科 学 通 报
第42卷 第9期 Chinese Science Bulletin 1997年5月

【研究简报】

纤维蛋白高选择性尿激酶变体的研究

彭贵洪 马 忠 余瑞荣 薛宇鸣 朱德煦*
(南京大学生物化学系医药生物技术国家重点实验室,南京 210093. * 联系人)

关键词 人尿激酶原 双链尿激酶 定点突变 纤维蛋白选择性

双链尿激酶(tcu-PA)作为最早进入临床使用的溶栓药物,由于它对纤维蛋白(fibrin)没有选择性,大剂量静脉注射时会使血液中纤维蛋白原(Fibrinogen)降解,从而引发出血,因此在临床应用上受到限制. 单链尿激酶(scu-PA,又称尿激酶原)是tcu-PA的前体,但它不同于一般的酶原,具有一定的内在纤溶酶原激活剂(PA)活性,而且能选择性地在Fibrin表面活化纤溶酶原,从而选择性地溶解血栓凝块. scu-PA经纤溶酶(Plasmin)的作用在Lys158-Ile159肽键断裂,转变成tcu-PA,由Cys148和Cys279间形成的一对二硫键将两条钛链连接. 我们以前的工作证明尿激酶A链的Lys151和Arg154氨基酸残基是导致双链尿激酶对纤维蛋白低选择性的结构基础. 本文通过定点突变手段构建了变体尿激酶原(Glu151-Gly154-rscu-PA)基因(以下简称mscu-PA),并在*E. coli*中获得表达. 测定了表达产物的双链形式mtcu-PA及未突变的重组尿激酶原(rscu-PA)及其双链形式(rtcu-PA)对Fibrin的亲和性以及对血浆中纤维蛋白的选择性,结果证明所得变体双链尿激酶对Fibrin具有较高的选择性.

1 材料与方法

1.1 材料、酶及主要试剂

各种限制性内切酶和工具酶均购自美国BoiLabs公司;DNA序列分析试剂盒购自美国

致谢 本工作为林业部重点资助课题.

参 考 文 献

1 Castiglione S, Wang G, Sala F, et al. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies in elite Poplar (*Populus spp.*) *clones*. TAG, 1993, 87: 54~59
2 王 文,凌发瑶,施立明. 银额果蝇自然群体中的mtDNA多态性研究——Ⅰ. 银额果蝇自然群体内存在丰富的mtDNA多态性. 中国科学,B辑,1993,23(11):1 158~1 1 68
3 王 文,凌发瑶,施立明. 银额果蝇自然群体中的mtDNA多态性研究——Ⅱ. 银额果蝇的起源及分化. 遗传学报,1994,21(4):263~274
4 兰 宏,王 文,施立明. 云南地区家猪和野猪mtDNA遗传多样性研究. 遗传学报,1995,22(1):28~33
5 Olivieri I, Couvet D, Gouyon P H. The genetics of transient populations: research at the metapopulation level. Tree, 1990, 5: 207~210
6 杨自湘,王守忠,徐 红,等. 用叶片特征区别不同产地不同单株青杨的研究. 林业科技通讯,1995,2:17~18
7 Brown A H D. Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources. Sunderland: Sinauer Associated Inc, 1990. 145~162

(1996-01-24收稿,1996-06-26收修改稿)

U.S.B.公司;Plasmin, Thrombin, Fibrinogen (Plasminogen free), Plasminogen, Sepharose CL 4B, Aprotinin, I0D0-beads, Benzamidine-sepharose CL, 合成发色底物 S2444 (pyro-Glu-Gly-Arg-p-nitro-aniline), S2251 (D-Val-Leu-Lys-p-nitro-aniline)均购自美国 Sigma 公司;(α-^{32}P)-dATP, ^{125}I-fibrinogen 购自英国 Amersham 公司; u-PA 单抗购自北京军事医学科学院. *E. coli* JA221 (Ipp^- $hdsM^+$ trpE5 leuB6lacYrecA1, F′$lacI^q$$lac^+$ pro^+)为上海生物化学研究所李琪梁先生提供. 其余试剂均为分析纯.

1.2 mscu-PA 基因的构建和表达

在DNA合成仪上分别合成编码Glu151位氨基酸和Gly154位氨基酸的两条互补寡核苷酸片断 5′-CCAAGAGACTCTGGGGCCCCGCTTTAAGATTATTGGGGGAG-3′ (41mer) 和 5′-AATTCTCCCCCAATAATCTTAAAGCGGGGCCCCAGAGTCTCTTGG-3′ (45mer), 将 pKK233-2/rscu-PA 用 Msc I 和 EcoR I 酶切,删除 rscu-PA 基因中 150～163 氨基酸残基的编码序列,并和上述合成的寡核苷酸片断连接,得到 scu-PA 变体基因,该表达质称为 pKK233-2/mscu-PA.

1.3 表达产物的体外变复性及分离纯化

分别按文献[1]进行.

1.4 mscu-PA 对 plasmin 活化的敏感性测定及 tcu-PA 的制备

按文献[2]方法进行.

1.5 动力学常数的测定

按文献[2]的方法,数据用 Enzffitter 软件处理.

1.6 mtca-PA 和 rtcu-PA 诱导的血浆凝块(Plasma-clot)的溶解

参考文献[3]进行,^{125}I-Fibrin 溶解的百分数用如下公式计算:

$$^{125}\text{I-fibrin 溶解\%} = \text{上清计数} \times 300/\text{总计数}.$$

1.7 对血浆中纤维蛋白原的溶解活性

按文献[4]方法测定.

1.8 其他实验方法

DNA 序列测定按 U.S.B. DNA 序列分析试剂盒说明书方法进行;fibrin 平板法测定纤溶活性按文献[5]进行.

2 结果与讨论

2.1 表达载体 mscu-PA 的构建和表达

在 scu-PA cDNA 基因的基础上,通过寡核苷酸介导的定点突变,构建了 Lys151 位和 Arg154 位氨基酸突变的 mscu-PA 基因,经序列测定和酶切鉴定得到阳性克隆,经 IPTG 诱导在 *E. coli* 中得以表达. 图 1(a)为变体和野生型两种尿激酶原表达产物的 SDS-PAGE 图谱. 图中两者表达水平相当,分子量均为 43 ku.

2.2 表达产物的体外变复性和分离纯化

由于 scu-PA 分子较大,含有 12 对二硫键,在 *E. coli* 中表达产物基本以无活性的包含体形式存在. 经体外变复性,从 1 L 摇瓶培养液中可获得 300 000 IU(平板法测活)的 rscu-PA 和 350 000 IU/mg 的 mscu-PA. 经 Zn^{2+} 选择性沉淀, u-PA 抗体亲和柱层析, Benzamidine-sepharose CL 亲和吸附, rscu-PA 和 mscu-PA 均被纯化至银染一条带. 图 1(b)示两种尿激酶原

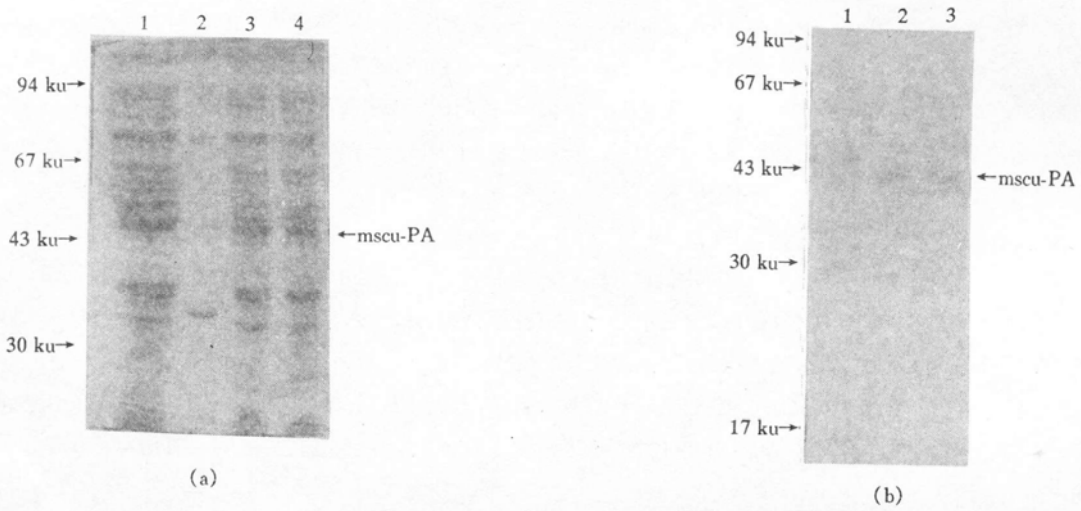


图 1 10% SDS-PAGE

(a)菌体总蛋白的凝胶电泳:1——pKK233-2, 2——蛋白分子量标准,3——pKK233-2/rscu-PA, 4——pKK233-2/mscu-PA; (b)纯化样品的凝胶电泳:1——蛋白分子量标准,2——rscu-PA, 3——mscu-PA

表达产物纯化后的 SDS-PAGE 银染图谱. 纯化后 rscu-PA 和 mscu-PA 的比活性分别为 110 000 IU"和 115 000 IU/mg.

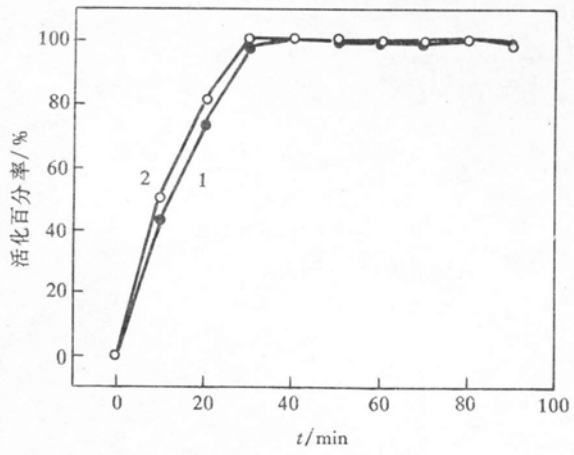


图 2 纤溶酶对 rscu-PA 和 mscu-PA 的活化

1——rscu-PA, 2——mscu-PA

2.3 mscu-PA 对 Plasmin 活化的敏感性及双链尿激酶的制备

由于平板法测活是基于单链尿激酶转化为双链形式的活性,因此我们进行了 plasmin 激活的时相测定. 从图 2 可知,mscu-PA 的 Lys151 和 Arg154 位氨基酸残基突变并不影响它对 Plasmin 的敏感性, rscu-PA 和 mscu-PA 的激活反应在 300 min 左右均达到饱和点,在制备双链尿激酶时,为保证充分活化,我们采用摩尔比为 100∶1 的 rscu-PA 或 mscu-PA/Plasmin 来活化 rscu-PA 或 mscu-PA,时间为 60 min. 用 Aprotinin 灭活 Plasmin 后, 所得 mtcu-PA 的比活为 142 000IU/mg 蛋白, rtcu-PA 的比活为 130 000IU/mg蛋白,这说明定点突变不影响双链尿激酶的纤溶活性. 结果列于表 1 中.

表 1 两种尿激酶及其酶原形式的比活比较

mscu-PA	mtcu-PA	rscu-PA	rtcu-PA
115 000	142 000	110 000	130 000

2.4　双链尿激酶水解 S2444 的动力学常数测定

对发色底物 S2444 水解的动力学研究表明：mtcu-PA 的相对亲和力（$K_m = 62.5\ \mu m$）稍高于 rscu-PA 的相对亲和力（$K_m = 83\ \mu m$），其催化效率（K_{cat}/K_m）亦然．这表明 Lys151 和 Arg154 的突变未影响酶的活性中心（结果见表 2）．

表 2　rtcu-PA 和 mtcu-PA 对合成底物 S2444 的动力学常数

	K_m/μmol·L^{-1}	$10^6 K_{cat}$/A·min·mol·L^{-1}	K_{cat}/K_m	$F^{a)}$/%
mtcu-PA	62.5 ± 9	1 029 ± 45	16.46	123
rtcu-PA	83 ± 15	1 107 ± 60	13.33	100

a) $(K_{cat,\ u\text{-}PA}/K_{m,\ u\text{-}PA})/(K_{cat,\ r\ tcu\text{-}PA}/K_{m,\ r\ tcu\text{-}PA})$，相对于重组 tcu-PA 的催化效率

2.5　mtcu-PA 对 Fibrin 的选择性有显著提高

图 3 表明，对 Plasma-clot 的降解，在 40 000 IU 作用 30 min，mtcu-PA 降解纤维蛋白凝块达到 38%，rscu-PA 只有 19%，而 rtcu-PA 则只有 5% 左右．这个结果说明变体尿激酶对 Fibrin 具有更好的亲和性．图 4 显示，37℃ 放置 2 h，血浆中纤维蛋白原的含量随着 rtcu-PA 浓度的增大而显著下降，rscu-PA 对血浆中纤维蛋白原的浓度虽无明显影响，但仍有降解，而 mtcu-PA 对血浆中的纤维蛋白原的含量几乎无影响，它对血纤维蛋白的降解比 rscu-PA 还要小，这表明变体尿激酶对 Fibrin 已有良好的选择性能．

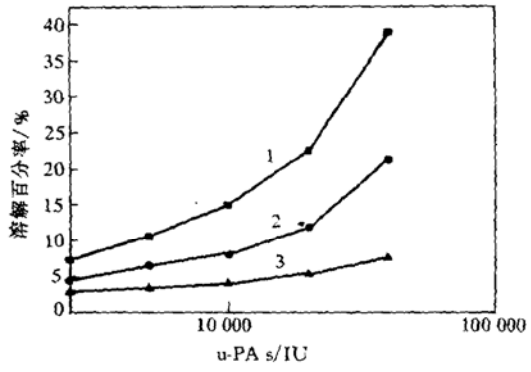


图 3　u-PA 对人血浆凝块的溶解

1——mtcu-PA，2——rscu-PA，3——rtcu-PA

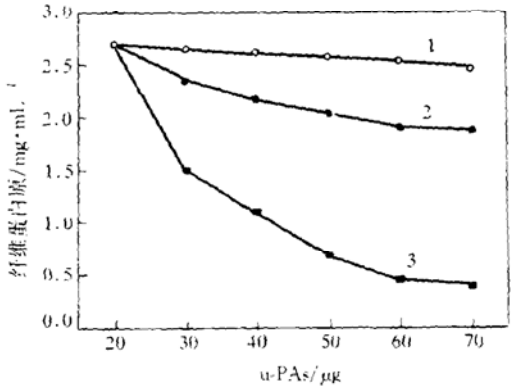


图 4　尿激酶对血浆纤维蛋白原含量的影响

1——mtcu-PA，2——rscu-PA，3——rtcu-PA

我们以前的工作证明 scu-PA 中 148～159 片段的电荷分布和纤维蛋白 A_α149～161 片段相似，而这一片段是纤维蛋白和 Kringle 结构相互作用的关键区域．当 scu-PA 被纤溶酶水解转变为双链尿激酶后，148～159 片段作为双链尿激酶 A 链的 C-末端，自由度大增，因此有可能和纤维蛋白竞争 Kringle 结构域，结果导致双链尿激酶对纤维蛋白的低亲和性．最近 Valery 等人[6]采用热量法也确认了我们的上述结果．删除 150～156 片段应能改善其双链形式（tcu-PA）对纤维蛋白的选择性，但 150～156 片段的缺失导致 scu-PA 对纤溶酶的敏感性降低了 16 倍[1)]．有鉴于此，本文将片段 150～156 中的两个正电荷氨基酸残基 Lys151 和 Arg154 分别置换成 Glu151 和 Gly154，结果既增加了 tcu-PA 突变体对纤维蛋白的选择性，又避免了 150～156

1) 马　忠，余瑞荣，华子春，等．纤维蛋白高亲和性尿激酶变体的研究．中国科学，C 辑，1997 年（待发表）

科 学 通 报
第42卷 第9期 Chinese Science Bulletin 1997年5月

【研究简报】

BmK AS，一种新型骨骼肌 Ryanodine 受体激动肽的氨基酸序列

吉永华① 刘 艳① 徐 科① 大石崇秀②
望月澈② 星野捻② 矢内原升③
（①中国科学院上海生理研究所，上海 200031；②日本静冈县立大学药学部，静冈 422，日本；
③日本矢内原研究所，富士宫，日本 418）

关键词 东亚钳蝎 Ryanodine 受体激动肽 一级结构

前文[1]曾报道从东亚钳蝎毒中纯化了一个新型骨骼肌 Ryanodine 受体激动肽(BmK AS)．本工作将进一步报道该活性肽的完整氨基酸序列．由它的序列(共66个残基)计算出的最小分子量为7 698 u与经电喷雾质子光谱测定的7 696.26 u值基本吻合．其分子结构与同一蝎毒中已知的各类 Na^+ 通道配体间的同源性较差．但与一种独特的非洲蝎所产抗昆虫毒素(AaH IT)，同属 Na^+ 通道配体间却存在着>80%的相似性[2]．

1 材料与方法

BamK AS的纯化参照文献[1]进行．分别用 SDS-PAGE 电泳法和电喷雾质子光谱仪鉴定纯化样品的纯度和分子量．

残基缺失影响纤溶酶对 scu-PA 的转换，取得较为理想的结果．

致谢 本工作为国家"八六三"高技术发展计划资助项目．

参 考 文 献

1 Wrinkle M E, Blaber M, Bennett G L. Purification and characterization of recombinant single-chain urokinase product in *Escherichia Coli*. Biochemistry, 1986, 25: 4 041～4 050
2 Liu J N, Gurewich V. The kinetics of plasminogen activation by thrombin-cleaved pro-urokinase and promotion of its activity by fibrin fragment E-2 and by tissue plasminogen activator. Blood, 1993, 81: 980
3 John R C, Marshall S R, Gery M, et al. A bispecific antibody enhances the fibrinolytic potency of single-chain urokinase. Biochem, 1990, 27: 6 374
4 Rampling M W, Gaffney P J. The sulfite precipitation method for fibrinogen measurement: its use on small samples in the presence of fibrinogen degradation products. Clin Chim Acta, 1976, 678: 43
5 Ploug J, Kjeldgaad N O. Urokinase, activator of plasminogen from bhuman urine: (Ⅰ) isolation and properties. Biochem Biophys Acta, 1957, 94(24): 278～282
6 Valery N, Leonid M H, Roger L, et al. Tissue-type plasminogen activator (tPA) interacts with urokinase-type plasmindgen (uPA) via tPA's lysine binding site. J Biol Chem, 1995, 270: 8 680

(1996-04-01收稿，1996-09-19收修改稿)