科 学 通 报
第 39 卷 第 19 期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1994 年 10 月

具有生物活性的人尿激酶原在大肠杆菌中的融合表达*

华子春 李 节 马 忠 朱德煦
(南京大学生物化学系,南京大学医药生物技术重点实验室,南京 210008)

关键词 人尿激酶原、融合载体、金黄色葡萄球菌蛋白 A、亲和层析

人尿激酶原(Pro-UK)由 411 个氨基酸组成,含 3 个结构域:类生长因子结构域、环柄结构域、丝氨酸蛋白酶结构域,有 12 对二硫键. Pro-UK 经纤溶酶作用,在 158—159 位发生断裂,变为双链形式的尿激酶(HUK). HUK 为目前临床广泛使用的溶栓制剂,由于对纤维蛋白无选择性,大剂量使用时有引发出血的副作用. 与 HUK 相比,Pro-UK 对纤维蛋白具有较好的选择性,因而具有更好的特异性和安全性[1]. 由于 Pro-UK 天然来源含量稀少,因而只能用基因工程方法获得. 1985 年以来,人尿激酶原已在哺乳动物细胞[2]、昆虫细胞[3]、酵母[4]及大肠杆菌[5]等表达体系中获得表达. 由于人尿激酶原分子较大,二硫键数量多,在大肠杆菌中的表达水平较低[5],而且表达产物都以无生物活性的不溶性包涵体状态存在,因此表达产物需经体外变、复性处理才能获得纤溶活性,且复性得率低[5,6].

金黄色葡萄球菌蛋白 A 具有和 IgG 特异亲和的性能,且可溶性和分泌性能极佳. Nilsson 等人成功地实现了人 IGF-1 和金黄色葡萄球菌蛋白 A 的 IgG 结构域的融合表达[7],表达产物具有很好的可溶性和分泌性,能被分泌到培养基中并且具有很好的生物活性. 运用该表达载体,作者在大肠杆菌中获得了具有生物活性的人 Pro-UK 的高效表达,每升培养基可得到 250 000 单位的活性尿激酶原.

1 材料和方法

1.1 材料

表达质粒 pET3d 及菌株 BL21(DE2)来源于美国 Studier 博士实验室;质粒 pEZZ318 系瑞典 Nilsson 博士馈赠;人 Pro-UK 基因系本实验室人工化学合成. 所用限制性内切酶、工具酶购自 New England Biolabs 和 Boehringer 公司.

1.2 质粒的提取、转化、酶切

参照文献[8]的方法.

1.3 重组表达质粒的表达

阳性克隆过夜菌以 1:50 稀释接种于 LB 培养基中,振荡培养至 $OD_{600}=0.5$ 后,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,诱导表达,再振荡培养 10—14 h,离心收集培养上清液.

1994-01-31 收稿、1994-05-17 收修改稿.
* 国家"八六三"高技术发展计划资助项目.

1.4 SDS-PAGE 分析

参照 Laemmli 的方法[8]. 取 100 μL 表达上清液，以 9 倍体积酒精沉淀，用 30 μL 上样缓冲液溶解样品. 堆积胶浓度 6%, 分离胶浓度 12%.

1.5 银染方法

参照文献[8] 方法进行.

1.6 IgG-Sepharose CL-4B 的制备

收集兔血清，以 45% 饱和度硫酸铵沉淀，收集沉淀溶解透析，DEAE-52 柱层析纯化兔 IgG. 用溴化氰活化 Sepharose CL-4B, 与纯化的兔 IgG 交联.

1.7 IgG 亲和层析

0.5 mL IgG-Sepharose CL-4B以 TST 溶液 (0.5 mmol/L Tris, pH7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20) 平衡，取 50 mL 培养上清液上柱，然后依次以 TST, 1 mmol/L NH_4Ac 洗涤至基线，最后以 0.5 mol/L, pH3.3HAc 洗脱.

1.8 蛋白质含量测定

参照 Bradford 的方法[9].

1.9 平板法测定纤溶活性

参照文献[10] 的方法.

2 实 验 结 果

克隆在 pUC9 中的化学合成的人 Pro-UK 基因经 BspH I 消解、Mung bean 核酸酶切平、Hind III 酶切，与经 Sma I, Hind III 消解的 pEZZ318 质粒连接，从而保证人 Pro-UK 基因与 ZZ 结构域融合后，阅读框架不变. 转化 JM103, 挑选白色菌落进行限制性内切酶酶切鉴定、筛选，得到阳性重组子 pEZZ-Pro-UK.

重组表达质粒 pEZZ-Pro-UK 经 Ase I, Hind III 酶切、Klenow 补平，得到完整的 ZZ-Pro-UK 结构基因，与经 Nco I, Mung bean 核酸酶作用的 pET-3d 连接，筛选得到重组表达质粒 pT_7-ZZ-Pro-UK. 图 1 示重组表达质粒 pT_7-ZZ-Pro-UK 的构建过程.

重组表达质粒 pT_7-ZZ-Pro-UK, pEZZ-Pro-UK 分别在宿主菌 BL21(DE3), JM103 中经 IPTG 诱导表达，取表达菌培养上清液进行平板法测定纤溶活性，结果显示: 以空载质粒菌为对照，含 pEZZ-Pro-UK 的重组表达菌培养上清液中具有明显的纤溶活性，活性为 20IU/ml 培养上清液; 而含 pT_7-ZZ-Pro-UK 的重组表达菌培养上清液中纤溶活性则高达 150IU/ml 培养上清液. 图 2 为还原型 SDS-PAGE 电泳的银染图谱，与空载质粒菌对照，重组表达菌在分子量 58 000 处有明显特异的蛋白质条带，重组表达质粒 pT_7-ZZ-Pro-UK 的表达水平明显高于 pEZZ-Pro-UK.

将含 pT_7-ZZ-Pro-UK 的重组表达菌培养上清液进行 IgG-Sepharose 4B 亲和层析 (图 3)，以 0.5 mol/L 醋酸缓冲液 (pH3.3) 洗脱. 图 4 示洗脱峰的还原型 SDS-PAGE 银染图谱，经一步亲和层析，即得到纯的银染一条带的分子量 58 000 的蛋白质条带，其大小与 ZZ-Pro-UK 的理论分子量一致. 平板测活显示该蛋白质条带具有明显的纤活性. 蛋白含量测定表明，每毫升培养上清液经 IgG 亲和层析纯化后，ZZ-Pro-UK 净得率为 1.5 μg, 约含 120IU 活性.

同时，含重组表达质粒 pT_7-ZZ-Pro-UK 的重组表达菌的细胞裂解液中也含有明显的纤溶

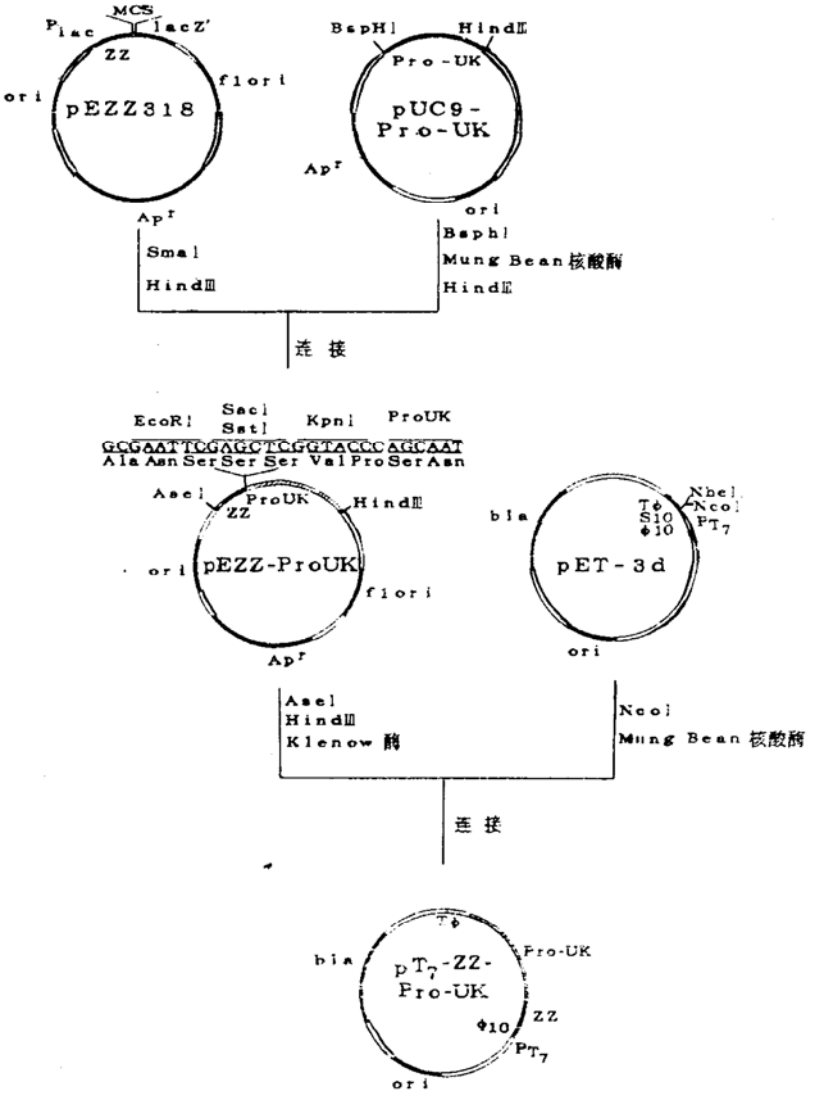


图 1　pEZZ-Pro-UK和 pT_7-ZZ-Pro-UK 构建图

活性，每毫升培养液的细胞裂解液约含 100 IU. 将细胞超声裂解液经 IgG 亲和层析纯化后 ZZ-Pro-UK 得率为 1.38 μg/mL 培养基，约含 50 IU 活性. 据此，我们在大肠杆菌中获得具有生物活性的人 Pro-UK 表达产物，其中有约 60% 分泌在培养上清液中，约 40% 则以可溶状态存在于细胞裂解液中. 经 IgG-SepharoseCL-4B 亲和层析后，每毫升培养液共可获得 2.88 μg ZZ-Pro-UK融合蛋白，比活为 59 000 IU/mg 蛋白质. ZZ-Pro-UK 的活力回收率为 68%，纯化倍数为 56.2.

3　讨　论

人 Pro-UK 分子极不稳定，极易被蛋白酶作用而转变为双链形式的尿激酶，因而大肠杆菌

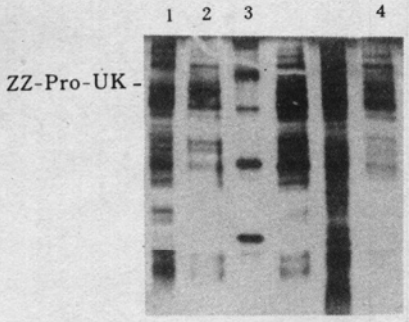


图 2 ZZ-Pro-UK 分泌融合表达产物的还原型 SDS-PAGE 银染图谱

1—— pEZZ-Pro-UK/JM103 表达上清液；2—— pT_7-ZZ-Pro-UK/BL21(DE3) 表达上清液；3—— 标准分子量标记从上到下依次为 94 000, 67 000, 43 000, 30 000, 17 000; 4—— 空载质粒菌上清液对照

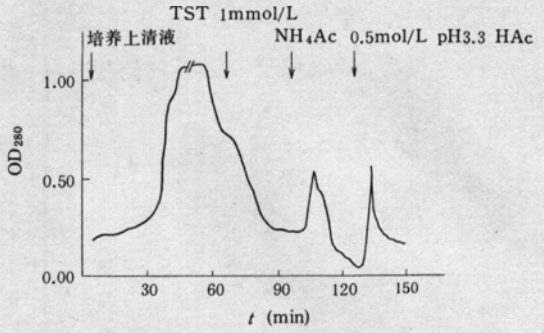


图3 ZZ-Pro-UK 分泌表达上清液的 IgG-Sepharose CL-4B 亲和层析

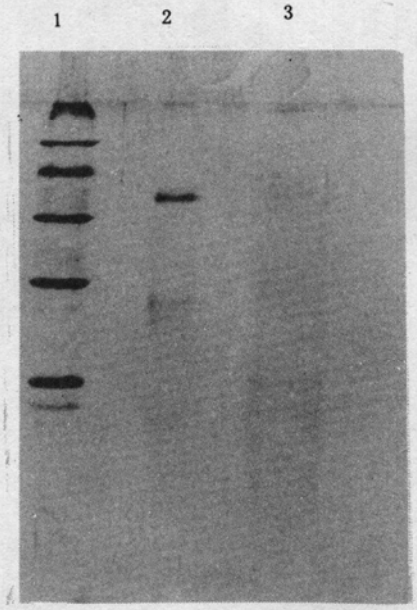


图 4 pT_7-ZZ-Pro-UK 表达上清液经亲和层析后的还原型 SDS-PAGE 银染图谱

1——标准分子量标记从上到下依次为 94 000, 67 000, 43 000, 30 000, 17 000; 2—— pT_7-ZZ-Pro-UK 表达上清液经亲和层析后产物；3—— pEZZ-Pro-UK 表达上清液经亲和层析后产物

成为人 Pro-UK 的最佳表达体系. 加上有研究表明，非糖基化的人 Pro-UK 具有更好的纤溶活性. 因此人 Pro-UK 在大肠杆菌中的表达一直受到人们的重视. 但人 Pro-UK 在大肠杆菌中的表达水平较低，而且表达产物以包涵体形式存在. 由于 Pro-UK 含有多达 12 对的二硫键，随机配对几率极高，所以复性得率也较低，因而成为人 Pro-UK 在大肠杆菌中表达的最为困扰的问题[5, 6]. 而且，即使是在酵母中表达人 Pro-UK，绝大多数表达产物仍以包涵体形式存在[4].

ZZ 结构域基因是类似于金黄色葡萄球菌 protein A IgG 结合结构域的人工合成基因. 利用和金黄色葡萄球菌 protein A 信号肽及 ZZ 结构域的融合表达，人 IGF-1 在大肠杆菌中获得了分泌性表达，效果极佳[7]. 我们利用该表达体系在 T_7 启动子的指导下，获得了人 Pro-UK 的分泌性表达，表达产物以活性 Pro-UK 形式存在. 每升培养液可得到 250 000 IU 的活性尿激酶原，从而为人 Pro-UK 在大肠杆菌中的高效表达及解决变、复性与分离纯化难题探索了一条可行路径. 由于人 Pro-UK 含 411 个氨基酸，有 3 个结构域，因而分泌效果不如 IGF-1 在该体系中的分泌表达效果，只有一大部分产物分泌至培养基中，另一部分产物则以可溶状态存在于细胞质中.

自 80 年代以来，研究者们一直在努力获得人 Pro-UK 的高效表达，但结果一直不理想．如在酵母细胞中，表达水平为 28 IU/mL(1990 年)，在人肾细胞株中的表达水平为 120 IU/mL(1984 年)，在昆虫细胞中的表达产率为 1—2 μg/mL(1991 年)．相形之下，T7 启动子控制下的人 Pro-UK 与 ZZ 结构域的融合表达获得了较好的结果，而且表达水平可望通过高密度发酵进一步得到提高．ZZ-Pro-UK 的融合表达解决了 Pro-UK 纯化过程复杂、难度较大的问题，使得纯化简便、高效、易行．

由于人 Pro-UK 含有多个 Met，Asp-Gly 氨基酸，因而常用的羟胺裂解、溴化氰裂解方法都无法使用．我们正在引入特异性蛋白酶裂解位点以获取不含 ZZ 融合蛋白的人 Pro-UK．活性形式的人 Pro-UK 的分泌表达为基因工程人 Pro-UK 溶栓药物的实用化及结构与功能研究提供了良好的基础．

致谢　作者感谢 Studier 博士和 Nilsson 博士提供实验材料．

参　考　文　献

[1] Pannell, R., Gurewich, V., *Blood*, 1986, **67**: 1215—1223.
[2] Cheng, S. M. *et al.*, *Gene*, 1988, **69**: 257—363.
[3] Linda, A. K. *et al.*, *Gene*, 1991, **106**: 151—157.
[4] Hiramatsu, R., *Gene*, 1991, **99**: 235—241.
[5] Holmes, W. E. *et al.*, *Bio/Technology*, 1985, **3**: 923—929.
[6] Winkler, M., Blaber, M., *Biochemistry*, 1986, **25**: 4041—4045.
[7] Nilsson, B. *et al.*, *Methods in Enzymology*, 1990, **185**: 144—160.
[8] Maniatis, T. *et al.*, *Molecular Cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
[9] Bradford, M. A., *Annal. Biochem.*, 1976, **72**: 248—254.
[10] Ploug, T., Kjeldgaard, N. O., *Biochem. Biophys. Acta*, 1957, **24**: 278—282.