

应用 RAD 多肽展示体系制备抗 hCG 类抗体分子

刘梦雯¹, 王美¹, 王琼¹, 辛化伟^{1,2}

1 武汉科技大学 生命科学与健康学院, 湖北 武汉 430065

2 临沂大学 药学院, 山东 临沂 276000

刘梦雯, 王美, 王琼, 等. 应用 RAD 多肽展示体系制备抗 hCG 类抗体分子. 生物工程学报, 2019, 35(5): 871–879.

Liu MW, Wang M, Wang Q, et al. Preparation of anti-hCG antibody-like molecule by using a RAD peptide display system. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 871–879.

摘要: 应用基于激烈火球菌 *Pyrococcus furiosus* 重组酶 RadA 的 ATP 酶结构域 (RAD 骨架) 的多肽展示体系, 通过嫁接人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 结合多肽, 制备抗 hCG 类抗体分子。通过合成 hCG 结合多肽插入 RAD 多肽展示位点的类抗体基因, 成功构建了 pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP 原核表达载体, 在大肠杆菌中诱导蛋白表达, 分离、纯化获得类抗体蛋白, 通过亲和和吸附-GFP 荧光检测方法测定类抗体对 hCG 的结合活性, 并应用单域抗体通用骨架制备的嫁接抗体比较活性差异。结果显示, RAD 类抗体分子对 hCG 分子具有较高的亲和性和特异性, 显著优于单域嫁接抗体, 并与商业单克隆抗体的活性相当; 同时, 利用 RAD 多肽展示骨架制备的抗 hCG 类抗体, 具有较高的生化稳定性, 是一种具有应用潜力的抗体替代分子。

关键词: hCG, 类抗体分子, RAD 多肽展示, 表达和纯化

Preparation of anti-hCG antibody-like molecule by using a RAD peptide display system

Mengwen Liu¹, Mei Wang¹, Qiong Wang¹, and Huawei Xin^{1,2}

1 College of Life Science and Health, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei, China

2 School of Pharmacy, Linyi University, Linyi 276000, Shandong, China

Abstract: By using an RAD peptide display system derived from the ATPase domain of recombinase RadA of *Pyrococcus furiosus*, an anti-hCG antibody-like molecule was prepared by grafting an hCG-binding peptide to the RAD scaffold. After linking to sfGFP gene, a gene of hCG peptide-grafted RAD was synthesized and cloned into a bacterial expression vector (pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP). The vector was transformed into *Escherichia coli*, and expression of the fusion protein was induced. After isolation and purification of the fusion protein, its binding affinity and specificity to hCG were determined by using a process of immunoabsorption followed by GFP fluorescence measurement. A comparison of hCG-binding activity with

Received: November 18, 2018; **Accepted:** January 14, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31371385).

Corresponding authors: Huawei Xin. Tel: +86-27-68893368; E-mail: xinhuawei@wust.edu.cn

Qiong Wang. Tel: +86-27-68893368; E-mail: wangqiong0911016@wust.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31371385) 资助。

网络出版时间: 2019-04-16

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190415.0957.002.html>

a similarly grafted single-domain antibody based on a universal scaffold was performed. The measurement of hCG-binding affinity and specificity revealed that the grafted RAD has an optimally high binding affinity and specificity to hCG, which are better than the grafted single-domain antibody. Moreover, the affinity and specificity of grafted RAD molecule are comparable to those of a commercial monoclonal antibody. In addition, the hCG-binding peptide-grafted RAD molecule has a relatively high biochemical stability, making it a good substitute for antibody with potential application.

Keywords: hCG, antibody-like molecule, RAD peptide display, expression and purification

人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 是人正常妊娠及某些恶性肿瘤发生中产生的多肽类激素^[1-3]。hCG 由胎盘合体滋养层细胞分泌, 由 α 和 β 两个亚基组成, 以二硫键将其连结在一起形成二聚体结构^[4-5]。hCG 的 α 亚基与 LH、TSH 及 FSH 的 α 亚基基本相似, 而 β 亚基的结构却不一样, hCG 的生物学活性和免疫学特性主要取决于 β 亚基^[6-7]。hCG- β 也是正常妊娠及相关失调、妊娠滋养细胞疾病的标识分子。另外, 近期研究发现, 在其他非滋养细胞来源的恶性肿瘤如卵巢癌、膀胱癌、结肠癌中, 也显示 hCG- β 的异常表达。因此, 利用特异性的 hCG 结合分子检验血和尿中的 hCG 水平, 在检测极早期妊娠及恶性肿瘤过程中起着至关重要的作用。

当前包括 hCG- β 在内的疾病标识分子的临床检验一直沿用基于单克隆抗体的免疫检测技术^[8-9]。近年来, 随着体外蛋白质 (及非蛋白质) 识别分子技术的发展, 应用非抗体蛋白骨架、通过多肽嫁接或置换筛选技术获得特定蛋白的亲和方法逐渐受到人们的重视, 并开始用于实验室医学分子检验的尝试。但是, 由于大多数蛋白骨架的可变位点有限, 可容许大片段多肽嫁接的蛋白骨架较少, 导致多肽嫁接后不能有效地结合目标分子。近期有研究报道, 一种嗜热古菌 *Pyrococcus furiosus* 的重组酶 RadA 分子的球形 ATP 酶结构域的蛋白质骨架 (简称 RAD 骨架), 可接纳多肽、完整结构域甚至全长蛋白的插入、嫁接, 具有其他蛋白质骨架所没有的高度灵活性, 并可在细菌中表达和快速生产, 引起了研究者的注意^[10]。这种蛋白质骨架还具有很高的

热稳定性, 不含半胱氨酸残基, 能容忍表面突变和缺失^[11-12]。利用 RAD 骨架建立的多肽或蛋白展示体系 (RAD display) 制备类抗体分子, 有望用于医学标识分子等的检测^[13-14]。因此, 本研究以 hCG 为检验分子, 尝试制备其 RAD 嫁接类抗体分子, 并与单域嫁接抗体及商业单克隆抗体进行抗原结合活性比较, 检验其应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

pET30a(+) 质粒、pET30a(+)-sfGFP 质粒由本实验室构建; 重组抗 hCG- α 抗体、重组抗 hCG- β 抗体-sfGFP 融合蛋白 (cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP), pCDNA3-hCG- α 、LHB (促黄体生成素 β 亚基) 表达质粒, hCG- α +LHB 转染 293T 细胞分泌上清, 由本实验室制备; 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞均由本实验室制备; BCA 蛋白含量检测试剂盒购于碧云天公司; JEG-3 细胞购于武汉普诺赛公司; hCG Antigen 购自上海领潮公司; Anti-hCG- β /FITC 购自北京博奥森公司; 各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 Thermo Scientific 公司; Ni-NTA 亲和柱购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 基因合成由杭州金唯智公司完成; DNA 测序由武汉擎科生物技术有限公司完成。

1.2 原核表达载体的构建

全基因合成 *P. furiosus* 重组酶 RadA 的 ATPase 结构域 (RAD 展示骨架) 基因, 在其上、下游分别引入 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切位点, 将其

用 *Bgl* II 和 *Sal* I 进行双酶切, pET30a-sfGFP 质粒用 *Bam*HI 和 *Sal* I 进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离, 然后用 T4 DNA 连接酶将胶回收后的 RAD 基因片段和 pET30a-sfGFP 酶切 DNA 产物于 22 °C 连接 2 h, 转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 挑取单菌落培养后提取质粒进行 *Eco*R V 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 并将双酶切鉴定正确的阳性克隆送至武汉擎科生物技术有限公司测序。质粒图谱如图 1A 所示。

全基因合成 hCG 结合多肽插入 RAD 骨架 L2 环的嫁接 RAD (后简称 RAD/hCGBP) 基因序列, 同样在其上、下游分别引入 *Bgl* II 和 *Sal* I 酶切位点, 克隆到 pET30a-sfGFP 载体中, 转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 挑取单菌落培养后提取质粒进行 *Eco*R V 单酶切鉴定, 并将酶切鉴定正确的阳性克隆送至武汉擎科生物技术有限公司测序。质粒图谱如图 1B 所示。

1.3 类抗体蛋白的表达

将质粒 pET30a-RAD-sfGFP 和 pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP 分别转化大肠杆菌菌株 BL21(DE3)。分别挑取单克隆菌落摇种子, 按 1 : 60 (V/V) 的接种量转接。当 OD 值为 0.6 时, 取部分未诱导菌液

作为阴性对照。剩余部分加入 0.5 mmol/L IPTG 于 18 °C 低温诱导 12 h, 离心收集菌体沉淀, 取一部分菌体沉淀用于检测全菌蛋白; 另一部分加入 9 倍体积的 Buffer H 缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mol/L NaCl, 10% 甘油, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 30 mmol/L 咪唑), 1 倍体积 10 mg/mL 溶菌酶, 0.1 倍体积 0.1 mol/L PMSF, 混匀, 冰浴超声破碎 20 min, 离心分离上清和沉淀, 用 12% SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测菌体全蛋白与超声破碎后上清和沉淀中的蛋白。

1.4 类抗体蛋白的纯化与 SDS-PAGE 鉴定

在适宜的诱导条件下 (18 °C, 120 r/min) 诱导类抗体蛋白的表达。收集诱导后菌体、取超声破碎菌体后的裂解液上清, 按照产品说明书, 与 Ni-NTA 亲和柱 (柱子平衡缓冲液: 上述 Buffer H) 充分结合, 以含 0.075 mol/L 咪唑的 Buffer H 洗脱杂蛋白, 接着使用新鲜配制 0.3 mol/L 咪唑的 H-Buffer 洗脱目的蛋白, 分别收集亲和柱穿透峰和洗脱峰, 用 12% SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色检测收集的蛋白。收集洗脱峰蛋白, 透析去除咪唑。类抗体蛋白 RAD-sfGFP 和 RAD/hCGBP-sfGFP 的理论分子量分别为 57 kDa 和 58 kDa。

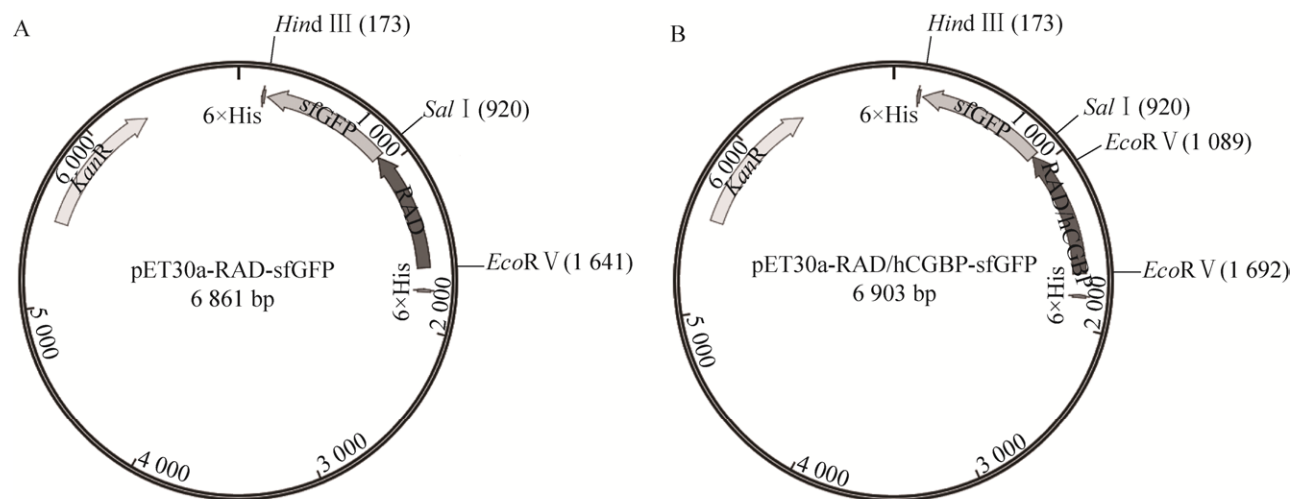


图 1 pET30a-RAD-sfGFP 和 pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP 质粒图谱

Fig. 1 Plasmid maps of pET30a-RAD-sfGFP and pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP. (A) Plasmid map of pET30a-RAD-sfGFP. (B) Plasmid map of pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP.

1.5 类抗体蛋白浓度及抗原结合活性的测定

按照 BCA 蛋白含量检测试剂盒说明书,测定样品的蛋白浓度。

类抗体蛋白的抗原结合活性采用亲和吸附-GFP 荧光检测方法进行测定。用包被缓冲液(碳酸盐缓冲液 pH 9.6, 含 5%新生牛血清)将 anti-hCG- α 稀释至 1 μ g/mL, 在每个 96 孔聚苯乙烯发光板的反应孔中加 0.1 mL 上述抗体稀释液, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。第二天, 弃去孔内溶液, 用 PBST 洗涤缓冲液瞬时洗 3 次, 3 min/次, 第 3 次要弃净孔中溶液 (此过程为洗涤, 下同)。分别加一定梯度稀释 JEG-3 细胞 (人绒毛膜癌细胞: 该细胞是从 Erwin-Turner 肿瘤的 Woods 系分离建立的 6 个克隆中的一个, 可产生 hCG) 分泌上清或 hCG Antigen 0.1 mL 于上述已包被孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤, 同时做空白孔对照。然后于各反应孔中, 分别加入 0.1 mL 同浓度的 RAD-sfGFP、RAD/hCGBP-sfGFP、cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP (应用单域抗体通用骨架 cAbBCII10, 以 hCG 结合多肽取代互补决定区 CDR1 或 CDR3, 制备的具有一定抗原结合活性的抗 hCG 单域抗体分子)、Anti-hCG- β /FITC, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗涤。于各反应孔中加入 0.2 mL 的 PBS, 于酶标仪上检测荧光强度, 激发光和荧光检测波长分别为 488 nm 和 525 nm。

1.6 类抗体蛋白滴度测定

按照同上包被步骤进行包被, 加一定相同浓度 JEG-3 细胞分泌上清 0.1 mL 于已包被的反应孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤, 同时做空白孔对照。于各反应孔中, 分别加入 0.1 mL 一定稀释浓度的 RAD/hCGBP-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP、Anti-hCG- β /FITC, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗涤。于各孔中加入 0.2 mL 的 PBS, 检测荧光强度。

1.7 类抗体蛋白的抗原结合特异性测定

按包被步骤进行包被, 分别加一定相同浓度

JEG-3 细胞分泌上清或 hCG- α +LHB 转染 293T 细胞分泌上清 0.1 mL 于上述已包被反应孔中, 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后洗涤, 同时留空白孔对照。于各反应孔中分别加入 0.1 mL 相同浓度的 RAD/hCGBP-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP、Anti-hCG- β /FITC, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 洗涤。于各孔中加入 0.2 mL 的 PBS, 检测荧光强度。

1.8 类抗体蛋白的生化稳定性测定

分别将 RAD/hCGBP-sfGFP 和 cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 与足量的 DP-GFP (一种 GFP 结合蛋白, 本实验室制备) 混匀, 保证 GFP 标签的稳定性。取等份的上述混合物及 Anti-hCG- β /FITC 抗体分别置于 4 $^{\circ}$ C、16 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C、80 $^{\circ}$ C 的水浴锅中水浴 30 min, 取出, 恢复至室温。各取 100 μ L 上清于聚苯乙烯板中, 检测其荧光强度, 分析类抗体蛋白的热稳定性。

取等份上述混合物及 Anti-hCG- β /FITC 抗体, 用伯瑞坦-罗宾森 (Britton-Robinson) 广泛缓冲液 (H_3PO_4 -HAc- H_3BO_3) 调 pH 至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 于 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min, 取出, 待恢复至室温。各取 100 μ L 于聚苯乙烯板中, 检测其荧光强度, 分析类抗体蛋白的酸碱稳定性。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建

重组子 pET30a-RAD-sfGFP 经 *EcoR* V 和 *Sal* I 双酶切鉴定后, 结果所得 2 条目的带大小约为 721 bp 和 5.4 kb, pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP 重组子经 *EcoR* V 单酶切鉴定后得到 2 条目的带大小约为 603 bp 和 5.5 kb, 结果符合预期 (图 2)。酶切正确的重组质粒经测序结果证实, 连入载体的目的序列与预期序列一致, 密码子阅读框准确无误, 说明两个重组质粒构建正确。

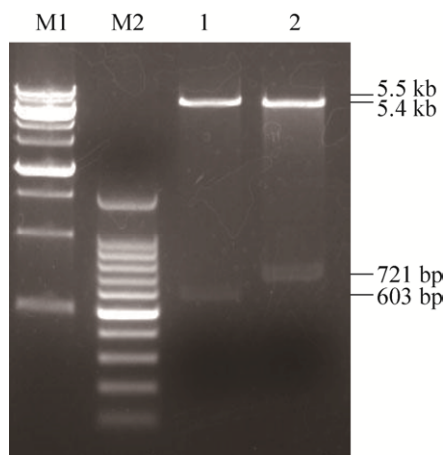


图 2 重组质粒 pET30a-RAD-sfGFP 和 pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP 的构建

Fig. 2 Construction of pET30a-RAD-sfGFP and pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP recombinant plasmid. M1: 1 kb DNA marker; M2: 100 bp DNA marker; 1: digestion of pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP with *EcoRV*; 2: digestion of pET30a-RAD-sfGFP with *EcoRV* and *SalI*.

2.2 类抗体蛋白的表达

将 pET30a-RAD-sfGFP 和 pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 收集细菌进行 SDS-PAGE 分析, 考马斯亮蓝染色结果 (图 3) 显示, IPTG 诱导后的 *E. coli* BL21(DE3)/pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP 和 *E. coli* BL21(DE3)/pET30a-RAD-sfGFP 可见明显的蛋白诱导条带。这两种蛋白在上清与沉淀中均有显示, 在上清中较多, 说明可通过纯化可溶性蛋白的方式纯化目的蛋白。

2.3 Ni-NTA 亲和层析柱纯化类抗体蛋白

将两个重组质粒 pET30a-RAD-sfGFP 和 pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP 转化大肠杆菌诱导表达超声后收集的上清, 经 Ni-NTA 亲和柱纯化后, 用不同浓度的咪唑洗脱液进行洗脱, 获得较高纯度的类抗体蛋白, SDS-PAGE 检测分析纯化结果 (图 4) 表明, 两个转化菌株的菌体裂解液上清样品分别在约 57 kDa 和 58 kDa 位置有特异性蛋白

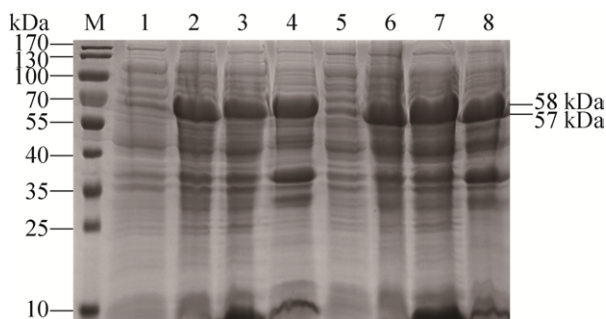


图 3 类抗体蛋白 RAD/hCGBP-sfGFP 和 RAD-sfGFP 的表达

Fig. 3 Expression of RAD/hCGBP-sfGFP and RAD-sfGFP fusion proteins. M: marker (10–170 kDa); 1: *E. coli* BL21(DE3)/pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP, uninduced; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP, IPTG induced; 3: pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP supernatant, IPTG induced; 4: pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP precipitate, IPTG induced; 5: *E. coli* BL21(DE3)/pET30a-RAD-sfGFP, uninduced; 6: *E. coli* BL21(DE3)/pET30a-RAD-sfGFP, IPTG induced; 7: pET30a-RAD-sfGFP supernatant, IPTG induced; 8: pET30a-RAD-sfGFP precipitate, IPTG induced.

条带, 与类抗体蛋白理论分子量大小相近, 表明成功纯化得到目的蛋白。

2.4 类抗体蛋白的浓度与抗原结合活性分析

通过 BCA 蛋白测定法可以得出 RAD-sfGFP 和 RAD/hCGBP-sfGFP 两个类抗体蛋白的浓度分别为 1.97 mg/mL、2.95 mg/mL。以 anti-hCG- α 蛋白作为捕获抗体, 以 JEG-3 细胞分泌含有 hCG 抗原的上清作为抗原, 分别以 RAD-sfGFP、RAD/hCGBP-sfGFP、cAbBCII10-CDR1/hCGBP1-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 和 Anti-hCG- β /FITC 为探测抗体测定与 hCG 的结合活性, 结果如图 5 所示。除空白对照 RAD-sfGFP 外, 其他 4 种蛋白对 hCG 均有一定结合活性, 其中 RAD 嫁接类抗体 (RAD/hCGBP) 的抗原结合活性高于 CDR3 嫁接抗体 (CDR3/hCGBP3) 和 CDR1 嫁接抗体 (CDR1/hCGBP1), 且具有不低于 Anti-hCG- β /FITC 抗体的结合活性。

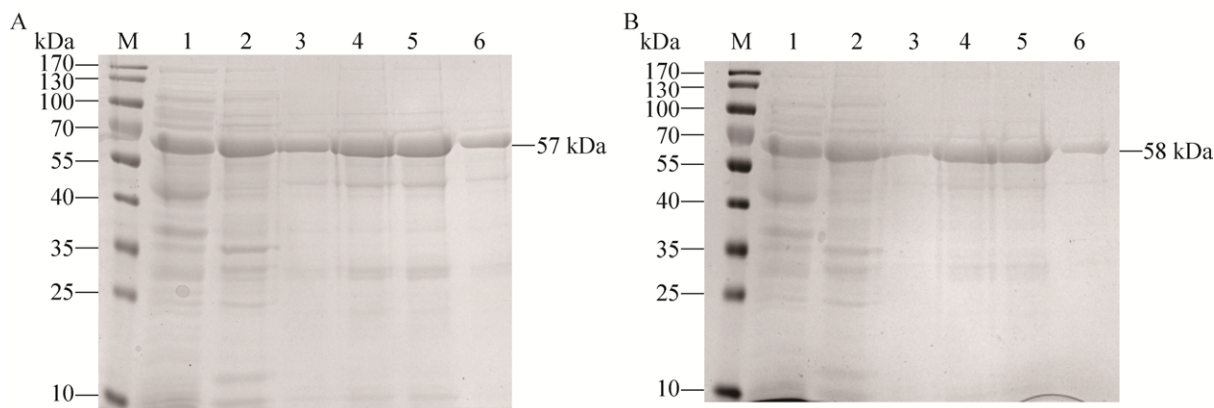


图4 类抗体蛋白 RAD-sfGFP 和 RAD/hCGBP-sfGFP 的纯化

Fig. 4 Purification of RAD-sfGFP and RAD/hCGBP-sfGFP fusion proteins. (A) Purification of RAD-sfGFP fusion proteins. M: protein Mw marker (10–170 kDa); 1: *E. coli* BL21 (DE3)/pET30a-RAD-sfGFP supernatant; 2: flow-through of Ni-NTA affinity chromatography resin; 3–6: elutions of Ni-NTA affinity chromatography resin. (B) Purification of RAD/hCGBP-sfGFP fusion proteins. M: protein Mw marker (10–170 kDa); 1: *E. coli* BL21 (DE3)/pET30a-RAD/hCGBP-sfGFP supernatant; 2: flow-through of Ni-NTA affinity chromatography resin; 3–6: elutions of Ni-NTA affinity chromatography resin.

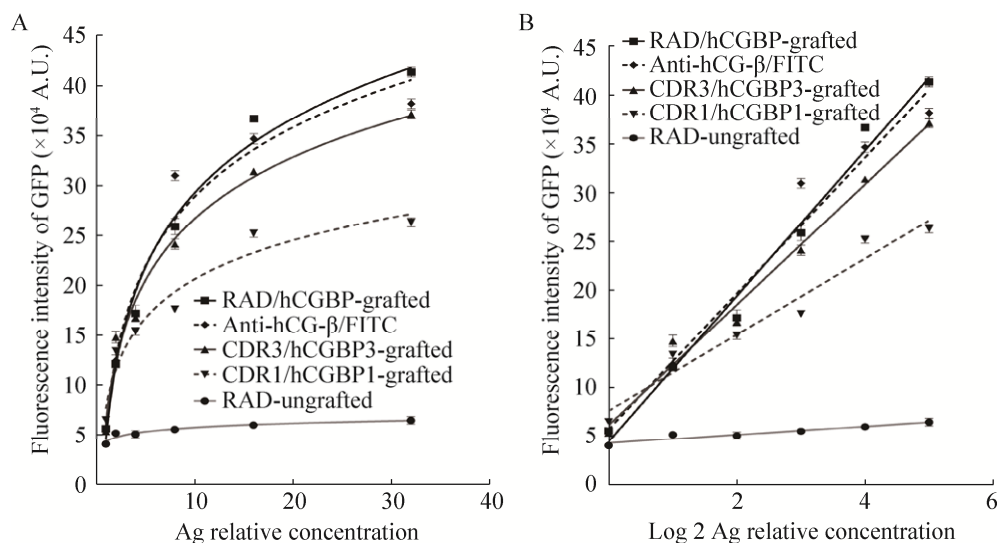


图5 类抗体蛋白 RAD/hCGBP-sfGFP 结合 hCG 抗原 (JEG-3 分泌上清) 的活性检测

Fig. 5 Determination of hCG-binding affinity of RAD/hCGBP-sfGFP fusion proteins (hCG antigen from the supernatant of JEG-3 cells). (A) hCG-binding curve against Ag (antigen) relative concentration. (B) hCG-binding curve against log 2 of Ag (antigen) relative concentration.

以 anti-hCG- α 蛋白作为捕获抗体, 以商业化的 hCG Antigen 作为抗原, 分别以上述 5 个蛋白为探测抗体测定与 hCG 的结合活性, 结果如图 6 所示。与单域抗体通用骨架嫁接的抗体相比, RAD 嫁接类抗体 (RAD/hCGBP) 对不同来源的 hCG 抗原均展现了较高的结合活性。

2.5 类抗体蛋白的滴度分析

分别以梯度稀释的 RAD/hCGBP-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 和 Anti-hCG- β /FITC 为探测抗体测定与 hCG 抗原 (JEG-3 细胞分泌上清) 的结合活性, 结果如图 7 所示, 3 种分子结合 hCG 抗原的滴度测定曲线相似, 滴度均为 1:20。

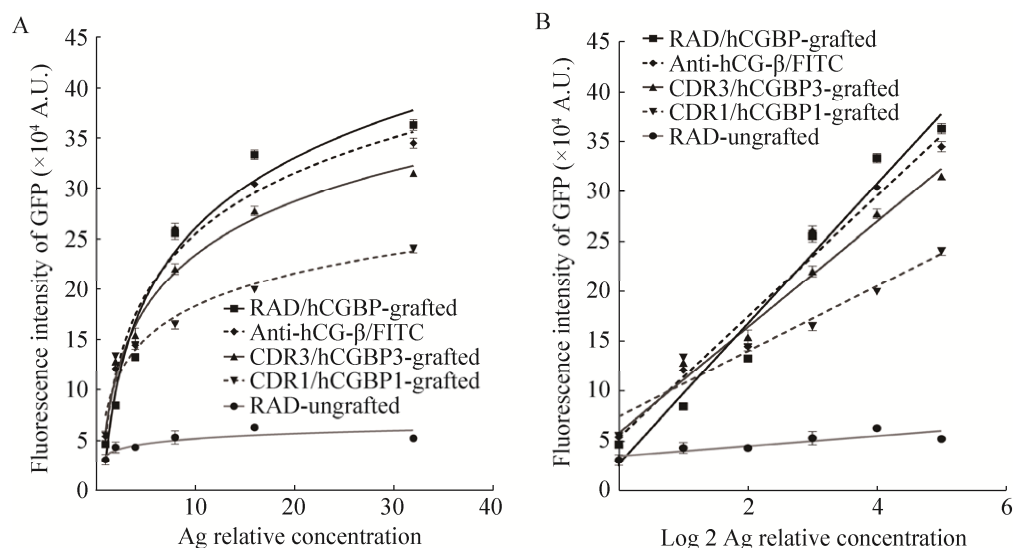


图 6 类抗体蛋白 RAD/hCGBP-sfGFP 结合 hCG 抗原 (hCG Antigen) 的活性检测

Fig. 6 Determination of hCG-binding affinity of RAD/hCGBP-sfGFP fusion proteins (hCG antigen from the hCG Antigen). (A) hCG-binding curve against Ag (antigen) relative concentration. (B) hCG-binding curve against log2 of Ag (antigen) relative concentration.

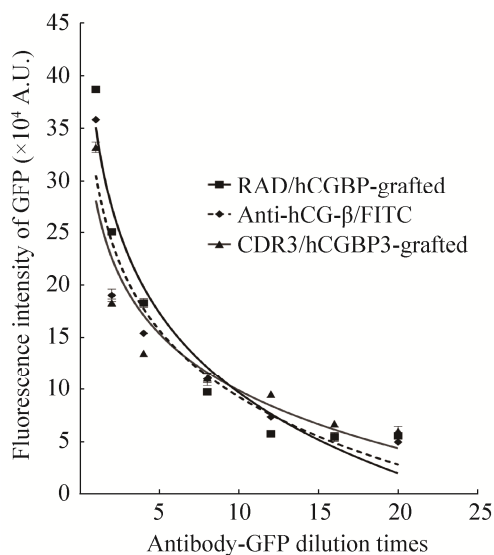


图 7 类抗体蛋白 RAD/hCGBP-sfGFP 的滴度分析

Fig. 7 Analysis on titer of RAD/hCGBP-sfGFP fusion proteins.

2.6 类抗体蛋白的抗原结合特异性分析

以 JEG-3 培养细胞上清液或 hCG α +LHB 转染的 293T 细胞上清液作为抗原, 以 RAD/hCGBP-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 或 Anti-hCG- β /FITC 为探测抗体, 分别测定对两种相似抗原 (hCG 和 LH) 的结合特异性, 结果如图 8 所示,

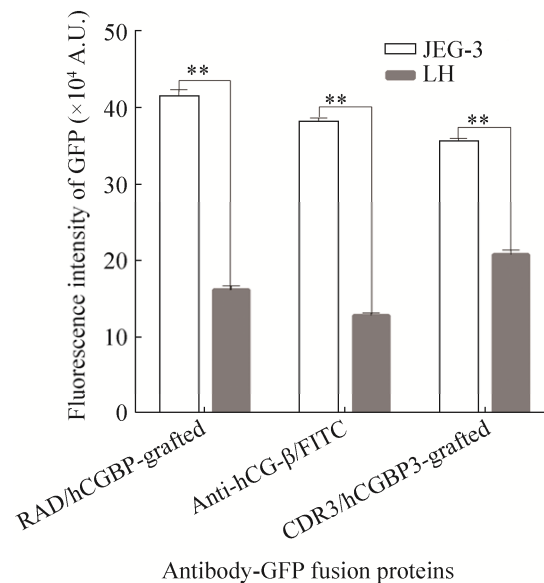


图 8 类抗体蛋白 RAD/hCGBP-sfGFP 的特异性分析 (** $P < 0.01$)

Fig. 8 Analysis of specificity of RAD/hCGBP-sfGFP fusion proteins (** $P < 0.01$).

3 种蛋白对 hCG 的结合活性均高于对 LH 的结合活性, 差异显著性相关 ($P < 0.01$), 并对 LH 存在一定的交叉结合活性; 且 RAD/hCGBP-sfGFP 对 hCG 的结合特异性相对较高。

2.7 类抗体蛋白的稳定性

通过图 9A 可以看出, 温度对 3 种蛋白 RAD/hCGBP-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 和 Anti-hCG- β /FITC 的稳定性均有很大影响。在 37–50 °C 内其稳定性较好, 在 70 °C 时几乎完全丧失稳定性。同样, 通过图 9B 可以看出, pH 对 3 种蛋白 RAD/hCGBP-sfGFP、cAbBCII10-CDR3/hCGBP3-sfGFP 和 Anti-hCG- β /FITC 的稳定性也有很大影响。稳定性在 pH<7 的范围内随 pH 的降低而降低, 在 pH 为 4 时几乎丧失稳定性, 在 pH>8 的范围内稳定性开始下降。

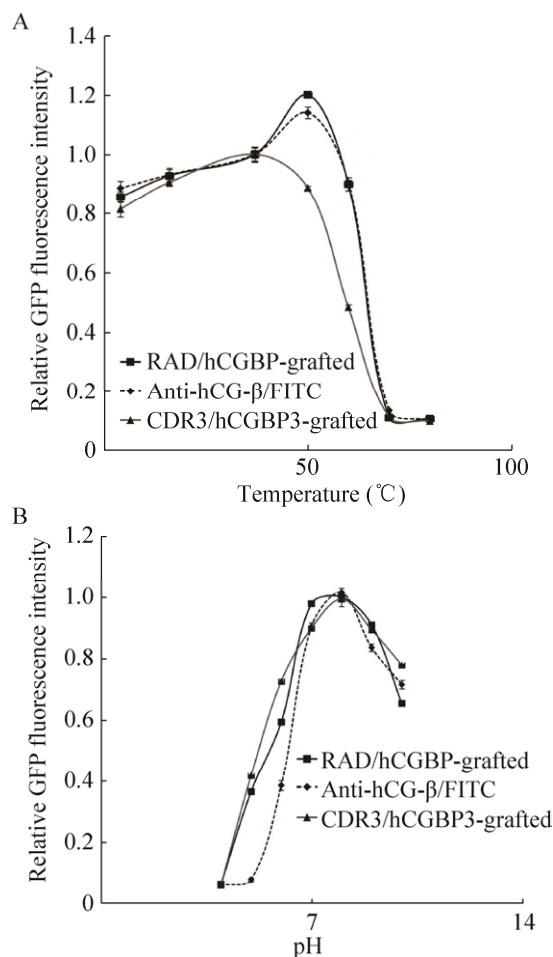


图 9 类抗体蛋白 RAD/hCGBP-sfGFP 的稳定性分析
Fig. 9 Analysis of stability of RAD/hCGBP-sfGFP fusion proteins. (A) Stability of antibody protein at different temperature conditions. (B) Stability of antibody protein at different pH conditions.

3 讨论

应用抗体/类抗体蛋白骨架制备新嫁接抗体/类抗体的技术是一种改善结合多肽的生化性能的重要手段^[15]。理想的类抗体蛋白骨架具有分子量小、高水溶性和热稳定性等生化特征, 其可以允许插入多肽、甚至更大的结构性肽段。在本项工作中, 我们以来源于嗜热古菌 *P. furiosus* 的 RAD 蛋白骨架制备 hCG 结合多肽的嫁接类抗体^[4], 展示了优异的 hCG 结合活性, 并且嫁接类抗体的生化稳定性等均与经典途径制备的商业单克隆抗体相近^[16-17], 暗示 RAD 骨架可能是一种较理想的多肽展示蛋白骨架。

应用多肽展示技术制备抗 hCG 抗体的工作已有研究者进行尝试^[18]。本研究结合前期研究对 hCG 结合多肽筛选工作和单域抗体通用骨架的选择、测试工作的成果基础上^[19-20], 尝试利用 RAD 新骨架进行多肽嫁接, 获得了具有较高抗原亲和力的 RAD 嫁接类抗体分子。RAD 嫁接类抗体蛋白在大肠杆菌中的表达较好, 且高度可溶, 并显示了较高的生化稳定性, 基本继承了原蛋白骨架优良的生化性能, 也充分说明了 RAD 骨架的高度稳定性^[9]。与前期研究工作相符, RAD 骨架的 DNA 结合 L2 环状结构可以容忍序列多样性, 其置换甚至删除均不影响蛋白质的稳定性。我们测定了不同条件下 RAD 嫁接类抗体的稳定性, 最终发现 RAD 嫁接类抗体蛋白的稳定性未受到干扰^[21]。RAD 蛋白骨架的稳定性为插入多肽片段维持较恒定的空间构象提供了一定保障, 可能是其抗原结合活性得以提高的主要因素。

在本项研究中, 我们比较了 RAD 嫁接类抗体与应用单域抗体通用骨架的嫁接抗体 (CDR1 嫁接抗体和 CDR3 嫁接抗体) 结合 hCG 抗原的活性情况, 发现 RAD 嫁接类抗体展示了更好的抗原结合活性。类抗体分子的抗原结合活性主要取决于所接入的多肽片段, 本研究所挑选的 hCG 结合多

肽对 hCG 抗原具有较高的结合特异性, 但与 LH 存在一定的交叉结合活性, 为了提高其对 hCG 抗原的特异结合活性, 可通过进行结合多肽的扫描突变等方法进行尝试。

本研究建立了一个新的嫁接类抗体制备体系, 并成功制备了 hCG 的类抗体, 有望应用于临床检验 hCG 水平, 用于早期妊娠或肿瘤检测。

REFERENCES

- [1] Cole LA, Khanlian SA, Sutton JM, et al. Hyperglycosylated hCG (invasive trophoblast antigen, ITA) a key antigen for early pregnancy detection. *Clin Biochem*, 2003, 36(8): 647–655.
- [2] Elliott MM, Kardana A, Lustbader JW, et al. Carbohydrate and peptide structure of the ϵ - and β -subunits of human chorionic gonadotropin from normal and aberrant pregnancy and choriocarcinoma. *Endocrine*, 1997, 7(1): 15–32.
- [3] Cole LA, Shahabi S, Butler SA, et al. Utility of commonly used commercial human chorionic gonadotropin immunoassays in the diagnosis and management of trophoblastic diseases. *Clin Chem*, 2001, 47(2): 308–315.
- [4] Jewell EL, Aghajanian C, Montovano M, et al. Association of β -hCG surveillance with emotional, reproductive, and sexual health in women treated for gestational trophoblastic neoplasia. *J Womens Health (Larchmt)*, 2018, 27(3): 387–393.
- [5] Peng J, Wang Q, Cheng XL, et al. Preparation of anti-hCG single domain antibody by antibody grafting technique using an antigen-binding peptide. *Chin J Biotech*, 2018, 34(4): 569–577 (in Chinese). 彭静, 王琼, 程小玲, 等. 利用抗原结合多肽嫁接抗体技术制备抗 hCG 单域抗体. *生物工程学报*, 2018, 34(4): 569–577.
- [6] Liang AH, Li CN, Li D, et al. A facile and sensitive peptide-modulating graphene oxide nanoribbon catalytic nanoplasmon analytical platform for human chorionic gonadotropin. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 8725–8734.
- [7] Rossmann M, Greive SJ, Moschetti T, et al. Development of a multipurpose scaffold for the display of peptide loops. *Protein Eng Des Sel*, 2017, 30(6): 419–430.
- [8] Lolli G, Pinna LA, Battistutta R. Structural determinants of protein kinase CK2 regulation by autoinhibitory polymerization. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(7): 1158–1163.
- [9] Scott DE, Ehebauer MT, Pukala T, et al. Using a fragment-based approach to target protein-protein interactions. *Chembiochem*, 2013, 14(3): 332–342.
- [10] Shin DS, Pellegrini L, Daniels DS, et al. Full-length archaeal Rad51 structure and mutants: mechanisms for RAD51 assembly and control by BRCA2. *EMBO J*, 2003, 22(17): 4566–4576.
- [11] Wu Y, Qian XG, He YJ, et al. Crystal structure of an ATPase-active form of Rad51 homolog from *Methanococcus voltae*: Insights into potassium dependence. *J Biol Chem*, 2005, 280(1): 722–728.
- [12] Moody IS, Verde SC, Overstreet CM, et al. *In vitro* evolution of an HIV integrase binding protein from a library of C-terminal domain γ S-crystallin variants. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(17): 5584–5589.
- [13] Tiede C, Tang AAS, Deacon SE, et al. Adhiron: a stable and versatile peptide display scaffold for molecular recognition applications. *Protein Eng Des Sel*, 2014, 27(5): 145–155.
- [14] Zhang HX, Jiang SS, Zhang XF, et al. Protein kinase CK2 α catalytic subunit is overexpressed and serves as an unfavorable prognostic marker in primary hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2015, 6(33): 34800–34817.
- [15] Benyamini H, Friedler A. Using peptides to study protein-protein interactions. *Future Med Chem*, 2010, 2(6): 989–1003.
- [16] Katz C, Levy-Beladev L, Rotem-Bamberger S, et al. Studying protein-protein interactions using peptide arrays. *Chem Soc Rev*, 2011, 40(5): 2131–2145.
- [17] Yan JR, Li GH, Hu YH, et al. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *J Transl Med*, 2014, 12: 343.
- [18] Reverdatto S, Burz DS, Shekhtman A. Peptide aptamers: development and applications. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15(12): 1082–1101.
- [19] Škrlec K, Štrukelj B, Berlec A. Non-immunoglobulin scaffolds: a focus on their targets. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(7): 408–418.
- [20] Nand KN, Gupta JC, Panda AK, et al. Development of a recombinant hCG-specific single chain immunotoxin cytotoxic to hCG expressing cancer cells. *Protein Expr Purif*, 2015, 106: 10–17.
- [21] Pellegrini L, Yu DS, Lo T, et al. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 2002, 420(6913): 287–6993.

(本文责编 郝丽芳)