

利用酵母展示系统确定空间构象性 抗原表位的方法研究*

贾俊英^{1, 2)} 王云波¹⁾ 唐捷^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 酵母展示系统是研究可溶性蛋白间相互作用的有效系统。利用酵母展示系统可以简单快速地研究抗原与抗体相互作用。充分利用此系统的优势, 在确定空间构象性的抗原决定簇方面发展出新的应用。利用酵母同源重组把巨噬细胞迁移抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)序列中的不同肽段以及不同点突变体展示在酵母表面, 并用 3 个抗 MIF 单克隆抗体 10C3, 2A12 和 4E10 分别标记, 流式细胞仪检测抗体与抗原突变体的结合。用酵母展示方法确定了 MIF 上与 3 个单克隆抗体结合的关键氨基酸序列, 从而建立起一个简便可靠的确定空间构象性抗原决定簇的方法。

关键词 酵母展示, MIF, 抗原决定簇, 同源重组

学科分类号 Q5, R392

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00446

寻找抗体与抗原结合位点, 对于了解抗体的作用机制是至关重要的。传统的方法主要通过合成小肽片段或原核表达蛋白片段, 然后用免疫印迹法或酶联免疫法检测各小肽或蛋白质片段是否与抗体结合, 以此来确定抗体的结合位点。但这些方法有各自的局限性。合成小肽价格昂贵, 成本高, 而且小肽不具备合适的空间构象, 对于识别抗原空间构象位点而不是识别线性位点的抗体, 此法完全不适用。蛋白质片段在原核系统中表达很容易形成包涵体, 不利于蛋白质纯化, 如果蛋白质不可溶, 也很难保持蛋白质的天然构象。

酵母展示是一种将目的蛋白展示在酵母细胞表面的新技术, 具有方便、快捷、不需要纯化蛋白质的优点。由于酵母的同源重组功能, 此方法省略了分子克隆的过程, 可以高通量地获得多个突变体展示在细胞表面。荧光标记的抗体或蛋白质标记酵母展示克隆或文库后, 可以用流式细胞仪方便快速地检测或分选。与免疫荧光印迹法和酶联免疫法相比, 流式细胞仪检测比较方便快捷。应用在抗体工程方面, 酵母展示技术主要用来展示单链抗体(scFv), 进行抗体序列的优化, 来提高抗体的亲和力和稳定性^[1, 2]。利用酵母展示技术还可以构建蛋白质表达文库, 从中筛选出感兴趣的蛋白^[3]。目前已有文献报道, 把抗原肽段展示在酵母表面,

成功鉴定出一些人表皮生长因子受体(EGFR)抗体的结合位点^[4]。也有应用随机突变 PCR 方法, 构建带有多位点突变的酵母展示文库, 结合流式细胞仪把不和抗体结合的克隆分选出来, 一般要经过几轮分选之后, 挑选大量的克隆做测序分析, 寻找出影响抗体与抗原结合的突变, 从而确定抗体与抗原的结合位点^[5, 6]。

我们以寻找巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)抗体的结合位点为例, 建立起一个利用酵母展示技术确定抗体空间结合位点的新方法。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

酿酒酵母 EBY100, 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存, pYDS 质粒改造自 pYD1 质粒 (Invitrogen 公司)。

1.2 试剂

限制性内切酶 *EcoR*, *NotI*, *BglII* 和 Pyrobest Taq 酶购自大连宝生物公司; 引物合成和

* 国家高技术研究发展计划资助项目(863)(2006AA02090805)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-64888447, Email: jtang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2008-06-20, 接受日期: 2008-09-22

测序由北京三博远志生物技术有限公司完成；酵母质粒提取试剂盒、普通质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司；抗人 MIF 单克隆抗体 10C3、2A12、4E10 由本实验室制备；goat anti-mouse-IgG-FITC 抗体购自 SouthernBiotech 公司；anti-V5-FITC 抗体购自 Invitrogen 公司；Streptavidin-PE 购自 BD Pharmingen 公司。

1.3 酵母转化

醋酸锂法转化酵母^[7]，转化后涂在 SD(selective growth dextrose medium) 平板，30℃ 培养箱培养 3 天。

1.4 酵母诱导

从 SD 平板上挑单克隆接种到 2 ml SD 培养基(加 2%葡萄糖)中，30℃ 摇床培养到 A 值至 2.0 时，取 1 ml 菌液，5 000 r/min 离心 5 min，弃上清。用 1 ml SG(selective growth galactose medium) 培养基(加 2%半乳糖)悬浮菌体，5 000 r/min 离心 5 min，弃上清，然后用 2 ml SG 培养基悬浮菌体，转入试管，20℃ 摇床诱导 48 h。

1.5 酵母标记和流式细胞仪分析

取 SG 诱导的酵母 1×10^6 个，用 1 ml FACS 缓冲液(PBS+1%BSA)洗 1 次，5 000 r/min 离心 5 min，弃上清，按 1 : 1 000 加入 anti-V5-FITC 抗体，流式细胞仪 FACS Calibur 检测 V5 信号。同时用 MIF 抗体 10C3、2A12、4E10 标记酵母，各抗体浓度为 200 nmol/L，4℃ 避光孵育 30 min，1 ml FACS 缓冲液洗 3 次，按 1 : 100 加入 goat-anti-mouse-IgG-FITC，4℃ 避光孵育 30 min，流式细胞仪检测。

1.6 MIF 抗体 10C3、2A12、4E10 的竞争

取诱导表达 MIF 全长片段的酵母克隆，先用 500 nmol/L 的非生物素化抗体室温孵育 10 min，然后加入 100 nmol/L 生物素标记的抗体，室温孵育 30 min，用 1 ml FACS 缓冲液洗 3 次，按 1 : 10 加入 Streptavidin-PE，4℃ 避光孵育 30 min，1 ml FACS 缓冲液洗 3 次，流式细胞仪检测。

生物素化 2A12 与 MIF 结合曲线。先用 200 nmol/L 10C3 或 4E10 与表达 MIF 酵母室温孵育 20 min，然后再加入不同浓度的生物素化 2A12，生物素化 2A12 起始浓度为 25 nmol/L，逐次 2 倍稀释到 0.098 nmol/L，室温孵育 30 min，1 ml FACS 缓冲液洗 3 次，按 1 : 10 加入 Streptavidin-PE，4℃ 避光孵育 30 min，FACS 缓冲液洗 3 次，流式细胞仪检测，与不同浓度生物素化 2A12 单独标记酵母的结合曲线比较。

1.7 MIF 抗原的分段酵母展示及检测

MIF 蛋白共由 115 个氨基酸组成，从 N 端第 1 个氨基酸开始把 MIF 分成 5 个不同大小的片段，同样，从 MIF C 端第 1 个氨基酸开始把 MIF 也分成 5 个不同大小的片段。分别设计引物，PCR 扩增各片段，凝胶纯化回收后与 *EcoR*、*Not* 双酶切线性化的 pYDS 载体一同转入酵母，诱导表达后，用 anti-V5-FITC 标记，流式细胞仪检测 V5 信号的强弱，同时分别用 10C3、2A12、4E10 标记，检测各片段是否与抗体结合。

1.8 MIF 片段中引入 *Bgl* 酶切位点

为了利用酵母同源重组快速方便地引入突变位点，在 MIF 序列中引进 *Bgl* 酶切位点，即用 *Bgl* 酶切位点取代 21~24 个氨基酸片段的编码序列，形成一个缺失 21~24 个氨基酸的 MIF 突变片段，共设计 4 个突变片段，分别记作：MIF-*Bgl*-1(缺失 16~36 氨基酸)，MIF-*Bgl*-2(缺失 37~57 氨基酸)，MIF-*Bgl*-3(缺失 58~78 氨基酸)和 MIF-*Bgl*-4(缺失 77~100 氨基酸)。分别设计引物，PCR 扩增以上 4 个 MIF 突变体片段，具体步骤是：首先分别扩增 *Bgl* 取代的氨基酸片段前后 2 个 MIF 片段，并引入 *Bgl* 酶切位点，然后将这 2 个 MIF 片段通过 PCR 方法连接成一个缺失一段氨基酸片段的 MIF 突变体，最后在片段末端加上酵母同源重组区。凝胶纯化回收后与 *EcoR*、*Not* 双酶切线性化的 pYDS 质粒转入酵母，挑单克隆提取酵母质粒，转化 DH5 α ，测序后得到正确的带有 *Bgl* 酶切位点的质粒。

1.9 酵母同源重组引入丙氨酸突变位点

将测序正确的 MIF-*Bgl*-1，MIF-*Bgl*-2，MIF-*Bgl*-3 和 MIF-*Bgl*-4 质粒用 *Bgl* 酶切线性化，通过酵母同源重组把相应的缺失片段补上，并引入一个氨基酸突变，相应位点的氨基酸残基均突变为丙氨酸(A)。由于缺失片段大小为 21~24 个氨基酸，DNA 序列长度为 63~72 bp，所以可以通过合成两条 50 bp 左右的 3'端互补的上下游引物，直接退火即可得到引入突变位点的目的片段，然后再在目的片段两端通过 PCR 方法加上酵母同源重组同源区。胶回收纯化片段，以对应的 *Bgl* 酶切线性化的质粒为载体转化酵母，挑单克隆并诱导，用 anti-V5-FITC 标记，取 V5 阳性克隆提取酵母质粒并转化 DH5 α ，测序，得到引入突变位点的正确克隆。各突变体诱导表达后，分别用 MIF 抗体 10C3，2A12 和 4E10 标记，流式细胞仪检测是否

与抗体结合.

2 结 果

2.1 抗 MIF 单克隆抗体 10C3、2A12、4E10 的相互竞争关系

SG 诱导表达展示 MIF 全长片段的酵母, 用 100 nmol/L 生物素化的 10C3 加上 Streptavidin-PE 标记, 流式细胞仪检测, 荧光强度几何平均值约为 50 左右. 先用 500 nmol/L 10C3 孵育 10 min 后, 再加入 100 nmol/L 生物素化的 10C3 和 Streptavidin-PE 标记, 荧光强度明显降低. 过量的非标记抗体可与标记的同种抗体有效竞争. 但先用 500 nmol/L 2A12 或 4E10 孵育 10 min 后, 再加入

100 nmol/L 生物素化的 10C3 和 Streptavidin-PE, 流式细胞仪检测荧光强度并没有明显降低(图 1a), 这说明 10C3 与 2A12、4E10 之间没有明显的竞争关系. 同样用 500 nmol/L 4E10 孵育 10 min 后, 再加入 100 nmol/L 生物素化的 2A12 和 Streptavidin-PE, 流式细胞仪检测荧光强度并没有明显降低(图 1b), 说明 2A12 和 4E10 之间也没有明显的竞争关系. 但是如果用浓度梯度的生物素化 2A12 做结合曲线, 在非标记的 10C3 或 4E10 抗体存在时, 曲线比没有竞争抗体时有不同程度左移(图 1c). 结果提示, 3 个单克隆抗体与 MIF 的结合位点虽不完全相同, 但可能有一定的重叠.

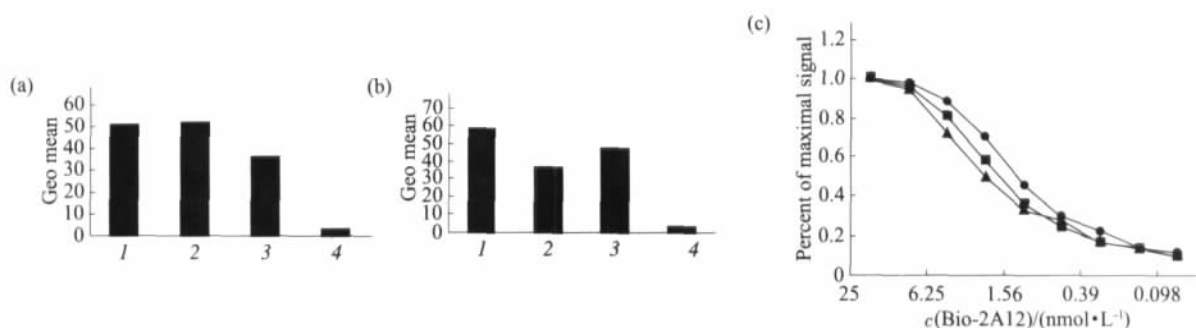


Fig. 1 Competitive binding of mAbs to yeast-displayed MIF

(a) Competition of mAbs between 10C3 and 2A12/4E10: yeast clone displaying wild-type MIF was first labeled with 500nmol/L 10C3, 2A12 and 4E10 respectively, then 100nmol/L biotinylated 10C3 was added, and finally Streptavidin-PE was used to detect biotinylated 10C3. Control was the sample labeled with 100nmol/L biotinylated 10C3. 1: Bio-10C3; 2: Bio-10C3+2A12; 3: Bio-10C3+4E10; 4: Bio-10C3+10C3. (b) Competition between 2A12 and 4E10: yeast was labeled with 500nmol/L 4E10 and 10C3 respectively, next 100nmol/L biotinylated 2A12 was added. 1: Bio-2A12; 2: Bio-2A12+10C3; 3: Bio-2A12+4E10; 4: Bio-10C3+10C3. (c) Yeast displayed MIF incubated with 200 nmol/L 10C3 or 4E10 firstly, the following added biotinylated 2A12 with varying concentration. ●—●: Bio-2A12; ▲—▲: Bio-2A12+10C3; ■—■: Bio-2A12+4E10.

2.2 MIF 分段酵母展示的流式检测结果

PCR 扩增 MIF 长度不同的截短片段, 表达在酵母表面后, 先用 anti-V5-FITC 标记, 检测酵母展示各片段的效率. 结果显示 V5 信号均为较强阳性, 各片段表达效率基本一致. 然后分别用 10C3、2A12、4E10 抗体标记, 流式细胞仪检测抗体结合. 结果表明, MIF C 端截短各片段除 MIF F1-100 和 MIF 全长片段 (human-MIF) 与 10C3、2A12、4E10 结合有阳性信号外, 其余片段均与 10C3、2A12、4E10 不结合. MIF N 端截短各片段除 MIF R16-115 与 10C3 结合有阳性信号外, 其余片段均与 10C3、2A12、4E10 不结合(图 2). 这说明所测试的 3 个抗体不是与 MIF 抗原的某一段线性片段结合, 抗体结合需要 MIF 的正确折叠, 可能与 MIF 抗原空间构象位点结合.

	10C3	2A12	4E10
F1-100	+	+	+
F1-80	-	-	-
F1-60	-	-	-
F1-40	-	-	-
F1-20	-	-	-
Human-MIF	+	+	+
R16-115	+	-	-
R36-115	-	-	-
R56-115	-	-	-
R76-115	-	-	-
R96-115	-	-	-

Fig. 2 MIF fragments displayed on the yeast cell surface and tested for binding to MIF mAbs, as detected by FACS

Cells were washed and incubated with 10C3, 2A12 and 4E10 respectively, then labeled with goat anti-mouse-IgG-FITC and analyzed by flow cytometry. +: Binding; -: No binding.

2.3 MIF 各突变体与 10C3、2A12、4E10 的结合情况分析

在 MIF 序列的 4 个不同位置引入 *Bgl* 酶切位点取代一段基因序列，以此为载体，通过同源重组将 *Bgl* 酶切位点取代的序列用引入突变的相应序列补齐。共设计了 17 个点突变，每隔 4 个或 5 个氨基酸残基有一个位置的氨基酸突变为丙氨酸。在酵母表面表达后，分别用 10C3、2A12 和 4E10 标记，流式细胞仪检测，结果总结在表 1 中。从结果来看，M48A 影响 10C3 的结合，荧光强度明显降低，但没有完全消除荧光信号，其余突变体对 10C3 的结合基本没有影响。M48A, I97A 与 2A12 完全不结合，流式细胞仪检测没有荧光信号，说明这 2 个位点是 2A12 在 MIF 上的关键结合位点。L27A, I38A, M48A, I97A 与 4E10 完全不结合(图 3)。

Table 1 Binding of MIF alanine mutants to mAbs

Code	Mutants	Binding of mAbs		
		10C3	2A12	4E10
B1-1A	D17A	+++	+++	+++
B1-2A	E22A	+++	++	+
B1-3A	L27A	+++	+++	-
B1-4A	G32A	+++	+++	+++
B2-1A	I38A	+++	+++	-
B2-2A	V43A	+++	+++	+++
B2-3A	M48A	+	-	-
B2-4A	S53A	+++	++	+
B3-1A	L59A	+++	++	++
B3-2A	S64A	+++	+++	+++
B3-3A	G69A	+++	+++	+++
B3-4A	R74A	+++	+++	+++
B4-1A	S77A	+++	+++	+++
B4-2A	G82A	+++	+++	+++
B4-3A	R87A	+++	++	++
B4-4A	P92A	+++	++	++
B4-5A	I97A	+++	-	-

+++ : Binding of alanine mutant similar to wild-type; ++ : Intermediate binding; + : Weak, but detectable binding; - : Complete loss of binding.

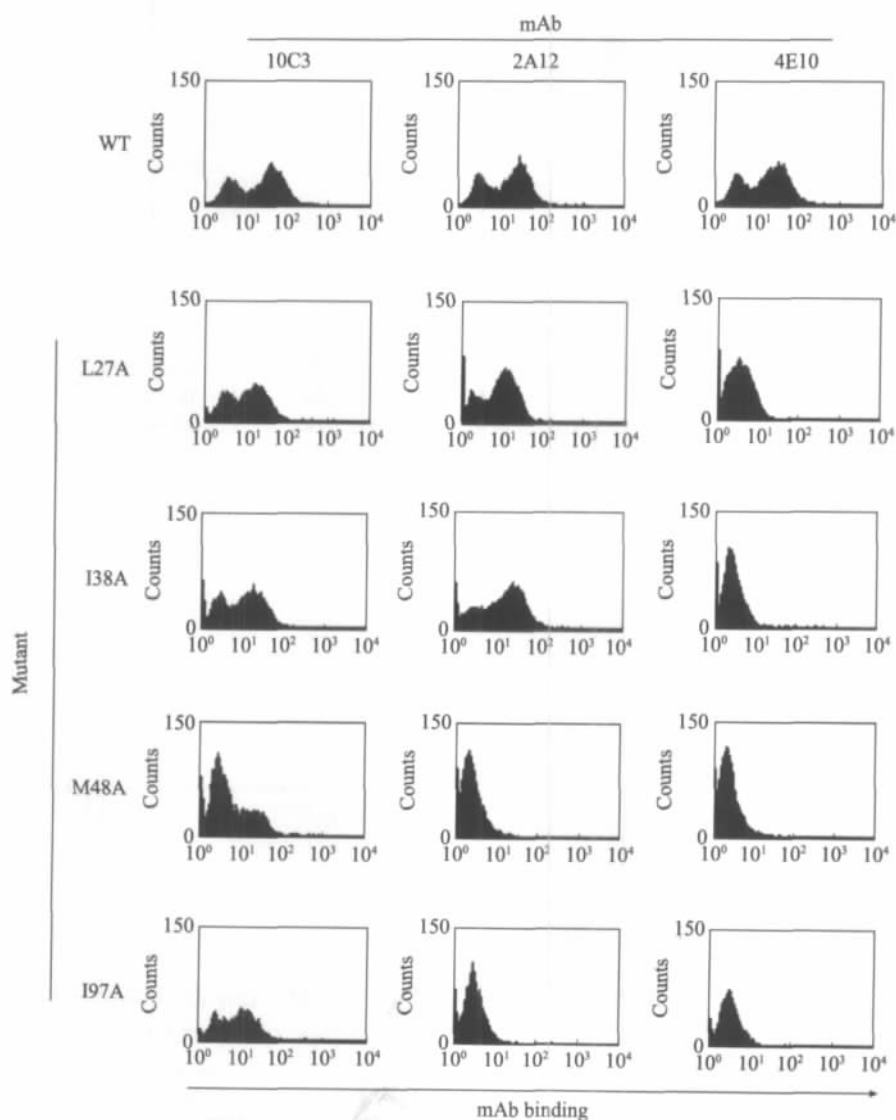


Fig. 3 Flow cytometry histograms for alanine mutants of MIF that exhibited loss of binding to mAbs

Yeast was labeled with 10C3, 2A12 and 4E10 respectively. Representative flow cytometry histograms depicting the mean fluorescence signal of MIF antibody labeling of yeast displayed MIF. WT: Wild-type.

3 讨 论

寻找抗体与抗原结合位点的研究对于抗体药物或疫苗的开发具有重要的指导作用。目前已有的多种方法,如合成小肽法^[8]、大肠杆菌表达蛋白法^[9]、酵母展示文库筛选法^[5]等,具有成本高,操作复杂,周期长等缺点。我们开发的新方法弥补了以上方法的不足,主要体现在:a. 成本低。酵母展示只需合成引物,将编码蛋白序列的基因扩增出来,或用 PCR 方法在 DNA 序列中引入点突变,然后将 PCR 产物和线性载体同时转化酵母。在酵母中 PCR 产物两端的序列与载体上相同的区域发生同源重组,将目的片段连入载体,经过诱导,目的蛋白就展示在酵母表面,不需要进行蛋白质纯化,也不需要挑选大量的克隆去测序和分析。b. 速度快。可以在一次实验中将不同的 PCR 产物分别平行转入酵母,同时进行诱导,同时进行检测。从 PCR 扩增到酵母转化,到诱导检测,一个周期大约只需要 10 天左右。c. 检测方法简单。酵母诱导表达后,目的蛋白展示在细胞表面,用抗体标记后,可用流式细胞仪检测。流式细胞仪检测比 Western-blot 和 ELISA 方法要方便快捷。

抗 MIF 抗体之间的竞争实验表明,3 个单克隆抗体的结合位点不同,但有一定的重叠。这一结论的获得得益于酵母展示系统对抗原抗体间亲和力的直接检测,即在一种抗体大量存在的情况下,另一种抗体的结合没有被完全阻断,但其亲和力受到了一定影响。这种比较细微的差别,在其他检测体系中不是很容易观察到的。

识别线性抗原片段的抗体,抗原决定簇大约在 10 个氨基酸左右。我们通过 MIF N 端和 C 端各截短片段的酵母展示首先大致确定 10C3, 2A12 与 4E10 只与将近 100 个氨基酸的 MIF 片段结合(图 2),表明这 3 个抗体识别的不是线性片段,而是 MIF 的空间结构位点。以此为基础在 MIF 15~100 氨基酸片段中不同位置设计 17 个点突变(表 1),进一步研究哪些位点是抗体结合所必需的。

我们所开发的方法,充分利用了酵母中 DNA 同源重组的优点。在 MIF 序列的 4 个不同部位分别去除一小段序列,同时引入 *Bgl* 酶切位点,再以此为载体,通过同源重组将 *Bgl* 酶切位点取代序列用突变后的新序列补齐。只要设计两条带有突变的互补的长链引物直接退火合成缺失序列,就可以随意在取代序列中引入氨基酸点突变,大大简化

了定点突变的工作量。我们共设计了 17 个点突变(表 1),每个突变有一个位置的氨基酸突变为丙氨酸,这一过程可以通过一次酵母转化轻松完成。

在 MIF 三级结构中,我们标出了对 3 个单抗结合有影响的 4 个点突变的位置(图 4)。Met48 这一突变,与 10C3 结合能力减弱,与 2A12 和 4E10 抗体完全不结合。我们推测此突变对 MIF 的正确折叠有一定负面作用,因此对 3 个不同抗体的结合都有影响。Ile97 突变同时影响了 2A12 和 4E10 的结合,推测这两个抗体的抗原决定簇在此区域有一定的重叠。而 Leu27 和 Ile38 相距不远,且只影响 4E10 结合,推测它们可能主要构成 4E10 的抗原决定簇。

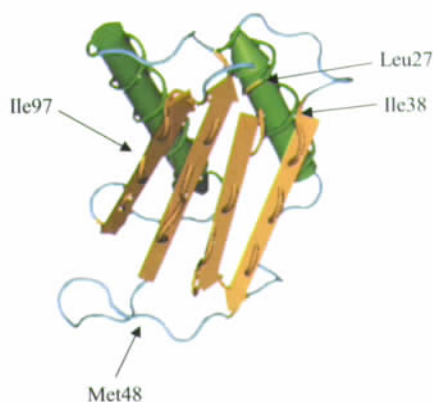


Fig. 4 Single amino acid mutations in MIF that exhibited loss-of-binding to mAbs 10C3, 2A12 or 4E10

Met48 mutant partially inhibits 10C3 binding to MIF. Met48 and Ile97 mutants result in 2A12 loss of binding to MIF. Leu27, Ile38, Met48 and Ile97 mutants result in 4E10 loss of binding to MIF.

致谢 感谢本实验室伍艳芳老师和李迅对本文的校对和修改;感谢中国科学院生物物理研究所刘春春工程师在流式细胞术检测中给予的指导和帮助。

参 考 文 献

- 1 Feldhaus M J, Siegel R W. Yeast display of antibody fragments: a discovery and characterization platform. *J Immunological Methods*, 2004, **290**(1~2): 69~80
- 2 Weaver-Feldhaus J M, Miller K D, Feldhaus M J, *et al.* Directed evolution for the development of conformation-specific affinity reagents using yeast display. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2005, **18**(11): 527~536
- 3 Richman S A, Healan S J, Weber K S, *et al.* Development of a novel strategy for engineering high-affinity proteins by yeast display. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2006, **19**(6): 255~264

- 4 Cochran J R, Kima Y S, Olsen M J, *et al.* Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments. *J Immunological Methods*, 2004, **287**(1~2): 147~158
- 5 Chao G, Cochran J R, Wittrop K D. Fine epitope mapping of anti-epidermal growth factor receptor antibodies through random mutagenesis and yeast surface display. *J Mol Biol*, 2004, **342**(2): 539~550
- 6 Levy R, Forsyth C M, LaPorte S L, *et al.* Fine and domain-level epitope mapping of botulinum neurotoxin type A neutralizing antibodies by yeast surface display. *J Mol Biol*, 2007, **365**(1): 196~210
- 7 Gietz R D, Woods R A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, 2002, **350**: 87~96
- 8 Nagahira K, Fukuda Y, Terakawa M, *et al.* Epitope mapping of monoclonal antibodies to tumor necrosis factor-alpha by synthetic peptide approach. *Immunology Letters*, 1995, **46**(1~2): 135~141
- 9 Shingarova L N, Sagaidak L N, Berkova N, *et al.* Determination of binding site of anti-tumour necrosis factor-alpha monoclonal antibody using hybrid and mutant proteins. *FEBS Letters*, 1996, **386**(1): 72~74

A New Strategy for Epitope Mapping by Yeast Surface Display System*

JIA Jun-Ying^{1,2)}, WANG Yun-Bo¹⁾, TANG Jie^{1)**}

¹⁾Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract As an effective method of studying soluble protein-protein interactions, yeast display system is now widely used for affinity maturation of single-chain antibodies. Due to the strong homology recombination machinery of yeast and the high-throughput nature of FACS detection, a rapid scan for interaction between antigen-antibody pairs could be easily achieved. Based on this system, a novel and reliable method for determining conformational epitopes was developed. Different fragments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and several point mutations of MIF were displayed on yeast cell surface using homologous recombination technology. Three MIF monoclonal antibodies, 10C3, 2A12 and 4E10, were screened for their binding affinity to each displayed peptide. Utilizing this technology, the key amino acids of MIF that bind to the MIF monoclonal antibodies were easily identified.

Key words yeast display, MIF, epitope mapping, homologous recombination

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00446

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China(2006AA02090805).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888447, E-mail: jtang@sun5.ibp.ac.cn

Received: June 20, 2008 Accepted: September 22, 2008