

## 蛇毒纤溶酶原激活剂 TSV-PA 在昆虫细胞中的表达

曹 郁 虞谷松 杨胜利 龚 毅\*

(中国科学院上海生命科学院生物工程研究中心,上海 200233)

**摘 要** 将蛇毒 TSV-PA 基因插入昆虫杆状病毒供体质粒 pFastBacHTa 中,在粉纹夜蛾 Tn-5B1-4 细胞中进行表达。SDS-PAGE 分析结果表明,表达产物为分子量 33kD 的 TSV-PA 蛋白,Western 印迹分析也证实了此结果。酶活力测定结果表明,昆虫细胞表达的 TSV-PA 蛋白具有较高活性。

**关键词** 蛇毒;纤溶酶原激活剂;TSV-PA;昆虫杆状病毒表达系统

**中图分类号** Q51 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0506-04

蛇毒是含有许多生物活性蛋白质和多肽的复杂混合物,其蛇毒蛋白酶的功能与凝血、溶血栓相关<sup>[1]</sup>,因此利用蛇毒蛋白酶开发出新的治疗脑血管和各种心血管疾病的药物,成为国内外研究的热点领域之一。蛇毒纤溶酶原激活剂 TSV-PA<sup>[2,3]</sup>是从竹叶青蛇毒中首先分离得到的真正能专一激活纤溶酶的蛇毒丝氨酸蛋白酶,具有激活人血浆纤溶酶的作用,和 t-PA、u-PA 相似,但又有显著差别。目前,t-PA、u-PA 是心血管疾病治疗中最常用的药物之一<sup>[4]</sup>,但存在半衰期短,可能引起全身性出血以及内源性抑制剂 PAI-1 作用而失活等潜在问题<sup>[5,6]</sup>。由于 TSV-PA 不存在引起 t-PA、u-PA 降解有关的结构域,TSV-PA 可能会有较长的半衰期。同时,TSV-PA 的 N 端缺乏一系列带正电荷的氨基酸,而这正好是内源性抑制剂 PAI-1 的结合位点,因此 TSV-PA 对 PAI-1 不敏感。又因为作为纤溶酶原激活剂,TSV-PA 的活性比 t-PA 低 50 倍左右,有可能在临床和基础研究中更有用。

天然的 TSV-PA 在蛇毒中含量低,分离得到不容易,本实验室已在大肠杆菌中表达了 TSV-PA,但是 TSV-PA 在大肠杆菌中的表达产物以包涵体形式存在,需经变性、复性后才具有生物活性。而且 TSV-PA 是一个单链糖蛋白,大肠杆菌表达系统缺乏蛋白质修饰加工体系,表达的 TSV-PA 没有糖基化。而杆状病毒表达系统是目前较受欢迎的一种真核表达系统,存在多种蛋白质修饰加工转运体系,使表达的蛋白质更具活性。本实验室应用该系统在昆虫细胞 Tn-5B1-4 中表达了 TSV-PA 蛋白,其酶活力比原

核表达的 TSV-PA 高 10 倍左右。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和细胞株:**大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)由本实验室保存;草地贪夜蛾细胞 sf21 由中科院上海生物化学研究所吴祥甫教授惠赠,粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4 由华东理工大学谭文松教授提供;Bac to Bac 昆虫杆状病毒表达系统为 Gibco BRL 公司产品,含有 pFastBac HT Expression Vectors, Max Efficiency DH10 Bac Competent Cells 以及 Cellfectin Reagent; pTSV-PA15 质粒由本实验室保存。

**1.1.2 试剂和培养液:**主要购自 Promega、Sangon、NEB、Gibco BRL、Sigma、华美生物工程公司及 QIAGEN 公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 重组杆状病毒供体质粒:**pFastBacHTa-TSV-PA 的构建:已克隆在 pTSV-PA15 质粒<sup>[3]</sup>中的蛇毒 TSV-PA 基因片段以 BamH I、EcoR I 双酶切后,低熔点胶分离回收,然后与先经 BamH I、EcoR I 双酶切的质粒 pFastBacHTa 相连接,构建重组供体质粒。

**1.2.2 重组杆状病毒基因组 Bacmid DNA 的获得和 PCR 鉴定:**将上述重组杆状病毒供体质粒转化大肠杆菌 DH10 Bac(含有经修饰的昆虫杆状病毒基因组),使其在大肠杆菌体内进行转座,产生含 TSV-PA 基因的重组杆状病毒基因组 Bacmid DNA。对此 Bacmid DNA 进行 PCR 鉴定,引物为 pUC/M13 正向、反向引物。PCR 条件为:94 $^{\circ}$ C 预先变性 5 min,加入

收稿日期:2001-03-12,修回日期:2001-06-25。

基金项目:高新技术研究发展计划项目(102-08-03-04)和中科院重大项目(KY951-A1-301-02001)资助。

\* 通讯作者。Tel:86-21-64700892-370;Fax:86-21-64700244;E-mail:yigong@srb.ac.cn

2u Taq DNA 聚合酶,按以下参数循环 30 次:94℃ 变性 1min,55℃ 退火 1min,72℃ 延伸 2min,最后一个循环 72℃ 延伸 10min。对 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查。

**1.2.3 昆虫细胞培养:**昆虫细胞培养技术,重组病毒的获取,外源基因的表达均参照文献[7]进行;共转染按 Cellfectin 产品说明书进行。

**1.2.4 重组杆状病毒的获取和 PCR 鉴定:**将上述重组杆状病毒基因组 Bacmid DNA 转染 sf21 细胞,在 3 d 后收取感染症状细胞的上清进行病毒扩增,并对此重组杆状病毒进行 PCR 鉴定。将病毒扩增的细胞上清经 8000r/min 离心 15min,取上清,用等体积的酚:氯仿:异戊醇(50:49:1)抽提,再用等体积氯仿抽提后乙醇沉淀,用 TE 缓冲液悬浮,以其为模板进行 PCR 鉴定。引物为 TSV-PA 上游引物(CCG GAT CCA ATC GAA GGT CGT GTC TTT GGA GGT GAT)和 TSV-PA 下游引物(A GAA TTC TCA CGG AGG GCA GGT CGC)。PCR 条件为:94℃ 预先变性 5min,加入 2u Taq DNA 聚合酶,按以下参数循环 40 次:94℃ 变性 1min,55℃ 退火 1min,72℃ 延伸 1.5min,最后一个循环 72℃ 延伸 10min。对 PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查。

**1.2.5 SDS-PAGE、Western 印迹分析及重组克隆:**均参照文献[8]稍加修改进行。

**1.2.6 His<sub>6</sub> 融合表达产物的纯化:**收集重组病毒感染的昆虫细胞 Tn-5B1-4,用裂解缓冲液(50mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mmol/L NaCl, 10mmol/L 咪唑, 0.05% Tween 20, pH8.0)悬浮后,超声波裂解细胞,10000g, 4℃ 离心 10min,取上清,加入适量 Ni-NTA 树脂,4℃, 200r/min 摇床上摇动 60min,然后将此混合物装柱,收集流出液,再以 10 倍柱体积的洗涤缓冲液(50mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mmol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑, 0.05% Tween 20, pH8.0)分 2 次洗脱杂蛋白,最后以 3 倍柱体积的洗脱缓冲液(50mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mmol/L NaCl, 250mmol/L 咪唑, 0.05% Tween 20, pH8.0)分 3 次洗脱目的蛋白。用 Bradford 法测定 TSV-PA 蛋白浓度。

**1.2.7 TSV-PA 蛋白酶活力测定:**纯化得到的 TSV-PA 蛋白样品于 4℃ 缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L NaCl, pH8.0)中透析过夜。然后 4℃ 用适量的 Factor-Xa 切离 48h。最后 25℃ 和过量的发色底物(2mmol/L S-2238)进行显色反应,测定酶活力:  $\Delta A_{405} / \Delta t$ 。

## 2 结果

### 2.1 重组供体质粒的构建

由张云等克隆的 TSV-PA 基因已在大肠杆菌表达系统中得到了表达<sup>[3]</sup>。通过 BamHI、EcoRI 双酶切将 TSV-PA 基因克隆到 pFastBacHTa 载体中,获得重组供体质粒 pFastBacHTa-TSV-PA(图 1)。重组供体质粒 pFastBacHTa-TSV-PA 可在大肠杆菌中发生转座,将外源基因 TSV-PA 转到大肠杆菌-昆虫细胞的穿梭载体 Bacmid 中,该方法较传统的重组病毒空斑筛选法具有实验操作方便,周期短的特点。

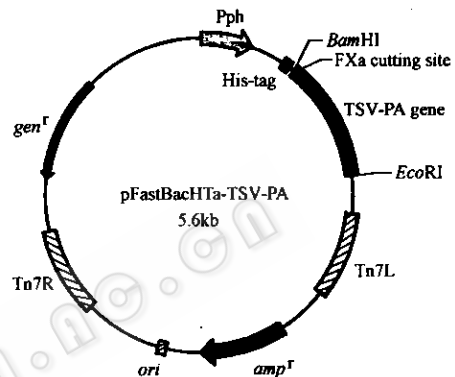


图 1 pFastBacHTa-TSV-PA 供体质粒构建图

Fig. 1 Schematic representation of the pFastBacHTa-TSV-PA donor vector

### 2.2 重组 Bacmid DNA 的获得

将重组供体质粒 pFastBacHTa-TSV-PA 转化 DH10 Bac 感受态细胞,在含有 Bluo-gal 及 IPTG 的平板上(卡那霉素 50μg/mL,庆大霉素 7μg/mL,四环素 10μg/mL)经两轮筛选后,挑取一个白色克隆接种于 3mL LB 培养基中,培养 24h 后,提取重组 Bacmid DNA。Bacmid DNA 片段大于 135kb,已不能用常规的酶切方法鉴定,采用 pUC/M13 正向、反向引物进行 PCR 鉴定,可扩增出约 3150bp 的 DNA 片段,正好是空白对照 Bacmid DNA 扩增出来的片段约 2430bp 加上 TSV-PA 基因片段约 720bp(图 2),说明 TSV-PA 基因已转座到 Bacmid DNA 中。

### 2.3 重组杆状病毒的获取

用 Cellfectin 法将重组的 Bacmid DNA 转染 sf21 细胞,收集上清进行病毒扩增,获得含 TSV-PA 基因的重组杆状病毒。感染上清提取病毒 DNA,以 TSV-PA 特定引物进行 PCR 反应,可扩增出约 720bp 的 DNA 片段,与相应供体质粒扩增出的 DNA 片段相一致(图 3),说明 TSV-PA 基因已整合到病毒基因组中。

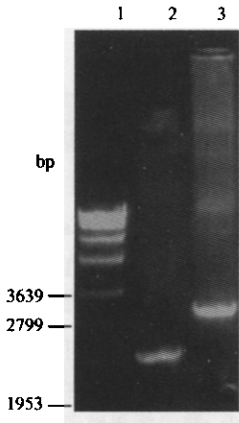


图2 重组 Bacmid DNA 的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant Bacmid

DNA by PCR amplification

- 1. BM  $\Psi$  Marker; 2. Bacmid DNA control;
- 3. Recombinant Bacmid DNA

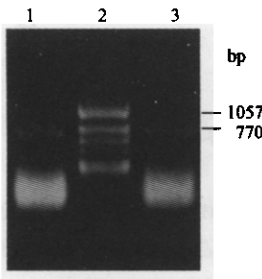


图3 重组杆状病毒的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of recombinant viral

DNA by PCR amplification

- 1. pFastBacHTa-TSV-PA; 2.  $\Phi$ X174 Hinc II marker;
- 3. TSV-PA recombinant baculovirus

### 2.4 TSV-PA 蛋白在昆虫细胞 Tn-5B1-4 中的表达

重组病毒感染昆虫细胞 Tn-5B1-4, 72h 后收集细胞, 超声波裂解破碎细胞, 取上清用于 SDS-PAGE 分析, 图 4 的结果表明, TSV-PA 在 Tn 细胞中得到表达, 表达量占细胞可溶性蛋白质的 4% 左右, 其分子量约 33kD, 大于大肠杆菌表达系统得到的分子量约 30kD 的 TSV-PA 重组蛋白。

由于在 TSV-PA 蛋白的 N 端融合了 6  $\times$  his, 所以表达产物以 Ni-NTA 树脂纯化, 纯化的 TSV-PA 蛋白纯度达 50% 以上, 分子量为 33kD 左右(图 5A)。为进一步确认表达产物, 同时进行了蛋白质印迹分析, 一抗采用由大肠杆菌表达的 TSV-PA 制备的兔抗 TSV-PA 的 IgG, 二抗采用碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG。蛋白质印迹分析结果也表明在昆虫细胞中表达的确为 TSV-PA 蛋白, 分子量大于大肠杆菌表达

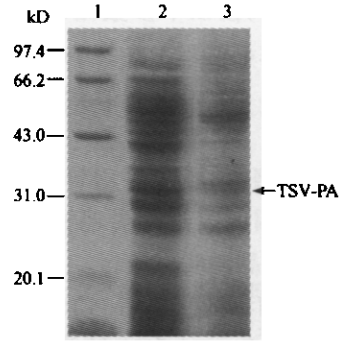


图4 Tn 细胞表达的 TSV-PA 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of TSV-PA protein expressed in

recombinant virus infected Tn cells

- 1. Molecular weight markers; 2. Total extract from cells infected with TSV-PA recombinant baculovirus; 3. Total extract from cells infected with baculovirus control

系统表达的 TSV-PA 蛋白, 应为糖基化所致(图 5B)。

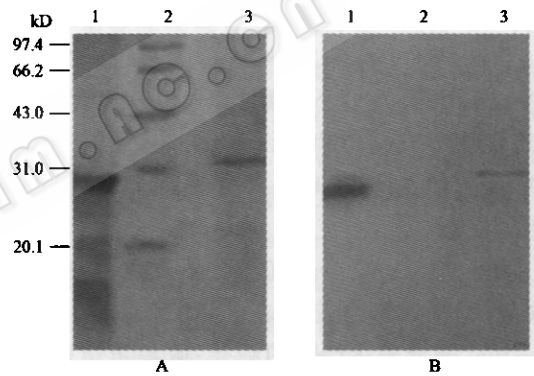


图5 昆虫细胞和大肠杆菌分别表达纯化的 TSV-PA 蛋白的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)

Fig.5 Analysis of TSV-PA protein expressed both in baculovirus

expression system and in *E. coli* expression system by SDS-PAGE(A) and Western blot(B)

- 1. Purified TSV-PA protein expressed in *E. coli*;
- 2. Molecular weight markers; 3. Purified TSV-PA protein expressed in Tn insect cells

### 2.5 TSV-PA 蛋白酶活力测定

大肠杆菌表达系统和杆状病毒表达系统得到的 TSV-PA 都以融合蛋白的形式存在, 必须经过 Factor-Xa 酶切等操作才具有活性。根据大肠杆菌表达系统得到的 TSV-PA 融合蛋白的 Factor-Xa 酶切的一系列数据, 杆状病毒表达系统得到的 TSV-PA 融合蛋白透析过夜后, 按 3mg/u 加酶, 于 4 $^{\circ}$ C 酶切 48h。然后, 25 $^{\circ}$ C, pH8.0, 测定 TSV-PA 蛋白的酶活力。

大肠杆菌表达的 TSV-PA 蛋白样品浓度约 0.151mg/mL, 加样量 600 $\mu$ L, 发色底物 S-2238 为

20 $\mu$ L, 根据下表, 算得酶活力  $\Delta A_{405}/\Delta t = 0.200$  ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ )。昆虫细胞表达的 TSV-PA 蛋白样品浓

度约 0.0143mg/mL, 加样量 600 $\mu$ L, 也根据下表, 算得酶活力  $\Delta A'_{405}/\Delta t = 0.199$  ( $\Delta A_{405}/\text{min}$ )。

表 1 TSV-PA 蛋白酶活力测定  
Table 1 Enzyme activity of TSV-PA protein

<i>t/s</i>	15	30	45	60	75	90
$A_{405}$	0.056 $\pm$ 0.001	0.104 $\pm$ 0.002	0.149 $\pm$ 0.001	0.185 $\pm$ 0.001	0.212 $\pm$ 0.003	0.229 $\pm$ 0.002
$A'_{405}$	0.051 $\pm$ 0.001	0.101 $\pm$ 0.001	0.149 $\pm$ 0.002	0.189 $\pm$ 0.002	0.224 $\pm$ 0.003	0.247 $\pm$ 0.002

从上述结果看出, 在不同表达系统表达的 TSV-PA, 两者的蛋白浓度相差约 10 倍, 测得的酶活力相近, 说明杆状病毒表达系统表达的 TSV-PA 蛋白构象更接近天然状态, 更具活性。同时由于大肠杆菌表达的 TSV-PA 蛋白还要经过变性、复性处理才具有活性。而且大肠杆菌表达的 TSV-PA 蛋白没有糖基化, 这些对其活性可能也有一定的影响。

### 3 讨论

TSV-PA 蛋白是我国首先从竹叶青蛇毒中分离得到的具独特作用的激活纤溶酶原的蛇毒蛋白酶, 对于开发具有自主知识产权的治疗心脑血管疾病的药物有重要意义。天然的 TSV-PA 蛋白稀少, 用基因工程的方法可以大量得到此蛋白。我们发现在大肠杆菌和昆虫表达系统中, 不采用融合表达技术得到的 TSV-PA, 检测不到活性。其原因是第一个甲硫氨酸影响了活性中心的形成, 导致 TSV-PA 蛋白失活。融合表达的 TSV-PA 蛋白在大肠杆菌和杆状病毒表达系统中表达产物的分子量有明显不同, 估计是由于昆虫细胞对 TSV-PA 蛋白进行了糖基化加工。但由于蛇毒蛋白对人体有异源免疫原性, 昆虫系统至今尚未被批准作为生产药物的系统, 目前我们的研究仅限于实验室阶段。Park 等<sup>[9]</sup> 在 1998 年底也发表了从蝮蛇中克隆得到类似的蛇毒纤溶酶原激活剂 Haly-PA 的研究报道, 和本实验室研究结果相似。总的来说, 杆状病毒表达系统对于表达需要

修饰和加工的蛋白质具有优势, 在昆虫细胞中表达的外源蛋白接近天然状态, 具有较高的活性, 并消除了原核表达系统中蛋白质大量表达呈包涵体时纯化遇到的复性问题, 此外, 一些在原核表达系统中不易表达的真核基因, 也有望在杆状病毒表达系统中得到表达。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Markland F S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, 1998, **36**(12): 1749 ~ 1800
- [2] Zhang Y, Wisner A, Xiong Y and Bon C. A novel plasminogen activator from snake venom. *J Biol Chem*, 1995, **270**(17): 10246 ~ 10255
- [3] Zhang Y, Wisner A, Maroun R C, Choumet V, Xiong Y and Bon C. *Trimeresurus stejnegeri* snake venom plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1997, **272**(33): 20531 ~ 20537
- [4] Lijnen H R and Collen D. Strategies for the improvement of thrombolytic agents. *Thromb. Haemostasis*. 1991, **66**(1): 88 ~ 110
- [5] Audennaert A M, Knockaert I, Collen D and Declercq P J. Conversion of plasminogen activator inhibitor-1 from inhibitor to substrate by point mutations in the reactive-site loop. *J Biol Chem*, 1994, **269**(30): 19559 ~ 19564
- [6] Manchanda N, Schwartz B S. Interaction of single-chain urokinase and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem*, 1995, **270**(34): 20032 ~ 20035
- [7] Summers M D, Smith C E. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*, Texas: Texas Agriculture Experiment Station and Texas A&M University College Station, 1987
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [9] Park D, Kim H, Chung K, Kim D-S and Yun Y. Expression and characterization of a novel plasminogen activator from *agkistrodon halys* venom. *Toxicon*, 1998, **36**(12): 1807 ~ 1819

## Expression of a Snake Venom Plasminogen Activator TSV-PA in Insect Cells

CAO Yu YU Gu-Song YANG Sheng-Li GONG Yi\*

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

**Abstract** A snake venom gene TSV-PA was inserted into the donor plasmids pFastBachTa and expressed in Tn-5B1-4 cells. SDS-PAGE analysis revealed that the molecular weight of expressed product of TSV-PA were 33kD. It was also proved by Western blot. The result of enzyme activity showed that TSV-PA protein expressed in insect cells had a higher activity.

**Key words** snake venom, plasminogen activator, TSV-PA, baculovirus expression system

Received: March 12, 2001

This work was supported by Grant from National High Technology R&D Project of China (102-08-03-04) and Great Project in Chinese Academy of Sciences (KY951-A1-301-02001).

\* Corresponding author. Tel: 86-21-64700892-371; Fax: 86-21-64700244; E-mail: yigong@srb.ac.cn