

# 血纤蛋白粘附肽与低分子量单链尿激酶融合产物活性分析

张用书 李秀珍 程度胜 刘凤云

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

**摘 要** 人工合成了血纤蛋白粘附肽基因, 构建了粘附肽与低分子量单链尿激酶 cDNA 的融合基因, 在大肠杆菌中表达了融合基因。融合基因表达产物的抗原性和天然尿激酶相同, 并具有尿激酶的溶纤活性和粘附肽的抗纤维蛋白单体聚合的功能。

**关键词** 低分子量单链尿激酶, 血纤蛋白粘附肽, 融合基因

低分子量单链尿激酶(scu-PA-32K)是单链尿激酶(scu-PA)的一种衍生物, 由 scu-PA 的 144-411 位氨基酸残基组成, 具有与 scu-PA 相似的溶栓性质, 即有一定的溶栓选择性, 出血副作用较低分子量双链尿激酶小, 但缺乏对纤维蛋白的特异亲和力<sup>[1-3]</sup>。血纤蛋白粘附肽四肽来源于纤维蛋白原  $\alpha$  链 N 端 17~20 位氨基酸序列, 研究表明具有抑制纤维蛋白单体聚合的功能<sup>[4,5]</sup>。若能用基因融合的方法构建血纤蛋白粘附肽和 scu-PA-32K 融合分子, 这种融合分子将可能兼具溶栓和抗栓双重功能, 对防止溶栓治疗后的血栓再形成可能会有一定意义; 此外, 由于粘附肽分子与纤维蛋白具有特异性结合的能力, 也可能使融合产物获得更好的特异性溶栓性能。国外曾有人用化学法获得低分子量双链尿激酶与粘附肽的偶联产物<sup>[6]</sup>, 但此法存在操作繁琐、产物不均一等缺点。由于 scu-PA-32K 有比低分子量双链尿激酶更高的溶栓选择性, 所以用基因融合手段获得的粘附肽与 scu-PA-32K 融合产物的溶栓性能可能会优于化学法构建的偶联产物。本研究将探索此设想的可行性。

## 1 材 料

*E. coli* JM101, *E. coli* DH5 $\alpha$  本实验室保存菌株。质粒 pMM-UK-32 含低分子量单链尿激酶的 cDNA, 为本实验室构建保存; 质粒 pUC18 购自华美公司; 质粒 pBV220 为预防医学科学院侯云德研究员惠赠。所用工具酶与生化试剂购自 Biolabs、Promega 或华美公司。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) 购自北京福瑞公司; 兔抗尿激酶 IgG、HRP 标记的兔抗尿激酶 IgG 由本研究室制备, HRP 为 Sigma 公司产品; 人无纤溶酶原纤维蛋白原为 Sigma 公司产品; 牛纤维蛋白原、牛凝血酶、标准尿激酶购自卫生部生物制品检定所。

## 2 方 法

### 2.1 血纤蛋白粘附肽 cDNA 的合成

采用 381A 型合成仪, 由本研究所石成华教授研究组合成。

国家自然科学基金资助课题。

本文于 1996 年 8 月 26 日收到。

## 2.2 DNA 序列分析

采用 Pharmacia<sup>TM</sup> Sequencing<sup>TM</sup> Kit 介绍方法进行。

## 2.3 包涵体的变性、复性实验

参照文献[7]介绍的方法进行。

## 2.4 ELISA 实验

参照文献[8]介绍的方法进行。

## 2.5 溶解圈(血纤维蛋白平板)实验

参照文献[9]介绍的方法进行。

## 2.6 抗凝实验

10 $\mu$ l 无纤溶酶原血纤维蛋白原(10 $\mu$ g/ $\mu$ l)、40 $\mu$ l PBS(pH7.2)和 50 $\mu$ l 待测样品混匀后加入 10 $\mu$ l 凝血酶(2BP u/ml),快速混匀,记录反应物凝结时间。用 50 $\mu$ l PBS 作为阴性对照。

# 3 结 果

## 3.1 血纤蛋白粘附肽与低分子量单链尿激酶融合基因的构建

**3.1.1 血纤蛋白粘附肽 cDNA 的合成:**合成基因片段 5'→3'依次为限制性内切酶位点,由 HindIII 粘末端和 EcoRV 位点组成;翻译起始位点 ATG;粘附肽编码序列(编码的氨基酸为:Gly Pro Ary Pro);连接区,采用 4 个甘氨酸编码序列。

**3.1.2 融合基因的构建<sup>[10]</sup>:**用 PstI、EcoRV 双酶切 pMM-UK-32 质粒<sup>[11]</sup>,回收 scu-PA-32K cDNA。用 PST I 和 HindIII 双酶切 pUC18 质粒,回收约 2.86kb 的大片段。将此片段与上述回收的 scu-PA-32K cDNA 及血纤蛋白粘附肽 cDNA 片段连接,并转化受体菌 JM101,重组子经酶切鉴定、DNA 序列分析,得含融合基因的重组质粒 pMM-A4-UK-32。

## 3.2 融合基因在大肠杆菌中的表达及产物活性分析

**3.2.1 表达载体的构建:**pBV220 经 EcoRI 酶切,DNA 聚合酶 I KLenow 大片段补平、PstI 酶切后,回收大片段酶切载体,与质粒 pMM-A4-UK-32 DNA 经 EcoRV-PstI 双酶切后回收的 A4-UK-32 基因重组连接、转化受体菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,经用快速电泳法筛选、限制性内切酶分析,获得大肠杆菌表达质粒 pBV220-A4-UK-32,含此质粒的重组菌株称为 *E. coli* DH5 $\alpha$ (A4-UK-32)。

**3.2.2 融合基因在大肠杆菌中的表达:**菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ (A4-UK-32)经 30℃ 扩增培养,42℃ 热诱导培养后,离心收集菌体。超声破碎、离心,收集沉淀和上清。

**3.2.3 表达产物的活性检测:**ELISA 实验检测菌体超声破碎液上清和复性液,结果都呈阳性,表明表达产物可以可溶性和包涵体两种形式存在,也表明产物具有与天然尿激酶相同的抗原性。

溶解圈实验结果表明表达菌体超声破碎液上清和复性液都具有溶纤活性(图 1),这种溶纤活性可被抗尿激酶血清中和,这说明表达产物具有与天然尿激酶相同的溶纤活性。同时用此法测得重组菌的表达量约为 1000IU/L。

抗凝实验结果表明(图 2)在融合基因 A4-UK-32 表达产物反应体系中:测得的凝集时间比阴性对照反应体系中的凝集时间显著延长;而在 pBV220 空载体表达超声破碎液

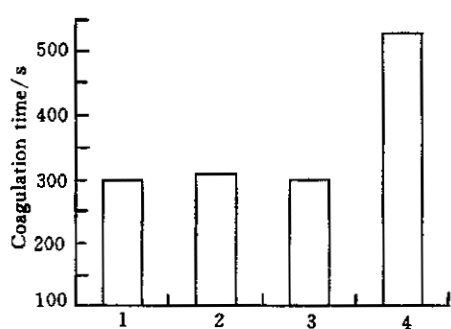


图 2 抗凝实验

Fig. 2 Anticoagulant assay

1. Cell lysates of *E. coli* DH5  $\alpha$ (pBV220)
2. PBS(pH7.2)
3. Human urokinase of low molecular weight
4. A4-UK-32

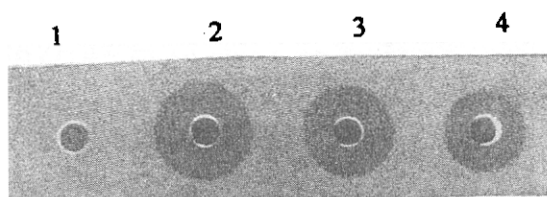


图 1 血纤维蛋白平板实验

Fig. 1 Fibrin plates assay

1. Cell lysates of *E. coli* DH5 $\alpha$ (pBV220)
2. Reference urokinase
3. Supernatant of the cell lysates of *E. coli* DH5 $\alpha$ (pBV220-A4-UK32)
4. Refolding products

上清和低分子量尿激酶溶液反应体系中,测得的凝集时间和阴性对照反应体系中的凝集时间相比,之间无明显差别,这表明融合基因 A4-

UK-32 表达产物具有抗纤维蛋白单体聚合活性。

## 4 讨 论

Phaneuf<sup>[12]</sup>等用化学连接的方法构建了重组水蛭素和链激酶复合物。体外研究结果表明复合物除溶栓及抗凝作用之外,还具有对血栓结合的凝血酶的亲和性,可获得选择性的溶栓作用。我们实验室曾构建了水蛭素 12 肽与 scu-PA-32K cDNA 的融合基因,结果表明融合基因表达产物也具有溶栓及抗凝性质。Chibber<sup>[13]</sup>、杨国玲<sup>[14]</sup>等的研究表明,化学法合成的粘附肽四肽的衍生物可选择性地增强天然纤溶酶原的活性,加速血凝块的溶解并延缓新生血纤维蛋白的聚合;在体内能有效地抑制实验性血栓的形成并能显著降低人血小板的聚集作用。结合我们的研究,可以推测,粘附肽与 scu-PA-32K 融合产物将可能是另一类具有选择性溶栓及抗栓作用的溶栓分子。已有的溶栓剂在使用时都还不同程度地存在着引起系统性纤溶,导致出血等副作用;同时,如何防止溶栓治疗后的再栓塞,也是一个需要解决的问题。对此类兼具溶栓和抗栓性质的溶栓药物性质的深入研究,将可能为解决这些问题提供一些有益的启示。

我们的工作表明,用基因融合的方法获得具有粘附肽与尿激酶性质的双功能分子是可行的。这为获得一类新型溶栓物质开辟了一条新的途径,也为进行更深入的研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Stump D C, Lijnen H R, Desirec J. *Biol Chem*. 1986, **261**:17120~17126.
- [2] Stump D C, Jean M S, Eddy Demarsin *et al.* *Blood*. 1987, **69**:592~596.
- [3] Lijnen H R, Luc. Nelles, Holmes W E *et al.* *J Biol Chem*, 1988, **263**:5594~5598.
- [4] Laudano P, Doolittle R F. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1978, **75**:3085~3089.

- [5] Laudano A P, Andrew P L, Doolittle R F. *Biochemistry*. 1980, 19:1013~1024.
- [6] Homandberg G A, Wai T. *Thrombosis Research*. 1990, 58:403~412.
- [7] Sarmientos P, Duchesne M. *Biol Technology*. 1989, 7:495~451.
- [8] 李秀珍, 唐红娣, 方继明等. 军事医学科学院院刊. 1988, 12:138~141.
- [9] 韩素文, 俞炜源, 李秀珍等. 军事医学科学院院刊. 1987, 11:101~105.
- [10] 金冬雁译, 分之克隆实验指南, 第二版, 北京: 科学出版社, 1992.
- [11] 李秀珍, 唐红娣, 刘凤云等. 《生物工程学报》创刊 10 周年, 《生物工程论文集》, 北京: 化学工业出版社, 1994, 75~80.
- [12] Phaneuf M D, Ozaki C K, Johnstone M T *et al.* *Thrombosis and Haemostasis*. 1994, 71:481~487.
- [13] Chibber B A K, Shoko Urano, Castellino F R A. *Int J Pept Protein Res*. 1990, 35:73~81.
- [14] 杨国玲, 李克勤, 胡晓愚. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28:159~163.

## Characterization of the Fusion Protein with a Fibrin-adherent Peptide and scu-PA-32K

Zhang Yongshu Li Xiuzhen Cheng Dusheng Liu Fengyun

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071*)

**Abstract** The fibrin-adherent peptide cDNA was chemically synthesized and fused with the scu-PA-32K, the single chain urokinase of low molecular weight. The fused gene was expressed in *E. coli*. The results of activity assays showed that the fusion product remained the same antigenicity and the fibrinolytic activity as urokinase, obtaining the ability of inhibiting fibrin monomer polymerization *in vitro*.

**Key words** scu-PA-32K, fibrin-adherent peptide, fusion gene