

# 抗肉毒毒素 A 人源单链抗体在酵母细胞中的分泌表达\*

王 慧\*\* 荫 俊 侯晓军 邢洪光

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

**摘要:** 将特异肉毒抗毒素基因克隆入载体 pPIC9k, G418 抗性加压筛选阳性整合克隆, 在毕赤酵母细胞 GS115 中进行分泌表达。获得了稳定分泌表达 ScFv 的工程菌, SDS-PAGE 分析可见, 目的蛋白分子量约为 26 kD, 通过放大体积来探索重组抗毒素的诱导表达条件及纯化工艺, 结果发现, 1% 甲醇诱导后 72 ~ 84 h, 目的蛋白的表达达到高峰, 占酵母培养上清中总蛋白的 15% 以上, 经两步层析纯化, 目的蛋白纯度可达 95%。竞争活性测定结果表明, 重组抗毒素在体外具有良好的活性, 可竞争肉毒抗毒素马血清与毒素的特异结合。

**关键词:** 人源单链抗体, 分泌表达, 纯化, 毕赤酵母

**中图分类号:** Q786, R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0050-04

## High-level Secretion Expression of Human ScFv Against Botulinum Neurotoxin A in *Pichia pastoris*\*

WANG Hui\*\* YIN Jun HOU Xiao-Jun XING Hong-Guang

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

**Abstract:** The specific ScFv gene against botulinum neurotoxin A (BoNTa) was cloned into pPIC9k. Positive integrators were screened by increasing the dose of G418 in culture and expressed in *Pichia pastoris* GS115. As a result, engineered recombinant clone were obtained. 26 kD product of interest was seen easily in SDS-PAGE. Expression of human ScFv got the highest level 15% of total secreted proteins during 72 ~ 84 h after 1% methanol inducing. Purification of ScFv was finished by two steps: gel filter and ion exchange. Competing ELISA showed that recombinant ScFv could compete with antiserum to specific bind BoNTa.

**Key words:** Human ScFv, Secretion expression, Purification, *Pichia pastoris*

肉毒神经毒素 (BoNT, 简称肉毒毒素) 是由肉毒梭状芽孢杆菌 (*Clostridium botulinum*) 厌氧产生的外毒素, 是已知自然界毒性最强的蛋白质, 其中毒剂量极小, 致死率很高。肉毒中毒可引起严重的神经失调和进行性神经肌肉麻痹症状, 造成骨骼肌无力和延髓麻痹, 严重的最终出现呼吸衰竭、心跳停止而导致死亡<sup>[1]</sup>。抗毒素是肉毒中毒急救治疗最有效的手段, 但目前的马血清抗毒素存在副作用大等诸多问题<sup>[2]</sup>。ScFv B17 是我们利用噬菌体表面展示抗体文库技术<sup>[3]</sup> 筛选获得的一株对 A 型肉毒毒素特异的人源单链抗体, 其在肉毒中毒被动免疫治疗应用方面具有一定应用前景。本研究将 ScFv B17 特异抗毒素基因克隆入毕氏酵母系统进行分泌表达, 探讨诱导表达条件和纯化工艺, 对重组人源抗毒素的抗原特异结合活性、竞争抑制活性进行分析。

\* 国家重点基础研究 973 项目资助 (No. 2002CB513205) .

\*\* 通讯作者 Tel: 010-66948532, E-mail: geno0109@vip.sina.com

收稿日期: 2004-07-05, 修回日期: 2004-07-26

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和载体

pGEM-ScFv (来源于噬菌体克隆 ScFv B17) 为本室构建的重组质粒, *E. coli* DH5 $\alpha$  为本室保存, 表达载体 pPIC9K、毕氏酵母菌株 GS115 均为 Invitrogen 公司产品。

### 1.2 试剂

限制性内切酶 *Xho*I、*Not*I 和 *Sac*I, T4 DNA 连接酶, DNA 和蛋白标准分子量, 质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品; PCR 试剂为宝生物公司产品; PCR 产物及酶切产物回收采用博大公司玻璃奶 DNA 快速回收纯化试剂盒; Sephacryl S-100 column 和 HiPrep Q column 为安法玛西亚公司产品; 培养基配制均为进口试剂。

### 1.3 基因操作

ScFv 基因的克隆: 01. HuVh4a-up: 5'-ccgctcgag cag gtg cag ctg cag gag tcg gg-3' (含 *Xho*I); 02. HuVk-down: 5'-aatgcggcgcgcc tta ggt gca gcc aca gta cgt tag atc tcca-3' (含 *Not*I)。

以 pGEM-ScFv 质粒为模板, 设计引物 01 和 02 扩增 ScFv 基因, PCR 反应条件是 94 $^{\circ}$ C 40 s, 57 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环。产物纯化回收后, 分别经 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切, 亚克隆入酵母表达载体 pPIC9K 中, 构建 pPIC-ScFv 重组表达质粒。

### 1.4 重组表达质粒的线形化和电转化酵母细胞

利用 *Sac*I 酶切, 将重组表达质粒 pPIC9K-ScFv 进行线形化, 纯化回收。分别将 10 $\mu$ g 线形 DNA 加入致敏的酵母细胞 GS115, 进行电转化 (1,500 V, 200 $\Omega$ , 50 $\mu$ F)。转化的细胞涂布 YPD-G418 板 (G418 浓度梯度为 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0g/L), 进行筛选。

### 1.5 重组克隆的活化和甲醇诱导表达

接种 GS115 (Mut+) 单菌落于 5 mL YPD-G418 培养基 (含 Kan 25 mg/L) 30 $^{\circ}$ C 培养过夜。按 1:50 转接于新鲜 2 mL BMGY 培养基, 30 $^{\circ}$ C, 250 r/min 培养至菌液  $OD_{600}$  = 2~6, 3,000 g 室温离心 5 min, 弃上清, 15 mL BMMY 培养液悬浮细胞沉淀, 30 $^{\circ}$ C 诱导表达培养, 每 24 h 补加甲醇至终浓度 1%, 连续培养 5 d, 离心收集上清, 浓缩后 4 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.6 重组 ScFv 的纯化

分子筛法: 用 0.05 mol/L PBS 平衡 Sephacryl S-100 凝胶柱, 将浓缩并透析的酵母培养上清液过柱, 以 0.05 mol/L PBS 洗脱, 将洗脱液分峰收集, SDS-PAGE 分析收集的样品。

收集的蛋白对 0.05 mol/L Tris-Cl (pH7.0) 透吸后进行离子交换层析 (HiPrep Q column), 平衡缓冲液 0.01 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-Cl pH7.0。洗脱时用梯度缓冲液 0.01~1.00 mol/L NaCl, 0.05 mol/L Tris-Cl (pH7.0)。收集洗脱峰, SDS-PAGE 分析收集的样品。Bradford 法定量测定蛋白<sup>[4]</sup>。

### 1.7 ELISA 检测 ScFv 的竞争抑制结合活性

肉毒类毒素抗原包被, 用 3% BSA-PBS (含 0.02% NaN<sub>3</sub>) 封闭, 加入纯化的人 ScFv 蛋白, 设置对照, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 加入 1:2,000 稀释的抗 A 型肉毒毒素马血清, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 h, 0.05% Tween-20-PBS (PBST) 洗板 3 次, 加 1:1,000 稀释的 HRP 标记兔

抗马抗体, 37℃温育 1 h 后, 加 TMB 底物显色 (5 mg TMB, 0.05 mol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 酶标仪上读取 A<sub>450</sub>。

## 2 结果

### 2.1 ScFv 的基因克隆

以 pGEM-ScFv 为模板扩增了 ScFv 基因, 大小约为 750 bp, 经 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切后, 亚克隆入酵母表达载体 pPIC9K 中, 构建了 pPIC-ScFv 重组表达质粒 (图 1)。

### 2.2 G418 抗性筛选高表达克隆及 ScFv 的诱导表达

在重组酵母克隆的加压筛选中, 随着 G418 浓度的提高, 培养平板上长出的菌落数逐渐减少, 在 G418 浓度为 2.0 g/L 的 YPD 平板上, 获得了 1 株阳性克隆。此克隆在 1% 甲醇诱导后 72 ~ 84 h, 目的蛋白的表达量最高, 占酵母培养上清液总蛋白的 15% 以上 (图 2)。



图 1 构建的 pPIC-ScFv 重组表达质粒

1 ScFv 的 PCR 产物, 2 pPIC-ScFv 的 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切产物, 3 DNA 标准分子质量  $\lambda$ DNA/*Hind*III

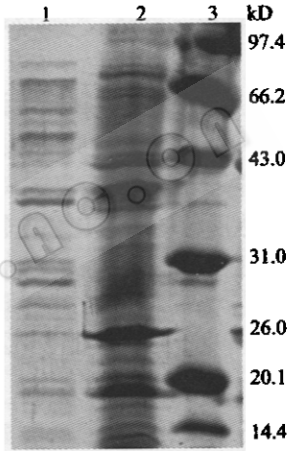


图 2 人 ScFv 在毕赤酵母细胞中的重组表达

1 诱导的酵母 pPIC/GS115 上清, 2 诱导的重组酵母 pPIC-ScFv/ GS115 上清, 3 蛋白分子量标准

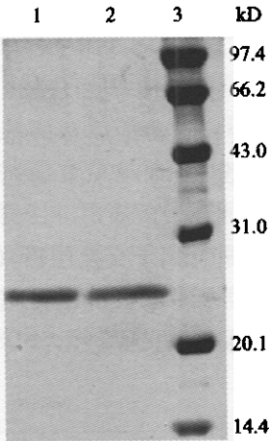


图 3 SDS-PAGE 分析纯化的重组 ScFv

1, 2 纯化的 ScFv, 3 蛋白分子量标准

### 2.3 重组 ScFv 的纯化

通过第一步凝胶层析纯化, ScFv 蛋白纯度近 90%。收集目标蛋白进行第二步 Q 柱离子交换, 当洗脱盐浓度为 0.5 mol/L NaCl 时, 目标蛋白被洗脱, SDS-PAGE 分析显示, 蛋白质纯度可达 95%, 图 3 示。

### 2.4 ScFv 的竞争抑制结合活性

竞争 ELISA 测定结果表明, 重组人 ScFv 在体外均具有良好的活性, 可竞争抗肉毒马血清与肉毒类毒素结合。而不能抑制破伤风抗毒素与破伤风类毒素的结合。结果见表 1。

表 1 ELISA 检测重组 ScFv 的竞争抑制活性 ( $A_{450}$ )

抗原	rScFv + 抗肉毒	BSA + 抗肉毒	rScFv + 抗破伤风	BSA + 抗破伤风
	毒素马血清	毒素马血清	毒素马血清	毒素马血清
A 型肉毒类毒素	0.309	0.843	-	-
破伤风类毒素	-	-	1.089	1.132
对照	0.044	0.045	0.043	0.045

### 3 讨论

毕赤酵母表达系统是目前最为成功的外源蛋白表达系统之一,该系统能够对目的蛋白进行类似高等真核生物的信号肽剪切、二硫键形成、糖基化等过程的翻译后蛋白加工。至今已有多种外源蛋白在该系统中成功表达<sup>[5,6]</sup>。本研究中选用了 *Pichia* 多拷贝基因表达载体 pPIC9K, 大多研究表明,基因表达水平与基因整合拷贝数成正相关,通过对单拷贝克隆基因的 His<sup>+</sup> 重组子进行 G418 抗性加压筛选,获得了高拷贝整合的超抗 G418 的克隆株,蛋白的表达量也较高。另外  $\alpha$ -因子信号肽使甲醇诱导表达的外源蛋白分泌到胞外,酵母培养上清中宿主蛋白的种类少,使得纯化更为简便。

经过条件的优化,最终筛选到蛋白表达量占上清蛋白 15% 以上的 ScFv 分泌表达株。采用两步纯化工艺获得了凝胶电泳纯度为 95% 的目标蛋白,竞争酶联免疫检测证实重组 ScFv 可以竞争抗毒素马血清并部分抑制它与肉毒类毒素的结合活性,而与结构相似的破伤风类毒素不具有结合活性,不能竞争破伤风抗毒素的结合。提示重组表达单链抗体具有毒素抗原识别表位的分子构象,可以被特异毒素抗原所识别,进一步的生物学活性研究正在进行中。

### 参考文献

- [1] Atassi M Z, Oshima M. *Immunology*, 1999, **19** (3): 219 ~ 260.
- [2] Peter A, Cindy W, Steven C H, *et al.* *Infect Immun*, 1997, **65** (9): 3743 ~ 3752.
- [3] Winter G, Griffith A D, Hawkins R E, *et al.* *Immunology*, 1994, **12** (2): 433 ~ 455.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛编著. 生化实验方法和技术 (第二版). 北京: 高等教育出版社, 1996. 138 ~ 140.
- [5] Andrade E V, Albuquerque F C, Moraes L M, *et al.* *J Biochem*, 2000, **128** (6): 891 ~ 895.
- [6] Clare J J, Rayment F B, Ballantine S P, *et al.* *Biotechnology*, 1991, **9**: 455 ~ 461.