

研究报告

# 一种含精-甘-天冬氨酰三肽人纤溶酶原 K 区缺失突变体在巴斯德毕赤酵母中的表达、纯化与特性

陈武<sup>1</sup>, 吴茂材<sup>1</sup>, 吴敬源<sup>1</sup>, 杨健忠<sup>1</sup>, 陈振林<sup>1</sup>, 黄智慧<sup>1</sup>, 张鑫涌<sup>1</sup>, 肖鄢<sup>2</sup>

1 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广州 510006

2 湖北医药学院附属十堰人民医院, 十堰 442000

**摘要:** 为获得具有抗血小板聚集作用的重组人纤溶酶原 (hPLG), 尝试了一种含有精-甘-天冬氨酰 (RGD) 三肽的 hPLG K 区缺失突变体 (RGD-hPLG-ΔK)。首先, 从 *pDNR-LIB-HPLG* 中克隆出 *HPLG-ΔK*。然后定点突变激活环内的 Pro<sup>559</sup> 为 Asp<sup>559</sup>, 形成 RGD 模序。构建的 *pPICZαA-RGD-HPLG-ΔK* 电转化巴斯德毕赤酵母 *GS115*, 甲醇诱导表达后可产生 0.16 g/L 培养液的 RGD-hPLG-ΔK。Ni-NTA 层析后纯度可达 90% 以上; Western blotting 证实所获 RGD-hPLG-ΔK 可与兔抗 hPLG 抗血清反应; 其 24 h 尿激酶激活速率和纤溶活性与 hPLG-ΔK 无显著差别 ( $P=0.630$ ,  $n=5$ ); 经尿激酶激活后, RGD-hPLG-ΔK 的血小板聚集抑制率 ( $21.8\% \pm 1.57\%$ ) 显著高于 hPLG-ΔK ( $3.8\% \pm 0.33\%$ ) ( $P=0.000$ ,  $n=5$ )。表明成功构建、表达了一种具有抗血小板聚集活性的 hPLG 突变体, 为研究新型多功能溶栓药物奠定了基础。

**关键词:** 人纤溶酶原, RGD 三肽, 突变体, 抗血小板聚集, 巴斯德毕赤酵母

## Purification and characterization of a kringle-deficit mutant of human plasminogen with Arg-Gly-Asp tripeptide expressed in *Pichia pastoris*

Wu Chen<sup>1</sup>, Maocai Wu<sup>1</sup>, Jingyuan Wu<sup>1</sup>, Jianzhong Yang<sup>1</sup>, Zhenlin Chen<sup>1</sup>, Zhihui Huang<sup>1</sup>, Xinyong Zhang<sup>1</sup>, and Yun Xiao<sup>2</sup>

1 Life Science and Bio-pharmaceutics College, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2 Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

**Abstract:** To obtain a recombinant human plasminogen (hPLG) with potential anti-platelet aggregation activity, we cloned the cDNA coding Pro<sup>544</sup> to Asn<sup>791</sup> of hPLG, a kringle-deficit derivative (hPLG-ΔK). The Pro<sup>559</sup> in activation loop was then mutated into Asp<sup>559</sup> to provide Arg-Gly-Asp (RGD) motif. The constructed *pPICZαA-RGD-HPLG-ΔK* plasmid was expressed in yeast *Pichia*

**Received:** November 2, 2010; **Accepted:** March 7, 2011

**Supported by:** Project of Doctor Foundation of Guangdong Pharmacology University (No. 43555026).

**Corresponding author:** Yun Xiao. Tel: +86-719-8637265; E-mail: shiyanxiaoyun@163.com

广东药学院博士基金项目 (No. 43555026) 资助。

*pastoris* GS115, which produced RGD-hPLG-ΔK about 0.160 g/L broth. After affinity chromatography, the purity of the recombinant protein reached above 90%. Western blotting test confirmed that it retained the immunological reaction capability as human PLG. Its urokinase activation rate in 24 hours and its fibrinolytic activity made no deference against native hPLG-ΔK ( $P=0.630$ ,  $n=5$ ). Importantly, after activation by urokinase, RGD-hPLG-ΔK showed a significantly higher platelet aggregation inhibition rate ( $R_i$ ) ( $21.8\% \pm 1.57\%$ ) than hPLG-ΔK ( $3.8\% \pm 0.33\%$ ) ( $P=0.000$ ,  $n=5$ ). These results proved that we constructed an hPLG mutant with anti-platelet aggregation activity, which made a foundation for developing innovative thrombolytic drugs with multifunction.

**Keywords:** human plasminogen, RGD tripeptide, mutant, anti-platelet aggregation, *Pichia pastoris*

栓塞是导致心脑血管疾病死亡的重要原因之一, 溶栓治疗是一种有效的手段。目前临床使用的主要溶栓药物, 如组织纤溶酶原激活剂 (Tissue-type plasminogen activator, t-PA)、尿激酶 (Urokinase-type plasminogen activator, UK)、链激酶 (Streptokinase, SK), 尽管表现出一定的治疗效果, 但由于需激活血液内的纤溶酶原 (PLG) 为纤溶酶 (PLM) 后方能发挥溶栓作用, 因此对陈旧性血栓的效率较低, 导致治疗窗短、出血并发症较高, 且不能阻止溶栓后再栓。近年来研究表明: 由于 PLM 是血液内发挥纤溶及栓溶作用的主要蛋白酶, 与 t-PA、UK、SK 相比, PLM 具有无免疫原性、可直接溶栓、出血并发症低等特点<sup>[1-2]</sup>。但由于 PLM 的 K 区富含糖链、结构复杂, 且易自身降解, 近年来通过大肠杆菌、哺乳动物细胞表达均未获得高水平的活性蛋白<sup>[3-4]</sup>。

一些学者通过构建小分子突变体, 提高了表达水平, 且保留了较好的纤溶活性, 其中部分进入临床实验研究<sup>[5-6]</sup>。我们前期工作构建了人纤溶酶原 K 区缺失突变体 (hPLG-ΔK), 显示出与 PLM 相近的纤溶活性<sup>[7]</sup>。本研究在此基础上, 通过突变激活环上的 Pro<sup>559</sup> 为 Asp<sup>559</sup>, 从而构建出含有 Arg-Gly-Asp (RGD) 三肽结构的突变体 RGD-hPLG-ΔK, 并通过酵母表达后, 以期获得一种具有直接溶栓作用和抗栓作用的重组人 PLG。RGD 序列可与纤维蛋白原竞争结合与血小板聚集相关的膜受体 GPIIb/IIIa, 阻断血栓形成的最后共同通路, 其模拟物临床上常用于预防再栓塞<sup>[8]</sup>。目前已构建了多种包含 RGD 的融合蛋白, 且显示出较好的抗栓功能<sup>[9-10]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 TOP10 由本实验室保存, *pDNR-LIB-HPLG* 质粒购自南京恩晶生物科技有限公司, *pPICZαA* 质粒、巴斯德毕赤酵母 GS115、Zeocin 购自美国 Invitrogen 公司, 牛血清 PLG、PLM 购自美国 Sigma 公司, *pGM-T* 质粒购自上海 Generay 生物技术有限公司, *Xba* I、*Xho* I、*Sac* I、T4 DNA 连接酶、Premix *Taq*、DNA marker、蛋白 marker 购自大连宝生物工程有限公司, 引物合成由上海生工生物工程公司提供, 测序由深圳华大测序公司完成, 质粒抽提、DNA 回收试剂盒购自天根生化科技有限公司, Ni-NTA 亲和介质为北京瑞达恒辉公司产品; LBY-NJ 血液凝聚仪购自北京普利生公司, 冷冻干燥仪 ZMD-MS 为 Waters 公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表达载体 *pPICZαA*-RGD-HPLG-ΔK 的构建

*HPLG-ΔK* 的亚克隆: 以含全长人 *PLG* cDNA 序列的 *pDNR-LIB-HPLG* 质粒作为模板, 以上游引物 F1 和下游引物 D (表 1) 进行 PCR。其中上游引物 F1 中引入 6×His, 下游引物中加上 *Xba* I 的酶切位点, 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 40 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物 1.0% 琼脂糖凝胶电泳、胶回收、测定浓度。

*pGME-T-HPLG-ΔK* 的构建: 以 *HPLG-ΔK* 片段为模板, 通过上游引物 F2 和下游引物 D, 其中上游引物 F2 中引入一个 *Xho* I 酶切位点、KEX2 酶识别位点序列, PCR 条件同上。反应产物经 1.0% 琼脂糖

表 1 文中所用引物

Table 1 Primers used in this paper

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
F1	CATCACCATCACCATCACCCTTCA TTTGATTGTGG	35
D	GTTTCTAGAAAGTTAATTATTCTC ATCACTCC	33
F2	TCTCTCGAGAAAAGACATCACCAT CACCATCAC	33
M	CCTACAACCCTTCCATCACATTTC TTCGGCT	31

凝胶电泳、胶回收、浓度测定后连接 *pGME-T* 载体，转化感受态大肠杆菌 TOP10，Amp-LB 培养板筛选白斑，菌落 PCR 鉴定重组子。

*HPLG-ΔK* 的定点突变：通过三轮 PCR 反应，第一轮以构建好的 *pGME-T-HPLG-ΔK* 质粒为模板，用上游引物 F2 和下游突变引物 M；第二轮以 *EcoR* I 线性化的 *pGME-T-HPLG-ΔK* 质粒为模板，用第一轮 PCR 片段为上游引物，与下游引物 D 进行 PCR；第三轮用第二轮 PCR 产物为模板，以上游引物 F2 和下游引物 D。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳、胶回收、浓度测定后测序鉴定 *RGD-HPLG-ΔK* 突变体构建成功。

*pPICZαA-RGD-HPLG-ΔK* 与 *pPICZαA-HPLG-ΔK* 的构建：将鉴定正确的 *RGD-HPLG-ΔK* cDNA 片段连接 *pGME-T* 载体，转化感受态大肠杆菌 TOP10 进行克隆。将 *pGME-T-HPLG-ΔK* 和 *pGME-T-RGD-HPLG-ΔK* 采用 *Xho* I、*Xba* I 进行双酶切，经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳、胶回收、浓度测定后连接 *pPICZαA* 载体，再转化感受态大肠杆菌 TOP10，涂布于含有 25 μg/mL Zeocin 的 LB 固体培养基上筛选转化子，菌落 PCR 鉴定重组子。

### 1.2.2 转化巴斯德毕赤酵母与表达

*pPICZαA-RGD-HPLG-ΔK* 的转化与筛选：将构建的 *pPICZαA-RGD-HPLG-ΔK* 质粒以 *Sac* I 线性化，酚氯仿抽提进行纯化浓缩，电击转化感受态巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株后，涂布含 100 μg/mL Zeocin YPDS 培养板，待长出菌落后再用无菌芽签

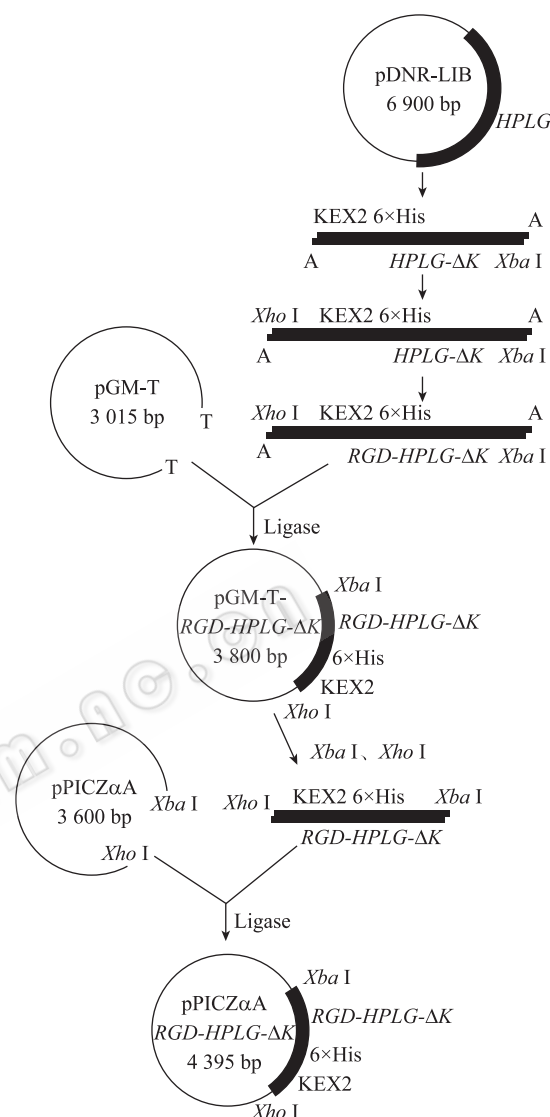


图 1 *pPICZαA-HPLG-ΔK* 和 *pPICZαA-RGD-HPLG-ΔK* 的构建

Fig. 1 Construction of *pPICZαA-HPLG-ΔK* and *pPICZαA-RGD-HPLG-ΔK*.

挑单菌落，分别接种至含 200 μg/mL、800 μg/mL Zeocin 的 YPD 培养板，筛选高拷贝重组子。同理进行 *pPICZαA-HPLG-ΔK* 的转化与筛选。

*RGD-HPLG-ΔK* 的表达：从含 800 μg/mL Zeocin 的 YPD 培养板上挑选 2 个单克隆菌落，分别接种到 30 mL 的 BMGY 液体培养基中，250 r/min、30 °C 培养 16~18 h，直到  $OD_{600}$  达到 3.0 左右。等体积预冷的灭菌水洗涤，1 500 r/min、4 °C 离心 5 min，

弃上清, 重复洗涤一次。菌体以 15 mL 的 BMMY 重悬, 30 °C、250 r/min 振荡培养, 每隔 12 h 取样 300  $\mu$ L, 样品 12 000 r/min 离心 5 min, -20 °C 上清保存, 直至培养 72 h, 其间每隔 24 h 补加甲醇(终浓度 1%)。样品以还原性 12% SDS-PAGE 检测目的蛋白表达; 纤维蛋白板法鉴定发酵液活性, HPLG- $\Delta$ K 的表达方法同上。

### 1.2.3 hPLG- $\Delta$ K 与 RGD-hPLG- $\Delta$ K 的纯化与激活

采用 Ni-NTA 亲和介质进行纯化, 层析柱 (2.5 cm $\times$ 15 cm) 先以 A 液 (0.05 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH 7.4), 0.5 mol/L NaCl) 平衡 5 个柱床体积, 流速为 2 mL/min; 发酵液 12 000 r/min 离心 5 min 后, 取 35 mL 上清上样 (流速 1 mL/min), 再以 A 液冲洗至 A<sub>280</sub> 近基线 (流速 2 mL/min)。依次以含 5、40、500 mmol/L 咪唑的 A 液进行阶段洗脱 (流速 2 mL/min), 收集各阶段洗脱峰, 12% 还原性 SDS-PAGE 和纤维蛋白板法鉴定目的蛋白组分。合并活性组分, 透析除盐 (透析液: 0.02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 (pH 7.4), 0.15 mol/L NaCl) 和 PEG 20000 浓缩, 冷冻抽干, -20 °C 保存备用, hPLG- $\Delta$ K 制备方法同上。

分别取纯化、透析后的 hPLG- $\Delta$ K 与 RGD-hPLG- $\Delta$ K, 以 100:1 摩尔比加入 UK, 37 °C 反应 24 h, 再通过 Ni-NTA 亲和色谱去除 UK, 获得激活的 hPLM- $\Delta$ K 与 RGD-hPLM- $\Delta$ K, 同样透析、浓缩后冷冻干燥保存。

### 1.2.4 hPLG- $\Delta$ K、RGD-hPLG- $\Delta$ K 的活性测定与比较

分别取 hPLG- $\Delta$ K、RGD-hPLG- $\Delta$ K 冻干品, 以 0.5 mL 双蒸水复溶, BCA 法测定蛋白浓度后, 再以 0.02 mol/L PBS 分别调整 hPLG- $\Delta$ K、RGD-hPLG- $\Delta$ K 至相同浓度: 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL。

纤维蛋白板法测定纤溶活性<sup>[11]</sup>: 1% 琼脂糖凝胶板中含有 0.05 mol/L PBS (pH 7.4)、1.5% 纤维蛋白、800 U/mL UK、0.02% NaN<sub>3</sub>。凝胶打孔后, 各孔中加等体积的样品液或 PLG 阳性对照, 37 °C 湿盒保温过夜。游标卡尺测定溶圈直径, 以溶圈直径

的平方与阳性对照活性作标准曲线, 计算样品的比活性。

抗血小板聚集活性<sup>[12]</sup>: 兔心脏取血 18 mL 加入 2 mL 0.109 mol/L 的枸橼酸钠溶液充分混匀, 800 r/min 离心 10 min, 取上清为富血小板血浆 (PRP); 剩余血液再以 2 500 r/min 离心 20 min, 取上清即为贫血小板血浆 (PPP)。血细胞计数板计数, PPP 调节 PRP 使血小板浓度为  $2.5\times 10^8\sim 4.0\times 10^8$ /mL。将 PRP、PPP 转移至硅化的三角瓶中室温保存, 1 h 内用血小板聚集仪分别测定 hPLG- $\Delta$ K、RGD-hPLG- $\Delta$ K 及其激活产物的血小板聚集抑制率 ( $R_i$ )。测定时, 将 200  $\mu$ L PRP 加入搅拌子后调零, 加入 5  $\mu$ L ADP (终浓度 10  $\mu$ mol/L), 反应 5 min, 记录最大聚集率 (PAGm), 以此为空白对照 (PAGm·blank); 样品测定时, 200  $\mu$ L PRP 分别加入 5  $\mu$ L 0.4 g/L PLG、PLM 及 hPLG- $\Delta$ K、RGD-hPLG- $\Delta$ K、hPLM- $\Delta$ K、RGD-hPLM- $\Delta$ K 制备液, 室温反应 15 min 后检测样品 PAGm (PAGm·sample); hPLG- $\Delta$ K 的测定方法同上。血小板聚集抑制率的计算公式为:

$$R_i(\%) = \frac{(\text{PAGm} \cdot \text{blank} - \text{PAGm} \cdot \text{sample})}{\text{PAGm} \cdot \text{blank}} \times 100\%$$

### 1.2.5 统计处理

统计数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 12.0 软件进行处理, 两均数间的比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 表达载体 pPICZaA-RGD-HPLG- $\Delta$ K 的构建

以含全长人 PLG 基因 cDNA 序列的质粒 pDNR-LIB-HPLG 为模板, 经第 1 轮 PCR 在 800 bp 附近显示单一条带, 与理论值 778 bp 相符, 其组成从 5'至 3'依次为: 6 组氨酸编码序列、HPLG- $\Delta$ K cDNA 片段、Xba I 酶切位点。第 2 轮 PCR 进一步在 5'末端依次加上 Xho I 酶切位点、KEX2 酶识别编码序列, 理论长度 792 bp, 同样与电泳结果一致。再通过 3 轮 PCR 构建了突变体 RGD-HPLG- $\Delta$ K 的

cDNA 片段 (图 1A)。经测序证实在指定位置成功将 Pro 的编码序列突变为 Asp (图 1B)。Xho I、Xba I 双酶切表明已成功构建了分别包含 HPLG-ΔK、RGD-HPLG-ΔK 的 pPICZaA 质粒 (图 1C)。

## 2.2 hPLG-ΔK 与 RGD-hPLG-ΔK 的表达及纯化

将构建好的 HPLG-ΔK 和 RGD-HPLG-ΔK 酵母工程菌分别经甲醇诱导表达 12 h, SDS-PAGE 检测即显示出在 31 kDa 处有单一条带, 与理论计算的分子量接近, 且表达量在诱导 24 h 后即达到峰值, 此

后 hPLG-ΔK 在 20 kDa 位置出现降解条带, 而 RGD-hPLG-ΔK 未发现有降解条带 (图 2A), 经计算可产生 RGD-hPLG-ΔK 约 0.160 g/L。发酵液经 Ni 亲和层析纯化, 可见位于 97 kDa 的杂带以及大部分的色素不能结合而流出, 通过咪唑洗脱可得到纯度 90% 以上的 RGD-hPLG-ΔK (图 2B), hPLG-ΔK 的结果与此相似 (数据未显示)。免疫印迹实验表明 RGD-hPLG-ΔK 及 hPLG-ΔK 皆可与兔抗人 PLG 抗血清反应, 证实该蛋白为预期构建的蛋白 (图 2C)。

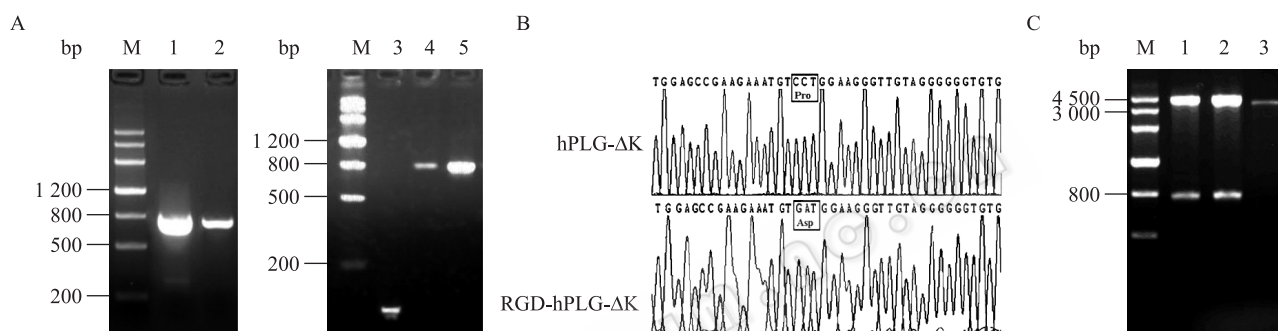


图 2 pPICZaA-RGD-HPLG-ΔK 表达质粒的构建

Fig. 2 Construction of expression plasmid pPICZaA-RGD-HPLG-ΔK. (A) PCR for constructing RGD-HPLG-ΔK. M: DNA marker; 1: subcloning of HPLG-ΔK; 2: adding Xho I recognizing site to 5' termi of HPLG-ΔK; 3: PCR products of the first site-directed mutagenesis; 4: PCR products of the second site-directed mutagenesis; 5: PCR products of the third site-directed mutagenesis. (B) Sequence analysis of HPLG-ΔK and RGD-HPLG-ΔK. (C) Identification of pPICZaA-HPLG-ΔK and pPICZaA-RGD-HPLG-ΔK with Xho I and Xba I. M: DNA marker; 1: pPICZaA-HPLG-ΔK; 2: pPICZaA-RGD-HPLG-ΔK; 3: pPICZaA.

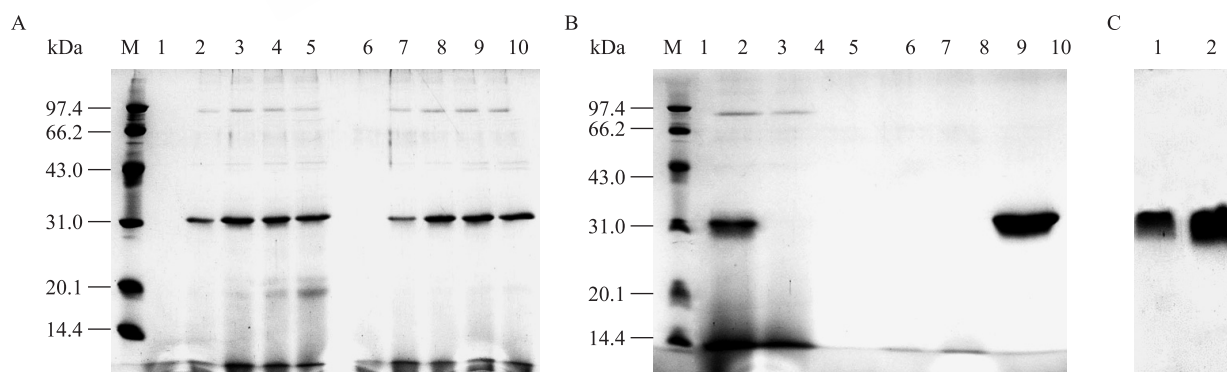


图 3 hPLG-ΔK 和 RGD-hPLG-ΔK 的表达、纯化及鉴定

Fig. 3 Expression, purification and identification of hPLG-ΔK and RGD-hPLG-ΔK. (A) The expression of HPLG-ΔK and RGD-HPLG-ΔK in *Pichia pastoris*. M: protein marker; 1-5: the expression of HPLG-ΔK in 0, 12, 24, 36, 48 h, respectively; 6-10: the expression of RGD-HPLG-ΔK in 0, 12, 24, 36, 48 h, respectively. (B) Purification of RGD-hPLG-ΔK by Ni-NTA affinity chromatography. M: protein standard; 1: fermentation broth; 2: eluant by buffer A; 3-6: Eluant by buffer A containing 25, 100, 200, 500 mmol/L imidazole. (C) The identification of hPLG-ΔK and RGD-hPLG-ΔK by Western blotting with rabbit anti-human plasminogen antiserum. 1: hPLG-ΔK; 2: RGD-hPLG-ΔK.

## 2.3 hPLG-ΔK、RGD-hPLG-ΔK 的活性测定与比较

### 2.3.1 纤维蛋白板法测定纤溶活性

采用纤维蛋白板法测定 24 h 后, 以牛血清 PLG 阳性对照制作标准曲线, 测定所纯化 hPLG-ΔK 和 RGD-hPLG-ΔK 的比活性分别为  $(17.6 \pm 4.2)$  U/mg 和  $(16.3 \pm 3.8)$  U/mg, 经统计分析两者无显著区别 ( $P=0.630$ ,  $n=5$ )。

### 2.3.2 UK 激活动力学

通过还原性 SDS-PAGE 分析可见未激活 RGD-hPLG-ΔK 及 hPLG-ΔK 均显示单一条带, 而被 UK 激活为 RGD-hPLM-ΔK 及 hPLM-ΔK 后, 由于蛋白水解作用失去一段小肽, 显示为分子量稍小的条带。从 UK 激活 RGD-hPLG-ΔK 和 hPLG-ΔK 的速率来看, RGD-hPLG-ΔK 明显比 hPLG-ΔK 要慢, 经光密度扫描分析显示: 两者在 24 h 时的激活百分比无显著差别 (图 5)。

### 2.3.3 抗血小板聚集活性

对 RGD-hPLG-ΔK、hPLG-ΔK 以及激活后的 RGD-hPLM-ΔK 和 hPLM-ΔK 抗血小板聚集活性分析显示: RGD-hPLG-ΔK、RGD-hPLM-ΔK 都可以明显抑制 ADP 诱导的血小板聚集, 且 RGD-hPLG-ΔK 的活性  $(36.1\% \pm 3.83\%)$  高于 RGD-hPLM-ΔK

$(21.8\% \pm 1.57\%)$ , 两者有显著差别 ( $P=0.0001$ ,  $n=5$ ), 两者都显著高于 hPLM-ΔK  $(3.8\% \pm 0.33\%)$  ( $P=0.000$ ,  $n=5$ ), PLG 及 PLM 表现弱的抑制活性 (图 6)。

## 3 讨论

人 PLG 是一种由 791 个氨基酸残基组成的糖蛋白, 包含 N 端多肽 (NTP)、5 个同源的 Kringle 区 (K1-K5)、丝氨酸蛋白酶区 (SP) 7 个结构域。PLG 经纤溶酶原激活剂 (PA) 特异性水解激活环上的 Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup> 肽键后, 转变为活性 PLM, 发挥溶解纤维蛋白的作用。在碱性条件下 (pH 11.0), Plm 可水解 Plg Arg<sup>530</sup>-Lys<sup>531</sup> 肽键, 产生由部分 K5、完整 SP 区组成的多肽片段 (Lys<sup>531</sup>-Asn<sup>791</sup>), 即微小纤溶酶原 (mPlg), 经 PA 激活后具有纤溶活性<sup>[13]</sup>。

本研究构建的 hPLG-ΔK (Pro<sup>544</sup>-Asn<sup>791</sup>) 去除了人 PLG 的所有 K 区和部分 SP 区序列, 其优势在于: 1) 进一步缩减了分子量, 有利于重组蛋白质的复性, 从而增加了利用大肠杆菌获得高水平表达的可能性; 2) 由于 PLG 的两个糖基化位点均位于 K 区<sup>[14]</sup>, 去除 K 区后避免了在酵母菌中表达时的过糖基化问题; 3) K 区的 Lys 结合位点是 PLG 与促炎细胞上受体相结合的主要结构域<sup>[15-16]</sup>, 去除后可避

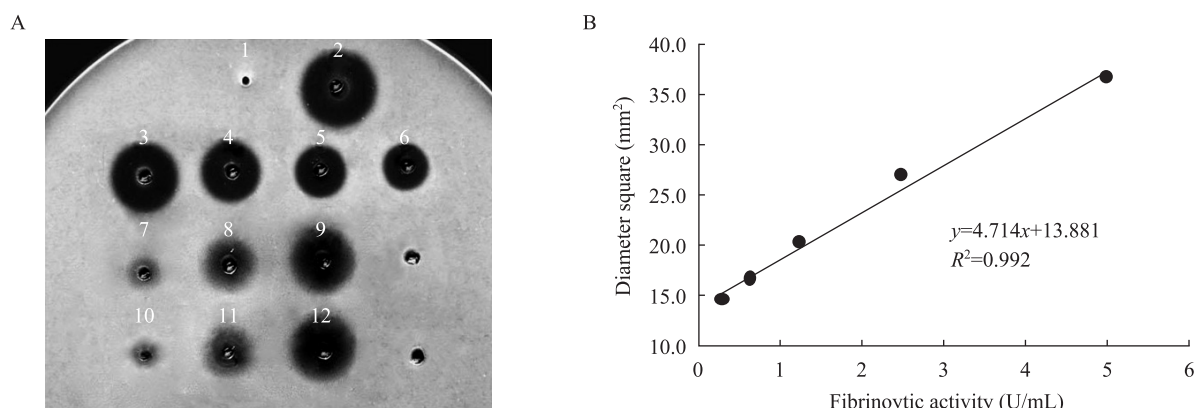


图 4 纤维蛋白板法测定 hPLG-ΔK and RGD-hPLG-ΔK 的纤溶活性

Fig. 4 Fibrinolytic activity assays of hPLG-ΔK and RGD-hPLG-ΔK using artificial fibrin plates with urokinase as activator. (A) Fibrin plates. 1: 0.02 mol/L PBS. 2-6: 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.32 U/mL plasminogen respectively. 7-9: 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL hPLG-ΔK. 10-12: 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL RGD-hPLG-ΔK. (B) The standard curve of fibrinolytic activity corresponding to the diameter square of fibrinolytic zone in fibrin plates using bovine serum PLG as control.



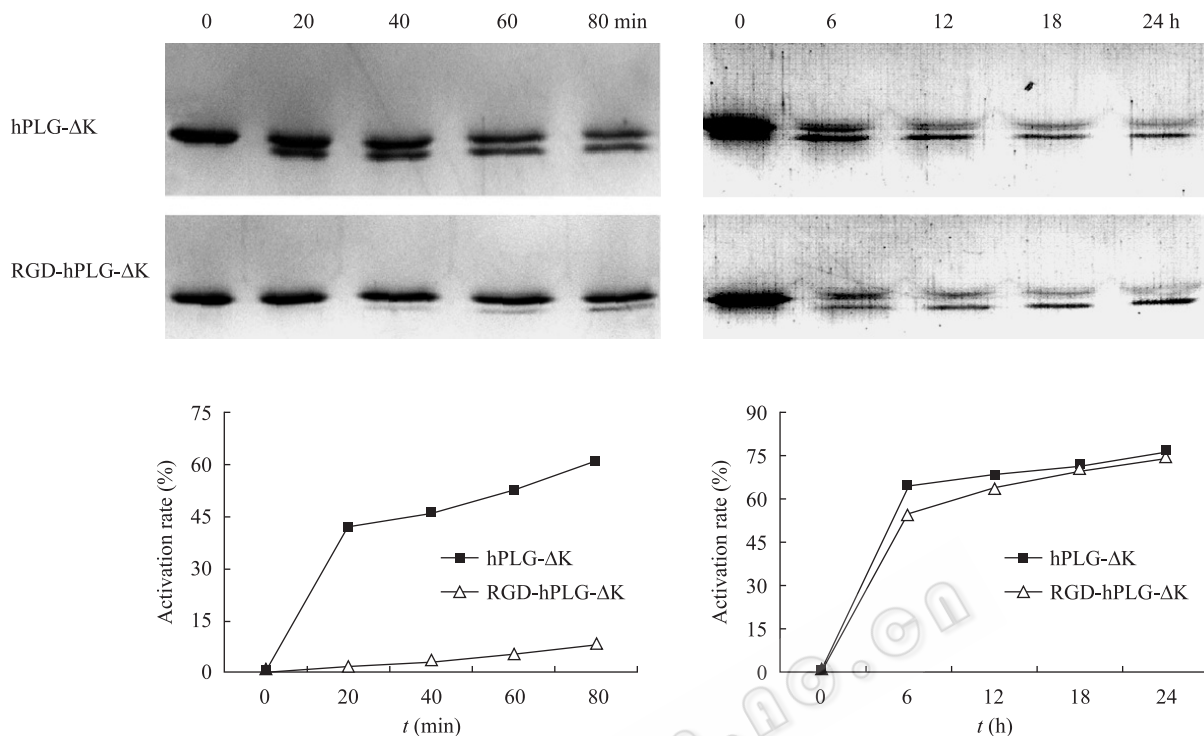


图5 UK 激活 RGD-hPLG-ΔK 和 hPLG-ΔK 的动力学分析

Fig. 5 UK activation kinetic analysis of RGD-hPLG-ΔK and hPLG-ΔK.

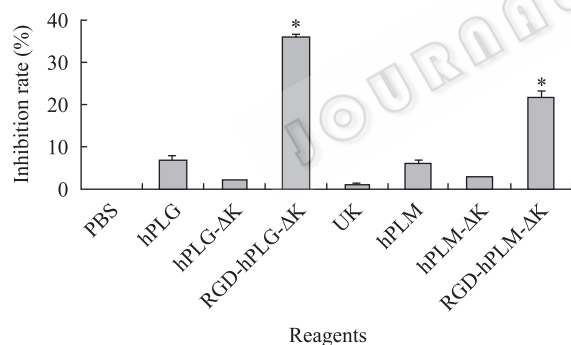


图6 抑制 ADP 诱导的血小板聚集活性

Fig. 6 Inhibition of platelet aggregating activity induced by ADP. \* $P=0.0001$ ,  $n=5$ .

免重组蛋白激活中性粒细胞、巨噬细胞、血小板、血管内皮细胞，从而降低溶栓时可能存在的促炎症副作用；4) K 区包含 PLG 与血浆中的抑制物  $\alpha 2$ -抗纤溶酶结合位点<sup>[17]</sup>，因此去除 K 区可能延长药物在血浆中的半衰期。

在此基础上我们通过突变激活环上的 Pro<sup>559</sup> 为 Asp<sup>559</sup>，形成 RGD 三肽。激活环是由 Cys<sup>558</sup>-Cys<sup>566</sup> 二硫键形成的环袢结构 (图 7)，晶体衍射数据表明：

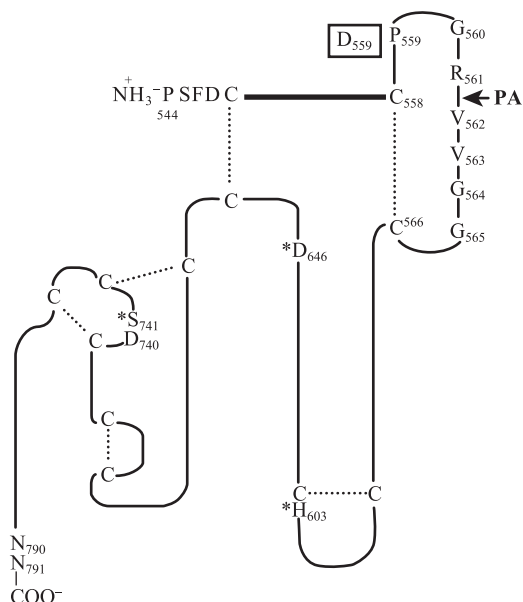


图7 hPLG-ΔK 的结构修饰图

Fig. 7 Diagram of hPLG-ΔK showing the structural modification. The activation site cleaved by plasminogen activators (PA) is indicated by the arrow; residue in box identifies site of modification.

该 9 肽的环袢结构暴露于分子表面, 是 PLG 与其他分子如 UK、t-PA、SK、SAK 相互作用的主要界面, 且位于 PLG 蛋白水解结构域外的单独结构域内。在 PA 特异性水解激活环上的 Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup> 肽键后, 其下游游离出来的 V<sup>562</sup>V<sup>563</sup>G<sup>564</sup>G<sup>565</sup> 通过二硫键旋转进入到 PLG 的催化活性区, 其中末端的 Val<sup>542</sup> 与 Asp<sup>740</sup> 形成氢键, 引起结构改变, 最终形成活性水解口袋<sup>[18-19]</sup>。本研究也证实, 将激活环激活位点上游的 RGP 突变为 RGD 后不影响其纤溶活性。虽然突变导致 UK 激活速率的下降, 但 24 h 后激活比率与天然的 hPLG-ΔK 无显著改变。且突变后形成的 RGD-hPLG-ΔK 在表达过程中不易被酵母中的蛋白酶降解, 从而有利于提高表达蛋白的产量。所构建的 RGD-hPLG-ΔK 能显著地抑制 ADP 诱导的血小板聚集。有研究表明 RGD 处于环袢结构中活性较高<sup>[20]</sup>, 本研究中也发现 RGD-hPLG-ΔK 激活为 RGD-hPLG-ΔK 后, 其 RGD 的环袢结构被破坏, 抑制活性有所下降, 但与 hPLM-ΔK 相比, 其抑制活性仍然提高了约 10 倍, 表明激活后 RGD 三肽依然位于分子表面, 可与血小板充分作用。

总之, 本研究成功构建了两种人 PLG 的突变体, 并且利用毕赤酵母系统获得了高水平的表达, 所得蛋白经 UK 激活后都显示了良好的纤溶活性, 其中含有 RGD 三肽的突变体具有明显的抑制 ADP 诱导的血小板聚集作用, 其体内活性还有待进一步证实。由于 PLM 是一种很有潜力的直接溶栓药物, 且广泛参与炎症、组织重建、伤口愈合、排卵、肿瘤浸润与转移等, 因此 PLG 的结构与功能研究, 对发现具有临床应用价值的突变体具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] Marder VJ. Pre-clinical studies of plasmin: superior benefit-to-risk ratio of plasmin compared to tissue plasminogen activator. *Thromb Res*, 2008, 122(3): S9-S15.
- [2] Valery VN, Gary JJ, Kyle AL, et al. Locally delivered plasmin: why should it be superior to plasminogen activators for direct thrombolysis? *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25: 72-75.
- [3] Gonzalez-Gronow M, Grenett HE, fuller GM, et al. The role of carbohydrate in the function of human plasminogen: comparison of the protein obtained from molecular cloning and expression in *Escherichia coli* and COS cells. *Bioch Bioph Acta*, 1990, 1039(3): 269-276.
- [4] Busby SJ, Mulvihill E, Rao D, et al. Expression of recombinant human plasminogen in mammalian cells is augmented by suppression of plasmin activity. *J Biol Chem*, 1991, 266(23): 15286-15292.
- [5] Marder VJ, Manyak S, Gruber T, et al. Haemostatic safety of a unique recombinant plasmin molecule lacking kringles 2-5. *Thromb Haemost*, 2010, 104(4): 780-787.
- [6] Thijs VNS, Peeters A, Vosko M, et al. Randomized, placebo-controlled, dose-ranging clinical trial of intravenous microplasmin in patients with acute ischemic stroke. *Stroke*, 2009, 40(12): 3789-3795.
- [7] Chen W, Mo W, Zhang YL, et al. Expression of recombinant serine protease domain of human plasminogen in *pastoris* and production purification and identification. *Chin Biotechnol*, 2009, 29(10): 18-22.
- [8] 陈武, 莫炜, 张艳玲, 等. 重组人纤溶酶原基因的酵母表达、产物纯化及鉴定. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(10): 18-22.
- [9] Topol EJ. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition: the GUSTO V randomised trial. *Lancet*, 2001, 357(9272): 1905-1914.
- [10] Combining thrombolysis with the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitor lamifiban: results of the platelet aggregation receptor antagonist dose investigation and reperfusion gain in myocardial infarction (PARADIGM) trial. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 32(7): 2003-2010.
- [11] He J, Di J, Xu R, et al. Novel recombinant thrombolytic and antithrombotic staphylokinase variants with an RGD motif at their N-termini. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008, 50(Pt 1): 17-23.
- [12] Astrup T, Müllertz S. Fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Bioph*, 1952, 40(2): 346-351.
- [13] Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*, 1963, 168(1): 178-195.



- [13] Shi GY, Wu HL. Isolation and characterization of microplasminogen. A low molecular weight form of plasminogen. J Biol Chem, 1988, 263(32): 17071-17075.
- [14] Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, et al. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. J Biol Chem, 1990, 265(11): 6104-6111.
- [15] Syrovets T, Simmet T. Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(7/8): 873-885.
- [16] Laumonnier Y, Syrovets T, Burysek L, et al. Identification of the annexin A2 heterotetramer as a receptor for the plasmin-induced signaling in human peripheral monocytes. Blood, 2006, 107(8):3342-3349.
- [17] Wiman B, Collen D. On the mechanism of the reaction between human  $\alpha 2$ -antiplasmin and plasmin. J Biol Chem, 1979, 254(18): 9291-9197.
- [18] Peisach E, Wang JY, de los Santos T, et al. Crystal structure of the proenzyme domain of plasminogen. Biochemistry, 1999, 38(34): 11180-11188.
- [19] Wang JY, Brdar B, Reich E. Structure and function of microplasminogen: I. Methionine shuffling, chemical proteolysis, and proenzyme activation. Protein Sci, 1995, 4(9): 1758-1767.
- [20] Huang GF, Zhou ZM, Srinivasan R, et al. Affinity manipulation of surface-conjugated RGD peptide to modulate binding of liposomes to activated platelets. Biomaterials, 2008, 29(11): 1676-1685.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 蛋白质工程实验指南

苏晓东 等译

开本: 16 开 营销分类: 生物 装帧: 平装

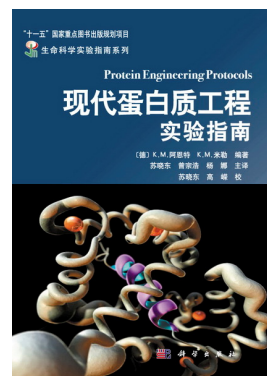
ISBN 978-7-03-030122-2 ¥ 58.00 2011 年 2 月出版

### 内容简介

现代蛋白质工程是将分子生物学、蛋白质结构与功能分析、理论计算, 以及生物化学有机结合的学科, 其目标是快速及高效率地发展和改进实用的或有价值的蛋白质。本书分为两个部分, 第一部分主要介绍了蛋白质理性设计的策略, 包括理论计算方法, 利用一些很有说服力的例证说明所设计蛋白质的全新特性, 阐述了如何设计具有目标特性的蛋白质, 并选择了很多如蛋白质-蛋白质相互作用、DNA 结合、抗体模拟, 以及酶活性设计等具体实例; 第二部分蛋白质的定向进化技术主要介绍了包括进化库设计的一般方法、进化库质量的统计评估、核酸混编的新方法, 以及不同的选择筛选策略等。同时也给出了不同特性体外定向进化的一些实例, 如蛋白质折叠类型、折叠热稳定性以及酶活性等。

**读者对象** 本书适合蛋白质科学各个层次的科研工作者, 特别是从事相关领域研究的高年级大学生及研究生参考使用。

**编辑推荐** 本书是译自由英国剑桥大学 John M. Walker 教授主编的【分子生物学方法: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY】丛书系列之一 (John M. Walker 教授由于阐明了 ATP 合成酶的结构与机理而荣获 1997 年诺贝尔化学奖)。主要总结评介了蛋白质工程研究领域近年来发展得较为成熟的新方法、技术和研究成效。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 (010-64031535)

网上订购: [www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目