

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

- 中国中文核心期刊
- 中国生物医学核心期刊
- 中国期刊方阵入选期刊

- 中国科技核心期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 中国药学会系列期刊

本期导读：

铂类抗肿瘤药物纳米递送系统研究进展

孙飘，丁杨，周建平

罗米地辛潜在杂质的分离与鉴定

熊磊，闵涛玲，陈昌发，胡海峰



微信号 : cjph-cjph



主 办
上海医药工业研究院
中国药学会
中国化学制药工业协会

12

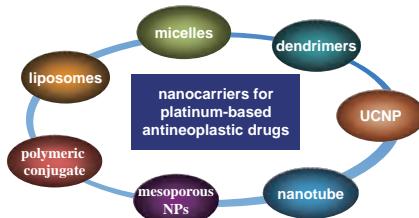
2019年12月

第50卷

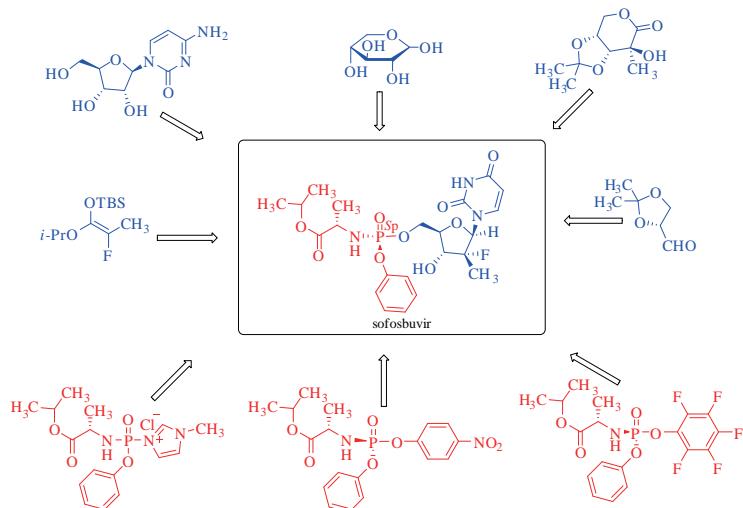
Vol.50 No.12

· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

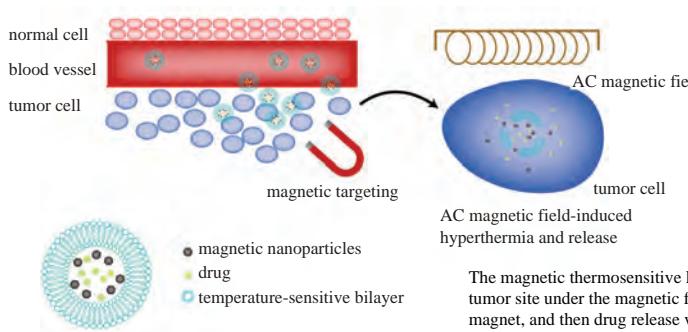
- 1383 铂类抗肿瘤药物纳米递送系统研究进展········孙 飘, 丁 杨, 周建平*
 Recent Progress in Drug Delivery Systems for Platinum Antineoplastic Agents········SUN P, DING Y, ZHOU J P*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.001



- 1393 索非布韦合成研究进展········韩美振, 秦晋晶, 谭志勇, 李振华*
 Progress in the Synthesis of Sofosbuvir········HAN M Z, QIN J J, TAN Z Y, LI Z H*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.002

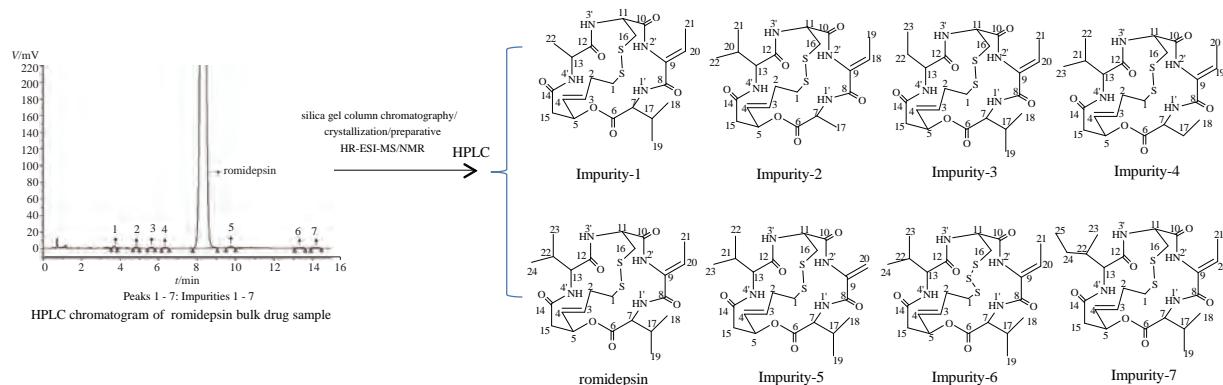


- 1405 磁靶向热敏脂质体在抗肿瘤靶向治疗中的新进展········马秋燕, 林华庆*, 张 静, 蒋 鸿, 鲁泊宏
 New Research Progress of Magnetic Thermosensitive Liposomes in Tumor Targeting Therapy········MA Q Y, LIN H Q*, ZHANG J, JIANG H, LU B H
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.003

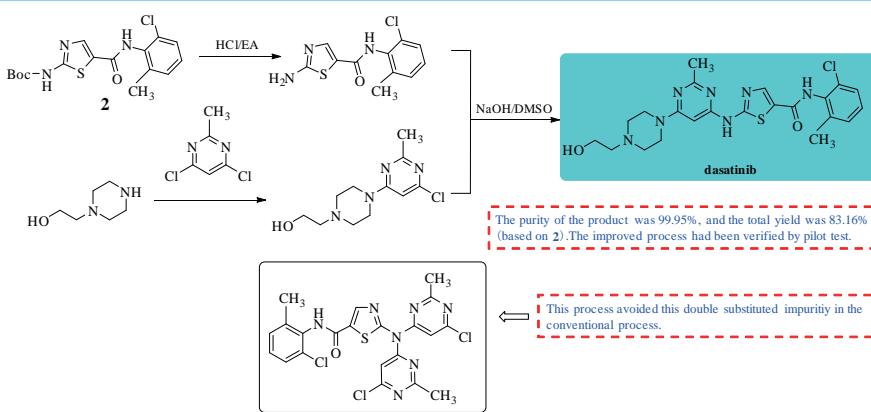


The magnetic thermosensitive liposomes can be targeted to the tumor site under the magnetic force generated by the horseshoe magnet, and then drug release will be triggered by hyperthermia upon local application of an AC magnetic field on the tumor tissue.

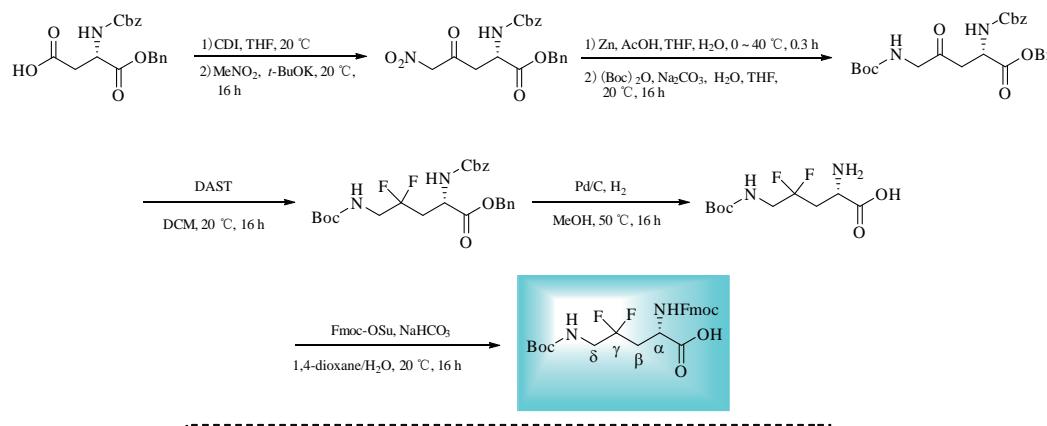
- 1413 罗米地辛潜在杂质的分离与鉴定.....熊磊, 闵涛玲, 陈昌发, 胡海峰*
 Isolation and Identification of Potential Impurities of Romidepsin.....XIONG L, MIN T L, CHEN C F, HU H F*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.004



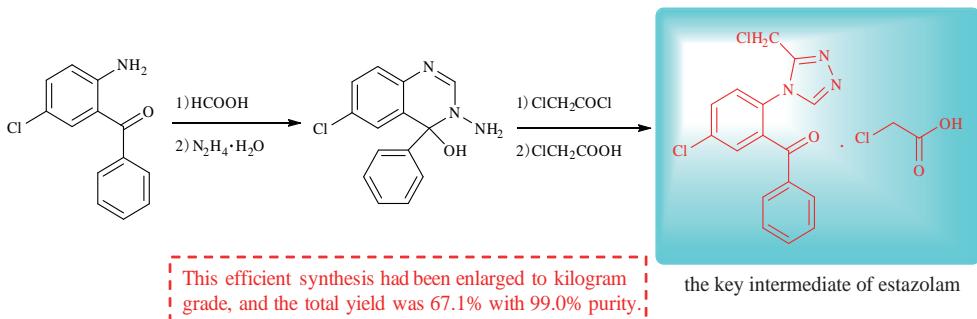
- 1423 达沙替尼的合成工艺优化.....王洪刚, 费凡, 张乃华, 潘高峰, 张贵民*
 Improved Synthetic Process of Dasatinib.....WANG H G, FEI F, ZHANG N H, PAN G F, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.005



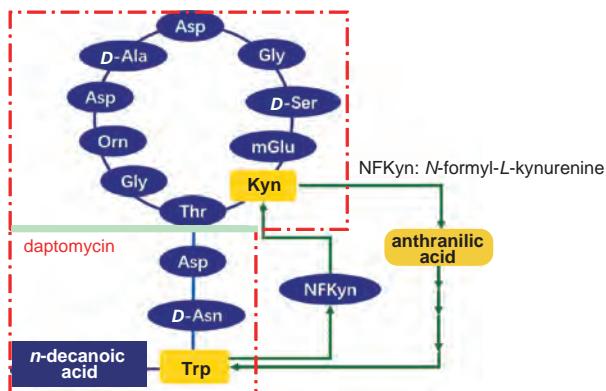
- 1427 (S)-2-[(芴甲氧羰基)氨基]-5-[(叔丁氧羰基)氨基]-4,4-二氟戊酸的合成.....王迪, 刘海侠, 傅磊*
 Synthesis of (S)-2-[(Fluorenylmethoxycarbonyl) amino]-5-[(tert-butoxycarbonyl) amino]-4,4-difluoropentanoic acid.....WANG D, LIU H X, FU L*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.006



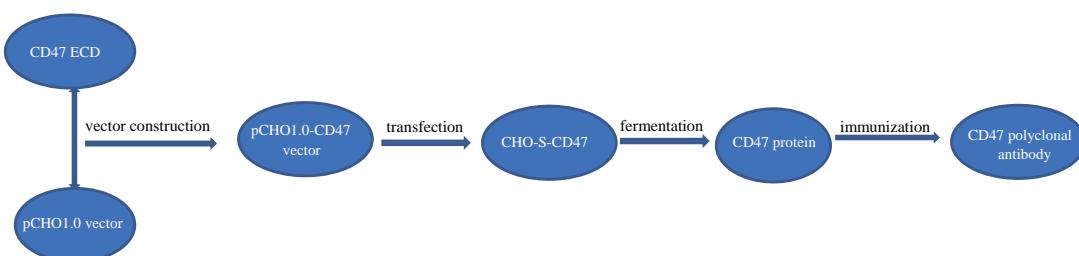
1431 5-氯-2-(3-氯甲基-1,2,4-三唑-4-基)二苯酮氯乙酸盐的合成.....范 钢, 仲 慧, 高浩凌, 卢时湧, 钱秀萍*
 Synthesis of 5-Chloro-2-(3-chloromethyl-1,2,4-triazol-4-yl)dibenzophenone Chloroacetate.....FAN G, ZHONG H, GAO H L, LU S Y, QIAN X P*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.007



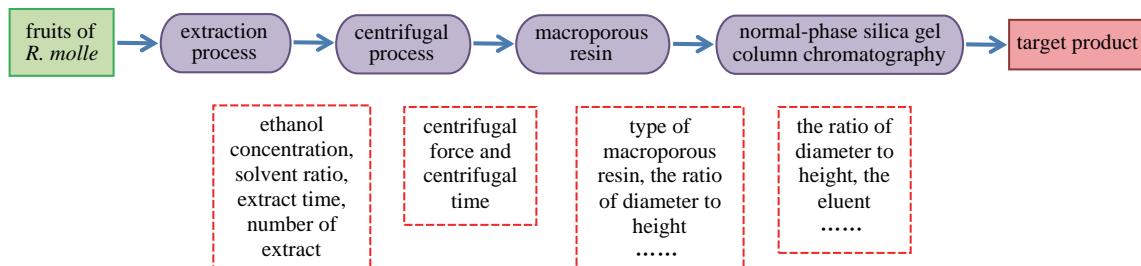
1434 邻氨基苯甲酸对达托霉素发酵的影响.....徐 鲁, 卢雪欢, 张建斌, 李继安, 林惠敏*
 Effect of Anthranilic Acid on Fermentation of Daptomycin.....XU L, LU X H, ZHANG J B, LI J A, LIN H M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.008



1439 CD47 胞外区蛋白的真核表达与多克隆抗体的制备.....朱中松, 赵丽丽, 王玲玲, 张贵民, 刘 忠*
 Eukaryotic Expression of CD47 Extracellular Domain Protein and Preparation of Polyclonal Antibody.....ZHU Z S, ZHAO L L, WANG L L, ZHANG G M, LIU Z*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.009

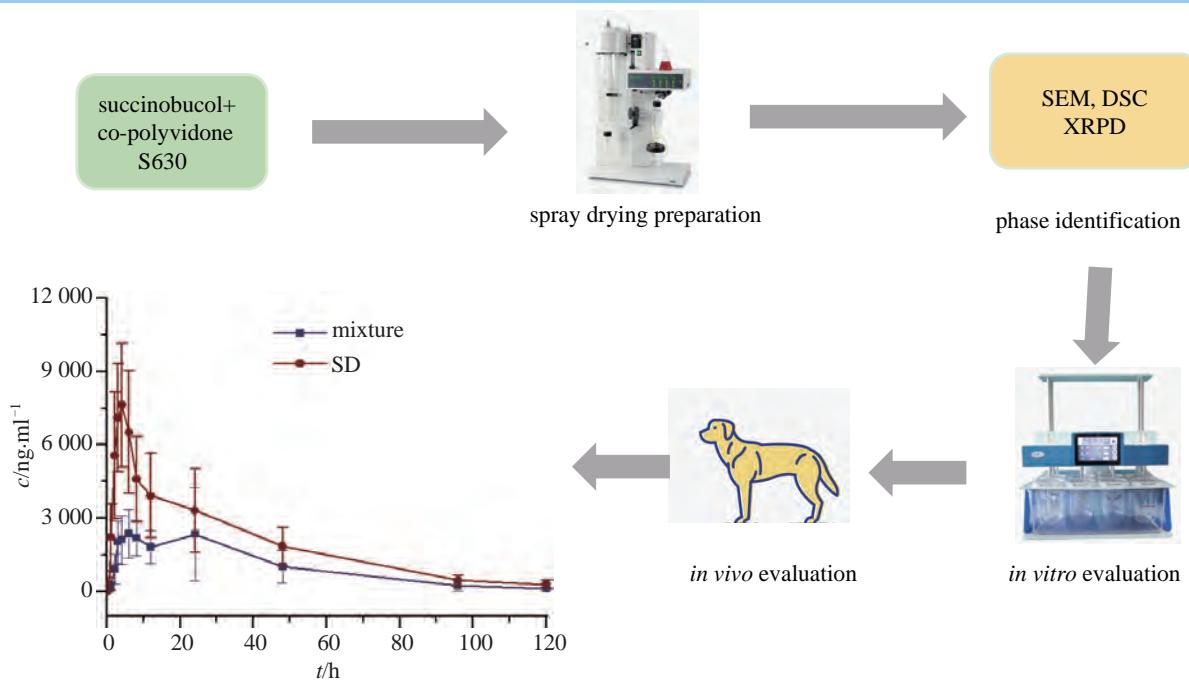


1444 大孔树脂-正相硅胶柱色谱法制备闹羊花二萜有效部位.....姚禹民, 房 鑫, 张继全, 阮克锋, 梁 爽*
 Preparation of Diterpenoid Fraction from Fruits of *Rhododendron molle* G. Don by Macroporous Resin Combined with Normal-phase Silica Gel Column Chromatography.....YAO Y M, FANG X, ZHANG J Q, RUAN K F, LIANG S*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.010

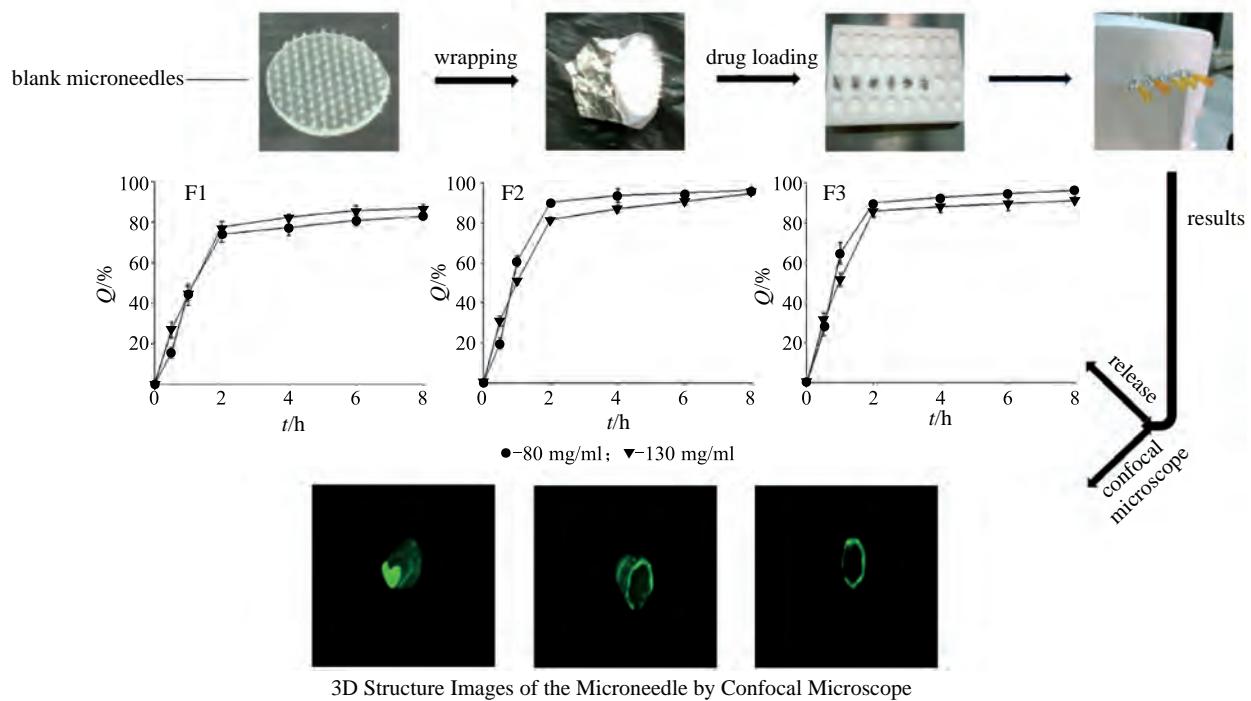


It is the first time to report the preparation process of diterpenoid fraction from fruits of *Rhododendron molle* G. Don which takes rhodojaponin III & IV as the indexes with purity no less than 50%.

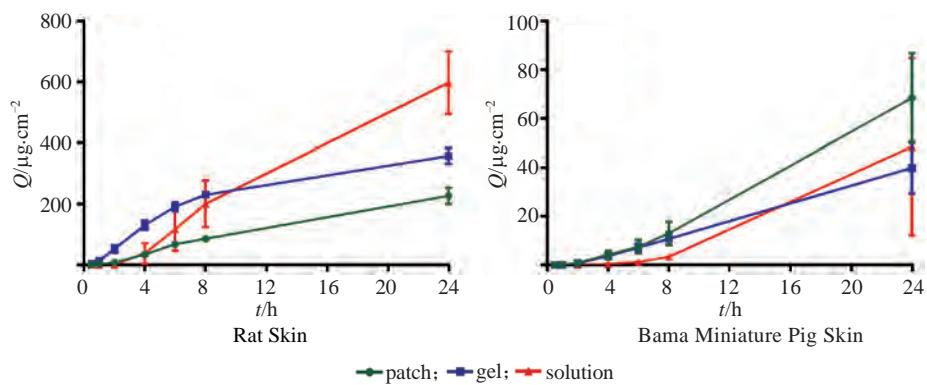
1450 琥珀布考固体分散体的制备及其Beagle犬体内药物动力学研究.....王 菁, 王 瑶, 张 磊, 张志文, 李又欣*
 Preparation of Succinobucol Solid Dispersion and Its Pharmacokinetics in Beagle Dogs.....WANG J, WANG Y, ZHANG L, ZHANG Z W, LI Y X*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.011

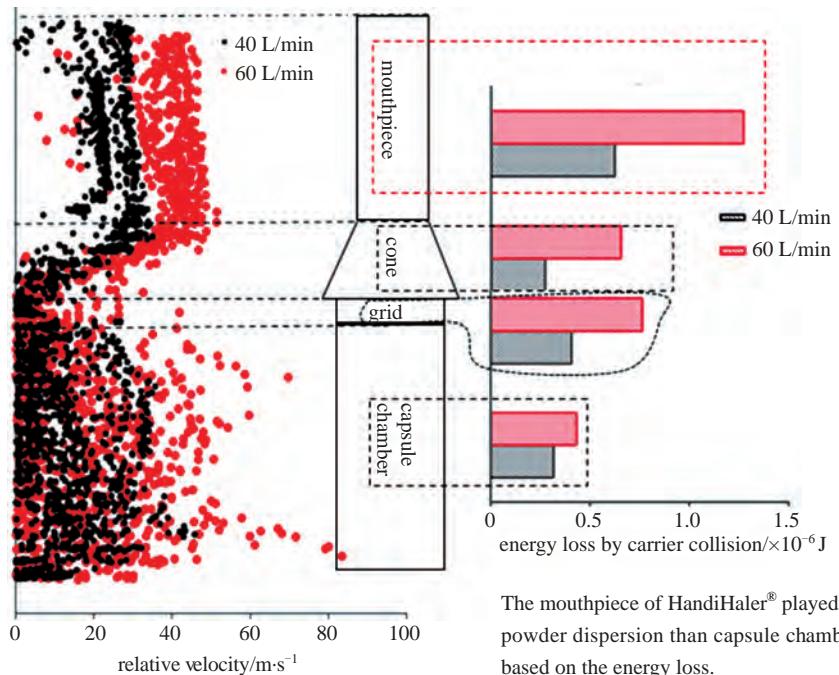


1457 蛋白药物相转化微针的浸泡吸附制备法.....董晓陶, 吴飞, 尹芹, 金拓*
 Phase-transition Microneedle Patches Loaded with Protein Drugs via Impregnation.....DONG X T, WU F, YIN Q, JIN T*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.012

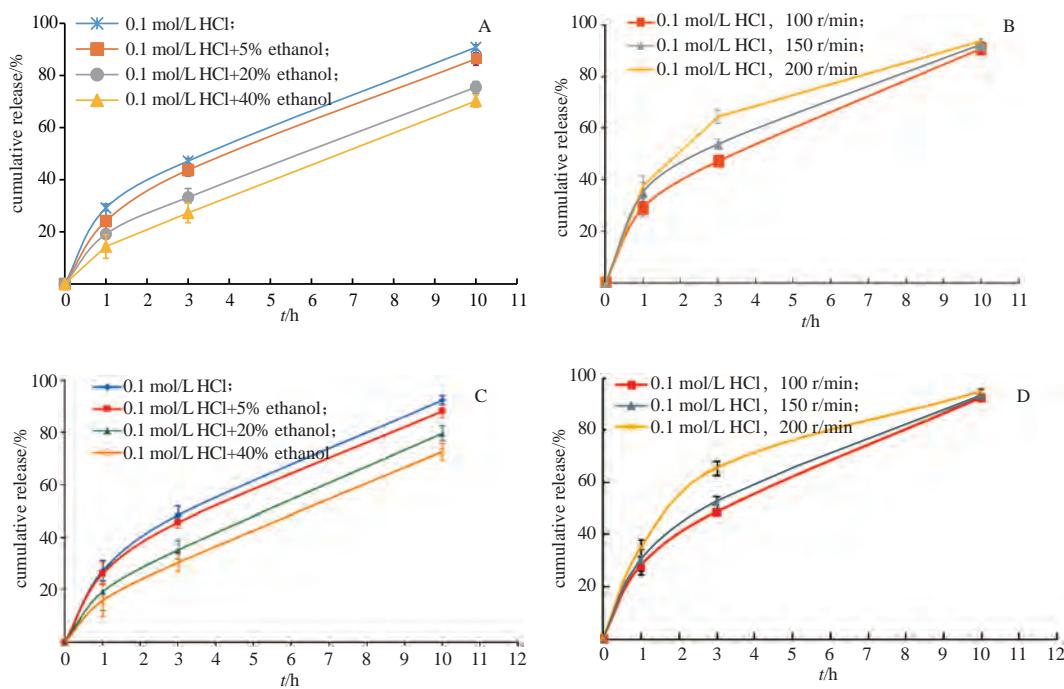


1463 地佐辛外用制剂的体外透皮特性比较.....杨雅丽, 童想柳, 林国钡, 罗华菲*
 Comparison of *in vitro* Transdermal Properties of Dezcocine External Preparations.....YANG Y L, TONG X T, LIN G B, LUO H F*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.013



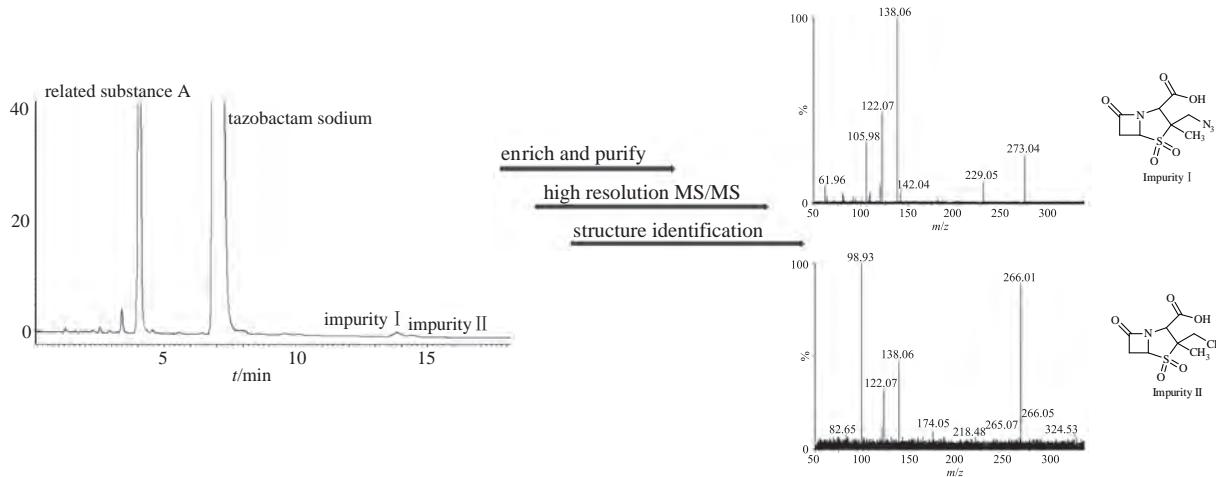


The mouthpiece of HandiHaler® played more impacts on powder dispersion than capsule chamber, cone and grid based on the energy loss.

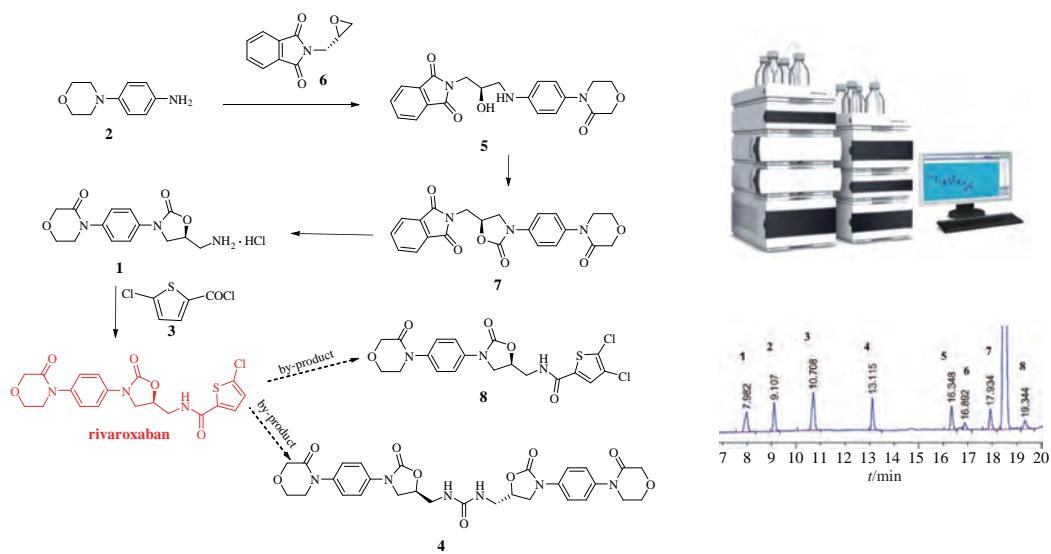


Release Profiles of Metformin Hydrochloride from the Commercial Tablets (A, B) and the Self-made Tablets (C, D)

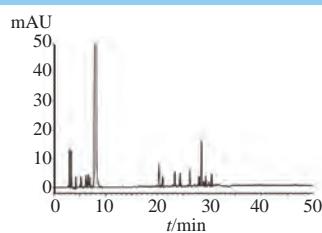
1482 他唑巴坦钠原料药中未知杂质的质谱结构研究.....陆 静, 蔡鹏俊, 李 悅*, 刘秀兰
 Structure Study of Unknown Impurities by Mass Spectrometry in Tazobactam Sodium Bulk DrugLU J, CAI P J, LI Y*, LIU X L
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.016



1487 利伐沙班有关物质的HPLC 测定.....尹秀娥, 胡小燕, 侯德粉, 张嘉月, 董 乔
 Determination of the Related Substances in Rivaroxaban by HPLC.....YIN X E, HU X Y, HOU D F, ZHANG J Y, DONG Q
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.017

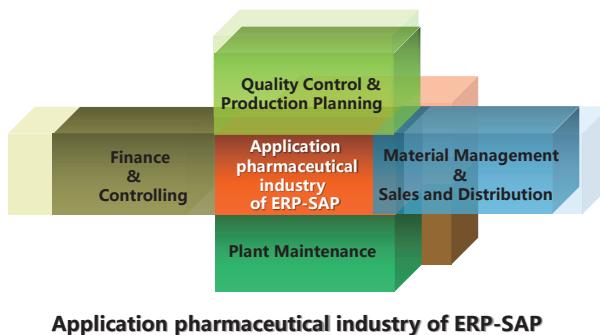


1492 阿莫西林胶囊有关物质的HPLC 法测定.....王 玮, 邓淑渊, 李翠芬, 邢 盛, 王健松
 Determination of Related Substances of Amoxicillin Capsules by HPLC.....WANG W, DENG S Y, LI C F, XING S S, WANG J S
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.018



A new HPLC method was established for simultaneous determination of amoxicillin and its 14 related substances.

- 1498 ERP+CSV在制药企业中的实施应用.....陆振宇,徐秀卉,徐蓉,沈忱*,章欢明
Implementation and Application of ERP&CSV in Pharmaceutical Manufacturers.....
.....LU Z Y, XU X H, XU R, SHEN C*, ZHANG H M
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.019



· 药学管理与信息(Pharmaceutical Management & Information) ·

- 1509 我国医药产业供给侧结构性改革的对策分析.....丁一磊
Countermeasure Analysis of Supply-side Structural Reform of Chinese Pharmaceutical Industry.....
.....DING Y L
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.020

- 1514 典型发达国家药品上市价值评估的分析及应用.....颜建周,雷璐倩,邵蓉*
Analysis and Application of Drug Market Value Assessment in Typical Developed Countries.....
.....YAN J Z, LEI L Q, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.021

- 1519 分析国家药品集中采购和使用试点政策对我国仿制药企业的影响.....王成
Analysis of the Impact of National Pilot Policies on Centralized Drug Procurement and Use on Generic Pharmaceutical Enterprises in China.....WANG C
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.022

- 1524 CAR-T疗法的研发现状与展望.....杜璇
Development Status and Prospects of Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T) Therapy...DU X
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.023

- 1530 2019 年前三季度我国医药工业经济运行情况分析.....郭文,钟一鸣,周斌*
Economic Operation of Chinese Pharmaceutical Industry from January to September 2019.....
.....GUO W, ZHONG Y M, ZHOU B*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.024

· 其他 ·

《中国医药工业杂志》2018 年度索引(1537)

广告索引(1426)

《中国医药工业杂志》向审稿专家致谢(1404)

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2019年第50卷 第12期 12月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.50 No.12 December 10, 2019

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	王 盈, 刘玲玲	Executive Editor	WANG Ying, LIU Lingling
出 版 单 位	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of <i>Chinese Journal of Pharmaceuticals</i>
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号(200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电 话	021-62126987, 62473200	Tel	021-62126987, 62473200
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	ouyy@pharmadl.com	E-mail	ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人; 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*170*zh*P*20.00* *24*2019-12

2019年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255
CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205
国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



微信号: cjph-cjph



微博: weibo.com/cjph

《中国医药工业杂志》第十六届编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF 《CHINESE JOURNAL OF PHARMACEUTICALS》

(以姓名拼音为序)

名誉主编(HONORARY EDITOR-IN-CHIEF)

桑国卫*(SANG Guowei)

主任编委(EDITOR-IN-CHIEF)

陈芬儿*(CHEN Fener)

顾问(CONSULTANT)

白 骥(BAI Hua)

蒋建东(JIANG Jiandong)

王广基*(WANG Guangji)

副主任编委(ASSOCIATE EDITOR-IN-CHIEF) (^常务副副主任编委)

陈 兵(CHEN Bing)

李明华(LI Minghua)

王 浩(^WANG Hao)

张贵民(ZHANG Guimin)

周 斌(ZHOU Bin)

编委(MEMBER OF THE EDITORIAL BOARD)

蔡正艳(CAI Zhengyan)

程卯生(CHENG Maosheng)

范代娣(FAN Daidi)

甘 勇(GAN Yong)

何 军(HE Jun)

胡又佳(HU Youjia)

李范珠(LI Fanzhu)

刘玲玲(LIU Lingling)

龙亚秋(LONG Yaqiu)

罗国强(LUO Guoqiang)

潘红娟(PAN Hongjuan)

沈 琦(SHEN Qi)

孙小强(SUN Xiaoqiang)

涂家生(TU Jiasheng)

王 健(WANG Jian)

王玉成(WANG Yucheng)

吴 勇(WU Yong)

杨苏蓓(YANG Subei)

张福利(ZHANG Fuli)

张卫东(ZHANG Weidong)

赵文杰(ZHAO Wenjie)

钟为慧(ZHONG Weihui)

朱建英(ZHU Jianying)

陈凯先*(CHEN Kaixian)

孔德云(KONG Deyun)

吴晓明(WU Xiaoming)

陈代杰(^CHEN Daijie)

林剑秋(LIN Jianqiu)

王军志*(WANG Junzhi)

张 霽(ZHANG Ji)

周伟澄(^ZHOU Weicheng)

丁 健*(DING Jian)

李绍顺(LI Shaoshun)

杨胜利*(YANG Shengli)

陈桂良(CHEN Gui liang)

潘广成(PAN Guangcheng)

魏宝康(WEI Baokang)

张万斌(ZHANG Wanbin)

朱建伟(ZHU Jianwei)

侯惠民*(HOU Huimin)

沈竞康(SHEN Jingkang)

朱宝泉(ZHU Baoquan)

胡文浩(HU Wenhao)

唐 岳(TANG Yue)

杨 超(YANG Chao)

张绪穆(ZHANG Xumu)

陈笑艳(CHEN Xiaoyan)

董 琳(DONG Lin)

傅 磊(FU Lei)

郭 文(GUO Wen)

胡海峰(HU Haifeng)

金 拓(JIN Duo)

刘东飞(LIU Dongfei)

柳 红(LIU Hong)

陆伟跃(LU Weiyue)

马 璞(MA Jing)

邵 蓉(SHAO Rong)

孙会敏(SUN Huimin)

陶 涛(TAO Tao)

王建新(WANG Jianxin)

王 彦(WANG Yan)

吴 伟(WU Wei)

杨 明(YANG Ming)

尤启冬(YOU Qidong)

张庆文(ZHANG Qingwen)

赵临襄(ZHAO Linxiang)

钟大放(ZHONG Dafang)

周一萌(ZHOU Yimeng)

*院士

《中国医药工业杂志》编辑部成员(EDITORIAL STAFF)

总编辑(Managing Editor): 周伟澄(ZHOU Weicheng)

副总编辑(Associate Managing Editor): 黄志红(HUANG Zhihong), 刘玲玲(LIU Lingling)

责任编辑(Editor): 刘玲玲(LIU Lingling)(兼), 王 盈(WANG Ying), 许文倩(XU Wenqian)

美术编辑(Art Editor): 沈建成(SHEN Jiancheng), 陆燕玲(LU Yanling), 钱苗苗(QIAN Miaomiao)

编辑助理(Editorial Assistant): 韦旭华(WEI Xuhua)

广告、发行负责(Avertisement Manager): 刘敬岩(LIU Jingyan), 金 雷(JIN Lei), 欧阳怡(OUYANG Yi)

CD47 胞外区蛋白的真核表达与多克隆抗体的制备

朱中松^{1,2}, 赵丽丽^{1,2}, 王玲玲^{1,2}, 张贵民³, 刘忠^{3*}

(1. 山东新时代药业有限公司, 山东临沂 273400; 2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室, 山东临沂 273400;

3. 鲁南制药集团, 山东临沂 276000)

摘要: 通过真核表达系统表达 CD47 胞外区融合蛋白, 并免疫新西兰兔, 制备多克隆抗体。构建 CD47 胞外区真核表达质粒 pCHO1.0-CD47-mFc, 转染 CHO-S 细胞, 建立高效表达 CD47 胞外区融合蛋白的稳转细胞库, 并表达 CD47 胞外区融合蛋白, 通过 protein G 亲和色谱法纯化, SDS-PAGE 和 Western Blot 方法进行鉴定, Fortebio 测定蛋白浓度。结果显示, 获得的 CHO-S-CD47-mFc 细胞库的表达量在 322 mg/L, 纯化后蛋白纯度大于 92%, 表达的 CD47-mFc 融合蛋白可同 CD47 抗体特异性结合; 将此 CD47-mFc 蛋白免疫新西兰兔, 多克隆抗血清的效价达到 1 : 102 400。

关键词: 真核表达; CD47 胞外区; 抗体; 细胞库

中图分类号: Q511 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2019)12-1439-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.12.009

Eukaryotic Expression of CD47 Extracellular Domain Protein and Preparation of Polyclonal Antibody

ZHU Zhongsong^{1,2}, ZHAO Lili^{1,2}, WANG Lingling^{1,2}, ZHANG Guimin³, LIU Zhong^{3*}

(1. Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400;

2. National Engineering Lab. for High Level Expression in Mammalian Cells, Linyi 273400; 3. Lunan Pharmaceutical Group, Linyi 276000)

ABSTRACT: Polyclonal antibodies were prepared by expressing the fusion protein of CD47 extracellular domain through adopting an eukaryotic expression system, and the products were used to immunize New Zealand white rabbits. The eukaryotic expression plasmid pCHO1.0-CD47-mFc of CD47 extracellular domain was constructed and transfected into CHO-S cells to establish a stable cell bank expressing CD47 extracellular domain protein. Protein G purification, SDS-PAGE and Western Blot methods were used to identify the protein, and concentration of the obtained protein was determined by Fortebio. The results showed that the expression level of the obtained CHO-S-CD47-mFc cell bank was 322 mg/L, the purity was greater than 92% purified by protein G affinity chromatography, and the expressed CD47-mFc fusion protein could specifically bind to the CD47 antibody. CD47-mFc protein was immunized to New Zealand white rabbits, and the titer of polyclonal antiserum reached 1 : 102 400.

Key Words: eukaryotic expression; CD47 extracellular domain; antibody; cell bank

CD47 也被称为整合素相关蛋白 (IAP), 属于免疫球蛋白超家族, 相对分子质量约 50 000, 该蛋

白为 5 次跨膜蛋白, 胞外区含有 123 个氨基酸, 形成 IgV 样结构, 在 C 端有 34 个氨基酸的胞质区^[1]。CD47 是细胞表面一个重要的“self”标记, 是调节巨噬细胞吞噬作用的一个重要信号, 可以与巨噬细胞表面信号调节蛋白 α (SIRPα) 结合, 磷酸化其免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM), 随后招募蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (SHP-1) 蛋白, 产生一系列的级联反应抑制巨噬细胞的吞噬作用^[2]。

收稿日期: 2019-05-16

作者简介: 朱中松(1984—), 男, 工程师, 从事蛋白类药物的研发。

E-mail: zzzsong1984@163.com

通信联系人: 刘忠(1975—), 男, 研究员, 从事蛋白类药物的研究。

Te1: 15963998806

E-mail: clevertree@163.com

CD47 可广泛地表达在很多健康细胞的表面，释放“Don't eat me”信号，告诉巨噬细胞不要吞噬它们，从而保护健康细胞不被免疫系统破坏。而当细胞老化或病变时，细胞表面就会逐渐丧失 CD47，如此一来，机体便可识别并处理掉那些细胞^[3]。不幸的是，这个机制被肿瘤细胞利用：肿瘤细胞为了保护自己，在表面布置了比正常细胞更多的 CD47，CD47 与 SIRPa 结合，也释放“Don't eat me”信号，使其不被巨噬细胞吞噬。抗 CD47 抗体通过阻断 CD47-SIRPa 信号通路，能有效激活巨噬细胞对肿瘤细胞的吞噬作用，为肿瘤治疗提供了有效的途径^[4]。目前，用于实体瘤和急性骨髓性白血病的抗 CD47 单克隆抗体 Hu5F9-G4 正处于临床Ⅱ期研究阶段^[5]，国内也有多家企业布局 CD47 产品线，本研究旨在为 CD47 抗体的研究提供前期资料。

1 仪器与试药

1.1 仪器

核酸电泳仪和蛋白电泳与转印系统（美国 Bio-Rad 公司）；CO₂ 恒温摇床（瑞士 Infors 公司）；凝胶成像系统（美国 GE 公司）；ForteBio OCTET K2(Pall) 生物分子相互作用分析仪（美国 ForteBio 公司）；超净工作台（苏州净化设备有限公司）。

1.2 材料

真核表达载体 Freedom pCHO1.0、细胞 CHO-S、转染试剂 FreestyleTM（美国 Invitrogen 公司）；限制性内切酶 AVR II、BSTZ17 I 和 T4 DNA 连接酶（美国 NEB 公司）；质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒（日本 TaKaRa 公司）；CD47-His 蛋白（北京义翘神州科技有限公司）；兔抗人 CD47 抗体（美国 Abcam 公司）；辣根过氧化物酶（HRP）标记兔抗羊 IgG 的和羊抗兔 IgG 抗体〔赛默飞世尔科技（中国）有限公司〕；protein A 探针（美国 Pall 公司）；质粒大量提取试剂盒（美国 Omega 公司）；弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂（美国 Sigma 公司）；CD47-mFc 基因全长由南京金斯瑞有限公司合成。

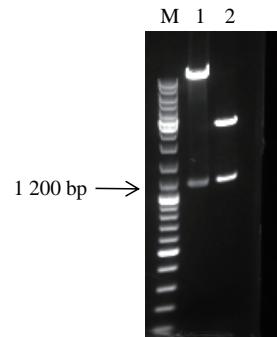
新西兰兔（邳州市东方养殖有限公司，合格证编号 201815554）。

2 方法与结果

2.1 pCHO1.0-CD47-mFc 质粒的构建及鉴定

CD47-mFc 基因的全长，根据 UniProt 网站公

布的人 CD47 蛋白的全长序列（UniProt：Q08722）选取 19~141 位氨基酸，通过连接肽 3 个 (GGGGS) 肽连接小鼠 IgG1 重链恒定区序列，由南京金斯瑞生物科技有限公司进行序列优化和 DNA 合成，将优化合成为 pUC57-CD47-mFc 质粒和 pCHO1.0 质粒用 AVR II 和 BSTZ17 I 双酶切，琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段，用 T4 DNA 连接酶 16 ℃ 连接过夜，转化 DH5α 载体，挑取克隆，接菌，提取质粒，进行双酶切鉴定，鉴定正确的质粒送上海生工生物工程有限公司测序鉴定。双酶切质粒经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定，由电泳结果可知在 1 148 bp 处有明显条带，见图 1 池道 1，该条带与 pUC57-CD47-mFc 质粒经 AVR II 和 BSTZ17 I 双酶切后的电泳条带一致。经上海生工生物工程有限公司测序，测序结果与设计序列一致，由此可知本试验已成功地将 CD47-mFc 的核苷酸序列克隆入 pCHO1.0 载体。



M—GeneRuler Mix；1—pCHO1.0-CD47-mFc AVR II 和 BSTZ17 I 双酶切；2—pUC57-CD47-mFc AVR II 和 BSTZ17 I 双酶切

图 1 真核表达载体的双酶切鉴定

Fig.1 Eukaryotic Expression Vector Digested by Double Enzymes

2.2 CD47-mFc 蛋白的真核表达

2.2.1 CHO-S 细胞转染

采用脂质体法，将线性化后质粒 pCHO1.0-CD47-mFc 转染 CHO-S 细胞，检测 CD47-mFc 融合蛋白表达情况。质粒转染按照 FreestyleTM MAX 转染试剂使用说明书，CHO-S 细胞转染前 1 d 按照每 1 ml 0.5×10⁶ 个传代，转染当天计数，调整细胞密度为 1×10⁶ 个，37 ℃ 培养。然后配制转染溶液，将 50 μg 线性化质粒 pCHO1.0-CD47-mFc 加入

OptiPROTM SFM 培养基至 1.5 ml, 50 μ l FreestyleTM MAX 转染试剂加入 1.45 ml OptiPROTM SFM 培养基中, 分别混匀后, 将转染试剂混合液缓慢加入至 DNA 混合液中, 混匀室温静置 10 min 后, 将转染混合液缓慢滴加入 30 ml 的 CHO-S 细胞中。8% CO₂、37 °C、130 r/min 培养。转染 48 h 后, 不同浓度的嘌呤霉素和甲氨蝶呤加压, 经 2 轮加压, 细胞活力恢复至 90%, 冻存 4 支; 并取部分细胞以每 1 ml 0.3×10⁶ 个接种, 补料降温培养。采用补料培养基 C (Feed C, 美国 Gibco 公司) 隔天补料, 并于 d5 开始降温培养, 细胞生长曲线如图 2 所示, 细胞密度能达到 22.4×10⁶ 个, 在 32 °C 培养到 13 d 时, 细胞活率仍可达 93%, 表明细胞生长良好。

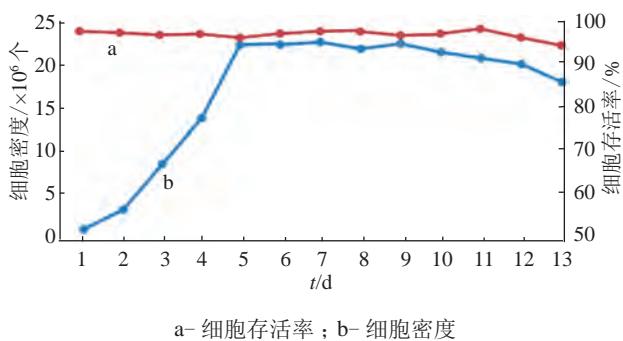


图 2 CHO-S-CD47-mFc 细胞补料培养生长曲线
Fig.2 CHO-S-CD47-mFc Cell Feed Culture Growth Curve

2.2.2 Fortebio 测定 CD47-mFc 稳转细胞库表达量

取细胞培养上清, 磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 分别进行 4 倍和 8 倍稀释, 以标准浓度的 IgG 作标准品, 用 PBST 稀释至 500、250、125、62.5、31.25、15.63、7.81、3.91 μ g/ml, 绘制标准曲线。以 protein A 做探针, 上样进行蛋白浓度测定。测定结果如图 3 所示, 4 倍稀释测出浓度在 80.5 μ g/ml; 8 倍稀释, 蛋白浓度在 40.2 μ g/ml, 标准曲线良好, 由结果计算可知, 构建的 CD47-mFc 稳转细胞库的细胞表达量达到 322 mg/L, 可方便地表达大量蛋白。

2.2.3 CD47-mFc 蛋白的纯化和鉴定

2.2.3.1 CD47-mFc 蛋白纯化

细胞培养上清, 采用 protein G 亲和色谱法进行纯化。首先用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4)

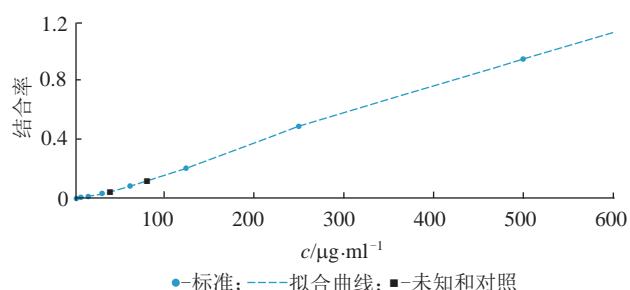


图 3 Fortebio 测定 CD47-mFc 细胞库表达量
Fig.3 Determination of CD47-mFc Cell Bank Expression by Fortebio

平衡 protein G 柱子, 将离心并经 0.4 μ m 滤膜过滤的细胞培养上清过柱, 然后用 20 mmol/L PBS (pH 7.4) 洗至 OD 值至基线, 以 20 mmol/L 枸橼酸溶液 (pH3.2) 洗脱, 收集峰值区的洗脱液, 调节 pH 值, 备用。SDS-PAGE 电泳后进行灰度扫描分析, 纯化后蛋白纯度大于 92%。

2.2.3.2 CD47-mFc 蛋白的鉴定

将 protein G 纯化后的蛋白与上样缓冲液混合, 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后样品转聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 加入兔抗人 CD47 抗体, 37 °C 孵育 2 h, 洗膜后加入羊抗兔 IgG-HRP 二抗, 37 °C 孵育 2 h, 洗涤 4 次, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色。CD47-mFc 蛋白的理论相对分子质量在 41 500, SDS-PAGE 结果见图 4, 显示其相对分子质量为 44 300 ~ 66 400, 因真核表达蛋白带有糖基化修饰, 相对分子质量电泳结果显示较大。Western Blot 结果见图 5, CD47-mFc 蛋白同兔抗人 CD47 抗体的特异性反应结果见泳道 1 和 2, 同阴性对照蛋白牛血清白蛋白无反应, 见泳道 3, 表达的蛋白为 CD47 胞外区特异性蛋白。

2.2.4 CD47 多克隆抗体的制备与血清效价测定

2.2.4.1 CD47 多克隆抗体的制备

取 A、B 两只新西兰兔为试验对象。将 2 mg 纯化的 CD47-mFc 与 2 ml 弗氏完全佐剂混合, 磁力搅拌器上乳化完全, 不同部位皮下多点免疫, 2 只新西兰兔均给予 500 μ g。2 周后, 将 1 mg CD47-mFc 与 1 ml 弗氏不完全佐剂混合后, 乳化完全, 对 2 只兔进行加强免疫 1 次, 间隔 2 周后再加强免

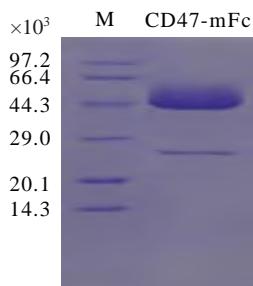


图 4 CD47-mFc SDS-PAGE 结果
Fig.4 CD47-mFc SDS-PAGE Results



M-Protein Marker ; 1,2-CD47-mFc 蛋白 ; 3- 牛血清白蛋白
图 5 CD47-mFc Western Blot 鉴定
Fig.5 Identification of CD47-mFc by Western Blot

疫 1 次，每次每只兔均给予 250 μg。共免疫 3 次。d 10 采血，收集血液，37 ℃恒温箱中放置 30 min，后 4 ℃放置过夜，4 ℃离心 (10 000×g) 10 min，收集血清。

2.2.4.2 抗血清的酶联免疫吸附 (ELISA) 法鉴定

CD47-His 蛋白包被 ELISA 板，每孔 20 ng，4 ℃包被过夜，质量分数 5% 的脱脂乳于 37 ℃封闭 2 h，加系列稀释的兔抗血清，37 ℃孵育 2 h，用 PBST 洗涤 3 次，加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 8 000) 孵育 40 min。用 PBST 洗涤 5 次，四甲基联苯胺 (TMB) 避光显色 10 min，2 mol/L 硫酸终止显色，酶标仪 450 nm 测定 OD 值。另采集免疫前新西兰兔的血清作为阴性对照。各组设 3 个复孔，进行试验，结果见图 6。由结果可知 A、B 两只新西兰兔均产生抗体，其中 B 兔产生的抗体滴度较高，可达 1 : 102 400。

3 讨论

肿瘤发病与机体免疫密切相关。正常情况下，肿瘤细胞会被免疫细胞清除，而在病理状态下，肿

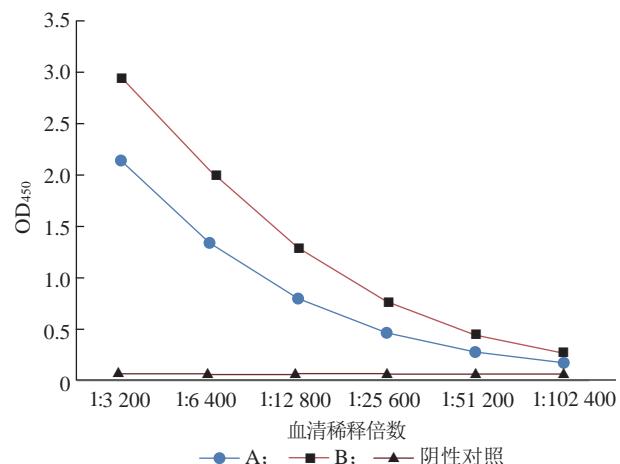


图 6 ELISA 法测定兔抗 CD47 抗血清的效价 (n=3)
Fig.6 Determination of Titer of Rabbit Anti-CD47 Antiserum by ELISA (n=3)

瘤细胞表面高表达 CD47 蛋白，借此逃避免疫识别，避免被巨噬细胞清除；利用抗 CD47 抗体，阻断 CD47-SIRP α 信号通路，可导致肿瘤细胞被巨噬细胞重新识别，从而杀伤、清除肿瘤细胞^[6]。郭亚楠等通过 Hek293T 瞬时转染的方法，表达小鼠 CD47-Fc 融合蛋白，此蛋白可与腹腔巨噬细胞表面的 SIRP α 相互作用^[7]。严学倩利用大肠埃希菌表达 Trx-His-hCD47，此蛋白能够与巨噬细胞上的受体 SIRP α 结合，能够促进巨噬细胞对 Jurkat 细胞的吞噬^[8]。本研究通过构建真核细胞表达系统，转染 CHO-S 细胞表达 CD47-mFc 融合蛋白，此方法可以方便地实现蛋白的高表达，蛋白带有 mFc 标签，可以方便地进行纯化，真核细胞表达蛋白为分泌性的糖基化蛋白，避免了原核表达系统蛋白的变性复性，蛋白带有糖基化修饰，更接近蛋白的天然结构，免疫动物可产生更多抗空间结构域的抗体，对新型抗体的发现作用巨大。以前，由于哺乳动物细胞培养困难、成本高、表达量低等原因，大家习惯用原核表达系统进行蛋白的表达，现在很多公司已推出成熟的真核表达系统，蛋白表达量达到 5 g/L，甚至 10 g/L^[9]，蛋白表达量高，并且蛋白的结构与活性更接近天然蛋白，真核表达系统也不失为蛋白表达的优良选择。

参考文献：

- [1] SICK E, JEANNE A, SCHNEIDER C, et al. CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, **167**(7): 1415-1430.
- [2] OHNISHI H, YAMADA M, KUBOTA M, et al. Tyrosine phosphorylation and association of BIT with SHP-2 induced by neurotrophins [J]. *J Neurochem*, 2010, **72**(4): 1402-1408.
- [3] BRIGHTWELL R M, GRZANKOWSKI K S, LELE S, et al. The CD47 “don’t eat me signal” is highly expressed in human ovarian cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2016, **143**(2): 393-397.
- [4] DISCHER D E. How does CD47-SIRP α “Don’t Eat Me Signal” physically signal self [J]. *Blood*, 2013, **122**(21): 953.
- [5] CHAO M P, MCKENNA K M, CHA A, et al. Abstract PR13: The anti-CD47 antibody Hu5F9-G4 is a novel immune checkpoint inhibitor with synergistic efficacy in combination with clinically active cancer targeting antibodies [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, **4**(11Supplement): PR13.
- [6] KIKUCHI Y, UNO S, KINOSHITA Y, et al. Humanized anti-CD47 antibody: US, 8759025 [P]. 2014-06-24.
- [7] 郭亚楠, 陈 阳, 崔利董, 等. 小鼠CD47-Fc融合蛋白表达载体构建、表达纯化及其生物学活性研究[J]. 郑州大学学报(理学版), 2018, **50**(2): 106-110.
- [8] 严学倩. CD47分子胞外段蛋白的表达及其对Jurkat细胞的作用研究[D]. 西安: 第四军医大学硕士学位论文, 2011.
- [9] LI F, VIJAYASANKARAN N, SHEN A Y, et al. Cell culture processes for monoclonal antibody production [J]. *MAbs*, 2010, **2**(5): 466-479.