

T7 启动子作用下人尿激酶原 cDNA 在大肠杆菌中的高效表达及分离纯化

彭贵洪 马 忠 薛宇鸣 陈于红 朱德煦*

(南京大学生物化学系南京大学医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

摘 要 化学合成的人尿激酶原 cDNA 克隆在表达质粒 pET-11d 中,在 T7 启动子的作用下,经 0.1mmol/L IPTG 诱导,在大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS 中获得表达。其表达量占菌体总蛋白的 15%,表达产物以无活性的包涵体形式存在。经体外变复性, Zn^{2+} 选择性沉淀,抗体亲和柱层析,及 Benzamidine 亲和吸附,所表达的人尿激酶原被纯化为单一条带,其比活约 110000IU/mg。

关键词 人尿激酶原,高效表达,变复性,分离纯化

人尿激酶原(pro-urokinase, pro-UK)由 411 个氨基酸残基组成,含有 24 个半胱氨酸,形成 12 对二硫键,构成三个结构域:表皮生长因子结构域,环柄状结构域,和丝氨酸蛋白酶活性结构域。

pro-UK 是双链尿激酶(UK)的前体,在纤溶酶的作用下,其 Lys158 - Ile159 肽键断裂,pro-UK 转化为具有高生物活性的 UK。由于 UK 对纤维蛋白完全没有选择性,大剂量静脉注射时会激活血循环中的纤溶酶原,导致系统性纤溶酶活,从而引起出血并发症,因此在临床上的应用受到限制。而 pro-UK 不同于一般的酶原,它具有一定程度的内在纤溶酶原激活活性,能在纤维蛋白表面选择性地激活纤溶酶原,但对血液中的纤溶酶原,纤维蛋白原等的影响较小,因而出血副作用也较小^[1],具有较好的临床应用价值。自 1985 年 Holmes 等人成功地克隆了人 pro-UK 的 cDNA 之后^[2],人 pro-UK 已在酵母^[3],哺乳动物细胞^[4]等表达体系中获得表达。由于大肠杆菌表达体系具有成本低,表达水平高,易于纯化等特点,且非糖基化的尿激酶原具有更高的纤溶活性^[5],因此,人 pro-UK 在大肠杆菌中的高效表达具有特殊的重要性。本文报道了人 pro-UK cDNA 在 T7 启动子作用下在大肠杆菌中的表达,变复性研究及分离纯化。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒与细菌菌种:人 pro-UK cDNA 由本室化学合成^[6]并克隆在 pUC9,含 T7 启动子的表达质粒 pET-11d 及其宿主菌 BL21(DE3)pLaysS 由本系徐贤秀教授提供。

国家“863”高技术研究发展计划资助项目。

* 通讯联系人。

本文于 1997 年 1 月 6 日收到。

1.1.2 酶及试剂盒: 各种限制酶及工具酶均为 New-Biolabs 或 Boehringer Mannheim 公司产品, DNA 测序 Kit 购自美国 U.S.B 公司, α -³²P-dATP 购自北京亚辉生物工程公司, 其它试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 体外重组: DNA 提取, 酶切, 重组及转化: 均参照文献[7]的方法进行。

1.2.2 重组 DNA 的序列测定: 参照 U.S.B Sequence Kit 操作手册进行。

1.2.3 人 pro-UK 的表达: 将过夜菌以 1% 接种于含氨苄青霉素(100 μ g/ml)的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 2h, 加 IPTG 至终浓度为 0.1mmol/L, 诱导表达 2h。

1.2.4 SDS-PAGE: 参照 Lammeli 方法^[8], 堆积胶浓度 4%, 分离胶浓度 10%。取 100 μ l 培养液离心收集菌体裂解液, 经还原性 SDS-PAGE 后用考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.5 表达产物的变复性: 参照文献[9], 并有所改进。取 100ml 表达菌离心, 菌体悬浮于 10ml 破菌溶液(0.05mol/L PBS, 0.3mol/L NaCl pH7.5)中, 冰上超声 2 \times 10min; 4 $^{\circ}$ C 5000r/min 离心 15min, 加 10ml 洗涤缓冲液(0.05mol/L PBS, 2% Triton X-100, pH7.5), 振荡悬浮, 加 10ml 铺垫缓冲液(50% glycerol, 0.05mol/L PBS), 于 4 $^{\circ}$ C 5000r/min 离心 15min, 沉淀悬于 2ml 变性溶液中(0.1mol/L PBS, 8mol/L urea, 50mmol/L β -ME), 4 $^{\circ}$ C 搅拌 12~18h, 10 000r/min 离心 10min, 除去不溶物, 上清对 1000ml 透析液(8mol/L urea, 0.1mol/L PBS, pH7.5)透析 2~3h, 离心取上清, 缓慢滴入剧烈搅拌条件下的 200ml 复性液(2mol/L urea, 50mmol/L Tris-HCl pH9.0, 5mmol/L EDTA 10mmol/L NaCl, 0.005% Tween-80, 0.25mmol/L GSSG, 2.5mmol/L GSH)中, 4 $^{\circ}$ C 搅拌 24~36h。

1.2.6 Zn²⁺ 选择性沉淀 pro-UK 粗品^[10]: 将复性液用稀 HCl 调 pH 至 4.5, 8000r/min 离心 10min, 取上清, 加 20ml 100mmol/L ZnCl₂(pH4.5), 缓慢搅拌, 再用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.5~8.0, 4 $^{\circ}$ C 放置 1h 后, 8000r/min 离心 20min, 弃上清, 沉淀用 20ml 0.5mmol/L EDTA 悬浮, 离心除去不溶物, 上清对平衡缓冲液(0.01mol/L PBS, 0.005% Tween-80 pH7.5)透析 6h。

1.2.7 pro-UK 的亲和层析^[11]: 将尿激酶单抗与溴化氰活化的 Sepharose 4B(Pharmacia)偶联, 制成 UK 亲和柱。将经 Zn²⁺ 选择性沉淀后的 pro-UK 粗品上柱, 用 5 倍体积的 0.01mol/L PBS 缓冲液(pH7.5, 内含 1mol/L NaCl)洗柱, 除去大部分杂蛋白后, 再用 3.5mol/L MgCl₂ 洗脱。收集洗脱峰, 透析去盐后, 用 Benzamidine-sepharose CL 4B 按 10ml 溶液加 1g 凝胶的比例, 吸附除去样品中的双链尿激酶。吸附后样品对 TNT 溶液(0.05mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L NaCl, 0.01% Tween-80 pH7.8)透析, 冷冻干燥并保存在 -20 $^{\circ}$ C。

1.2.8 蛋白质浓度测定: 参照 Bradford^[12] 方法, 用考马斯亮蓝 G250 作显色反应, 用 UV2200 紫外可见分光光度计(Shimaduzo, Japan)测定 OD₅₉₅。

1.2.9 纤维蛋白-琼脂糖平板法测定 UK 纤溶活性: 参照文献[13]方法进行。

2 结 果

2.1 表达载体 pET-11d/pro-UK 的构建

克隆在 pUC9 中的人工化学合成的 pro-UK 基因经 Hind III 酶解, Klenow 补平, Real

酶解后,得到完整的人 pro-UK 基因。利用 RcaI 和 NcoI 互为同尾酶的关系,将上述人 pro-UK cDNA 基因与经 BamHI 酶解, Klenow 补平, NcoI 酶解的表达载体 pET-11d 连接,转化 *E. coli* JM109 并筛选阳性重组子。pET-11d-pro-UK 的构建过程示于图 1。图 2 为阳性重组子的 N 端部分序列测定结果。

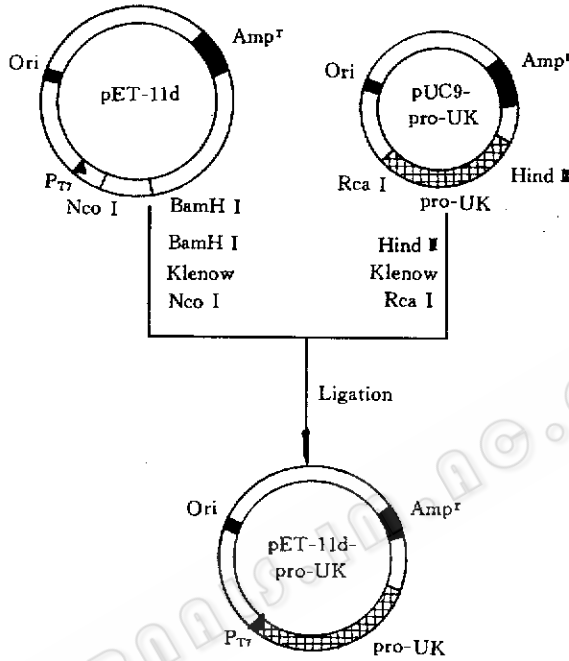


图 1 表达载体 pET-11d-pro-UK 的构建图

Fig. 1 Construction of the expression vector pET-11d-pro-UK

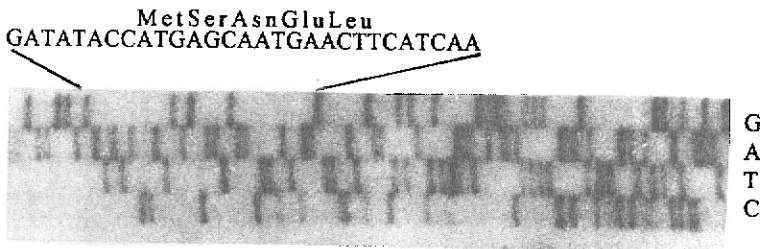


图 2 pro-UK cDNA 的 5' 端部分序列

Fig. 2 Partial sequence of the 5' end of pro-UK cDNA

2.2 人 pro-UK 在大肠杆菌中的高效表达

将阳性重组子转化大肠杆菌 BL21(DE3)pLysS 菌株,经 0.1mmol/L IPTG 诱导,使人 pro-UK 在 T7 启动子作用下得以表达。图 3 为重组表达质粒的 SDS-PAGE 图谱。与空载质粒相对照,重组表达菌在分子量为 43kDa 处有一明显的蛋白条带,其分子量与理论计算的非糖基化 pro-UK 分子量相吻合。经薄层扫描,pro-UK 的表达量占菌体总蛋白

的 15% 以上。

表达菌经超声破碎后,用纤维蛋白-琼脂糖平板法测定其上清和沉淀的生物活性,结果均无明显的纤溶活性。沉淀经体外变复性处理后,可获得较好的纤溶活性,说明表达产物基本以无活性的包涵体形式存在。

2.3 人 pro-UK 包涵体的体外变复性及分离纯化

以 1L 表达菌的菌液为原料,经体外变复性处理,获得了总活性为 500 000IU 的 pro-UK,再经 Zn²⁺ 离子选择性沉淀初分后,在尿激酶抗体亲和柱上,用 3.5mol/L MgCl₂ 洗脱得一蛋白峰(见图 4 中的 B),在 Fibrin-plate 上检查具有纤溶活性,将活性部分按每 10ml 加 1g Benzamidine-Sepharose CL 4B 湿胶,亲和吸附除去双链分子,即得 pro-UK 纯品,冷冻干燥,于 -20℃ 保存。

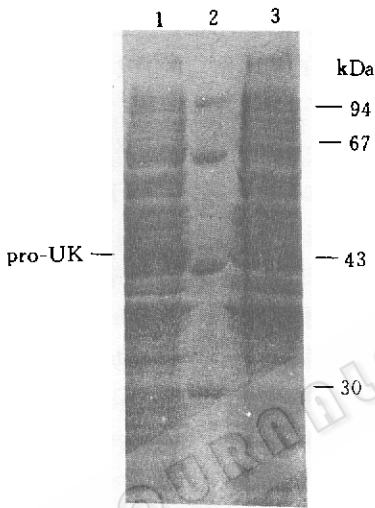


图 3 菌体裂解物的 10% SDS-PAGE 图谱

Fig.3 The SDS-PAGE pattern of bacterial lysats
Lane 1, pET11d-pro-UK in *E. coli* BL21(DE3);
Lane 2, MW standard markers;
Lane 3, pET11d in *E. coli* BL21(DE3)

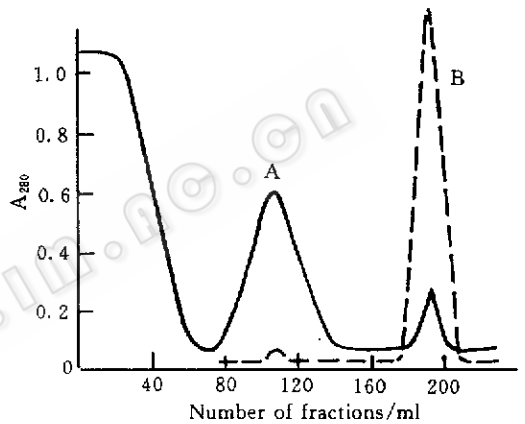


图 4 pro-UK 的抗体亲和层析

Fig.4 Chromatography of pro-UK on anti-UK antibody sepharose CL 4B
Column, 2.0×20cm; Equilibrated buffer: 0.01mol/L PBS (pH7.5); Elute buffer: 3.5mol/L MgCl₂ in 0.01mol/L PBS; Flow rate, 60ml/h; —, Absorbance at 280nm, - - -, Pro-UK activity determined by fibrin-plate assay

2.4 pro-UK 的鉴定及其比活测定

经 10% SDS-PAGE 电泳后银染鉴定,纯化的样品表现为单一条带,说明产物以单链形式存在(图 5)。初步计算,从 1L 培养液可得纯品 pro-UK 1.4mg 以上。根据平板法测活可知,其比活可高达 110 000IU/mg 以上。

3 讨 论

选择合适的载体——宿主系统是外源基因在原核体系内高效表达的关键之一。自从 1985 年成功克隆了 pro-UK 以来,由于其潜在的应用前景,pro-UK 的 cDNA 已被克隆在许多体系中,并得到了表达,但表达水平鲜有超过 2% 的。这一方面是由于 pro-UK 不仅

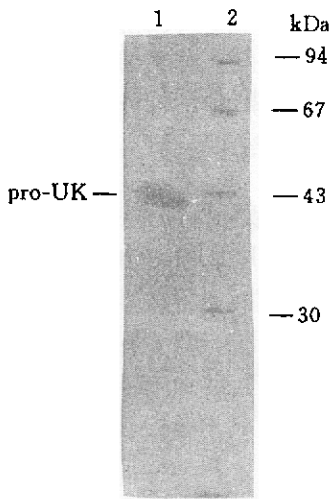


图 5 纯化后 pro-UK 的还原性 SDS-PAGE 银染图谱

Fig. 5 Reducing SDS-PAGE pattern of the purified pro-UK by silver staining

Lane 1, the purified pro-UK;

Lane 2, MW standard markers.

分子量大,由多达 411 个氨基酸组成,而且其 cDNA 中含有较多的 G/C 碱基,含量高达 83%^[14];另一方面,和其它真核蛋白在原核细胞表达一样,pro-UK 的 cDNA 中真核基因偏爱的密码子,难以被大肠杆菌中的稀有 tRNA 识别。鉴于以上两个原因,我们采用化学合成的 pro-UK 全长 cDNA,优先选用大肠杆菌偏爱的密码子,并且探索了多种原核表达体系。结果表明,在 T7 启动子作用下,人工合成的人 pro-UK cDNA 能在大肠杆菌中高效表达,从而解决了长久以来单链尿激酶在原核体系中表达水平低的难题。

外源基因在大肠杆菌中高效表达时,表达产物往往形成不溶性的,无活性的包涵体。一般认为,包涵体形成的原因是由于表达水平过高所致,即使大肠杆菌自身的蛋白质在高效表达时也会形成包涵体。分子量大小和半胱氨酸的含量也和包涵体形成有关。由于大肠杆菌胞质的还原性环境影响到二硫键的正确形成。人 pro-UK 含 24 个半胱氨酸(5.83%),二硫键多达 12 对,二硫键随机配对的几率很高,因此尽管我们获得了人 pro-UK 在大肠杆菌中的高效表达,表达产物仍不可避免地以包涵体形式存在,

为获得具有生物活性的人 pro-UK,我们进行了体外变复性。我们采用高 pH 值(pH 11)和合适的谷胱甘肽氧化型(GSSG)与谷胱甘肽还原型(GSH)的比值(即 GSSG:GSH = 10:1),提高了复性几率。

在分离纯化的过程中,我们在复性前,尽可能地先除去杂蛋白,这既有利于提高复性得率,又有利于复性产物的纯化。有鉴于此,我们利用超声破菌离心,充分洗涤沉淀,可除去 50% 的杂蛋白。复性后,上亲和柱之前,则借助 Zn^{2+} 离子对 pro-UK 的高亲和性,使复性液中 pro-UK 与 Zn^{2+} 离子在酸性条件下形成胶状复合物,然后升高 pH,使 Zn^{2+} 沉淀,pro-UK 也随之被沉淀下来,其活性回收率在 80% 以上。

经抗体亲和柱层析所得到的人 pro-UK 并不完全是单链形式,在表达及变复性的过程中会因细菌蛋白酶或温度过高而产生少量双链分子。一般而言,在分离过程中即使微量的细菌蛋白酶也会降解单链尿激酶,这会以后的动力学测定及活性测定带来影响。用双链分子的特异性抑制剂 Banzamidine 可以除去样品中的双链分子,这样所得到的 pro-UK 95% 以上都是单链 pro-UK。

参 考 文 献

- [1]Gurewich V J. Clin Invest, 1984, 73:1731~1738.
- [2]Holmes W E, Pennica D, Blaber M, et al. Biotechnology, 1985, 3:923~929.
- [3]Laurence M M, Brian G T, Patricia P, et al. J Biol Chem, 1990, 365:801~807.
- [4]Neltes L, Lijnen H K, Collen D, et al. J Biol Chem, 1987, 262:5682~5689.
- [5]Lenich C, Pannall R, Henkin J, et al. Thromb and Haemos, 1992, 68:539~544.

- [6]马忠,华子春,董晨等.生物化学与生物物理学报,1995,27:17~22.
- [7]Maniatis T, Fritsch E F, and Sambrook J. Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, New York, 2nd 1989.
- [8]Lammeli U K. Nature 1970, 217:680~683.
- [9]Winkler M, and Blaber M. Biochemistry, 1986, 25:4041~4045.
- [10]Husain S S. J Biol Chem, 1993, 268:8574~8579.
- [11]沈倍奋,贺水怀,赵薇薇等.生物化学与生物物理学报,1988,20:51~54.
- [12]Bradford M B, Anal Biochem, 1976, 72:248~255.
- [13]Ploug T, and Kjeldgaard N O. Biochem Biophys Acta, 1957, 24:278~282.
- [14]Verde P. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984, 81:4727~4733.

High-level Expression in *Escherichia coli* and Purification of Human pro-UK cDNA

Peng Guihong Ma Zhong Xue Yuming Chen Yuhong Zhu Dexu

(Department of Biochemistry, National Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract A chemically synthesized human pro-urokinase (pro-UK) cDNA was cloned into the expression vector pET-11d, and expressed in *E. coli* BL21(DE3) pLysS under the control of T7 promoter. By using 0.1mmol/L IPTG induction, the expression level of the recombinant pro-UK was over 15% of total bacterial proteins as inclusion bodies. After denaturation and renaturation *in vitro*, the expressed pro-UK was purified to Identity by Zn^{2+} selective precipitation, immuno-affinity chromatography, and Benzamidine affinity adsorption. The specific activity of the purified human pro-UK was about 110 000IU/mg.

Key words Human pro-UK, high-level expression, denaturation and renaturation, purification