轻链淀粉样蛋白的包涵体表达及体外活性检测

李 茜，边延林，朱建伟，张宝红*
（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：该研究通过构建大肠埃希菌原核表达载体、优化诱导条件，从包涵体中获得了轻链淀粉样蛋白 AL-09 及 V_{λ}6wil 可变结构域；后续采用硫磺素 T（ThT）法检测了其在体外的聚集活性，并利用 MTT 法初步鉴定了其对心肌细胞 AC16 的细胞毒性。结果表明，AL-09 及 V_{λ}6wil 的最适异丙基 -β-D- 硫代半乳糖苷诱导浓度分别为 0.2 和 0.4 mmol/L，最佳诱导时间均为 3 h，蛋白总产量可达约 10 mg/L；2 种轻链淀粉样蛋白均具备体外纤维化活性，且在心肌细胞 AC16 中均表现出显著的细胞毒性。该研究建立了轻链淀粉样蛋白的包涵体表达系统，为轻链淀粉样变性的深入研究及新型疗法开发提供了一定的研究基础。

关键词：轻链淀粉样蛋白；大肠埃希菌；包涵体；表达；活性检测
中图分类号：R816 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)07-0977-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.07.008

Inclusion Body Expression and *in vitro* Bioactivity Evaluation of Light Chain Amyloid

LI Xi, BIAN Yanlin, ZHU Jianwei, ZHANG Baohong*
(*Engineering Research Center of Cell & Therapeutic Antibody (MOE), School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: This study obtained variable domain of light amyloid AL-09 and V_{λ}6wil from inclusion bodies through constructing *Escherichia coli* expression vectors and optimizing the induction conditions. Then the aggregation activity of AL-09 and V_{λ}6wil *in vitro* was detected by thioflavin T (ThT) assay, and the cytotoxicity to AC16 cells was preliminarily identified by MTT assay. The results showed that the optimal isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside concentrations for AL-09 and V_{λ}6wil expression were respectively 0.2 and 0.4 mmol/L, and the optimal expression time was 3 h. Under the optimal condition, the yields could reach around 10 mg/L. Both AL-09 and V_{λ}6wil were proved to have the capacity to form fibrils *in vitro* and showed significant cytotoxicity to AC16 cells. In conclusion, we established an inclusion body expression system for light chain amyloid, which provided a specific research basis for the further study of amyloidosis.

Key Words: light chain amyloid; *Escherichia coli*; inclusion body; expression; bioactivity assay

淀粉样变性是由以淀粉样原纤维形式沉积在组织中的自体蛋白质的错误折叠和聚集引起的蛋白质构象疾病，通常可分为系统性和局部性淀粉样变性。局部淀粉样变性如脑淀粉样变性（最常见的是阿尔茨海默病）和局部轻链淀粉样变性（light chain amyloidosis，AL），主要累及气道、皮肤和泌尿道，通常不需要全身性治疗[1—2]。系统性 AL 也称为“原发性淀粉样变性”，是较常见也是较严重的一种系统性淀粉样变性，占总体患者的 3/4 以上，是由缓慢增殖的、位于骨髓的浆细胞克隆分泌不稳定的免疫球蛋白轻链浸润外周器官而导致的器官功能障碍甚至衰竭，涉及器官通常包括肾脏、心脏、胃肠道、肝脏和神经系统[3]。

收稿日期：2022-03-30
作者简介：李 茜（1996—），女，硕士研究生，专业方向：生物技术药物。
通信作者：张宝红（1975—），女，副教授，博士生导师，从事生物技术药物研究与开发。
E-mai：bhzhang@sjtu.edu.cn

目前，已有超过 30 种不同的蛋白质被确定为淀粉样变性的可能原因，且基于质谱的诊断结果，相关蛋白质的数量还在不断增加[4]。根据组织病例结果中单克隆轻链沉积的类型，可将 AL 型淀粉样变性分为 λ 型和 κ 型。临床上以 λ 轻链为主，约占 AL 的 80%[5]。目前被广泛接受的是，轻链可变区（variable light chain，VL）是淀粉样原纤维的主要成分。最近的蛋白质组学研究也表明，淀粉样蛋白沉积物本质上可能是异质的，可以由轻链蛋白全长、可变区、恒定区或各种类型的轻链蛋白片段的混合物形成[6]。AL-09 及 V_{λ}6wil 分别是具有较强原纤维性的 κ 和 λ 型轻链淀粉样蛋白，在室温、生理条件下搅拌时都能够表现出单体基本完全转化为原纤维的性质[7—8]。已有报道中轻链淀粉样蛋白的表达纯化方法多为原核系统表达[9—10]，原核系统表达得到的包涵体变复性可获得大量有功能的蛋白产物。

因此，本研究分别构建了 AL-09 及 V_{λ}6wil 轻链淀粉样蛋白可变结构域的原核表达载体，优化了异丙基 -β-D- 硫代半乳糖苷（isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside，IPTG）的诱导浓度及时间，通过将原核表达系统得到的包涵体经洗涤及变复性处理获得了 AL-09 及 V_{λ}6wil 蛋白，并检测了其在体外的纤维化活性及细胞毒性，为进一步理解淀粉样变性相关机制提供帮助。

1　试剂与试药

T100 型聚合酶链式反应（PCR）分析仪、Mini Prorean 3 Cell 型蛋白凝胶电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；Tanon HE-120 型多功能水平电泳槽、Tanon-1600 型全自动数码凝胶成分分析系统（上海天能科技有限公司）；AH-1500 型高压均质仪［安拓思纳米技术（苏州）有限公司］；Infinite M200 Pro 型多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）；AKTA Start 型快速液相系统（美国 Cytiva 公司）；Sorvall LYNX 4000 型台式离心机（美国 Eppendorf 公司）；Countstar 细胞计数仪（上海睿钰生物科技有限公司）；SERIES 8000 DH 型二氧化碳培养箱（美国 Thermo Scientific 公司）；96 孔黑壁透明底半区板（德国 Grenier 公司）；96 孔细胞培养板（美国 Corning 公司）；Pellicon XL Ultracel 超滤膜包（美国 Millipore 公司，5 000，0.005 m^2）。

硫磺素 T（ThT，上海麦克林生化科技有限公司）；IPTG、乙二胺四乙酸（EDTA）、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、盐酸胍（Gdn-HCl）（国药集团化学试剂公司）；BugBuster 蛋白提取试剂（美国 EMD Millipore 公司）；精氨酸（L-arginine，美国 Sigma-Aldrich 公司）；还原型谷胱甘肽（GSH）、氧化型谷胱甘肽（GSSG）（上海少辛生物科技有限公司）；辛基苯基聚氧乙烯醚（北京索莱宝科技有限公司，商品名 Triton-X 100）；rProtein A 亲和色谱柱填料、噻唑蓝（MTT）细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒［翌圣生物科技（上海）股份有限公司］；DNA 聚合酶、*Nde* Ⅰ /*Nhe* Ⅰ限制性内切酶和 Solution Ⅰ酶溶液（日本 TaKaRa 公司）；1× 磷酸盐缓冲液（PBS）、Freestyle 293 培养基、DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清和抗细胞结团剂（美国 Gibco 公司）；DNA 凝胶回收试剂盒、PCR Cleanup 试剂盒（美国 Axygen 公司）。

大肠埃希菌（*Escherichia coli*）DH5α 及 BL21（DE3）（苏州新赛美生物科技有限公司）；原核表达载体 pET-27b(+)（本实验室保存）；人心肌细胞（AC16 细胞，北纳创联生物科技有限公司）；人肾上皮细胞（HEK-293F 细胞，本实验室保存）。

测序及引物合成服务由铂尚生物技术有限公司提供；全序列合成服务由通用生物股份有限公司提供。

2　方法与结果

2.1　轻链淀粉样蛋白表达载体的构建

AL-09 蛋白质序列从 GenBank（AF490909）中获得[10]，V_{λ}6wil 序列来源于 WALL 等报道[11]，如图 1 所示。经基因全合成的方式得到淀粉样蛋白基因片段[10]，采用酶切连接的方法将其克隆至 pET-27b(+) 载体上，构建 AL-09 及 V_{λ}6wil 原核表达载体，设计引物如表 1 所示。利用 PCR 扩增目的基因片段，通过琼脂糖电泳验证扩增结果并利用 PCR Cleanup 试剂盒获得较纯净的目的基因片段（图 2A）。在 37 ℃条件下，利用 *Nde* Ⅰ和 *Nhe* Ⅰ限制性内切酶对获得的目的片段和实验室保存的 pET-27b(+) 载体进行双酶切，通过琼脂糖电泳和胶回收获得纯净的酶切目的基因和载体片段后（图 2B），利用 Solution Ⅰ酶溶液进行酶连，将编码 AL-09 及 V_{λ}6wil 目的片段分别克隆至 pET-27b(+) 载体中。

随后将酶连产物转化至 DH5α 中，挑取阳性单克隆菌落培养并抽提质粒送以测序。测序结果正确，表明 pET-27b(+)-AL-09 与 pET-27b(+)-V_λ6wil 表达载体构建成功。

表 1 AL-09 及 V_λ6wil 的引物

Tab.1 Primers of AL-09 and V_λ6wil

引物	序列(5'-3')
AL-09-F	GATATACATATGAAATACCTGCTGCCG
AL-09-R	CTGGCTAGCCCGTTTGATCTCGAGGCGCTTAATTTCCA
V_λ6wil-F	GATATACATATGAAATACCTGCTGCCG
V_λ6wil-R	TGGCTAGCCCGTTTGATCTCGAGACCCAGAACG

2.2 轻链淀粉样蛋白原核表达

本研究选用 *E. coli* BL21 作为原核表达体系，pET-27b(+) 质粒作为表达载体，对原核表达过程中 IPTG 的诱导浓度、诱导时间等条件进行优化。

2.2.1 IPTG 诱导浓度的优化

将 pET-27b(+)-AL-09 与 pET-27b(+)-V_λ6wil 质粒分别转化至 BL21 中，将菌种以甘油菌的形式于 −20 ℃保存。蛋白表达时照 1 ∶ 100 的比例将 pET-27b(+)-AL-09 与 pET-27b(+)-V_λ6wil 甘油菌分别接种于 LB 培养基 5 ml 中，置 37 ℃、220 r/min 摇床中培养至 OD_{600} 达到 0.6 ～ 0.8，取发酵液 1 ml 作为诱导前样品。在发酵液中分别加入不同浓度的 IPTG，使得其终浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1、2、4 mmol/L，置 37 ℃、220 r/min 摇床中继续培养 4 h，各取发酵液 1 ml 作为诱导后样品。将诱导后样品离心 (13 400×*g*)5 min，弃去上清液后将菌体用 BugBuster 裂解液 200 μl 重悬，在 20 ℃、220 r/min 摇床中孵育 20 min，再离心 (13 400×*g*)5 min，弃去上清液后即得包涵体样品。将包涵体样品用 1×PBS 200 μl 重悬，制样后进行 4%～ 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析。

SDS-PAGE 及 Image J 软件 (V1.8.0.112) 条带灰度值定量分析结果显示，在 37 ℃诱导表达 4 h 的

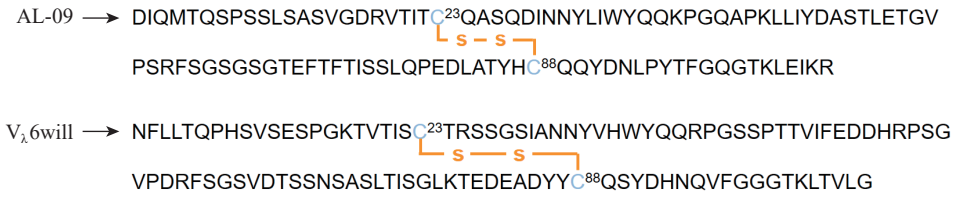
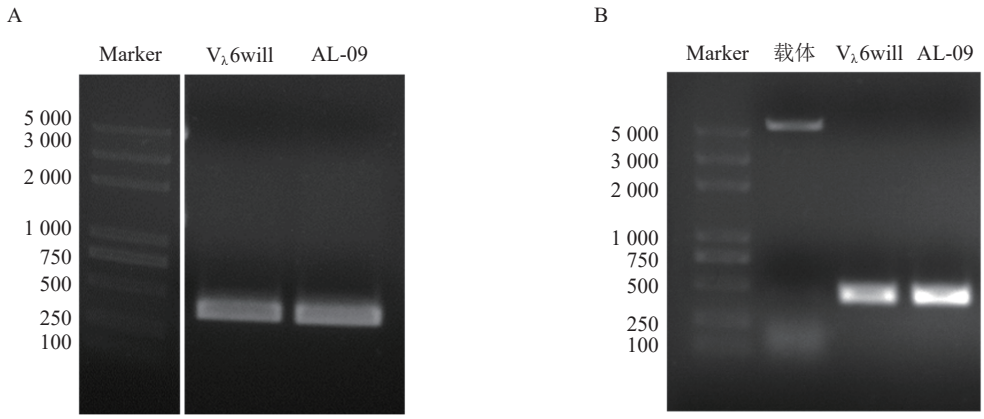


图 1 AL-09 及 V_λ6wil 的氨基酸序列

Fig.1 Amino Acid Sequences of AL-09 and V_λ6wil



A：PCR 扩增目的片段琼脂糖凝胶电泳图，B：PCR 产物及载体双酶切琼脂糖凝胶电泳图

图 2 AL-09 及 V_λ6wil 原核表达载体构建

Fig.2 Constructions of AL-09 and V_λ6wil Prokaryotic Expression Vectors

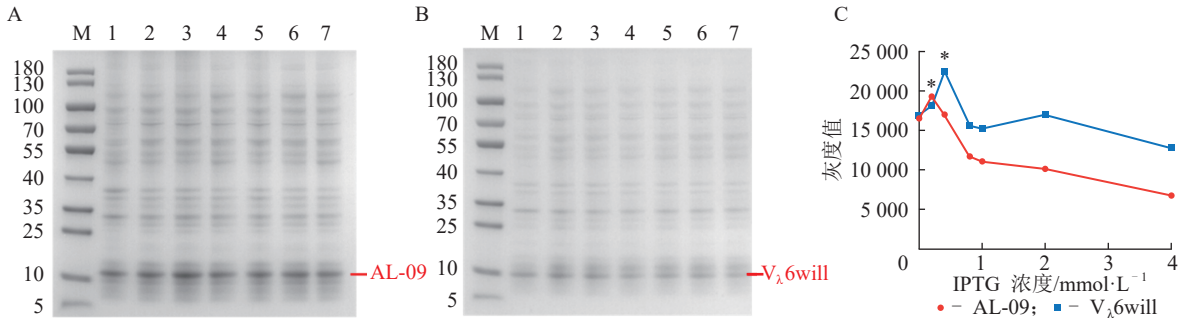
条件下，AL-09 和 V_λ6wil 分别在 IPTG 浓度为 0.2 和 0.4 mmol/L 时表达量达到最高，随着 IPTG 浓度进一步增加，表达量均有所下降（图 3）。且考虑到 IPTG 毒性，不宜采用过高浓度，故确定 AL-09 和 V_λ6wil 的最佳 IPTG 诱导浓度分别为 0.2 和 0.4 mmol/L。

2.2.2　IPTG 诱导时间的优化

用“**2.2.1**”项下确定的最佳 IPTG 诱导浓度考察 IPTG 诱导时间的影响。设置不同诱导时间（1、2、3、4、5、6 h），并取 0 时刻的发酵液作为诱导前样品，照上述方法进行小试表达，并对包涵体样品制样进行 4%～12% SDS-PAGE 分析。

SDS-PAGE 及 Image J 软件条带灰度值定量分析结果显示，在一定的温度和 IPTG 浓度下，AL-09 和 V_λ6wil 均在诱导 3 h 时达到较高表达量，随着诱导时间进一步增加，表达量增加不明显（图 4）。综合考虑到生产效率和生产经济性，最终确定 AL-09 和 V_λ6wil 的最佳诱导时间为 3 h。

根据项“**2.2.1**”及“**2.2.2**”探索的最适诱导表达条件（AL-09：0.2 mmol/L IPTG，3 h；V_λ6wil：0.4 mmol/L IPTG，3 h），采用 1 L 的表达体系，分别表达 AL-09 和 V_λ6wil 蛋白。诱导表达完毕收集菌液，离心（1 914×*g*）10 min 收集菌体，取 1×PBS

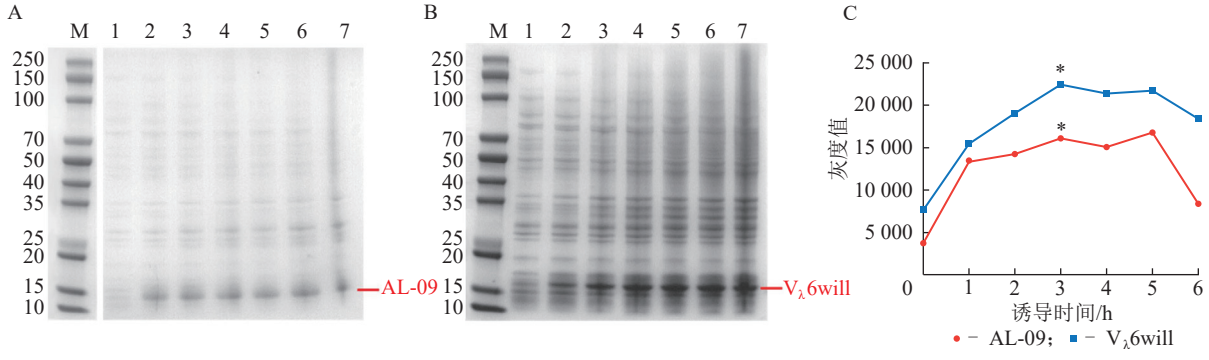


A：不同 IPTG 浓度诱导下的 AL-09 表达量，B：不同 IPTG 浓度诱导下的 V_λ6wil 表达量（非还原型样品），C：蛋白表达量的定量分析结果（* 表示最适诱导浓度）

M－蛋白 Marker；泳道 1～7－IPTG 浓度分别为 0（诱导前）、0.2、0.4、0.8、1、2、4 mmol/L

图 3　不同诱导浓度 IPTG 下的蛋白表达量

Fig.3　Target Protein Expressions Level under Different Induction Concentrations of IPTG



A：不同 IPTG 诱导时间下 AL-09 表达量，B：不同 IPTG 诱导时间下 V_λ6wil 表达量（非还原型样品），C：蛋白表达量的定量分析结果（* 表示最适诱导时间）

M－蛋白 Marker；泳道 1～7－IPTG 诱导时间分别为 0～6 h

图 4　不同诱导时间下目的蛋白表达量

Fig.4　Target Protein Expressions Level under Different Induction Time Points

100 ml 重悬菌体，使用高压均质仪在 80 ～ 1 00 MPa 条件下破菌 10 min，于 4 ℃离心（17 226×*g*）20 min，弃上清，收集包涵体，保存于 －20 ℃，用于下一步研究。

2.3 轻链淀粉样蛋白包涵体的变复性

将“**2.2**”项下收集的包涵体样品进行 3 次洗涤。用 1×PBS 50 ml 重悬，于 4 ℃离心（17 226×*g*）20 min，沉淀用洗涤剂（20 mmol/L PBS，含 0.2 mol/L 磷酸二氢钠、0.2 mol/L 磷酸氢二钠、0.1 mmol/L EDTA、100 mmol/L 氯化钠和 0.5 mol/L Gdn-HCl，pH=7）50 ml 重悬，再于 4 ℃离心（17 226×*g*）20 min；沉淀用添加了 1% Triton X-100 的洗涤剂 50 ml 重悬，4 ℃离心（17 226×*g*）20 min，沉淀待用。

用变性液（20 mmol/L PBS，含 0.2 mol/L 磷酸二氢钠、0.2 mol/L 磷酸氢二钠，6 mol/L Gdn-HCl，500 mmol/L 精氨酸，10 mmol/L 二硫苏糖醇，pH=7）10 ml 重悬上述包涵体，在 4 ℃条件下，于 15 ml 离心管中以 60 r/min 的转速摇过夜。将变性后样品在室温条件下离心（17 226×*g*）25 min，取上清液，待用。

按照 $V_{变性液}$ ∶ $V_{复性液}$=1 ∶ 50 的比例，配制复性液，将复性液（含 50 mmol/L Tris，0.1 mmol/L EDTA，50 mmol/L 氯化钠，500 mmol/L 精氨酸，5 mmol/L GSH，1 mmol/L GSSG）500 ml 在 4 ℃预冷并置磁力搅拌器上，照变性液上清与复性液体积比为 1 ∶ 50 逐滴滴入变性液上清，于 4 ℃过夜搅拌。复性后样品于 4 ℃离心（17 226×*g*）20 min，取上清液，即为目的蛋白样品。

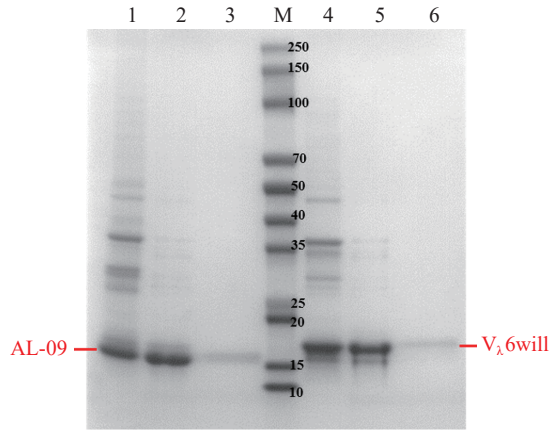
采用膜包换液法，利用 Pellicon XL Ultracel 超滤膜包（截留分子量 5 000，0.005 m^2）将 500 ml 样品浓缩至 50 ml。然后根据 1/2 换液原则，将样品 50 ml 用 1×PBS 稀释至 100 ml，再将样品稀释液重新浓缩至 50 ml，重复 15 ～ 20 次即可将蛋白 buffer 置换成 1×PBS 缓冲液，最终将 2 种蛋白体积均浓缩至 15 ml。

将包涵体、变性液和复性液分别制样，进行 4%～ 12% SDS-PAGE 分析。SDS-PAGE 结果显示，未经处理的包涵体样品中含有较多杂带，经过洗涤和变性处理后样品中的杂带明显减少，且复性样品呈现出单一目的条带（图 5）。

通过多功能酶标仪检测换液后蛋白的 OD_{280} 值，根据式①计算蛋白浓度，AL09 及 V_λ6wil 的 OD_{280} 分别为 0.041 0 和 0.035 9，消光系数分别为 1.221 和 1.101，此酶标仪光程为 0.05 cm，根据式①得 2 种 AL 蛋白产量均可达 10 mg/L 左右。

$$c=\frac{OD_{280}}{\varepsilon\times b} \qquad 式①$$

式①中，*c* 为蛋白浓度；OD_{280} 为蛋白在 280 nm 处吸光度值；ε 为消光系数；*b* 为光程。



M－蛋白 marker；泳道 1 ～ 3－AL-09 包涵体处理前、变性后、复性后样品；泳道 4 ～ 6－V_λ6wil 包涵体处理前、变性后、复性后样品

图 5 包涵体处理前后的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE Analysis of Inclusion Bodies before and after Treatment

2.4 轻链淀粉样蛋白体外活性检测

2.4.1 抗 AL 嵌合抗体的表达及 Protein A 亲和纯化

根据专利（US 2019/0038745 A1）中公布的序列信息[12]，本研究合成了基因序列并构建了 pcDNA3.4-CAEL-101-HC/LC 真核表达载体，采用瞬时转染的方法进行抗体表达。以每毫升 7×10^5 个的细胞密度接种 HEK-293F，总体系为 300 ml，培养 24 h 后，检测显示细胞密度达到每毫升 1×10^6 个左右，照每 10^6 个细胞加入质粒 0.6 μg 计算质粒总质量，照重链∶轻链质量比为 1 ∶ 3、质粒∶聚乙

烯亚胺（PEI）质量比为 1 ∶ 4 的比例进行转染，然后于 37 ℃、220 r/min 摇床中培养 5 ～ 7 d，至细胞活率下降至 50% 以下时收样。将样品于 4 ℃离心（1 914×*g*）10 min，取上清液再离心（5 861×*g*）30 min。将上清液分别经 0.8、0.45 μm 滤膜过滤，利用 Protein A 亲和色谱的方法通过蛋白纯化仪进行蛋白纯化，并用 10% SDS-PAGE 鉴定纯化结果。

Protein A 亲和纯化色谱图显示（图 6A），经洗脱缓冲液（100 mmol/L 枸橼酸缓冲液，pH 2.8）洗脱时，嵌合抗体 CAEL-101 被大量洗脱且洗脱峰独立。SDS-PAGE 结果显示（图 6B），抗体相对分子质量大于 170 000，还原型样品条带清晰，重链约为 55 000，轻链约为 25 000。经透析处理最终得到蛋白 2 mg，产量约为 6.93 mg/L。

2.4.2　轻链淀粉样蛋白 ThT 活性验证

由于淀粉样蛋白纤维中的 β 折叠结构，苯并噻唑染料 ThT 可选择性结合淀粉样蛋白纤维，且结合后，ThT 的激发波长由 385 nm 增加至 450 nm，发射波长由 445 nm 增加为 482 nm。因此，ThT 荧光分析被广泛用来研究淀粉样蛋白在体外的纤维化过程。

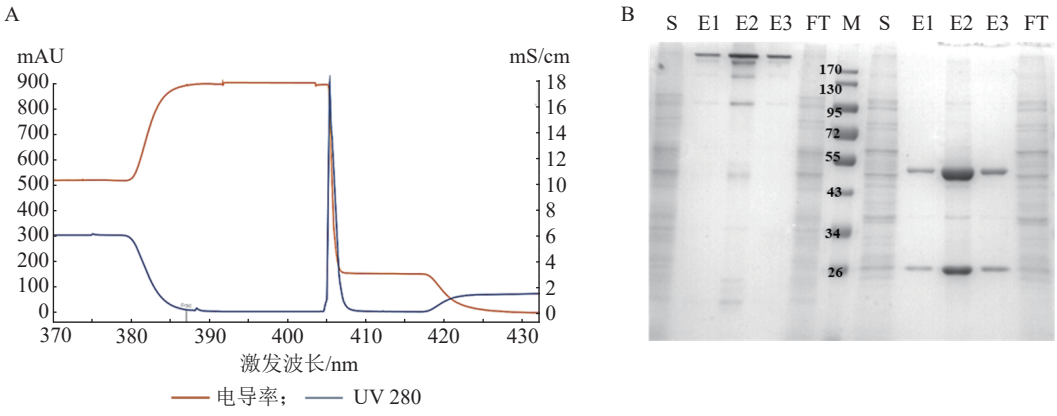
本研究用 1×PBS 将表达得到的 AL-09 及 V_{λ}6wil 蛋白稀释至 100 μmol/L，混合均匀后置冰上备用。将 CAEL-101 抗体用 1×PBS 分别稀释至浓度为 4、0.4、0.04 μmol/L。在每个 1.5 ml EP 管中分别加入 AL 蛋白稀释液 100 μl 和不同浓度的抗体稀释液 100 μl。此外，设置 3 组对照组，即 1×PBS、抗体和 AL 蛋白溶液。将总体积为 200 μl 的溶液吹打混匀，并将 EP 管置 37 ℃、220 r/min 摇床中连续孵育 96 h。

96 h 孵育结束后，取孵育产物 17 μl 加至 ThT 溶液 153 μl 中（使 AL 蛋白终浓度约为 5 μmol/L），吹打混匀后在室温条件下避光放置 30 min。取 96 孔黑壁透明底低吸附半区板，将孵育后的反应产物与 ThT 的混合液加入孔板，每孔 50 μl，设置 3 个复孔。使用多功能酶标仪测量，设定激发波长为 450 nm，发射波长为 482 nm，选择底部测量模式，每孔数据读取 5 次。

ThT 检测结果显示（图 7），未加入抗 AL 嵌合抗体 CAEL-101 的 AL 蛋白溶液组显示出较高的荧光值，与 PBS 对照组相比具有显著性差异，表明有 AL 蛋白在体外孵育过程中可聚集形成原纤维；在加入 2 μmol/L 抗体时，AL 蛋白的体外聚集过程被显著抑制，且抗体抑制聚集的效果呈现出一定的浓度依赖性。综上所述，制备的 AL-09 及 V_{λ}6wil 蛋白具有较好的纤维化活性，且体外纤维化进程在一定程度上可以被抗 AL 嵌合抗体 CAEL-101 抑制。

2.4.3　轻链淀粉样蛋白细胞毒性检测

本研究采用 MTT 法检测 AL-09 及 V_{λ}6wil 蛋白

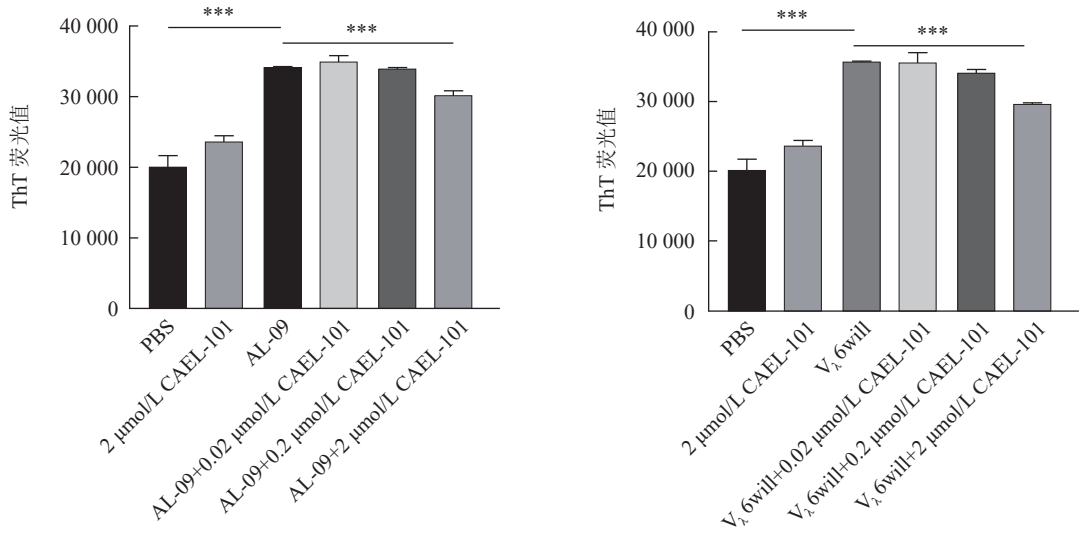


A：Protein A 亲和纯化色谱图，B：纯化样品 SDS-PAGE 分析

［S－上样前样品；E1 ～ E3－洗脱样品；FT－流穿（左：非还原，右：还原）］

图 6　抗 AL 嵌合抗体表达及 Protein A 亲和色谱纯化

Fig.6　Purification of Anti-AL Chimeric Antibody by Protein A Affinity Chromatography



A：ThT 检测 AL-09 体外聚集情况，B：ThT 检测 V_λ6wil 体外聚集情况

图 7 ThT 检测 AL-09 及 V_λ6wil 的体外纤维化活性（P<0.001，n=3）

Fig.7 Fibrotic Capacities of AL-09 and V_λ6wil by ThT Assay（P<0.001，n=3）

对 AC16 细胞的细胞毒性。用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 AC16 细胞，将处于对数生长期的细胞以每孔 5 000 个的密度接种于 96 孔细胞培养板中，在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中过夜培养，使细胞贴壁。用无血清的细胞培养基 DMEM 将 AL 蛋白进行梯度稀释，使其终浓度分别达到 0.2、1、5、10 μmol/L。细胞贴壁后，将培养基用移液器吸弃，分别向每孔加入 AL-09 或 V_λ6wil 蛋白稀释液 100 μl，以 PBS 为空白对照，每组设置 3 个复孔。将孔板置 37 ℃、5% CO_2 中继续培养 72 h。孵育结束后，将细胞培养孔板中含不同浓度 AL 蛋白的 DMEM 培养基用移液器吸弃。将 DMEM 与 MTT 试剂以体积比 10 ∶ 1 混匀，每孔加入 100 μl。振荡 1 min 后，置 37 ℃条件下避光孵育 4 h，再次将孔板中溶液吸弃，每孔加入 MTT 试剂盒中的甲臜溶解液 100 μl，置 37 ℃条件下孵育 4 h。待紫色结晶完全溶解后，用多功能酶标仪在 570 nm 波长下测定 96 孔细胞培养板中各孔吸光度值，照式②计算细胞毒作用。

$$细胞毒作用=\frac{OD(经处理细胞)}{OD(空白对照组)}\times 100\% \quad 式②$$

MTT 结果显示（图 8），AL-09 及 V_λ6wil 蛋白与心肌细胞 AC16 共孵育 72 h 后，细胞增殖受到明显抑制，且 AL 蛋白相关细胞毒性呈现出浓度依赖性。此外，相较于 AL-09，V_λ6wil 对 AC16 细胞产生了更强的增殖抑制作用。MTT 试验在细胞水平上初步验证了 *E. coli* 表达生产的 AL-09 及 V_λ6wil 蛋白的生物活性。

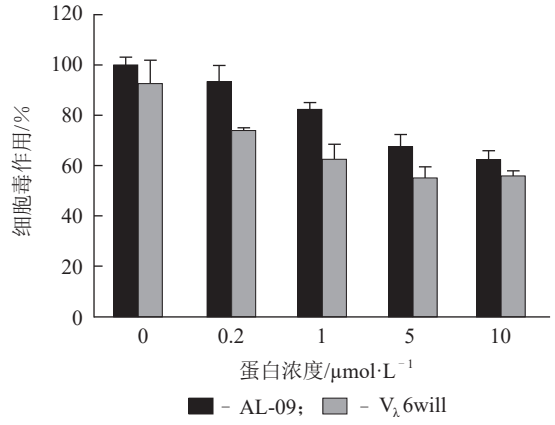


图 8 AL-09 及 V_λ6wil 对人心肌细胞 AC16 的毒性检测（n=3）

Fig.8 Cytotoxicities of AL-09 and V_λ6wil against AC16 Cells by MTT Assay（n=3）

3 讨论

相比于其他表达系统，*E. coli* 原核表达具有成本低、复制快、表达水平高等特性，已成为有效且

经济的蛋白生产方式之一[13]。轻链淀粉样蛋白多利用 *E. coli* 原核表达系统生产，有研究通过添加促溶标签、降低诱导温度等增加蛋白可溶性表达，从细菌周质空间中提取蛋白质，然后通过尺寸排阻色谱进行蛋白纯化[9—10]。另有研究通过包涵体提取 AL-09 V_L 蛋白，使用 5 mol/L 尿素溶解包涵体，并在 10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4 的透析液中使蛋白重新折叠[6]。经过试验发现，蛋白可溶性表达杂质较多，后续纯化较为困难，故本研究利用包涵体提取轻链淀粉样蛋白。由于包涵体中除了目的蛋白，还含有少量脂类、核酸、多糖和其他杂蛋白，本试验中利用三步洗涤工序即可得到纯净的目的条带，简化了后续色谱纯化的步骤[14]。考虑到变性能力[15]，采用变性能力更强的 6 mol/L 盐酸胍而非尿素溶解包涵体，然后利用稀释法使蛋白缓慢重折叠。经 SDS-PAGE 验证，复性得到的 AL-09 及 V_λ6wil 蛋白已拥有较高纯度，无需进一步色谱纯化，且蛋白产量充分满足试验需求。后续可继续优化表达条件，如调整温度、pH 值等，进一步提高表达效率。

将 ThT 添加到富含 β- 折叠沉积物的样品（如淀粉样蛋白原纤维 β- 折叠四级结构）中时，ThT 会发出强烈的荧光[16]。由于 ThT 和淀粉样蛋白原纤维之间存在化学计量且可饱和的相互作用，因此淀粉样蛋白 -ThT 复合物的荧光为淀粉样蛋白原纤维的长度和数量提供了准确量化指标[17]。本研究通过将轻链淀粉样蛋白体外孵育后进行 ThT 检测，验证了其在体外具有良好的纤维化能力，且该聚集过程一定程度上可被抗 AL 抗体抑制。

迄今为止，轻链淀粉样变性患者的治疗选择依然有限，人们对该疾病的分子基础缺乏了解，从而阻碍了药物的有效开发。临床观察表明，通过抗浆细胞化疗达到血液学缓解（定义为游离轻链水平正常化）的 AL 心脏淀粉样变性患者在心力衰竭症状方面有所改善，因此提出了轻链淀粉样蛋白除在细胞外沉积引起的损伤外，也会直接在心肌细胞中引起细胞毒性的概念[18—19]。这一概念后续也得到了验证，即单独使用 AL-LC 可在分离的心肌细胞和心脏中诱导氧化应激和细胞功能障碍，AL-09 全长或可变结构域蛋白处理过的 AC16 细胞均显示 caspase 活性显著增加，证明可溶性蛋白可通过浓度依赖性的方式激活人心肌细胞中的凋亡事件，尤其是淀粉样蛋白原性更强的变体[6]。本研究利用 AC16 细胞，对原核表达的 AL-09 及 V_λ6wil 可变域蛋白进行细胞毒性验证，试验结果与上述文献报道吻合。

综上所述，本研究利用 *E. coli* 包涵体表达技术得到了 2 种不同类型的轻链淀粉样蛋白可变域，并验证了其在体外的纤维化活性和细胞毒性，为继续深入探索淀粉样变性相关疾病的分子基础、实现其早期诊断和开发新型疗法提供支持。

参考文献：

[1] MAHMOOD S, BRIDOUX F, VENNER C P, *et al*. Natural history and outcomes in localised immunoglobulin light-chain amyloidosis: a long-term observational study[J]. *Lancet Haematol*, 2015, **2**(6): e241-e250.

[2] KOURELIS T V, KYLE R A, DINGLI D, *et al*. Presentation and outcomes of localized immunoglobulin light chain amyloidosis: the mayo clinic experience[J]. *Mayo Clin Proc*, 2017, **92**(6): 908-917.

[3] AL HAMED R, BAZARBACHI A H, BAZARBACHI A, *et al*. Comprehensive review of AL amyloidosis: some practical recommendations[J]. *Blood Cancer J*, 2021, **11**(5): 97.

[4] PALLADINI G, MERLINI G. What is new in diagnosis and management of light chain amyloidosis?[J]. *Blood*, 2016, **128**(2): 159-168.

[5] 中国系统性轻链型淀粉样变性协作组, 国家肾脏疾病临床医学研究中心, 国家血液系统疾病临床医学研究中心. 系统性轻链型淀粉样变性诊断和治疗指南(2021年修订)[J]. 中华医学杂志, 2021, **101**(22): 1646-1656.

[6] MARIN-ARGANY M, LIN Y, MISRA P, *et al*. Cell damage in light chain amyloidosis: fibril internalization, toxicity and cell-mediated seeding[J]. *J Biol Chem*, 2016, **291**(38): 19813-19825.

[7] MCWILLIAMS-KOEPPEN H P, FOSTER J S, HACKENBRACK N, *et al*. Light chain amyloid fibrils cause metabolic dysfunction in human cardiomyocytes[J]. *PLoS One*, 2015, **10**(9): e0137716.

[8] RAMIREZ-ALVARADO M. Amyloid formation in light chain amyloidosis [J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, **12**(22): 2523-2533.

[9] SIKKINK L A, RAMIREZ-ALVARADO M. Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain [J]. *Biophys Chem*, 2008, **135**(1-3): 25-31.

[10] MCLAUGHLIN R W, DE STIGTER J K, SIKKINK L A, *et al*. The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein [J]. *Protein Sci*, 2006, **15**(7): 1710-1722.

[11] WALL J S, GUPTA V, WILKERSON M, *et al*. Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four Vlambda6 proteins [J]. *J Mol Recognit*, 2004, **17**(4): 323-331.

[12] SUZANNE L. Methods and compositions for treatment of amyloid deposition diseases: US, 20190038745A [P]. 2019-02-07.

[13] 方 敏, 黄华樑. 包涵体蛋白体外复性的研究进展[J]. 生物工程学报, 2001, **17**(6): 5.

[14] 王 增, 马会勤, 张 文, 等. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2009, **29**(7): 102-107.

[15] 马 静, 陈开廷, 曹美娜, 等. 青海血蜱重组rHq002蛋白包涵体的纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, **35**(1): 91-94.

[16] NILSSON M R. Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro* [J]. *Methods*, 2004, **34**(1): 151-160.

[17] BOLDER S G, SAGIS L M C, VENEMA P, *et al*. Thioflavin T and birefringence assays to determine the conversion of proteins into fibrils [J]. *Langmuir*, 2007, **23**(8): 4144-4147.

[18] LIAO R, JAIN M, TELLER P, *et al*. Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts [J]. *Circulation*, 2001, **104**(14): 1594-1597.

[19] BRENNER D A, JAIN M, PIMENTEL D R, *et al*. Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress [J]. *Circ Res*, 2004, **94**(8): 1008-1010.

广告索引

封二：鲁南厚普制药有限公司

封三：天津市天大天发科技有限公司

封底：苏州海顺包装材料有限公司