

重组双功能水蛭素的发酵、纯化和鉴定

莫 炜 张艳玲 王龙生 杨新英 宋后燕*

(复旦大学教育部分子医学重点实验室,上海 200032)

摘 要 构建了重组双功能水蛭素(Recombinant-RGD-Hirudin、r-RGD-Hirudin)cDNA 的表达质粒 RGD-Hirudin-pPIC9K,转化入毕赤酵母中,经筛选得到高表达的阳性克隆。种子菌经过 3d 发酵培养,其培养液上清经超滤浓缩、凝胶过滤层析和离子交换层析后,得到纯度大于 97%、比活性为 12000 ATU/mg 的 r-RGD-Hirudin,回收率大于 60%,发酵产率为 1 g/L。纯化后的 r-RGD-Hirudin 经过还原 SDS-PAGE、抗凝血酶活力分析、抗血小板聚集分析、质谱分析及等电聚焦分析等方法鉴定,证明该表达产物为水蛭素的衍生物,具有抗凝血酶和抗血小板聚集双重功能。

关键词 重组双功能水蛭素(r-RGD-Hirudin),高效表达,发酵,纯化,鉴定

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0126-04

天然水蛭素是凝血酶的特异性抑制剂^[1,2],从医用水蛭的唾液腺中提取而得。它是一条含 65 或 66 个氨基酸残基的无糖基化单链多肽,分子量约 7 kD,其 N 端为活性区,含 3 对二硫键,对其空间构象起稳定作用;C 端含有较多的酸性氨基酸,能与凝血酶碱性部位特异性结合,从而进一步增强其抗凝作用。水蛭素对凝血酶有很高的亲和力^[3],与凝血酶形成摩尔比为 1:1 的非共价结合的可逆复合物,使凝血酶失去裂解纤维蛋白原的能力,抑制纤维蛋白的凝固;同时它也能阻断凝血酶催化的止血反应及凝血酶诱导的血小板反应。所以低浓度的水蛭素即可有效地抑制血液凝固。基于水蛭素的这些特点与生物学活性,用它作为防治血栓的药物有诸多优点:1. 专一性强,特异性直接抑制凝血酶活性,不良反应少而轻;2. 分子量小,几乎没有抗原性;3. 几乎没有毒性。

由于从医用水蛭中提取天然水蛭素产量低、价格昂贵、工艺复杂,本室用基因工程的方法成功地在大肠杆菌及哺乳动物细胞中表达了重组水蛭素,但表达效率较低。非常规酵母表达系统如毕赤酵母(*Pichia pastoris*)近年来被广泛采用,具有分泌型高效表达、使产物分离纯化简便等优点^[2]。我们在保留水蛭素原有生物学作用的基础上,将 Arg-Gly-Asp(RGD)编码顺序融合在水蛭素 cDNA 的合理部位^[4,5]。构建了含 RGD 编码顺序的双功能水蛭素 cDNA 克隆 RGD-Hirudin-pPIC9K,表达质粒转化毕赤酵母后,筛选获得高表达工程菌株(另文发表)。发酵罐大量培养工程菌,经甲醇诱导后,从培养液上清纯化重组双功能水蛭素,并证明这是一种水蛭素的衍生物,兼有抗凝血酶和抗血小板聚集的双重功能^[6]。本文报道重组双功能水蛭素的分离纯化和鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要设备、化学试剂和实验动物

1.1.1 5L BioFlo 3000 发酵罐为 NBS 公司产品;FPLC 系统为 Waters prep 4000;层析柱:Sephadex-G50(Pharmacia)凝胶过滤柱(7.5 cm×100 cm),Q-Sepharose-F.F.(Pharmacia)离子交换柱(2.6 cm×15 cm);多能双通道血小板聚集仪为上海斯隆机电设备有限公司产品;等电聚焦电泳仪为 Bio-Rad 公司产品。

1.1.2 试剂:凝血酶购自中国药品-生物制品检定所;其它试剂为进口或国产分析纯。

1.1.3 实验动物 SD 大鼠,雄性,250±20g。

1.2 菌种和培养基

1.2.1 菌种:RGD-Hirudin-pPIC9K/GS115 由本室构建。

1.2.2 摇瓶种子培养基:BMGY(1% Yeast extract,2% Peptone,100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0),1.34% YNB,(4×10⁻⁵)% biotin,1% Glycerol)。

1.2.3 发酵基础培养基(低盐发酵培养基):H₃PO₄(85% stock)13 ml/L, CaSO₄·2H₂O 0.93 g/L, K₂SO₄ 18.2g/L, MgSO₄ 7.27 g/L, KOH 10.6 g/L, Sodium citrate·2H₂O 1.47 g/L, Glycerol 4%(W/V),PTM₁(2ml/L 终浓度,高压灭菌后加入)。

1.2.4 微量元素(PTM₁):CuSO₄·5H₂O 6 g/L, MnSO₄·H₂O₂ g/L, H₃BO₄ 0.2 g/L, ZnCl₂ 20 g/L, KI 0.8 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.2 g/L, CoCl₂ 0.5 g/L, FeSO₄·7H₂O 65 g/L, H₂SO₄ 5 ml/L, CaSO₄·2H₂O 0.5 g/L, biotin 0.2g/L(0.22 μm 滤膜过滤除菌)。

1.2.5 发酵补料:甲醇补料:PTM₁(2 ml/L 终浓度)加入 100% 甲醇中;甘油补料:PTM₁(2 ml/L 终浓度)加入 50% 甘

油溶液中。

1.3 方法

1.3.1 接种 从 -70°C 深低温冰箱中取出种子菌, 室温下解冻, 划 YPD 平板, 30°C 温箱培养 2~3 d。从平板上挑取单菌落, 接种于 5 mL BMGY 培养液中, 30°C 培养过夜, 此为一级种子液。再将一级种子液加入 200 mL BMGY 培养液中, 30°C 培养 10 h 左右, 直至 OD_{600} 为 6, 此为二级种子液。

1.3.2 发酵 在 5 L 全自动发酵罐内加入 4 L 发酵基础培养基, 于 0.06 MPa 下灭菌 20min, 冷却到 30°C , 加入 PTM_1 8 mL, 用氨水调节 pH 为 5。接入 200 mL 二级种子液进行发酵, 控制溶氧为 35%, 搅拌速度为 500~700 r/min, 搅拌速度由溶氧控制, 温度为 30°C 。每隔 2 个小时测定 OD_{600} , 当基础培养基中的甘油耗尽后, 适当加入甘油补料, 直至 OD_{600} 为 150 为止。然后开始加入甲醇补料诱导, 从 1 mL(L·h) 逐渐升高至 10 mL(L·h), 以后一直维持此速度。每隔 2 个小时测定 OD_{600} 和发酵液上清的抗凝血酶活性。诱导 40h 后, 下罐。

1.3.3 超滤浓缩和凝胶过滤 4000 r/min × 20min 离心收集酵母培养液上清, 以截留分子量为 1000 D 的超滤膜超滤、浓缩至 300 mL, Sephadex-G50 除盐, 收集有抗凝血酶活力的组分。

1.3.4 离子交换层析 用 50 mmol/L PB (pH 7.4) 平衡 Q-Sepharose-F.F. 柱, 凝胶过滤后收集的抗凝血酶活力部分以 20 mL/min 的速率将其吸附到 Q-Sepharose-F.F. 柱上, 用 0~1 mol/L NaCl (50 mmol/L PB pH 7.4) 线性梯度洗脱, 收集有抗凝血酶活力部分, 分装, 冷冻干燥 $4\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.5 抗凝血酶活力分析 参照 Markwardt^[1] 的方法进行, 取人血浆 200 μL , 在缺少或存在不同量的 RGD-hirudin 的情况下用凝血酶滴定血浆, 由凝血酶的消耗量换算得到 RGD-hirudin 的单位数。一个凝血酶单位相当于一个抗凝血酶单位 (Anti-Thrombin Units ATU)。

1.3.6 抗血小板聚集作用分析 取 SD 大鼠, 戊巴比妥钠 (40mg/kg) 腹腔麻醉, 腹主动脉取血, 枸橼酸钠 (110mmol/L) 1:9 抗凝, 分离富血小板血浆 (PRP), 并用贫血小板血浆 (PPP) 稀释, 血小板计数为 $4 \times 10^5/\mu\text{L}$ 。分别加入 RGD-hirudin 和野生型 hirudin (0.0005、0.001、0.002、0.004、0.006、0.008 mg/mL 终浓度), 37°C 孵育 5min, 20 $\mu\text{mol/L}$ (终浓度) 二磷酸腺苷 (ADP) 诱导血小板聚集, 比浊法测定其聚集率。

1.3.7 SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%, 加样 20 μL , 电泳条件为稳压 120V, 考马斯亮蓝染色。

1.3.8 等电聚焦电泳 RGD-Hirudin 浓度为 1 mg/mL, 加样 20 μL , 电泳条件为稳压 80V × 15min, 稳流 8mA × 15min, 稳压 500V × 60min, 考马斯亮蓝染色。

1.3.9 质谱分析 由上海市计量研究所测定。

2 实验结果

2.1 发酵

诱导前, 酵母菌一般需要增殖 24 h。加入甲醇诱导后, 培养液上清中目的蛋白的表达和抗凝血酶活性的变化情况, 酵母菌密度的变化如图 1、2 所示 (Fig. 1、2)。

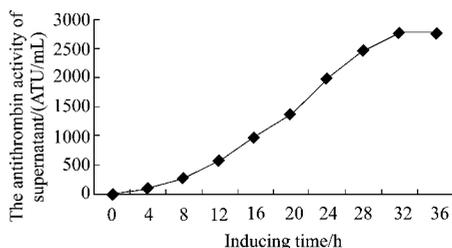


图 1 甲醇诱导后 RGD-Hirudin 的表达 (以培养液上清中, 单位体积抗凝血酶活性变化表示)

Fig. 1 The production of RGD-hirudin after inducement

经过 32h 甲醇诱导, 培养液上清中, 单位体积抗凝血酶活性可达 25000 ATU/mL, 随着时间延长, 抗凝活性增长缓慢或停滞。

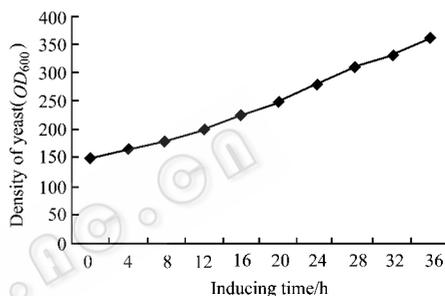


图 2 甲醇诱导后 酵母菌密度变化趋势

Fig. 2 The increase of yeast after inducement

我们采用高密度发酵, 甲醇诱导前, 酵母菌密度 OD_{600} 为 150, 经过 36h 诱导, OD_{600} 可达 350 左右。

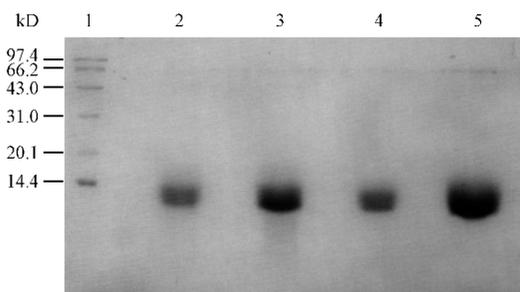


图 3 RGD-Hirudin 的表达和纯化

Fig. 3 SDS-PAGE of Expression and purification of RGD-Hirudin

1: marker; 2: supernatant after fermentation; 3: after ultrafiltration; 4: after gel filtration chromatography; 5: after ion exchange chromatography

2.2 RGD-hirudin 的纯化

收集培养液, 离心 (4000 r/min × 20min) 分离上清, 用截留分子量为 1000 D 的超滤膜超滤, 回收率达 85% 以上, 然后用凝胶过滤除去大分子杂蛋白和盐, 再经过阴离子交换层析, 浓缩, 得到最后的产品, 用 Lowry 法测定蛋白质含量, 血浆凝固法测定抗凝血酶活性, 计算比活性为 12 000 ATU/mg。

一次发酵可以得到 4 g 纯的 RGD-hirudin, 总的回收率为 60%。

控制甲醇终浓度为 1%^[7],诱导时间控制在 48h 以内。开始诱导时,甲醇浓度不宜太高,一般在 6h 内逐步加大甲醇的浓度,并最后达到所需的终浓度。最初 4~6h 里,蛋白表达启动,培养液上清抗凝血酶活性没有太大的变化。6h 后,随着甲醇速率的加快并最后达到恒定,目的蛋白表达量也随之增加,表现在抗凝血酶活性大大提高。32~36h 后停止诱导,从图 2 可以看到诱导相当长的时间后,菌体密度已经很高,不发酵酵母菌的继续生长,反而会产生大量的死菌,菌体破裂,菌体蛋白释放出来,一方面增加了杂蛋白,给纯化带来困难,另一方面杂蛋白中的蛋白酶容易降解目的产物。

在纯化过程中,尝试了多种方法。目的产物存在于培养液上清中,而且 RGD-hirudin 分子量较小,因此将培养液上清浓缩是纯化过程中最为关键的一步。我们采用超滤浓缩的方法,可以去除小分子的色素,再经过凝胶过滤和阴离子交换,最终产品的纯度达到 97% 以上。纯化路线简单、有效,而且可以线性放大,用于产业化。如用截留分子量为 30~40 kD 的超滤膜超滤,收集滤出液,再经第二步超滤(上述方法),则还能去除大分子杂质,纯化的效果更好。

SDS-PAGE 显示, RGD-Hirudin 的分子量为 14 kD,通过 LC/MS 测定,分子量约 7 kD, RGD-Hirudin 纯品以二聚体的形式存在^[8]。通过制备 RGD-hirudin 的蛋白质晶体,行 X 射线晶体衍射分析,可以确定聚合的部位和聚合的方式。

经 ADP 激活的血小板膜糖蛋白 II b/III a (GP II b/III a) 发生变构,而位于纤维蛋白原上的 RGD 序列可识别 GP II b/III a,两者的结合引起血小板聚集,导致血栓形成,所以阻断该环节是防治血栓形成的新途径。研究表明含 RGD 序列的多肽可竞争结合血小板膜膜 GP II b/III a,从而抑制纤维蛋白原与之结合,达到抑制血小板聚集的目的^[4,10,11]。因此,我们研制的水蛭素衍生物从理论上讲既具有抗凝血酶的作用,又有阻断血小板集聚的作用。通过血小板聚集试验,证明了

RGD-hirudin 能够抑制 ADP 诱导的血小板聚集。凝血酶也可诱导血小板聚集,但其激活血小板机制与 ADP 不同,wt-Hirudin 和 RGD-Hirudin 都是凝血酶抑制剂,它们都能抑制凝血酶诱导的血小板聚集,而 wt-Hirudin 对于 ADP 诱导的血小板聚集没有任何抑制作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Markwardt F, Sturzebecker J, Griessbach U. Hirudin as an inhibitor of thrombin. *Method in Enzymology*, 1970, **19**: 924-932
- [2] Liu K (刘峰), Huo KK (霍克克), Li YY (李育阳). Expression system of nonconventional yeasts for genetic engineering. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 1996, **12**(1): 1-5
- [3] Modi NB, Baughman SA, PaaschBD, Celniker A, Smith SY. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of TP-9201, a GPIIb/IIIa antagonist, in rats and dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, **25**: 888-897
- [4] Chang JY. The functional domain of hirudin, a thrombin-specific inhibitor. *FEBS Lett*, 1983, **164**: 307-313
- [5] Smith JW, Tachias K, Madison EL. Protein loop grafting to construct a variant of tissue-type plasminogen activator that binds platelet integrin α IIbB3. *J Bio Chem*, 1995, **270**: 30486-30490
- [6] M Verstraete. Modulating platelet function with selective thrombin inhibitors. *Haemostasis*, 1996, **26**(4): 70-77
- [7] Rosenfeld SA, Nadeau D, Tirado J. Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 1996, **9**(4): 476-482
- [8] Han YM (韩玉珉), Shen TJ (申同健). The molecular biology of hirudin. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学和生物物理进展), 1991, **18**(2): 88-90
- [9] Cregg JM. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biol Technology*, 1993, **11**: 905-910
- [10] Modi NB, Baughman SA, PaaschBD, Celniker A, Smith SY. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of TP-9201, a GPIIb/IIIa antagonist, in rats and dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, **25**: 888-897
- [11] Luo CZ (罗春贞), Gu YL (顾银良), Song HY (宋后燕). Molecular cloning of hirudin derivative and expression in *E. Coli*. *ACTA Academiae Medicinae Shanghai* (上海医科大学学报), 1996, **23**: 181-184

Fermentation, Purification and Identification of Recombinant RGD-Hirudin

MO Wei ZHANG Yan-Ling WANG Long-Sheng YANG Xin-Ying SONG Hou-Yan*

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan university, Shanghai 200032, China)

Abstract Recombinant RGD-Hirudin (r-RGD-Hirudin) has double functions: anti-thrombin activity and anti-platelet aggregation activity. To identify these functions, the expression plasmid, RGD-Hirudin-pPIC9K, was constructed by inserting cDNA of RGD-hirudin in yeast expression vector pPIC9K. The high expression clone was gained after screening. This clone was fermented for 3 days. The r-RGD-hirudin was secreted into the culture. It was ultra-filtrated from culture supernatant, then after gel filtration chromatography and anion exchange chromatography, the purified r-RGD-hirudin was gained. Its purity was larger than 97% and its specific activity was 12 000 ATU/mg. The yield per liter culture of purified r-RGD-hirudin was 1 g and overall recovery yield was more than 75%. The purified r-RGD-hirudin was identified by reductive SDS-PAGE, anti-thrombin activity assay, anti-platelet aggregation assay, LC/MS and isoelectrofocusing assay. It is proved that r-RGD-Hirudin is ramification of wt-Hirudin and it has anti-thrombin activity and anti-platelet aggregation activity.

Key words r-RGD-hirudin, high expression, fermentation, purification, identification

Received: 07-17-2003

This work was supported by Shanghai Modern Biotechnology and R&D of Novel Medicine Fund (No.20014319202).

* Corresponding author. Tel: 86-21-54237092; Fax: 86-21-64033738; E-mail: hysong@shmu.edu.cn

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