

酵母表面展示-酶联免疫吸附测定法的建立*

叶茂 韩双艳 林影** 唐语谦 王小宁

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510640)

摘要 以表面展示人源蛋白酶体 α 亚基 6 蛋白的重组酵母细胞, 结合酶联吸附免疫原理检测技术, 以表面展示有人源蛋白酶体 α 亚基 6 (proteasome subunit alpha 6, PS α 6) 的重组酵母细胞及其对应的单克隆抗体 3D7D12D 为研究对象, 建立酵母酶联免疫吸附 (yeast-ELISA) 检测技术, 应用于检测小鼠单克隆抗体及单抗效价. 应用该方法最佳酵母浓度为 $0.50 A_{600}$; 测得单抗效价为 $1:5 \times 10^5$, 与常规 ELISA 效价接近; 交叉试验和阻断试验表明该方法特异性强; 同时该方法可用于检测抗血清. 结果表明, yeast-ELISA 可直接应用于检测单抗, 测得效价与常规抗原包被间接 ELISA 具有良好一致性, 特异性好, 无交叉反应性.

关键词 酵母表面展示, 抗体检测, 酶联免疫吸附测定法

学科分类号 Q5, R392

近几年, 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 作为真核细胞表面展示体系, 以其能对表达蛋白翻译后的修饰加工、遗传操作简便和易于培养等优势, 在细胞催化剂、环境治理、蛋白质文库筛选、高亲和抗体、生物传感器、抗原/抗体库构建、癌症诊断等领域得到极大的发展和应用^[1]. 研究表明, 酵母表面展示的抗原/抗体蛋白能进行接近天然状况下的折叠^[2,3], 这为我们应用酵母展示抗原检测抗体技术提供研究基础.

酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 是一种常规免疫学检测技术, 操作简便易行并可以定量检测, 是较为经济实用的检测方法^[4]. 一般来讲, ELISA 多以可溶性物质为包被抗原, 重组蛋白作为抗原表达后需要多步纯化, 对于膜蛋白、糖基化蛋白更困难. 随着蛋白质组学和抗体组学研究的蓬勃发展, 重组蛋白抗原包被 ELISA 在抗体检测和鉴定上显得力不从心^[5].

本文以人源蛋白酶体 α 亚基 6 (proteasome subunit alpha 6, PS α 6) 为研究对象^[6], 通过结合酵母表面展示技术与 ELISA 技术, 初步建立了酵母-酶联免疫吸附 (yeast-ELISA) 检测技术, 并应用于检测单克隆抗体和抗血清, 为下一步酵母展示抗原技术应用于高通量筛选抗体奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

重组酵母 MT8-1- α 6 (携带重组质粒 pICAS- α 6, 能在酵母表面展示人源蛋白酶体 α 亚基 6) 及酵母 MT8-1-pICAS (不展示人源蛋白酶体 α 亚基 6), 由本实验室构建并保存^[7]. 单抗 3D7D12D4 (杂交瘤细胞株编号), 由重组人源蛋白酶体 α 亚基 6 免疫小鼠制备, 亚型 I gG₁; 单抗 2G2E4D9 (杂交瘤细胞株编号), 由重组人源谷胱甘肽硫基转移酶 kappa 1 (GST13-13) 免疫小鼠制备, 亚型 I gG₁; 单抗 1G9G5F9 (杂交瘤细胞株编号), 由重组复制蛋白 A2 (PRA2, RP-A, RF-A) 免疫小鼠制备, 亚型 I gG₁; HPS α 6 蛋白免疫小鼠所得抗血清 002; 小鼠正常血清, 均由本实验室联合广州泰默公司制备并保存.

1.2 主要试剂和仪器

牛血清白蛋白 (BSA) (北京鼎国公司), HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗 (博士德公司, BA1050); SURISE 酶标仪 (TECAN 公司).

* 国家科技攻关计划项目 (中国人类肝脏蛋白质组计划, 863 计划, 973 项目, 2004BA711A20).

** 通讯联系人.

Tel: 020-87112748, Fax: 020-39380606, E-mail: feylin@scut.edu.cn

收稿日期: 2007-03-04, 接受日期: 2007-04-02

1.3 方法

1.3.1 重组酵母 MT8-1- $\alpha 6$ 的诱导表达并检测. 参见文献[6]培养重组酵母细胞, 将洗涤好的重组酵母菌置于含 1% BSA 的 PBS 悬浮过夜, 并调酵母浓度 $A_{600}=10$, 4℃ 保存备用. 流式细胞仪检测抗原的表达.

1.3.2 酵母-酶联免疫吸附测定(yeast-ELISA)的流程. 取 50 μl 上述 (1.3.1) 酵母细胞于 1.5 ml 微型管, 离心弃上清; 加入 100 μl 一定稀释度的单抗, 37℃ 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 及 0.05% Tween-20) 离心洗涤 3 次; 加入 100 μl HRP 标记羊抗小鼠 IgG 二抗 (稀释度 1:5 000), 37℃ 温育 45 min, PBS-T 洗涤 3 次; 最后一次洗涤后, 把酵母细胞移至新 1.5 ml 微型管, 加入反应底物 (OPD) 150 μl , 37℃ 避光反应

20 min; 离心取上清 100 μl 至酶标板各孔 (各孔均已含 50 μl 2 mol/L H_2SO_4) 终止反应; 酶标仪 A_{492} 检测[7,8].

1.3.3 yeast-ELISA 中重组酵母工作浓度的确定. 分别选取重组酵母 MT8-1- $\alpha 6$ 和空载酵母 MT8-1-pICAS 浓度 $A_{600}=0.10, 0.50, 1.00$ 和 2.00, 一抗单抗 3D7D12D4 作 1:500 稀释, 按 yeast-ELISA 操作流程检测.

1.3.4 特异性试验参考文献[9]

a. 阻断试验. 取单抗 3D7D12D4 按 1:1 000 和 1:100 000 稀释, 与 10 倍最佳工作浓度的重组酵母 MT8-1- $\alpha 6$ 混合均匀, 37℃ 作用 2 h (或 4℃ 过夜), 离心取上清, 按 yeast-ELISA 操作步骤, 检测 A_{492} ; 同时取未处理的单抗 3D7D12D4 按同等稀释度做 yeast-ELISA, 检测 A_{492} . 按下列公式计算阻断率:

$$\text{阻断率} = \frac{(\text{阻断前 } A \text{ 值} - \text{空白 } A \text{ 值}) - (\text{阻断后 } A \text{ 值} - \text{空白 } A \text{ 值})}{\text{阻断前 } A \text{ 值} - \text{空白 } A \text{ 值}} \times 100\%$$

b. 交叉试验. 采用本实验室制备的其他抗原所得单克隆抗体 2G2E4D9 和 1G9G5F9, 与抗 HPS $\alpha 6$ 单抗 3D7D12D4 同时倍比稀释, 进行 yeast-ELISA 检测.

1.3.5 yeast-ELISA 检测单抗灵敏度. 取重组酵母细胞 MT8-1- $\alpha 6$ 与酵母 MT8-1-pICAS 按 yeast-ELISA 操作步骤, 确定 yeast-ELISA 单抗 3D7D12D4 最大效价.

1.3.6 yeast-ELISA 检测抗血清. 取重组酵母细胞 MT8-1- $\alpha 6$ 按 yeast-ELISA 操作步骤, 分别以酵母 MT8-1-pICAS 和正常血清作为阴性对照, 检测 HPS $\alpha 6$ 蛋白免疫抗血清.

1.3.7 统计学方法. 本实验所有数据处理均采用 OriginPro 7.5 统计软件.

2 结 果

2.1 流式细胞仪检测酵母表面 HPS $\alpha 6$ 的展示

以酵母 MT8-1-pICAS 为对照, 分别用小鼠抗 His 标签抗体和针对抗原蛋白 HPS $\alpha 6$ 的单抗 3D7D12D4 检测重组酵母 MT8-1- $\alpha 6$ 表达情况, 通过流式细胞仪检测, 结果表明, 抗原蛋白 HPS $\alpha 6$ 成功展示在重组酵母 MT8-1[6].

2.2 重组酵母工作浓度的确定

不同浓度的酵母细胞做 yeast-ELISA 检测, 结

果显示, 当酵母浓度为 $A_{600}=0.50$ 时, 与酵母 MT8-1-pICAS A_{492} 相比, 重组酵母细胞 MT8-1- $\alpha 6$ 的 A_{492} 差值最大, 所以采用酵母浓度 $A_{600}=0.50$ 作为 yeast-ELISA 检测技术的最佳酵母工作浓度 (图 1).

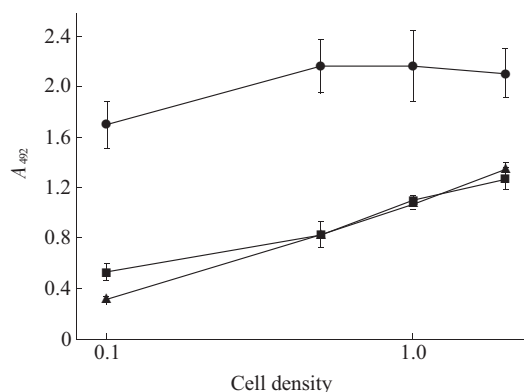


Fig. 1 Selection of working concentration of yeast-ELISA

HPS $\alpha 6$: Recombination yeast cell MT8-1- $\alpha 6$, with monoclonal antibody 3D7D12D4; pICAS: Yeast cell MT8-1-pICAS, with monoclonal antibody 3D7D12D4; Blank control: Without primary antibody, only incubation with second antibody; Dilution of monoclonal antibody 3D7D12D4: 1:500. ●—●: HPSA6; ▲—▲: Blank control; ■—■: pICAS.

2.3 yeast-ELISA 的特异性试验

2.3.1 阻断试验. 用重组酵母细胞 MT8-1- $\alpha 6$ 与不

同稀释度的单抗 3D7D12D4 作用后, 其 A_{492} 值明显降低, 结果显示, 单抗 3D7D12D4 能被 MT8-1- $\alpha 6$ 阻断其阳性反应, 表明, MT8-1- $\alpha 6$ 能和抗 HPS $\alpha 6$ 发生抗原抗体特异性结合反应. 结果见表 1.

Table 1 Results of interdiction test		
	The dilution of Mab 3D7D12D4	
	1 : 1 000	1 : 100 000
A_{492} before interdiction	2.4570 ± 0.1637	1.6337 ± 0.0724
A_{492} after interdiction	1.5787 ± 0.0541	0.7797 ± 0.0805
A_{492} of blank control	0.7290 ± 0.0488	
Interdiction rate/%	50.83	94.40

2.3.2 交叉试验. 按稀释梯度, 以其他无关蛋白制备的单抗 1G9G5F9 和单抗 2G2E4D9 为阴性对照, 以及单抗 3D7D12D4 为阳性对照, 进行交叉试验. 结果表明, 含抗原蛋白 HPS $\alpha 6$ 重组酵母菌 MT8-1- $\alpha 6$ 与单抗 3D7D12D4 发生特异性结合, 与单抗 1G9G5F9 和单抗 2G2E4D9 不发生交叉反应 (图 2).

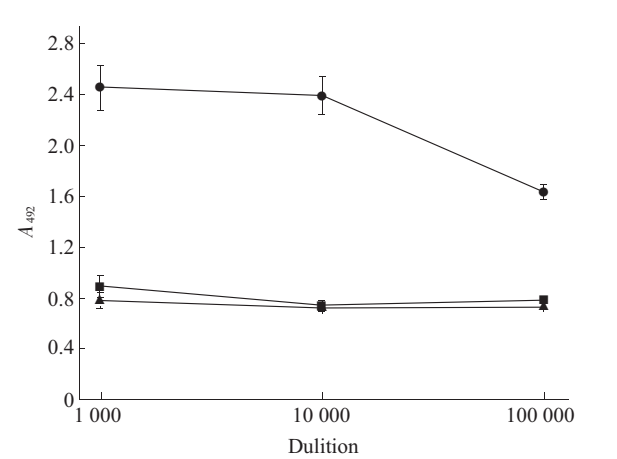


Fig. 2 Result of crossing test of yeast-ELISA
Blank control $A_{492} \approx 0.77$ (data no show). ●—●: 3D7D12D4; ▲—▲: 1G9G5F9; ■—■: 2G2E4D9.

2.4 yeast-ELISA 检测单抗

我们用该方法检测单抗 3D7D12D4 的效价, yeast-ELISA 测得单抗 3D7D12D4 的最大效价为 $1 : 5 \times 10^5$ (图 3), 与使用重组蛋白包板测得的效价 1×10^6 接近, 表明 yeast-ELISA 检测技术具有接近常规 ELISA 的灵敏度.

2.5 yeast-ELISA 检测抗血清

重组蛋白 HPS $\alpha 6$ 蛋白免疫小鼠所得抗血清 002 (常规 ELISA 检测的效价约为 $1 : 10^5 \sim 1 : 10^6$),

在稀释度为 $1 : 500$ 时, MT8-1- $\alpha 6$ 的 A_{492} 值比阴性对照空载 pICAS 高, 比正常血清对照的 A_{492} 值也高 0.8 (图 4), 表明 yeast-ELISA 检测技术可用于检测抗血清.

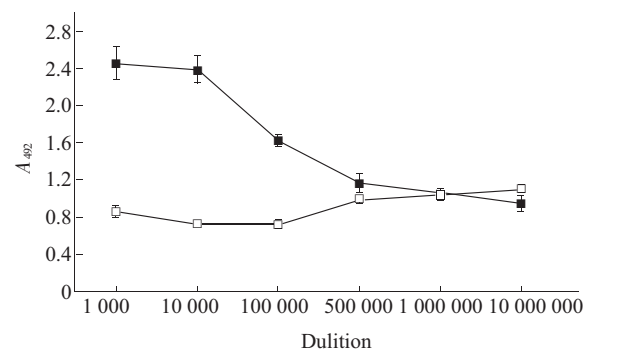


Fig. 3 Detection of dilution of monoclonal antibody 3D7D12D4 by yeast-ELISA
HPS $\alpha 6$: Recombination yeast cell MT8-1- $\alpha 6$, with monoclonal antibody 3D7D12D4; pICAS: Yeast cell MT8-1-pICAS, with monoclonal antibody 3D7D12D4; Blank control: Without primary antibody, only incubation with second antibody, $A_{492} \approx 0.85$ (data no show). ■—■: HPS $\alpha 6$; □—□: pICAS.

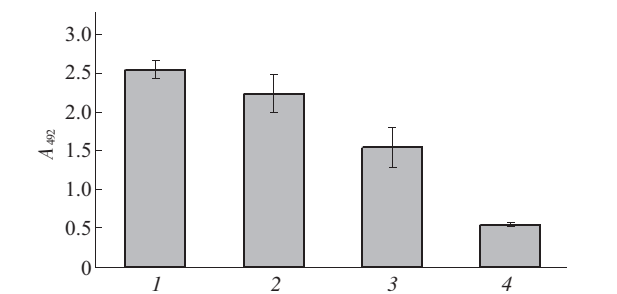


Fig. 4 Antiserum detection by yeast-ELISA
 $\alpha 6$: Recombination yeast cell MT8-1- $\alpha 6$, pICAS: Yeast cell MT8-1-pICAS, Blank control: Without primary antibody, only incubation with second antibody. 1: $a6 + antiserum002$; 2: $pICAS + antiserum002$; 3: $a6 + serum$; 4: Blank control. ■: Mean dilution: $1 : 500$.

3 讨 论

近年来酵母表面展示系统在蛋白质组学和抗体组学中的应用得到了迅猛的发展, 在报道的展示乙型肝炎病毒表面抗原开发口服疫苗、T 细胞受体(TCR)的配体和单链 T 细胞受体(TCR)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)的展示工程酵母. 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进行抗体检测、筛选以及治疗具有重要价值^[1].

酵母表面展示抗原应用在检测抗体方面鲜有报道, 仅 Mischo 等^[2], Wang 等^[10]和本实验室^[6]有报道

利用展示了抗原的酵母结合流式细胞仪检测对应抗体,特异性和灵敏度与蛋白质印记和 ELISA 检测技术等相当.但采用的流式细胞仪较为昂贵,一般实验室条件难以实现,可能出现荧光染料的非特异性结合及荧光淬灭等问题^[1].酶联免疫吸附测定法(ELISA),是应用极为广泛的检测技术之一,具有简便快速、成本较低、以及特异性和灵敏度高等优点^[2],报道较少的 whole-cell ELISA 与我们建立的 yeast-ELISA 原理上也截然不同, whole-cell ELISA 方法主要利用已知抗体检测细胞表面蛋白^[8,12],结合流式细胞仪检测^[13].

本研究以表面展示人源蛋白酶体 α 亚基 6 (proteasome subunit alpha 6, PS α 6) 酵母和常规抗原蛋白 HPS α 6 免疫小鼠制备的单克隆抗体为研究对象,首次将酵母展示抗原技术与酶联免疫吸附检测技术结合,建立简便可实现高通量操作的 yeast-ELISA 检测抗体技术,可成功检测单克隆抗体和抗血清.实验结果表明, yeast-ELISA 检测技术应用于检测单抗,有良好的重现性和特异性,无交叉反应, yeast-ELISA 检测单抗效价在 $1:5 \times 10^5$ 左右,与抗原蛋白 HPS α 6 包被间接 ELISA 所检测的 $1:10^6$ (数据未显示)相比较,具有良好的相关性, yeast-ELISA 检测灵敏度接近与常规抗原包被 ELISA.同时, yeast-ELISA 也可用来检测重组蛋白免疫抗血清.

当前生产单抗的常规方法是用纯化的、较大量的重组蛋白免疫小鼠,再用重组蛋白包被、ELISA 方法筛选单抗.而实际上,单抗往往受限于蛋白质制备、纯化,尤其是难以制备的膜蛋白、活性蛋白等.本文研究用于免疫小鼠生产单克隆抗体的重组抗原蛋白 HPS α 6 由华大基因组研究中心提供,来源于重组酵母分泌表达,即遇到了表达量低、纯化困难、规模化和高通量单克隆抗体筛选受到严重制约. yeast-ELISA 检测技术采用表面展示含目的抗原的酵母重组细胞代替重组蛋白抗原,避开重组蛋白的制备纯化困难的瓶颈,通过简单的诱导培养,一步离心即获得可直接应用的“天然抗原”细胞,效率高,成本低.将 yeast-ELISA 技术与实验室已成功获得的无蛋白 DNA 免疫制备单克隆抗体技术结合^[14],有望建立高通量无蛋白单克隆抗体制备体系.

实验中,我们初步建立了 yeast-ELISA 检测技术,发现了一些问题,如测得单抗效价比抗原蛋白间接 ELISA 检测结果略低,灵敏度相对较低,以

及实验本底偏高(特别是检测抗血清)等不足之处,目前我们正在进行多方面实验改进,如:进一步提高酵母展示抗原的表达量,减少非特异性吸附等力求进一步地完善 yeast-ELISA 检测技术.

本文的研究结果提示, yeast-ELISA 是对常规 ELISA 提供有效补充和发展,为酵母展示抗原应用于高通量筛选抗体、抗体表位鉴定奠定了实验基础.

参 考 文 献

- 1 肖朝廷,傅衍,田勇.酿酒酵母细胞表面工程应用研究的新进展.微生物学报,2005, **45** (5): 812~815
Xiao C T, Fu Y, Tian Y. Acta Microbiology Sinica, 2005, **45** (5): 812~815
- 2 Mischo A, Wadle A, Watzig K, et al. Recombinant antigen expression on yeast surface(RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. Cancer Immunity, 2003, **3** (6): 5
- 3 Wadle A, Mischo A, Imig J, et al. Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. Int J Cancer, 2005, **117** (5): 1104~1132
- 4 焦奎,张书圣.酶联免疫分析技术及应用.北京:化学工业出版社,2004. 141~156
Jiao K, Zhang S S. Enzyme-Linked Immuno Assay and Its Application. Beijing: Chemical Industry Press, 2004. 141~156
- 5 李建伟,白侠,李曦,等.应用 ELISA 与 IFA 检测 MDV 单克隆抗体的比较.黑龙江畜牧兽医,2000, **6** (6): 19~20
Li J W, Bai X, Li Y, et al. Heilongjiang Journal of animal Science and Veterinary Medicine, 2000, **6** (6): 19~20
- 6 唐语谦,叶茂,林影,等.人源蛋白酶体 α 亚基 6 (Proteasomesubunit alpha 6)在酿酒酵母表面展示的研究.生物化学与生物物理进展,2007, **34** (9): 984~990
Tang Y Q, Ye M, Lin Y, et al. Prog Biochem Biophys, 2007, **34** (9): 984~990
- 7 Hirotaka 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** (6): 994~997
- 8 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. Immunological Methods, 1996, **197** (5): 51~67
- 9 范薇,于长明,杨敬,等.重组钩端螺旋体外膜蛋白酶联免疫吸附(ELISA)检测方法的建立.中国实验动物学报,2005, **13** (4): 249~253
Fan W, Yu C M, Yang J, et al. Acta Laboratorium Animals Scientia Sinica, 2005, **13** (4): 249~253
- 10 Wang X X, Cho Y K, Shusta E V. Mining a yeast library for brain endothelial cell-binding antibodies. Nature Methods, 2007, (4):143~145
- 11 辛忠涛,薛沿宁,柳川.流式细胞分选技术在微生物表面展示文库筛选中的应用进展.微生物学免疫学进展,2003, **31** (3): 62~67
Xin Z T, Xue Y N, Liu C. Progress in Microbiology and Immunology, 2003, **31** (3): 62~67

- 12 Jeong H, Yoo S, Kim E. Cell surface display of salmabin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom on *Escherichia coli* using ice nucleation protein. *Enzyme and Microbiological Technology*, 2001, **28** (7):155~160
- 13 Erdile L F, Smith D, Berd D. Whole cell ELISA for detection of tumor antigen expression in tumor samples. *Journal of Immunological Methods*, 2001, **258** (7): 47~53
- 14 郑泓, 韩双艳, 林影, 等. 质粒 DNA 单次脾内注射制备单克隆抗体. *生物工程学报*, 2007, **23** (4): 710~714
- Zheng H, Han S H Y, Lin Y, *et al.* *Chin J Biotech*, 2007, **23** (4): 710~714

Establishment of Yeast Surface Display-ELISA for The Detection of The Monoclonal Antibody*

YE Mao, HAN Shuang-Yan, Lin Ying**, Tang Yu-Qian, Wang Xiao-Ning

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

Abstract With *Saccharomyces cerevisiae* cell surface engineering, combining with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), a new method has been, which is named as ‘yeast-ELISA’ detection. Here, the recombination yeast cell MT8-1 surface display expressing antigen HPS α 6 (Human proteasome subunit α 6), and its monoclonal antibody 3D7D12D4 (hybridoma cell line No) was used as study object. The fitful yeast cell concentration of this method is 0.50 A_{600} , and it was used to detect monoclonal antibody and its valance (1 : 5 $\times$ 10⁵). The specificity and sensitivity of the method was demonstrated by crossing test and interdiction test. The results indicated that ‘yeast-ELISA’ could detect monoclonal antibody directly, and the valance of which is concordance with the result of the proteantigen indirect ELISA. And also this method could be used to antiserum detection, which also has good result. It demonstrates that the method of the ‘yeast-ELISA’ detection was established, which is the supply and application of *Saccharomyces cerevisiae* cell surface engineering.

Key words yeast surface display, antibody detection, ELISA

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

**Corresponding author: Tel: 86-20-87112748, Fax: 86-20-39380606, E-mail: feylin@scut.edu.cn

Received: March 4, 2007 Accepted: April 2, 2007