

重组人尿激酶原的体外变复性研究

朱 慧 刘 伟 史 蔚 薛宇鸣 马 忠

(南京大学生物化学系医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

摘 要 重组人尿激酶原在大肠杆菌中过量表达时形成不溶物包涵体,需经体外变复性后才能获得生物活性。本文旨在提高包涵体中变性尿激酶原的复性效率,通过对 pH, 温度, 变性剂种类及浓度, 蛋白浓度, 以及巯基氧化还原对的比率等的定性定量分析, 研究重组人尿激酶原体外变复性的基本条件, 并比较了添加某些非特异有效成分, 脉冲稀释, 梯度透析等方法对提高重组人尿激酶原体外变复性效率的作用。确定了重组人尿激酶原体外变复性的适宜方法, 复性效率可达 20%~30%。

关键词 重组人尿激酶原, 变性, 复性

中图分类号 Q782 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061 (2000) 02-0150-05

在血栓疾病的药物治疗中, 重组人尿激酶原 (pro-UK) 是一种重要的纤溶酶原激活剂。天然尿激酶原是一个由 411 个氨基酸组成的单链糖蛋白, 分子量为 54kD, 12 对二硫键组成 3 个结构域。尿激酶原天然来源稀少, 只有用基因工程方法才能大量获得。重组人尿激酶原在大肠杆菌中的表达产物大部分以无活性的包涵体形式存在, 需经体外变复性才能获得生物活性。由于 pro-UK 分子量较大, 富含半胱氨酸, 且结构域较多, 对其进行体外变复性比较困难。因此提高重组人尿激酶原体外变复性效率是使其在临床得以应用的关键。本项工作对影响重组人尿激酶原体外变复性效率的各种基本因素进行了定性定量比较研究, 确定了重组人尿激酶原体外变复性的合适方法, 使其复性效率从 5%~10% 提高到 20%~30% 左右。

1 材 料

纤维蛋白原购自美国 Sigma 公司。凝血酶购自日本持田株式会社。用于尿激酶活力测定的国际标准购自中国生物制品检定所。尿素, 盐酸胍, 二硫苏糖醇 (DTT), 葡萄糖, BSA 购自加拿大生工生物工程公司。PEG2000 (聚乙二醇 2000), PEG4000, PEG6000, PEG8000, PEG10000, 氧化/还原型谷胱甘肽 (GSSG/GSH), 半胱氨酸 (Cysteine), 胱氨酸 (Cystine), Triton X-100, 环

状糊精, 硫胺购自上海华美生物工程公司。其余试剂均为分析纯。

2 方 法

2.1 包涵体的制备和变性

重组人尿激酶原基因在大肠杆菌中的表达按文献 [1] 方法进行。将 1L 摇瓶培养基中收获的菌体悬于 100mL 超声液 (50mmol/L Tris-HCl, 100mmol/L NaCl, 10mmol/L DTT, pH8.0) 中, 冰浴超声破菌 1h, 于 4℃ 12 000r/min 离心 20min, 弃上清, 所有的包涵体经洗涤液 (50mmol/L Tris-HCl, 5mol/L Urea, 5‰ Triton X-100, pH7.5) 重悬洗涤并离心后, 再用丙酮洗涤一次并冻干。称取 10mg 包涵体, 加 1mL 变性液 (6mol/L Guanidine-HCl (Gudn-HCl), 50mmol/L Tris-HCl, 10mmol/L DTT, pH7.5), 37℃ 搅拌 2h, 使其溶解。4℃ 12 000r/min 离心 20min, 去除不溶物, 上清备用。

2.2 复性方法

2.2.1 复性基本条件的确定: 将上述变性 pro-UK (0.9 mg/mL) 按 1:100 的比例, 缓慢滴入剧烈搅拌并冰浴冷却的复性液中, 4℃ 静置 24h。比较不同的 pH 范围, 温度, 变性剂种类及浓度, 蛋白浓度, 以及巯基氧化还原对的比率及添加物等对重组人尿激酶原体外复性效率的影响。

2.2.2 脉冲稀释复性: 将变性 pro-UK (0.9

收稿日期: 1999-01-21, 修回日期: 1999-09-19。

基金项目: 国家高技术研究发展与计划项目资助 (863-102-08-02-01)。

mg/mL)等分为3部分,按1:100的比例,间隔60min,分3次缓慢滴入复性液(2.5mol/L Urea, 0.1mol/L Tris-HCl, 1mmol/L GSH, 0.05g/L PEG 8000, 5% Glycerol, pH8.6~8.8)中,4℃复性24h。

2.2.3 梯度透析复性:将10μL变性 pro-UK (0.9mg/mL)先用变性液稀释100倍,其中添加0.1mmol/L GSSG。装入透析袋中,对100mL含8mol/L Urea的复性液透析,并以0.3mL/min的速度泵入不含尿素的复性液(含0.1mmol/L GSSG),4℃搅拌直至复性液中的尿素浓度降至2.5mol/L,所需不含尿素的复性液约为220mL,4℃静置24h。

2.3 复性效率的测定

变性 pro-UK 浓度按 Bradford^[2]的方法测定,标准曲线所用的参照蛋白 BSA 用相同的变性液溶解。复性后的 pro-UK 纤溶活性测定依照纤维蛋白-琼脂糖平板测活法^[3],以尿激酶国际标准活力单位的对数对溶圈的面积作标准曲线,所测活性按 1nmol/L pro-UK 相当于 5.5IU/mL,即 1mg 纯 pro-UK 的活性为 10⁵IU 的比率折算成浓度单位。因此重组人尿激酶原的复性效率按以下公式计算:

$$x = \text{复性 pro-UK 纤溶活性 (IU/mL)} \div 10^5 \text{ (IU/mg)}$$

$$y = \text{变性 pro-UK 蛋白浓度 (mg/mL)}$$

$$\text{复性效率} = x \div y \times 100\%$$

在所附图中 1 × 10⁵IU/L 所测得活性相当于 8%~11%的复性效率。

3 结果与讨论

3.1 Pro-UK 基本复性条件的确定

3.1.1 pH, 温度对 pro-UK 复性的影响:我们根据不同缓冲对的有效缓冲范围,比较了不同 pH 条件对 pro-UK 包涵体复性的影响(Fig. 1)。从 pH4.0 到 12.0 范围内, pH8~11 的 Tris-HCl 缓冲效果最好,但超过缓冲范围的 Tris-HCl 的 pH 会下降,所以我们采用微碱条件 pH8.6~pH8.8。

温度对 pro-UK 的复性有很大影响,在 4℃ 到 37℃ 范围内,温度越高,pro-UK 复性效率越低(数据未示)。本实验所有复性操作均在 4℃ 进行。

3.1.2 变性剂种类和浓度对 pro-UK 复性的影响:David N. Brems 认为变性蛋白在中浓度变性剂的复性体系中能“预折叠”,从而减少无规凝聚^[4]。我们比较了多种浓度的 Gudn-HCl 和 Urea 对 pro-UK 复性的影响(数据未示),发现 0.8mol/L 到 1.2mol/L 的 Gudn-HCl 或 2.5mol/L 到 3.0mol/L 的 Urea 最适合 pro-UK 的复性。

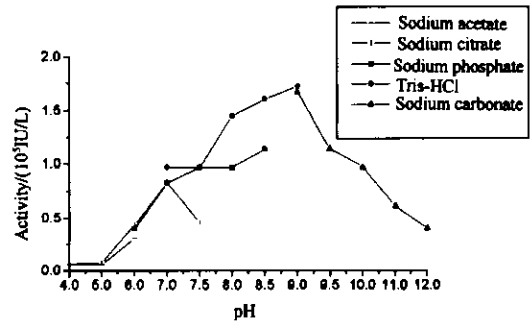


图 1 pH 对 pro-UK 复性效率的影响

Fig. 1 Effect of pH on pro-UK renaturation activity

Renaturation was performed by 100-fold dilution into renaturation solution (2.5mol/L Urea, 1mmol/L GSH) with various pH values; 0.1mol/L sodium acetate, pH4.0~6.0; 0.1mol/L sodium citrate, pH4.0~7.5; 0.1mol/L sodium phosphate, pH6.0~8.5; 0.1mol/L Tris-HCl, pH7.0~9.0; 0.1mol/L sodium carbonate, pH9.0~12.0

3.1.3 蛋白浓度对 pro-UK 复性的影响:在复性体系中, pro-UK 的浓度为 0.9μg/mL, 即最大稀释倍数 1000 倍时, 复性效率最高(数据未示), 由于 1000 倍的复性体系不方便, 我们采用 100 倍为最佳稀释倍数, 此时 pro-UK 的浓度为 9μg/mL。

3.1.4 氧化还原条件对 pro-UK 复性的影响:天然状态下的 pro-UK 含有 12 对二硫键, 在复性过程中必需有氧化还原剂的存在来催化分子内二硫键的形成及纠正错配的二硫键。通常所用的巯基氧化还原对为 GSH/GSSG, 这里我们还探讨了 Cysteine/Cystine 的使用。Fig. 2A, 2B 显示在不同的毫摩尔比浓度下, GSH/GSSG 比为 10:1, Cysteine/Cystine 比为 600:1 时最有利于 pro-UK 的复性。

由于溶解包涵体所用的变性液中含有 10 mmol/L DTT, 经 100 倍稀释后在复性体系中仍含有一定量的残余 DTT。因此在复性体系中添加氧化还原对时必需考虑这部分残余 DTT 的存在。Fig. 2C, 2D 显示 pro-UK 复性体系中单独添加 GSSG 和 GSH, 它们的最适浓度分别为 0.05mmol/L GSSG 和 0.8~1mmol/L GSH。它们之间的一个明显差别是, 随着 GSSG 浓度的增加, 活性蛋白数量迅速降低; 但是 GSH 的浓度对 pro-UK 复性效率的影响却不大。原因可能就是单独使用 GSSG 时, 一定数量的残余 DTT 还原 GSSG, 产生 GSH 和 GSSG 氧化还原对催化二硫键的交换^[5]。但是, 当 DTT 耗尽时, 过量的 GSSG 将封闭蛋白分子上的自由半胱氨酸残基, 从而阻止二硫键的进一步交换。然而在只有 GSH 的情况下, 由于空气中的 O₂ 氧化 GSH (Sekine *et al.*, 1985; Marston, 1986), 总能平衡并产

生合适的 GSH/GSSG 比,因此 pro-UK 的复性始终保持较高水平。类似于 Cysteine/Cystine 的高摩尔比, Fig. 2D 显示只有在高浓度 20~30mmol/L 的 Cysteine 下,才有较好结果。而 Cystine 的溶解度很低,效果不明显。

Fig. 2E 显示相对于 GSH/GSSG 单独使用或组合使用,半胱氨酸体系对 pro-UK 复性效果稍好。

原因可能是因为 Cysteine 和 Cystine 比起 GSH 和 GSSG,分子较小,所带净电荷也较少,从而更易接近部分折叠的蛋白分子上的 Cysteine 残基。但由于较高的复性率要求高浓度的 Cysteine,而大量 Cysteine 又极易氧化成不溶的 Cystine,因此它们都不适于单独或组合用于 pro-UK 的复性。综合比较,我们认为最适合 pro-UK 的巯基氧化还原条件为 1mmol/L GSH。

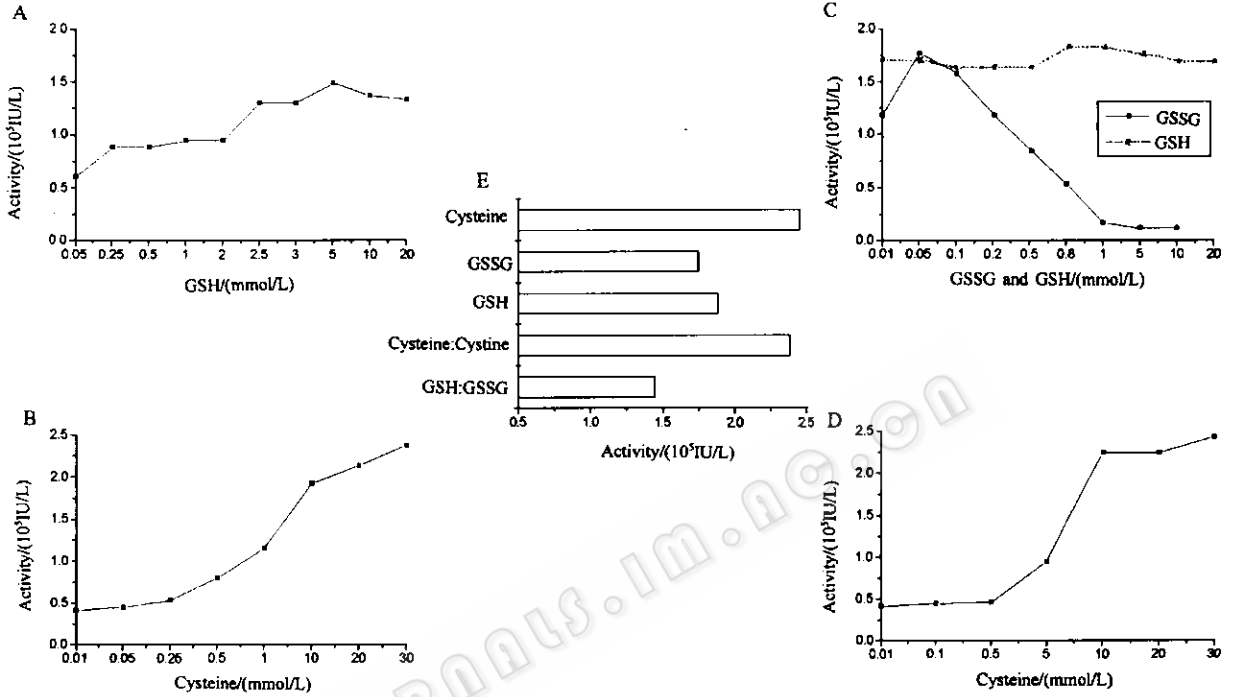


图 2 氧化还原条件对 pro-UK 复性的影响

Fig. 2 Effect of redox condition on pro-UK renaturation activity

Renaturation was performed by 100-fold dilution into renaturation solution (2.5mol/L urea, 0.1mol/L Tris-HCl, pH8.8) and A. 0.5mmol/L GSSG, various concentrations of GSH; B. 0.05mmol/L cystine, various concentrations of cysteine; C. various concentrations of GSSG or GSH; D. Various concentrations of cysteine; E. GSH:GSSG, 5mmol/L GSH:0.5mmol/L GSSG; Cysteine:Cystine, 30mmol/L cysteine:0.05mmol/L cystine; GSH, 1mmol/L GSH; GSSG, 0.05mmol/L GSSG; Cysteine, 30mmol/L cysteine.

3.2 提高 pro-UK 复性效率的一些方法

3.2.1 减少无规凝聚的添加物对 pro-UK 复性的影响: 在变性蛋白的复性过程中,蛋白分子的疏水核心暴露于溶液中,不同肽链间疏水区域的非特异性相互作用会导致蛋白无规凝聚的形成^[6]。而蛋白的正确折叠与无规凝聚是一对矛盾,它们之间的动力学竞争是影响蛋白复性的根本原因之一^[6]。减少无规凝聚,使平衡向蛋白复性方向转移是提高蛋白复性效率的必需条件之一。

根据报道,在复性过程中,添加无规凝聚抑制剂或折叠协同因子如 PEG^[7],甘油^[8,10],环状糊精^[9],葡萄糖^[10],硫胺^[10],Triton X-100^[11]等可以有效地抑制无规凝聚。这里我们比较了一些添加物在不同

浓度下对提高 pro-UK 复性的作用。

我们首先比较了溶解于标准稀释溶液 (50mmol/L Tris-HCl, pH8.8) 的不同浓度和分子量的 PEG 对 pro-UK 复性的影响,发现 0.05g/L PEG8000 可明显提高 pro-UK 的复性效率(数据未示)。这个结果支持了 PEG 在蛋白复性过程中可与复性中间态结合并阻止其自身凝聚,从而增加复性效率的理论^[7]。由于不同蛋白的疏水性不同,所需添加的 PEG 分子量和浓度也不同。

Fig. 3 显示 5% Glycerol 或 0.01% Tritonx-100 也可以增加复性效率。Back 等认为合适浓度的 glycerol 可以增加蛋白的稳定性(Back *et al.*, 1979; Gekko and Timasheff, 1981a, b),但 glycerol 浓度过

高却使蛋白复性效率下降。这可能是因为随着 glycerol 浓度的增加,溶液的粘度也增加,而这并不利于蛋白的复性^[10]。少量的 Triton X-100 也证明是有效的,Sailendra 等认为 Triton X-100 能够去除具有强极性界面的、部分折叠的无规凝聚^[11]。另外, Fig. 3 还显示 0.05g/L PEG8000 加上 5% Glycerol 可进一步提高 pro-UK 的复性效率。

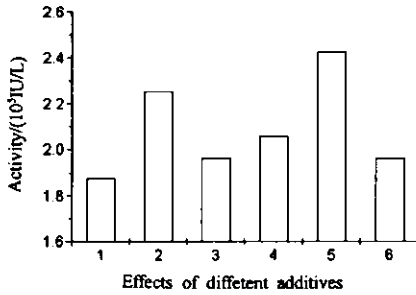


图 3 减少无规凝聚的添加物对 pro-UK 复性的影响

Fig. 3 Effects of different additives on pro-UK renaturation activity

Renaturation was performed by 100-fold dilution into renaturation solution (2.5mol/L Urea, 0.1mol/L Tris-HCl, 1mmol/L GSH, pH8.8) and 1. none additive; 2. pEG8000 (0.05g/L); 3. 0.01% Triton X-100; 4. 5% glycerol; 5. PEG8000(0.05g/L) + 5% glycerol; 6. PEG8000(0.05g/L) + 0.01% Triton X-100.

其它添加物如环状糊精,葡萄糖,巯胺等对 pro-UK 复性都没有有效结果,说明不同的变性蛋白在复性体系中,其折叠过程和中间态都不一样,从而折叠协同因子对其复性的作用也不一样。

3.2.2 复性方式对 pro-UK 复性的影响: 在变性蛋白稀释后,无规凝聚通常在几分钟内就会出现,而复性过程却相当缓慢,需要几个小时^[12]。如果变性蛋白加进复性体系的速度等于或低于蛋白的复性速度,那么无规凝聚将会减少。在复性过程中将变性液缓慢滴入复性体系中是一种有效的方法,但采用脉冲稀释的方法,将变性 pro-UK 等分为 3 部分,间隔一定的时间,分 3 次缓慢滴入复性体系中,效果更好(Fig. 4)。我们比较了间隔不同时间的影响(数据未示),其中间隔 60min 所获的 pro-UK 复性效率最高。间隔大于 60min,影响并不大。

在传统的透析复性方法中,常常会在透析袋中出现大量沉淀,类似于快速稀释时产生的沉淀,因此,直接对含有 2.5mol/L Urea 的复性液透析,效果很不理想。我们采用的缓慢降低尿素梯度的透析方法,可以克服大量沉淀产生的问题,有利于进一步提高 pro-UK 的复性效率(Fig. 4)。由于透析袋内和透析体系内的溶氧有限,GSH 氧化不足,所以另加入

0.1mmol/L 的 GSSG 并采用较长的复性时间非常重要。

以上两种复性方法都较适合于小规模复性(1L 体积),在大规模复性过程中(10L 以上),由于搅拌困难和透析体积有限,我们采用了把复性溶液泵入变性蛋白溶液的方法,效果很好(Fig. 4)。同样,另加少量的 GSSG (0.1mmol/L) 也是必要的。这种方法可使变性剂浓度随蛋白浓度的降低而缓慢降低,并可以减少沉淀的大量产生,使复性条件变得更加温和,从而使大规模复性同样也能达到甚至略高于小规模复性体系中 pro-UK 的复性效率。

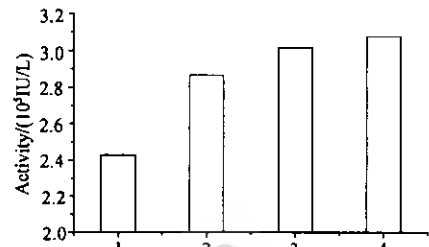


图 4 复性方式对 pro-UK 复性的影响

Fig. 4 Effects of approaches on pro-UK renaturation activity

1. Direct 100-fold dilution; 2. Step-wise 100-fold dilution (The renaturation solution of 1. and 2. contained 2.5mol/L urea, 0.1mol/L Tris-HCl, 1mmol/L GSH, 0.05g/L PEG8000, 5% Glycerol, pH8.8); 3. Urea gradient dialysis; 4. A large-scale renaturation. 100-fold renaturation solution was pumped slowly into stirring denaturation solution at the rate of 2.78ml/min at 4°C. (The renaturation solution of 3. and 4. contained 0.1mol/L Tris-HCl, 1mmol/L GSH, 0.1mmol/L GSSG, 0.05g/L PEG8000, 5% Glycerol, pH8.8)

随着基因工程的发展,对原核体系中高效表达产生的重组蛋白包涵体进行有效的体外变复性处理已越来越成为一个很实际的问题。一些文献报道的对某种包涵体蛋白进行体外变复性的方法可能并不适合于其它蛋白,特别是对于具有 12 对二硫键的重组人尿激酶原。因为不同的蛋白具有不同的分子大小,不同的氨基酸组成(特别是半胱氨酸数目),其分子结构,疏水程度等也不相同,因此其复性条件也不同,有必要对每一个蛋白的基本复性条件如 pH,温度,蛋白浓度,巯基氧化还原对的比率等进行仔细甄别和优化。另外,无规凝聚是降低复性率的重要因素,本文结果表明渐进的、温和的复性方法,添加无规凝聚抑制剂等都不失为克服无规凝聚的有效办法。在重组尿激酶原的表达量为 15%~18%,包涵体的蛋白浓度为 1.8~2.5mg/mL,包涵体的纯度为 50% 的情况下,我们能将复性率从 5%~10% 提高到 20%~30% 左右。

致 谢:本课题得到哈佛大学医学院(Beth Israel Deaconess Medical Center)Dr. Ziyong Sun 和 Dr. Jian-Ning Liu 的大力帮助和细心审阅,在此深表谢意。

参 考 文 献

- [1] MA Zhong, HUA Zi-chun, Dong Chen *et al.* *ACTA BIOCHEMICA et BIOPHYSICA SINICA*. 1995, **27**(1):17~22
- [2] Bradford M M. *Aral Biochem.* 1976, **72**:248~254
- [3] Ploug J, Kjeldgaard N O. *Biochem Biophys Acta*. 1957, **24**:278~282
- [4] David N, *Brems Biochemistry*. 1998, **27**:4541~4546
- [5] Buchner J, Ruddph R. *Bio/Technology*. 1991, **9**:157~162
- [6] Michel E Goldberg, Rainer Rudolph, Rainer Jaenicke. *Biochemistry*. 1991, **30**:2790~2797
- [7] Jeffrey L, Cleland, Daniel I C Wang. *Biotechnology*. 1990, **8**:1274~1278
- [8] Johannes Buchner, Ira Pastom, Ulrich Brinkmann. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. 1992, **205**:263~270
- [9] Karuppiah N, Sharma A. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*. 1995, **211**(1):60~66
- [10] Yoshitake Maeda, Hidenori Yamada, Tadashi Ueda *et al.* *Protein Engineering*. 1996, **9**(5):461~465
- [11] Sailendra Nath Sarkar, Nandini Ghosh. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*. 1996, **330**(1):174~180
- [12] Brinkmann U, Buchner J, Pastan I. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992, **89**(7):3075~3079

Research on Renaturation of Recombinant Human Pro-urokinase Expressed from *Escherichia coli*

ZHU Hui LIU Wei SHI Wei XUE Yu-Ming MA Zhong

(State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Department of
Biochemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

Abstract Recombinant human pro-urokinase forms insoluble inclusion body when overexpressed in *Escherichia coli*, and it must be denatured and renatured *in vitro* before it acquires activity. This study aimed to increase the renaturation yield of denatured pro-urokinase. We have evaluated the basic renaturation conditions of pro-urokinase through qualitative and quantitative analysis of pH, temperature, denaturant concentration, protein concentration, the ratio of reduced and oxidized thiol reagents. The effects of nonspecific additives, step-wise dilution and urea gradient dialysis have been also compared. The optimal conditions of pro-urokinase renaturation with the yield about 20%~30% have been obtained.

Key words Recombinant human pro-urokinase, denaturation, renaturation