

# 白喉毒素突变体 CRM197 在大肠杆菌中的高效可溶表达、纯化及免疫原性分析

房婷<sup>1</sup>, 陶正红<sup>2</sup>, 刘艳红<sup>1</sup>, 于长明<sup>1</sup>, 职睿智<sup>1</sup>, 于蕊<sup>1</sup>

1 军事医学科学院 生物工程研究所, 北京 100071

2 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100083

房婷, 陶正红, 刘艳红, 等. 白喉毒素突变体 CRM197 在大肠杆菌中的高效可溶表达、纯化及免疫原性分析. 生物工程学报, 2018, 34(4): 561-568.

Fang T, Tao ZH, Liu YH, et al. Expression, purification and characterization of diphtheria toxin mutant CRM197 in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2018, 34(4): 561-568.

**摘要:** CRM197 (Cross-reacting material 197) 是白喉毒素的无毒突变体, 在生物制药领域具有非常广泛的应用前景。为了实现 CRM197 在大肠杆菌中的无标签、可溶表达, 以替代现有昂贵、复杂的白喉杆菌分泌发酵工艺, 文中对目的蛋白的序列进行优化, 转化大肠杆菌经 IPTG 诱导, 目的蛋白获得了可溶性高表达, 目的蛋白约占碎菌上清总蛋白的 40%。超声破菌后、经阴离子交换、肝素亲和以及脱盐三步柱上层析获得纯度高于 95% 的 CRM197 样品。细胞毒性实验证明, CRM197 的 IC<sub>50</sub> 值是白喉毒素 IC<sub>50</sub> 值的 2.1×10<sup>7</sup> 倍, 是白喉类毒素 IC<sub>50</sub> 值的 9.6 倍, 表明文中表达的 CRM197 是安全无毒的。随后, 比较高、低剂量的 CRM197 在小鼠体内的免疫原性, 发现 2 μg 组三免后的抗体滴度与 20 μg 组的相当, 可达 1:409 600。文中建立了 CRM197 的无标签、高效、可溶表达的大肠杆菌表达系和快速纯化体系, 获得了具有较好免疫原性和安全性的重组蛋白, 为该蛋白的进一步应用奠定了基础。

**关键词:** 白喉毒素突变体, 无标签可溶性表达, 纯化, 毒性试验, 免疫原性

## Expression, purification and characterization of diphtheria toxin mutant CRM197 in *Escherichia coli*

Ting Fang<sup>1</sup>, Zhenghong Tao<sup>2</sup>, Yanhong Liu<sup>1</sup>, Changming Yu<sup>1</sup>, Ruizhi Zhi<sup>1</sup>, and Rui Yu<sup>1</sup>

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 Department of Biology and Medicine, Beijing City University, Beijing 100083, China

**Abstract:** CRM197 (cross-reacting material 197), a non-toxic mutant of diphtheria toxin, has wide application potential in biopharmaceuticals. However, it is difficult to express CRM197 in bacteria other than *Corynebacterium diphtheriae*. Here we

**Received:** August 28, 2017; **Accepted:** October 27, 2017

**Supported by:** Major Project of National Science and Technology on New Drug Creation and Development (No. 2013ZX10004001), 2016 annual Graduation Practice Training Program of Beijing City University.

**Corresponding author:** Rui Yu. Tel: +86-10-66948868; E-mail: yurui1102@139.com

国家科技重大专项——重大新药创制 (No. 2013ZX10004001), 北京城市学院 2016 年度实培计划项目资助。

proposed a new alternative method to produce soluble CRM197 without label in *Escherichia coli*. In particular, a synthetic gene coding for CRM197, optimized for *E. coli* codon usage, was cloned in the pET32a (+) vector. Accordingly, the over-expression of the protein was simply induced with IPTG in *E. coli* BL21 (DE3). The target protein was soluble and accounted for about 40% of the total protein in the supernatant. Following an ultrasonic cytolysis step, the recombinant protein was purified by anion exchange, affinity and desalting chromatography and the purity of the final preparation reached 95%. Cytotoxicity tests showed that the  $IC_{50}$  value of CRM197 was  $2.1 \times 10^7$  times the  $IC_{50}$  value of diphtheria toxin, and 9.6 times the  $IC_{50}$  value of diphtheria toxoid, telling that the target protein is safe and non-toxic. Subsequently, we found that both the high dose (20  $\mu\text{g}$ ) and the low dose (2  $\mu\text{g}$ ) of CRM197 were equally efficient in inducing an immune response against diphtheria toxoid in mice, and the antibodies titer of mice after three immunizations with low dose could reach 1:409 600. In conclusion, our findings provide a highly efficient strategy for the rapid production and purification of unlabeled and soluble recombinant CRM197 in *E. coli*, with good immunogenicity and safety.

**Keywords:** diphtheria toxin mutant, no label soluble expression, purification, toxicity test, immunogenicity

CRM197 蛋白是白喉毒素 (Diphtheria toxin, DT) 的突变体, 由于其第 52 位氨基酸 Gly 突变为 Glu, 使其丧失了 ADP-核糖转移酶活性, 从而失去细胞毒性<sup>[1]</sup>。但 CRM197 仍然具有 DT 的完整功能结构, 从而保留其免疫原性, 且不存在传统白喉类毒素制备需要甲醛脱毒处理、组分不均一以及可能恢复毒性等缺点, 而有望成为重组白喉疫苗的有效成分<sup>[2-3]</sup>。此外 CRM197 可以作为多糖疫苗的载体蛋白, 能有效提高多糖抗原的免疫原性, 而广泛用于疫苗开发领域<sup>[4-6]</sup>。目前已有多种以 CRM197 为载体的多糖疫苗上市, 包括武田 B 型流感嗜血杆菌 (Hib) 疫苗 VaxemHibT<sup>TM</sup> (Takeda)、C 群脑膜炎疫苗 Meningitec<sup>TM</sup> 和 Menjugate<sup>TM</sup> (Nuron)、四价脑膜炎球菌 ACWY 多糖结合疫苗 Menveo<sup>TM</sup> (Nuron) 以及针对肺炎球菌的 7 价疫苗 Prevnar<sup>TM</sup> 和 13 价疫苗 Prevnar 13<sup>TM</sup> (Pfizer)。同时有研究发现 CRM197 具有抑制肿瘤细胞增殖和迁移的作用, 可作为肿瘤抑制剂开发为新型抗肿瘤药物<sup>[7-9]</sup>。

本研究通过对 CRM197 的序列进行优化, 实现了目的蛋白在大肠杆菌中无标签、高效、可溶表达。通过对纯化步骤进行一系列的摸索与优化, 搭建了可以工业放大的快速纯化体系, 并对其毒性和免疫原性开展了初步研究, 为该蛋白的进一步应用打下了坚实的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

质粒 pET-32a(+) 购自 Novagen 公司。感受态细菌 *Escherichia coli* Top10、*E. coli* BL21(DE3) 购自天根公司。

#### 1.1.2 主要材料和仪器

限制性内切酶购自 NEB 公司; Pyrobest DNA 聚合酶、*ExTaq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 OMEGA 公司。PageRuler Prestained Protein Ladder 购自 Thermo 公司。蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司。化学发光试剂盒购自 Millipore 公司。兔抗白喉类毒素多克隆抗体和 HRP 标记羊抗兔 IgG 购自 Abcam 公司。

HiTrap Q Sepharose FF 预装柱 (CV=5 mL)、HiTrap Heparin HP 预装柱 (CV=5 mL)、HiPrep 26/10 Desalting 预装柱 (CV=53 mL) 均购于 GE Healthcare 公司。酵母提取物、胰蛋白胨为 OXOID 公司产品, 其余为国产或进口分析纯试剂。

低温高速离心机购自 Beckman Coulter 公司。SDS-PAGE 电泳仪为 BIO-RAD 公司产品。Image Quant LAS 4000 mini 成像系统和纯化仪 ÄKTA

avant 均为 GE Healthcare 公司产品。酶标仪 Spectra Max Paradigm 为 Molecular Devices 公司产品。

### 1.1.3 实验动物

6-8 周龄雌性 BALB/c 小鼠来自本院实验动物中心。

## 1.2 方法

### 1.2.1 CRM197 的序列优化

根据白喉毒素序列 (GenBank Accession No. K01722.1), 分析编码 CRM197 的序列进行优化。用大肠杆菌常用密码子替换稀有密码子, 并平衡 A、T、G、C 四种碱基的比例和分布。在 CRM197 序列的 5'端和 3'端分别加入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 并在起始密码子前加入 UAA 终止密码子以终止载体 pET32a (+) 上 Trx 蛋白的表达, 委托北京博迈德基因技术有限公司进行全基因合成。

### 1.2.2 CRM197 表达载体构建

将优化合成后的 CRM197 基因用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后, 接入同样双酶切后的表达载体 pET32a (+) 上, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 37 °C 培养过夜。次日挑取单克隆于 5 mL LB (Amp<sup>+</sup>) 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 12 h, 提取质粒, *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定目的基因的插入, 并送测序。测序正确的质粒命名为 pET32a(+)-CRM197。

### 1.2.3 CRM197 在大肠杆菌中的表达

将重组表达质粒 pET32a(+)-CRM197 转化至感受态 *E. coli* BL21 (DE3), 挑取单克隆于 5 mL LB (Amp<sup>+</sup>) 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至  $OD_{600} \approx 0.6$  时, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 28 °C、220 r/min 继续培养 6 h。6 163 r/min、4 °C 离心收集菌体, 用 PBS 重悬后超声碎菌。12 000 r/min、4 °C 离心取上清, 进行 SDS-PAGE, 以空载体表达产物为对照, 鉴定 CRM197 蛋白的表达情况。

### 1.2.4 Western blotting 鉴定

将含有 CRM197 蛋白的超声碎菌上清及空载体碎菌上清进行 SDS-PAGE 后, 蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用含 3% BSA 的 PBST 室温封闭 1 h 后, 加入 1:1 000 稀释的兔抗白喉类毒素多克隆抗体, 37 °C 反应 1 h。将膜用 PBST 洗涤 4 遍后, 加入 1:5 000 稀释的辣根酶标记的羊抗鼠 IgG 二抗, 37 °C 反应 1 h 后 PBST 洗涤 4 遍, 采用化学发光法显色、压片和曝光。

### 1.2.5 CRM197 阴离子交换

将 pET32a(+)-CRM197/BL21(DE3) 按上述发酵条件扩大培养到 1 L, 收集菌体, 按菌体湿重 (g) 与缓冲液体积 (mL) 为 1:20 重悬于缓冲液 A (20 mmol/L Tris, 0.5 mmol/L EDTA, 5% 甘油, pH 8.0)。超声破菌后, 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集上清。采用 HiTrap Q Sepharose FF 预装柱 (CV=5 mL), 流速为 5 mL/min, 缓冲液 A 平衡 5 CV 后上样, 收集流穿, 缓冲液 B (20 mmol/L Tris, 1 mol/L NaCl, pH 8.0) 100% 缓冲液 B、10 CV, 洗脱杂蛋白。

### 1.2.6 肝素亲和层析

采用肝素亲和层析柱 HiTrap Heparin HP 预装柱 (CV=5 mL) 对样品进行精纯, 缓冲液 C (20 mmol/L Tris, pH 8.0)、缓冲液 D (20 mmol/L Tris, 1 mol/L NaCl, pH 8.0), 流速为 5 mL/min, 梯度洗脱, 60% D、10 CV 收集目的蛋白峰。

### 1.2.7 脱盐换液

采用 HiPrep 26/10 Desalting 预装柱 (CV=53 mL), 缓冲液 E (20 mmol/L PB, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.2), 流速为 15 mL/min, 每次上样量 15 mL, 更换缓冲液, 收集目的蛋白。

### 1.2.8 毒性试验

将 Vero 细胞消化后进行细胞计数, 调整细胞浓度为  $1.25 \times 10^5$  个细胞/mL, 将细胞悬液加入到 96 孔培养板中, 100  $\mu$ L/孔。白喉毒素首孔从 5 ng/mL 开始倍比稀释, 依次加入到含有细胞的培养板中,

100  $\mu\text{L}$ /孔；白喉类毒素和 CRM197 蛋白首孔从 0.25 mg/mL 开始倍比稀释，依次加入到含有细胞的培养板中，100  $\mu\text{L}$ /孔。加入毒素、类毒素和 CRM197 蛋白的 Vero 细胞培养板继续于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  孵箱中培养 6–7 d，采用 MTT 法观察细胞的存活情况，用酶标仪在 490 nm 测定吸光值，参比波长 620 nm。用 GraphPad Prism 5.01 软件计算各组的  $\text{IC}_{50}$ 。

### 1.2.9 免疫原性检测

将不同剂量的 CRM197 蛋白 2  $\mu\text{g}$ /只和 20  $\mu\text{g}$ /只，采用腹部皮下方式免疫 6–8 周龄 BALB/c 小鼠，每 3 周免疫 1 次，共免疫 3 次，均采用氢氧化铝佐剂，每次免疫后 3 周、下一次免疫前取血检测血清中的抗体滴度；抗体滴度的测定采用 ELISA 的方法，白喉类毒素 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，100  $\mu\text{L}$ /孔包被 96 孔酶联板，4  $^{\circ}\text{C}$  包被过夜。PBST 洗涤 4 次，5 min/次。将抗血清用 PBST 从 1:100 依次倍比稀释后，加入酶联板中，37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h，同时设 PBS 免疫后的血清为对照。PBST 洗涤 4 次，5 min/次。加入 HRP-抗小鼠二抗，37  $^{\circ}\text{C}$  反应 30–40 min。加入 TMB 显色液，50  $\mu\text{L}$ /孔，显色后用 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止，酶标仪 450 nm 测定光吸收值。以加入阴性

对照血清孔的显色值为对照，以  $OD_{450}$  大于 0.1 且高于阴性孔 2 倍为阳性稀释滴度。

## 2 结果与分析

### 2.1 CRM197 序列优化及载体构建

构建 CRM197 表达载体 pET32a(+)-CRM197 (图 1) 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ，用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定，结果显示，该重组质粒酶切后产生一条约 1 600 bp 的条带 (图 1B 箭头所示)，与目的基因片段大小一致，测序结果 (序列略) 表明此片段与设计的 CRM197 基因序列完全相同。

### 2.2 可溶性表达分析

将构建好的质粒 pET32a(+)-CRM197 转化入大肠杆菌 BL21 (DE3)，IPTG 诱导表达，收集菌体超声后，取上清，以空白载体为对照进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。从图 2 可以看出，与空载体对照相比，转化有 pET32a(+)-CRM197 质粒的菌株在 58 kDa 左右有明显的条带。Western blotting 结果证实该蛋白可与鼠抗白喉类毒素多克隆抗体发生特异性结合。目的条带用凝胶灰度扫描显示重组蛋白可占菌体总蛋白的 40% 以上，说明 CRM197 蛋白在大肠杆菌中得到了高效可溶性表达。

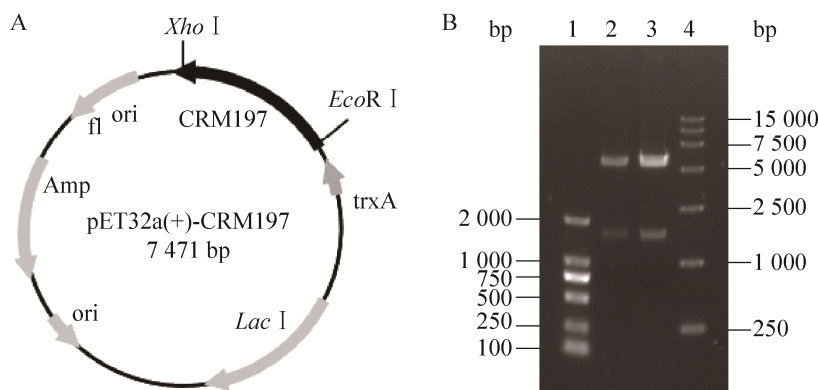


图 1 CRM197 表达载体的构建及酶切鉴定

Fig. 1 Construction and characterization of CRM197 expression plasmid. (A) Diagram of pET32a(+)-CRM197 expression plasmid. (B) Restriction map of recombinant plasmid. 1: DNA marker (DL2000); 2, 3: pET32a(+)-CRM197 digested by *Xho* I/*EcoR* I; 4: DNA marker (DL15000).

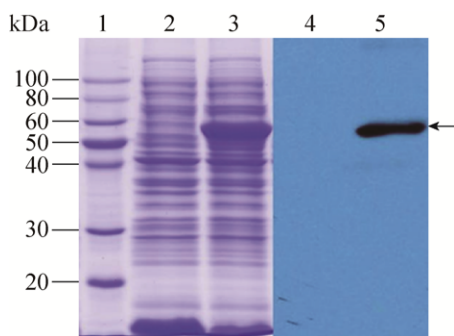


图2 表达蛋白 CRM197 的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

Fig. 2 SDS-PAGE and Western blotting analysis of expression protein. 1: marker; 2, 4: the blank vector; 3, 5: the supernatant after homogenate and centrifuge.

### 2.3 重组 CRM197 蛋白的纯化及鉴定

从图 3 可以看出, 目的蛋白基本在超声上清中, 为可溶表达, 且表达量较高占比为 40%。首先通过 QFF 一步流穿快速去除杂蛋白, 随后无需更换缓冲液, 正确折叠的目的蛋白能与 Heparin 特异性结合, 并且通过梯度洗脱进一步去除痕量杂质, 最后通过脱盐换液将蛋白置换到保存溶液 PBS 中, 经过三步纯化后, 无标签的目的蛋白得到了很好的纯化, 纯度可达 95% 以上。

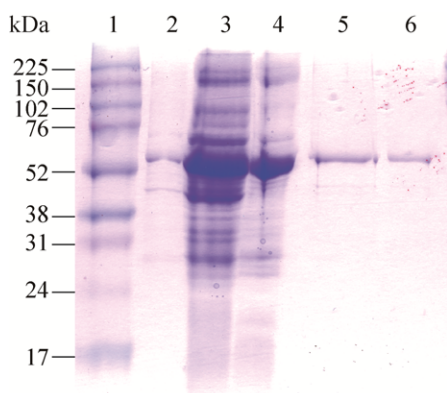


图3 纯化 CRM197 各步骤的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of CRM197's purification of each step. 1: marker; 2: the precipitation after ultrasonic cytolysis and centrifuge; 3: the supernatant after ultrasonic cytolysis and centrifuge; 4: the flow-through collection of QFF; 5: the fraction collection of Heparin HP; 6: the fraction collection of desalting.

### 2.4 重组 CRM197 蛋白的毒性试验

根据加入毒素、类毒素和 CRM197 蛋白的 Vero 细胞的存活情况 (图 4), 计算  $IC_{50}$  值分别为 0.012 ng/mL、26.46  $\mu$ g/mL 和 254.50  $\mu$ g/mL。可以看出, CRM197 的  $IC_{50}$  值是白喉毒素  $IC_{50}$  值的  $2.1 \times 10^7$  倍; 与白喉类毒素相比, CRM197 的  $IC_{50}$  值是前者的 9.6 倍。以上结果说明 CRM197 在细胞实验水平上是安全无毒性的。

### 2.5 抗原在小鼠体内的免疫原性分析

分别采用高剂量 (20  $\mu$ g) 和低剂量 (2  $\mu$ g) 免疫 BALB/c 小鼠, 每两周免 1 次, 共免 3 次。从图 5 中可以看出, 2  $\mu$ g 和 20  $\mu$ g 组的 CRM197 均可诱导小鼠产生较高的抗体滴度, 且在第 9 周抗体滴度达到峰值, 达 1:409 600, 并且 2  $\mu$ g 组三免后的抗体滴度与 20  $\mu$ g 组的相当。

## 3 讨论

自 19 世纪 80 年代以来, 结合疫苗的发展大大降低了包括 Hib、肺炎支原体和脑膜炎奈瑟氏球菌等导致的相关儿科疾病的发病率<sup>[10]</sup>。其中白喉类毒素、破伤风类毒素和 CRM197 是目前已获批上市疫苗中使用最多的载体。有实验表明, 使用 CRM197 作为载体蛋白的结合疫苗, 除了能有效激发受体产生针对结合物的抗体外, 还能产生足够针对白喉毒素的抗体<sup>[11-14]</sup>。并且在上述 3 种载体蛋白存在预存免疫的情况下, CRM197 能更加有效地激发小鼠产生特异的针对结合物的抗体<sup>[15]</sup>, 这对于已接种破伤风和白喉疫苗的人群具有一定的参考意义。随着研究手段的进步, 进一步拓宽了 CRM197 作为载体蛋白的应用领域, 除了与传统的多糖结合外, 还可与半合成糖进行缀合, 进而提升 13 价肺炎疫苗的功效, 或利用 CRM197 能与白喉毒素受体 (Diphtheria toxin receptor, DTR) 结合通过血脑屏障的特性, 与纳米粒子相结合, 开发针对阿尔茨海默病的治疗药物<sup>[16-18]</sup>。

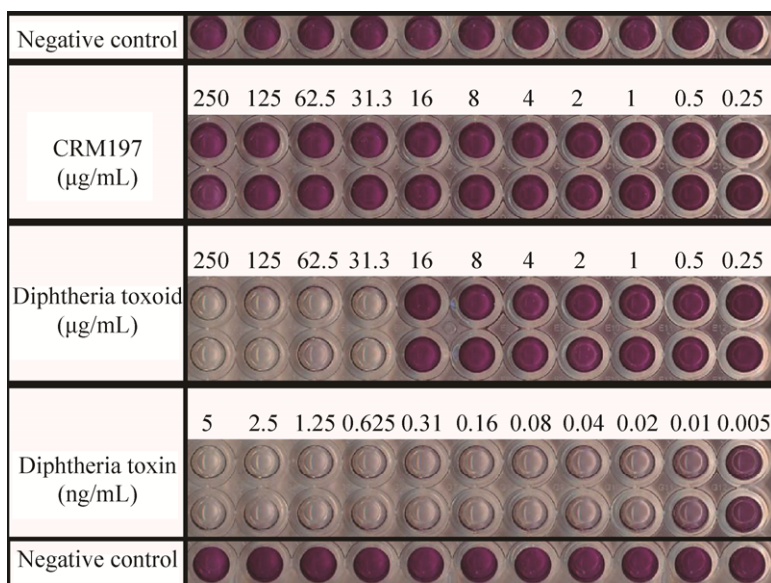


图 4 细胞毒性试验 (MTT)

Fig. 4 Cytotoxicity test (MTT).

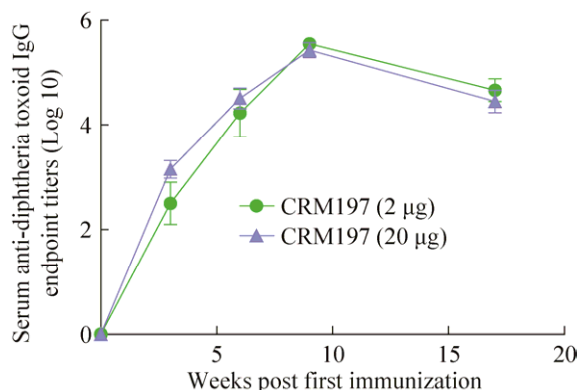


图 5 免疫后小鼠血清中的抗体滴度

Fig. 5 Serum IgG titer in mouse serum after immunization.

目前 CRM197 以及其他非毒突变体一般采用溶原化的白喉杆菌分泌产生, 该菌株经由  $\beta$  噬菌体感染含有编码 DT 的 *tox* 突变基因<sup>[19-20]</sup>。该系统的优点是目的蛋白以分泌形式表达于胞外, 杂蛋白含量低有利于纯化生产。缺点是白喉杆菌发酵条件严苛, 且培养基成分复杂、价格昂贵<sup>[21-22]</sup>。采用大肠杆菌表达系统, 具有生产周期短、成本低、外源 DNA 易于导入、外源蛋白表达简易和能很快产生大量的目的蛋白等优点, 是表达重组

蛋白优先选用的系统。但目前采用该系统表达 CRM197 存在缺陷, 即目的蛋白以包涵体的形式存在, 需要经过变性、复性的阶段, 不利于产量的提高和生产放大, 且携带标签需要后续处理步骤, 为产品质控增加风险<sup>[23-24]</sup>。本研究对原有序列进行了优化, 采用大肠杆菌常用密码子替换稀有密码子, 并平衡 A、T、G、C 四种碱基的比例和分布, 优化后重组 CRM197 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得了可溶性高表达, 目的蛋白约占碎菌上清总蛋白的 40%, 克服了上述表达体系的缺点, 实现了目的蛋白的高效、可溶表达, 且无标签无需后续去除步骤。

目的蛋白获得表达后, 我们又对纯化流程进行了摸索。通过研究发现, CRM197 具有与天然的 DT 对 DTR 相似的亲和力。而 DTR 的氨基酸序列与肝素结合表皮生长因子前体 (pro-HB-EGF) 的相同<sup>[25]</sup>。因此推断, 正确折叠的 CRM197 能与 Heparin 柱特异结合, 经过一系列的条件摸索, 最终确定了阴离子柱流穿、肝素亲和柱梯度洗脱、脱盐柱换液的快速纯化流程, 获得了无细胞毒性、

能诱导小鼠产生较高抗体滴度的目的蛋白, 为后续工艺放大、工业生产奠定了坚实的基础。

## REFERENCES

- [1] Bröker M, Costantino P, DeTora L, et al. Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 (CRM<sub>197</sub>), a non-toxic mutant of diphtheria toxin: use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications. *Biologicals*, 2011, 39(4): 195–204.
- [2] Bröker M, Berti F, Costantino P. Factors contributing to the immunogenicity of meningococcal conjugate vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 2016, 12(7): 1808–1824.
- [3] Podda A, Vescia N, Donati D, et al. A phase-I clinical trial of a new antitetanus/antidiphtheria vaccine for adults. *Ann Ig*, 1991, 3(2): 79–84.
- [4] Bröker M, Berti F, Schneider J, et al. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a “neglected valency” - potential and limitations. *Vaccine*, 2017, 35(25): 3286–3294.
- [5] Romaniuk SI, Kolibo DB, Komisarenko SV. Perspectives of application of recombinant diphtheria toxin derivatives. *Bioorg Khim*, 2012, 38(6): 639–652.
- [6] Pappenheimer AM Jr, Uchida T, Harper AA. An immunological study of the diphtheria toxin molecule. *Immunochemistry*, 1972, 9(9): 891–906, IN5-IN6.
- [7] Buzzi S, Rubboli D, Buzzi G, et al. CRM197 (nontoxic diphtheria toxin): effects on advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(11): 1041–1048.
- [8] Fiorentini G, Banfi R, Dentico P, et al. Clinical experience of treatment of metastatic melanoma and solid tumours adopting a derivative of diphtheria toxin: cross-reacting material 197. *In vivo*, 2013, 27(2): 197–202.
- [9] Dateoka S, Ohnishi Y, Kakudo K. Effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in oral cancer. *Med Mol Morphol*, 2012, 45(2): 91–97.
- [10] Shinefield HR. Overview of the development and current use of CRM<sub>197</sub> conjugate vaccines for pediatric use. *Vaccine*, 2010, 28(27): 4335–4339.
- [11] Halperin SA, McDonald J, Samson L, et al. Simultaneous administration of meningococcal C conjugate vaccine and diphtheria-tetanus-acellular pertussis-inactivated poliovirus-Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine in children: a randomized double-blind study. *Clin Invest Med*, 2002, 25(6): 243–251.
- [12] Gasparini R, Conversano M, Bona G, et al. Randomized trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of MenACWY-CRM, an investigational quadrivalent meningococcal glycoconjugate vaccine, administered concomitantly with a combined tetanus, reduced diphtheria, and acellular pertussis vaccine in adolescents and young adults. *Clin Vaccine Immunol*, 2010, 17(4): 537–544.
- [13] McVernon J, MacLennan J, Clutterbuck E, et al. Effect of infant immunisation with meningococcus serogroup C-CRM<sub>197</sub> conjugate vaccine on diphtheria immunity and reactogenicity in pre-school aged children. *Vaccine*, 2003, 21(19/20): 2573–2579.
- [14] Tashani M, Alfelali M, Barasheed O, et al. Effect of Tdap when administered before, with or after the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (coadministered with the quadrivalent meningococcal conjugate vaccine) in adults: a randomised controlled trial. *Vaccine*, 2016, 34(48): 5929–5937.
- [15] Tontini M, Berti F, Romano MR, et al. Comparison of CRM<sub>197</sub>, diphtheria toxoid and tetanus toxoid as protein carriers for meningococcal glycoconjugate vaccines. *Vaccine*, 2013, 31(42): 4827–4833.
- [16] Möglinger U, Resemann A, Martin CE, et al. Cross reactive material 197 glycoconjugate vaccines contain privileged conjugation sites. *Sci Rep*, 2016, 6: 20488.
- [17] Parameswarappa SG, Reppe K, Geissner A, et al. A semi-synthetic oligosaccharide conjugate vaccine candidate confers protection against *Streptococcus pneumoniae* Serotype 3 infection. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(11): 1407–1416.
- [18] Kuo YC, Rajesh R. Targeted delivery of rosmarinic acid across the blood-brain barrier for neuronal rescue using polyacrylamide-chitosan-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with surface cross-reacting material 197 and apolipoprotein E. *Int J Pharm*, 2017, 528(1/2): 228–241.

- [19] Rappuoli R. Isolation and characterization of *Corynebacterium diphtheriae* nontandem double lysogens hyperproducing CRM197. *Appl Environ Microbiol*, 1983, 46(3): 560–564.
- [20] Rappuoli R, Michel JL, Murphy JR. Integration of corynebacteriophages  $\beta^{tox+}$ ,  $\omega^{tox+}$ , and  $\gamma^{tox-}$  into two attachment sites on the *Corynebacterium diphtheriae* chromosome. *J Bacteriol*, 1983, 153(3): 1202–1210.
- [21] Cox JC. New method for the large-scale preparation of diphtheria toxoid: purification of toxin. *Appl Microbiol*, 1975, 29(4): 464–468.
- [22] Fass R, Bahar S, Kaufman J, et al. High-yield production of diphtheria toxin mutants by high-density culture of C7 ( $\beta$ )<sup>tox+</sup> strains grown in a non-deferrated medium. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 43(1): 83–88.
- [23] Stefan A, Conti M, Rubboli D, et al. Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2011, 156(4): 245–252.
- [24] Bishai WR, Rappuoli R, Murphy JR. High-level expression of a proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1987, 169(11): 5140–5151.
- [25] Mitamura T, Umata T, Nakano F, et al. Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 1997, 272(43): 27084–27090.

(本文责编 陈宏宇)