

## 人源性抗 HBsAg 抗体 Fab 段在酵母中的表达

邓宁<sup>1</sup> 粟宽源<sup>2</sup> 王珣章<sup>1\*</sup> 龙繁新<sup>1</sup> 杨林<sup>1</sup> 余宙耀<sup>2</sup>

<sup>1</sup>( 中山大学生物防治国家重点实验室、生物医药中心 广州 510175 )

<sup>2</sup>( 解放军第 458 医院传染病研究中心 广州 510602 )

**摘 要** 通过分步整合的方式,将人源性抗乙肝表面抗原(HBsAg)抗体 Fab 的轻、重链基因分步整合到巴斯德毕赤(*Pichia pastoris*)酵母 GS115 菌株的染色体上,经甲醇诱导,成功地分泌表达出抗 HBsAg 抗体的 Fab 片段,表达量达 50~80mg/L。ELISA 结果显示重组酵母分泌表达出的 Fab 具有较强的结合 HBsAg 的能力。通过抗 Fab 的抗体柱亲和层析,纯化出了纯度较高的 Fab 产品。

**关键词** 人源性 Fab,分泌表达,亲和纯化,巴斯德毕赤酵母

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0546-05

人源性抗乙肝表面抗原(HBsAg)抗体 Fab 在临床上具有防治乙型肝炎病毒的很好的应用前景,如防治新生儿乙型肝炎病毒的垂直传播、肝脏移植病人的病毒控制和用于制备治疗性乙肝疫苗等<sup>[1,2]</sup>。Fab 抗体具有全抗体相同的抗原结合活性,且糖基对抗原抗体的结合活性没有影响<sup>[3]</sup>。高辉、粟宽源利用噬菌体展示技术获得了一株抗 HBsAg 的 Fab 抗体基因,在原核表达系统中进行了表达,并对其抗原结合位点进行了初步研究。结果显示该 Fab 抗体具有较强的 HBsAg 结合活性和抗原特异性<sup>[4,5]</sup>。为了进一步提高抗 HBsAg 抗体 Fab 段的表达量,并对其生物学特性进行研究,本文选用近年来发展最快的 *Pichia pastoris* 表达系统,构建了高效分泌表达 Fab 的酵母工程菌,并对该 Fab 抗体进行了分泌表达和纯化研究。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 质粒、菌株及试剂

含人源性抗 HBsAg 抗体 Fab 基因的质粒 pCom 3H 由解放军第 458 医院传染病研究中心保存,载体质粒 pPICZ $\alpha$ A、pPIC 9K,巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株,购自 Invitrogen 公司;大肠杆菌 Top 10F<sup>+</sup>购自华美生物工程公司。

Vent DNA 聚合酶,T4 DNA 连接酶,dNTP 及相应的限制酶购自 Gene 有限公司;丙烯酰胺,NN'-亚甲双丙烯酰胺,蛋白及核酸分子量 Marker 等购自华美生物工程公司;YNB、Biotin 和 Zeocin<sup>TM</sup>购自 Invitrogen 公司;质粒 DNA<sup>KT</sup>试剂盒购自华舜公司;羊抗人 Fab 抗体及其碱性磷酸酶标记物购于 Sigma 公司;ELISA 检测试剂盒购于中山生物工程公司;NBT/BCIP 购自 Roche 公司。聚偏氟乙烯(PVDF)膜购于 Millipore 公司;HiTrap 亲和层析柱和快速液相蛋白层析仪(FPLC)均为 Pharmacia Bio. 公司产品。

#### 1.2 引物

抗 HBsAg 抗体 Fab Fd 链 基因上游引物为: 5'-CGGAATTCCAGGTGCAGCTGCTGGAGTCT-3'

下游引物为 5'-GGGCTACCTTAGCTAGTTTTGTCA CAAGA-3'。

抗 HBsAg 抗体 Fab L 链 基因上游引物为: 5'-GGAATTGTGTTGACCCAGTCT-3'

下游引物为 5'-CGGAATTCCTAACACTCTCCCCTG TTGA-3'。

#### 1.3 抗 HBsAg 抗体 Fab 基因的克隆

参照 Sambrook 的方法<sup>[6]</sup>进行。

#### 1.4 酵母表达载体 pPIC 9K-L 和 pPICZ $\alpha$ A-Fd 的构建

参照 Sambrook 的方法<sup>[6]</sup>进行。

## 1.5 酵母转化及重组酵母的筛选

表达载体 pPIC9K-L 对 Gs115 的转化采用原生质球转化法,按 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 的说明进行。利用 His 缺失平板来筛选整合有 Fab L 链基因的重组酵母(GS115/pPIC9K-L)并用 G418 抗生素来筛选多拷贝重组体。表达载体 pPICZ  $\alpha$  A-Fd 对含 Fab L 链基因的重组酵母 GS115/pPIC9K-L 的转化,按 Esay Select™ *Pichia* Expression Kit 中的氯化锂转化法进行。利用 Zeocin™ 抗生素筛选重组酵母,并用高剂量的 Zeocin™ 和 G418 双抗生素平板来筛选多拷贝既整合有 L 链基因又整合有 Fd 链基因的重组酵母。

## 1.6 表达产物的检测

SDS-PAGE 和 Western blotting 参照 Sambrook 的方法<sup>[6]</sup>进行。ELISA 则参照 In-Hak Choi 等<sup>[7]</sup>的方法进行。

## 1.7 表达产物的纯化

参照 HiTrap 亲和层析柱说明书进行。

## 2 结 果

### 2.1 Fab 的 Fd、L 链基因的克隆及序列测定

以含 Fd、L 链基因的 pCom 3H 质粒为模板,用 PCR 分别扩增出 Fab 的 Fd 和 L 链基因。电泳结果显示,PCR 产物 Fd 链和 L 链大小约为 690bp,与预期的大小一致(图略)。将 H、L 链的 PCR 产物回收酶切,分别插入到克隆载体 pGEM-7Zf 的相应酶切窗口上,构建 Fd 和 L 链基因的克隆载体,对这两个克隆载体进行序列测定,结果表明克隆的 Fd 和 L 链基因的碱基序列与预期的完全一致。

### 2.2 Fab L 和 Fd 链基因表达载体的构建

从 pGEM-7Zf-L 载体质粒上用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切出含 L 链基因片段,插入到载体质粒 pPIC9K 强启动子 P<sub>AOXI</sub> 下游的 *Bam*H I + *Eco*R I 酶切窗口中,构建重组质粒 pPIC9K-L。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定表达载体 pPIC9K-L,琼脂糖电泳结果显示能切出大小约 700bp 的片段,与预期的相符(图略)。从 pGEM-7Zf-Fd 载体质粒上用 *Eco*R I 和 *Xba*I 双酶切出 Fd 链基因片段,连接到载体 pPICZ  $\alpha$  A 的 *Eco*R I + *Xba*I 酶切窗口中构建表达载体 pPICZ  $\alpha$  A-Fd。用 *Eco*R I + *Xba*I 双酶切鉴定表达载体 pPICZ  $\alpha$  A-Fd,琼脂糖电泳结果显示能切出 700bp 大小的片段,与预期的一致(图略)。

### 2.3 重组表达载体质粒 pPIC9K-L 对酵母的转化及重组子的筛选

表达载体质粒 pPIC9K-L 线性化后,转化宿主巴

斯德毕赤酵母 GS115,在含 0.76mg/mL G418 的 YPD 平板上筛选高抗性的多拷贝重组子。对筛选的重组子的染色体进行 PCR 检测,都能扩增出 690bp 左右的特异的 L 链条带( Fig.1 )。将重组子分别挑到 MM 板和 MD 板上培养,结果均只在 MD 板上生长而 MM 板上几乎不生长。其甲醇利用表型为 Mut<sup>s</sup>。

### 2.4 Fab 抗体 L 链基因在酵母中的表达及其表达产物的鉴定

分别挑取筛选出的多拷贝重组子单菌落,接种到酵母生长培养基(BMGY)中,30℃培养至 OD<sub>600</sub> 约为 5~6 左右,离心收菌,重悬于甲醇诱导培养基(BMMY)中进行诱导培养,培养上清液进行 SDS-PAGE 结果显示,在分子量约为 28kD 处,可见重组子表达上清中有特异的轻链蛋白带( Fig.3 )。

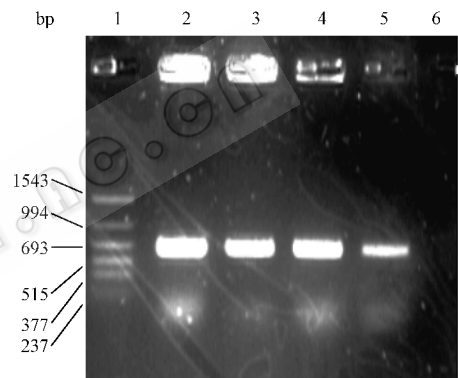


图1 重组酵母 GS115/pPIC9K-L L 链的 PCR 检测

Fig.1 Detection of Fab L chain from recombinant yeast GS115/pPIC9K-L by PCR

1. Molecular weight marker 2~5. PCR of L chain from recombinant yeast GS115/pPIC9K-L. 6. PCR from GS115/pPIC9K

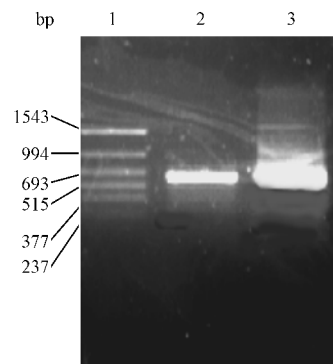


图2 重组酵母 GS115/Fab Fd 链和 L 链的 PCR 检测

Fig.2 Detection of Fab L chain and Fd chain by PCR

1. Molecular weight marker 2. PCR of L chain from recombinant yeast GS115/Fab 3. PCR of Fd chain from recombinant yeast GS115/Fab

对该重组子的表达产物进行 Western Blotting 分析,用带碱性磷酸酶的羊抗人 Fab<sub>1</sub> 抗体与其结合

NBT/BCIP 显色。在 28 kD 附近有一条特异的显色条带即为预期的 Fab 的 L 链( Fig. 4 )。

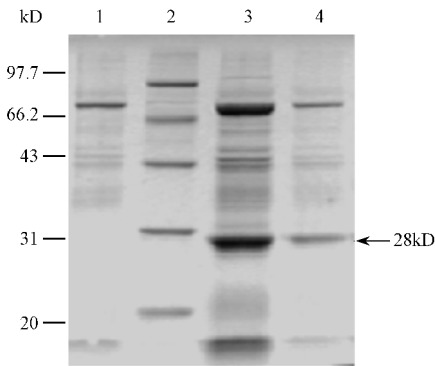


图 3 Fab L 链表达上清的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of the expressed Fab L chain of anti-HBsAg antibody from cultural supernatant of GS115/pPIC9K-L

1. The supernatant of GS115/pPIC9K ; 2. Molecular weight marker ; 3 ~ 4. The supernatant of GS115/pPIC9K-L

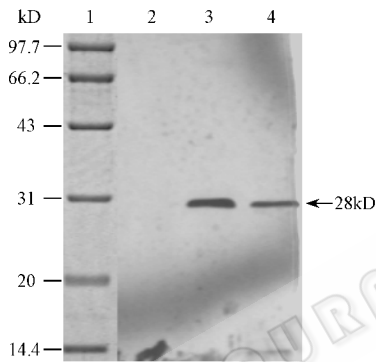


图 4 Fab L 链表达上清的 Western blotting 分析

Fig. 4 Western blotting analysis of the expressed Fab L chain from cultural supernatant of GS115/pPIC9K-L

1. Molecular weight marker ; 2. The supernatant of GS115/pPIC9K ; 3 ~ 4. The supernatant of GS115/pPIC9K-L

## 2.5 重组质粒 pPICZ $\alpha$ A-Fd 对酵母的转化及重组子的筛选

表达载体质粒 pPICZ  $\alpha$  A-Fd 线性化后,转化已转化有轻链基因的 GS115/pPIC9k-L 重组酵母菌。在 zeocin<sup>TM</sup> 的抗性平板上培养,挑选单菌落,转接到含 0.76mg/mL G418 和 1mg/mL zeocin<sup>TM</sup> 的双抗性平板上,筛选出既整合有 Fab L 链基因又整合有 Fab H 链基因的酵母重组子 GS115/Fab。对这些重组子的染色体进行 PCR 检测,结果能分别扩增出 690bp 左右的 L 链条带和 Fd 链条带( Fig. 2 )。重组子只能在 MD 平板上生长,所以其甲醇利用表型为 MutS。

## 2.6 Fab 的 L、Fd 链基因在酵母中的表达及表达产物的鉴定

分别挑取筛选出的多拷贝重组酵母 GS115/Fab

的单菌落,接种到 BMGY 中,28℃ 培养至  $OD_{600}$  约为 5~6 左右,离心收菌,重悬于 BMMY 培养基中进行甲醇诱导培养,对诱导培养第 4 天的培养液上清分别进行还原性处理和非还原处理后进行 SDS-PAGE 电泳,还原处理的 SDS-PAGE 结果显示,在分子量 28 和 30kD 附近分别有两条特异蛋白带。非还原处理的 SDS-PAGE 结果显示,在 45kD 附近有一条特异的蛋白带( Fig. 5 )。对表达量高的重组子的表达产物进行 Western blot 分析,用带碱性磷酸酶的羊抗人 Fab 抗体与其结合,NBT/BCIP 显色。结果表明,还原处理后,28 和 30kD 附近的这两条蛋白带能特异显色,是组成抗 HBsAg Fab 抗体的轻链和 Fd 链,非还原处理后,仅在 45kD 附近有一条特异显色的蛋白带,即为抗 HBsAg 抗体的 Fab 片段( Fig. 6 )。从 SDS-PAGE 和 Western Blotting 结果中可见,非还原处理后 28kD 和 30kD 附近并无多余的带出现,说明 Fab 的 L、Fd 链的表达量基本相等,在细胞中完成了二硫键的正确配对并形成了完整的 Fab 片段。

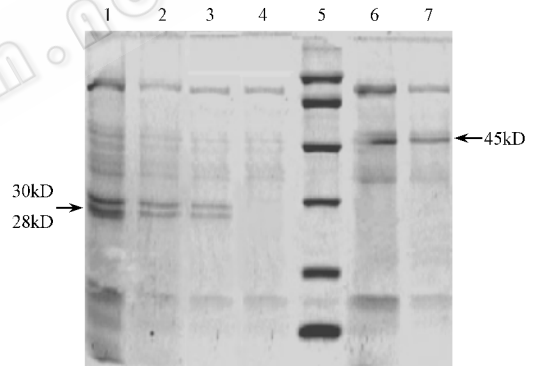


图 5 重组酵母 GS115/Fab 表达上清的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE of the supernatant of recombinant yeast GS115/Fab culture

1 ~ 3. Under reduced conditions ; 6 ~ 7. Under non-reduced conditions ; 4. The culture supernatant of GS115/pPIC9K 5. Molecular weight marker

对图 7 的电泳结果进行凝胶薄层扫描显示,抗 HBs Fab 目的条带可占总蛋白条带的 15%。用 Bradford 试剂测定重组酵母培养上清的总蛋白量为 550mg/L,由此可知,抗 HBs Fab 的表达量可达 80mg/L。

## 2.7 重组酵母 GS115/Fab 表达上清液的 ELISA 分析

在包被好 HBsAg 的多孔板(中山生物工程公司试剂盒)中分别加入 10 倍稀释的抗 HBsAg 抗体 Fab 重组酵母(GS115/Fab)培养上清液,37℃ 作用 2h,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 Fab 抗体,

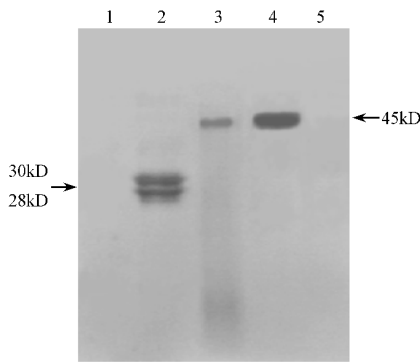


图 6 重组酵母 GS115/Fab 表达上清的 Western 分析

Fig.6 The Western Blotting analysis of the supernatant of recombinant yeast GS115/Fab

1. Supernatant of GS115/pPIC9K 2. Under reduced conditions 3. Under non-reduced conditions 4. Molecular weight marker

37℃作用 1h,试剂盒中的显色液 A、B 进行显色,ELISA 仪检测。用人源性抗乙肝表面抗原抗体(HBIG,上海生物制品研究所)作为阳性对照(8u/孔)。试剂盒提供的阴性对照品为阴性对照。测定值如表 1。重组酵母培养上清的吸收值达到 1.05~1.99,与阴性对照的比值高达 21~39.8,显示出重组酵母培养上清具有很好的 HBsAg 结合活性。

## 2.8 表达产物 Fab 的纯化

诱导表达的培养上清液先用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀,脱盐后上样到羊抗人 Fab 偶联的 HiTrap 抗体柱上,进行亲和纯化。SDS-PAGE 电泳检测,可见大部分杂带都已除去(Fig. 7)。薄层扫描显示 28 和 30kD 附近的条带纯度达到了 90%以上。

表 1 重组酵母表达上清的 ELISA 测定

Table 1 ELISA detection of cultural supernatant of recombinant yeast

	Blank control		Cultural supernatant of recombinant yeast						Positive		Negative control	
	1	2	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4
A <sub>540/630</sub>	0.0000	0.0002	1.991	1.556	1.897	1.317	1.055	1.763	2.328	2.572	0.023	0.040
Ratio of negative control			39.82	31.12	37.94	26.34	21.1	35.26	46.56	51.44		

(与阴性对照的比值大于 2.1 即为阳性,阴性对照小于 0.05 时按 0.05 计算)

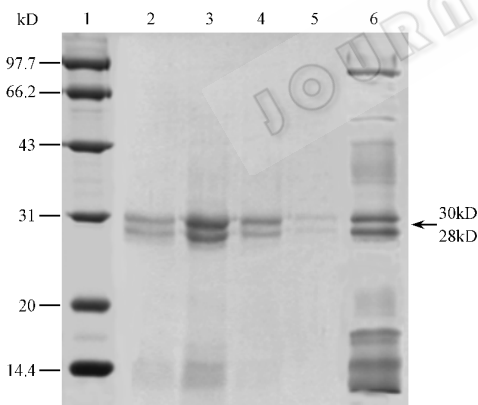


图 9 纯化的 Fab 抗体的还原性 SDS-PAGE 分析

Fig.9 SDS-PAGE of Fab fragment of anti-HBsAg antibody under reduced condition

1. Molecular weight marker 2~5. L and Fd chain of Fab fragment purified by anti-Fab antibody conjugated HiTrap column 6. Cultural supernatant of recombinant yeast GS115/Fab

(*Pichia pastoris*)表达系统中分泌表达了抗 IgE 受体的人源化 Fab 抗体片段,其表达量提高到 10~40 mg/L。人源性抗 HBsAg 抗体 Fab 段的表达研究目前仅见于大肠杆菌,在大肠杆菌的胞周质进行分泌表达或者以包含体的形式表达<sup>[10,11]</sup>。胞周质中的表达量非常低,没有什么生产应用价值。以包含体的形式表达虽然表达量较高,但是包含体的变性与复性很难完成 Fab 的正确组装,正确装配的有功能的 Fab 得率较低,无法应用于生产。到目前为止,抗 HBsAg 抗体 Fab 段还没有在酵母表达系统中表达的报道。巴斯德毕赤酵母表达系统是近年来发展最快和最具潜能的表达系统,已被成功地应用于多种异源蛋白高水平表达和商业化生产<sup>[12]</sup>。本文首次采用分步整合的方式,将人源化抗 HBsAg Fab 抗体的轻、重链基因分步整合到巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株的染色体上,通过诱导表达,成功地分泌表达出抗 HBsAg 抗体的 Fab 片段。表达量可达 80mg/L。Takahashi K. 等<sup>[9]</sup>曾认为组成 Fab 的单一链在酵母细胞中不稳定,易分解,组成 Fab 的轻链和 Fd 链基因不能单独地在酵母细胞中表达。但是,本实验发现,抗 HBsAg 抗体 Fab 段的轻链能稳定的得到表达并分泌

## 3 讨论

1988 年 Horwitz A. H. 等<sup>[8]</sup>在啤酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株中分泌表达了具有功能的抗人鼠嵌合抗体 Fab 片段。其表达量仅为 100~200 μg/L。Takahashi, K. 等<sup>[9]</sup>2000 年在巴斯德毕赤酵母

出来。从图 3 和图 4 可以清楚地看到,GS115/pPIC9K-L 表达上清中存在着表达出的 Fab 的轻链产物。当抗 HBsAg 抗体 Fab 段的轻链和 Fd 链基因均整合插入后,轻、重链基因都能进行表达且二者表达水平相当。从非还原条件下进行的 SDS-PAGE 分析可以看出,Fab 片段下方没有多余的轻链或重链存在,说明表达出的轻链和重链在细胞中能正确配对成完整的稳定的 Fab 片段。而且表达出的 Fab 抗体片段具有较强的 HBsAg 结合能力,ELISA 结果显示 Fab 重组酵母表达上清的 HBsAg 结合能力仅仅略低于人多价免疫球蛋白。这更进一步说明组成 Fab 的 Fd 链和 L 链在酵母细胞中能完成二硫键的正确配对,组装成有功能的 Fab 分子。抗 HBsAg 抗体 Fab 段在酵母中的表达,为产业化生产抗乙肝病毒的 Fab 抗体奠定了基础,也为临床防治乙肝病毒提供一条经济、高效的治疗途径。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Zebedee S L, Barbas C F, Hom Y L *et al.* Human combination antibody libraries to hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 3175 ~ 3179
- [ 2 ] Sawyer L A. Antibodies for the prevention and treatment of viral disease. *Antiviral Research*, 2000, **47**: 57 ~ 77
- [ 3 ] HE M L (何明亮), LI Z P (李载平). Character and application prospect of gene engineering antibody. *Chinese Journal of Cell Biology* (细胞生物学杂志), 1995, **17**(3): 112 ~ 117
- [ 4 ] GAO H (高辉), GAO I (高磊), REN Z I (任宗玲) *et al.* Screening and
- sequence analysis of a humanized anti-HBsAg Fab fragment. *J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 1998, **14**(2): 155 ~ 157
- [ 5 ] YU Z Y (余宙耀), SU K Y (粟宽源), GAO H (高辉) *et al.* Screening antibody and purification of bacterially expressed human anti-HBs Fab. *Shanghai Journal of Immunology* (上海免疫学杂志), 1999, **19**(2): 91 ~ 93
- [ 6 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed., New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989
- [ 7 ] In-Hak Choi, Jun-Ho Chun, Ik-Jung Kim. Generation of human Fab monoclonal antibodies against PreS2 of Hepatitis B Virus using antibody phage display library. *J Korean Soc Microbiol*, 1999, **34**(1): 21 ~ 30
- [ 8 ] Horwitz A H, Chang C P, Better M *et al.* Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988, **85**: 8678 ~ 8682
- [ 9 ] Takahashi K, Yuuki T, Takai T *et al.* Production of humanized Fab fragment against human high affinity IgE receptor in *Pichia Pastoris*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, **64**(10): 2138 ~ 2144
- [ 10 ] MAO C S (毛春生), SONG H B (宋宏彬), LI J Z (李季枝) *et al.* High expression of anti-HBsAg Fab fragment in *E. coli* and re-folding of Fab. *Chinese Journal of Immunology* (免疫学杂志), 1999, **15**(4): 229 ~ 231
- [ 11 ] WANG Y (王琰), LIU Q Y (刘群英), XU J J (徐建军) *et al.* Expression and sequence analysis of anti-HBs Fab fragment of human. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物和免疫学杂志), 1995, **15**(5): 304 ~ 307
- [ 12 ] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris*. *FEMS Microbiology Previews*, 2000, **24**: 45 ~ 66

## The Expression of Humanized Fab Fragment of the Anti-HBsAg Antibody in Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*

DENG Ning<sup>1</sup> SU Kuan-Yuan<sup>2</sup> WANG Xun-Zhang<sup>1\*</sup> LONG Qing-Xin<sup>1</sup> YANG Lin<sup>1</sup> YU Zhou-Yao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(State Key Laboratory for Biological Control, Biopharmaceutical Center in Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

<sup>2</sup>(Central research institute of the 458th hospital of PLA, Guangzhou 510602, China)

**Abstract** Using of two-step integrating technology, transduced the H and L chain gene of humanized Fab fragment of anti-HBsAg antibody into the genome of methylotrophic yeast *P. pastoris*. Constructed a engineering yeast to produce humanized Fab fragment of the anti-HBsAg antibody. The Fab fragment was efficiently secreted into the medium at a concentration of 50 ~ 80mg/L. The Fab fragment was purified from culturing supernatant of the recombinant yeas by affinity chromatography. The ELISA analysis showed the high affinity of the expressed humanized Fab fragment to the HBsAg.

**Key words** humanized Fab, secreting expression, affinity purification, *Pichia pastoris*

Received: 04-08-2002

This work was supported by Grant from Guangzhou Municipal Department of Science and Technology(No.97-2-65-05).

\* Corresponding author. Tel: 86-20-84112504; Fax: 86-20-84036551; E-mail: wxz@zsu.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>