

使用优化的信号肽和密码子在 Expi293F 细胞中高表达重链抗体可变区抗体

谭书桢¹, 董虎¹, 潘颂佳¹, 穆素雨¹, 陈永杰¹, 张韵¹, 孙世琪¹,
郭慧琛^{1,2,3*}

- 1 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730000
- 2 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070
- 3 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州 730046

谭书桢, 董虎, 潘颂佳, 穆素雨, 陈永杰, 张韵, 孙世琪, 郭慧琛. 使用优化的信号肽和密码子在 Expi293F 细胞中高表达重链抗体可变区抗体[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4219-4227.

TAN Shuzhen, DONG Hu, PAN Songjia, MU Suyu, CHEN Yongjie, ZHANG Yun, SUN Shiqi, GUO Huichen. High expression of variable domain of heavy-chain antibodies in Expi293F cells with optimized signal peptide and codons[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4219-4227.

摘要: 重链抗体可变区抗体(variable domain of heavy-chain antibody, VHH)已被广泛用于药物治疗、诊断和研究。大肠杆菌是生产 VHH 最常用的表达系统,但可能会导致 VHH 的生物活性降低。哺乳动物细胞是目前最理想的 VHH 表达宿主之一。本研究通过优化 VHH 的信号肽(signal peptide, SP)和密码子,以期提高 VHH 在 Expi293F 细胞中的产量。VHH1-Fc 被用于筛选 SP,通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)筛选出的 SP IFN- α 2 分泌效果最佳;通过提高基因的 GC3 和 GC 含量,VHH1 的产量提高了约 1 倍,且对 VHH1 与 A 型塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA)的结合活性无明显影响;其他 5 种重组 VHHs 分别连接 SP IFN- α 2 并进行密码子优化,其平均产量大于 191.6 mg/L。此外,这些 VHHs 在培养上清中具有高纯度和高回收率的优点。本研究证实了 SP IFN- α 2 和密码子优化可以在 Expi293F 细胞高效表达 VHH,为 VHH 的大规模生产提供参考。

关键词: 重链抗体可变区抗体; 信号肽; 密码子优化; 表达

资助项目: 成都农业科技中心地方财政专项资金项目(NASC2024KR06); 兰州市人才创业创新项目(2023-RC-3); 国家自然科学基金(32072847, 32072859, 32301127); 甘肃省重大科技专项(23ZDNA007); 甘肃省自然科学基金(22JR5RA032, 23JRRA551); 中国博士后科学基金(2023M733819); 甘肃省博士后专项项目(23JRRA554)

This work was supported by the Local Financial Funds of National Agricultural Science and Technology Center, Chengdu (NASC2024KR06), the Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (2023-RC-3), the National Natural Science Foundation of China (32072847, 32072859, 32301127), the Major Science and Technology Project of Gansu Province (23ZDNA007), the Natural Science Foundation of Gansu Province (22JR5RA032, 23JRRA551), the China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (2023M733819), and the Gansu Provincial Postdoctoral Special Project (23JRRA554).

*Corresponding author. E-mail: guohuichen@caas.cn

Received: 2023-11-05; Accepted: 2024-06-14; Published online: 2024-06-17

High expression of variable domain of heavy-chain antibodies in Expi293F cells with optimized signal peptide and codons

TAN Shuzhen¹, DONG Hu¹, PAN Songjia¹, MU Suyu¹, CHEN Yongjie¹, ZHANG Yun¹, SUN Shiqi¹, GUO Huichen^{1,2,3*}

1 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China

2 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

3 Gansu Province Research Center for Basic Disciplines of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: The variable domain of heavy-chain antibody (VHH) has been developed widely in drug therapy, diagnosis, and research. *Escherichia coli* is the most popular expression system for VHH production, whereas low bioactivity occurs sometimes. Mammalian cells are one of the most ideal hosts for VHH expression at present. To improve the yield of VHH in Expi293F cells, we optimized the signal peptide (SP) and codons of VHH. Firstly, the fusion protein VHH1-Fc was used to screen SPs. The SP IFN- α 2 showed the highest secretion as quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Subsequently, codon optimization by improving GC3 and GC content doubled the yield of VHH1 and kept its binding activity to Senecavirus A (SVA). Finally, the mean yields of other 5 VHHs that fused with SP IFN- α 2 and codon-optimized were over 191.6 mg/L, and these VHHs had high recovery and high purity in the culture supernatant. This study confirms that SP IFN- α 2 and codon optimization could produce VHHs in Expi293F cells efficiently, which provides a reference for the large-scale production of VHHs.

Keywords: variable domain of heavy-chain antibody (VHH); signal peptide; codon optimization; expression

重链抗体可变区抗体(variable domain of heavy-chain antibody, VHH)是重链抗体的可变结构域,负责与靶标的结合。与传统抗体相比,VHH的分子量更小,结构更简单,而且通常没有糖基化,具有良好的耐热性,能够在不同的酸碱条件下保持其结构和功能^[1-3]。因此,越来越多基于VHH的应用得到发展,如肿瘤和传染病的治疗、生物标志物检测、分子成像等^[4]。在2019冠状病毒病大流行期间,研究者已经分离出数百个用于中和严重急性呼吸综合征冠状病毒2型的VHH^[5]。

细菌、酵母、真菌、昆虫细胞和哺乳动物

细胞都被用来表达VHH^[6]。其中,大肠杆菌是VHH最常用的表达宿主。利用大肠杆菌周质表达VHH的产量只能达到几十毫克/升或更低^[7]。虽然大肠杆菌胞质表达VHH的产量要高得多,但可能形成无功能的包涵体,增加纯化VHH的难度。有研究通过提高包涵体复性效率^[8]或使用突变菌株^[9]来提高活性VHH产量。然而,包涵体复性和使用突变菌株增加了活性VHH产量的不确定性。哺乳动物细胞是生产抗体的最佳表达系统,悬浮适应型重组中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞系用于生产人类治疗性抗体已有几十年的历史^[10]。与重组

CHO 细胞株相比, 人胚胎肾 293 (human embryonic kidney 293, HEK293)细胞因其高转染效率和优秀的外源蛋白质生产能力常被用于基因的瞬时表达(transient gene expression, TGE),更适合于抗体开发的早期阶段^[11]。目前, 鲜有在 HEK293 细胞中增强 VHH 表达的研究报道。

重组蛋白的 TGE 产量与多个重要因素相关, 包括转染试剂、培养基、培养控制、表达载体设计^[12]。表达载体设计是提高 TGE 产量的关键, 包括启动子、内含子、开放阅读框架(open reading frame, ORF)、非翻译区、poly(A)信号序列等多种影响因素^[13-14]。本研究以 Expi293F 细胞为表达宿主, 选择 ORF 作为优化对象, 通过筛选 SP 和优化密码子使多种 VHH 的产量远高于大肠杆菌的一般产量, 且 VHH 活性良好, 为哺乳动物细胞大规模生产 VHH 提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 抗体、病毒与细胞

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的小鼠抗人 IgG Fc 单克隆抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司。HRP 标记的兔抗 6×His 多克隆抗体购自 Bethyl Laboratories 公司。A 型塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA) CH-HB-2017 株(GenBank 登录号: MN922286)由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫防控技术团队保存^[15]。Expi293F 细胞购自 ThermoFisher Scientific 公司。293SFM 培养基购自苏州天信和生物科技公司。

1.2 载体构建方法

VHH1 的 5'端连接人天青素(azurocidin, Azu)、小鼠免疫球蛋白 κ 轻链(Mutant A2)、人免疫球蛋白重链(heavy chain, HC)、Secrecon、人干扰

素- $\alpha 2$ (interferon- $\alpha 2$, IFN- $\alpha 2$)或人白介素-2(interleukin-2, IL-2)的 SP 序列, *VHH1* 的 3'端连接人 IgG Fc 片段, 带有不同 SP 的 *VHH1-Fc* 基因克隆至 pTT5 的 *Hind* III 和 *Not* I 位点。pTT5 图谱见图 1, SP 信息见表 1。

VHH1 的 5'端和 3'端分别连接 SP IFN- $\alpha 2$ 和 6×His 标签, 根据 KUDLA 等^[18]的方法进行密码子优化, 避开哺乳动物稀有密码子并优先选择使用率最高的密码子。优化后的 *VHH1* 命名为 *OptiVHH1*。合成该基因并克隆至 pTT5 的 *Hind* III 和 *Not* I 位点。按照 *VHH1* 的优化方法对 *VHH2-VHH6* 进行优化, 将优化后的基因分别克隆至 pTT5 的 *Hind* III 和 *Not* I 位点。*VHH1* 和 *OptiVHH1* 的 cDNA 序列分别为: *VHH1* (GenBank 登录号: PP879182); *OptiVHH1* (GenBank 登录号: PP879183)。*VHH2-VHH6* 的原始 cDNA 序列分别为: *VHH2* (GenBank 登录号: PP879184); *VHH3* (GenBank 登录号: PP879185); *VHH4* (GenBank 登录号: PP879186); *VHH5* (GenBank 登录号: AJ629049.1); *VHH6* (GenBank 登录号: KJ751546.1)。

1.3 蛋白质表达

利用 Expi293F 细胞进行蛋白表达。转染

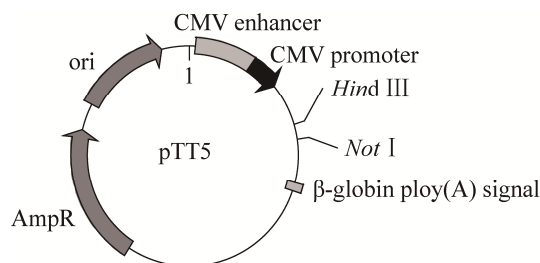


图1 pTT5质粒图谱 含有不同 SP 的 *VHH1-Fc*、*VHH1*、*OptiVHH1*、*VHH2*、*VHH3*、*VHH4*、*VHH5* 和 *VHH6* 基因插入至 *Hind* III 和 *Not* I 位点

Figure 1 Plasmid profile of pTT5. The genes of *VHH-Fc* with different SPs, *VHH1*, *OptiVHH1*, *VHH2*, *VHH3*, *VHH4*, *VHH5*, and *VHH6* were inserted between *Hind* III and *Not* I.

表 1 信号肽信息

Table 1 Overview of SPs used in this study

Origin of SPs	Amino acid sequences of SPs	cDNA sequences of SPs	GenBank accession numbers or references
IL-2	MYRMQLLSIALS LALVTNS	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGT CTTGCACTTGTACGAATTC	NP_000577.2
Mutant A2	MDMRAPAGIFGFL LVLFPGYRS	ATGGACATGAGGGCCCCCGCCGGCATTTCGGGTTCTT GCTGGTGTGTGTCCCCGGCTACAGGAGC	[16]
HC	MEFGLSWVFLVAI LKGVCQ	ATGGAGTTCGGGTTGAGCTGGGTGTTCTTGGTGCCAT CTTGAAGGGGTGTCAGTGC	QBK47494.1
IFN- α 2	MALTFALLVALLVL SCKSSCSVG	ATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTG CTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGC	NP_000596
Secrecon	MWWRLWWLLLLL LLLWPMVWA	ATGTGGTGGAGGCTGTGGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCT GCTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCT	[17]
Azu	MTRLTVLALLAGL LASSRA	ATGACCCGGCTGACCGTGTGGCCCTGCTGGCTGGACT GCTGGCCTCCTCCCGGGCT	NP_001691

时细胞体积为 25 mL, 密度为 2×10^6 个/mL。将 50 μ g 质粒 DNA 和 150 μ g 聚乙烯亚胺(25 kDa, Polysciences 公司)加入至 1.25 mL PBS 溶液中, 混匀后静置 10 min, 将混合液逐滴加入细胞中。表达 VHH1-Fc 的培养物在转染后 5 d 收获培养上清。表达 VHH-6 \times His 的培养物在转染后 4 d 收获培养上清。

1.4 Western blotting

转染后收获的培养上清依次进行 SDS-PAGE 电泳、蛋白质转印、封闭、抗体孵育、化学发光。使用 HRP 标记的小鼠抗人 IgG Fc 单克隆抗体鉴定携带不同 SP 的 VHH1-Fc。使用 HRP 标记的兔抗 6 \times His 多克隆抗体鉴定 VHH1-6 \times His 和 optiVHH1-6 \times His。

1.5 蛋白纯化

根据 AGRAWAL 等^[19]的方法纯化 VHH1-Fc 标准品。使用 Protein A 填料[通用电气医疗系统贸易发展(上海)有限公司]纯化 IL-2-VHH1-Fc 的培养上清。标准品经 SDS-PAGE 鉴定纯度在 95%以上, 并使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定其浓度。

对于 VHH-6 \times His 的纯化, 将培养上清与缓

冲液 1 (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5%甘油, pH 8.0)混合, 加载至 Ni-NTA 填料[通用电气医疗系统贸易发展(上海)有限公司]进行蛋白吸附, 使用缓冲液 2 (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 30 mmol/L 咪唑, 5%甘油, pH 8.0)洗脱杂蛋白, 使用缓冲液 3 (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L 咪唑, 5%甘油, pH 8.0)洗脱目的蛋白。

1.6 VHH1-Fc 的定量分析

4 $^{\circ}$ C 过夜包被纯化的灭活 SVA (4 μ g/mL), 100 μ L/孔; 洗板 5 次后拍干, 使用 0.5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 100 μ L/孔; 洗板 5 次后拍干, 使用 PBST 缓冲液对标准品和待测培养上清稀释 100 倍, 加入包被板中, 倍比稀释, 使每孔的最终体积为 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 洗板 5 次后拍干, 15 000 倍稀释 HRP 标记的小鼠抗人 IgG Fc 单克隆抗体, 100 μ L/孔加入板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 洗板 5 次后拍干, 加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)溶液 37 $^{\circ}$ C 显色 15 min, 100 μ L/孔; 加入终止液, 50 μ L/孔; 读取 450 nm 处的吸光值, 并绘制标准曲线, 计

算培养上清蛋白浓度。

1.7 重组 VHH 的定量分析

将表达 VHH-6×His 的培养上清进行 SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝 R250 染色、考马斯亮蓝脱色。使用 Image J 软件对目的条带进行纯度分析, 根据 BCA 蛋白定量试剂盒测定的总蛋白浓度计算目的蛋白浓度。

1.8 VHH 结合活性的检测

4 °C 过夜包被纯化的灭活 SVA (1 μg/mL), 100 μL/孔; 洗板 5 次后拍干, 使用 0.5% BSA 37 °C 封闭 1 h, 100 μL/孔; 洗板 5 次后拍干, 使用 PBST 分别稀释纯化的 VHH1 和 OptiVHH1 至 10 nmol/L, 加入包被板中, 倍比稀释, 使每孔的最终体积为 100 μL, 37 °C 孵育 1 h; 洗板 5 次后拍干, 5 000 倍稀释 HRP 标记抗 6×His 多克隆抗体, 100 μL/孔加入板中, 37 °C 孵育 1 h; 洗板 5 次后拍干, 加入 TMB 溶液 37 °C 显色 15 min, 100 μL/孔; 加入终止液, 50 μL/孔; 读取 450 nm 处的吸光值, 使用 GraphPad Prism 软件中绘制结合曲线, 并计算达到最大吸光值

一半时所需的抗体浓度。

2 结果与分析

2.1 VHH SP 的优化

SP 在膜蛋白前体靶向内质网的过程中起着至关重要的作用^[20]。研究表明, 优化 SP 可以提高单克隆抗体和细胞因子等分泌性蛋白的表达^[21-22]。VHH 是一类分泌性蛋白, 可以通过 SP 的优化提高其分泌表达。

将 6 种常用的 SPs (表 1) 分别连接至 VHH1-Fc 的 N 端, 以筛选促进 VHH 分泌表达的 SP。所有筛选的 SPs 都具有清晰的 41 kDa 条带 (图 2A), western blotting 证明该条带为 VHH1-Fc (图 2B)。SP Mutant A2、IFN-α2、Azu 获得相近的蛋白表达量, 但 SP IFN-α2 获得的表达量最高[(541.3±45.8) mg/L] (图 2C)。之前的研究表明, 提高 SP 核心区的疏水性可以增强蛋白的分泌^[23]。SP IFN-α2 在其核心区拥有一段长的疏水性多肽 (图 3), 可能促进 VHH1-Fc 的分泌。因此, VHH 的优选 SP 为 SP IFN-α2。

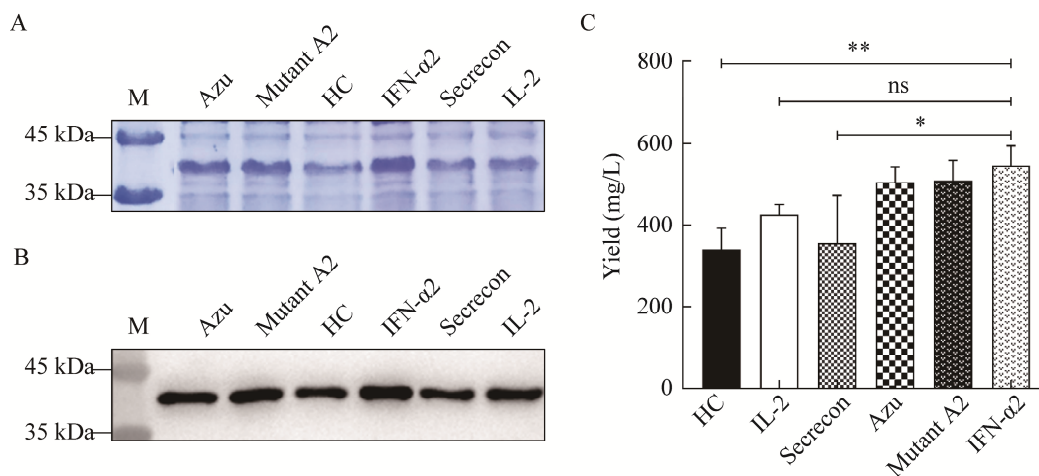


图 2 SP 的筛选 A: SDS-PAGE 分析. B: Western blotting 分析. C: ELISA 定量

Figure 2 Screening of SP suitable for the secretion of VHH. VHH1-Fc fused with different SP were expressed in Expi293F cells, which was followed by SDS-PAGE (A), western blotting (B), and ELISA quantification (C). One-way ANOVA was used, ns indicates no statistically significant differences, * indicates P -value<0.05, ** indicates P -value<0.01.

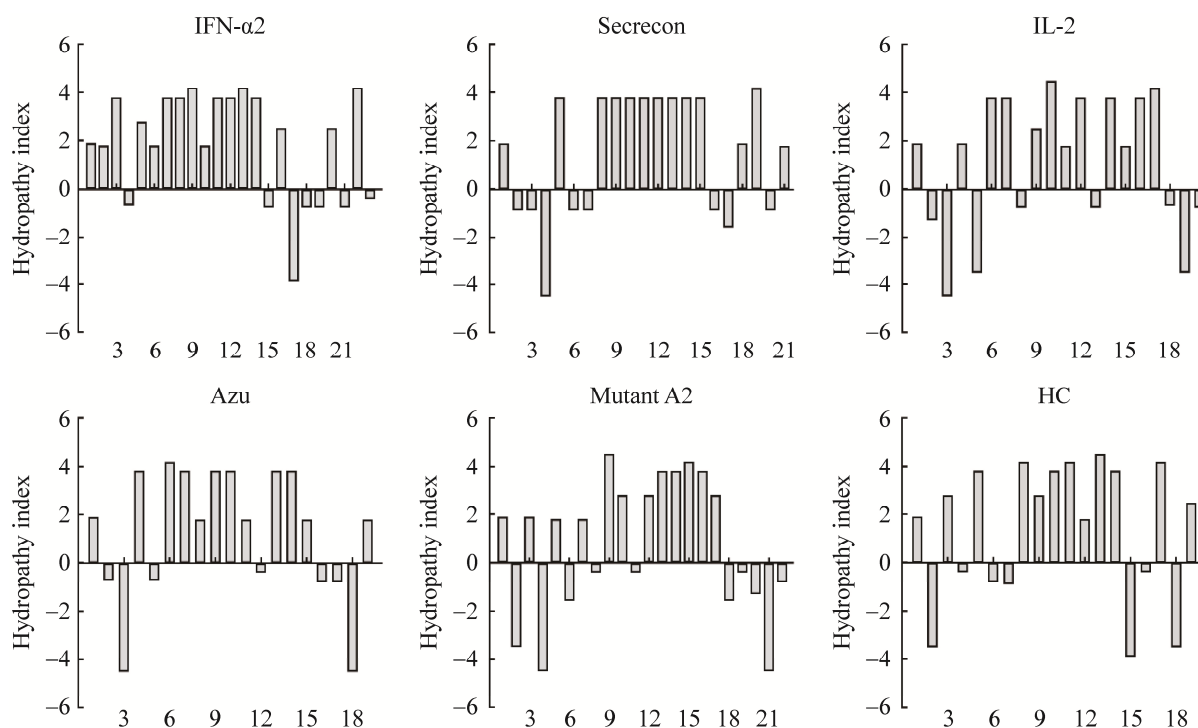


图3 SP疏水性分析 根据 Kyte-Doolittle 亲水指数分析氨基酸的疏水性, 亲水指数越大代表疏水性越强, X 轴数字代表 SPs 的氨基酸顺序

Figure 3 Hydropathy analysis of SP. Hydropathy charts for each SP was performed according to the Kyte-Doolittle Hydrophobicity scale. Larger number means higher hydrophobicity, and the X-axis number represents the amino acid order of the SPs.

2.2 VHH 密码子的优化

虽然许多在线服务器提供密码子优化服务, 但依然需要切实可靠的哺乳动物密码子优化方法。本研究聚焦于同时提高 GC3 含量和 GC 含量的密码子优化方法, 以期提高 VHH 的分泌表达水平。含有 SP IFN- α 2 和 6 \times His 标签的 VHH1 经密码子优化后, GC3 含量增加了 34%, GC 含量增加了 12%, 表达量明显增加(图 4A、4B), 达到(254.5 \pm 20.9) mg/L(图 4C)。之前的研究表明, 在真核细胞中优化酶的密码子可能会影响酶的功能^[24]。然而, 在病毒结合实验中发现 VHH1 和 OptiVHH1 的吸光曲线几乎重叠, VHH1 达到最大吸光值一半时的浓度为 0.25 nmol/L, 而 OptiVHH1 为 0.26 nmol/L(图 4D), 表明密码子优化没有明显影响 VHH1

对 SVA 的结合活性。

2.3 多种 VHHs 的表达与纯化

为进一步检验 SP IFN- α 2 与密码子优化对 VHHs 产量的影响, 将 SP IFN- α 2 和 6 \times His 标签连接至多种 VHHs, 并修改密码子以提高 GC3 含量和 GC 含量。转染后 4 d 收集培养上清, 依次进行 SDS-PAGE 分析、产量分析、蛋白纯化。结果显示, 所有重组 VHHs 在培养上清中占比较高(图 5), 纯度在 50%以上(表 2)。所有 VHHs 的平均产量超过 190 mg/L, VHH2 和 VHH4 的平均产量超过 320 mg/L(表 2)。除 VHH6 外, 其他 VHH 纯化后的回收率在 85%以上(表 2)。这些结果表明, 使用 SP IFN- α 2 并提高重组 VHH 基因的 GC3 含量和 GC 含量可以在较短时间内获得高产量和高纯度的 VHH。

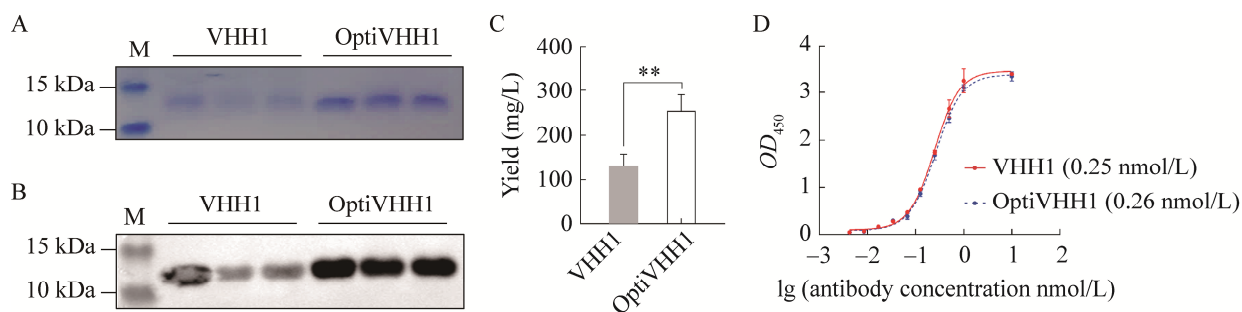


图4 密码子优化对 VHH 产量和结合活性的影响 A: SDS-PAGE 分析. B: Western blotting 分析. C: 产量分析. D: VHH 结合活性检测

Figure 4 Effects of codon-optimization on yield and binding activity of VHH. VHH1 fused with SP IFN- α 2 and a 6 \times His tag was codon-optimized and expressed in Expi293F cells, which was followed by SDS-PAGE (A), western blotting (B), yield analysis (C), and binding activity analysis to SVA (D). *t*-test was used, ** indicates *P*-value<0.01.

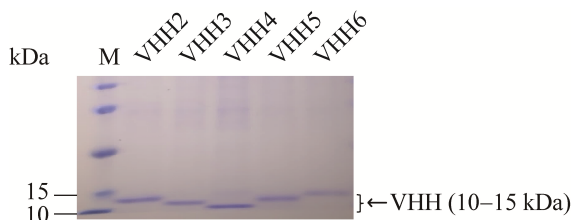


图5 VHHs 的 SDS-PAGE 分析

Figure 5 SDS-PAGE analysis of VHHs. VHH2-VHH6 fused with SP IFN- α 2 and a 6 \times His tag were codon-optimized and expressed in Expi293F cells.

表2 多种 VHHs 的表达

Table 2 Expression of VHHs

Name	Yield (mg/L)	Mean purity (%)	Mean recovery (%)
VHH2	328.5 \pm 7.9	71.4	93.1
VHH3	239.4 \pm 11.6	72.9	86.5
VHH4	357.0 \pm 19.7	67.1	92.9
VHH5	282.4 \pm 12.9	71.5	89.7
VHH6	191.6 \pm 8.8	51.5	76.2

3 讨论与结论

近年来, 第一个纳米抗体药物 Caplacizumab 被欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局批准用于临床^[4,25], 更多的研究者和商业公司开发基于 VHH 的应用。VHH 需求的增加促使 VHH 及其融合蛋白的大规模生产。包括 VHH 在内的重组蛋白的表达是一个复杂的过程, 许

多因素影响重组蛋白的产量和生物活性, 如目的基因序列、表达宿主、表达条件等。蛋白质折叠系统是原核宿主表达蛋白质的主要缺点之一, 可导致部分 VHH 形成无功能的包涵体。并且原核宿主的 VHH 产量较低, 一般低于 100 mg/L。哺乳动物细胞拥有强大的蛋白质折叠机制, 可保证重组 VHH 的结构与天然结构相近。为解决 VHH 折叠和产量问题, 本研究以悬浮适应型 Expi293F 细胞为表达宿主, 通过优化 VHH 的 SP 和密码子提高了 VHH 的产量, 优化后的 VHH 产量达到 190 mg/L 以上。

位于分泌蛋白前体 N 端的 SP 通过与信号识别颗粒的作用指导分泌蛋白前体靶向内质网^[26]。合适的 SP 决定于细胞类型和蛋白质特异性。本研究测试了 6 种 SP 对 VHH1-Fc 分泌表达的影响, 其中 SP IFN- α 2 获得最高表达量, 这与使用增强型绿色荧光蛋白为模板在 HEK293 细胞中测试 SP 的结果一致^[27]。SP 的氨基酸序列被划分为 3 个区域: N 端的碱性区、中间的疏水核心区、C 端的切割区。ZHANG 等^[23]在 SP IL-2 的疏水核心区引入亮氨酸以提高核心区的疏水性, 提高了胎盘碱性磷酸酶和内皮抑素的分泌, 说明合理提高核心区的疏水性能增

强蛋白质的分泌表达。SP IFN- α 2 的核心区拥有一段比其他 5 种 SP 更长的连续疏水氨基酸序列可能是其获得最高产量的原因。密码子优化是在原核与真核系统中提高蛋白表达量的强有力工具^[28-29]。提高 GC3 或 GC 含量能提高 mRNA 在哺乳动物细胞中的水平、稳定性和翻译速率^[16,30-31]。GC3 含量的提高导致 GC 含量的提高,通过密码子选择可以进一步提高 GC 含量。因此,本研究综合了提高 GC3 含量和 GC 含量的密码子优化方法,成功将 VHH1 的产量提高了 1 倍。在包括哺乳动物细胞在内的宿主中,同义密码子的改变会引起一些蛋白质的构象变化,从而导致功能的异常^[32-34],并且蛋白质的无规则卷曲区域对同义密码子的改变更为敏感^[35]。然而,研究结果没有观察到密码子优化前后 VHH1 对 SVA 结合活性的明显变化,这可能是 VHH 分子量小,并且依靠多个区域发挥结合活性所致。本研究随机选择不同 VHH 测试 SP IFN- α 2 和密码子优化的组合对 VHH 表达的效果, VHH 的平均产量在 191.6–357.0 mg/L 之间,远高于大肠杆菌的一般产量。

综上所述,使用 SP IFN α 2 和优化的密码子能在 Expi293F 细胞中高效表达 VHH,为 VHH 的大规模生产奠定基础。

REFERENCES

- [1] JINDAL V, KHOURY J, GUPTA R, JAIYESIMI I. Current status of chimeric antigen receptor T-cell therapy in multiple myeloma[J]. *American Journal of Clinical Oncology*, 2020, 43(5): 371-377.
- [2] van der LINDEN RH, FRENKEN LG, de GEUS B, HARMSSEN MM, RUULS RC, STOK W, de RON L, WILSON S, DAVIS P, VERRIPS CT. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1431(1): 37-46.
- [3] de VOS J, DEVOOGDT N, LAHOUTTE T, MUYLDERMANS S. Camelid single-domain antibody-fragment engineering for (pre)clinical *in vivo* molecular imaging applications: adjusting the bullet to its target[J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2013, 13(8): 1149-1160.
- [4] MUYLDERMANS S. Applications of nanobodies[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2021, 9: 401-421.
- [5] Oxford protein informatics group[DB/OL]. [2024-06-01]. <https://opig.stats.ox.ac.uk/>.
- [6] LIU YK, HUANG H. Expression of single-domain antibody in different systems[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 539-551.
- [7] BAKHERAD H, MOUSAVI GARGARI SL, RASOOLI I, RajabiBAZL M, MOHAMMADI M, EBRAHIMIZADEH W, SAFAEE ARDAKANI L, ZARE H. *In vivo* neutralization of botulinum neurotoxins serotype E with heavy-chain camelid antibodies (VHH)[J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, 55(2): 159-167.
- [8] DOLK E, van VLIET C, PEREZ JMJ, VRIEND G, DARBON H, FERRAT G, CAMBILLAU C, FRENKEN LGJ, VERRIPS T. Induced refolding of a temperature denatured llama heavy-chain antibody fragment by its antigen[J]. *Proteins*, 2005, 59(3): 555-564.
- [9] ZARSCHLER K, WITECY S, KAPPLUSCH F, FOERSTER C, STEPHAN H. High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of *Escherichia coli*[J]. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12: 97.
- [10] SHARKER SM, RAHMAN A. A review on the current methods of Chinese hamster ovary (CHO) cells cultivation for the production of therapeutic protein[J]. *Current Drug Discovery Technologies*, 2021, 18(3): 354-364.
- [11] HACKER DL, KISELJAK D, RAJENDRA Y, THURNHEER S, BALDI L, WURM FM. Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells[J]. *Protein Expression and Purification*, 2013, 92(1): 67-76.
- [12] YOU M, LIU YN, CHEN YW, GUO JY, WU J, FU YJ, SHEN R, QI R, LUO WX, XIA NS. Maximizing antibody production in suspension-cultured mammalian cells by the customized transient gene expression method[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(6): 1207-1213.
- [13] GUPTA K, PARASNIS M, JAIN R, DANDEKAR P. Vector-related stratagems for enhanced monoclonal antibody production in mammalian cells[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(8): 107415.
- [14] WANG TY, GUO X. Expression vector cassette engineering for recombinant therapeutic production in

- mammalian cell systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(13): 5673-5688.
- [15] 郭笑然, 韩世充, 张小丽, 孙世琪, 马小军, 郭慧琛. A 型塞尼卡病毒的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 病毒学报, 2018, 34(5): 555-563.
- GUO XR, HAN SC, ZHANG XL, SUN SQ, MA XJ, GUO HC. Isolation, identification and biological characteristics of the Chinese strain of Senecavirus A[J]. Chinese Journal of Virology, 2018, 34(5): 555-563 (in Chinese).
- [16] KOBER L, ZEHE C, BODE J. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(4): 1164-1173.
- [17] BARASH S, WANG W, SHI YG. Human secretory signal peptide description by hidden Markov model and generation of a strong artificial signal peptide for secreted protein expression[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 294(4): 835-842.
- [18] KUDLA G, LIPINSKI L, CAFFIN F, HELWAK A, ZYLICZ M. High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells[J]. PLoS Biology, 2006, 4(6): e180.
- [19] AGRAWAL V, SLIVAC I, PERRET S, BISSON L, ST-LAURENT G, MURAD Y, ZHANG JB, DUROCHER Y. Stable expression of chimeric heavy chain antibodies in CHO cells[J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 911: 287-303.
- [20] O'KEEFE S, POOL MR, HIGH S. Membrane protein biogenesis at the ER: the highways and byways[J]. The FEBS Journal, 2022, 289(22): 6835-6862.
- [21] YOU M, YANG Y, ZHONG CQ, CHEN FT, WANG X, JIA TR, CHEN YZ, ZHOU B, MI QY, ZHAO QJ, AN ZQ, LUO WX, XIA NS. Efficient mAb production in CHO cells with optimized signal peptide, codon, and UTR[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(14): 5953-5964.
- [22] WILKINSON C, KYLE J, IRIMPEN M, STUART S, MOHANDASS S, SHEPERD A, SMITH KJ, MULLIN MJ. Improved yield of recombinant human IFN- α 2b from mammalian cells using heterologous signal peptide approach[J]. Protein Expression and Purification, 2022, 198: 106125.
- [23] ZHANG L, LENG QX, MIXSON AJ. Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins *in vitro* and *in vivo*[J]. The Journal of Gene Medicine, 2005, 7(3): 354-365.
- [24] YU CH, DANG YK, ZHOU ZP, WU C, ZHAO FZ, SACHS MS, LIU Y. Codon usage influences the local rate of translation elongation to regulate co-translational protein folding[J]. Molecular Cell, 2015, 59(5): 744-754.
- [25] MORRISON C. Nanobody approval gives domain antibodies a boost[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2019, 18: 485-487.
- [26] JOMAA A, EITZINGER S, ZHU ZK, CHANDRASEKAR S, KOBAYASHI K, SHAN SO, BAN N. Molecular mechanism of cargo recognition and handover by the mammalian signal recognition particle[J]. Cell Reports, 2021, 36(2): 109350.
- [27] ROMÁN R, MIRET J, SCALIA F, CASABLANCAS A, LECINA M, CAIRÓ JJ. Enhancing heterologous protein expression and secretion in HEK293 cells by means of combination of CMV promoter and IFN α 2 signal peptide[J]. Journal of Biotechnology, 2016, 239: 57-60.
- [28] MAURO VP. Codon optimization in the production of recombinant biotherapeutics: potential risks and considerations[J]. BioDrugs, 2018, 32(1): 69-81.
- [29] HAN JH, CHOI YS, KIM WJ, JEON YH, LEE SK, LEE BJ, RYU KS. Codon optimization enhances protein expression of human peptide deformylase in *E. coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2010, 70(2): 224-230.
- [30] FATH S, BAUER AP, LISS M, SPRIESTERSBACH A, MAERTENS B, HAHN P, LUDWIG C, SCHÄFER F, GRAF M, WAGNER R. Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17596.
- [31] PARVATHY ST, UDAYASURIYAN V, BHADANA V. Codon usage bias[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(1): 539-565.
- [32] BUHR F, JHA S, THOMMEN M, MITTELSTAET J, KUTZ F, SCHWALBE H, RODNINA MV, KOMAR AA. Synonymous codons direct cotranslational folding toward different protein conformations[J]. Molecular Cell, 2016, 61(3): 341-351.
- [33] KIMCHI-SARFATY C, OH JM, KIM IW, SAUNA ZE, CALCAGNO AM, AMBUDKAR SV, GOTTESMAN MM. A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity[J]. Science, 2007, 315(5811): 525-528.
- [34] ZHAO FZ, YU CH, LIU Y. Codon usage regulates protein structure and function by affecting translation elongation speed in *Drosophila* cells[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(14): 8484-8492.
- [35] ZHOU M, WANG T, FU JJ, XIAO GH, LIU Y. Nonoptimal codon usage influences protein structure in intrinsically disordered regions[J]. Molecular Microbiology, 2015, 97(5): 974-987.

(本文责编 陈宏宇)