

人微小纤溶酶原基因的克隆和表达

沈俊卿 宋后燕

(上海医科大学分子遗传研究室 上海 200032)

摘 要 用 PCR 方法扩增人微小纤溶酶原(Microplasminogen, mPlg)基因,再与表达载体重组,构造 mPlg 原核表达质粒并转化大肠杆菌。阳性克隆 pSSE-mPlg 经温度诱导表达,SDS-PAGE 等方法证明表达产物的分子量约为 29kDa,占全菌总蛋白的 24%左右,并在菌内形成包涵体。经半胱氨酸再氧化法和空气氧化法复性,表达产物 r-mPlg 经 SK 作用后显示纤溶活性。同时对蛋白质浓度、复性时间等因素对复性的影响进行了初步探讨。

关键词 人微小纤溶酶原,克隆,表达,体外复性

人纤溶酶原(Plasminogen, Plg)是一分子量约 92kDa 具有多个结构域的单链多肽,经 t-PA、SK 等激活剂作用后,在 Arg₅₆₀-Val₅₆₁ 特异性裂解形成由二硫键维系的活性双链纤溶酶。其中 PlgN 端 1~560 位氨基酸为重链部分,由 N 端多肽(NTP)和 5 个三角区(K1~5)组成,这些结构域与其它凝血和纤溶系统中的蛋白质具有高度同源性;C 端 561~790 位氨基酸为轻链部分,其中 3 个氨基酸残基 His₆₀₂、Asp₆₄₅、Ser₇₄₀ 构成 Plg 的活性中心^[1~3],目前还发现^[4]:Plg 轻链存在 SK 特异性的结合位点。Plg 是纤溶系统中重要的组成成分,它的激活导致纤维蛋白的降解,使血栓溶解,血管畅通;并参与人体内一系列生理、病理过程。Plg 的激活受其激活剂及纤溶酶抑制剂的调节^[5,6]。

Plg 因分子量大和固有的柔韧性,及其糖链结构的影响,难以获得完整的晶体,以致研究其结构与功能的关系有一定困难;Plg 与其激活剂如 SK 的共晶则更难以得到,研究两者之间的相互作用困难更大。而一些小分子 Plg 衍生物也许易于制备晶体,为进一步研究提供条件,故我们以人微小纤溶酶原(Micro-plasminogen, mPlg)为研究对象。

人 mPlg 是 PlgC 端 530~790 位间的 261 个氨基酸残基组成的肽链,分子量约 29kDa,有 6 对二硫键,没有 PlgN 端 5 个三角区,不能与纤维蛋白等结合,但保留了丝氨酸酶活性中心,被激活后,形成具有纤溶活性的 mPlm。mPlm 双链结构中一条为天然 Plg 分子完整的轻链,一条为 Plg 重链 C 端 31 个氨基酸残基组成的肽段^[6],两对链间二硫键对活性中心的形成十分重要。若能制备大量的 mPlg,则能为深入研究 Plg 与 SK 或 SaK 间相互作用的机理提供必要的材料,为 SK 或 SaK 的加工改造提供理论依据,由此为新药设计奠定基础。我们设计了 mPlg 两端引物,以含全长 Plg cDNA 的质粒 pBS-S1/BamHI 线性化片段为模板,用 PCR 方法扩增 mPlg 基因,构建原核表达质粒后,实现了在大肠杆菌中的高效表达,通过体外蛋白质复性,表达产物 mPlg 显示了纤溶活性。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

表达质粒 pLY-4, 受体菌 JF1125 大肠杆菌由刘新垣教授赠送, 寡聚核苷酸由 Oligo 公司合成, PCR 试剂盒购自中国科学院遗传研究所, 所用工具酶购自 Boehringer Mannheim 或 Gibco BRL 公司, 阳离子交换树脂购自 Pharmacia 公司。

1.2 PCR 扩增人微小纤溶酶原基因

根据 mPlg N、C 端氨基酸顺序设计 PCR 引物, 两个引物 5' 末端分别含有限制酶 EcoRI、BamHI 识别位点, 以含全长 Plg cDNA 的质粒 pBS-S1/BamHI 线性化片段为模板, 扩增人微小纤溶酶原(mPlg)基因。

1.3 人微小纤溶酶原基因表达质粒的构建和鉴定^[8]

将 PCR 产物用 DNA 聚合酶 I Klenow 片段补平可能存在的粘性末端使之成为平端, 再用限制酶 EcoRI、BamHI 酶切, 并回收片段, 与相应酶切并回收 pLY-4 质粒载体片段以 2:1 摩尔比混合, T4DNA 连接酶连接, 所得重组 DNA 转化 *E. coli* JF1125, 筛选重组子。小量提取阳性转化菌的质粒, 分别用 EcoRI/BamHI、EcoRV/BamHI 进行酶切分析。

1.4 人微小纤溶酶原基因克隆在大肠杆菌中的表达

将含有表达质粒的阳性菌落接种于 LB-Amp 培液中 30℃ 培养过夜, 以 1:100 稀释于 M₉CA 培液中, 30℃ 培养 3h 后升温至 42℃ 诱导培养 3h, 5000r/min 离心 5min, 收集细菌。

1.5 表达产物的鉴定

1.5.1 SDS-PAGE 鉴定表达产物分子量: 按修改后的 Laemmli 法^[9]。

1.5.2 表达产物在菌体内存在状态: 细菌悬浮于 PBS 中, 在冰盐浴中超声处理, 25000r/min 超速离心 60min, 沉淀和上清分别取样进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.5.3 Western Blot 分析表达产物的免疫特异性: 参照 Burnette 法^[10], 一抗为兔抗人 Plg 的抗血清, 以纯化人血浆 Plg 为阳性对照。

1.5.4 酪蛋白-纤溶酶原-琼脂糖凝胶板测定表达产物纤溶活性: SDS-PAGE 后, 凝胶一分为二: 一半作考马斯亮蓝染色, 另一半用含 2.5% Triton X-100 缓冲液充分洗涤后, 覆盖于含 1% 琼脂糖, 1.6% 脱脂牛奶, 4000uSK, 5μg/ml 牛纤溶酶原的凝胶上, 于湿盒 37℃ 保温 2~24h, 观察酪蛋白溶解现象。

1.6 工程菌的发酵

将过夜培养的菌液以 1:50 稀释于 3L 含多种氨基酸的 M₉CA 培液中, 在控制温度、溶氧、pH 及搅拌速度的情况下, 温度诱导发酵, 发酵结束后, 离心收集细菌, 保存于 -20℃。

1.7 mPlg 初步纯化

细菌悬浮于 10 倍体积 PBS 中, 高压匀浆泵破碎细菌后, 离心收集沉淀, 沉淀用含 2% Triton X-100 的 0.02mol/L PB(pH7.4)洗涤 2 次, 用 0.02mol/L PB 洗 1 次, 再用含 2mol/L 尿素的 0.02mol/L PB 洗 1 次, 离心后, 沉淀悬浮于 10 倍体积含 8mol/L 尿素的缓冲液中(含 0.02mol/L PB pH6.8, 1mmol/L EDTA, 1mmol/L PMSF), 10℃ 搅拌 1h, 10000r/min 4℃ 离心 20min, 再将沉淀悬浮于含 9mol/L 尿素, 10mmol/L β-ME 的缓冲液中, 37℃

搅拌 3h,使之充分溶解,4℃ 10000r/min 离心 20min,上清用 S-Sepharose 阳离子交换柱,含盐缓冲液梯度洗脱初步纯化 mPlg。

1.8 mPlg 体外初步复性

初步纯化的 mPlg 用半胱氨酸再氧化和空气氧化两种不同的方法进行体外复性。

半胱氨酸再氧化法中,取 1mg 纯化样品,1:100 稀释于复性缓冲液 A 中(含 20mmol/L Tris-HCl pH8.8,5mmol/L 半胱氨酸,0.5mmol/L 胱氨酸,1mmol/L β -ME,50mmol/L NaCl,1mol/L 尿素,5mmol/L $MgCl_2$,10% 甘油)。

空气氧化法中,1mg 纯化样品,1:100 稀释于复性缓冲液 B 中(含 20mmol/L Tris-HCl pH8.8,1mmol/L β -ME,150mmol/L NaCl, 5×10^{-2} mmol/L Cu^{2+} ,10% 甘油)。

上述各稀释液分别于 4℃ 搅拌 24h,然后对不含 NaCl 的复性缓冲液透析 36h,取样,10000r/min 离心 15min,测定上清部分纤溶活性,剩余部分继续复性 1 周甚至更长时间,然后测定纤溶活性。

1.9 溶圈法测纤溶活性

样品与 SK(4000u)于 37℃ 共孵育 18h,取 10 μ l 点样于含 1% 琼脂糖凝胶,1.6% 脱脂牛奶,5 μ g/ml 牛纤溶酶原的溶圈板中,37℃ 湿盒放置 6~18h,观察酪蛋白溶解圈。

2 结果与讨论

2.1 人微小纤溶酶原基因表达质粒的构建

2.1.1 PCR 扩增结果:电泳鉴定 PCR 产物,在 800~900bp 之间可见一条十分明显的 DNA 扩增条带,片段长度与理论值相符(图版 I-A)。

2.1.2 pSSE-mPlg 的构建:为了保证 mPlg 基因片段有效地组装入表达载体,PCR 产物先补平末端后,再用 EcoRI 和 BamHI 酶切并用凝胶电泳回收 PCR 产物,与原核表达质粒 pLY-4 相应酶切并回收的载体片段相连接,构建 pSSE-mPlg 质粒(图 1)。用 BamHI、EcoRI 双酶切和 BamHI、EcoRV 双酶切分别得到 822bp 和 597bp 线性化片段(图版 I-A),显示了 mPlg cDNA 的特征性酶切位点。

2.2 人微小纤溶酶原基因克隆在大肠杆菌中的表达及表达产物的测定

pSSE-mPlg 质粒转化大肠杆菌 JF1125,经温度诱导表达,SDS-PAGE 鉴定,在分子量相当于 29kDa 左右处有一浓集的条带(图版 I-B),与预计的表达产物分子量相符。表达产物约占菌体总蛋白的 24% 左右,细菌经超声破碎、超速离心后,经鉴定表达产物主要分布在沉淀中,说明 mPlg 在菌体内形成了包涵体。Western Blot 结果表明:表达产物可与抗人 Plg 的抗血清结合(图版 I-C)。包涵体中表达产物未经复性时没有纤溶活性。

2.3 表达产物体外复性

mPlg 分子上有 14 个半胱氨酸,形成 6 对二硫键,其中两对链间二硫键对形成活性中心尤为重要,而原核表达系统缺乏翻译后加工体系,尤其胞液中没有二硫化物形成的氧化还原条件,故难以形成有活性的 mPlg,表达产物 mPlg 必须在体外复性。

在大肠杆菌中 mPlg 形成了包涵体,分子内结构处于不成熟状态,必须经过洗涤、溶解、再折叠以形成活性中心,才能显示活性。本实验中,包涵体经 2% Triton X-100 洗涤后,菌体蛋白没有明显减少,在此基础上,分别用含有 2mol/L、4mol/L、5mol/L 尿素再次

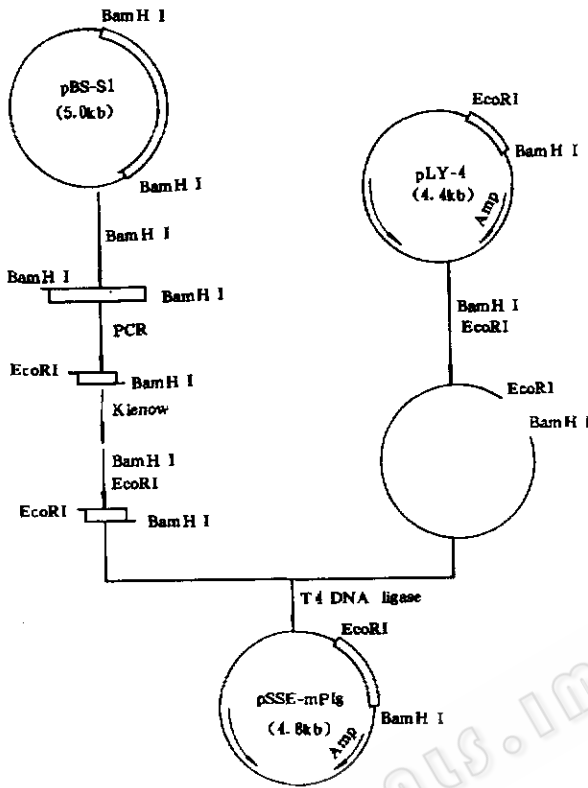


图 1 表达质粒 pSSE-mPlg 的构建

Fig.1 Construction of expression plasmid pSSE-mPlg

mPlg 的 PI 约为 pH8.3, 而细菌蛋白质 PI 多在 pH5.0 左右, 故选用阳离子交换树脂, 在 pH6.8 的 PB 缓冲液中纯化, 此时 mPlg 带正电, 而细菌蛋白质多带负电, 并且缓冲能量大, 可以消除尿素水解对 pH 的影响。mPlg 经初步纯化后纯度达 72% 以上。

变性的多肽需在氧化条件下复性, 通常采用稀释或透析的方法降低变性剂和还原剂的浓度, 使变性蛋白重新折叠^[11, 12]。我们用不同的方法进行 r-mPlg 复性, 在复性 48、60h 和 1 周后分别取样测定纤溶活性, 结果表明: 复性 48h 样品无活性; 60h 时, 采用半胱氨酸再氧化法复性的样品出现少量纤溶活性(图 2); 1 周后, 用 Cu^{2+} 催化的空气氧化法, 也出现了纤溶活性(图 3)。说明复性时间是复性过程中一个重要参数, 对不同方法其影响程度也不相同。一般氧化还原剂多用谷胱甘肽, 但我们用半胱氨酸和胱氨酸来取代谷胱甘肽就更为经济。在两种复性方法中, 又都用不同的蛋白质浓度: 0.01mg/ml、0.1mg/ml, 活性测定结果表明: 当蛋白质浓度为 0.01mg/ml 时, 复性效果好。表明蛋白质浓度低有利于分子内肽链重新折叠, 而不利于分子间相互作用, 从而提高复性效率^[13]。因为没有标准品, 活性无法定量, 故用本实验室所纯化的人血浆纤溶酶原作为阳性对照; 含 SK 的缓冲液作阴性对照。

Wu H L 等人在 1987 年^[14]用血浆 Plg 经 Plm 自身水解后得到的 mPlg 来研究, 发现

洗涤, 结果表明: 在 2% Triton X-100 洗涤后再用 2mol/L 尿素洗涤, 效果最好, 杂蛋白明显减少, mPlg 相对含量增高。

洗涤后包涵体用 8mol/L 尿素分别在 10℃、37℃、56℃ 作用 1h, 发现在 10℃ 时, 包涵体几乎不溶解, 37℃、56℃ 仅部分溶解, 但两者没有明显差异, 说明变性温度影响蛋白质的溶解。因含有链内和链间非活性的二硫键, 在溶解包涵体时, 必须加入还原剂使半胱氨酸还原, 断裂已存在的二硫键, 释放出单个多肽链。所以用 8mol/L 尿素于 10℃ 作用 1h 以去除部分杂蛋白后, 沉淀再用含 9mol/L 尿素、10mmol/L β -ME 的缓冲液于 37℃ 变性 3h, 包涵体几乎完全溶解, 说明变性剂和还原剂浓度及变性时间对蛋白质的溶解也有所影响。

为了减少 mPlg 与杂蛋白之间形成二硫键的可能, 包涵体溶解后, 先进行纯化, 然后再复性。

mPlg 激活后具有完全的纤溶活性,以后又研究发现,Plg 轻链上存在 SK 特异性结合位点^[4]。我们用基因工程方法克隆和表达了 mPlg 基因,并通过体外复性,得到具有活性的 mPlg,为进一步研究 Plg 的结构和功能及其与激活剂间的相互作用机制创造了条件。

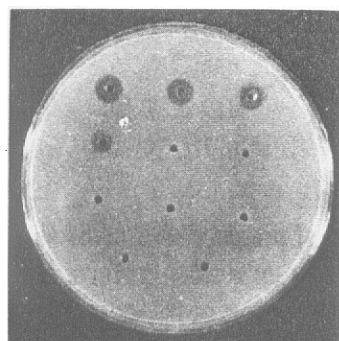


图2 溶圈法鉴定复性 60h 后 mPlg 的纤溶活性

Fig.2 Identification of fibrinolysis activity of r-mPlg after refolding for 60h

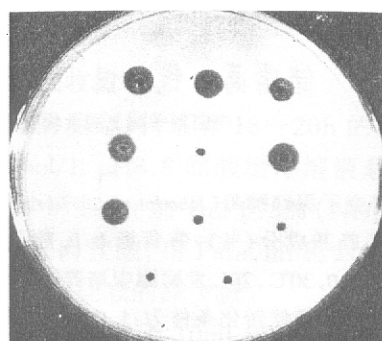


图3 溶圈法鉴定复性 1 周后 mPlg 的纤溶活性

Fig.3 Identification of fibrinolysis activity of r-mPlg after refolding for one week

1.2.3. Human Plg 4.5. Refolding in buffer A:0.01mg/ml, 0.1mg/ml r-mPlg, respectively
6.7. Refolding in buffer B:0.01mg/ml, 0.1mg/ml r-mPlg, respectively 8.9. r-mPlg after IEC 10.11. Buffer

参 考 文 献

- [1] Wiman B, Wiman P. Eur J Biochem. 1975, 37:387~394.
- [2] Novokhituy V V, Kulinov S A, Privalov P L. J Mol Biol. 1984, 179:215~232.
- [3] Pattly L. Cell. 1985, 41:657~663.
- [4] Dawn K M, Micichill J M, Rapt R H. et al. Biochemistry. 1994, 33:12041~12047.
- [5] Ponting C P, Holland S K, Ledinhdn-Willis S A. et al. Biochimica Biophysica Acta. 1992, 1150:155~161.
- [6] Him C K. Cancer and Metastasis Rev. 1992, 11:291~311.
- [7] Gury-Yuh Shi, Wu H L. J Biol Chem. 1988, 263(32):17011~17015.
- [8] 金冬雁译,分子克隆实验指南,第二版,北京:科学出版社,1992.
- [9] Laemmili U K. Nature. 1970, 227:680.
- [10] Burnette W N. Anal Biochem. 1981, 112:195~203.
- [11] Buchmer J, Rudolph R. Bio/Technol. 1991, 9:157~162.
- [12] Hoess A, Arthur G K, Wanmer G, et al. Bio/Technol. 1988, 6:1214~1217.
- [13] Deloskey R J, Dyk D K, Van Aken T E, et al. Arch Biochemi Biophys. 1994, 311(1):72~78.
- [14] Wu H L, Gury-yuh shi, Proc Natl Acad Sci USA. 1987, 84:8292~8295.

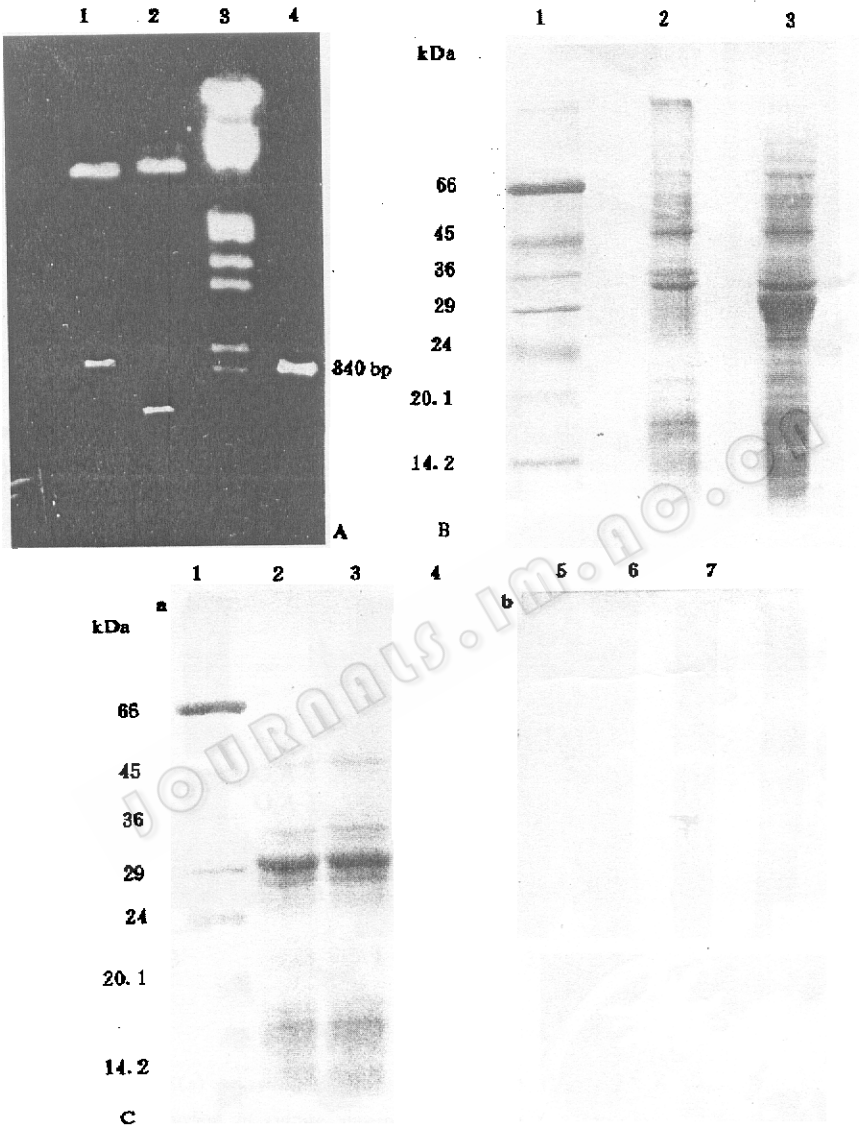
Construction and Expression of Human Micro-Plasminogen Gene in *Escherichia coli*

Shen Junqing Song Houyan

(Department of molecular genetics, Shanghai Medical college, Shanghai 200032)

Abstract Human mPlg was amplified by PCR, using pBS-S1 cDNA encoding human plasminogen as a template. The mPlg gene was cloned into expression vector and transfected into *E. coli* JF1125. SDS-PAGE analysis revealed that expression product was Mr. 29 and about 24% of total bacteria protein and formed inclusion body. After refolding by Air Oxidation and Cysteine Reoxidation, the fibrinolysis activity of r-mPlg was shown. Effects of protein concentration and refolding time on re-naturation efficiency were discuss.

Key words Human microplasminogen, cloning, expression, refolding



A. Analysis of PCR product and pSSE-mPlg after restrictive enzyme digestion by agarose gel electrophoresis
1. pSSE-mPlg/EcoR I + BamH I : 822bp; 2. pSSE-mPlg/EcoR V + BamH I : 597bp; 3. Marker: λ/Hind III + EcoR I
4. PCR product
B. SDS-PAGE analysis of the expression product
1. Protein molecular weight markers
2. Total protein of pSSE-mPlg/JF 1125 before the induction

3. Total protein of pSSE-mPlg/JF 1125 after the induction
C. Western Blot analysis of the expression product
a. Coomassie brilliant blue stain
b. Western blot
1. Protein molecular weight markers
2. 3. 5. 6. Total protein of pSSE-mPlg/JF 1125 after the induction
4. 7. Human Plg