]。单个特异性记忆性 B 细胞分选制备单克隆抗体是一种制备单克隆抗体的新型方法^[14]。此方法的关键点是利用流式技术获得单个特异性记忆性 B 细胞, 候选抗原的纯度、浓度以及和抗体的亲和力等对分选至关重要^[15]。鉴于狂犬病病毒的糖蛋白与感染、免疫和抗体水平评价、抗体分选的紧

密关系, 本实验通过研究不同表达系统获得不同的目的蛋白, 以期能够获取用于分选特异性记忆 B 细胞的候选抗原。

本实验采用基因工程的方法, 利用不同的原核表达系统 (pGEX-5X-1, pET28a, pET30a) 分别表达带有不同标签 (GST-tag 和 His-tag) 的全长和膜外区 RVG, 纯化后鉴定、分析比较和狂犬免疫球蛋白的结合能力, 再利用荧光标记和流式细胞技术, 用于目标记忆 B 细胞的分选。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5a、BL21(DE3) 和 Rosetta (DE3)pLysS 以及原核表达载体 pGEX-5X-1(4 972 bp, GST-tag)、pET28a(5 369 bp, His-tag)、pET30a(5 422 bp, His-tag)均由本实验室保存; 毒株狂犬病病毒 CTN-1 株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I, T4 DNA 连接酶均购自 BioLab; Trizol、DNA 纯化回收试剂盒和质粒小提试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; HRP 标记的羊抗人抗体购自碧云天生物技术研究so; 逆转录试剂盒 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit Primer StarMax(2×)均购自宝生物工程(大连)有限公司; 蛋白荧光标记试剂盒购自 Innova Bioscience; 人狂犬病免疫球蛋白购自广东双林生物制药有限公司。CD19、CD27 抗体购自美国 BD 生物公司。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建

根据狂犬病病毒 CTN-1 株 G 基因的序列

(GenBank 登录号为 FJ959397.1), 采用 Primer Premier 5.0 软件设计狂犬病毒 CTN-1 株 G 基因全长序列 (1 575 bp) 和膜外区去除信号肽序列 (1 308 bp) 的引物, 并在上下游引物中分别引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I (用下划线表示), 见表 1。Trizol 法提取病毒 RNA, 经逆转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行特异 PCR 扩增。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对扩增出的 DNA 片段和载体 pGEX-5X-1、pET28a、pET30a 进行双酶切, 然后将酶切后的载体 pGEX-5X-1 和 pET28a 与 G 基因全长序列连接, 载体 pET30a 和 G 基因膜外区连接, 16 °C 过夜, 将连接后质粒转化到 *E. coli* DH5a, 提取质粒, 经双酶切鉴定, 并送铂尚生物技术(上海)有限公司测序。鉴定正确的质粒命名为 pGEX-5X-1-RVG、pET28a-RVG 和 pET30a-G。

1.2.2 目的基因的诱导表达

将鉴定为阳性的表达载体的 pGEX-5X-1-RVG 转化到 Rosetta(DE3)pLysS 感受态中, pET28a-RVG、pET30a-G 转化到 BL21(DE3)感受态中; 挑取重组工程菌接种于含有 1% 葡萄糖的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 摇床过夜; 将培养物按 1:50 的比例接种至 10 mL 新鲜 LB 液体培养基, 37 °C、220 r/min 振荡培养约 3 h 至菌液

表 1 重组蛋白原核表达载体构建所用引物及其序列
Table 1 Primer sequences for the construction of expression vectors of the recombinant proteins

Primer name	Primer sequence (5'-3')
RVG-F	GGAATTCATTCCTCAAGCTCTGTGTTT
RVG-R	GGCTCGAGTTACAGCTTGGTCTCACCTCC
G-F	GGAATTCAAATTCCTCCATTTACACGA
G-R	CCTCGAGTTATTTGGGAGACCGAGAT

Restriction sites were underlined.

A_{600} 为 0.6 时, 进行诱导表达。IPTG 诱导终浓度为 0.5 mmol/L, 温度为 16 °C, 诱导 12 h。收集菌体, 超声波破菌后, 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀, 进行 12% SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达情况。其中, 载体 pGEX-5X-1-RVG、pET28a-RVG、pET30a-G 对应表达的重组蛋白形式分别为 GST-RVG (约 85.2 kDa)、His-RVG (约 62.4 kDa)、His-G (约 54.8 kDa)。同时用空载体 pGEX-5X-1、pET28a 和 pET30a 作为阴性对照。

1.2.3 蛋白纯化

根据目的蛋白所带标签和表达情况的不同, 选择不同的纯化方法。其中蛋白 GST-RVG 采用 GST 亲和层析柱纯化; 蛋白 His-RVG 采用阴离子柱层析和镍柱亲和层析纯化; 蛋白 His-G 采用包涵体变性复性的方法纯化。

1.2.4 重组蛋白的抗原特异性鉴定

采用 Western blotting 鉴定。纯化后重组蛋白 GST-RVG、His-RVG、His-G 经 12% SDS-PAGE 分离后, 转移至 PVDF 膜上, 以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入抗狂犬病病毒免疫球蛋白 (1:10 000), 室温孵育 2 h; TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 再加入 HRP 标记的羊抗人 IgG (1:30 000 稀释), 室温孵育 1 h; TBST 洗涤 4 次, 每次 10 min; ECL 显影。

1.2.5 重组蛋白与抗狂犬病病毒免疫球蛋白的亲合力检测

通过竞争 ELISA 法来检测纯化后重组蛋白与狂犬免疫球蛋白的亲合力大小。用纯化后的重组蛋白包被两块抗原板, 4 °C 过夜, 用 PBST 洗板 3 次后, 用 3% 的 MPBS (MPBS 即含有脱脂奶粉的 PBS) 室温封闭 2 h, PBST 洗板 3 次; 在一排 12 个试管中, 建立从 0.1 nmol/L-1 μ mol/L 浓

度梯度的抗原即蛋白 PBS 溶液, 加入终浓度为 0.5 nmol/L 的抗狂犬病病毒抗体, 加入抗体溶液使总体积为 100 μ L, 室温孵育 30 min 后, 加入 90 μ L 反应混合物到前述已被包被抗原的微孔中, 微孔中预先加入 30 μ L 的 30% MPBS 后孵育, 时间不超过 10 min; 孵育结束后, 将反应混合物转入另一块包被抗原的板中, 第二块板的 ELISA 操作与第一块相同。充分洗涤第一块和第二块板, 加入带 HRP 标记的羊抗人 IgG (1:750 稀释), 室温 1 h, PBST 洗板 3 次, 加入 TMB 显色液 100 μ L/孔, 37 °C 避光 10 min, 加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应; 检测各孔的吸光度值。在半饱和状态下 (ELISA 信号强度是最高强度的一半) 所得到的抗原浓度约等于解离常数 K_{dis} ($K_{dis}=C/nM$, C 为蛋白总浓度, n 为蛋白稀释倍数, M 为蛋白相对分子质量), 解离常数的倒数即为亲和力。

1.2.6 免疫后血清中抗狂犬病病毒抗体水平检测

采用间接 ELISA 法。志愿者按照暴露前程序接受狂犬疫苗接种, 在接种第 3 针后 14 d, 采集志愿者血液 5 mL, 分离血清。将纯化的 GST-RVG 包被酶标板, 包被液为碳酸盐缓冲液 (pH 9.6), 每孔 0.7 μ g 蛋白, 4 °C 过夜; PBST 洗板 3 次后, 用 1% BSA 封闭液室温封闭 1 h; 洗板 3 次, 加入稀释的阴性血清 (志愿者免疫前血清), 狂犬病毒免疫球蛋白以及志愿者免疫后血清 (稀释倍数为 1:6 400), 室温孵育 2 h; 洗板 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗人二抗 (1:750 稀释), 孵育 1 h 后加入 TMB 显色液 100 μ L/孔, 37 °C 避光 10 min, 加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应; 检测各孔的吸光度值。

1.2.7 GST-RVG 标记 FITC

使用 Lightning-Link 荧光标记试剂盒。将

1 mL GST-RVG (516 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 100 μL LL-modifier reagent 混匀后, 加入到 Lightning-Link[®] mix 中轻轻混匀, 避光, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后, 加入 100 μL LL-quencher FD reagent, 放置 30 min。

1.2.8 流式细胞术检测特异性结合记忆性 B 细胞

采用流式细胞术。志愿者按照暴露前程序接受狂犬疫苗接种, 在接种第 3 针后 14 d, 采集志愿者血液 5 mL, 用来分离外周血淋巴细胞 (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)。将 ELISA 鉴定为阳性志愿者的 PBMCs 样品进行流式细胞术分析, 并将接种疫苗前的血清和 PBMCs 作为阴性对照。将冻存的 PBMCs 复苏后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 离心收集细胞并计数, 细胞数量达到约 1×10^6 个/管, PBS 洗涤 2 次, 离心后弃上清。为确定最佳的标记蛋白使用量, 我们分别采用 10、20、40 μg 的 GST-RVG-FITC 对 PBMCs 进行细胞染色, 同时加入 10 μL anti-CD19-PE 抗体, 10 μL anti-CD27-APC^[16] 抗

体 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min, 用 PBS 洗涤, 离心后弃上清, 加入 200 μL PBS, 流式细胞仪检测并分选。

2 结果

2.1 重组表达载体的构建

PCR 扩增产物 pGEX-5X-1-RVG、pET28a-RVG 和 pET30a-G 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析产物, 载体片段、全长序列 (1 575 bp) 和膜外区序列 (1 308 bp) 的基因片段均与预期相符 (图 1A 和 1B); 测序结果与 GenBank 标准序列一致, 表明质粒 pGEX-5X-1-RVG、pET28a-RVG 和 pET30a-G 均构建成功。

2.2 目的基因诱导表达产物的鉴定

12% SDS-PAGE 结果显示, 可见相对分子质量约为 85 kDa (pGEX-5X-1-RVG)、62 kDa (pET28a-RVG) 和 55 kDa (pET30a-G) 的目的蛋白条带, 大小均与预期相符, 且 GST-RVG、His-RVG 在添加 1% 葡萄糖培养表达量明显增多, 见图 2。

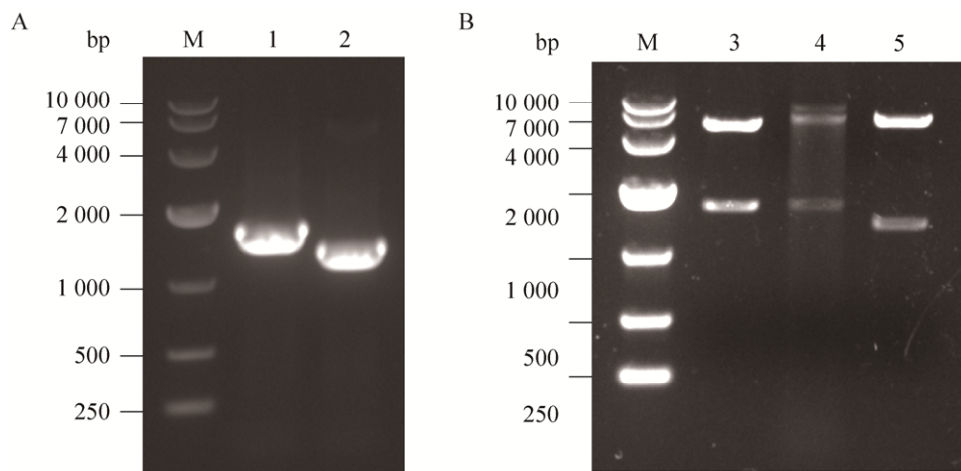


图 1 重组蛋白原核表达载体构建

Fig. 1 Construction of expression vectors of the recombinant proteins. M: DNA marker DL10000. (A) 1: PCR products of *G* gene; 2: PCR products of *G* gene extracellular membrane sequence; (B) 3: pGEX-5X-1-RVG digested with *EcoR* I and *Xho* I; 4: pET28a-RVG digested with *EcoR* I and *Xho* I; 5: pET30a-G digested with *EcoR* I and *Xho* I.

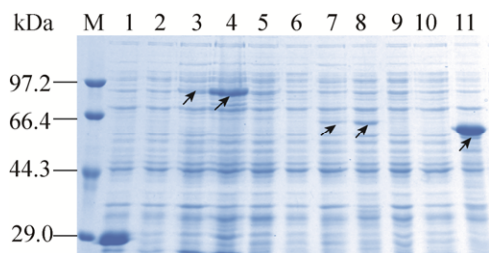


图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE profile of expressed proteins. M: protein marker; 1: total protein of pGEX-5X-1 after induction; 2: total protein of pGEX-5X-1-RVG before induction; 3: total protein of pGEX-5X-1-RVG after induction; 4: total protein of pGEX-5X-1-RVG after induction incubated in culture with 1% glucose; 5: total protein of pET28a after induction; 6: total protein of pET28a-RVG before induction; 7: total protein of pET28a-RVG after induction; 8: total protein of pET28a-RVG after induction.

2.3 纯化产物的鉴定

12% SDS-PAGE 分析纯化上述表达蛋白, 可见相对分子质量约为 85 kDa (亲和层析)、62 kDa (阴离子交换层析和亲和层析) 和 55 kDa (包涵体变性复性) 大小条带 (图 3A)。Bradford 法检测蛋白浓度, GST-RVG : 516 $\mu\text{g}/\text{mL}$, His-RVG : 1 224 $\mu\text{g}/\text{mL}$, His-G : 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。Scion Image 灰度扫描计算蛋白纯度, GST-RVG : 87.12%, His-RVG : 23.1%, His-G : 95.2%, 见表 2。Western blotting 结果显示, 纯化后蛋白均可与人狂犬病病毒免疫球蛋白特异性结合 (图 3B)。

表 2 纯化后蛋白的分析比较

Table 2 Comparison of purified proteins

	Mr (kDa)	Tag	Purity (%)	Affinity		
				Low ($<10^5$ L/mol)	Middle (10^7-10^8 L/mol)	High ($>10^8$ L/mol)
GST-RVG	85.2	GST	87.12			1.38×10^8
His-RVG	62.4	6×His	23.1		5.1×10^7	
His-G	54.8	6×His	95.2	1.7×10^5		

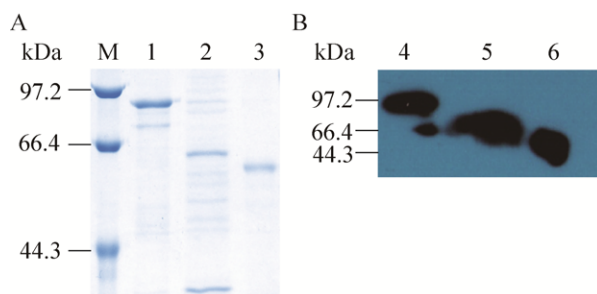


图 3 纯化后蛋白 SDS-PAGE (A) 和 Western blotting (B) 鉴定

Fig. 3 Identification of purified proteins by SDS-PAGE (A) and Western blotting (B). M: protein marker; 1,4: purified GST-RVG; 2,5: purified His-RVG; 3,6: purified His-G.

2.4 重组蛋白与抗狂犬病病毒抗体的亲和力检测

竞争 ELISA 法结果显示, 纯化后不同蛋白与人狂犬病病毒免疫球蛋白的亲和力大小分别为: GST-RVG : 1.38×10^8 L/mol, His-RVG : 5.1×10^7 L/mol, His-G : 1.7×10^5 L/mol, 结果见表 2。通常, 抗原抗体反应的亲和常数 K_a (Affinity constant) 小于 10^5 L/mol 为低亲和力, 10^7-10^8 L/mol 为中等亲和力, 大于 10^8 L/mol 为高等亲和力。故 GST-RVG 与人狂犬病病毒免疫球蛋白为高亲和力结合, His-RVG 与特异性抗体属于中等亲和力结合, His-G 与则以低亲和力结合特异性抗体。由此, 后续实验将使用 GST-RVG 作为阳性血清和特异性 B 细胞的候选抗原进行分析。

2.5 免疫后血清中抗狂犬病病毒抗体水平检测

为了进行特异性单个记忆性B细胞的分选,我们对志愿者免疫前后的血清进行了ELISA检测,结果显示,高亲和力的GST-RVG可用于免疫后血清样本的分析检测,与亲和力的计算结果吻合,由此,我们最终确认GST-RVG用于记忆B细胞的分选(图4)。且当血清稀释度为6400倍时,阴性血清和志愿者1的免疫后血清 OD_{450} 值相比 $P<0.01(**)$,差异具有较强的统计学意义,阴性血清和人狂犬病毒免疫球蛋白 OD_{450} 值相比 $P<0.05(*)$,差异具有统计学意义,故选择志愿者1的PBMCs进行下一步实验。

2.6 流式细胞术分选特异性结合记忆性B细胞

在比较了10、20和40 μg GST-RVG-FITC染色 1×10^6 个PBMCs的荧光信号强弱后,确定以20 μg GST-RVG-FITC标记 1×10^6 个PBMCs,随后采用anti-CD19-PE抗体(CD19,B细胞特异性表面分子)、anti-CD27-APC抗体(CD27,记忆B细胞特异性表面分子)和GST-RVG-FITC进行狂犬病毒抗原特异性记忆B细胞的分选,

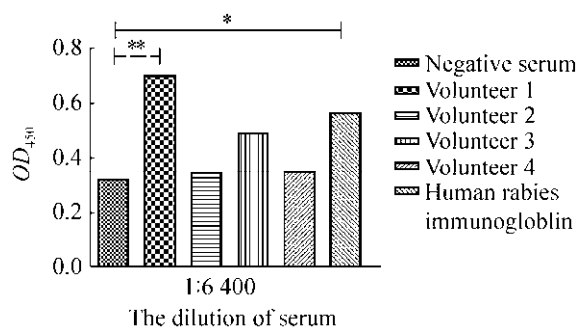


图4 间接ELISA检测免疫后志愿者血清抗体结果
Fig. 4 Indirect ELISA detection of serum antibody results of volunteers after immunization.

流式细胞术检测结果显示,阴性对照组(免疫前)和实验组(免疫后)的B细胞、记忆B细胞分群及所占比例情况基本一致(图5B、C、F、G);阴性对照组中记忆B细胞(CD19+和CD27+)能识别GST-RVG而被GST-RVG-FITC染色的数量极少,而实验组中有相当数量的FITC阳性记忆B细胞(CD19+和CD27+),提示实验组中GST-RVG可以特异性结合记忆B细胞。如图5D、5H所示,我们选取了GST-RVG-FITC染色标记的部分记忆B细胞,初步比较了阴性对照组和实验组间的差别,即0% vs 8.11%。实验组中GST-RVG-FITC染色的记忆B细胞,可能含有抗狂犬病病毒抗体基因的B细胞克隆。

3 讨论

本实验采用基因工程的方法构建了pGEX-5X-1-RVG、pET28a-RVG和pET30a-G三个原核表达载体。通过不同温度、添加葡萄糖等诱表达条件的摸索,获得了大小分别为85 kDa (GST-RVG)、62 kDa (His-RVG)及55 kDa (His-G)的重组蛋白,Western blotting结果显示均能够与阳性血清特异性结合,竞争性ELISA^[17]结果显示,3个蛋白中,仅GST-RVG与抗狂犬病病毒抗体为较高亲和力结合。随后,以GST-RVG为初步候选抗原进行下一步实验,间接ELISA结果显示GST-RVG能够用于检测狂犬病病毒疫苗免疫后志愿者血清抗体水平高低,FITC荧光标记GST-RVG后,结合CD19、CD27抗体,流式细胞术检测志愿者1的PBMCs,可以检测分选到抗原特异性的记忆B细胞。

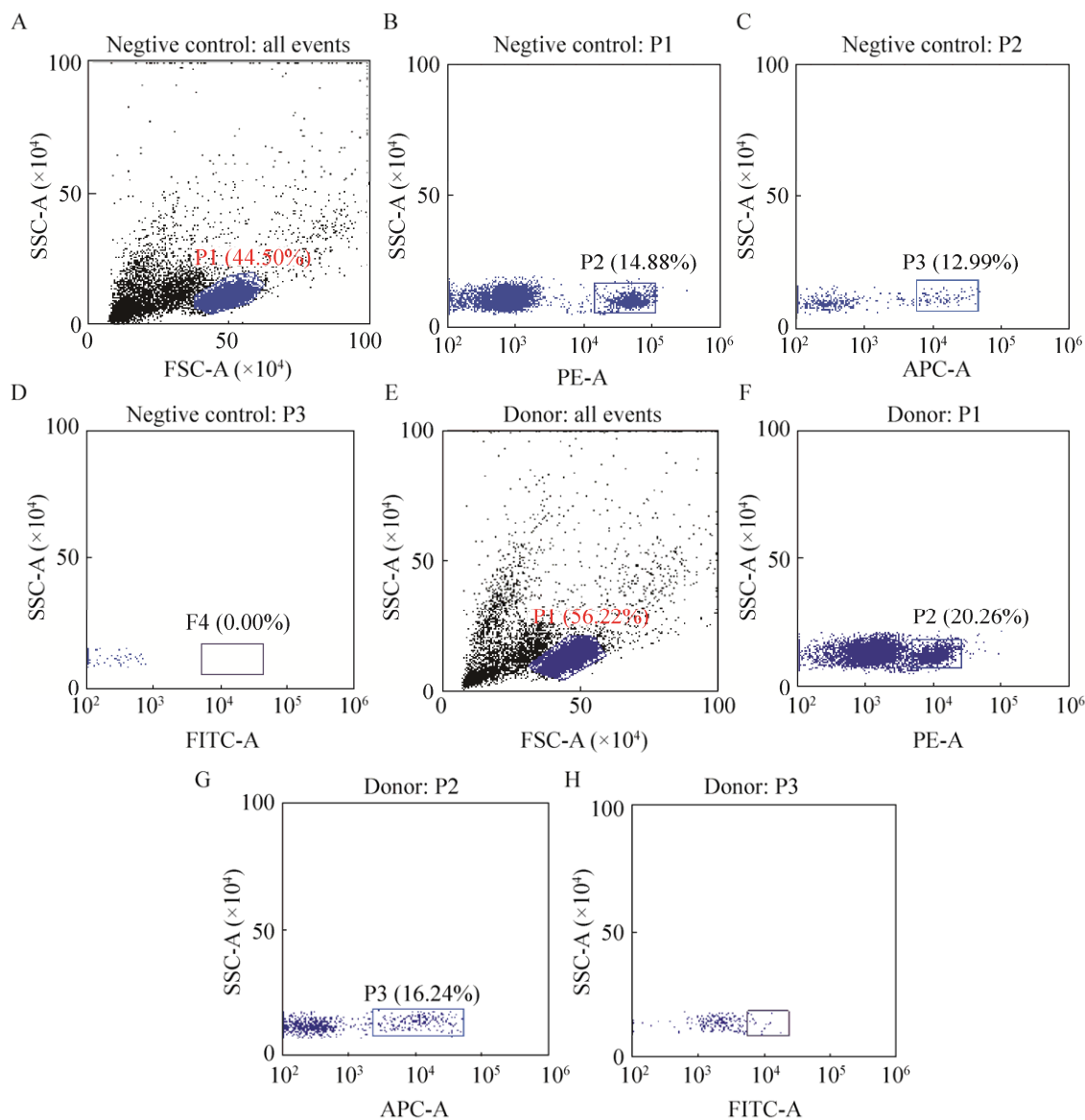


图 5 流式细胞术分析 PBMC 的抗狂犬病毒记忆 B 细胞

Fig. 5 Flow cytometry analysis of anti-rabies virus memory B cells of PBMCs. (A,E) PBMCs population selected on the basis of forward and side light scatter. (B,F) B cell selected from PBMCs (anti-CD19). (C,G) Memory B cell selected from B cell (anti-CD27). (D,H) Anti-rabies virus memory B cell selected from memory B cell (rabies virus glycoprotein labelled with FITC).

采用原核系统表达 RVG 是一个快速有效获得目的蛋白的方法^[18]。本实验表达纯化并分析了带不同标签的不同分子量的糖蛋白。由于膜蛋白的高度疏水性和错误的折叠可能引起蛋白

聚集，从而导致快速降解或是形成沉淀，故膜蛋白通常很难大量表达和纯化。但是如果膜蛋白以融合蛋白的形式表达，这个问题可以在一定程度上得到缓解^[19]。可能的原因包括：1) 狂

犬病毒 G 蛋白胞外区蛋白 (His-G) 是带有 6×His 标签的重组蛋白,其标签对目的蛋白空间结构的影响相对较小。His-G 表达量高,但多以包涵体的形式存在,针对包涵体变性、复性和后续检测发现,其与阳性血清结合的亲和力较低,原因可能是狂犬病毒胞外区 G 蛋白的不完整性部分制约了其生物学功能^[20],变性和复性也可能影响了其折叠及功能^[21]。2) 对于重组蛋白 His-RVG,由于 RVG 全长基因信号肽、跨膜区和膜内区含有大量的稀有密码子,导致 RVG 全长基因难以获得高表达^[22],超声菌体上清中包含少量 His-RVG,而在添加 1% 葡萄糖培养后,其表达量明显增高,可能原因是完整的狂犬病毒 G 蛋白在此表达系统中毒性较大^[23],宿主菌受到了抑制,1% 的葡萄糖可以抑制毒性增强表达。但对其上清进行离子交换和亲和层析后,得到的 His-RVG 纯度偏低,杂蛋白可能会影响 His-RVG 与免疫球蛋白的结合,无法在后续实验中使用。3) 对于重组蛋白 GST-RVG,GST 是一种高度可溶的蛋白,可增加外源蛋白的可溶性^[24]。亲和层析纯化获得了纯度、浓度均满足我们实验目的的 GST-RVG,具备和抗体高亲和力结合的特性 ($K_a=1.38 \times 10^8$ L/mol),流式细胞技术显示 GST-RVG 能够和抗原特异性记忆 B 细胞结合,分离特异性群落的分群显示为阳性,阳性率为 0.15%。鉴于其与特异性细胞结合的高亲和力特性,该候选蛋白还可用来判断疫苗接种后的免疫效果及毒株间的抗原性比较。

目前,狂犬病的防治主要是通过疫苗进行预防和使用免疫球蛋白进行紧急治疗,但免疫球蛋白多来源于马及人血清,异源性和副作用导致了免疫球蛋白的使用受限^[25]。单个特异性记忆性 B 细胞分选制备单克隆抗体是一种制备

单克隆抗体的新型方法,该方法的关键点是分选得到单个抗原特异性记忆性 B 细胞,如何获得用于分选的高要求抗原至关重要。本研究基于表达不同的狂犬病病毒糖蛋白,进而选择具有较高纯度以及与阳性血清具有较高亲和力特性的蛋白,用于筛选抗狂犬病病毒糖蛋白的记忆性 B 细胞,为分离纯化得到单克隆抗体奠定基础。

REFERENCES

- [1] Perrin P, Thibodeau L, Sureau P. Rabies immunosomes (sub-unit vaccine) structure and immunogenicity. Pre-and post-exposure protection studies. *Vaccine*, 1985, 3(3): 325–332.
- [2] Sun X, Roth SL, Bialecki MA, et al. Internalization and fusion mechanism of vesicular stomatitis virus and related rhabdoviruses. *Future Virol*, 2010, 5(1): 85–96.
- [3] Roche S, Gaudin Y. Characterization of the equilibrium between the native and fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein indicates that the fusion complex is made of several trimers. *Virology*, 2002, 297(1): 128–135.
- [4] Wunner WH, Larson JK, Dietzschold B, et al. The molecular biology of rabies viruses. *Rev Infect Dis*, 1988, 10(S4): S771–S784.
- [5] Benazoun S, Benzakour M, Sghaier S, et al. Expression of rabies virus glycoprotein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol Appl Bioche*, 2017, 64(1): 50–61.
- [6] de Pourcq K, de Schutter K, Callewaert N. Engineering of glycosylation in yeast and other fungi: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(5): 1617–1631.
- [7] Ramya R, Subramanian BM, Sivakumar V, et al. Expression and solubilization of insect cell-based rabies virus glycoprotein and assessment of its immunogenicity and protective efficacy in mice. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(10): 1673–1679.

- [8] Prehaud C, Takehara K, Flamand A, et al. Immunogenic and protective properties of rabies virus glycoprotein expressed by baculovirus vectors. *Virology*, 1989, 173(2): 390–399.
- [9] Zhang JM, Wang LL, Deng YQ, et al. Expression and purification of glycoprotein gene of rabies virus in prokaryotic system. *Strait J Prev Med*, 2009, 15(2): 1–4 (in Chinese).
张建明, 王灵岚, 邓艳琴, 等. 狂犬病毒糖蛋白基因在原核系统中的表达及纯化. *海峡预防医学杂志*, 2009, 15(2): 1–4.
- [10] Tordo N, Poch O, Ermine A, et al. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(11): 3914–3918.
- [11] Hu RL, Zhang SF, Fooks AR, et al. Prevention of rabies virus infection in dogs by a recombinant canine adenovirus type-2 encoding the rabies virus glycoprotein. *Microbes Infect*, 2006, 8(4): 1090–1097.
- [12] Jia WH, Luo DY, Wang XL. Research progress in memory B cell. *Int J Immunol*, 2009, 32(5): 362–368 (in Chinese).
贾卫红, 罗德炎, 王希良. 记忆性 B 细胞的研究进展. *国际免疫学杂志*, 2009, 32(5): 362–368.
- [13] Cox KS, Tang AM, Chen ZF, et al. Rapid isolation of dengue-neutralizing antibodies from single cell-sorted human antigen-specific memory B-cell cultures. *mAbs*, 2016, 8(1): 129–140.
- [14] Ho IY, Bunker JJ, Erickson SA, et al. Refined protocol for generating monoclonal antibodies from single human and murine B cells. *J Immunol Methods*, 2016, 438: 67–70.
- [15] Tiller T. Single B cell antibody technologies. *N Biotechnol*, 2011, 28(5): 453–457.
- [16] Tiller T, Meffre E, Yurasov S, et al. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods*, 2008, 334(1/2): 112–124.
- [17] Shen BF, Chen ZN, Liu MP. Recombinant Antibody. Beijing: Science Press, 2005: 459–463.
沈倍奋, 陈志南, 刘民培. 重组抗体. 北京: 科学出版社, 2005: 459–463 (in Chinese).
- [18] Gómez S, López-Esteba M, Fernández FJ, et al. Protein complex production in alternative prokaryotic hosts//Vega MC, Ed. *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization*. Switzerland: Springer International Publishing, 2016.
- [19] Singh A, Yadav D, Rai KM, et al. Enhanced expression of rabies virus surface G-protein in *Escherichia coli* using SUMO fusion. *Protein J*, 2012, 31(1): 68–74.
- [20] Sato S, Ohara S, Tsutsui KI, et al. Effects of G-gene deletion and replacement on rabies virus vector gene expression. *PLoS ONE*, 2015, 10(5): e0128020.
- [21] Basharov MA. Residual ordered structure in denatured proteins and the problem of protein folding. *Indian J Biochem Biophys*, 2012, 49(1): 7–17.
- [22] Atanasiu P, Tsiang H, Perrin P, et al. Immunogenicity and protective activity of glycoprotein extracted from rabies virus: results from comparison of preparations obtained by different methods of purification (author's transl). *Ann Microbiol*, 1976, 127B(2): 257–267.
- [23] Ohara S, Sato S, Oyama K, et al. Rabies virus vector transgene expression level and cytotoxicity improvement induced by deletion of glycoprotein gene. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e80245.
- [24] Zhao XY, Li GS, Liang SF. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *J Anal Methods Chem*, 2013, 2013: 581093.
- [25] Ega TT, Luboobi LS, Kuznetsov D. Modeling the dynamics of rabies transmission with vaccination and stability analysis. *Appl Comput Math*, 2015, 4(6): 409–419.

(本文责编 郝丽芳)