

毕赤酵母表达 gp96-scFv 抗体及生物活性测定

桂明明¹, 武慧英^{2,3}, 孙璐^{2,3}, 徐亚星^{2,3}, 赵报², 李鑫^{2,3}, 李长菲², 王希东¹, 孟颂东²

1 新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 100049

桂明明, 武慧英, 孙璐, 等. 毕赤酵母表达 gp96-scFv 抗体及生物活性测定. 生物工程学报, 2014, 30(4): 595-604.

Gui MM, Wu HY, Sun L, et al. Expression of anti-gp96 scFv fragment in *Pichia pastoris* and identification of its biological activity. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 595-604.

摘要: 旨在利用毕赤酵母分泌表达 gp96-scFv 抗体, 纯化后得到能特异性结合 gp96 抗原的小分子抗体片段 (scFv)。根据 gp96-scFv 抗体基因序列, 合成 gp96-scFv 抗体基因序列, 将 gp96-scFv 抗体序列克隆到毕赤酵母表达质粒 pPICZα-A, 线性化的重组表达载体电转化到毕赤酵母 X33, 甲醇诱导目的蛋白表达, 通过亲和层析法纯化目的蛋白, 并以 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行鉴定。通过 Western blotting、Immunofluorescence、ELISA、FACS 方法对 gp96-scFv 抗体的生物活性进行了检测。结果成功地构建了分泌表达抗 gp96 蛋白 scFv 抗体的毕赤酵母菌, 每升毕赤酵母菌培养上清经纯化可获约 50 mg gp96-scFv 抗体, 所获抗体其分子量大约为 15 kDa, 具有与 gp96 抗原特异性结合的生物活性。本研究通过毕赤酵母菌成功表达了 gp96-scFv 抗体, 生物活性 Western blotting、Immunofluorescence、ELISA、FACS 分析表明该抗体能特异性结合 gp96。

关键词: gp96-scFv 抗体, 毕赤酵母, gp96, 分泌表达, 亲和力, 特异性

Received: August 22, 2013; **Accepted:** November 15, 2013

Supported by: Beijing Natural Science Foundation (No. KQA201105260010A), Shenzhen Science and Technology Innovation Project (No. CYC201012290024A).

Corresponding author: Songdong Meng. Tel: +86-10-64807350; E-mail: mengsd@im.ac.cn

Xidong Wang. Tel: +86-991-8763971; E-mail: wxdxnd@126.com

北京自然科学基金 (No. KQA201105260010A), 深圳市科技创新委员会项目 (No. CYC201012290024A) 资助。

Expression of anti-gp96 scFv fragment in *Pichia pastoris* and identification of its biological activity

Mingming Gui¹, Huiying Wu^{2,3}, Lu Sun^{2,3}, Yaxing Xu^{2,3}, Bao Zhao², Xin Li^{2,3}, Changfei Li², Xidong Wang¹, and Songdong Meng²

1 College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

2 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Secretory anti-gp96 scFv fragment was expressed in *Pichia pastoris* to obtain a small molecule antibody that specifically recognizes heat shock protein gp96. The gp96-scFv fragment gene was synthesized and cloned to *Pichia pastoris* expression plasmid pPICZα-A. *Pichia pastoris* X33 was electroporated with the linearized recombinant expression vector, and expression of gp96-scFv fragment was induced by methanol. The His-tagged recombinant protein was then purified by affinity chromatography and analyzed with SDS-PAGE and Western blotting assays. The biological activities of recombinant gp96-scFv fragment were determined by Western blotting, Immunofluorescence, ELISA and FACS assays. The gp96-scFv fragment was expressed successfully in *Pichia pastoris*. About 50 mg of recombinant protein could be purified from 1 liter of the *Pichia pastoris* culture supernatant. Its molecular weight was about 15 kDa. The gp96-scFv fragment could specifically bind to gp96 protein by Western blotting, immunofluorescence, ELISA and FACS analyses. *Pichia pastoris*-expressed gp96-scFv fragment specifically recognizes gp96 protein, which could be used for Western blotting, Immunofluorescence, ELISA and FACS analyses.

Keywords: gp96-scFv antibody, *Pichia pastoris*, gp96, secretory expression, affinity, specificity

gp96 是存在于真核生物细胞内质网中分子量约为 96 kDa 的热休克蛋白 (又称 GRP94)^[1]。它属于 HSP90 家族,是胞质 HSP90 的旁系同源蛋白,约占细胞总蛋白的 1%,在细胞各种代谢功能中都起着重要的作用^[2]。gp96 具有结合多肽的能力,因而在抗原加工、呈递中发挥重要作用。内源性或外源性抗原进入细胞后被细胞中蛋白酶降解,通过 TAP 分子进入内质网,进而与 MHC (主要组织相容性复合物) I 类或 II 类分子结合,供 CD8⁺T 细胞或 CD4⁺T 细胞识别^[3]。研究表明 gp96 能结合进入内质网中的抗原肽并将结合的抗原呈递给 MHC I 类或 II 类分子,在 T 细胞识别抗原的过程中发挥着重要作

用^[4-6]。gp96 作为一种重要的热休克蛋白,与多种疾病及肿瘤的发生相关^[7-8]。因此,获得特异性结合 gp96 的抗体检测 gp96 的表达,同时作为靶向 gp96 治疗来抑制有关疾病和肿瘤的发生^[9-11],具有很重要的意义。

目前市场上已有的 gp96 抗体大都是兔源、鼠源的单克隆或多克隆抗体。而腹水法生产的单抗或多抗往往含有较多的宿主性成分,应用于临床特别是体内治疗时可能引起一些麻烦(例如引起患者不适),此外腹水法自身也无法满足工业、医药卫生及科研领域对抗体日益增长的需求。由于各种原因,研究者纷纷开展新型抗体研究来满足对抗体的日益需求^[12]。新型小

分子抗体单链可变区片段 (scFv) 是由一弹性接头 (Linker) 将 VH 和 VL 连接而成的两个可变区首尾相接的单一肽链, 通过正确折叠, 两个可变区由非共价键形成具有抗原结合功能的 Fv 段, 此单一肽链的结构既有利于表达和进行基因重组操作, 又增加了 Fv 的稳定性^[13]。scFv 抗体具有抗原结合部位的最小功能结构单位。以分子量小、体内半衰期短、免疫原性低、易于基因工程操作等特点而倍受关注^[14]。已经有文献报道利用原核表达系统获得了鼠源的 scFv^[15] 和 Fab^[16] 小分子抗体。与原核表达系统相比, 真核表达系统具有遗传操作方便、培养基成分简明和适合高密度发酵等优点; 真核表达系统毕赤酵母具有分泌表达和二硫键加工等翻译后修饰的能力。因此许多在大肠杆菌中难以表达的重组蛋白在毕赤酵母中得以成功表达。另外, 由于毕赤酵母遗传性状稳定、生产成本较低、蛋白表达量高, 因此其在生物制药业中受到越来越多的关注^[17-18]。文中通过构建毕赤酵母 scFv 抗体 pPICZ α -A 表达质粒进行分泌表达, 获得与 gp96 特异性结合的 scFv 小分子抗体, 为 gp96 蛋白的功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体菌株、细胞株

毕赤酵母菌株 X33 及表达质粒 pPICZ α -A 购自 Invitrogen 公司 (美国); 大肠杆菌 DH5 α 、293T 细胞系、人乳腺癌细胞 SK-BR-3、人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 HepG2 细胞为本实验室保存。

1.1.2 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA

marker 为 TaKaRa 公司产品; 博莱霉素 (Zeocin) 购自 Invitrogen 公司 (美国); 分子量蛋白 marker、PVDF 膜购自 Promega 公司; 小鼠抗 His-Tag mAb、山羊抗小鼠 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-FITC 为北京中杉金桥公司产品; Anti-His-HRP 为 Santa Cruze Biotech 产品; gp96 兔多克隆抗体为 Enzo 产品; DMEM、1640 细胞培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司; 质粒胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自北京康为世纪公司; Anti-His-tag 亲和层析柱 (His-Trap HP) 为 GE 公司产品。

1.1.3 PCR 引物

根据 gp96-scFv 抗体片段序列设计引物: 上游引物 (5'-CGGAATTCCAGGTGCAGCTGGTGCAG-3'), 引入 *EcoR* I 酶切位点; 下游引物 (5'-CGTCTAGATGAGTGGTGGTGGTGGTGCAC-3'), 引入 *Xba*I 酶切位点和 His 标签。

1.2 方法

1.2.1 gp96-scFv 基因的设计及合成

根据 gp96-scFv 的基因序列 (GenBank Accession No. AJ252276.1)^[19], 委托上海生工生物工程技术服务公司合成该基因。

1.2.2 pPICZ α -gp96-scFv 重组表达载体的构建

以合成的 gp96-scFv 基因序列为模板设计引物, 利用 *Taq* DNA 聚合酶进行常规扩增反应, 将扩增产物和 pPICZ α -A 质粒分别用 *EcoR* I 和 *Xba*I 双酶切, 回收、连接, 获得 pPICZ α -gp96-scFv 重组表达载体, 并对其进行酶切和测序鉴定。

1.2.3 酵母菌转化、筛选及鉴定

将上述重组质粒和空载体 pPICZ α -A 分别用 *Sac* I 单酶切, 用 Bio-Rad 电转仪 (270 V, 11 ms) 将线性化后的质粒分别转化至毕赤酵母株 X33

中。取转化菌涂布于含有 100 mg/L Zeocin 的 YPDS 平板上,于 28–30 °C 温箱中培养 2–3 d。将抗性筛选转化子梯度接于含 500、800、1 000 mg/L Zeocin 的 YPDS 固体培养基上,48 h 左右观察转化子的生长情况。挑取 1 000 mg/L Zeocin 平板中单菌落接种于 5 mL YPD 液体培养基中,28–30 °C 培养 16–20 h。提取酵母菌基因组 DNA,PCR 鉴定目的基因是否整合成功。

1.2.4 甲醇诱导表达及鉴定

取阳性菌液接种于 100 mL BMGY 培养液中,于 28–30 °C 培养至 OD_{600} 值为 2.0–6.0 时,3 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用适量体积的 BMMY 培养基重悬,使 OD_{600} 值为 1.0 左右。加入甲醇溶液诱导表达使其终浓度维持在 0.5%–1% (每 24 h 补加 1 次甲醇),培养 4 d 分别在各诱导表达的时间点 (0、12、24、36、48、72、96 h) 各取 1 mL 发酵液,采用斑点杂交法对表达产物进行鉴定。

1.2.5 目的蛋白的纯化和鉴定

采用 Anti-His-tag 亲和层析柱 (His-Trap HP) 对表达的 scFv 进行纯化,具体步骤见纯化试剂盒说明书。通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 对纯化目的蛋白进行鉴定。

1.3 gp96-scFv 抗体生物活性的测定

1.3.1 Western blotting 方法评价 gp96-scFv 抗体对 SK-BR-3 细胞 gp96 蛋白的检测活性

将培养的 SK-BR-3 细胞去培养基后,PBS 洗 2–3 遍,加入 500 μ L 预冷的细胞裂解液,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 SDS 电泳上样缓冲液混匀后上样,SDS 电泳 3 h。然后,通过电转移系统将凝胶中分离的蛋白转印 (恒压 100 V,95 min) 到 PVDF 膜上。PVDF 膜经含 5% 脱脂

奶粉的 TBST 封闭 2 h 后,用终浓度为 1 μ g/mL 的 gp96-scFv 抗体于 4 °C 孵育过夜。PVDF 膜经 TBST 漂洗后,置于含有 1 μ g/mL 的小鼠抗 His-Tag 抗体的 TBST 中,4 °C 孵育 4 h。PVDF 膜经 TBST 再次漂洗后,用 1 : 2 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体于室温孵育 2 h。最后按 Western blotting 发光试剂盒的操作说明,将胶片曝光显影观察结果。

1.3.2 Flow cytometry 方法评估 gp96-scFv 抗体对 SK-BR-3 细胞膜表面 gp96 的检测活性

SK-BR-3 经 0.5 mmol/L EDTA 消化处理后,收集 1×10^6 个细胞,PBS 洗两遍。用 200 μ L PBS 重悬细胞,加入纯化后的 gp96-scFv 抗体使其终浓度为 100 μ g/mL,轻轻混匀,4 °C 孵育 1 h。用 PBS 洗两遍,以 200 μ L 的 PBS 将细胞重悬,加入 2 μ L anti-His-FITC 抗体,轻轻混匀,4 °C 避光孵育 30 min,再用 PBS 洗两遍,最终用 400 μ L PBS 重悬细胞,流式细胞仪观察结果。

1.3.3 ELISA 方法评估 gp96-scFv 抗体对 gp96 蛋白的检测活性

用于包被的 gp96 蛋白从人胎盘中纯化提取^[20],用包被液 (25 mmol/L 碳酸盐缓冲液,pH 9.6) 倍比稀释 10 μ g gp96 蛋白,每孔 100 μ L,4 °C 包被过夜,用 PBST 洗涤 3 次 (PBST: 0.05% Tween-20 的 PBS,pH 7.4) 后,每孔加 200 μ L 封闭液封闭 (封闭液: 5% BSA),置于 37 °C 孵育 1 h,每孔加入 100 μ L 1 μ g/mL 封闭液稀释的 gp96-scFv 抗体,37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次后加入 100 μ L 用封闭液稀释的 anti-His-HRP (1 : 100) 抗体,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗涤 4 次。每孔加入 100 μ L TMB 底物液避光反应 10 min 后,每孔再加入 50 μ L 终止液 (2 mol/L 硫酸),5 min 后读取 450 nm 处的吸光值 (OD_{450})。

1.3.4 Immunofluorescence 方法评估 gp96-scFv 抗体对 MCF-7 细胞膜表面 gp96 的检测活性

将灭菌后的盖玻片放入 6 孔板, 每孔加入 3×10^5 的 MCF-7 细胞, 培养过夜。吸去 6 孔板中的培养液, 用 PBS 洗 1 次。加入 5% BSA 的 PBS 封闭液 37°C 封闭 15 min。加入纯化后的 gp96-scFv 抗体使其终浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, 孵育 1 h, PBS 洗 3 次。加入用封闭液稀释后的 anti-His-FITC (1:100) 抗体避光孵育 1 h。PBS 洗 3 次, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 吸去多聚甲醛固定液, PBS 洗 3 次。在载玻片上滴一滴封片剂, 用镊子轻轻夹出盖玻片, 用吸水纸将残留的液体吸干。最后用中性树脂封片, 荧光显微镜观察结果。

2 结果

2.1 pPICZ α -gp96-scFv 重组表达载体的构建及鉴定

以合成 gp96-scFv 抗体序列为模板, PCR 扩

增该基因片段, 结果在琼脂糖凝胶电泳上出现 1 条约 300 bp 的 DNA 条带, 同预期结果相符 (图 1A)。以 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切的 PCR 产物和 pPICZ α -A 空载质粒连接后, 再用双酶切鉴定, 在琼脂糖凝胶电泳上出现 2 条分别约 300 bp 和 3.6 kb 的 DNA 条带 (图 1B), 与预期结果相符。

2.2 重组质粒转化的毕赤酵母菌 Mut 的鉴定

在含 500、800、1 000 mg/L 不同梯度的 Zeocin 的 YPDS 固体培养基上抗性筛选毕赤酵母转化子, 最后提取 1 000 mg/L Zeocin 毕赤酵母菌的基因组, PCR 鉴定为阳性重组的毕赤酵母菌, PCR 产物包含 pPICZ α -A 载体和 gp96-scFv 基因片段, 通过 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后在琼脂糖凝胶电泳上出现 2 条大小约是 300 bp 和 3.6 kb 的 DNA 条带, 分别为 pPICZ α -A 载体和 gp96-scFv 基因片段, 同预期分子量相符合 (图 1C)。

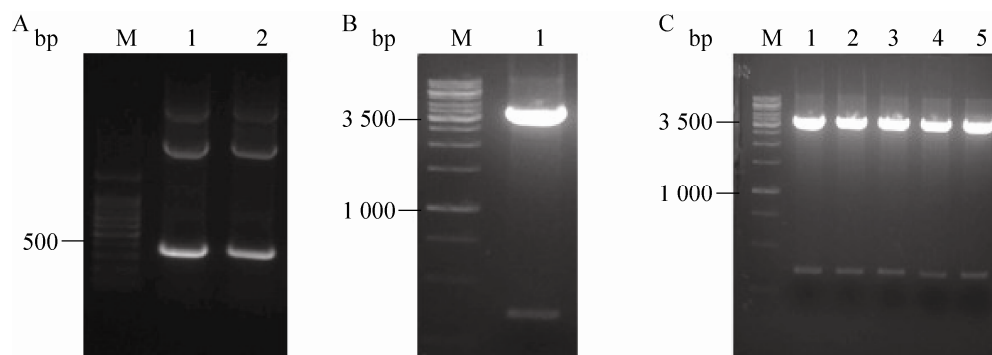


图 1 pPICZ α -gp96-scFv 重组表达载体的构建及鉴定

Fig. 1 Construction and identification of pPICZ α -gp96-scFv fragment recombinant plasmid. (A) The gp96-scFv fragment gene was produced by PCR from the pUC57 templates. M: DNA marker; 1-2: PCR products of gp96-scFv gene. (B) Identification of the recombinant vectors by enzyme digestion. M: DNA marker; 1: *EcoR* I and *Xba* I digested plasmid. (C) Identification of the *Pichia pastoris* colonies by PCR and enzyme digestion. M: DNA marker; 1-5: *EcoR* I and *Xba* I digested PCR products from positive *Pichia pastoris* colonies.

2.3 目的基因在毕赤酵母菌中的表达

将重组质粒转化的毕赤酵母菌加入甲醇诱导不同时间后的培养上清进行斑点杂交检测,结果显示以 pPICZ α -gp96-scFv 重组质粒转化,各时间点毕赤酵母菌的培养上清在硝酸纤维素膜上均出现斑点,其中第 72 h 出现的斑点亮度最高;而空载体转化的毕赤酵母菌各时间点的培养上清在硝酸纤维素膜上均未出现斑点(图 2A)。

2.4 目的蛋白的纯化和鉴定

采用 Anti-His-tag 亲和层析柱(His-Trap HP)

对表达的 gp96-scFv 进行纯化,纯化的目的产物经 SDS-PAGE 检测表明,考马斯亮蓝染色的聚丙烯酰胺凝胶出现 2 条分子量约为 15 kDa 的条带(图 2B)。Western blotting 鉴定的结果显示,纯化的目的蛋白在胶片上出现 1 条分子量为 15 kDa 的蛋白条带;而空载体转化的毕赤酵母菌发酵液作为阴性对照则没有相应的条带(图 2C),并且条带位置同预期分子量大小基本相同。同时,将人胎盘中纯化的 gp96 蛋白进行 SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝染色的聚丙烯酰胺凝胶出现 1 条分子量约为

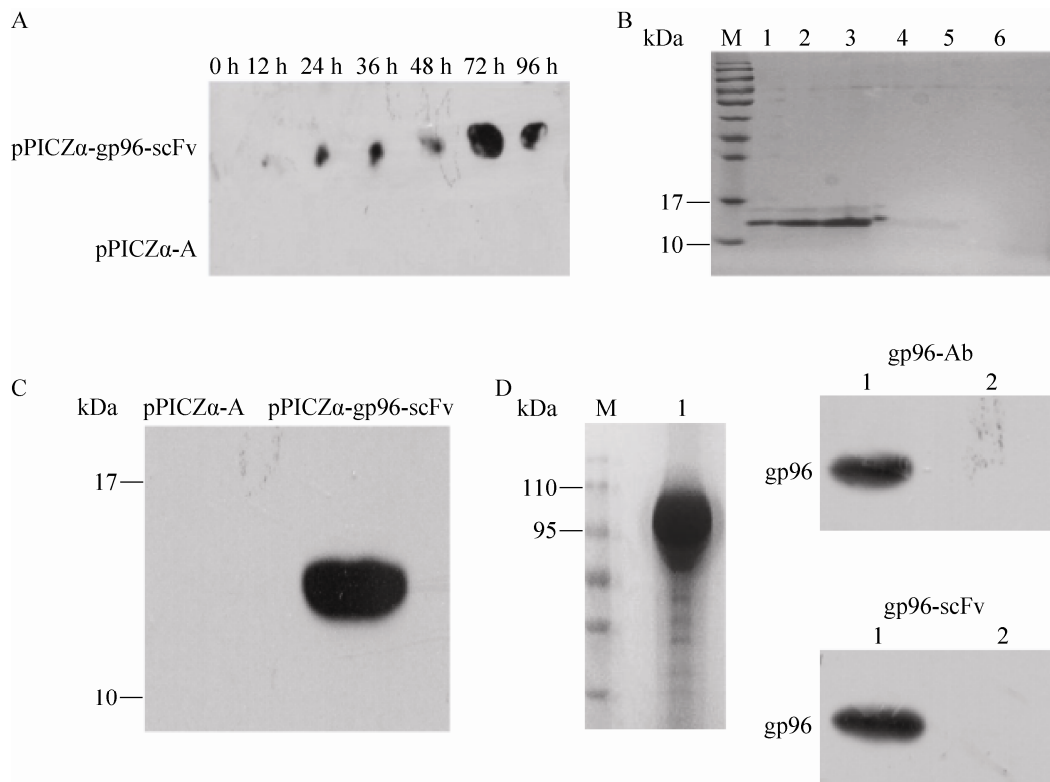


图 2 gp96-scFv 抗体在毕赤酵母中表达、纯化与鉴定

Fig. 2 Expression, purification and identification of gp96-scFv fragment in *Pichia pastoris*. (A) Dot blotting of His-tagged gp96-scFv probed with HRP-conjugated anti-His antibody. The pPICZ α -A electroporated clone serves as a negative control. (B) SDS-PAGE analysis of gp96-scFv. M: protein marker; 1-3: different amounts of gp96-scFv sample; 4-6: different amounts of the sample of negative control. (C) Determination of His-tagged gp96-scFv by Western blotting assay using anti-His antibody. (D) SDS-PAGE analysis of purification placenta gp96. M: protein marker; 1: placenta gp96 (left). Western blotting analysis of placenta gp96 with gp96 polyclonal antibody and gp96-scFv. 1: placenta gp96; 2: BSA (right).

96 kDa 的明显条带,再使用商业化的 gp96 兔多克隆抗体或 gp96-scFv 抗体对人胎盘 gp96 蛋白和牛血清白蛋白 (BSA) 作为阴性对照进行 Western blotting 杂交,Western blotting 结果显示均能出现明显杂交条带 (图 2D),结果表明纯化的蛋白是 gp96-scFv 抗体,且能够结合 gp96 蛋白。

2.5 gp96-scFv 抗体生物活性检测

2.5.1 gp96-scFv 抗体的 Western blotting 检测

SK-BR-3 细胞经细胞裂解液处理后,分别

取 0、20、30 μg 细胞裂解液上清进行 SDS-PAGE。转膜以后将 PVDF 膜与 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化后的 gp96-scFv 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。最后按 Western blotting 发光试剂盒的操作说明,将胶片曝光显影观察结果。结果显示,在胶片上出现 1 条分子量约为 96 kDa 的蛋白条带;而阴性对照则无此条带 (图 3A)。同时,将野生型 HepG2 细胞和 siRNA 稳定敲低 gp96 的 HepG2 细胞经细胞裂解液处理后,分别取 30 μg 上清蛋白进行 Western blotting,结果显示 siRNA 稳定敲低 gp96 细胞

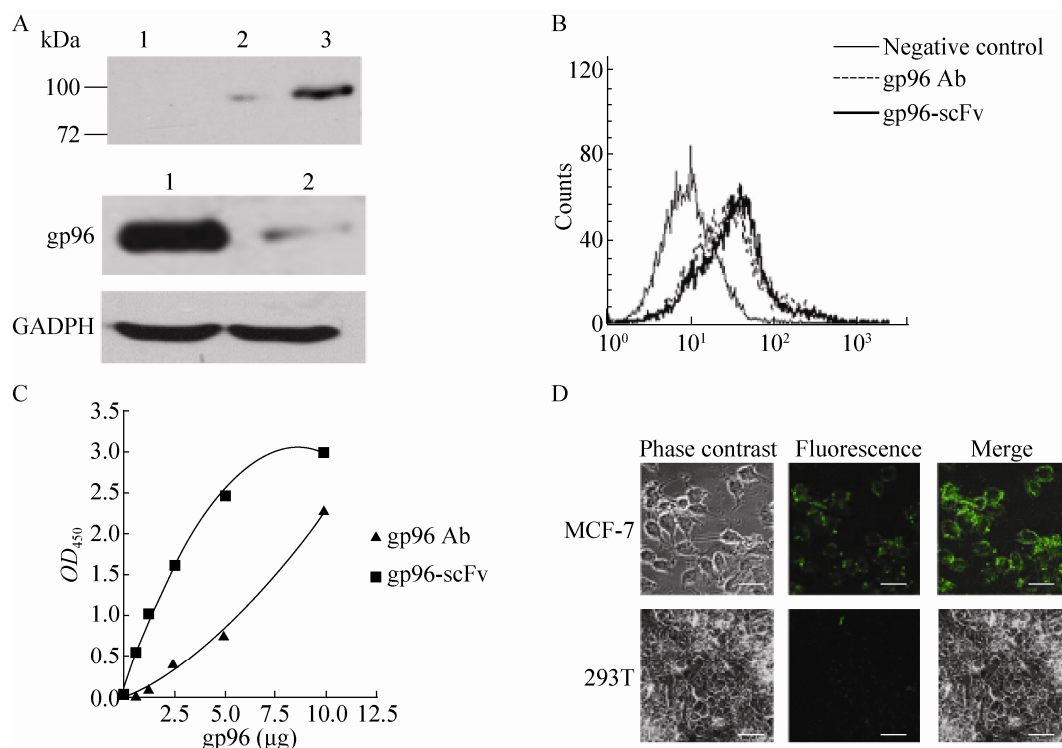


图 3 gp96-scFv 抗体生物活性检测

Fig. 3 Detection of the biological activities of gp96-scFv antibody. (A) Western blotting detection of endogenous gp96 in SK-BR-3 cells (up), and HepG2 cells or HepG2 cells stably transfected with gp96 RNAi (down) using gp96-scFv antibody. (up) lane 1: PBS as a negative control; 2-3: different amounts of SK-BR-3 cells lysates. (down) 1: HepG2 cells lysates; 2: cell lysates of HepG2 cells stably transfected with gp96 siRNA. (B) FACS analysis of cell surface gp96 in SK-BR-3 cells using gp96-scFv antibody. Mouse control IgG serves as a negative control. gp96 Rabbit polyclonal antibody serves as a positive control. (C) ELISA analysis of gp96-scFv antibody. gp96 Rabbit polyclonal antibody serves as a positive control. (D) Immunofluorescence staining of unpermeabilized MCF-7 cells and 293T cells (as a negative control) using gp96-scFv antibody. Bar=30 μm .

相对于野生型细胞条带明显变弱(图 3A 下) 这些结果均表明 gp96-scFv 抗体能够特异结合 gp96 蛋白。

2.5.2 gp96-scFv 抗体的 Flow cytometry 检测

用 EDTA 处理 SK-BR-3 细胞后, 分别向细胞中加入 1 100 gp96 兔多克隆抗体和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 表达纯化的 gp96-scFv 抗体, 其中 gp96 兔多克隆抗体处理组为阳性对照组, 不加 gp96 抗体为阴性对照组。孵育后分别加入 FITC 标记的荧光二抗, 流式细胞仪结果显示阳性对照和纯化 gp96-scFv 抗体处理的都出现峰明显的偏移(图 3B)。Flow cytometry 结果表明 gp96-scFv 抗体能够结合细胞膜表面 gp96。

2.5.3 gp96-scFv 抗体的 ELISA 检测

将纯化的 gp96 蛋白 10 μg 依次梯减倍比稀释包被, 用 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化后的 gp96-scFv 抗体, 同时加入 1 1 000 gp96 兔多克隆抗体处理组为阳性对照组, 经 Anti-His-HRP 二抗孵育显色后在 450 nm 读取的吸光值 (OD_{450}) (图 3C) gp96-scFv 抗体检测的 gp96 蛋白最低浓度为 50 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。ELISA 结果表明重组表达 gp96-scFv 抗体具有比商业化 gp96 兔多克隆抗体 (Enzo 产品) 有更强的灵敏度和亲和力。

2.5.4 gp96-scFv 抗体的 Immunofluorescence 检测

将 MCF-7 细胞与 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释后的 gp96-scFv 抗体孵育后, 同时 293T 细胞 (293T 细胞表面没有 gp96) 与 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 稀释后的 gp96-scFv 抗体孵育作为阴性对照, 通过荧光显微镜观察 MCF-7 细胞表面分布大量绿色荧光, 而 293T 细胞表面没有绿色荧光(图 3D)。Immunofluorescence 结果同样表明 gp96-scFv 抗

体能够特异结合细胞膜表面 gp96。

3 讨论

本研究构建了重组载体 pPICZ α -gp96-scFv, 使用毕赤酵母表达系统表达目的蛋白 gp96-scFv 抗体片段, 且获得具有较高亲和力和特异性的抗 gp96 蛋白的分泌型 scFv 小分子抗体^[21-22]。在毕赤酵母表达的目的蛋白 gp96-scFv 抗体筛选体系中不仅限于传统的 PCR、RT-PCR 及分子杂交等方法筛选, 而且利用毕赤酵母其强大的分泌功能对蛋白直接筛选鉴定, 本研究筛选多拷贝整合转化子是参照了 Schagger 等^[23]的斑点杂交方法, 由于本研究中工程菌 gp96-scFv 基因的密码子是毕赤酵母利用频率最高的密码子, 同时工程菌是通过斑点杂交筛选的拷贝数较高的转化子, 因此该毕赤酵母菌具有能高效分泌表达的能力。

毕赤酵母表达目的蛋白 gp96-scFv 抗体片段通过在 C 端连接 His 标签是为了方便纯化和鉴定, 采用 Anti-His-tag 亲和层析柱 (His-Trap HP) 对表达的 gp96-scFv 进行纯化的方法, 能保持蛋白的生物活性, 操作简单、经济, 而且可重复使用^[24]。通过 Anti-His-tag 亲和层析柱纯化目的蛋白的纯度能达到 95%, 在经过截留相对分子质量为 10 kDa 膜进行超滤浓缩, 浓缩后的目的蛋白纯度效果更好。本研究中的目的蛋白在电泳 SDS-PAGE 图中的条带大小位置与预期蛋白的分子量大小接近, 并通过 Western blotting 鉴定了目的蛋白。并对纯化的目的蛋白通过 Western blotting、Flow cytometry、Immunofluorescence 等分析方法鉴定其生物活性, 结果表明 gp96-scFv 抗体是具有较高亲和力

和特异性抗 gp96 蛋白的 scFv 小分子抗体, ELISA 试验分析发现表达的 gp96-scFv 抗体对 gp96 蛋白检测的灵敏度和亲和力高于市售的商业化抗体。

利用毕赤酵母可大量和相对廉价地表达 scFv 抗体片段, 用于 Western blotting、Immunofluorescence、ELISA 和 Flow cytometry 检测 gp96 蛋白。scFv 抗体片段的最大优点是能增强荧光激活细胞分类筛选 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 和 ELISA 检测等许多免疫化学应用中的灵敏性和效率^[25]; 其次, scFv 片段一般设计某种形式的“标签”(如组氨酸或 E-tag 标签) 可用于快速检测和纯化 gp96 蛋白分子; 此外, 相对于传统抗体, 由于 scFv 抗体分子小, 有较强穿透能力, 适合于肿瘤的检测和靶向治疗^[26-27]。因此 scFv 片段抗体能够广泛地应用于临床检测、治疗和免疫化学等领域^[28-30]。

REFERENCES

- [1] Wu S, Hong F, Gewirth D, et al. The molecular chaperone gp96/GRP94 interacts with Toll-like receptors and integrins via its C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem*, 2012, 287(9): 6735–6742.
- [2] Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, 1988, 22: 631–677.
- [3] Wang SF, Qiu LP, Liu GZ, et al. Heat shock protein gp96 enhances humoral and T cell responses, decreases Treg frequency and potentiates the anti-HBV activity in BALB/c and transgenic mice. *Vaccine*, 2011, 29: 6342–6351.
- [4] Xu YX, Wang SF, Zhang XJ, et al. Immune activity of heat shock protein gp96 and its application in active immunotherapy for tumor and infectious diseases. *Chin J Biotech*, 2012, 28(3): 261–266 (in Chinese).
- [5] Srivastava PK, Udono H, Blachere NE, et al. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics*, 1994, 39(2): 93–98.
- [6] Matsutake T, Sawamura T, Srivastava PK. High efficiency CD91-and LOX-1-mediated re-presentation of gp96-chaperoned peptides by MHC II molecules. *Cancer Immunity*, 2010, 10: 7.
- [7] Han JM, Kwon NH, Lee JY, et al. Identification of gp96 as a novel target for treatment of autoimmune disease in mice. *PLoS ONE*, 2010, 5(3): e9792.
- [8] Chavany C1, Mimnaugh E, Miller P, et al. p185erbB2 binds to GRP94 *in vivo*. Dissociation of the p185erbB2/GRP94 heterocomplex by benzoquinone ansamycins precedes depletion of p185erbB2. *J Biol Chem*, 1996, 271(9): 4974–4977.
- [9] Melendez K, Wallen ES, Edwards BS, et al. Heat shock protein 70 and glycoprotein 96 are differentially expressed on the surface of malignant and nonmalignant breast cells. *Cell Stress Chaperones*, 2006, 11(4): 334–342.
- [10] Ciocca DR, Cuello-Carrión FD, Natoli AL, et al. Absence of caveolin-1 alters heat shock protein expression in spontaneous mammary tumors driven by Her-2/neu expression. *Histochem Cell Biol*, 2012, 137(2): 187–194.
- [11] Li J, Richter K, Buchner J. Mixed Hsp90-cochaperone complexes are important for the progression of the reaction cycle. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18: 614–617.
- [12] Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol*, 2005, 174(5): 2453–2455.
- [13] Arndt KM, Müller KM, Plückthun A. Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry*, 1998, 37(37): 12918–12926.

- [14] Biocca S, Ruberti F, Tafani M, et al. Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria. *Biotechnology*, 1995, 13(10): 1110–1115.
- [15] Muller BH, Lafay F, Demangel C, et al. Phage-displayed and soluble mouse scFv fragments neutralizerabies virus. *J Virol Methods*, 1997, 67(2): 221–233.
- [16] Ando T, Yamashiro T, Takita-Sonoda Y, et al. Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus-neutralizing ability. *Microbiol Immunol*, 2005, 49(4): 311–322.
- [17] Guo Y, Kang W, Zhong Y, et al. Purification and characterization of human IL-10/Fc fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2012, 83(2): 152–156.
- [18] Li Y, Song HL, Li J, et al. Hansenula polymorpha expressed heat shock protein gp96 exerts potent T cell activation activity as an adjuvant. *J Biotechnol*, 2011, 151: 343–349.
- [19] Arnold-Schild D, Kleist C, Welschof M, et al. One-step single-chain Fv recombinant antibody-based purification of gp96 for vaccine development. *Cancer Res*, 2000, 66(15): 4175–4178.
- [20] Zhao B, Wang YZ, Wu B, et al. Placenta-derived gp96 as a multivalent prophylactic cancer vaccine. *Sci Rep*, 2013, 3: 1947.
- [21] Hartner FS, Glieder A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 39.
- [22] Shapiro RI, Wen D, Levesque M, et al. Expression of sonic hedgehog-Fc fusion protein in *Pichia pastoris*. Identification and control of post-translational, chemical, and proteolytic modifications. *Protein Expr Purif*, 2003, 29(2): 272–283.
- [23] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodiumdodecyl sulfate polyacrylamid gel electropores is for the separationof proteins in the range from1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 1987, 166(2): 368–379.
- [24] Hou X, Liu JE, Hu TM. Prokaryotic expression of functional PTEN in *Escherichia coli* and preparation of polyclonal antibody. *Chin J Biotech*, 2006, 22(1): 58–64 (in Chinese).
侯鑫, 刘俊娥, 扈廷茂. 抑癌蛋白 PTEN 的原核表达、抑癌活性研究和抗体制备. *生物工程学报*, 2006, 22(1): 58–64.
- [25] Wang T, Duan Y. Probing the stability-limiting regions of an antibody single-chain variable fragment: a molecular dynamics simulation study. *Protein Eng Des Sel*, 2011, 24(9): 649–657.
- [26] Liu D, Wang C, Li C, et al. Production and characterization of a humanized single-chain antibody against human integrin alphav beta3 protein. *J Biol Chem*, 2011, 286(27): 24500–24507.
- [27] Robert R, Wark KL. Engineered antibody approaches for Alzheimer's disease immunotherapy. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 526(2): 132–138.
- [28] Ma Q, De Marte L, Wang Y, et al. Carcinoembryonic antigen-immunoglobulinFc fusionprotein (CEA-Fc) for identification and activation of anti-CEA immunoglobulin-T-cell receptor-modified T cells, representative of anewclass of Ig fusion proteins. *Cancer Gene Ther*, 2004, 11(4): 297–306.
- [29] Wagner B, Robeson J, McCracken M, et al. Horse cytokine/IgG fusion proteins-mammalian expression of biologically active cytokines and a system to verify antibody specificity to equine cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 105(1/2): 1–14.
- [30] Liu J, Wei D, Qian F, et al. pPIC9-Fc: a vector system for the production of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris* as detection reagents *in vitro*. *J Biochem*, 2003, 134(6): 911–919.

(本文责编 郝丽芳)