

人源化鼠抗人纤维蛋白单链抗体-尿激酶融合蛋白 在大肠杆菌中的功能性表达

刘志刚¹ 林建波¹ 袁旭东² 康铁军¹ 俞炜源^{1*}

¹(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071) ²(沈空司令部门诊部,沈阳 110015)

关键词 尿激酶,融合蛋白,大肠杆菌,表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)04-0509-03

尿激酶是目前临床上广泛使用的一种有效的溶栓制剂,但由于尿激酶缺乏对血栓的特异亲和性,导致临床上尿激酶的使用剂量较大,容易出现全身性出血等副作用。因而开发对血栓特异的导向溶栓制剂是目前溶栓药研制的一个重要方向。本实验室在以前的工作中,利用噬菌体表面呈现技术,筛选到一种对人纤维蛋白特异的鼠单链抗体^[1],在对该鼠抗体可变区进行结构建模的基础上^[2],对其进行了人源化改造和体外亲和力成熟,得到亲和力和特异性较鼠抗体更好的人源化单链抗体^[3]。为研制导向溶栓制剂,本实验室构建了人源化单链抗体-低分子量尿激酶的融合基因,并在大肠杆菌中实现了高表达,但由于重组蛋白含有 8 对二硫键,而且大肠杆菌胞内的还原环境不利于二硫键的正确配对,导致表达产物不能正确折叠,表达产物主要以不溶的包涵体形式存在,在可溶组份中不能检测到尿激酶的活性^[4]。

为实现异源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达,国内外的科研工作者进行了多方面的尝试,包括:优化培养条件,尽量降低目的蛋白的表达速率以促进其正确折叠^[5];或构建 TrxA、GST 或 MBP 融合表达系统^[6],以提高异源蛋白的溶解性,或共表达一些伴侣类分子以促进异源蛋白的溶解和折叠^[7]。本研究通过共表达二硫键异构酶 DsbC 和对宿主菌、培养条件等表达因素进行优化,实现了融合基因在大肠杆菌中的功能性表达,并利用亲和层析方法对胞内可溶组份中的融合蛋白进行了纯化和体外生物活性分析。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21(DE3), Origami(DE3), 购自 Novagen 公司, 本室保存。其中, 大肠杆菌菌株 Origami(DE3) 为胞内还原系统缺陷的菌株(即 *trxB⁻ gor⁻* 双突变), 其本身为四环素抗性和卡那霉素抗性。pBAD-DsbC, 本室保存, 其复制子为 p15A,

为氯霉素抗性, 能够与复制子为 ColE1 的质粒共存, 该质粒上克隆有 DsbC 的编码基因, 且 DsbC 受阿拉伯糖启动子的控制。pET15b-IIn-UK, 本室构建, 其为氨苄青霉素抗性, 复制子为 ColE1, 并克隆有人源化鼠抗人纤维蛋白单链抗体-低分子量尿激酶融合基因(IIn-UK)。

1.2 抗原、抗体和生化试剂

IPTG、氨苄青霉素、氯霉素、四环素、卡那霉素和 Bradford 试剂购自上海生工生物工程有限公司; L-阿拉伯糖购自 sigma 公司。抗原 D-dimer(DD) 为人交联纤维蛋白经纤溶酶原水解后产生的一个特异性降解片段, 带有交联纤维蛋白的特异性抗原表位, 本室制备; 兔抗尿激酶 IgG, 本室制备; HRP-羊抗兔 IgG 抗体, 购自北京中山生物技术有限公司。CNBr 活化的 Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司。尿激酶标准、牛凝血酶、牛纤维蛋白原购自中国药品生物制品检定所。蛋白质分子量标准购自 Sigma 公司。其它生化试剂均为分析纯。

1.3 双质粒共转化

转化时取等分子数的两种质粒混匀, 然后按常规方法转化相应的大肠杆菌感受态细胞。

1.4 可溶组份和不溶组份的制备

离心收菌 1 000g, 4℃, 10min, 重悬于 1/10 培养体积的 PBS 中, 超声碎菌。14 000g, 4℃, 10min, 取上清, 经 0.45μm 膜过滤, 为可溶组份; 超声重悬沉淀部分于 1/10 体积的 PBS 中, 即为不溶组份。

1.5 尿激酶亲和层析柱的制备

参照 Pharmacia 公司 CNBr-activated Sepharose 4B 的使用手册, 将兔抗尿激酶 IgG 偶联于 CNBr-activated Sepharose 4B, 然后装柱。

1.6 融合蛋白的亲和层析

将制备的可溶组份样品上样于 IgG 亲和层析柱, PBS 洗涤后, 然后用 pH2.0 的 0.2mol/L Glycine-HCl 洗脱, 分部收集

洗脱液并用 1mol/L Tris 调节 pH 至 7.2,置 4℃ 保存备用。

1.7 溶圈法测定单链抗体-尿激酶融合蛋白中尿激酶活性
参照文献 [8] 进行。

1.8 血栓块的制备

参照文献 [9] 进行,并稍作修改。

1.9 ELISA 分析单链抗体-尿激酶融合蛋白中单链抗体活性

抗原 DD 包被酶联孔,随后用 1% BSA-1% Tween20 封闭;加入融合蛋白样品(在本实验室中,是经血栓块吸附后的融合蛋白样品),37℃,1h;洗涤后加入兔抗尿激酶 IgG,37℃,1h;洗涤后加入 HRP-羊抗兔 IgG 抗体,37℃,1h;洗涤后加入 OPD 底物液显色至适当强度,用 2mol/L H₂SO₄ 终止反应并测定 OD₄₉₂。

2 结果与讨论

2.1 人源化单链抗体-尿激酶融合蛋白在大肠杆菌中表达的优化

为优化大肠杆菌菌株和质粒的组合,设计如下 4 种质粒/菌株组合:

I: pET15b-II_n-UK/BL21(DE3)

II: pET15b-II_n-UK + pBAD-DsbC/BL21(DE3)

III: pET15b-II_n-UK/Origam(DE3)

IV: pET15b-II_n-UK + pBAD-DsbC/Origam(DE3)

按以上设计,进行质粒的转化或共转化,并涂布于含相应抗生素的 LB 平板(各自所用抗生素如下: I: 氨苄青霉素, II: 氨苄青霉素 + 氯霉素, III: 氨苄青霉素 + 四环素 + 卡那霉素, IV: 氨苄青霉素 + 氯霉素 + 四环素 + 卡那霉素)。分别挑单克隆,分别接种于含相应抗生素的 50mL LB 培养基(同前) 200r/min, 37℃ 培养至 OD₆₀₀ = 0.8, II 和 IV 中加阿拉伯糖至终浓度为 0.05% (W/V), 30℃ 培养 30min, 然后 I、II、III 和 IV 中都加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 30℃ 诱导培养 3h。随后收菌,重悬于 5mL PBS 中,超声裂菌,制备可溶组份和不溶组份。各取少量样品进行 SDS-PAGE,分析重组融合蛋白的表达形式,结果表明 4 种组合中,融合蛋白都得到高表达,表达产物都主要以包涵体形式存在(图略)。各取 10μL 制备的可溶组份样品,用溶圈法分析 4 种样品中尿激酶活性,结果表明:在相同的实验条件下, I 可溶组份未能检测到尿激酶活性, II 和 III 可溶组份中能够检测到少量的尿激酶活性,而 IV 可溶组份中尿激酶活性最高(图 1)。

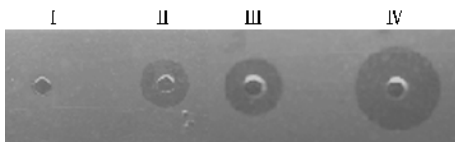


图 1 溶圈法分析 4 种组合的可溶组份中尿激酶活性

Fig.1 Analysis of activity of urokinase in the soluble fraction by the method of dissolved circle

2.2 重组人源化单链抗体-尿激酶融合蛋白的纯化

首先以本实验室制备的兔抗尿激酶抗体偶联 CNBr 活化的 Sepharose 4B, 然后装柱, 制备尿激酶的亲和层析柱。

本实验室以胞内可溶组份中尿激酶活性为指标,对 IV 组合的表达条件进行了优化(包括 IPTG 浓度,诱导时间等),然后参照优化的融合蛋白表达条件,制备了胞内可溶组份,并利用制备的亲和层析柱对胞内可溶组份中的人源化单链抗体-尿激酶融合蛋白进行纯化,经一步亲和层析得到电泳纯的融合蛋白(图 2)。

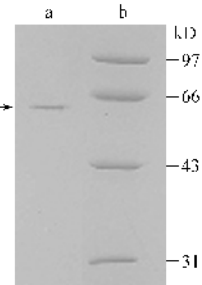


图 2 纯化的融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein

a. Purified protein (marked with the arrow, Mw = 59kD) b. Protein molecular weight marker

2.3 纯化的重组人源化单链抗体-尿激酶融合蛋白的活性分析

采用 Bradford (CBBG-250 染色)法对纯化的融合蛋白进行蛋白定量,并用中国药品生物制品检定所的尿激酶为标准,用溶圈法测定了纯化样品的尿激酶活性,结果表明纯化的融合蛋白中尿激酶的比活达到 80 000IU/mg 融合蛋白。

为进一步分析融合蛋白中单链抗体的生物活性,将纯化的融合蛋白用含 1% BSA 的 PBST 稀释至 10μg/mL,取稀释后的融合蛋白溶液 1mL,加入制备的血栓块,每隔 20min 取出 100μL 溶液样品,利用 ELISA 分析溶液中残留的单链抗体量(见 1.9 节)。结果表明(图 3)随着吸附时间的延长,溶液中残留的融合蛋白量逐渐减少,而且在吸附 100min 后,溶液中残留的融合蛋白量降低至起始量的约 20%,表明融合蛋白中单链抗体保持了较好的血栓结合特性。

3 讨论

大肠杆菌表达系统因其遗传背景清楚、操作简便、经济快速等优点一直是重组蛋白的首选表达系统^[10]。但当重组蛋白的表达需要转录后加工或翻译后修饰时,大肠杆菌表达系统则往往难以胜任。特别是当需要表达的重组蛋白富含

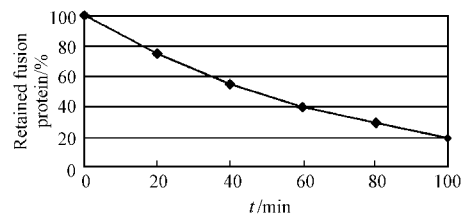


图 3 ELISA 分析融合蛋白对血栓的亲合性

Fig.3 Analysis of affinity to thrombus of fusion protein

二硫键时,由于大肠杆菌胞内是一种还原环境,二硫键通常不能稳定形成^[11],导致表达的富含二硫键的重组蛋白不能

正确折叠而形成包涵体。在本实验室以前的工作中,单链抗体-低分子量尿激酶融合蛋白(其含 8 对二硫键)在大肠杆菌中的表达时,主要以不溶的包涵体形式存在,胞内可溶组份中不能检测到尿激酶活性^[4]。而且本实验室曾尝试将融合蛋白分泌到大肠杆菌的周质中,希望在周质中得到正确折叠的重组蛋白,但结果表明大肠杆菌分泌该融合蛋白的能力很低(结果未发表)。本研究通过选用胞内还原系统缺陷的菌株 Origam(DE3)和共表达 DsbC 等方法,促进了胞内二硫键的形成及异构化,实现了人源化单链抗体-低分子量尿激酶融合蛋白在大肠杆菌中的功能性表达。

本实验室以前的工作表明,设计融合蛋白时,在单链抗体和尿激酶基因之间加入一段序列为(Gly₄ Ser)₃的连接肽能够有效地促进融合蛋白的在体外的复性^[4]。因此,在本研究中,表达的人源化单链抗体-尿激酶融合蛋白中含有该柔性的连接肽。本研究对纯化的融合蛋白的活性分析结果表明,该融合蛋白基本保持了单链抗体和尿激酶的双功能,也暗示该柔性肽能够消除融合蛋白折叠时的空间位阻,有利于融合蛋白在胞内的正确折叠。本研究的结果为设计该融合蛋白的真核表达载体提供了可靠的依据,也为研制导向溶栓药物奠定了良好的基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] HUANG J J(黄君健),YU W Y(俞炜源),HUANG C R(黄翠芬). Preparation of mouse single chain Fv fragment specific against human fibrin by using phage display. *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯),1996,7(1):1~5
- [2] WANG G L(王国力),LIU S H(刘仕辉),HUANG J J(黄君健) et al. Three dimensional structure modelling of the single chain Fv fragment of mouse antibody against human fibrin, *Letters in Biotechnology*

(生物技术通讯),1996,7(1):6~9

- [3] LIU Z Q(刘志刚),YU W Y(俞炜源),LIN J K(林建波). *In vitro* maturation of a humanized mouse ScFv specific against human cross-linked fibrin. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*(细胞与分子免疫学杂志),2001,17(5):462~463
- [4] LIU Z Q(刘志刚),YU W Y(俞炜源),WANG X(王翔). The construction and expression of two humanized ScFv-urokinase fusion genes. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),2000,16(4):514~516
- [5] Saeyer J R, Schlom J, Kashmiri S V S. The effects of induction conditions on production of a soluble antitumor sFv in *Escherichia coli*. *Protein Engineering*, 1994, 7: 1401~1406
- [6] Chames P, Fieschi J, Baty D. Production of a soluble and active MBP-ScFv fusion: favorable effect of the leaky tolR strain. *FEBS Letters*, 1997, 405: 224~228
- [7] Hayhurst A, Harris W J. *Escherichia coli* Skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Protein Expression and Purification*, 1999, 15: 336~343
- [8] HAN S W(韩素文),YU W Y(俞炜源),LI X Z(李秀珍) et al. Study on plasminogen activators secreted by various cultured cells. *Bulletin of the academy of military medical sciences*(军事医学科学院院刊),1987,11(2):101~108
- [9] Loskutoff D J, Mussoni L. Interactions between fibrin and the plasminogen activators produced by cultured endothelial cells. *Blood*, 1983, 62(1):62~68
- [10] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10: 411~421
- [11] Prinz W A, Aslund F, Holmgren A et al. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem*, 1997, 272: 15661~15667

The Functional Expression of Humanized ScFv-urokinase Fusion Protein in *Escherichia coli*

LIU Zhi-Gang¹ LIN Jian-Bo¹ YUAN Xu-Dong² KANG Tie-Jun¹ YU Wei-Yuan^{1*}

¹(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

²(Ambulant clinic of Command of Shenyang Air Force, Shenyang 110015, China)

Abstract The fusion protein of Humanized mouse anti-human fibrin ScFv and the low molecular weight urokinase(IIu-UK) contained seven disulfide bonds and formed inclusion body while expressing in normal *E. coli* strain. By coexpressing DsbC and using the special *E. coli* strain Origam(DE3) which was *trxB/gor* double mutant, the fusion protein IIu-UK was functionally expressed in the cytoplasm of *E. coli*. The expressed fusion protein in the soluble fraction was purified by using affinity chromatography specific against urokinase. The purified fusion protein could combine the thrombus *in vitro* and the specific activity of urokinase reached 80 000IU/mg fusion protein. The result showed that the fusion protein retained the activity of two moieties, and this study laid a foundation for further research of targeting thrombolytic agent.

Key words urokinase fusion protein, *E. coli*, expression

Received : 01-07-2002

This work was supported by Grant from State 863 HI-TECH Research and Development Project of China(No. 102-09-03-01).

* Corresponding author. Tel 86-10-66948828 ; Fax 86-10-63833521 ; E-mail liuzg@nic.bmi.ac.cn

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