

毕赤酵母表达 CD63 单链抗体及其生物活性的鉴定

陈雪丹, 蔡志坚*

浙江大学 医学院 免疫学研究所, 浙江 杭州 310009

陈雪丹, 蔡志坚. 毕赤酵母表达 CD63 单链抗体及其生物活性的鉴定[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1440-1454.

CHEN Xuedan, CAI Zhijian. Expression and biological characterization of anti-CD63 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1440-1454.

摘 要: 为了制备能够特异性识别 CD63 蛋白胞外大环中保守结构域的抗体, 本研究利用毕赤酵母分泌表达 CD63 单链抗体(single chain variable fragment, scFv), 纯化后得到能特异性结合 CD63 蛋白以及 SK-MEL-28 细胞表面 CD63 分子的 CD63 scFv。对筛选得到的 CD63 单克隆抗体细胞株进行可变区测序得到重链可变区(variable heavy chain, VH)与轻链可变区(variable light chain, VL), 经柔性肽连接构成 scFv, 通过密码子优化后全基因合成 CD63 scFv 序列并克隆至毕赤酵母表达质粒 pPICZ α -A, 质粒经 *Sac* I 线性化后电转到毕赤酵母 X33, 1%甲醇诱导表达 scFv, 发酵上清通过 Ni 柱纯化, 并用 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行了鉴定。通过免疫印迹、免疫荧光、基于细胞的酶联免疫吸附实验、流式细胞术对 CD63 scFv 的生物活性进行鉴定。本研究成功构建了能够分泌表达抗 CD63 scFv 的毕赤酵母菌株, 抗体分子量约为 30 kDa, 能与 CD63 蛋白特异性结合。抗 CD63 scFv 在毕赤酵母中的表达是一种经济有效的抗体获取方法, 为大规模生产抗 CD63 抗体奠定了基础。

关键词: CD63 单链抗体; 毕赤酵母; 分泌表达; 亲和力; 特异性

Expression and biological characterization of anti-CD63 single-chain variable fragment antibody in *Pichia pastoris*

CHEN Xuedan, CAI Zhijian*

Institute of Immunology, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

Abstract: To prepare antibodies that specifically recognize the conserved domain in the large extracellular loop of the CD63 protein, we expressed anti-CD63 single-chain variable fragment (scFv) antibody in *Pichia pastoris* in a secreted form. The purified expression product was found to bind specifically with CD63 protein and recognize CD63 on the surface of SK-MEL-28

资助项目: 国家自然科学基金(31970845)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970845).

*Corresponding author. E-mail: caizj@zju.edu.cn

Received: 2024-07-17; Accepted: 2024-12-03; Published online: 2024-12-03

cells. The variable region of the anti-CD63 monoclonal antibody in an anti-CD63-positive cell line was sequenced. The anti-CD63 scFv consisted of a variable heavy chain and a variable light chain linked by a flexible peptide was then designed. After codon optimization, the gene was synthesized and cloned into the expression plasmid pPICZα-A. The *Sac*I-linearized plasmid was electroporated into *P. pastoris* X33, and 1% methanol were used to induce the expression of scFv. The fermentation supernatant was purified by Ni column. Anti-CD63 scFv was identified by SDS-PAGE and Western blotting, and its biological activities were analyzed by immunoblotting, immunofluorescence, cell-based ELISA, and flow cytometry. A *P. pastoris* strain capable of expressing and secreting anti-CD63 scFv was successfully obtained. The antibody had a molecular weight of approximately 30 kDa and specifically recognized CD63 protein. The expression of anti-CD63 scFv in *P. pastoris* paves the way for the production of anti-CD63 antibodies on a large-scale, which is undoubtedly an economical and effective way of antibody acquisition.

Keywords: anti-CD63 single-chain variable fragment; *Pichia pastoris*; secretory expression; affinity; specificity

CD63 基因位于人类 12q13 染色体上, 编码一个含有 237 个氨基酸的蛋白, 分子量在 30–60 kDa 之间^[1]。CD63 具有 4 个疏水跨膜结构域, 属于四次跨膜蛋白家族, 是一个有 28 个成员的质膜蛋白超家族。包括 CD63 在内的四次跨膜蛋白的结构包括形成短胞质结构域的 N 端和 C 端、跨膜结构域 2 和 3 之间的胞内互连环, 以及 2 个胞外结构域[跨膜结构域 1 和 2 之间的小环(small extracellular loop, SEL)以及跨膜结构域 3 和 4 之间的大环(large extracellular loop, LEL)]。四次跨膜蛋白的特征是在其 4 个跨膜结构域中具有高度保守的序列, 并在大的胞外环中存在 CCG 基序^[2]。CD63 在几乎所有的细胞和组织类型中均有表达, 不仅位于细胞质膜上, 还位于晚期内体、溶酶体和多囊泡体(multivesicular bodies, MVBs)中^[3]。

外泌体的生物合成被认为始于内吞作用引起的膜嵌入(图 1)。细胞膜嵌入后形成早期内体, 当其成熟并成为晚期内体后, 膜嵌入形成腔内囊泡(intraluminal vesicles, ILVs)。当含有大量 ILVs 的多囊泡体与细胞膜融合时, 会分泌囊泡。在此过程中分泌的囊泡通常被称为外泌体^[4]。有研究

发现, CD63 存在于细胞膜表面, 但更多地定位于内体和溶酶体中, 它在 ILVs 中的丰度大约比晚期内体中高 7 倍, 还参与 ILVs 的分选^[5]。Fordjour 等^[6]发现, 通过突变内吞信号(CD63/Y235A), 将 CD63 从内体重定向到质膜, 其外泌体分泌增加了 6 倍, 而通过添加内体靶向信号(CD9/YEVM), 将 CD9 重定向到内体, 其外泌体分泌减少了 80%。这些数据表明, 定位于质膜的蛋白更有利于外泌体的分泌。质膜是外泌体生物发生的主要部位, 更重要的是, 细胞拥有外泌体出芽(budding)的共同途径, 即在质膜和内体膜上都起作用。

CD63 是广泛存在于外泌体表面的四次跨膜蛋白受体之一。外泌体标志物 CD63 在外泌体分离鉴定、免疫磁珠法纯化回收以及外泌体载药、靶向修饰等方面有较高应用价值。目前国内外已有几十家公司主要聚焦外泌体研究, 近年来也有大型生物医药公司 Lonza^[7]、Eli Lilly^[8]等加入到外泌体诊断与治疗领域。随着外泌体研究领域的不断发展, 对靶向外泌体标志物抗体的需求也逐步增加。目前市售的 CD63 抗体大多是鼠源的单克隆抗体, 且腹水法生产的单抗数量有限, 往往无法满足工业化生产的需求。

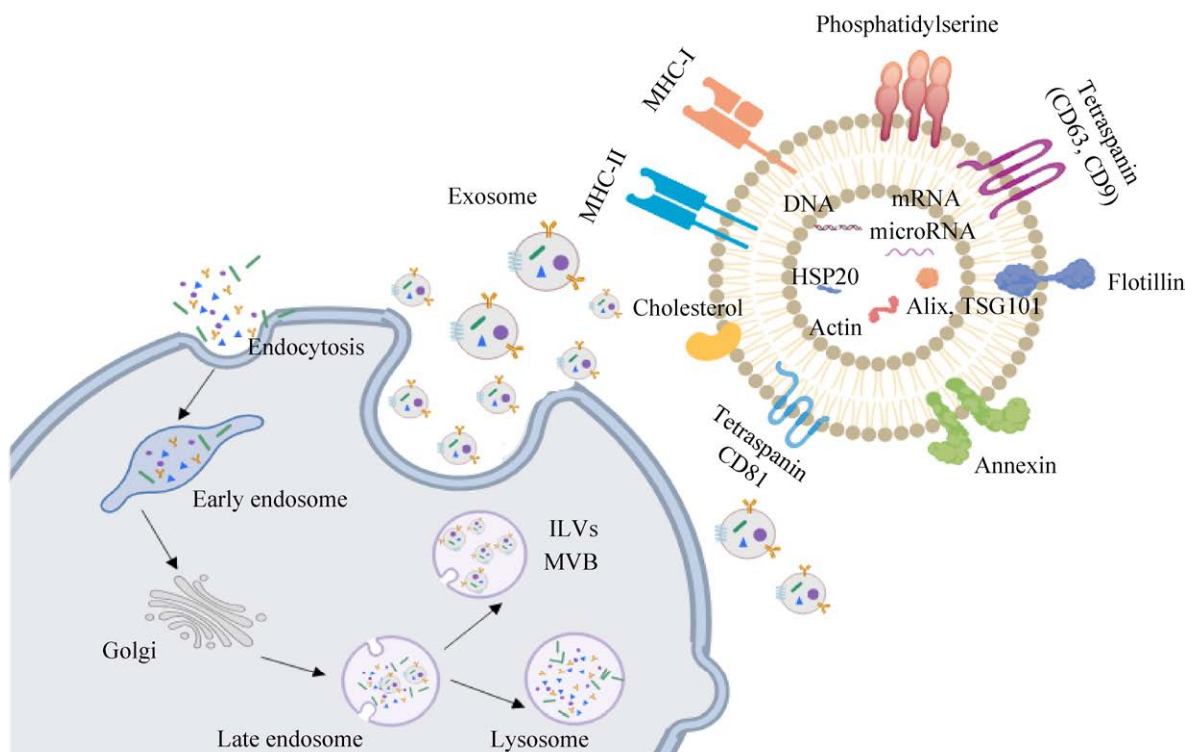


图1 外泌体产生机制

Figure 1 Mechanism of exosome production. Exosomes are formed by embedding in cell membranes and are secreted outside the cell when they contain a large number of molecules on the membrane surface or within the vesicles. ILVs: Intraluminal vesicles; MVB: Multivesicular body; MHC: Major histocompatibility complex; HSP20: Heat shock protein 20; TSG101: Tumor susceptibility gene 101. Created with MedPeer.

近年来,毕赤酵母表达系统渐受关注,艾普奈珠单抗(Eptinezumab)^[9]是继 Ablynx 公司的卡拉西单抗(Caplacizumab)获美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准上市后的又一种采用毕赤酵母表达系统生产的抗体药物。毕赤酵母不仅具有原核表达系统的优势^[10],如生产成本低、发酵周期短、易于培养、操作简便、可大规模生产等,同时还有真核表达系统的特点,如蛋白加工、折叠、翻译后修饰等。因此,毕赤酵母受到越来越多生物医药企业的青睐。毕赤酵母与中国仓鼠卵巢细胞(chinese hamster ovary cell, CHO)表达系统相比也有诸多优势,首先,毕赤酵母构建细胞株更快;其次,毕赤酵母细胞倍增时间较 CHO 短,可以明

显缩短发酵周期;最后,毕赤酵母表达系统有操作更简单、更便宜、更高产的特点,可以进行高密度发酵培养,从而大幅降低抗体的生产成本。

本研究采用毕赤酵母表达系统发酵生产抗 CD63 胞外大 loop 结构域的单链抗体(single chain variable fragment, scFv),以期对外泌体诊断与靶向外泌体研究提供更加经济、有效的抗体。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株及细胞

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) X33 及表

达质粒 pPICZ α -A 购自赛默飞世尔科技公司;大肠杆菌 DH5 α 、HEK 293 细胞系、人恶性黑色素瘤细胞 SK-MEL-28 为本实验室保存。

1.1.2 试剂

Sac I、Xho I、BamH I 均为 New England Biolabs 公司产品;DNA marker 为 Biosharp 公司产品;博来霉素(zeocin)购自上海懋康生物科技有限公司;三色预染蛋白 Marker 购自上海七纯生物科技有限公司;聚丙二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜购自默克公司;HRP-conjugated 6 $\times$ His antibody、CoraLite[®] 594-conjugated 6 $\times$ His antibody、CoraLite[®] 647-conjugated 6 $\times$ His antibody、Myc tag Monoclonal antibody、放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、灵敏 ECL 化学发光检测试剂盒购自武汉三鹰生物技术有限公司;Goat anti-Mouse IgG (H&L) HRP 购自 Immunoway 公司;DMEM、1640 细胞培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司;PCR 产物回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司;Tris-MOPS 电泳缓冲液、Sure PAGE[™] 购自南京金斯瑞生物科技有限公司;酵母提取物、蛋白胨购自 Oxoid 公司;YNB 购自 BD Difco 公司;山梨醇购自国药集团化学试剂有限公司;其余化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 试剂配制

酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD): 1%酵母抽提物, 2%胰蛋白胨, 2%葡萄糖(0.45 μ m 滤膜过滤除菌, 待培养基降温到 50 $^{\circ}$ C 左右加入), 固体培养基再加入琼脂 15 g/L, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。按需加入一定量 100 mg/mL 的博来霉素配制成不同浓度梯度的 YPD 抗性筛选平板。

基础甲醇培养基(minimal methanol medium, MM): 1.34%无氨基酸酵母氮源、1%甲醇与 0.000 04%生物素(0.45 μ m 滤膜过滤除菌, 待培养基降温到 50 $^{\circ}$ C 左右加入), 固体培养基再加入

琼脂 15 g/L, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。按需加入一定量 100 mg/mL 的博来霉素配制成 MM 平板。

含有甘油的缓冲性完全培养基(buffered glycerol-complex medium, BMGY): 1%酵母抽提物, 2%胰蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0), 1%甘油, 1.34%无氨基酸酵母氮源与 0.000 04%生物素(0.45 μ m 滤膜过滤除菌, 待培养基降温到 50 $^{\circ}$ C 左右加入), 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

含有甲醇的缓冲性复杂培养基(buffered methanol-complex medium, BMMY): 1%酵母抽提物, 2%胰蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0), 1.34%无氨基酸酵母氮源、1%甲醇与 0.000 04%生物素(0.45 μ m 滤膜过滤除菌, 待培养基降温到 50 $^{\circ}$ C 左右加入), 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 Anti-CD63 scFv 基因的设计及合成

将 CD63 单克隆抗体的重链可变区(variable heavy chain, VH)与轻链可变区(variable light chain, VL)序列通过 GS 柔性肽 linker 进行连接 [VH-(G4S)₃-VL], 经过密码子优化与全基因合成将目的片段无缝克隆到表达载体 pPICZ α -A 上。添加 α -factor 信号肽, 保留载体上的 Myc 和 His 标签方便后续抗体的纯化与鉴定。目标序列委托南京铭研生物科技有限公司合成(图 2)。

1.2.2 酵母菌转化、筛选

将上述重组质粒和空载体 pPICZ α -A 分别用 Sac I 单酶切线性化, 之后经过 PCR 产物回收试剂盒直接回收并电泳鉴定, 产物浓度大于 100 ng/ μ L, 线性化质粒总量大于 5 μ g, 可用于电转。用 Bio-Rad 电转仪(1 500 V, 25 μ F, 200 Ω , 5 ms)进行电击, 将线性化后的质粒分别转化至毕赤酵母菌株 X33 中。取转化菌涂布于含有 zeocin 的 YPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 2–3 d。将转化子分别转接于不同梯度的含 25、50、100、300、500 μ g/mL zeocin YPD 固体平板上以及仅含有甲醇作为唯

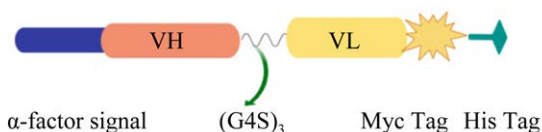


图2 Anti-CD63 scFv 序列结构的示意图

Figure 2 Schematic of the anti-CD63 scFv. Created with MedPeer.

一碳源的含 25 $\mu\text{g/mL}$ zeocin 的 MM 平板上, 48 h 左右观察转化子的生长情况。

1.2.3 甲醇诱导表达及鉴定

随机挑取 7 个能够在含 300 $\mu\text{g/mL}$ zeocin 的 YPD 平板以及 MM 平板生长的毕赤酵母菌株进行甲醇诱导表达。分别接种于 5 mL BMGY 培养基中进行扩大培养至 OD_{600} 值为 2.0–6.0, 1 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用适量体积的 BMMY 培养基重悬, 使毕赤酵母菌株的起始接种密度为 OD_{600} 约 1.0, 培养体系为 BMMY 培养基(1%甲醇) 10 mL, pH 6.0, 诱导温度为 24 $^{\circ}\text{C}$ 。每隔 24 h 取样 100 μL 并补加甲醇至终浓度为 1%, 连续甲醇诱导 3 d, 诱导 anti-CD63 scFv 的表达。

1.2.4 目标抗体的纯化和鉴定

酵母发酵液采用 Ni 柱纯化, 首先对 Ni 柱进行再生, 上样平衡后用 50、250、500 mmol/L 咪唑进行梯度洗脱, 对 50 mmol/L 与 250 mmol/L 咪唑洗脱组分进行 SDS-PAGE 鉴定, 并通过 Western blotting 对目标抗体进行进一步鉴定。

1.3 anti-CD63 scFv 生物活性的鉴定

1.3.1 细胞 ELISA 检测毕赤酵母表达的 anti-CD63 scFv 生物活性

将 SK-MEL-28 细胞按每孔 2×10^4 个的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 贴壁培养 24–48 h, 待细胞伸展至长满 96 孔板即可用于后续检测。加入 100 μL 的 8% 多聚甲醛溶液, 将细胞固定到 96 孔板上, 室温固定 30 min。用 PBS 洗 3 次, 加入 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。用 PBS 洗 3 次, 将表达纯化后的毕赤酵母来源的抗体稀释至一定比例作为一抗, 加入到 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。用 PBS

洗 5 次, 将 anti-His-HRP 二抗按 1:10 000 稀释, 每孔 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。用 PBS 洗 5 次, 加入 100 μL 显色液, 室温显色 5–10 min。加入 100 μL 终止液, 酶标仪上测定 OD_{450} 吸光值。整个 PBS 洗涤过程需轻柔, 避免细胞脱落影响读数。

1.3.2 Western blotting 鉴定 anti-CD63 scFv 对人恶性黑色素瘤细胞 SK-MEL-28 与 CD63 蛋白的结合活性

将长满的 T75 细胞培养瓶中的 SK-MEL-28 细胞去除培养基后, PBS 洗 2–3 遍, 加入 3 mL 胰酶消化并收集细胞沉淀, 加入 500 μL 预冷的 RIPA 裂解液, 置于冰上裂解 1 h, 收集细胞裂解液, 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 与蛋白上样缓冲液混匀后上样, SDS-PAGE 电泳 45 min。然后通过 eBlotTML1 快速湿转仪将凝胶中分离的蛋白转印至 PVDF 膜上。PVDF 膜经含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h 后, 用纯化所得的不同组分的 anti-CD63 scFv 室温孵育 2 h。PVDF 膜经 TBST 洗 3 次, 每次 5 min。用含有 His 标签的小鼠单克隆抗体(1:2 000)作为二抗, 室温孵育 1 h。对于用 HEK293 细胞中表达的 CD63 蛋白则以含有 myc 标签的小鼠单克隆抗体(1:2 000)作为二抗, 室温孵育 2 h。PVDF 膜再经 TBST 洗 3 次, 每次 5 min。以含 HRP 的山羊抗小鼠抗体(1:5 000)为三抗, 室温孵育 1 h。最后根据 ECL 化学发光试剂盒的操作说明在全自动化学发光凝胶成像系统(ChampChemiTM)中观察结果。

1.3.3 免疫荧光检测 anti-CD63 scFv 对 SK-MEL-28 细胞膜表面 CD63 的结合活性

将天然高表达 CD63 的阳性细胞株 SK-MEL-28 作为检测用细胞, 以合适的密度接种于 6 孔板中, 将无菌盖玻片置于 6 孔板中, 进行细胞爬片; 取出铺好细胞的盖玻片, 用 PBS 洗 1 遍; 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 200 μL /孔, 室温固定 30 min, PBS 洗 3 遍; 在室温下将细胞与 anti-CD63 scFv (毕赤酵母发酵所得) 孵育 60 min; 然后用 1%

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液稀释荧光二抗(CoraLite® 594-conjugated 6×His antibody), 1:100 稀释, 每孔加入 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 用 PBS 洗 3 遍; 用 DAPI 染色细胞核, 室温避光孵育 10 min, PBS 洗 3 遍; 在荧光显微镜下观察实验结果。

1.3.4 流式细胞术检测 anti-CD63 scFv 对 SK-MEL-28 细胞表面的 CD63 的结合活性

将天然高表达 CD63 的阳性细胞株 SK-MEL-28 作为检测用细胞, CoraLite® 647-conjugated 6×His antibody 作为二抗, 对自制 anti-CD63 scFv (作为一抗)进行亲和力检测。收集并洗涤 SK-MEL-28 细胞, 用冰冷 PBS 溶液重悬细胞至约 $(1-5) \times 10^6$ 细胞/mL。向每根离心管中添加 100 μ L 细胞悬液。添加一抗(100 μ g/mL)。4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。细胞洗涤 3 次: 以 400 $\times g$ 的速度离心 5 min, 然后在冰冷的 PBS 中重悬。使用 3% BSA/PBS 将荧光染料标记二抗稀释到最佳浓度(1:2 000 稀释), 然后在该溶液中对细胞进行重悬。4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。细胞洗涤 3 次: 以 400 $\times g$ 的速度离心 5 min, 然后在冰冷 PBS 溶液中重悬。之后立即用流式细胞仪对细胞进行分析。

1.4 Alphafold2 软件预测蛋白-蛋白相互作用

通过在线软件 AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com>)对 CD63 抗原(胞外大 loop-LEL, GenBank 登录号: NP_001244318.1)与 anti-CD63 scFv (unpublished data)进行蛋白-蛋白相互作用预测(CD63 LEL loop 序列: anti-CD63 scFv 序列填入 query_sequence, 修改 jobname; 然后点击全部运行, 大约 30 min-1 h 可以完成计算), 计算完成后, 计算结果会以压缩包的形式保存。压缩包里面有 5 个 pdb 文件, rank_001 是可信度较高的。这个 pdb 文件是预测的三维结构, 可以导入到可视化软件进行展示(例如导入到 pymol 分析互作)。然后对运算结果评分最高者(scores_rank_001_)进行 pymol 分析(<https://pymol.org/2/>)。

2 结果与分析

2.1 pPICZ α -A-CD63 scFv 重组表达载体的鉴定

pPICZ α -A-CD63 scFv 质粒图谱见图 3A, 其中 VH 与 VL 通过(G4S)₃ 柔性肽进行连接, 位于

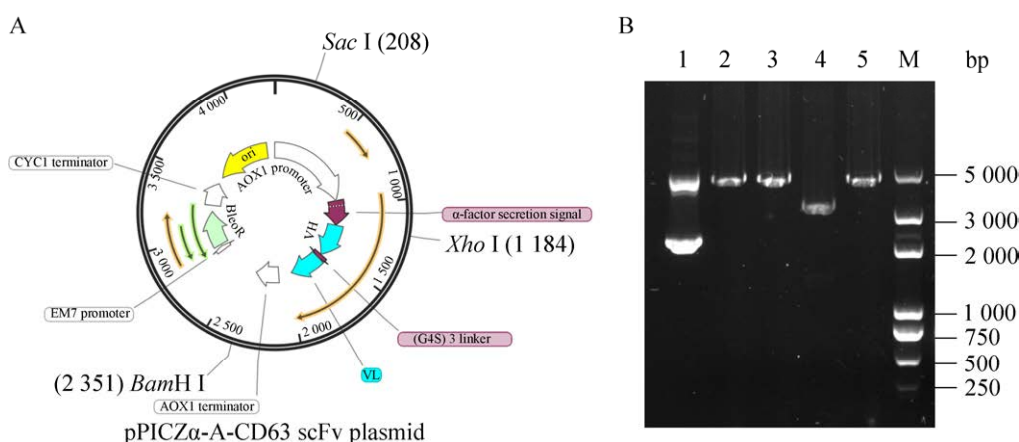


图 3 pPICZ α -A-CD63 scFv 质粒图谱(A)与酶切电泳图(B)

Figure 3 Plasmid map and enzyme digestion of pPICZ α -A-CD63 scFv. A: Plasmid map of pPICZ α -A-CD63 scFv. The VH and VL are linked by (G4S)₃ flexible peptide, located at the behind of α -factor signal peptide. B: Enzyme digestion of pPICZ α -A-CD63 scFv. Lane 1: Undigested plasmid; Lane 2, 3: Plasmid digested with Xho I or BamH I; Lane 4: Plasmid digested with Xho I and BamH I; Lane 5: Plasmid linearized with Sac I; M: DNA marker.

α -factor 信号肽之后; pPICZ α -A-CD63 scFv 质粒经 *Xho* I/*Bam*HI 双酶切后的电泳图见图 3B。

2.2 毕赤酵母阳性转化子 Mut⁺表型筛选与抗性筛选

随机挑取的毕赤酵母阳性转化子在含 25、50、100、300 μ g/mL 的博来霉素 YPD 抗性平板与含 25 μ g/mL 博来霉素的 MM 平板上生长良好; 部分毕赤酵母阳性转化子菌株可以耐受 500 μ g/mL 的博来霉素抗性筛选, 可以为后续大规模发酵生产抗体提供高拷贝的高产菌株; 并且这些高拷贝(1#, 5#, 6#)转化子均能在 MM 平板上生长, 说明它可以利用甲醇, 是 Mut⁺而非 Mut^s表型, 在电转质粒进行同源重组的过程中其 AOX1 基因没有被替换(图 4)。

2.3 Anti-CD63 scFv 在毕赤酵母菌株中的初步表达

毕赤酵母阳性转化子(1#-7#)在含 1% 甲醇的 BMMY 培养基中连续 3 d 进行诱导, 可表达出 anti-CD63 scFv, 目的条带大约 30 kDa (图 5); 但由于毕赤酵母发酵液上清中存在较多除了 anti-CD63 scFv 以外的杂质, 比如 AOX1 蛋白含量高达细胞分泌总蛋白的 30%^[11]。为了对得到的 anti-CD63 scFv 的生物活性进行进一步鉴定,

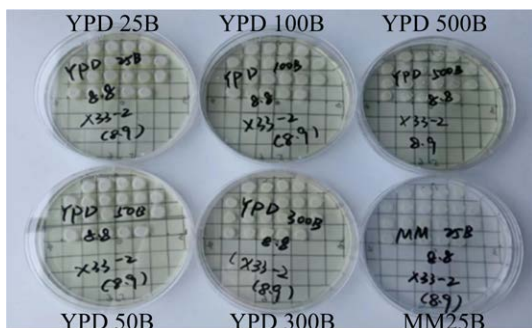


图 4 毕赤酵母转化子 Mut⁺表型筛选(MM 平板)与抗性筛选(YPD 平板)

Figure 4 *Pichia pastoris* transformant Mut⁺ phenotype screening (MM plate) and resistance screening (YPD plate). 25B, 50B, 100B, 300B, 500B YPD plate refers to 25, 50, 100, 300, 500 μ g/mL zeocin resistant YPD plate; 25B MM plate refers to 25 μ g/mL zeocin resistant minimal methanol plate.

将毕赤酵母发酵液上清进行 Ni 柱法纯化除杂, 对带 His 标签的 anti-CD63 scFv 进行有效富集, 分别收集 50 mmol/L 与 250 mmol/L 咪唑洗脱组分进行 SDS-PAGE 鉴定(图 6), anti-CD63 scFv 主要存在于 250 mmol/L 咪唑洗脱液中, 而 50 mmol/L 咪唑洗脱液中几乎没有; 另外, 对 250 mmol/L 咪唑洗脱组分进行 Western blotting 鉴定, 其中表达的 7 个 anti-CD63 scFv 均能与 His 二抗结合, 而对照 pPICZ α -A (空载质粒)不表达抗体, 故不与 His 标签结合(图 7)。

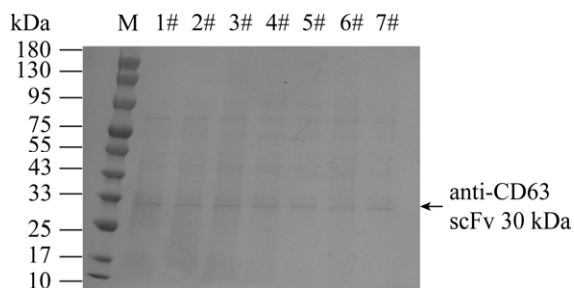


图 5 毕赤酵母菌株(1#-7#)表达上清的 SDS-PAGE 分析

Figure 5 SDS-PAGE analysis of *Pichia pastoris* (1#-7#) expression supernatant. M: Protein marker.

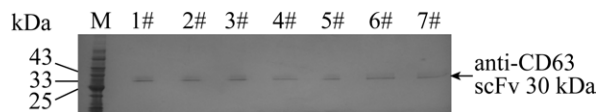


图 6 酵母(1#-7#)发酵液纯化后 SDS-PAGE 分析
Figure 6 SDS-PAGE analysis after purification (1#-7#). Anti-CD63 scFv (30 kDa) mainly exists in 250 mmol/L imidazole elution. M: Protein marker.

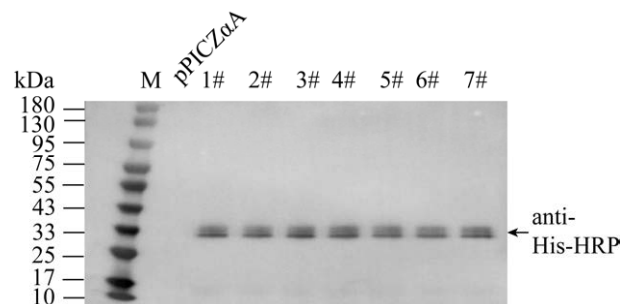


图 7 酵母(1#-7#)发酵液纯化后(250 mmol/L 咪唑洗脱)组分的 Western blotting 分析

Figure 7 Western blotting analysis of purified (250 mmol/L imidazole elution) components of yeast (1#-7#) fermentation broth. M: Protein marker.

2.4 Anti-CD63 scFv 生物活性检测

2.4.1 细胞 ELISA 检测毕赤酵母表达的 anti-CD63 scFv 生物活性

通过天然高表达 CD63 分子的 SK-MEL-28 细胞进行细胞 ELISA 测活, 发现上述 7 株毕赤酵母表达菌株产生的 anti-CD63 scFv 均能有效识别 SK-MEL-28 细胞表面的 CD63 分子, 并且具有较高的亲和力; 而对照 pPICZ α -A (空载质粒) 菌株发酵液产物几乎不结合(图 8); 说明本轮构建的毕赤酵母表达菌株能够产生具有生物活性的 anti-CD63 scFv。

2.4.2 Western blotting 检测毕赤酵母表达的 anti-CD63 scFv 的生物活性

通过不同标签对纯化后的 anti-CD63 scFv 1#、3#、7#分别进行 Western blotting 检测后发现, 无论 SK-MEL-28 细胞裂解液(图 9A), 还是 HEK293 细胞中表达的 CD63 蛋白(图 9B), anti-CD63 scFv 都能够识别 12–15 kDa 左右的 CD63 抗原表位。另外, 天然表达 CD63 分子的 SK-MEL-28 细胞本身可以和带 His 标签的 anti-CD63 scFv 进行反应, 虽然细胞裂解液本身

的组分非常复杂, 但是 anti-CD63 scFv 具有一定特异性, 这与细胞 ELISA 检测毕赤酵母表达的 anti-CD63 scFv 的亲和力时的结果较为一致; 而 HEK293 细胞中表达的 CD63 蛋白带有 His 标签, 不能用带 His 的标签抗体进行检测, 故采用 Myc 标签抗体进行检测, 发现 anti-CD63 scFv 也能

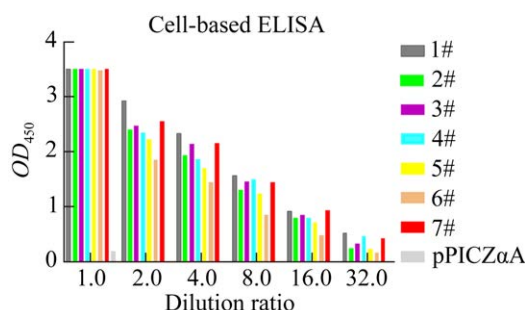


图 8 细胞 ELISA 检测毕赤酵母表达的 anti-CD63 scFv 亲和力

Figure 8 The affinity of anti-CD63 scFv expressed in *Pichia pastoris* detected by cell-based ELISA. Among them, 1#–7# is the antibody (250 mmol/L imidazole elution) after purification of *P. pastoris* positive transformant fermentation broth, and pPICZ α -A as negative control.

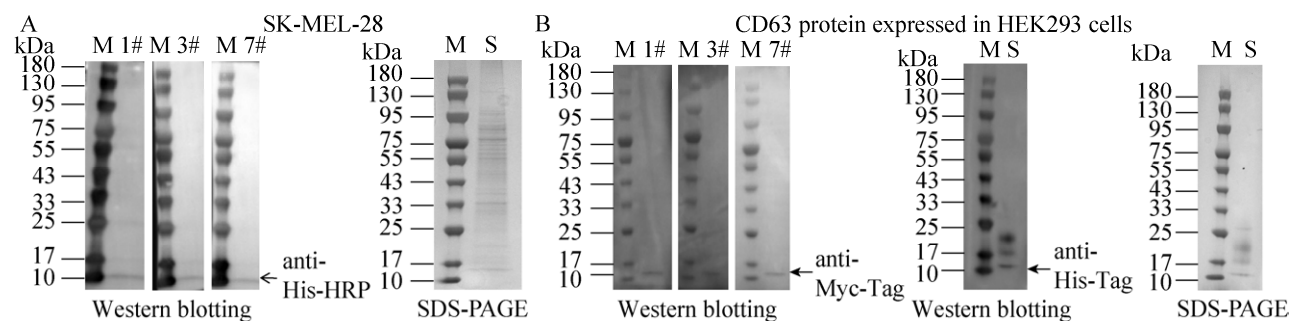


图 9 Western blotting 检测 SK-MEL-28 细胞裂解液(A)和 HEK293 细胞中表达的 CD63 蛋白(B)

Figure 9 Western blotting analysis of CD63 protein expressed in SK-MEL-28 cell lysate and HEK293 cells. A: Western blotting analysis of CD63 protein expressed in SK-MEL-28 cell lysate. Purified anti-CD63 scFv 1#, 3#, and 7# were used as primary antibodies, and anti-His tag antibody was used as secondary antibody for Western blotting and SDS-PAGE analysis of SK-MEL-28 cell lysate (S). B: Western blotting analysis of CD63 protein expressed in HEK293 cells. Purified anti-CD63 scFv 1#, 3#, and 7# were used as primary antibodies and anti-Myc tag antibody was used as secondary antibody to detect the expression of CD63 protein in HEK293 cells. Western blotting and SDS-PAGE were performed on CD63 protein (S) expressed in HEK293 cells using anti-His tag antibody as the primary antibody. M: Protein marker.

特异性地识别 12–15 kDa 左右的 CD63 抗原表位 (图 9B)。

2.4.3 免疫荧光检测毕赤酵母表达的 anti-CD63 scFv 生物活性

用人 SK-MEL-28 细胞检测毕赤酵母阳性转化子发酵液纯化后抗体(250 mmol/L 咪唑洗脱组分), 其中 1#、3#、7#作为待测一抗进行亲和力

测定, pPICZ α -A (空载质粒)为空白质粒转化子发酵液(阴性对照), 将市售 CoraLite[®] 594-conjugated 6 $\times$ His antibody 作为二抗, 在荧光显微镜下观察细胞膜(红色)与细胞核(蓝色)共定位(图 10)。Anti-CD63 scFv 主要位于 SK-MEL-28 细胞外围的质膜和一些小的细胞内区室(intracellular compartments)中以及细胞外少量散在的 CD63

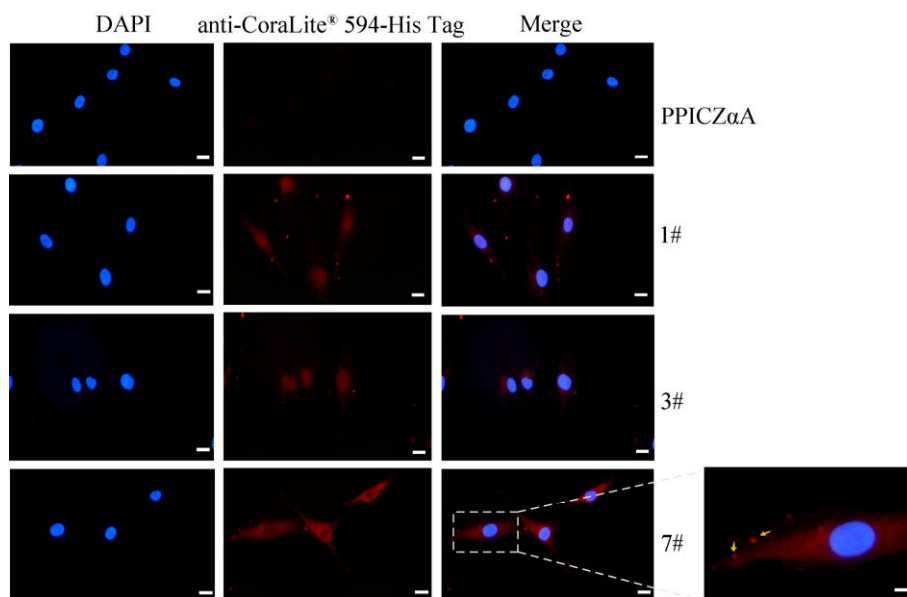


图 10 免疫荧光检测毕赤酵母(1#, 3#, 7#)表达的 anti-CD63 scFv 亲和力

Figure 10 Immunofluorescence detected the affinity of anti-CD63 scFv expressed in *Pichia pastoris* (1#, 3#, 7#) (Low magnification: scale bar, 10 μ m; High magnification: scale bar, 5 μ m).

阳性颗粒中(图 10, 虚线框放大图中黄色箭头标记)。

2.4.4 流式检测毕赤酵母表达的 anti-CD63 scFv 生物活性

将 SK-MEL-28 作为流式检测用细胞, 市售 CoraLite[®] 647-conjugated 6 $\times$ His antibody 作为二抗, 对自制 anti-CD63 scFv (作为一抗)进行亲和力检测。其中 1#、3#、7#为毕赤酵母阳性转化子发酵液纯化后抗体(250 mmol/L 咪唑洗脱组分), pPICZ α -A (空载质粒)为空白质粒转化子发酵液(阴性对照)。流式细胞仪分析结果见图 11。

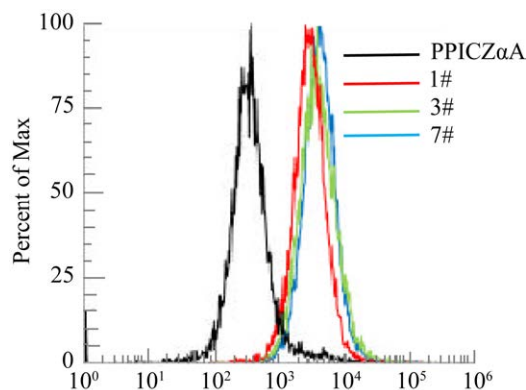


图 11 流式检测毕赤酵母(1#, 3#, 7#)表达的 anti-CD63 scFv 亲和力

Figure 11 The affinity of anti-CD63 scFv expressed in *P. pastoris* (1#, 3#, 7#) detected by flow cytometry.

2.5 Alphafold2 软件预测蛋白-蛋白相互作用

由图 12A 可知, CD63 LEL loop 序列在蛋白质数据库中的丰度较高, 而 anti-CD63 scFv 序列 coverage 较低(因为模型之前没预测过这种序

列)。图 12B、12C 是 pLDDT 结构预测显示 rank_001 评分最高; 图 12D 是 alphafold2 预测的 pdb 文件导入到 pymol 后展示的蛋白-蛋白相互作用的三维结构, 其中 CD63 LEL loop 蛋白结构域与 anti-CD63 scFv 主要通过极性相互作用(黄

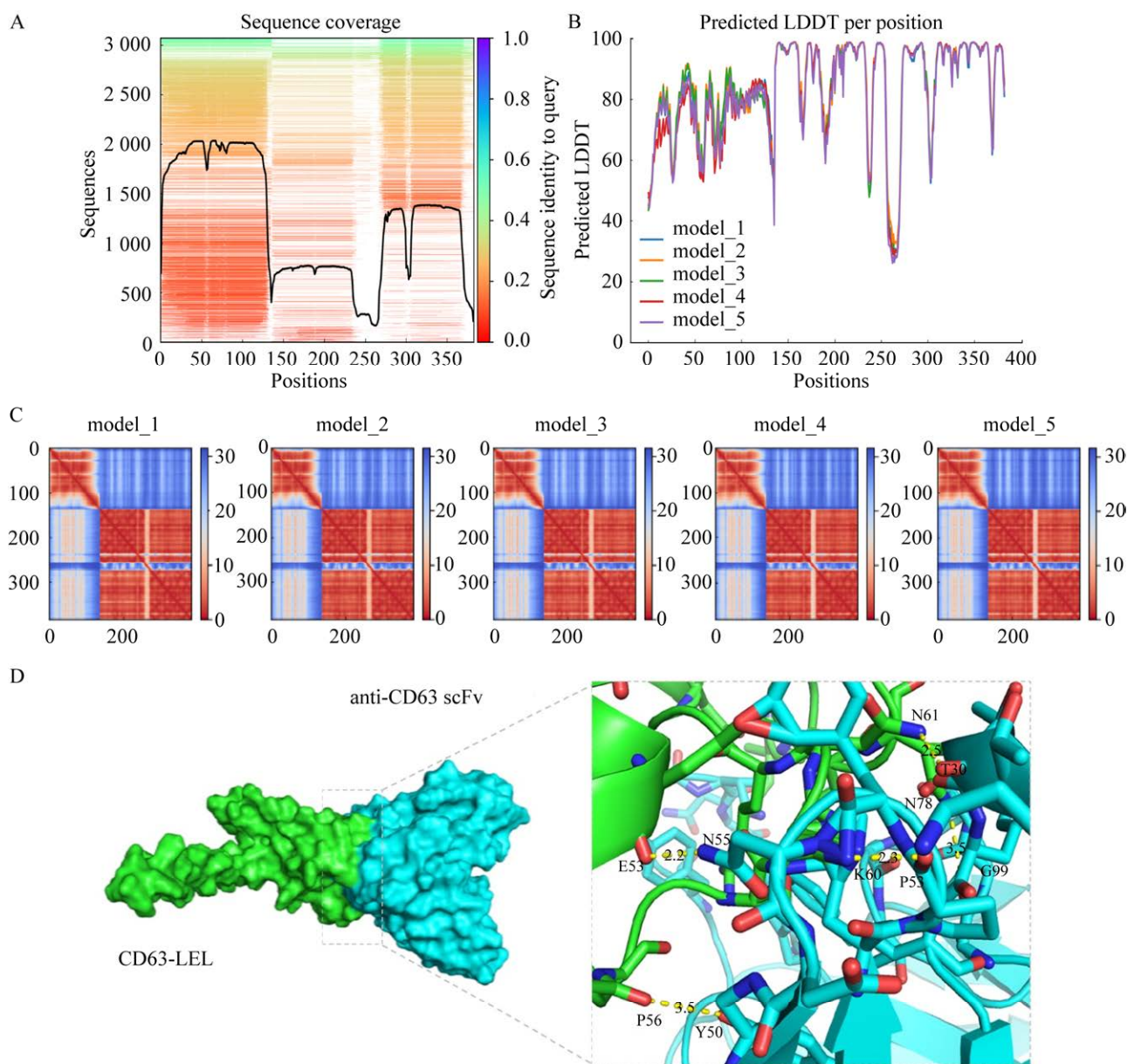


图 12 Alphafold2 软件预测蛋白-蛋白相互作用

Figure 12 Alphafold2 predicts protein-protein interactions. A: Abundance of each part sequence in the protein database. B, C: pLDDT structure prediction score. D: Pymol analysis of protein interaction regions, shows the predicted polar interaction between the CD63 LEL loop protein domain and anti-CD63 scFv by alphafold2 (yellow dotted line).

色虚线), 潜在的结合位点为: Glu53 & Asn55; Lys60 & Pro53; Asn61 & Thr30; Pro56 & Tyr50; Asn78 & Gly99。结合 Western blotting 检测结果, 推测该 anti-CD63 scFv 抗体特异性识别 CD63 LEL loop 蛋白结构域中 CD63 核心蛋白, 而非 N-糖基化位点。

3 讨论与结论

毕赤酵母表达系统是分子生物学中最常用的重组蛋白生产工具之一。毕赤酵母表达系统生产蛋白质的优点在于能够在内质网中对重组蛋白进行适当的折叠并将其分泌到细胞外部环境。此外, 由于毕赤酵母内源性分泌蛋白的含量有限, 使得重组蛋白很容易纯化。有研究表明, 毕赤酵母表达系统在钙、钾通道, 硝酸盐、磷酸盐转运体以及组胺 H1 受体等膜蛋白的生产中具有独特意义^[12]。放射性配体结合分析显示, 与哺乳动物细胞系统相比, 一些受体在毕赤酵母中表达时具有更高的功能^[13]。

尽管毕赤酵母表达系统有诸多优势, 但不同的菌株和外源蛋白之间的表达水平有所不同。在实际生产中, 尤其是使用生物反应器进行大规模发酵时需要一定程度的过程优化, 进而实现最高产量的目标蛋白。因此, 必须根据实际情况适当调整甲醇的浓度、选择合适的温度和培养时间, 以获得最佳的条件^[14]。由于之前开发的毕赤酵母表达系统的几乎所有表达载体都是基于乙醛氧化酶 1 启动子(aldehyde oxidase 1, AOX1)调控的^[15], AOX1 启动子可产生高达 22 g/L 的细胞内^[16]和 10.5 g/L 的分泌型^[17]的异源蛋白, 但因其诱导剂甲醇是一种有毒和易燃的化合物, 在工业应用中可能会引起安全问题; 同时, 甲醇诱导的发酵过程需要转化碳源, 发酵时间较长; 此外, 高水平的甲醇(浓度超过 5%)对细胞有毒, 会导致甲醛和过氧化氢的积累, 从而导致细胞死亡。

反之, 低水平的甲醇会引发蛋白降解, 造成较低的生产效率^[18]。目前的替代方案是开发无甲醇诱导体系, 比如 PHO89 启动子^[19]、THI11 启动子^[20]等。新的启动子 ICL1 (由葡萄糖消耗抑制和乙醇诱导)、ADH1(由甘油和乙醇诱导)和 GUT1(由葡萄糖、甘油和乙醇诱导)已经获得了专利授权^[21]。启动子改造的研究不仅丰富了毕赤酵母启动子种类, 更拓宽了其调控模式^[22-23]。近年来, 以龙沙生物为代表的 XS[®] Pichia 表达系统, 采用的是葡萄糖调节启动子, 其生产工艺可以很容易地从 50 L 放大到 15 000 L, 而且过程相对简单, 同时也没有甲醇及其代谢产物的不良影响^[24]。

此外, 信号肽是影响毕赤酵母异源蛋白分泌效率的关键因素之一。目前最常使用的信号肽是来自酿酒酵母的 α 交配因子(α -mating factor, MF α)的信号肽, 利用这个外源信号肽已经成功分泌表达了多种异源蛋白。然而, MF α 可能不适用于所有外源蛋白的分泌表达。毕赤酵母分泌蛋白中具有许多典型的信号肽序列, 这些内源信号肽更加丰富了信号肽的选择性。朱凌宣等^[25]利用 SignalP、TMHMM、Phobius、WoLF PSORT 和 NetGPI 等生物信息工具预测出了 10 条可能用于外源蛋白表达的内源性信号肽。Ito 等^[26]对 MF α 进行了单点突变, 发现其中 8 个单点突变可以显著提高毕赤酵母中单链抗体的分泌量, 并通过机制研究发现这些突变可以减少未折叠蛋白反应活化, 避免重组蛋白在分泌过程中进入细胞内蛋白质降解途径。该团队还开发了高通量筛选系统(high-throughput screening, HTS), 极大地提高了发现分泌目的蛋白菌株的可能性^[27]。

许多治疗性蛋白质是糖蛋白, 需要碳水化合物结构附着在蛋白质主干上(即糖基化), 以便正确折叠、溶解、维持稳定和适当的生物活性^[28]。尽管毕赤酵母可以进行翻译后修饰, 如 O-糖和

N-糖基化和二硫键的形成。然而不容忽视的是,在毕赤酵母中 N-聚糖的结构是典型的超甘露糖型,与人类细胞中的有所不同,可能引起免疫反应或与人细胞中的部分受体结合,从而降低其功效^[29]。最近,研究人员设计了新的策略来改造毕赤酵母的 N-糖基化途径。通过毕赤酵母糖开关,酵母自身的高糖基 N-聚糖被转换为更多人源化的双触角的复杂型 N-聚糖。在糖工程策略中,通过破坏内源性糖基转移酶基因 *och1* 并引入异源酶活性,毕赤酵母被改造为能产生人源化的糖蛋白的菌株^[30]。在过去的几十年里,已开发出一些人源化的毕赤酵母菌株并应用于多药耐药蛋白 1 (multidrug resistance protein 1, MRP1) 的生产,实现了更均匀和更合适的糖基化修饰^[31]。

本研究首次成功构建了 pPICZ α -A-CD63 scFv 表达质粒并将其电转到毕赤酵母菌株中,通过博来霉素抗性平板与 MM 平板筛选,获得若干能够分泌 anti-CD63 scFv 的菌株。经过 1% 甲醇诱导表达后对发酵液进行 Ni 柱 His 标签的纯化,得到 30 kDa 的目标抗体。然后对纯化的目标抗体进行基于细胞的酶联免疫吸附实验、免疫印迹、免疫荧光、流式细胞术等方法,鉴定其具有较好的生物活性,对天然高表达 CD63 蛋白的 SK-MEL-28 细胞具有较高亲和力和特异性。利用毕赤酵母可大量表达 anti-CD63 scFv,可以为外泌体诊断与靶向外泌体研究提供更加经济、有效的抗体。

本研究对毕赤酵母表达系统表达 anti-CD63 scFv 进行了初步探索并对其生物活性进行鉴定。Anti-CD63 scFv 本身的理化性质如等电点 (isoelectric point, PI)、热稳定性、聚集性、抗体二/三级结构、糖基化位点、翻译后修饰等还需要后续进一步的抗体表征研究。此外,抗体结构预测、成药性分析、抗体功能优化(亲和力成熟、人源化改造)、抗体结构优化(点突变、去糖基化、

Fc 区改造、串联成多抗)等均有助于进一步认识与改良抗体的性质。石井明子等^[32]总结了利用抗体工程的方法可以将 scFv 进行个性化的组装,产生不同药物代谢动力学(pharmacokinetics, PK)特性的改良型的低分子抗体,比如 scFv-Fc、scFv-IgBD、scFv-HSA、scFv-ABD 等,这将有助于根据需求进行个性化设计与改造抗体分子。

最后,在外泌体检测与鉴定方面,通常会会对超速离心及蔗糖密度梯度离心^[33]后获得的外泌体通过蛋白质印迹、流式细胞术、透射型电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)、纳米颗粒示踪分析(nanot racking analysis, NTA)等^[34]多种方法,对外泌体膜上的标志性蛋白如 CD63、CD81、CD9、TSG101 等^[35]的表达情况、外泌体的形态结构与粒径大小等进行综合评价。免疫电子显微镜与冷冻电子显微镜在检查外泌体表面的 CD9 与 CD63 标志性蛋白方面的报道极少^[36-37];而外泌体荧光标记最常规的方法有直接用脂溶性荧光染料 PKH26^[38]或 PKH67^[39]标记提取好的外泌体的脂质双层膜,再与靶细胞共培养后进行激光共聚焦显微镜观察。优点是可以体内外示踪研究,缺点是外泌体分离提取步骤复杂、成本高且特异性不高,尤其常规超速离心法富集的细胞外囊泡(extracellular vesicles, EVs),无法排除来自其他 EVs 亚群(如微囊泡)污染的可能性^[40]。目前,仅有极少数的研究人员在外泌体的荧光标记中采用 anti-CD63 多抗^[41];此外,也有少数研究者在 EVs 的荧光标记中采用 anti-CD63 单抗^[42-43]或多抗^[44]结合对应的荧光二抗(Fluor™ 488 或 594)进行激光共聚焦显微镜观察,优点是特异性好。可能由于目前开发出来的针对 CD63 抗原的抗体较少,也可能受限于显微成像系统,CD63 抗体在外泌体与 EVs 的荧光标记中的应用报道甚少。相信随着 CD63 抗体与一体化荧光显微成像系统(比如 BZ-X800)^[45]

的普及,精确定位及经时动态观察细胞释放的外泌体将不再困难。

另外,在开发一种新的靶向外泌体 miRNA 的药物传递系统时,Yamayoshi 等^[46]使用抗外泌体 anti-CD63 IgG 的抗体偶联抗 miR 寡核苷酸复合物形成 ExomiR- Tracker,可以与外泌体结合,然后将复合物引导进入到受体细胞,并且这种抗 miR 寡核苷酸在体内和体外对外泌体 miRNA 功能具有抑制作用。这与目前研究比较热门的抗体药物偶联物(antibody-drug conjugate, ADC)类似。Ma 等^[47]在研究抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体的耐药机制时发现 CD63 可以介导 VEGF 在 EVs 中的免疫逃逸。基于上述相似的理论,de Goeij 等^[48]首次报道了一种新型的靶向溶酶体膜蛋白 CD63 的双特异性抗体(bispecific antibodies, BsAbs),其中一个抗体结合臂专门靶向 CD63 (CD63 被认为可以在质膜和胞内膜之间穿梭),另一个抗体结合臂与肿瘤特异性结合的人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)相连。由此产生的 HER2×CD63 双特异性抗体可以在 HER2 阳性肿瘤细胞中表现出很强的结合、内化和溶酶体积累的特性,改善 ADC 的细胞内运输,而在 HER2 阴性细胞中具有最小的内化作用。

由于本研究制备的 Human CD63 抗原为胞外大 loop (aa103-203),不含 C 端胞质尾的溶酶体靶向基序(GYEVM)^[49],因此 anti-CD63 scFv 的亚细胞定位(subcellular localization, SL)与上述 CD63/Y235A (突变体)在细胞中的定位类似,更容易识别 SK-MEL-28 细胞外围的质膜和一些小的细胞内区室(intracellular compartments)中的 CD63,而文献报道的 CD63 单抗,比如 Invitrogen 的 MEM-259^[42]或 Cosmo Bio 株式会社的 8A12^[43]主要定位于细胞质中的 MVBs 或 EVs,这可能

与本研究筛选到的抗体的靶向性不同有关。

Mathieu 等^[50]通过跟踪标记 CD9 和 CD63 从内质网到其驻留区室(分别是细胞膜和晚期内体)的细胞内运输过程,为研究不同亚群的 EVs (含外泌体)的异质性及其特定功能奠定基础。另外,本研究在荧光显微镜下也意外地发现在 SK-MEL-28 细胞外有少量散在的 CD63 阳性颗粒。

肿瘤细胞经常会脱落过多的外泌体,并通过多种方式促进肿瘤的生长、生存和转移^[51-52]。Edgar 等^[53]研究指出,外泌体通过栓蛋白附着在细胞表面,栓蛋白在外泌体的命运中发挥着关键作用,决定将其保留或释放到细胞外基质中。因此推测 SK-MEL-28 细胞外少量散在的 CD63 阳性颗粒可能就是肿瘤细胞分泌的外泌体,该现象背后的机制有待于进一步研究与探讨。

作者贡献声明

陈雪丹:实施实验,并进行数据分析与论文撰写;蔡志坚:设计并监督。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] BOUCHEIX C, RUBINSTEIN E. Tetraspanins[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2001, 58(9): 1189-1205.
- [2] WRIGHT MD, TOMLINSON MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily[J]. Immunology Today, 1994, 15(12): 588-594.
- [3] POLS MS, KLUMPERMAN J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63[J]. Experimental Cell Research, 2009, 315(9): 1584-1592.
- [4] KRYLOVA SV, FENG DR. The machinery of exosomes: biogenesis, release, and uptake[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1337.
- [5] van NIEL G, CHARRIN S, SIMOES S, ROMAO M, ROCHIN L, SAFTIG P, MARKS MS, RUBINSTEIN E, RAPOSO G. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis[J]. Developmental Cell, 2011,

- 21(4): 708-721.
- [6] FORDJOUR FK, GUO C, AI Y, DAABOUL GG, GOULD SJ. A shared, stochastic pathway mediates exosome protein budding along plasma and endosome membranes[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(10): 102394.
 - [7] Lonza bags Codiak's exosome plant in \$65m deal[EB/OL]. 2021-11-03. <https://bioprocessintl.com/bioprocess-insider/deal-making/lonza-bags-codiaks-exosome-plant-in-65m-deal/>.
 - [8] ZIPKIN M. Big pharma buys into exosomes for drug delivery[J]. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(11): 1226-1228.
 - [9] DATTA A, MARYALA S, JOHN R. A review of eptinezumab use in migraine[J]. *Cureus*, 2021, 13(9): e18032.
 - [10] 抗体技术的未来: 毕赤酵母表达系统的“春天”还有多远? [EB/OL]. 2020-08-10. <https://www.cn-healthcare.com/articlewm/20200810/content-1136774.html>.
 - [11] JUTURU V, WU JC. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: latest research progress and applications[J]. *Chembiochem*, 2018, 19(1): 7-21.
 - [12] BYRNE B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, 32: 9-17.
 - [13] LUNDSTROM K, WAGNER R, REINHART C, DESMYTER A, CHEROUATI N, MAGNIN T, ZEDER-LUTZ G, COURTOT M, PRUAL C, ANDRÉ N, HASSAINE G, MICHEL H, CAMBILLAU C, PATTUS F. Structural genomics on membrane proteins: comparison of more than 100 GPCRs in 3 expression systems[J]. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 2006, 7(2): 77-91.
 - [14] KARBALAEI M, REZAEI SA, FARSIANI H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(9): 5867-5881.
 - [15] BAGHBAN R, FARAJNIA S, RAJABIBAZL M, GHASEMI Y, MAFI A, HOSEINPOOR R, RAHBARNIA L, ARIA M. Yeast expression systems: overview and recent advances[J]. *Molecular Biotechnology*, 2019, 61(5): 365-384.
 - [16] HASSLACHER M, SCHALL M, HAYN M, BONA R, RUMBOLD K, LÜCKL J, GRIENGL H, KOHLWEIN SD, SCHWAB H. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts[J]. *Protein Expression and Purification*, 1997, 11(1): 61-71.
 - [17] SCHOTTE P, DEWERTE I, de GROEVE M, de KEYSER S, de BRABANDERE V, STANSSENS P. *Pichia pastoris* Mut(S) strains are prone to misincorporation of O-methyl-L-homoserine at methionine residues when methanol is used as the sole carbon source[J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 98.
 - [18] ZHOU XS, ZHANG YX. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate[J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24(17): 1449-1453.
 - [19] AHN J, HONG J, PARK M, LEE H, LEE E, KIM C, LEE J, CHOI ES, JUNG JK, LEE H. Phosphate-responsive promoter of a *Pichia pastoris* sodium phosphate symporter[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(11): 3528-3534.
 - [20] STADLMAYR G, MECKLENBRÄUKER A, ROTHMÜLLER M, MAURER M, SAUER M, MATTANOVICH D, GASSER B. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 150(4): 519-529.
 - [21] CREGG JM, TOLSTORUKOV II. *P. pastoris* ADH promoter and use thereof to direct expression of proteins: US8222386[P]. 2012-07-17.
 - [22] ATA Ö, PRIELHOFER R, GASSER B, MATTANOVICH D, ÇALIK P. Transcriptional engineering of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for improved heterologous protein production in *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(10): 2319-2327.
 - [23] PORTELA RMC, VOGL T, KNIELY C, FISCHER JE, OLIVEIRA R, GLIEDER A. Synthetic core promoters as universal parts for fine-tuning expression in different yeast species[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2017, 6(3): 471-484.
 - [24] Lonza's XS® *Pichia* Expression System[EB/OL]. 2021. <https://dam.lonza.com/dmm3bwsv3/assetstream.aspx?assetid=12933&mediaformatid=10061&destinationid=10016>.
 - [25] 朱凌宜, 崔鑫, 胡善桐, 王诗卉, 张桂敏. 毕赤酵母全蛋白质组信号肽及分泌蛋白分析[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(3): 834-846.
 - ZHU LX, CUI X, HU ST, WANG SH, ZHANG GM. Analysis of signal peptides and secreted proteins in the whole proteome of *Pichia pastoris*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(3): 834-846 (in Chinese).
 - [26] ITO Y, ISHIGAMI M, HASHIBA N, NAKAMURA Y, TERAJ G, HASUNUMA T, ISHII J, KONDO A. Avoiding entry into intracellular protein degradation pathways by signal mutations increases protein secretion in *Pichia pastoris*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2022, 15(9): 2364-2378.
 - [27] ITO Y, ISHIGAMI M, TERAJ G, NAKAMURA Y, HASHIBA N, NISHI T, NAKAZAWA H, HASUNUMA T, ASAI K, UMETSU M, ISHII J, KONDO A. A streamlined strain engineering workflow with genome-wide screening detects enhanced protein secretion in *Komagataella phaffii*[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 561.
 - [28] CEREGHINO GPL, CEREGHINO JL, ILGEN C, CREGG JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 329-332.
 - [29] HOPKINS D, GOMATHINAYAGAM S, RITTENHOUR AM, DU M, HOYT E, KARAVEG K, MITCHELL T, NETT JH, SHARKEY NJ, STADHEIM TA, LI HJ, HAMILTON SR. Elimination of β -mannose glycan structures in *Pichia pastoris*[J]. *Glycobiology*, 2011, 21(12): 1616-1626.
 - [30] JACOBS PP, GEYSSENS S, VERVECKEN W, CONTRERAS R, CALLEWAERT N. Engineering complex-type N-glycosylation in *Pichia pastoris* using GlycoSwitch technology[J]. *Nature Protocols*, 2009, 4(1): 58-70.

- [31] HAMILTON SR, BOBROWICZ P, BOBROWICZ B, DAVIDSON RC, LI HJ, MITCHELL T, NETT JH, RAUSCH S, STADHEIM TA, WISCHNEWSKI H, WILDT S, GERNGROSS TU. Production of complex human glycoproteins in yeast[J]. *Science*, 2003, 301(5637): 1244-1246.
- [32] 石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ. 抗体医薬品の分子設計[J]. *薬剤学*, 2014, 74(1): 4-11. ISHII-WATABE A, SUZUKI T, TADA M, KAWASAKI N. Molecular design of therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Pharmaceutics*, 2014, 74(1): 4-11 (in Japanese).
- [33] GAO XJ, RAN N, DONG X, ZUO BF, YANG R, ZHOU QB, MOULTON HM, SEOW Y, YIN HF. Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy[J]. *Science Translational Medicine*, 2018, 10(444): eaat0195.
- [34] 下田麻子, 澤田晋一, 秋吉一成. 細胞外ベシクルの構造特性と機能制御[J]. *Drug Delivery System*, 2014, 29(2): 108-115. SHIMODA A, SAWADA SI, AKIYOSHI K. Characterization and functional modification of extracellular vesicles[J]. *Drug Delivery System*, 2014, 29(2): 108-115 (in Japanese).
- [35] PEGTEL DM, GOULD SJ. Exosomes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88: 487-514.
- [36] NISHIDA-AOKI N, TOMINAGA N, TAKESHITA F, SONODA H, YOSHIOKA Y, OCHIYA T. Disruption of circulating extracellular vesicles as a novel therapeutic strategy against cancer metastasis[J]. *Molecular Therapy*, 2017, 25(1): 181-191.
- [37] エクソソームモノクローナル抗体 [EB/OL]. [2024-07-10]. https://www.cosmobio.co.jp/product/detail/cac-20130508.asp?entry_id=11015 (in Japanese).
- [38] SUN W, CUI JP, GE Y, WANG JS, YU YF, HAN B, LIU BL. Tumor stem cell-derived exosomal microRNA-17-5p inhibits anti-tumor immunity in colorectal cancer via targeting SPOP and overexpressing PD-L1[J]. *Cell Death Discovery*, 2022, 8: 223.
- [39] NASERI Z, OSKUEE RK, JAAFARI MR, FOROUZANDEH MOGHADAM M. Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer *in vitro* and *in vivo*[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2019, 13: 7727-7747.
- [40] WITWER KW, BUZÁS EI, BEMIS LT, BORA A, LÄSSER C, LÖTVALL J, NOLTE-T HOEN EN, PIPER MG, SIVARAMAN S, SKOG J, THÉRY C, WAUBEN MH, HOCHBERG F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2013, 2: 20360.
- [41] WANG XC, SHEN HY, ZHANGYUAN GY, HUANG RY, ZHANG WJ, HE QF, JIN KP, ZHUO H, ZHANG ZC, WANG JC, SUN BC, LU XJ. 14-3-3 ζ delivered by hepatocellular carcinoma-derived exosomes impaired anti-tumor function of tumor-infiltrating T lymphocytes[J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 159.
- [42] FEI XF, LI ZJ, YANG DY, KONG XH, LU XL, SHEN YY, LI X, XIE SF, WANG JL, ZHAO YC, SUN Y, ZHANG J, YE ZM, WANG JL, CAI ZJ. Neddylation of Corol1a determines the fate of multivesicular bodies and biogenesis of extracellular vesicles[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2021, 10(12): e12153.
- [43] URABE F, KOSAKA N, SAWA Y, ITO K, KIMURA T, EGAWA S, OCHIYA T, YAMAMOTO Y. The miR-1908/SRM regulatory axis contributes to extracellular vesicle secretion in prostate cancer[J]. *Cancer Science*, 2020, 111(9): 3258-3267.
- [44] LU XL, SONG ZB, HAO JY, KONG XH, YUAN WY, SHEN YY, ZHANG CY, YANG J, YU PF, QIAN Y, ZHANG GS, FENG HJ, WANG JL, CAI ZZ, CAI ZJ. Proton pump inhibitors enhance macropinocytosis-mediated extracellular vesicle endocytosis by inducing membrane v-ATPase assembly[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2024, 13(4): e12426.
- [45] 外泌体的定位观察 [EB/OL]. [2024-07-10]. <https://www.keyence.com.cn/ss/products/microscope/bz-casestudy/exosomes.jsp>.
- [46] YAMAYOSHI A, OYAMA S, KISHIMOTO Y, KONISHI R, YAMAMOTO T, KOBORI A, HARADA H, ASHIHARA E, SUGIYAMA H, MURAKAMI A. Development of antibody-oligonucleotide complexes for targeting exosomal microRNA[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(6): 545.
- [47] MA SL, MANGALA LS, HU W, BAYAKTAR E, YOKOI A, HU W, PRADEEP S, LEE S, PIEHOWSKI PD, VILLAR-PRADOS A, WU SY, McGUIRE MH, LARA OD, RODRIGUEZ-AGUAYO C, LaFARGUE CJ, JENNINGS NB, RODLAND KD, LIU T, KUNDRA V, RAM PT, RAMAKRISHNAN S, et al. CD63-mediated cloaking of VEGF in small extracellular vesicles contributes to anti-VEGF therapy resistance[J]. *Cell Reports*, 2021, 36(7): 109549.
- [48] de GOEIJ BE, VINK T, TEN NAPEL H, BREIJ ECW, SATIJN D, WUBBOLTS R, MIAO D, PARREN PWHI. Efficient payload delivery by a bispecific antibody-drug conjugate targeting HER2 and CD63[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2016, 15(11): 2688-2697.
- [49] ROUS BA, REAVES BJ, IHRKE G, BRIGGS JAG, GRAY SR, STEPHENS DJ, BANTING G, LUZIO JP. Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes[J]. *Molecular Biology of the Cell*. 2002, 13(3): 1071-1082.
- [50] MATHIEU M, NÉVO N, JOUVE M, VALENZUELA JI, MAURIN M, VERWEIJ FJ, PALMULLI R, LANKAR D, DINGLI F, LOEW D, RUBINSTEIN E, BONCOMPAIN G, PEREZ F, THÉRY C. Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 4389.
- [51] ZHANG X, YUAN X, SHI H, WU LJ, QIAN H, XU WR. Exosomes in cancer: small particle, big player[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2015, 8: 83.
- [52] ZHAO HY, YANG LF, BADDOUR J, ACHREJA A, BERNARD V, MOSS T, MARINI JC, TUDAWA T, SEVIOUR EG, SAN LUCAS FA, ALVAREZ H, GUPTA S, MAITI SN, COOPER L, PEEHL D, RAM PT, MAITRA A, NAGRATH D. Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism[J]. *eLife*, 2016, 5: e10250.
- [53] EDGAR JR, MANNA PT, NISHIMURA S, BANTING G, ROBINSON MS. Tetherin is an exosomal tether[J]. *eLife*, 2016, 5: e17180.