

技术与方法

用于抗体/抗体片段表达的系统及其高表达策略

陈耀祖 张娟 王旻*

(天然药物活性物质与功能国家重点实验室 中国药科大学生化与分子生物学实验室 南京 210009)

摘要 随着诊断及治疗领域内单克隆抗体及片段的广泛应用,传统的杂交瘤生产技术已很难满足对其日益增长的需求。由于基因重组技术及生物工程技术的迅速发展及日益成熟,大规模生产单克隆抗体/片段已成为可能。对目前常用的载体及表达系统进行列举和比对,这些系统包括大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)系统、酵母表达系统、昆虫细胞表达系统及哺乳动物细胞表达系统。在第二部分,对提高表达产率的策略进行了探讨,其中包括:表达蛋白质本身的修饰(如蛋白融合、定点突变)、表达系统的选择、密码子优化、表达环境的优化和抗体体内表达等。最后,对抗体/抗体片段高表达的前景作了展望,认为生物信息学将在此领域发挥重大作用,并且相信建立高表达平台的时机已经来到。

关键词 抗体及抗体片段表达 表达系统 分子修饰 诱导优化

中图分类号 Q786

抗体/抗体片段(如 Fab、scFv)等由于对抗原结合高效性和特异性,在生化研究、诊断和治疗等领域正发挥越来越重要的作用,对其的需求量也日益增长。而用传统的杂交瘤技术生产单克隆抗体,由于其研发周期长、生产成本低,已成为大规模快速生产抗体/抗体片段的瓶颈。同时,基因重组技术及生物工程技术的发展日渐成熟,通过高通量筛选和大规模生产单克隆抗体/抗体片段已成为现实。当前,常用于生产抗体/抗体片段的表达系统通常有 *E. coli* 系统(产量大,但不宜实现翻译后加工)、酵母系统、昆虫细胞系统和哺乳动物细胞系统 4 种。以表达成本而言,大致是依次递增的,但就其翻译后加工的精确性而言,是依次递减的。为了能够高表达所需抗体/抗体片段,常采取如修饰表达蛋白本身的分子结构(如定点突变、蛋白质融合等)、选择最合适的表达载体、密码子优化以适应宿主的偏好性、优化表达环境和选择适宜的诱导时机等措施。本文就近年来有关通过生物工程技术生产抗体/抗体片段研究的研究现状进行简要的归纳总结,并且

就对未来抗体/抗体片段高效表达的研究趋势进行预示,认为研究热点在生物信息学的参与和大规模表达平台的建设方面。

1 表达系统

1.1 常见载体

常用载体如表 1 所示。

1.2 宿主

1.2.1 原核细胞 ① *E. coli* 宿主。常见的 *E. coli* 表达系统的相关性能如表 2 所示。

目前 *E. coli* 工程菌发展迅速, Merk 公司撰写的《pET 系统操作手册》对 *E. coli* 工程菌有较为详尽的列举,此外,关于菌株的信息,可通过 *E. coli* genotypes 网站(http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes)以及美国典型菌种收藏所(<http://www.atcc.org/>)查询。

1.2.2 真核细胞系统 ① 酵母表达宿主。酵母表达系统,既具有微生物的特点,又作为真核生物弥补了原核表达系统缺乏蛋白质翻译后加工的缺陷,目前常用的酵母表达系统有啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)与巴斯德毕赤氏酵母(*P. pastoris*)等;啤酒酵母安全性

收稿日期:2011-05-16 修回日期:2011-07-07

*通讯作者,电子信箱:minwang@cpu.edu.cn

表 1 常用载体
Table 1 General vector

载体	特点及用途
pET 家族	目标蛋白可以被 T7 RNA 聚合酶诱导表达
pBAD	阿拉伯糖诱导表达
pKK223-3	具有强启动子和转录终止子,用于蛋白质非融合表达
pIN III	位于转录调控序列下游为信号肽序列,用于蛋白质分泌型表达
λgt10	通过噬菌斑透明与否筛选重组基因,用于组建、表达 cDNA 文库
pCDNA3.1	强启动子 CMV,利于蛋白质在哺乳动物细胞内高表达,用于蛋白质在哺乳动物细胞内稳定瞬时高表达
pGFP	外源蛋白与 EGFP 融合表达;实现细胞定位;可对稳定表达的真核细胞进行筛选
AcNPV	克隆入外源基因的传递质粒与野生型 AcNPV 共转染昆虫细胞;用于蛋白质在昆虫细胞中的可溶表达
pHEN2	位于 scFv 基因和 gIII 之间引入琥珀突变终止密码,可方便的进行 scFv 的噬菌体展示或可溶性表达 ^[1]
pETBlue TM 系统	tet 启动子控制的 lacZα-肽段编码区用以筛选重组体,T7 启动子用以表达外源蛋白,用于 <i>E. coli</i> 中表达外源蛋白
pGEX	其多克隆位点含有三种不同阅读框,用于表达融合蛋白

表 2 常用 *E. coli* 表达系统
Table 2 General *E. coli* expression system

菌株	适用载体	特点
HB2151	噬菌体载体	可用于高亲和性 scFv 展示筛选模式或表达模式间切换
BL21 (DE3) a	携带 T7 启动子的载体	<i>lon⁻ompT</i> ,有效防止重组蛋白在胞内被水解
Origami B	pET 系列	<i>ompT⁻</i> , <i>trxB/gor</i> 基因双突变,形成胞质内氧化环境,从而有利于重组蛋白的正确折叠

Note: a. BL21 has many derivation such as *recA⁻*, *trxB⁻/gor⁻*, *lacY* et. al.

高,基因调控与高等真核生物接近,但表达的蛋白质常超糖基化,分泌能力不强,较难实现高密度发酵;巴斯德毕赤氏酵母发酵密度高,分泌外源产物能力强,糖基化修饰功能接近高等真核生物,但其分子生物学的研究基础差,发酵周期长,此外发酵时需添加甲醇亦限制了对它的使用。

②昆 hxl 虫细胞表达系统。杆状病毒/昆虫细胞表达系统可生产大量活性蛋白,并表现出比其它真核系统更高级真核细胞所具有的翻译后加工功能;同时,由于杆状病毒具有严格的宿主范围,因此它相对于哺乳

动物表达系统更为安全(此处主要描述宿主细胞,而非表达载体,故建议在此删除有关载体的信息)。然而,外源基因在杆状病毒/昆虫细胞系统中的高表达依赖很多因素:良好的生长培养基和精心护理是必须的;由于昆虫细胞对氧气供应需求量高,这使得喷氧变得非常必要,但由于昆虫细胞对压力极为敏感,其操作过程将十分苛刻。除这些因素外,待表达基因本身的性质亦影响着表达蛋白的产率^[2]。

③哺乳动物细胞宿主。常见用于表达蛋白的哺乳动物细胞宿主如表 3 所示。

表 3 哺乳动物细胞宿主
Table 3 General mammal expression system

细胞	来源	特点	应用
CHO	中国仓鼠卵巢细胞	表达蛋白接近天然蛋白,可贴壁生长,又可悬浮生长,便于下游产物分离纯化	用于表达外源蛋白
BHK	幼地鼠肾细胞	原始的细胞株是成纤维细胞,后经无数次传代后细胞可悬浮生长	用于增殖病毒,生产疫苗
SP2/0	小鼠骨髓瘤	半贴壁细胞,具有无限生长繁殖的能力,可进行连续传代培养,常与脾 B 细胞融合	用于制备单克隆抗体

2 抗体/抗体片段的高表达策略

2.1 融合蛋白

为了使原核系统能更方便快捷的表达重组蛋白,可将表达肽段与另外的蛋白质序列融合,常见的融合

蛋白及蛋白质水解位点如表 4、表 5^[3]所示。

2.2 蛋白质序列本身的修饰

通过定点突变,可以改变蛋白质在某些关键位点的氨基酸,优化其稳定性,增强与抗原的亲合性,提高表达产量。

表 4 通常用于表达的融合蛋白
Table 4 General fusion protein for expression

蛋白/肽段	优点
组氨酸标签	镍柱结合,易于分离纯化
GST	与带有谷胱甘肽载体特异结合,易于分离纯化
淀粉连接蛋白(MBP)	应用于易形成包含体的重组蛋白,增加蛋白质的可溶性和活性
NusA	与重组蛋白融合的 GFP 所产生的荧光,与目标基因表达产物的可溶性相关,因此 GFP 可被用于可溶蛋白的检测及筛选

表 5 常用蛋白酶及酶切位点
Table 5 General protease and cutting site

蛋白水解酶	酶切位点
胰激酶	DDDDK/X (X 为脯氨酸外任意氨基酸)
高精密度蛋白酶	LEVLFQ/GP
烟草腐蚀病毒蛋白酶(TEV)	ENLYFQ/G

Duefias 等^[4]发现鼠 mAb CB-Nm.1 的 V_L FR3 的 72 位氨基酸为 Ile,而相似抗体位于此位点的氨基酸为 Ser 或 Thr,通过点突变将 72 位 Ile 突变为 Thr,结果显示, Thr 突变使轻链得以表达,这表明 V_L 氨基酸序列决定其表达量,此外,密码子替换可能预防翻译过程中 mRNA 二级结构的形成。Pierre 等^[5]选择能够激活非活性状态 β 半乳糖苷酶的 scFv,并将 scFv13 进行 4 次定点突变,生成 scFv13R4。结果发现,scFv13R4 在胞质内以可溶形式积聚,于摇瓶及发酵罐中产率分别达 500mg/L 和 3.1g/L。Philip 等^[6]发现 S5 scFv 的 Gln44 与 Gln168 之间形成氢键,对形成其正确结构起重要作用,他们对 Gln44 和 Gln168 进行定点突变,并发现突变型的复性率均有明显的提高,其中 Q168M 的复性率达 27%。Redwan 等^[7]发现,多聚抗体中的 J 链在表达后,往往发生持续性降解,

这可能是由于其本身的两个自由巯基引起。因此,他们将 J 链蛋白中 Cys 突变成 Ser,结果发现,完全可溶 J 链的表达量达 11.5mg/L。scFv 重链与轻链的连接顺序对其表达也有影响。Hu 等^[8]设计了抗软骨藻酸 scFv 的 V_H-V_L 及 V_L-V_H 两种连接形式,并发现 V_H-V_L scFv 表达量约是 V_L-V_H scFv 的 3 倍,他们认为相对于 V_L-V_H 形式,V_H-V_L scFv 更易穿过细胞膜。此外,通过将目标蛋白与分子伴侣共表达,也是提高产率的选择之一。Hiroyuki 等^[9]发现将重组蛋白与分子伴侣 GroELS,trigger 因子(TF)或 DnaKJE 在 *E. coli* 中共表达,可使专一性产物产率提高 2.8 倍。Horacio 等^[10]将不同 scFv 与 MBP 相融合,发现 MBP-scFv 主要以可溶形式表达,产率为 70 ~ 120mg/L。值得注意的是,原本被报道极为难溶的抗荧光素 scFv4 - 4 - 20/212(即使在细胞质中亦不溶),当与 MBP 融合时,其可溶表达量达 50mg/L。

2.3 表达系统的选择

各类载体的性能及用途已如表 1 所示

总体来说,选择表达系统应考虑的因素有实验设备、所需表达的蛋白质、蛋白质是否有毒性、是否需要其他营养物的存在、是否需要蛋白质的高产率,蛋白质的纯化工艺、生产成本,调控、生物及环境安全和如何实施表达等方面的考虑^[11]。

杨炼等^[12]比较了黄曲霉毒素 B1 (AFB1) scFv 在 4 种载体 (pET20b、pET22b、pET28a、pET32a) 中的表达情况。他们发现,由于 pET22b 带有 pelB 和更为严谨的 T7 lac 启动子,其表达可溶且具有活性 AFB1 scFv 的能力最强。Sylvain 等^[13]比较了催化抗体 4B2 scFv 在 *E. coli*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* 中的表达情况如表 6 所示。

表 6 *E. coli*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis* 中表达 4B2 scFv 的情况
Table 6 4B2 scFv Expressed in *E. coli*, *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*

宿主	载体	表达量
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET21a	12mg/L (主要为包涵体)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pGT2a	尽管 scFv4 B2 可溶性大为增加,可溶部分中 scFv 4B2 未被纯化,这可能是因为 scFv 4B2 与 GroEL 紧密结合成多聚物
<i>P. pastoris</i> AD494 (DE3) ^b	pET21a	正确折叠率和产率均有所下降
<i>P. pastoris</i> GS115	pPICZαC	加富培养基 4mg/L b 基本培养基 400μg/L b
<i>K. lactis</i> MD2/1 (pKD1 ⁰) / MW98 - 8C (pKD1 ⁺)	pKDU7	加富培养基 1.3mg/L b 基本培养基 200μg/L b

Note: a. GroEL/ES and TF could be coexpressed in this vector; b. ScFv4B2 could not be immobilized in Ni - sepharose probably because His label was concealed in native conformation.

Keith 等^[14] 比较各种 scFv 于 *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris* 和 *E. coli* 中的表达情况,并检测所表达 scFv 的结合活性,试图建立快速、稳定的 scFv 表达平台。他们发现,尽管 scFv 于 *E. coli* 中平均表达量较低,但由于其表达 scFv 稳定,在分离纯化初期不需要对培养基进行浓缩,Keith 等认为 *E. coli* 是生产 scFv 最为稳定、快捷的表达系统。Brian 等^[15] 发现,当抗地高辛及其他强心苷 scFv26-10 与信号肽段 ssTorA 融合时,可以在具有氧化环境的胞质中被转移到细胞周质中,然而表达量很低。他们从 scFv26-10 突变库中筛选出 C8 突变,其在周质中的表达量提高了 1 倍。Noor 等^[16] 选择使用 AspII 作为分泌表达目的蛋白环糊精葡萄糖转移酶(CGTase)的信号肽,并将 AspII N 区第 3 至第 5 位氨基酸(分别为谷氨酸、苯丙氨酸、苯丙氨酸)均突变为精氨酸。他们发现,相对于野生型, N1R3 突变所引导的 CGTase 在周质中的酶活力增高,而 CGTase 在胞质内所形成的包涵体量却有所减少,并认为有 3 个原因造成分泌表达量的增加。Joel 等^[17] 使用信号肽 OmpA 以引导核酸酶 A 及 TEM- β 内酰胺酶的可溶表达,并构建若干 OmpA 突变,他们发现,将 OmpA 第 9 位丙氨酸替换为缬氨酸能显著提高其功能,与之融合的核酸酶 A 表达量提高 1 倍。并认为这是由于 OmpA H 区的疏水性及 β 折叠含量提高造成的。

2.4 密码子优化

由于天然抗体/scFv 来源于真核生物,其密码子很可能不为 *E. coli* 所偏好。Maertens 等^[18] 在 94 种全长蛋白质中比较了野生型及密码子优化型基因在 *E. coli* 中的表达情况,他们发现,相对于野生型,密码子优化型蛋白的产量提高了 70%。Ashutosh 等^[19] 设计合成了乙肝表面抗原的人源化鼠 scFv(5S-scFv)基因,其中密码子均为 *E. coli* 所偏好,他们发现相对于人源化 5S-scFv,其周质内 scFv 可溶表达量提高了 100 倍。Fab59 能够模拟红细胞生成素(TPO)。Lin 等^[20] 将 Fab59 轻链密码子优化为 *E. coli* 偏好的密码子,并发现,尽管密码优化子型 Fab59 对 *E. coli* 更具有毒性,与细菌分子伴侣 Skp 共表达亦增加了细胞毒性。其在 *E. coli* 中的表达量能够提高 100 倍,提纯的单体 Fab59 表达量达 3.5mg/L。需要注意的是,有时对目的基因进行宿主偏好密码子的替换,可能会引起相反的效果,这是由于密码子的改变,可能引起 mRNA 空间构象的改变;形成发卡结构;缩短半衰期;增加基因 GC 含量以及造成宿主中某种 tRNA 的稀缺。此外,Grzegorz 等^[21] 发现在翻译

水平,影响蛋白质表达量的决定因素是核糖体结合位点附近的 mRNA 结构,因为翻译过程中的限速步骤是肽链合成的起始,而非延伸。同时,Grzegorz 等指出使用偏好密码子能提高细胞对环境及外源蛋白的适应性,减少重组蛋白的错误折叠率。

2.5 条件优化

对表达过程中的条件优化,在外源蛋白的表达量起重要作用。需要考虑的因素包括温度、培养基配比、pH、培养时间及诱导条件等。

Santala 等^[22] 发现在 24℃ 诱导温度下, *E. coli* 内抗甲状腺激素 scFv 融合蛋白情况表达量最高,为 13mg/L。Zhang 等^[23] 优化了抗 HsBAG scFv-A15 在 *E. coli* 中表达的环境,其最终产率为 7.4mg/L。此外,他们在培养基中加入 0.3mol/L 蔗糖、2% 甘氨酸、1% Triton X-100,发现抗体的亲和性提高了 16.78 倍。Want 等^[24] 研究了 *E. coli* w3110 分批发酵 D1,3 抗溶菌酶 Fab 的产率,他们混入双-(1,3-dibutylbarbituric 酸)三甲酮氧鎢醇类和碘化丙啶(PI/BOX),伴随诱导条件的优化,Fab 的表达量可以提高 3 倍,最大生物量约降低 50%,然而此时活细胞含量更高。Hackel 等^[25] 在研究在重组酿酒酵母中抗转铁蛋白受体 scFv(OX26 scFv)的表达情况中优化表达温度、内质网折叠环境,并发现,当诱导温度为 20℃ 时,重链结合蛋白和二硫异构酶蛋白共同表达将 scFv 表达量提高了 10.4(± 0.3) 倍,此外,优化 scFv 基因的转化量,可以将分泌蛋白提高 7.1(± 0.2) 倍,纯化后,OX26 scFv 最终产率为 0.5mg/L。

2.6 体内直接表达

将携带有抗体或抗体片段的载体注射入动物体内,使其于哺乳动物体内直接表达,这也是抗体/抗体片段表达策略之一。Fang 等^[26] 将来自手足病病毒(FMDV)的 2A 自我加工片段基因与一段弗林蛋白酶“裂解位点”基因融合,通过此融合片段将抗 VEGFR2 mAb DC101 的重链与轻链基因连接,并将此 ORF 连入腺相关病毒(AAV)载体,构建为 rAAV8-DC101(HF2AL)。然后,Jianmin Fang 等将不同剂量的载体注入小鼠内,并发现,注射 28 天后, 4×10^{11} μ g(vector genomes)/鼠剂量组与 2×10^{11} μ g/鼠剂量组血清中 DC101 峰值均大于 8 000 μ g/ml,在其后 4 个月的研究中,血清中抗体仍维持在 1 000 μ g/ml 左右。

3 展 望

综上所述,对于抗体/抗体片段的表达、生产研究

正方兴未艾,越来越多的表达载体及表达系统被开发,并且笔者相信,更多功能强大,具有相当专一性或通用性,适用于抗体/抗体片段表达的载体将不断涌现。

在分子水平层面,目前提高抗体/抗体片段表达量常用的策略有:与增溶蛋白片段融合;定点突变以优化蛋白质空间结构;scFv VH-VL 链前后位置的替换;密码子优化等。

对于表达条件、提高表达量的策略有:培养及诱导环境的优化;载体及信号肽的替换;新型诱导剂的选择;体内直接表达等。

随着计算机技术的日新月异,信息学与生物学的交叉结合已是大势所趋。目前常用的软件有:用于PCR引物设计的Primer premier,用于序列比对的软件(如BlastX、BioEdit),用于蛋白质三维结构预测的软件(如PyMOL、Swissmodelpdv-Viewer)等。在抗体及抗体生产方面,利用生物信息学技术,可在计算机上预测各种突变对蛋白质结构稳定性、亲水性等各种性质的影响,从而利于在分子水平改造目的抗体/抗体片段,以达到提高表达量的目的。此外,同源蛋白质之间的比对也是提高表达量的选择之一。Partha等^[27]构建抗间皮素scFv(K1)-假单胞菌外毒素(PE)融合蛋白,并将K1-PE与被证明能够高表达的同源蛋白进行比对,分析保守区内氨基酸组成,并将目的框架区内较稀有的氨基酸残基转化为各同源蛋白中较常见的残基,结果发现,目的蛋白的稳定性及产率显著提高。

同时,在同一表达系统中,不同的蛋白质,其表达量和表达情况差异显著,而同一蛋白质在不同载体中的表达也千差万别。因此,似乎很难找到高表达抗体/抗体片段的标准程序,一般来说,抗体/抗体片段表达设计的基本程序是:①抗体/片段性质及结构的研究,设计定点或片段突变;②根据表达蛋白质的性质,选择表达系统;③根据表达方式及后期分离纯化需求的不同,进一步改造蛋白质,如融合信号肽段、融合(His)6或GST等;④根据宿主特性,优化密码子;优化培养环境及诱导条件、时间等;⑤设计分离纯化过程;⑥设计亲和性试验。

笔者设想能否建立这样一些平台,使某类性质相似的抗体/片段能够在平台上较迅捷的被研发、生产,即当一类抗体或片段的表达条件被优化及确定下来时,与之相似的蛋白质,即可被快速的套用到此表达程序中,只需做稍稍的修改。理论上,可将抗体分为超家族、家族、亚家族等,相信只要找到亚家族中各抗体之

间的共性、家族之间各亚家族的共性以及超家族中各家族的共性,以此类推,一套庞大的,具有系统性的高表达平台将会建立起来,这样,表达程序的自动化设计将有可能登上舞台。

参考文献

- [1] 甄永苏,邵荣光. 抗体工程药物. 北京:化学工业出版社, 2002:48.
Zhen Y S, Shao R G. Antibody Engineering Pharmaceuticals. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 48.
- [2] Sytse J, Piersmaa, Marij J P, et al. Tumor-specific regulatory T cells in cancer patients, Human Immunology, 2008, 69: 241-249.
- [3] Hans P S, Kim K M. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J Biotechnol. 2005, 115 (2):113-128.
- [4] Duenas M, Ayala M, Vazquez J, et al. A point mutation in a murine immunoglobulin V-region strongly influences the antibody yield in *Escherichia coli*. Gene, 1995, 158: 61-66.
- [5] Pierre M, Peter J, Greg W. Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. J Mol Biol, 1998, 280: 117-127.
- [6] Philip H T, Brenda M S, Patrick S S. Contributions of a highly conserved VH/VL hydrogen bonding interaction to scFv folding stability and refolding efficiency. Biophys J, 1998, 75 (3): 1473-1482.
- [7] Redwanel R M, Matar S M, Serour I A. Recombinant human J-chain: fix the protein aggregations and yield maximize. Hum Antibodies, 2006,15(3):95-102.
- [8] Hu X J, Ronan O D, Gerard J W. Cloning, expression and characterisation of a single-chain Fv antibody fragment against domoic acid in *Escherichia coli*. J Biotechnol, 2005,120(1):38-45.
- [9] Hiroyuki S, Yoichi K, Tomohisa K, et al. Functional expression of single-chain Fv antibody in the cytoplasm of *Escherichia coli* by thioredoxin fusion and co-expression of molecular chaperones. Protein Expr Purif, 2010,70(2):248-253.
- [10] Horacio B, Yariv M, Shelly S, et al. *Escherichia coli* Maltose-binding Protein as a Molecular Chaperone for Recombinant Intracellular Cytoplasmic Single-chain Antibodies. J Mol Biol, 2001,312:79-93.
- [11] Verma R, Boleti E, George A J T. Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. Journal of Immunological Methods, 1998, 216: 165-181.
- [12] 杨炼,刘自琴,刘蓉,等. 抗黄曲霉毒素B1单链抗体的表达载体的比较. 食品科学, 2010, 31(9): 171.
Yang L, Liu Z Q, Liu R, et al. China Biotechnology, 2010, 31 (9):171.
- [13] Sylvain R, Kliment P, Thierry D, et al. Comparison of three microbial hosts for the expression of an active catalytic scFv.

- Protein Expr Purif, 2010,70(2):248-253.
- [14] Keith D M, Jane W F, Sean A G, et al. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*, Protein Expr Purif, 2005,42(2):255-267.
- [15] Brian R, Blarcom T V, George G. A scFv Antibody Mutant Isolated in a Genetic Screen for Improved Export via the Twin Arginine Transporter Pathway Exhibits Faster Folding. J Mol Biol, 2007, 369, 631-639.
- [16] Noor F I, Salehuddin H, Nor M M, et al. A mutant L-asparaginase II signal peptide improves the secretion of recombinant cyclodextrin glucanotransferase and the viability of *Escherichia coli*, Biotechnol Lett DOI 10.1007/s10529-011-0517-8.
- [17] Joel G, Susan L, Masayoriinouye. Enhancement of protein translocation across the membrane by specific mutations in the hydrophobic region of the signal peptide, Journal of Bacteriology, 1990, 1225-1231.
- [18] Maertens B, Spriestersbach A, von Groll U, et al. Gene optimization mechanisms: a multi-gene study reveals a high success rate of full-length human proteins expressed in *Escherichia coli*. Protein Sci, 2010,19(7):1312-1326.
- [19] Tiwari A, Sankhyan A, Khanna N, et al. Enhanced periplasmic expression of high affinity humanized scFv against Hepatitis B surface antigen by codon optimization. Protein Expr Purif, 2010, 74(2):272-279.
- [20] Lin B, Renshaw M W, Autote K, et al. A step-wise approach significantly enhances protein yield of a rationally-designed agonist antibody fragment in *E. coli*, Protein Expr Purif, 2008 59 (1):55-63.
- [21] Grzegorz K, Andrew W M, David T, et al. Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*, Science, 2009,324:225.
- [22] Santala V, Lamminmäki U. Production of a biotinylated single-chain antibody fragment in the cytoplasm of *E. coli*. J Immunol Methods, 2004,284(1-2):165-175.
- [23] Zhang J L, Wang J H, Zhong R G, et al. Optimization of human anti-HBsAg scFv secretory expression in *Escherichia coli*, Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2009,23 (1):50-52.
- [24] Want A, Thomas O R, Kara B, et al. Studies related to antibody fragment (Fab) production in *Escherichia coli* W3110 fed-batch fermentation processes using multiparameter flow cytometry, Cytometry A, 2009,75(2):148-154.
- [25] Hackel B J, Huang D, Bubolz J C, et al. Production of soluble and active transferrin receptor-targeting single-chain antibody using *Saccharomyces cerevisiae*, Pharm Res, 2006, 23 (4):790-797.
- [26] Fang J M, Qian J J, Yi S L, et al. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. Nature Biotechnology, 2005, Apr;23, 584-590.
- [27] Partha S C, George V, Richard B, et al. Improved Stability and Yield of a Fv-Toxin Fusion Protein by Computer Design and Protein Engineering of the Fv. J Mol Biol, 1998,281:917-928.

The Expression System of Antibody and Antibody Fragment and Strategy of High-level Production

CHEN Yao-zu ZHANG Juan WANG Min

(State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract With the widely use of MAbs and their fragments, traditional hybridoma technology cannot meet the increasing demands of MAbs or antibody fragments. Owing to the rapid development and matures of recombinant DNA technology and biological engineering Technology, it is possible to manufacture MAbs/fragments in large scale. Firstly, the most popularly expression system such as *Escherichia coli* (*E. coli*), yeast, insect cell and mammalian cell system were listed and compared. To achieve high-level expression, secondly, the strategies including modification of recombinant protein (fusion of protein, site-specific mutagenesis), expression *in vivo*, choice of expression system, optimization of codon and expression circumstance were discussed. Finally, the prospective of the field of antibody/antibody fragment expression was described with consideration of bioinformatics playing an important role in this area, and it is the right time to construct the platform of high expression.

Key words Expression of antibody and it's fragment Expression system Molecule modification Induction optimization