

使用Cellufine Phosphate的T7 RNA聚合酶纯化

Cellufine是一种在圆球状多孔性纤维素粒子表面修饰各种配体（官能基）的层析填料。被用于制造抗体医药、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。近年来作为新型冠状病毒（COVID-19）疫苗备受瞩目的mRNA疫苗，其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具有亲和性的亲和层析介质。由于T7 RNA聚合酶是一种核酸结合蛋白质，因此可以用Cellufine Phosphate进行高效的纯化。本报告介绍了表达T7 RNA聚合酶的大肠杆菌（pAR1219）发酵液用硫酸铵沉淀后，利用Cellufine MAX DEAE(弱阴离子交换介质)、Cellufine Phosphate以及Cellufine ET Clean L进行高纯度纯化的案例。其中，Cellufine Phosphate被用于去除杂质，能够纯化出高纯度的酶。此外，通过使用Cellufine ET Clean L，还能够高效去除残留的大肠杆菌内毒素。

1. 使用 CellufineMAX DEAE 进行粗纯化

培养表达 T7 RNA 聚合酶（T7 RNAP）的重组大肠杆菌（源自 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。在溶菌产物中加入硫酸铵，使配比达到 35 % (w/v)，再在 4℃ 的温度下搅拌一小时，经过离心分离后回收沉积物。

用平衡缓冲液（组分参照图 1）使该沉积物悬浊，将导电率调整到 10.0 mS/cm 以下，作为上样样品。将阴离子交换介质 Cellufine MAX

DEAE 填充入预装柱中，加入样品。用氯化钠进行梯度洗脱。（图 1）。回收洗脱液，并通过 SDS-PAGE 及酶活性测定法测定各馏分的蛋白质和 DNA 的洗脱量以及 T7 RNAP 的活性（图 2）。酶活性是使用市售试剂盒（T7 RNA polymerase assay kit, ProFoldin）进行测定的。1 unit 被定义为 37℃ 下在 1 小时内能够将 1 nmol ATP 掺入酸性不溶物中的酶量。成为杂质的 DNA 带负电荷，故与阴离子交换基（DEAE 基）间产生强相互作用。因此在洗脱馏分的后半部分洗脱，并与大部分蛋白质分离。

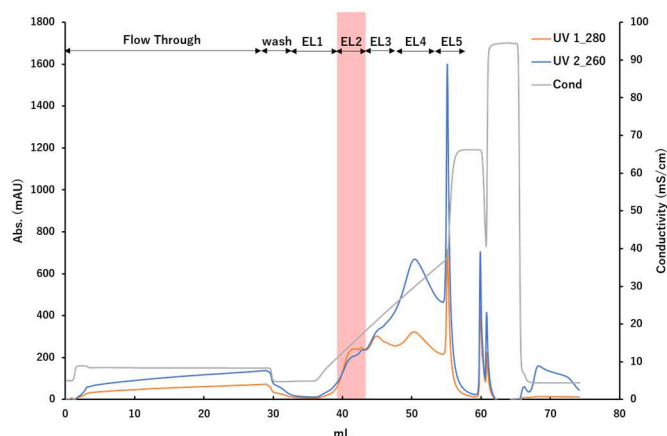


图 1 使用 CellufineMAX DEAE 进行 T7 RNAP 粗纯化

用红色标示的 EL2 馏分是 T7 RNAP 的部分。

T7 RNAP 的活性在洗脱馏分 EL2 时最高。EL4-5 时也显示了活性，但这是因为测定原理上核酸被非特异性检测，同时由于蛋白质数量较少，可以认为 T7 RNAP 和 DNA 已经分离出来。

因此，在 CellufineMAX DEAE 的工序中，能从含有 T7 RNAP 的馏分中明确地分离出 DNA，减少 DNA 污染。

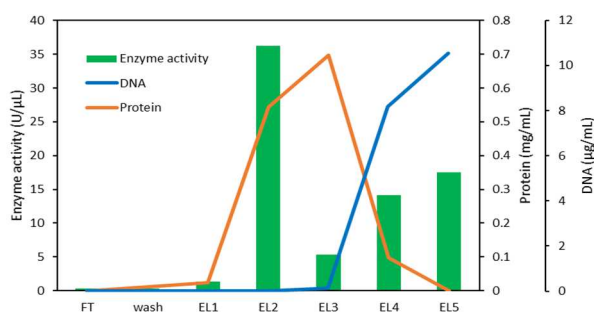


图 2 使用 Cellufine MAX DEAE 去除 DNA

预装柱条件

上样量: 28.5CV (使用平衡缓冲液溶解, 使培养液硫酸铵沉淀物达到 10.0 mS/cm)

预装柱: 1 mL 迷你预装柱 (6.7 mm 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, benzamidine 100 μM, bacitracin 10 μM)

洗脱缓冲液: Eq. + 1 M NaCl

2. 用 Cellufine Phosphate 进行纯化

用平衡缓冲液 (见图 3) 将 CellufineMAX DEAE 工序中回收的洗脱馏分 EL2 进行 3 倍稀释的溶液作为上样样品, 使用 Cellufine Phosphate 进行预装柱纯化 (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。图 3 中叠加显示了对各馏分进行酶活性值 (酶活性/蛋白质质量) 测定的结果。P-EL2 中的酶活性值最高, 杂质蛋白质已在 Flow through (FT) 部分被去除。

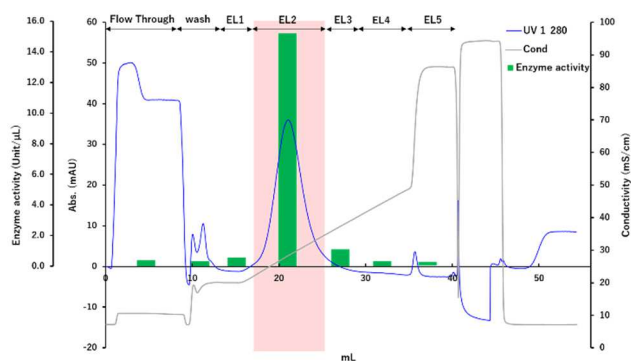


图 3 使用 Cellufine Phosphate 进行 T7 RNAP 的纯化

用红色标示的 EL2 馏分上有 T7 RNAP 积聚。

表 1 各部分中 T7 RNAP 的回收率

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

使用 Cellufine Phosphate 在预装柱内纯化后的酶活性/回收率和蛋白质回收率如表 1 所示。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。蛋白质质量已减少到 24.7%，由此可知杂质已被高效去除。此外，P-EL2 的酶活性值高于上样前，因此证实了 T7 RNAP 可以使用 Cellufine Phosphate 进行高纯度纯化。

预装柱条件

上样量：8 CV（使用平衡缓冲液进行 3 倍稀释）

预装柱：1 mL 迷你预装柱（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

洗脱缓冲液：Eq + 1 M NaCl

3. 预装柱纯化后的纯度

利用从 CellufineMAX DEAE 和 Cellufine Phosphate 的各纯化工序中得到的馏分，然后用 SDS-PAGE 进行纯化度评价（图 4）。每经过层析的各工序，杂质就会被去除，而在 Cellufine Phosphate 阶段，高纯度的 T7 RNAP 被纯化到几乎成为单条带。在蛋白质印迹发中也能判断该单条带就是 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，能够将 T7 RNAP 进行高纯度纯化（表 2）。使用 Cellufine Phosphate 在预装柱内纯化得到的最终馏分样品所显示的酶活性值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，能够制得高纯度的 T7 RNAP。

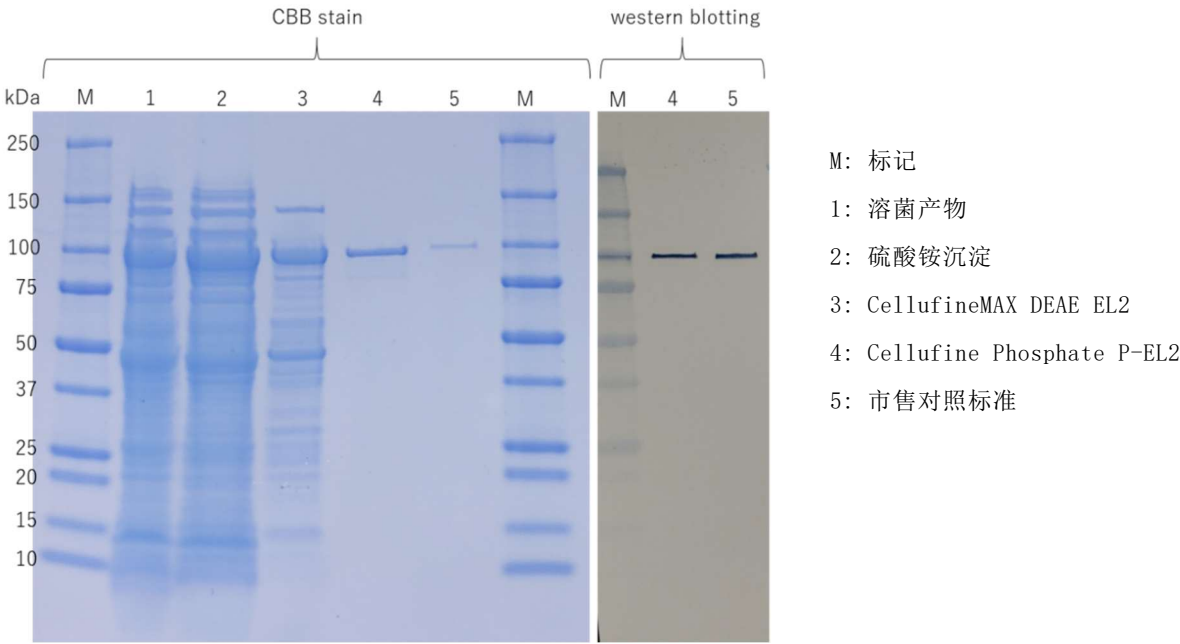


图 4 层析纯化后的 T7 RNAP 的 SDS-PAGE 纯度确认

表 2 各个工序中的 T7 RNAP 酶活性

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

4. 蛋白酶、核酸酶的去活性

在 T7 RNAP 纯化过程中，分解蛋白质的蛋白酶和分解核酸的核酸酶（RNase, DNase）是需要去除的杂质。通过分析 Cellufine Phosphate 纯化后的洗脱部分评估了各种酶的活性。

首先，测定了 Cellufine Phosphate 纯化前后蛋白酶活性随时间的变化，结果如图 5 所示。活性是使用试剂盒（Amplite Universal Fluorimetric Protease Activity Assay Kit Green, AAT Bioquest）进行测定的。在纯化前（Load）阶段，随着时间的推移，蛋白酶活性逐渐增加；而在纯化后（Elution）阶段，活性基本保持在一个稳定的水平，表明蛋白酶已经被成功去除。

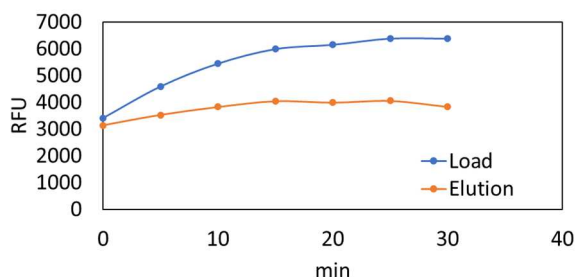


图 5 Cellufine Phosphate 纯化前后的蛋白酶活性

测定了 Cellufine Phosphate 纯化前后 RNase 活性随时间的变化，结果如图 6 所示。活性是使用试剂盒（RNaseAlert Lab Test Kit, Applied Biosystems）进行测定的。与蛋白酶一样比较了纯化前后的活性，结果显示纯化后的酶

活性几乎没有随时间变化，并且与阴性对照组中使用的 RNase-free 水相当，因此判断 RNase 已被成功去除。

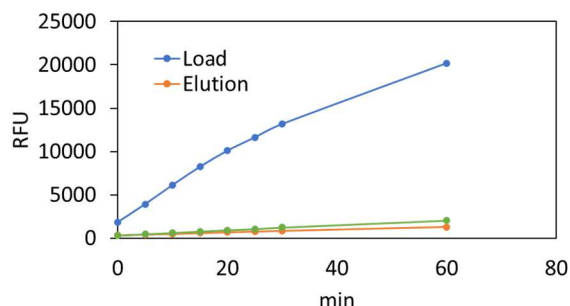


图 6 Cellufine Phosphate 纯化前后的 RNase 活性

Cellufine Phosphate 纯化前后的 DNase 活性是按以下步骤进行评估的。首先，制备了含性有 T7 RNAP 250U 和 λ DNA 10 μ g 的 500 μ L 溶液。准备了一个仅包含 λ DNA 的阴性对照（NC）样品以及一个添加了 0.2 U/ μ L DNase I 以达到阳性对照（PC）浓度的样品。调整好的溶液在 37°C 下孵育 16 小时。然后，通过琼脂糖凝胶电泳检测处理过的样品中的 DNA。结果如图 7 所示。含有 DNase 的样品会导致 λ DNA 降解，因此像阳性对照样品一样，带状消失。纯化前

（Load）样品与阳性对照样品一样， λ DNA 的带状消失，而纯化后（Elution）样品与阴性对照样品和市售产品一样，带状仍然存在。因此可以判断 DNase 也已被成功去除。

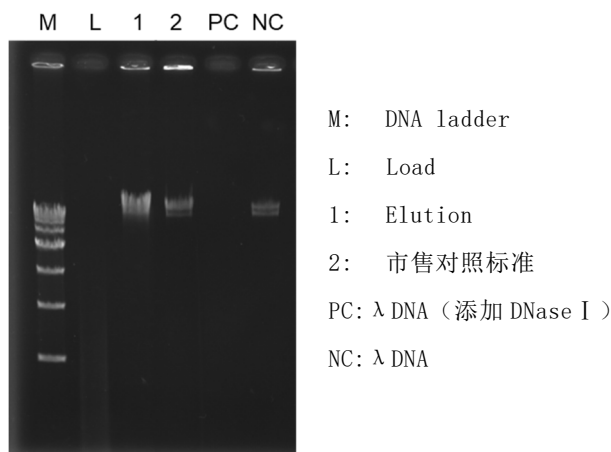


图 7 Cellufine Phosphate 纯化前后的 DNase 活性

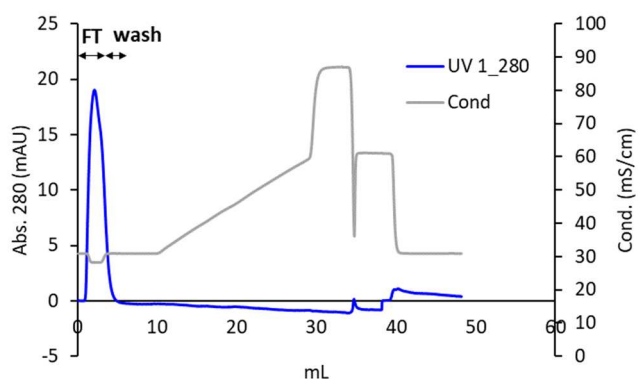
5. 使用 CellufineET Clean L 进行内毒素去除的研究

由于 T7 RNAP 是由重组大肠杆菌产生的，因此无法避免在提取的菌液中含有内毒素。测量 Cellufine Phosphate 纯化前后的内毒素含量的结果显示可以去除近 97% 的内毒素，但仍留有一定数量的内毒素（表 3）。内毒素含量是通过 Endosafe nexgen-PTS (Charles River) 进行测定的。因此，我们使用选择性吸附内毒素的 Cellufine ET Clean L 进行了去除研究。

表 3 Cellufine Phosphate 纯化前后的内毒素量

Fr.	内毒素量 (EU/mL)
上样	7691
洗脱	222

首先，使用 Cellufine Phosphate 纯化后的洗脱液，尝试通过流穿模式回收 T7 RNAP 并吸附内毒素以实现纯化（图 8）。从 UV 峰的表现来看，可以推测 T7 RNAP 在流穿部分中被洗脱出来。表 4 显示了内毒素的去除性和 T7 RNAP 的活性测定结果。在含有 UV 峰的馏分 FT 和 wash 中，根据酶活性计算得到的 T7 RNAP 回收率总共达到 74.6%，这表明目标物质可以通过流穿回收，并反映在色谱图结果中。内毒素量以浓度 (EU/mL)、单位量 (EU)、每单位酶活性的内毒素量 (mEU/unit) 以及通过 Bradford 法测定的每单位蛋白质的内毒素量 (EU/μg) 的值表示。无论是在哪个定量值中，与纯化前相比，馏分 FT 和 wash 中所含的内毒素量明显下降，并且在该工序中成功吸附并除去了 96.4% 的内毒素（表 4）。



预装柱条件

上样样品: 2 CV (Cellufine Phosphate 洗脱)
 预装柱: 1mL 迷你预装柱 (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)
 平衡缓冲液 (Eq.):
 10 mM potassium phosphate pH7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT
 洗脱缓冲液: Eq + 1 M NaCl

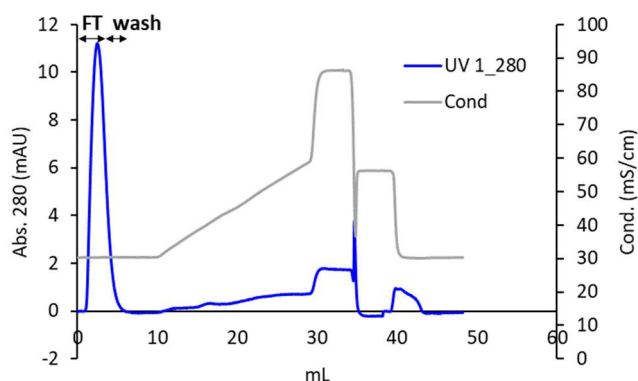
图 8 通过使用 Cellufine ET Clean L 去除 T7 RNAP 中的内毒素（磷酸缓冲液类）

表 4 Cellufine ET Clean L 纯化前后的内毒素量（磷酸缓冲液类）

	内毒素					T7 RNAP
	EU/mL	EU	去除率 (%)	mEU/unit	EU/μg	回收率 (%)
Load	151	302	—	5.14	2.14	—
FT	2.89	7.23	—	0.32	0.10	40.7
wash	1.75	3.50	—	0.19	0.05	33.9
Total (FT+wash)	2.38	10.7	96.4	0.26	0.07	74.6

其次，为了验证通过 Cellufine ET Clean L 纯化时缓冲液类型的影响，我们尝试用 Tris 缓冲液对经过 Cellufine Phosphate 纯化后的洗脱馏分进行透析置换纯化（图 9）。透析使用透析膜，其透过极限分子量为 3000MW，以 100 倍量的平衡缓冲液在 4℃ 下进行 2 次，每次持续 1 小时，并在最后一次透析后过夜置换，然后回收作为上样液。与图 8 的结果一样，图 9 中的流穿部分显示了 UV 峰。根据表 5 中所示的内毒素去除性和 T7 RNAP 的活性测定结果，酶的回收率在馏分 FT 和 wash 方面总共达到 99.3%，结

果良好。无论在任何定量值上，内毒素的去除性都比磷酸缓冲液类更高，显示出 99% 以上的去除性。因缓冲液类型造成这种差异的原因，可能是 Cellufine ET Clean L 的离子交换基与磷酸离子缓冲液具有相反的电荷，因此磷酸离子会通过吸附抑制内毒素或通过离子交换引起的 pH 扰动来产生影响。尽管如此，它仍然显示了 96.4% 的去除率，这表明可以直接使用上一工序的洗脱液，这是它的一个优点。



预装柱条件

上样样品: 2 CV (利用平衡缓冲液透析后)

预装柱: 1mL 迷你预装柱 (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)

平衡缓冲液 (Eq.):

10 mM Tris-HCl pH7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT

洗脱缓冲液: Eq + 1 M NaCl

图 9 通过使用 Cellufine ET Clean L 去除 T7 RNAP 中的内毒素 (Tris 缓冲液类)

表 5 Cellufine ET Clean L 纯化前后的内毒素量 (Tris 缓冲液类)

	内毒素					T7 RNAP
	EU/mL	EU	除去率 (%)	mEU/unit	EU/μg	回收率 (%)
Load	134	268	—	11.0	3.46	85.8*
FT	0.30	0.75	—	0.07	0.02	46.5
wash	0.15	0.30	—	0.02	0.01	52.8
Total (FT+wash)	0.23	1.05	99.6	0.04	0.01	99.3

*透析时的回收率

上述结果表明, 通过使用 Cellufine ET Clean L 以流穿模式纯化 Cellufine Phosphate 洗脱液, 最多可以去除 99.6% 的内毒素。即使直接使用洗脱液并用相同的缓冲液类进行纯化, 也可以实现一定程度的去除, 如果需要更高程度的去除, 则建议将其替换成 Tris 缓冲液。

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等，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 聚合酶在体外转录合成中，是由模块化 DNA 合成 mRNA 时所使用的极为重要的 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，需要从源自大肠杆菌的内毒素、源自宿主和载体的 DNA、源自宿主的蛋白质等许多杂质中高纯度地纯化 T7 RNA 聚合酶。

Cellufine 的系列产品中，Cellufine Phosphate 作为能够高纯度纯化核酸结合蛋白质的亲和层析介质，已在市面销售。Cellufine Phosphate 具有磷酸基与纤维素 6 位羟基形成酯键的结构（图 10）。由于这种结构类似于核酸，因此可以有效吸附像 T7 RNA 聚合酶这样的核酸结合蛋白质。此外，磷酸基具有作为带负电荷的阳离子交换介质的功能，因此不会像内毒素那样吸附带负电荷的杂质物质。通过这种合理的化学结构，可以从以大肠杆菌为宿主的发酵液中实现高效的蛋白质纯化。

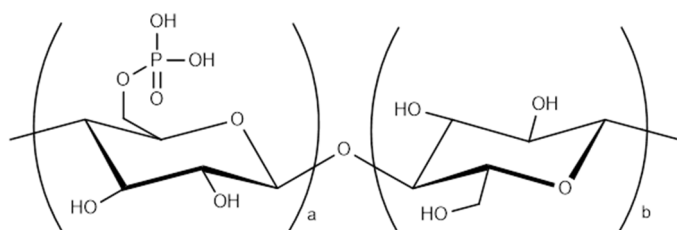


图 10 Cellufine Phosphate 的化学结构

6 位的 1 级羟基被替换成了磷酸酯基。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，一开始是使用 CellufineMAX DEAE 进行粗纯化，然后用 Cellufine Phosphate 进行亲和纯化，再用 CellufineET Clean L 去除内毒素，是经过这三个阶段的层析工序纯化出高纯度的 T7 RNA 聚合酶。利用大肠杆菌进行发酵生产时，源自宿主和载体的 DNA 会作为杂质存在。由于 DNA 带负电荷，因此需通过阴离子交换层析进行纯化。为此，在本次研究中，在第一阶段的纯化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。在经过使用 Cellufine Phosphate 的层析工序后，

再对酶活性进行评价，发现纯化后的纯度要高于市场上销售的 T7-RNA 聚合酶。另外，还确认到可以降低蛋白酶和核酸酶等酶类的活性。宿主大肠杆菌产生的内毒素也能够去除近 97%，但使用 CellufineET Clean L 可以进一步提高去除效率。这些结果表明，通过 CellufineMAX DEAE、Cellufine Phosphate 和 CellufineET Clean L 进行的三步纯化对 T7 RNA 聚合酶的高纯度纯化非常有效。

mRNA 的体外转录合成，除了 T7 RNA 聚合酶外，还使用了磷酸酶、2 氧甲基转移酶、多聚腺苷酸聚合酶等多种核酸结合蛋白质（图 11）。我们认为这些酶也能够适用于本次介绍的两步纯化法。这些酶组对于 mRNA 医药合成非常重要，且高度可靠的纯化工序将有助于降低制备成本、缩短开发周期及稳定生产。

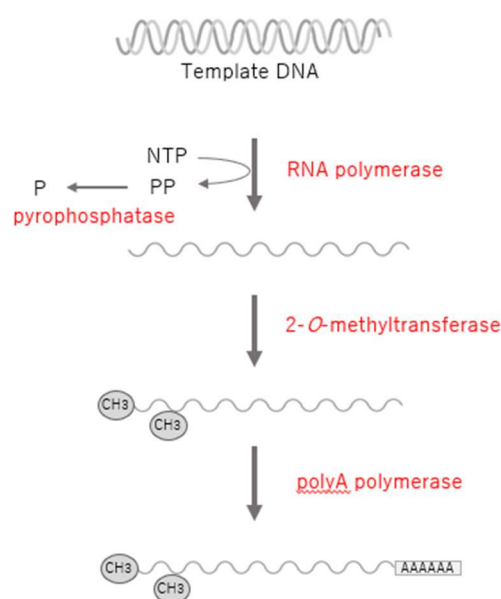


图 11 mRNA 的体外转录合成

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/>

CellufineMAX DEAE

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

CellufineET クリーン L

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

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/>

订购说明

产品名称	包装尺寸	目录编号
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
Cellufine ET clean L	1ml x 5 (Mini-Column)	20051
	5ml x 1 (Mini-Column)	20015
	10ml	681 984 324
	50ml	681 984 326
	500ml	681 984 328

关于各种咨询和技术的说明

(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