

抗 HIV-1 重组导向毒素 SL120 在毕赤酵母中的表达及其活性检测

Expression and Detection of Recombinant Directing Toxin SL120 in *Pichia pastoris*

王 宏^{1,2}, 金宁一^{1*}, 尹革芬¹, 徐一鸣¹, 金洪涛¹, 张立树¹, 李子建¹

WANG Hong^{1,2}, JIN Ning-Yi^{1*}, YIN Ge-Fen¹, XU Yi-Ming¹, JIN Hong-Tao¹, ZHANG LI-Shu¹ and LI Zi-Jian¹

1. 军事医学科学院军事兽医研究所全军基因工程实验室, 长春 130062
2. 暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632

1. Key laboratory of Genetic Engineering of PLA, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China
2. Life Science and Technology colleg of Jinan University, Guangzhou 510632, China

摘 要 以 pPIC9K 为载体, 构建抗 HIV-1gp120 单链抗体 scFv120 与葡萄球菌肠毒素 A (Staphylococcal enterotoxin A, SEA) 融合基因表达质粒, 线性化、电转化法整合入巴斯德毕赤酵母菌, 经表型鉴定、PCR 分析和 G418 筛选得到 Muts 型多拷贝整合菌, 甲醇诱导培养可分泌表达 57kD 的预期大小蛋白—重组导向毒素 SL120, 表达量达 50.1mg/L。通过单链抗体亲和力测定, 表明蛋白 SEA 和 scFv120 的构象有微弱的相互影响, 但此重组导向毒素仍可高效介导 CTLs 杀伤 HIV-1 靶细胞。

关键词 HIV-1, gp120, 单链抗体, 金黄色葡萄菌外毒素 A, 分泌表达, 毕赤酵母
中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)03-0473-05

Abstract Anti-HIV-1 gp120 single chain antibody (scFv) gene and staphylococcus extoxin A (SEA) gene were inserted into vector pPIC9K. The recombinant plasmid was integrated into *Pichia pastoris* by electroporation. High level expression was performed by determining the Muts phenotype and screening muti-copy integrants. The recombinant protein was about 57kD and the production was 50.1mg/L. It was shown that the two kinds of protein affected the conformation of each other by antibody affinity assay, but the recombinant targeting toxins could highly mediate CTLs to kill HIV-1 target cells.

Key words HIV-1, gp120, scFv, SEA, secretory expression, *Pichia pastoris*

艾滋病 (人获得性免疫缺陷综合症, AIDS) 自 1981 年首例报道以来, 已经在全世界许多地区流行, 造成严重危害。虽然高效抗病毒疗法 (Highly active anti-retroviral therapy, HAART) 可有效地抑制病毒复制, 基本上清除血清中游离的 HIV-1 病毒粒子, 但对潜伏感染的 HIV-1 无作用^[1]。针对此现象, 人

们提出辅助疗法, 导向治疗为其中之一。目前, 超抗原 SEA 用于肿瘤导向治疗得到广泛研究, 并且疗效显著, 利用 SEA 治疗 HIV/AIDS 的研究国内外尚未见报导。本文利用 *Pichia pastoris* 表达系统, 构建了高效分泌表达抗 HIV-1 gp120 单链抗体与超抗原 SEA 融合表达产物的酵母工程菌, 并对表达产物进

Received: November 18, 2004; Accepted: January 20, 2005.

This work was supported by grants from Key items Foundation of Jilin (No.20010404) and "863" Foundation of China (No.2003AA219051).

* Corresponding author. Tel: 86-431-6986755; E-mail: ningyij@yahoo.com

吉林省重点项目 (No.20010404), 国家 "863" 基金资助项目 (No.2003AA219051)。

行了初步纯化及活性检测研究。

1 材料和方法

1.1 材料

pPIC9K 载体, 质粒 pKS、pET-SL120, 菌株 *E. coli* DH5 α , 毕赤酵母菌株 GS115, 稳定表达 HIV-1gp160 蛋白的重组人肝癌细胞株 SMMC-7721-gp160, 人抗 HIV-1 gp160 阳性血清等本室保存。各种限制酶、碱性磷酸酶、连接酶、Taq 酶、dNTPs 等分别购自 TaKaRa 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体和 DAB 为北京鼎国生物技术有限责任公司产品, 抗 SEA 多抗为 Sigma 公司产品。HIV-1 抗原硝酸纤维膜条购自杭州澳亚生物有限公司。CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay 购自 Promega 公司。低分子量标准蛋白质(分子量分别为 97.4kD、66.2kD、43kD、31kD、20kD、14kD)购自上海西巴斯生物技术开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 鉴定重组子用引物:通用引物(针对载体上信号肽序列): P1: 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'; P2: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'。特异引物(针对 SEA 基因): P3: 5'-GGCCATGGAGCGAGAAAAGCG-3'; P4: 5'-GGAGATCTAGATTCCGCTCCACCAC TTGTATATAAATATATAGC-3'。

1.2.2 重组表达质粒构建:按常规方法进行, 基因 scFv120、SEA 人工合成, L(Linker)为 (Gly₄Ser)₃, 质粒 pET-SL120 构建过程见参考文献[2]。

1.2.3 转化酵母菌 GS115 感受态细胞及多拷贝转化子的筛选:重组质粒 pPIC9K-SL120 及空载体 pPIC9K 分别用 *Bgl* II 线性化, 电击转化 GS115 酵母感受态细胞, 菌液涂布于 MD 平板, 30℃ 培养箱培养至出现菌落为止, 用无菌牙签同时接种单菌落于 MD 和 MM 平板上, 28~30℃ 培养 2~4d, 挑选在 MD 板生长快速而 MM 板生长缓慢或几乎不生长的 Mut^r 表型酵母菌, 然后经 YPD 液体培养基扩菌后, 涂布 0.25、0.5、0.75、1.0、2.0mg/mL G418 + YPD 平板, 筛选多拷贝转化子。

1.2.4 PCR 鉴定酵母转化子:分别挑选不同抗性的转化子, 利用玻璃珠法提取转化子基因组 DNA, 以提取的基因组 DNA 为模板, 分别用通用引物 P1、P2 及特异性引物 P3、P4 进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 重组菌诱导表达:接种重组菌于 5mL YPD 液

体培养基中, 28~30℃ 250 r/min 振摇过夜, 次日将培养物转移入 100mL BMGY 培养基中, 28~30℃ 250 r/min 振摇过夜, 培养至 $OD_{600} = 2.0 \sim 6.0$, 离心收集菌体, 用 20mL BMMY 培养基重悬, 25~28℃ 250r/min 诱导培养 2~6d, 每日取样 1mL 并补加甲醇于培养基中至终浓度为 0.5%~1%。样品离心收集上清, 以备 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 表达产物检测:通过 SDS-PAGE 和 Western blot 方法检测重组蛋白的表达。

1.2.7 表达产物的初步纯化:培养液取上清, 加入固体 (NH₄)₂SO₄ 达 65% 饱和度, 4℃ 过夜。10000 r/min 离心 10min, 沉淀溶于 0.01mol/L、pH7.0 的磷酸缓冲液中, 上样于 Sephadex G-75 凝胶过滤层析柱, 并用同种磷酸缓冲液洗脱(流速为 30mL/h), 分别收集不同洗脱峰的洗脱液并检测。

1.2.8 单链抗体亲和力测定:采用间接 ELISA 方法检测^[3]。表达 HIV-1gp160 蛋白的 SMMC-7721-gp160 细胞, 5000r/min 离心 5min, 收集细胞沉淀, 加入细胞裂解液冰浴 30min, 12000r/min 离心 10min, 所得细胞裂解产物上清作为包被抗原; 酵母表达产物经初步纯化并用离心超滤管浓缩后, 进行 SDS-PAGE 分析, 估算浓度。ELISA 具体方法参照《现代动物免疫学》^[4], 酶联检测仪 492 nm 下测每孔吸光度值 (OD), 亲和力常数按如下公式计算:

$$K_a = \frac{n-1}{2 \times (n \times [Ab'] - [Ab]_i)};$$

$$n = [Ag]_i / [Ag']$$

公式中: [Ab']: 表示抗原浓度为 [Ag'] 时 $OD = 1/2 OD_{max}$ 对应的抗体浓度; [Ab]_i: 表示抗原浓度为 [Ag]_i 时 $OD = 1/2 OD_{max}$ 对应的抗体浓度; n: 为抗原 [Ag'] 与 [Ag]_i 间的稀释倍数。

1.2.9 CTL 杀伤活性检测:

PBMCs 分离: 取静脉血(肝素抗凝), 利用淋巴细胞分离液参照说明书分离。

效应细胞的制备: PBMC 10⁶ cell/mL, 加入 1~10 μ g/mL 过滤除菌的重组导向毒素或单链抗体、100IU/mL IL-2, 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养 72h, 收集细胞、2000r/min 离心 10min、Hank's 溶液洗涤 2 次; 10% FCS-RPMI1640 悬起、记数, 分成不同细胞浓度组, 再加入 1~10 μ g/mL 重组导向毒素或单链抗体, 同时加入 100IU/mL IL-2, 4℃ 孵育 30min, 用于测 CTL 活性。

靶细胞的准备:用胰酶消化培养的靶细胞(表达 HIV-1 gp160 抗原的 SMMC-7721-gp160 细胞), Hank's 液洗涤 3 次,用 10% FCS-RPMI1640 培养液调整细胞浓度至 1×10^5 /mL。

CTL 活性测定:按细胞毒测定试剂盒的说明书进行,即以乳酸脱氢酶释放法检测 CTL 反应。在 96 微孔板上划分好样品、自然释放及最大释放孔,效靶细胞比例(E/T)为 12.5:1、25:1、50:1,每孔补加 5%

$$\text{杀伤活性(\%)} = \frac{(\text{实验孔 OD 值} - \text{靶细胞自然释放孔 OD 值} - \text{效应细胞自然释放孔 OD 值})}{(\text{最大释放管孔 OD 值} - \text{靶细胞自然释放管孔 OD 值})} \times 100\%$$

2 结果

2.1 表达载体的构建

重组表达质粒构建过程见图 1。

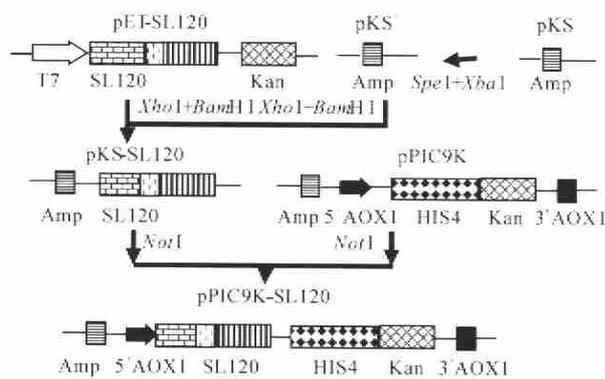


图 1 质粒 pPIC9K-SL120 构建流程图

Fig.1 Construction of plasmid pPIC9K-SL120

2.2 酵母转化子的 PCR 鉴定

PCR 扩增结果见图 2。其中 1、14 为阴性对照,泳道 14、4~8 为特异引物扩增产物电泳结果(SEA 基因特异性引物),泳道 1、9~13 为通用引物(针对载体信号肽引物)扩增产物电泳结果,由图可见,4~8 泳道扩增出 700bp 带,与 SEA 基因大小相当;9~13 泳道中的带有 1.8kb 大小,正好与目的基因加分泌信号(1.5kb + 298bp)大小相当;1 泳道扩增出约 300bp 条带,与载体分泌信号带大小相当;证明我们的目的基因已成功整合入酵母基因组中。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

将经 PCR 鉴定为阳性的转化子分别接种 BMGY 和 BMMY 培养基诱导表达后,表达上清用硫酸铵浓缩 10 倍后取样进行 SDS-PAGE,其结果见图 3。从图 3 可以看出,在 57kD 处出现与预计大小相符条带,并且能抗 0.75mg/mL G418 的重组子诱导培养 4d,目

FCS-RPMI1640 至 200 μ L,每组设 3 个复孔,效靶细胞于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱共同孵育 4h,每孔吸取上清,加于另一 ELISA 反应板的孔中,每孔中加入新鲜配置的底物液 50 μ L,室温避光反应 30min 后,每孔加入 50 μ L 终止液,终止酶促反应。在酶联检测仪 492nm 下测每孔吸光度值(OD),CTL 活性用杀伤率表示,按如下公式计算:

的蛋白表达量最高,达 50.1mg/L。由图中可见在目的带上方还有 1 条带,分析原因可能是表达产物信号肽切割不完全。

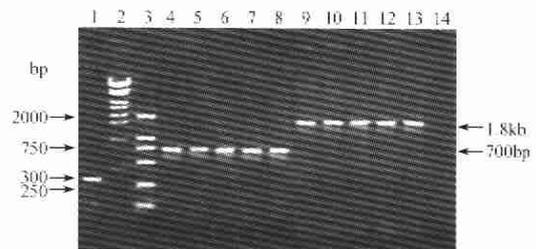


图 2 酵母转化子 PCR 鉴定

Fig.2 PCR Identification of yeast recombinants

1: PCR of pPIC9K transformants by general primer;4~8:PCR by specific primer;9~13:PCR by general primer;14: PCR of pPIC9K transformants by specific primer.

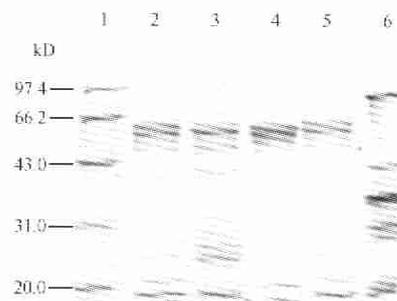


图 3 SL120 表达上清 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE of the expressed SL120 from cultural supernatant of GS115/pPIC9K-SL120

1: marker;2: G418-0.25;3: G418-0.5;4:G418-0.75;5: G418-1;6: pPIC9K control.

2.4 表达产物的 Western blot 检测

利用 HIV-1 抗原条检测 scFv120,利用抗 SEA 的多抗检测 SEA,结果见图 4,5。由图 4 可见,1、2、3 试纸条在 gp160、gp120 所在位置均出现条带,其中试纸条 1、2 是使用表达产物检测结果,试纸条 3 是

使用人抗 HIV-1 阳性血清检测结果,从而证明本研究获得的重组导向毒素具有特异性与 HIV-1 gp120 结合的活性;从图中可见在 gp160、gp120 处均出现条带,原因是 gp160 经细胞蛋白酶作用被水解为非共价连接的 gp120 和 gp41 两部分,因此在 gp160、gp120 处均出现条带;另外 gp160 条带处明显深于 gp120 处,分析原因可能为厂家制作的抗原条中抗原的定量是以摩尔单位计算。由图 5 可见在 57kD 处显出特异性条带,正好与 SEA + Llinker + scFv120 大小相当,证明我们的目的基因得到完好表达。

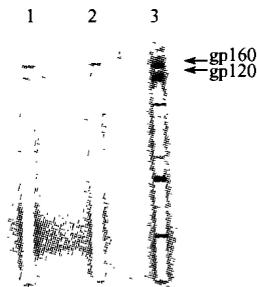


图 4 单链抗体结合活性检测

Fig. 4 Binding activity of scFv120 by Western blot

1,2:SL120;3:positive control.

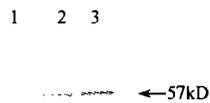


图 5 检测 SEA

Fig. 5 Western blot for SEA

1: negative control;2,3:SL120.

2.5 表达产物初步纯化

表达产物经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀、分子筛层析后, SDS-PAGE 检测,可见大部分杂质已除去(图 6)。薄层扫描显示纯度达 85% 以上。

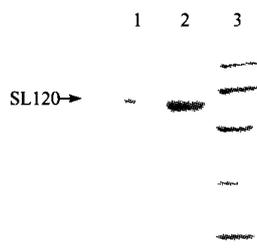


图 6 纯化的 SL120 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE of purified SL120

1,2:SL120;3:marker.

2.6 单链抗体亲和力测定

在抗原分别作 20 倍、40 倍稀释条件下, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 目的产物倍比稀释, 所测 OD 值见图 7。根据抗体亲和力常数公式可计算出本实验所表达的重组导向毒素中单链抗体的亲和常数为 2.18×10^8 , 略低于单独表达的 scFv120 亲和力值(未列出), 说明两蛋白间有微弱的相互影响。

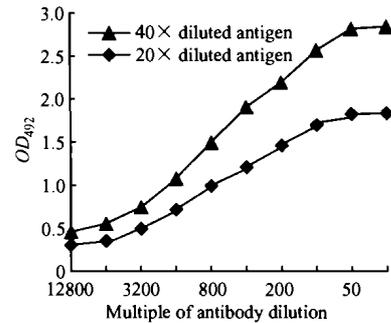


图 7 单链抗体亲和力曲线

Fig. 7 Affinity curves of scFv

2.7 特异性 CTL 杀伤活性检测

以单独表达的 scFv120 为对照, 定量的样品经过滤除菌后, 分别加入细胞培养孔中, 使其终浓度分别达到 1、2、3、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 刺激分离的 PBMCs, 使之激活、增殖; 在效靶比分别为 12.5:1、25:1 和 50:1 条件下, 特异性 CTL 杀伤率检测结果见表 1。

表 1 特异性 CTL 杀伤活性 (%)

Table 1 The specific CTL cytotoxicity activity (%)

Effectors: targets	SL120					scFv120	
	1	2	3	5	10	1	5($\mu\text{g}/\text{mL}$)
12.5:1	16.23	14.16	20.66	12.85	17.77	6.56	5.54
25:1	31.22	44.33	33.14	23.02	21.76	7.43	8.23
50:1	70.56	99.74	72.56	38.48	48.26	7.02	8.17

从表 1 可知: 实验组因 SL120 的加入, SEA 可非特异的激活 T 细胞, 在 scFv120 导向下可特异性杀伤 HIV-1 靶细胞, 杀伤活性明显高于对照组(scFv120 对 T 细胞无作用, 因此无 T 细胞激活, 无法杀伤 HIV-1 靶细胞), 并且当重组导向毒素终浓度达 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 可最大限度的激活 PBMCs 并介导 CTLs 发挥杀伤活性。

3 讨论

虽然 HAART 疗法可显著降低病毒载量, 延迟疾病进展, 但却不能根除感染者体内的病毒, 一旦停药, 病毒感染就会出现反弹。针对此现象, 人们提出辅助治疗策略, 而导向治疗为其中之一。本研究应

用 SEA 作为“弹头”有三点优势:一、可使处于潜伏感染的表达 T 细胞抗原受体(TCR)V β 区的 T 细胞活化^[5],从而表达病毒蛋白,被机体免疫系统识别并杀伤或直接被我们的导向药物介导而杀伤;二、强烈诱导 CTL 活性及产生各种细胞因子,如 INF- γ 、TNF- α 、IL-2 和 IL-6 等^[6],细胞因子可直接或间接产生杀伤作用;CTLs 在 scFv120 的导向作用下可杀伤 HIV-1 感染的靶细胞;并且激活的淋巴细胞主要分泌 Th1 型细胞因子,可使因 HIV-1 感染引起的 Th1 型细胞因子向 Th2 型转换发生逆转,从而增强机体细胞免疫水平;三、虽然 HAART 疗法已显著降低 HIV-1 相关的发病率和死亡率,但由于它所具有的强副作用,很多患者不能持续用药,而一旦停药,病毒就会出现反弹。如用抗 HIV-1 单链抗体导向的 SEA 辅助 HAART 治疗,可显著降低体内处于 HIV-1 潜伏感染的细胞数,使病毒反弹周期相对于只用 HAART 治疗的时间延长,从而可延长 HAART 治疗的间隔期。目前利用 SEA 治疗 HIV/AIDS 的研究国内外尚未见报导,但在肿瘤免疫治疗中得到广泛研究,并且取得显著疗效,如 Takemura 等^[7]用融合蛋白 SEA-D227A-M \times 3(M \times 3 为 anti-MUC1 \times anti-CD3 diabody)进行的 SCID 鼠试验表明,注射 SEA-D227A-M \times 3 激活的 T-LAK(具有 T 细胞表型的淋巴因子激活杀伤细胞)9 周后,对照组肿瘤达 20mm,实验组 6 只鼠中有 3 只肿瘤完全消退,其他 3 只的肿瘤也得到明显抑制。

SEA 同其他 T 细胞超抗原一样,与 T 细胞作用导致其所处的状态与所用超抗原的剂量和次数有关。一般在初次刺激可导致细胞大量活化和快速增殖,但多次刺激后,却导致 T 细胞免疫耐受。余德厚^[8]等用 MTT 法检测外周血 T 淋巴细胞的增殖,显示 SEA 浓度在 1 μ g/mL 时,可使外周血 T 细胞产生最大增殖,并且增殖高峰在 72h 左右出现;本研究设不同浓度 SL120 组进行实验,发现当 SL120 浓度为 2 μ g/mL 时可高效地活化 T 淋巴细胞并且杀伤 HIV-1 靶细胞,与上述研究结果相符。

本研究利用酵母分泌型表达载体 pPIC9K 构建了酵母表达质粒,它带有 α 因子分泌信号序列,能够引导表达的外源蛋白分泌到细胞外。通过 SDS-PAGE 分析,表明表达产物 SL120 主要存在于上清

中,这有利于重组蛋白的分离纯化;通过饱和度为 65%的 (NH $_4$) $_2$ SO $_4$ 沉淀、凝胶过滤层析,目的蛋白得到了初步纯化,纯度达 85%以上。

为了更好地发挥单链抗体与 SEA 各自的作用,我们利用 PCR 方法在两基因间引入柔性连接肽 Gly4Ser 基因序列。对表达产物中的 scFv120 结合活性的检测(与 HIV-1 抗原硝酸纤维素膜条的结合反应及抗体亲和力测定)及重组导向毒素活化 PBMCs 并介导 CTLs 发挥杀伤活性的检测,说明两蛋白间虽有微弱的相互影响,但仍能很好地发挥各自的功能。因此,此重组导向毒素有可能成为 HAART 治疗的良好辅助药物。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Chun TW, Finzi D, Margolick J *et al.* *In vivo* fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*, 1995, 1(12):1284-1290
- [2] Wang H(王宏), Jin NY(金宁一), Jin HT(金洪涛) *et al.* Construction of temperature control prokaryotic expression vector and expression of a mutated SEA D227A fusion single chain antibody specific to HIV-1 gp120. *High Technology Letters* (高技术通讯), 2004, 14(11):38-41
- [3] Wang SR(王世若), Wang XL(王兴龙), Han WY(韩文瑜). *Modern Immunology of Animal* (Second Edition). Changchun: Jilin Science and Technology Publishing House(吉林科学技术出版社), 2001
- [4] Dong ZW(董志伟), Wang Y(王琰). *Antibody Engineering*. Beijing: Beijing Medical University Publishing House(北京医科大学出版社), 2001
- [5] Dohlsten M, Lando PA, Hedlund G *et al.* Targeting of human cytotoxic T lymphocytes to MHC class II-expressing cells by staphylococcal enterotoxins. *Immunology*, 1990, 71(1):96-100
- [6] Dohlsten M, Sundstedt A, Bjorklund M *et al.* Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells. *Int J Cancer*, 1993, 54(3):482-488
- [7] Takemura S, Suzuki M, Sakurai N *et al.* A mutated superantigen SEA D227A fusion diabody specific to MUC1 and CD3 in targeted cancer immunotherapy for bile duct carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, 2002, 51(1):33-44
- [8] Yu DH(余德厚), Lu HG(陆洪光), Cheng Bo(程波) *et al.* Observation of the activation of human peripheral T cells with superantigen SEA. *Guizhou Medical Journal* (贵州医药), 2003, 27(7):583-585