

hK-Fc 融合蛋白的改良、表达及其生物活性的分析

周同¹, 陶建军¹, 李林国¹, 侯永敏², 余龙¹

1 复旦大学遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

2 广东天普生化医药股份有限公司, 广州 510520

摘要: 为了延长人激肽释放酶(hK)的血清半衰期, 提高分泌蛋白的产率, 制备了重组激肽释放酶-IgG1 Fc 融合蛋白(hK'-Fc)。采用 PCR 扩增 *hK* 基因和 IgG1 的 *Fc* 序列, 用鼠源信号肽序列替换 *hK* 基因原有的信号肽序列, 构建改良型融合蛋白 hK'-Fc 以及天然型融合蛋白 hK-Fc 的表达载体, 转染中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞, 筛选稳定分泌融合蛋白的细胞株, 通过 Western blotting 鉴定信号肽改造效果, 利用 Protein A+G 亲和层析柱纯化融合蛋白, 酶学实验检测融合蛋白的体外活性。结果表明: 成功构建了 pcDNA-hK'-Fc 以及 pcDNA-hK-Fc 重组表达载体; 获得了稳定表达融合蛋白的细胞株, 产量达 11 mg/L 以上; 信号肽改造后融合蛋白的分泌效率提高约 5~10 倍; 融合蛋白能水解其特异性的底物 S-2266, 具有生物学活性。本研究为进一步探讨融合蛋白的体内半衰期打下了坚实基础, 也为研制治疗脑梗塞疗效更好的第二代 hK 蛋白和其他药用蛋白的改良提供新的线索。

关键词: 激肽释放酶, hK'-Fc 融合蛋白, 血清半衰期, 信号肽改造, 酶活性

Modification, expression and bioactivity analysis of hK-Fc fusion protein

Tong Zhou¹, Jianjun Tao¹, Linguo Li¹, Yongmin Hou², and Long Yu¹

1 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433, China

2 Techpool Bio-Pharma Co., Ltd., Guangzhou 510520, China

Abstract: To prolong serum half-life of human kallikrein (hK) and enhance its secretion rate, we modified *hK* gene and constructed a new form of recombinant hK protein (hK'-Fc). We amplified *hK* gene and *Fc* sequence, replaced the signal peptide of *hK* gene with murine signal peptide, constructed native expression plasmid of pcDNA-hK-Fc and modified expression plasmid of pcDNA-hK'-Fc, then transfected to CHO cells respectively. After the stable cell lines were screened, we compared the secretion rate between native fusion protein and modified fusion protein, purified fusion protein through Protein A+G affinity chromatography column and investigated the bioactivity of fusion protein. The results showed that recombinant vectors encoding fusion protein hK-Fc and hK'-Fc were constructed successfully; CHO cell lines stably secreting fusion protein were obtained, the yield is higher than 11 mg/L; Secretion rate was enhanced by 5–10 times after the signal peptide of fusion protein was modified; Fusion protein has enzymatic activity *in vitro*. The above results could promote the following researches on serum half-life of the fusion protein and develop a new stroke medicine with better clinical efficacy.

Keywords: kallikrein, hK'-Fc fusion protein, serum half-life, signal peptide, bioactivity

Received: July 10, 2009; Accepted: September 30, 2009

Corresponding author: Long Yu. Tel: +86-21-6564-3954; Fax: +86-21-6564-3404; E-mail: Longyu@fudan.edu.cn

人激肽释放酶 1(Human Kallikrein 1, 以下简称为 hK)是人体丝氨酸蛋白酶家族的一个亚族成员^[1]。它在人体内分布广泛, 主要存在于胰腺、脾脏、唾液腺、下丘脑、肾脏及尿液中等^[2-5]。hK 蛋白相对分子量为 43 kD, 其成熟蛋白由 238 个氨基酸组成^[6]。激肽释放酶在人体内主要作用于激肽原(Kininogen), 使之水解为激肽(Kinin)^[7], 从而激活下游通路行使一系列生理功能, 如扩张毛细血管、松弛血管平滑肌、增加血流量、降低血压、抗凝、溶血栓、降低血液粘度等^[8-10]。

目前, hK 蛋白在临床上用于治疗急性脑梗塞。广东天普生化医药股份有限公司成功地从男性尿液中提取出 hK 蛋白并制成粉末制剂, 用于改善病人的脑部血流供应^[11]。尽管 hK 蛋白是当前临床上治疗急性脑梗塞的一种有效药物, 但是它在临床应用上仍存在血清半衰期短的问题。因此, 如何延长 hK 蛋白在人体内的血清半衰期, 使其药效更为持久是一个重要的研究课题。解决这一重要问题, 不仅可以在临床获得更好的疗效, 同时还可减少用药剂量和用药次数, 为患者减轻痛苦和经济负担。目前已有报道药用蛋白与 IgG1 重链的 Fc 片段融合表达可显著延长目的蛋白的半衰期, 甚至提高其体内生物活性。临床上使用的一些细胞因子和受体药物的改造已经取得了明显的成功, 如: IL-2、TNF- α 、IFN- α 等^[12-13]。

为了延长 hK 蛋白的体内半衰期, 本研究将 hK 基因与 Fc 序列进行融合表达, 筛选稳定表达融合蛋白的细胞株, 并试图通过细胞表达的方式来生产融合蛋白, 以降低药物的生产成本, 规避天然源 hK 药物蛋白生产中可能遇到的某些安全问题。在前期的预实验中发现 hK 重组蛋白分泌产量较低, 远不能达到规模化生产的要求。为了提高融合蛋白的分泌效率, 特别对 hK 基因的信号肽序列进行了改造。根据 Coloma 等利用小鼠抗体轻链 Ig κ 的信号肽(Ig κ -chain leader sequence)构建的高效蛋白表达分泌载体^[14], 用信号肽分析软件 Signal P^[15-16]对该段鼠源信号肽及 hK 蛋白原有信号肽进行分析, 发现鼠源信号肽替换 hK 信号肽有可能提升蛋白的分泌效率。所以, 本研究用鼠源信号肽序列替换了 hK 基因原有

的信号肽序列, 结果表明这种重组设计确实能提高融合蛋白的分泌效率, 可以达到使细胞株高效产出融合蛋白的目的。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及抗体

预染的蛋白 Marker, 脂质体 LipfectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品; 各种限制性内切酶 (*Bam*H I、*Xho* I、*Eco*R I)、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、Pyrobest 酶、DL2000 DNA marker 均为大连 TaKaRa 公司产品; 小量质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 中量质粒抽提试剂盒为上海 Tiangen 公司产品; NC 膜购自上海华舜公司; HyQ SFMCHO CHO 细胞专用无血清培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清(FCS)、DMEM 培养基购自 GIBCO 公司; 兔抗人 hK 多克隆抗体为深圳晶美生物工程有限公司产品; 鼠抗人 IgG1 Fc-HRP 单克隆抗体为上海中科英沐生物有限公司产品; G418 购自 Sigma 公司; 引物合成及 DNA 测序由 Invitrogen 公司完成; 底物 S-2266 为武汉彼尔生物医药技术有限公司产品; hK 蛋白标准品为广东天普生化制药有限公司产品。

1.2 载体与细胞

克隆载体 pcDNATM3.1/*myc*-His(-) A 为 Invitrogen 公司产品; pCMV-hK 重组载体为本室保存; pMD18-T-Fc 重组载体由苏州大学生物技术研究院惠赠; 中国仓鼠卵巢细胞株 CHO 购自中国科学院细胞库。

1.3 实验引物

用来扩增人肾 hK 基因的引物为 hK F 和 hK R3, 扩增人脾脏 Fc 序列的引物为 Fc-F2 和 Fc-R。用于信号肽改造的 4 个正向引物为 Ig maF、hK IgF2、hK IgF3 和 hK IgF4, 反向引物都是 hK R3。引物的具体序列和酶切位点设计见表 1。

1.4 hK 基因、改良型 hK 基因(hK')和 IgG1 Fc 片段的扩增

以重组载体 pCMV-hK 为模板, 用引物 hK F 和 hK R3 扩增 hK 基因。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 62°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 扩增 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。以重组载体

表 1 实验所需引物的序列

Table 1 Primers used in the study

Primer	Sequence (5'-3')
hK F	GTG <u>ACTCGAG</u> ACCATGGGGTTCCTGGTTCTGTGC (<i>Xho</i> I)
hK R3	ATCTGAATTCGGAGTCTCCGCTATGGTGTC (<i>Eco</i> R I)
Fc-F2	GTG <u>AGAATTC</u> GGCGACGAGCC CAAATCTTGTGACAAA (<i>Eco</i> R I)
Fc-R	ATCTGGATCCTCATTTACCC GGGGACAGGGAG (<i>Bam</i> H I)
Ig maF	CCAGGTTCCACTGGTGACATTGTGGGAGGCTGGG
hK IgF2	TACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTG
hK IgF3	CACACTCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGG
hK IgF4	GTG <u>ACTCGAG</u> ACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGG (<i>Xho</i> I)

The restriction enzyme sites for *Eco*R I (GAATTC), *Bam*H I (GGATCC) and *Xho* I (CTCGAG) included in the PCR primes are indicated by underlining.

pMD18-T-Fc 为模板, 用引物 Fc-F2 和 Fc-R 扩增人 IgG1 重链 *Fc* 序列, PCR 反应条件为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 扩增 35 个循环; 最后 72°C 延伸 4 min。PCR 产物用胶回收试剂盒进行纯化。*hK'*基因的扩增利用逐步延伸 PCR 的方法, 分 4 轮 PCR 逐段的将鼠源信号肽序列添加到 *hK* 基因成熟序列区 N 末端。第一轮 PCR 以 pCMV-hK 为模板, 以 Ig maF 和 hK R3 为双向引物, 在 *hK* 成熟基因 N 末端添加 18 bp 的鼠源信号肽 C 末端序列; 第二轮 PCR 以上一轮 PCR 产物为模板, 以 Ig F2 和 hK R3 为双向引物, 将鼠源信号肽序列的 17 bp 添加到上一轮产物 N 末端; 如此循环, 每一轮 PCR 以上一轮 PCR 产物为模板, 利用部分配对的引物逐步在 *hK* 成熟基因 N 末端延伸鼠源信号肽序列, 最终将小鼠 Ig κ 链信号肽序列添加到 *hK* 基因成熟序列区 N 端。

1.5 重组表达载体的构建和验证

Xho I 和 *Eco*R I 双酶切处理 *hK* 基因的 PCR 回收产物以及相应空载体 pcDNA 3.1, 连接酶切产物, 构建 pcDNA-hK, 转化 DH5 α 感受态细菌, 挑取阳性克隆并进行验证。测序结果正确后, *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切处理 pcDNA-hK 和 *Fc* 序列的胶回收产物。重复连接和转化步骤, 最终得到重组表达载体 pcDNA-hK-Fc。通过酶切、PCR 和测序验证后, 中量提取质粒 DNA 以备转染 CHO 细胞用。改良型重组表达载体 pcDNA-hK'-Fc 的构建, 是用 *hK'*基因代替 *hK* 基因, 其他具体实验步骤同 pcDNA-hK-Fc 的构建。

1.6 稳定细胞株的构建

CHO 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中。转染前 24 h, 将 CHO 细胞以 5×10^5 个/mL 的密度传代至 35 mm 培养皿。转染前 0.5 h 换一次培养基。转染的具体步骤参照 Lipfectamine 2000 的说明书。转染 6 h 后换一次培养液。24 h 后, 将细胞以 1:2000 的比例传代至 100 mm 培养皿中。同时, 加入 G418 至终浓度为 600 μ g/mL 进行稳定株筛选。14 d 后将培养皿中形成的细胞单克隆挑至 96 孔板培养。待细胞长满后将每株单克隆转入 24 孔板扩大培养, 然后鉴定每个克隆的目的蛋白表达并筛选稳定表达株。

1.7 融合蛋白的鉴定

1.7.1 Western blotting 检测

将细胞从 10%胎牛血清培养基中换入 HyQ SFMCHO 无血清培养基中培养 3 d, 收集上清, 10 000 \times g 离心 5 min。取 80 μ L 细胞上清, 加 20 μ L 5 \times SDS loading buffer, 混匀。每个 35 mm 培养皿的细胞直接用 400 μ L 1 \times SDS loading buffer 裂解。各样品于 95°C 加热 10 min 后上样, 进行 SDS-PAGE 电泳。室温 80 V, 30 min, 然后 120 V 电压下继续电泳 2 h。4°C 下用湿式电转移仪恒压 100 V、2.5 h 进行转膜。封闭后相继加入一抗(1:5000)和二抗(1:5000)孵育后, ECL 发光试剂显影曝光。本实验分别用抗 hK 蛋白的多克隆抗体和抗 Fc 片段的单克隆抗体分别对融合蛋白进行检测。

1.7.2 融合蛋白产量的鉴定

将细胞置于无血清培养基中培养 3 d, 收集细胞上清进行 Western blotting 检测。以 hK 蛋白标准品

为对照, 设立不同的浓度梯度。利用 Quantity One 软件比较分析曝光后的条带强度, 再计入摩尔质量差异以及电泳上样稀释度等因素, 最终确定细胞稳定株上清中融合蛋白的浓度。

1.8 信号肽改造效果的鉴定

1.8.1 瞬时转染鉴定信号肽改造效果

转染前 24 h, 将 CHO 细胞以 5×10^5 个/mL 的密度传代至 2 个 24 孔中。转染前 0.5 h 换新的培养液, 每孔 500 μ L 培养液。分别用 400 ng 的 pcDNA-hK-Fc 和改良后的 pcDNA-hK'-Fc 重组质粒 DNA 瞬时转染 CHO 细胞。72 h 后分别收取细胞和上清, 检测等量的细胞对应的上清中融合蛋白含量的差异。

1.8.2 稳定转染鉴定信号肽改造效果

将 2 株分别稳定表达 hK-Fc 和 hK'-Fc 融合蛋白的细胞株以 5×10^5 个/mL 的密度等量接种在 2 个 24 孔中。培养 72 h 后, 收取上清并裂解细胞。在调整 2 株稳定株细胞内融合蛋白表达量一致的前提下, 比较对应的上清中融合蛋白含量的差异。

1.9 融合蛋白的纯化

细胞稳定株置于无血清培养基中培养 72 h, 收集培养上清, 2000 \times g 离心 5 min, 真空冷凝浓缩后用原体积 1/10 体积的灭菌水溶解蛋白, PBS(pH 7.4) 透析过夜。然后通过 Amersham pharmacia 公司的 Protein A+G 亲和层析柱纯化, 收集洗脱液。收获的融合蛋白再经 12% SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 进行定性定量分析。

1.10 融合蛋白酶活性分析

1.10.1 融合蛋白酶活性值的测定

取试管 3 支, 第 1 管为空白对照管, 2、3 管为测定复管。各精密加入样品溶液 0.1 mL 和 0.2 mol/L Tris 缓冲液 2.0 mL, 混匀, 置 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 水浴中保温 5 min, 向第 1 管中加入 50% 醋酸溶液 0.2 mL, 其余 2 管中加入底物溶液 0.2 mL, 立即摇匀并计时。置于 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 水浴中准确反应 15 min, 向第 1 管中加入底物溶液 0.2 mL, 向第 2、3 管中加入 50% 醋酸溶液 0.2 mL, 在 405 nm 波长处测定, 以第 1 管为空白, 测定 2、3 管的吸收值 A , 将 A 值代入下式计算: $\text{PNA 单位/mL} = 173.6 \times A \times T / 1000$, 其中 173.6 为反应常数; T 为稀释倍数; 1000 为单位/L 与单位/mL 的单位换算值。

1.10.2 融合蛋白酶活性曲线分析

实验组 1: 取试管 2 支, 分别加入 0.2 mol/L Tris 缓冲液 1 mL 和 0.1 mL 底物 S-2266, 置 37°C 水浴中保温 5 min。以其中一管作为空白对照管, 另一管精密加入融合蛋白稀释液 0.05 mL, 摇匀, 分光光度计开始连续测定 405 nm 紫外光激发下的样品吸光值。每 2 min 测一次吸光值, 将 1 h 内的所有吸光值绘成曲线图进行分析。实验组 2: 取试管 2 支, 分别加入 0.2 mol/L Tris 缓冲液 1 mL 和融合蛋白 0.05 mL。置 37°C 水浴中保温 5 min。以其中一管作为空白对照管, 另一管精密加入 0.1 mL 底物 S-2266, 摇匀。紫外分光光度计开始连续测定 405 nm 紫外激发下的吸光值。2 min 测一次值, 将 1 h 内的所有吸光值绘成曲线图进行分析。

2 结果

2.1 hK 基因、Fc 序列以及 hK' 基因的克隆

以 pCMV-hK 为模板扩增出 hK 全长基因, 人肾 hK 基因全长 789 bp; 以 pMD18-T-Fc 载体为模板扩增 Fc 序列。人脾脏 IgG 1 的 Fc 序列全长为 699 bp (图 1)。电泳结果均与理论值相符。

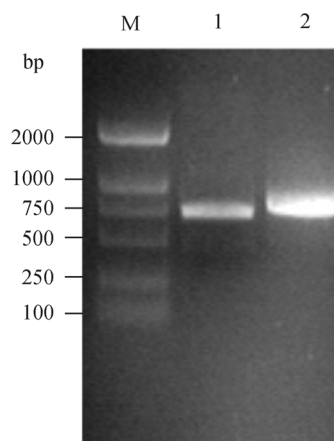


图 1 hK 基因和 Fc 序列的扩增

Fig. 1 PCR product of hK gene and Fc sequence. M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of Fc sequence; 2: PCR product of hK gene.

hK' 基因的扩增通过 4 轮 PCR (图 2), 将小鼠 Ig κ 链的信号肽序列成功融合到了 hK 成熟基因的 N 末端, 从而获得了 hK' 基因。电泳显示 hK' 基因大小约 780 bp, 与预测大小相符 (图 3)。

2.2 融合蛋白表达载体的构建与鉴定

用 *EcoR* I/*Xho* I 双酶切 *hK* 基因后将其插入 pcDNA 3.1 空载体, 获得 pcDNA-hK 重组载体, 鉴定组装成功后用 *EcoR* I/*Bam*H I 双酶切 *Fc* 序列, 将其装入重组载体 pcDNA-hK, 构建 pcDNA-hK-Fc。筛选的阳性克隆进行双酶切鉴定(图 4A)、PCR 鉴定(图 4B)和测序验证, 结果表明成功构建了 pcDNA-hK-Fc 融合蛋白表达载体。改良型重组表达载体 pcDNA-hK'-Fc 的构建与鉴定步骤同 pcDNA-hK-Fc。

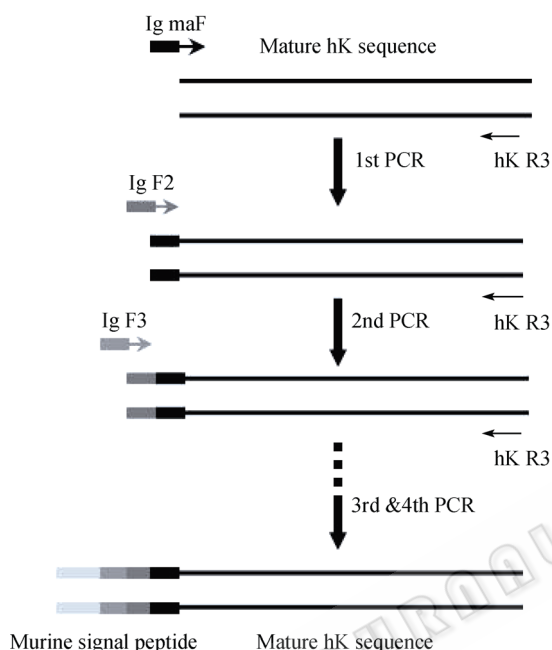


图 2 逐步延伸 PCR 克隆 *hK'* 基因

Fig. 2 Cloning of *hK'* gene.

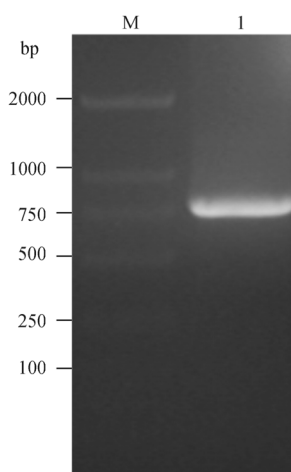


图 3 *hK'* 基因最终 PCR 产物

Fig. 3 Final PCR product of *hK'* gene. M: DNA marker DL2000; 1: *hK'* gene.

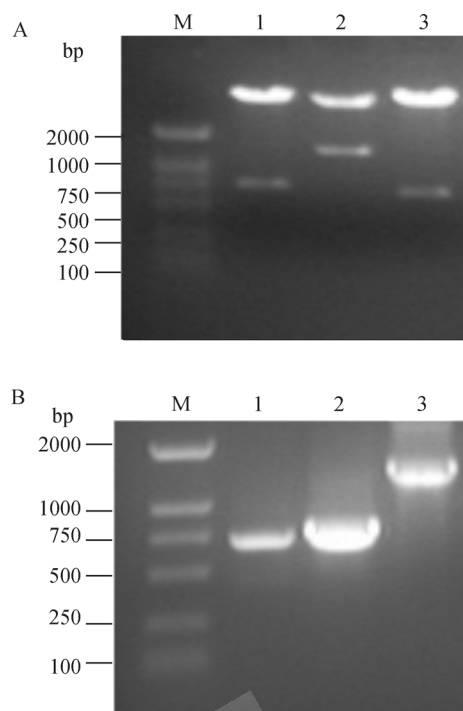


图 4 真核重组表达载体 pcDNA-hK-Fc 的酶切(A)和 PCR 鉴定(B)

Fig. 4 Restriction enzyme analysis (A) and PCR analysis (B) of pcDNA-hK-Fc. (A) M: DNA marker DL2000; 1: *hK* gene, pcDNA-hK-Fc digested with *EcoR* I/*Xho* I; 2: *hK*-Fc sequence, pcDNA-hK-Fc digested with *Xho* I/*Bam*H I; 3: *Fc* sequence, pcDNA-hK-Fc digested with *EcoR* I/*Bam*H I. (B) M: DNA marker DL2000; 1: *Fc* sequence, pcDNA-hK-Fc amplified with primers Fc-F2 and Fc-R; 2: *hK* gene, pcDNA-hK-Fc amplified with primers hK F and hK R3; 3: *hK*-Fc sequence, pcDNA-hK-Fc amplified with primers hK F and Fc-R.

2.3 融合蛋白的表达和鉴定

Western blotting 检测稳定株的细胞和上清中的目的蛋白 hK'-Fc。为了确证目的蛋白, 本实验同时用抗 hK 蛋白的多克隆抗体(图 5A)和抗 Fc 片段的单克隆抗体(图 5B)这两种抗体对融合蛋白进行检测。图 4 显示在稳定株的细胞和上清中都有目的蛋白的大量表达, 而阴性对照 CHO 细胞及其上清无对应条带检出, 由此确定筛选得到的稳定株可以大量地表达和分泌融合蛋白, 融合蛋白的分子量约 66 kD。

2.4 信号肽改造效果鉴定

取瞬转了 pcDNA-hK-Fc 和 pcDNA-hK'-Fc 的细胞裂解液和上清进行 Western blotting 检测(图 6A)。每个 24 孔的细胞用 100 μ L 裂解液裂解, 上样 20 μ L。结果显示细胞内表达 hK-Fc 和 hK'-Fc 两种融合蛋白的量基本一致。同时每个 24 孔有 500 μ L 培养上清, 上样 25 μ L。结果显示细胞上清中融合蛋白 hK'-Fc

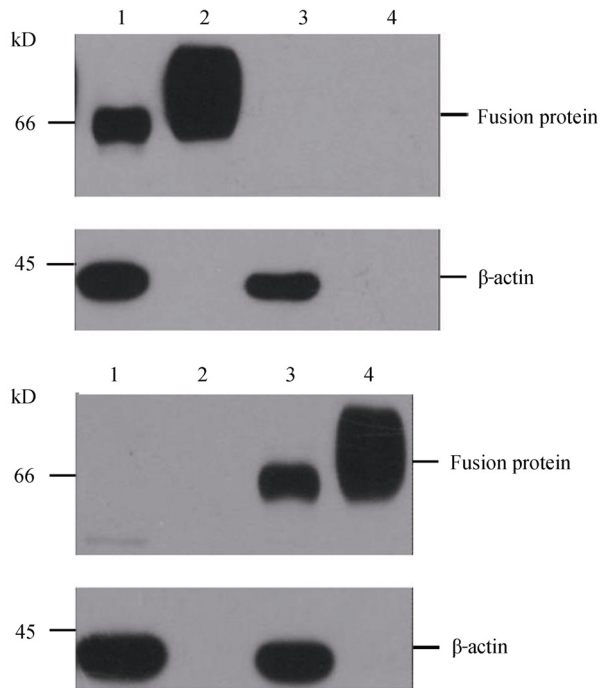


图5 hK多抗(A)和Fc单抗(B)鉴定融合蛋白

Fig. 5 Identification of fusion protein by anti-hK polyclonal antibody (A) and anti-Fc monoclonal antibody (B). (A) 1: stable cell lines; 2: supernate of stable cell lines; 3: CHO cells; 4: supernate of CHO cells. (B) 1: CHO cells; 2: supernate of CHO cells; 3: stable cell lines; 4: supernate of stable cell lines.

的量显著高于 hK-Fc 的量。稳定转染检测中, 筛选得到稳定分泌 hK-Fc 的细胞株 T8 和稳定分泌 hK'-Fc 的细胞株 Z97。因为稳定株自身表达量不一致, 所以先进行调平实验。12 μ L 的 T8 细胞和 3 μ L Z97 细胞中融合蛋白的表达量基本一致。同比例条件下, 比较 12 μ L 的 T8 上清和 3 μ L 的 Z97 上清中融合蛋白的量。结果表明, Z97 的上清中融合蛋白的量远远大于 T8 上清中融合蛋白的量(图 6B)。综合瞬时转染和稳定转染的数据, 发现信号肽改造后蛋白的分泌效率可以提高约 5~10 倍。

2.5 细胞稳定株的分泌量测定

取无血清上清样品进行 Western blotting 检测。以 hK 蛋白标准品为对照, 设立 1 ng、3 ng、5 ng、7 ng、9 ng、11 ng 6 个浓度。比较上清样品和标准浓度梯度的曝光条带强度关系, 计入摩尔质量的差距以及上样的稀释度, 最终确定细胞稳定株上清中融合蛋白的浓度。从图 7 可以得出稳定株 Z58 分泌 hK'-Fc 融合蛋白的产量为 11.25 mg/L。

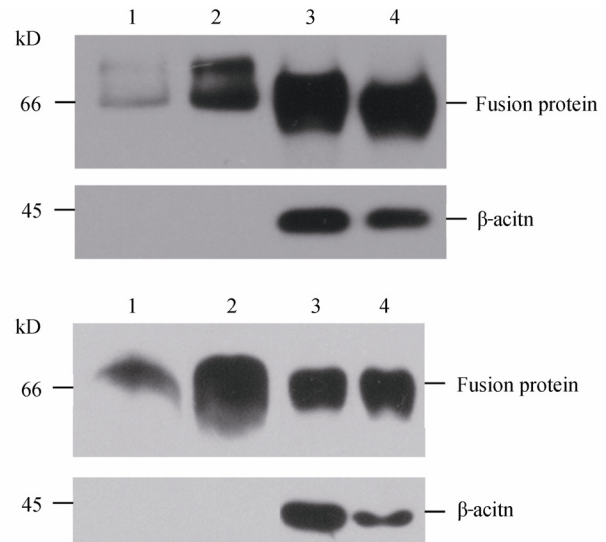


图6 信号肽改造效果的瞬时转染(A)和稳定转染(B)鉴定
Fig. 6 Comparison of secretion rate by transient transfection (A) and stable transfection (B). (A) 1: supernate of pcDNA-hK-Fc; 2: supernate of pcDNA-hK'-Fc; 3: pcDNA-hK-Fc cells; 4: pcDNA-hK'-Fc cells. (B) 1: supernate of T8; 2: supernate of Z97; 3: T8 cells; 4: Z97 cells. T8: stable cell line secreting hK-Fc; Z97: stable cell line secreting hK'-Fc.

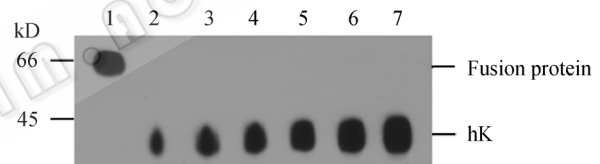


图7 细胞稳定株分泌融合蛋白的产量鉴定

Fig. 7 Yield determination of stable cell lines. 1: supernate sample; 2: 1 ng hK protein; 3: 3 ng hK protein; 4: 5 ng hK protein; 5: 7 ng hK protein; 6: 9 ng hK protein; 7: 11 ng hK protein.

2.6 融合蛋白的纯化与鉴定

收集的无血清上清经离心浓缩, PBS(pH 7.4)透析过夜后, 用 Protein A+G 亲和层析柱纯化, Western blotting 测定收集洗脱峰蛋白。纯化后的融合蛋白通过 SDS-PAGE 电泳鉴定(图 8)。结果显示: 上清样品经过一步亲和层析纯化呈现单一的 66 kD 的条带, 与 Western blotting 的条带一致。因此该条带为融合蛋白 hK'-Fc 条带, 其相对分子量为 66 kD, 比理论值稍大, 可能是受蛋白质糖基化的影响。

2.7 融合蛋白酶活性的测定

经过和特异性底物 S-2266 的酶学反应, 测得融合蛋白 hK'-Fc 的活性值为 1.77 PNAU/mL。该值说

明融合蛋白具有生物学活性。本实验还研究分析了融合蛋白 hK'-Fc 水解底物 S-2266 的反应曲线, 以进一步验证融合蛋白的生物活性。为了避免融合蛋白或者底物自身吸光值的变化对测定实验的影响, 做两组同步对照实验: 实验组 1 和实验组 2。实验组 1 中, 先在空白对照管和反应管中加入反应缓冲液和底物溶液, 再向反应管加入融合蛋白稀释液进行反应并开始测定吸光值变化; 实验组 2 中, 先在空白对照管和反应管中加入反应缓冲液和融合蛋白稀释液, 再向反应管加入底物溶液进行反应并开始测定。从图 9 可以看出, 1、2 两组对照试验的曲线斜率和吸光值增长幅度基本一致, 斜率分别为 0.0603 和 0.0615, 增长幅度分别为 0.057 和 0.061。这说明曲线的变化完全是因为特异性的酶解反应造成的。由此结果可以断定: 融合蛋白具有生物学活性, 它可以特异性地水解其底物 S-2266。

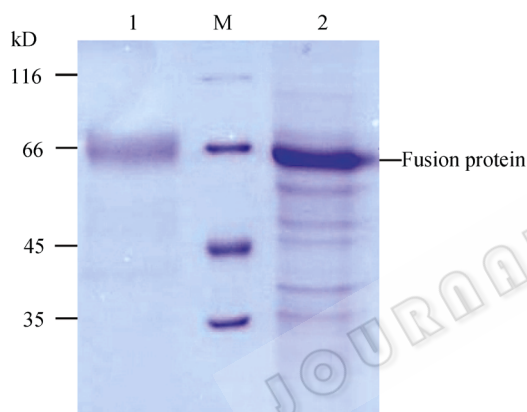


图 8 纯化后融合蛋白的鉴定

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein. 1: purified fusion protein sample; 2: supernate sample before purification.

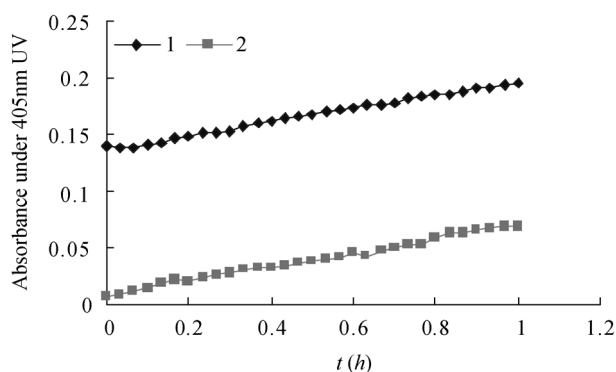


图 9 融合蛋白的酶活曲线

Fig. 9 Bioactivity analysis of fusion protein. 1: assay 1-fusion protein was added in reaction solution (buffer+S-2266); 2: assay 2-S-2266 was added in reaction solution (buffer+fusion protein).

3 讨论

由于蛋白结构的特异性, hK 蛋白在人体内水解速度较快。临床实验中, 健康成人静脉滴注后 30 min 血药浓度即迅速下降, 消除相的半衰期 $T_{1/2\beta}$ 仅为 156~197 min。通常, 病人在疗程内每天滴注一支 hK 蛋白制剂。但从上述实验得知的 hK 体内半衰期时程来看, 每天给药一次显然不足以维持 24 h 的药效。因此设法延长 hK 蛋白的血清半衰期将可有效提高病人的治疗效果, 降低治疗费用。

人体免疫球蛋白 IgG 被木瓜蛋白酶水解后会产生 2 个 Fab 片段以及一个 Fc 片段。IgG 的血清半衰期长达 21 d, 与 Fc 片段关系密切^[17]。目前研究表明, 将目的蛋白与 IgG1 重链的 Fc 片段融合表达, 可以有效地延长目的蛋白的血清半衰期, 甚至提高其生物活性。促红细胞生成素(EPO)通过和 Fc 片段融合表达, 显著地延长了其体内半衰期^[17]。Enbrel(TNFR-Fc)是临床上另一种成功的融合蛋白药物, TNF 抑制剂与 Fc 片段融合后显著地延长了药物蛋白在体内的半衰期, 并增强了其生物学活性。

本研究借鉴以往的研究策略, 将 hK 蛋白与 IgG1 重链的 Fc 片段融合表达, 摸索延长 hK 蛋白血清半衰期的方法。本研究采用了酶切连接的方法依次将 hK 基因(或者改造了信号肽序列的 hK'基因)和 Fc 序列装入 pcDNA 3.1 真核表达载体, 成功实现了融合蛋白的表达, 筛选到稳定表达融合蛋白的细胞株, 然后通过一步亲和层析纯化便得到了融合蛋白。hK 蛋白经过与 Fc 片段融合表达, 使纯化步骤大大简化, 可降低将来工业上批量纯化的难度, 节省生产成本。还通过酶学实验证明了所得的融合蛋白具有生物活性, 为下一阶段系统开展药物动力学和药效学试验奠定了坚实的基础。

同时, 为了提高蛋白分泌效率, 还对 hK 蛋白的信号肽进行了改造, 用小鼠 Ig κ 链信号肽置换 hK 蛋白原信号肽。结果发现改造后的融合蛋白分泌效率可以提高约 5~10 倍。实验得到的中等产量的细胞株 Z58 分泌产量即达到 11 mg/L 以上, 表达量最高的细胞稳定株产量预计可达到 15~20 mg/L。对比同类实验, 田瑞阳等在 COS-7 贴壁细胞中表达了 TACI-Fc 和 BCMA-Fc 融合蛋白, 产量为 2 mg/L^[18]; 杨建军等

利用悬浮细胞生产 rhEPO-Fc 融合蛋白, 产量为 2 g/L^[19]; Chan 等在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中表达了 hK 蛋白的前体, 产量达 30 mg/L^[20]; 黄秀东等在甲醇酵母中表达了 hK 蛋白, 产量达 1.25 g/L^[21]; Wang 等在 *E. coli* 中表达了 hK 蛋白, 产量为 30~50 mg/L^[22]。从以上数据可以看出, 对于贴壁细胞真核表达系统, 本实验筛选到的细胞稳定株产量非常高, 已经接近毕赤酵母和大肠杆菌的分泌产量。经过近 20 次的传代培养以及多次冻存复苏测试, 产量基本不变。因此, 本实验中 hK 蛋白信号肽改造是相当成功的。该结果有助于将来在 CHO 悬浮细胞中实现融合蛋白的高效分泌, 可为未来的规模化生产降低成本, 也为其他药用蛋白的改良研究提供了新的线索。

REFERENCES

- [1] Yousef GM, Diamandis EP. An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumor markers. *Clin Biochem*, 2003, **36**(6): 443.
- [2] Fukushima D, Kitamura N, Nakanishi S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for human pancreatic kallikrein. *Biochemistry*, 1985, **24**(27): 8037–8043.
- [3] Barker AR, Shine J. Human kidney kallikrein: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA*, 1985, **4**(6): 445–450.
- [4] Chao J, Woodley C, Chao L, *et al.* Identification of tissue kallikrein in brain and in the cell-free translation product encoded by brain mRNA. *J Biol Chem*, 1983, **258**(24): 15173–15178.
- [5] Nolly H, Scicli AG, Scicli G, *et al.* Characterization of a kininogenase from rat vascular tissue resembling tissue kallikrein. *Circ Res*, 1985, **56**(6): 816–821.
- [6] Evans BA, Yun ZX, Close JA, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human renal kallikrein gene. *Biochemistry*, 1988, **27**(9): 3124–3129.
- [7] Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*, 1992, **44**(1): 1–80.
- [8] Pesquero JB, Bader M. Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. *Braz J Med Biol Res*, 1998, **31**(9): 1197–1203.
- [9] Campbell DJ. The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001, **28**(12): 1060–1065.
- [10] Erdős EG. Kinins, the long march—a personal view. *Cardiovasc Res*, 2002, **54**(3): 485–491.
- [11] Fu HL, Wu JT, Wang XY, *et al.* Application of human urokininogenase in preparing medicine for preventing and treating cerebral infraction: CN, 1403156. 2003-03-19.
- [12] Jones TD, Halon M, Smith BJ, *et al.* The development of a modified human IFN- α 2b linked to the Fc portion of human IgG 1 as a novel potential therapeutic for the treatment of hepatitis C virus infection. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, **24**(9): 560–572.
- [13] Lo KM, Sudo Y, Chen J, *et al.* High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng*, 1998, **11**(6): 495–500.
- [14] Coloma MJ, Hastings A, Wims LA, *et al.* Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain-reaction. *J Immunol Methods*, 1992, **152**(1): 89–104.
- [15] Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, *et al.* Improved prediction of signal peptides: signal P 3.0. *J Mol Biol*, 2004, **340**(3): 783–795.
- [16] Nielsen H, Krogh A. Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden markov model. Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 1998: 122–130.
- [17] Zhu Q, Huang ZH, Huang YL, *et al.* Expression of rhEPO-L-Fc fusion protein and analysis of its bioactivity and pharmaceutical kinetics. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(11): 1874–1879.
- [18] 祝强, 黄智华, 黄予良, 等. rhEPO-L-Fc 融合蛋白的表达、生物活性和初步药动学分析. *生物工程学报*, 2008, **24**(11): 1874–1879.
- [18] Tian RY, Huang YH, Chen Y, *et al.* Expression and identification of TACI/BCMA-IgG1 Fc fusion proteins in mammalian cells. *Acta Zool Sin*, 2004, **50**(3): 401–407.
- [18] 田瑞阳, 黄玉辉, 陈悦, 等. BLyS 受体 TACI、BCMA 与人 IgG1 Fc 融合蛋白在哺乳动物细胞中的表达与鉴定. *动物学报*, 2004, **50**(3): 401–407.
- [19] Yang JJ, Zhang X, Zhou J, *et al.* High expression, purification, quality control of rhEPO-Fc fusion protein. *China Biotechnol*, 2007, **27**(6): 6–9.
- [19] 杨建军, 张昕, 周洁, 等. rhEPO-Fc 融合蛋白的表达、纯化及质量研究. *中国生物工程杂志*, 2007, **27**(6): 6–9.
- [20] Chan H, Springman EB, Clark JM, *et al.* Expression and characterization of human tissue kallikrein variants. *Protein Expr Purif*, 1998, **12**(3): 361–370.
- [21] Huang XD, Wang SS, Chen PX, *et al.* High level expression, purification and characterization of human kallikrein-1 in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(7): 1186–1193.
- [21] 黄秀东, 王书生, 陈佩新, 等. 人激肽释放酶-1 在甲醇酵母中高水平表达、纯化与鉴定. *生物工程学报*, 2008, **24**(7): 1186–1193.
- [22] Wang J, Chao J, Chao L. Purification and characterization of recombinant tissue kallikrein from *Escherichia coli* and yeast. *Biochem J*, 1991, **276**(1): 63–71.