

人源蛋白酶体 α 亚基 6 (Proteasome subunit alpha 6) 在酿酒酵母表面展示*

唐语谦 叶茂林 影** 韩双艳 郑泓 王小宁 梁世中

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640)

摘要 为构建人源蛋白酶体 α 亚基 6 ($\alpha 6$) 的酵母展示体系, 研制其单克隆抗体用于抗体表位分析和研究泛素-蛋白酶体途径, 建立绕过重组抗原表达及纯化制备、将展示重组抗原直接应用于抗体检测的方法. 在酵母展示表达载体 pICAS 中引入 His.tag 标签, 将编码 $\alpha 6$ 的基因 *PSA6_HUMAN* 克隆到酵母表面展示载体 pICAS-H 上, 用流式细胞仪检测其抗原表位活性, 以表面展示 $\alpha 6$ 的重组酵母细胞, 结合酶联吸附免疫检测技术, 建立酵母(yeast)-ELISA 检测技术, 应用于检测小鼠单克隆抗体及单抗效价. 酵母细胞培养 48 h 后获得抗原 $\alpha 6$ 的高效表面展示, 展示的 $\alpha 6$ 具有良好的抗原活性和特异性, 将 $\alpha 6$ 的展示酵母用于 yeast-ELISA 的初步实验结果显示可有效检测和筛选到抗 $\alpha 6$ 抗体.

关键词 泛素-蛋白酶体途径, 人源蛋白酶体 α 亚基 6, 酵母表面展示体系, 抗体检测

学科分类号 Q78, R392

一般认为在生物机体内存在经溶酶体蛋白酶、钙依赖蛋白酶和泛素-蛋白酶体 3 种蛋白质降解的途径^[1]. 泛素-蛋白酶体途径(ubiquitin-proteasome pathway)是新近受到关注的调节蛋白质降解与功能的重要系统, 其过程是靶蛋白以共价键形式联结多个泛素分子, 输送到 26 S 蛋白酶体上被消化降解, 主要作用于胞内一些半衰期短的调节蛋白和结构异常、错构或受损的蛋白质^[2,3]. 泛素-蛋白酶体途径与许多疾病的发生和发展密切相关, 因而蛋白酶体的抑制剂成为治疗很多相关疾病的研究方向, 蛋白酶体 α 亚基 6 (proteasome subunit alpha6, $\alpha 6$) 是一个有效的着手点, 利用 $\alpha 6$ 的抗原活性进行位点识别或生产抑制蛋白酶体活性的抗体, 可实现对泛素-蛋白酶体系统的有效调节^[4]. 最近新开发的抗肿瘤药 borteZomib 就是一种 26 S 的蛋白酶体抑制剂, 对该系统的研究已成热点.

人类基因组计划完成后, 蛋白质组学和抗体组学研究已成为 21 世纪生命科学的重点. 但筛选功能基因、研究蛋白质的表达、修饰和相互作用仍是一项艰巨的任务. 抗体是研究蛋白质性质和功能及其相关疾病的重要工具, 目前其体外研究和制备技术存在着抗原制备、高亲和力抗体筛选和抗体表位分

析等瓶颈问题, 无法适应快速发展的蛋白质组学和抗体组学研究需求.

酵母表面展示体系与其他展示体系相比, 除了具有高通量筛选的特点, 作为真核生物表达体系可以展示糖基化和二硫键异构化等修饰的真核蛋白^[5,6]. 在酵母细胞表面展示的蛋白质可直接进行活性分析, 利用流式细胞仪进行高活性分选, 可大大提高筛选的灵敏度及阳性克隆的富集比率. 近年来, 酵母表面展示体系在蛋白质文库筛选、高亲和性抗体分选及抗原/抗体库构建等多个领域得到迅猛发展^[7~9].

此外, 与常用的血清学检测方法(如蛋白质印迹、噬菌体展示和 ELISA)相比, 展示在酵母细胞表面的抗原具有天然蛋白质构象的表位分析能力. 本文将人源蛋白酶体 α 亚基 6 ($\alpha 6$) 展示在酵母细胞表面(RAYS), 使之形成类似天然的空间折叠构象, 展示的蛋白 $\alpha 6$ 能与抗 $\alpha 6$ 单抗特异性结合. 展示 $\alpha 6$ 的重组酵母用于酵母(yeast)-ELISA 实验, 可有

*国家科技攻关计划项目(2004BA711A20).

** 通讯联系人.

Tel: 020-39380698, 13538997829, E-mail: feylin@scut.edu.cn

收稿日期: 2007-03-02, 接受日期: 2007-05-24

将表达 6xHis.tag 标签的序列(CATCATCATCAT-CATCAT)插入酵母表面展示载体 pICAS, 位于多克隆位点与 α -agglutinin 之间, 将 pICAS 改造成载体 pICAS-H. 克隆基因 *PSA6_HUMAN* 的 5' 引物 P5: 5' ATAAGATCTATTCCCGTGGTTCCAGCG-CCG 3' (含 *Bgl* II 酶切位点), 3' 引物 P3: 5' TAACTCGAGAGTCTCTCTCTGCTAGAG-CAACA-AGG 3' (含 *Xho* I 酶切位点).

1.2 方法

1.2.1 表达载体的构建.以 Human Fetal Liver Creator SMART cDNA Library 中携带基因 *PSA6_HUMAN* (738 bp) 的质粒为模板, P5 和 P3 为上下游引物, 扩增目的基因, 扩增片段及 pICAS-H 载体经双酶切、连接转化 TOP10, 提取转化子质粒, 经过双酶切和测序验证, 得到重组子 pICAS-H-PSA6.

1.2.2 酿酒酵母的转化与鉴定.将重组质粒 pICAS-H-PSA6 线性化, 以醋酸锂法转化酵母宿主 MT8-1, 涂布 SD 平板, 30℃ 培养 2~3 天, 观察生长情况, 挑取转化子经菌落 PCR 筛选含目的基因的重组子 $\alpha 6$ -MT8.

1.2.3 重组酵母的诱导表达. 随机挑取 6~8 株重组酵母经 SD 平板活化, 转入 SD-CAA 液体培养基中, 30℃, 220 r/min 培养 24 h, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体; 加入新鲜 SD-CAA 液体培养基, 相同条件培养 24 h, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, pH 7.2 PBS(8.0 g/L NaCl, 1.92 g/L Na₂HPO₄·12H₂O, 0.2 g/L KCl, 0.24 g/L KH₂PO₄)洗涤 3 次, 含 1% BSA 的 PBS ($A_{600}=10$) 封闭, 进行免疫荧光标记, 用流式细胞仪分析其表达量, 复筛表达量较高的菌株继续优化培养条件.

1.2.4 重组酵母表达量及抗原活性分析方法

以 His.tag 单抗与重组菌 $\alpha 6$ -MT8 进行免疫荧光实验, 整合 pICAS 的重组酵母菌 pI 作为阴性对照, 流式细胞仪检测酵母细胞表面的平均荧光强度 X-mean 值反映 $\alpha 6$ 的展示表达量的大小. 以抗 $\alpha 6$

的单抗 3D7D12D4 与 $\alpha 6$ -MT8 进行免疫荧光实验, 以 pI 作为阴性对照, 以非对应单抗 2G2E4D9 作为正常对照, 流式细胞仪检测酵母细胞表面的平均荧光强度 X-mean 值反映展示的 $\alpha 6$ 抗原活性的高低.

1.2.5 免疫荧光显微镜观察.取经流式细胞仪检测成功展示 $\alpha 6$ 的酵母细胞样品, 在荧光显微镜 BX51 (Olympus) 下用油镜观察, 荧光激发光波长 495 nm, 用 Image-Pro® Plus version 5.0 (MediaCybernetics) 软件拍照分析.

1.2.6 酵母酶联免疫吸附测定(yeast-ELISA)^[10,11].取上述 (1.2.3) 酵母细胞 50 μ l 于 1.5 ml 微型管, 离心弃上清, 加入 100 μ l 适当稀释度的单抗, 37°C 温育 1 h. 洗涤液 pH 7.4 PBS-T (8.0 g/L NaCl, 2.9 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH_2PO_4 , 0.05% Tween-20) 离心洗涤 3 次. 加入 100 μ l HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗 (稀释度 1 : 5 000), 37°C 温育 45 min, PBS-T 洗涤 3 次. 将酵母细胞移至新 1.5 ml 微型管, 加入反应底物(OPD) 150 μ l, 37°C 避光反应 20 min. 离心取上清 100 μ l 至酶标板各孔(各孔均已含 50 μ l 2 mol/L H_2SO_4) 终止反应. 酶标仪(SURISE, TECAN) A_{492} 检测.

2 结 果

2.1 $\alpha 6$ 蛋白表面展示酵母重组质粒的构建与鉴定

在酵母展示载体 pICAS 上的多克隆位点(MCS) 和 α 凝集素之间插入一个 6 $\times$ His.tag 标签的基因序列, 用于目的蛋白的表达分析. 改造后的载体 pICAS-H 经酶切分析鉴定(图 1)及测序确认.

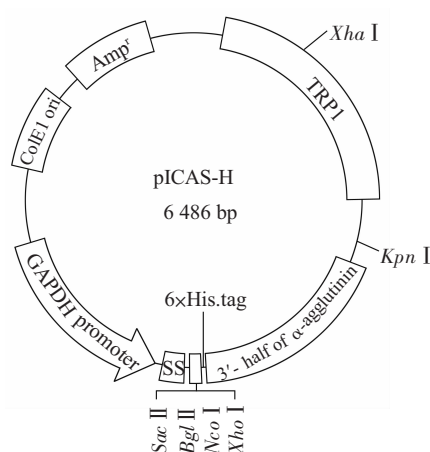


Fig. 1 Expression plasmid of pICAS-H

由肝脏 cDNA 文库扩增的目的基因 *PSA6_HUMAN* (738 bp) 插入载体 pICAS-H, 提取

转化子质粒用限制性内切酶 *Bgl* II 和 *Xho* I 进行酶切, 电泳出现约 750 bp 条带, 用 *Xho* I 和 *Kpn* I 进行酶切, 电泳出现约 1 500 bp 条带, 与预测结果一致, 见图 2 和图 3, 得到重组质粒 pICAS-H-PSA6. 测序结果证明插入表达质粒的目的基因序列与设计一致, 与 GenBank 序列比对, 核苷酸序列一致性达 99.9%, 氨基酸序列一致性达 100%. 载体 pICAS-H 所含的葡萄糖淀粉酶分泌信号肽序列使展示蛋白分泌至胞外, 融合蛋白的 α 凝集素共价连接到细胞壁的葡聚糖上, 使展示蛋白锚定在酵母细胞表面, 展示蛋白与 α 凝集素之间有 6 $\times$ His.tag 标签方便检测.

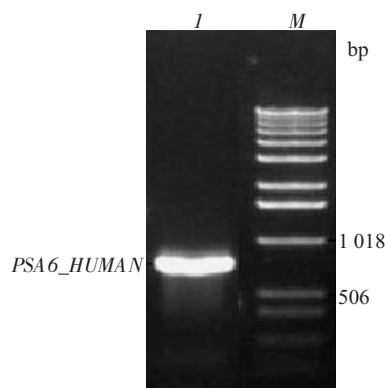


Fig. 2 PCR product of *PSA6_HUMAN* gene

M: DNA 1 kb ladder; I: PCR product.

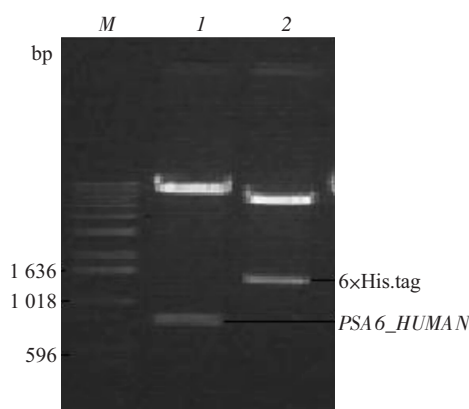


Fig. 3 Restriction analysis of the construction of the expression vector pICAS-H-PSA6

M: DNA 1kb ladder; 1: *PSA6_HUMAN*; 2: 6 $\times$ His.tag

2.2 重组酵母抗原蛋白展示分析

酵母 MT8-1 是 *Leu*、*His*、*Ade*、*Ura* 和 *Trp* 缺陷型菌株, 只有重组质粒整合入其基因组中, 表达合成 *Trp*, 菌株才能在只含有 *Leu*、*His*、*Ade* 和 *Ura* 的选择性培养基 SD 或者 SD-CAA 中生长, 从

而起到筛选作用. 线性化重组质粒转化 MT8-1 后的重组子涂布 SD 平板, 经 Colony PCR 鉴定, 诱导表达工程菌株, 筛选表达量较高的重组酵母 (结果未显示).

以 His.tag 单抗与重组菌 $\alpha 6$ -MT8 进行免疫荧光实验, 流式细胞仪检测酵母表面的平均荧光强度 (X-mean) 间接反映抗原 $\alpha 6$ 的展示表达量大小. 由于酵母表面有微弱的自荧光, 或与一抗产生非特异性结合, 取重组酵母 pI 作为阴性对照, 经相同的培养过程和荧光染色处理, 在 495 nm 激发光激发下, 重组酵母 $\alpha 6$ -MT8 表面有明显的特异性荧光, 对照组 pI 近乎无荧光, $\alpha 6$ -MT8 的 X-mean 值为 pI 的 4 倍 (图 4). 通过荧光显微镜可看到, 有明显表达的 $\alpha 6$ -MT8 细胞表面有一圈明显发射荧光 (图 5), 而

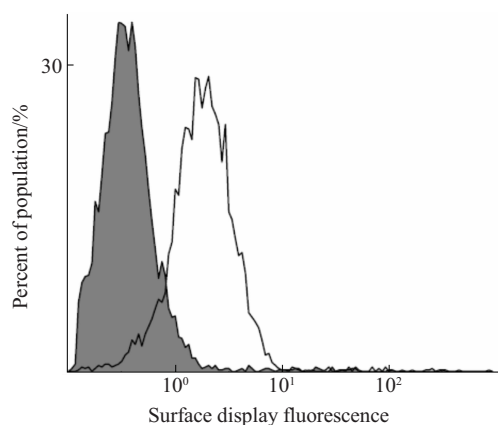


Fig. 4 Detection of the proteasome subunit alpha type 6 ($\alpha 6$) displayed on yeast surface

Mean($\alpha 6$ -MT8)=3.2, Mean(pI)=0.8. ■: pI(Control); □: $\alpha 6$.

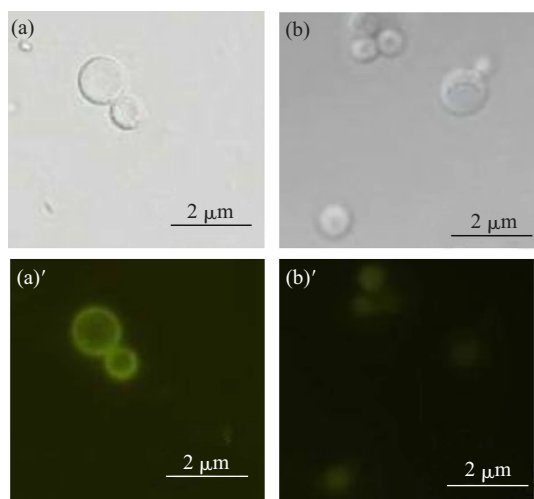


Fig. 5 Microscopic observations of transformed cells labeled with biotinylated FITC

Phase contrast micrographs (a, b) and immunofluorescence micrographs (a', b') of $\alpha 6$ -MT8 (a, a') and pI (b, b') as a control.

pI 则无荧光显示, 证明外源蛋白 $\alpha 6$ 被展示锚定在酵母细胞壁上. 选择高表达的工程酵母菌进一步研究其展示抗原 $\alpha 6$ 的抗原活性.

2.3 重组酵母展示抗原蛋白 $\alpha 6$ 的活性分析

为检测在酵母表面展示的人源蛋白酶体 α 亚基 6 能否形成正确的抗原表位, 将抗 $\alpha 6$ 单抗 3D7D12D4 分别在 1:100~1:10 000 5 个稀释度与 $\alpha 6$ -MT8 展示酵母进行免疫荧光实验 (pI 酵母为阴性对照). 经流式细胞仪检测, 在单抗 3D7D12D4 稀释度高达 1:10 000 时, $\alpha 6$ -MT8 的 X-mean 值与阴性对照有显著性差异, 表明展示在酵母表面的重组 $\alpha 6$ 蛋白具有较高的抗原活性 (图 6). 考虑到检测灵敏度和检测范围, 选取 1:3 000 作为单抗 3D7D12D4 的实验稀释度.

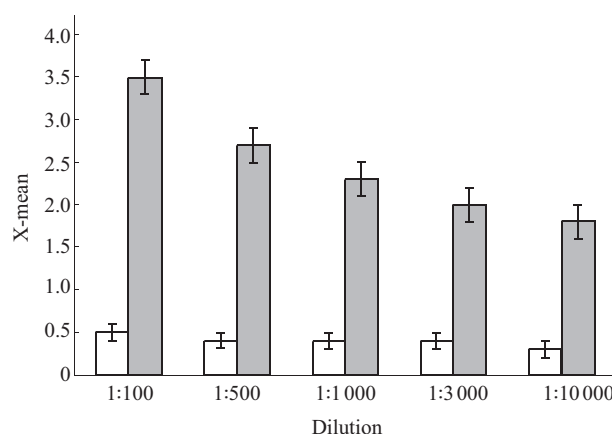


Fig. 6 Dilution detection of the immune activity of displayed $\alpha 6$ by monoclonal antibody 3D7D12D4

■: $\alpha 6$; □: pI-CAS.

在该稀释度下, 将 $\alpha 6$ 抗原高表达的 $\alpha 6$ -MT8 菌分别与单抗 3D7D12D4 和单抗 2G2E4D9 (正常对照) 作用, 经荧光染色, $\alpha 6$ -MT8 菌体与单抗 3D7D12D4 作用染色的 X-mean 值为阴性对照 pI 的 5 倍以上 (图 7), 为正常对照的 4 倍以上 (数据未显示). 在荧光显微镜下观测, 与单抗 3D7D12D4 反应的 $\alpha 6$ -MT8 表面有明显绿色荧光 (图 8), 阴性对照 pI 和正常对照则无明显荧光. 以上数据表明, 展示在酵母细胞壁上的外源蛋白 $\alpha 6$ 与抗 $\alpha 6$ 单抗 3D7D12D4 有较强的特异性结合力, 酵母展示的 $\alpha 6$ 蛋白可以形成有高亲和力的抗原表位, 提示 $\alpha 6$ 蛋白展示酵母可用于进一步的 yeast-ELISA 研究.

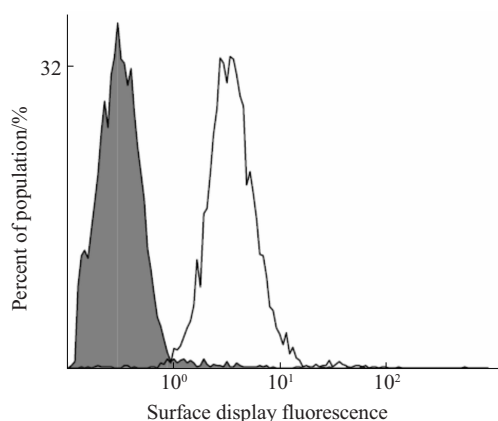


Fig. 7 Detection of the immune activity of displayed $\alpha 6$
Mean($\alpha 6$ -MT8)=4.3, Mean(pI)=0.8. ■: pI(Control); □: $\alpha 6$.

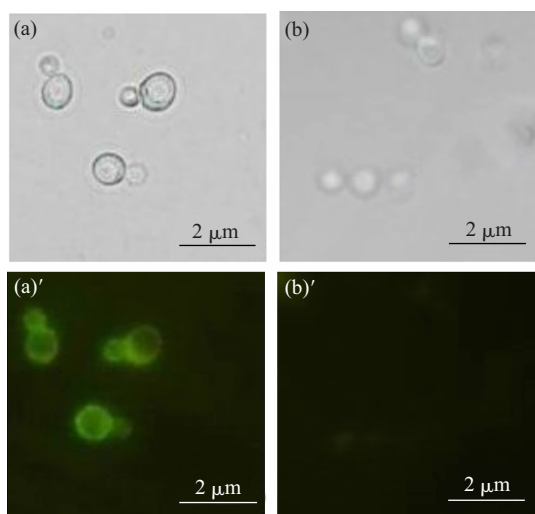


Fig. 8 Microscopic observations of transformed cells labeled with biotinylated FITC

Phase contrast micrographs (a, b) and immunofluorescence micrographs (a', b') of $\alpha 6$ -MT8 (a, a') and pI (b, b') as a control.

2.4 酵母酶联免疫吸附测定 (yeast-ELISA) 小鼠单克隆抗体

常用的血清学检测方法, 如蛋白质印迹、噬菌体展示和 ELISA, 都不能在蛋白质天然的构象下分析, 所以在检测、筛选抗体方面的应用受到一定限制. 酵母表面展示的抗原蛋白能进行近天然状况的折叠, 而且酵母具有颗粒化与可再生等特点, 可绕过抗原蛋白的生产和纯化等繁琐过程, 制备方法简单, 有利于高通量的抗体的检测、筛选和制备. 本研究将高效展示 $\alpha 6$ 抗原的重组酵母 $\alpha 6$ -MT8, 采用 yeast-ELISA 的方法检测抗 $\alpha 6$ 蛋白的抗体.

yeast-ELISA 实验结果如图 9, 重组酵母 $\alpha 6$ -MT8 与抗 $\alpha 6$ 单抗 3D7D12D4 反应的平均 A_{492}

值比阴性对照组(pI+3D7D12D4)高出 1 倍, 而与正常对照组($\alpha 6$ +2G2E4D9)相比仍有明显区别, 这与免疫荧光实验中 $\alpha 6$ -MT8 与非对应单抗 2G2E4D9 反应未检测到明显的发射荧光(数据未给出)结果一致. 结果显示: 展示在酵母表面的 $\alpha 6$ 蛋白具有抗原特异性, 且具有良好的重现性, 为进一步对应的抗 $\alpha 6$ 单抗 yeast-ELISA 检测方法的建立打下物质基础.

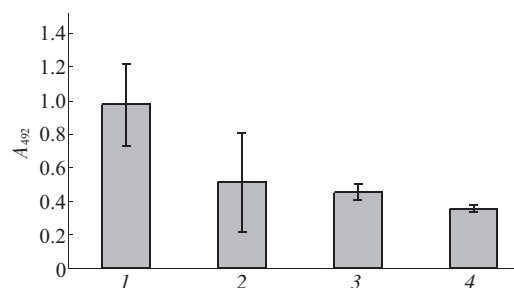


Fig. 9 Detection of monoclonal antibody 3D7D12D4 by yeast-ELISA

■: Mean dilution, 1 : 500. 1: $\alpha 6$ +3D7D12D4; 2: pI+3D7D12D4; 3: $\alpha 6$ +2G2E4D9; 4: Control.

3 讨 论

酵母展示体系除继承了噬菌体展示的表现型与基因型一致和易于扩增的特性外, 还可用荧光激活细胞分选仪(FACS)进行表面蛋白的高通量检测、鉴定和筛选. 美国麻省理工大学的 Wittrup 教授利用酵母展示体系表达和筛选抗体和受体蛋白获得成功, 还对一些受体蛋白的抗体表位进行了分析和预测. 日本京都大学的植田充美教授应用酵母展示体系在酶分子筛选与极端微生物选育等方面取得重要进展, 并发展了新型的全细胞免疫吸附剂等. 酵母展示技术通过构建抗体库筛选与抗原特异结合可以得到高亲和性抗体, 除了报道的展示乙肝病毒表面抗原开发口服疫苗、T 细胞受体的配体和单链 T 细胞受体的应用研究后, 最近又报道了展示抗体 Fab 片段和单链抗体可变区片段(scFv)的工程酵母, 由此可见, 在酵母表面展示具有抗原活性的蛋白质对于蛋白质组学和抗体组学研究具有重要的意义.

大规模的抗体制备为蛋白质组学的研究提供了基础, 但高纯度重组抗原蛋白的制备却成为抗体筛选与制备的瓶颈, 酵母展示技术可成为解决这一瓶颈问题的途径之一, 尤其是糖基化蛋白和膜蛋白, 已有实验证明这些蛋白质能在酵母展示体系中有较好的表达效率. 此外, 酵母表面展示的抗原蛋白能

进行接近天然状况下的折叠, 在目前血清学分析常用的蛋白质印迹和 ELISA 等方法受到局限时, 通过酵母表面展示将会鉴定出能进行翻译后修饰或形成构象表位后才产生的免疫应答作用, 这是对传统的 SEREX(重组 cDNA 表达文库血清学分析法)的突破. 我们在单克隆抗体制备研究工作中发现, 人源蛋白酶体 α 亚基 6($\alpha 6$)基因 *PSA6_HUMAN* 与 GST 在酵母中融合表达时出现产量低和纯化困难的不足, 影响了单克隆抗体制备和筛选工作的进展. 本文利用酵母展示体系成功将人源蛋白酶体 α 亚基 6($\alpha 6$)展示在酿酒酵母 MT8-1 表面, 筛选一株高表达量重组菌 $\alpha 6$ -MT8, 经流式细胞仪和荧光显微镜检测证明, 酵母展示的 $\alpha 6$ 抗原与对应抗体有较高的特异性结合力, yeast-ELISA 的初步实验证实, 高效展示 $\alpha 6$ 抗原的重组酵母 $\alpha 6$ -MT8 可直接应用与检测抗 $\alpha 6$ 的抗体, 重现性与特异性良好, 解决了大规模单克隆抗体筛选和制备的瓶颈问题.

此外, 人源蛋白酶体 α 亚基 6($\alpha 6$)酵母展示体系的成功构建及其单克隆抗体的获得, 为抗体表位分析和进一步泛素 - 蛋白酶体途径的研究奠定了物质基础. 通过酵母表面展示 α 亚基在结构域水平描绘出抗体的抗原决定簇的分布, 可从氨基酸残基水平确定不连续和热变性单克隆抗体结合抗原决定簇, 从而更精确地确定抗体的抗原决定簇的分布^[12]. 同时, 利用 α 亚基抗原活性筛选可抑制蛋白酶体活性的抗体, 为有效地研究、调控泛素 - 蛋白酶体系统提供有效的途径.

参 考 文 献

- Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin : structure, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1695** (123): 55~72
- Glickman M H, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*, 2002, **82** (2): 373~428
- Burger A M, Seth A K. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *European J Cancer*, 2004, **40** (15): 2217~2229
- Hatakeyama S, Nakayama K I. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **302** (4): 635~645
- Shiraga S, Kawakami M, Ueda M. Construction of combinatorial library of starch-binding domain of *Rhizopus oryzae* glucoamylase and screening of clones with enhanced activity by yeast display method. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, **28** (4): 229~234
- Cappellaro C, Hauser K, Mrsa V, *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction. *EMBO J*, 1991, **10** (13): 4081~4088
- Shiraga S, Ueda M, Takahashi S, *et al.* Construction of the combinatorial library of *Rhizopus oryzae* lipase mutated in the lid domain by displaying on yeast cell surface. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **17** (3): 167~173
- Blaise L, Wehnert A, Steukers M P G, *et al.* Construction and diversification of yeast cell surface displayed by yeast mating: application to the affinity maturation Fab antibody fragments. *Gene*, 2004, **342** (2): 211~2181
- Cochran J R, Kim Y S, Olsen M J, *et al.* Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments. *J Immunol Methods*, 2004, **287** (1): 147~158
- Hirota F, Takanori T, Hideki F, *et al.* Development of novel yeast cell surface display system for homo-oligomeric protein by coexpression of native and anchored subunits. *Biotechnol Prog*, 2006, **22** (4): 994~997
- Ravindranath M H, Bauer P M, Cornillez-Ty C, *et al.* Quantitation of the density of cell surface carbohydrate antigens on cancer cells with a sensitive cell-suspension ELISA. *J Immunological Methods*, 1996, **197** (1): 51~67
- Chao G, Cochran J R, Wittrup K D. Fine epitope mapping of anti-epidermal growth receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. *J Molecular Biology*, 2004, **342** (2): 539~550

Display of Proteasome Subunit Alpha 6 on The Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae**

TANG Yu-Qian, YE Mao, LIN Ying**, HAN Shuang-Yan,
ZHENG Hong, WANG Xiao-Ning, LIANG Shi-Zhong

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract In order to construct the yeast display system of the human proteasome subunit alpha 6 ($\alpha 6$) and obtain its specific monoclonal antibodies for epitope analysis and mechanism investigation of ubiquitin-proteasome pathway, and set up a new rapid efficient way for the preparation of specific monoclonal antibodies (MAbs) without proteantigens which applicated recombinant antigen into detection directly, the gene *PSA6_HUMAN* coding human proteasome subunit alpha 6 was cloned into a yeast-displaying expression vector, pICAS-H, which had been inserted a His.tag marker for expression level detection. As probed with a His.tag monoclonal antibody and a specific monoclonal antibody generated by hybridoma, a recombinant yeast strain, $\alpha 6$ -MT8, was selected by flow cytometry and fluorescence microscopy analysis. Combining with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), ‘yeast-ELISA’ detection was established by basing on *Saccharomyces cerevisiae* cell surface engineering and applied to examined monoclonal antibody and its valance. The yeast-displaying recombinant antigen $\alpha 6$ with highly specific affinity was expressed efficiently after 48 h cultivation. The ‘yeast-ELISA’ was demonstrated primarily to detect and screen monoclonal antibody successfully.

Key words ubiquitin-proteasome pathway, proteasome subunit alpha 6, yeast surface display, antibody detection

*This work was supported by a grant from The National Science and Technology Research and Development Program of China (2004BA711A20).

**Corresponding author . Tel: 86-20-39380698, 13538997829, E-mail: feylin@scut.edu.cn

Received: March 2, 2007 Accepted: May 24, 2007