

断裂内含肽在含有抗体铰链区氨基酸序列的非天然外显肽中的剪接

窦同璐, 陈 浩, 曹 津, 陈俊升, 朱建伟*

(上海交通大学药学院, 细胞工程及抗体药物教育部工程研究中心, 上海 200240)

摘要 内含肽是一种能够介导蛋白质分子从前体分子中自我切除, 同时将其双侧的外显肽蛋白通过肽键连接起来的功能性蛋白质, 其中断裂型内含肽在抗体连接领域有着广泛应用。但由于天然断裂型内含肽 C 端可特异性识别外显肽的前 3 位氨基酸序列——半胱氨酸、苯丙氨酸和天冬酰胺(CFN), 因此在蛋白剪接反应后不可避免的会引入外源氨基酸。由于本课题组前期开发出的断裂内含肽介导的双特异性抗体药物装配平台也存在该缺陷, 因此本研究尝试采用抗体铰链区的半胱氨酸、天冬氨酸和赖氨酸(CDK)取代“CFN”作为内含肽的识别位点, 并构建突变型断裂内含肽 $Npu *_{GEP} DnaE$ 。结果表明, 突变体可以识别“CDK”并成功发生了内含肽剪接反应。进而对影响该内含肽剪接反应平台的各因素如 NaCl 浓度、DTT 浓度、pH 和温度等进行了考察, 结果表明在所考察的范围内断裂内含肽的剪接反应均可很好的进行。该内含肽剪接反应平台的建立将有助于减少外源氨基酸的引入, 进一步拓展了内含肽底物宽泛性, 为内含肽应用于抗体药物特别是双特异性抗体药物的装配提供了技术支持。

关键词 断裂内含肽; 外显肽; 双特异性抗体药物; 蛋白质剪接; 外源氨基酸

中图分类号 Q816; Q511 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)05-0606-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190515

引用本文 窦同璐, 陈浩, 曹津, 等. 断裂内含肽在含有抗体铰链区氨基酸序列的非天然外显肽中的剪接[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(5):606-613.

Cite this article as: DOU Tonglu, CHEN Hao, CAO Jin, et al. Splicing reaction of split inteins between non-natural exteins containing amino acid sequences of antibody hinge area[J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(5):606-613.

Splicing reaction of split inteins between non-natural exteins containing amino acid sequences of antibody hinge area

DOU Tonglu, CHEN Hao, CAO Jin, CHEN Junsheng, ZHU Jianwei*

Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody (MOE), School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract Intein is a functional protein that mediates self-cleavage from precursor protein and simultaneously connects the exteins on both sides of the intein via peptide bonds. Among all kinds of inteins, split intein has a wide range of applications in the field of antibody ligation. However, since the naturally split intein specifically recognizes the first three amino acid sequences “cysteine, phenylalanine, and asparagine” (CFN) of the extein, exogenous amino acids are inevitably introduced after the protein splicing reaction. In this study, the amino acid sequence “cysteine, aspartic acid, and lysine” (CDK) of the antibody hinge region was substituted for “CFN” as the recognition site for the intein and the split intein Npu DnaE was mutated into $Npu *_{GEP}$ DnaE. The results showed that the mutant could recognize “CDK” and the intein splicing reaction could successfully take place. The factors affecting the intein splicing reaction platform, such as pH, temperature and the concentration of NaCl and DTT were investigated in this study. The results showed that the splicing reaction of the mutant performed well,

which indicated its potential usefulness in bispecific antibody assembly. In conclusion, the problem of introducing foreign amino acids was alleviated, the broadness of intein substrate was further expanded, and further technical support for the application of intein to the antibody assembly was provided.

Key words split intein; extein; bi-specific antibody drug; protein splicing; exogenous amino acids

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773621)

内含肽 (intein) 可以催化蛋白质剪接反应^[1], 将其自身从前体蛋白中自我剪除的同时将其两端的外显肽 (extein) 以肽键相连^[2-3]。尽管内含肽通常是以连续的形式存在, 但是某些内含肽在天然状态下是以断裂的形式存在的^[4-6]。这些天然存在的断裂内含肽可以催化蛋白质反式连接, 将两个外显肽连接成一个新的蛋白质, 并且此过程无需其他外部能量^[7-8]。

蛋白质反式剪接 (protein trans-splicing, PTS) 目前已经在蛋白质剪切和连接的过程中得到广泛的应用^[9], 如蛋白质的纯化^[10], 免疫毒素非特异性毒性的降低^[11], 蛋白质的环化^[12]及体内蛋白质工程^[13]等。本实验室结合这一技术, 开发出一种基于断裂内含肽的双特异性抗体装配系统, 可以很好的解决双特异性抗体轻重链错配的问题^[14-15], 此平台的建立为双特异性抗体药物的工业制备提供了技术支持。但值得注意的是, 天然的断裂内含肽与外显肽连接时, 通常在 C-末端连接处含有保守的“CFN”三肽序列, 它们是 C 末端外显肽序列的前 3 个氨基酸^[16]。这 3 个氨基酸在剪接后仍保留在剪接反应产物中^[6, 17], 这意味着最终的产物引入了外源氨基酸而可能影响抗体药物的质量。

为了解决这一问题, 本课题组探究寻找不引入外源氨基酸的断裂内含肽剪接断开位点。“KSCD-KTHT”是一段来自于人 IgG1 型抗体铰链区的氨基酸序列, 以“KS/CDK”为断开位点可以很好的解决引入外源氨基酸的问题。但是, 天然断裂蛋白质内含子的剪接活性高度依赖于外显肽, 当 C 末端外显肽前 3 位氨基酸为天然氨基酸序列即“CFN”时, 蛋白质内含子表现出高剪接活性^[18-19], 而当 C 末端外显肽序列为非天然氨基酸序列时, 会使断裂内含肽活性降低甚至丧失^[17], 而寻求“CDK”为断开位点高效剪接的天然断裂内含肽比较困难。本研究希望结合文献报道^[6], 以对野生型断裂内含肽第 122 位到 124 位进行突变, 使其可以识别“CDK”序列, 在不引入抗体外源氨基酸的情况下使断裂内

含肽的剪接反应得以顺利发生。这将能够帮助指导断裂内含肽在双特异性抗体装配的实际应用, 并有助于为更多复杂的工程内含肽的设计奠定基础。

1 材料

1.1 菌株和质粒

大肠埃希菌 DH5 α 、BL21 (DE3) (上海唯地生物技术有限公司); 包含抗体 CH1 片段的质粒 pET30a/CH1、包含断裂内含肽 *Npu* DnaE 的质粒 pET28a/*Npu* DnaE 和包含绿色荧光蛋白 (eGFP) 的质粒 pET28a/eGFP 均为本实验室保藏。

1.2 仪器与试剂

DNA 凝胶电泳仪和凝胶成像分析系统 (上海天能科技有限公司); 蛋白凝胶电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); PCR 所用 DNA 聚合酶、连接酶和限制性内切酶 (大连宝生物工程有限公司); 同源重组试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司); 质粒抽提试剂盒, PCR 产物回收试剂盒 (美国 Axygen 公司); ECL 发光显色液 (美国 Millipore 生物公司); 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG, 美国 Sigma 公司); 抗硫氧还蛋白抗体 (anti-T)、抗组氨酸标签抗体 (anti-His)、抗绿色荧光蛋白抗体 (anti-eGFP) 和羊抗鼠二抗 (goat anti-mouse IgG) 均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 引物合成及测序服务由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司提供。

2 方法

2.1 重组表达质粒的构建

本研究使用抗体片段 CH1 和模式蛋白 eGFP 作为外显肽, 在原核系统内表达内含肽与外显肽融合蛋白。本实验中用到的引物见表 1。

2.1.1 CH1-*Npu*N 重组表达质粒的构建 使用引物 1 (含限制性内切酶 *Eco*R I 位点) 和引物 2 从 pET30a/CH1 中通过 PCR 扩增 CH1 片段。使用引物 3 (含限制性内切酶 *Hind* III 位点) 和引物 4 从 pET28a/*Npu* DnaE 中扩增 *Npu*N 片段基因, 通过重

叠 PCR 连接 CH1 片段和 *NpuN* 片段, 将产物用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 使用 DNA 连接酶将产物与经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的 pET32a 质粒相连接, 将连接产物转化入大肠埃希菌 DH5 α 感受态中, 挑取单菌落并送测序。

2.1.2 *NpuC-CFN-eGFP* 和 *NpuC-CDK-eGFP* 野生型及突变型重组表达质粒的构建 C 端野生型重组表达质粒的构建以 pET28a/*NpuC-CDK-eGFP* 为例, 使用引物 5 和引物 6 从 pET28a/*Npu* DnaE 中 PCR 扩增 *NpuC* 片段基因。使用引物 7 和引物 10 从 pET28a/eGFP 中通过 PCR 扩增 eGFP 片段。通过重叠 PCR 连接 *NpuC* 片段和 eGFP(CDK)片段, 将产物使用同源重组的方法连入 pET28a 中, 将连接产物转化入大肠埃希菌 DH5 α 感受态中, 提取质粒后测序鉴定。pET28a/*NpuC-CFN-eGFP* 重组表

达质粒的构建采用引物 5、8、9 和 10, 其余步骤与上述过程相同。

C 端突变型重组表达质粒的构建以 pET28a/*NpuC* *_{GEP}-CDK-eGFP 为例, 以 pET28a/*NpuC-CDK-eGFP* 重组质粒为模版, 将 *NpuC* 第 122-124 位氨基酸由谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸(ERD)突变为甘氨酸、谷氨酸和脯氨酸(GEP)。以引物 11 和 12 对 pET28a/*NpuC-CDK-eGFP* 重组质粒进行 PCR 扩增。将得到的 PCR 产物使用 *Dpn* I 限制性内切酶进行消化, 之后对产物进行同源重组, 将产物转化入大肠埃希菌 DH5 α 感受态中, 挑取单菌落并送测序。*NpuC-CFN-eGFP* 突变体的构建以 pET28a/*NpuC-CFN-eGFP* 重组质粒为模板, 其余构建步骤同上。

Table 1 Primers used in the experiment

No.	Name	Sequence
1	CH1-F	5'-CCGGAATTCCGGCTCGACGAAGGGG-3'
2	CH1- <i>NpuN</i> -R1	5'-TTCATAGCTAACACTTGTCCAGCTCTT-3'
3	CH1- <i>NpuN</i> -F2	5'-AAGAGCTGCCACAAGTGTAAAGCTATGAA-3'
4	CH1- <i>NpuN</i> -R2	5'-GCGAAGCTTTAATTCCGGC-3
5	<i>NpuC</i> -eGFP-F1	5'-AGAAGGAGATATACATATGATCAAAATAGCCACA-3'
6	<i>NpuC</i> -CDK-eGFP-R1	5'-AACTCCAATGTCATAGACATTTGTTGCTAAATTTT-3'
7	<i>NpuC</i> -CDK-eGFP-F2	5'-AATGTCATGACATTGGAGTTGAGCGCGACCATAATTTC-3'
8	<i>NpuC</i> -CFN-eGFP-R1	5'-AATTTATCGCTCATGTTAAACAATTAGAAGCTATGAA-3'
9	<i>NpuC</i> -CFN-eGFP-F2	5'-TTCATAGCTCTAATTGTTAACATGACCGATAAAATT-3'
10	<i>NpuC</i> -eGFP-R2	5'-ATGACTGACGACTGATTATCACAAATTAGAAGCTAT-3'
11	<i>NpuC</i> -GEP-F	5'-ATTGGAGTTGGTAACCGCATAATTTCGACTCAAAAT-3'
12	<i>NpuC</i> -GEP-R	5'-AAAATTATGCGTTACCAACTCCAATGTCATAGACATT-3'

2.2 重组蛋白的诱导表达及纯化

2.2.1 重组蛋白的诱导表达 将以上所得重组表达质粒分别转化入大肠埃希菌 BL 21 (DE3) 中得到相应重组蛋白表达菌株(见表 2)。挑取单菌落分别接种至含有对应抗性的 LB 培养基中, 在

37 °C 下过夜培养。在 LB 培养基 500 mL 中 1:100 接种过夜培养的种子液继续培养, 当 A_{600} 达到 0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L 并过夜诱导 (25 °C, 180 r/min)。

Table 2 Proteins expressed in this study

Recombinant protein composition	Short name	Theoretical molecular weight /kD
Trx-6 × His-tag-CH1- <i>NpuN</i> -6 × His	CH1- <i>NpuN</i>	40
<i>NpuC</i> -CDK-eGFP-6 × His	<i>NpuC</i> -CDK-eGFP	33
<i>NpuC</i> -CFN-eGFP-6 × His	<i>NpuC</i> -CFN-eGFP	33
<i>NpuC</i> * _{GEP} -CDK-eGFP-6 × His	<i>NpuC</i> * _{GEP} -CDK-eGFP	33
<i>NpuC</i> * _{GEP} -CFN-eGFP-6 × His	<i>NpuC</i> * _{GEP} -CFN-eGFP	33

2.2.2 重组蛋白纯化 过夜诱导后, 4 000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 配制纯化用上样缓冲液 (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4), 用其将沉淀菌体重悬, 用高压匀质机加压至 900 bar

(1 bar = 0.1 MPa), 4 °C 破碎 3 min 后逐渐减压并收集菌液。后迅速在离心机内 4 °C, 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液放置在冰上备用, 收集裂菌沉淀并制备蛋白电泳样品。使用上样缓冲液与 2 mol/L

咪唑母液梯度稀释配制洗脱缓冲液, 进行梯度洗脱。取大肠埃希菌 BL 21 (DE3) 诱导前、诱导后、裂菌沉淀、裂菌上清液、纯化过程中的流穿及各洗脱浓度下收集的样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。

2.3 内含肽的体外剪接反应的探究

2.3.1 内含肽的体外剪接反应的检测 N 末端反应底物为 CH1-*NpuN*, 分别与 C 末端反应底物 *NpuC*-CFN-eGFP, *NpuC*-CDK-eGFP, *NpuC**_{GEP}-CDK-eGFP 和 *NpuC**_{GEP}-CDK-eGFP 以 1:1 物质的量比混合, 加入二硫苏糖醇 (DTT) 的终浓度为 1 mmol/L, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 的终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 反应 2 h。其中, 阳性对照的反应组合为 CH1-*NpuN* 与 *NpuC*-CFN-eGFP 反应。

以上剪接反应均加入蛋白电泳的 5 × 上样缓冲液终止反应, 反应产物用 Western blot 检测, 分别使用抗硫氧还蛋白抗体 (anti-T)、抗组氨酸抗体 (anti-His) 和抗绿色荧光蛋白抗体 (anti-eGFP) 作为一抗。随后, 用考马斯亮蓝染色法对内含肽剪接反应进行检测。

2.3.2 质谱鉴定酶解肽段相对分子质量 分别对 CH1-*NpuN* 与 *NpuC**_{GEP}-CDK-eGFP 发生的内含肽的剪接反应后和 CH1-*NpuN* 与 *NpuC*-CFN-eGFP 发生的内含肽的剪接反应后的体系进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。蛋白胶经过考马斯亮蓝法染色及脱色后, 在对应相对分子质量位置切割反应产物条带, 进行胶内酶解, 使用纳升液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱联用仪测定肽段的氨基酸构成。质谱分析由上海交通大学分析测试中心完成。

2.3.3 影响断裂内含肽剪接反应因素的探究

为了进一步研究改造后断裂内含肽的剪接活性, 本文对影响其反应产物生成率的 4 个因素进行考察, 分别是 NaCl 浓度、pH、DTT 浓度和温度。通过不同条件下断裂内含肽剪接产物生成率的比较, 考察构建的突变型断裂内含肽对剪接反应不同条件的耐受度。

反应初始条件均为在 25 °C, pH 7.4, DTT 终浓度 1 mmol/L, 内含肽剪接反应 2 h 后取样。加入 5 × 上样缓冲液煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳检测, 每组实验均重复 3 次。使用 Image J 软件扫描 SDS-PAGE 电泳图上对应条带的光密度并将内含肽剪接反应产物生成率绘制成柱形图, 产物生成率计算公式如下:

产物生成率 (%) = 目的条带的光密度/所有条带的光密度 × 100。

分别选取 NaCl 为 0、50、150、250、和 500 mmol/L 的剪接条件来研究 NaCl 对内含肽剪接反应的影响。以 NaCl 浓度为横坐标, 内含肽剪接效率为纵坐标, 绘制剪接效率随 NaCl 浓度变化柱状图。分别选取 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.4、8.0、8.5 和 9.0 的剪接条件来研究 pH 对内含肽剪接反应的影响。以 pH 为横坐标, 内含肽剪接效率为纵坐标, 绘制剪接效率随 pH 变化柱状图。分别选取 DTT 浓度为 1、2 和 4 mmol/L 来研究 DTT 浓度对内含肽剪接反应的影响。以 DTT 浓度为横坐标, 内含肽剪接效率为纵坐标, 绘制剪接效率随 DTT 浓度变化柱状图。

分别选取温度为 4 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C 的剪接条件来研究温度对内含肽剪接反应的影响。分别在内含肽剪接反应 0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 900, 1 440 min 时间点取样。以时间为横坐标, 内含肽剪接效率为纵坐标, 绘制不同温度下剪接效率随时间变化的曲线。

3 结 果

3.1 重组表达质粒的构建

CH1-*NpuN* 重叠 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示获得了 600 bp 左右的产物, 与目的片段大小一致 (图 1-A)。*NpuC*-CFN-eGFP 和 *NpuC*-CDK-eGFP 的重叠 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果显示在 750 bp 附近出现了单一、锐利条带, 与目的片段大小一致 (图 1-B)。突变的 *NpuC**_{GEP}-CFN-eGFP 和 *NpuC**_{GEP}-CDK-eGFP 的 PCR 产物消化处理后经 1% DNA 琼脂糖凝胶进行鉴定, 结果显示在 5 000 bp 以上出现了 2 条清晰锐利的条带, 与目的片段大小一致 (图 1-C)。以上结果经过测序后均正确。

3.2 重组蛋白的表达与纯化

将大肠埃希菌 BL 21 (DE3) 作为宿主细胞表达重组蛋白。蛋白经过镍柱纯化后, 使用 SDS-PAGE 进行鉴定。由图 2 可知对于内含肽 C 端反应底物 CH1-*NpuN*, 在 40 kD 处出现单一一条带, 符合预期相对分子质量。在 60 mmol/L 咪唑洗脱下浓度及纯度较高, 利用超滤管将洗脱液浓缩, 以待下一步反应。

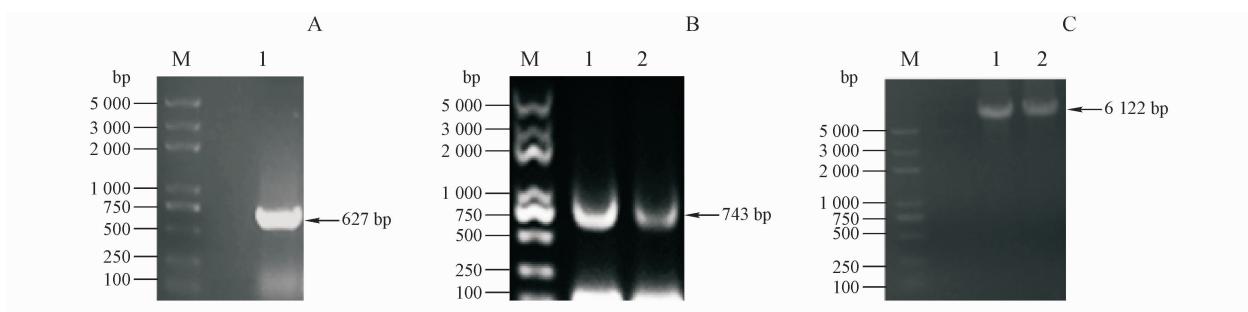


Figure 1 Detection of the PCR products by agarose gel electrophoresis
A: 1. CH1-*NpuN*; B: 1. *NpuC*- CFN-eGFP; 2. *NpuC*- CDK-eGFP; C: 1. *NpuC* * GEP- CFN-eGFP; 2. *NpuC* * GEP-CDK-eGFP

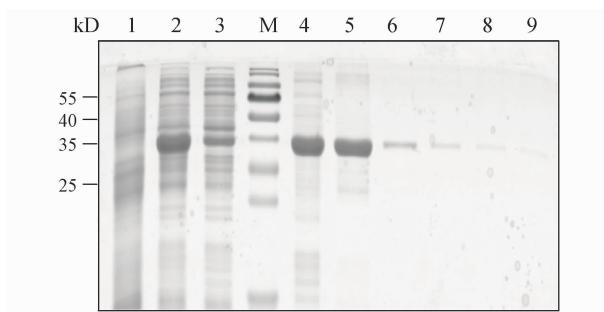


Figure 2 SDS-PAGE of CH1-*NpuN* purification, using Ni column, elution from 20 mmol/L imidazole to 500 mmol/L imidazole
1: Bacteria before adding IPTG; 2: Supernatant; 3: Flow through, M. marker; 4: 40 mmol/L imidazole elution; 5: 60 mmol/L imidazole elution; 6: 80 mmol/L imidazole elution; 7: 100 mmol/L imidazole elution; 8: 200 mmol/L imidazole elution; 9: 500 mmol/L imidazole elution

由 SDS-PAGE 电泳结果(图 3)可以看出,对于内含肽 C 端反应底物,使用镍柱梯度咪唑纯化后,在

33 kD 处出现单一条带,符合预期相对分子质量。由泳道 6 可以看出,在 20 mmol/L 咪唑洗脱下杂蛋白含量较高。由泳道 9 可以看出,在 100 mmol/L 咪唑洗脱下浓度及纯度较高,因此将在此浓度洗脱下的蛋白收集后利用超滤管浓缩,以待下一步反应。

3.3 内含肽的体外剪接反应的探究

3.3.1 内含肽的体外剪接反应的检测 Western blot 结果显示, *NpuN*-CH1 与 *NpuC*-CFN-eGFP 剪接后在 56 kD 处出现新条带,符合剪接产物 CH1-eGFP 的理论相对分子质量大小[(图 4-A(泳道 3), 图 4-B(泳道 4), 图 4-C(泳道 4)]。 *NpuN*-CH1 与 *NpuC*-CDK-eGFP 混合后加入 DTT 诱导,在相应位置并未出现新条带[图 4-B(泳道 6), 图 4-C(泳道 6)], 表明野生型 *Npu* DnaE 不能够识别前 3 位为

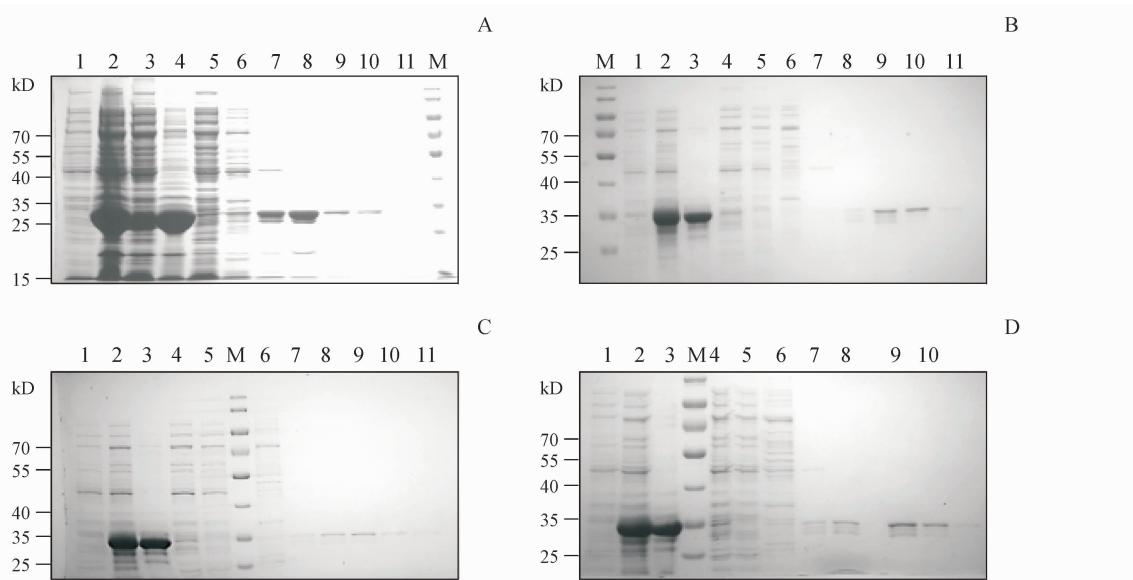


Figure 3 SDS-PAGE analysis of *NpuC* fusion protein purification
A: *NpuC* * GEP-CDK-eGFP; B: *NpuC*-CDK-eGFP; C: *NpuC* * GEP- CFN-eGFP; D: *NpuC*- CFN-eGFP purification, using Ni column, elution from 20 mmol/L imidazole to 500 mmol/L imidazole

1: Protein expression before induction; 2: Protein expression after induction; 3: Sediment; 4: Supernatant; 5: Flow through; 6: 20 mmol/L imidazole elution; 7: 40 mmol/L imidazole elution; 8: 60 mmol/L imidazole elution; 9: 100 mmol/L imidazole elution; 10: 200 mmol/L imidazole elution; 11: 500 mmol/L imidazole elution

CDK 的 C 端外显肽, 反式剪接反应无法进行。*NpuN-CH1* 与 *NpuC * GEP-CDK-eGFP* 的反应体系内检测到 56 kD 处出现了新条带, 大小符合剪接产物 *CH1-CDK-eGFP* 的理论相对分子质量[(图 4-A(泳

道 2), 图 4-B(泳道 2), 图 4-C(泳道 2)]。表明将 122 ~ 124 位的 ERD 突变为 GEP 的 *Npu* DnaE 突变体能够识别前 3 位为 CDK 的 C 端外显肽, 进而发生反式剪接。

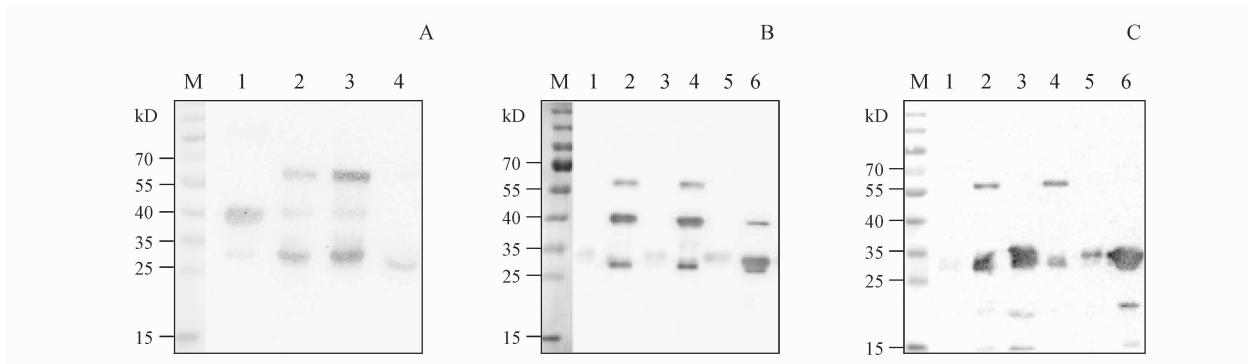


Figure 4 Western Blot of intein splicing reaction

A: anti-Trx antibody. 1. *CH1-NpuN*; 2. *CH1-(Npu * GEP)-CDK-eGFP*; 3. *CH1-(Npu)-CFN-eGFP*; 4. *CH1-(Npu)-CDK-eGFP*
B: anti-his antibody; C: anti-GFP antibody. 1. *NpuC * GEP-CDK-eGFP*; 2. *CH1-Npu * GEP-CDK-eGFP*; 3. *NpuC-CFN-eGFP*; 4. *CH1-(Npu)-CFN-eGFP*; 5. *NpuC-CDK-eGFP*; 6. *CH1-(Npu)-CDK-eGFP*

用考马斯亮蓝染色法对内含肽剪接反应进行检测(图 5), 可以看出, *CH1-NpuN* 与 *NpuC * GEP-CDK-eGFP* 发生的内含肽的剪接反应, 不仅可以在 Western Blot 中被检测出, 也可以在 SDS-PAGE 中被检测出。*CH1-eGFP* 理论相对分子质量为 56 kD, 反应产物相对分子质量大小与阳性对照一致。



Figure 5 SDS-PAGE of intein splicing reaction

1: *CH1-NpuN*; 2: *NpuC-CFN-eGFP*; 3: *CH1-(Npu)-CFN-eGFP* reaction; 4: *NpuC * GEP-CFN-eGFP*; 5: *CH1-(Npu * GEP)-CFN-eGFP* reaction; 6: *NpuC * GEP-CDK-eGFP*; 7: *CH1-(Npu * GEP)-CDK-eGFP* reaction

3.3.2 质谱鉴定酶解肽段相对分子质量 *CH1-NpuN* 与 *NpuC * GEP-CDK-eGFP* 发生的内含肽的剪接反应后和 *CH1-NpuN* 与 *NpuC-CFN-eGFP* 发生的内含肽的剪接反应后, 这 2 个内含肽剪接反应产物经过酶解后, 分别可以检测到包含有“CDK”和“CFN”的肽段, 肽段的理论相对分子质量和实测相对分子质量见表 3, 说明产生了本研究预期的反应产物, 突变后的断裂内含肽可以成功识别 C 末端

前 3 位氨基酸为“CDK”的外显肽。

Table 3 LC/MS identification of the splicing products

Peptides sequence	Theoretical molecular weight/kD	Measured molecular weight/kD
KVEPPKSCFNMSK	1 568. 744 73	1 568. 751 88
VEPPKSCDK	1 059. 513 92	1 059. 510 38

3.3.3 影响断裂内含肽剪接反应因素的探究 对于内含肽剪接反应的考察中(图 6), *NaCl* 浓度为 0 ~ 500 mmol/L 时, 产物生成率为 33.6% ~ 47.8%。*DTT* 浓度在 1 ~ 4 mmol/L 时, 产物生成率为 47.4% ~ 54.1%。*pH* 为 6 ~ 9 时, 产物生成率为 38.3% ~ 51.1%。

由图 7 可以看出, 对于温度影响内含肽剪接反应速率的考察中, 除了 4 °C 之外, 在其他 3 个温度下, 反应 30 min 后产物生成率均可达到 60% 以上, 在 4 °C 条件下, 反应 30 min 后产物生成率均可达到 40% 以上。在反应 24 h 后, 37 °C 最终反应效率最高, 达到 85.1%。

4 讨 论

内含肽在蛋白质工程领域是一个非常强大的工具, 特别是在蛋白质连接领域有着十分广阔的应用。但是天然断裂型内含肽对 C 末端外显肽的识别十分保守, 使得在蛋白质连接的过程中引入外源氨基酸, 导致重组蛋白潜在的免疫原性增加, 从而降低了重组蛋白的质量。因此, 拓展断裂内含肽对

C端外显肽的宽泛性,使其能够识别抗体铰链区中

的CDK等氨基酸序列十分必要。

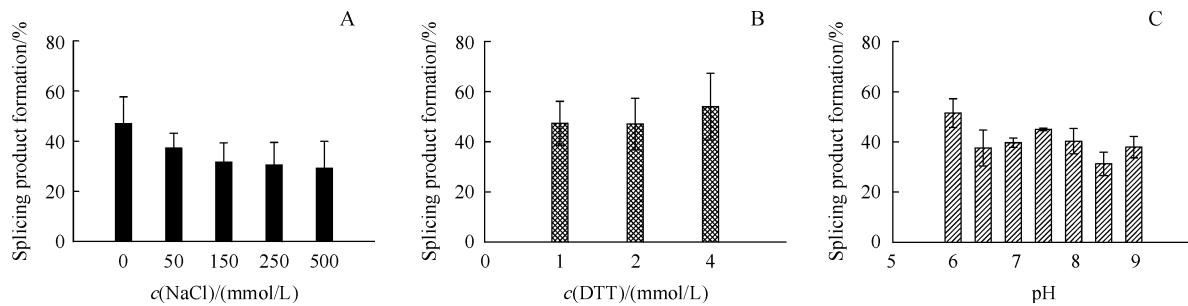


Figure 6 Factors affecting the splicing reaction of intein ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Splicing product formation with specified NaCl concentration; B: Splicing product formation with specified DTT concentration; C: Splicing product formation with specified pH

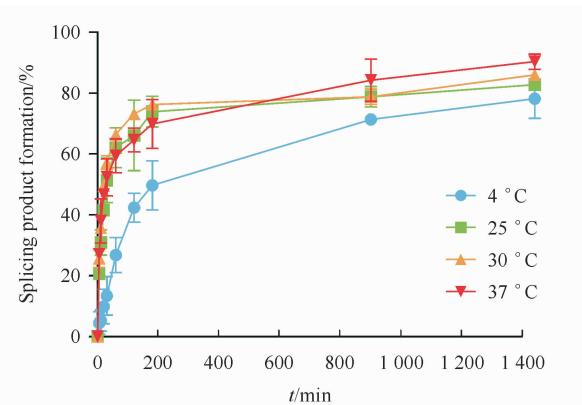


Figure 7 Reaction kinetic curves under different temperature conditions between CH1-NpuN(N) and NpuC * GEP-eGFP

本研究构建了 *NpuC * GEP* 突变体, 探究内含肽的底物宽泛性以及首次探究 C 端外显肽前 3 位作用。结果表明在 C 末端前 3 位氨基酸为“CDK”时, *NpuC * GEP* 突变体成功发生了剪接反应。接下来, 本研究对影响断裂内含肽剪接反应的因素进行考察。由结果可以看出考察的不同的 NaCl 浓度断裂内含肽剪接反应的影响, 除 NaCl 浓度为 0 mmol/L 时产物生成率较高之外, 在不同 NaCl 浓度下产物生成率并无太大区别。同样的, 在不同 pH 和 DTT 浓度下进行断裂内含肽的剪接反应, 产物生成率的区别也不大。在对反应温度和反应时间进行考察中, 在反应温度为 25 °C、30 °C 和 37 °C 的条件下反应 24 h 后, 产物生成率均可达 85% 以上。对上述各种因素的考察体现出本技术平台的优势, 即在所考察的范围内断裂内含肽的剪接反应均可很好的进行反应, 说明本研究构建的突变型断裂内含肽的适用的剪接反应条件宽泛, 而这些条件都是在双特异性抗体装配中可能采用的, 因此本平台可以很好

的为后续双特异性抗体的装配提供技术支持。同时, 本课题仍有许多方面可以进行更为深入的研究, 例如在断裂内含肽介导的双特异性抗体装配平台中, 可以进一步探索内含肽 N 端融合蛋白和 C 端融合蛋白进行剪接反应时加入的摩尔比, 加入还原剂类型的筛选以及用量等等。总之, 本文为双特异性抗体的开发提供了新的思路, 为生物制药的工艺开发提供了有力的技术支持。

参考文献

- [1] Lennon CW, Belfort M. Inteins [J]. *Curr Biol*, 2017, 27(6): R204–R206.
- [2] Carvajal-Vallejos P, Pallissé R, Mootz HD, et al. Unprecedented rates and efficiencies revealed for new natural split inteins from metagenomic sources [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(34): 28686–28696.
- [3] Xu YR, Zhang L, Ma BY, et al. Intermolecular disulfide bonds between unpaired cysteines retard the C-terminal trans-cleavage of Npu DnaE [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2018, 118: 6–12.
- [4] Stevens AJ, Sekar G, Gramespacher JA, et al. An atypical mechanism of split intein molecular recognition and folding [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(37): 11791–11799.
- [5] Gramespacher JA, Stevens AJ, Thompson RE, et al. Improved protein splicing using embedded split inteins [J]. *Protein Sci*, 2018, 27(3): 614–619.
- [6] Stevens AJ, Sekar G, Shah NH, et al. A promiscuous split intein with expanded protein engineering applications [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(32): 8538–8543.
- [7] Iwai H, Züger S, Jin J, et al. Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from *Nostoc punctiforme* [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(7): 1853–1858.
- [8] Li YF. Split-inteins and their bioapplications [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(11): 2121–2137.
- [9] Mills KV, Johnson MA, Perler FB. Protein splicing: how inteins

- escape from precursor proteins [J]. *J Biol Chem*, 2014, **289** (21):14498 – 14505.
- [10] Shi SW, Chen HH, Jiang H, et al. A novel self-cleavable tag Zbasic-ΔI-CM and its application in the soluble expression of recombinant human interleukin-15 in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, **101** (3):1133 – 1142.
- [11] Wang J, Han L, Chen JS, et al. Reduction of non-specific toxicity of immunotoxin by intein mediated reconstitution on target cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, **66**:288 – 295.
- [12] Scott CP, Abel-Santos E, Wall M, et al. Production of cyclic peptides and proteins *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96** (24):13638 – 13643.
- [13] Giriati I, Muir TW. Protein semi-synthesis in living cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, **125** (24):7180 – 7181.
- [14] Han L, Chen JS, Ding K, et al. Efficient generation of bispecific IgG antibodies by split intein mediated protein trans-splicing sys-
- tem [J]. *Sci Rep*, 2017, **7** (1):8360.
- [15] Han L, Zong HF, Zhou YX, et al. Naturally split intein Npu DnaE mediated rapid generation of bispecific IgG antibodies [J]. *Methods*, 2019, **154**:32 – 37.
- [16] Shah NH, Eryilmaz E, Cowburn D, et al. Extein residues play an intimate role in the rate-limiting step of protein trans-splicing [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, **135** (15):5839 – 5847.
- [17] Cherian M, Pedamallu CS, Tori K, et al. Faster protein splicing with the *Nostoc punctiforme* DnaE intein using non-native extein residues [J]. *J Biol Chem*, 2013, **288** (9):6202 – 6211.
- [18] Mills KV, Perler FB. The mechanism of intein-mediated protein splicing: variations on a theme [J]. *Protein Pept Lett*, 2005, **12** (8):751 – 755.
- [19] Johnson MA, Southworth MW, Herrmann T, et al. NMR structure of a KlbA intein precursor from *Methanococcus jannaschii* [J]. *Protein Sci*, 2007, **16** (7):1316 – 1328.

· 校园信息 ·

中国药科大学 2019 年 8 ~ 9 月获授权专利情况

申请(专利)号	名称	发明(设计)人
CN201710012303.9	一种表面结合载药纳米粒的干细胞肿瘤靶向系统的构建	宗莉;金亮;徐梦露
CN201711082021.2	一种大环内酯类抗生素中空多孔型分子印迹聚合物的制备方法及应用	纪顺利;丁黎;杨文;李腾飞;李多
CN201710195714.6	含脲基的 IDO1 和 IDO2 双重抑制剂、其制法及其医药用途	朱启华;方升阳;段齐珠;徐云根;江振洲;衡浩;张陆勇
CN201810268573.0	一种基质金属蛋白酶 9 的多肽抑制剂及其应用	薛建鹏;徐寒梅;韩艳珍;胡加亮;李伟光;栾佳琪
CN201610678121.0	一种高活性长效降糖融合蛋白及其制备方法与医药用途	谭树华;古丽丽;付剑;张永波;田清华;王玥;龚晓健
CN201510626510.4	一种基于碳量子点的荧光双水相的制备方法	何华;王娜;潘仁锋;肖得力;彭军;李思桥
CN201710195165.2	具有抗癌活性的 3-O-(对甲磺酸酯苯甲基)抗坏血酸及制备方法	栾立标;胡思源
CN201710247597.3	一种尼莫地平脂质纳米粒及其制备工艺	周建平;丁杨;姜孟劳
CN201610463035.8	喹唑啉-N-苯乙基四氢异喹啉类化合物及其制备方法和应用	黄文龙;钱海;崔建;刘保民;邱倩倩;吴玉祥;潘渺博
CN201610227136.5	高活性艾塞那肽类似物及其医药应用	谭树华;古丽丽;黄传龙;王玥;许雅琼
CN201910073368.3	SNase 在制备治疗炎症性肠病药物中的应用	吴洁;董万法;张婷婷
CN201710046028.2	白花前胡乙素的医药用途	徐晓军;李会军;卢翀;郑祖国;李萍
CN201810090735.6	神经氨酸酶抑制剂用于制备治疗心肌炎的药物的用途	齐炼文;张蕾;尹小建;李菁;马高祥
CN201710290191.3	一种七甲川菁荧光染料及其肿瘤精准诊断和治疗的应用	顾月清;马袆;韩智豪
CN201710492893. X	一种 5-碘酰氧基-8-酰胺基喹啉衍生物的制备方法	朱启华;吴欢欢;徐云根;贺新;王致斌;崔芷莹;纪德重;其他发明人请求不公开姓名
CN201710119592.2	硫酸化透明质酸 2-辛基十二醇酯	栾立标;易芳莲
CN201710309493.0	一种评估药物发生不良反应倾向的方法	顾月清;洪尚志;包未央
CN201610064215.9	吡咯[4,3,2-de]喹啉-2(1H)-酮类 BRD4 蛋白抑制剂的制备方法及其用途	陆涛;陈亚东;张智敏;冉挺;姜飞;陈红丽;卞媛媛;张德伟
CN201610250472.1	4-芳香胺-香豆素衍生物及其制备方法和医药用途	向华;莫希斯;骆国顺;王崇;邱荣茂;陈明琪;陈德英;尤启冬

检索用数据库: CNIPR 中外专利数据库服务平台; 检索日期: 2019-10-21

(图书与信息中心 顾东蕾)