

人源抗 HBsAg 单链抗体在巴氏毕赤酵母中的表达

熊 盛¹ 任向荣² 唐永红² 粟宽源² 余宙耀^{2*} 罗 勇¹ 王一飞^{1*} 李久香¹

(¹ 暨南大学生物医药研究开发基地 广州 510630; ² 解放军 458 医院全军传染病中心 广州 510640)

摘 要 在 *P. pastoris* 中分泌表达非融合抗 HBsAg 单链抗体(HBscFv)。设计引物从 pGEM-HBscFv 上扩增目的基因,亚克隆至 *P. pastoris* 表达载体 pPICZαA 中,线性化后转化 *P. pastoris* GS115 转化子经菌落 PCR、高浓度 Zeocin 抗性筛选鉴定后,用醇诱导目的蛋白表达。结果发现,重组 HBscFv 可以在 α 因子的引导下,分泌至培养基中,产量为 80mg/L,分泌至培养基中的 HBscFv 具有结合 HBsAg 活性,活性总量在诱导培养 72h 后达最高峰,在诱导培养后期,HBscFv 活性下降,PAS 糖显色结果表明,酵母表达 HBscFv 是一种低糖基化蛋白或非糖基化蛋白。

关键词 乙型肝炎,单链抗体,巴氏毕赤酵母,表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0019-05

乙型肝炎病毒感染是全球性公共卫生问题,能和乙肝病毒表面特异性位点结合并封闭其侵袭肝细胞活性的抗体和抗体片段是唯一能用于紧急预防的生物制品^[1]。现在使用的乙肝表面抗体(HBsAb)均为人血源抗体,由于各类肝炎和艾滋病的蔓延,血源性 HBsAb 的安全性逐渐引起人们的关注。针对这一问题,多个研究小组报道了在 *E. coli* 中表达鼠源^[1-3]或人源^[4-6]抗 HBsAg 小分子抗体的研究结果,最近还有在 CHO^[7]和转基因烟草^[8]中进行这方面研究的报道,由于抗体的特殊性和表达系统的局限性,这些研究结果距现实应用都还为时尚早。为了大量获得活性更强的可溶性 HBscFv,我们尝试在巴氏毕赤酵母(*P. pastoris*)中表达前期研究获得的一株人源抗 HBsAg 单链抗体(anti-HBsAg single chain Fv, HBscFv)。 *P. pastoris* 具有比大肠杆菌更高级的蛋白折叠和翻译后修饰系统,并且较其它真核表达系统更容易操作,表达量更高,应用极为广泛^[9]。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒:含人源 HBscFv 基因的重组质粒 pGEM-HBscFv 由本室保存。*P. pichia* 表达载体 pPICZαA、宿主菌 GS115(*his4*)、KM71(*his4 arg4 aox1*

Δ :*SARG4*)及 *E. coli* TOP10 均购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 引物:用于扩增 HBscFv 的引物:P1,5'-CG GAATTC CAGGTGCTGGTGGAGTCTGGG-3',其中划线部分为引入的 *EcoR* I 酶切位点;P2,5'-GCTCTAGATCAT-TATCGAATGATTCACCTTG-3'其中划线部分为引入的 *Xba*I 酶切位点。用于测序及鉴定外源基因整合至 *P. pichia* 基因组的引物:5' AOX1 *Pichia* primer,5'-GCAAATGGCAITCTGACATCC-3';3' AOX1 *Pichia* primer,5'-GACTGGTTC AATTGACAAGC-3'。以上引物均委托上海生工公司合成。

1.1.3 主要试剂:各种限制酶、VentTM DNA 聚合酶及连接酶购自 New England Biolabs;酵母细胞壁裂解酶 Zymolase、抗生素 Zeocin 及酵母氮碱(YNB)干粉购自 Invitrogen 公司;质粒提取及 DNA 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司;彩色预染蛋白质分子量标准品购自 Bio-Rad laboratories;重组 HBsAg 及乙型肝炎表面抗体检测试剂盒购自中山生物工程公司。用于重组蛋白表达的 BMGY、BMMY 培养基按文献[10]方法配制。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 体外重组:PCR 扩增及 DNA 酶切、连接、转化 *E. coli* TOP10 均参照文献[11]进行。

1.2.2 表达质粒转化 *P. pastoris*:表达质粒 pPIC-

HBscFv 经 *Sac* I 线性化后, LiCl 法转化 *P. pastoris* GS115^[10]。

1.2.3 菌落 PCR 检测目的基因整合^[12]: 取适量转化子菌落, 悬浮于 10 μ L 无菌水中, 加入 1u Zymolase 消化 10min, 然后置液氮中冷冻 30min, 融化后作为模板, 以 P1 和 P2 作为引物, PCR 扩增整合至酵母基因组中的目的基因。

1.2.4 筛选 Zeocin 高抗性的 *P. pastoris* 转化子: 从含 Zeocin 100mg/L 的 YPD 抗性平板上挑选一定数目的酵母转化子, 接种 YPD 液体培养基, 连续培养 3 代使菌液密度相同, 然后取适量菌液, 分别接种于含 Zeocin 1000 mg/L、2000 mg/L 的 YPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养至单菌落出现。

1.2.5 HBscFv 在 *P. pastoris* 中的表达^[10]: Mut⁺ (methanol utility plus phenotype, 甲醇利用野生型) *P. pastoris* 转化子单菌落接种 25mL BMGY 培养基, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 2~6, 离心收集细胞, 重悬于 100~200mL BMMY 中, 使 OD₆₀₀ 为 1.0, 继续振荡培养, 每 24h 补加甲醇 1 次, 至终浓度为 20mL/L, 同时取培养上清检测蛋白表达。Mut^s (methanol utility slow phenotype, 甲醇利用缓慢型) *P. pastoris* 转化子单菌落接种 200mL BMGY 培养基, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 2~6, 离心收集细胞, 重悬于 20~40mL BMMY 中, 继续培养。每 24h 补加甲醇一次, 至终浓度为 5mL/L, 同时取培养上清检测蛋白表达。

1.2.6 蛋白质含量测定: Bradford 法^[13]测定酵母培养上清中蛋白的绝对含量, 凝胶光密度扫描确定目的蛋白的相对含量。

1.2.7 兔抗 HBscFv 多克隆抗体的制备: 大肠杆菌表达的 HBscFv 经纯化、复性后, 皮下多点注射, 免疫体重 2kg 的雄性新西兰兔(购自中山医科大学实验动物中心), 每次 10 μ g, 间隔 10d, 共免疫 3 次, 最后一次免疫不用佐剂。抗体滴度达到预期目标后, 分离血清, 用 *P. pichia* GS115 和含表达载体 pQE-40 的 *E. coli* M15 [pREP4] 分别吸收非特异性抗体 3 次。

1.2.8 表达产物的活性检测: 间接 ELISA 法测定^[1]。包被有 HBsAg 的酶标板加入 *P. pastoris* 培养上清, 以兔抗 HBscFv 作为第一抗体, HRP 标记的羊抗兔 IgG 作为第二抗体, TMB 显色, 酶标仪 450nm/630nm 波长测定吸光度。

1.2.9 PAS 糖蛋白染色^[14]: SDS-PAGE 后的凝胶用乙酸/甲醇/水(10:35:55)固定 1h, 再置于 0.7% 过碘酸溶液(以 5% 冰醋酸作为溶剂)中 1h, 换蒸馏水略为漂洗后, 加入 50mL 0.2% 偏亚硫酸钠溶液(以 5%

冰醋酸作为溶剂), 浸泡 10min 后更换 50mL 偏亚硫酸钠, 再过 10min, 待凝胶完全脱色; 脱色后的凝胶置于希夫试剂中, 直至有红色条带出现; PAS 染色后, 脱色液脱去凝胶中残留的希夫试剂, 再进行常规考马斯亮蓝染色。

2 结 果

2.1 表达质粒的构建

由 pGEM-HBscFv 中扩增出的 HBscFv 序列经 *Eco*R I 和 *Xba* I 双酶切后, 插入同样酶切过的表达载体 pPICZ α A 中, 得表达质粒 pPIC-HBscFv, 其结构如图 1 所示, 其中, HBscFv 与长度为 89 个氨基酸残基的酿酒酵母 α 因子共阅读框融合, 由 α 因子引导 HBscFv 分泌至胞外。新生的 α factor-HBscFv 融合肽链在成熟、分泌过程中, 在 3 个蛋白酶剪切位点处相继断裂, 产生 N 末端含有 Glu-Phe 残基的成熟 HBscFv, 催化 HBscFv 成熟的蛋白水解酶及其作用位点示如图 2。pPICZ α A (3593bp) 经 HBscFv 编码序列插入后, 所得重组质粒的理论长度为 4286bp, 如图 3 是这两种质粒经 *Bam* H I 酶切后的电泳图谱。从图中可以看出, 重组质粒的长度符合理论值。序列测定结果表明, 包含 α -因子在内的整个 HBscFv 开放阅读框序列完全正确(结果未显示)。

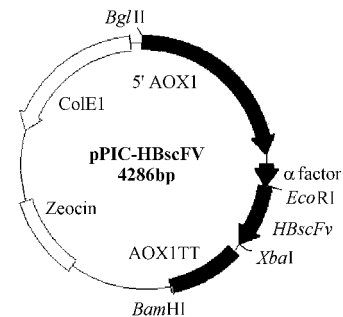


图 1 表达质粒 pPIC-HBscFv 结构

Fig.1 Structure of the expression plasmid pPIC-HBscFv

2.2 菌落 PCR 鉴定酵母转化子

随机挑选 8 个 *P. pastoris* GS115 转化子菌落, 以 P1、P2 为引物从酵母基因组 DNA 中扩增 HBscFv, 同时用宿主菌 GS115、KM71、整合有载体 pPICZ α A 的 GS115 及分泌表达 HSA 的 GS115 工程菌作为对照, 扩增结果如图 4。从图中可以看出, 阴性对照菌株均无扩增条带, 而 8 个转化子中, 除 D、E 号转化子外, 其它 6 个菌落均有目的基因整合。

2.3 重组 HBscFv 的表达

从 *P. pastoris* GS115 转化板上随机挑选 100 个

2.4 表达产物的活性测定

M 菌株经甲醇诱导后,不同时段取样,间接 ELISA 测定培养上清中 HBscFv 活性,同时测定菌液的细胞密度,结果如 Fig. 7 所示。从图中可以看出,培养液中 HBscFv 活性在 24h 后急剧上升,72h 后达到高峰,随后逐渐下降,120h 后降至高峰时的 67%。培养上清中 HBscFv 活性下降可能主要与衰老细胞释放出的蛋白水解酶有关。

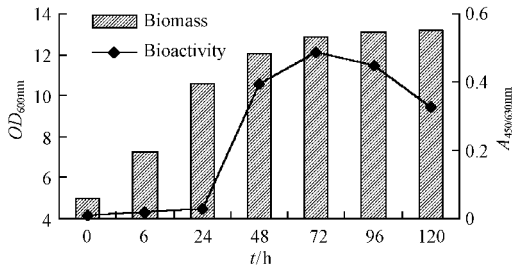


图 7 *P. pastoris* M 工程菌的生长曲线和活性图谱
Fig. 7 HBscFv bioactivity profile and the growth curve of GS115 transformant No. M

2.5 表达产物的糖基染色

蛋白质经过 PAS 糖基染色和考马斯亮蓝染色后,非糖基化蛋白或含糖量较低的糖蛋白呈通常所见的蓝色,而含糖量高的糖蛋白呈红色。Fig. 8 是酵母表达 HBscFv 的糖蛋白染色结果,从图中可以看出,酵母表达 HBscFv 显蓝色,说明酵母表达 HBscFv 含糖量较低或不含糖基。从 Fig. 8 中还可以看出,显红色的糖蛋白均是分子量较大且相对含量较高的蛋白质,这说明 PAS 糖显色法灵敏度有限,只能显色绝对对糖基量较高的蛋白带。

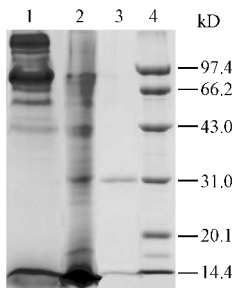


图 8 酵母表达 HBscFv 的糖基染色

Fig. 8 PAS staining determine the glycosylation of HBscFv produced by *P. pastoris*

1. GS115[*pPICZα*]; 2. *P. pastoris* transformant No. M; 3. HBscFv produced by *E. coli*; 4. Standard molecular weight markers

3 讨 论

单克隆抗体技术和各种展示技术的发展使得抗体基因的克隆逐渐成为常规,限制重组抗体进入临

床应用的最后一道瓶颈是抗体的高效表达和大规模生产。对于全抗体来说,CHO 系统仍是最常用的表达系统,对于小分子抗体来说,细菌、酵母和 CHO 均是可选择的表达系统^[9]。

本文所表达的 HBscFv 由 248 个氨基酸残基组成,分子中有 4 个 Cys 残基,形成 2 对分子内二硫键。我们曾利用原核分泌型和胞内型载体在大肠杆菌中表达该单链抗体,但结果都存在一定程度的局限,表达量很低或者产物形成包涵体。与大肠杆菌相比,*P. pastoris* 表达 HBscFv 最重要的优点在于它的高效分泌表达。虽然大肠杆菌也可以获得周质分泌型表达的重组抗体,但表达量很难超过 5mg/L,改用胞内包涵体型表达后,虽然可以提高表达量,但需要通过复杂的变性复性过程才能获得活性蛋白,且表达量不超过 35mg/L^[1,15]。本文采用 *P. pastoris* 表达 HBscFv,毋需复杂的变性复性过程,就可获得有活性的重组产物,且表达量更高。若采用发酵罐高密度培养技术,可进一步提高表达量,因为通过发酵罐高密度培养技术,可使 *P. pastoris* 的细胞密度提高 10 倍以上^[9]。

相对于前期研究获得的原核表达 HBscFv^[15] 酵母表达产物 N 末端不含纯化标签等异源成分,更有利于临床应用或晶体结构解析等基础研究。本文在构建表达质粒时,参照文献方法^[16],利用载体上的克隆位点 *EcoR* I、*Xba* I 引入目的序列,所以目的蛋白 N 末端不可避免带有 Glu-Phe 残基,若从 *EcoR* I 上游 24bp 处的 *Xho* I 位点开始设计引物,则可获得 N 末端完全非融合的目的蛋白,但要进行长引物 PCR。

筛选高表达的酵母工程菌是一件费时费力的工作。一般情况下,提高整合到 *P. pastoris* 基因组中外源基因的拷贝数可以提高表达量,而 *pPICZα* 载体上带有的 Zeocin 抗性基因也具有累加效应,因此,以 Zeocin 高抗性菌株为出发菌株,可以快速筛选到外源蛋白高表达的工程菌^[16]。

在 HBscFv 序列中没有 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr),但有一个可能的 O-糖基化位点 Ser₁₅₃(Net OGlyc 2.0 预测结果);虽然毕赤酵母主要进行 N-糖基化,但根据多项实验结果,我们发现酵母表达 HBscFv 的分子量比理论值增加,它与针对大肠杆菌来源 HBscFv 的单克隆抗体 14F7、15F1 反应但不与 15C3 反应,因此初步认为本文获得的酵母表达 HBscFv 含有 O-糖基化修饰,并且,该糖基化修饰可能屏蔽 HBscFv 的个别抗原表位,进一步确证实验正在进行中。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Sanchez L, Ayala M, Freyre F *et al.* High cytoplasmic expression in *E. coli*, purification, and *in vitro* refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen. *Journal of Biotechnology*, 1999, **7**(1 - 2): 13 - 20
- [2] Passafiume M, Normand B V, Riottot M M *et al.* Sequence analysis of a monoclonal antibody specific for the preS2 region of hepatitis B surface antigen, and the cloning, expression and characterization of its single-chain Fv construction. *FEBS letters*, 1998, **441**(3): 407 - 412
- [3] Kuttner G, Kramer A, Schmidtke G *et al.* Characterization of neutralizing anti-pre-S1 and anti-pre-S2 (HBV) monoclonal antibodies and their fragments. *Molecular Immunology*, 1999, **36**(10): 669 - 683
- [4] WANG Y (王琰), LIU Ch Y (刘群英), GAO R K (高荣凯) *et al.* Construction of ScFv expression vectors and expression of anti-HBs ScFv. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志), 1997, **17**(1): 68 - 71
- [5] MAO C S (毛春生), SONG H B (宋宏彬), LI J Z (李季枝) *et al.* High-level expression in *E. coli* and refolding of human Fab antibody against hepatitis B virus surface antigen (HBsAg). *Immunological Journal* (免疫学杂志), 1999, **15**(4): 229 - 231
- [6] YU Z Y (余宙耀), SU K Y (粟宽源), RENG X R (任向荣) *et al.* Screening antibody and purification of bacterially expressed human anti-HBs Fab. *Shanghai Journal of Immunological* (上海免疫学杂志), 1999, **19**(2): 91 - 93
- [7] Park S S, Ryu C J, Kang Y J *et al.* Generation and characterization of a novel tetravalent bispecific antibody that binds to hepatitis B virus surface antigens. *Molecular Immunology*, 2000, **37**(18): 1123 - 1130
- [8] Ramirez N, Ayala M, Lorenzo D *et al.* Expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for the hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research*, 2002, **11**(1): 61 - 64
- [9] Cereghion J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, **24**(1): 45 - 66
- [10] Invitrogen Corporation. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPIC Zain *Pichia pastoris*. Catalog no K1740-01, Version G, USA
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [12] Linder S, Schliwa M, Kube-Grandenath E. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques*, 1996, **20**(6): 980 - 982
- [13] Ausubel F, Brent R, Kingston R E *et al.* Using the Bradford method to determine protein concentration. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, New York: John Wiley and Sons Inc, 1987, 10.1.4 - 10.1.5
- [14] FANG D F (方德福). *Advanced technology of molecular biology* (分子生物学前沿技术). 1st ed, Beijing: Beijing Medical University Press, 1998, pp. 246 - 258
- [15] XIONG S (熊盛), RENG X R (任向荣), YAN X (严兴) *et al.* Purification of an anti-HBsAg scFv and measurement of its affinity constant. *Chinese Journal of Pathophysiology* (中国病理生理杂志), 2002, **18**(9): 1069 - 1073
- [16] Chen C M, Cheng W T, Chang Y C *et al.* Growth enhancement of fowls by dietary administration of recombinant yeast cultures containing enriched growth hormone. *Life Sciences*, 2000, **67**(17): 2103 - 2115

Expression of a Human Single-chain Fv Antibody Against HBsAg in *Pichia pastoris*

XIONG Sheng¹ REN Xiang-Rong² TANG Yong-Hong² SU Kuan-Yuan²
YU Zhou-Yao^{2*} LUO Yong¹ WANG Yi-Fei^{1*} LI Jiu-Xiang¹

¹(Biomedicine Research & Development Center, Jinan University, Guangzhou 510640, China)

²(Center of Infectious Diseases, The 458th Hospital of PLA, Guangzhou 510602, China)

Abstract To express and secrete native HBscFv (anti-HBsAg single-chain Fv) in *P. pastoris*, HBscFv was amplified from plasmid pGEM-HBscFv, and then sub-cloned into expression vector pPICZalphaA. The resulting plasmid pPIC-HBscFv was linearized and transformed into *P. pastoris* GS115. The recombinant *Pichia* strains, identified by direct PCR and Zeocin-resistant screening of *Pichia* transformants, were cultured and induced with methanol. It was found that recombinant HBscFv, lead by α -factor, could be secreted into the culture supernatant to a level of 80mg/L. The bioactivity of *Pichia* produced HBscFv was confirmed by indirect ELISA, which also suggested that the bioactivity of HBscFv in the culture supernatant reached its peak in 72h and decreased in the late-stage of the induction. PAS staining suggests that HBscFv produced by yeast is poorly glycosylated or none-glycosylated protein.

Key words hepatitis B, single-chain Fv, *Pichia pastoris*, expression

Received: 08-01-2002

This work was supported by Grant from Guangzhou municipal department of science and technology (No. 99-2-010-01) and National "863" High-tech Project (No. 2001AA215041).

* Corresponding author. Tel 86-20-85222706 Fax 86-20-85220908 E-mail 熊盛@journals.im.ac.cn 中国微生物学研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn