

RGD-葡激酶突变体(K130T, K135R)的制备与活性分析 Preparation and Activity Analysis of RGD-mSAK (K130T, K135R)

宁保安^{1,2}, 马茹¹, 郑玉玲¹, 高志贤², 申博¹, 姜永强^{1*}

NING Bao-An^{1,2}, MA Ru¹, ZHENG Yu-Ling¹, GAO Zhi-Xian², SHEN Bo¹ and JIANG Yong-Qiang^{1*}

1. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071

2. 军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050

1. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China

2. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Science, Tianjin 300050, China

摘要 以葡激酶突变体质粒 mSAK(K130T, K135R)-pBV220 为模板, PCR 重叠引物延伸法引入突变位点, 并将该片段克隆至载体 pBV220, 构建了 RGD-mSAK-pBV220 质粒, 转化大肠杆菌后热激诱导获得了高效表达, 表达产物占菌体总蛋白的 50% 以上, 且主要以可溶性形式存在, 所获蛋白依次用 Q-Sepharose HP 柱、Sephacryl S-200 HR 柱和 SP 柱进行纯化, 纯化的蛋白的纯度可达 98% 以上, 纤维蛋白溶酶体法体外溶栓活性测定结果表明, 所获 RGD-mSAK 蛋白溶栓活性与野生型葡激酶相当, 豚鼠体内免疫试验证明突变体的免疫原性也有所降低, 血小板聚集试验分析突变体蛋白的抗血小板聚集能力, RGD-葡激酶突变体具有一定的抗血小板聚集能力。

关键词 葡激酶, RGD, 免疫原性

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0456-05

Abstract In order to construct RGD-mSAK mutant with reduced immunogenicity, and identify its biological activity after purification, mSAK gene fragment was amplified by over-lapping extension PCR. Then the gene was inserted into the prokaryotic expression vector pBV220 with P_RP_L promoters after confirmed by DNA sequencing; the expression plasmid pBV220-RGD-mSAK was constructed, and then was transformed into *E. coli*. DH5 α . After temperature induction, the mutant Staphylokinase was over-expressed and much of protein was in the supernate of lysate, which is over 50% of total protein in the host. The protein was isolated and purified in Q-Sepharose FF, Sephacryl S-200 and SP, high purity protein was obtained and its purity was over 98%. The thrombolysis activity of the RGD-mSAK protein is 1.68×10^5 u/mg by fibrin plate assay, which is slightly higher than that of the wild-type, and antiserum titers raised against this protein in guinea pigs were much lower than those of wild-type SAK, determined by ELISA. In anti-platelets aggregation assay *in vitro*, the RGD-mSAK protein has obvious inhibition activity of platelet aggregation in low concentration comparing to the control group and wild-type SAK group. So the RGD-mSAK protein is a low immunogenicity, bi-function molecular with both thrombolysis activity and anti-embolism activity. It provided the basis for further research of RGD-SAK.

Key words staphylokinase, immunogenicity, RGD

Received: November 4, 2004; Accepted: December 15, 2004.

This work was supported by grants from Natural Science Foundation of Beijing (No. 7992030) and New Drug Development Foundation of Academy of Military Medical Science (No. 200108041).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948487; E-mail: jiangyq@nic.bmi.ac.cn

北京市自然科学基金(No. 7992030)与军事医学科学院新药开发基金(No. 200108041)资助项目。

葡激酶(Staphylokinase, SAK)是由某些金黄色葡萄球菌产生的一种纤溶酶原激活剂,具有用量低、对凝血系统干扰小、凝前效应低等优点,因而迅速成为新一代溶栓候选药物之一,但是,临床试验表明,与前两代溶栓药物相类似,使用重组葡激酶后仍有一定的再梗塞率,国外的两项临床试验报道再梗塞率分别为 13.8%^[1]和 12%^[2];另一方面,血小板介导的动脉血栓的形成是导致梗塞和成功溶栓后再梗塞的主要原因,而活化后血小板聚集反应是动脉血栓形成的前提,因此,在溶栓的同时进行抗凝、抗血小板聚集治疗是一种积极的防再梗塞治疗策略。RGD(Arg-Gla-Asp)肽序是血小板膜糖蛋白 GP II b/III a 结合基序^[3],存在于纤维蛋白原(Fgn)、纤维粘连蛋白等分子中,Fgn 与活化血小板的 GP II b/III a 结合是血小板聚集的前提,因此外源 RGD 肽序通过与 Fgn 竞争结合活化血小板表面的 GP II b/III a,可以抑制活化血小板聚集,从而抑制血栓的形成^[4]。Wald 等^[5]将 RGD 序列融合在 SAK 的 C 末端,但溶栓活性降低了,宋钢等^[6]在重组葡激酶的基础上定点突变(K109R, F111D),引进 RGD 序列,但是在大肠杆菌中为包涵体表达,产物复性困难,较难获得活性蛋白,增加了进一步应用的难度。我们在构建的低免疫原性葡激酶突变体 mSAK(K130T, K135R)的基础上,通过位点特异突变,将葡激酶的 35、36、37 位氨基酸分别替换为 R、G、D,即在分子内引入了 RGD 序列,突变体在大肠杆菌中获得了高效表达和纯化。活性分析结果表明,RGD-mSAK 蛋白的溶栓活性不低于野生型葡激酶,同时具有抗血小板聚集效应,是低免疫原性的双功能分子。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌 DH5 α 、pBV220、突变体葡激酶 mSAK(K130T, K135R)-pBV220 质粒由本室构建并保存,抗 SAK 多克隆抗体均由本室制备并保存,葡激酶标准品购自中国生物制品检定所, Taq DNA 聚合酶购自大连宝生物公司, T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒、限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam* H I 均购自 Promega 公司, DNA 纯化试剂盒购自鼎国生物技术公司, Gradifrac FPLC 蛋白纯化系统系 Pharmacia 公司产品, 血小板聚集及血凝测试仪为北京世帝科学仪器公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 PCR: 根据已知的葡激酶 DNA 序列, 设计

下列引物:

P1: 5'-CAC GAA TTC ATG TCA AGT TCA TTC GAC AAA-3', 含引入的酶切位点 *EcoR* I

PRGDUP: 5'-GAT GGT CGT GGA GAT GAA TTG CTA TCC CC-3'

PRGDDOWN: 5'-CAA TTC ATC TCC ACG ACC ATC AAC TCC AGT-3'

P101: 5'-GGC GGA TCC TTA TTT CCT TTC TAT AAC AAC-3', 含引入的酶切位点 *Bam* H I

其中 P1 与 PRGDDOWN, PRGDUP 与 P101 配对使用, PRGDDOWN, PRGDUP 重叠互补, 下划线部分为欲突变的位点, 用重叠引物延伸 PCR 法引入突变位点, 反应模板为本课题组构建的 mSAK(K130T, K135A)-pBV220 质粒, 反应条件为: 96 $^{\circ}$ C 5min 预变性, 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 60s, 50 $^{\circ}$ C 60s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.2.2 载体的构建与筛选: DNA 片段的回收、质粒的提取与纯化、均按分子克隆实验指南^[7]及相应试剂盒操作手册进行; RGD-mSAK DNA 片段经 *EcoR* I、*Bam* H I 酶切回收后与相同酶切回收的 pBV220 载体连接, 构建重组表达质粒 pBV220-RGD-mSAK, 然后转化 DH5 α , PCR 筛选阳性克隆, 同时培养后提取质粒, 酶切鉴定是否含有 RGD-mSAK 基因序列, 阳性克隆送上海博亚公司测序。

1.2.3 RGD-mSAK 蛋白的诱导表达与鉴定: 挑取单菌落, 在 5mL LB 培养基(含 100mg/L 氨苄青霉素)中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 按 1% 比例接种到 200mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.8 时, 升温至 42 $^{\circ}$ C 诱导培养 4h; 完毕后离心收集菌体并超声破碎, 离心分别收集上清和沉淀进行蛋白 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 表达产物的纯化: 采用阴离子交换层析、凝胶过滤与阳离子交换层析三步纯化。

Q-Sepharose HP 离子交换层析: 5mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 平衡后, 将超声破碎收集的上清, 用同一缓冲液稀释至 1~2mg/mL 蛋白上样, 结束后用 3 倍柱床体积的上述缓冲液洗脱未结合蛋白, 洗脱峰恢复至基线后, 用 0~0.5mol/L NaCl 5mmol/L Tris-HCl 线性梯度洗脱, 收集洗脱峰各组分并测定各组分 RGD-mSAK 活性, SDS-PAGE 分析各组分中蛋白分布。

Sephacryl S-200 凝胶过滤: 分子筛凝胶柱 Sephacryl-s-200 用 40mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 平衡备用。将 Q-Sepharose HP 收集的活性组分合

并, PEG20000 浓缩后上样, 40mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2), 0~0.5mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集蛋白峰, 用 SDS-PAGE 分析测定 RGD-mSAK 在各峰中的分布。

SP 阳离子交换柱: 5mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH5.0) 平衡后, 将凝胶过滤的活性峰用同一缓冲液透析过夜后上样, 用含 0~0.5mol/L NaCl 的平衡缓冲液线性梯度洗脱, 收集蛋白峰, 用纤维蛋白溶解法测定各组分中 RGD-mSAK 活性, 收集活性峰, SDS-PAGE 分析 RGD-mSAK 蛋白纯度, BCA 法测定蛋白含量。

1.2.5 表达产物的溶栓活性测定: 采用纤维蛋白溶圈法, 即在含有纤维蛋白原、人纤溶酶和凝血酶的凝胶板上打孔, 将 mSAK 蛋白稀释后加入各孔, 每孔加样 10μL, 置于潮湿平皿中 37℃ 孵箱中过夜, 测量溶圈直径, 同时采用系列稀释的葡激酶标准品做一标准曲线, 计算回归方程从而推算 mSAK 的溶栓活性。

1.2.6 血小板聚集抑制试验: 取 20mL 用柠檬酸钠处理的新鲜健康人血液 1000r/min 离心 10min, 取上清为富血小板血浆 (PRP)。取 300μL 加 20μL 待测样品于 37℃ 温育 5min, 加入致聚剂 ADP 至终浓度为 10μmol/L, 用血小板聚集仪于 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。

1.2.7 豚鼠免疫原性检测: 选用健康雄性豚鼠, 体重 (280 ± 20)g, 购自本院动物中心, 每只豚鼠腹腔注射相应抗原 0.5mL, 每周 1 次, 第一次 125μg/只, 第二次与第三次各 250μg/只, 每次注射后一周耳静脉取血, ELISA 检测血清中抗体水平。

2 结果

2.1 目的片段的获取

以本室构建 mSAK-pBV220 为模板进行两次 PCR 扩增, 分别扩增出约 100bp 和 300bp 的片段, 凝胶回收后以这两个片段为模板进行重叠引物延伸 PCR, 电泳结果显示, 在约 400bp 左右出现单一特异性条带, 如图 1 所示。

2.2 表达质粒的构建与序列确定

转化大肠杆菌 DH5α 后 PCR 筛选阳性转化子, 提取重组质粒, 用 EcoR I、BamH I 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳, 可见载体片段与约 400bp 的插入片段, 它与 DNA marker 相应片段的大小基本一致 (结果未显示)。测序结果表明: 相应位点改变, 无其他非特异突变 (图 2)。

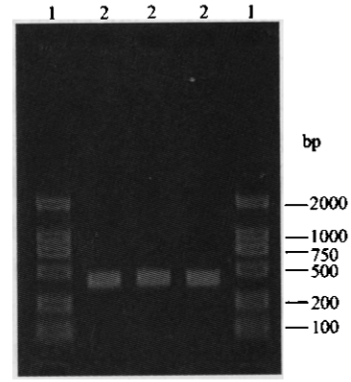


图 1 PCR 产物的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR products

1: DNA marker; 2: products of over-lapping extension PCR.

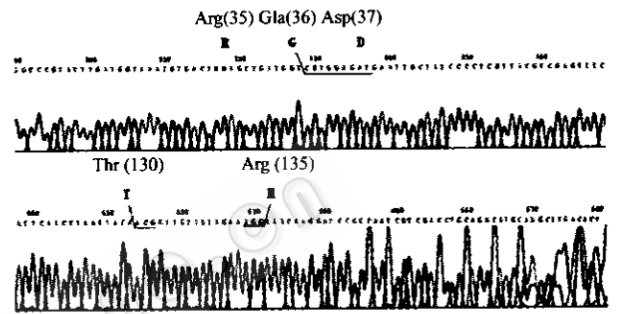


图 2 突变位点上下游部分测序图谱

Fig. 2 Partial sequencing results of mutant sites

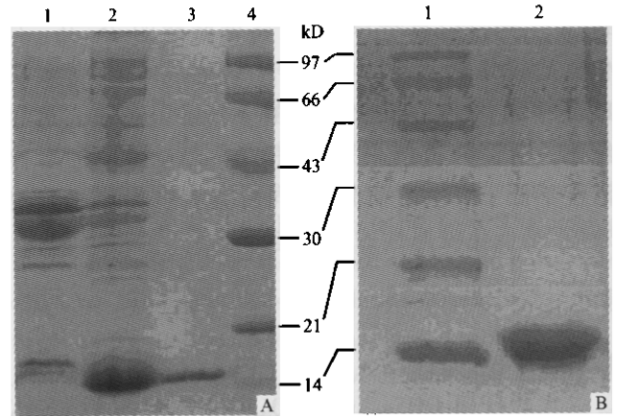


图 3 RGD-mSAK (K130T, K135R) 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of RGD-mSAK (K130T, K135R)

A: SDS-PAGE analysis of RGD-mSAK (K130T, K135R) expressed in *E. coli* DH5α. 1: precipitate of lysates; 2: supernatant of lysates; 3: recombinant wild-type SAK after purification; 4: protein marker. B: SDS-PAGE analysis after purified by SP. 1: protein marker; 2: RGD-mSAK.

2.3 RGD-mSAK 工程菌的诱导表达和表达产物存在形态的鉴定

热激诱导含有重组质粒的大肠杆菌 DH5α, 重组蛋白获得高效表达, 与纯化后的野生型葡激酶相比, 位置相当, 其分子量约为 15kD; 色谱扫描仪检测

显示,重组蛋白占菌体总蛋白的 40% ~ 50%, 离心收集菌体, PBS 洗涤, 超声处理后进行 SDS-PAGE 分析, 表达蛋白主要以可溶性产物为主(图 3A)。

2.4 RGD-mSAK 蛋白的纯化

Q-Sepharose HP 离子交换层析柱, 线性梯度洗脱, SDS-PAGE 分析显示, 离子交换层析可以去除较多杂蛋白(结果未显示); 收集样品峰进一步浓缩透析后上凝胶柱 Sephacryl-s-200 洗脱, SDS-PAGE 分析结果 RGD-mSAK 后有一条杂带, 将凝胶纯化后的样品透析过夜后过 SP 柱, 蛋白电泳分析显示, 样品呈单一条带(图 3B), 色谱扫描显示, 该蛋白带占该泳道蛋白的 98% 以上; 以上试验表明, 经三步纯化组合, 可以对构建的葡激酶的突变体进行有效的纯化, 最终可获得纯度达 98% 以上的蛋白。

2.5 RGD-mSAK 体外溶栓活性测定

测量溶圈直径, 代入回归方程中计算各总溶栓活性, 用 BCA 试剂法测定蛋白含量, 用溶栓活性除以蛋白含量计算出样品中 RGD-mSAK 的比活性, 同时设野生型葡激酶(wt-SAK)作为参考, 结果所获突变体蛋白的活性比野生型葡激酶略有升高, 为 1.68×10^5 u/mg 蛋白。

2.6 血小板聚集抑制试验

检测时间为 10min, wt-SAK 在测定条件下几乎没有抑制血小板聚集的活性, 最终完全聚集; RGD-mSAK 组在 7min 时达最大聚集, 最终未达到完全聚集, 有明显的抑制活性(图 4)。

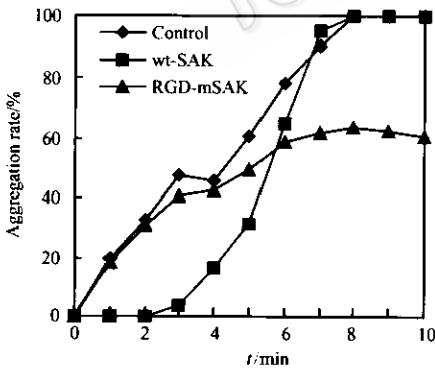


图 4 血小板聚集抑制试验
Fig. 4 Result of anti-platelets aggregation assay

2.7 豚鼠免疫原性检测

每次免疫后一周耳静脉取血, 以 wt-SAK、RGD-SAK 为抗原, ELISA 法检测血清中的抗体水平。前两次免疫二者的抗体滴度上升得不快, 相差也不明显; 第三次免疫后, wt-SAK 抗体滴度的常用对数迅速超过 4 而接近 5, 而 RGD-SAK 抗体滴度的常用对

数仅仅接近 3 左右(图 5), 免疫原性相差明显。

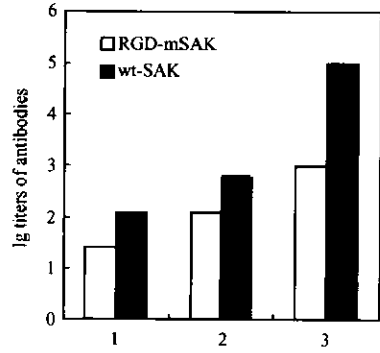


图 5 豚鼠免疫试验 ELISA 抗体滴度图

Fig. 5 Titres of antibodies raised against RGD-mSAK or wt-SAK in immunized guinea pigs

1: one week after 1st immunization; 2: one week after 2nd immunization; 3: one week after 3rd immunization. All data are mean values of every group (n = 6).

3 讨论

血小板的聚集性升高是冠脉血栓成功溶栓后发生再次梗塞的重要原因, 而纤维蛋白原与 GP b/ a 的结合是形成血小板富集血栓的最终共同途径, 因此 GP IIb/ IIIa 拮抗剂作为血小板聚集抑制剂可广泛用于治疗各种心血管疾病^[8]。已经证明外源 RGD 肽序只能与血栓部位活化的血小板结合, 对循环血小板无影响^[9], RGD 肽序还具有特异性靶向作用^[10], 溶栓药物特异靶向性增加可以减少药物用量, 减弱出血倾向。因此, 如何适当应用 RGD 序列成为溶栓药物研究的热点, 在尿激酶^[11]、葡激酶^[5,6]上均有不同的研究者做出不同的尝试。

葡激酶基因可以从噬菌体 sakΦC、sak42D 或溶原性葡萄球菌菌株的基因组 sakSTAR 中克隆, 成熟的葡激酶为单链多肽, 含 136 个氨基酸。成熟的 SAKΦC、SAK42D 与 SAKSTAR 蛋白在第 34、36 与 43 位氨基酸有所不同, 第 36 位, SAKΦC 与 SAKSTAR 中为 Gly, 在 SAK42D 中为 Arg, 而它们的溶栓活性相差不大, 可以初步推断第 36 位氨基酸及其周围个别氨基酸的改变对葡激酶的结构和溶栓活性影响不大, 结合三维结构分析, 第 35-37 位氨基酸位于葡激酶分子表面(结果未显示), 突变成为 Arg-Gly-Asp (RGD) 后可以充分发挥 RGD 肽序的作用; 另一方面, mSAK(K130T, K135R) 是我们课题组构建的葡激酶突变体分子, 在溶栓活性、免疫原性和抗出血倾向等方面较野生型葡激酶均有不同程度的改进(文章另行发表), 在此工作的基础上, 我们利用定点突变

的方法,成功构建了 RGD-mSAK 高效表达菌株, RGD-mSAK 主要以可溶性形式表达,表达蛋白占菌体破碎上清的 50% 以上,经三步纯化后进行活性分析,该蛋白体外溶栓活性较野生型葡激酶稍高,在血小板聚集试验中,在较低的浓度下(0.6mg/mL, 试验前)就具有明显的抗血小板聚集效应,极有可能成为具有溶栓和抗栓效应的低免疫原性双功能分子。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Vanderschueren S, Barrios L, Kerdsinchai P *et al.* A randomized trial of recombinant staphylokinase versus alteplase for coronary artery patency in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995, **92** (10): 2044 - 2049
- [2] Vanderschueren S, Stockx L, Wilms G *et al.* Thrombolytic therapy of peripheral arterial occlusion with recombinant staphylokinase. *Circulation*. 1995, **92**(10): 2050 - 2057.
- [3] David R Phillips, Israel F Charo, Laurence A Fitzgerald *et al.* The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood*, 1988, **71** (4): 831 - 843
- [4] Plow EF, Marguerie G, Ginsberg M. fibrinogen receptors, and the peptide that inhibit the seinter action. *Biochem pharmacol*, 1987. **36**(23): 4035 - 4041
- [5] van Zyl WB, Pretorius GH, Hartmann M *et al.* Production of a recombinant antithrombotic and fibrinolytic protein, PLATSAK, in *Escherichia coli*. *Thromb Res*, 1997, **88**(5): 419 - 426
- [6] Song G(宋钢), Yu M(于敏), Mo W(莫炜) *et al.* Rational design, over expression and characterization of a novel Staphylokinase with lower tendency of polymerization. *Chinese Engineering Science*(中国工程科学), 2000, **2**(11): 68 - 72
- [7] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [8] Collier BS. Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Ann Rev Med*, 1992, **43**: 171 - 180
- [9] Huang TF, Sheu JR, Teng CM *et al.* Triflavin, an antiplatelet Arg-Gly-Asp-containing peptide, is a specific antagonist of platelet membrane glycoprotein IIb - IIIa complex. *J Biochem*(Tokyo), 1991, **109**(2): 328 - 334
- [10] Ling SC(凌世长), Tian Q(田青), Peng SQ(彭师奇). Study on targeting thrombolysis by drug carrying liposome modified with RGDs peptide. *Journal of Beijing Medical University*(北京医科大学学报), 1994, **26**(3): 174 - 177
- [11] Sun YQ(孙迎庆), Guo Y(郭雁), Li LY(李令媛) *et al.* Construction and expression of RGDs-prourokinase. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生化与分子生物学报), 1999, **15**(2): 189 - 193