

# HBscFv-IFN $\gamma$ 在毕赤酵母 X33 中的表达、纯化及鉴定

周世水, 王小宁

华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640

**摘要:** 为了有效治疗乙肝病而研究了将抗乙肝病毒表面抗原单链抗体(single-chain Fv against *HBV* surface antigen, HBscFv)与临床治疗乙肝常用的  $\gamma$ -干扰素( $\gamma$ -interferon, IFN $\gamma$ )连接的融合蛋白(HBscFv-IFN $\gamma$ )。采用重叠 PCR 法将基因 *hbscfv* 与 *ifn $\gamma$*  连接成 *hbscfv-ifn $\gamma$* , 再构建多拷贝重组质粒 pPICZaA/(*hbscfv-ifn $\gamma$* )<sub>1,2,4</sub>, 然后转入巴斯德毕赤酵母 X33。从中筛选出的工程菌株 X4 能够分泌表达目的蛋白 HBscFv-IFN $\gamma$ , 并用 SDS-PAGE、Western blotting 和 ELISA 方法进行了初步鉴定, 结果表明组成 HBscFv-IFN $\gamma$  的 HBscFv 和 IFN $\gamma$  仍具有生物学活性。用 14F7 亲和层析纯化 X4 的发酵液可获得纯度达 95%~98% 的 HBscFv-IFN $\gamma$ 。它可中和 *HBV* 转基因小鼠血清中 27.9% 的乙肝病毒表面抗原(*HBV* surface antigen, HbsAg), 这表明 HBscFv-IFN $\gamma$  上的抗体能够与生物体内的 *HBV* 有效结合。可见, HBscFv-IFN $\gamma$  将是一种防治乙肝病而有开发前景的靶向新药。

**关键词:** 重叠 PCR, HBscFv-IFN $\gamma$ , 巴斯德毕赤酵母 X33, 14F7 亲和层析

## Expression Purification and Verification of HBscFv-IFN $\gamma$ in *Pichia pastoris* x33

Shishui Zhou, and Xiaoning Wang

School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

**Abstract:** In order to effectively cure hepatitis B virus (*HBV*), we studied on fusion protein HBscFv-IFN $\gamma$ , which was connected with single-chain Fv against *HBV* surface antigen(HBscFv) and  $\gamma$ -interferon(IFN $\gamma$ ) of being used in clinic against *HBV*. Adopting overlap PCR, the *hbscfv* and the *ifn $\gamma$*  were connected into *hbscfv-ifn $\gamma$* . Then the pPICZaA/(*hbscfv-ifn $\gamma$* )<sub>1,2,4</sub> of multi-copy recombinant plasmid were constructed and transformed into *Pichia pastoris* x33. The engineering strain x4 was screened from transformed x33 and could secretively express HBscFv-IFN $\gamma$ . The preliminary verification indicates that HBscFv-IFN $\gamma$  has the bioactivity of HBscFv and IFN $\gamma$  by SDS-PAGE, Western blotting and ELISA. The supernatant of culturing X4 was purified by 14F7 affinity chromatography to HBscFv-IFN $\gamma$  with purity of 95%~98%. The HBscFv-IFN $\gamma$  is able to bind 27.9% *HBV* surface antigen (HbsAg) in the serum of *HBV* transgenic mice, which shows the antibody of HBscFv-IFN $\gamma$  has bioactivity *in vivo*. Therefore HBscFv-IFN $\gamma$  can shed light on the development of a new promising *HBV*-targeted drug.

**Keywords:** Overlap PCR, HBscFv-IFN $\gamma$ , *P. pastoris* x33, 14F7 affinity chromatography

目前乙型肝炎是一种严重危害人类健康的病毒性传染病, 世界卫生组织估计全球乙型肝炎病毒

Received: July 13, 2007; Accepted: November 14, 2007

Supported by: Guangdong Natural Science Foundation (No. B6060480).

Corresponding author: Shishui Zhou. Tel: +86-13022032953; E-mail: hgzhous@scut.edu.cn

广东省自然科学基金资助 (No. B6060480)。

(HBV)感染者上 10 亿人, 乙肝慢性患者上亿人, 仅在中国就多达 3000 万人<sup>[1,2]</sup>, 但在临床治疗上缺乏有效根治的药物。因此, 预防感染、控制病毒复制成为防治该病传染的主要方式, 其中能够与 HBV 结合并阻止其侵袭肝细胞的乙肝病毒表面抗原抗体或抗体片段成为用于紧急预防的被动免疫制品。近年来基因工程抗体的兴起, 出现了许多小分子抗体或抗体片段, 特别是由抗体重链可变区和轻链可变区连接成的单链抗体, 它即保留了抗体活性又可缩小到完整抗体的六分之一<sup>[3-6]</sup>。这就为融合新蛋白提供了足够空间而成为开发靶向药物的良好载体。因此, 本文将临床上治疗乙肝病常用的 IFN $\gamma$ <sup>[7,8]</sup>和已开发的 HBscFv<sup>[3]</sup>融合成治疗乙肝病的靶向新药-HBscFv-IFN $\gamma$ , 以达到提高治疗效果, 减少 IFN $\gamma$  用量和减轻病人负担的目的。

目前, 工程酵母具有分泌外源蛋白、表达量比大肠杆菌高, 以及初步糖基化等优势<sup>[9,10]</sup>。因此, 通过构建多拷贝体的工程酵母来实现 HBscFv-IFN $\gamma$  的高分泌表达, 可为进一步的药效研究和临床研究提供足够目的蛋白。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 质粒与菌株

含 *hbscfv* 质粒、含 *ifn $\gamma$*  质粒、HBV 转基因小鼠<sup>[11]</sup>, 空军广州医院肝病研究所提供; TOP10, 华美公司; 酵母表达质粒 pPICZaA、菌株 *P. pastoris x33*, Invitrogen 公司。

#### 1.1.2 试剂

基因操作各种酶、分子量标准, TaKaRa 公司; IFN $\gamma$  的 ELISA 检测试剂盒, Bender medsystems 公司; 质粒提取、琼脂胶回收试剂盒, 华瞬公司。

### 1.2 实验方法

常规分子生物学操作、感受态制备等见参考文献<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.1 PCR 引物的合成

上海基康生物公司合成 *hbscfv* 和 *ifn $\gamma$*  的两端引物: 5 端 H<sub>A</sub>、I<sub>A</sub> 与 3 端 H<sub>B</sub>、I<sub>B</sub>。

H<sub>A</sub> 5'-GACTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG;

H<sub>B</sub> 5'-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTCGATTGATTTCCACCTTGGT;

I<sub>A</sub> 5'-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAGGACCCGTACGTTAAAGAA;

I<sub>B</sub> 5'-CGTCTAGATACTGAGATCTTTTACGTTACC。在 H<sub>B</sub> 和 I<sub>A</sub> 中包含 *hbscfv* 与 *ifn $\gamma$*  连接序列: 5'-GGTGGAGGCGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG, 45 bp, 对应的 Linker 为 15 个氨基酸残基的 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>; 划线处为限制酶切位点。

#### 1.2.2 重叠 PCR 合成 *hbscfv-ifn $\gamma$*

分别用引物 H<sub>A</sub> 与 H<sub>B</sub>、I<sub>A</sub> 与 I<sub>B</sub> 从质粒中 PCR 扩增出 *hbscfv*、*ifn $\gamma$* , 再用 H<sub>A</sub> 与 I<sub>B</sub> 为引物, 重叠 PCR 法连接成 *hbscfv-ifn $\gamma$* 。

#### 1.2.3 pPICZaA/*hbscfv-ifn $\gamma$* 的构建与鉴定

*Xba* I 与 *Xho* I 双酶切 pPICZaA、*hbscfv-ifn $\gamma$* , 酶连成 pPICZaA/*hbscfv-ifn $\gamma$* , CaCl<sub>2</sub> 法转化 TOP10, 提取阳性菌落质粒, 双酶切电泳鉴定和测序确定。

#### 1.2.4 X33 的转化与筛选

按 Multi-copy *Pichia* Expression Kit 说明, 电穿孔法转化 *P. pastoris X33*, 在含 0.1~2 mg/mL Zeocin<sup>TM</sup> 的 YPD 平板上逐步筛选高抗性重组菌株。

#### 1.2.5 诱导表达

将工程酵母菌接种到 BMGY 培养基, 28 培养至 OD<sub>600</sub>=5~6, 菌体离心后重悬于 BMMY 培养基, 1%(V/V) 甲醇诱导培养, 3d 后浓缩上清液进行分析。

#### 1.2.6 表达产物的检测

SDS-PAGE、Western blotting、ELISA 等方法, 参考 Sambrook 进行<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.7 表达产物的 14F7 亲和层析纯化

(1) 发酵上清液的浓缩与脱盐: 将发酵上清液配制成 20%、30%、40%、50%、60% 和 70% 饱和度 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液, 4°C 放置 2 h 后 10 000 r/min 离心 10 min, 沉淀蛋白溶于 pH8.0 的 0.1 mol/L Tris-HCl, Sephadex G25 柱过滤脱盐。

(2) 鼠抗人 HBscFv 单克隆抗体 14F7 的制备: 将第二医科大学实验中心用杂交瘤法制备的抗 HBscFv 抗体的单克隆细胞株, 注入 BALB/C 小鼠腹腔进行扩增, 辛酸法纯化腹水获得鼠抗人 HBscFv 特异性抗体。

(3) 14F7 亲和层析柱的制备: 用 0.1 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 缓冲液透析 14F7。装 5mL 的 HiTrap<sup>TM</sup> NHS activated Sepharose HP 柱, 用 4°C 1 mmol/L HCl 溶液 10 mL 洗

脱异丙醇。加 5~10 mL 14F7 溶液, 25°C 吸附 30 min。用灭活缓冲液 A(0.1 mol/L NaAc, 0.5 mol/L NaCl, pH 4.5)、B(0.1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0)交替洗脱柱上的非特异性结合抗体和灭活未结合的活化基团。中和缓冲液洗柱至中性, 4°C 备用。

(4) 14F7 亲和层析纯化 HBscFv-IFN $\gamma$ : 先用 0.5 mL/min 的 C 液(0.15 mol/L NaCl 的 20 mmol/L pH 7.4 磷酸缓冲液)平衡 14F7 柱, 以 0.2 mL/min 上样 5~10 mL, 用 40 mL C 液洗脱杂蛋白, 用含 0.1 mol/L  $\alpha$ -甲基-D-甘露糖苷、1 mol/L NaCl 的 C 液 0.1 mL/min 洗脱样品, 再用增加 50%乙二醇的同种缓冲液继续洗脱, 并分部收集样品。

### 1.2.8 间接 ELISA 法测定 HBscFv

用 HBsAg 包被 96 孔板(50ng/孔), 分别加入纯化的 HBscFv、HBscFv-IFN $\gamma$  和 X4 上清液, 37°C 孵育 1 h, 洗后加 14F7 孵育 1 h; 洗后加结合辣根过氧化物(HRP)的羊抗鼠 IgG; 洗后加显色液 A、B 各一滴, 室温显色 15 min, 加一滴终止液, 酶标仪测定 OD<sub>450/630</sub> 值。

### 1.2.9 间接 ELISA 法测定 IFN $\gamma$

按照 IFN $\gamma$  的间接 ELISA 试剂盒方法检测纯化的 HBscFv-IFN $\gamma$  和 X4 上清液。

### 1.2.10 HBscFv-IFN $\gamma$ 在 HBV 转基因小鼠体内的中和实验

给 HBV 转基因小鼠尾静脉注射 200  $\mu$ L 样品, 30 min 后眼眶取血, 间接 ELISA 测定血清(1:2 稀释)中 HBsAg 浓度。用中和率表示注射后血清中 HBsAg 浓度的降低程度, 中和率=(注射前 HBsAg 浓度-注射后 HBsAg 浓度)/注射前 HBsAg 浓度 $\times$ 100%。

## 2 结果

### 2.1 *hbscfv*、*ifny*、*hbscfv-ifny* 的 PCR 扩增

按 1.2.2 方法扩增出 *hbscfv* 和 *ifny*, 1.5% 琼脂糖电泳结果如图 1, 得到与理论碱基数 803 bp 和 443 bp 一致的 DNA 带。用重叠 PCR 将 *hbscfv*、*ifny* 连接成 *hbscfv-ifny*, 电泳结果如图 2, 与理论碱基数 1225 bp 一致。

### 2.2 pPICZ $\alpha$ A/*hbscfv-ifny* 的构建与鉴定

按 1.2.3 法将 *hbscfv-ifny* 与 pPICZ $\alpha$ A 连接成 pPICZ $\alpha$ A/*hbscfv-ifny*, 转化 TOP10 后随机挑选阳性菌株, 提取质粒跑 0.8% 琼脂糖电泳, 如图 3。由于带 1 的碱基数比 pPICZ $\alpha$ A 多而初步判定菌株 1 可能含

有重组质粒。用 *Xba* 和 *Xho* 双酶切重组质粒、pPICZ $\alpha$ A 的电泳, 如图 4。可知: 双酶切重组质粒比双酶切 pPICZ $\alpha$ A 多出一条约 1200 bp 的带, 与 *hbscfv-ifny* 的碱基数一致, 可判定为重组质粒 pPICZ $\alpha$ A/*hbscfv-ifny*。

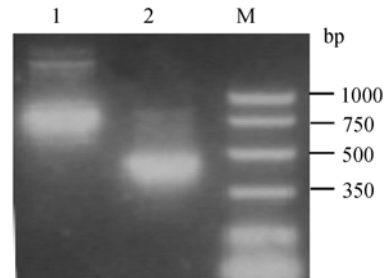


图 1 PCR 的琼脂糖电泳

Fig. 1 Agarose electrophoresis of PCR

1: *hbscfv*; 2: *ifny*; M: DNA marker

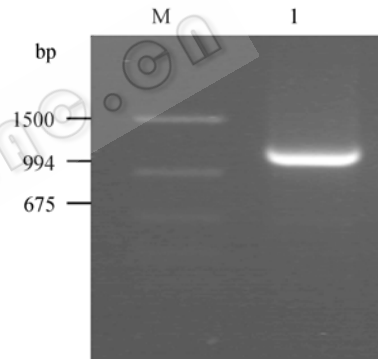


图 2 重叠 PCR 的琼脂糖电泳

Fig. 2 Agarose electrophoresis of overlap PCR

M: DNA marker; 1: *hbscfv-ifny*

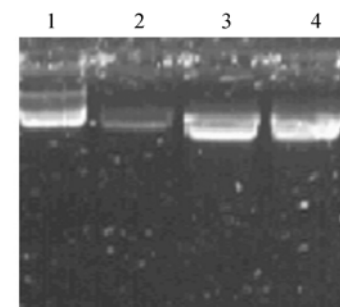


图 3 工程菌质粒的琼脂糖电泳

Fig. 3 Agarose electrophoresis of plasmid of engineering strain

3: pPICZ $\alpha$ A; 1,2,4: multi-copy plasmids

最后测定 *hbscfv-ifny* 的序列, 1215 bp, 仅在 42 bp 和 597 bp 处发生 T  $\rightarrow$  A 突变, 都由 CCT 突变成 CCA, 都编码脯氨酸而未影响蛋白质, 达到实验目的。其中黑体部分为 Linker 序列, 省略 *hbscfv*、*ifny* 后的序列: CTCTGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG...GGTGGAGGCGGTTTCAG

GCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG...  
...GGTAAACGTAAAAGATCTCAGTAG.

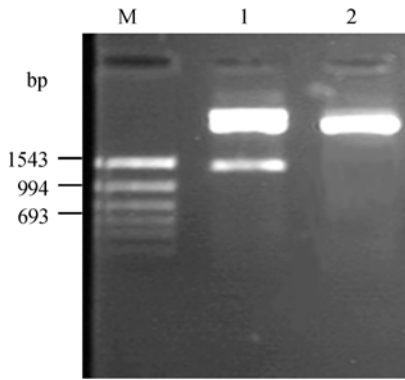


图 4 重组质粒的酶切验证结果

Fig. 4 Restriction analysis of recombinant plasmid

1: digestion of *pPICZaA/hbscfv-IFNγ2*; 2: digestion of *pPICZaA*, M: DNA marker

2.3 体外构建 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)n*

为获得多拷贝工程酵母来提高表达量,先在体外构建多拷贝重组质粒 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)n*,即质粒上携带目的基因完整表达系统的个数(*n*),包括α-信号肽及与目的蛋白分开的酶切点基因。*pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)2*的构建过程如图5。先在α-信号肽前625 bp处和 *hbscfv-IFNγ* 后2500 bp处 *APa* L酶切,补平后在2210 bp处 *Aa*T II酶切,得到一个拷贝。再在 *pPICZaA/hbscfv-IFNγ* 的2162 bp处 *Nco* I酶切,补平后在2210 bp处 *Aa*T II酶切出一个粘端单拷贝质粒。最后将两者连接成 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)2*, 转化 TOP10 备用。

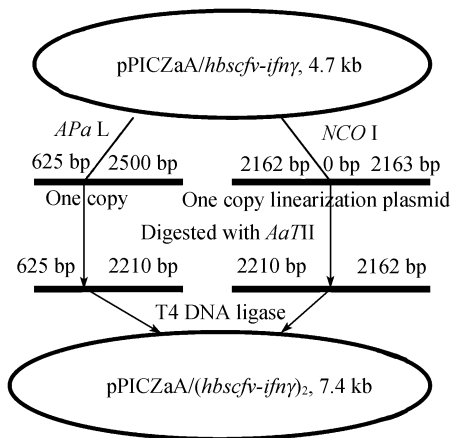


图 5 *pPICZaA/(HBscFv-IFNγ)2* 的构建

Fig. 5 Construction of *pPICZaA/(HBscFv-IFNγ)2*

筛选 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)2* 转化的 TOP10 阳性菌株,提取质粒的电泳结果如图6, 条带5碱基数比 *pPICZaA/hbscfv-IFNγ* 多 2000 bp, 约一个拷贝大小,

判断是 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)2*。按上述操作可得到 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)3,4*, 电泳结果如图7。

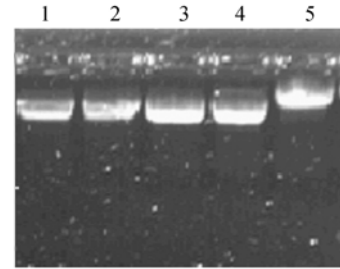


图 6 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)2* 的电泳

Fig. 6 Electrophoresis of *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)2*  
3: *pPICZaA/hbscfv-IFNγ*; 1,2,4,5: recombinant plasmids

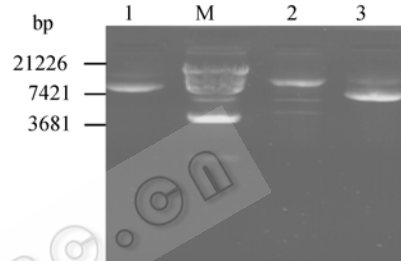


图 7 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)n* 的电泳

Fig. 7 Electrophoresis of *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)n*  
M: DNA marker; 3,2,1: *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)2,3,4*

2.4 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)n* 转化 X33 和筛选工程菌株

线性化 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)1,2,4*, 按 1.2.4 法分别转化 X33, 最后在 2mg/mL Zeocin™ 高抗性平板上各存活 10、7、3 个菌落。挑选 7 个大菌落,用 *H<sub>A</sub>* 和 *I<sub>B</sub>* 引物 PCR 扩增的电泳如图8。在 1200 bp 处有 5 条亮带,表明目的基因已转入酵母。其中 *pPICZaA/(hbscfv-IFNγ)2* 转化的工程菌株 X4 对应条带 4 最亮,说明 X4 含有更多拷贝,表明体外构建多拷贝载体可获得更高拷贝的工程菌株。

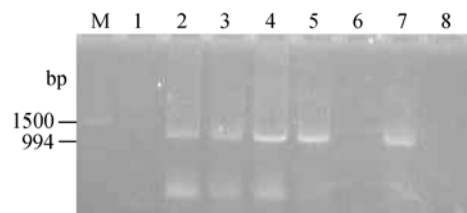


图 8 PCR 分析 X33 基因组中的 *hbscfv-IFNγ*

Fig. 8 PCR analysis of *hbscfv-IFNγ* in X33 genome  
M: DNA markers; 1: X33; 2-8: transformants of X33

2.5 工程酵母表达 HBscFv-IFNγ 的鉴定

选出 X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8 等 7 个大菌落的工程菌株进行 1%(V/V)甲醇诱导培养,取上

清进行 SDS-PAGE 电泳结果, 如图 9。

从图 9 可知: X4 表达的蛋白带最明显, 分子量约 42 kD, 与理论分子量 42 518.56 D 相近。对 SDS-PAGE 进行 Western blotting 分析的结果, 如图 10。

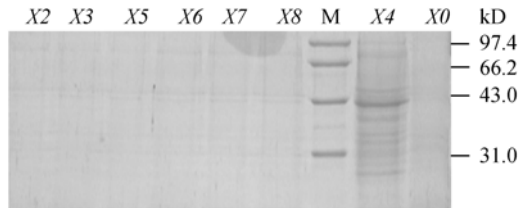


图 9 X33 转化菌株上清的 SDS-PAGE

Fig. 9 SDS-PAGE of the supernatant of X33 transformants

M: protein marker; X0: Clone of X33/pPICZaA; X2-X8: Clone of X33/pPICZaA/hbscfv-ifn $\gamma$

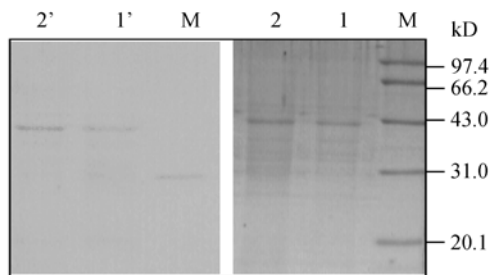


图 10 SDS-PAGE 及其对应的免疫印迹

Fig. 10 Result of Western blotting and SDS-PAGE

M: protein marker; 1,2: SDS-PAGE of supernatant of X4; 1', 2': Western blotting of supernatant of X4

从图 10 可知: X4 表达上清的 Western blotting 结果清晰, 表明融合蛋白中含有活性 HBscFv, 并与鼠抗人 HBscFv 单克隆抗体具有特异性结合活性。

## 2.6 HBscFv-IFN $\gamma$ 的纯化及分析

### 2.6.1 X4 表达上清的浓缩与脱盐

X4 表达上清分别用 20%~70%饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀, SDS-PAGE 结果如图 11。其中 60%沉淀 HBscFv-IFN $\gamma$  的效果最好。将沉淀溶解的浓缩样经 Sephadex G25 凝胶柱脱盐, 过程如图 12。峰 1、2 为洗脱杂蛋白, 峰 3 为洗脱 HBscFv-IFN $\gamma$ 。该法脱盐速度比透析快, 不会引起大分子物质变性, 并能去除一部分小分子杂质。

### 2.6.2 14F7 亲和层析纯化 HBscFv-IFN $\gamma$

含 HBscFv-IFN $\gamma$  的浓缩脱盐样品, 14F7 亲和层析柱纯化的过程如图 13。ELISA 测定洗脱样品, 取测定值最大的两管进行透析脱盐, SDS-PAGE 结果如图 14。用薄层扫描后数据分析得知: HBscFv-IFN $\gamma$  纯度达 95%~98%, 蛋白回收率达 75%~85%。可见 14F7 亲和层析能有效分离纯化上清液中的 HBscFv-IFN $\gamma$ 。

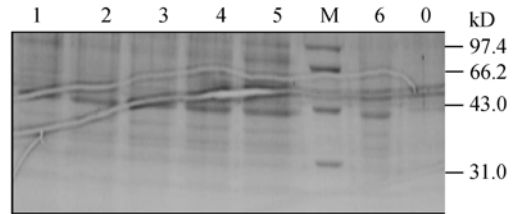


图 11 硫酸铵盐析 HBscFv-IFN $\gamma$  的 SDS-PAGE  
Fig. 11 SDS-PAGE of HBscFv-IFN $\gamma$  by salting-out lane with ammonium sulphate

M: protein marker; 0: supernatant of X4  
1~6: 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;

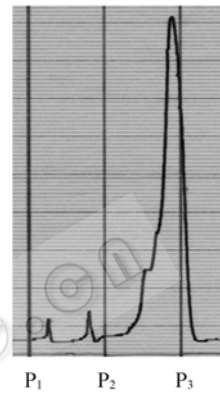


图 12 Sephadex G25 凝胶过滤脱盐过程

Fig. 12 Desalting process by Sephadex G25

P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>: elute peaks of other protein; P<sub>3</sub>: elute peaks of sample protein

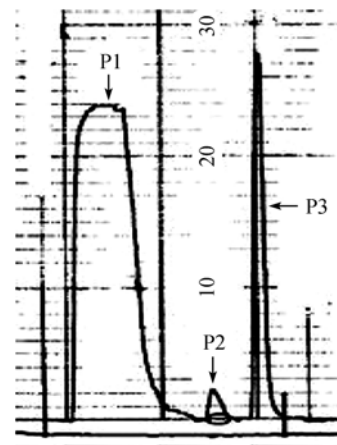


图 13 14F7 亲和层析 HBscFv-IFN $\gamma$  过程

Fig. 13 Purification process of HBscFv-IFN $\gamma$  by 14F7 affinity chromatography

P<sub>1</sub>: peaks of sample; P<sub>2</sub>: elute peaks of other protein; P<sub>3</sub>: elute peaks of sample protein

## 2.7 ELISA 测定结果

按 1.2.8、1.2.9 方法分别对 14F7 亲和层析纯化的 HBscFv-IFN $\gamma$  和 HBscFv、X4 表达上清进行间接 ELISA 测定, 表 1 是对 HBscFv 的测定结果, 表 2 是对 IFN $\gamma$  的测定结果。

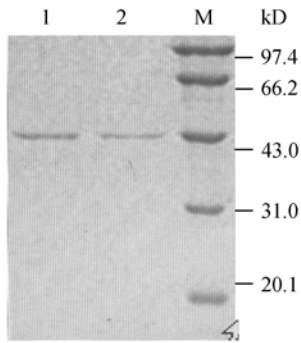


图 14 14F7 亲和层析 HBscFv-IFN $\gamma$  的 SDS-PAGE  
Fig. 14 SDS-PAGE of purified HBscFv-IFN $\gamma$  by 14F7 affinity chromatography  
M: Protein marker; 1,2: sample1 and sample 2

从表 1 的测定结果可知: 四个样品的 HBscFv 测定结果与其阴性对照比值都在 20 以上, 说明 X4 表达并纯化的 HBscFv-IFN $\gamma$  具有与 HBsAg 较强的抗体抗原

结合能力, 作为药物将能起到靶向作用。而纯化 HBscFv-IFN $\gamma$  上 HBscFv 的活性为 HBscFv 活性的 91%, 这说明 X4 表达并纯化 HBscFv-IFN $\gamma$  上的 HBscFv 生物学活性基本不受影响。从表 2 的测定结果可知: 三个样品的 IFN $\gamma$  测定结果与阴性对照的比值都大于 30, 纯化 HBscFv-IFN $\gamma$  上 IFN $\gamma$  的活性为阳性对照 IFN $\gamma$  活性的 74%, 这说明 HBscFv-IFN $\gamma$  上的 IFN $\gamma$  具有 IFN $\gamma$  生物学活性, 但活性受到一定程度的影响。

## 2.8 HBscFv-IFN $\gamma$ 在 HBV 转基因小鼠体内的中和实验

将 12 只约 40g 转基因小鼠分成 3 组, 按 1.2.10 方法分别注射 200  $\mu$ L 的 HBscFv-IFN $\gamma$ (1.4 mg/mL)、人血源 HBsAb(40 u/mL)和生理盐水进行对照实验, 并对小鼠血清中 HBV 的中和率进行计算, 结果如表 3。

表 1 对 HBscFv 活性的间接 ELISA 测定结果  
Table 1 Indirect ELISA determination of HBscFv activity

Determination sample	HBscFv	HBscFv-IFN $\gamma$	Supernatant of X4	HBsAb	Supernatant of X33
Value of $A_{540/630}$	1.585	1.435	1.28	2.135	0.0575
Value of sample/ supernatant of X33	27.55	24.95	22.25	37.15	1

1  $\mu$ g/pore HBsAb as positive control of determining HBscFv, cultivation supernatant of X33 as negative control

表 2 对 IFN $\gamma$  活性的间接 ELISA 测定结果  
Table 2 Indirect ELISA determination of IFN $\gamma$  activity

Determination sample	HBscFv-IFN $\gamma$	Supernatant of X4	IFN $\gamma$	Supernatant of X33
Value of $A_{540/630}$	2.59	2.15	3.52	0.063
Value of sample/ supernatant of X33	41.1	34.1	55.9	1

1  $\mu$ g/pore standard IFN $\gamma$  as positive control of determining IFN $\gamma$ , cultivation supernatant of x33 as negative control

表 3 注射不同抗体对 HBV 转基因小鼠血清中 HBsAg 的影响  
Table 3 The effect of injecting different antibodies on HBsAg in the serum of HBV transgenic mice

	Average weight of mice(g)	Concentration of HbsAg (before injection, mg/L)	Concentration of HbsAg (after injection, mg/L)	Rate of neutralization (%)
HBscFv-IFN $\gamma$	42.5	4.55	3.28	27.9
HBsAb	43.2	4.37	2.71	38
Saline	42.9	4.43	4.16	6.1

从表 3 可知: HBscFv-IFN $\gamma$  中的 HBscFv 能够与 HBV 转基因小鼠血清中的 HBsAg 有效结合, 注射 30 min 后的中和率为 27.9%, 达到人血源 HBsAb 的 73.4%, 是生理盐水的 460%, 这说明 HBscFv-IFN $\gamma$  在动物活体内表现出了对 HBV 较好的抗原抗体结合活性。

## 3 讨论

传统生物学认为, 蛋白质的序列决定了它的结构, 也就决定了它的功能<sup>[13]</sup>, 融合蛋白上的单体能

否保留其活性而相互不受干扰, 那么连接肽的设计应用就非常重要。根据国内外学者对连接肽的研究: 连接肽应在几个到十几个氨基酸, 要具有一定的柔性和伸展性, 以缓解两蛋白之间的相互影响<sup>[14,15]</sup>。本研究在构建 HBscFv-IFN $\gamma$  时, 采用 Huston 设计的 15 个氨基酸残基的连接肽(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, 构建成融合蛋白 HBscFv-IFN $\gamma$ , 并经实验验证 HBscFv-IFN $\gamma$  很好保持了 HBscFv 的抗原抗体结合活性, 其活性损失仅 9%, 而 IFN $\gamma$  的生物活性受到一定程度的影响, 其活

性损失有 26%。可见, 实验设计应用的连接肽基本有效, 达到了阻止 HBscFv-IFN $\gamma$  上 HBscFv 和 IFN $\gamma$  对相互活性影响的目的, 但是 HBscFv 和 IFN $\gamma$  的活性受影响程度不同, 这值得进一步探讨。

对于构建的 HBscFv-IFN $\gamma$  能否达到研究开发靶向药物的预期效果, ELISA、Western blotting 和 HBV 转基因小鼠的初步实验表明: HBscFv-IFN $\gamma$  能有效结合 HBV, 表现出了对抗原的特异性结合, 使 HBscFv-IFN $\gamma$  具有了作为靶向性的可能。虽然 HBscFv-IFN $\gamma$  上的 IFN $\gamma$  也表现出一定的生物学活性, 但是能否仍具有免疫调节功能和对 HBV 的抑制作用, 以及能否达到减少乙型肝炎发生的作用, 尚需要进一步的实验验证。所以, HBscFv-IFN $\gamma$  能否具有预期对 HBV 的靶向性和治疗效果, 还需要做进一步的动物实验和临床研究。

总之, 本研究通过构建多拷贝重组质粒 pPICZaA/(hbscfv-ifn $\gamma$ )<sub>1,2,3,4</sub>, 成功转化和筛选到多拷贝的工程酵母菌株 X4, 通过甲醇诱导培养可分泌表达 HBscFv-IFN $\gamma$ , 并具有优化发酵工艺提高 HBscFv-IFN $\gamma$  表达量的潜力。对 HBscFv-IFN $\gamma$  的初步生物学活性研究和分离纯化研究为 HBscFv-IFN $\gamma$  开发成新药奠定了基础, 这将对乙肝病的防治将起到积极地推动作用。

致谢: 感谢空军广州医院肝病研究所粟宽源、余宙耀、陈文吟、饶桂荣等人的支持和帮助。

## REFERENCES

- [1] Akuta N, Kumada H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the response to antiviral therapies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, **55**(2): 139-142.
- [2] McMahon BJ. Selecting appropriate management strategies for chronic hepatitis B: who to treat. *The American Journal of Gastroenterology*, 2006, **101**: 7.
- [3] Fang Z, Luo WX, Wang MQ, et al. Preparation and Identification of a Single-chain Antibody Fragment Against High Pathogenic H5N1 Avian Influenza Virus. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23**(2): 292-296.  
方钟, 罗文新, 王明桥, 等. 高致病性禽流感病毒 H5N1 中和抗体的单链抗体构建与活性鉴定. *生物工程学报*, 2007, **23**(2): 292-296.
- [4] Chen WY, Su KY, Rao GR, et al. Construction of a *Pastoris* expression vector for a fusion protein consisting of anti-HBsA scfv and interferon- $\alpha$ . *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2005, **26**(2): 95-98.
- [5] Asvadi P, Fletcher A, Raison RL. Expression and functional analysis of recombinant scFv and diabody fragments with specificity for humanRhD. *Journal of Molecular Recognition*, 2002, **15**(5): 321-330.
- [6] Sullivan DE, Mondelli MU, Curiel DT, et al. Construction and characterization of an intracellular single-chain human antibody to hepatitis C virus nonstructural 3 protein. *Journal of Hepatology*, 2002, **37**(5): 660-668.
- [7] Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World Journal of Gastroenterology*, 2001, **7**: 42-48.
- [8] Tornetta P. Displaced acetabular fractures: Indications for operative and nonoperative management. *J Am Acad Orthop Surg*, 2001, **9**: 18-28.
- [9] Freyre FM, Vazquez JE, Ayala M, et al. Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2000, **76**: 157-163.
- [10] Janowicz ZA, Melber K, Merckelbach A, et al. simultaneous expression of the S and L surface antigen of hepatitis B and formation of mixed particle in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast*, 1999, **7**: 431-433.
- [11] Xiong YL, Jia YZ, Wang HM, et al. Hepatitis B virus transgenic mice for the model of anti-hepatitis B virus drug study. *Chinese Journal of Hepatology*, 2001, **9**(1): 19-21.  
熊一力, 贾彦征, 王洪敏, 等. 乙型肝炎病毒转基因小鼠用于研究治疗乙型肝炎药物初探. *中华肝脏病杂志*, 2001, **9**(1): 19-21.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup>. Beijing: Science Press, 1999.
- [13] Zhang JH. Expression of single-chain bifunctional antibody fusion protein ScFv-TNF- $\alpha$  and its forecast with softwares. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2006, **27**(24): 2256-2258.  
张建华. ScFv 及重组 TNF- $\alpha$  双功能抗体融合蛋白的表达及其软件预测. *第四军医大学学报*, 2006, **27**(24): 2256-2258.
- [14] Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, et al. Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 5879-5883.
- [15] Zhang Y, Qu XM, Yang SL. Studies on the expression of the recombinant human GM-CSF/IL-3 fusion protein. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2000, **16**(3): 316-319.  
张毅, 屈贤铭, 杨胜利. 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子/白细胞介素-3 融合蛋白的表达研究. *生物工程学报*, 2000, **16**(3): 316-319.