

抗 IV 型胶原酶单链抗体在毕赤酵母中分泌表达*

阎锡蕴 汤 健 刁爱坡

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要:利用毕赤酵母系统表达抗 IV 型胶原酶人单链抗体。首先把目的基因克隆到毕赤酵母表达载体上,电击转化受体菌。在甲醇诱导下表达单链抗体。SDS-PAGE 和免疫印迹显示毕赤酵母分泌表达人单链抗体,表达量约 20mg/L 酵母培养物。该表达系统与大肠杆菌相比,简化了表达产物的分离纯化程序。

关键词:人单链抗体,毕赤酵母,分泌表达

中图分类号:Q344 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-048-05

EXPRESSION OF SINGLE CHAIN ANTIBODY TO COLLAGENASE IV BY *PICHTIA PASTORIS*

YAN Xi-Yun TANG Jian DIAO Ai-Po

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract: To express human single chain antibody to collagenase IV as soluble proteins secreted by *pichia pastoris*, a recombinant vector scFv-pPIC9 was constructed, and then transformed into *pichia pastoris*

* 国家高技术研究发展计划项目("863"项目)(No. 102-09-0204)

Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 102-09-0204)

收稿日期:1999-09-01,修回日期:2000-11-10

GS115 by electroporation. The transformants were selected by DNA hybridization and cultured in the media with methanol. Soluble scFv were secreted into culture supernatant and characterized by SDS-PAGE and Western Blot. Our results showed that the secreting of soluble scFv in *Pichia pastoris* was as high as 20mg/L. The soluble scFv has similar immuno-activity to its counterpart produced in bacteria, and it is more easily and efficiently purified.

Key words: Single chain antibody, *Pichia pastoris*, Secreting expression

IV型胶原酶在肿瘤组织中的过度表达是涉及肿瘤新生血管形成和肿瘤转移的重要因素^[1]。抗IV型胶原酶人单链抗体将通过特异识别肿瘤组织中过度表达的IV型胶原酶和抑制酶活力而应用于某些恶性肿瘤的辅助诊断和治疗。

有关基因工程抗体表达系统的报道很多,在表达单链抗体方面最常见的是大肠杆菌。我们曾报道过抗IV型胶原酶人单链抗体的构建及其在大肠杆菌中的高效表达^[2]。尽管该系统操作方便并且表达量高,然而,在进行包含体变性和复性的过程中却费时费力,损失较大,最终获得生物活性抗体量并不理想。近年来毕赤酵母表达系统用于基因工程抗体的表达,Patric Eldin等曾用该系统分泌表达抗人CD7单链抗体^[3]。毕赤酵母表达系统的主要优点^[4]在于可高密度培养;分泌表达的外源蛋白为可溶性;进行蛋白糖基化的糖链比酿酒酵母短,更接近于人体蛋白的糖基化,所以表达产品在临床应用时免疫原性小。本文将探讨抗IV型胶原酶人单链抗体在毕赤酵母中的分泌表达。

1 材料与方 法

1.1 酶和主要试剂

Prime-a-Gene[®] 标记试剂盒和 Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司。抗 E-tag 单抗购自 Pharmacia 公司。羊抗鼠 IgG-HRP、蜗牛酶购自华美生物工程公司。IV型胶原酶购自 Sigma 公司。内切酶 EcoRI、T₄DNA 连接酶购自 Biolabs 公司。同位素 α -³²P-dATP 购自亚辉公司。

1.2 菌种和质粒

抗IV型胶原酶人单链抗体重组质粒 hCo4-pCANTAB-5E 参见文献[2]。毕赤表达试剂盒(包括酵母分泌表达载体 pPIC9、*E. coli* TOP10F⁷、酵母宿主菌 GS115 及表达阳性对照 GS115/His⁺ Mut⁺ Albumin, GS115/His⁺ Mut⁺ β -galacto-sidase)购自 Invitrogen 公司。

1.3 培养基

YPD/YEPD (2% Tryptone, 1% Yeast Extract, 2% 葡萄糖); YNB 为酵母菌基本培养基购自 Invitrogen 公司; MD (YNB + 1% 葡萄糖); MM (YNB + 0.5% 甲醇); BMGY (YNB + 2% Tryptone + 1% Yeast + Extract + 1% 甘油, pH 6.0); BMMY (YNB + 2% Tryptone + 1% Yeast Extract + 1% 甲醇 + 1% 酪蛋白水解物, pH 6.0)。

1.4 酵母重组表达载体的构建和鉴定

以重组质粒 hCo4-pCANTAB5E 为模板,用两条引物 5'-CGA GAA TTC TAT GCG GCC CAG CCG GCC -3' 和 5'-CG AGA ATT CTA TTA GTG GTG ATG GTG ATG GTG ACG CGG TTC CAG CGG ATC CGG -3', 在 100 μ L 体系中进行 30 个循环的 PCR 扩增,每个循环反应条件为 94 C 45s, 55 C 1min, 72 C 2min。扩增产物经酚:氯仿抽提、乙醇沉淀后,溶解在双蒸水中。电泳鉴定后,用 EcoRI 酶切并纯化,供连接用。

酵母分泌型表达载体 pPIC9 经 EcoRI 酶切,进行碱性磷酸酶 CIP 去磷酸化,与经 EcoRI 酶切的单链抗体基因连接,将重组质粒转化大肠杆菌 TOP10F⁷。

用 PCR 法筛选重组子并扩增,提取质粒,利用 pPIC9 载体上 α -Factor 引物(5'-T ACT ATT GCC AGC ATT GCT GC -3'),进行 DNA 序列测定,以鉴定抗体基因的插入方向,选择方向正确的重组质粒以备转化酵母。

1.5 基因转化

重组酵母表达质粒经 Bgl II 酶切纯化,将线性化质粒 1-3 μ g 与感受态细胞 GS115^[5]混合,混合物转移到电击槽中,冰浴 5min,用 Bio-Rad 电击仪进行电击转化(1500V, 25 μ F, 200 Ω , 5ms)随后,立即向槽内加入 1mL 冰冷的 1mol/L 山梨醇,混匀后,取 200 μ L 菌液涂布到 MD 平板上,30 C 培养 2d。

1.6 转化子表型鉴定

将 MD 平板上生长的转化菌落按先后顺序分别接种到 MM 和 MD 平板上的对应位置,30 C 培养 3d,根据菌落在 MM 和 MD 平板上生长情况,鉴定转化子的表型。

1.7 转化子斑点杂交分析

选取 Mut⁺ 和 Mut^s 转化子分别接种到含 YEPD 的培养管中,30 C 培养 24h,取 20 μ L 菌液均匀点到硝酸纤维素薄膜上。阳性对照为插入基因的 PCR 扩增产物,经 100 C 变性 5min 后点到膜上,阴性对照为空载体转化菌。按毕赤表达试剂盒介绍的方法处理膜。用 α -³²P-dATP 标记抗体基因,制备杂交探针。参照文献[6]进行杂交。

1.8 基因表达及鉴定

按毕赤试剂盒介绍的方法,选取转化菌分别接种 BMGY 培养基中,30 C 摇床培养至 OD₆₀₀ = 2 ~ 6,离心收集菌体,重悬于 BMMY 培养液,在 30 C 培养 48h,每隔 24h 加入 0.5% 甲醇,诱导外源蛋白表达。用免疫印迹检测方法分析培养上清中的可溶性单链抗体。

2 结果与讨论

2.1 酵母表达单链抗体的载体构建与鉴定

为了便于表达产物的检测和纯化,采用 PCR 方法在单链抗体 hCo4 基因的 3' 端引入了一段编码 E-tag 和 6 个组氨酸的 DNA 序列以及 EcoR I 酶切位点。用 EcoR I 分别酶切 PCR 产物和表达载体 pPIC9,用 CIP 使线形 pPIC9 质粒去磷酸化以降低单酶切质粒在连接时自我环化率。把抗体基因与去磷酸化的线形 pPIC9 质粒连接,构建酵母重组表达质粒 hCo4-pPIC9(图 1)。

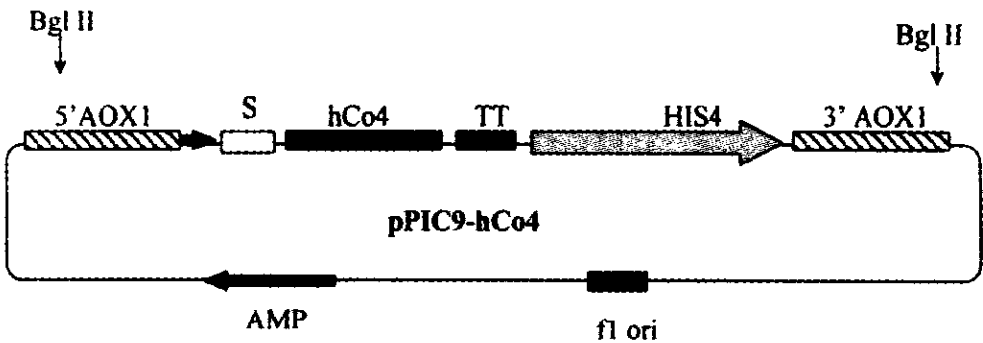


图 1 重组酵母表达载体 pPIC9-hCo4 示意图

用 EcoRI 酶切鉴定重组质粒结果如图 2 所示,酶切产物含 8.0kb 的载体和约 0.7kb 单链抗体基因。

为了鉴定抗体基因在重组质粒中的插入方向,采用了 pPIC9 质粒上 α -Factor 引物对重组质粒进行序列测定,图 3 表示抗 IV 型胶原酶单链抗体 DNA 序列以及推导出的氨基酸序列。选择插入方向正确的重组质粒用于酵母转化。

2.2 毕赤酵母的基因转化及转化子的鉴定

为了使目的基因整合到酵母染色体上, hCo4-pPIC9 重组质粒被 Bgl II 酶切线性化,然后电击转入毕赤酵母受体菌 GS115。转化的酵母菌涂在 MD 培养板上。由于 GS115 为组氨酸缺陷型(His⁻)菌株,未转化的菌在基本培养基 MD 上不生长,因此,在 MD 平板上获得的 360 个克隆被初步认为是含有重组质粒的转化子。随机挑选其中 100 个转化子进行 DNA 斑点杂交实验,得到 40 个杂交阳性转化子,确定其目的基因已整合到毕赤酵母染色体上。

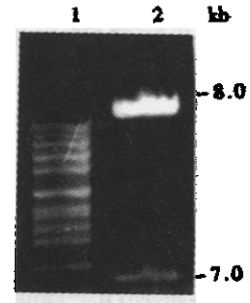


图 2 琼脂糖电泳鉴定重组载体 pPIC9-hCo4 酶切产物

1 DNA 标准分子量(λ DNA Spp1/EcoRI),

2 重组载体 EcoRI 酶切产物

```

VH
GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATC CAG CCT GGG GGG TCC CTG
E V Q L V E S G G G L I Q P G G S L
AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGG TTC ACC GTC AGT AGC AAC TAC ATG AGC TGG
R L S C A A S G F T V S S N Y M S W
                                CDR1
GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT TAT AGC GGT
V R Q A P G K G L E W V S V I Y S G
GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC
G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D
                                CDR2
AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CIT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG
N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T
GCC GTA TTA CTG TGC AAG AGA GAC TTG TGT GAT TGG GGC CAA GGT ACC CTG GTC
A V I L I C K R D L C D W G Q G T L V
                                CDR3
ACC GTG TCG AGA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT GGG TCG GGT GGC GGC GGA
T V S R G G G G S G G G G S G G G
                                VL
                                Linker
TCT TCT GAG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TTG GGA CAG ACA GTC
S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V
AGG ATC ACA TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC CAG
R I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q
                                CDR1
CAG AAG CCA GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG CCC
Q K P G Q A P V L V I Y G K N N R P
                                CDR2
TCA GGG ATC CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC AGC TCA GGA AAC ACA GCT TCC TTG
S G I P D R F S G S S S G N T A S L
ACC ATC ACT GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG
T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S R
GAC AGC AGT GGT AAC CAT GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA
D S S G N H V V F G G G T K L T V L
                                CDR3
GGT
G

```

图 3 抗 IV 型胶原酶单链抗体的核苷酸序列及氨基酸序列

根据线性化质粒在毕赤酵母染色体上整合位点是否使乙醇氧化酶(AOX1)基因突变,对转化子的两种表型 His⁺/Mut⁺ 和 His⁺/mut⁻ 进行了分析,His⁺/Mut⁺型菌利用甲醇作碳源效率高,在基本培养基 MM 上生长正常,而 His⁺/Mut⁻ 型菌利用甲醇作碳源效率低,在 MM 上生长较慢。表型鉴定结果显示 40 个杂交阳性转化子中,18 个为 His⁺/Mut⁺,其余为 His⁺/mut⁻。这种表型分析对转化子的诱导表达具有指导意义。

2.3 抗体 hCo4 在毕赤酵母中的表达及鉴定

将 His⁺/Mut⁺ 转化子在 BMMY 培养基中用甲醇诱导表达。菌液离心后,上清进行 ELISA 筛选鉴定,其中有一株菌表达量较高,进一步扩大培养。SDS-PAGE 电泳和免疫印迹分析培养上清,结果如图 4 所示酵母表达的单链抗体为可溶性蛋白,分子量为 30kD,其中含有预先设计的 E-Tag 标志肽。表达量大约为 20mg/L 酵母培养物。

点免疫印迹实验结果表明毕赤酵母分泌表达的基因工程抗体特异结合 IV 胶原酶活性,而不与其它无关蛋白质反应,例如血管内皮生长因子,癌胚抗原,乙肝病毒表面抗原等(图 5),这一结果与大肠杆菌表达产物复性后的免疫活性相同,但毕赤酵母表达的单链抗体是可溶性的,后者可以方便地从培养上清中一步纯化。

毕赤酵母分泌表达具有生物活性的抗人 IV 型胶原酶单链抗体,为该抗体的大规模生产和应用奠定了基础。然而,目前抗体表达量并不理想。在研究中我们注意到基因拷贝数与外源蛋白的表达量有正相关。因此,用斑点杂交法筛选高拷贝转化子是十分必要的,但并非所有的高拷贝转化子都能有效分泌外源蛋白。这可能是由于高水平表达阻断分泌途径所致。另外,外源基因本身也可能对表达量起着重要作用,如果将外源基因中的密码子改为酵母菌偏爱的密码子或改变单链抗体中 V_L 和 V_H 排列次序将有可能改善表达量。根据文献报道在发酵条件下外源蛋白表达量要比摇瓶培养条件下高 10~100 倍。有关优化表达条件和提高表达量的工作正在深入进行。

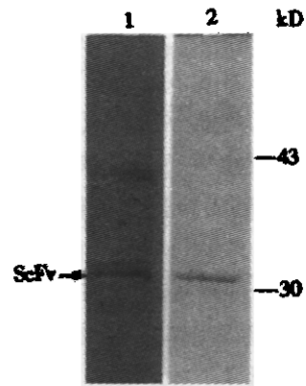


图 4 抗体 hCo4 在毕赤酵母中的表达

1 SDS-PAGE 箭头示单链抗体,
2 Western Blot 右边数字示蛋白质标准分子量

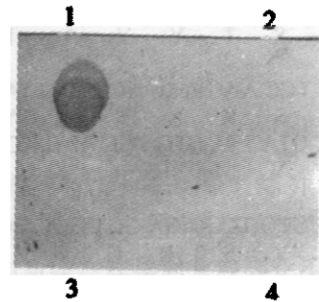


图 5 点免疫印迹示抗 IV 型胶原酶人单链抗体的免疫活性

1 IV 型胶原酶, 2 血管内皮生长因子
3 癌胚抗原, 4 乙肝病毒表面抗原

参 考 文 献

[1] Vaisanen A, Tuominen H, Kallioinen M *et al.* J Pathol, 1996, **180**:283~287.
 [2] Tang J, Yan X, Liu Y, *et al.* Science in China, Series B, 1998, **41**:387~392.
 [3] Eldin P, Pauza M E, Hieda Y, *et al.* Journal of Immunological Methods, 1997, **201**:67~75.
 [4] Romanos M A, Scorer C A, Clare J J. Yeast, 1992, **8**:423~488.
 [5] Pichia pastoris expression kit, a laboratory manual. Invitrogen B V.
 [6] Sambrook J 等著. 金冬雁等译. 分子克隆(第二版). 北京:科学出版社, 1989.