

纤维蛋白肽与低分子量尿激酶原融合蛋白的构建及性质

焦建伟 刘宁 俞梅敏 茹炳根*

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 将人工合成的寡核苷酸片段进行定向连接后, 得到编码纤维蛋白 β 链 N 端 (β 15~ 42) 多肽的基因片段及连接区片段 (linker), 再与低分子量尿激酶原 (scuPA-32k) cDNA 分子进一步连接后, 得到了 FB (15~ 42) / scuPA-32k 的融合基因. 在大肠杆菌中经过 IPTG 诱导表达, 经过变性及复性, Zn^{2+} 螯合层析及 Sephacryl S200 凝胶层析后, 目的蛋白被纯化. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 显示为一条蛋白质纯化条带, 分子质量为 35 ku. 经纤维蛋白平板法测定比活为 87 000 U/mg. 经纤溶酶活化后的融合蛋白与低分子量尿激酶相比, 对显色底物 S2444 酶促动力学性质相似. 同时 FB (15~ 42) / scuPA-32k 具有较高的纤维蛋白的亲合性并能抑制纤维蛋白凝块的形成.

关键词 低分子量单链尿激酶原, 纤维蛋白肽, 融合
学科分类号 Q71

尿激酶原 (proUK) 和组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 是比较理想的溶栓药物, 具有较强的溶栓活性, 具有一定的纤维蛋白的专一性. 但在临床大剂量使用的情况下仍可引起全身性的出血副作用及使用后再次形成栓塞^[1]. 应用蛋白质工程的手段改造现有的溶栓剂, 综合多种功能为一身的溶栓分子, 已经作为新型溶栓剂的研究热点^[2].

scuPA-32k 是一种低分子量尿激酶原, 其性质与 proUK 相似, 但分子质量较小, 稳定性较高, 在溶栓中有一定的优越性^[3]. 研究表明纤维蛋白 β 链 N 端 15~ 42 位的多肽是影响纤维蛋白单体聚合成多聚体的位点之一, 它主要参与纤维蛋白的侧向聚合^[4]. 人工合成的 FB (15~ 42) 多肽能和纤维蛋白单体聚合位点结合, 具有较强的抑制纤维蛋白聚合的功能^[5]. 设想如果将纤维蛋白肽-FB (15~ 42) 和低分子量尿激酶原——scuPA-32k 融合在一起, 得到的融合分子很可能既具有较强的溶栓活性, 同时对纤维蛋白的亲合性有所提高, 并且可能抑制溶栓治疗后以纤维蛋白凝块为主的血栓的再次形成.

我们在 scuPA-32k cDNA 与 FB (15~ 42) cDNA 基础上, 通过一段连接区, 采用基因工程技术构建了 FB (15~ 42) / scuPA-32k 的融合基因, 并在大肠杆菌中进行了表达. 并对重组蛋白进行了初步性质分析.

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pET29a 购自 Novagen 公司; 纤溶酶、纤维蛋白原、凝血酶原、S2444 (pyr-Glu-Gly-Arg-p-nitroalide) 购自 Sigma 公司; 尿激酶标准品购自中国药品生物制品检定所; 氧化型/还原型谷胱甘肽 (GSSG/GSH) 购自 Promega 公司; 各种限制性内切酶购自 Biolabs 公司; 其余试剂均为分析纯. pUC19-proUK 由本实验室构建, FB (15~ 42) cDNA 由人工合成. 低分子量尿激酶原由本实验室纯化.

1.2 FB (15~ 42) / scuPA-32k 融合基因的构建

scuPA-32k 基因片段是从 pUC19-proUK 中通过 PCR 扩增得到的.

FB (15~ 42) 及 Linker (GGG) 基因片段是通过人工合成 4 条寡核苷酸片段经过体外连接而得到的, 合成的寡核苷酸片段如下. 1: 5'-TATGGG-TCATCGACCCCTTGACAAGAAAAGAGAAGAGGCT-CCG-3'; 2: 5'-AGCCTGCCACCTGCCCCACCGCCCA-TCACTGGAGGTGGCTATCGGGAGGCGGAAT-3'; 3: 5'-CGATTCCGCCTCCCCGATAGCCACCTCCACT-

* 通讯联系人.

Tel: 010-62751842, E-mail: rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2001-03-28, 接受日期: 2001-05-21

GATGGGCGGTGG-3'; 4: 5'-GGCAGGTCGCAGGGTGGGAGCCTCTTCTCTTTTCTTGTCAAGGGGTCGATGACCCA-3'.

其中 5'-1-2-3' 对应 cDNA 的正链, 5'-3-4-3' 对应 cDNA 的负链. 将上述 4 个片段混合后, 它们会通过相配对的碱基互相识别, 最后在 DNA 连接酶的作用下连接成双链 DNA 分子.

将得到的 scuPA-32k 及 F β (15~42)-linker 经过体外连接后, 并克隆到表达载体 pET29a 中, 得到重组表达载体.

1.3 在大肠杆菌中的表达, 表达产物的变性及复性

将重组表达载体转化的大肠杆菌 (BL21/DE3) 培养至 $A = 0.5$ 后, 加入终浓度为 0.3 mmol/L 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 在 37°C 诱导培养 5 h. 将收集到的菌体超声破碎后, 离心得到包涵体. 包涵体在变性缓冲液中变性 12 h, 然后缓慢稀释到复性缓冲液中复性 24 h.

1.4 表达产物纯化

将复性产物经过 Zn^{2+} 螯合柱及 Sephacryl S200 分子筛柱两步层析后, 目的蛋白质得到纯化.

1.5 氨基酸组成分析

将待测样品用 5.7 mol/L HCl 真空封管, 于 110°C 水解 24 h, 用氨基酸组成分析仪 Beckman 121MB Amino acid analyzer 进行测定.

1.6 动力学常数测定

对显色底物 S2444 反应的动力学常数测定按照文献 [6] 进行.

1.7 血纤维蛋白的亲水性分析

主要参考文献 [7] 进行, 并略有改动. 在 1.5 ml Eppendorf 管中加入浓度为 4 g/L 的纤维蛋白悬液 $100 \mu\text{l}$, 加入活力为 50 U/ml 纤溶酶原激活剂 (PA) $100 \mu\text{l}$, 室温下振荡 2 h, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清用纤维蛋白平板法测活, 计算 PA 与纤维蛋白结合的百分比.

1.8 纤维蛋白聚集测定

将待测样品与纤维蛋白原混合后在室温下放置 1 min, 然后加入凝血酶, 记录反应物凝集的时间. 最终反应液中含有 $15 \mu\text{mol/L}$ PA, 0.2 g/L 纤维蛋白原, 0.14 U/ml 凝血酶, 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.038 mol/L NaCl, 0.01% Tween 80.

1.9 其他实验方法

血纤维蛋白平板法测定活性参照文献 [8]; 聚丙烯酰胺凝胶电泳参照文献 [9], 制备 15% 的分离胶, 5% 浓缩胶, 然后用 0.1% 考马斯亮蓝 R250

染色; 蛋白质浓度的测定, 采用考马斯亮蓝法, 以牛血清白蛋白为标准.

2 结 果

2.1 融合基因的构建

通过末端带有合适酶切位点的两条引物, 从 pUC19-proUK 中扩增 scuPA-32k 基因, 经过限制性酶切后回收基因片段. 将编码 F β (15~42)-linker 的寡核苷酸混合片段经过变性、退活后进行体外连接, 然后回收连接产物.

将 scuPA-32k 片段, F β (15~42)-linker 片段, 以及 pET29a 片段同时进行连接后, 得到重组表达载体. 经过限制性酶切验证, 并用 T7 启动子通用测序引物进行核苷酸序列测定, 结果正确.

2.2 F β (15~42) / scuPA-32k 在大肠杆菌中的表达及纯化

表达载体 pET29a 的启动子为 T7 启动子, 宿主菌 BL21 (DE3) 在染色体上含有一拷贝的 T7 RNA 聚合酶基因, 该基因受控于可诱导的 Lac UV5 启动子, 因此加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 后可诱导 T7 RNA 聚合酶, 进而可使受控于 T7 启动子下的目的基因获得转录和表达. 将携带有外源基因的重组表达载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 通过 IPTG 进行诱导表达. 目的蛋白基本以无活性的包涵体形式存在, 表达量可达 10% 左右 (经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 及薄层扫描检测, 结果略).

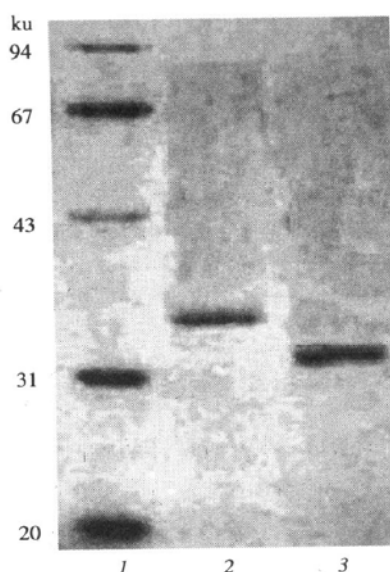


Fig. 1 SDS PAGE analysis on a 15% gel

1: molecular mass marker; 2: F β (15~42) / scuPA-32k; 3: scuPA-32k.

将诱导后的菌体沉淀经过超声破碎后, 收集包涵体. 对包涵体蛋白质变性及复性后进行纯化. 复性蛋白质收集液经过 Zn^{2+} 螯合层析柱和 Sephacryl S 200 分子筛层析柱两步层析后, 目的蛋白得到了纯化. 从图 1 可以看出经过两步纯化后, 目的蛋白被纯化为一 条带, 分子质量为 35 ku, 并且比未重组的 scuPA-32k 分子质量大.

2.3 部分物理化学性质分析

2.3.1 比活测定: 采用考马斯亮蓝测定蛋白质浓度, 纤维蛋白平板测定活力, 计算得纯化产物 $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 比活为 87 000 U/mg 蛋白. 而 scuPA-32k 的比活为 100 000 U/mg 左右, 融合蛋白与 scuPA-32k 的比活相当.

2.3.2 氨基酸组成分析: 从表 1 可以看出除了 Cys 和 Trp 没有检测外, 测得的 $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 氨基酸组成与理论计算基本符合, 表明得到的纯化蛋白质应该是 $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k.

Table 1 The amino acid composition of $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k

Amino acid	$F\beta$ (15~42) /scuPA-32k	Theoretical
Ala	14.02	13
Arg	18.74	19
Asx	24.07	22
Glx	30.71	29
Gly	28.41	30
His	9.90	10
Ile	19.04	18
Leu	23.82	24
Lys	20.97	19
Met	5.76	5
Phe	10.12	9
Pro	18.02	19
Ser	20.98	22
Thr	18.39	20
Tyr	13.83	14
Val	12.92	11

2.4 动力学性质研究

$F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 或 scuPA-32k 与纤溶酶按摩尔比 100:1 的比例充分活化后, 进行双链尿激酶对显色底物 S2444 水解的动力学研究, 从表 2 中可以看出 $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 与未重组的 scuPA-32k 对底物的亲和性 (K_m) 基本维持不变, 反应活性 (k_{cat}) 略有下降. 说明融合蛋白的活性中心受到一定的影响.

Table 2 Kinetic constants analysis of $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k and scuPA-32k

	K_m / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	k_{cat} / s^{-1}	$\frac{k_{cat}}{K_m}$ / $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{L}$
$F\beta$ (15~42) /scuPA-32	47.9	7.3	0.15
scuPA-32k	48.6	10.4	0.21

2.5 纤维蛋白的亲和性分析

分别检测了 proUK, scuPA-32k, $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 对纤维蛋白的亲和性, 图 2 显示 $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 对纤维蛋白的亲和性的确得到了提高, 与 scuPA-32k 和 proUK 相比, 分别提高了 80% 和 50%. 说明 $F\beta$ (15~42) 多肽确实增强了 $F\beta$ (15~42) /scuPA 与纤维蛋白的专一性.

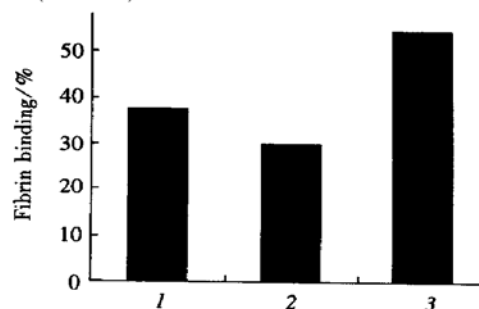


Fig. 2 The fibrin binding analysis

1: proUK; 2: scuPA-32k; 3: $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k.

2.6 纤维蛋白聚集的时相测定

在 proUK, scuPA-32k 或 $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 的参与下进行了纤维蛋白聚集时相的测定. 图 3 显示在 $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 参与下, 纤维蛋白聚集的时间明显延长, 与 scuPA-32k 或 proUK 相比, 聚集时间延长了 70%. 说明 $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k 确实在抑制纤维蛋白的聚集方面发挥了作用.

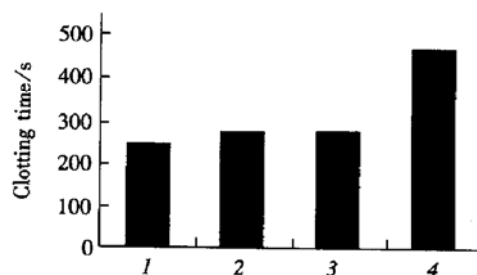


Fig. 3 Analysis of fibrin clotting time

1: control; 2: proUK; 3: scuPA-32k; 4: $F\beta$ (15~42) /scuPA-32k.

3 讨 论

新型溶栓剂的要求是具有多种功能综合在一起的理想溶栓制剂, 既具有较高的溶栓活性, 又具有较强的纤维蛋白的亲合性或抑制血栓的功能, 从而使溶栓剂具有较高的纤维蛋白专一性, 减少出血副作用, 降低溶栓药物使用后再栓塞形成的可能性。基于此目的, 我们选择具有较强溶栓活性的 scuPA-32k 和在纤维蛋白聚合中起重要作用的纤维蛋白 β 链 N 端 F β (15~42) 多肽进行重组研究。

本研究成功地向 scuPA-32k cDNA 分子定向引入了编码 F β (15~42) 多肽的寡核苷酸片段, 构建了 F β (15~42) /scuPA-32k 突变基因。并进行了 F β (15~42) /scuPA-32k 的性质研究。从实验结果来看融合蛋白 F β (15~42) /scuPA-32k 在与纤维蛋白的亲合性方面有明显提高, 原因可能是 F β (15~42) 多肽起定向导肽作用, 引导 F β (15~42) /scuPA-32k 到纤维蛋白表面, 从而提高 F β (15~42) /scuPA-32k 对纤维蛋白的专一性。而且 F β (15~42) /scuPA-32k 延长了纤维蛋白凝块的形成时间, 从而在体内实验中可能抑制血栓的形成。

关于 F β (15~42) /scuPA-32k 的溶栓性能和应用前景有待进行一定的体外和体内实验。

参 考 文 献

- Collen D. Thrombolytic therapy. *Throm Haemost*, 1997, **78** (1): 742~ 746
- Verstraete M. Third-generation thrombolytic drugs. *Am J Med*, 2000, **109** (1): 52~ 58
- Foster T M, Dormish J J, Narahari U, *et al.* Thermal stability of low molecular weight urokinase during heat treatment: III. Effect of salts, sugars and Tween 80. *Int J Pharm*, 1996, **134** (1): 193 ~ 201
- Siebenlist K R, DiOrio J P, Budzynski A Z, *et al.* The polymerization and thrombin-binding properties of des- (B beta 1-42) -fibrin. *J Biol Chem*, 1990, **265** (30): 18650~ 18655
- Pandya B V, Gabriel J L, O'Brien J, *et al.* Polymerization site in the β chain of fibrin: mapping of β 1-55 sequence. *Biochemistry*, 1991, **30** (1): 162~ 168
- Lenich C, Pannell R, Henkin J, *et al.* The influence of glycosylation on the catalytic and fibrinolytic properties of pro-urokinase. *Thromb Haemost*, 1992, **68** (5): 539~ 544
- Jiao J W, Yu M M, Ru B G. Characterization of a recombinant chimeric plasminogen activator with enhanced fibrin binding. *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1546** (2): 399~ 405
- Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating the fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys*, 1952, **40** (3): 346 ~ 351
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (259): 680 ~ 685

Construction and Characterization of a Fusion Protein with Fibrin Peptide and scuPA-32k

JIAO Jian-Wei, LIU Ning, YU Mei-Min, RU Bing-Gen*

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

Abstract A novel plasminogen activator containing low molecular single-chain urokinase (scuPA-32k) and fibrin β chain polypeptide (F β 15~42) was designed and constructed. ScuPA-32k cDNA was obtained by polymerase chain reaction (PCR) from pro-urokinase gene; while F β (15~42) cDNA was generated by joining synthesized oligonucleotide fragments together. Through suitable linker and approximately restriction site, scuPA-32k and F β (15~42) cDNA were ligated together. The fusion protein was expressed by IPTG induced in *E. coli*. After denaturation and renaturation, the aim protein was purified to homogeneity by Zn²⁺ chelating chromatography and Sephacryl S200 chromatography. The apparent molecular mass was 35 ku shown by SDS-PAGE analysis. The special activity was 87 000 U/mg detected by fibrin plate determination. The enzyme had similar kinetic parameters to that of natural uPA-32k when was assayed with the chromogenic substrate S2444. However F β (15~42) /scuPA-32k had higher fibrin affinity than that of natural scuPA-32k and had antifibrin polymerization. These results showed that the fusion protein had good respects.

Key words low molecular single chain urokinase, fibrin peptide, fusion

* Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, E-mail: rulab@pku.edu.cn

Received: March 28, 2001 Accepted: May 21, 2001