

分类号: Q81

密 级: 公开

单位代码: 10363

学 号: 2220520113

基于理性设计提高人表皮生长因子稳定性

Improving the Stability of Human Epidermal Growth Factor Based on Rational Design

学 生 姓 名: 方旭娟

校 内 导 师: 王洲 副教授

校 外 导 师: 孙良玉

专业学位类别: 生物与医药

研 究 方 向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：方旭娟
日期：2025 年 5 月 15 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 __ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：方旭娟

指导教师签名：王洲

日期：2025 年 05 月 15 日

日期：2025 年 05 月 15 日

基于理性设计提高人表皮生长因子稳定性

摘 要

人表皮细胞生长因子（Human Epidermal Growth Factor, hEGF）是一种广泛存在于人体内具有生物活性的短链多肽，对机体多种细胞的增殖分化和迁移具有调节作用，广泛应用于皮肤修复、眼科疾病治疗、烧伤治疗、胃肠道疾病治疗、癌症研究、神经修复等领域。hEGF 能刺激皮肤细胞的增殖和迁移，加速伤口愈合，修复受损的胃肠道黏膜细胞，治疗胃溃疡、十二指肠溃疡等胃肠道疾病，还可以促进胶原蛋白和弹性蛋白的合成，增强皮肤弹性，减少皱纹等，其强大的生物学功能使其成为医学和美容领域的重要工具。然而在治疗应用中，hEGF 半衰期较短，在受损环境中易受蛋白酶水解、氧化应激及 pH 波动等多重因素影响，进而引发分子降解，为维持疗效常需通过高频率给药或增加剂量以确保有效浓度，这可能会可能导致生长因子受体过度激活，诱发靶细胞周期调控紊乱，表现出细胞异常增殖、间质细胞肥大，甚至引发肿瘤。因此，提高 hEGF 的稳定性，延长半衰期，以降低使用剂量是目前仍需面临的问题。为改善 hEGF 的稳定性，本课题进行了如下工作：

（1）利用计算机辅助药物设计方法指导人表皮生长因子的改造和筛选。以 hEGF 的晶体结构（PDB ID: 2KV4）作为初始结构，通过分子动力学模拟和温度因子 (B-factor) 分析蛋白结构中波动性较高的柔

性区域，位于 α 螺旋区域 7-11，不规则 β 转角区域 23-27，C-末端区域 48-53。结合丙氨酸扫描和多重序列比对结果，确定了 hEGF 中的 7 个氨基酸(ILE23, ILE38, LEU52, TRP49, LEU15, LEU26, PRO7)作为待突变位点，对这 7 个位点进行虚拟氨基酸饱和突变，得到 133 个单点突变，其中 9 个为稳定突变，借助打分函数并通过初始能量优化，挑选出 3 个突变体。

(2) 构建大肠杆菌重组菌株成功表达野生型 hEGF 和突变体 L15、I23、L26，优化重组菌株的发酵条件并纯化重组蛋白。根据氨基酸序列进行大肠杆菌密码子优化，人工合成 hEGF 和突变体的 cDNA 序列，构建重组菌株 BL21/pET-22b(+)-hEGF、BL21/pET-22b(+)-L15、BL21/pET-22b(+)-I23、BL21/pET-22b(+)-L26，发酵验证蛋白表达情况并检测重组蛋白含量。进一步探究发酵培养基种类，诱导时间，诱导温度，诱导剂浓度对发酵后可溶性 hEGF 表达的影响，得出重组菌株 hEGF 发酵最优条件为：TB 培养基作为发酵培养基，发酵温度为 20℃，诱导剂 IPTG 浓度为 1 mM，诱导时间 16 h。

(3) 对野生型 hEGF 和突变菌株 L15、I23、L26 的表达蛋白进行体外稳定性测定，细胞增殖实验验证其生物活性，并制备重组人表皮生长因子水凝胶，小鼠实验验证其对伤口愈合的促进作用。结果表明，三个蛋白突变体的热稳定性相对野生型均有提高，其中突变体 L15 在酸性条件下半衰期延长，但在碱性条件下稳定性略微变差，与之相反，I23 在碱性条件下半衰期延长，但在酸性条件下稳定性略微变差，L26 在酸碱条件下的半衰期均有延长表现，稳定性明

显提高。细胞增殖实验验证了 4 种重组蛋白均具有生物活性，将野生型 hEGF 和稳定性最好的 L26 与透明质酸结合制成水凝胶贴剂，通过小鼠伤口愈合实验证明了其对伤口呈现更好的愈合作用。

关键词：人表皮生长因子，理性改造，大肠杆菌表达系统，蛋白质稳定性，生物活性

IMPROVING THE STABILITY OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR BASED ON RATIONAL DESIGN

ABSTRACT

Human Epidermal Growth Factor (hEGF) is a short-chain polypeptide widely present in the human body with biological activity. It regulates the proliferation, differentiation, and migration of various cells in the body and is widely used in skin repair, ophthalmic disease treatment, burn treatment, gastrointestinal disease treatment, cancer research, and neural repair. hEGF stimulates the proliferation and migration of skin cells, accelerates wound healing, repairs damaged gastrointestinal mucosal cells, treats gastrointestinal diseases such as gastric ulcers and duodenal ulcers, and promotes the synthesis of collagen and elastin, enhancing skin elasticity and reducing wrinkles. Its powerful biological functions make it an important tool in the medical and cosmetic fields. However, in therapeutic applications, the half-life of

hEGF is relatively short, and it is susceptible to proteolysis, oxidative stress, and pH fluctuations in the damaged environment, leading to molecular structure degradation. To maintain efficacy, frequent administration or increased dosage is often required to maintain an effective concentration, which may lead to over-activation of growth factor receptors, inducing disordered regulation of the target cell cycle, manifested as abnormal cell proliferation, interstitial cell hypertrophy, and even tumors. Therefore, improving the stability of hEGF, prolonging its half-life, and controlling the appropriate dosage are still problems that need to be addressed. To improve the stability of hEGF, this project carried out the following work:

(1) Computer-aided drug design methods were used to guide the modification and screening of human epidermal growth factor. Using the crystal structure of hEGF (PDB ID: 2KV4) as the initial structure, molecular dynamics simulations and temperature factor (B-factor) analysis were used to identify highly flexible regions in the protein structure, located in the α -helix region 7-11, the irregular β -turn region 23-27, and the C-terminal region 48-53. Combined with alanine scanning and multiple sequence alignment results, seven amino acids in hEGF (ILE23, ILE38, LEU52, TRP49, LEU15, LEU26, PRO7) were identified as mutation sites. A virtual amino acid saturation mutation was performed on these 7 sites, resulting in 133 single point mutations, of which 9 were

stable mutations. Utilizing a scoring function and through initial energy optimization, 3 variants were selected.

(2) Recombinant *E. coli* strains were constructed to successfully express wild-type hEGF and mutants L15, I23, and L26. The fermentation conditions of the recombinant strains were optimized, and the recombinant proteins were purified. According to the amino acid sequence, the *E. coli* codon was optimized, and the cDNA sequences of hEGF and the mutants were artificially synthesized. Recombinant strains BL21/pET-22b(+)-hEGF, BL21/pET-22b(+)-L15, BL21/pET-22b(+)-I23, and BL21/pET-22b(+)-L26 were constructed. Fermentation was performed to verify protein expression and detect recombinant protein content. The effects of fermentation medium type, induction time, induction temperature, and inducer concentration on the expression of soluble hEGF after fermentation were further investigated. The optimal fermentation conditions for the recombinant strain hEGF were determined as: LB medium as the fermentation medium, fermentation temperature of 20°C, inducer IPTG concentration of 1 mM, and induction time of 16 h.

(3) The *in vitro* stability of the expressed proteins of wild-type hEGF and mutant strains L15, I23, and L26 was determined, and their biological activity was verified by cell proliferation and scratch assays. Recombinant human epidermal growth factor hydrogels were prepared,

and mouse experiments were conducted to verify their wound-healing promoting effect. The results showed that the thermal stability of the three protein mutants was improved compared to the wild type. The half-life of mutant L15 was prolonged under acidic conditions, but its stability was slightly worse under alkaline conditions. In contrast, the half-life of I23 was prolonged under alkaline conditions, but its stability was slightly worse under acidic conditions. The half-life of L26 was prolonged under both acidic and alkaline conditions, and its stability was significantly improved. Cell proliferation and cell scratch assays verified that the four recombinant proteins had biological activity. The wild-type hEGF and the most stable L26 were combined with hyaluronic acid to prepare hydrogel patches. Mouse wound-healing experiments demonstrated that they exhibited a better wound-healing effect.

Fang Xujuan (Biology and Medicine)

Supervised by Wang Zhou

KEY WORDS: human epidermal growth factor, rational design, *E. coli* expression system, protein stability, bioactivity

目录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
目录	VIII
第 1 章 绪论	1
1.1 表皮生长因子	1
1.1.1 表皮生长因子的发现	1
1.1.2 表皮生长因子的结构与特性	1
1.1.3 表皮生长因子的作用机制及生物学效应	2
1.2 人表皮生长因子的应用研究	3
1.2.1 hEGF 和伤口修复	3
1.2.2 hEGF 和肿瘤	3
1.2.3 hEGF 和胃肠溃疡	4
1.3 人表皮生长因子在大肠杆菌中表达的研究	4
1.4 提高多肽类药物的稳定性方法及策略	6
1.4.1 氨基酸替换	6
1.4.2 形成环形肽	6
1.4.3 多肽末端修饰	7
1.4.4 融合蛋白表达	8
1.5 本课题研究的意义与研究内容	8
1.5.1 研究意义	8
1.5.2 研究内容	9
第 2 章 计算机辅助人表皮生长因子的理性改造	10
2.1 前言	10
2.2 研究对象和技术平台	11
2.3 实验方法	11
2.3.1 丙氨酸扫描	11

2.3.2 多重序列比对	11
2.3.3 氨基酸虚拟突变	11
2.3.4 分子动力学模拟	11
2.4 结果与分析	12
2.4.1 hEGF 蛋白结构柔性区域分析	12
2.4.2 丙氨酸扫描结果分析	13
2.4.3 多重序列比对	14
2.4.4 饱和突变结果分析	14
2.4.5 均方根波动 (RMSF) 分析	15
2.5 本章小结	16
第 3 章 表达 hEGF 及其突变体的重组大肠杆菌的构建	17
3.1 前言	17
3.2 材料与仪器	18
3.2.1 菌株和质粒	18
3.2.2 实验材料与仪器	18
3.3 实验主要试剂配置	19
3.3.1 培养基的配置	19
3.3.2 主要溶液配制	20
3.4 实验方法	20
3.4.1 表达 hEGF 的重组大肠杆菌的构建	20
3.4.2 重组大肠杆菌蛋白表达及分离纯化	23
3.4.3 可溶性 hEGF 在大肠杆菌中高效表达条件的优化	24
3.4.4 大量表达及纯化	25
3.4.5 蛋白透析	26
3.4.6 酶联免疫吸附实验	26
3.5 结果与分析	27
3.5.1 生长曲线的绘制	27
3.5.2 阳性克隆子的验证	27
3.5.3 重组蛋白的诱导表达	28

3.5.4 发酵培养基的选择	29
3.5.5 诱导表达温度的优化	30
3.5.6 诱导剂浓度的优化	31
3.5.7 诱导时间的优化	32
3.5.8 响应面结果方差分析	33
3.5.9 响应面相互作用分析	34
3.5.10 重组蛋白的纯化	35
3.6 本章小结	36
第 4 章 重组人表皮生长因子性能研究及应用	37
4.1 前言	37
4.2 材料与仪器	38
4.2.1 实验材料与仪器	38
4.2.2 主要试剂配置	38
4.3 实验方法	39
4.3.1 体外稳定性检测	39
4.3.2 细胞增殖实验-生物活性验证	40
4.4 结果与分析	42
4.4.1 hEGF 突变体耐热性	42
4.4.2 hEGF 突变体耐酸碱性	43
4.4.3 hEGF 突变体在人工胃液中稳定性	45
4.4.4 hEGF 突变体在人工肠液中稳定性	46
4.4.5 细胞增殖实验	46
4.4.6 小鼠伤口愈合实验结果	48
4.5 本章小结	50
第 5 章 结论与展望	51
5.1 结论	51
5.2 展望	52
参考文献	53
致谢	60

第 1 章 绪论

1.1 表皮生长因子

1.1.1 表皮生长因子的发现

1962 年 Cohen^[1]对小鼠下颌腺分泌的液体进行研究时,发现了一种可促进新生小鼠提早开眼、长牙的多肽类物质,并将其命名为“齿睑因子”。1972 年, Savage 研究团队^[2]成功纯化并解析了一种由 53 个氨基酸组成的多肽,将其正式命名为表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)。1975 年, Gregory^[3]首次从人尿中分离出人源 EGF (human epidermal growth factor, hEGF), 该因子因表现出胃酸抑制功能最初被命名为“尿胃抑素”。后续分子生物学研究证实,尿抑胃素的 cDNA 序列与 hEGF 编码区完全相同,因而统一命名为人表皮生长因子。hEGF 是一种由人体多种组织中的细胞合成和分泌的多肽类物质,具有广泛的生物活性,它能够促进多种细胞的生长,并参与调控细胞的增殖、分化、凋亡等关键生物学过程^[4]。

1.1.2 表皮生长因子的结构与特性

hEGF 基因(染色体定位: 4q25-q27)具有典型的真核基因结构特征,包含 24 个外显子与 23 个内含子,其转录翻译产生的 1207 个氨基酸前体经剪切后释放出 53 个氨基酸的功能性成熟蛋白^[5]。hEGF 分子量大小为 6.2 kDa, 等电点为 4.6, 该分子包含 6 个半胱氨酸残基,它们通过分子内配对形成了三对二硫键(Cys6-20、Cys14-31、Cys33-42),这三对二硫键对维持蛋白质的空间构象和生物活性具有关键作用^[6]。表皮生长因子(EGF)表现出较强的稳定性特征:在-20℃条件下可长期保存而不失活;中性 pH 环境中,即使经 100℃高温处理 30 分钟仍能维持其活性;然而,在极端酸碱条件下进行相同的高温处理则会导致其活性^[7]。

hEGF 的二级结构特征为:一个由 β 转角连接的反向平行 β 折叠(残基 19-21 与 30-32),以及两段 α 螺旋结构-N 端螺旋(Leu8-Gly12)和 C 端螺旋(Leu47-Glu51)^[8]。Huang^[9]等通过核磁共振技术(NMR)解析了 hEGF 的溶液结构

(PDB ID: 2kv4)，发现其与 EGFR 结合时的构象在 C 端疏水核心区域存在差异。此外，Burgess 等^[10]研究发现 hEGF 结构中 Leu47 和 Tyr37 具有高度保守性，其中，Leu47 直接参与 EGF 与受体的结合作用，实验表明该位点发生突变时，会导致 EGF 的生物学活性显著下降。

1.1.3 表皮生长因子的作用机制及生物学效应

hEGF 是通过与表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 特异性结合发挥作用的。当 hEGF 与受体结合后，会促使受体形成同源二聚体，进而激活其酪氨酸激酶结构域，引发受体自身酪氨酸残基磷酸化，这些磷酸化位点作为分子开关，能够特异性结合下游效应蛋白，从而启动包括 PI3K-AKT、Ras-MAPK、PKC 和 STATs 在内的多条信号转导途径^[11]。在信号传递过程中，EGFR 及其配体复合物通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞内，部分被溶酶体降解以终止信号，另一部分则可再循环至细胞膜表面，实现受体的重复利用^[12]。这种动态调控机制确保了细胞对外界刺激的敏感性，同时维持了信号转导的高效性和可塑性，最终调控细胞增殖、分化等生物学功能。

hEGF 广泛存在于人体各种组织和体液中，能够促进多种细胞和组织的生长，调节着多种生理和病理过程。hEGF 在体内通过内分泌和旁分泌等方式作用于细胞，产生多种生物学效应，包括：hEGF 促使细胞内 DNA、蛋白质和细胞外大分子的合成，加速皮肤及角膜上皮等组织的成熟与再生。Wang 等^[13]研究发现 EGF 通过激活 HDAC6 促进 α -微管蛋白去乙酰化，进而增强角膜上皮细胞迁移能力，揭示了 HDAC6/ α -微管蛋白去乙酰化轴在角膜伤口愈合中的关键作用。hEGF 还可以抑制胃酸分泌，保护胃黏膜免受胃酸侵蚀，Koskenpato 等^[14]研究发现干燥综合征患者唾液 EGF 分泌减少可能导致胃体中质子泵阳性壁细胞功能受损，引发自身免疫性胃体胃炎。另外，hEGF 还与多种内分泌相互调节，影响皮质醇、生长激素等分泌，抑制雌二醇、甲状腺素等分泌；提升物质转运效率并促进糖代谢活动^[15,16]，通过介导小分子化合物跨膜运输，有效增加细胞内营养物质的积累等。

1.2 人表皮生长因子的应用研究

1.2.1 hEGF 和伤口修复

hEGF 能显著促进表皮细胞、成纤维细胞及上皮细胞等靶细胞的增殖，同时可上调细胞因子和胶原蛋白酶的合成，通过促进肉芽组织生成和加速创面再上皮化进程，最终实现伤口的高效修复^[17]。hEGF 作为伤口愈合剂已被广泛用于治疗糖尿病性溃疡、外科伤口修复和烧伤等方面，其中药物缓释载体成为研究热点。关于 hEGF 用于糖尿病性溃疡治疗方面，有研究证明 rhEGF 可以缩短糖尿病足溃疡愈合时间^[18]，而且 hEGF 与其他细胞生长因子联合使用时对糖尿病足溃疡伤口有更好的愈合作用^[19]。此外，研究发现利用含有重组人表皮生长因子（rhEGF）的新型喷雾型治疗慢性糖尿病足溃疡，也可以加快愈合速度，提高完全愈合率^[20]。关于 hEGF 用于外科伤口的治疗研究，一项纳入 4 项随机对照试验（294 例）Meta 分析证实，rhEGF 治疗慢性溃疡的完全愈合率显著高于安慰剂对照^[21]。2019 年，Lu 等^[22]制备制备了含维甲酸变形脂质体（TRADLs）和表皮生长因子阳离子变形脂质体（EGF CDLs）的双载药软膏，与游离药物相比，表现出优异的皮肤渗透性，应用于在烧伤模型中可加速创面闭合，愈合质量显著提升，烧伤治疗提供了新型脂质体递送系统，有希望作为烧伤治疗的局部治疗剂。Kim 等^[23]将表皮生长因子（EGF）与透明质酸（HA）结合制备成贴剂，提升了 EGF 透皮效率，延长了 EGF 在创面滞留时间，为 EGF 的透皮治疗慢性伤口提供了稳定高效的新型递送系统。研究表明^[24]，基于聚己内酯-透明质酸复合材料的纳米纤维支架能有效包封 EGF，并通过调控生长因子的缓释行为加速皮肤再生，为创伤修复的组织工程治疗提供了新策略。

1.2.2 hEGF 和肿瘤

hEGF 在肿瘤中具有双重角色。一方面，hEGF 在某些情况下可能具有抗肿瘤作用，比如诱导细胞分化或凋亡；另一方面，某些恶性肿瘤细胞能够自主分泌 EGF，通过与细胞表面 EGFR 的特异性结合，激活下游信号通路，进而促进肿瘤细胞的异常增殖、侵袭及转移，最终导致肿瘤恶性程度显著升高。临床观察显示，hEGF 虽然在恶性肿瘤进展中多呈现促癌效应，然而其特异性表达特征却为癌症预后评估提供了新的分子依据。Bracher 等^[25]首次证实黑色素瘤细胞分泌的高水平 EGF，通过上调血管内皮生长因子 C（VEGF-C）表达促进淋巴管

生成,进而介导淋巴结转移,临床队列显示血清 EGF 水平可作为预测淋巴结微转移的潜在生物标志物;Hao 等^[26]研究发现 EGF 和 TGF- α 在慢性胰腺炎和胰腺癌中呈异常高表达,其表达水平与疾病进展密切相关,可作为评估病情及临床诊断的潜在生物标志物;Chen 等^[27]在非小细胞肺癌研究过程中发现,检测呼出气冷凝液中的 EGF 水平对非小细胞肺癌的诊断、病情监测和预后评估具有重要意义。

1.2.3 hEGF 和胃肠溃疡

hEGF 作为多功能调节因子,具有多重胃保护作用:其一,通过抑制胃酸分泌减轻胃黏膜损伤;其二,促进胃肠黏膜上皮细胞的增殖与分化^[28],加速组织修复;其三,增加黏膜血流量以改善局部微循环。这些协同效应显著增强了其对胃溃疡的治疗效果,使其在胃肠道疾病治疗中具有重要价值。据研究报道发现,表皮生长因子(EGF)、肝细胞生长因子(HGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)能够通过上调环氧合酶-2(COX-2)的表达,改善胃黏膜微循环并减少胃酸分泌,进而促进胃溃疡修复,此外,这些生长因子不仅能增加胃部血流量,还能刺激溃疡边缘的新生血管形成^[29]。Sullivan 研究团队于 1991 年首次报道了应用 hEGF 成功治疗坏死性肠炎危重患儿的临床案例^[30]。Bang 等实验研究表明,基于 EGF 的溃疡涂层粉剂通过双重作用机制—止血和黏膜修复,显著改善胃溃疡动物模型的病理状态,并展现出良好的临床转化潜力^[31]。然而,鉴于 hEGF 可能诱导上皮细胞异常增殖及潜在致癌风险,当前针对其治疗胃肠道疾病的研究主要局限于动物实验阶段。其关于胃肠道溃疡治疗的临床应用仍需通过更深入的疗效与安全性评估来验证可行性。

1.3 人表皮生长因子在大肠杆菌中表达的研究

早期 hEGF 的制备主要采用离子交换层析技术从人尿中分离纯化,但该方法的提取效率较低。化学合成法虽曾被尝试用于 hEGF 生产,却面临产物活性不足和产量受限的问题。随着基因工程技术的进步,利用重组 DNA 技术高效制备具有生物活性的 hEGF 已成为现实。在早期尝试中,虽然通过磷酸三酯法人工合成的 hEGF 基因已导入大肠杆菌 K21,但可能受限于宿主细胞的蛋白降解机制,最终未能检测到目标蛋白的表达产物^[32]。1985 年, Oka 等^[33]通过将

hEGF 基因与大肠杆菌 *phoA* 信号肽融合并受 *phoA* 启动子调控，在磷酸盐限制条件下实现 hEGF 向大肠杆菌周质空间的分泌表达，证实信号肽引导是 hEGF 可溶性分泌的必要条件。1990 年，Chalmers 等^[34]探究温度对过量生成并分泌 β -内酰胺酶或人表皮生长因子（hEGF）的大肠杆菌菌株的作用，证明低温培养可改善质粒编码蛋白的生产稳定性及可溶性。1992 年，国内甘人宝等^[35]通过构建碱性磷酸酶启动子与信号肽序列大肠杆菌变异株 YK539 成功分泌表达成熟的生物活性完好的 hEGF。1997 年，赵忠良研究团队通过构建 GST-EGF 融合蛋白，证实经复性处理的融合蛋白仍保留 EGF 的生物活性，表明 GST 标签的融合表达不会影响 EGF 的功能特性^[36]。2001 年，Tong 等^[37]优化重组大肠杆菌 HB-101 发酵条件，在分批发酵中使 hEGF 浓度达 242 mg/L，并发现高乳糖培养基可有效降低杂蛋白污染。2006 年，Liu 等^[38]将利用鼠疫耶尔森菌 *CafI* 信号肽介导 hEGF 在大肠杆菌中跨内外膜分泌至周质和培养基，且分泌的 hEGF 保留促细胞分裂活性；Su 等^[39]通过 SUMO 标签融合 hEGF 基因并在 Origami（DE3）大肠杆菌中可溶性表达，结合 Ni-NTA 层析与 SUMO 酶切，获得高纯度的活性 hEGF 产量，解决了 hEGF 在大肠杆菌中因二硫键错配导致的低活性问题。2007 年，Abdull 等^[40]用 *OmpA* 信号序列，在大肠杆菌周质中实现了可溶性 hEGF 的表达，得到具有生物活性的 hEGF；Zhi 等^[41]构建 pPTD-hEGF 原核表达载体，在大肠杆菌中以包涵体形式高效表达膜透性 PTD-hEGF 融合蛋白，经镍柱纯化后获 16 kD 单一蛋白，质谱验证序列正确，且其促 HEK-293 细胞增殖活性显著。2008 年，Esipov 等^[42]利用 pTWIN1 载体表达融合蛋白，重组融合蛋白包含 N 端几丁质结合域、微型内含肽 *Ssp dnaB* 结构域及 C 端 hEGF 多肽，利用微型内含肽 *Ssp dnaB* 的自催化切割特性纯化蛋白。2009 年，Kim 等^[43]构建了含拟态弧菌金属蛋白酶胶原蛋白结合域（VMCBD）的 hEGF 融合蛋白，其较天然 hEGF 更有效地促进细胞生长。2013 年，Kwong 等^[44]在大肠杆菌中首次同时实现 bFGF 和 hEGF 的胞外上清与胞内裂解物双位点高效表达，且两者均具生物活性。2021 年，李凤等^[45]将 *Pep-1* 穿膜肽和 hEGF 融合表达，并优化诱导条件，实现可溶性融合蛋白表达量占总蛋白 21.58%，结合 GST 亲和层析与阴离子交换层析，hEGF 纯度可达到 92.57%。

1.4 提高多肽类药物的稳定性方法及策略

多肽作为与人体同源的生物大分子，凭借免疫原性低、可设计性强及生物相容性优势，在癌症治疗、药物递送及精准医疗中展现巨大潜力，成为现代医药领域的研究热点^[46]。相较于蛋白质，多肽分子具有更短的氨基酸序列和更简单的空间结构，其氨基酸残基易发生多种化学修饰，包括氧化还原、脱酰胺及水解等反应，同时可能伴随 β 消除和二硫键重排等现象^[47]，导致多肽结构稳定性降低，进而限制了其作为药物开发的潜力。为改善多肽类药物的稳定性，同时提高生物利用度，延长其在血浆中的半衰期，从而降低用药剂量，避免一些潜在副作用，研究者探索了多种修饰和改造策略，例如定点突变或氨基酸替代^[48]、多肽链首尾连接环化^[49]、PEG或脂肪酸链修饰多肽末端^[50]、以及与半衰期长的内源蛋白融合表达^[51]等。

1.4.1 氨基酸替换

多肽链主链和侧链间的结构稳定性主要依赖静电作用维持，通过对单个或多个氨基酸实施替换，增强多肽链间的静电作用，以提升抗酶解能力并延长生物活性持续时间，最终达到延长血浆半衰期的目的^[52]。Chen等^[53]研究发现组氨酸（His）对增加肽链的稳定性和降低细胞毒性起到了至关重要的作用，将肽链中的两个Lys全部替换为His后，多肽的稳定性得到了明显提高，半衰期延长至11 h。采用丙氨酸扫描技术，Björklund等^[54]证实CTT肽中的色氨酸残基对其明胶酶抑制功能具有决定性作用，该发现为优化肽类抑制剂提供了重要依据。通过定点突变替代不稳定的氨基酸或插入结构稳定的氨基酸也可以提高多肽稳定性，如将白介素-6中成游离状态的第125位的Cys替换成丙氨酸（Ala）或者丝氨酸（Ser）后，白介素-6的生物活性翻倍，半衰期也从几分钟延长到了1.2 h^[55]。Wunderlich等^[56]对枯草芽孢杆菌中冷休克蛋白CspB进行研究，将M1R、E3K、K65L和E66L这4个突变基团连接在CspB的特定部位后，该蛋白的耐热性有了显著提升，并且稳定性也有明显的增强。

1.4.2 形成环形肽

相较于直链肽线性结构，环形肽通过二硫键介导的分子内环化一首尾连接或半胱氨酸成环，可消除末端游离的氨基和羧基，从而有效规避蛋白酶对肽链端基的特异性识别与降解，显著提升其结构稳定性和生物活性^[52]。将肽链的N

端和 C 端进行环化，可以极大的提高肽链的稳定性和延长半衰期^[57]，Bogdanowich-Knipp 等^[58]通过对比研究揭示：线性 RGD 肽因结构柔性较高易发生降解，而通过侧链与末端氨基酸环化形成的环状 RGD 肽可显著增加反应原子的空间位阻，增强分子刚性，从而大幅提升其稳定性。Chan 等^[59]将戈美辛（Gomesin）首尾相连形成环肽，研究发现环化的 Gomesin 对 HaLa 细胞的毒性增加 3 倍，并且抗疟原虫和抗菌活性都有显著提高，环肽折叠时半胱氨酸之间生成了二硫键提高了多肽结构的稳定性。Rozek 等^[60]在 CP-11 中插入 2 个 Cys 残基形成 cycloCP-11 环肽，发现该环肽在胰酶中的半衰期相比于 CP-11 的半衰期长 4.5 倍。Chen 等^[61]在多肽中插入 2 个半胱氨酸，每条肽链中的 Cys 进行连接促使其形成二聚体，二聚体的形成稳定了肽链的 α -螺旋结构，同时也对二聚体的螺旋结构的疏水作用进行改善。

1.4.3 多肽末端修饰

多肽末端修饰的核心目标在于提升其抗蛋白酶降解能力，常见策略为末端引入脂肪链或 PEG 基团，通过延长肽链及增强疏水相互作用来稳定结构^[62]。其中脂肪酸作为人体脂质的基本结构单元，其修饰可显著提升药物的脂溶特性，促进肠道吸收效率，优化药物-受体相互作用，同时改善药物的稳定性和生物活性，并有效降低免疫反应风险^[63]。而 PEG 化修饰作为一种成熟的蛋白修饰技术，能与蛋白质分子形成共价连接，构建亲水性保护层，还能增加分子体积，延缓肾脏清除速率，从而延长药物作用时间^[64]。研究证实引入脂肪链可显著提高多肽稳定性，Wang 等^[65]在研究多肽的抗病毒活性的过程中，发现如果将脂肪酸连接到 m4HR 的 C 端时，其抗 HIV-1 活性明显提高了 200 倍。Lee 等^[66]给小鼠进行皮下注射药物时，发现利用棕榈酸对 Ex4-C16 进行修饰后，Ex4-C16 的稳定性明显提高，相比没有修饰的 Ex4-C16，体内存留时间从 2 d 延长至 10 d。此外研究表明，PEG 修饰具有增强稳定性、延长多肽在体内和体外半衰期、避免蛋白酶降解、降低免疫原性等优点，同时还有效提高了蛋白质多肽类药物的临床效果，是目前此类药物最常用的修饰剂^[67]。Zhang 等研究者^[68]通过 PEG 与 R8 的偶联修饰，有效中和了 R8 分子表面的正电荷，这种修饰策略不仅减少了其与血浆蛋白的非特异性结合，还显著提升了 R8 的体内稳定性，确保其能够靶向递送至目标组织。将非格司亭进行 PEG 修饰后，给药周期会得以延长，由原来

的每天注射一次延长至每周注射一次^[68]。目前已经有许多多肽类药物经 PEG 修饰后上市，如 PEG 修饰后的重组生长激素（PEG-rhGH）^[69]、PEG 修饰的水蛭素^[70]等。

1.4.4 融合蛋白表达

将多肽类药物与活性良好、血浆半衰期长的内源蛋白进行结合后，能够延长多肽类药物的半衰期。HSA 作为人体循环系统中主要的转运蛋白，可以与很多内源性物质（如脂肪酸、激素、维生素等）和外源性的物质（如药物分子等）可逆性地结合^[71]。研究人员为了提高干扰素（IFN- α ）的稳定性，将其与 HSA 进行融合形成 IFN- α -HSA 复合物，检测到复合物在短尾猴体内的半衰期比没有被 HSA 修饰的 IFN- α 要延长约 18 倍^[72]。免疫球蛋白（IgG）是人血清中最丰富的蛋白质之一，每个 IgG 都是两条重链和两条轻链组成，重轻链之间通过二硫键连接，Fc 受体（FcRn）是能够识别 IgG 的特异性受体，也是唯一一种可以跨越黏膜屏障运输 IgG 的受体^[73]。利用基因工程技术，将 IgGFc 抗体分子和作用蛋白进行融合形成抗体融合蛋白，该融合蛋白既具有 IgGFc 区的效应结构域，还具有更长的半衰期，因此，能够更好的激发机体的免疫应答作用^[74]。

1.5 本课题研究的意义与研究内容

1.5.1 研究意义

人表皮生长因子（hEGF）作为一种重要的多肽类生物活性分子，在皮肤修复、溃疡治疗和化妆品等领域具有广泛的应用前景。然而，其在治疗应用中的局限性，如半衰期短、易降解以及潜在的副作用（如细胞异常增殖、纤维化和疤痕形成等），严重限制了其更广泛的临床应用。因此，如何通过分子水平的理性改造提高 hEGF 的结构稳定性、延长其半衰期并降低副作用，是当前需要面临的关键问题。

近年来，随着计算生物学和分子动力学模拟技术的快速发展，科研人员能够通过计算机模拟技术深入研究多肽分子的构效关系，预测其稳定性关键区域，并筛选潜在的改造靶点。本研究以提高 hEGF 的体外稳定性为目的，利用氨基酸虚拟突变和分子动力学模拟等多肽药物物理性设计技术，对 hEGF 进行了系统性改良和筛选。通过计算机模拟筛选出可能影响其稳定性的关键氨基酸残基，

并利用体外实验平台对筛选出的 hEGF 突变体进行稳定性和生物活性的验证。实验结果表明,改造后的 hEGF 突变体在高温、极端 pH 和蛋白酶存在条件下表现出稳定性的提高,同时保持了其促进细胞增殖和迁移的生物学活性。hEGF 稳定性的提高有利于在医学和化妆品等领域的更广泛应用,同时也为其他多肽药物的理性设计与优化提供了一定的理论依据和实践参考。

1.5.2 研究内容

主要包括以下几个方面:

1. 利用计算机辅助药物设计方法指导人表皮生长因子的改造和筛选,通过丙氨酸扫描和虚拟氨基酸突变等技术,筛选出三个稳定性提高的人表皮生长因子突变体 L15、I23 和 L26,并对突变体进行分子动力学模拟和轨迹分析。
2. 构建大肠杆菌重组菌株成功表达野生型 hEGF 和突变体 L15、I23、L26,优化重组菌株的发酵条件并纯化重组蛋白。得出重组菌株 hEGF 发酵最优条件为:LB 培养基作为发酵培养基,发酵温度为 20℃,诱导剂 IPTG 浓度为 1mM,诱导时间 12 h。
3. 对野生型 hEGF 和突变体 L15、I23、L26 的进行体外稳定性测定,其中突变体 L26 稳定性最好,通过细胞增殖和划痕验证重组蛋白的生物活性,并制备重组人表皮生长因子水凝胶,小鼠伤口实验验证其对伤口愈合的促进作用,且 L26-HA 促进伤口效果优于 hEGF-HA。

第2章 计算机辅助人表皮生长因子的理性改造

2.1 前言

人表皮生长因子（hEGF）作为一类重要的细胞信号调节蛋白，通过与细胞膜表面的表皮生长因子受体（EGFR）特异性结合，激活下游一系列复杂且精细的信号转导通路，包括 Ras/Raf/MEK/ERK、PI3K/AKT 等经典信号级联反应，进而在细胞生长、增殖、分化以及迁移等关键生理过程中发挥核心调控作用^[75]。在创伤修复进程中，hEGF 能够显著促进上皮细胞的有丝分裂，加速细胞周期进程，增强细胞的迁移能力，通过上调整合素等黏附分子的表达，促使上皮细胞快速覆盖创面，极大地缩短慢性伤口的愈合周期。于皮肤再生医学范畴，hEGF 可有效刺激成纤维细胞合成并分泌胶原蛋白、弹性纤维等细胞外基质成分，重塑皮肤的细胞外基质网络结构，改善肌肤的紧致度与弹性，在延缓皮肤衰老、改善皮肤质地方面展现出卓越功效。

hEGF 作为小分子多肽的氨基酸数量相比蛋白质来说较少，在机体内很容易被蛋白酶降解，严重限制了其在实际临床应用与商业开发中的效能发挥。在常温储存或常规运输条件下，hEGF 易发生变性，导致生物活性丧失。传统随机诱变筛选，建立突变文库多依赖于繁琐且盲目性较高的实验试错。研究人员往往需要耗费大量的人力、物力与时间，在众多可能的改造方案中反复尝试，不仅成本高昂，成功率也难以得到保证。

随着计算机技术的快速发展，计算机辅助蛋白质理性设计（Computer-Aided Protein Rational Design, CAPRD）为精准改造蛋白多肽分子结构、优化其性能提供了高效且可靠的手段。通过结合生物信息学、分子动力学模拟、虚拟氨基酸突变等技术，研究人员能够在分子水平上深入解析多肽的结构与功能关系，筛选出稳定性更高、活性更强的突变体。此外，分子动力学模拟能够揭示蛋白质多肽在生理环境下的动态行为，为理性设计提供重要的构象动态信息。

2.2 研究对象和技术平台

人源性表皮生长因子的蛋白结构(PDB ID: 2KV4) 来源于 RCSB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>); Discovery Studio 2019 Client 主要用于计算机辅助多肽设计及分子动力学模拟。

2.3 实验方法

2.3.1 丙氨酸扫描

将 hEGF 蛋白结构导入 Discovery Studio 2019 软件, 在 Tools Explorer 中展开 Macromolecules | Prepare Protein, 点击 Clean Protein 对蛋白的结构进行预处理, 点击 Apply Forcefield 赋予蛋白 CHARMM 力场, 选中所有待突变氨基酸后, 展开 Macromolecules | Design Protein, 点击 Calculate Mutation Energy (Stability), 设置突变位点为 Single Mutations, 将所有的氨基酸突变为 ALA, 其余参数采用默认设置, 点击 Run 执行操作, 运行结束后双击 Jobs Explorer 中相应的行, 打开 Report 页面查看丙氨酸扫描结果^[46]。

2.3.2 多重序列比对

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站上寻找不同物种以及人源 EGF 家族成员的 EGF 样结构域序列, 利用 SnapGene 软件分进行序列比对, 找出 hEGF 序列的保守位点^[76]。

2.3.3 氨基酸虚拟突变

使用 DS 的 Calculate Mutation Energy (Stability) 模块完成饱和突变, 将蛋白结构预处理并赋予 CHARMM 力场后, 启动 Calculate Mutation Energy 程序, 设置 Mutation Sites 为 Single Mutations, 根据丙氨酸扫描和多重序列比对结果选择关键的氨基酸, 将其突变为其他 19 种标准氨基酸, 根据突变能大小筛选出最佳突变位点, 保存为突变体的初始结构。

2.3.4 分子动力学模拟

将 hEGF 蛋白结构和突变体初始结构导入 Discovery Studio 2019 软件, 在 Standard Dynamics Cascade 模块进行 200 ns 的分子动力学模拟, 先在 prepare protein 模块进行蛋白结构预处理, 添加 CHARMM 力场和溶剂环境, 并在 Standard Dynamics Cascade 模块进行能量优化、升温、平衡、采样, 使用参数

设置如下：升温阶段由 50 K 逐渐上升到 300 K，模拟时间设置为 2 ps，其中平衡阶段模拟时间设置为 20 ps，模拟采样阶段时间设置为 200 ns，模拟环境为恒温恒压（NPT），其他参数默认。分析分子动力学模拟结果，在 Analysis Trajectory 模块计算野生型 hEGF 和突变体的 RMSF 值并分析。

2.4 结果与分析

2.4.1 hEGF 蛋白结构柔性区域分析

蛋白质的柔性结构域和热不稳定区域往往是引发其构象解折叠的关键位点，这些区域可作为稳定性改造的重要靶点。通过分析蛋白晶体结构的温度因子（B-factor）和分子动力学模拟的均方根波动(RMSF，Root Mean Square Fluctuation)，表现为 B-factor 和 RMSF 值显著升高，可有效识别这些高柔性区域^[77]。hEGF 氨基酸残基标准化后的 B-factor 可以借助 ba2r 软件直接从 hEGF 晶体结构中提取并统计，如图 2-1 所示，B 因子值区域较高位于 N-末端 1-13 和不规则 β 转角 21-29。采用 Discovery Studio 软件对 hEGF 蛋白进行 200 ns 分子动力学模拟，通过轨迹分析计算均方根波动（RMSF）值，以评估其结构动态特征，如图 2-2 所示，具有较高波动性区域位于 N-末端 7-11、 β 转角 25-27 和 C-末端 40-45、50-53。温度因子 (B-factor) 数值较大和均方根波动数值较大的区域具有一致性。

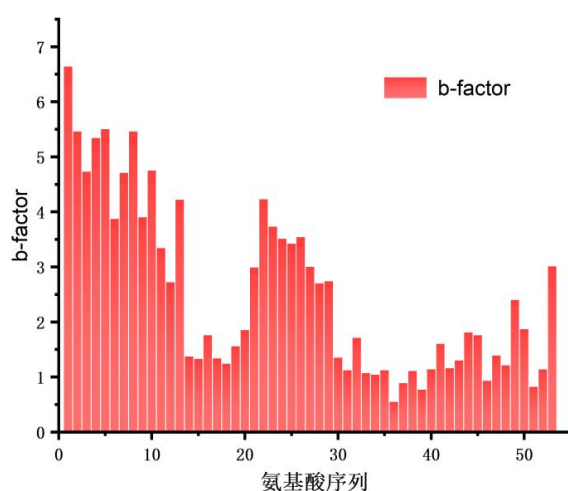


图 2-1 野生型 hEGF 的 B-factor 分析

Figure 2-1 B-factor analysis of wild-type hEGF

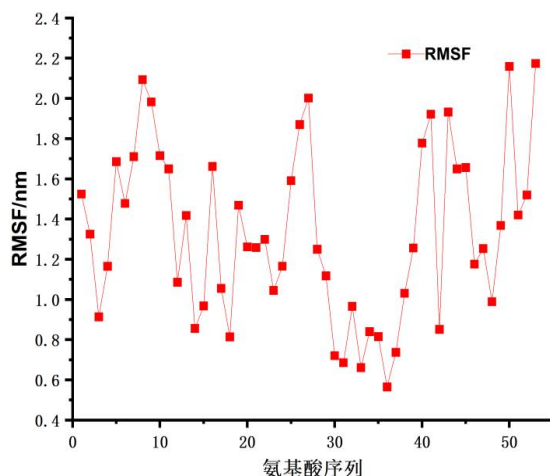


图 2-2 野生型 hEGF 的 RMSF 分析

Figure 2-2 RMSF analysis of wild-type hEGF

2.4.2 丙氨酸扫描结果分析

丙氨酸扫描可以确定维持蛋白质天然构象所必需的关键残基。如果某个位点的丙氨酸突变导致蛋白质结构崩塌或显著失稳,说明该残基对折叠和稳定性至关重要^[78]。通过对 hEGF 蛋白结构进行丙氨酸扫描,发现表 2-1 中的 19 个氨基酸,在突变为 ALA 时会处于不稳定状态,可能是影响稳定性的关键氨基酸。

表 2-1 丙氨酸扫描结果

Table 2-1 Alanine scanning results

Mutation	MutationEnergy (kcal/mol)	Effect
A:GLY18>ALA	6.36	DESTABILIZING
A:GLY39>ALA	3.58	DESTABILIZING
A:ILE23>ALA	1.81	DESTABILIZING
A:LEU47>ALA	1.61	DESTABILIZING
A:ILE38>ALA	1.41	DESTABILIZING
A:LEU52>ALA	1.05	DESTABILIZING
A:TRP49>ALA	0.88	DESTABILIZING
A:LEU15>ALA	0.87	DESTABILIZING
A:LEU26>ALA	0.87	DESTABILIZING
A:PRO7>ALA	0.86	DESTABILIZING
A:VAL34>ALA	0.86	DESTABILIZING
A:TYR37>ALA	0.84	DESTABILIZING
A:ARG45>ALA	0.78	DESTABILIZING
A:HIS10>ALA	0.75	DESTABILIZING
A:LEU8>ALA	0.73	DESTABILIZING
A:GLU51>ALA	0.72	DESTABILIZING
A:ARG41>ALA	0.68	DESTABILIZING
A:GLU24>ALA	0.6	DESTABILIZING
A:SER2>ALA	0.52	DESTABILIZING

2.4.3 多重序列比对

在 NCBI 网站搜寻与 hEGF 同源的 11 个物种的 EGF 样结构域的序列，分别为：*Homo sapien*、*Equus caballu*、*Bos taurus*、*Oryctolagus cuniculus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Gallus gallus*、*Callinectes arcuatus*、*Iconisemion striatum*、*Mustela putorius furo*、*Strongylocentrotus purpuratus*，利用 SnapGene 进行序列比对，比对结果如图 2-3 所示，其中 CYS6 和 GLY39 是保守位点。同理在 NCBI 网站搜寻人源 EGF 家族的成员表皮生长因子（EGF），双调蛋白(AR)， β 纤维素(BTC)，肝素结合性 EGF (HB-EGF)，转化生长因子 (TGF- α)的序列并比对，比对结果如图 2-4 所示，其中 GLY18，CYS20，GLY39，ARG41，CYS42 为高度保守位点，高度保守位点突变会影响 hEGF 的亲合性和稳定性。结合文献报告 LEU47 和 TYR37 是高度保守的，其突变会导致表皮生长因子的活性极大降低。最终确定氨基酸 ILE23，ILE38，LEU52，TRP49，LEU15，LEU26，PRO7，VAL34，ARG45，HIS10，LEU8，GLU51，GLU24，SER2 为 hEGF 的突变位点。

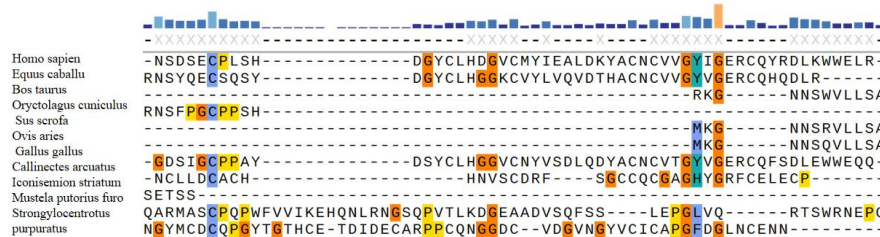


图 2-3 不同物种的 EGF 序列比对图

Fig 2-3 EGF sequence alignment of different species

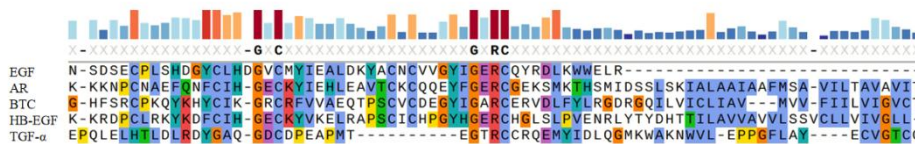


图 2-4 EGF 家族序列比对图

Fig 2-4 sequence alignment of EGF family

2.4.4 饱和突变结果分析

根据突变前后的自由能差，选择前列 ILE23，ILE38，LEU52，TRP49，LEU15，LEU26，PRO7 作为突变位点，进行单点饱和突变，将 Results 栏中 Mutation Energy Terms 结果按照突变能从低到高排列。突变能在 +0.5 kcal/mol

与-0.5 kcal/mol 之间，说明该突变对多肽的稳定性没有产生影响，显示 Nature；当突变能小于-0.5 kcal/mol 时，说明该突变能够提高多肽的稳定性，显示 Stabilizing^[46, 79]。通过饱和突变共获得 133 个单位点突变，其中 9 个是稳定突变，如表 2-2 所示，借助打分函数和初步能量优化，选择了 3 个突变体：LEU15>GLN，ILE23>ARG，LEU26>PHE。

表 2-2 单点稳定性突变结果

Table 2-2 Single-point stability mutation results

Mutation	MutationEnergy (kcal/mol)	Effect
A:LEU26>PHE	-2.31	STABILIZING
A:LEU26>ARG	-2.12	STABILIZING
A:LEU26>TYR	-1.79	STABILIZING
A:LEU15>GLN	-1.52	STABILIZING
A:ILE23>ARG	-1.15	STABILIZING
A:ILE23>PHE	-0.78	STABILIZING
A:ILE23>TYR	-0.73	STABILIZING
A:ILE38>PHE	-0.68	STABILIZING
A:ILE38>TYR	-0.52	STABILIZING

2.4.5 均方根波动 (RMSF) 分析

均方根波动是计算体系中各个原子相对于其平均位置的涨落，是原子位置偏移量对于时间的平均变化情况，能够指明整个模拟过程中蛋白质体系的柔性和运动的剧烈程度^[75]。将野生型 hEGF 和 3 个突变体的氨基酸中进行 200ns 的分子动力学模拟，根据 RMSF 评估多肽的构象波动，RMSF 值越小说明氨基酸的运动涨幅越小，构象越稳定^[80]。如图 2-5 所示，三个突变体蛋白结构的整体运动涨幅均小于野生型 hEGF，其中突变体 I23 所有氨基酸的 RMSF 值都小于野生型 hEGF，变化最稳定；突变体 L15 的 RMSF 曲线在 Tyr13、Tyr29、Glu40 三处出现峰值，RMSF 值分别达到 1.76 nm、1.63 nm、1.86 nm，但均低于 hEGF 峰值 2.33 nm；同理，突变体 L26 的 RMSF 曲线在 Leu8、Tyr29、Arg45 三处出现峰值，RMSF 值分别达到 2.16 nm、1.47 nm、1.70 nm，也均低于 hEGF 峰值 2.33 nm。综上所述，说明三个突变体理论上稳定性比野生型高。

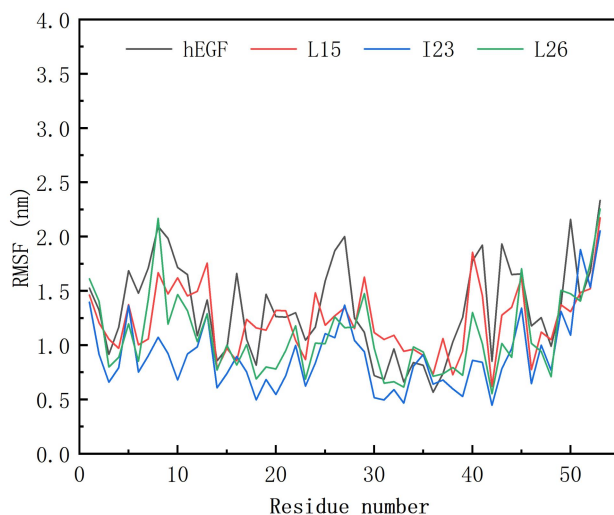


图 2-5 模拟体系 RMSF 的变化图

Fig 2-5 RMSF variation plot of the simulated system

2.5 本章小结

本章主要利用计算机辅助药物设计方法指导人表皮生长因子的改造和筛选，通过对野生型 hEGF 蛋白晶体结构的温度因子 (B-factor) 和均方根波动(RMSF) 数值进行分析，初步评估其柔性区域主要位于 N-末端 1-12 和 β 转角 23-28，可以作为改造蛋白稳定性的靶标。在 DS 软件中进行丙氨酸扫描确定了 19 个影响 hEGF 稳定性的关键氨基酸，通过已有文献报道和多重序列比对，排除 LEU47、TYR37、GLY18、GLY39 和 ARG41 等高度保守位点后，选取 7 个突变能高的氨基酸位点进行虚拟氨基酸饱和突变，通过计算获得共获得 133 个单位点突变，其中有 9 个稳定突变，借助打分函数和初步能量优化结果，选择 LEU15>GLN、ILE23>ARG、LEU26>PHE 这 3 个突变体，对野生型 hEGF 和突变体进行 200 ns 分子动力学模拟和轨迹分析，评估多肽的构象波动，三个突变体氨基酸的运动涨幅相对野生型都有所降低，其中 I23 的 RMSF 值最低，变化最稳定。

第 3 章 表达 hEGF 及其突变体的重组大肠杆菌的构建

3.1 前言

hEGF 在临床应用方面潜力巨大，但其天然来源的产量限制严重制约了实际应用需求^[81]。随着重组 DNA 技术的发展，利用基因技术规模化生产高活性 EGF 已成为现实，有效解决了产量瓶颈问题^[75]。大肠杆菌作为外源蛋白表达的经典模式宿主系统，因其突出优势在生物技术领域获得广泛应用。其基因组结构简约且遗传背景明晰，便于实施精确的基因操作与遗传改造；而且完备的载体 - 宿主系统为外源基因的高效表达构筑了坚实保障；此外，该菌株具备增殖速率快、培养条件高度可控等特性；更为关键的是，重组蛋白在该系统中能够保持较高稳定性。本研究使用了 BL21(DE3)/pET-22b(+)表达系统进行异源表达，其中 BL21 (DE3)菌株缺失了 lon 和 ompT 蛋白酶基因，可以有效减少了外源蛋白的降解，为蛋白稳定表达提供了良好的宿主环境。pET-22b(+)载体带有 T7 噬菌体启动子，可在 IPTG 诱导下实现高效转录，其具有 pelB 信号肽序列，能够引导重组蛋白进行周质空间分泌表达，并在目标蛋白的 C 端添加了 6×His 标签，有利于后续蛋白纯化工作。

进一步提高大肠杆菌异源表达 rhEGF 的产量和活性，需要对发酵培养条件进行优化。在培养基配方方面，采用富含多种营养成分的复合培养基，如添加适量酵母提取物、蛋白胨等，为大肠杆菌生长和外源蛋白合成提供充足营养；在温度方面，诱导前较高温度 37°C 有利于促进大肠杆菌快速增殖，诱导表达阶段适当降温至 25-30°C，有助于减少包涵体形成，提升可溶性 rhEGF 的稳定性和活性；在诱导发酵时间方面，若发酵时间过短，大肠杆菌未能充分表达 rhEGF，产量会远低于预期，发酵时间过长，一方面，菌体生长进入衰退期，营养物质逐渐耗尽，有害代谢产物积累，导致细胞活力下降，可能引发菌体自溶，不仅影响 hEGF 的进一步合成，还会使后续蛋白纯化难度加大。另一方面，长时间的发酵可能导致 hEGF 发生降解或错误折叠，降低其活性。

表 3-2 主要实验仪器

Table 3-2 Main Experimental Instruments

仪器名称	生产厂家
高温高压灭菌锅	日本 sanyo
超纯水机	和泰
组合式摇床	太仓市强乐实验设备有限公司
全自动酶标仪	赛默飞世尔仪器有限公司
pH 计	上海生工
高速离心机	赛默飞世尔仪器有限公司
超净台	苏州净化
恒温培养箱	天津津腾实验设备有限公司
PCR 仪	Applied Biosystems
恒温磁力搅拌器	上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司
循环水式多用真空泵	郑州长城科工贸有限公司
台式低速离心机	湖南湘仪有限公司
超声波细胞粉碎机	新芝生物科技有限公司

3.3 实验主要试剂配置

3.3.1 培养基的配置

培养基类型	培养基配方
TB 培养基	称取 1.2% (M/V) 胰蛋白胨, 2.4% (M/V) 酵母提取物, 0.4% (V/V) 甘油, 蒸馏水定容至 1 L, 在 115℃ 高压条件下灭菌 20 min; 再加 100 mL 过滤除菌的 0.17 mol/L KH ₂ PO ₄ 和 0.72 mol/L K ₂ HPO ₄ 的溶液。
2×YT 培养基	称取 1.6% (M/V) 胰蛋白胨, 1.0% (M/V) 酵母提取物, 0.5% (M/V) 氯化钠, 蒸馏水定容至 1 L, 在 121℃ 高压条件下灭菌 20 min。
MBL 培养基	称取 1.0% (M/V) 胰蛋白胨, 0.5% (M/V) 酵母提取物, 0.5% (M/V) 氯化钠, 蒸馏水定容至 1 L, 在 121℃ 高压条件下灭菌 20 min; 再加 10 mL 过滤除菌的 20% (M/V) 麦芽糖溶液。
SOB 培养基	称取 2.0% (M/V) 胰蛋白胨, 0.5% (M/V) 酵母提取物, 0.5% (M/V) 氯化钠, 0.25% (M/V) 氯化钾, 蒸馏水定容至 1 L, 在 121℃ 高压条件下灭菌 20 min; 冷却后再加 10 mL 过滤除菌的 1 M 氯化镁溶液 (终浓度为 10 mM)。

3.3.2 主要溶液配制

PBS 缓冲液：KH₂PO₄ 0.24 g/L，Na₂HPO₄ 1.44 g/L，NaCl 8 g/L，KCl 0.2 g/L，调 pH 至 7.4，在 121℃高压条件下灭菌 20 min。

0.8%琼脂糖凝胶：称取琼脂糖 0.24 g，加入 30 mL 1 × TAE 缓冲液，加热至琼脂糖完全溶解，待温度降至 60℃左右后，加入 1 μl 核酸染料 Goldview 轻摇混匀，倒入制胶板等待凝固。

考马斯亮蓝染色液：称取考马斯亮蓝（R250）0.4 g，加入 90 mL 乙醇和 20 mL 冰醋酸，用蒸馏水定容到 200 mL，避光保存。

脱色液：40 mL 乙醇和 5 mL 冰醋酸混合，再加入 50 mL 蒸馏水，混匀保存。

Binding Buffer（pH 7.4）：称取 2.75984 g NaH₂PO₄，2.8392 g Na₂HPO₄，29.2215 g NaCl，用蒸馏水配置成 1 L 的缓冲液，调 pH 至 7.4，并用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

Wash Buffer（pH 7.4）：称取 2.75984 g NaH₂PO₄，2.8392 g Na₂HPO₄，29.2215 g NaCl，1.3616 g 咪唑，加入适量蒸馏水搅拌溶解，用蒸馏水定容至 1 L，调 pH 至 7.4，并用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

Elution Buffer（pH 7.4）：称取 2.75984 g NaH₂PO₄，2.8392 g Na₂HPO₄，29.2215 g NaCl，34.04 g 咪唑，加入适量蒸馏水搅拌溶解，用蒸馏水定容至 1 L，调 pH 至 7.4，用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

3.4 实验方法

3.4.1 表达 hEGF 的重组大肠杆菌的构建

3.4.1.1 编码 hEGF 和突变体的 cDNA 的全合成

在 NCBI 检索 hEGF 的氨基酸序列，结果为：NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYIEALDKYA CNCVVG YIGE RCQYRDLKWW ELR。依据氨基酸序列，按如下要求进行人工合成：1.采用大肠杆菌密喜好码子；2.合成的 cDNA 序列不包含 Aval、XhoI、NotI、EagI、HindIII、SalI、SacI、EcoRI、BamHI、NcoI 等酶切位点；3.优化后的序列 5'端加有 EcoRI 酶切位点，3'端加有 XhoI 酶切位点，并在 5'端加入一个碱基 G 以补全移码。合成的 hEGF 和 3 个突变体的基因序列如下：

hEGF:ATGAATAGTGATAGTGAATGTCCCCTATCTCACGACGGCTACTGC
CTGCATGACGGCGTGTGCATGTATATCGAGGCGCTGGATAAATACGCATGTA
ACTGCGTTGTCGGTTATATTGGTGAACGTTGTCAGTACCGCGATTTGAAGTG
GTGGGAGCTGCGT.

L15:ATGAATAGTGATAGTGAATGTCCCCTATCTCACGACGGCTACTGCC
AGCATGACGGCGTTTGTATGTATATCGAGGCGCTGGATAAATACGCATGTAA
CTGCGTCGTGGGTACATTGGTGAGCGCTGCCAATATCGTGATTTGAAGTG
GTGGGAACTGCGT.

I23:ATGAATAGTGATAGTGAATGTCCCCTATCTCACGACGGCTACTGCTT
GCATGACGGCGTGTGCATGTATCGTGAGGCTCTGGATAAATACGCGTGTA
CTGCGTTGTCGGTTATATCGGTGAACGTTGTCAGTACCGCGATCTGAAGTG
GTGGGAGCTGCGT.

L26:ATGAATAGTGATAGTGAATGTCCCCTATCTCACGACGGCTACTGCC
TGATGACGGCGTTTGTATGTATATCGAGGCGTTGATAAATACGCATGTAA
CTGCGTCGTGGGTACATTGGTGAGCGCTGCCAGTATCGTGATTTGAAGTG
GTGGGAACTGCGT.

3.4.1.2 质粒抽提

从-80℃冰箱中取出含有 pET-22b(+)空载体的大肠杆菌保种管，平衡至室温后接种于 LB 培养基（50 μg/mL 氨苄青霉素）活化，活化后菌悬液转移至 LB 培养基 37℃过夜培养。将过夜培养的菌液低温离心收集菌体，用质粒小抽提试剂盒进行质粒抽提，提取出的质粒保存于-20℃备用，使用 NanoDrop 测定质粒浓度，并进行琼脂糖凝胶电泳检测验证。

3.4.1.3 目的片段和质粒的双酶切

对合成的 hEGF 及突变体基因片段与空载体 pET-22b(+)分别进行双酶切处理，具体酶切体系详见表 3-4。

表 3-4 双酶切反应体系

Table 3-4 Double enzyme digestion reaction system

组分	体积 (μL)
质粒或目的基因片段	10
EcoRI 限制性内切酶	1
XhoI 限制性内切酶	1
10x Quickcut Buffer	2
Water, nuclease-free	6
总反应体系	20

混合体系在 37℃ 条件下水浴反应 1 h，随后分别进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳操作，进行胶回收纯化后，于 -20℃ 环境下保存。

3.4.1.4 连接

借助 T₄ 连接酶将经酶切处理的 hEGF 及突变体基因片段与质粒 pET-22b(+) 进行连接，反应过程中两者摩尔比设定为 2:1，在 25℃ 下孵育连接 1 小时，具体连接反应体系见表 3-5。

表 3-5 连接反应体系

Table 3-5 Reaction system of ligation

组分	体积 (μL)
Linear vector DNA	4
Insert DNA	8
10x T ₄ DNA Ligase buffer	2
Thermo Scientific T ₄ DNA Ligase	1
Water, nuclease-free	5
Water, nuclease-free	20

3.4.1.5 感受态细胞的制备

通过 CaCl₂ 法制备获得大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞，具体方法参考文献^[82]，最后加入 2 mL 0.1 M CaCl₂ 重悬菌体并分装至 1.5 mL 离心，-80℃ 冰箱保存。

3.4.1.6 重组质粒的转化

通过热激法转化重组质粒，具体方法参考文献^[82]，最后吸去 900 μL 上清，剩余液体与沉淀轻柔吹打混匀，均匀涂布到有氨苄青霉素抗性 LB 平板上，倒置培养过夜。

3.4.1.7 阳性菌株的验证

挑取单克隆转化子至 LB 培养基过夜，第二天进行菌液 PCR 扩增，并对产物进行琼脂糖凝胶电泳验证，观察是否得到预期大小的目的条带，将验证阳性

的菌株送去测序分析（由南京金斯瑞科技有限公司完成测序）。菌液 PCR 体系和运行程序见表 3-6，表 3-7。

表 3-6 菌液 PCR 体系
Table 3-6 Bacterial Colony PCR System

组分	用量
上游引物	2 μ L
下游引物	2 μ L
模板 DNA	1 μ L
DNA Polymerase	25 μ L
ddH ₂ O	补足至 50 μ L

表 3-7 PCR 运行程序
Table 3-7 PCR Protocol

阶段	温度	时间	循环数
预变性	98°C	3 min	1
变性	98°C	10 s	34
退火	55°C	5 s	
延伸	72°C	1 min/1 kb	
终延伸	72°C	5 min	1
保存	4°C	∞	

3.4.2 重组大肠杆菌蛋白表达及分离纯化

3.4.2.1 蛋白小量表达

挑取阳性单克隆，接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 5 mL 液体 LB 培养基中，在 37°C，200 rpm 条件下过夜培养，随后，将种子液按 4 %接种量接入 25 mL LB 发酵培养基中，于 37°C，200 rpm 培养至对数期（菌液 OD₆₀₀ 约为 0.6），加入 IPTG 诱导剂至终浓度 0.5 mM，接着将摇床温度调至 25°C，以 180 rpm 继续诱导培养 12 h。发酵液在 4°C、8000 rpm 下离心 5 min，弃上清，收集的菌体沉淀用去离子水洗涤 3 次，再用 10 mL pH 7.4 的 PBS 缓冲液重悬，最后使用超声细胞破碎仪(冰浴，功率 400 W，破碎 3 s，间隔 5 s) 超声破碎 15 min。

3.4.2.2 Tricine-SDS-PAGE 检测

Tricine-SDS-PAGE 凝胶的配置和蛋白电泳参考文献^[83]和小分子量蛋白凝胶制备试剂盒，分离胶和浓缩胶配方见下表 3-7。跑胶结束后加入考马斯亮蓝染色

液静置染色 2 h，蒸馏水漂洗数次除去多余染色液后，再加入脱色液在摇床上低速过夜脱色，直至蛋白条带清晰。

表 3-8 Tricine-SDS-PAGE 配方
Table 3-8 Formula table of Tricine-SDS-PAGE

组分	16.5%分离胶 (7 mL)	4%浓缩胶 (2mL)
49.5%T 3%C	/	0.16 mL
49.5%T 6%C	2.33 mL	/
Gel Buffer	2.33 mL	0.496 mL
Glycerol	0.75 mL	/
H ₂ O	1.59 mL	1.344 mL
10% APS	62 μ l	20 μ l
TEMED	7.78 μ l	3 μ l

3.4.3 可溶性 hEGF 在大肠杆菌中高效表达条件的优化

3.4.3.1 培养基筛选实验

将活化后的种子液以 4%接种量转接至 5 种含氨苄青霉素的液体培养基 (LB、TB、2×YT、MBL、SOB) 中，每管 25mL，待菌液达到对数期 (OD_{600} 约为 0.6) 时，加入 IPTG 至终浓度 0.5 mM，在 25°C，180 rpm 条件下诱导表达 12 h，随后进行超声细胞破碎，离心收集上清液，通过 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测上清液中目标蛋白表达水平。

3.4.3.2 诱导温度优化

将活化后种子液以 4%接种量接入 25 mL 含氨苄青霉素的 TB 培养基中，当菌液达到对数期时，加入 0.5 mM IPTG 诱导剂，并分别设置 16°C，20°C，23°C，30°C 和 37°C 五个温度梯度，在 180 rpm 转速下诱导培养 12 h，经超声破碎和离心处理后，对上清样品进行 Tricine-SDS-PAGE 分析，评估不同温度对目的蛋白表达的影响。

3.4.3.3 IPTG 浓度优化

在 25mL 含氨苄青霉素的 TB 培养基中接种 4%的活化种子液，对数生长期时，分别添加 0.25 mM、0.5 mM、1 mM 和 2 mM 四种终浓度的 IPTG，于最佳诱导温度 20°C、180 rpm 条件下培养 12 h，破碎细胞后取上清，通过 Tricine-SDS-PAGE 电泳比较不同诱导剂浓度下蛋白表达差异。

3.4.3.4 诱导时间优化

将 4%接种量的种子液培养于 25 mL 含氨苄青霉素的 TB 液体培养基中，达

到对数期后加入 1 mM IPTG，在 20℃、180 rpm 条件下诱导培养。分别于诱导后 8 h、12 h、14 h、16 h、18 h 和 20 h 取样，经超声破碎和离心处理后，利用 Tricine-SDS-PAGE 电泳分不同时间点蛋白表达动态变化。

3.4.3.5 响应面实验

在单因素试验基础上，以诱导时间（A）、诱导温度（B）和诱导剂浓度（C）为自变量，以破碎液上清中 hEGF 的浓度为因变量，进行 Box-Behnken 响应面试验设计（表 3-9）。

表 3-9 响应面 Box-Behnken 试验设计

Table 3-9 Response surface Box-Behnken experimental design			
水平	因素		
	诱导时间（A）	诱导温度(B)	诱导剂浓度（C）
-1	12 h	16℃	0.5 mM
0	16 h	20℃	1 mM
1	20 h	24℃	1.5mM

3.4.4 大量表达及纯化

选取野生型 hEGF 和 3 个突变体的阳性单克隆接种 LB 液体培养基中活化，按 4%接种量将种子液接种于 100 mL 氨苄青霉素抗性 TB 液体培养基中，培养至对数期后加入 1 mM IPTG，在 20℃，180 rpm 条件下诱导培养 16 h。菌体经 4℃、10000 rpm 离心 30 分钟后收集，用 PBS 缓冲液洗涤两次，再用磷酸盐缓冲液（详见 3.3.2 Binding Buffe）重悬。超声破碎后于相同条件下离心，收集上清液并通过 0.45 μm 滤膜过滤，最后采用镍柱亲和层析进行蛋白纯化。利用 AKTA pure 系统和 His Prep HP 亲和层析柱纯化样品，操作步骤如下：

（1）水洗：将预装好的镍柱连接上 AKTA pure 系统，用超纯水冲洗系统和镍柱约 5-10 个柱体积，直至 UV 基线平衡，除去系统和镍柱中的乙醇。

（2）平衡：用 5-10 个柱体积磷酸盐缓冲液（详见 3.3.2 Binding Buffe）平衡系统，直至 UV 基线平衡，保证介质中的溶液的组分和 pH 一致。

（3）上样：样品经过离心，过滤（0.45μm 滤膜）后低速上样，流速设定为 2 mL/min。

（4）洗杂：用 10-20 个柱体积低浓度咪唑的磷酸盐缓冲液（详见 3.3.2 Wash Buffe）冲洗柱子，除去镍柱上非特异性吸附的杂蛋白，直至基线平衡。

（5）洗脱：用高浓度咪唑的磷酸盐缓冲液（详见 3.3.2 Elution Buffer）

进行洗脱，并收集出现 UV 峰的样品，Tricine-SDS-PAGE 检测洗脱液中蛋白。

(6) 水洗和保存：用超纯水低速冲洗系统至 UV 基线稳定，除去镍柱中的洗脱液，再用 20%乙醇冲洗系统，最后卸下镍柱-4℃保存。

3.4.5 蛋白透析

洗脱液中含有高浓度咪唑，长时间对蛋白活性产生影响，因此需要进一步透析除去咪唑。将透析袋剪成适当 10-12 cm 的小段，用 2% (M/V) NaHCO_3 和 1 mM EDTA (pH 8.0) 依次将透析袋煮沸 10 min，用超纯水彻底清洗透析袋，冷却后置于 30%酒精，存放 4℃冰箱待用，确保透析袋始终浸没在液体中。使用前用超纯水将透析袋里外酒精冲洗干净，取 5-10 ml 含有目的蛋白的洗脱液加入处理后的透析袋中，放入含 1 L 透析液 PBS 的量杯内于低速搅拌透析 24 h，定时更换透析液，透析结束后将透析袋中的蛋白溶液倒入干净的样品管中并真空冷冻干燥，得到蛋白冻干粉保存在-20℃。

3.4.6 酶联免疫吸附实验

使用人表皮生长因子(EGF)ELISA 试剂盒 (Human EGF ELISA Kit) 定量 hEGF 蛋白的浓度。制备在 0 至 250 pg/mL 范围内的 EGF 标准品的系列稀释液，并使用酶标仪在 450 nm 处测量样品中 hEGF 蛋白的量。所有测量均重复进行两次，结果计算为两次读数的平均值，使用“四参数 logistics 模型”绘制标准曲线。标准品 EGF 标准曲线见图 3-2。

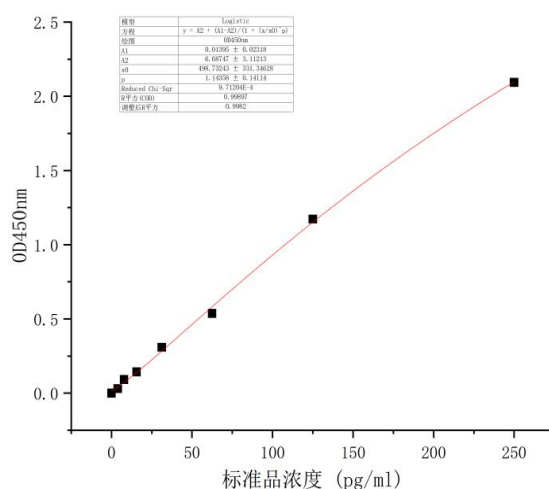


图 3-2 标准品 EGF 标准曲线

Fig.3-2 Standard EGF Standard Curve

3.5 结果与分析

3.5.1 生长曲线的绘制

宿主菌 BL21(DE3)在 LB 液体培养基的生长曲线如下图 3-3 所示：在 0 到 8 小时之间，细菌呈现缓慢生长；而在 9 到 12 小时之间，OD₆₀₀ 值从 0.15 左右增至 1.0 左右，细菌生长速度迅速加快，大肠杆菌 BL21(DE3)进入对数生长期，12 小时后进入稳定生长期，菌株浓度保持稳定，波动较小。由于大肠杆菌菌株在对数生长阶段具有较高的新陈代谢活性，对外界环境非常敏感，因此选择在对数期的菌液制备感受态细胞，提高后续重组质粒转化的成功率。

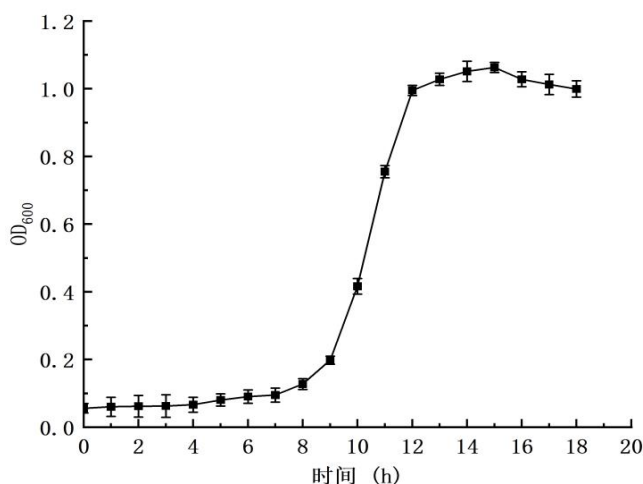


图 3-3 大肠杆菌生长曲线

Fig.3-4 Recombinant *Escherichia coli* growth curve

3.5.2 阳性克隆子的验证

挑取 LB 平板上野生型 hEGF 和突变型 L15、I23、L26 的单菌落进行菌液 PCR 鉴定，扩增引物均为 T7/T7t，序列见表 3-10，PCR 结果显示扩增产物的条带大小约为 445 bp，与预期目的基因的大小相符，同时作为阴性对照的 BL21 空菌株未见 445 bp 大小的条带，表明选取的单菌落为阳性克隆子，后续测序结果也证明单克隆菌中含有目的基因。将四株重组菌命名为重组菌 hEGF、重组菌 L15、重组菌 I23、重组菌 L26。菌液 PCR 结果如图 3-4。

表 3-10 菌液 PCR 引物

Table 3-10 Colony PCR primers

引物名称	序列
T7	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG
T7t	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

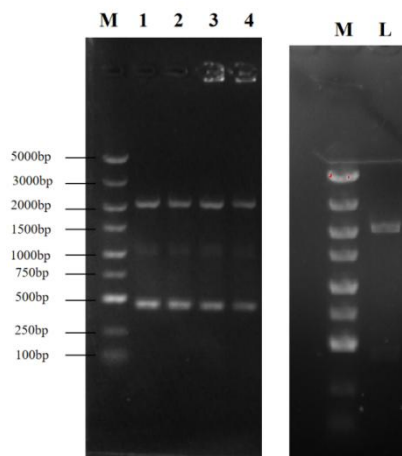


图 3-4 阳性克隆子验证

Fig.3-4 Positive clone verification

M: 5000bp DNA marker; 泳道 1: 重组菌 hEGF; 泳道 2: 重组菌 L15; 泳道 3: 重组菌 I23; 泳道 4: 重组菌 L26; L: 阴性对照 BL21(DE3)。

3.5.3 重组蛋白的诱导表达

将四株重组菌在 LB 培养基的摇瓶中小量诱导发酵 12 h, 诱导温度为 20°C, 发酵结束后收集菌体超声破碎后进行 Tricine-SDS-PAGE, 结果如图 3-5 所示, 破碎上清中有条大小约为 10.8 kDa 的蛋白, 与预期目的蛋白大小一致, 显示重组菌在诱导后成功表达了目的蛋白, 还需要进一步优化发酵条件, 提高可溶性表皮生长因子在宿主菌的表达, 后续将从发酵培养基选择、诱导发酵温度、诱导发酵时间和诱导剂浓度进行优化。

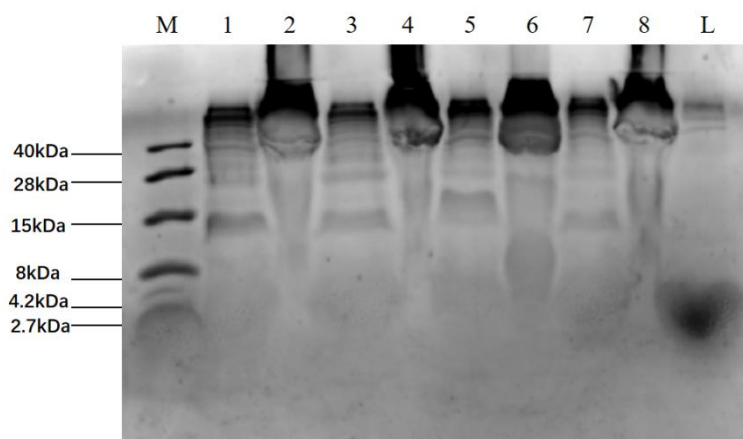


图 3-5 重组蛋白的诱导表达

Fig.3-5 Induced expression of recombinant protein

M: Protein marker; 1: 重组菌 hEGF 破碎后上清; 2: 重组菌 hEGF 破碎后沉淀; 3: 重组菌 L15 破碎后上清; 4: 重组菌 L15 破碎后沉淀; 5: 重组菌 I23 破碎后上清; 6: 重组菌 I23 破碎后沉淀; 7: 重组菌 L26 破碎后上清; 8: 重组菌 L26 破碎后沉淀; L: 空白对照 BL21(DE3)破碎后上清。

3.5.4 发酵培养基的选择

培养基的营养成分差异会直接影响微生物的生长和重组蛋白的表达，选择合适的发酵培养基可以提高目标产物的产量和质量，降低生产成本，提高发酵过程的稳定性和效率，因此，选择了大肠杆菌系统表达 rhEGF 常见的五种培养基即 LB 培养基、2×YT 培养基、TB 培养基、MBL 培养基、SOB 培养基作为发酵培养基，以重组菌 hEGF 作为出发菌株，根据菌液 OD₆₀₀ 和 Tricine-SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达情况。如图 3-6 和 3-7 所示，相同条件下，大肠杆菌在 TB 培养基中菌液浓度最高，OD₆₀₀ 值达到 3.1，说明生长速度最快，可以在更短的时间内获得大量的菌体，从而提高 rhEGF 的产量；同样的，大肠杆菌在 TB 培养基中菌液的破碎上清蛋白条带最清晰，说明其可溶性 rhEGF 表达量也高于其他四种培养基，最终选择 TB 培养基作为发酵培养基。

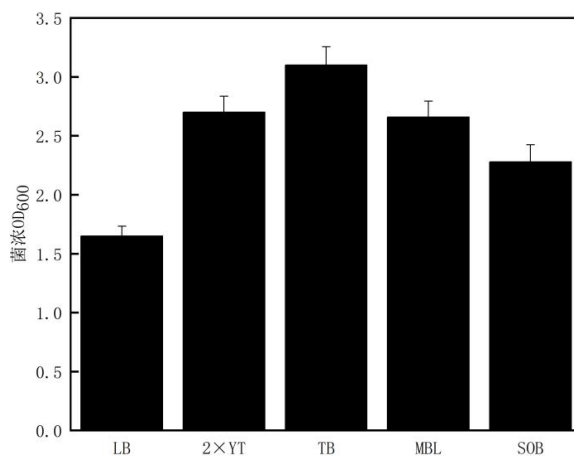


图 3-6 不同培养基中菌液浓度

Fig. 3-6 Bacterial Culture Concentration in Different Media

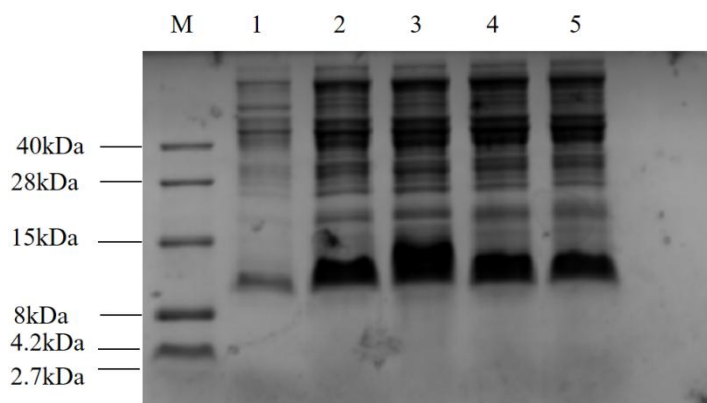


图 3-7 培养基类型对 hEGF 可溶性表达的影响

Fig.3-7 The influence of medium types on the soluble expression of hEGF

M: Protein marker; 1: LB 培养基; 2: 2×YT 培养基; 3:TB 培养基; 4: MBL 培养基; 5: SOB 培养基。

3.5.5 诱导表达温度的优化

大肠杆菌的最适宜的生长温度是 37-39℃，但在较高温度下外源蛋白多以包涵体形式存在，相反 16-30℃低温有利于可溶性蛋白的表达^[84]。为寻找最适合可溶性蛋白诱导表达的温度，选择几个的温度梯度 16℃、20℃、23℃、25℃、28℃、30℃，诱导发酵 12 h，根据菌液 OD₆₀₀ 和 Tricine-SDS-PAGE 分析可溶性蛋白的表达情况。如图 3-8 和 3-9 所示，菌液浓度随着温度增加而呈现上升趋势，较高温度更有利于细胞的生长但易生成包涵体，蛋白可溶性表达含量最高的是 20℃。由于在低温培养条件下，细菌代谢速率减缓导致蛋白合成速度下降，这使得新生肽链有更充足的时间完成正确折叠，同时降低了重组蛋白的降解风险，从而显著提升其稳定性^[85]。但同时温度过低的话大肠杆菌将停止生长，外源蛋白的表达也会停止。最终选择 20℃作为最佳诱导发酵温度。

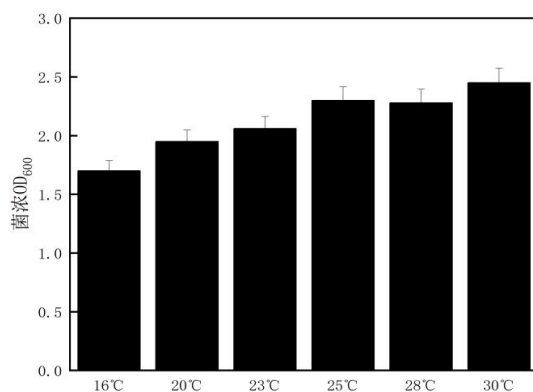


图 3-8 不同发酵温度的菌液浓度

Fig. 3-8 Cell Concentration at Different Fermentation Temperatures

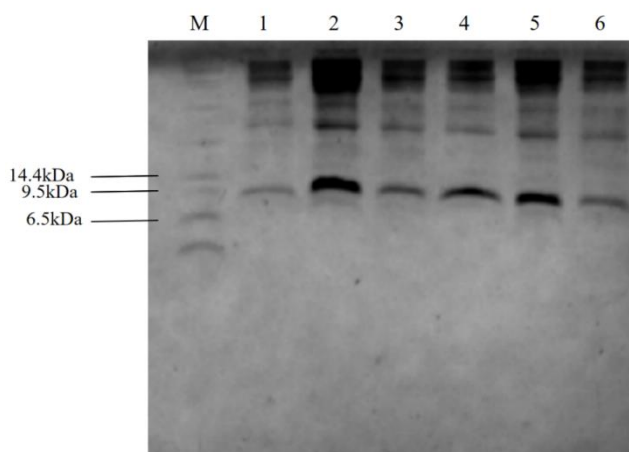


图 3-9 发酵温度对 hEGF 可溶性表达的影响

Fig. 3-9 The influence of fermentation temperature on the soluble expression of hEGF

M: Protein marker; 1: 16℃; 2: 20℃; 3: 23℃; 4: 25℃; 5: 28℃; 6: 30℃。

3.5.6 诱导剂浓度的优化

IPTG 即异丙基- β -D-硫代半乳糖苷，是半乳糖苷的硫代衍生物，能够与阻遏蛋白结合，使阻遏蛋白构象发生变化，解除对基因转录的抑制，从而启动下游基因的表达^[86]，但 IPTG 对细胞有一定的毒性，浓度过高不仅资源浪费也会抑制菌体的生长，不利于异源蛋白的合成。选择 0.25 mM、0.5 mM、1 mM 和 2 mM 四个诱导浓度进行实验，结果如图 3-10 和 3-11 所示，IPTG 浓度为 1 mM 时，菌液浓度达到最高值，同时可溶性蛋白表达量也处于最佳水平。这表明在该浓度下，既能有效诱导 hEGF 基因的表达，又能将对菌体生长的不利影响控制在最小范围内，实现了诱导效果与菌体生长的最佳平衡。选择 1 mM IPTG 作为最佳诱导剂浓度。

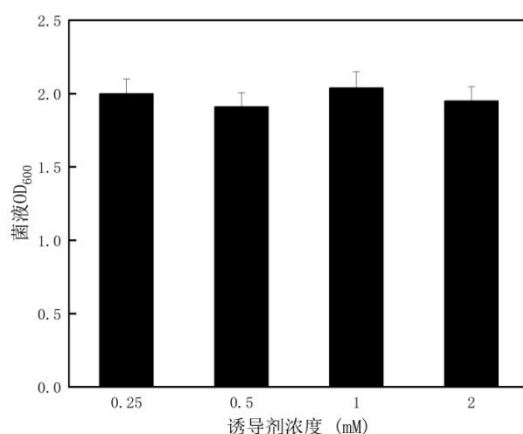


图 3-10 不同诱导剂浓度的菌液浓度

Fig. 3-10 Bacterial Culture Concentration at Different Inducer Concentrations

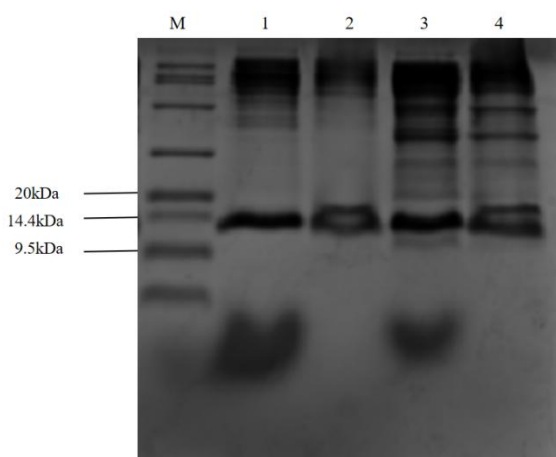


图 3-11 诱导剂浓度对 hEGF 可溶性表达的影响

Fig. 3-11 The effect of Inducer Concentration on soluble expression of hEGF

M: Protein marker; 1: 0.25 mM IPTG; 2: 0.5mM IPTG; 3: 1mM IPTG; 4: 2mM IPTG。

3.5.7 诱导时间的优化

在重组菌对数期加入 1 mM IPTG，20℃低温诱导培养 8 小时后，为进一步确定诱导大肠杆菌分表达 rhEGF 的最适时间，每隔 2 小时取样一次，并补充等量 TB 培养基，样品测定菌液 OD₆₀₀后放入 4℃冰箱保存，取样结束后一起超声破碎取上清进行 Tricine-SDS-PAGE。结果如图 3-12 和 3-13 所示，菌液浓度在诱导发酵 18 小时后达到最高值，培养 20h 后菌液浓度和蛋白表达量都明显有所下降，可能是大肠杆菌菌体开始自溶，重组蛋白发生降解。诱导 12 和 16 小时蛋白条带最清晰，可溶性蛋白表达量最高，蛋白的表达量并不是随着表达时间的延长而不断增加的，可能原料不足或重组蛋白发生降解。选择最佳诱导表达时间为 16 小时。

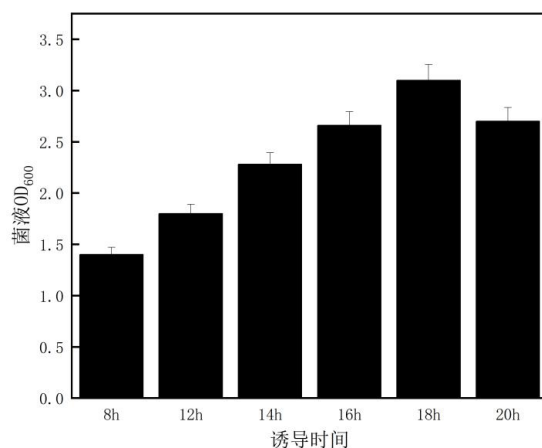


图 3-12 不同诱导时间的菌液浓度

Fig. 3-12 Bacterial Concentration at Different Induction Times

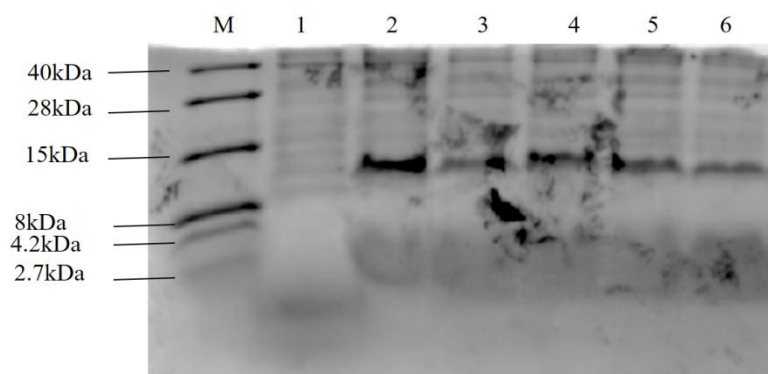


图 3-13 诱导时间对 hEGF 可溶性表达的影响

Fig. 3-13 The influence of induction time on soluble expression of hEGF

M: Protein marker; 1: 8h; 2: 12h; 3: 14h; 4: 16h; 5: 18h; 6: 20h.

3.5.8 响应面结果方差分析

利用 Design Expert 8 软件设计三因素三水平的响应面实验，实验结果如表 3-11 所示。根据表 3-11 结果进行多元回归拟合，得到多项回归方程： $Y = -3273.13600 + 153.31994A + 194.05938B + 651.76350C - 0.31391AB + 1.06250AC - 1.32125BC - 4.55591A^2 - 4.65169B^2 - 327.03800C^2$

由表 3-12 方差可以看出，模型的 P 值小于 0.0001，说明模型极显著。失拟项 P 值大于 0.05，说明该模型的失拟项差异不显著影响响应值的各因素均已包含在模型范围内，回归模型中无失拟因素存在，模型拟合度好^[87]。相关系数 $R^2 = 0.9941$ ，调整 $R^2 = 0.927$ 表示模型校正关系，均接近 1 说明该模型具有较好的拟合度，回归方程准确度高。变异系数 CV 值小于 10，说明非实验因素对结果影响较小，试验的可信度和精确度较好^[88]。另外，分析方差分析表明，诱导时间 A 对 hEGF 浓度有显著影响， A^2 、 B^2 和 C^2 对多糖得率有极显著影响。综上所述，该模型一定程度上可预测破碎液上清中 hEGF 浓度随各因素的变化。

表 3-11 响应面实验设计和结果

Table 3-11 Response Surface Methodology Design and Results

序号	诱导时间 h (A)	诱导温度 °C (B)	诱导剂浓度 mM (C)	hEGF 浓度 $\mu\text{g/mL}$
1	16	20	1	248.66
2	20	16	1	107.87
3	20	24	1	113.3
4	16	20	1	264.87
5	12	24	1	105.6
6	12	20	0.5	93.10
7	16	20	1	250.82
8	16	16	0.5	90.25
9	16	20	1	233.87
10	16	24	1.5	90.16
11	16	16	1.5	84.55
12	16	20	1	246.95
13	20	20	1.5	99.91
14	12	20	1.5	76.36
15	16	24	0.5	106.43
16	12	16	1	80.08
17	20	20	0.5	108.15

表 3-12 方差分析结果
Table 3-12 Analysis of Variance Results

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	83954.49	9	9328.28	130.28	< 0.0001
A-诱导时间	686.17	1	686.17	9.58	0.0174
B-诱导温度	347.69	1	347.69	4.86	0.0634
C-诱导剂浓度	275.54	1	275.54	3.85	0.0906
AB	100.9	1	100.9	1.41	0.2739
AC	18.06	1	18.06	0.25	0.6309
BC	27.93	1	27.93	0.39	0.5521
A ²	22373.09	1	22373.09	312.46	< 0.0001
B ²	23323.7	1	23323.7	325.73	< 0.0001
C ²	28145.75	1	28145.75	393.07	< 0.0001
残差	501.23	7	71.6		
失拟项	12.83	3	4.28	0.035	0.9899
纯误差	488.4	4	122.1		
总误差	84455.71	16			
R ²	0.9941				
调整 R ²	0.9864				
预测 R ²	0.9885				
精密度	26.488				
变异系数	5.99				

3.5.9 响应面相互作用分析

在响应面图中，曲线越陡，表明该因素对破碎液上清中 hEGF 浓度的影响越明显^[87]。图 3-14 为因素间相互作用响应面图，各单因素的对破碎液上清中 hEGF 浓度影响程度依次为：诱导时间 > 诱导温度 > 诱导剂浓度。在较低温度下，随着诱导时间的延长 hEGF 浓度变大，诱导温度与诱导时间具有较强的交互作用（如图 A），结合方差分析，诱导剂浓度和诱导时间、诱导温度之间的交互作用较小，经过模型拟合得到：诱导时间为 16.25 h，诱导温度 20.17℃，诱导剂浓度 0.98 mM 时，破碎液上清中 hEGF 浓度预测值最高为 249.565 $\mu\text{g/mL}$ 。实际操作中方便起见，设置诱导时间为 16 h，诱导温度为 20℃，诱导剂浓度为 1 mM，在此条件下得到的破碎液上清中 hEGF 浓度为 236.57 $\mu\text{g/mL}$ ，与预测值接近，表明该模型较为可靠。

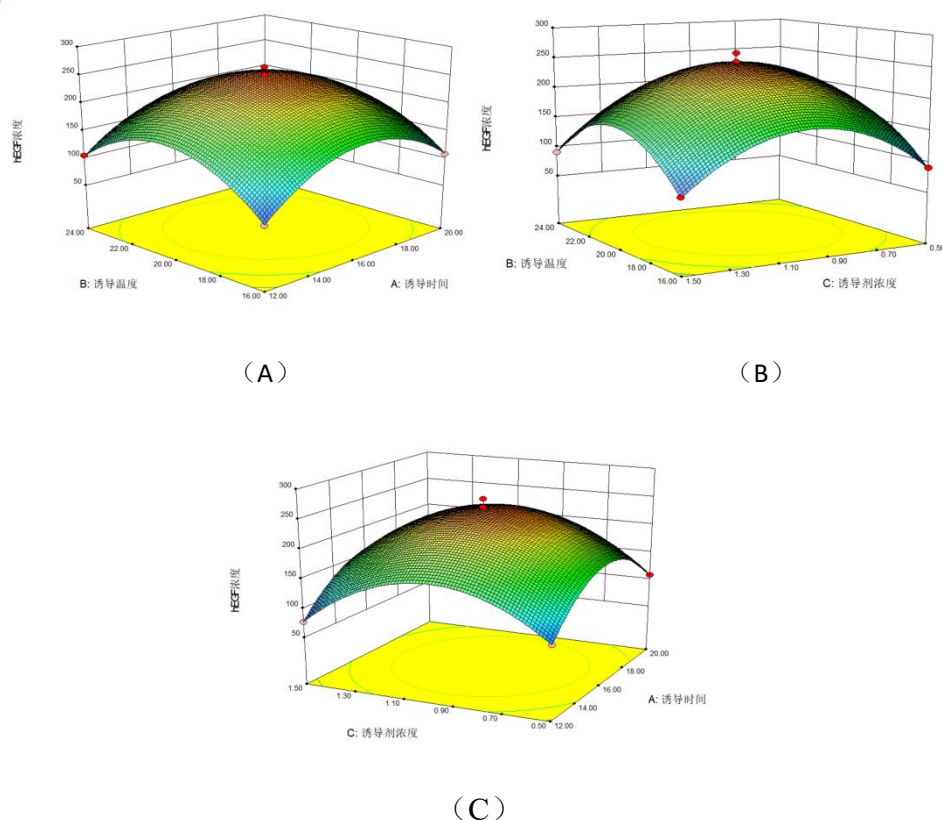


图 3-14 各因素交互作用响应面图

Fig. 3-14 Response Surface Plots of Factor Interactions

3.5.10 重组蛋白的纯化

利用前述的可溶性蛋白表达量最高的发酵条件对四株重组菌进行蛋白的大量发酵表达，由于重组蛋白末端带有组氨酸标签，可以与镍离子特异性结合，因此用镍柱亲和层析对重组蛋白进行纯化。蛋白纯化后通过 Tricine-SDS-PAGE 进行检测，结果显示较为单一的条带，而且蛋白大小与预期基本相符，约为 10.8 kDa 大小（图 3-15），说明蛋白纯化成功。

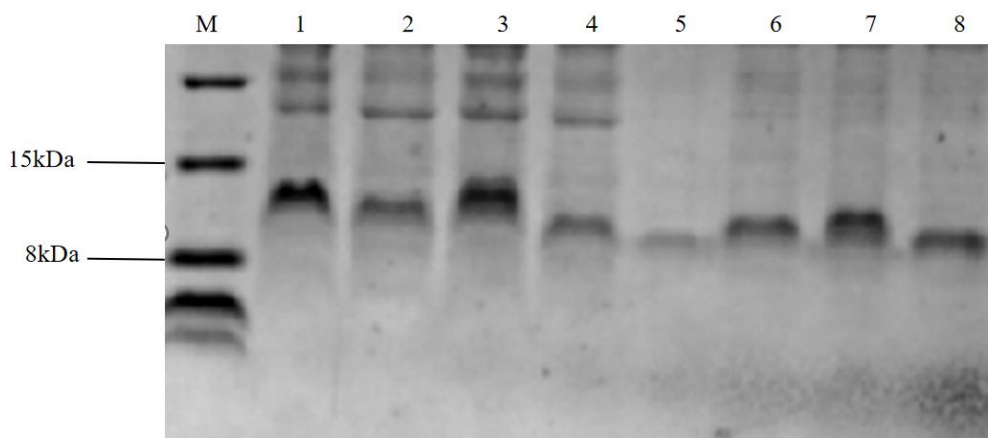


图 3-15 蛋白的分离纯化

Fig. 3-15 Isolation and purification of proteins

M: Protein marker; 1-4: 0.45 μm 滤膜过滤后 hEGF、L15、I23、L26 ; 5-8: 纯化后 hEGF、L15、I23、L26。

3.6 本章小结

本章首先根据野生型和突变体氨基酸序列进行大肠杆菌密码子优化，人工合成 hEGF 和突变体的 cDNA 序列并连接至 pET-22b(+)质粒，通过热激转化至大肠杆菌 BL21(DE3)获得重组菌株 BL21/pET-22b(+)-hEGF、BL21/pET-22b(+)-L15、BL21/pET-22b(+)-I23、BL21/pET-22b(+)-L26，小量发酵完成后通过 Tricine-SDS-PAGE 验证蛋白的表达情况，用人表皮生长因子 ELISA 试剂盒检测破碎上清中可溶性重组蛋白浓度。为了提高可溶性重组蛋白产量，进一步探究了发酵培养基种类，诱导时间，诱导温度，诱导剂浓度对摇瓶发酵中可溶性 hEGF 表达的影响，结合响应面实验得出重组菌株 hEGF 发酵最优条件为：LB 培养基作为发酵培养基，发酵温度为 20℃，诱导剂 IPTG 浓度为 1 mM，诱导时间 16 h。使用前述的可溶性蛋白表达量最高的发酵条件对 4 种重组菌株进行蛋白的大量发酵表达，利用组氨酸标签（His-tag）与镍离子（Ni²⁺）的特异性结合原理，通过镍柱亲和层析纯化重组蛋白，纯化后蛋白通过 Tricine-SDS-PAGE 进行验证大小，并通过透析脱盐脱去咪唑，进一步真空冷冻干燥获得冻干粉，保存在-20℃用于后续实验。本研究的主要目标是实现 rhEGF 在大肠杆菌 BL21(DE3)高水平可溶性表达，并最终纯化得到具有生物活性的 rhEGF。

第 4 章 重组人表皮生长因子性能研究及应用

4.1 前言

皮肤作为人体与外界环境直接接触的屏障系统，承担着体温调节、感觉传导、免疫防御等多重生理功能。当遭遇外界机械、热力或化学损伤时，表皮层的浅部损伤（如轻度烧伤、表皮擦伤）可通过基底干细胞的增殖分化实现自我修复，通常 1-2 周内不留痕迹；但涉及真皮层的深度损伤（如 III 度烧伤、贯通伤）则触发纤维增生性修复，成纤维细胞异常分泌胶原形成以血管畸形和附属器缺失为特征的瘢痕组织，导致伤口难以愈合。据世界卫生组织统计，全球每年约 1.1 亿人因皮肤损伤就医，其中深度创伤患者中 35% 出现愈合延迟，22% 发展为增生性瘢痕，不仅导致外观毁损，更可能引发关节挛缩、慢性溃疡甚至癌变。

透明质酸是一种由 N-乙酰葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸双糖单位重复连接而成的线性大分子多糖，广泛存在于动物组织细胞间质中，在人类的眼玻璃体、关节滑液、皮肤等部位含量丰富。在结构上，透明质酸分子呈无分支长链状，链上的羧基等亲水基团使其具有强亲水性，能结合大量水分子，这赋予了它独特的理化性质。其具有极高的黏弹性和保湿性，在水溶液中可形成高度水化的凝胶状结构，这种特性使其在多个领域发挥着重要作用。在生物医药领域，透明质酸凭借良好的生物相容性，可作为药物载体，为药物提供稳定微环境并实现缓慢释放。在眼科手术中，它常被用作辅助材料，因其能维持眼内压稳定、保护眼内组织；在关节疾病治疗方面，可向关节腔内注射透明质酸以补充滑液，改善关节润滑和缓冲功能，缓解疼痛与炎症。在化妆品行业，透明质酸是明星保湿成分。它能在皮肤表面形成一层透气的水化膜，阻止水分流失，增加皮肤水分含量，使肌肤保持水润、光滑，减少皱纹产生，改善皮肤质感，广泛应用于各类护肤品中。本研究将 rhEGF 与透明质酸混合制备成水凝胶形式，能为其提供稳定微环境，实现缓慢释放，持久发挥促进伤口愈合的功效。

4.2 材料与仪器

4.2.1 实验材料与仪器

主要实验材料，仪器如表 4-1，4-2 所示。

表 4-1 主要实验材料

Table 4-1 Main Experimental Materials

药品名称	级别	生产厂家
人表皮生长因子 ELISA 试剂盒	生化试剂	上海生工
CCK-8 试剂盒	生化试剂	天根生化
小鼠成纤维细胞 NIH/3T3	细胞	海星生物
胃蛋白酶	BR	阿拉丁生物
胰酶	BR	阿拉丁
氯化钠	分析纯	国药集团
盐酸	分析纯	国药集团
氢氧化钠	分析纯	国药集团
磷酸二氢钾	分析纯	上海生工
海藻酸钠	分析纯	国药集团
无水乙醇	分析纯	国药集团
DMEM-H	基础培养基	赛维尔生物
PBS	pH7.4 (DNase, RNase & Protease free, Sterile)	赛维尔生物

表 4-2 主要仪器

Table 4-2 Main Instruments

仪器名称	生产厂家
PH 计	上海仪电科学仪器有限公司
冷冻高速离心机	BBI
超净台	江苏通净净化设备有限公司
酶标仪	赛默飞世尔仪器有限公司
隔水式恒温培养箱	宁国沙鹰科学仪器有限公司
台式低速离心机	湖南湘仪实验室仪器开发有限公司
数显恒温水浴锅	上海力辰邦西仪器科技有限公司
二氧化碳培养箱	上海博讯实业有限公司
倒置荧光显微镜	宁波永新光学股份有限公司
精密分析天平	华智电子科技有限公司

4.2.2 主要试剂配置

人工胃液：称取 2.0 g 氯化钠溶于适量蒸馏水中，加入 10 g 胃蛋白酶，搅拌至完全溶解，缓慢加入 7 mL 浓盐酸，搅拌均匀，用蒸馏水定容至 1 L，调节 pH 至 2 ± 0.1 （使用 pH 计检测），现配现用。

人工肠液：称取 6.8 g 磷酸二氢钾溶于适量蒸馏水中，加入 3.2 g 胰酶，搅拌至完全溶解，用 0.1 M 氢氧化钠调节 pH 至 6.8 ± 0.1 （使用 pH 计检测），用

蒸馏水定容至 1 L，现配现用。

盐酸-氯化钾缓冲液（pH 1.2）：称取 0.69 g 氯化钾溶于适量蒸馏水中，加入 8.5 mL 0.2 M 盐酸，用蒸馏水定容到 100 mL，使用 pH 计校准缓冲液的 pH 值至 1.2，现配现用。

醋酸盐缓冲液（pH 3.6）：称取 0.82 g 醋酸钠溶于适量蒸馏水中，加入 5.8 mL 冰醋酸，用蒸馏水定容到 100 mL，使用 pH 计校准缓冲液的 pH 值至 3.6，现配现用。

碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液（pH 10）：称取 1.06 g 碳酸钠和 0.84 g 碳酸氢钠溶于适量蒸馏水中，用蒸馏水定容到 100mL，使用 pH 计校准缓冲液的 pH 值至 10，现配现用。

氢氧化钠溶液（pH 12）：在小烧杯称取 0.4 g 溶于适量蒸馏水中，用蒸馏水定容到 1L，使用 pH 计校准缓冲液的 pH 值至 12，现配现用。

4.3 实验方法

4.3.1 体外稳定性检测

4.3.1.1 hEGF 突变体耐高温能力测定

分别称取等量的 hEGF 冻干粉与突变体冻干粉，置于洁净且标记清晰的容器内。加入适量 PBS 溶液，用移液器吹打混匀至完全溶解，配制成等浓度 hEGF 溶液及 3 种突变体溶液。水浴锅分别调至 60℃、80℃。将 hEGF 溶液与 3 种突变体溶液放入不同温度水浴锅中进行热处理，分别在放入水浴锅的第 10、20、30、40、50、60 min 取样并立即转移至 -20℃ 冰箱保存，稀释后 ELISA 法测定不同时间点多肽的残留率，并利用 origin 软件中 ExpDec 函数拟合算出半衰期，残留率计算公式如下：

$$\text{残留率}(\%) = \frac{t \text{ 时刻的浓度}}{0 \text{ 时刻的浓度}} \times 100\%$$

4.3.1.2 hEGF 突变体耐酸碱能力测定

取等量 hEGF 和 3 个突变体的冻干粉在 PBS 溶解配置成溶液，各取 1 mL 蛋白溶液和 4 mL pH 分别为 1.2、3.6、10、12 的缓冲液（详见 4.2.2 试剂配置）混匀，放入 37℃ 水浴锅孵育，在第 0，20、40、60、80、100min 取样并立即用

样品稀释液稀释后保存在-20℃，人表皮生长因子 ELISA 试剂盒测定不同时间点多肽的残留率，并利用 origin 软件中 ExpDec 函数拟合算出半衰期。

4.3.1.3 hEGF 突变体在人工胃液中稳定性

取等量 hEGF 和 3 个突变体的冻干粉在 PBS 溶解配置成溶液，各取 1mL 蛋白溶液与 4 mL 已预热人工胃液，在 37℃恒温水浴锅中消化水解 30、60、90、120、150 min 后取样，立即调节 pH 值至 7 左右并用样品稀释液稀释后保存在-20℃，ELISA 法测定不同时间点多肽浓度，计算野生型 hEGF 和 3 个突变体在人工胃液中消化后的残留率。

4.3.1.4 hEGF 突变体在人工肠液中稳定性

取等量 hEGF 和 3 个突变体的冻干粉在 PBS 溶解配置成溶液，各取 1mL 蛋白溶液与 4 mL 已预热人工肠液，在 37℃恒温水浴锅中消化水解 30、60、90、120、150 min 后取样，取样后立即加入 1 滴胰蛋白酶抑制剂 PMSF 并用样品稀释液稀释后保存在-20℃，ELISA 法测定不同时间点多肽浓度，计算野生型 hEGF 和 3 个突变体在人工肠液中消化后的残留率。

4.3.2 细胞增殖实验-生物活性验证

使用 CCK-8 试剂盒测定不同浓度的重组蛋白对小鼠成纤维细胞 NIH/3T3 活力的影响，具体操作如下：

(1) 将处于对数生长期的 NIH/3T3 细胞接种于 96 孔板中，每孔大约 1×10^4 个细胞 (100 μ L/孔)，将 96 孔板放在 37℃，5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 小时。实验分为 4 组：hEGF 组；L15 组；I23 组；L26 组。

(2) 第二天，用含有 1% FBS 的低血清培养基替代完全培养基，并加入不同浓度的用基础培养基稀释的药物孵育。

(3) 孵育后第 24、48 和 72h 后，在每个孔中加入 CCK-8 试剂 (10 μ L)，在培养箱中避光反应 1-2 小时，随后使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。细胞活力计算公式为：

$$\text{相对细胞活力 (\%)} = \frac{A(\text{实验}) - A(\text{空白})}{A(\text{对照}) - A(\text{空白})} \times 100\%$$

其中 A (实验) 表示具有细胞、CCK-8 溶液和药物溶液的孔的 OD 值；A (对照) 表示具有细胞、CCK-8 溶液，无药物溶液的孔的 OD 值；A (空白) 表示具有培养基和 CCK-8 溶液，没有细胞的孔的 OD 值。

4.3.3 rhEGF 水凝胶制备及其对创面愈合的影响

4.3.3.1 rhEGF-透明质酸水凝胶的制备

将透明质酸粉末加入 PBS 中，在搅拌下缓慢溶解，可适当加热（不超过 60℃）并延长搅拌时间，以促进溶解，制成浓度为 2%（w/v）的透明质酸溶液。接着把 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐（EDC）和 N-羟基丁二酰亚胺（NHS）按 1:1 的比例加入透明质酸溶液，搅拌反应大约 30min。然后加入用无菌 PBS 溶解的 rhEGF 溶液，继续搅拌 1-2 h，促进透明质酸与 rhEGF 之间的交联反应。反应过程中，需用 pH 计监测并调节 pH 至合适范围（一般为 6 - 8）。反应完成后，把混合液小心倒入无菌培养皿或特定模具，转移至温度 37℃、湿度 95% 的恒温恒湿箱中，1 - 3 小时后透明质酸水凝胶固化成型。最后，将成型水凝胶从模具取出，放入大量 PBS 缓冲液的离心管，以 5000 rpm 的转速离心 10 min，弃去上清液，重复 3 次，去除未反应原料、交联剂及副产物，完成 rhEGF 透明质酸水凝胶的制备。在自然光下，仔细观察水凝胶颜色是否均一，应为无色或略带淡黄色；透明度应良好，无明显浑浊；形状应与模具一致，无变形、塌陷，表面光滑，无气泡、沉淀等缺陷。

4.3.3.2 小鼠伤口愈合实验

Balb/c 雄性小鼠 6-8 周龄，体重 20 ± 2 g，采自北京维通利华实验动物技术有限公司，在标准环境条件下(20-24℃，12 h 光暗循环，相对湿度为 40%-70%)饲养。所有动物的饲养均按《实验动物护理及使用指南》所列的指引进行。所有动物实验均经合肥综合性国家科学中心大健康研究院实验动物福利与伦理委员会(批准文号:IHM-AP-2025-006-R3)批准。剃掉尾巴上方的背侧区域确保完全脱毛，对皮肤进行消毒后，使用穿刺活检工具在小鼠背部产生全层皮肤缺损，制作圆形伤口（直径 5 mm）。将 9 只小鼠随机分为对照组（control 组）、hEGF 组（H1 组）和 L26 组，每组 3 只小鼠，去除伤口皮肤后，将载有 hEGF 或 L26 的透明质酸水凝胶贴敷在伤口，不载药透明质酸水凝胶为对照组，无菌纱布完全覆盖包扎伤口，各组分别于术后 1-7 天观察伤口愈合程度并进行体重记录，愈合率 = (建模后伤口面积 - 现在剩余伤口面积) / 建模后伤口面积 $\times 100\%$ 。在术后第 8 天，脱颈处死小鼠，分离背部创面组织并使用 4% 多聚甲醛溶液固定用于 HE 染色。

4.4 结果与分析

4.4.1 hEGF 突变体耐热性

hEGF 及其突变体的耐高温结果如图 4-1 和 4-2 所示, 野生型 hEGF 在 60℃ 孵育 60min 后, 残留率为 17%, 而突变体 L15、I23 与 L26 分别保留 24%、35% 和 40%。野生型 hEGF 和突变体 L15、I23 与 L26 在 80℃ 温度孵育 60 min 后, 残留率都接近 0。测定野生型和突变体分别在 60℃、80℃ 下的半衰期来衡量突变体的热稳定性, 如表 4-3 所示, 野生型 hEGF 在 60℃ 半衰期为 23.58 min, 突变体 L15 半衰期为 30.42 min, I23 半衰期为 41.06 min, L26 半衰期为 48.58 min, 是野生型的 2.06 倍。温度升至 80℃ 后, 野生型和突变体半衰期都大大缩短, 野生型 hEGF 的半衰期仅有 9.44 min, 与野生型相比, 突变体 L26 半衰期增长了 105.83%, 突变体 L15 半衰期增长了 6.57%, I23 半衰期增长了 90.36%。由此可见, 三个突变体在高温下热稳定有所提高, 其主要机制是 L15 的酰胺侧链和 I23 的胍基侧链基团具有较强的形成氢键能力, 加强了原有的氢键网络, L26 中苯环的引入强化了蛋白质内部的疏水核心, 使蛋白质折叠更加紧密, 使蛋白质在受热时更不易发生变性, 从而提高热稳定性。

表 4-3 野生型及其突变体半衰期

Table 4-3 Half-lives of Wild-Type and Mutant Forms

组别	hEGF		L15		I23		L26	
温度(℃)	60	80	60	80	60	80	60	80
半衰期 $t_{1/2}$ (min)	23.58	9.44	30.42	10.6	41.06	17.97	48.58	19.43

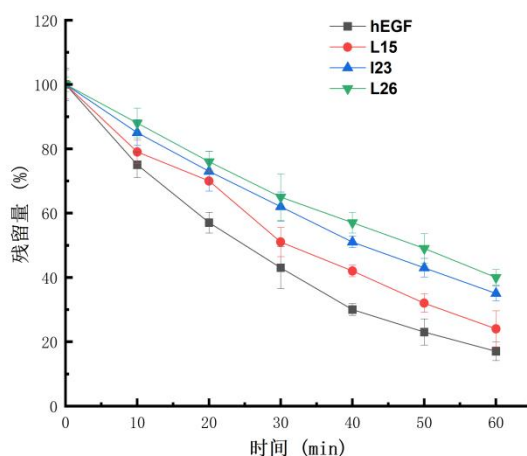


图 4-1 高温 60℃ 下 rhEGF 残留量变化

Fig. 4-1 Changes in rhEGF Residual Amount at High Temperature (60℃)

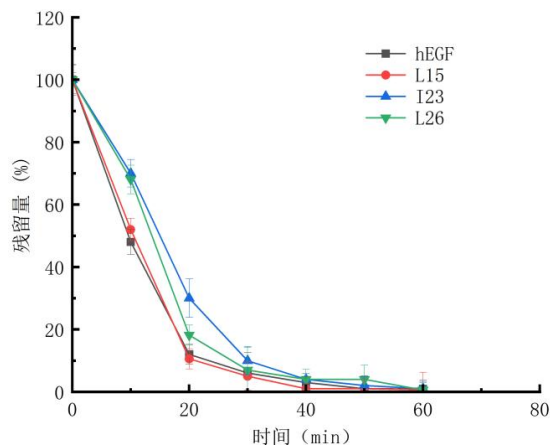


图 4-2 高温 80°C 下 rhEGF 残留量变化

Fig. 4-2 Changes in rhEGF Residual Amount at High Temperature (80°C)

4.4.2 hEGF 突变体耐酸碱性

hEGF 及其突变体的耐酸性结果如图 4-3、4-4、4-5、4-7 以及表 4-4 所示，与野生型 hEGF 相比，在酸性缓冲液中，突变体 I23 稳定性略微变差，相反，在碱性缓冲液，突变体 I23 残留率明显高于野生型和突变体 L15、L26，耐碱性最好，其主要原因是 I23 突变后的精氨酸是碱性氨基酸，在强酸溶液中，ARG 的胍基大量质子化，带更多正电荷，导致分子内电荷排斥增加，破坏蛋白质的原有结构，使稳定性变差。突变体 L15 在酸性溶液相比 hEGF 稳定性有所提高，但对于碱性环境耐受能力差，其主要原因为 L15 的酰胺基团在强碱溶液中会发生去质子化，导致分子内电荷分布改变，引起结构不稳定。L26 酸碱条件下半衰期都有所提高，酸性条件下稳定性最好，主要是 L26 中苯环的引入增强分子内的疏水核心，使多肽链更倾向于折叠成紧密的结构，减少了溶剂（酸或碱溶液）与蛋白质内部的相互作用，从而提高强酸碱环境中的稳定性。

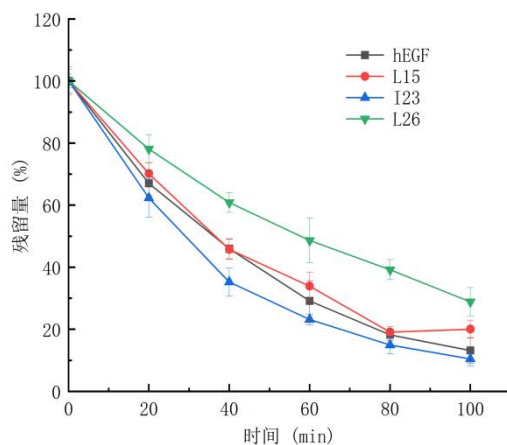


图 4-3 pH=1.2 条件下 rhEGF 残留量变化

Fig. 4-3 Changes in rhEGF Residual Amount Under pH 1.2 Conditions

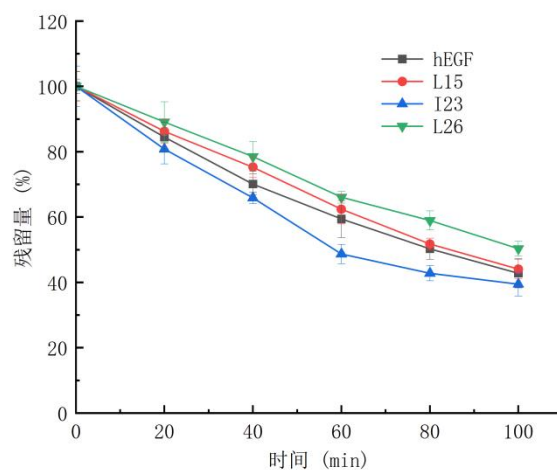


图 4-4 pH=3.6 条件下 rhEGF 残留量变化

Fig. 4-4 Changes in rhEGF Residual Amount Under pH 3.6 Conditions

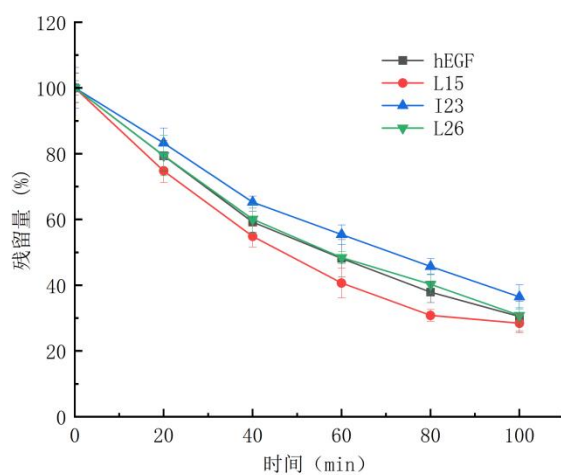


图 4-5 pH=10 条件下 rhEGF 残留量变化

Fig. 4-5 Changes in rhEGF Residual Amount Under pH 10 Condition

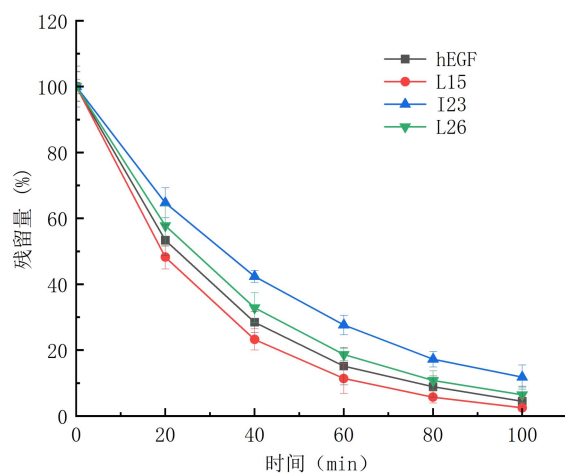


图 4-6 pH=12 条件下 rhEGF 残留量变化

Fig. 4-6 Changes in rhEGF Residual Amount Under pH 12 Conditions

表 4-4 野生型及其突变体半衰期
Table 4-4 Half-lives of Wild-Type and Mutant Forms

组别	溶液 pH 值	半衰期 $t_{1/2}$ (min)
hEGF	1.2	34.22
	3.6	81.66
	10	58.32
	12	22.3
L15	1.2	43.09
	3.6	84.49
	10	55.11
	12	18.73
I23	1.2	30.71
	3.6	74.48
	10	68.72
	12	32.43
L26	1.2	55.75
	3.6	100.89
	10	58.84
	12	25.26

4.4.3 hEGF 突变体在人工胃液中稳定性

由图 4-7 可以看出, 在 pH 值为 2 的人工胃液中, 2.5 h 后野生型 hEGF 和 3 个突变体的残留量都接近 0, 说明胃蛋白酶对表皮生长因子的稳定性有极大影响, 同时在人工胃液中孵育 0.5 h 后, L15 和 L26 残留率分别为 38.76%、42.07%, 均高于野生型 35.14%, 但突变体 I23 残留率为 31.23%, 明显低于野生型, 与上述 I23 在碱性条件下稳定性最好, 酸性条件下半衰期略微降低结论趋向一致。

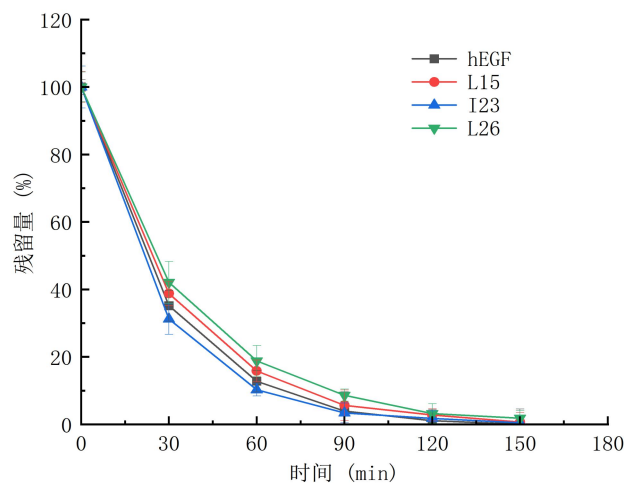


图 4-7 人工胃液中 rhEGF 残留量变化

Fig. 4-7 Changes in rhEGF Residue in Artificial Gastric Juice

4.4.4 hEGF 突变体在人工肠液中稳定性

由图 4-8 可以看出, 在 pH 值为 6.8 的人工肠液中孵育 0.5 h 后, 野生型 hEGF 和突变体 L15、I23 和 L26 的浓度变化不大, 突变体 L26 残留率为 86.47% 最高, 野生型 hEGF 残留率最低为 83.26%, 直至孵育 2.5 h 后, 野生型 hEGF 和突变体的残留率仍都接近 50%, 但可以看出三个突变体稳定性都高于野生型, 其中 L26 在人工肠液中稳定性最好, 残留率最高。

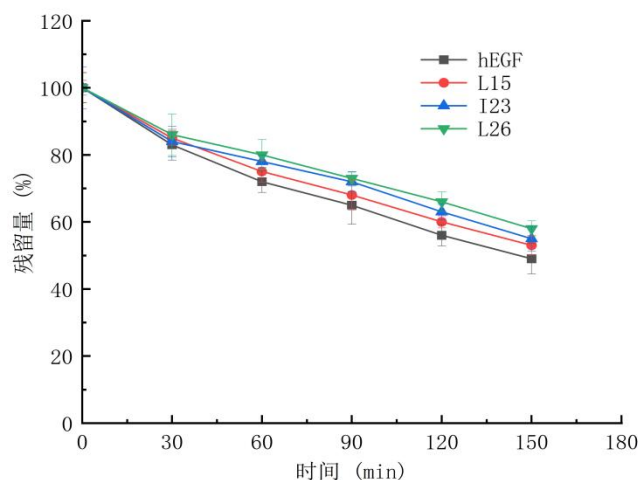


图 4-8 人工肠液中 rhEGF 残留量变化

Fig. 4-8 Changes in rhEGF Residue in Artificial Gastric Juice

4.4.5 细胞增殖实验

如图 4-9 所示, 孵育 24 小时后不同浓度的四种重组蛋白对 NIH/3T3 均有增殖作用, 而且随着四种蛋白浓度的增加, NIH/3T3 细胞增殖显著增加, 其中 L26 增殖效果最显著, 浓度为 100ng/ml 时细胞相对活力为 1.76, hEGF 次之, 在浓度为 100ng/ml 时, 细胞相对活力为 1.68, L15 和 I23 对细胞增殖的促进效果均差于 hEGF。将孵育时间延长至 48 h 孵育 (图 4-10), I23 在浓度 0.1 ng/ml 和 1ng/ml 时, 增殖效果与 hEGF 无显著差异。将孵育期延长至 72 h 后, 低浓度时 hEGF、L15、I23、L26 对细胞增殖效果无明显差异, 在 10 和 100 ng/ml 时。L15 促进细胞增殖效果比其他三种低 (图 4-11)。可以得出结论, 纯化后的四种重组蛋白均具有生物活性, 能够促进 NIH/3T3 细胞增殖, 且与蛋白浓度具有一定依赖性。

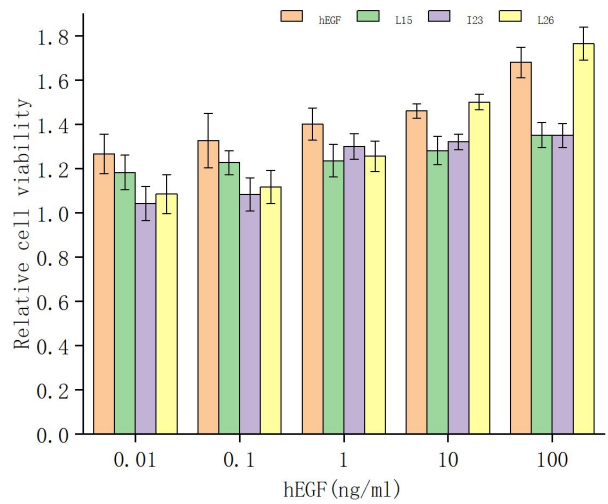


图 4-9 孵育 24 后细胞相对活性

Fig. 4-9 Relative cell viability after 24-hour incubation

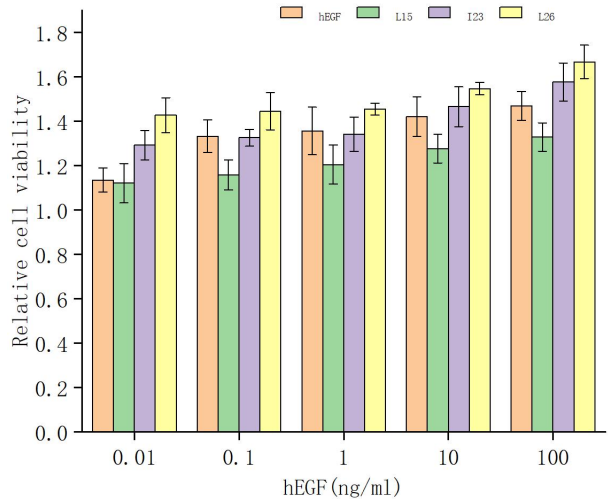


图 4-10 孵育 48 后细胞相对活性

Fig. 4-10 Relative cell viability after 48-hour incubation

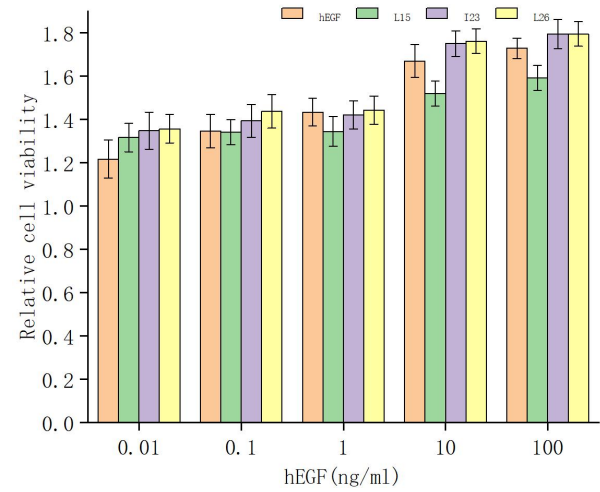


图 4-11 孵育 72 后细胞相对活性

Fig. 4-11 Relative cell viability after 72-hour incubation

4.4.6 小鼠伤口愈合实验结果

如图 4-12 所示, 治疗期间, 各组小鼠体重均呈现先下降后上升的趋势, 主要原因是前期手术应激和疼痛会影响小鼠食欲和消化功能, 使其进食量减少, 同时创面愈合需要消耗大量的能量和营养物质, 从而导致体重下降; 随着术后时间的推移, 小鼠的身体逐渐适应创伤, 应激反应消退, 使得小鼠的食欲逐渐恢复, 进食量增加, 身体各器官和系统的功能逐渐恢复正常, 从而使体重逐渐上升并趋于稳定。小鼠创面面积变化如图 4-13 和图 4-14 所示, 各组小鼠第 7 天创面伤口明显收缩变小, 创面均被血痂皮覆盖, 且 L26 组和 H1 组创面愈合速度明显快于对照组, 其中 L26 组促进伤口愈合的效果最明显, 第 7 天伤口相对愈合率达到 63.28%。术后第 8 天对创面组织进行 HE 染色结果如图 4-15 所示, 三组皮肤组织均呈现中等范围损伤, 且表皮、真皮及皮下组织原有结构不清, 皮肤组织表面均可见大量由坏死细胞碎片、嗜酸性均质物、粒细胞及红细胞形成的痂皮, 损伤边缘均出现表皮增生, 且棘层肥厚。但对照组肉芽组织增生范围相对较大, L26 组和 H1 组相对较小, 在肉芽组织增生的范围上三组存在差异; 此外, 对照组伴大量以淋巴细胞及粒细胞为主的炎性细胞浸润, 炎性细胞浸润程度相对较重且周围的皮下组织小范围水肿, L26 组较轻, 仅伴少量以淋巴细胞及粒细胞为主的炎性细胞浸润, H1 组则介于两者之间, 说明 L26-HA 可以有效的促进伤口愈合, 且促进效果略优于 hEGF-HA。

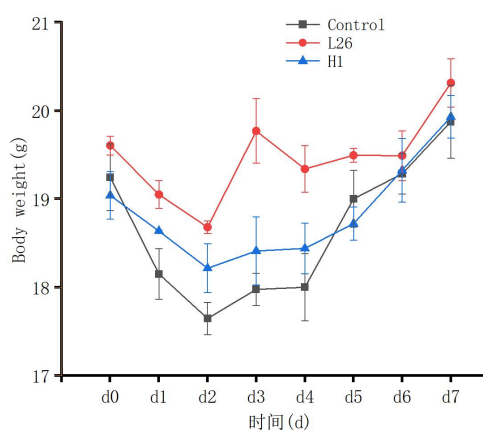


图 4-12 小鼠体重变化

Fig. 4-12 Weight changes in mice

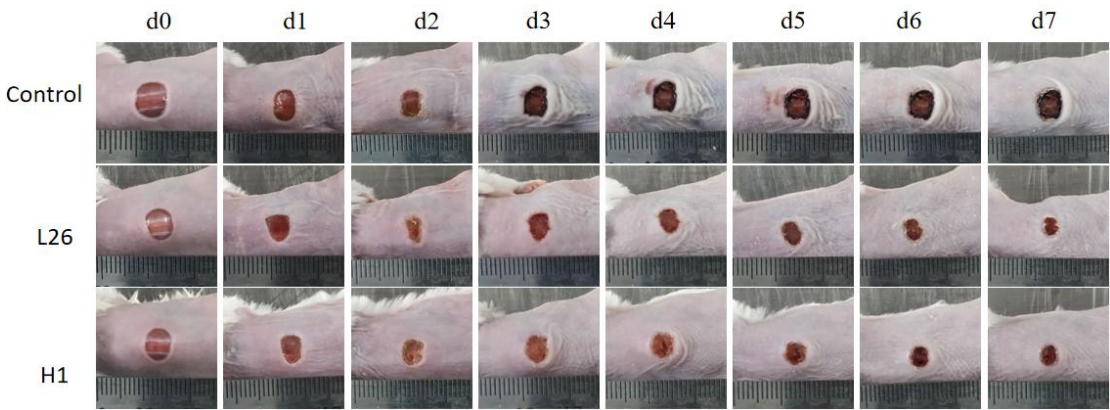


图 4-13 小鼠伤口愈合图
Fig. 4-13 Mouse Wound Healing Diagram

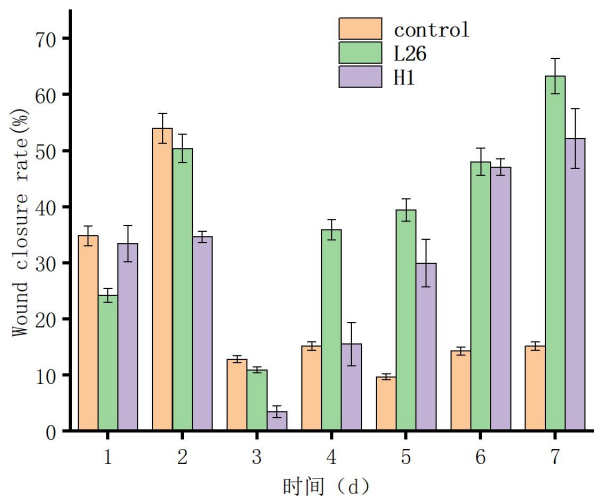


图 4-14 伤口愈合率
Fig. 4-14 Wound healing rate

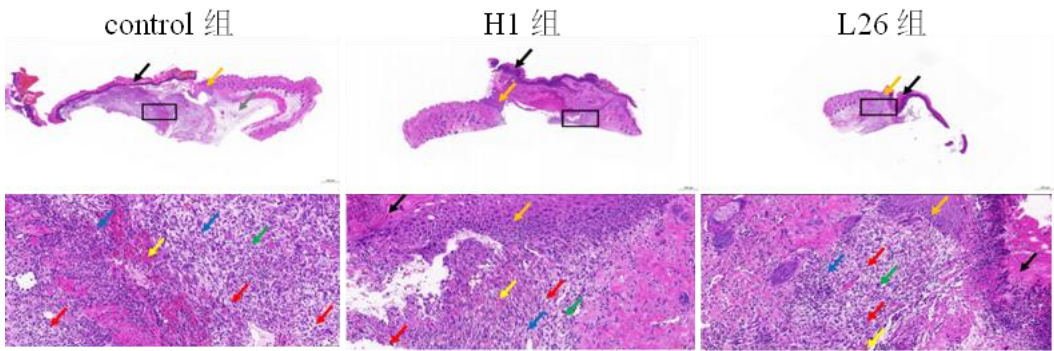


图 4-15 小鼠创面 HE 染色
Fig. 4-15 HE staining of the mouse wound
其中绿色箭头表示新生血管；红色箭头表示炎性细胞；黄色箭头表示局部出血；蓝色箭头表示肉芽组织增生；黑色箭头表示由坏死细胞碎片、嗜酸性均质物、粒细胞及红细胞形成的痂皮；橙色箭头表示损伤边缘表皮增生；灰色箭头表示皮下组织水肿。

4.5 本章小结

对野生型 hEGF 和突变体 L15、I23、L26 的进行体外稳定性测定，细胞增殖和其生物活性，并制备重组人表皮生长因子水凝胶，通过小鼠实验验证其对伤口愈合的促进作用。结果显示三个突变体的热稳定性相对野生型都提高了，其中突变体 L15 在酸性条件下半衰期延长，但在碱性条件下稳定性略微变差，与之相反，I23 在碱性条件下半衰期延长，但在酸性条件下稳定性略微变差，L26 在酸碱条件下半衰期都延长了，稳定性明显提高。细胞增殖实验和细胞划痕实验验证了 4 种重组蛋白具有生物活性，将野生型 hEGF 和稳定性最好的 L26 与透明质酸结合制成水凝胶贴剂，通过小鼠伤口愈合实验证明了其对伤口呈现更好的愈合作用。

第5章 结论与展望

5.1 结论

本研究利用计算机辅助药物设计方法指导人表皮生长因子的改造和筛选，选出了3个突变体：LEU15>GLN，ILE23>ARG，LEU26>PHE。构建大肠杆菌重组菌株成功表达野生型 hEGF 和突变体 L15、I23、L26，通过响应面实验进一步优化重组菌株的发酵条件，得到最优发酵条件为：TB 培养基作为发酵培养基，发酵温度为 20℃，诱导剂 IPTG 浓度为 1mM，诱导时间 16 h。使用镍柱亲和层析纯化重组蛋白，脱盐后冷冻干燥成冻干粉。通过温度实验和 pH 实验验证四种重组蛋白在体外的稳定性，结果显示：在 60℃和 80℃高温下，L15、I23 和 L26 的热稳定性相对 hEGF 都有所提高，其中 L15 半衰期是野生型 1.29 倍和 1.07 倍，I23 半衰期是野生型的 1.74 倍和 1.9 倍，L26 的半衰期将近延长了一倍。pH 稳定性实验结果显示，L15 在酸性 pH 1.2 溶液中半衰期延长，是野生型的 1.28 倍，但在碱性 pH 溶液中稳定性略微变差，溶液 pH 12 时相对野生型缩短了 16%左右；与之相反，I23 在碱性 pH 10 和 pH 12 条件下半衰期延长，是野生型的 1.18 倍和 1.45 倍，在酸性 pH 1.2 和 pH 3.6 条件下稳定性略微变差，是野生型的 89.74%和 91.21%；L26 在强酸强碱条件下半衰期都有所延长，溶液 pH 1.2 时增长 62.92%，pH 3.6 时增长 23.55%，pH 12 时增长 0.89%，pH 12 时增长 13.27%，综上所述，L26 在体外稳定性最佳。通过细胞增殖实验验证四种重组蛋白生物活性，结果显示 L15 和 I23 的生物活性相对 hEGF 有所降低，L26 与 hEGF 生物活性相近。基于稳定性评估结果，选择性能野生型 hEGF 和最优的 L26 突变体与透明质酸（HA）通过酰胺键共价结合，制备了具有缓释功能的水凝胶贴剂。体内实验表明，该制剂在小鼠全层皮肤缺损模型中表现出显著的促愈合效果，且与 H1 组相比，L26 组促进伤口愈合的效果最明显，效果最佳。

5.2 展望

在人表皮生长因子的改造与筛选工作中，采用计算机辅助药物设计方法进行了单点虚拟氨基酸突变研究。然而，为进一步提升筛选效率及获得性能更优的突变体，后续研究可考虑设计双点突变乃至多点突变策略。通过系统性地对多个氨基酸位点同时进行虚拟突变，并结合分子动力学模拟、结合自由能计算等手段，能够更全面地探索氨基酸残基间的协同作用对人表皮生长因子结构与功能的影响，进而筛选出稳定性显著提升的突变体，为后续的实验研究提供更具潜力的候选分子。

目前已成功利用大肠杆菌表达系统实现了野生型和突变型人表皮生长因子的表达，并针对摇瓶发酵条件开展了初步优化工作。从实验室规模迈向工业化生产，下一步可深入探究发酵罐培养条件的优化。在发酵罐体系中，需精确调控诸如温度、pH 值、溶氧、搅拌速率等关键参数，同时优化培养基成分及补料策略，以实现高密度细胞培养及目标蛋白的高效表达。此外，还需考虑发酵过程中的代谢副产物积累、细胞生长动力学及产物稳定性等因素，通过多参数耦合优化，建立一套适用于工业化生产的高效发酵工艺。

现有研究已验证了突变体在极端条件下具备良好的稳定性以及对伤口愈合的促进作用。但从实际应用角度出发，仍需进一步深入研究其在储存和运输条件下的稳定性。例如，模拟不同温度、湿度及光照条件，考察突变体在长期储存过程中的结构完整性及生物活性变化，确定其货架期及适宜的储存条件。同时，拓展对突变体其他潜在应用领域的验证，如在组织工程、再生医学及美容护肤等领域的应用探索，评估其在不同场景下的有效性及安全性，为其更广泛的临床及商业应用奠定基础。

参考文献

- [1] COHEN S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal[J]. J Biol Chem, 1962,237: 1555-1562.
- [2] SAVAGE C J, INAGAMI T, COHEN S. The primary structure of epidermal growth factor[J]. J Biol Chem, 1972,247(23): 7612-7621.
- [3] GREGORY H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor[J]. Nature, 1975,257(5524): 325-327.
- [4] ZENG F, HARRIS R C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014,28: 2-11.
- [5] BELL G I, FONG N M, STEMPIEN M M, etc. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization[J]. Nucleic Acids Res, 1986,14(21): 8427-8446.
- [6] 曾嵘, 邵晓霞, 夏其昌. 人表皮生长因子肽谱及一级结构的质谱法分析[J]. 生物化学与生物物理学报, 1999(01): 33-38.
- [7] FANGER B O, STEPHENS J E, STAROS J V. High-yield trapping of EGF-induced receptor dimers by chemical cross-linking[J]. FASEB J, 1989,3(1): 71-75.
- [8] HUANG H W, MOHAN S K, YU C. The NMR solution structure of human epidermal growth factor (hEGF) at physiological pH and its interactions with suramin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010,402(4): 705-710.
- [9] 吴美玉, 阮靖华, 钟伯雄. 人表皮生长因子的研究进展[J]. 生物工程学报, 2020,36(12): 2813-2823.
- [10] BURGESS A W, LLOYD C J, SMITH S, etc. Murine epidermal growth factor: structure and function[J]. Biochemistry, 1988,27(14): 4977-4985.
- [11] BRAND T M, IIDA M, LI C, etc. The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer[J]. Discov Med, 2011,12(66): 419-432.
- [12] 廖小金. 表皮生长因子结构和生物学效应[J]. 海峡药学, 2006(05): 14-17.
- [13] WANG J, LIN A, LU L. Effect of EGF-induced HDAC6 activation on corneal epithelial wound healing[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010,51(6): 2943-2948.
- [14] KOSKENPATO K, AINOLA M, PRZYBYLA B, etc. Diminished salivary epidermal growth factor secretion: a link between Sjogren's syndrome and autoimmune gastritis?[J]. Scand J Rheumatol, 2016,45(2): 118-121.
- [15] ZOU Z G, RIOS F J, MONTEZANO A C, etc. TRPM7, Magnesium, and Signaling[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(8).
- [16] ORTEGA B, DEY J M, GARDELLA A R, etc. Antibody-mediated inhibition of

EGFR reduces phosphate excretion and induces hyperphosphatemia and mild hypomagnesemia in mice[J]. *Physiol Rep*, 2017,5(5).

[17] 孔晶瑶. 重组跨膜肽—人表皮生长因子融合蛋白在毕赤酵母中的表达[D]. 吉林大学, 2017.

[18] XU J, MIN D, GUO G, etc. Experimental study of epidermal growth factor and acidic fibroblast growth factor in the treatment of diabetic foot wounds[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018,15(6): 5365-5370.

[19] PARK K H, HAN S H, HONG J P, etc. Topical epidermal growth factor spray for the treatment of chronic diabetic foot ulcers: A phase III multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018,142: 335-344.

[20] SINGLA S, GARG R, KUMAR A, etc. Efficacy of topical application of beta urogastrone (recombinant human epidermal growth factor) in Wagner's Grade 1 and 2 diabetic foot ulcers: Comparative analysis of 50 patients[J]. *J Nat Sci Biol Med*, 2014,5(2): 273-277.

[21] YANG S, GENG Z, MA K, etc. Efficacy of Topical Recombinant Human Epidermal Growth Factor for Treatment of Diabetic Foot Ulcer: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2016,15(2): 120-125.

[22] LU K J, WANG W, XU X L, etc. A dual deformable liposomal ointment functionalized with retinoic acid and epidermal growth factor for enhanced burn wound healing therapy[J]. *Biomater Sci*, 2019,7(6): 2372-2382.

[23] KIM H, KONG W H, SEONG K Y, etc. Hyaluronate-Epidermal Growth Factor Conjugate for Skin Wound Healing and Regeneration[J]. *Biomacromolecules*, 2016,17(11): 3694-3705.

[24] WANG Z, QIAN Y, LI L, etc. Evaluation of emulsion electrospun polycaprolactone/hyaluronan/epidermal growth factor nanofibrous scaffolds for wound healing[J]. *J Biomater Appl*, 2016,30(6): 686-698.

[25] BRACHER A, CARDONA A S, TAUBER S, etc. Epidermal growth factor facilitates melanoma lymph node metastasis by influencing tumor lymphangiogenesis[J]. *J Invest Dermatol*, 2013,133(1): 230-238.

[26] HAO C, LI Z, ZHANG X, etc. Expression and clinical significance of EGF and TGF- α in chronic pancreatitis and pancreatic cancer[J]. *Minerva Endocrinol*, 2018,43(3): 253-258.

[27] CHEN J, CHEN J, LV X, etc. Epidermal Growth Factor in Exhaled Breath Condensate as Diagnostic Method for Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019,18: 1078139919.

[28] TRINH N T, PRIVE A, MAILLE E, etc. EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008,295(5): L866-L880.

- [29] SULLIVAN P B, BRUETON M J, TABARA Z B, etc. Epidermal growth factor in necrotising enteritis[J]. Lancet, 1991,338(8758): 53-54.
- [30] BRZOZOWSKI T, KONTUREK P C, KONTUREK S J, etc. Effect of local application of growth factors on gastric ulcer healing and mucosal expression of cyclooxygenase-1 and -2[J]. Digestion, 2001,64(1): 15-29.
- [31] BANG B W, MAENG J H, KIM M K, etc. Hemostatic action of EGF-endospray on mucosectomy-induced ulcer bleeding animal models[J]. Biomed Mater Eng, 2015,25(1): 101-109.
- [32] SMITH J, COOK E, FOTHERINGHAM I, etc. Chemical synthesis and cloning of a gene for human beta-urogastrone[J]. Nucleic Acids Res, 1982,10(15): 4467-4482.
- [33] OKA T, SAKAMOTO S, MIYOSHI K, etc. Synthesis and secretion of human epidermal growth factor by *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985,82(21): 7212-7216.
- [34] CHALMERS J J, KIM E, TELFORD J N, etc. Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor[J]. Appl Environ Microbiol, 1990,56(1): 104-111.
- [35] 甘人宝, 黄培勇. 人表皮生长因子在大肠杆菌中高效表达和分泌[J]. 生物化学与生物物理学报, 1992(6): 587-589.
- [36] 赵忠良, 路凡, 陈南春, 等. 人表皮生长因子在大肠杆菌中的融合表达与活性分析[J]. 第四军医大学学报, 1997(05): 101-102.
- [37] TONG W Y, YAO S J, ZHU Z Q, etc. An improved procedure for production of human epidermal growth factor from recombinant *E. coli*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001,57(5-6): 674-679.
- [38] LIU Y L, HUANG L M, LIN W P, etc. Secretion of biologically active human epidermal growth factor from *Escherichia coli* using *Yersinia pestis* Caf1 signal peptide[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2006,39(5): 366-371.
- [39] SU Z, HUANG Y, ZHOU Q, etc. High-level expression and purification of human epidermal growth factor with SUMO fusion in *Escherichia coli*[J]. Protein Pept Lett, 2006,13(8): 785-792.
- [40] ABDULL R A, ISMAIL E N, HAMBALI Z, etc. Expression of recombinant human epidermal growth factor in *Escherichia coli* and characterization of its biological activity[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008,144(3): 249-261.
- [41] ZHI Q W, WANG S H, ZHANG F Y, etc. [PTD-hEGF fusion protein--gene expression and function analysis][J]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao, 2007,23(4): 589-592.
- [42] ESIPOV R S, STEPANENKO V N, CHUPOVA L A, etc. Production of recombinant human epidermal growth factor using *Ssp dnaB* mini-intein system[J]. Protein Expr Purif, 2008,61(1): 1-6.

- [43] KIM D G, MIN M K, AHN S C, etc. Expression of a fusion protein containing human epidermal growth factor and the collagen-binding domain of *Vibrio mimicus* metalloprotease[J]. *Biotechnol Lett*, 2009,31(2): 259-264.
- [44] KWONG K W, WONG W K. A revolutionary approach facilitating co-expression of authentic human epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor in both cytoplasm and culture medium of *Escherichia coli*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013,97(20): 9071-9080.
- [45] 李风, 柯博文, 孙中伟, 等. 细胞穿膜肽与人表皮生长因子在大肠杆菌中的重组融合表达[J]. *现代食品科技*, 2021,37(11): 151-158.
- [46] 王叶青. 基于提高结构稳定性的胰岛新生相关多肽药物物理性设计[D]. 曲阜师范大学, 2023.
- [47] ELGENDY M. Assessment of Modulation of Protein Stability Using Pulse-chase Method[J]. *Bio Protoc*, 2017,7(16): e2443.
- [48] CZAJKOWSKY D M, HU J, SHAO Z, etc. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives[J]. *EMBO Mol Med*, 2012,4(10): 1015-1028.
- [49] KIM D, JEON H, AHN S, etc. An approach for half-life extension and activity preservation of an anti-diabetic peptide drug based on genetic fusion with an albumin-binding aptide[J]. *J Control Release*, 2017,256: 114-120.
- [50] KAWAMURA S, ITO Y, HIROKAWA T, etc. Ligand-Phospholipid Conjugation: A Versatile Strategy for Developing Long-Acting Ligands That Bind to Membrane Proteins by Restricting the Subcellular Localization of the Ligand[J]. *J Med Chem*, 2018,61(9): 4020-4029.
- [51] DEYLE K, KONG X D, HEINIS C. Phage Selection of Cyclic Peptides for Application in Research and Drug Development[J]. *Acc Chem Res*, 2017,50(8): 1866-1874.
- [52] 何佳戡, 梁菊, 宣茂松, 等. 提高多肽体内稳定性的有效策略[J]. *药学学报*, 2020,55(01): 25-32.
- [53] CHEN L, TU Z, VOLOSHCHUK N, etc. Lytic peptides with improved stability and selectivity designed for cancer treatment[J]. *J Pharm Sci*, 2012,101(4): 1508-1517.
- [54] BJORKLUND M, VALTANEN H, SAVILAHTI H, etc. Use of intein-directed peptide biosynthesis to improve serum stability and bioactivity of a gelatinase inhibitory peptide[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003,6(1): 29-35.
- [55] 吴梧桐, 王友同, 吴文俊, 等. 生物技术药物的研究开发新进展[J]. *中国新药杂志*, 2002(11): 831-838.
- [56] WUNDERLICH M, MARTIN A, SCHMID F X. Stabilization of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* by evolutionary optimization of Coulombic interactions[J]. *J Mol Biol*, 2005,347(5): 1063-1076.

- [57] MUTTENTHALER M, KING G F, ADAMS D J, etc. Trends in peptide drug discovery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021,20(4): 309-325.
- [58] BOGDANOWICH-KNIPP S J, JOIS D S, SIAHAAN T J. The effect of conformation on the solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides[J]. *J Pept Res*, 1999,53(5): 523-529.
- [59] CHAN L Y, ZHANG V M, HUANG Y H, etc. Cyclization of the antimicrobial peptide gomesin with native chemical ligation: influences on stability and bioactivity[J]. *Chembiochem*, 2013,14(5): 617-624.
- [60] ROZEK A, POWERS J P, FRIEDRICH C L, etc. Structure-based design of an indolicidin peptide analogue with increased protease stability[J]. *Biochemistry*, 2003,42(48): 14130-14138.
- [61] CHEN Y, YANG C, LI T, etc. The Interplay of Disulfide Bonds, alpha-Helicity, and Hydrophobic Interactions Leads to Ultrahigh Proteolytic Stability of Peptides[J]. *Biomacromolecules*, 2015,16(8): 2347-2355.
- [62] 李治国, 高静, 郑爱萍. 提高蛋白质、多肽类药物稳定性的研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2017,44(11): 1069-1074.
- [63] 高德民, 刘金锋, 王凤山. 多肽类药物结构稳定性的研究进展[J]. *中国医药生物技术*, 2007(05): 380-382.
- [64] WANG C, SHI W, CAI L, etc. Artificial peptides conjugated with cholesterol and pocket-specific small molecules potently inhibit infection by laboratory-adapted and primary HIV-1 isolates and enfuvirtide-resistant HIV-1 strains[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014,69(6): 1537-1545.
- [65] LEE C, CHOI J S, KIM I, etc. Decanoic acid-modified glycol chitosan hydrogels containing tightly adsorbed palmityl-acylated exendin-4 as a long-acting sustained-release anti-diabetic system[J]. *Acta Biomater*, 2014,10(2): 812-820.
- [66] 王永亮, 陈敬蕊, 孔令聪, 等. 蛋白/多肽类药物长效化技术研究进展[J]. *经济动物学报*, 2022,26(03): 230-236.
- [67] DELGADO C, FRANCIS G E, FISHER D. The uses and properties of PEG-linked proteins[J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 1992,9(3-4): 249-304.
- [68] ZHANG L, WANG Y, GAO H L, etc. [The construction of cell-penetrating peptide R8 and pH sensitive cleavable polyethylene glycols co-modified liposomes][J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2015,50(6): 760-766.
- [69] ABUCHOWSKI A, MCCOY J R, PALCZUK N C, etc. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase[J]. *J Biol Chem*, 1977,252(11): 3582-3586.
- [70] GOODSON R J, KATRE N V. Site-directed pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site[J]. *Biotechnology (N Y)*, 1990,8(4): 343-346.

- [71] 于爱平, 蒋中华, 钟根深, 等. 聚乙二醇修饰水蛭素的分离纯化与活性分析[J]. 药物生物技术, 2004(05): 302-305.
- [72] PANTUSA M, SPORTELLI L, BARTUCCI R. Influence of stearic acids on resveratrol-HSA interaction[J]. Eur Biophys J, 2012,41(11): 969-977.
- [73] OSBORN B L, OLSEN H S, NARDELLI B, etc. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002,303(2): 540-548.
- [74] STAPLETON N M, EINARSDOTTIR H K, STEMERDING A M, etc. The multiple facets of FcRn in immunity[J]. Immunol Rev, 2015,268(1): 253-268.
- [75] GONG R, WANG Y, FENG Y, etc. Shortened engineered human antibody CH2 domains: increased stability and binding to the human neonatal Fc receptor[J]. J Biol Chem, 2011,286(31): 27288-27293.
- [76] SULLIVAN P B, BRUETON M J, TABARA Z B, etc. Epidermal growth factor in necrotising enteritis[J]. Lancet, 1991,338(8758): 53-54.
- [77] 杨柳, 姜龙, 刘耀杰, 等. 半理性设计改造南极假丝酵母脂肪酶 B 催化合成氯乙酰胺[J]. 中国生物工程杂志, 2024,44(09): 33-41.
- [78] 陈权, 吕成, 许菲. 基于柔性区域的计算设计改造玉米赤霉烯酮水解酶热稳定性[J]. 生物工程学报, 2021,37(12): 4415-4429.
- [79] 莫沁梓, 郑珩. 订书抗菌肽的研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2024,45(04): 217-225.
- [80] 杜昊澜, 骆树娟, ADEGOKE TOSIN VICTOR, 等. 基于热不稳定区段分析和二硫键预测的玉米赤霉烯酮脱毒酶 ZLHY-6 热稳定性改造[J]. 食品安全质量检测学报, 2022,13(22): 7150-7157.
- [81] PURMONEN M, VALJAKKA J, TAKKINEN K, etc. Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases[J]. Protein Eng Des Sel, 2007,20(11): 551-559.
- [82] 李跃东, 王星洋, 李硕豪, 等. 利用家蚕核型多角体病毒多角体蛋白序列提高人表皮细胞生长因子表达水平[J]. 生物工程学报, 2024,40(11): 4211-4218.
- [83] 吴少敏. 人表皮细胞生长因子在大肠杆菌中的高效表达及功能鉴定[D]. 华南理工大学, 2016.
- [84] 梁倩怡. 重组丁酸梭菌体外表达猪源表皮生长因子的研究[D]. 华南农业大学, 2020.
- [85] 姚欣, 邹沛璇, 郑永祥, 等. 抗菌肽 Cecropin A 的可溶表达及快速纯化工艺研究[J]. 华西药学杂志, 2025,40(02): 131-134.
- [86] 刘龙英, 汪婷婷, 于伟, 等. 基于类弹性蛋白融合金属硫蛋白的构建及其生物学活性评价[J]. 生物工程学报, 2024,40(11): 4242-4253.

- [87] 独军政, 常惠芸, 高闪电, 等. 牛 FMDV 受体整合素 $\beta 6$ 亚基 LBD 的多克隆抗体制备及初步应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008(07): 696-698.
- [88] 许伟, 张博文, 刘浩, 等. 响应面法优化核桃青皮单宁的微波-超声波协同提取工艺及其结构表征[J]. 陕西科技大学学报, 2024,42(06): 52-58.
- [89] HE M, YASIN K, YU S, etc. Total Flavonoids in *Artemisia absinthium* L. and Evaluation of Its Anticancer Activity[J]. Int J Mol Sci, 2023,24(22).

致谢

文至此，落笔为终。回首这三年来的求学时光，诸多感慨涌上心头。论文的完成，不仅是学术研究的阶段性成果，更是无数温暖与支持汇聚而成的结晶，在此，我想用最真挚的文字，向所有帮助过我的人表达深深的谢意。

桃李不言，下自成蹊。首先，由衷的感谢我的导师-王洲老师，从论文选题、实验研究设计、到论文撰写修改，每一个环节都离不开导师耐心的指导和无私的帮助，一步步引导我分析问题、调整方案，最终顺利完成我的论文。同时，要感谢实验室的其他老师-钱森和老师、赵世光老师、魏明老师、李闯老师和刘庆涛老师，感谢大学中遇到的所有老师的帮助与栽培，我们才能走到今天，走到毕业。

特别感谢我的家人，是你们默默地支持和鼓励，让我能够心无旁骛地投入学习。你们用温暖的怀抱包容我的疲惫与压力，用鼓励的话语给予我信心和勇气。在我因学业繁忙无法陪伴你们时，你们总是说“安心学习，家里一切都好”，这份理解与体谅，我将永远铭记于心。

数声风笛离亭晚，君向潇湘我向秦。感谢我的室友雅妮、现现还有杨老师，那些一起为论文熬夜奋战的日子，一起在校园里漫步谈心的时光，都成为了我生命中最珍贵的回忆，感谢你们的陪伴与支持，让我的硕士生活充满了欢声笑语。感谢我亲爱的闺蜜胡婷婷，在我失意消沉时一通通电话的安慰，实验遇到困难时无数次的鼓励。感谢师兄石成龙和汪锡武对我的帮助和关心，感谢实验室的小伙伴杨子成、肖柳柳和师弟阮永海，感谢研究生三年遇到的每一个人。

最后，感谢过去这三年的时光中遇到的点点滴滴的温暖与快乐，感谢自己面对困难时的勇气和坚持，也感谢自己始终保持对生活的那一份热情和善良。虽然硕士阶段的学习即将结束，但这不是终点，而是新的起点，去结识更多的人，去欣赏更多的美景，让一切逐渐发生，慢慢地相遇。人生难免遇到挫折，但是未来广阔、一切皆有可能。

方旭娟

2025年4月15号