

RGD 肽与尿激酶 B 链融合蛋白原核重组表达质粒的构建、表达和功能的初步分析

朱甫祥 邢桂春 贺福初*

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘 要 将化学合成的 RGD 肽(Arg-Gly-Asp)编码寡核苷酸与尿激酶 B 链 cDNA 相连成为融合基因后,克隆至原核表达质粒 pBV220 中,在 P_{RPL} 启动子的作用下,经 42℃ 热诱导,在大肠杆菌 DH5 α 中获得了融合基因的表达,其表达量占菌体总蛋白的 9.2%,表达产物以无活性的包含体形式存在。经变复性处理得到纯化的融合基因的表达产物,经 Western blotting 分析表明产物具有与天然尿激酶相似的抗原性,体外活性分析显示其具有一定的纤溶和抗血小板聚集的活性。

关键词 RGD 肽 尿激酶 B 链 融合基因

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0582-05

血小板是动脉血栓的主要成分,血小板介导的血栓形成是导致冠脉梗塞和成功溶栓后再梗塞的主要原因,而血小板的聚集反应是血小板栓子形成的最后共同通路,血小板膜整合素受体 GP II b/III a 复合物在血小板的聚集过程中发挥重要的作用。GP II b/III a 是血小板膜上最丰富的膜糖蛋白,血小板通过其介导与纤维蛋白和 von Willebrand factor (vWF) 等粘附分子中 Arg-Gly-Asp(RGD)序列的结合而发生聚集^[1]。实验证明含有 RGD 序列的天然和人工合成寡肽能够显著抑制血小板的聚集反应^[2]。尿激酶原(proUK)是双链尿激酶(UK)的单链前体酶原形式,本身亦具有较低的酶活性和一定程度的纤维蛋白特异性,当其 Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ 肽键被纤溶酶裂解后转变成高催化活性但失去纤维蛋白特异性的 UK^[3]。研究表明,proUK 的 Glu¹⁴³-Leu¹⁴⁴ 和 Arg¹⁵⁶-Phe¹⁵⁷ 肽键可分别被蛋白酶或凝血酶裂解而成为与 proUK 相似性质的低分子量单链尿激酶(LMW-SCUK, 33kD)或无酶活性且对纤溶酶不再敏感的双链 UK^[4,5]。为了获得高效特异的新型溶栓剂分子,基于对天然溶栓剂(包括 proUK 和 t-PA) 分子结构与功能关系的认识,通过运用 DNA 重组及蛋白质化学偶联技术,人们构建了一系列 t-PA 和

proUK 的突变体(Mutants)和变构体(Variants), 二者的优势互补嵌合体以及二者与单克隆抗体的偶联分子,其中有些分子经体内实验证明溶栓功能有明显改善^[6],为新型溶栓剂的开发与应用提出了新的思路。鉴于 LMW-SCUK 具有与 proUK 相似的特性(低溶栓活性和纤维蛋白特异性),目前所构建的嵌合体溶栓剂分子大多采用 LMW-SCUK,但是由于 LMW-SCUK 含有凝血酶的敏感键,这种分子易于被富集于血栓部位的凝血酶所灭活而不利于体内实际应用。国内有人将血纤蛋白粘附肽与 LMW-SCUK 融合,体外实验结果表明具有一定的抗凝作用^[7]。

为了获得兼有溶栓和抗栓作用且避免凝血酶灭活作用的新型溶栓剂分子,本文构建了 RGD 肽与 UK B 链的融合基因,在大肠杆菌中进行了表达,并对所表达的融合蛋白的生物学功能进行了初步的分析。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

含人 pro-UK 全长 cDNA 的 pUC9-pro-UK 由南京大学马忠教授惠赠,原核表达载体 pBV220 及宿主菌 *E. coli* DH5 α 由本室保存。

收稿日期:1999-10-12,修回日期:2000-04-24。

基金项目:国家自然科学基金重点项目(39730270)资助。

* 通讯作者。

1.2 工具酶、试剂盒、抗体及主要生化试剂

内切酶、T4DNA 连接酶和 Klenow 酶为 Biolabs 公司产品,T7 DNA 测序试剂盒、质粒提取及 PCR 产物回收试剂盒购自 Promega 公司, α - 32 P-dATP 购自亚辉生物医学工程公司,uPA 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,HRP 标记的二抗、DAB 显色系统为中山生物工程公司产品,其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 引物及 RGD 肽编码寡核苷酸的合成

按照 pro-UK cDNA 的序列设计其 B 链的 PCR 引物,上游为:5' CC CTT AAG GGT GGC GAA TTC ACT ACT ATC 3',含 *Afl* II 识别位点,下游为:5' AA CTG CAG TTA CAG AGC CAA GCC ATT CTC TTC 3',含 *Pst* I 识别位点。为了获取 UK B 链基因的表达产物作为对照,我们设计了含起始密码子的 B 链基因的上游引物,序列为:5' AT ATG CTT AAG GGT GAA TTT ACT ACT ATC GAG 3',下游引物同 B 链的 PCR 下游引物。含起始密码子和连接肽(数个 Gly)的 RGD 的编码寡核苷酸的正义链为:5' AA TTC ATG GGT CGT GGT GAT TCT GGT GGT GGT GGT GGT GGT C 3',含起始密码子,反义链为:5' TT AAG ACC ACC ACC ACC ACC AGA ATC ACC ACG ACC CAT G 3',二者退火后 5'端为 *Eco*RI 之粘性末端,3'为 *Afl* II 之粘性末端。以上 DNA 均选用大肠杆菌偏爱的密码子并考虑到所转录的 mRNA 有利于翻译的结构,由上海生工公司合成。

1.4 人 UK B 链 cDNA 片段的 PCR 扩增

以含人 pro-UK 全长 cDNA 的质粒 pUC9-pro-UK 为模板,在 PE 480 型基因扩增仪上分别扩增与 RGD 编码 cDNA 融合及含起始密码子的 UK B 链的 cDNA。反应参数为:94℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 1.5min,行 35 次循环,72℃ 总循环 7 min。用 PCR 产物回收试剂盒回收特异性扩增片段。

1.5 表达质粒的构建及鉴定

按分子克隆常规方法进行 DNA 的酶切、补平末端、连接及转化,分别将 RGD 与 UK B 链的融合基因(RuB)和 UK B 链基因插入到原核表达载体 pBV220 的双启动子 P_{RPL} 的下游,酶切鉴定筛选转化子得到阳性重组子 pBV220-RuB 和 pBV220-uB。

1.6 DNA 序列测定

对筛选得到的 pBV220-RuB 和 pBV220-uB 用 T7 DNA 测序试剂盒按照操作说明书对其进行测序。

1.7 基因的诱导表达

原核表达载体 pBV220 的双启动子 P_{RPL} 受 λ 噬菌体温度敏感基因 *clts857* 的调控,因此插入的外源基因可在双启动子 P_{RPL} 的控制下进行温控表达。将测序正确的阳性克隆及含 pBV220 空载体的克隆分别于 5 mL LB 培养液中 30℃ 振荡培养过夜,次日以 2% 接种到 100 mL LB 培养液,30℃ 振荡培养至 OD_{600} 为 0.3~0.4 时,迅速转移至 42℃ 继续振荡培养诱导表达 5 h。

1.8 SDS-PAGE

参照 Lammeli 的方法^[8]进行。分离胶浓度为 15%,浓缩胶浓度为 5%。取 500 μ L 菌液离心后收集菌体,加 50 μ L 水和 50 μ L 的 2 \times 样品缓冲液,重悬菌体后于 100℃ 煮 5min,取 20 μ L 上样经还原性 SDS-PAGE 后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.9 表达产物的变复性

参照文献^[9]提取包含体并进行变复性。

1.10 Western 印迹

按照抗体说明书进行。诱导表达的产物经 SDS-PAGE 后,按 0.8mA/cm² 将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上(作用 2h),膜于室温干燥 30 min 后用 Blotto A 液(为含 5% 脱脂奶粉和 0.05% Tween20 的 1 \times TBS)室温封闭 1h 后,于 Blotto A 液中加一抗至终浓度为 0.2 μ g/mL,于 4℃ 过夜,用含 0.5% Tween20 的 1 \times TBS 室温洗膜 3 次,每次 5min,将膜置于用 Blotto A 液稀释为 1:400 的 HRP 标记的二抗中室温孵育 1h,洗膜 3 次,用 DAB 避光显色 3~5min,待显色满意后,用水冲洗膜,晾干后避光保存。

1.11 纤溶活性的测定

参照文献^[10]的方法进行。取 5mL 煮溶的 1.4% 琼脂糖(溶于 0.1 mol/L PBS, pH7.5)与 5mL 37℃ 保温的 2 mg/mL 纤维蛋白原(溶于水中)混合,快速加入 0.2mL 40℃ 保温的 50 NIH u/mL 凝血酶,倒入酶连板盖中,凝固后打孔。加样于孔中 37℃ 保温 16~24h,观察透明溶解圈的大小。

1.12 抗血小板聚集活性的测定

取 20mL 用柠檬酸钠处理的新鲜健康人血液 1000 r/min 离心 10 min,取上清为富血小板血浆 (PRP)。取 300 μ L PRP 加 20 μ L 待测样品于 37℃ 温育 5min,加入致聚剂 ADP 至终浓度为 10 μ mol/L,用血小板聚集仪(Chrono-LOG 502, USA)于 490nm 波长处测透射率,根据光透射率的增加来检测血小板的聚集率。

2 结果

2.1 UK B 链 cDNA 的扩增

以 pUC9-proUK 为模板分别扩增用于与 RGD 之编码 cDNA 融合和含起始密码子的 UK 的 B 链 cDNA 取 10 μ L 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 可见于 750 bp 处有一特异性扩增条带(图 1)。

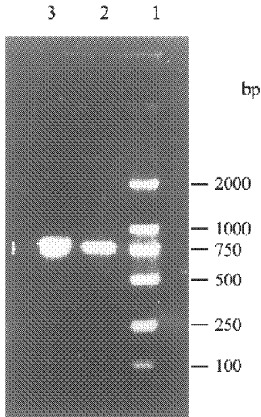


图 1 PCR 产物的电泳分析

Fig.1 Electrophoretogram of PCR products

- 1. DNA molecular weight marker ;
- 2. UK B chain ;
- 3. ATG-containing UK B chain

2.2 原核表达载体 pBV220-RuB 和 pBV220-uB 的构建

将人工合成编码 RGD 肽的寡核苷酸正、反义链退火后, 与经 *Afl* II 和 *Pst* I 双酶切之 B 链 cDNA 及经 *Eco*RI 和 *Pst*I 双酶切的 pBV220 连接, 构建 RGD 肽与 B 链的融合基因表达质粒 pBV220-RuB。将 B 链 cDNA 经 *Pst* I 酶切后与经 *Eco*R I 和 *Pst* I

双酶切的 pBV220 粘连, 用 Klenow 补平 *Eco*RI 后平连, 构建成 B 链的表达质粒 pBV220-uB。用连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, 挑取若干转化子培养后, 小量提取质粒 DNA 并行酶切鉴定以筛选阳性重组子。pBV220-RuB 阳性重组子用 *Eco* RI 和 *Pst* I 双酶切可切下 420bp 和 330bp 两种片段, pBV220-uB 阳性重组子用 *Eco*R I 可切下一 330bp 大小的片段(结果未示)。对阳性重组子进行测序, 图 2 为 pBV220-RuB 的 N 端部分序列的测定结果, 可读出含有起始密码子和连接肽的 RGD 的全部编码序列和 B 链的部分 N 端序列。

2.3 融合蛋白 RuB 和 B 链在大肠杆菌中的表达

将构建好的表达质粒 pBV220-RuB 和 pBV220-uB 分别转化大肠杆菌 DH5 α , 经温度诱导后 RuB 和 uB 在双启动子 P_{RPL} 作用下得到表达。SDS-PAGE 分析结果如图 3, 与空载体质粒 pBV220 相比, 重组的表达质粒 pBV220-uB 和 pBV220-RuB 在分子量大约 32 kD 处均有明显的表达条带, 经薄层扫描, 分别占菌体总蛋白的 9.87% 和 10.32%。用 uPA 的多克隆抗体进行的 Western 印迹结果进一步表明, 这两个特异性的表达条带均与抗体发生特异性的结合反应(图 4)。

2.4 表达产物的活性分析

提取包含体并经变复性处理后, 对复性液进行纤维平板溶圈实验, 结果表明表达产物 RuB 和 uB 均具有与天然尿激酶相似的纤溶活性(图 5), 用此法测得重组菌的表达量约为 8000 IU/L。抗血小板聚集活性结果表明(图 6)RuB 与 uB、天然尿激酶相比具有一定程度的抗血小板聚集活性。

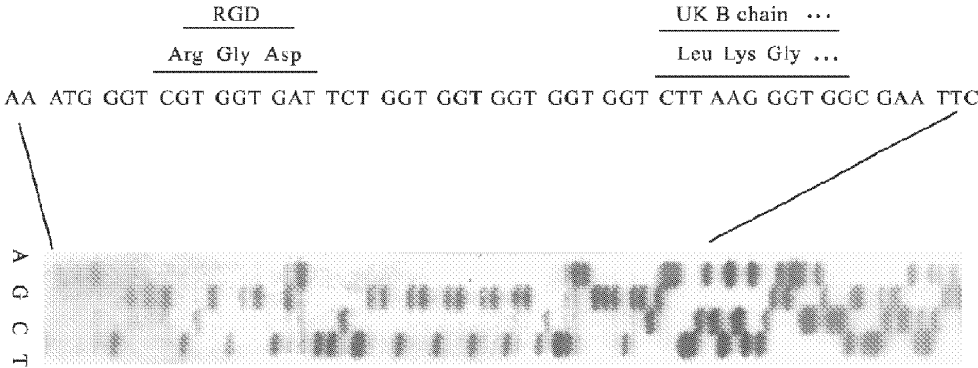


图 2 RuB cDNA 的 5'端部分序列

Fig.2 Partial sequence of the 5' end of RuB

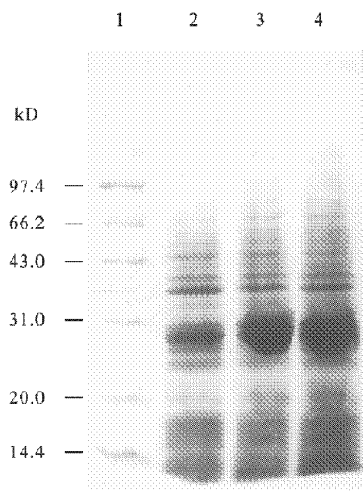


图 3 菌体裂解产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 The SDS-PAGE pattern of bacterial lysates

1. Protein molecular weight marker
2. pBV220 ; 3. pBV220-RuB ;
4. pBV220-uB

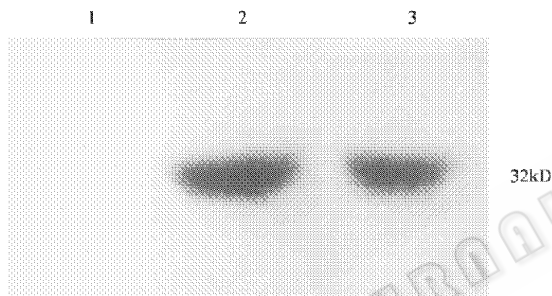


图 4 重组蛋白的 Western 印迹分析

Fig.4 Western blot analysis of the recombinant proteins

1. pBV220 ; 2. pBV220-RuB ;
3. pBV220-uB

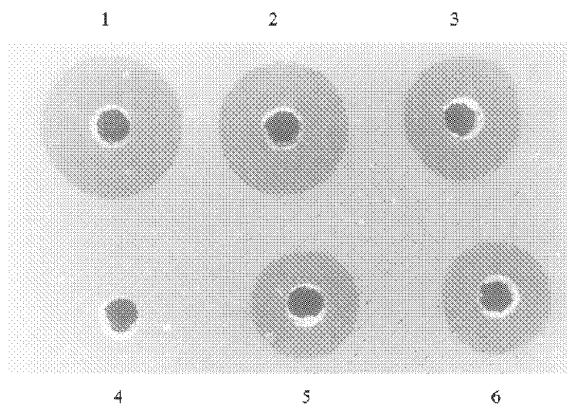


图 5 纤维蛋白平板溶圈实验

Fig.5 Fibrin plate assay

1 2 3. Reference urokinase ;
4. pBV220 ; 5. pBV220-RuB ;
6. pBV220-uB

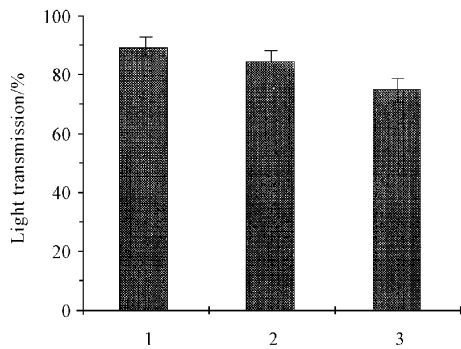


图 6 抗血小板聚集实验

Fig.6 Anti-platelets aggregation assay

1. pBV220 ; 2. uB ; 3. RuB

3 讨论

传统的溶栓剂由于特异性差、半衰期短等缺点使得临床应用往往需要大剂量反复给药,由此经常会伴随由系统性纤溶引起的出血副作用。另外血小板的聚集性升高是冠脉血栓成功溶栓后发生再梗塞的重要原因。寻找和发展新型特效的溶栓剂是目前心血管研究的一个重要领域。随着分子生物学理论的发展和技术的应用以及对溶栓剂分子结构与功能的认识,人们通过对传统的溶栓剂进行拆分和重新组合,构建了一系列新型的重组溶栓剂,其中某些经体内外实验表明具有较高的生物利用度。我们用基因重组的方法,将已证明具有抗血小板聚集活性的 RGD 肽与尿激酶的酶功能区的 B 链融合(RuB),通过对其表达产物的活性分析表明,这种融合蛋白具有纤溶和抗血小板聚集的双重活性。proUK 分子具有依赖于其分子中 Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ 肽键完整性的一定程度的纤维蛋白特异性^[11],因此,目前大多采用含有此键的 LMW-SCUPA 构建嵌合体溶栓剂,但是,由于在 LMW-SCUPA 分子中同时包含的一个凝血酶的敏感键,使其易于在凝血酶富集的血栓部位被灭活。我们构建的 RuB 所采用的是避开凝血酶敏感键的 B 链酶功能区,虽然同时也去除了与其纤维蛋白特异性相关的 Lys¹⁵⁸-Ile¹⁵⁹ 肽键,但由于分子的另一部分 RGD 可能与血栓部位大量暴露于活化的血小板膜表面的膜糖蛋白 GP II b/III a 的结合而起到血栓导向的作用。Colucci 等^[12]利用 t-PA 分子的 finger 区和 kringle 2 区具有纤维蛋白结合性的特点分别将其 kringle 2 区、finger 区加 kringle 2 区与 UK 的 B 链融合,结果表明这两种融合蛋白均具有纤维蛋白依赖性的纤溶作用。因此 UK 的 B 链可与其它分子融合而保持其纤溶的活性。

参 考 文 献

- [1] Collen D , Lu H R , Stassen J M *et al.* *Thromb Haemost* , 1994 , **71** :95~102
- [2] Adelman B , Gennings C , Strony J *et al.* *Cir Res* , 1990 , **67** :941~947
- [3] Gurewich V , Pannell R , Louie S *et al.* *J Clin Invest* , 1984 , **73** :1731~1739
- [4] Stump D C , Lijnen H R , Collen D . *J Biol Chem* , 1986 , **261** :17120~17126
- [5] Ichinose A , Fujikawa K , Suyama T . *J Biol Chem* , 1986 , **261** :3486~3489
- [6] Lijnen H R , Collen D . *Br J Haematol* , 1991 , **77** :261~266
- [7] 张用书 , 李秀珍 , 程度胜等 . 生物工程学报 , 1997 , **13** :415~418
- [8] Lammeli U K . *Nature* , 1970 , **217** :680~683
- [9] Winkler M , Blaber M . *Biochemistry* , 1986 , **25** :4041~4045
- [10] 韩素文 , 俞炜源 , 李秀珍等 . 军事医学科学院院刊 , 1987 , **11** :101~105
- [11] Lijnen H R , Collen D . *Thromb Haemost.* 1991 , **66** :88~110
- [12] Colucci M , Gavallo L G , Agnelli G *et al.* *Thromb Haemost.* 1993 , **69** :466~472

Construction of Fusion Recombinant Plasmid Coding for RGD Peptide and Urokinase B Chain Its Expression in *Escherichia coli* and Preliminary Characterization of Its Biological Activity

ZHU Fu-Xiang XING Gui-Chun HE Fu-Chu
(Beijing Institute of Radiation Medicine , Beijing 100850)

Abstract A synthetic RGD(Arg-Gly-Asp) peptide-coding sequence was fused with urokinase B-chain cDNA and then cloned into the prokaryotic expression vector pBV220. The fused gene was expressed in *E. coli* DH5 α under the control of P_RP_L promoter by 42℃ induction. The expression level of the fusion protein was over 9.2% of the total bacterial proteins as a or of inactive inclusion body. The purified fusion protein was obtained with similar antigenicity as urokinase shown by Western blotting. Its *in vitro* fibrinolysis and anti-platelet aggregation activity was also evaluated by bioassay.

Key words RGD peptide , urokinase B-chain , fusion gene