

一种 A 型肉毒毒素的制备方法及其应用

交叉引用

本发明要求于 2023 年 6 月 8 日向中国专利局提交的申请号为 202310681461.9, 发明名称为“一种 A 型肉毒毒素的制备方法及其应用”的优先权, 其全文内容作为引用整体合并于此。

技术领域

本发明涉及多肽制备的技术领域, 尤其是 A 型肉毒毒素的高效制备, 以及其在制备药物方面的用途。

背景技术

肉毒芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)和破伤风芽孢梭菌产生高度有力的神经毒素, 即分别是肉毒毒素(BoNT)和破伤风神经毒素(TeNT), 这些梭毒素(CNTs)特异性地结合至神经元细胞, 并且干扰神经递质的释放。肉毒芽孢梭菌分泌肉毒毒素(BoNT)的七种以 A 到 G 命名的差异抗原血清型, 所有血清型均为阻断突触的胞吐的 Zn^{2+} -内蛋白酶, 其通过切割控制细胞膜融合的 SNARE 复合体的形成中涉及的蛋白质来进行上述阻断。

1989 年, 美国批准了肉毒毒素血清型 A(BoNT/A)应用于人类以治疗斜视、眼睑痉挛及其它疾病。其市售可得为肉毒毒素 A 蛋白质制剂, 例如以商品名 BOTOX(Allergan 公司)和商品名 DYSPORT(Ipsen 有限公司)出售。BoNT/A 的高效制备和产品应用在医疗领域展现出了巨大的商业价值。

天然存在的梭菌属毒素各自被翻译为约 150kDa 的单链多肽, 单链多肽的二硫环随后被天然存在的蛋白酶(例如像内源性梭菌属毒素蛋白酶或环境中产生的天然存在的蛋白酶)通过蛋白水解切割作用而裂解, 翻译后加工产生成熟双链分子, 分子包含约 50kDa 轻链(LC)和约 100kDa 重链(HC), 二者通过单个链间二硫键和非共价相互作用结合在一起。在参与的半胱氨酸残基之间有接头区域或环状区域, 其长度在各种血清型的梭毒素之间变化很大, 该环最迟会在细胞溶胞过程中从梭菌释放毒素时, 其中切割和未切割的种类的比率在血清型之间有所不同, 蛋白酶的切割(在环状区域和重链的末端)是随机的, 由此会产生许多不被期望的中间产物, 从而增加了纯化的难度, 并降低了产品的得率, 有一种在大肠杆菌中分别表达及纯化 TeTx 和 BoNTs 的重链和轻链的方法(参见 Li, et al., Biochemistry 33:7014-7020(1994); Zhou, et al., Biochemistry, 34: 15175-15181(1995)), 在没有 L 链时, 分离的 H 链水溶性很差并且非常容易被蛋白水解降解, 因此并不实用。专利 US7709228 公开了可以进行修饰的酶切位点

和可以特异地识别这些位点的蛋白酶，但其重组产品的毒性相当于天然 TeTx 的五之二，其下降幅度并不是十分显著。同时现有的技术人员一般会通过限制性内切酶构建方法，将目的蛋白构建到目的区域后，会引入 2-3 个氨基酸残留，这样会出现免疫原性的风险。因此，领域内亟需一种对肉毒素神经毒素的高效、安全的制备方法，以得到安全性高、产率高的多肽产品，使其能够更加安全、更加有效的应用于医学治疗。

发明内容

针对现有技术的不足，本发明目的在于提供一种肉毒素的制备方法和应用。

本发明的技术方案本发明的目的之一，一种重组 A 型肉毒素（BoNT/A），其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示。

优选地，所述重组 A 型肉毒素（BoNT/A）的氨基酸序列包括 SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 5；

(a) 编码 BoNT/A 的 Lc 区域，氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示；

(b) 编码凝血酶酶切位点，氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示；

(c) 编码 BoNT/A 的 Hc 区域，氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

优选地，通过同源重组法将组合标签插入 BoNT/A 的氨基酸序列 N 端，即设计得到的重组 A 型肉毒素（BoNT/A）的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 13 所示的。

优选地，所述组合标签为 His 标签和 SUMO 标签。

His 标签，其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示，其编码核苷酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

SUMO 标签，其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 11 所示，其编码核苷酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示。

本发明的目的之二，重组 A 型肉毒素（BoNT/A）的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

- (1) 设计和构建重组 A 型肉毒素（BoNT/A）的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示的；
- (2) BoNT/A 表达载体的设计和连接制备；
- (3) BoNT/A 蛋白的诱导表达和菌体收集；
- (4) 菌体上清的亲和纯化；
- (5) 酶切去除 SUMO 标签并激活 BoNT/A 蛋白。

优选地，所述酶切去除 SUMO 标签并激活 BoNT/A 蛋白的实验步骤为：SUMO 标签酶切后，再按照 1mg 蛋白加入 1U 凝血酶。

优选地，所述 BoNT/A 蛋白的诱导表达步骤为：菌体 OD₆₀₀ 为 0.6 后加入终浓度为 1mM

IPTG 30°C诱导培养 12h。

优选地，所述菌体收集步骤为：4000rpm 离心收集菌泥，利用 40ml 20mM PB+150mM NaCl, pH 7.2 重悬，420W 冰浴超声破碎，超声 3S，间隔 5S，持续 15min；12000rpm，4°C 离心 20min 离心再次收集上清；

所述菌体上清的亲和纯化的具体步骤为：离心收集的上清经过 0.22 μm 滤膜过滤后进行 Ni 柱亲和富集纯化，其中平衡缓冲液为 20mM PB+150mM NaCl, 清洗缓冲液为 20mM PB+150mM NaCl+5mM 咪唑、20mM PB+150mM NaCl+20mM、20mM PB+150mM NaCl+50mM 咪唑、20mM PB+150mM NaCl+80mM 咪唑，洗脱缓冲液为 20mM PB+150mM NaCl+300mM 咪唑，试剂酸碱度均为 pH8.0。

本发明的目的之三，通过上述方法制备得到的重组 BoNT/A 多肽。

本发明的目的之四，通过上述方法制备得到的重组 BoNT/A 多肽在制备药物中的应用。

有益效果

本发明提供了一种重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A) 的制备方法，在 P0DP10 蛋白数据库设计 BoNT/A 氨基酸序列，通过同源重组法将 His 标签（其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示，其编码核苷酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示）和 SUMO 标签序列（其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 11 所示，其编码核苷酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示）插入 BoNT/A 氨基酸序列 N 端的设计，再通过 SUMO 蛋白酶在 GG-M 之间进行切割，不会有任何标签和 SUMO 序列的氨基酸残留。

当凝血酶用量为 0U 时，目的蛋白并未呈现两个片段，使得 BoNT/A 蛋白未被激活，即得到无活性的 BoNT/A 蛋白；当凝血酶用量分别为 0.5U、1U、2U 和 3U 时，只有按照 1mg 蛋白加入 1U、2U 和 3U 时凝血酶时，凝血酶切后目的蛋白呈现两个片段，且上清液纯化得到的 BoNT/A 蛋白更多的被激活，同时又考虑到使用凝血酶的量越大，越不安全风险问题，所以本方案优选按照 1mg 蛋白加入 1U 凝血酶。

还有通过对比实验，结果显示以 SUMO 标签标记时，选择菌体离心上清液进行标签去除的酶切和 A 型肉毒毒素蛋白多肽的激活，对标签的去除和多肽的激活均体现更为高效；动物实验限制，上述上清制备纯化并激活得到的重组 A 型肉毒毒素多肽毒力更强，因此在实际应用中，副作用和刺激也显著降低，具有更高的安全性。

附图说明

图 1 示出了 SUMO-BoNT/A 表达载体示意图。

图 2 示出了 pKMD-SUMO 空白质粒抽提鉴定结果。

图 3 示出了 BoNT/A 分段 PCR 产物鉴定结果。

图 4 示出了 BoNT/A 转化子 PCR 产物鉴定结果。图 5 示出了 pKMD-SUMO-BoNT/A 表达载体酶切鉴定。

图 6 示出了表达菌株转化与鉴定。

图 7 示出了 BoNT/A 目的蛋白上清纯化结果。

图 8 示出了 BoNT/A 目的蛋白包涵体纯化结果。

图 9 示出了目的蛋白 SUMO 标签酶切结果。

图 10 示出了上清目的蛋白凝血酶酶切激活结果。

图 11 示出了目的蛋白凝血酶激活结果。

具体实施方式

下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

实施例 1：设计和构建 BoNT/A 的氨基酸序列

(1) 设计和构建 BoNT/A，其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 7 所示，其核酸分子如 SEQ ID NO. 8 所示，并且 BoNT/A 分子从 5' 端起依次包含：

(a) 编码 BoNT/A 的 Lc 区域，氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示，其对应的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示；

(b) 编码凝血酶酶切位点，氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示，其对应的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 4 所示；

(c) 编码 BoNT/A 的 Hc 区域，氨基酸序列如 SEQ ID NO. 5 所示，其对应的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 6 所示；

BoNT/A 蛋白信息来源于 Uniprot 网站，其唯一蛋白数据库编号为 P0DPI0，详见 <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0DPI0/entry>。

(2) 通过同源重组法将组合标签插入 BoNT/A 的氨基酸序列 N 端，即设计得到的重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示，其对应的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 14 所示。

其中组合标签为 His 标签和 SUMO 标签。

His 标签，其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 9 所示，其编码核苷酸序列如 SEQ ID NO. 10 所示。

SUMO 标签，其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 11 所示，其编码核苷酸序列如 SEQ ID NO. 12 所示。

实施例 2：BoNT/A 表达载体的设计和连接制备

(1) 表达载体的选择：空白质粒作为 BoNT/A 表达载体骨架载体，通过获得的氨基酸进行密码子优化后获得在原核宿主中能够有益表达的基因密码子序列，再利用质粒构建设计软件 Snapgene 进行理论上的序列拼接，即载体示意图构建设计，获得完整的表达载体构建示意图如图 1 所示。

(2) 表达载体的制备：首先对空白质粒进行抽提和鉴定，鉴定结果如图 2 所示，左侧泳道显示质粒得到提取。

(3) 目的片段的合成和预扩增：将化学合成的 BoNT/A 氨基酸序列,即氨基酸序列包括的 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.5，所对应核苷酸序列分别 SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4 和 SEQ ID NO.6；首先将这三段核苷酸序列进行 PCR 分段预扩增，引物序列由公司内部引物。具体地

上游引物 G0268322-1F：SEQ ID NO. 15
TATCGAAGCCCATCGCGAACAGATTGGTGGTATGCCGTTTGTTAATAAGCAGTTTAACTATAAG

下游引物 G0268322-1R1：SEQ ID NO. 16
CACCGGAATGGCAATTTCCGGAATGAATTCCAG

预期扩增的片段长度为 2100bp，凝胶电泳鉴定如图 3 所示的两个扩增片段。

(4) 目的片段的自连接以及其与载体的连接：

合成的 BoNT/A 核苷酸片段连接后，与载体连接反应体系如表 1 所示，采用同源重组酶的连接原理，在 52℃恒温环境下连接 30min，而后进行转化。

表 1. 同源重组酶的连接反应体系

反应物	体积
自连接纯化的 PCR 产物	5 μl
酶切后载体	5 μl
无缝组装 MIX	10 μl
总体积 20 μl	
以上连接液在 52℃恒温环境下连接反应 30min	

(5) 重组质粒的转化：

- (a) 将质粒浓度在 100ng/μl 左右的质粒吸取 1-3 μl 加入到 100μl 左右的 BL21 菌株感受态细胞里，轻轻晃动旋转以混匀，冰上放置 3 分钟。质粒浓度较高的适当少加质粒，质粒浓度较低的可多加一些质粒；

- (b) 42℃水浴 90s 不要摇动，冰浴中放置 3 分钟左右；
- (c) 每管中加入 500-800 μl 37℃ 预温 LB 培养基，37℃摇床 200rpm 温和振荡 40 分钟。
- (6) 重组质粒的验证：
- (a) 制备含相应抗性的琼脂平板；
- (b) 取 100 μl IBL21 菌株菌液,然后平铺在含有相应抗性的琼脂板，用无菌玻璃涂布器轻轻将细菌涂在平板表面，将平板置于 37℃培养 15 分钟；
- (c) 倒置平板于 37℃培养 12-16 小时可出现菌落；
- (d) 平板挑菌，37℃ 250 转/分钟摇菌 14 小时，用菌液进行 PCR 鉴定，将阳性克隆菌液测序。

上游引物：SEQ ID NO.15

TATCGAAGCCCATCGCGAACAGATTGGTGGTATGCCGTTTGTTAATAAGCAGTT
TAACTATAAG；

下游引物：SEQ ID NO.16

CACCGGAATGGCAATTTCCGGAATGAATTCCAG

(7) PCR 鉴定反应体系：

BoNT/A 转化子 PCR 产物鉴定：设计引物预期扩增的片段长度为 2100bp（目的基因的部分序列），PCR 反应采用 20μL 体系：引物 0.5μL，模板菌液 2μL，聚合酶缓冲液 0.5μL，buffer 3 μl，ddH₂O 14μL。循环参数：96℃预变性 3min；95℃15S，58℃15S，72℃20s，23 个循环，72℃终延伸 1min，如图 4 所示，BoNT/A 转化子挑选 8 个进行 PCR 产物鉴定，引物采用前文所述：G0268322-1F 和 G0268322-1R1。选择并得到阳性转化子。

酶切鉴定：获得阳性转化子后，构建成功后的 pKMD-SUMO-BoNT/A 表达质粒(基因编号为：G0268322-1)，通过酶切实验鉴定质粒结构，选用酶为：EcoRI，预计获得 1851/7599 两个片段，反应体系如表 2，实验结果如图 5 所示。

表 2. 酶切反应体系

pKMD-SUMO-BoNT/A 质粒	5μl
EcoRI 内切酶	0.25μl
10x Buffer	1.0μl
ddH ₂ O	加到终体积 10μl
反应温度	37℃，1h

实施例 3：BoNT/A 蛋白的诱导表达和菌体收集

(1) 表达菌株转化

取Rosetta BL21感受态一只100 μ l, 放置冰上化冻, 超净工作台内取1.5ml无菌离心管, 并均分50 μ l感受态细胞;

取实施例2构建的载体20 μ l, 在超净工作台中将质粒加入到感受态细胞中, 轻轻混匀后, 冰浴30min;

42°C热击 90S 后立即冰浴 5min, 取 30 μ l 涂布 TB (含 50 μ g/ml Kana) 平板, 37°C培养 14h (过夜培养) 后挑取单克隆进行活化培养;

(2) 表达鉴定

从表达菌株转化的 TB 平板中挑取单克隆, 加入 2ml TB 液体培养基 (含 50 μ g/ml Kana); 活化至菌体OD600为0.6-0.8后, 转接到5ml TB液体培养基 (含50 μ g/ml Kana); 培养至菌体OD600为0.6-0.8后加入浓度为1mM的IPTG进行37°C诱导表达4h后收集菌体;

取诱导表达前与诱导后各条件的菌体制样 SDS-PAGE 分析; 实验结果如图 6 所示, 泳道 2 和 3 均有明确表达。

(3) 菌体放大表达和收集

从表达鉴定中选取能够表达目的蛋白的 BL21 菌株, 接种到 1L TB 培养基 (含 50 μ g/ml kana) 中, 220rpm, 37°C扩大培养至 OD₆₀₀ 至 0.6-0.8, 再加入终浓度为 1mM IPTG 30°C诱导培养 12h 后, 4000rpm 离心收集菌体待用。

收集获得的菌泥利用 40ml 20mM PB+150mM NaCl, pH 7.2 重悬, 420W 冰浴超声破碎, 超声 3S, 间隔 5S, 持续 15min; 12000rpm, 4°C离心 20min 离心分别收集上清和沉淀, 待用。

实施例 4: 菌体上清和沉淀包涵体的亲和纯化

(1) 上清纯化: 离心收集的上清经过 0.22 μ m 滤膜过滤后进行 Ni 柱亲和富集纯化
平衡缓冲液: “20mM PB+150mM NaCl, pH8.0”

清洗缓冲液: 20mM PB+150mM NaCl+5mM 咪唑, pH8.0

20mM PB+150mM NaCl+20mM 咪唑, pH8.0

20mM PB+150mM NaCl+50mM 咪唑, pH8.0

20mM PB+150mM NaCl+80mM 咪唑, pH8.0

洗脱缓冲液: 20mM PB+150mM NaCl+300mM 咪唑, pH8.0 流穿, 纯化样品, 加入 loading buffer 后 100°C煮样后进行 SDS-PAGE 分析, 实验结果如图 7 所示, 泳道 2-9 均获得 BoNT/A 目的蛋白。

(2) 沉淀包涵体蛋白纯化：离心收集的沉淀经过 20mM PB+150mM NaCl, pH 7.2 重悬重悬，后进行 Ni 柱亲和富集纯化

平衡缓冲液：20mM PB+150mM NaCl, pH8.0

清洗缓冲液：20mM PB+150mM NaCl+5mM 咪唑, pH8.0

20mM PB+150mM NaCl+20mM 咪唑, pH8.0

20mM PB+150mM NaCl+50mM 咪唑, pH8.0

20mM PB+150mM NaCl+80mM 咪唑, pH8.0

洗脱缓冲液：20mM PB+150mM NaCl+300mM 咪唑, pH8.0 流穿，纯化样品，加入 loading buffer 后 100℃煮样后进行 SDS-PAGE 分析，实验结果如图 8 所示，泳道 2-10 均获得 BoNT/A 目的蛋白。

(3) 酶切去除 SUMO 标签并激活 BoNT/A 蛋白：SUMO 标签酶切后，SUMO 标签切割彻底，实验结果如图 9 所示，上清纯化 BoNT/A 蛋白比包涵体纯化 BoNT/A 蛋白，经过 SUMO 酶切后，酶切彻底。

现对 BoNT/A 蛋白进行凝血酶酶切优化，处理如下：

凝血酶：上海源叶生物科技有限公司 货号：S10117-1ku 凝血酶/Thrombin Lot: M25HS179066

实验组 1：按照 1mg 蛋白加入 0 U 凝血酶，酶切 16 小时。

实验组 2：按照 1mg 蛋白加入 0.5U 凝血酶，酶切 16 小时。

实验组 3：按照 1mg 蛋白加入 1 U 凝血酶，酶切 16 小时。

实验组 4：按照 1mg 蛋白加入 2U 凝血酶，酶切 16 小时。

实验组 5：按照 1mg 蛋白加入 3U 凝血酶，酶切 16 小时。

凝血酶是通过人工合成的方式获得的，并不存在于自然界中；通常人们使用凝血酶进行酶切操作，以切割蛋白质链；而在使用凝血酶时，剂量是一个很重要的因素。剂量过高可能会导致血栓的形成或出现出血等和环境污染等不安全问题。

从图 10 可以看出，上清目的蛋白凝血酶酶切激活结果：当凝血酶用量为 0 U 时，目的蛋白并未呈现两个片段，使得 BoNT/A 蛋白未被激活，即得到无活性的 BoNT/A 蛋白；当凝血酶用量分别为 0.5U、1U、2U 和 3U 时，只有按照 1mg 蛋白加入 1U、2U 和 3U 时凝血酶时，凝血酶切后目的蛋白呈现两个片段，且上清液纯化得到的 BoNT/A 蛋白更多的被激活，同时又考虑到使用凝血酶的量越大，越不安全这样的风险，本方案优选按照 1mg 蛋白加入

1U 凝血酶。

上清和包涵体目的蛋白凝血酶激活结果，按照 1mg 蛋白加入 1U 凝血酶，酶切 16 小时，从图 11 可以看出，上清纯化 BoNT/A 蛋白和包涵体纯化 BoNT/A 蛋白，均经过凝血酶激活后，上清纯化 BoNT/A 蛋白完全激活。

实施例 5：多肽的活性安全性对比验证

(1) 受试药物：待测样品为本方法凝血酶激活后的上清、沉淀包涵体纯化来源重组 A 型肉毒毒素活性多肽的蛋白冻干粉，取待测样品 1 瓶（50 μg），加灭菌注射用水 1ml，溶解。

动物：昆明小鼠，SPF 级，26~30 日龄，来源：广东省医学实验动物中心；实验动物生产许可证：SCXK(粤)2022-0002，合格证：№.44007200115254，2023-03-23 采购。实验动物使用许可证：SYXK(粤)2021-0253。检疫期为：2023-03-23~2023-03-26。

仪器：MS8001TS 电子天平(20213248)；902 超低温冰箱（20141115）；HYC-390F 医用冷藏箱（20212898）；DW-25L262 医用低温保存箱（20212917）。

(2) 实验方法：

(a) 样品准备：取待测样品 1 瓶（50 μg），加灭菌注射用水 1ml，溶解。按照 10 倍稀释法，依次稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 。

(b) 动物注射：取稀释度 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 共计 4 个稀释度，各稀释度腹腔注射 26-30 日龄 SPF 级昆明小鼠 4 只，每只注射 0.1ml，统计 4 天内小鼠存活与死亡情况，用统计学方法（Reed-Muench）计算本品的毒力，单位为 LD₅₀/ml。

(3) 实验结果：上清纯化来源重组 A 型肉毒毒素活性多肽和沉淀包涵体来源重组 A 型肉毒毒素活性多肽的蛋白安全性数据如表 3 所示。

表 3. 重组 A 型肉毒毒素活性多肽的蛋白安全性数据

上清纯化来源重组 A 型肉毒毒素活性多肽的蛋白安全性数据							
稀释度	小鼠数量 (只)	存活	死亡	累计存活	累计死亡	死亡比	死亡率
		(只)	(只)	(只)	(只)		(%)
10^3	4	0	4	0	4	4/4	100
10^4	4	0	4	0	4	4/4	100
10^5	4	0	4	0	4	4/4	100
10^6	4	4	0	4	0	0/4	0

沉淀包涵体来源重组 A 型肉毒毒素活性多肽的蛋白安全性数据							
稀释度	小鼠数量 (只)	存活	死亡	累计存活	累计死亡	死亡比	死亡率
		(只)	(只)	(只)	(只)		(%)
10 ¹	4	2	2	2	2	2/4	50
10 ²	4	4	0	4	0	0/4	0
10 ³	4	4	0	4	0	0/4	0
10 ⁴	4	4	0	4	0	0/4	0

LD₅₀ 距离比计算：按照 Reed-Muench 法计算：距离比=（高于 50%的死亡数-50%）/（高于 50%的死亡百分数-低于 50%的死亡百分数）即，距离比=（100%-50%）/（100%-0%）=50/100=0.5，LD₅₀ 的对数=高于 50%的样品稀释度的对数+距离比例×稀释系数的对数，即，LgLD₅₀=-5+0.5×（-1）=-5.5，1×10^{5.5} LD₅₀ 是指注射体积为 0.1ml 条件下的样品毒力单位，即 1×10^{5.5} LD₅₀/0.1ml。药典取 0.5ml 体积注射小鼠，因此 5×10^{5.5} LD₅₀/ml。药典 3.1 规定 1×10⁷ LD₅₀/mg 以上，1000/50=20 倍，即 5×10^{5.5} LD₅₀/ml×20 倍=1×10^{7.5} LD₅₀/mg。

因此，上清纯化来源重组 A 型肉毒毒素活性多肽的注射体积为 0.1ml 条件下的本样品毒力为 1×10^{5.5} LD₅₀，而沉淀包涵体来源的重组 A 型肉毒毒素活性多肽的蛋白毒力明显更弱，即在使用中，上清纯化来源重组 A 型肉毒毒素活性多肽在较低剂量下便可发挥作用，相较于沉淀包涵体来源的重组 A 型肉毒毒素活性多肽需要大剂量使用的情况下，显著具有更高的安全性。

综上所述，本发明通过对比试验验证了上清来源的重组 A 型肉毒毒素活性多肽，在使用 SUMO 标签纯化时，能够高效去除标签，酶切后高比例激活，并在突出的强效毒力下，具备显著的使用安全性。

本发明可用其他的不违背本发明的精神或主要特征的具体形式来概述。因此，无论从哪一点来看，本发明的上述实施方案都只能认为是对本发明的说明而不能限制本发明，权利要求书指出了本发明的范围，而上述的说明并未指出本发明的范围，因此，在与本发明的权利要求书相当的含义和范围内的任何改变，都应认为是包括在本发明的权利要求中。

权 利 要 求 书

1、一种重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A)，其特征在于：其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示。

2、如权利要求 1 所述的重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A)，其特征在于，所述重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A) 的氨基酸序列包括 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3 和 SEQ ID NO.5；

(a) 编码 BoNT/A 的 Lc 区域，序列如 SEQ ID NO.1 所示；

(b) 编码凝血酶酶切位点，序列如 SEQ ID NO.3 所示；

(c) 编码 BoNT/A 的 Hc 区域，序列如 SEQ ID NO.5 所示。

3、如权利要求 2 所述的重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A)，其特征在于，通过同源重组法将组合标签插入 BoNT/A 的氨基酸序列 N 端，即设计得到的重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示的。

4、根据权利要求 3 所述的重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A)，其特征在于，所述组合标签为 His 标签和 SUMO 标签。

5、根据权利要求 4 所述的重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A) 的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

(1) 设计和构建重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO.13 所示的；

(2) BoNT/A 表达载体的设计和连接制备；

(3) BoNT/A 蛋白的诱导表达和菌体收集；

(4) 菌体上清的亲和纯化；

(5) 酶切去除 SUMO 标签并激活 BoNT/A 蛋白。

6、根据权利要求 5 所述的重组 A 型肉毒毒素 (BoNT/A) 的制备方法，其特征在于，所述酶切去除 SUMO 标签并激活 BoNT/A 蛋白的实验步骤为：SUMO 标签酶切后，再按照 1mg 蛋白加入 1U 凝血酶。

7、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于：所述 BoNT/A 蛋白的诱导表达步骤为：菌体 OD₆₀₀ 为 0.6 后加入终浓度为 1mM IPTG 30℃诱导培养 12h。

8、根据权利要求 7 所述的制备方法，其特征在于：所述菌体收集步骤为：4000rpm 离心收集菌泥，利用 40ml 20mM PB+150mM NaCl, pH 7.2 重悬，420W 冰浴超声破碎，超声 3S，间隔 5S，持续 15min；12000rpm，4℃离心 20min 离心再次收集上清；

所述菌体上清的亲和纯化的具体步骤为：离心收集的上清经过 0.22 μm 滤膜过滤后进行 Ni 柱亲和富集纯化，其中平衡缓冲液为 20mM PB+150mM NaCl,清洗缓冲液为 20mM

PB+150mM NaCl+5mM 咪唑、20mM PB+150mM NaCl+20mM 咪唑、20mM PB+150mM NaCl+50mM 咪唑、20mM PB+150mM NaCl+80mM 咪唑，洗脱缓冲液为 20mM PB+150mM NaCl+300mM 咪唑，试剂酸碱度均为 pH8.0。

9. 一种根据利用权利要求 1-8 任一项所述的方法制备得到的重组 BoNT/A 多肽。
- 5 10. 一种根据利用权利要求 1-9 任一项所述的方法制备得到的重组 BoNT/A 多肽在制备药物中的应用。