蛋白 L 突变体的表达纯化及其亲和色谱填料制备

夏名轩[1]，吴　勇[2]，白道军[1]，冯　军[1,2]*
（1. 上海师范大学生命科学学院 上海 200234；2. 上海多米瑞生物技术有限公司，上海 202103）

摘要：蛋白 L（Protein L）是由大消化链球菌（*Peptostreptococcus magnus*）产生的一种细胞壁表面蛋白，可与带有 kappa 轻链的抗体特异性结合，是抗体纯化的重要工具之一。目前国内市场在售的 Protein L 亲和填料种类少、价格昂贵，且在载量与耐碱性能上存在较大的提升空间。该研究采用构建的耐碱突变 Protein L 表达菌株 DMR582，通过高密度发酵、聚乙烯亚胺（PEI）抽提、预处理及阳离子交换柱色谱纯化获得纯度达 96.7%的 Protein L，并将其固定于环氧活化琼脂糖介质上，制备得 Protein L 亲和色谱填料。经参数优化，其对抗体片段 Fab 在 10%穿透下的动态结合载量（$DBC_{10\%}$）达到 35 mg/（mL 填料）。采用 100 mmol/L 氢氧化钠溶液模拟 50 次在位清洗（CIP）后测得其 $DBC_{10\%}$为初始值的 73.9%，比原始序列配体填料高。在 15 mmol/L 氢氧化钠溶液模拟 100 次 CIP 后其 $DBC_{10\%}$仍能保持在初始值的 89.6%，与在售产品 Capto L 填料耐碱性相当。

关键词：蛋白 L 突变体；离子交换层析；固定化；动态结合载量
中图分类号：Q816　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)03-0357-09
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.03.009

Expression and Purification of Protein L Mutant and Preparation of Its Affinity Chromatographic Medium

XIA Mingxuan[1], WU Yong[2], BAI Daojun[1], FENG Jun[1,2]*
(*1. College of Life Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234; 2. Shanghai Duomeirui Biotechnology Corporation, Shanghai 202103*)

ABSTRACT: Protein L is a kind of cell wall-anchored surface proteins produced by *Peptostreptococcus magnus*, which can specifically bind to antibodies with the kappa light chain. Moreover, it is one of the crucial tools for antibody fragment purification. There are few types of Protein L affinity chromatographic packings for sale, and most of them are expensive. Meanwhile, the alkali resistance and capacity of the existing Protein L affinity chromatographic packings still need to be improved. In this study, the Protein L was expressed by high-density fermentation of constructing alkali-resistant mutant Protein L expression strain DMR582. After extraction with polyethylenimine(PEI), pretreatment and one-step cation exchange chromatography, the purity of Protein L reached 96.7%. Then, the purified Protein L fillers was immobilized on epoxy activated agarose medium to prepare Protein L affinity chromatographic medium. After parameter optimization, the dynamic binding capacity at 10% breakthrough($DBC_{10\%}$) could reach 35 mg/mL for Fab. After 50 times of clean in place(CIP) with 100 mmol/L sodium hydroxide solution, the remaining $DBC_{10\%}$ was 73.9%, higher than the ligand fillers with the original sequence. And after 100 times of CIP with 15 mmol/L sodium hydroxide solution, the remaining $DBC_{10\%}$ could still maintain at 89.6% of the initial load, which was equivalent to the alkali resistance of Capto L resin.

Key Words: protein L mutant; ion exchange chromatography; immobilization; dynamic binding capacity

单克隆抗体（mAb）和抗体片段（Fab、ScFv、dab）是用于治疗各种肿瘤及自身免疫疾病的重要蛋白药物[1]。抗体片段缺失 Fc 区域，结构更小、更简单，因而具有较高的组织渗透性、较低的免疫原

收稿日期：2022-11-23
作者简介：夏名轩(1994—)，男，硕士研究生，专业方向：蛋白药物及工具的研究、环境微生物的研究。
通信作者：冯　军(1971—)，男，研究员，从事蛋白质及多肽药物的开发与研究。
E-mail：fengjdmr@163.com

性[2]，同时更易在大肠埃希菌中表达[3]。凭借这些优势，抗体片段逐渐成为 mAb 的可行性替代品[4]。

抗体药物在生产制备阶段通常采用 Protein A 亲和色谱进行纯化，但由于 Protein A 仅结合抗体 Fc 部分的 CH_2-CH_3 区域，不能用于不含 Fc 结构的抗体片段的下游纯化[5]。有研究[6—7]显示，来自大消化链球菌（*Peptostreptococcus magnus*）的 Protein L 与带有 kappa 轻链的人源 Ig、ScFv 和 Fab 有较强的特异性结合能力，使得它能更广泛地捕获 mAb 及抗体片段形式，有可能取代 Protein A 用于抗体片段的亲和色谱纯化。

目前市售的 Protein L 产品中，以美国 Cytiva 公司开发的 Capto L 填料占主导，但其价格昂贵，且针对 Fab 片段的 10%流穿时的动态载量（dynamic binding capacity at 10% breakthrough，$DBC_{10\%}$）仅为 25 mg/mL[8]，致使在抗体片段的制备工艺中，仅填料成本就占 50%以上。因此，Protein L 亲和色谱填料的国产替代产品开发具有重要意义。

本研究使用实验室已构建的重组耐碱突变 Protein L 周质表达菌株 DMR582［*Escherichia coli* BL21（DE3）/pET28a- SP1 rPpL］作为目的蛋白表达菌株。通过高密度发酵表达目的蛋白，然后采用离子交换色谱纯化，优化了制备 Protein L 与环氧固相基质的键合条件，并使用赛妥株单抗 Fab、阿达木单抗 Fab、兰尼单抗 Fab 对其 $DBC_{10\%}$进行评价。最后，基于 Cytiva 公司的耐碱评价标准，对比了自制原始序列 Protein L 填料和 Capto L 填料的耐碱性能。

1　仪器与试药

SCG-100 型蛋白纯化系统（苏州赛谱科技仪器有限公司）；5BG-900 型机械搅拌发酵罐（上海保兴生物设备工程有限公司）；MD SpectraMax i3 型多功能酶标仪［美谷分子仪器（上海）有限公司］；Mini-PROTEAN® Tetra 电泳仪（美国伯乐实验室有限公司）；1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；SW-CJ-2D 型净化工作台（苏州净化设备有限公司）。

赛妥株单抗 Fab、阿达木单抗 Fab、兰尼单抗 Fab 样品（均由本实验室提供，规格均为 1 mg/mL）；卡那霉素（kanamycin）、异丙基硫代半乳糖苷（IPTG）、BCA 蛋白定量试剂盒［生工生物工程（上海）股份有限公司］；1- 硫代甘油（安徽泽升科技有限公司）；蛋白标准品（相对分子质量 10 000 ～ 250 000，上海雅酶生物医药科技有限公司，批号 02351800）；三氟乙酸（TFA，上海泰坦科技股份有限公司）；三（2- 羧乙基）膦（TCEP，上海泰坦科技股份有限公司）；其他试剂均为分析纯，购于国药集团化学试剂有限公司。

Protein L 表达菌株 DMR582、DMR580（由本实验室构建并保存）。

2　方法与结果

2.1　溶液的配制

种子培养基（LB）/（$g·L^{-1}$）：酵母粉 5，蛋白胨 10，NaCl 10。121 ℃灭菌 30 min（使用前加入 25 μg/mL 的卡那霉素）。

发酵培养基 /（$g·L^{-1}$）：甘油 20，$Na_2HPO_4·12H_2O$ 17.5，硫酸铵 3，酵母粉 15，KH_2PO_4 3，NaCl 0.5，KCl 1，$MgSO_4$ 0.51，$CaCl_2$ 0.011，葡糖糖 2；pH 7.0。121 ℃灭菌 30 min。

磷酸缓冲盐溶液（PBS）/（$g·L^{-1}$）：NaCl 8.0，KCl 0.2，Na_2HPO_4 1.44，KH_2PO_4 0.24；pH 7.4。

固定化偶联缓冲液 /（$mol·L^{-1}$）：EDTA-Na_2 0.001，Na_2HPO_4 0.1。

封闭缓冲液 /（$mol·L^{-1}$）：碳酸氢钠 0.2，NaCl 0.5，EDTA-Na_2 0.001；pH 9.0。

2.2　Protein L 的发酵及纯化

2.2.1　纯度及浓度的测定方法

色谱条件：色谱柱 YMC-Triart Bio C_4 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相　A 为 0.1% TFA 水溶液，B 为 0.1% TFA 的乙腈溶液，洗脱梯度程序如表 1 所示；流速 1 mL/min；检测波长 215 nm；柱温 68 ℃；进样量 5 μL。

表 1　HPLC 洗脱梯度表

Tab.1　Gradient Elution Procedure of HPLC

t/min	A/%	B/%
0	80	20
3	80	20
10	60.5	39.5
22	58	42
22.5	20	80
28	20	80

Protein L 峰面积占蛋白总峰面积的比值即为纯度。先用 BCA 蛋白定量试剂盒测定经预试验制备的高纯度（>95%）Protein L 的质量浓度，然后分别稀释至 0.5、1、1.25、1.5 和 2.0 mg/mL，并以各样品质量浓度（c）为横坐标、Protein L 洗脱峰面积（A）为纵坐标，得标准曲线方程 A=0.000 3c+0.024 2，R^2=0.998 3。

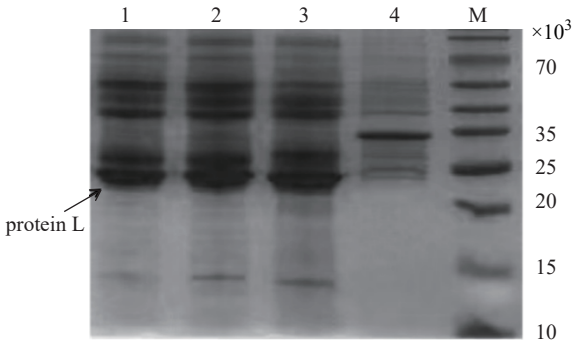
2.2.2 高密度发酵及周质蛋白的提取

将保存于 －80 ℃的 DMR582 菌株复融，以 3% 的接种量接种至 LB 培养基 30 mL 中，于 220 r/min、37 ℃恒温培养 7 h 后获得一级种子液。照 1% 的接种量将一级种子液转接于 LB 培养基 100 mL 中，于 220 r/min、37 ℃恒温培养 12 h 得二级种子液。以 3% 的接种量将二级种子液接种至 5 L 发酵罐（发酵培养基装量 3 L）中进行高密度发酵。初始温度 37 ℃，转速 400 r/min，通气量 3.0 L/min，pH 7.0。发酵中后期通过调节转速、罐压、补料（体积分数为 75% 的甘油溶液）等手段确保溶氧量保持在 30%～40%。待吸光度（OD_{600}）为约 75 时，将罐温逐渐降至 25 ℃；待 OD_{600} 至约 80 时，加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 以诱导目的蛋白表达，诱导发酵 14 h，总发酵时长 26 h。

将发酵菌液离心（14 000×g）30 min 后，收集菌体沉淀。以质量体积比 1 ∶ 10 将菌体重悬于缓冲液（含 25 mmol/L Tris-HCl 和 5 mmol/L EDTA，pH 8.0）中，然后加入终体积分数为 0.05% 的聚乙烯亚胺（PEI）溶液，室温下搅拌抽提（280 r/min）1.5 h，而后离心（14 000×g）30 min，收集上清液，即获得目的蛋白抽提液，采用 12.5% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）进行分析，结果如图 1 所示；并用“**2.2.1**”项下方法检测，结果显示 Protein L 的表达量为（4.71±0.17）g/L（n=3），纯度为（47.6±3.8）%（n=3）。

2.2.3 抽提液预处理

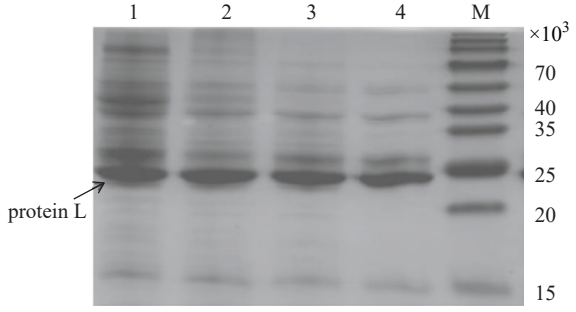
预处理操作为调节抽提液 pH 值，以两次跨越目的蛋白等电点（PI：4.98）。先调节蛋白抽提液 pH 值至 4.0，搅拌 30 min 后离心（14 000×g）30 min；取上清液，再调至 pH 6.0，搅拌 30 min 后离心（14 000×g）30 min；取上清液，60 ℃水浴加热 1 h，再离心（14 000×g）30 min，取上清液，待测。各步处理所得的上清液均进行 SDS-PAGE（12.5%）分析，结果如图 2 所示；并照“**2.2.1**”项下方法测定 Protein L 的纯度。结果（表 2）显示，蛋白纯度提高至（70.6±1.4）%，总收率为 91%（n=3）。



M—蛋白标准品；1～3—诱导时间分别为 8、10 和 12 h 的蛋白抽提液；4—发酵上清液。

图 1 抽提液及发酵上清液的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE Analysis of Extraction Liquid and Fermentation Supernatant



M—蛋白标准品；1—蛋白抽提液；2—调至 pH 4.0 后的上清液；3—调至 pH 6.0 后的上清液；4—60 ℃水浴加热 1 h 后的上清液。

图 2 各步预处理操作所得上清液的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE Analysis of the Supernatant at Each Pretreatment Step

2.2.4 离子交换柱色谱制备

依据等电点选择阳离子交换柱色谱对 Protein L 进一步纯化，色谱条件如下：色谱柱 HiTrap SP HP（柱体积 5 mL）；流动相 A 为 30 mmol/L 乙酸钠溶液（pH 4.0），B 为含 30 mmol/L 乙酸钠和 1 mol/L 氯

表 2　各步预处理骤所得上清液中 Protein L 的纯度及收率（*n*=3）

Tab.2　Purity and Yield of Protein L in the Supernatant of Each Pretreatment Step (*n*=3)

处理方式	纯度/%	收率/%
抽提	47.6±3.8	—
pH 4.0处理	61.3±2.1	97.0±1.0
pH 6.0处理	62.9±1.5	98.0±0.8
60 ℃加热处理	70.6±1.4	96.0±1.4

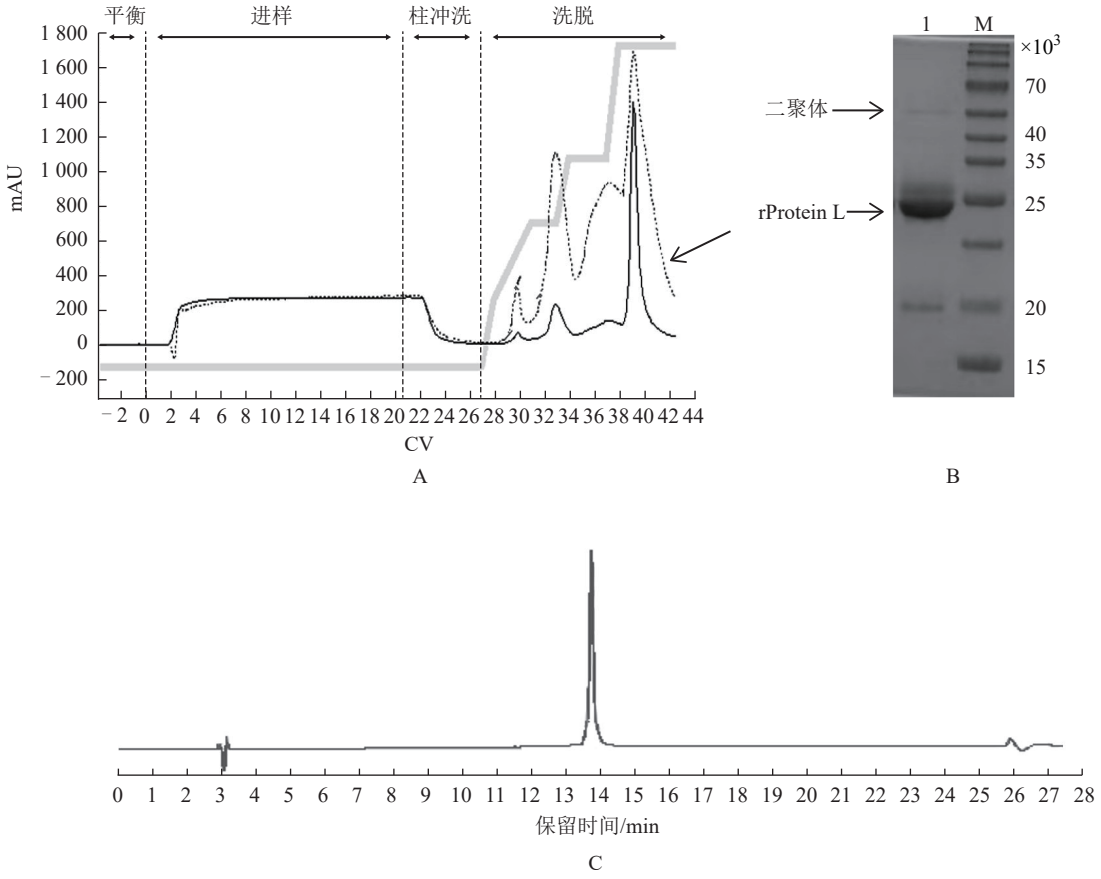
化钠的溶液（pH 4.0），梯度洗脱，程序如表 3 所示；流速 5 mL/min。洗脱图谱如图 3A 所示。洗脱后各收集管采用“**2.2.1**”项下方法测定 Protein L 的纯度，收集纯度 >90%的样品（当 Protein L 纯度 >90%即可用于固定化），合并后采用 12.5%的 SDS-PAGE 进行分析并测定纯度。结果如图 3B 和 3C 所示。“**2.2.3**”项下经调节 pH 值及水浴加热处理后的上清液经离子交换柱色谱纯化后，Protein L 的收率为（67±3.4）%，纯度为（96.7±0.9）%（*n*=3）。最后利用中空纤维（截留分子量 13 000）将纯化后的 Protein L 制备成质量浓度为 20 mg/mL 的母液，并将缓冲液置换为 PBS。

表 3　洗脱梯度表

Tab.3　Gradient Elution Procedure

柱体积(CV)[1)]	A/%	B/%
0	100	0
1	79	21
3	55	45
2	55	45
1	35	65
3	35	65
1	0	100
3	0	100

注：[1)] 指流动相 A 和 B 的总体积。



A—阳离子交换色谱（实线—215 nm；虚线—280 nm；灰色粗线—流动相 B 的柱体积比例）；B—AGE 分析（M—Marker；1—Protein L 纯化后合并样品）；C—纯化 Protein L 的 HPLC 色谱图。

图 3　Protein L 的纯化过程和结果

Fig.3　Purification Process and Results of Protein L

2.3 Protein L 填料的制备及评价

2.3.1 键合量及 $DBC_{10\%}$的测定方法

Protein L 固定化方法：将 Protein L 浓缩液（其中所含 Protein L 质量为 m_0 mg，照“**2.2.1**”项下方法测定 Protein L 质量浓度后计算得到，下同）与已活化的环氧填料（C/mL）混合后置恒温摇床中，以 120 r/min 的速度摇动孵育，进行固定化（具体条件如表 4 所示）。待键合反应结束后抽去反应液（其中含 Protein L m_1 mg），所得固定化产物用氯化钠终浓度为 1 mol/L 的固定化偶联缓冲液冲洗，抽去冲洗液（其中含 Protein L m_2 mg），然后剩余物中加入封闭缓冲液，所得混悬体系置恒温摇床中，于 120 r/min、室温条件孵育 4 h，进行封闭。待封闭结束后使用 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 8.0）、0.05 mol/L 乙酸交替冲洗，收集洗液（其中含 Protein L m_3 mg），所得 Protein L 填料则保存于 20%乙醇中。照式①计算键合量。

$$\text{Protein L 键合量 (mg/mL 填料)} = (m_0 - m_1 - m_2 - m_3)/C \quad \text{式①}$$

表 4 固定化反应初始条件

Fig.4 Initial Conditions of Immobilization Reaction

反应条件	数值
反应液pH值	8.5
NaCl加入浓度/(mol·L^{-1})	0.5
Protein L加入量/[mg·(mL^{-1}填料)]	40
Protein L加入浓度/(mg·mL^{-1})	8
反应时长/h	8
反应温度/℃	40
TCEP加入浓度/(mmol·L^{-1})	7

$DBC_{10\%}$的测定方法：量取上述自制的 Protein L 填料，以 1 ∶ 1.15 的压缩比装填为 1 mL 的亲和色谱柱，将 1 mg/mL 的赛妥株 Fab 单抗 45 mL 加至色谱柱上，通过蛋白纯化系统以 1 mL/min 的速度进行梯度洗脱以分离 Fab 抗体片段，洗脱程序如表 5 所示。以每管 1 mL 收集流穿液，并通过 HPLC 法分析其中 Fab 抗体片段的浓度（分析方法由本实验室建立并验证，符合定量分析的要求）。

当 Fab 瞬时流穿浓度达到进样时样品浓度的 10%时计为 10%穿透，按式②计算 $DBC_{10\%}$。

$$DBC_{10\%} = (V_{10\%} - V_0)C_0/V_c \quad \text{式②}$$

表 5 洗脱梯度表

Tab.5 Gradient Elution Procedure

CV[1)]	A[2)]/%	B[3)]/%
0	100	0
1	79	21
3	55	45
2	55	45
1	35	65
3	35	65
1	0	100
3	0	100

注：[1)] 指流动相 A 和 B 的总体积；[2)] A 为含 20 mmol/L 十二水合磷酸氢二钠和 0.15 mol/L 氯化钠的水溶液（pH 7.2）；[3)] B 为含 0.1 mol/L 甘氨酸的盐酸（pH 2.7）。

式中：C_0 为进样时的抗体 Fab 质量浓度 /(mg·mL^{-1})；V_c 为亲和色谱柱体积 /mL；$V_{10\%}$为到达 10%穿透时的进样体积 /mL；V_0 为 SCG 进样管路体积 /mL。

2.3.2 固定化反应条件的优化

对影响键合量的 5 个固定化偶联阶段的主要条件，反应液 pH、偶联缓冲液中氯化钠的终浓度、Protein L 加入时的质量浓度、Protein L 加入量和反应时长进行单因素试验。除考察因素外，其余固定变量设定照“**2.3.1**”项下所述。键合量及 $DBC_{10\%}$ 应用“**2.3.1**”项下方法及公式计算，每个因素重复试验 3 次。

首先对影响其键合位点的主要因素（反应液 pH）进行优化，分别设置反应液 pH 为 7.0、7.3、7.6、7.9、8.2、8.5、8.8 和 9.1 进行试验。结果显示，键合量和 $DBC_{10\%}$在 pH 8.8 时达到最高，分别为 8.8 和 24.2 mg/(mL 填料)（图 4A）。

分别设置偶联缓冲液中氯化钠终浓度为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mol/L 进行试验，结果显示，当氯化钠终浓度为 1.5 mol/L 时 $DBC_{10\%}$达到最高值 27.1 mg/(mL 填料)，此时键合量为 10.2 mg/(mL 填料)（图 4B）。

接下来对 Protein L 加入量进行优化，分别设置 Protein L 加入量为 20、40、60、80、100、120、140 mg/(mL 填料)。结果显示，随着 Protein L 加入量的增加，键合量与载量开始出现不规律波动，这可能是不同的加入量使孵育体积比产生差异导致的。但当 Protein L 加入量为 60 mg/(mL 填料)

时，达到较大键合量 10.8 mg/(mL 填料）和较高 $DBC_{10\%}$ 29.2 mg/(mL 填料）(图 4C)。

对 Protein L 加入时质量浓度进行优化，分别设置 4、6、8、10、12、14、16、18、20 mg/mL。结果显示，键合量达到 12.3 mg/(mL 填料）后，即使键合量继续增加，载量却出现了明显下降，说明此时已出现空间位阻，因此选择加入质量浓度为 10 mg/mL，此时键合量达到 12.3 mg/(mL 填料），且具有较高的 $DBC_{10\%}$，32.3 mg/(mL 填料）(图 4D)。

最后对固定化反应时间进行优化，分别设置固定化反应时间为 4、6、8、10、12、14、16 h。结果显示，最高 $DBC_{10\%}$为 35 mg/(mL 填料），此时反应时间为 10 h，键合量为 14.5 mg/(mL 填料）。当继续增加反应时间，虽然键合量有所增加，但 $DBC_{10\%}$呈下降趋势，因此反应时间 10 h 为最佳反应时间（图 4E)。

综上所述，固化反应的优化条件是 pH 8.8，偶联缓冲液中氯化钠终浓度为 1.5 mol/L，Protein L 加入量为 60 mg/(mL 填料）、加入浓度为 10 mg/mL，反应 10 h。

2.3.3 自制 protein L 亲和填料的性能评价

首先采用赛妥株单抗 Fab、兰尼单抗 Fab、阿达木单抗 Fab，按照“**2.3.1**”项下方法以及“**2.3.2**”项下优化条件分别测定回收率和填料的 $DBC_{10\%}$，并以载量的 80%样品量上样，洗脱、收集后按式③计算各 Fab 样品的回收率。

回收率 =（洗脱液 Fab 浓度 × 洗脱液体积）/ 上样 Fab 样品总含量　　式③

结果如图 5、表 6 所示，除 Fab 条带及其单体与聚体条带外再无其他杂蛋白条带。Fab 回收率均大于 90%，且 $DBC_{10\%}$均大于 30 mg/(mL 填料）。

接下来，用 2 种不同浓度氢氧化钠溶液模拟纯化循环，以评价自制 Protein L 填料的耐碱性。设置平衡体积为 5 CV，柱冲洗体积为 5 CV，洗脱结束后使用氢氧化钠溶液在位清洗（CIP)15 min。将每进行 1 次平衡、进样、柱冲洗、洗脱和 CIP 计为一次循环，共运行 50 次，每 5 次后按照“**2.3.1**”项下方法对 $DBC_{10\%}$进行测定。

表 6　对不同 Fab 片段回收率及 $DBC_{10\%}$（*n*=3）

Tab.6　Recovery Rates and $DBC_{10\%}$ of Different Fab Fragments (*n*=3)

Fab种类	回收率/%	$DBC_{10\%}$/(mg·mL^{-1})
赛妥珠单抗Fab	92.8±1.8	35.0±0.9
兰尼单抗Fab	93.0±2.4	30.7±0.5
阿达木单抗Fab	90.0±1.1	32.1±1.7

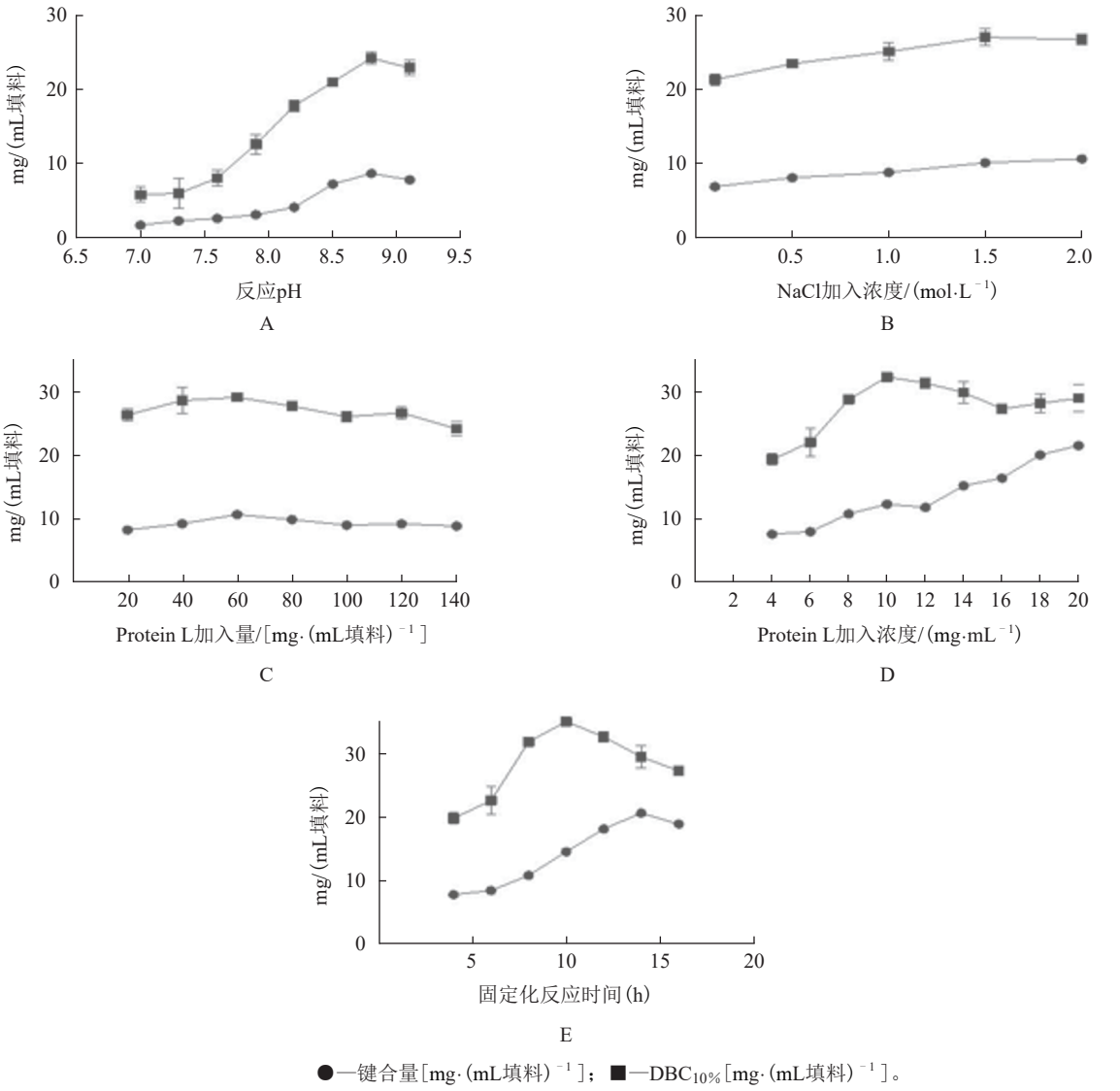
以 100 mmol/L 氢氧化钠溶液进行 CIP 时，设置固定有原始序列 Protein L 的填料作为对照组，结果如图 6 所示，固定有原始 Protein L 的填料从第 5 次循环起，其剩余结合载量明显低于固定有耐碱突变序列 Protein L 填料，在进行 50 次循环后，原始序列 Protein L 填料剩余 $DBC_{10\%}$仅为 50.3%，而耐碱突变序列 Protein L 为 73.9%，比原始序列配体填料高，说明在对原始序列进行耐碱突变后其耐碱性能得到大幅度提升。

而后，依据 Cytiva 公司当前公布的 Capto L 填料耐碱性能检测方法，使用 15 mmol/L 氢氧化钠溶液进行 CIP 100 次[6]，并设置 Capto L 为对照组。结果如图 7 所示，自制 Protein L 填料在 CIP 100 次后其剩余 $DBC_{10\%}$为 89.6%，Capto L 填料为 95%，在剩余 $DBC_{10\%}$比例来看自制 Protein L 填料略低于其水平，但自制填料实际剩余 $DBC_{10\%}$[31.36 mg/(mL 填料）] 则远高于 Capto L 初始载量 [25 mg/(mL 填料）]。

4　讨论

本研究在对 Protein L 序列的改造时参考专利及文献[6]选取了个别结合活性较强的构域为模板，设计了多结构重复的 Protein L 小分子，以提升其与抗体片段结合强度，同时对结构域中的一些不影响亲和力且碱敏感的氨基酸进行替换，如将部分天冬酰胺替换为谷氨酰胺或是丙氨酸，以提高其耐碱能力[9]。

在构建 Protein L 工程菌时，优先采用生长更快、易于转化外源性 DNA、易获得高细胞密度的大肠埃希菌表达系统[10]。并在 Protein L 序列前构建有本实验室自主设计的周质表达信号肽 SP1，使目的蛋白分泌于周质空间中，并使用 PEI 周质抽提法对分泌周质空间蛋白进行提取[11]，该方法所获得的



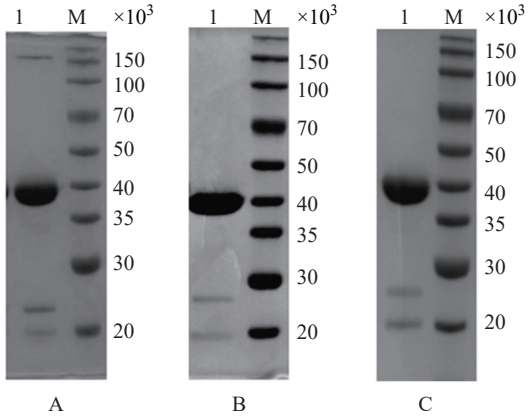
A—反应液 pH；B—NaCl 加入浓度优化；C—Protein L 加入量；D—Protein L 加入质量浓度；E—反应时长优化。

图 4 固定化反应条件优化

Fig.4 Optimization of Immobilization Reaction Conditions

抽提液纯度高于胞内或胞外分泌形式。构建菌株的目标蛋白表达量可达 4.7 g/L，表达产物经预处理及一步阳离子纯化后，可在保证 67%收率的前提下使 Protein L 纯度提升至 96.7%。

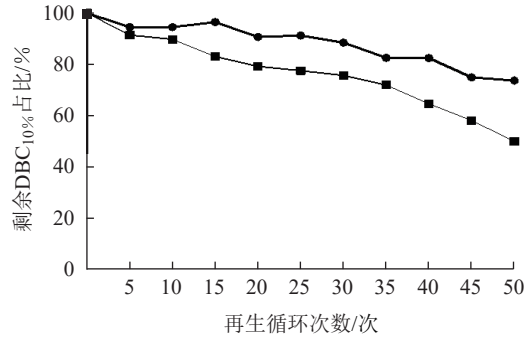
对 Protein L 环氧固相基质键合的研究中，序列设计时便在 C 端添加有半胱氨酸，其中的巯基可在 pH 7.5 ～ 8.5 时主要与环氧基团键合，避免其他基团与亲和位点中氨基酸结合而遮蔽亲和位点。在对固定化反应参数进行优化时，依照 pH 值、氯化钠加入浓度、Protein L 加入量、Protein L 加入时质量浓度浓度、固定化反应时间顺序依此优化。其中 pH 值与氯化钠加入浓度分别影响 Protein L 的键合位点与键合反应的速率，其最优条件为 pH 8.8，无机盐加入量 1.5 mol/L。在对 Protein L 加入浓度及加入量进行优化时，均出现了当键合量到达一定水平时 $DBC_{10\%}$不再增加或下降的现象，这说明当键合量达到阈值时所结合 Fab 出现空间位阻，且 Protein L 自身位点相互掩盖，因此均在 $DBC_{10\%}$达



A—赛妥株单抗 Fab；B—兰尼单抗 Fab；C—阿达木单抗 Fab。
M—蛋白标准品；1—相应上样药品。

图 5　纯化后 Fab 的 SDS-PAGE 分析

Fig.5　SDS-PAGE Analysis of Purified Fab



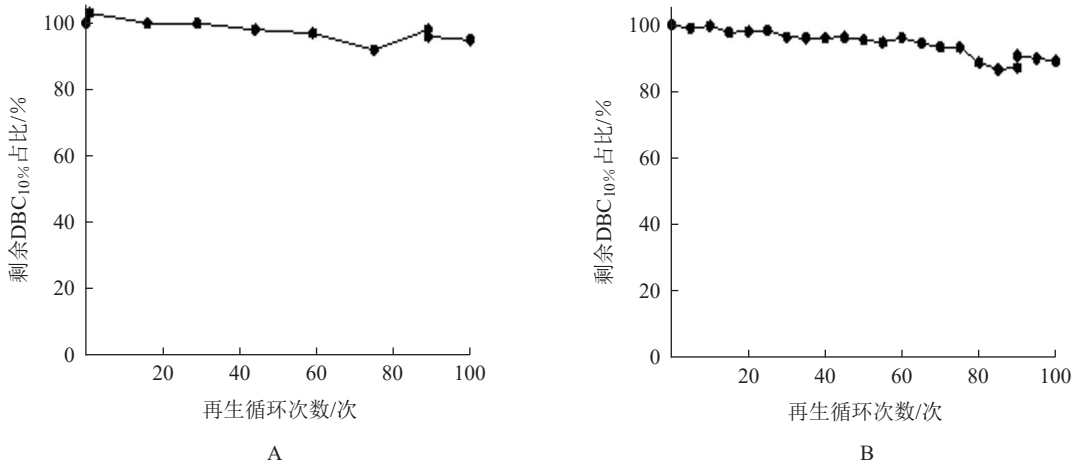
●—耐碱突变Protein L；■—原始Protein L。

图 6　100 mmol/L 氢氧化钠溶液在位清洗 50 次剩余 DBC10$_{\%}$

Fig.6　Remaining DBC$_{10\%}$ of 50 Times Clean in Place by 100 mmol/L Sodium Hydroxide Solution

到阈值时确定 Protein L 加入量为 60 mg/mL 填料、加入浓度 10 mg/mL。最后再对反应时间进行优化，可以降低反应时间提高固定化反应效率，最终选择反应 10 h，Protein L 键合可达到 14.5 mg/mL。

对本研究制备的 Protein L 进行耐碱性的评价，使用 100 mmol/L 氢氧化钠溶液在位清洗 50 次后其剩余 DBC$_{10\%}$仍保持 73.9%，而原始序列填料的对照组仅为 50.3%，说明对 Protein L 序列的突变不仅提升了其载量，其耐碱性也大幅度提升。又使用填料 Capto L 的碱清洁及耐碱性评价方法对自制 Protein L 填料在位清洗 100 次，剩余 DBC$_{10\%}$为 89.6%，仅略低于 Capto L 95%的水平，但自制 Protein L 具有初始载量优势，且可控制生产成本为在售价格的 18%～22%。因此该研究制备的 Protein L 不仅具有优异的耐碱性、载量，还具有较低的生产制备成本，为实现该填料的国产化奠定了基础。



A—Capto L；B—自制 Protein L。

图 7　15 mmol/L 氢氧化钠溶液在位清洗 100 次的剩余 DBC10$_{\%}$

Fig.7　Remaining DBC$_{10\%}$ of 100 Times Clean in Place by 15 mmol/L Sodium Hydroxide Solution

参考文献：

[1] DHAR S K, DAS M. Engineering Antibodies [J]. *J Indian Inst Sci*, 2018, **98**(1): 5-20.

[2] MEHTA D, CHIRMADE T, TUNGEKAR A A, *et al*. Cloning and expression of antibody fragment (Fab) Ⅰ: effect of expression construct and induction strategies on light and heavy chain gene expression [J]. *Biochem Eng J*, 2021, **176**: 108189.

[3] SPADIUT O, CAPONE S, KRAINER F, *et al*. Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments [J]. *Trends Biotechnol*, 2014, **32**(1): 54-60.

[4] NASCIMENTO A, PINTO I F, CHU V, *et al*. Studies on the purification of antibody fragments [J]. *Sep Purif Technol*, 2018, **195**: 388-397.

[5] GRODZKI A C, BERENSTEIN E. Antibody purifification: affifinity chromatography—protein A and protein G sepharose [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, **588**: 33-41.

[6] PALONI M, CAVALLOTTI C. Molecular modeling of the interaction of protein L with antibodies [J]. *ACS Omega*, 2017, **2**(10): 6464-6472.

[7] UROSEV G, TOM-YEW S A L, PRESTA L G, *et al*. Antigen-binding polypeptide constructs comprising kappa and lambda light chains and uses thereof: US, 11161915B2 [P]. [2021-11-02].

[8] GE Healthcare LifeSciences. Regulatory support file Capto™ L [EB/OL]. [2017-4-30]. www. cytivalifesciences. com. cn/zh/cn

[9] GUSTAV R, MATS A, TOMAS B. Cytiva Bioprocess R&D. Modified kappa light chain-binding polypeptides: US, 11136357B2 [P]. [2021-10-05].

[10] AHMAD I, NAWAZ N, DARWESH N M, *et al*. Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2018, **144**: 12-18.

[11] CUNNINGHAM B C, WELLS J A, OLSON K, *et al*. Human growth hormone variants: CA, 2230492C [P]. [2009-05-26].