

用Cellufine Phosphate精制T7RNA聚合酶

Cellufine是一种在圆球状多孔性纤维素粒子表面加上各种配体（官能基）的层析填料。广泛用于制造抗体医药、疫苗、蛋白质制剂等生物医药品。

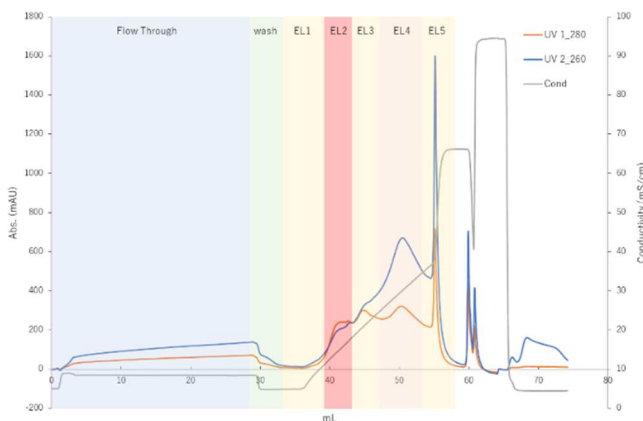
T7 RNA聚合酶是一种来源于T7 噬菌体的RNA合成酶，用于由模块化DNA产生mRNA。近年来，mRNA疫苗作为一种非常有名的新冠（COVID-19）疫苗，在mRNA疫苗的生产工序中，就会用到T7 RNA聚合酶。

Cellufine Phosphate是一种与核酸结合蛋白质具有亲和力的亲和层析介质。由于T7 RNA聚合酶是一种核酸结合蛋白质，因此可以用Cellufine Phosphate进行高效地精制。本文介绍的例子就是在大肠杆菌（pAR1219）中表达RNA聚合酶之后，再利用Cellufine Phosphate和Cellufine MAX DEAE(弱阴离子交换介质)精制其高纯度发酵液。利用Cellufine Phosphate这种亲和层析介质能够精制纯度极高的酶。

1. 利用 Cellufine MAX DEAE 进行粗精制

培养表达 T7 RNA 聚合酶（T7 RNAP）的重组大肠杆菌（来自 pAR1219），并通过 IPTG 进行诱导表达，获得含有 T7 RNAP 的培养液。用 PBS 清洗菌体后，加入 0.2 mg/mL 的溶菌酶，反复进行 3 次冻融，粉碎后制得溶菌产物。在溶菌中加进硫酸铵，使配比达到 35 % (w/v)，再在 4°C 的温度下搅拌一小时，经过离心分离后回收沉积物。

用平衡缓冲溶液（组成参照图 1）使该沉积物悬浊，将导电率调整到 10.0 mS/cm 以下，作为负载样品。将阴离子交换介质 Cellufine MAX DEAE 充填入色立柱中，装载样品。用氯化钠进行梯度洗脱洗脱（图 1）。回收洗脱洗脱液，并通过 SDS-PAGE 和酶活性测量确认 T7 RNAP 的活性，发现在洗脱洗脱馏分 2（EL2）上有 T7 RNAP 洗脱洗脱（数据见图 5）。



立柱条件

装载样品：硫酸铵沉淀 28.5 CV

用平衡缓冲溶液稀释到 10.0 mS/cm

立柱：1mL 微型立柱（6.7mm ID x 30 mm L, JNC 产品）

流速：0.5 mL/min（85 cm/h、滞留时间 2 分钟）

平衡缓冲溶液 (Eq.)：

10 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10 % glycerol, protease inhibitor (PMSF 10 µg/mL, benzamide 100 µM, bacitracin 10 µM)

溶出缓冲溶液：Eq. + 1 M NaCl

图 1 利用 Cellufine MAX DEAE 进行 T7 RNAP 粗精制

用红色标示的 EL2 馏分是 T7 RNAP 的区划。

在各洗脱洗脱区划中测量了蛋白质和 DNA 的洗脱洗脱量（图 2）。杂质 DNA 带负电荷，故与阴离子交换基（DEAE 基）产生强力的相互作用。因此在洗脱馏分的后半部分洗脱，并与大部分蛋白质分离。从而在 Cellufine MAX DEAE 的工序中，能从含有 T7 RNAP 的馏分中明显地分离出 DNA，减少 DNA 污染。

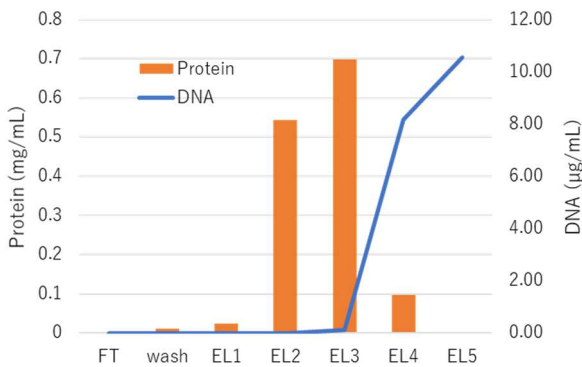


图 2 用 Cellufine MAX DEAE 去除 DNA

2. 用 Cellufine Phosphate 进行精制

用平衡缓冲溶液将 Cellufine MAX DEAE 工序中回收的洗脱馏分 EL2 进行 3 倍稀释，作为装载样品。然后使用 Cellufine Phosphate 进行立柱内的精制（图 3）。经过使用氯化钠进行梯度洗脱后，在洗脱馏分 2（以下称 P-EL2）上得到明显的峰值。对各馏分的酶活性值（酶活性/蛋白质量）和蛋白质量进行测量，结果如（图 4）所示。测量酶活性使用市售检测包（T7 RNA polymerase assay kit, ProFoldin）。1 unit（单位）定义为在 37°C 的温度下，用 1 小时能将 1 nmol ATP 吸收酸性不溶物的酶量。P-EL2 的酶活性值最高，杂质蛋白质已在 Flow through (FT) 区划中去除。与样品装载前相比，P-EL2 的酶活性值增高，由此可确认利用 Cellufine Phosphate 能够精制高纯度的 T7 RNAP。

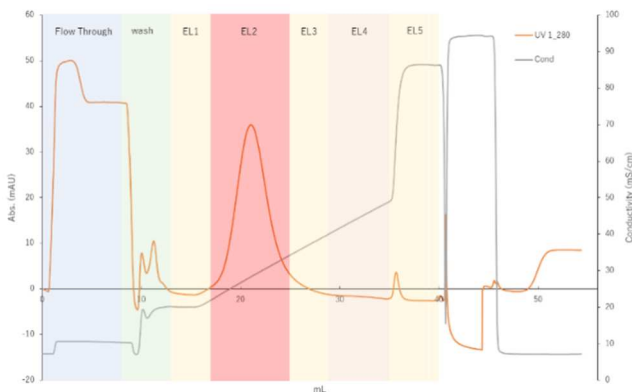


图 3 使用 Cellufine Phosphate 精制 T7 RNAP

用红色标示的 EL2 馏分上有 T7 RNAP 积聚。

立柱条件

装载样品：8 CV（使用平衡缓冲溶液进行 3 倍稀释）

立柱：1mL 微型立柱管（6.7mm ID x 30 mm L, JNC 产品）

流速：0.5 mL/min（85 cm/h、滞留时间 2 分钟）

平衡缓冲溶液 (Eq.):

10 mM potassium phosphate pH7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, protease inhibitor

洗脱缓冲溶液：Eq + 1 M NaCl

Fr.	酶活性 (Unit/protein)	酶活性 回收率(%)	蛋白质 回收率(%)
装载液	94043	100	100
通过(FT)	2763	1.8	59.8
P-EL2	267034	70.2	24.7

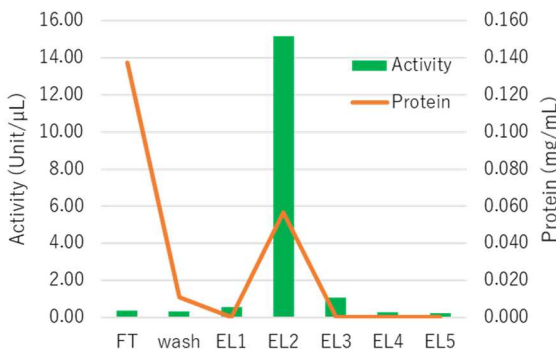


图 4 立柱内精制后的酶活性定量

使用 Cellufine Phosphate 在立柱内精制后的酶活性率和蛋白质回收率如表 1 所示。

表 1 各区划中 T7-RNAP 的回收率

从表中可知，洗脱馏分 P-EL2 上的 T7-RNAP 的活性为 70.2%，回收率很高，而蛋白质量已减少到 24.7%，由此可知杂质杂质杂质已被高效去除。

3. 立柱内精制后的纯度

利用从 Cellufine MAX DEAE 和 Cellufine Phosphate 的各精制工序中得到的馏分，然后用 SDS-PAGE 对精制进行评价（图 5）。每经过一个层析工序，杂质杂质就会被去除，而在用 Cellufine Phosphate 精制的阶段，精制得到的 T7 RNAP 纯度几乎达到单频带，非常高。在蛋白质印迹法中也能判断该单频带就是 T7 RNAP。

每经过一次层析工序，酶活性值就会上升。由此可知杂质蛋白质已被去除，可制得高纯度 T7 RNAP（表 2）。用 Cellufine Phosphate 在立柱内精制所得到的最终馏分样品所显示的酶活性值要高于市售的对照标准。以上结果表明，通过使用 Cellufine 的 2 步工序，能够精制得到高纯度的 T7 RNAP。

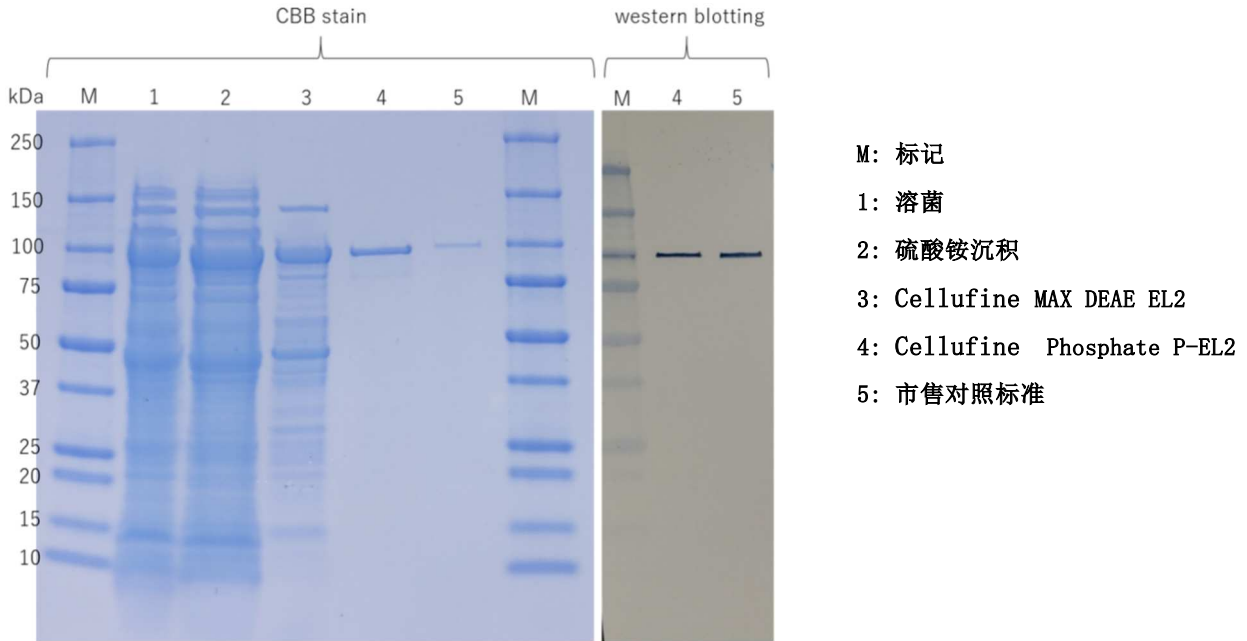


图 5 层析精制后的 T7 RNAP 的纯度

表 2 各个工序中的 T7 RNAP 酶活性

馏分	酶活性 (Unit/protein)
溶菌产物	24,011
硫酸铵沉积	34,296
MAX DEAE	66,741
Phosphate	267,034
市售对照标准	208,535

结语

自爆发 COVID-19 疫情以来，mRNA 医药作为疫苗的新形态得到了快速发展。mRNA 医药与普通的生物医药品不同，它是通过体外转录合成方式制备原药。因此，无需担心抗体医药中常见的内在病毒污染，从品质管理的角度来看，这使得其具有了传统生物医药品所不具备的优势。因此，通过生产 COVID-19 疫苗，mRNA 医药的制备技术得到快速的发展。而另一方面，其生产成本依然居高不下，且制备方法还需要不断改进。

T7-RNA 聚合酶是一种采用体外转录合成技术，用于由模块化 DNA 合成 mRNA 时的极为重要的 RNA 合成酶。T7-RNA 聚合酶一般是通过以大肠杆菌为宿主的发酵生产制备。因此必须去除源于大肠杆菌的内毒素、来自宿主和载体的 DNA 以及来自宿主的蛋白质等多种杂质，高纯度地精制 T7-RNA 聚合酶。

Cellufine 的系列产品中，Cellufine Phosphate 作为能够精制高纯度核酸结合蛋白质的亲和层析介质，已经上市销售。Cellufine Phosphate 在结构上是磷酸基与纤维素的 6 位氢氧基进行酯化反应的结合（图 6）。这种结构和核酸十分相近，因此非常适合用来吸附 T7-RNA 聚合酶一类核酸结合蛋白质。并且由于磷酸基还具有作为带负电荷的阳离子交换介质的作用，所以不会像内毒素一样使其吸附带负电荷的杂质。由于这种化学构造相当合理，因此可以实现以大肠杆菌为宿主的发酵液来高效率地精制蛋白质。

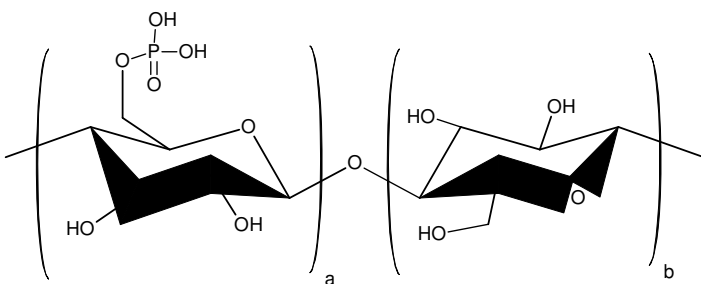


图 6 Cellufine Phosphate 的化学结构

6 位的 1 级氢氧基被置换成了磷酸酯基。由于它的结构近似于核酸，所以对核酸结合蛋白质具有亲和活性。

在本次所列举的例子当中，一开始是利用 Cellufine MAX DEAE 进行粗精制，然后用 Cellufine Phosphate 进行亲和精制，通过这两个阶段的层析工序精制出高纯度的 T7-RNA 聚合酶。利用大肠杆菌进行发酵生产时，宿主和载体的 DNA 会作为杂质存在。因 DNA 带负电荷，因此需通过阴离子交换层析进行精制。在本次研究中，在第一阶段的精制工序中采用了具有高吸附性、能以高流速进行通液的 Cellufine MAX DEAE。在经过 2 个层析工序后，再对酶活性进行评价，发现精制后的纯度要高于市场上销售的 T7-RNA 聚合酶。由此，我们可

以认为使用 Cellufine MAX DEAE 和 Cellufine Phosphate 分 2 个阶段进行精制，对高纯度地精制 T7-RNA 聚合酶非常有效。

mRNA 的体外转录合成，除了使用 T7-RNA 聚合酶以外，还可以使用焦磷酸酶、2 氧甲基转移酶、多聚腺苷酸聚合酶等多个种类的核酸结合蛋白质（图 7）。我们认为这些酶也能够适用于本次介绍的 2 个阶段精制。这些酶组对于 mRNA 医药合成非常重要，且高度可靠的精制工序将助于降低制备成本、缩短开发周期及稳定生产。

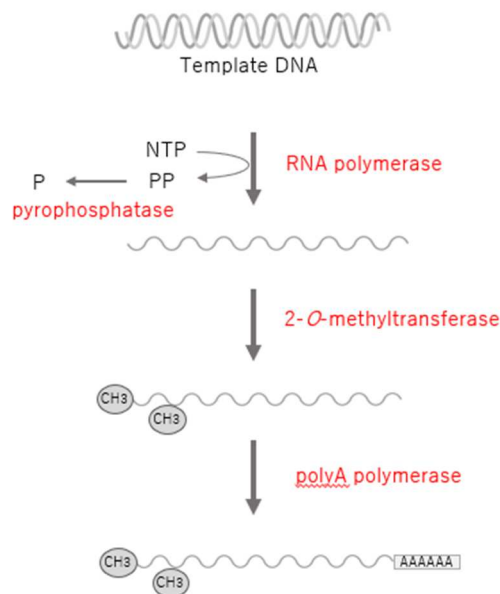


图 7 mRNA 的体外转录合成

产品信息介绍 产品相关详细信息请浏览本公司的主页。

Cellufine Phosphate

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-1-phosphate/>

Cellufine MAX DEAE

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/grade/grade-6/>

使用说明书和技术资料可从以下网页以 pdf 格式下载。

<https://www.jnc-corp.co.jp/fine/jp/cellufine/guide/>

下单说明

产品名	包装尺寸	产品目录 No.
Cellufine Phosphate	1ml x 5 (Mini-Column)	19551
	5ml x 1 (Mini-Column)	19515
	10ml	19524
	50ml	19545
	500ml	19546
	5 L	684 987 330
	10 L	684 987 335
Cellufine MAX DEAE	1ml x 5 (Mini-Column)	21000-51
	5ml x 5 (Mini-Column)	21000-55
	100ml	21000
	500ml	21001
	5 L	21002
	10 L	21003

各类咨询及技术相关说明

(北美 & 欧洲)

JNC America, Inc.
555 Theodore Fremd Ave,
Rye, NY 10580

Tel: 914-921-5400

Fax: 914-921-8822

Email: cellufine@jncamericany.com

(日本、亚洲、其他)

JNC 株式会社
生命化学事业部
邮编 100-8105
东京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町大楼 9 楼

Tel: 03 3243 6150

Fax: 03 3243 6219

Email: cellufine@jnc-corp.co.jp