

RGD-葡激酶的凝胶过滤层析法复性及其纯化

程 麋 宋 刚 苏华波 于 敏 李育阳 宋后燕*

(复旦大学教育部分子医学重点实验室 上海 200032,复旦大学生命科学院 上海 200433)

摘 要 构建的溶栓和抗栓双重功能的 RGD-葡激酶突变体(RGD-Sak)在大肠杆菌中高表达,目的蛋白质以包涵体形式存在。为获得有活性的蛋白质,需要对包涵体进行变复性。利用凝胶层析方法对包涵体中 RGD-Sak 进行复性,并与稀释复性法进行比较,发现凝胶柱复性方法具有操作周期短、简便、成本低而高效等优点。复性后蛋白质用 Q-Sepharose FF 离子交换进一步纯化,纯度达 95%。酪蛋白凝胶板活性测定表明两种复性法得到的蛋白质比活性相当。圆二色谱测定显示两种复性法得到的蛋白质的二级结构成份和谱形一致,说明在两种复性过程中完成了 RGD-Sak 分子的正确折叠。

关键词 RGD-葡激酶,包涵体,复性,圆二色谱(CD 谱)

中图分类号 Q71 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)06-0693-05

葡激酶(Staphylokinase, Sak)是一种由金黄色葡萄球菌中几种溶源性噬菌体分泌的蛋白质,其成熟蛋白质由 136 个氨基酸组成,相对分子量为 15000。Sak 是一种纤溶酶原(Plasminogen, Plg)的激活因子,在血浆中与 Plg 形成 1:1 复合物,该复合物被血块表面痕量纤溶酶(Plasmin, Plm)激活为 Sak-Plm, Sak-Plm 是高效纤溶酶原激活剂,特异切割 Plg 形成有活性的 Plm,溶解血栓,其溶解血栓特异性强,对富含血小板的血栓溶解效果较其他溶栓药好。

我们的 RGD-葡激酶,是在重组葡激酶的合适部位通过定点突变(K109R, F111D)引进 RGD 编码序列^[1]。由于 RGD 肽序是血小板膜糖蛋白 GP II b-III a 的结合基序^[2],存在于纤维蛋白原(Fibrinogen, Fgn)等分子中, Fgn 与血小板 GP II b-III a 结合是血小板聚集的前提,外源 RGD 肽序与 Fgn 竞争结合血小板表面的 Fgn 受体(GP II b-III a),可以抑制血小板聚集。而 Fgn 受体只在血小板活化后 GP II b 与 GP III a 才形成有功能的二聚体,这样,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^[3], RGD 肽序还具有特异性靶向作用^[4],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。因而 RGD-葡激酶可望成为双功能新型溶栓和防栓药。

Wald 等将 RGD 融合序列连接在 Sak 的 C 末端^[5],但溶栓活性大大削弱,而我们的 RGD-Sak 保持了与野生型相仿的催化效率,并在 *E. coli* 中得到高效表达,表达量占菌体总蛋白量的 50%,但重组 RGD-Sak 在大肠杆菌中以包涵体形式存在,虽易于纯化,但复性工作是获得活性蛋白质的难点和重点。

影响蛋白质复性的因素主要与氨基酸序列,二硫键,分子的空间结构,亲疏水特性等有关,此外还受蛋白质浓度、纯度、变性剂浓度、复性液离子强度、pH 值等影响。传统的稀释复性方法虽比较通用,但操作周期长,易形成沉淀,产率低。近年来凝胶过滤层析法复性不断获得发展,如用于 Lysozyme, Carbonic anhydrase 的复性^[6],取得了较好效果。我们用凝胶过滤层析法复性 RGD-Sak,使复性率大大提高,显示了良好应用前景。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

大肠杆菌 JF1125,原核表达载体 pLY-4 由中科院生物化学研究所刘新垣院士惠赠。质粒 pST-RGD-Sak 为本室构建。

1.2 试剂和仪器

人纤溶酶原(本室制备),蛋白胨(Oxoid, UK),酵

收稿日期 2002-04-30,修回日期 2002-06-10。

基金项目 国家 863 生物高技术研究发展计划项目(No. 863-2001AA215291)资助。

* 通讯作者。 Tel 86-21-64033738; Fax 86-21-64033738; E-mail: hysong@shmu.edu.cn

母提取物(Oxoid ,UK),酪蛋白水解物(Sigma , US), 盐酸胍 ,Sak 标准品(中国生物制品鉴定所)SephacrylS-100(Pharmacia),Q-Sepharose FF(Pharmacia)液相色谱仪(Bio-Rad Econo , UK),高压匀质机 ,ImageMaster VDS 紫外分光扫描检测仪 ,分光光度计(Bio-Rad SmartSpec3000 , UK),超滤器(Waters , USA),圆二色仪(J-715 , Jasco , Japan) ,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 RGD-Sak 的表达和包涵体的提取与洗涤

挑取保存的 LBA 平板上 RGD-Sak 菌 ,接种于 10mL LB 培养液 30℃ 过夜培养 ,扩种于 1000mL M9CA 培养液中 ,于 30℃ 生长至菌密度 OD_{600} 约 0.6 (4h) 42℃ 诱导表达 (4~5h) ,离心收集菌体 ,菌体按 1/20 (W/V) 比例悬浮于破菌缓冲液(0.05 mol/L PB pH7.4)于高压匀浆机 500kg/cm² ,反复破菌 8 次 ,离心(5000r/min 4℃ , 10min) ,收集包涵体 ,收集的包涵体悬浮于洗涤缓冲液中(0.1mol/L NaCl , 1% TritonX-100 , 0.05mol/L Na₂HPO₄ , 0.05mol/L NaH₂PO₄ , pH7.4) ,以匀浆器反复研磨 ,离心收集包涵体。

1.4 稀释复性

按 1/15 (W/V) 比例用包涵体溶解液(6mol/L GuHCl , 0.05mol/L PB pH7.4 , 2.5% Sucrose)溶解包涵体 ,匀浆器研磨均匀 ,8000r/min 4℃ 40min 离心 ,取上清 ,用滴注法缓慢加入复性缓冲液(0.05mol/L PB pH7.4 , 2.5% Sucrose) ,同时缓慢搅拌 12h ,离心去除沉淀 ,以分子量截留为 3000 的超滤器浓缩至 100mL 以下。浓缩液上样于用 0.05mol/L PB (pH8.0) 平衡好的 SephacrylS-100 柱 0.05mol/L PB 洗脱除盐。

1.5 凝胶过滤层析法复性

复性洗脱液(0.05mol/L PB , pH7.4) ,平衡 SephacrylS-100 柱(3 × 100cm) ,用包涵体溶解液(3mol/L GuHCl , 0.05mol/L PB pH7.4 , 2.5% Sucrose)按 1/15 (W/V) 比例溶解包涵体 ,15mL 变性蛋白液 ,浓度在 5~10mg/mL ,在 4~20℃ 环境中过 SephacrylS-100 柱 ,洗脱复性液 0.05mol/L PB (pH7.4) 以 1mL/min 流速 ,洗脱复性。收集的目标蛋白峰 4℃ 下对 0.05mol/L PB (pH8.0) 透析过夜。

1.6 SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)

制备浓度 15% 的凝胶 ,25mA 恒流电泳至样品进分离胶 ,改用 100V 恒压电泳至指示剂刚出胶 ,考马斯亮蓝染色。

1.7 蛋白质浓度的计算

以牛血清蛋白作为标准 ,Bio-Rad Protein Assay 法测蛋白质浓度。

1.8 Q-Sepharose FF 离子交换

Q-Sepharose FF 柱用缓冲液平衡至柱前后 pH 值一致 将过柱除盐或透析除盐的蛋白质溶液上柱 , 0.05mol/L PB (pH8.0) 洗脱至基线平稳 ,1mol/L NaCl 梯度洗脱 ,收集 RGD-Sak 蛋白峰。

1.9 RGD-Sak 的辅助溶解血栓活性测定

酪蛋白凝胶板(牛奶板)溶圈法 ,凝胶含 1.6% 脱脂奶粉 ,1% 琼脂粉 0.02% NaN₃ 和 5μg/mL 纤溶酶原。凝胶经打孔后 ,在各孔加标准系列或样品液 , 37℃ 湿盒保湿过夜。

1.10 相对复性率的计算

首先确定包涵体中蛋白质的含量 A ,计算出复性纯化后的完全活性的蛋白质的含量 B。相对复性率 = B/A (因为两种复性法复性蛋白质后都用离子交换进一步纯化 ,过离子柱后所得蛋白量 B 用于计算 ,可反映两种复性法复性率和复性效果比较。)

1.11 圆二色谱(CD 谱)测定

在 J-715 圆二色光谱仪(JASCO , Japan)上进行 ,在二级结构波长范围(190~250nm)扫描 ,速度 100nm/min ,灵敏度(Sensitivity) : 20mdeg ,带宽(Band width) : 1.0nm ,Response : 0.5s ,Reference : yang. jsr , Mode : Infinite ,本室单蒸水为空白液 ,25℃ 恒温下测 RGD-Sak 的稀释复性冻干品(0.125mg/mL) ,凝胶过滤层析法复性冻干品(0.110mg/mL)和野生型 Sak (0.125mg/mL) 的 CD 谱 结果用摩尔椭圆度 θ 表示。

2 结 果

2.1 包涵体的获得

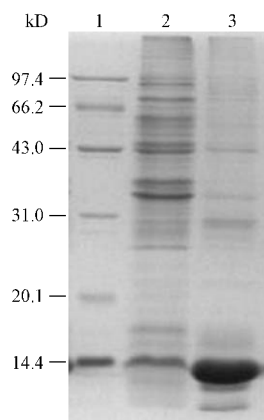


图1 RGD-Sak 工程菌压榨破菌后 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE showing inclusion bodies

1. Protein marker 2. Supernatant 3. Pellet of inclusion bodies

收获的菌用 0.05mol/L PB (pH7.4) 重悬 ,经高压

匀质机压榨破菌(压力 50MPa,每次 3min,8 次),离心,上清和沉淀用 SDS-PAGE 电泳鉴定,RGD-Sak 主要存在于包涵体沉淀中(图 1 的 14.4kD 条带)。

2.2 稀释复性结果

包涵体(湿重)用溶解液按比例溶解,蛋白浓度 5.6mg/mL,84mg 蛋白质,复性缓冲液稀释至 1500mL,离心去除沉淀,超滤浓缩至 50mL,加样于 SephacrylS-100 (3cm × 100cm)柱,0.05mol/L PB (pH8.0)洗脱除盐,并收集目标蛋白峰,蛋白定量为 15mg 蛋白质,复性后蛋白质得率 17.9%。经后续离子柱纯化得完全活性的 RGD-Sak 10mg,复性率 12%。

2.3 凝胶过滤层析法复性结果

15mL 变性蛋白,蛋白浓度 5.6mg/mL,上样于经复性缓冲液平衡好的 SephacrylS-100 柱,洗脱复性液 0.05mol/L PB (pH7.4)以 1mL/min 流速洗脱复性,图 2 为 RGD-Sak 过 SephacrylS-100 柱复性的紫外检测图,峰 1 经测 A_{260nm} 和 A_{280nm} 比值认为是核酸峰,峰 2 为 RGD-Sak 目标蛋白峰,峰 3 为盐峰。取 3 个峰尖样品进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 3,RGD-Sak 主要集中在目标峰(泳道 4,5),泳道 6,7 显示了盐峰中少量未复性的 RGD-Sak。收集的目标蛋白峰蛋白定量有 52.3mg 蛋白质,复性后蛋白质得率 62%。经后续离子交换柱纯化得完全活性的 RGD-Sak 39mg,复性率 46.4%。

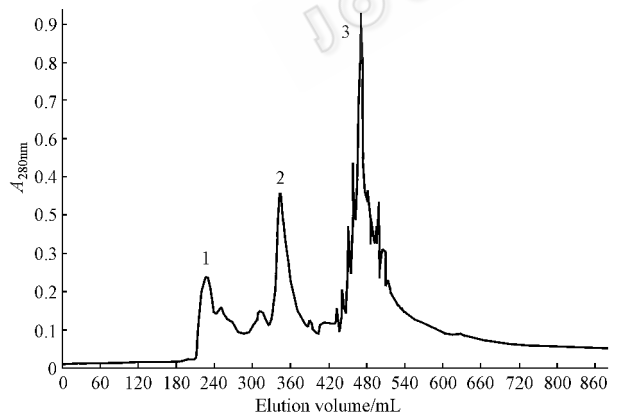


图 2 RGD-Sak 经凝胶过滤层析柱(Sephacryl S-100) 复性的洗脱图谱

Fig.2 Renaturation of RGD-Sak through Sephacryl S-100 filtration
Column :3cm × 100cm , Elution rate :1mL/min

2.4 Q-Sepharose FF 离子交换结果

两种复性方法复性和去盐后的蛋白溶液分别上样于平衡好的 Q-Sepharose FF 柱,0.05mol/L PB

(pH8.0)洗脱至基线平稳,1mol/L NaCl 梯度洗脱,约在 30% NaCl 梯度时出现目标峰,SDS-PAGE 电泳结果纯度达 95%。

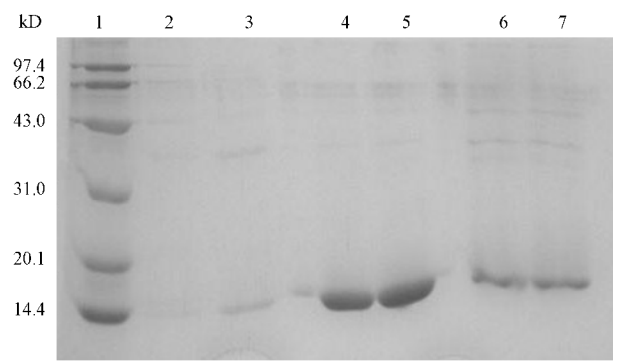


图 3 RGD-Sak 经 Sephacryl S100 复性和纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE showing RGD-Sak refolding and purification by Sephacryl S100
1. Protein marker ; 2,3. Peak one ; 4,5. Peak two ; 6,7. Peak three

2.5 酪蛋白凝胶板溶圈法活性测定结果

两种复性法得到的蛋白活性相当,测定结果均为 5×10^4 HU/mg。表 1 为 2 种复性方案的比较。凝胶过滤层析法复性率是稀释复性率的 3 倍多,复性过程相对也简便,避免了稀释复性对蛋白质进行了几百倍的稀释后形成的低浓度和大体积给后续纯化带来的不变,同时在复性时对蛋白质进行了初步纯化,复性后蛋白纯度高于稀释复性。图 4 为酪蛋白凝胶板溶圈法活性测定显示刚刚柱复性后 5 个收集管中蛋白液活性与稀释复性冻干品活性。

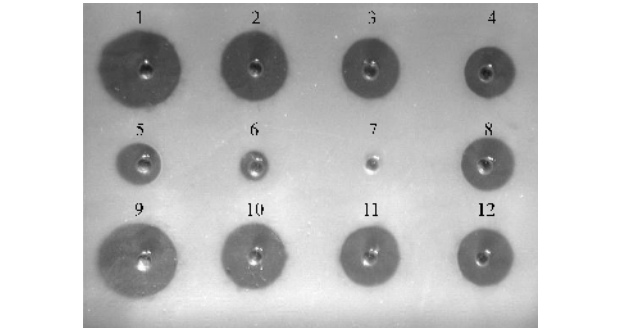


图 4 酪蛋白凝胶板溶圈法显示稀释复性和凝胶层析复性 RGD-Sak 的样品活性

Fig.4 Casein-plasminogen test plate showing the activities of the final product of RGD-Sak through dilution renaturation(1 ~ 7) and the RGD-Sak after renaturation through gel filtration(8 ~ 12)
The protein concentratins were 430, 215, 108, 53.8, 26.9, 13.5, 6.72, 170, 490, 230, 210 and 210μg/mL, respectively. The protein activities were 215, 107, 54, 27, 13, 6, 3, 44, 215, 107, 54 and 54HU, respectively.

2.6 圆二色谱 (CD 谱) 测定结果

图5 为凝胶柱复性和稀释复性的冻干品 CD 谱,它们的谱形结果是一致的。表 2 为两种复性冻干品和野生型 Sak 二级结构成份和含量结果,没有显著差异,说明两种复性法都使 RGD-Sak 分子得到正确折叠。我们的 RGD-Sak 与野生型 Sak 二级结构成份和含量也是很接近的。

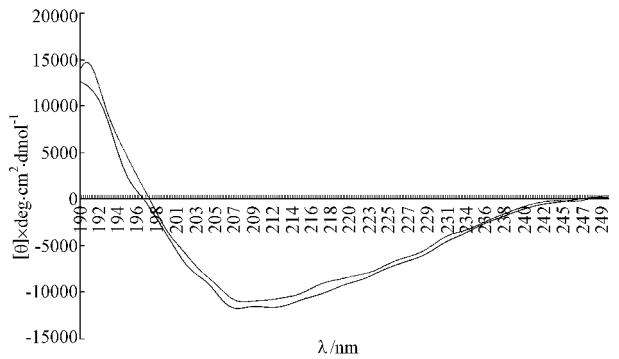


图5 凝胶层析复性和稀释复性的 RGD-Sak 的 CD 波谱
Fig.5 Far-ultraviolet CD spectra obtained for RGD-Sak
a. RGD-Sak renaturated by gel filtration ,0.110mg/mL ;
b. RGD-Sak renaturated by dilution ,0.125mg/mL

表 1 凝胶层析复性与稀释复性的比较

Table 1 Comparison between gel filtration and dilution renaturation

	Protein purity after renaturation/ %	Final product specific activity/10 ⁴ HU · mg ⁻¹	Final recovery rate / %
Gel filtration renaturation	82	5.0	46.4
Dilution renaturation	60	5.0	12

表 2 圆二色仪测定的 RGD-Sak(凝胶层析复性和稀释复性)与野生型 Sak 的二级结构含量

Table 2 The secondary structure contents of RGD-Sak through gel filtration renaturation , RGD-Sak through dilution renaturation and Wild-type Sak

	RGD-Sak renaturated by gel filtration/ %	RGD-Sak renaturated by dilution/ %	Wild-type Sak / %
α Helix	19.5	19.3	17.5
β Sheet	37.4	38.5	37.3
Turn	4.4	5.4	7.3
Random	38.7	36.8	37.8
Total	100	100	100

3 讨 论

Sak 与其它溶栓药物比较,具有分子量小,特异性高,疗效安全等优点。同时,Sak 蛋白质结构特殊,同源结构罕见,目前只有 SK 与其序列较接近。X 射线晶体衍射^[7,8]及 NMR 溶液构象测定^[9]表明,Sak 是一个椭球状分子,活性区位于球状分子的一侧。随 α 螺旋亲疏水性氨基酸的异常分布,Sak 呈明显的亲疏水性的不对称性。稀释复性时, RGD-Sak 在折叠过程中,在疏水区暴露的早期中间阶段易形成聚集体。稀释复性后形成的沉淀和大体积液体给后期纯化带来很大不便,同时大体积复性蛋白质溶液超滤时死体积和长周期也会影响得率。

凝胶层析复性将变性蛋白质局限于凝胶颗粒分割的局部空间中,同时让变性蛋白质与复性缓冲液进行缓慢交接,并在此过程中缓慢地完成复性,蛋白质分子逐渐分开,由于空间分割可以较顺利完成早期中间体折叠。洗脱时,蛋白质分子与变性剂分子在凝胶柱介质中移动速度不同,当蛋白质分子脱离变性分子时易于进行空间结构折叠,为了使分子正确折叠,复性缓冲液洗脱凝胶柱时流速不能太快以利于复性,我们原先将复性流速控制在 0.5mL/min,但由于 RGD-Sak 结构相对简单,我们用 1mL/min 流速也有较好效果。

另据文献报道包涵体中无活性蛋白质已具有部分二级结构^[10],溶解包涵体时所需的盐酸胍浓度与蛋白质分子结构复杂程度有关,常用 6mol/L 盐酸胍溶解包涵体,6mol/L 盐酸胍会将包涵体中某些无活性蛋白质已具有的部分正确二级结构去折叠,我们也试用 3mol/L 或 4mol/L 盐酸胍抽提包涵体,可能会保留包涵体中蛋白质在表达时折叠的部分二级结构。由于 RGD-Sak 相对简单的高级结构,3mol/L 或 4mol/L 盐酸胍已能将包涵体中 Sak 基本溶解出来,并同样能很好地使 Sak 复性。

凝胶层析复性可以进行高浓度蛋白复性,凝胶层析复性时虽然仍有少量 Sak 蛋白在盐峰中,但活性峰主要集中在 Sak 目标峰,复性的得率仍大大高于稀释复性。

Sak 活性测定和 CD 谱结果表明了凝胶复性法是成功的。两种复性法得到的终产品比活性相当,CD 谱和二级结构含量也一致,复性蛋白质在凝胶层析柱中完成了正确折叠。刚经柱子复性完的 RGD-Sak 蛋白质收集液 CD 谱(未显示)已接近成品 CD 谱,但仍有差别,差别可能是残余盐酸胍和杂蛋白

干扰的缘故。另外凝胶层析复性需注意复性前柱子必须用 0.1mol/L 的 NaOH 清洗干净。

不同蛋白质空间结构的复杂程度不同,所用变性剂盐酸胍浓度不同,复性时间也不同。本实验证明了凝胶层析能成功地复性 RGD-Sak,并缩短了复性纯化过程的周期,操作过程相对简便,相对复性率高。 $3 \times 100\text{cm}$ 柱可以一次上样 100 多毫克,增大柱体积可以扩大复性规模。因此该法可望用于中试乃至工业化生产。

REFERENCES(参考文献)

- [1] SONG G(宋刚),YU M(于敏),SONG H Y(宋后燕) *et al.* Rational Design, Over-expression and Characterization of a Navel Staphylokinase with Lower Tendency of Polymerization. *Engineering Science*(中国工程科学) 2000, 2(11): 68
- [2] David R Phillips, Israel F Charo, Laurence A Fitzgerald *et al.* The platelet membrane glycoprotein II b/III a complex. *Blood*, 1998, 71(4): 1
- [3] Huang T F, Shen J R, Liu C S *et al.* Triflavin, an antiplatelet Arg-Gly-Asp-containing peptide, is a specific antagonist of platelet membrane glycoprotein II b/III a complex. *J Biochem*(Tokyo), 1991,

109: 328

- [4] LING S C(凌世长),TIAN Q(田青),PENG S Q(彭师奇) *et al.* Study on targeting thrombolysis by drug-carrying liposomes modified with RGDS peptide. *Journal of Beijing Medical University*(北京医科大学学报), 1994, 26(3): 174
- [5] Walda B. van Zyl, Gert H J Pretorius, Harry F Kotze *et al.* Production of a recombinant antithrombotic and fibrinolytic protein, PLAT-Sak, in *Escherichia coli*. *Thrombosis reserch*, 1997, 88: 419 ~ 426
- [6] Batas B, Chaudhuri J B. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioengin*, 1996, 50: 16 ~ 23
- [7] Zhan C H, Liang D C, Song H Y *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of recombinant staphylokinase. *Acta Cryst*, 1996, 52: 564 ~ 565
- [8] Rabins A, De Bondt H L, De Ranter C. Three-dimensional-structure of staphylokinase, a plasminogen activator with therapeutic potential. *Nat Struct Biol*, 1997, 4: 357 ~ 360
- [9] Ohlenschlager D, Ramachandran R, Brown LR. Nuclear magnetic resonance solution structure of the plasminogen-activator protein staphylokinase. *Biochemistry*, 1998, 37: 10635 ~ 10642
- [10] LONG J Y(龙建银),WANG H X(王会信). Refolding of recombinant protein. *Progress in Physiological Science*(生理科学进展), 1998, 29(2): 103 ~ 107

The Renaturation and Purification of RGD-Staphylokinase by Gel Filtration

CHENG Ao SONG Gang SU Hua-Bo YU Min LI Yu-Yang SONG Hou-Yan*

(The Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Medicine, Fudan University, Shanghai 200032;

School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract A recombinant RGD-Staphylokinase(RGD-Sak) with thrombolytic and anti-thrombolytic bifunction was expressed in *E. coli*. The expression product accumulates as inclusion bodies. In order to obtain active molecule, the RGD-Sak in the inclusion body should be denatured and then renatured. The renaturation of RGD-Sak was performed by gel filtration. Comparing with the traditional way of dilution renaturation, gel filtration way is better than the traditional one, since there are some advantages, such as simple processing, high recovery, low cost and higher purity after renaturation. After renaturation, RGD-Sak was purified by Q-Sepharose FF, and the purity was more than 95%. Analysis of CD spectra showed that the final product from the two renaturation ways have similar CD spectra. It was demonstrated that RGD-Sak molecules proceeded correct refolding through gel filtration or dilution renaturation process.

Key words RGD-Staphylokinase, inclusion bodies, renaturation, CD spectra

Received: 04-30-2002

This work was supported by Grant from the Nation High Technology Project of China(No.863-2001AA215291).

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