

玻尿酸合成酶的鲨鱼源单域抗体筛选

束树超^{1,2,3}, 徐明策^{1,2,3}, 哈承旭⁴, 周宇杭⁵, 邓鹏辉^{1,2,3}, 查丽莎⁵, 陈锦霖⁶, 陈建明⁶, 毕允晨^{1,2,3}

(1. 中国科学院海洋研究所, 中国科学院暨山东省实验海洋生物学重点实验室, 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室, 山东 青岛 266237; 4. 青岛海洋科技馆, 山东 青岛 266003; 5. 安徽农业大学, 安徽 合肥 230036; 6. 闽江学院海洋研究院, 福建 福州 350108)

摘要: 在鲨鱼等软骨鱼类体内存在天然的缺失轻链、仅包含重链的抗体, 源于这种重链抗体可变区的片段称为单域抗体(single domain antibody)。目前单域抗体研究中的抗原主要来源于水溶性蛋白或病原体, 筛选膜蛋白鲨鱼源单域抗体的领域接近空白。本研究以重组表达的小球藻病毒玻尿酸合成酶(一种膜蛋白)为抗原, 经过免疫、建库、淘选、验证等步骤获得了抗原特异性条纹斑竹鲨(*Chiloscyllium plagiosum*)单域抗体序列。随后利用大肠杆菌表达了该单域抗体, 通过等温滴定量热技术(ITC)测定了其与抗原的亲和力, 证实了以膜蛋白作为抗原制备鲨鱼源单域抗体的可行性。

关键词: 单域抗体; 纳米抗体; 玻尿酸合成酶

中图分类号: Q816

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2022)08-0111-10

DOI: 10.11759/hyxx20210118001

传统抗体是由两条重链和两条轻链组成的具有 Y 形结构、能够识别和结合抗原的蛋白质。每条重链包含一个可变区(VH)和三个恒定区(CH1、CH2、CH3), 每条轻链包含一个可变区(VL)和一个恒定区(CL)^[1](图 1)。其中, VH 和 VL 结构域共同发挥识别和结合抗原的作用。1993 年, 科学家在羊驼等骆驼科物种体内发现了天然的缺失轻链, 仅由重链形成的抗体^[2], 后来在鲨鱼等软骨鱼纲动物中也发现了类似的轻链缺失型重链抗体(heavy chain only antibody)^[3]。由于缺失轻链, 这种抗体中具有抗原识别与结合作用的只有重链可变区(如图 1, 在羊驼中称为 VHH, 在鲨鱼中称为 VNAR)。在体外, 这种重链可变区能够单独重组表达, 并发挥识别和结合抗原的作用^[4], 称为单域抗体, 也称为纳米抗体。

单域抗体具有由较长 Loop 柔性区域组成的抗原结合区^[5], 能够紧密结合到传统抗体不易识别的抗原表位, 其分子质量仅有 13 kDa 左右, 大约为传统抗体的十分之一, 且易于在大肠杆菌中大规模表达^[6], 能够显著降低制备成本。同时, 相较于传统抗体及其衍生物(如 Fabs、scFvs), 单域抗体具有更好的溶解度和稳定性^[7]。基于以上特点, 单域抗体被广泛应用于疾病诊疗、生化检测和蛋白质结构研究等领域。在疾

病诊疗方面, 用于治疗血栓性血小板减少性紫癜症的单域抗体药物 Cablivi[®](caplacizumab-yhdp)已经分别于 2018 年、2019 年和 2020 年获得了欧洲药品管理局、美国食品和药品管理局以及加拿大卫生部的上市批准^[8-9]。用于治疗风湿性关节炎^[10]、下呼吸道感染^[11]、乳腺癌^[12]和炎症性肠病^[13]等多种疾病的单域抗体药物也相继进入了临床试验阶段。另外, 由于其尺寸小, 易于代谢, 在医学造影剂领域也发挥了重要作用^[14]。在生化检测方面, 特异性识别绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的单域抗体产品已经上市, 能够应用于 GFP 融合蛋白的亲和纯化^[15]。在蛋白质

收稿日期: 2021-01-18; 修回日期: 2021-03-01

基金项目: 国家自然科学基金(41876168); 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋生物学与生物技术功能实验室引进人才支持计划(YJ2019NO03); 中科院合肥大科学中心高端用户培育基金(2020HSC-UE018)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, NSFC, No. 41876168; Scientific Research Foundation of Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), No. YJ2019NO03; Advanced Customer Cultivation Project of Hefei Science Center, Chinese Academy of Sciences, No. 2020HSC-UE018]

作者简介: 束树超(1994—), 男, 山东济宁人, 学士, 主要从事海洋蛋白质研究, 电话: 19801252213, E-mail: shushuchao18@mails.ucas.ac.cn; 毕允晨(1982—), 男, 研究员, 通信作者, E-mail: yunchenbi@qdio.ac.cn

结构研究方面,单域抗体能够稳定并锁定目的抗原蛋白的特定构象,有助于解决蛋白质结构生物学研究中关键的获得单一构象样品的问题。同时,在蛋白

质晶体学研究中,单域抗体本身可以作为潜在的晶体堆积界面,提高抗原蛋白-单域抗体复合物的结晶几率^[16]。

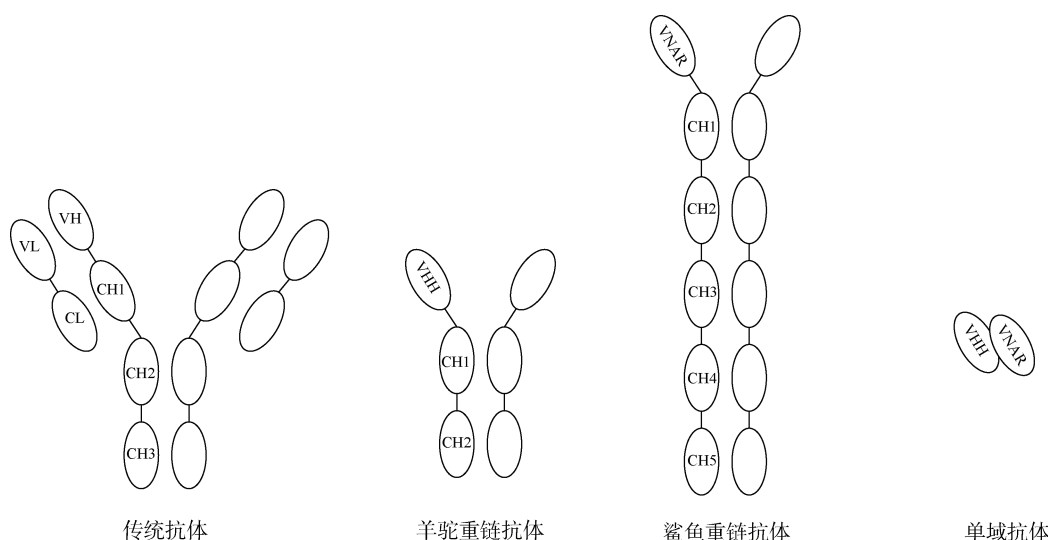


图1 传统抗体、羊驼源重链抗体、鲨鱼源重链抗体以及单域抗体的模式图

Fig. 1 Schematic of traditional antibodies, alpaca-derived heavy chain only antibodies, shark-derived heavy chain only antibodies and single domain antibodies

注: VL 为轻链可变区, VH 为重链可变区, CL 为轻链恒定区, CH 为重链可变区, VHH 为羊驼源单域抗体, VHAR 为鲨鱼源单域抗体

尽管羊驼源和鲨鱼源单域抗体具有相似的理化性质,但是受制于养殖条件等,鲨鱼源单域抗体的研究及应用还非常少。目前鲨鱼源单域抗体的研究主要集中在铰口鲨、斑纹须鲨等^[17-19],如周文锦等人完成了白鲢肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶单域抗体免疫库(铰口鲨源)构建及淘选^[19],UBAH 等人在铰口鲨源免疫文库中筛选了肿瘤坏死因子 α (TNF- α)特异性的单域抗体^[20]。这些鲨鱼物种体型较大,对养殖设施要求高且不易于实验操作。另外,在鲨鱼源单域抗体抗原选择方面,主要以水溶性蛋白或病原物为抗原进行鲨鱼免疫并筛选制备单域抗体^[21-22],很少使用膜蛋白作为抗原,而膜蛋白数量众多,并且在生物体内发挥重要作用,同时也是药物开发的重要靶标。因此,膜蛋白抗原的鲨鱼源单域抗体制备是领域内的研究热点和难点。

玻尿酸,又称透明质酸,是定位于细胞外基质的多糖,在胚胎发育、伤口修复、细胞增殖和分化,以及恶性肿瘤迁移等方面具有重要作用^[23-25]。玻尿酸合成酶是一种具有多个跨膜区域的膜蛋白,能够利用胞内的尿苷二磷酸-乙酰葡萄糖胺(UDP-NAG)和尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸(UDP-GA)为底物合成玻尿酸并将其跨膜转运到胞外发挥功能^[26]。尽管玻尿酸

合成酶的功能十分重要,但其行使功能的分子机理研究在其被发现后的几十年里一直没有得到突破。本研究选用体型较小、更易于开展免疫等实验操作步骤的条纹斑竹鲨,以玻尿酸合成酶为抗原,将其整合至脂质体后进行免疫,筛选并体外重组表达、纯化了鲨鱼源单域抗体,对其进行了亲和力测定并进行了抗体结合对抗原活性影响实验,为进一步的玻尿酸合成酶分子机理研究奠定了基础。

1 材料与方法

本研究主要包括玻尿酸合成酶的制备与前处理、单域抗体的筛选与体外重组表达纯化、单域抗体亲和力测定,以及单域抗体结合对抗原活性影响的测定等步骤。

1.1 玻尿酸合成酶的表达纯化

玻尿酸合成酶的表达纯化步骤参考以往文献^[27],略有修改。简要来说,将过夜培养的大肠杆菌 C43 (DE3)菌株接种至自诱导培养基,37 °C培养至 OD₆₀₀=0.6~0.8 时加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),30 °C培养 12~16 h;高速离心(8 000 r/min, 10 min)收集细菌菌体并重悬[缓冲液为 25 mmol/L 吗啉乙磺酸钠盐(MES)pH 6.5, 0.1 mol/L

氯化钠, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 10%甘油, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)]; 高压破碎细菌后超速离心收集沉降的膜组分(42 000 r/min, 1 h), 将该膜组分与膜蛋白提取缓冲液于 4 °C 混匀 1 h[20 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 7.5, 0.1 mol/L 氯化钠, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 10%甘油, 1 mmol/L PMSF, 1%十二烷基- β -D-麦芽糖苷(n-dodecyl- β -D-maltopyranoside, DDM, anatrace), 0.05%胆固醇半琥珀酸酯(cholesteryl hemisuccinate tris salt, CHS, anatrace), 40 mmol/L 咪唑], 超速离心收集上层清液(42 000 r/min, 30 min); 将上清与 Ni-NTA 填料(invitrogen)于 4 °C 孵育 1 h, 然后用洗涤缓冲液[25 mmol/L MES pH 6.5, 0.3 mol/L 氯化钠, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 10%甘油, 60 mmol/L 咪唑, 0.05%十二烷基麦芽糖乙戊二醇(lauryl maltose neopentyl glycol, LMNG, anatrace), 0.01% CHS]除去杂蛋白, 再用洗脱缓冲液(25 mmol/L MES pH 6.5, 0.3 mol/L 氯化钠, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 10%甘油, 300 mmol/L 咪唑, 0.05% LMNG, 0.01% CHS)洗脱得到目的蛋白。目的蛋白浓缩后, 使用缓冲液为 25 mmol/L MES pH 6.5, 0.2 mol/L 氯化钠, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 10%甘油的 Superdex S200 凝胶过滤柱(GE Healthcare)进一步纯化; 最终利用聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹实验检测目的蛋白纯化结果。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳实验显色方法为考马斯亮蓝染色, 免疫印迹实验所用一抗为组氨酸标签特异性鼠源单抗(CST, 2366S), 所用二抗为 HRP 偶联的鼠 IgG 特异性抗体(CST, 7076P2)。

1.2 玻尿酸合成酶活性检测实验

玻尿酸合成酶的活性检测实验参考以往文献^[26]。简要来说, 取 10 μ L 反应缓冲液(40 mmol/L 磷酸钠缓冲液 pH 7.2, 40 mmol/L 氯化镁, 10 mmol/L 二硫苏糖醇, 200 mmol/L 氯化钠, 10 mmol/L UDP-NAG, 10 mmol/L UDP-GA 和 0.2 μ Ci UDP-[³H]-NAG)与 10 μ L 玻尿酸合成酶(1 mg/mL)混合, 于 30 °C 水浴条件下反应 1 h, 加入 40 mmol/L EDTA 终止反应。通过纸层析法(展开液为 65% 1 mol/L 醋酸铵 pH 5.5, 35%乙醇)分离合成的玻尿酸多糖与未反应的底物, 利用液闪仪(PerkinElmer Tri-Carb 4910 TR)对产物进行检测。单域抗体结合对玻尿酸合成酶的活性影响实验步骤同上, 区别在于将 10 μ L 玻尿酸合成酶更换为 10 μ L 单域抗体与玻尿酸合成酶混合物(单域抗体和玻尿酸合成酶按照摩尔浓度比 3 : 1 于 4 °C 孵育 3 h, 其中玻尿酸合成酶的终浓度为 1 mg/mL)。

1.3 玻尿酸合成酶重组脂质体实验

制备去垢剂溶解的大肠杆菌全脂质(*E. coli* total lipid, Avanti)溶液, 浓度为 16 mg/mL, 将其与玻尿酸合成酶混合, 混合后玻尿酸合成酶浓度为 1 mg/mL, 大肠杆菌全脂质浓度为 4 mg/mL, 混合物 4 °C 孵育 3 h 后, 按照每毫升添加 0.5 g 的比例添加适量聚苯乙烯二乙烯基苯微球体(Biobeads, Bio-Rad), 4 °C 过夜混匀, 去除去垢剂分子。

1.4 鲨鱼免疫

将 50 μ g 玻尿酸合成酶抗原皮下注射条纹斑竹鲨, 随后, 每间隔 14 d 皮下注射抗原一次, 以加强免疫反应, 共完成 6 次免疫过程。

1.5 抗体库构建

从条纹斑竹鲨脾脏组织, 分离取得淋巴细胞, 采用 TRIzol 法提取淋巴细胞总 RNA, 根据条纹斑竹鲨 VNAR 区域保守序列设计引物, PCR、酶切后连入 pMES4 质粒。采用电转法将构建好的质粒转化大肠杆菌 ER2738 菌株, 构建得到单域抗体文库。

1.6 单域抗体淘选

用包被液(0.05 mol/L pH 9.6 碳酸钠缓冲液)将玻尿酸合成酶稀释为 10 μ g/mL 后转移至 96 孔酶标板, 4 °C 孵育过夜, 去除未结合的玻尿酸合成酶, 并用 3%BSA 封闭酶标板待用。取单域抗体文库接种于 50 mL LB 培养基中, 培养至指数期后, 加入 100 μ L 辅助噬菌体(M13KO7, 10⁹ pfu/mL), 37 °C 继续培养 1.5 h。离心(8 000 r/min, 3 min)后用 2YT 培养基(已提前加入 100 μ g/mL 氨苄青霉素, 50 μ g/mL 卡那霉素)重悬细菌沉淀, 30 °C 过夜培养, 离心(8 000 r/min, 5 min)收集上清, 加入 10 mL 聚乙二醇/氯化钠沉淀噬菌体, 离心(5 000 r/min, 30 min)后用磷酸钠缓冲液溶解噬菌体沉淀。取前述待用酶标板, 加入上述噬菌体溶液, 孵育后洗去背景。用 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L pH 2.2)洗脱结合玻尿酸合成酶的噬菌体, 添加 100 mL ER2738 菌液(OD₆₀₀=0.6), 静置 30 min 后培养 2~3 h, 完成第一轮淘选。用包被液将玻尿酸合成酶分别稀释至 5 μ g/mL 和 2.5 μ g/mL, 重复上述步骤, 完成第 2、3 轮淘选。

1.7 酶联免疫吸附测定实验

将经过 3 轮淘选后获得的单域抗体文库接种至具有氨苄青霉素抗性的固体培养基, 过夜培养后挑

取 100~200 个单菌落分别转接至 500 μ L 2YT 培养基(已加入 100 μ g/mL 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养 4~5 h。加入 1 μ L 辅助噬菌体(10^9 pfu/mL), 静置 15 min 后, 离心弃去上清。沉淀部分用 500 μ L 2YT 培养基(已提前加入 100 μ g/mL 氨苄青霉素, 50 μ g/mL 卡那霉素)重悬并 30 $^{\circ}$ C 过夜培养。离心(8 000 r/min,

5 min)后的上清转移至包被 2.5 μ g/mL 抗原的 96 孔酶标板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后洗去背景, 加入 1 : 10 000 稀释后的 HRP 偶联的抗噬菌体抗体(义翘神州, 11973-MM05T-H), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 洗去背景, 使用 TMB 显色试剂盒检测。步骤 1.4~1.7 为鲨鱼源单域抗体筛选的主要流程(图 2)。

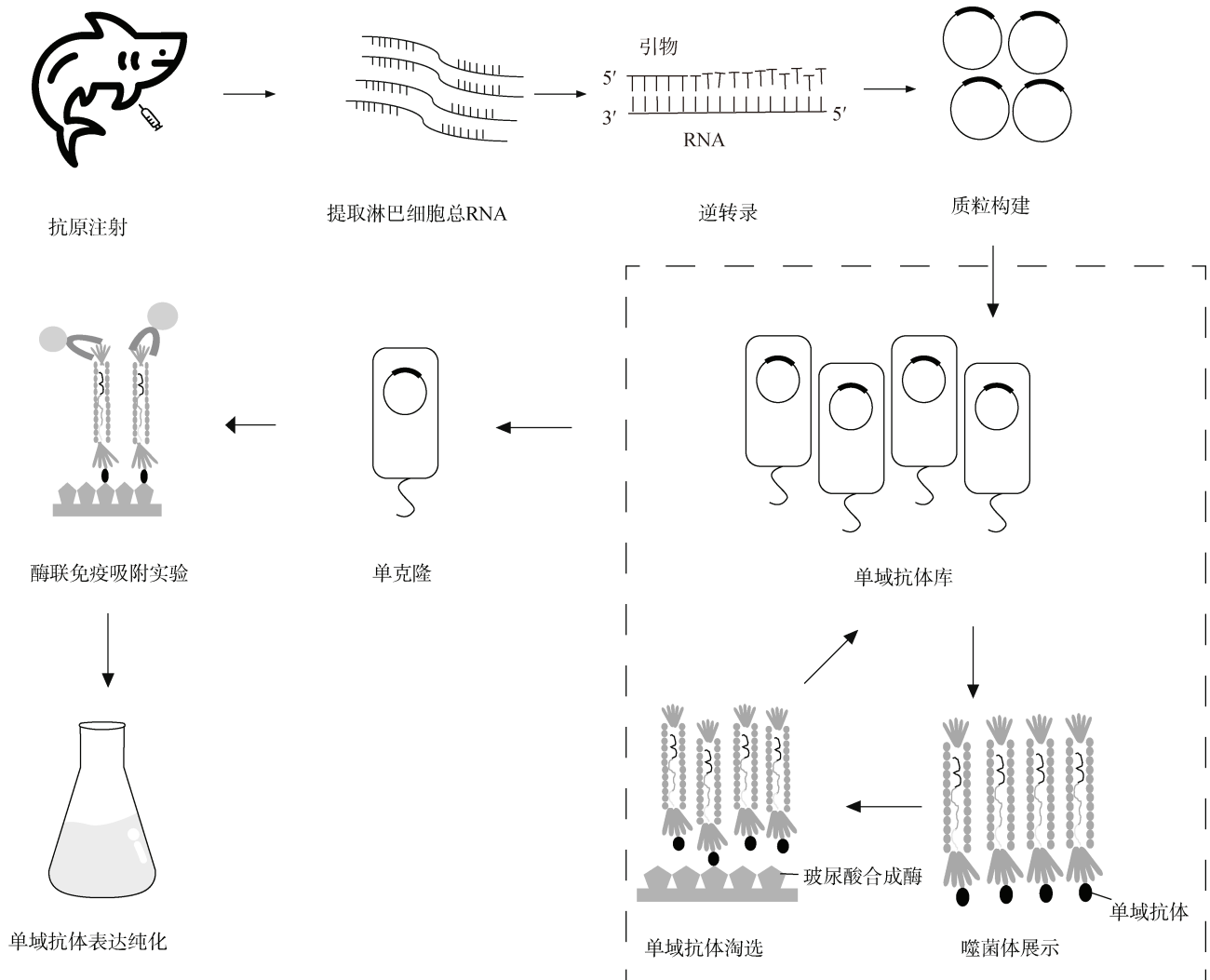


图 2 鲨鱼源单域抗体筛选流程

Fig. 2 Schematic representation of screening the single domain antibody from the immunized shark

1.8 单域抗体的表达纯化

筛选得到的单域抗体序列用 Nde I 和 HindIII 限制性内切酶位点连入 pCold II 质粒, 并转入大肠杆菌 SHuffle[®] T7 菌株中。使用 2YT 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养至指数期, 加入 IPTG 诱导表达, 25 $^{\circ}$ C 培养过夜。收集细菌菌体并重悬(缓冲液为 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 50 mmol/L 氯化钠), 破碎细胞后高速离心(14 000 r/min, 30 min, 4 $^{\circ}$ C), 取上清与 Ni-NTA 填料

(Invitrogen)于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。分别用 W1 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH7.8, 1 mol/L 氯化钠, 20 mmol/L 咪唑)、W2 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 50 mmol/L 氯化钠, 40 mmol/L 咪唑)洗脱杂蛋白, 然后用 ELU 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.8, 50 mmol/L 氯化钠, 300 mmol/L 咪唑)洗脱单域抗体, 并用缓冲液为 25 mmol/L MES pH 6.5, 0.2 mol/L 氯化钠, 10%甘油的 Superdex S75 凝胶过滤柱(GE

Healthcare)进一步纯化;最终利用聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹实验检测目的蛋白纯化结果。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳实验显色方法为考马斯亮蓝染色,免疫印迹实验所用一抗为组氨酸标签特异性鼠源单抗(CST, 2366S),所用二抗为 HRP 偶联的鼠 IgG 特异性抗体(CST, 7076P2)。

1.9 等温滴定量热实验

纯化得到的玻尿酸合成酶和单域抗体分别置换到同批配制的 ITC 缓冲液中(25 mmol/L MES pH 6.5, 0.2 mol/L 氯化钠, 10%甘油, 2 mmol/L TCEP), 分别浓缩至终浓度为 50 μ mol/L(玻尿酸合成酶)和 5.6 mmol/L(单域抗体)。在等温滴定量热(MicroCal PEAQ-ITC, Malvern Panalytical)设备中向含有玻尿酸合成酶的样品池中滴加单域抗体, 共滴加 19 次, 第一次为 0.4 μ L, 其余每次均为 2 μ L。用 MicroCal PEAQ-ITC 分析软

件处理实验结果(实验设置对照组, 对照组为向缓冲液中滴加单域抗体)。

2 结果与分析

2.1 玻尿酸合成酶的制备与前处理

为提高单域抗体的特异性, 要求进行鲨鱼免疫的玻尿酸合成酶纯度较高、状态良好(有活性、无降解等)。分子排阻层析的纯化图谱显示玻尿酸合成酶在 11.5 mL 处洗脱, 无杂峰, 说明纯化的样品状态较均一(图 3a), 聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹实验均呈现单一条带, 说明样品无聚集, 无降解, 纯度高(图 3b、图 3c)。纯化后的样品在 4 $^{\circ}$ C 静置过夜后, 再次进行分子排阻层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳实验, 仍然仅有单一洗脱峰和单一条带(数据未呈现), 进一步说明样品状态良好。

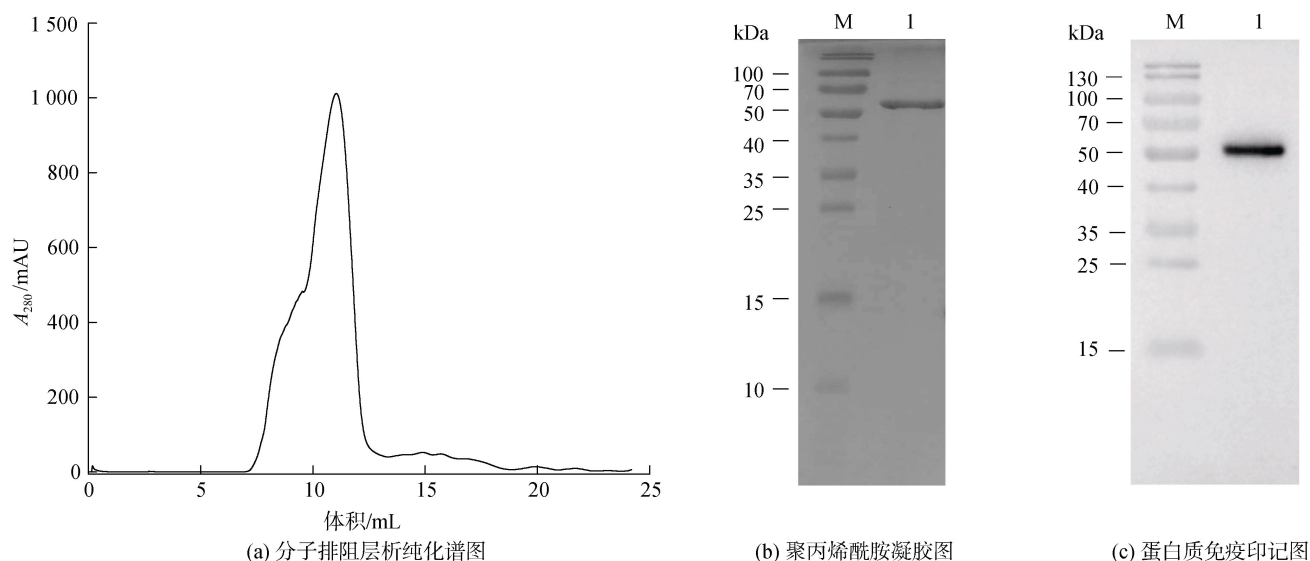


图3 玻尿酸合成酶的纯化

Fig. 3 Purification of hyaluronan synthase

注: 泳道 M 为蛋白分子量标准, 泳道 1 为玻尿酸合成酶

纸层析法结合同位素检测已被成功应用于玻尿酸合成酶的活性检测。玻尿酸合成酶能够利用尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸和尿苷二磷酸-乙酰葡萄糖胺两种底物合成玻尿酸。将玻尿酸合成酶与同位素标记的尿苷二磷酸-乙酰葡萄糖胺, 以及其他底物混合孵育反应, 利用纸层析分离方法, 除去未反应的小分子底物, 最终通过同位素分析方法检测高分子量玻尿酸产物, 进而检测玻尿酸合成酶的活性。纯化得到的玻尿酸合成酶样品无论在去垢剂环境中还是重组至脂质体中均具有活性, 而只有一种底物的对照实验组

没有检测到高分子量玻尿酸产物。玻尿酸酶是一种能够特异性降解高分子量玻尿酸的酶分子, 当加入两种底物并用玻尿酸酶处理时, 同位素信号强度明显降低, 证明生成的高分子产物为玻尿酸, 本研究中表达纯化的玻尿酸合成酶具有活性。玻尿酸合成酶的活性较稳定, 在去垢剂环境中, 4 $^{\circ}$ C 静置一周后仍然具有活性(数据未展示)。

分子排阻层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳、免疫印迹实验结果以及活性测定结果互相验证, 表明本研究中表达纯化得到的玻尿酸合成酶适于进一步开展

鲨鱼免疫反应以获得单域抗体。

2.2 单域抗体的筛选与体外重组表达纯化

单域抗体的筛选及体外表达纯化包括：将制备的玻尿酸合成酶注射到鲨鱼体内，促使其产生免疫反应；分离脾脏淋巴细胞，提取总 RNA，构建单域抗体库；利用三轮淘选，淘选出亲和力较高的单域抗体；挑取 100~200 个单菌落用酶联免疫吸附实验检验抗原抗体的结合(图 2)，获得单域抗体的氨基酸序列信息。

在单域抗体体外重组表达中，首先选用了相关

研究中使用较多的 pMES4 质粒，将其转化入 BL21 (DE3)菌种中。pMES4 质粒中，单域抗体上游包含有 pelB 信号肽片段，能够引导单域抗体表达至氧化环境的细胞间质中，遗憾的是，在此条件下单域抗体没有得到表达。随后，选用 pCold II 质粒，将其转化至 SHuffle® T7 菌株，单域抗体在胞质内获得表达，且产量较高，每升培养基能够获得约 5 mg 单域抗体。同时，后续的纯化过程中，分子排阻层析和聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明纯化得到的单域抗体纯度很高，状态单一(图 4)。

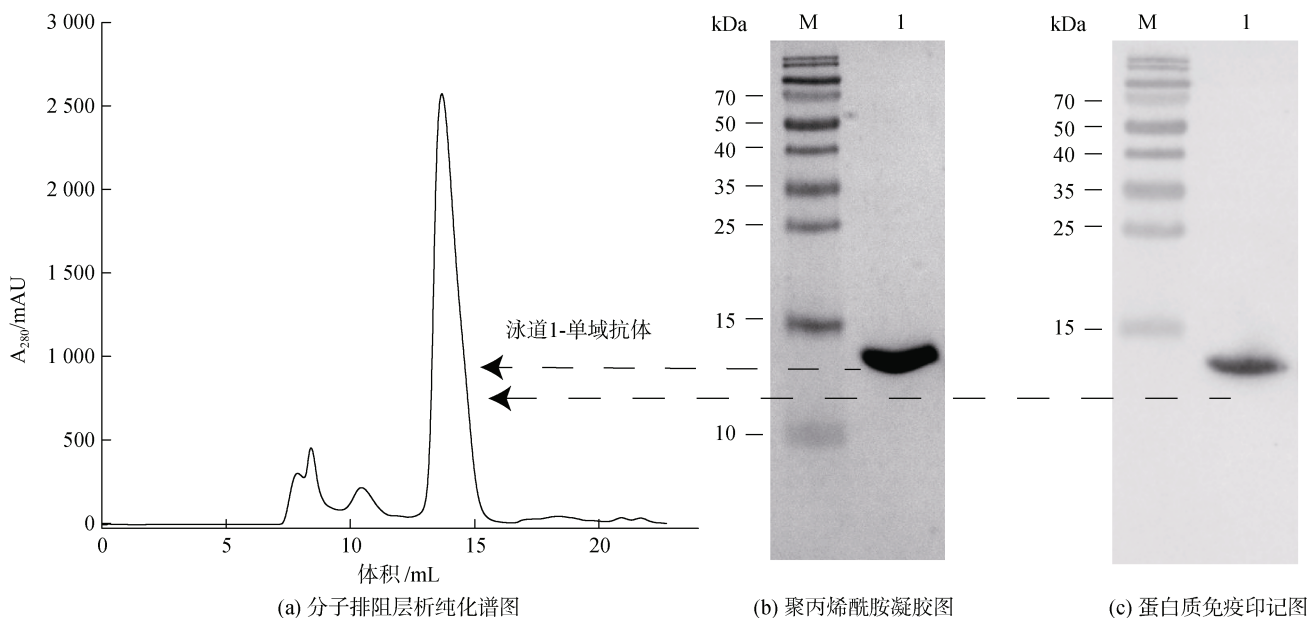


图 4 单域抗体的纯化

Fig. 4 Purification of single domain antibody

注：泳道 M 为蛋白分子量标准，泳道 1 为单域抗体

2.3 单域抗体亲和力检测

等温滴定量热实验通过测定抗体滴定抗原过程中的热量变化检测抗原与抗体的亲和力。等温滴定量热实验结果显示(图 5)，抗原抗体化学计量数约为 1，说明单域抗体仅识别并结合 1 个抗原表位；平衡解离常数(K_d)约为 171 $\mu\text{mol/L}$ ，比已报道的通过免疫筛选获得的单域抗体亲和力低，这可能是由于选用的大肠杆菌胞内表达体系，其中的还原环境造成了表达的单域抗体与筛选时(氧化环境)得到的单域抗体在二硫键形成方面存在略微差异(详见讨论部分)。

2.4 单域抗体对玻尿酸合成酶活性的影响

将单域抗体与玻尿酸合成酶按照摩尔浓度比 3 : 1 的比例混合，检测单域抗体的添加对玻尿酸合成酶

活性的影响。图 6 显示添加单域抗体能够提高玻尿酸合成酶的活性。

3 讨论

在鲨鱼源单域抗体的研究中，主要是以水溶性蛋白作为研究对象^[21-22]，较少以膜蛋白作为抗原。一方面是由于膜蛋白表达纯化较难^[28]，另一方面是因为单域抗体通常不能够识别线性抗原^[29]，所以需要保证膜蛋白抗原在免疫过程中保持天然构象，而鲨鱼血液中存在几百毫摩尔浓度的尿素^[30]，对于膜蛋白抗原保持正确折叠造成一定影响。本研究采用了将膜蛋白重组至脂质体中的方式，一定程度上保证了抗原的天然构象，为膜蛋白鲨鱼源单域抗体的制备提供了借鉴。本研究选用玻尿酸合成酶作为抗原

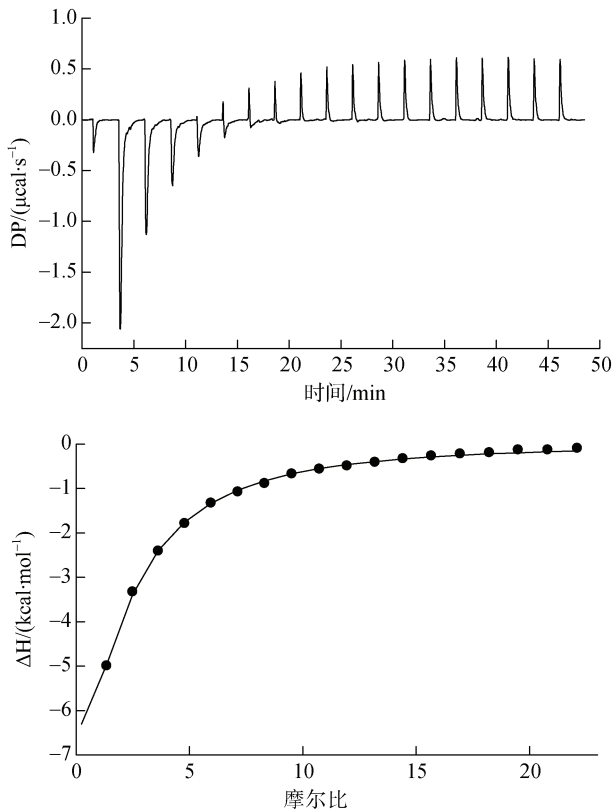


图5 基于等温滴定量热实验的亲合力测定

Fig. 5 Binding affinity determination by Isothermal Titration Calorimetry

注: DP 即 power differential

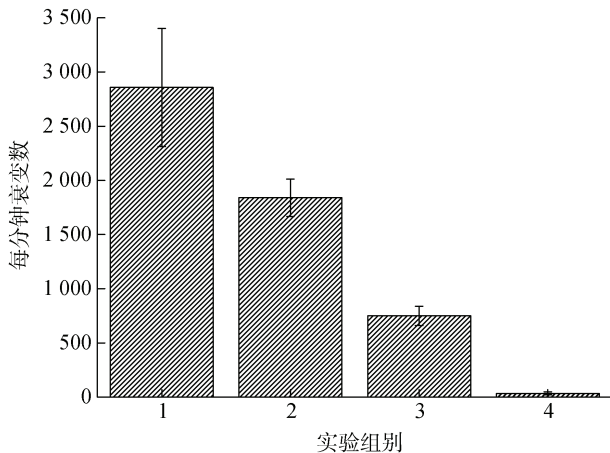


图6 玻尿酸合成酶活性实验

Fig. 6 Hyaluronan synthase activity assay

注: 各组反应条件分别为: 1: 单域抗体与玻尿酸合成酶混合样品; 2: 仅玻尿酸合成酶样品; 3: 在样品2的基础上添加玻尿酸酶; 4: 单一底物样品

也是经过考量的。玻尿酸合成酶的纯化中使用了可与其高亲和力结合的去垢剂分子, 在最后的分子排阻层析纯化步骤中, 不需要添加去垢剂分子, 仍然可

以得到具有活性的样品^[31]。在一般膜蛋白体系中, 分子排阻层析溶液中的去垢剂分子极有可能在后续样品浓缩过程中形成空的去垢剂胶束(micelle), 并进而在 ITC 实验中由于滴定后体积的变化, 造成去垢剂分子在胶束状态和自由状态平衡的移动, 引起热量变化。因此, 玻尿酸合成酶这种特殊的膜蛋白体系能够极大地减少 ITC 实验的误差。同时, 已经建立的玻尿酸合成酶活性检测方法能够快速检测单域抗体结合后抗原活性变化情况, 为抗原抗体相互作用研究提供了新方案。蛋白质的结构决定其所发挥的功能, 在蛋白质行使功能的不同状态, 其构象往往会发生变化, 而单域抗体能够结合抗原蛋白并稳定特定构象。例如, G 蛋白偶联受体有一系列功能状态, 单域抗体 Nb80 能够将人 $\beta 2$ 肾上腺素受体的构象稳定在激活状态^[32]。本研究中, 单域抗体能够提高玻尿酸合成酶的酶活力, 这可能是因为单域抗体的结合稳定了玻尿酸合成酶的特定构象, 这种构象能够促进玻尿酸合成酶合成玻尿酸, 这也是单域抗体结合玻尿酸合成酶的间接证据。

单域抗体作为已知天然存在的能够结合抗原的最小蛋白抗体^[33], 受到越来越多的关注。目前, 对羊驼源单域抗体的研究较多, 而对鲨鱼源单域抗体研究较少^[34]。这主要是受到养殖条件的限制, 并无证据表明鲨鱼源单域抗体较羊驼源单域抗体有劣势, 对鲨鱼源单域抗体的研究能够拓宽单域抗体的应用范围。但需要指出的是, 绝大部分羊驼源单域抗体只在框架区的结构核心位置存在一对保守的半胱氨酸, 并形成二硫键^[35]。鲨鱼源单域抗体也存在这对保守的半胱氨酸, 除此之外, 多数鲨鱼源单域抗体还存在其他非保守的半胱氨酸。根据非保守二硫键的数目和位置, 鲨鱼源单域抗体被分为不同的类型^[36]。本研究筛选出的单域抗体为 II 型单域抗体, 在抗原结合位置的互补决定区(complementarity determining regions, CDR)存在两个半胱氨酸, 根据已知 II 型单域抗体的结构推测这两个半胱氨酸也能够形成二硫键, 并发挥稳定抗原结合区域结构的作用^[37-38]。这对半胱氨酸位于蛋白表面位置, 极易受到表达纯化和应用条件的影响, 形成分子间二硫键, 由于处于抗原结合位置, 一旦形成分子间二硫键, 将极可能造成其与抗原结合能力的丧失。本研究中采用了大肠杆菌胞内表达, 由于胞内为还原环境, 因此, 位于蛋白表面的半胱氨酸将不会形成分子内和分子间二硫键, 可能也由此造成了较低的抗原亲和力(已报道的

通过免疫筛选方式获得的单域抗体与抗原的平衡解离常数一般为纳摩量级^[39-40]。因此,通过表达条件优化,例如优化大肠杆菌胞间质表达条件或者选用真核表达系统,使鲨鱼源单域抗体既能够有效表达纯化,又能够确保其具有较高的抗原结合能力,将是影响鲨鱼源单域抗体广泛应用的关键问题。同时,以胞内分子为靶标的胞内抗体技术发展迅速,单域抗体由于其尺寸小,在入胞效率方面远高于传统抗体,具有成为胞内抗体的独特优势^[41],但胞内环境具有高还原性,鲨鱼源单域抗体还需要经过适当改造,将易受环境影响的二硫键替换为其他的共价键或非共价键形式,以实现其在高还原环境中的结构稳定和高抗原亲和力。

4 结论

本研究筛选并制备获得了小球藻病毒玻尿酸合成酶的鲨鱼源单域抗体,该抗体能够一定程度上提高抗原的活性,尽管由于抗体表达条件的影响,抗体的二硫键可能没有完全正确折叠并进而造成了抗原抗体亲和力较低的现象,但是本研究证实了以膜蛋白为抗原制备鲨鱼源单域抗体的可能性,增加了鲨鱼源单域抗体的抗原选择范围,进而拓展了鲨鱼源单域抗体的应用领域。

致谢: 感谢山东胶州湾海洋生态系统国家野外科学观测研究站在同位素测试中提供的设备支持。感谢赵宏鑫、王溥在项目进展过程中的讨论。

参考文献:

- [1] CHIU M L, GOULET D R, TEPLUAKOV A, et al. Antibody structure and function: The basis for engineering therapeutics[J]. *Antibodies*, 2019, 8(4): 55.
- [2] HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains[J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 446-448.
- [3] GREENBERG A S, AVILA D, HUGHES M, et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks[J]. *Nature*, 1995, 374(6518): 168-173.
- [4] NUTTAL S D, KRISHNAN U V, HATTARKI M, et al. Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries[J]. *Molecular Immunology*, 2001, 38(4): 313-326.
- [5] KUNZ P, ZINNER K, MUCKE N, et al. The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 7934.
- [6] DE MARCO A. Recombinant expression of nanobodies and nanobody-derived immunoreagents[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 172: 105645.
- [7] DUMOULIN M, CONRATH K, VAN MEIRHAEGHE A, et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability[J]. *Protein Science*, 2002, 11(3): 500-515.
- [8] DUGGAN S. Caplacizumab: first global approval[J]. *Drugs*, 2018, 78(15): 1639-1642.
- [9] POULLIN P, BORNET C, Veyradier A, et al. Caplacizumab to treat immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura[J]. *Drugs of Today*, 2019, 55(6): 367-376.
- [10] KRATZ F, ELSADEK B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery[J]. *Journal of Controlled Release*, 2012, 161(2): 429-445.
- [11] PALOMO C, MAS V, DETALLE L, et al. Trivalency of a nanobody specific for the human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein drastically enhances virus neutralization and impacts escape mutant selection[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(11): 6498-6509.
- [12] FATEHI D, BARAL T N, ABULROB A. In vivo imaging of brain cancer using epidermal growth factor single domain antibody bioconjugated to near-infrared quantum dots[J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2014, 14(7): 5355-5362.
- [13] SAKER S A, JAKEL M, SULTANA S, et al. Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: A randomized placebo-controlled trial[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(4): 740-748.
- [14] KIJANKA M, WARNDERS F J, EL KHATTABI M, et al. Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery[J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2013, 40(11): 1718-1729.
- [15] KUBALA M H, KOVTUN O, ALEXANDROV K, et al. Structural and thermodynamic analysis of the GFP: GFP-nanobody complex[J]. *Protein Science*, 2010, 19(12): 2389-2401.
- [16] BRUNNER J D, SCHENCK S. Production and application of nanobodies for membrane protein structural biology[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2127: 167-184.
- [17] NUTTAL S D, KRISHNAN U V, DOUGHTY L, et al. A naturally occurring NAR variable domain binds the Kgp protease from *Porphyromonas gingivalis*[J]. *FEBS Letters*, 2002, 516(1): 80-86.
- [18] DOOLEY H, FLAJNIK M F, PORTER A J. Selection and characterization of naturally occurring single-

- main (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display[J]. *Molecular Immunology*, 2003, 40(1): 25-33.
- [19] 周文锦, 屈跃宽, 张葵, 等. 白鲢肌原纤维结合型丝氨酸蛋白酶单域抗体文库构建及淘选[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(3): 87-94.
ZHOU Wenjin, QU Yuekuan, ZHANG Yan, et al. Construction and panning of single domain antibody library against silver carp myofibril-bound serine protease[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2020, 39(3): 87-94.
- [20] UBAH O C, STEVEN J, KOVALEVA M, et al. Novel, anti-hTNF- α variable new antigen receptor formats with enhanced neutralizing potency and multifunctionality, generated for therapeutic development[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1780.
- [21] BURGESS S G, OLEKSY A, CAVAZZA T, et al. Allosteric inhibition of Aurora-A kinase by a synthetic vNAR domain[J]. *Open Biology*, 2016, 6(7): 160089.
- [22] STANTFIELD R L, DOOLEY H, FLAJNIK M F, et al. Crystal structure of a shark single-domain antibody V region in complex with lysozyme[J]. *Science*, 2004, 305(5691): 1770-1773.
- [23] GIRISH K S, KEMPARAJU K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview[J]. *Life Sciences*, 2007, 80(21): 1921-1943.
- [24] BI Y, HUBBARD C, PURUSHOTHAM P, et al. Insights into the structure and function of membrane-integrated processive glycosyltransferases[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, 34: 78-86.
- [25] TIAN X, AZPURUA J, HINE C, et al. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat[J]. *Nature*, 2013, 499(7458): 346-349.
- [26] HUBBARD C, MCNAMARA J T, AZUMAYA C, et al. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 418(1/2): 21-31.
- [27] BLACKBURN M R, HUBBARD C, KIESSLING V, et al. Distinct reaction mechanisms for hyaluronan biosynthesis in different kingdoms of life[J]. *Glycobiology*, 2018, 28(2): 108-121.
- [28] LIN S H, GUIDOTTI G. Purification of membrane proteins[J]. *Methods in Enzymology*, 2009, 463: 619-629.
- [29] BEGHEIN E, GETTESMANS J. Nanobody technology: A versatile toolkit for microscopic imaging, protein-protein interaction analysis, and protein function exploration[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 771.
- [30] HAMMERSCHLAG N. Osmoregulation in elasmobranchs: a review for fish biologists, behaviourists and ecologists[J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2006, 39(3): 209-228.
- [31] BREYTON C, JAVED W, VERMOT A, et al. Assemblies of lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG) and LMNG-solubilized membrane proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2019, 1861(5): 939-957.
- [32] RASMUSSEN S G F, CHOI H-J, FUNG J J, et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the $\beta 2$ adrenoceptor[J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 175-180.
- [33] MUYLDERMANS S, CAMBILLAU C, WYNS L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2001, 26(4): 230-235.
- [34] KONNING D, ZIELONKA S, GRZESCHIK J, et al. Camelid and shark single domain antibodies: structural features and therapeutic potential[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 45: 10-16.
- [35] HARMSSEN M M, DE HAARD H J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(1): 13-22.
- [36] MATZ H, DOOLEY H. Shark IgNAR-derived binding domains as potential diagnostic and therapeutic agents[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 90: 100-107.
- [37] STANFIELD R L, DOOLEY H, VERDINO P, et al. Maturation of shark single-domain (IgNAR) antibodies: evidence for induced-fit binding[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 367(2): 358-372.
- [38] SIMMONS D P, SRELTSOV V A, DOLEZAL O, et al. Shark IgNAR antibody mimotopes target a murine immunoglobulin through extended CDR3 loop structures[J]. *Proteins*, 2008, 71(1): 119-130.
- [39] WALSH R, NUTTALL S, REVILL P, et al. Targeting the hepatitis B virus precore antigen with a novel IgNAR single variable domain intrabody[J]. *Virology*, 2011, 411(1): 132-141.
- [40] LIU J L, ANDERSON G P, DELEHANTY J B, et al. Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naïve shark library[J]. *Molecular Immunology*, 2007, 44(7): 1775-1783.
- [41] 康晓圳, 曹佳莉, 张保惠, 等. 单域抗体的研究和应用进展[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(12): 1974-1984.
KANG Xiaozhen, CAO Jiali, ZHANG Baohui, et al. Single-domain antibody—advances in research and application[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2018, 34(12): 1974-1984.

Screening of shark-derived single domain antibodies for hyaluronan synthase

SHU Shu-chao^{1, 2, 3}, XU Ming-ce^{1, 2, 3}, HA Cheng-xu⁴, ZHOU Yu-hang⁵,
DENG Peng-hui^{1, 2, 3}, ZHA Li-sha⁵, CHEN Jin-lin⁶, CHEN Jian-ming⁶,
BI Yun-chen^{1, 2, 3}

(1. CAS and Shandong Province Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Marine Biology and Biotechnology Laboratory, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 4. Ocean Science and Technology Museum of Qingdao, Qingdao 266003, China; 5. Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 6. Institute of Oceanography Minjiang University, Fuzhou 350108, China)

Received: Jan. 18, 2021

Key words: single domain antibody; nanobody; hyaluronan synthase

Abstract: The single domain antibody (sdAb) is derived from the variable fragment of the heavy-chain-only antibody, which has been found naturally in cartilaginous fishes, such as sharks. The sdAb research mainly arise from the soluble proteins and pathogens as the antigens to date. In this study, after the steps of immunogen preparation, immunization, repertoire cloning, library construction, selection and verification obtained the shark-derived sdAb, which specifically recognizes *Chlorella virus* hyaluronan synthase (a membrane protein). The sdAb was then expressed in *E.coli* and purified for the binding affinity determination performed by Isothermal Titration Calorimetry technology (ITC). Overall, this study proves the practicability of generating shark-derived single-domain antibodies against membrane protein antigen.

(本文编辑: 杨 悦)