

C 端断裂型内含肽 *Npu DnaE* 介导的抗体片段及免疫毒素 在大肠埃希菌中的可溶性表达与纯化

曹 津, 陈 浩, 张 静, 朱建伟*, 陈俊升**

(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 为实现免疫毒素在大肠杆菌内的可溶性表达, 避免包涵体的形成带来的繁琐操作, 本实验选用抗间皮素单克隆抗体 SS1, 以及其与毒素 PE38KDEL 连接的产物 SS1P 为实验对象; 采用促溶标签结合低温诱导方式实现重组蛋白在大肠埃希菌 (SHuffle T7) 胞质内可溶性表达, 其中促溶标签连接在 *NpuC_{D118G}* 突变体的 N 端, SS1/SS1P 连接在 *NpuC_{D118G}* 突变体的 C 端; 采用 Dextrin Beads 6FF 柱亲和色谱和镍柱亲和色谱方法实现目的蛋白纯化; 采用分别表达纯化后混合的方法实现断裂内含肽 *Npu DnaE* 的自我断裂; 采用镍柱亲和色谱除去未剪切的前体和断裂后促溶标签, 其中, SS1 进一步用 Capto L 捕获富集; 采用 Fortebio 检测蛋白亲和力。本实验通过内含肽与促溶标签和纯化标签连用, 实现了免疫毒素在大肠埃希菌中的可溶性表达, 简化了纯化方式。该方法为开发基于大肠埃希菌表达系统的可溶性表达、纯化免疫毒素类药用重组蛋白方法提供了理论参考。

关键词 免疫毒素; 促溶标签; 断裂内含肽

中图分类号 Q78 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)02-0213-10

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200213

引用本文 曹津, 陈浩, 张静, 等. C 端断裂型内含肽 *Npu DnaE* 介导的抗体片段及免疫毒素在大肠埃希菌中的可溶性表达与纯化 [J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(2): 213-222.

Cite this article as: CAO Jin, CHEN Hao, ZHANG Jing, et al. Expression and purification of soluble recombinant antibody fragment and immunotoxin in *Escherichia coli* using *Npu DnaE* C-cleavage mutant [J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(2): 213-222.

Expression and purification of soluble recombinant antibody fragment and immunotoxin in *Escherichia coli* using *Npu DnaE* C-cleavage mutant

CAO Jin, CHEN Hao, ZHANG Jing, ZHU Jianwei*, CHEN Junsheng**

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

Abstract The purpose of this experiment is to achieve the soluble expression of immunotoxins in *Escherichia coli* and avoid the complicated operation caused by the formation of inclusion bodies. An anti-mesothelin monoclonal antibody SS1 and its derivative SS1P which composing of SS1 and a truncated pseudomonas exotoxin PE38KDEL were used as the passenger protein. We took advantages of solubility promoting fusion tags and the self-cleaving split intein in recombinant antibody fragment and immunotoxin expression and purification. We constructed solubilizing tags-*NpuC_{D118G}* fusion tags, and recombinant SS1/SS1P were fused at the C-terminal of the fusion tags. The constructs were expressed in *E. coli* (SHuffle T7) cytoplasm in soluble form at low temperature. Dextrin Beads 6FF column and Nickel column was used to purify the fusion protein. The self-cleavage of the fusion protein was achieved by adding the *NpuN* fragment. The released solubilizing tag and unreacted precursor were removed by Nickel column and the cleaved antibody fragment and immunotoxin were further captured by Capto L. The dissociation constant of the obtained Fv and immunotoxin were determined by Fortebio. In summary, the current method

收稿日期 2020-02-22 通信作者 * Tel: 021-34204631 E-mail: jianweiz@sjtu.edu.cn

** Tel: 021-34204631 E-mail: js.chan@sjtu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81773621)

could enhance the solubility of antibody fragment and immunotoxin in *E. coli*, and could improve the purification process. This method provides a reference for the development of a method for soluble expression and purification of immunotoxin-type pharmaceutical recombinant proteins based on the *Escherichia coli* expression system.

Key words immunotoxin; solubilizing label; split intein

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

长期以来,大肠埃希菌一直是外源蛋白的首选表达系统,但由于重组蛋白在大肠埃希菌中合成速度过快导致没有足够的时间进行折叠、含硫氨基酸过多不易正确配对、胞内 pH 接近蛋白等电点、缺乏真核生物中翻译后修饰所需的酶类和辅助因子等原因,重组蛋白在大肠埃希菌中非常容易形成包涵体,导致其应用受到了限制^[1-2]。目前,国内外对蛋白质体外复性研究较多,过程主要包括破菌、包涵体洗涤、包涵体溶解、复性等步骤。蛋白质复性是一个非常复杂的环节,其复性结果除与蛋白质复性的过程控制相关外,还很大程度上与蛋白质本身的性质有关,该过程费时费力,且不经济。虽然添加促溶标签可以促进蛋白在大肠埃希菌中的可溶性表达,但含有促溶标签的重组蛋白需要用多种蛋白酶切除标签,在大规模生产时使用蛋白酶降解成本很高,应用也受到了限制。因此,探索重组蛋白在大肠埃希菌中的可溶性表达以及低成本的标签纯化方式具有广泛的应用前景。

免疫毒素是指将抗体和毒素蛋白连接起来,利用抗体的靶向性和毒素的细胞毒性,结合特定的细胞表面蛋白从而杀伤细胞。用免疫毒素治疗肿瘤具有广泛的应用前景^[3]。目前,已有免疫毒素类药物被美国 FDA 批准上市,如用于治疗毛细胞白血病成人患者的 Lumoxiti^[4],相信未来还会有更多的类似药物被批准。

SS1 是小鼠中提取的抗间皮素单克隆抗体的单链二硫键稳定抗体(scdsFv)片段,可与间皮素特异性结合。其与假单胞菌外毒素 A (*Pseudomonas exotoxin A*) 的衍生毒素 PE38KDEL 连接的产物 SS1P 目前已进入临床Ⅱ期阶段,主要用于针对间皮瘤、卵巢癌等的治疗^[5]。

内含肽是一种可介导前体蛋白质自我切除,将两侧外显肽连接在一起的功能性蛋白质。内含肽按照结构特征分类,可分为标准蛋白内含肽、微小蛋白内含肽和断裂蛋白内含肽^[7-8]。其中,标准蛋白内含肽由蛋白剪接结构域和归巢核酸内切酶结

构域组成;微小蛋白内含肽仅含有剪接结构域;断裂蛋白内含肽的剪接结构域则位于两个不同的编码框中^[6-7]。断裂内含肽如 *Npu DnaE* 可有效避免体内提前断裂,具有广泛应用前景^[8-12]。Zetteler 等^[13]证实, *Npu DnaE* 具有很高的反应速率,且适用条件宽泛。研究表明,天然内含肽分子内的半胱氨酸之间形成了二硫键,降低了内含肽的剪切反应速率,加入 DTT 会破坏分子内的二硫键,可能会提高断裂反应速率^[14]。Ramirez 等^[15]建立了 *Npu DnaE_{D118G}* 的突变体,这种突变体可以在有效抑制 N 端断裂的同时提高 C 端的断裂效率,在重组蛋白生产纯化中被广为应用。

本实验中将断裂内含肽与促溶标签联用,实现免疫毒素在大肠埃希菌中的可溶性表达;同时,内含肽的自我断裂可以很容易地将标签从免疫毒素中除去,避免通过蛋白酶等方法去除标签,降低了实验成本。

1 材 料

1.1 试 剂

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);抗组氨酸标签抗体、羊抗鼠二抗(anti His, goat anti mouse IgG, 上海生工生物工程股份有限公司);生物素化人源间皮素(北京义翘神州生物科技有限公司);其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

Dextrin Beads 6FF 柱和镍柱(常州天地人和生物科技有限公司);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 BioRad 公司);型号为 Octet RED 96 生物分子相互作用工作站(Fortebio, 上海交通大学生命

学院)。

1.3 菌株和质粒

大肠埃希菌 DH5 α 、SHuffle T7 感受态均为实验室自制;包含促溶标签麦芽糖结合蛋白(MBP)片段的质粒 pET30a/MBP、包含断裂内含肽 *Npu* DnaE 的 C 端内含肽的质粒 pET32a/*Npu*C、包含断裂内含肽 *Npu* DnaE 的 N 端内含肽的质粒 pET30a/*Npu*N 均为实验室保存^[16];包含毒素 PE38KDEL 片段的质粒 pET32a/PE38KDEL 为实验室保存^[17];包含 scdsFv 片段的质粒 pUC57/SS1 由金斯瑞生物科技有限公司合成。

2 方 法

2.1 重组表达质粒的构建

本研究以断裂内含肽 *Npu* DnaE (*Npu* DnaE_{D118G}突变体)为工具,通过外显肽与 *Npu*C 端连接构建 4 种重组质粒(图 1),分别在大肠埃希菌 SHuffle T7 中表达后比较重组蛋白的溶解性。实验所用到的引物见表 1,所需构建的质粒、所用模板等信息见表 2。其中,6H 为 His 标签的缩写,TH 为硫氧还蛋白促溶标签(thioredoxins, Trx)与 His 标签联用的缩写。

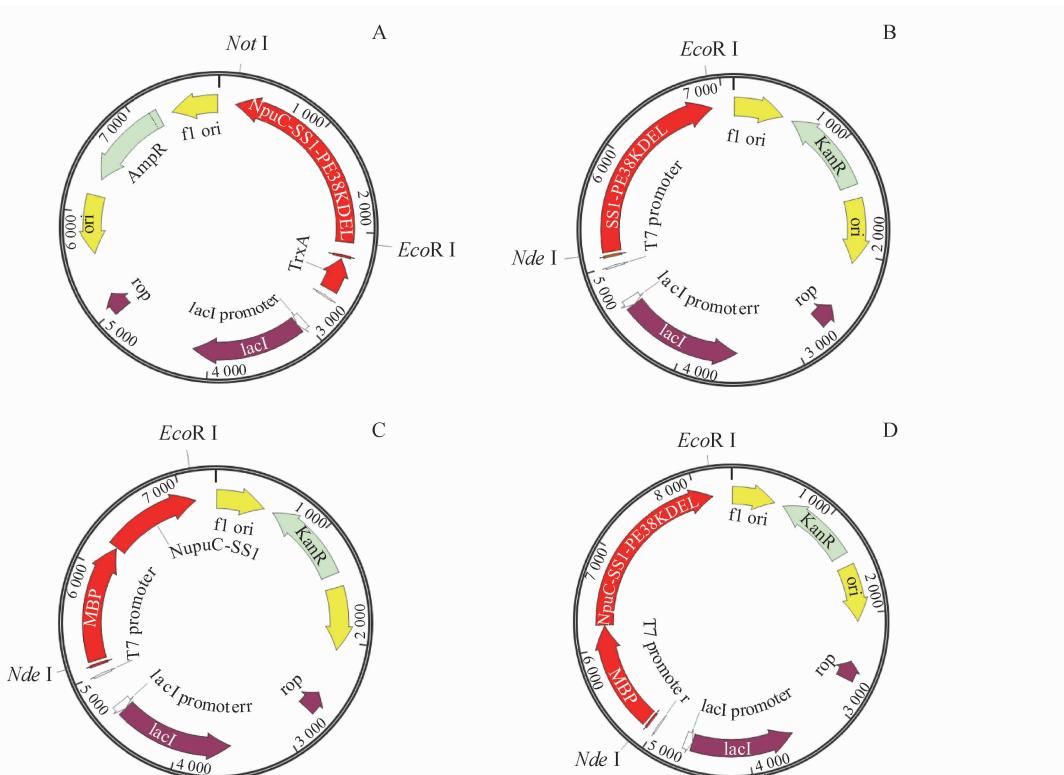


Figure 1 Schematic diagram of plasmids

A:pET32a/TH-*Npu*C-SS1-PE38KDEL; B:pET28a/6H-SS1-PE38KDEL; C:pET28a/6H-MBP-*Npu*C-SS1; D:pET28a/6H-MBP-*Npu*C-SS1-PE38KDEL

Table 1 Primers used to construct plasmids

No.	Sequence
1	5'-CATGGCTGATATCGGATCCGAATTGATGATCGAGATAGCCACAGAGAAATA-3'
2	5'-CCAGACTGCTGCAGTTGTACCTGCATATTAGAAGCTATGAAGCCATTCTCGAGTGCAAA-3'
3	5'-CCAGACTGCTGCAGTTGTACCTGCAT-3'
4	5'-GCAAGCGGAGGACCAAGAA-3'
5	5'-GTGCTGGACAAAGTTGAAATAGGCCAGCCCTGGCCGGCTGACCGCGCACCAAG-3'
6	5'-TGGTGGTGGTGCCTCGAGTGCAGGCCGCTCACAGCTCGTCTTCGGCGG-3'
7	5'-TGAAAGAGTTCTCGACGCTAACCTGGCATGATCAAATAGCCACACGTAATATTT-3'
8	5'-GCCGGACTACGCCAGCCAGCCCGAAACCGCCGAAAGACGAGCTGTGAGGAATTCAA-3'
9	5'-TGCTGTCCACCAAGGGCGAGGCCGATCTGGTGGTGGCGATCCGGAGGTGGCGAAC-3'
10	5'-CTCGTATCACCAAGGGCGAGGCCGATCTGGTGGTGGCGATCCGGAGGTGGCGAAC-3'
11	5'-GGATCCGGAGGTGGCGGAAGCATGATCAAATAGCCACACGTAATATTAGGCAAAC-3'
12	5'-AGGGACCAAGGTACCGTCTCCATGAGAATTGAGCTCCGTGACAAGCTTGC-3'

Table 2 Template, primers and restriction enzymes used to construct plasmids and bp of insert gene

Plasmids Name	Template	Primers	Restriction enzyme	bp
pET32a/TH- <i>NpuC</i> -SS1-PE38KDEL	pET32a/ <i>NpuC</i> pUC57/SS1 pET32a/PE38KDEL	1-6	<i>EcoR</i> I <i>Not</i> I	1 887
pET28a/6H-SS1-PE38KDEL	pET32a/ <i>NpuC</i> - SS1-PE38KDEL	7-8	<i>Nde</i> I <i>EcoR</i> I	1 770
pET28a/6H-MBP- <i>NpuC</i> -SS1	pET30a/MBP pET32a/ <i>NpuC</i> -SS1	9-12	<i>Nde</i> I <i>EcoR</i> I	2 008
pET28a/6H-MBP- <i>NpuC</i> -SS1-PE38KDEL	pET28a/MBP- <i>NpuC</i> -SS1 pET32a/PE38KDEL	5,8 9,12	<i>Nde</i> I <i>EcoR</i> I	3 054

2.1.1 pET32a/TH-*NpuC*-SS1-PE38KDEL 质粒构建 使用引物 1 和引物 2 从 pET32a/*NpuC* 中扩增 *NpuC* 片段; 使用引物 3 与引物 4 从 pUC57/SS1 中扩增 SS1 片段; 使用引物 5 与引物 6 从 pET32a/PE38KDEL 中扩增 PE38KDEL 片段。胶回收后用引物 1 和引物 4 通过重叠 PCR 连接 *NpuC*、SS1 两个片段得到 *NpuC*-SS1; 质粒 pET32a 用 *EcoR* I, *Not* I 酶切后, 使用多片段同源重组酶将 *NpuC*-SS1、PE 片段与 pET32a 质粒相连接; 将连接产物转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态中, 挑取单菌落培养后抽提质粒并送测序。

2.1.2 pET28a/6H-SS1-PE38KDEL 质粒构建 使用引物 7 和引物 8 从 pET32a/*NpuC*-SS1-PE38KDEL 中扩增 SS1-PE38KDEL 片段, 胶回收后用 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切; pET28a 用 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切, 分别胶回收后用连接酶 Solution I 连接; 将连接产物转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态中, 挑取单菌落培养后抽提质粒并送测序。

2.1.3 pET28a/6H-MBP-*NpuC*-SS1 质粒构建 使用引物 9 和引物 10 从 pET30a/MBP 中扩增 MBP 片段; 使用引物 11 和引物 12 从 pET32a/*NpuC*-SS1 中扩增 *NpuC*-SS1 片段; pET28a 质粒用 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切; 分别胶回收后使用多片段同源重组酶将两个扩增片段与酶切回收后 pET28a 质粒相连接; 将连接产物转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态中, 挑取单菌落培养后抽提质粒并送测序。

2.1.4 pET28a/6H-MBP-*NpuC*-SS1-PE38KDEL 质粒构建 使用引物 9 和引物 12 从 pET28a/MBP-*NpuC*-SS1 中扩增 MBP-*NpuC*-SS1 片段; 使用引物 5 和引物 8 从 pET32a/PE38KDEL 中扩增 PE38KDEL 片段; pET28a 用 *Nde* I 和 *EcoR* I 酶切; 分别胶回收后使用多片段同源重组酶将两个扩增片段与

pET28a 质粒相连接, 将连接产物转入大肠埃希菌 DH5 α 感受态中, 挑取单菌落培养后抽提质粒并送测序。

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入大肠埃希菌 SHuffle T7 中得到相应的重组蛋白表达菌株。SHuffle T7 菌株在含有相应抗性平板上 37 °C 培养过夜后挑取单菌落接种到含有相同抗性的 LB 5 mL 培养基中培养。其中, 含有 pET32a/TH-*NpuC*-SS1-PE38KDEL 质粒的菌株为 Amp 抗性, 其余 3 种表达菌株均为 Kan 抗性。将 LB 5 mL 培养基在 37 °C, 220 r/min 培养 12 h 后, 按 1% 的接种量接种到含有相同抗性的 LB 500 mL 培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养 3~4 h, 当 A_{600} 达到 0.5 时, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 20 °C, 180 r/min 过夜培养。分别取诱导前、诱导后、裂解后上清液与裂解后沉淀制样, 用考马斯亮蓝方法检测蛋白表达情况和可溶性, 用 GraphPad Prism (8.3.0 版) 软件做统计学分析。本实验中表达的蛋白及其基本性质见表 3。用 Western blot 方法验证蛋白。

Table 3 Theoretical molecular weight and pI of proteins expressed in this study

Recombinant protein name	Theoretical molecular weight / kD	pI
TH- <i>NpuC</i> -SS1-PE38KDEL	100.6	5.71
6H-SS1-PE38KDEL	65.8	5.40
6H-MBP- <i>NpuC</i> -SS1	74.1	7.02
6H-MBP- <i>NpuC</i> -SS1-PE38KDEL	112.0	5.69
6H- <i>Npu</i> N	14.0	4.75

2.2.2 6H-MBP-*NpuC*-SS1, 6H-MBP-*NpuC*-SS1-PE38KDEL 重组蛋白纯化 过夜诱导后, 7 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用纯化用缓冲液 (20 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA

咪唑, pH 7.4) 40 mL 将沉淀菌重悬, 高压均质机加压至 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、4 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液备用, 收集裂菌沉淀并制备蛋白电泳样品。用 Dextrin Beads 6FF 重力柱纯化, 使用洗脱液(20 mmol/L Tris, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L 麦芽糖, pH 7.4)洗脱, 分管收集蛋白。利用考马斯亮蓝法对蛋白纯化结果进行检测, 将含有目的蛋白的洗脱液合并, 放置在 -20 °C 冻存待用。

2.2.3 6H-*Npu*N 重组蛋白纯化 纯化采用镍柱。上样缓冲液为含有 40 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液(pH 7.4); 洗脱缓冲液分别为含有 60、80、200 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液(pH 7.4), 每个浓度洗脱 10 mL, 分管收集蛋白。利用考马斯亮蓝法对蛋白纯化结果进行检测, 将含有目的蛋白的洗脱液合并, 放置在 -20 °C 冻存待用。

2.3 内含肽的体外剪切反应

2.3.1 内含肽的体外剪切反应的检测 *Npu*N 端反应底物为 6H-*Npu*N, 分别与 *Npu*C 端反应底物 6H-MBP-*Npu*C-SS1、6H-MBP-*Npu*C-SS1-PE38KDEL 混合加入, 其中 6H-*Npu*N 过量。加入二硫苏糖醇(D, L-dithiothreitol, DTT) 至终浓度为 1 mmol/L, 30 °C 反应 2 h。以上反应均加入蛋白电泳的 5 × 上样缓冲液终止反应, 用考马斯亮蓝染色法对内含肽剪切反应进行检测。剪切后可能包括的产物如表 4。使用 Image J 软件扫描 SDS-PAGE 电泳图上对应条带的光密度并计算产物生成率, 产物生成率计算公式如下:

产物生成率(%) = 目的蛋白条带的光密度与相对分子质量的比值/(剩余前体蛋白光密度与相对分子质量的比值 + 目的蛋白条带的光密度与相对分子质量的比值) × 100。

Table 4 Theoretical molecular weight and pI of intein cleavage product

Name	Theoretical molecular weight / kD	pI
SS1	25.4	7.96
SS1-PE38KDEL	62.9	5.40
6H-MBP- <i>Npu</i> C	46.2	6.27

2.3.2 影响内含肽体外剪切反应的因素 为了进一步优化断裂反应条件, 提高断裂反应效率, 本实

验以 6H-MBP-*Npu*C-SS1 和 6H-MBP-*Npu*C-SS1-PE38KDEL 为例, 在 6H-*Npu*N 过量条件下, 对可能影响内含肽断裂的几个因素进行探索, 包括 DTT 浓度、反应温度、反应时间 3 个方面。在时间为 2 h, DTT 浓度为 1 mmol/L 条件下, 探究在 4, 30, 37 °C 3 个温度条件下内含肽剪切产物生成率; 在温度为 30 °C, DTT 浓度为 1 mmol/L 条件下, 探究在 5, 30, 60 min 3 个时间点时内含肽剪切产物生成率; 在温度为 30 °C, 反应时间为 2 h 条件下, 探究不加 DTT 和 DTT 浓度为 5 mmol/L 2 个条件下内含肽剪切产物生成率。用 Graphpad Prism(8.3.0 版)软件作统计学分析, 通过不同条件下断裂内含肽剪切产物生成率的比较, 考察内含肽对剪切反应不同条件的耐受度。使用 ImageJ 软件扫描 SDS-PAGE 电泳图上对应条带的光密度并计算产物生成率, 生成率计算公式同“2.3.1”项。

2.4 蛋白除杂与目的蛋白的浓缩

断裂反应完成后产物在 4 °C 下用 3 kD 滤膜按照 1:1 000 的比例透析, 透析液为 PBS(pH 7.4), 每隔 6 小时换液 1 次, 共换液 2 次。透析样品稀释 5 倍后用镍柱除去未完全断裂的 6H-MBP-*Npu*C-SS1、6H-MBP-*Npu*C-SS1-PE38KDEL 和断裂后的产物杂质 6H-MBP-*Npu*C, 接流穿。用 Capto L 柱浓缩流穿中的目的蛋白, 洗脱液为柠檬酸缓冲液(pH 2.6), 洗脱后立即加入 1 mol/L Tris-HCl(pH 9) 调节 pH 至 7.4, 所得到的蛋白立即用 PBS(pH 7.4) 透析, 透析步骤同上。

2.5 Fortebio 检测亲和力

SS1 是鼠源的抗间皮素片段抗体, 可与间皮素特异性结合, 实验以生物素化人源间皮素为抗原, 以 pH 7.4 的 PBS 作为蛋白稀释缓冲液, 将抗体 SS1 与免疫毒素 SS1-PE38KDEL 分别稀释成 20, 50, 100, 200, 300 nmol/L 5 个浓度梯度检测其亲和力。其中传感器采用 SA 传感器, 在 PBS 浸泡 30 min 后使用。抗原结合时间设定为 300 s, 之后用含有 0.05% BSA 的 0.02% PBST 封闭 300 s, 在 PBS 浸泡 120 s 后, 用抗体亲和 300 s, 然后在 PBS 中解离 300 s, 循环 3 次再生步骤后(pH 3 的 10% 甘氨酸浸泡 15 s, 0.05% PBST 浸泡 5 s), 相同步骤测定下一个浓度的抗体亲和情况。

3 结果

3.1 重组表达质粒的构建

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果显示 *NpuC-SS1* 片段、PE38KDEL 片段、*NpuC* 片段、SS1 片段、SS1-PE38KDEL 片段、MBP-*NpuC-SS1* 片段、MBP 片段均与理论片段大小一致,电泳结果如图 2。同源重组或酶切连接后转入 DH5 α 中,抽提质粒后送测序,结果表明质粒均为正确序列。

3.2 重组蛋白的诱导表达及纯化

3.2.1 重组蛋白的诱导表达 将大肠埃希菌 SHuffle T7 作为宿主细胞表达重组蛋白,探索含有不同促溶标签的蛋白可溶性。其中 6H-SS1-PE38KDEL 重组蛋白不含有促溶标签。TH-*NpuC-SS1-PE38KDEL*、6H-MBP-*NpuC-SS1*、6H-MBP-*NpuC-SS1-PE38KDEL* 分别与 6H-SS1-PE38KDEL 对比可溶性,结果如图 3。对比看出,相较无促溶标签的 6H-SS1-PE38KDEL,含有 Trx 促溶标签的 TH-*NpuC-SS1-PE38KDEL* 上清液中蛋白由 43% 提

高到 47%;含有 MBP 促溶标签的 6H-MBP-*NpuC-SS1* 上清液中蛋白约为 87%,6H-MBP-*NpuC-SS1-PE38KDEL* 上清液中蛋白约为 98%。可见 MBP 促溶标签对本实验中重组蛋白促溶效果更佳,因此实验选用 MBP 作为促溶标签的重组蛋白用于后期纯化。用 Western blot 验证蛋白,一抗为抗组氨酸标签抗体 (anti His),二抗用羊抗鼠二抗 (goat anti mouse IgG),结果如图 4,结果表明 4 种表达蛋白为所构建的重组蛋白。

3.2.2 重组蛋白的纯化 6H-MBP-*NpuC-SS1* 与 6H-MBP-*NpuC-SS1-PE38KDEL* 重组蛋白经过 Dextrin Beads 6FF (MBP 标签亲和柱) 纯化后,使用 SDS-PAGE 进行鉴定,结果如图 5-A。结果显示条带大小均符合理论相对分子质量。6H-*NpuN* 蛋白经过镍柱纯化后,结果如图 5-B。蛋白在 60 mmol/L 咪唑浓度条件下开始洗脱,在 200 mmol/L 咪唑条件下洗脱集中。将含有目的蛋白较多的收集液合并,以待下一步反应。

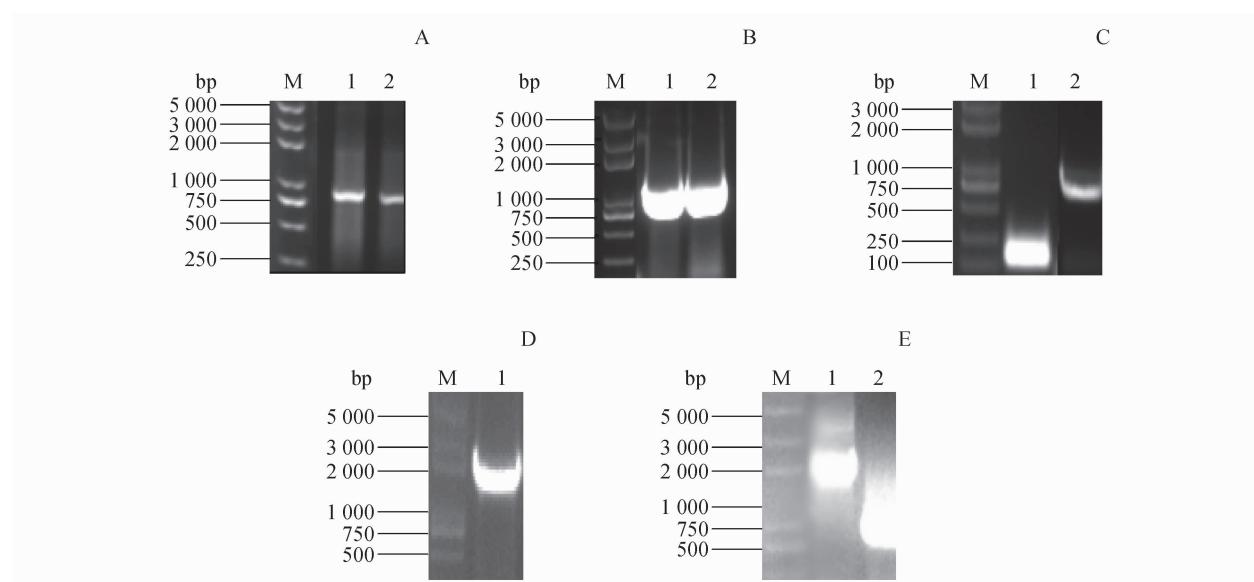
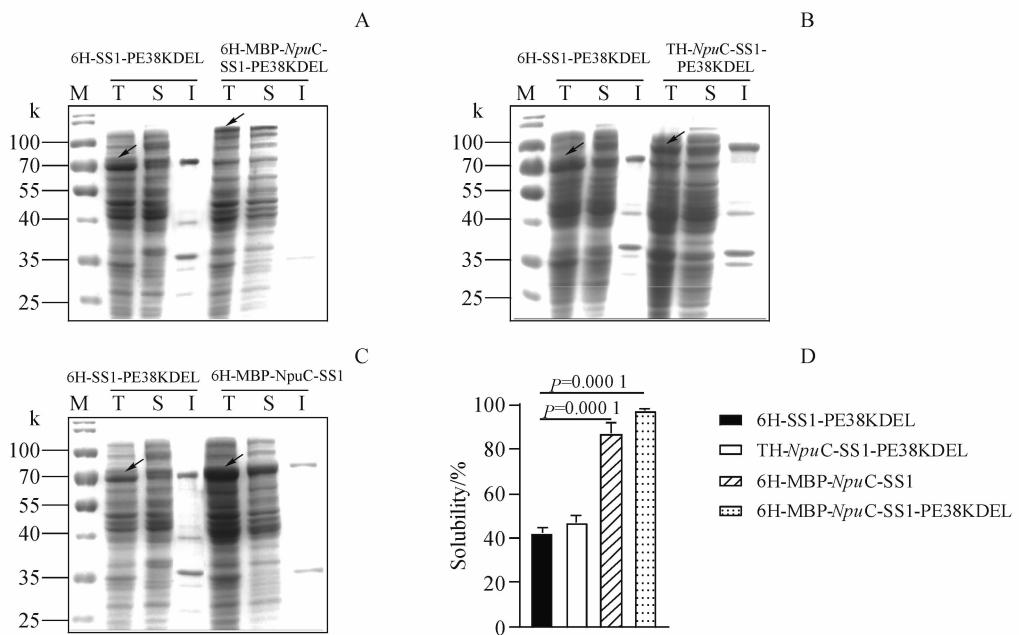


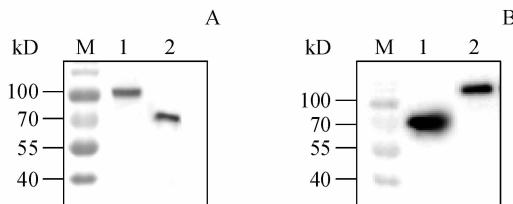
Figure 2 PCR products detected by 1% agarose gel electrophoresis

Lane M: Nucleic acid marker; (A) Lane 1: PCR product *NpuC-SS1* amplified by primer 1 and primer 4; Lane 2: PCR product *NpuC-SS1* amplified by primer 11 and primer 12; (B) Lane 1: PCR product PE38KDEL amplified by primer 5 and primer 6; Lane 2: PCR product PE38KDEL amplified by primer 5 and primer 8; (C) Lane 1: PCR product *NpuC* amplified by primer 1 and primer 2; Lane 2: PCR product SS1 amplified by primer 3 and primer 4; (D) Lane 1: PCR product SS1-PE amplified by primer 7 and primer 8; (E) Lane 1: PCR product MBP-*NpuC-SS1* amplified by primer 9 and primer 12; Lane 2: PCR product MBP amplified by primer 9 and primer 10

**Figure 3** 12% SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant proteins

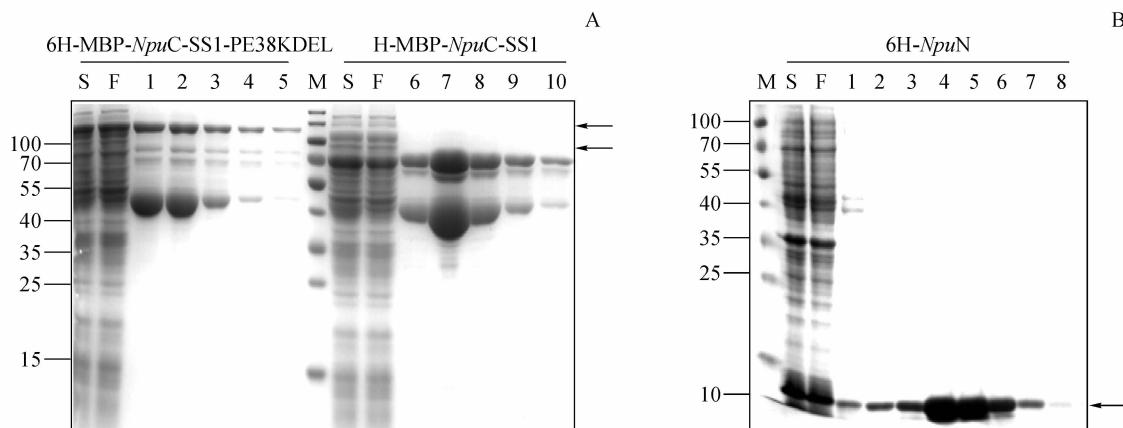
A: 12% SDS-PAGE analysis of the expression of 6H-MBP-NpuC-SS1-PE38KDEL compared with 6H-SS1-PE38KDEL; B: 12% SDS-PAGE analysis of the expression of TH-NpuC-SS1-PE38KDEL compared with 6H-SS1-PE38KDEL; C: 12% SDS-PAGE analysis of the expression of 6H-MBP-NpuC-SS1 compared with 6H-SS1-PE38KDEL; D: Solubility of four kind of recombinant proteins ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Lane M: Molecular weight marker; Lane T: Whole cell lysates; Lane S: Soluble fraction; Lane I: Insoluble fraction; Full-length fusion proteins are indicated with arrows

**Figure 4** Western blot of four kind of recombinant proteins

The primary antibody is anti His antibody, and the secondary antibody is goat anti mouse IgG antibody

Lane M: Molecular weight marker; (A) Lane 1: Western blot of 6H-NpuC-SS1-PE38KDEL; Lane 2: Western blot of 6H-SS1-PE38KDEL; (B) Lane 1: Western blot of 6H-MBP-NpuC-SS1; Lane 2: Western blot of 6H-MBP-NpuC-SS1-PE38KDEL

**Figure 5** 12% SDS-PAGE of purification of NpuC recombinant proteins and NpuN 6H-MBP-NpuC-SS1-PE38KDEL and 6H-MBP-NpuC-SS1 purified by Dextrin Beads 6FF column, 6H-NpuN purified by nickel column. Full-length fusion proteins are indicated with arrows

(A) Lane M: Molecular weight marker; Lane S: Supernatant after induction; Lane F: Flow through; Lane 1-5: Elution of 6H-MBP-NpuC-SS1-PE38KDEL using 10 mmol/L maltose; Lane 6-10: Elution of 6H-MBP-NpuC-SS1 using 10 mmol/L maltose; (B) Lane M: the molecular weight marker; Lane S: Supernatant after induction; Lane F: Flow through; Lane 1: Elution of 6H-NpuN using 60 mmol/L imidazole; Lane 2-3: Elution of 6H-NpuN using 80 mmol/L imidazole; Lane 4-8: Elution of 6H-NpuN using 200 mmol/L imidazole

3.3 内含肽的体外剪切反应

3.3.1 内含肽的体外剪切反应的检测 *NpuC* 端反应底物 6H-MBP-*NpuC*-SS1 和 6H-MBP-*NpuC*-SS1-PE38KDEL 分别与 *NpuN* 端表达产物 6H-*NpuN* 反应,结果如图 6 所示。反应体系中出现了 SS1 预期分子大小产物和 SS1-PE38KDEL 预期分子大小产物。由 ImageJ 计算得 6H-MBP-*NpuC*-SS1 的转化率约为 74%,6H-MBP-*NpuC*-SS1-PE38KDEL 的转化率约为 70%。

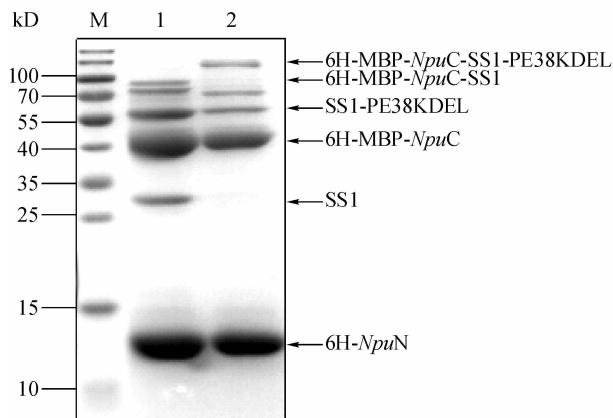


Figure 6 12% SDS-PAGE of intein mediated cleavage of recombinant proteins ($t=2$ h, $T=30$ °C, $c(\text{DTT})=1$ mmol)
Lane M: Molecular weight marker; Lane 1: *NpuC* cleavage product of 6H-MBP-*NpuC*-SS1 when add excess 6H-*NpuN*; Lane 2: *NpuC* cleavage of 6H-MBP-*NpuC*-SS1-PE38KDEL when add excess 6H-*NpuN*

3.3.2 影响内含肽的体外剪切反应的因素 6H-MBP-*NpuC*-SS1 断裂效率受温度影响较小,在 4, 30, 37 °C 下断裂产物生成率基本相当;在 DTT 浓度为 5 mmol/L 条件下断裂产物生成率明显高于 DTT 不存在时断裂产物生成率,且断裂反应 5 min 之内即可达到平衡。

6H-MBP-*NpuC*-SS1-PE38KDEL 在低温下剪切效率受到较大影响,在 30 °C 或 37 °C 条件下断裂产物生成率较高;在 DTT 浓度为 5 mmol/L 条件下断裂产物生成率明显高于 DTT 不存在时断裂产物生成率,且断裂反应在 30 min 内达到平衡。

3.4 内含肽断裂后蛋白纯化

内含肽断裂后产物用镍柱除去未反应底物和断裂杂质后,目的蛋白 SS1 与 SS1-PE38KDEL 保留在流穿中,浓度较低。由于 Capto L 柱对于抗体可变区域 Kappa 片段具有很强的亲和力,因此在本实验中用于富集镍柱流穿中的目的蛋白。结果表明,Capto L 可捕获 SS1 蛋白,对 SS1-PE38KDEL 无明

显富集作用。SDS-PAGE 检测结果如图 7 所示。图 7-A 为 SS1 除杂后 Capto L 捕获结果,图 7-B 为镍柱除杂后流穿中剩余的 SS1-PE38KDEL。

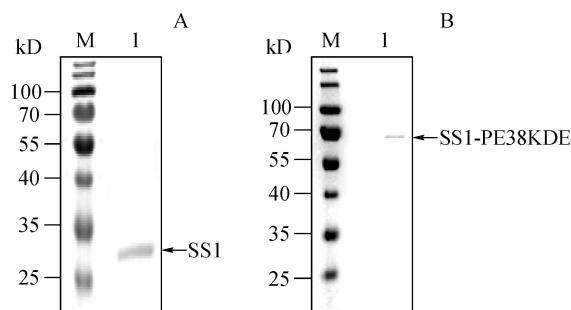


Figure 7 Protein purification after intein cleavage
Nickel column removes precursor protein and impurities after *NpuC* cleavage. Then Capto L column capture SS1
Lane M: Molecular weight marker; (A) Lane 1: SS1 captured by Capto L column; (B) Lane 1: SS1-PE in flow through after removal of impurities by nickel column

3.5 ForteBio 检测亲和力

SS1 及其免疫毒素 SS1P 能够特异性的与人源 mesothelin 蛋白结合。利用生物膜干涉技术检测断裂后纯化的 SS1 与 SS1-PE38KDEL 与生物素化人源间皮素之间的亲和力常数,检测结果显示(图 8),断裂纯化后的 SS1 与 mesothelin 的亲和力常数 K_d 为 1.59×10^{-7} mol/L,SS1P 与 mesothelin 的亲和力常数 K_d 为 2.03×10^{-7} mol/L,二者的亲和力常数相当。

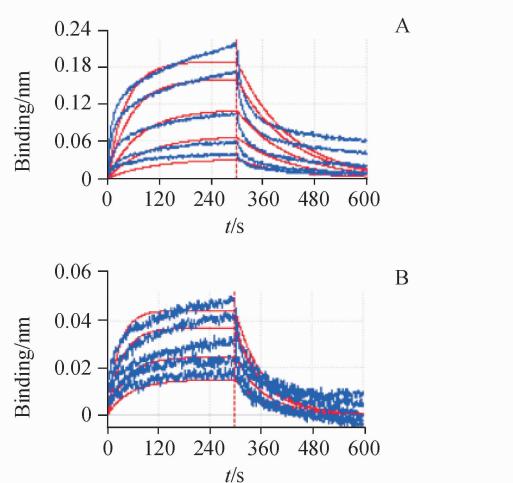


Figure 8 Affinity and dissociation between recombinant protein and human mesothelin
Concentration of human mesothelin is 100 nmol, concentration of recombinant protein is 20, 50, 100, 200, 300 nmol/L
A: Affinity and dissociation between SS1 and human mesothelin (K_d 1.59×10^{-7} mol/L); B: Affinity and dissociation between SS1-PE38KDEL and human mesothelin (K_d 2.03×10^{-7} mol/L)

4 讨 论

本实验中, 应用断裂内含肽实现蛋白 SS1 与免疫毒素 SS1-PE38KDEL 的可溶性表达, 既可以省略包涵体复杂的变复性过程, 又可以降低去除促溶标签的成本, 对今后免疫毒素的生产过程优化具有重要借鉴意义。

本课题中, 内含肽 *Npu DnaE* 断裂效率略大于 70%, 断裂效率还有待于进一步提高。推测较低的断裂效率可能由于目的蛋白的首三位氨基酸残基与 *NpuC* 天然的 C 端外显肽首三位氨基酸残基不同导致。大部分 *DnaE* 内含肽 C 端连接的外显肽首三位氨基酸残基为高度保守的“CFN”(半胱氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸), 尤其是外显肽首位半胱氨酸对内含肽剪接、剪切活性具有重要作用^[18], 而本研究是为了探索开发适合于抗体片段及免疫毒素等药用重组蛋白的纯化方法, 需避免在目的蛋白中引入外源氨基酸, 因此 *NpuC* 与目的蛋白之间并未使用连接子进行连接, *NpuC* 的 C 端外显肽首三位氨基酸残基即为 SS1 的首三位氨基酸残基“DIE”(天冬氨酸、异亮氨酸、谷氨酸), 外显肽首三位氨基酸的差异可能在一定程度上降低了断裂效率^[19-20]。此外, 本实验发现 SS1P 相较于 SS1 而言, 剪切效率较低, 且受温度影响较大, 推测是由于外显肽自身构象会影响内含肽的断裂^[21], 片段抗体 SS1 及其免疫毒素 SS1P, 结构上毒素分子的差异可能造成了断裂产物生成率与剪切速度上的差异。本实验还观察到 SS1-PE38KDEL 不能很好地与 Capto L 柱结合, 同样提示 PE38KDEL 片段的存在可能影响了 SS1 与 Capto L 柱子的亲和。为进一步探究断裂效率的具体影响因素, 可分别通过在外显肽中引入外源氨基酸“CFN”探究连接外显肽的首三位残基的影响, 进一步可通过定向进化筛选对外显肽首三位氨基酸宽泛性更佳的内含肽突变体; 此外, 由于 *Npu DnaE* 等天然断裂内含肽在有变性剂存在的条件下仍能保持优异的活性, 可尝试通过加入尿素破坏蛋白空间结构的方式探究外显肽构象对断裂效率的影响。

经 Fortebio 验证, 借由本研究表达纯化方法得到的 SS1 与 SS1-PE38KDEL 均具有亲和活性, 表明方案设计的免疫毒素可溶性表达工艺具有潜在实际应用价值。同时, 本研究仍有许多方面需要进行

更加深入的研究, 例如内含肽剪接反应后产物的进一步纯化方法的开发, 空间结构的因素是否影响断裂反应效率等。

参 考 文 献

- [1] Ejima D, Watanabe M, Sato Y, et al. High yield refolding and purification process for recombinant human interleukin-6 expressed in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **62** (3): 301-310.
- [2] Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins [J]. *J Biosci Bioeng*, 2005, **99** (4): 303-310.
- [3] Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB, et al. Monoclonal antibody successes in the clinic [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (9): 1073-1078.
- [4] Zhang JZ. New drugs be approved by FDA in September 2018 [J]. *Shanghai Med* (上海医药), 2019, **40** (5): 79.
- [5] Shan L, Liu YY, Wang P. Recombinant immunotoxin therapy of solid tumors: challenges and strategies [J]. *J Basic Clin Med*, 2013, **2** (2): 1-6.
- [6] Gorbalyena AE. Non-canonical inteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (7): 1741-1748.
- [7] Martin DD, Xu MQ, Evans TC Jr. Characterization of a naturally occurring trans-splicing intein from *Synechocystis* sp. PCC6803 [J]. *Biochemistry*, 2001, **40** (5): 1393-1402.
- [8] Giriat I, Muir TW. Protein semi-synthesis in living cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, **125** (24): 7180-7181.
- [9] Ludwig C, Pfeiff M, Linne U, et al. Ligation of a synthetic peptide to the N terminus of a recombinant protein using semisynthetic protein trans-splicing [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, **45** (31): 5218-5221.
- [10] Dassa B, Amitai G, Caspi J, et al. Trans protein splicing of cyanobacterial split inteins in endogenous and exogenous combinations [J]. *Biochemistry*, 2007, **46** (1): 322-330.
- [11] Shi JX, Muir TW. Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, **127** (17): 6198-6206.
- [12] Fong BA, Wu WY, Wood DW. The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, **28** (5): 272-279.
- [13] Zettler J, Schütz V, Mootz HD. The naturally split *Npu DnaE* intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction [J]. *FEBS Lett*, 2009, **583** (5): 909-914.
- [14] Nicastri MC, Xega K, Li LY, et al. Internal disulfide bond acts as a switch for intein activity [J]. *Biochemistry*, 2013, **52** (34): 5920-5927.
- [15] Ramirez M, Valdes N, Guan DL, et al. Engineering split intein *DnaE* from *Nostoc punctiforme* for rapid protein purification [J]. *Protein Eng Des Sel*, 2013, **26** (3): 215-223.

- [16] Dou TL. Splicing intein-mediated bi-specific antibody traceless assembly(断裂内含肽介导的双特异性抗体无痕装配) [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2019.
- [17] Wang J. Design and application of novel immunotoxins with low non-specific toxicity(新型免疫毒素降低非特异性毒性的设计与研究) [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2019.
- [18] Cheriyam 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.
- [19] 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.
- [20] Shah NH, Dann GP, Vila-Perelló M, et al. Ultrafast protein splicing is common among cyanobacterial split inteins: implications for protein engineering [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(28): 11338-11341.
- [21] Luo H, Hu LF, Ma BY, et al. Molecular dynamics based improvement of the solubilizing self-cleavable tag $Z_{\text{basic}}-\Delta I-\text{CM}$ application in the preparation of recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, **513**(2): 412-418.

· 新药研发 ·

2020年中国创新药物态势

过去的2019年,国家医保目录谈判、“4+7”带量采购、新药审批加速等,对中国创新药市场影响巨大。无论是大型传统药企,还是中小型生物科技公司都渐渐认识到,需要扎实做创新。

据了解,2019年是中国生物医药行业的政策创新年,2019年8月,我国《药品管理法》实行了18年来的一次重大修订。本次修订涉及多项调整,例如明确药品上市许可持有人制度;实施临床试验备案制;通过药品追踪确保问责;用自主申报和跟踪检查替代临床试验机构资格认定等。而曾经长达8年没有调整的中国医保目录也在2019年迎来再次更新,在此状态下,预计医保目录的频繁更新将会成为常态。另外带量采购由“4+7”模式进一步扩大至全国范围,使未能进入集采名单的药企遭到一定的打击。国家药监局的持续改革掀起了新药上市的热潮。

过去一年,中国创新药在某些重大疾病领域及出海上实现了从0到1的突破。业内表示,我国新药上市的速度往往滞后于国外5~10年,但是基于2019年在中国上市的所有新药统计,这一数字已缩短至4年左右,有一些药已经缩短到1年甚至更短。如今2020年已经到来,中国创新药或将再次步入发展的高峰。

据公开资料统计,2019年,中国本土获批的创新药共有9款,其中有名的小分子药物当属国产1类创新药本维莫德和BTK抑制剂泽布替尼。据预计,2020年或将上市十款国产创新药,皆为小分子药,数据再创新高。除此之外,跨国药企正在加快将海外新药引入中国市场的速度,2020年,多款进口创新药有望在国内市场获批上市。

有分析人士表示,从新药创制纳入国家科技重大专项,到新药获批量连年增加、速度加快,再到国产创新药不断上市,中国的医药创新之路在国家政策和资本市场的双重助力下,越走越顺畅。

另外,医药市场的持续繁荣也直接助力行业发展。数据显示,2007~2017年,我国医药市场的总产值增速持续攀升,复合增长率超8%,成为全球医药行业较大的新兴市场。而逐年增加的研发投入为医药创新带来强劲动力,预计2012至2021年总投入将近300亿美元。

通过对医药行业空间的看法,业内得出对医药行业投资的核心思想——永远拥抱创新,选择核心具创新能力的药企。

据了解,在医药及生物技术领域,当前发展亮眼的是创新药赛道。鼓励技术创新的政策红利、生物技术人才“海归潮”的出现、港交所允许未盈利的生物技术公司上市、科创板的开板,都是过去以及接下来中国医药自主创新能力集中爆发的理由。随着市场的发展,投资机构对“全球新”项目的偏好越来越强烈,倾向具备全球技术创新力、有能力获得海外市场份额的企业。

(来源:制药网,本刊有删改)