

重组抗人活化血小板单链抗体-尿激酶原导向溶栓剂的基因构建及表达*

张曼 方巧君 胡美浩**

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 为了获得特异性高的导向溶栓药物, 应用 PCR 技术, 得到抗人活化血小板单抗(SZ-51)的 Fab 基因片段。再用酶切方法, 将 Fab 中 CH1 基因片段替换成合成的连接分子(linker)基因, 构建成单链抗体基因, 并插入到人尿激酶原分泌肽基因及低分子量单链尿激酶(scu-PA-32k)之间, 最终构建成重组抗人活化血小板单链抗体-尿激酶原融合蛋白基因。此融合蛋白基因在昆虫细胞中得到表达。纯化的表达产物 SDS-PAGE 鉴定, 其分子量约为 60 kD, 与预期值相符。其比活为 9 000 IU/mg 蛋白。ELISA 法初步证明此重组的融合蛋白具有与活化血小板抗原结合特异性。

关键词 导向溶栓分子, 血小板, 单链抗体, 尿激酶原

Construction and Expression of a Thrombolytic-targeted Molecule with Single Chain Antibody against Activated Human Platelet

ZHANG Man, FANG Qiaojun, HU Meihao

(National Laboratory of Protein Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract In order to obtain a thrombolytic-targeted protein, a chimerical molecule, scFv-U K32, containing the low molecular weight form of Pro-urokinase (scu-PA-32k) and the single chain form (scFv) of the monoclonal antibody SZ-51 against the glycoprotein GMP-140 on activated platelet membrane was designed and constructed. The cDNA of scFv of SZ-51 was generated by PCR in which SZ-51 Fab cDNA served as the template and a flexible linker (Gly₄Ser)₂Gly₃ was introduced between VH (variable region of heavy chain) and VK (variable region of light chain). Scu-PA-32k DNA was generated by PCR in which the pro-UK cDNA served as the template. In the transferring vector pBacPA K8/Fv-U K32, scFv was inserted behind the Pst I site after the secret peptide, and scu-PA-32k was located on the C-terminal of the entire chimerical molecule pBacPA K8/Fv-U K32 was cotransfected into insect cells Sf9 together with the linear virus A cNPV DNA (BacPA K6/Bsu36 I digest). The fibrin plate assay showed the thrombolysis activity of the supernatant of cotransfected cells was 20 IU/ml. The affinity-column of monoclonal antibody against B chain of pro-UK was used to purify the expression product. SDS-PAGE showed that the molecular weight of the chimerical protein was about 60 kD and the scanning of the SDS-PAGE showed the purity was 82%. The thrombolysis activity of the lyophilized powder was about 9 000 IU/mg protein. The ELISA assay demonstrated that the chimerical molecule possessed the activity of binding to the activated platelet as well.

Key words Thrombolytic-targeted molecule, Platelet, scFv, scu-PA-32k

人尿激酶原, 作为第二代溶栓药物, 具有较强的纤维蛋白特异性。在体外实验及体内动物模型实验, 均得到较好的溶栓效果。但在冠状动脉栓塞病人治疗中, 所需剂量较大, 因此仍会引起全身性出血的副作用。为了克服以上缺点, 我们构建了抗血小板 α

* 863高科技项目资助(863-102-09)

** 联系人 Tel: (010) 62751859, Fax: (010) 62751843,

E-mail: humh@plum.1sc.pku.edu.cn

张曼, 女, 1972年5月生, 硕士研究生

收稿日期: 1998-12-04, 修回日期: 1999-02-25

颗粒膜蛋白 GM P-140的抗体 SZ-51^[1]的单链抗体基因, 作为导向抗体, 与低分子量尿激酶原 (scu-PA -32k) 融合, 并在昆虫杆状病毒系统中表达, 以期得到一种新型导向溶栓药物。

1 材料与方法

1.1 材料

含低分子量人尿激酶原 cDNA 质粒 pBS/U K32及人尿激酶原质粒 pBS-U PA (*Pst* I) 为本实验室构建。含 SZ-51-Fab 单抗 cDNA 质粒 (pHEN I/

SZ-51 Fab) 为苏州医学院阮长耿教授提供。昆虫杆状病毒载体 pBacPA K8及线性野生病毒 DNA (BacPA K6/*Bsu*36 I digest) 为 Clontech 公司产品。抗 pro-U K 单抗 4D 1E8 为 Lijnen 教授和 Declerck 教授赠送。T7 DNA 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司。纤维蛋白平板测活试剂盒购自中国生物药品检定所。其它化学试剂均为分析纯。连接 VH 及 VK 的 linker (Fig. 1) 及扩增 SZ-51Fab 的引物 I 及 II 由上海生工公司合成 (Fig. 2)。

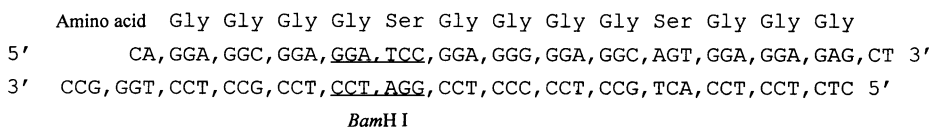


Fig 1 The nucleic acids and amino acids sequences of the linker between VH and VK of SZ-51

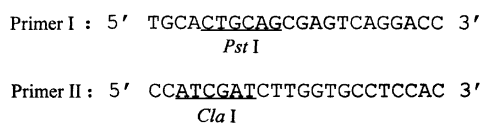


Fig 2 The PCR primers of SZ-51-Fab

1.2 方法

1.2.1 SZ-51单链抗体 (scFv) 基因的构建

合成分别具有 *Pst* I 及 *Cla* I 位点的引物 I 和 II (Fig. 2), 分别与 VH 的 5' 序列及 VK 的 3' 序列互补。以 pHEN I/SZ-51/Fab 为模板, 扩增 SZ-51-Fab 基因片段, 并克隆入 pBS 克隆质粒。利用 SZ-51-Fab 上的 *Apa* I 位点, 将其中的 CH1 换成合成的 L linker (Fig. 1) 基因片段, 最终构建含 scFv 基因片段的质粒 pBS/scFv。

1.2.2 pBS/Fv-U K32 质粒及转移载体 pBacPA K8/Fv-U K32 的构建

为了利用人尿激酶原 cDNA 的分泌肽基因, 我们将人尿激酶原 cDNA 上分泌肽基因后引入了一个 *Pst* I 位点构成了质粒 pBS/U PA (*Pst* I), 以便 scFv 基因片段与之连接。将 pBS/U K32 质粒的 *Cla* I 及 *Hind* III 酶切片段, scFv 基因片段及带有分泌肽基因 pBS/U PA (*Pst* I) 的 *Pst* I 及 *Hind* III 酶切大片段进行三段连接 (Fig. 3), 构建成 pBS/Fv-U K32。再利用 *Xba* I 及 *Kpn* I 位点将嵌合基因片段插入 pBacPA K8, 构建成 pBacPA K8/Fv-U K32 转移载体 (Fig. 4)。

1.2.3 嵌合基因 scFv-U K32 的表达

将野生型线性病毒 DNA 1 μ g, 与转移载体 DNA (5~10 μ g), 加入到 50 μ l 脂质体中, 终体积为 100 μ l, 室温下放置 15 min, 共转染对数生长期的 Sf9 细胞。于 27 $^{\circ}$ C 培养 6 d 后, 用纤维蛋白平板法检测细胞培养上清中的溶纤活性。

1.2.4 DNA 测序

按照 T7 DNA 序列分析套盒说明书进行。

1.2.5 纤维蛋白平板法检测活性

参照中国生物药品检定所试剂说明书进行。

1.2.6 ELISA 法检测表达产物与活化血小板抗原的结合活性

将活化血小板包被的 ELISA 板, 用 200 μ l PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。然后向各孔中加入适量表达产物, 37 $^{\circ}$ C 保温 2 h。用 PBST (含 0.02% Tween-80 的 PBS) 洗。再向各孔中加入 200 μ l 抗 pro-U K 单抗 4D 1E8 (5 μ g/ml), 37 $^{\circ}$ C 保温 2 h 后, 同上用 PBST 洗涤。再向各孔加入 180 μ l 辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 IgG (效价为 1:1000), 37 $^{\circ}$ C 保温 2 h, 最后用 PBST 洗 3 次。加入 160 μ l 邻苯二胺 (400 μ g/ml), 0.03% H_2O_2 底物液, 于室温避光反应适当时间。再加入 50 μ l 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。

1.2.7 scFv-U K32 融合蛋白的分离纯化

按参考文献 [2] 进行。

1.2.8 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度

按参考文献 [3] 进行。

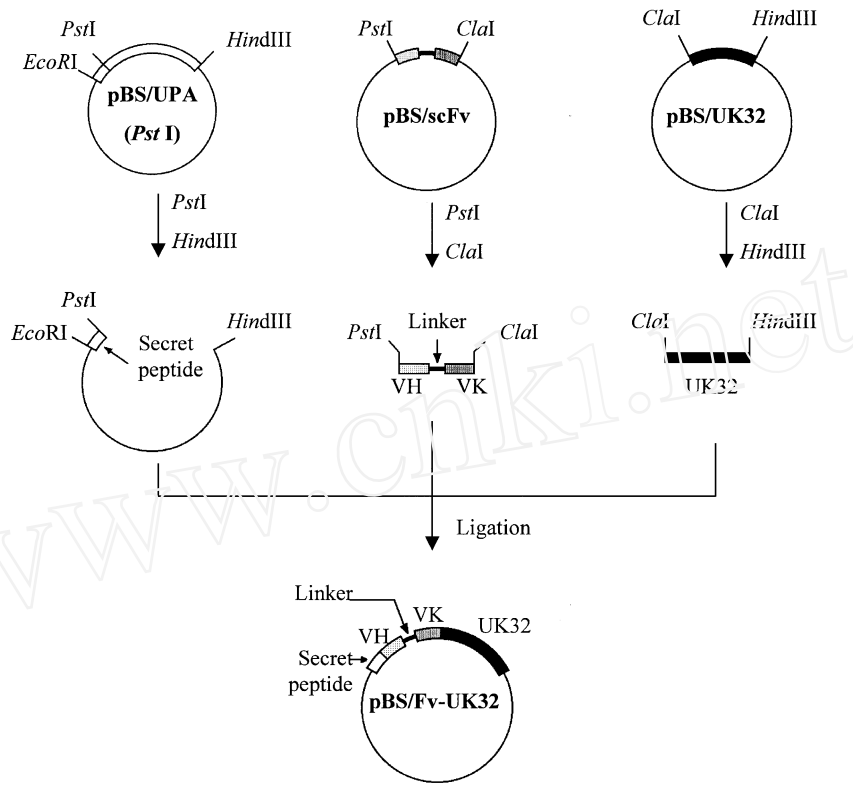


Fig 3 Construction of pBS/Fv-U K32

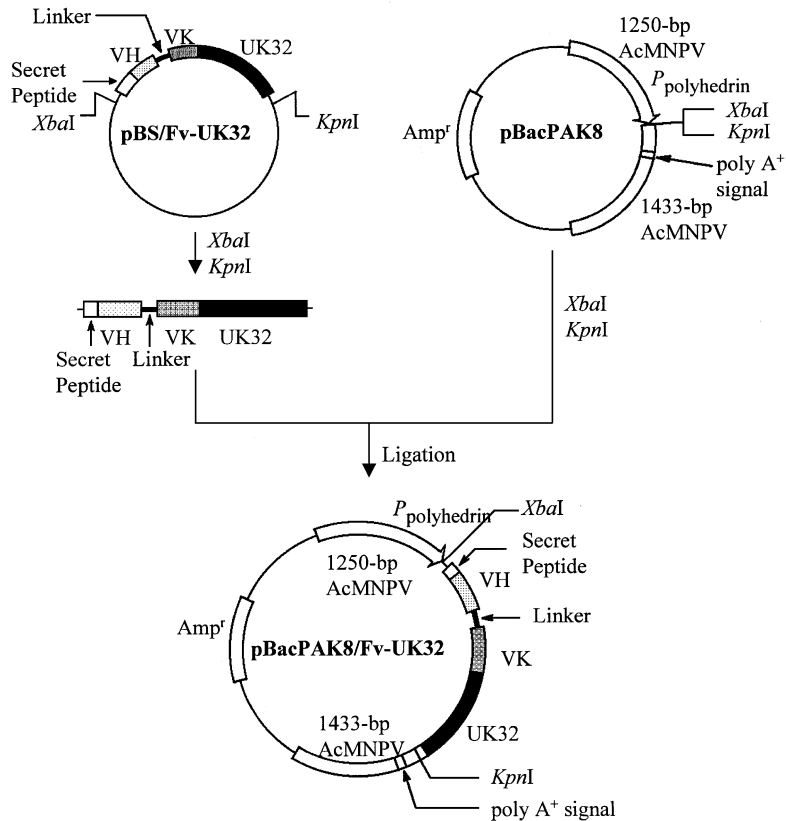


Fig 4 Construction of pBacPA K/Fv-U K32

2 结果与讨论

2.1 SZ-51的单链抗体(scFv)基因的构建

由于动脉血栓富含大量活化血小板, 可以用抗人活化血小板单链抗体做导向抗体。与完整的抗体相比, scFv 与抗原结合能力虽然有所下降, 但在体内能够更有效的参与到血栓深部, 并有利于在体内的清除, 同时具有较低的免疫原性。近年来, 已有许多将单链抗体与效应物分子相偶联的成功例子^[4,5], 因此我们选择单链抗体作导向分子。按照方法1.2.1构建成SZ-51的scFv基因, 经全长(1.6 kb)测序, 除两个碱基外, 其余序列均正确。序列测定中所发现的两处突变碱基, 第一个是在linker的第5位核苷酸G变为C, 导致Gly转变成Arg, 这可能是由于合成Linker时所产生的错误。第二个是在VH区, 第171位碱基G变为A, 则编码的61位氨基酸由Ala变为Ser。产生此突变的原因, 可能是由于PCR引起的。从以后测定融合蛋白结合活化血小板抗原的活性看, 此带有一个氨基酸突变的scFv, 仍具有与活化血小板结合能力。

2.2 scFv-UK32嵌合基因的构建及表达

由于尿激酶原的Glu 143-Leu 144位被蛋白酶水解后, 得到低分子量尿激酶原scu-PA-32k。它与完整的尿激酶原分子有完全相似的酶学性质^[6]。因此我们在构建导向溶栓分子时选用了低分子量尿激酶原做为效应分子, 这样可以减少融合蛋白总的分子量, 使其在体内能够更有效地渗入到血栓深部。按照方法1.2.2构建成的含scFv-UK32基因片段, 经酶切鉴定及片段接头处的DNA序列测定, 其序列正确, 证明我们已构建成了scFv-UK32嵌合分子基因片段(结果从略)。经重组成pBacPAK8/Fv-UK32转移载体, 并共转染至Sf9细胞中表达。纤维蛋白平板法测得重组病毒感染的细胞上清液中具有溶纤活性(20 IU/ml)。其表达量比pro-UK在昆虫杆状病毒系统中的表达量要低。这可能是由于所用转移载体不同而引起的^[7]。

2.3 嵌合分子scFv-UK32与活化血小板的结合活性

按照方法1.2.6, ELISA测得重组病毒共转染细胞培养液上清具有结合活化血小板能力(Fig 5)。与对照(PBS)相比, 其显色反应是阳性。颜色反应深浅与样品浓度成正比。这初步证明表达产物具有结合活化血小板的能力。同时也表明了scFv的VH第61位氨基酸虽然产生了突变, 但未引起抗体活性的

消失。在这一测定方法中, 我们利用了人尿激酶原单抗与融合蛋白分子的结合。由于没有SZ-51的天然样品, 因此尚不能对此融合蛋白的结合活化血小板的能力进行定量分析。



Fig 5 ELISA of Fv-UK32 conjugation with activated-platelet

- 1: Control added with PBS;
- 2- 4: Added with 100 μ l co-transfection supernatant;
- 5- 7: Added with 200 μ l co-transfection supernatant;
- 8- 10: Added with 20 μ l co-transfection supernatant

2.4 纯化的scFv/UK32融合蛋白的鉴定

收集含有表达产物的重组病毒感染上清, 按照方法1.2.7经免疫亲和柱纯化, 并经SDS-PAGE鉴定(Fig 6), 其分子量约为60 kD, 与理论值相符。PAGE胶紫外扫描显示嵌合蛋白的纯度达82%。用考马斯亮蓝法测定蛋白含量, 纤维蛋白平板法测活性, 计算其比活为9 000 IU/mg蛋白。以上实验结果说明我们通过基因工程手段制备了具有与活化血小板特异结合并有溶纤性能的融合蛋白。这为进一步开展导向溶栓剂的研究打下基础。



Fig 6 SDS-PAGE of purified Fv-UK32

1. Mid-range protein molecular weight marker;
2. Fv-UK32

References

- 1 Gu Jianming, Liu Yue, Xia Lijun, Ruan Changgen. Construction and expression of mouse human chimeric antibody SZ-51 specific for activated platelet P-selection. *Thromb Haemostas*, 1997, 77(4): 755~759
- 2 Nelles L, Collen D, Hoimes W E. Characterization of recombi-

- nant human single chain urokinase-type plasminogen activator mutant produced by site-specific mutagenesis of lysine 158 *J Biol Chem*, 1987, **262**: 5682~ 5689
- 3 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248~ 254
- 4 Chaudhary V K, Queen C, Junghans R P, Waldmann T A, Fitzgerald D J, Platan I A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to pseudomonas exotoxin *Nature*, 1989, **339**: 394~ 397
- 5 Batra J K, Fitzgerald D J, Gately M, Chaudhary V K, Platan I Anti-Tac (FV)-PE40, a single chain antibody pseudomonas fusion protein directed at interleukin 2 receptor bearing cells *J Biol Chem*, 1990, **265**: 15198~ 15202
- 6 Lijnen H R, Nelles L, Holmes W E, Collen D. Biochemical and thrombolytic properties of a low molecular weight form (comprising Leu144 through Leu411) of recombinant single-chain Urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1988, **263**: 5594~ 5598
- 7 徐扬, 张洪涛, 宓怡德, 吴祥甫, 胡美浩. 人尿激酶原 cDNA 在昆虫杆状病毒真核表达系统中的高效表达. *生物化学杂志* (Xu Yang, Zhang Hongtao, Mi Yide, Wu Xiangfu, Hu Meihao. Expression of the human pro-urokinase cDNA product in insect cells using baculovirus system. *Chin Biochem J*), 1993, **9** (6): 709~ 713