

凝胶色谱柱复性在低分子量尿激酶原突变体(DscuPA-32K)中的应用

焦建伟 俞梅敏 茹炳根*

(北京大学生命科学学院蛋白质工程国家重点实验室 北京 100871)

摘要 将构建的一种具溶栓和抗栓双重功能尿激酶原突变体(DscuPA-32K)基因,在大肠杆菌中进行表达。由于DscuPA-32K分子较大并且表达量较高,目的蛋白质基本以包涵体的形式存在。包涵体中的蛋白质是无活性的蛋白质,为了获得有活性的蛋白质,就需要对包涵体进行变性及复性。尝试了一种新的凝胶色谱柱复性方法,并通过柱复性方法与常规的稀释复性方法进行了比较,发现柱复性方法明显优于稀释复性方法,具有成本低,效率高,并对目的蛋白质(DscuPA-32K)进行了初步纯化等优点,尤其对酶这一类容易失活降解的蛋白质进行复性时,很值得进行推广应用。

关键词 低分子量尿激酶原,包涵体,复性

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0300-04

在血栓病的药物治疗中,单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(scu-PA)是一种首选的溶栓药物^[1]。单链尿激酶(又称尿激酶原)其实是双链尿激酶(tcu-PA)的前体,但是它又不同于一般的酶原,它本身具有一定的纤溶酶原激活剂的活性,同时能选择性地激活纤维蛋白附近的纤溶酶原,因而在治疗血栓病人的过程中具有一定的优势^[2]。低分子量单链尿激酶原(scuPA-32K)是尿激酶原的一种衍生物,缺少尿激酶原N端的143个氨基酸,但具有与尿激酶原相似的性质^[3]。抗栓肽(Decorsin)具有很强的抗栓效果^[4]。我们在低分子量尿激酶原基因的基础上融合了这种抗栓肽(Decorsin)的基因,目的是想构建一种具有溶栓与抗栓功能的尿激酶原的突变体(DscuPA-32K)。DscuPA-32K基因在大肠杆菌中得到了高效表达,但由于在大肠杆菌中,尿激酶原突变体是以包涵体形式存在的,为了获得有活性的蛋白质,必须先对包涵体进行变性和复性。包涵体的复性工作是获得活性蛋白质的难点和重点,影响复性的因素很多,主要与蛋白质本身的氨基酸组成,分子结构及疏水特性有关,其次复性液中的离子强度、pH、蛋白浓度也对蛋白质的复性效率有一定的影响。目前用于复性的方法很多^[5],并且对于不同的蛋白质用于复性的方法不尽相同,所以必须进行复性条件及方法的探索。传统的复性方法是用流加稀释法,操作周期长,复性

效率低。最近报道的一种柱洗脱复性的方法可以降低复性过程中多聚物形成的趋势,并能对目的蛋白质进行初步纯化^[6]。由于DscuPA-32K是以酶原形式进行表达的,比较容易降解,克服这个问题的关键是缩短操作周期,本文首次尝试柱复性方法来对DscuPA-32K进行复性,取得了很好的效果,具有很好的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

pET29a和BL21(DE3)购自Novagen公司;pUC19-proUK由本实验室构建;血纤维蛋白原、凝血酶原和尿激酶标准品购自中国药品生物制品检定所;Sephacryl S-200购自Pharmacia公司;氧化型/还原型谷胱甘肽(GSSG/GSH)购自Promega公司;各种限制酶购自Biolabs公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 低分子量尿激酶原突变体基因的获得:DscuPA-32K基因片段是从pUC19-proUK中通过PCR扩增得到的;Decorsin基因是由人工合成;将scuPA-32K基因与Decorsin基因经过连接后,克隆到表达载体pET29a中,得到重组表达载体,并在大肠杆菌中进行诱导表达。

1.2.2 低分子量尿激酶原突变体的表达及包涵体

收稿日期 2000-11-08,修回日期 2001-02-12。

基金项目 国家高技术研究发展计划项目(863-102-09)资助。

* 联系作者。 Tel 86-10-62751842 Fax 86-10-62751842 E-mail jrub@pkuc.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的处理:将含有低分子量尿激酶原突变体的重组质粒,首先转化大肠杆菌 BL21(DE3),然后挑取单克隆菌于 50mL LB 培养基中 37℃ 过夜培养,然后以 1:10 的比例接种于 500mL 的培养基中,于 37℃ 生长至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$ (约 2h),加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L 进行诱导培养 5h 后,离心收集菌体。

菌体悬于 100mL 破菌溶液中(50mmol/L Tris-Cl, 0.15mol/L NaCl, pH7.4),冰浴超声破碎 24min,7000r/min 离心 15min,收集包涵体沉淀。将包涵体用 100mL 洗涤液(50mmol/L Tris-Cl, 0.15mol/L NaCl, 1% Triton \times 100, pH7.4)洗涤 3 次,收集包涵体沉淀,最后将包涵体冻干。将包涵体冻干粉溶于 20mL 变性缓冲液中(8mol/L Urea, 50mmol/L Tris-Cl, 0.15mol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 50mmol/L β Mercaptoethanol, pH7.4)中 4℃ 搅拌 12h。

1.2.3 复性:A. 稀释复性:将变性的 DscuPA-32K 蛋白质,12 000r/min 离心除去不溶物,然后将上清对不含 β -巯基乙醇的变性缓冲液透析 3~5h。再次离心后的上清溶液缓慢滴于 1000mL 复性缓冲液中(2mol/L Urea, 50mmol/L Tris-Cl, 0.15mol/L NaCl, 5mmol/L EDTA, 1.25mmol/L GSH, 0.25mmol/L GSSG, pH11) 4℃ 放置复性 24h。B. 凝胶色谱柱复性:首先用平衡缓冲液(50mmol/L Tris-Cl, 0.15mol/L NaCl, 5mmol/L EDTA)对 Sephacryl S200(20mm \times 900mm)凝胶过滤柱进行平衡,然后将变性的蛋白质上样。然后用洗脱缓冲液(平衡缓冲液 + 1.25mmol/L GSH + 0.25mmol/L GSSG)对样品进行柱复性。

1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):制备 15% 的分离胶,5% 浓缩胶,50V 恒压电泳 5h,然后用 0.1% 考马斯亮蓝 R250 染色。

1.2.5 蛋白质浓度的计算:以牛血清白蛋白作为标准,考马斯亮蓝 G250 法^[7]测定蛋白浓度。

1.2.6 血纤维蛋白平板法测活:以尿激酶标准品为计算活性的参照,参考文献^[8]。

1.2.7 相对复性率的计算:首先确定包涵体中蛋白质的含量(A),计算出复性蛋白质的含量(B)。相对复性率 = B/A。(B 的计算方式为: B = 测得样品的活性/DscuPA-32K 纯品比活;以功能性 DscuPA-32K 纯品的比活作为参照品)。

1.2.8 Western blot 分析:将进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后的凝胶取下后,在电转印装置中转印 5h,然后将转有蛋白质的硝酸纤维素膜浸泡于抗 UK 的单克隆抗体腹水中,37℃ 保温 2h,再加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG 溶液,37℃ 保温 1h,最后加入显色液室

温显色 1h。

2 结果

2.1 融合基因的构建及表达

通过末端带有合适酶切位点的两条引物,从 pUC19-proUK 中扩增 scuPA-32K 基因,经过限制性酶切后回收基因片段。人工合成编码 Decorsin 的基因片段,将 scuPA-32K 基因,Decorsin 基因,以及 pET29a 片段同时进行连接后,得到重组表达载体。经过限制性酶切验证以及核苷酸序列测定,结果正确。将重组表达载体转化大肠杆菌后,在 IPTG 的诱导下目的蛋白质获得表达。

2.2 DscuPA-32K 包涵体的处理

由于 DscuPA-32K 的分子量较大,目的蛋白质基本以包涵体的形式存在。要获得有活性的蛋白质,就必须对包涵体进行变性及复性。为了提高复性效率,包涵体一定要充分洗涤,因为大肠杆菌中的残余物例如杂蛋白质、核酸、磷脂等会降低目的蛋白质的复性效率。尽可能提高 DscuPA-32K 在整个包涵体中的含量,将会大大提高下面的复性效率。通过图 1 可以看出经过充分洗涤后的包涵体中 DscuPA-32K 的含量很高,为随后的蛋白质复性作好了充分准备。经初步计算,500mL 培养液可得 100mg 包涵体冻干粉,其中蛋白质的含量为 80mg。将包涵体溶解于 20mL 变性缓冲液中,4℃ 放置 12h。将变性的 DscuPA 分成 2 份,做平行对照,比较 2 种复性方法的得率。一份用于稀释复性,另一份用于柱复性。

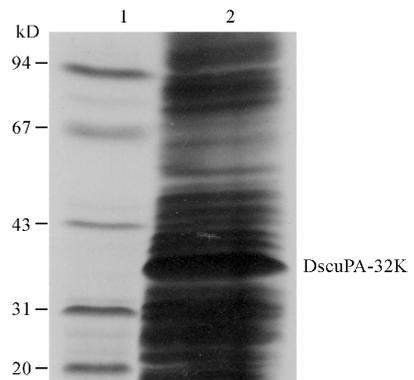


图 1 包涵体的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE showing inclusion bodies

1. Protein marker; 2. Inclusion bodies

2.3 稀释复性

将透析后的 10mL 变性蛋白质按 1:100 的比例缓慢滴入 1L 复性缓冲液中,由于 DscuPA-32K 含有 9 对二硫键,所以复性缓冲液中 GSH/GSSG 一定要保

持适当的比例(5:1)来保证分子内二硫键的正确配对。复性 24h 后,经纤维蛋白平板测定溶栓活性及蛋白质浓度检测,最后获得有活性的目的蛋白质为 10mg, DscuPA-32K 的复性率达 16.5%。

2.4 凝胶色谱柱复性

将 10mL 变性蛋白质,上样于用平衡缓冲液平衡好的 Sephacryl S200 凝胶过滤柱。尝试用洗脱缓冲液(平衡缓冲液 + 1.25mmol/L GSH + 0.25mmol/L GSSG)进行目的蛋白质的复性。洗脱液的流速控制在 0.3mL/min,让 DscuPA-32K 充分复性。最后将收集到的样品分别测活,结果证明用柱复性进行复性后得到有活性的 DscuPA-32K 的含量为 47mg,复性率为 60%。洗脱图谱见图 2,从活性曲线可以看出目的蛋白质主要集中在峰 3。

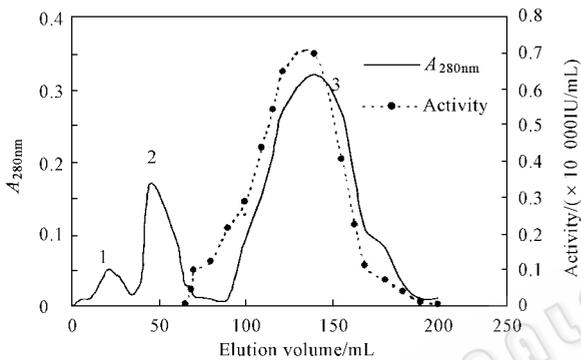


图 2 Sephacryl S200 对 DscuPA-32K 进行复性的洗脱图谱

Fig.2 Renaturation of DscuPA-32K through Sephacryl S200 chromatography
Column 20mm × 900mm, Elution rate 0.3mL/min

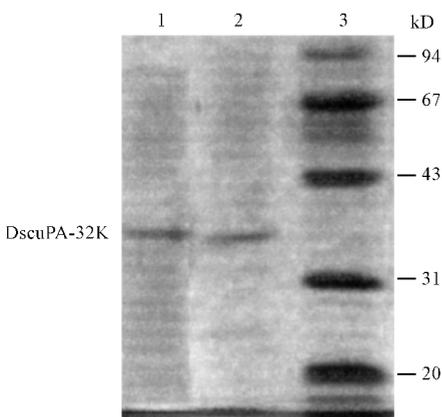


图 3 DscuPA-32K 通过 Sephacryl S200 复性和纯化后的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE showing DscuPA-32K refolding and purification by Sephacryl S200

1. DscuPA-32K without reduction ; 2. DscuPA-32K with reduction ; 3. Protein marker

取峰 3 的峰尖进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,从图 3 看出经过柱复性后蛋白质的纯度很高,并且不加还原剂与加还原剂进行电泳的蛋白质条带都为一条带,位置在 36 000 左右,进一步证明了复性后的蛋白为单体。Western blot 分析结果(图 4)表明重组蛋白质 DscuPA-32K 保留了 scuPA-32K 的抗原性。

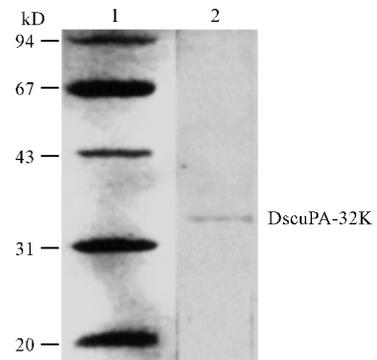


图 4 DscuPA-32K 的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of dscuPA-32K
1. Protein marker ; 2. DscuPA-32K

总之,比较柱复性方法与稀释复性方法在获得活性蛋白质的数量上有很大差别,前者的复性效率是后者的 3.6 倍。而且如果通过稀释复性法对蛋白质进行几百倍的稀释后,使得 DscuPA-32K 在复性液具有很稀的蛋白质浓度,为后续的纯化带来极大的不便。表 1 为两种复性方法的比较。

表 1 稀释复性与凝胶色谱柱复性的比较

Table 1 Comparison of the two renaturation effect :
dilution and gel chromatography renaturation

	Protein purity after renaturation /%	Specific activity ($10^4 \times \text{IU}/\text{mg}$)	Recovery index /%
Dilution renaturation	58 ± 9	1.1 ± 0.3	16.5 ± 3
Gel chromatography renaturation	90 ± 5	8.2 ± 0.5	60 ± 5

3 讨 论

大肠杆菌表达系统中,外源蛋白质能否表达是其中的一个重要因素。但如果外源蛋白质以很高的效率表达,往往以包涵体的形式存在。包涵体的形成一方面有利于防治蛋白酶对外源蛋白质的降解,另一方面包涵体中的蛋白质不具有生物活性,必须对包涵体中的蛋白质在变性后进行复性。传统的复性方法是将变性蛋白质缓慢稀释到复性缓冲液中进行自然复性或透析复性。这种方法最大的缺点是脱

离变性环境的蛋白质由于疏水核心暴露于溶剂中,不同分子间疏水核心的相互作用会产生多聚物沉淀。影响复性的因素很多,主要有温度、pH 值、离子强度、蛋白质浓度和纯度等^[9]。

复性的过程应是一个缓慢脱离变性环境的过程。柱复性方法能很好地控制这一过程。柱复性的优点是保证变性蛋白质与复性缓冲液进行缓慢交换,并在此过程中缓慢地完成复性,并且蛋白质分子是逐渐分开的,避免了分子多聚物的形成^[10]。蛋白质柱复性的原理主要基于蛋白质分子与变性分子在凝胶柱介质中具有不同的移动速度,当蛋白质脱离变性分子时就开始进行空间结构域的重新组合和二硫键的正确配对,不过这一过程是缓慢的,所以用复性缓冲液进行洗脱时流速一定要慢。对于 DscuPA-32K 而言,由于分子量大以及二硫键较多,要完全恢复其空间结构域需要时间较长,我们控制流速在 0.3mL/min,取得了很好的效果。而且 DscuPA-32K 本身容易发生失活和自身降解等问题,所以最重要是减少蛋白质操作的周期,用凝胶过滤柱复性法来进行 DscuPA-32K 的复性,不仅减少了蛋白质操作的周期而且将复性和纯化两个过程结合在一起,大大提高了活性蛋白质的产率。

对于不同的蛋白质空间结构域的复杂程度不同,复性时间也不同。总之,用分子筛进行复性的方法可以减少复性及纯化过程的操作时间,而且操作简便,并具有很高的相对复性效率,因此具有很好的发展前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Sherry S , Marder V J . Thrombosis , fibrinolysis , and thrombolytic therapy : a perspective . *Prog Cardiovasc Dis* ,1991 **34** :89 ~ 100
- [2] Longstaff C , Clough A M , Gaffney P J . Kinetics of plasmin activation of single chain urinary-type plasminogen activator (scu-PA) and demonstration of a high affinity interaction between scu-PA and plasminogen . *J Biol Chem* ,1992 **267** :173 ~ 179
- [3] Stump D C , Lijnen H R , Collen D . Purification and characterization of a novel low molecular weight form of single-chain urokinase-type plasminogen activator . *J Biol Chem* ,1986 **261** :17120 ~ 17126
- [4] Seymour J L , Henzel W J , Nevins B *et al* . Decorsin : a potent glycoprotein II b-III a antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora* . *J Biol Chem* ,1990 **265** :10143 ~ 10147
- [5] ZHU H (朱慧) , LIU W (刘伟) , SHI W (施蔚) *et al* . Research on renaturation of recombinant human pro-urokinase expressed from *Escherichia coli* . *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)* , 2000 **16** (2) :150 ~ 154
- [6] Batas B , Chaudhuri J B . Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography . *Biotechnol Bioengin* ,1996 **50** :16 ~ 23
- [7] Bradford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding . *Anal Biochem* ,1976 **72** :248 ~ 254
- [8] Deogny L , Weidenbach A A , Hampton J W . Improved fibrin plate method for fibrinolytic activity measurements : use of bentonite precipitation and agar solidification . *Clin Chim Acta* ,1975 **60** :85 ~ 89
- [9] Guise A D , West S M , Chaudhuri J B . Protein folding *in vivo* and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies . *Mol Biotechnol* ,1996 **6** :53 ~ 64
- [10] Batas B , Chaudhuri J B . Considerations of sample application and elution during size-exclusion chromatography-based protein refolding . *J Chromatogr A* ,1999 **864** :229 ~ 236

Application of a Gel Chromatography Renaturing Way on Low Molecular Single-chain Urokinase Mutant(DscuPA-32K)

JIAO Jian-Wei YU Mei-Min RU Bing-Gen *

(National Laboratory of Protein Engineering , College of Life Sciences , Peking University , Beijing 100871 , China)

Abstract A recombinant mutant gene with thrombolytic and antithrombolytic bifunction was expressed in *E. coli* . Owing to two reasons of high molecular weight and over expression , dscuPA existed in inclusion body form . The protein of inclusion body was inactive protein . In order to obtain active protein , inclusion bodies should be denatured and then renatured . We performed a novel way named gel-chromatography column renaturation way . Compare with traditional renaturation way , this refolding approach had some obvious advantages , such as low cost and high recovery , and accomplished the preliminary purification step of desired protein(DscuPA-32K) . Especially to proteins that easily became inactive and degradation , this approach might have good prospect .

Key words low molecular single chain urokinase , inclusion bodies , renaturation

Received : November 8 , 2000

This work was supported by Grant from the National High Technology Project of China(863-102-09) .

* Corresponding author . Tel : 86-10-62751842 ; Fax : 86-10-62751842 ; E-mail : jwlab@pku.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>