

## • 医药生物技术 •

# 分子伴侣对白喉毒素无毒突变体 CRM197 重组蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的促进作用

杨梦婷<sup>1,2</sup>, 李晓晓<sup>1,2</sup>, 林晨<sup>2</sup>, 刘明靓<sup>1,2</sup>, 陈叶梓<sup>1,2</sup>, 赵云<sup>2</sup>, 刘朝奇<sup>1,2</sup>

1 三峡大学 医学院 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

2 三峡大学 医学院, 湖北 宜昌 443002

杨梦婷, 李晓晓, 林晨, 等. 分子伴侣对白喉毒素无毒突变体 CRM197 重组蛋白在大肠杆菌中可溶性表达的促进作用. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1368-1375.

Yang MT, Li XX, Lin C, et al. Molecular chaperones facilitate soluble expression of recombinant non-toxic mutant CRM197 of diphtheria toxin in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1368-1375.

**摘要:** 为了获得有活性的白喉毒素突变体蛋白 (Cross-reacting material 197, CRM197), 本研究利用分子伴侣 pG-KJE8 与重组质粒 pET28a-CRM197 在大肠杆菌原核表达系统中进行共表达, 来促进目的蛋白的正确折叠, 进而提高 CRM197 蛋白的可溶性表达。将质粒转化至大肠杆菌后并诱导其表达目的蛋白, 再通过 SDS-PAGE 胶染色、Western blotting 等技术对所得蛋白进行检测分析。结果发现: 利用体外重组技术成功得到了 pET28a-CRM197 重组蛋白原核表达质粒, 且 CRM197 重组蛋白在原核表达系统中主要以包涵体形式表达; 通过探索和优化, 确定了诱导蛋白的最佳浓度和温度, 当加入终浓度为 1.0 mmol/L IPTG、0.5 mg/mL L-阿拉伯糖、5.0 ng/mL 四环素, 在 20 °C 条件下诱导 16 h 时, 目的蛋白的可溶性表达得到显著提高; 可溶性表达的 CRM197 重组蛋白可以与 CRM197 一抗发生特异性结合, 免疫反应性良好。因此, 研究发现分子伴侣 pG-KJE8 可以促进 CRM197 重组蛋白在大肠杆菌中以可溶性形式表达, 且能很好地与 CRM197 一抗发生特异性结合, 证实 CRM197 重组蛋白具有良好的免疫反应性, 为 CRM197 蛋白的工业化生产及应用奠定了一定的基础。

**关键词:** 白喉毒素突变体蛋白, 原核表达, 分子伴侣, 可溶性蛋白

**Received:** September 6, 2020; **Accepted:** December 25, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 81473461, 81673675).

**Corresponding author:** Chaoqi Liu. Tel: +86-717-6397179; E-mail: ctguleq@163.com

国家自然科学基金 (Nos. 81473461, 81673675) 资助。

网络出版时间: 2021-01-13

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20210111.1116.002.html>

# Molecular chaperones facilitate soluble expression of recombinant non-toxic mutant CRM197 of diphtheria toxin in *Escherichia coli*

Mengting Yang<sup>1,2</sup>, Xiaoxiao Li<sup>1,2</sup>, Chen Lin<sup>2</sup>, Mingjing Liu<sup>1,2</sup>, Yezi Chen<sup>1,2</sup>, Yun Zhao<sup>2</sup>, and Chaoqi Liu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Hubei Provincial Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, School of Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

<sup>2</sup> School of Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

**Abstract:** Diphtheria toxin is an ADP-ribosyltransferase toxic to human cells. Mutation of the active site in its catalytic domain eliminates the toxicity, but retains its immunogenicity. A non-toxic mutant of diphtheria toxin known as CRM197 protein has become an ideal carrier protein for conjugate vaccines. CRM197 can further improve its immunogenicity by cross-linking with other antigens, so it has good potential to find broad applications. Unfortunately, inclusion bodies are easily formed during the expression of recombinant CRM197 protein in *Escherichia coli*, which greatly reduces its yield. In order to address this problem, pG-KJE8 vector carrying molecular chaperones and plasmid pET28a-CRM197, were co-expressed in *Escherichia coli*. The results showed that the recombinant CRM197 protein was successfully expressed and appeared largely in inclusion bodies. The molecular chaperones DnaK, DnaJ, GrpE, GroES and GroEL5 expressed can facilitate correct and rapid folding of CRM197. Furthermore, it can also improve the recovery rate of soluble CRM197 protein. The soluble expression of CRM197 was maximized upon addition of 1.0 mmol/L IPTG, 0.5 mg L-arabinose, 5.0 ng/mL tetracycline and induction at 20°C for 16 h. The soluble CRM197 protein shows good immunoreactivity, demonstrating the molecular chaperones expressed from pG-KJE8 facilitated the soluble expression of CRM197 protein in *E. coli*.

**Keywords:** CRM197, prokaryotic expression, molecular chaperone, soluble protein

白喉毒素 (Diphtheria toxin, DT) 是一种 ADP-核糖基化酶, 分子量约为 58 kDa, 以 535 个氨基酸残基的原酶形式分泌, 可以被类胰蛋白酶处理并释放出两个片段 (A 和 B)<sup>[1]</sup>, 其中 A 片段具有催化活性位点<sup>[2]</sup>, 是发生毒性作用的唯一片段。CRM197 蛋白是白喉毒素的突变体<sup>[3-4]</sup>, 仅包含一个 G52E 突变<sup>[5]</sup>, 即第 52 位氨基酸由甘氨酸突变为谷氨酸, 此突变使白喉毒素酶活性位点发生了改变, 导致 CRM197 丧失了 ADP-核糖转移酶活性<sup>[6]</sup>, 从而失去细胞毒性<sup>[7]</sup>。因其无细胞毒性, CRM197 一般作为一种安全的载体被广泛应用于疫苗<sup>[8]</sup>。

据研究报道, CRM197 不仅可以用作疫苗抗原载体, 还应用于阿尔茨海默症 (AD)<sup>[9]</sup>、肿瘤治疗<sup>[10-11]</sup>和结核病防治<sup>[12-13]</sup>等多个领域的研究, 具

有一定的临床应用价值。Vingtdeux 等<sup>[9]</sup>将 CRM197 作为表位呈递的载体蛋白, 把焦谷氨酸抗  $\beta$  淀粉样蛋白 (A $\beta$ pE3) 递送到体内, 并触发特异性抗 A $\beta$ pE3 抗体的产生。而 A $\beta$ pE3 具有治疗阿尔茨海默症的潜能, 结果证明 CRM197 与 A $\beta$ pE3 的结合可以产生特异性 AD 疫苗。Yotsumoto 等<sup>[10]</sup>为了评估肝素结合 EGF 样生长因子 (HB-EGF) 作为 EGFR 突变的肺癌的治疗靶标的有效性, 将 CRM197 直接作用与具有突变的 EGFR 肺癌细胞中, 结果表明 CRM197 可以诱导细胞凋亡并有显著的抑瘤性。Hu 等<sup>[14]</sup>利用 CRM197 与结核分枝杆菌分泌的 CFP10 和 TB10.4 两种抗原缀合, 发现该缀合物可引起 CFP10-TB10.4 融合蛋白高度特异性的 IgG 滴度, 且对心脏、肝脏及肾功能无明显毒性, 证实 CRM197 为结核病的治

疗提供了新方向。

CRM197 蛋白表达的宿主菌主要为白喉杆菌<sup>[15]</sup>，但白喉杆菌的发酵条件极为苛刻，且发酵成本较高，不利于工业化生产<sup>[16-17]</sup>。大肠杆菌因具有生长速度快、遗传背景简单、表达水平高等特点，逐步成为基因工程首选的表达系统。CRM197 蛋白在原核表达系统中极易形成包涵体，使蛋白失去活性，包涵体的复性操作十分复杂，增加了其应用难度<sup>[18]</sup>。

质粒 pG-KJE8 的 araB 启动子可以表达 DnaK、DnaJ 和 GrpE, Pzt-1 启动子可以表达 GroEL 和 GroES, 通过表达 DnaK、DnaJ、GrpE、GroES 和 GroEL 5 种蛋白从而实现蛋白质的正确、快速折叠，进而增加可溶性表达蛋白的回收率<sup>[19]</sup>。其具体机制为，在辅助蛋白 DnaJ 和核苷酸交换因子 GrpE 的帮助下，DnaK 通过其自身构象发生变化，实现快速与折叠中间体的结合与释放，促进蛋白质正确折叠，同时伴侣蛋白 GroEL 与 GroES 辅助蛋白可以形成一个空腔，为蛋白的正确折叠提供微环境，进而促进去折叠蛋白向天然状态的流动，加速蛋白质的正确折叠。周宇等<sup>[16]</sup>通过构建新型的双质粒自动切割原核表达系统来提高 CRM197 蛋白的可溶性表达；王艳芳等<sup>[20]</sup>利用 pG-KJE8、pGro7、pG-Tf2 和 pTf16 4 种分子伴侣来促进牛支原体膜蛋白的可溶性表达，通过对诱导温度及时间的优化，最终证实分子伴侣 pG-Tf2 和 pG-KJE8 能提高牛支原体膜蛋白的可溶性表达。

本研究在 CRM197 蛋白的表达过程中加入分子伴侣 pG-KJE8 质粒，使其在大肠杆菌原核表达系统中共表达，来促进目的蛋白的正确折叠，防止其沉降聚集，来提高 CRM197 蛋白的可溶性表达。同时在高表达系统中通过对诱导剂、诱导温度和时间的不断优化<sup>[21]</sup>，尽可能增加目的蛋白的可溶性表达，为大规模生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及质粒

通过 GenBank 网站查询基因 CRM197，其编号为 No.KU521393；含有密码子优化的重组质粒 pET28a-CRM197 由生工生物工程（上海）股份有限公司合成；大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* BL21 (DE3) 菌株由本研究所保存；分子伴侣 pG-KJE8 购自武汉淼灵生物科技有限公司。

### 1.2 主要试剂及仪器

氯霉素、硫酸卡那霉素、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、四环素、L-阿拉伯糖均购自武汉科瑞生物技术有限公司。氯化钙购自 Sigma 公司。DNA marker 购自北京天根生物有限科技公司。质粒提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。胰蛋白酶、酵母粉购自 OXOID 公司。氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司。鼠源 His 单克隆抗体 (mAb)、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 均购自北京中衫金桥生物技术有限公司。含有 CRM197 多克隆抗体的小鼠血清由本实验室提供。镍柱纯化试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。超声波细胞破碎仪购自 BRANSON 公司。落地式高速低温离心机购自 BECKMAN COULTER 公司。

### 1.3 重组蛋白 CRM197 的可溶性表达鉴定

取 2  $\mu$ L 重组质粒 pET28a-CRM197 加到表达载体 BL21 (DE3) 中，置于冰上反应 30 min；42  $^{\circ}$ C 热激 90 s，冰上静置 10 min。提前将卡那霉素固体培养基取出置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中复温 15 min，将菌液用涂布棒均匀涂布在卡那霉素培养基中，倒置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养过夜。次日挑取单克隆于卡那霉素液体培养基中，37  $^{\circ}$ C 过夜培养；按菌液比 1 : 100 的比例加入到新鲜培养基中扩大培养，当  $OD_{600}$  约 0.6 时，加入终浓度为 1.0 mmol/L IPTG 诱导剂进行诱导表达，收集菌液，用 SDS-PAGE 进行分析鉴定。

#### 1.4 分子伴侣共表达菌株的构建及 SDS-PAGE 分析鉴定

将分子伴侣 PG-KJE8 质粒转化至表达菌株 BL21 (DE3) 中,方法见 1.3。次日挑取单克隆至含有氯霉素抗性的液体培养基中,37 °C 过夜培养,将其制成感受态。取 2  $\mu$ L 重组质粒 pET28a-CRM197 转化至含分子伴侣 pG-KJE8 质粒的 BL21 (DE3) 表达菌株中,方法见 1.3。次日挑取单克隆至含有硫酸卡那霉素和氯霉素抗性的液体培养基中,按照 1.3 的方法进行诱导表达。收集菌液,4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,菌体用磷酸缓冲液 (PBS) 洗涤两次,洗涤后称重,按每克加 5 mL 的 PBS 回溶,超声破碎 20 min (65%,工作 3 s,间歇 2 s),4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,收集上清与沉淀。沉淀用与上清等体积的 PBS 重悬,加入 5 $\times$ 上样缓冲液煮沸 10 min,取 10  $\mu$ L 上清和沉淀进行 10% 的 SDS-PAGE 分析,以不含分子伴侣诱导的重组菌作为阴性对照。

#### 1.5 目的蛋白诱导条件的优化

为了获得大量的 CRM197 可溶性蛋白,本实验对诱导剂的浓度及诱导温度进行了一定的优化,利用正交试验,通过改变 IPTG、L-阿拉伯糖及四环素等诱导剂的浓度,并进行 SDS-PAGE 分析,选择出最优的诱导条件;同时用最佳的诱导浓度分别在 20 °C 和 37 °C 恒温摇床中诱导 16 h 及 6 h,收集菌液,用 SDS-PAGE 进行鉴定,分析其表达特异性。

#### 1.6 目的蛋白的纯化与 SDS-PAGE 分析鉴定

收集诱导表达的重组菌,经 PBS 洗涤后,超声破碎 20 min,在低温高速离心机中 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清。上清经 0.45  $\mu$ m 的滤器过滤,然后经镍柱亲和纯化,利用不同浓度的咪唑进行梯度洗涤、洗脱,从而达到纯化除杂的目的。收集各个组分,进行 SDS-PAGE 分析,上样量为 10  $\mu$ L。

#### 1.7 目的蛋白的免疫反应性检测

将纯化后的目的蛋白经 10% 的 SDS-PAGE 电泳后,用湿转法转至 PVDF 膜,条件为 250 mA,1.5 h。转印后的 PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶在 37 °C 摇床上封闭 1 h,再用含 0.5% 的 Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液 (即 TBST) 振荡洗涤 3 次,每次 10 min。加入含有 CRM197 的鼠源阳性血清 (1:200) 稀释,4 °C 孵育过夜,次日用 TBST 振荡洗涤 3 次,每次 10 min;加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5 000 稀释),室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, ECL 显色。

## 2 结果与分析

#### 2.1 重组蛋白 CRM197 的可溶性表达分析

经 1.0 mmol/L IPTG 诱导后,收集菌液进行超声破碎,以未诱导组作对照,进行 SDS-PAGE 检测,观察目的蛋白的可溶性。图 1 中 SDS-PAGE 显示目的蛋白约在 58 kDa 处,与预期一致;通过比较沉淀和上清中目的蛋白的量,发现目的蛋白主要以包涵体形式表达。

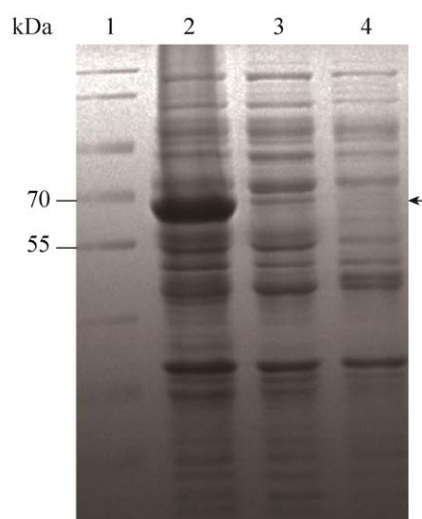


图 1 CRM197 重组蛋白的可溶性分析

Fig. 1 Solubility analysis of CRM197 recombinant protein. 1: protein pre-stained marker; 2: RM197 recombinant bacteria precipitated after ultrasound; 3: CRM197 recombinant bacteria supernatant after ultrasound; 4: not induced (negative control).

## 2.2 分子伴侣共表达的 SDS-PAGE 分析

将分子伴侣 pG-KJE8 质粒与 pET28a-CRM197 重组质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达载体中共表达,按照 1.3 中的方法进行诱导,37 °C 诱导 6 h 后,收集菌液,超声破碎,用超声后的上清与未加分子伴侣诱导后的超声上清进行 SDS-PAGE 分析。图 2 表明,分子伴侣 pG-KJE8 质粒能提高 CRM197 蛋白的可溶性表达。经分析软件 Image J 分析得出,含分子伴侣的上清中目的蛋白的表达量是不含分子伴侣的 3.2 倍,由此证实分子伴侣 pG-KJE8 质粒能显著提高目的蛋白 CRM197 的可溶性表达。

## 2.3 目的蛋白诱导条件的优化

为了使目的蛋白的表达量增大,本研究对诱导剂的浓度与诱导温度进行的优化。对诱导剂采用正交试验进行选择,从 SDS-PAGE 可看出 8 号为最佳诱导条件(图 3-4)。同时用 37 °C 和 20 °C

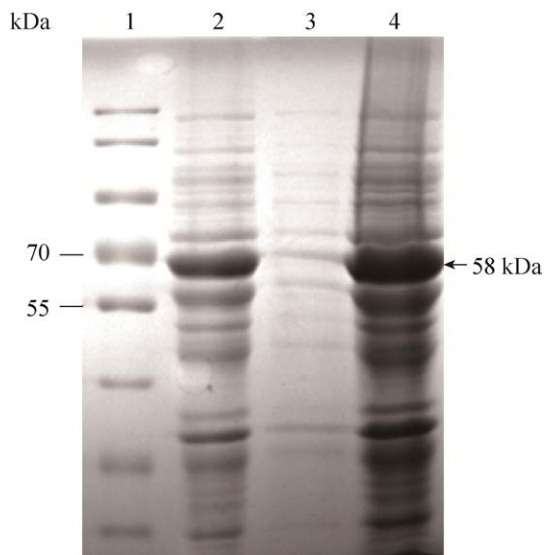


图 2 含分子伴侣与不含分子伴侣重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant protein with or without molecular chaperones. 1: protein pre-stained marker; 2: pET28a-CRM197 recombinant protein supernatant; 3: uninduced bacteria (negative control); 4: pET28a-CRM197-pG-KJE8 recombinant protein supernatant.

恒温摇床分别诱导 6 h 及 16 h, 收集菌液, 超声破碎, 用各自的总菌与超声后的上清进行 SDS-PAGE 分析; 证实目的蛋白在 20 °C 时的总菌表达量和上清表达量都明显高于 37 °C 的表达量(图 5), 因此选择 20 °C 作为诱导的最佳温度。

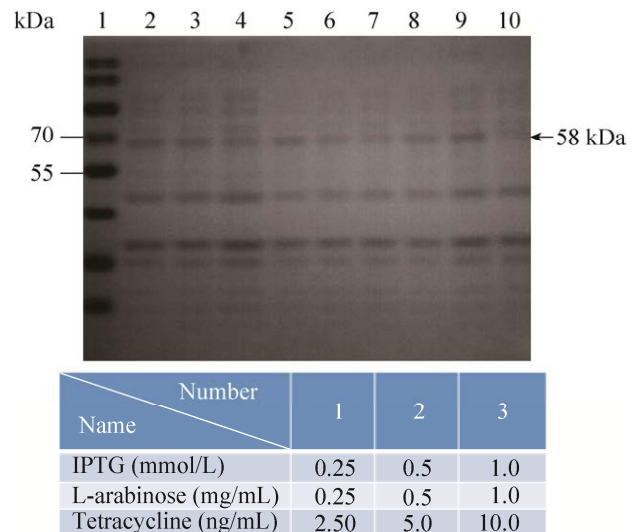


图 3 诱导剂浓度的优化分析

Fig. 3 Optimization analysis of inducer concentration. 1: protein pre-stained marker; 2: 111; 3: 122; 4: 133; 5: 211; 6: 222; 7: 233; 8: 311; 9: 322; 10: 333.

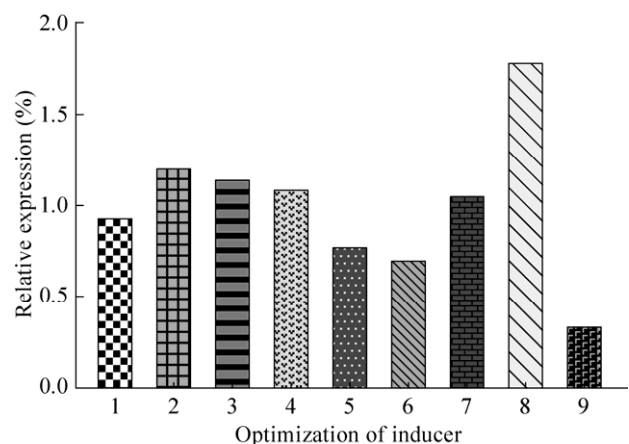


图 4 正交试验分析最佳诱导剂浓度

Fig. 4 Orthogonal test analysis of optimal inducer concentration. 1: 111; 2: 122; 3: 133; 4: 211; 5: 222; 6: 233; 7: 311; 8: 322; 9: 333.

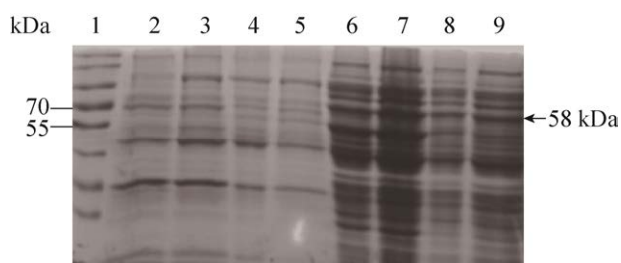


图 5 CRM197 蛋白 20 °C、37 °C 诱导表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of CRM197 protein induced expression at 20 °C and 37 °C. 1: protein pre-stained marker; 2, 3: supernatant of recombinant bacteria induced at 20 °C; 4,5: supernatant of recombinant bacteria induced at 37 °C; 6,7: total bacteria of recombinant bacteria induced at 20 °C; 8,9: total bacteria of recombinant bacteria induced at 37 °C.

#### 2.4 目的蛋白的纯化与 SDS-PAGE 分析鉴定

将含有分子伴侣 pG-KJE8 的重组菌进行诱导表达, 收集菌体, 菌体用 PBS 洗涤两次, 复用 PBS 回溶, 超声破碎 20 min, 在低温高速离心机中 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 经 0.45 μm 滤膜过滤后用 Ni 柱纯化目的蛋白。经过多次实验探索, 发现当洗脱液为 pH 7.0、200 mmol/L 的咪唑时, 杂蛋白的洗脱能力较好; 当洗脱液为 pH 6.5、500 mmol/L 咪唑时, 杂蛋白基本被洗脱, 只剩所需的目的蛋白 (图 6)。经

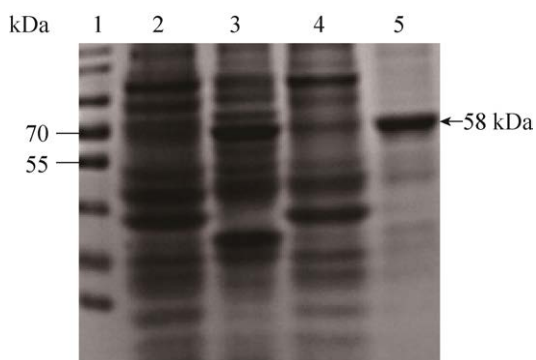


图 6 CRM197 蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of CRM197 protein purification. 1: protein pre-stained marker; 2: uninduced bacteria (negative control); 3: recombinant bacteria containing molecular chaperones; 4: pH 7.0, 200 mmol/L imidazole eluent; 5: pH 6.5, 500 mmol/L imidazole eluent.

分析软件 Image J 分析, 进一步得出目的蛋白的收率为 91.4%, 证明 pH 6.5、500 mmol/L 的咪唑为最佳纯化浓度。

#### 2.5 表达产物的 Western blotting 鉴定及免疫反应性检测结果

Western blotting 结果显示, 当使用含 CRM197 鼠源的阳性血清作为一抗时, CRM197 重组蛋白能被其识别 (图 7A); 当时用 His 单抗作为一抗时, 表达产物能够与之发生特异性结合 (图 7B); 两者均在 58 kDa 处出现特异性条带, 说明检测结果相一致, Western blotting 结果表明纯化后获得的 CRM197 重组蛋白具有良好的免疫反应性。

### 3 讨论

目前, CRM197 的用途虽然很广泛, 但是由于其在生产过程中容易形成包涵体, 对后续的分选纯化有一定的影响, 故 CRM197 的大量获得和

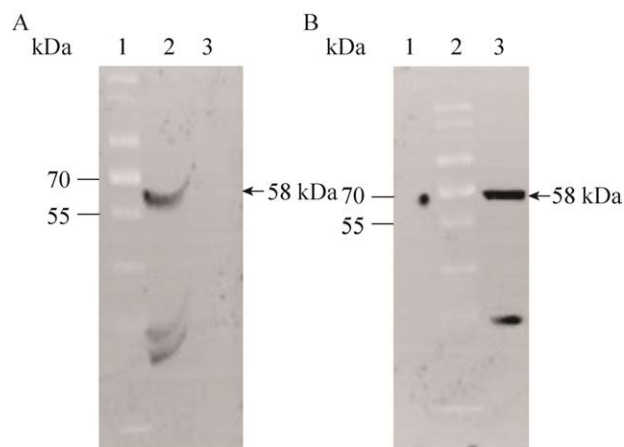


图 7 纯化后 CRM197 的 Western blotting 鉴定及免疫反应性分析

Fig. 7 Western blotting identification and immunoreactivity analysis of CRM197 after purification. (A) Western blotting of CRM197 reacting with anti-His monoclonal antibody. 1: protein pre-stained marker; 2: purified CRM197 recombinant protein; 3: negative control. (B) Detection of immunoreactivity between CRM197 and mouse serum containing CRM197 polyclonal antibody. 1: negative control; 2: protein pre-stained marker; 3: purified CRM197 recombinant protein.

生产仍然是一个难题。为了提高 CRM197 的可溶性表达,经查阅文献以及一定的实验探究,决定在实验中加入一种分子伴侣来提高其可溶性表达。

大肠杆菌原核表达系统虽然可以快速实现异源蛋白的高效表达,但同时存在目的蛋白容易形成包涵体的问题<sup>[22]</sup>。形成包涵体的主要原因有以下几种:1) 蛋白的表达速度过快、浓度过高,导致生成的蛋白质没有足够时间和空间折叠正确的结构<sup>[23]</sup>;2) 表达时,细菌所处环境还原性过高,从而不能有效地完成二硫键的氧化折叠;3) 诱导温度过高,胞内 pH 接近目的蛋白的等电点等因素影响了包涵体动力学的稳定;4) 培养环境缺乏一些促折叠的辅助因子。各种研究表明,添加促溶标签<sup>[24]</sup>、密码子优化<sup>[25]</sup>、载体表达原件的优化<sup>[26]</sup>及改变诱导温度、时间、pH 等,可以有效地减少包涵体的生成,从而提高可溶性表达。

该实验通过将分子伴侣 pG-KJE8 质粒与重组质粒 pET28a-BMP2 共转化至表达菌株 BL21 (DE3) 中使其共表达。加入分子伴侣后,可明显发现包涵体有所减少,超声破碎后,可溶性蛋白显著增多。在诱导表达的过程中,通过改变诱导温度、诱导时间等条件来确定最佳的诱导环境,最终发现诱导温度为 20 °C,诱导 16 h,蛋白的得率较高,且活性较好。

CRM197 不仅可以被用作疫苗佐剂,还具有一定的抗肿瘤作用<sup>[27]</sup>。因此,CRM197 蛋白有望成为一种新的抗肿瘤药物。本研究旨在探讨如何增加 CRM197 蛋白的可溶性。通过加入分子伴侣与目的质粒共转化达到促进目的蛋白正确折叠,减少包涵体的生成,从而增加其可溶性表达;随后将纯化的目的蛋白与含有 CRM197 鼠源的阳性血清进行 Western blotting 反应,鉴定重组蛋白 CRM197 的反应原性。因条件有限,纯化后的蛋白没有进行后续的探讨。本研究为 CRM197 可溶性蛋白的工业化生产和后续的研究应用奠定了一定的基础,同时也为 CRM197 靶向抗肿瘤提供了一个新的思路。

## REFERENCES

- [1] Malito E, Bursulaya B, Chen C, et al. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(14): 5229-5234.
- [2] Louie GV, Yang W, Bowman ME, et al. Crystal structure of the complex of diphtheria toxin with an extracellular fragment of its receptor. *Mol Cell*, 1997, 1(1): 67-78.
- [3] Giannini G, Rappuoli R, Ratti G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12(10): 4063-4069.
- [4] Uchida T, Pappenheimer AJ, Greany R. Diphtheria toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. *J Biol Chem*, 1973, 248(11): 3838-3844.
- [5] Park AR, Jang SW, Kim JS, et al. Efficient recovery of recombinant CRM197 expressed as inclusion bodies in *E. coli*. *PLoS ONE*, 2018, 13(7): 1060-1076.
- [6] Mishra R, Yadav R, Jones C, et al. Structural and immunological characterization of *E. coli* derived recombinant CRM197 protein used as carrier in conjugate vaccines. *Biosci Rep*, 2018, 38(5): 1042-1056.
- [7] 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 (in Chinese).
- [8] Broker M, Costantino P, DeTora L, et al. Biochemical and biological characteristics of cross-reacting material 197 CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin: use as a conjugation protein in vaccines and other potential clinical applications. *Biologics*, 2011, 39(4): 195-204.
- [9] Vingtdeux V, Zhao H, Chandakkar P, et al. A modification-specific peptide-based immunization approach using CRM197 carrier protein: Development of a selective vaccine against pyroglutamate A $\beta$  peptides. *Mol Med*, 2017, 22(1): 841-849.
- [10] Yotsumoto F, Fukagawa S, Miyata K, et al. HB-EGF is a promising therapeutic target for lung cancer with secondary mutation of EGFR(T790M). *Anticancer Res*, 2017, 37(7): 3825-3831.
- [11] Miyamoto S, Yotsumoto F, Ueda T, et al. BK-UM in patients with recurrent ovarian cancer or peritoneal

- cancer: a first-in-human phase- I study. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 89-98.
- [12] Yu W, Hu T. Conjugation with an inulin-chitosan adjuvant markedly improves the immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* CFP10-TB10.4 Fusion Protein. *Mol Pharm*, 2016, 13(11): 3626-3635.
- [13] 高宇辉, 邓唯唯. 原核表达及一步法制备可溶性白喉毒素突变体 CRM197. *基础医学与临床*, 2018, 38(6): 815-820.  
Gao YH, Deng WW. Prokaryotic expression and one-step preparation of soluble diphtheria toxin mutant CRM197. *Bas Med Clinical*, 2018, 38(6): 815-820 (in Chinese).
- [14] Hu S, Yu W, Hu C, et al. Conjugation of the CRM197-inulin conjugate significantly increases the immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* CFP10-TB10.4 fusion protein. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(21): 5968-5974.
- [15] Shinefield HR. Overview of the development and current use of CRM(197) conjugate vaccines for pediatric use. *Vaccine*, 2010, 28(27): 4335-4339.
- [16] 周宇, 赵兆, 袁涛, 等. 白喉毒素无毒突变体 CRM197 基因的克隆与表达. *微生物学免疫学进展*, 2014, 42(3): 18-21.  
Zhou Y, Zhao Z, Yuan T, et al. Cloning and expression of CRM197 gene of non-toxic diphtheria toxin mutant. *Pro Microbiol Immunol*, 2014, 42(3): 18-21 (in Chinese).
- [17] Pecetta S, Vijayakrishnan B, Romano MR, et al. Evaluation of the non-toxic mutant of the diphtheria toxin K51E/E148K as carrier protein for meningococcal vaccines. *Vaccine*, 2016, 34(11): 1405-1411.
- [18] 李鹏昊, 梁严予, 王彦伟, 等. 非洲猪瘟病毒 K196R 和 A240L 蛋白的可溶性表达及酶活力分析. *生物技术通报*, 2020, 36(11): 29-34.  
Li PH, Liang YY, Wang YW, et al. Soluble expression and enzyme activity analysis of African swine fever virus K196R and A240L protein. *Biotechnol Bull*, 2020, 36(11): 29-34 (in Chinese).
- [19] Rodrigo WW, Dassanayake RS, Karunanayake EH, et al. Heterologous expression, chaperone mediated solubilization and purification of parasitic nematode-specific growth factor-like protein of *Setaria digitata*. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(2): 85-92.
- [20] 王艳芳, 周雅坪, 张新竹, 等. 四种分子伴侣促进牛支原体膜蛋白在大肠杆菌中可溶性表达研究. *中国农业大学学报*, 2018, 23(12): 75-83.  
Wang YF, Zhou YP, Zhang XZ, et al. Soluble expression promotion of *Mycoplasma bovine* membrane protein by four types molecular chaperones in *Escherichia coli*. *China J Agric Univ*, 2018, 23(12): 75-83 (in Chinese).
- [21] Bravo-Bautista N, Hoang H, Joshi A, et al. Investigating the deoxyribonuclease activity of CRM197 with site-directed mutagenesis. *ACS Omega*, 2019, 4(7): 11987-11992.
- [22] 亓振国, 张宽亮, 陈宗梅, 等. 大肠杆菌分子伴侣表达的辅助载体构建及应用. *农业生物技术学报*, 2011, 19(1): 171-177.  
Qi ZG, Zhang KL, Chen ZM, et al. Construction and application of auxiliary vector for expression of *Escherichia coli* molecular chaperone. *J Agric Biol*, 2011, 19(1): 171-177 (in Chinese).
- [23] 王侃, 刘次全, 曹槐, 等. 大肠杆菌 mRNA 编码区长度、形成二级结构倾向与密码子偏好性的关系. *微生物学报*, 2006, 46(6): 895-899.  
Wang K, Liu CQ, Cao H, et al. Insight into relationship among mRNA coding region length, folding tendency and codon usage bias in *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Sin*, 2006, 46(6): 895-899 (in Chinese).
- [24] 张宇萌, 童梅, 陆小冬, 等. 提高大肠杆菌可溶性重组蛋白表达产率的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(5): 118-124.  
Zhang YM, Tong M, Lu XD, et al. Research progress on improving the expression yield of *Escherichia coli* soluble recombinant protein. *China Biotechnol*, 2016, 36(5): 118-124 (in Chinese).
- [25] Sar P, Rath B, Subudhi U, et al. Alterations in expression of senescence marker protein-30 gene by 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3). *Mol Cell Biochem*, 2007, 303(1/2): 239-242.
- [26] Kageyama T, Ohishi M, Miyamoto S, et al. Diphtheria toxin mutant CRM197 possesses weak EF2-ADP-ribosyl activity that potentiates its anti-tumorigenic activity. *J Biochem*, 2007, 142(1): 95-104.
- [27] Hu Y, Lin X, Wang P, et al. CRM197 in combination with shRNA interference of VCAM-1 displays enhanced inhibitory effects on human glioblastoma cells. *J Cell Physiol*, 2015, 230(8): 1713-1728.

(本文责编 陈宏宇)