

免疫亲和层析法纯化单链尿激酶型纤溶酶原激活剂

高丽华* 胡显文 吴清法 肖成祖 胥照平 张正光

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

关键词 尿激酶原, 单克隆抗体, 免疫亲和层析, 杂交瘤细胞培养, 多孔微载体

中图分类号 Q814.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0356-04

尿激酶原(Pro-urokinase, pro-UK), 也称单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(Single-chain urokinase-type plasminogen activator, scu-PA), 与 t-PA 一样是第二代溶栓药物。给药时, 保持无活性的酶原状态, 只激活被纤维蛋白吸附的纤溶酶原, 而对游离的纤溶酶原没有作用, 即只在血栓表面才能活化转变为双链尿激酶(Two-chain urokinase-type plasminogen activator, tcu-PA 或 UK), 因而具有较高的特异性溶血栓作用^[1]。尿激酶原在纤溶酶、激肽释放酶或胰蛋白酶等的作用下, Lys158-Ile159 间肽键断裂, 整条肽链一分为二, 并通过二硫键连接, 成为具有酶催化活性的双链尿激酶型纤溶酶原激活剂^[2,3], 即高分子量尿激酶(HMW-UK)。如果加入还原剂如巯基乙醇破坏二硫键, 可继续降解为低分子量尿激酶(LMW-UK)。由于 scu-PA 能够选择性地使纤维蛋白表面激活纤溶酶原, 可以克服尿激酶使用过程中非特异地激活全身纤溶系统所造成的出血倾向问题, 故以 scu-PA 作为溶栓药更有前途^[4-6]。目前, 我们已构建了高水平表达 scu-PA 的工程细胞株, 并建立了相关的纯化方法, 但此纯化工艺比较繁杂, 加之单链尿激酶原极不稳定, 在纯化过程中易降解为双链尿激酶, 最终 scu-PA 的产率和质量会受到影响。因此, 迫切需要一种高效、简便的纯化方案。一般认为抗体亲和层析是最快捷、高效的纯化方法。但由于 scu-PA 与 tcu-PA 在肽链结构上差异甚微, 只是 Lys158-Ile159 抗原表位不同^[7], 针对这一抗原表位, 我们设计了包含这一表位的 13 肽与载体蛋白 KLH 偶联, 用偶联物免疫小鼠, 做细胞融合, 从 800 个融合细胞中筛选出了 4 株特异结合 scu-PA 的单克隆抗体, 取 G7 杂交瘤细胞株进行了 anti-scu-PA 单抗的生产和纯化, 用所纯化的单克隆抗体偶联了 Sepharose 4B 亲和柱, 以此建立了新的简便、高效的纯化 scu-PA 方法。

1 材料和方法

1.1 抗 scu-PA 单克隆抗体的制备

合成跨越 scu-PA 纤溶酶等酶切位点 Lys158-Ile159 的 13

肽(Thr-Leu-Arg-Pro-Arg-Phe-Lys-Ile-Ile-Gly-Gly-Glu-Cys), 与载体蛋白 KLH(Keyhole limpet hemocyanin)偶联。按常规方法用偶联物免疫 Balb/c 小鼠, 待小鼠产生良好的免疫反应后, 取其脾细胞与 Sp2/0 细胞融合制备杂交瘤细胞。然后用间接 ELISA 法^[8]筛选强阳性克隆孔, 再进行亚克隆, 最后鉴定、建立分泌抗 scu-PA 单抗的杂交瘤细胞株 G7(抗体类型为 IgG1)。

1.2 杂交瘤细胞培养

采用 Cytopore 2(Pharmacia Biotech AB)多孔微载体, 在 1.5L 搅拌瓶(NALGENE 公司, USA)中培养分泌抗 scu-PA 的杂交瘤细胞 G7。杂交瘤细胞培养基用 1640, 补加多种氨基酸, 1% 血清和 0.1% 蛋白胨。培养时, 微载体浓度 1.5g/L, 装液量 300mL, 搅拌速度 40~60r/min, 当细胞密度大于 2.0×10^6 /mL 时, 开始收集培养上清, 细胞密度约 5.0×10^6 /mL 时, 换液量 200mL/d。

1.3 CL-11G 细胞株培养

在 30 L Biostat UC(B. Braun)反应器中用 Cytopore 2 多孔微载体培养分泌 scu-PA 的重组 CHO 细胞株 CL-11G(军事医学科学院生物工程研究所)^[8,9], 采用无血清培养基, 基本组成为 DMEM/F12(1:1)(Hyclone Co. USA), 添加适量蛋白胨、胰岛素及某些氨基酸和无机盐等小分子物质^[10]。为防止在细胞培养中, scu-PA 过度降解成 tcu-PA, 在培养基中加入少量抑蛋白酶肽(Bayer Co.)过滤除菌。

1.4 制备免疫亲和柱纯化 scu-PA

用蛋白 G-Sepharose 4B 亲和层析柱(Pharmacia Co.)纯化杂交瘤细胞 G7 培养上清中的抗 scu-PA 单抗, 将单克隆抗体与用 CNBr 活化的 Sepharose 4B 交联、装柱, 用此亲和柱纯化 CL-11G 细胞培养上清中的 scu-PA。上样前用 pH 7.5 的 0.1 mol/L 的 PBS(磷酸缓冲液, A 液)平衡亲和柱, 将 CL-11G 细胞培养上清的 pH 调至 7.5~8.0 后上亲和柱, 上样完毕后用 A 液洗脱杂蛋白, 之后用 pH 2.5、0.2 mol/L 的 Gly-HCl 缓冲液

洗柱 ,收集的单克隆抗体的溶液立即加入 1mol/L Tris 溶液调节 pH 至 7.0。

1.5 检测方法

- 1.5.1 细胞计数采用柠檬酸结晶紫染色法^[11]。
- 1.5.2 scu-PA 活性测定采用改进的纤溶板法^[12]。
- 1.5.3 蛋白测定采用改良的 Lowry's 法。
- 1.5.4 抗体滴度测定采用 ELISA 法^[13]。
- 1.5.5 scu-PA 纯度测定采用 HPLC 法^[14]。
- 1.5.6 SDS-PAGE 分离胶浓度 12.5% ,浓缩胶浓度 4.5% , 0.01% 考马斯亮蓝 G250 染色^[15]。
- 1.5.7 免疫亲和柱制备采用文献 14 方法进行。

2 结 果

2.1 抗 scu-PA 单克隆抗体的生产

分别用 13 肽-KLH 和 70% scu-PA + 30% tcu-PA 混合物做抗原免疫小鼠获得的两株杂交瘤细胞(G7 和 uPA1)分泌的 anti-scu-PA 单抗和 anti-u-PA 单抗与几种抗原间的交叉反应见表 1 ,表明 G7 分泌的 anti-scu-PA 单抗的特异性很高 ,并且与 tcu-PA 抗原无交叉反应。在 1.5L 搅拌瓶中培养杂交瘤细胞 G7 ,随时间延长 ,细胞数、抗体滴度均增长 ,10d 达到高峰。细胞最高密度为 6.5×10^6 /mL ,抗体滴度为 43.5mg/L。13d 换液培养共收集含约 71mg 单抗的上清 1.9L。(图 1)

表 1 抗 scuPA 的 McAb 特性的 ELISA 实验

Table 1 ELISA of specificity of anti-scu-PA McAb

Antigen	Antigen Ascu-PA	McAb	Anti-scu-PA	Anti-u-PA
			McAb	McAb
		scu-PA	1.00	1.00
		tcu-PA	0.04	0.88
		t-PA	0.02	0.01
		BSA	0.00	0.00

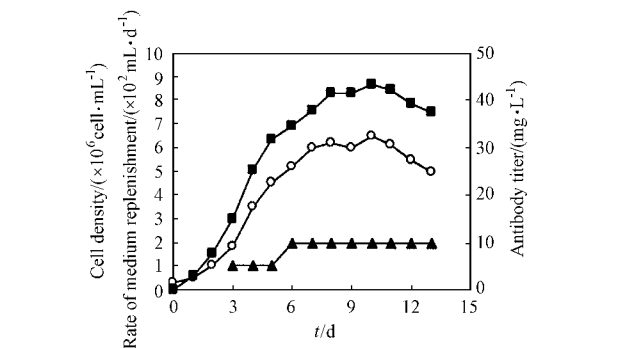


图 1 在搅拌瓶中多孔微载体培养杂交瘤细胞生长曲线

Fig.1 Growth curve of hybridoma cell culture

on porous microcarriers in spinner flask

○Cell density ; ■Antibody titer ; ▲Rate of medium replenishment

2.2 Anti-scu-PA 的 McAb 的纯化

用蛋白 G-Sepharose 4B 直接纯化杂交瘤细胞 G7 培养上清 ,平衡液为 pH8.0 的 0.02mol/L 磷酸缓冲液 + 0.2mol/L NaCl 溶液 ,洗脱液为 pH2.0 的 0.1mol/L Gly-HCl。纯化结果见表 2。亲和层析法纯化能使抗体滴度提高 152 倍 ,电泳扫描纯度为 98% ,抗体收率 93.3%。

表 2 蛋白 G-Sepharose 4B 亲和层析纯化单抗

Table 2 Anti-scuPA McAb purified by protein G-Sepharose 4B affinity chromatography

	Antibody titer(mg/L)	Purification factor
Before purification	37.37	-
After purification	5708.1	152.7

2.3 用 anti-scu-PA IgG-Sepharose 4B 抗体柱纯化抗原 scu-PA

将 1.5 g CNBr 活化 Sepharose 4B 胶与 10mL 上述纯化后蛋白浓度为 5.7 mg/mL anti-scu-PA IgG 交联 ,制备免疫亲和柱 ,交联率为 87.5%。用此柱直接纯化 CL-11G 细胞培养上清中的 scu-PA 纯化结果见表 3。三批样品一步纯化获得的蛋白作 SDS-PAGE 电泳并作扫描分析(图 2) ,在非还原条件下只有一条带 ,在还原条件下 ,scu-PA 纯度为 96.3% ,比活为 1.2×10^5 IU/mg ,u-PA 回收率约为 90.4% ,说明获得的 anti-scu-PA 的 McAb 具有高度特异性。

表 3 免疫亲和层析法纯化 scu-PA

Table 3 scu-PA purification by immuno-affinity chromatography

	Volume of sample /mL	u-PA concentration (mg/L)	Specific activity (IU/mg)	Recovery ratio /%
Before purification	1240	50.0	354	-
After purification	20	2802.4	1.2×10^5	90.4

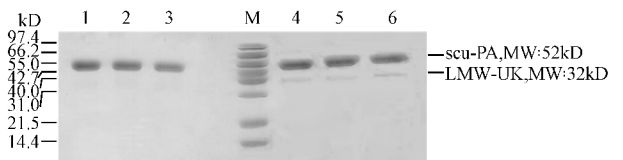


图 2 免疫亲和层析法纯化 CL-11G 细胞培养上清的 u-PA 的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE analysis of u-PA purified from supernatant of

CL-11G cell culture by immuno-affinity chromatography

Electrophoresis under non-reducing and reducing conditions is shown in lanes 1 ,2 ,3 and lanes 4 ,5 ,6 MW marker(Gibco BRL ;97.4 ,66.2 , 55.0 ,42.7 ,40.0 ,31.0 ,21.5 ,14.4kD) ;Batch I(lanes 1 ,4) ; Batch 2 (lanes 2 ,5) ;Batch Ⅲ(lanes 3 ,6)

2.4 三步法纯化 scu-PA

三步法纯化工艺包含三步 (1)用阳离子交换扩张床从 CL-11G 培养上清中纯化 u-PA (2)用凝胶过滤制备色谱使 u-PA 纯度达到 98% (3)根据实际情况 ,采用苯基脲亲和柱去

除部分双链 UK 使单链比例 > 80%(图 3)。每步纯化的结果见表 4。采取三步法纯化工艺,从约 2100L 细胞培养上清中

获得单链比例 > 90% 的冻干合格 u-PA 约 80 克,总回收率 > 60%。

表 4 三步法纯化 u-PA
Table 4 u-PA purification by 3-step chromatography process

	Specific activity/(IU/mg)	u-PA ratio/%	Scu-PA ratio in total u-PA/%	u-PA recovery ratio/%
Cation-exchange column	~ 6.0 × 10 ⁴	~ 50	70 ~ 80	100
Gel filtration colum	1.0 × 10 ⁵	~ 98	~ 85	~ 80
Benzaamidine affinity columnn	1.2 × 10 ⁵	~ 98	~ 90	~ 80

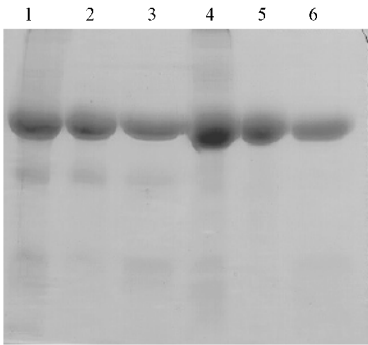


图 3 三步法纯化 CL-11G 细胞培养上清中 u-PA 的 SDS-PAGE
Fig.3 SDS-PAGE analysis of u-PA purified from supernatant of CL-11G cell culture by three-step chromatography process

Electrophoresis under reducing and non-reducing conditions is shown in lanes 1 2 3 and lanes 4 5 6 respectively 1 4. u-PA purified from supernatant by expanded-bed cation-exchange chromatography (Step 1); 2 5. u-PA purified from step-1 sample by gel filtration chromatography (Step 2); 3 6. u-PA purified from step-2 sample by benzaamidine affinity chromatography(Step 3)

3 讨 论

与 tcu-PA 相比, scu-PA 具有选择性溶栓作用,但是在生产过程中, scu-PA 极不稳定, Lys158-Ile159 肽键易断裂而转变为其活性形式 tcu-PA。由于两者在肽链结构上差异甚微,只有一个抗原表位的不同,因而如何将 scu-PA 和 tcu-PA 分离是开发尿激酶原药物的难点之一。用单抗制备的亲和层析提纯干扰素、凝血因子Ⅷ等都已形成了规模化,为有效分离 scu-PA 和 tcu-PA,我们研制了抗-scu-PA 的单抗,针对二者唯一的不同抗原表位,选取 scu-PA 上 Thr152-Cys163 这一段氨基酸序列(Thr-Leu-Arg-Pro-Arg-Phe-Lys-Ile-Ile-Gly-Gly-Glu-Cys)作为半抗原,因为它不仅包含 scu-PA 中 Lys158-Ile159 肽键,而 tcu-PA 中则不存在这一完整的肽段,而且亲水氨基酸残基占多数,且有一个脯氨酸残基,因而较其它序列更可能暴露在 scu-PA 分子表面,由此产生的抗多肽抗体更容易识别天然蛋白。为了进一步增加其抗原性,在 C 端连接一载体蛋白 KLH。实验表明,由此获得的 G7 杂交瘤分泌的单抗对于 scu-PA 具有很高的特异性。

u-PA 常规纯化方法一般需要四、五步,操作复杂,回收率低,而且单链比例只有 90% 左右。本实验用抗 scu-PA 的

McAb 制备的免疫亲和层析柱提纯 u-PA。一步纯化, u-PA 的回收率约 90%,其中 scu-PA 的比例可达 96.3%。由于步骤的减少,避免了因步骤繁杂造成的 scu-PA 降解为 tcu-PA,同时降低了成本。此方法简便、快速、高效。

要提高杂交瘤细胞培养密度,在连续培养过程中必须将细胞截留在反应器中,但由于杂交瘤细胞属悬浮细胞,用实心微载体无法将其固定化。在本文中,采用 Cytopore 多孔微载体培养杂交瘤细胞,细胞生长在微载体内部,既可以将细胞固定化,又可以保护细胞免受机械损伤,使其在搅拌瓶中的培养密度便可达到 6.5 × 10⁶/mL,上清中抗体浓度大于 40mg/L。而在反应器中,多孔微载体培养杂交瘤细胞密度可达 1.2 × 10⁷/mL^[16]。因此, Cytopore 多孔微载体不仅可用于高密度培养贴壁细胞如 CHO 细胞等(细胞密度 > 2.5 × 10⁷/mL)^[8,17],而且适合于高密度培养悬浮细胞如杂交瘤细胞等。

REFERENCES (参考文献)

[1] Pannall R , Gurewich V . Pro-urokinase : A study of a mechanism for its selectively fibrinolytic effect . *Blood* , 1986 , **67** (5) : 1215 ~ 1223

[2] Kasai S , Arimura H , Nishida M *et al* . Primary structure of single-chain pro-urokinase . *J Biol Chem* , 1985 , **260** : 12382 ~ 12389

[3] Ichinose A , Fujikawa K , Suyama T . The activation of Pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin . *J Biol Chem* , 1986 , **261** : 3486 ~ 3489

[4] PRIMI Trial Study Group . Randomized double-blind trial of recombinant prourokinase against streptokinase in acute myocardial infarction . *Lancet* , 1989 , **1** : 863 ~ 867

[5] Sasahara A A , Barker W M , Weaver W D *et al* . Clinical studies with the new glycosylated recombinant prourokinase . *J Vasc Interv Radiol* , 1995 , **6** : 84S ~ 93S

[6] Weaver W D , Hartmann J , Anderson J L . *et al* . New recombinant glycosylated prourokinase for treatment of patients with acute myocardial infraction . *J Am Coll Cardiol* , 1994 , **24** : 1242 ~ 1248

[7] Wun T C , Schleuning W D , Reich E . Isolation and Characterization of Urokinase from Human Plasma . *J Biol Chem* , 1982 , **257** : 3276 ~ 3283

[8] HU X W (胡显文) , XIAO C Z (肖成祖) , LI Z H (李佐虎) *et al* . Production of u-PA with rCHO cell culture on porous microcarriers in serum-free growth medium . *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2000 , **16** (3) 387 ~ 391

[9] HU X W (胡显文) , XIAO C Z (肖成祖) , GAO L H (高丽华) *et*

- rous microcarriers. *Biotechnology Information* (生物技术通报), 2001, **150**: 45 ~ 48
- [10] HU X W (胡显文), XIAO C Z (肖成祖), GAO L H (高丽华) *et al.* Effects of serum concentration and dissolved oxygen on production of prourokinase with rCHO cell culture. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 2001, **12**(3): 198 ~ 201
- [11] HU X W (胡显文), XIAO C Z (肖成祖), HUANG Z C (黄子才) *et al.* Preparation of cellulose porous microcarrier and application in animal cell culture. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1999, **15**(1): 93 ~ 97
- [12] GAO L H (高丽华), XIAO C Z (肖成祖), YU F (于芳). Modification of assay for measuring prourokinase and observation of stability of prourokinase expressed by genetically-engineered cell line CL-11G. *Letters in Biotechnology* (生物技术通讯), 1997, **8**(2): 94 ~ 96
- [13] Dalili M, Ollis D F. Transient kinetics of hybridoma growth and monoclonal antibody production in serum-limited cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, **33**: 984 ~ 990
- [14] LIU G Q (刘国詮). Down-stream of Biotechnology (生物工程下游技术). Chemical Industry Press. 1993, pp. 193 ~ 205
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Press. 1989
- [16] XIAO C Z, HU X W, GAO L H *et al.* High-density and scale-up cultivation of recombinant CHO cell line and hybridomas with porous microcarrier Cytopore. *Cytotechnology*, 1999, **30**: 143 ~ 147
- [17] HU X W, XIAO C Z, LI Z H *et al.* Pilot production of u-PA with porous microcarrier cell culture. *Cytotechnology*, 2000, **33**: 13 ~ 19.

Single-chain Urokinase-type Plasminogen Activator (scu-PA) Purification by Immuno-affinity Chromatography

GAO Li-Hua* HU Xian-Wen WU Qing-Fa XIAO Cheng-Zu XU Zhao-Ping ZHANG Zheng-Guang
(Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract The only difference of primary structure between single-chain prourokinase (pro-UK or scu-PA) and two-chain urokinase (UK or tcu-PA) is the cleavage of a single peptide bond (Lys158-Ile159) and transform scu-PA into its active two-chain form. A 13-peptide (Thr-Leu-Arg-Pro-Arg-Phe-Lys-Ile-Ile-Gly-Gly-Glu-Cys), which spans the cleavage peptide bond, was synthesized and linked to KLH (Keyhole limpet hemocyanin). The Balb/c mice were immunized by the conjugated protein with proper adjuvant. According to the Kohler and Milstein's methods, a hybridoma cell line G7 secreting monoclonal antibody specific for scu-PA was obtained. The anti-scu-PA McAb, purified from the supernatant of porous microcarrier hybridoma cell culture, was conjugated to CNBr-activated Sepharose 4B to prepare an immuno-affinity chromatography column. The u-PA was purified only by this affinity column from the supernatant of cultivating the u-PA-producing recombinant CHO cell, the u-PA recovery ratio is 90.4%, the purification factor was about 50, with the specific activity of 1.2×10^5 IU/mg, the scu-PA ratio in the u-PA product was 96.3%. Compared to immuno-affinity chromatography, the 3-step process for purifying u-PA (cation-exchange column, gel filtration column and benzamidine affinity column) has a u-PA recovery ratio of about 65%, with a specific activity of 1.0×10^5 IU/mg, and an scu-PA ratio of about 90%. These results showed that immuno-affinity chromatography is simple to recover u-PA and effective to separate scu-PA from tcu-PA.

Key words prourokinase, monoclonal antibody, immuno-affinity chromatography, hybridoma cell culture, porous microcarrier

Received: 11-22-2001

This work was supported by Grant from the Project of Chinese National Programs High Technology Research and Development (No. Z18-03-21).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948817; Fax: 86-10-63833521; E-mail: lihuagao@hotmail.com

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>