

人组织型纤溶酶原激活剂-水蛭素融合基因的构建及其在毕赤酵母中的表达

Construction and Expression of a Fusion Protein Made of Tissue-type Plasminogen Activator and Hirudin in *Pichia pastoris*

于爱平,石炳兴,董春娜,蒋中华,吴祖泽*

YU Ai-Ping, SHI Bing-Xing, DONG Chun-Na, JIANG Zhong-Hua and WU Zu-Ze*

军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850

Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

摘 要 构建并表达兼有溶栓和抗凝活性、减少出血副作用的人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)和水蛭素(HV2)的融合蛋白。通过提取总 RNA 和 RT-PCR 获得 t-PA 基因,与 HV2 基因通过活化凝血因子 X(FXa)识别序列(IEGR)的对应碱基序列连接构成融合蛋白基因。融合蛋白基因经 pGEM-T、pIC9 克隆至表达载体 pIC9K 上,电转入毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115。转化子摇瓶内甲醇诱导表达。纤维蛋白平板溶圈法和纤维蛋白凝块法分别检测溶栓和抗凝活性。琼脂糖凝胶电泳结果显示克隆的 t-PA 基因片段大小为 1700bp,序列测定结果表明其 35 位氨基酸由文献报道的精氨酸突变为色氨酸。限制性酶切和 PCR 鉴定结果均表明融合蛋白基因已克隆入表达载体和宿主菌。甲醇利用实验、G418 抗性筛选获得多拷贝甲醇利用快型克隆。甲醇诱导表达产物具有纤溶活性并可被抗 t-PA 抗体抑制。完整融合蛋白无抗凝活性,但以 FXa 裂解后可释放抗凝活性。同时,融合蛋白以单链和双链两种形式存在。融合蛋白在血栓部位特有的 FXa 作用下靶向释放抗凝活性,具有溶栓抗凝双功能,有望降低临床出血副作用。

关键词 融合蛋白,人组织型纤溶酶原激活剂,水蛭素,溶栓,抗凝

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2005)04-0553-05

Abstract To combine the fibrinolytic with anticoagulant activities for therapy of thrombotic diseases, a fusion protein made of tissue-type plasminogen activator(t-PA) and hirudin was constructed and expressed in *Pichia pastoris*. To improve thrombolytic properties of t-PA and reduce bleeding side effect of hirudin, FXa-recognition sequence was introduced between t-PA and hirudin molecules. The anticoagulant activity of hirudin can be target-released through cleavage of FXa at thrombus site. t-PA gene and hirudin gene with FXa-recognition sequence at its 5'-terminal were obtained by RT-PCR and PCR respectively. The fusion protein gene was cloned into plasmid pIC9K and electroporated into the genome of *Pichia pastoris* GS115. The expression of fusion protein was induced by methanol in shaking flask and secreted into the culture medium. Two forms of the fusion protein, single-chain and double-chain linked by a disulfide bond(due to the cleavage of t-PA at Arg275-Ile276), were obtained. The intact fusion protein retained the fibrinolytic activity but lacked any anticoagulant activity. After cleavage by FXa, the fusion protein liberated intact free hirudin to exert its anticoagulant activity. So, the fusion protein is a bifunctional molecule having good prospect to develop into a new targeted therapeutic agent with reduced bleeding side effect for thrombotic diseases.

Key words fusion protein, tissue-type plasminogen activator, hirudin, thrombolysis, anticoagulation

人组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 是由血管内皮细胞产生的一种丝氨酸蛋白酶,能激活纤溶酶原成为纤溶酶,从而降解血栓中的纤维蛋白,起到溶栓的作用。其 Kringle II 结构域能特异识别并结合纤维蛋白,所以能在血栓局部激活纤溶酶原^[1],引起的出血副反应较低。在血栓性疾病的治疗中,为了防止再栓塞,在使用溶栓药物的同时,往往还使用抗凝药物。研究表明,在与 t-PA 联合应用的抗凝药物中,水蛭素效果要优于肝素^[2]。水蛭素是凝血酶的特异性抑制剂,其 C 末端与凝血酶特异性结合,N 末端具有抑制凝血酶的活性,其抑制常数达到 $10^{-14} \text{ mol}^{-1}$ ^[3]。但水蛭素具有引起出血的副作用。FXa 是一种胰岛素样丝氨酸蛋白酶,在血栓发生时由其非活性形式 FX 活化生成,主要存在于凝血部位并在凝血途径中处于关键和核心位置,可将凝血酶原转变为凝血酶。以其识别序列作为连接肽构建融合蛋白,表达产物可被其裂解。

本研究利用水蛭素 N-末端延伸引起活性降低的特性,构建了一种通过 FXa 识别序列 (IEGR) 连接的 t-PA 与水蛭素的融合蛋白,期望完整的融合蛋白在非血栓部位无抗凝活性而减小出血的危险,只有被血栓部位 FXa 裂解后才释放水蛭素的活性而发挥抗凝作用,从而实现在血栓局部发挥溶栓、抗凝双功能,并降低出血的副作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌株与质粒: ECV304 细胞、*E. coli* DH5 α 和 *Pichia pastoris* GS115 为本室保存, pGEM-T 为 Promega 公司产品, pIC9、pIC9K 为 Invitrogen 公司产品, pIC9-HV 为本室构建保存。

1.1.2 工具酶与抗体: 逆转录试剂盒购自 Promega 公司, DNA 聚合酶、各种限制酶和连接酶均购自 TaKaRa 公司, 抗 t-PA 抗体为军事医学科学院生物工程研究所惠赠。

1.1.3 其它试剂: RNA 抽提液 Trizol 购自 Gibco 公司, G 418、蜗牛酶、牛凝血酶均购自 Sigma 公司, 人纤溶酶原和 FXa 购自 Roche 公司, 人纤维蛋白原购自中国药物生物制品检定所, 琼脂糖购自 Promega 公司, 各种培养基 (LB、YPD、MM、MD、BMGY、BMMY) 均按 Invitrogen 公司推荐的方法配制。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 引物 1 (t-PA 上游引物, 含 *Xho* I 酶切位点) 5'-G CTC GAG AAA AGA TCT TAC CAA GTG ATC TGC AGA GAT G-3', 引物 2 (t-PA 下游引物, 含 *Bln* I 酶切位点) 5'-C CCT AGG CGG TCG CAT GTT GTC ACG AAT CC-3', 引物 3 (含 FXa 识别位点的水蛭素上游引物, 含 *Bln* I 酶切位点) 5'-C CCT AGG ATC GAA GGT CGT ATT ACT TAC ACT GAT TGT ACG GAA TC-3', 引物 4 (水蛭素下游引物, 含 *Not* I 酶切位点) 5'-TT GC GGC CGC TTA TTG TAA ATA TTC TTC TGG-3' 均由上海博亚公司合成。

1.2.2 t-PA 基因的获取及序列测定 用 Trizol 试剂从 ECV304 细胞提取总 RNA 进行 RT-PCR, 具体操作按照试剂盒说明书进行。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7min。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。PCR 产物与 pGEM-T 连接, 以蓝白斑显示挑取白色克隆测序。

1.2.3 表达载体的构建 以 pIC9-HV 为模板, 取引物 3、4 进行 PCR 以获取 5' 端连有 FXa 识别位点的水蛭素基因 (FXa-HV, 简称 FXH), PCR 产物纯化后连接到 pGEM-T, 测序正确。用限制酶 *Bln* I 和 *Not* I 对 pGEM-T-FXH 进行双酶切, 回收水蛭素基因, 以 T4 DNA 连接酶连接到以相同酶切的含 t-PA 基因的重组载体 pGEM-T-t-PA 的回收大片段, 得到 pGEM-T-t-PA-FXH, 简称为 pGEM-T-TFXH。取 pIC9 和 pGEM-T-TFXH 以 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切, 回收 pIC9 大片段和 pGEM-T-TFXH 小片段进行连接, 得到 pIC9-TFXH。将 pIC9K 和 pIC9-TFXH 以 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后连接, 得到 pIC9K-TFXH, 用 *Xho* I 和 *Not* I 作双酶切进行鉴定。表达质粒 pIC9K-TFXH 经 *Sal* I 线性化后以电转法转入 GS115 细胞, 涂 YPD 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~4d。

1.2.4 菌落筛选及鉴定: 从 YPD 平板上挑取同一菌落依次转印至 MM 平板和 MD 平板上, 以检验转化菌的甲醇利用型。用 G 418 以 0.25、0.5、1、2、4mg/mL 的浓度进行梯度筛选, 以获得多拷贝菌株。从高浓度 G 418 平板上挑取单菌落以蜗牛酶裂解, 按文献 [4] 方法用引物 1 和引物 4 进行 PCR 扩增, 进一步证实表达质粒已转入 GS115。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

1.2.5 摇瓶诱导表达: 从含 4mg/mL G 418 的平板上挑取单菌落, 在 50mL BMGY 培养基中以 30 $^{\circ}\text{C}$ 、300

r/min培养至 $OD_{600} = 2 \sim 6$, 室温下离心, 弃上清, 菌体以 BMMY 培养基重悬, 在 30°C 、 $300\text{r}/\text{min}$ 条件下培养, 每 24h 补加甲醇至终浓度 0.5%, 并取样离心收集上清。

1.2.6 蛋白电泳 对相同样品进行了还原性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和非还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用 12% 的分离胶, 5% 的积层胶, 电泳结束后进行银染。

1.2.7 溶栓活性检测: 采用琼脂糖-纤维蛋白平板溶圈法, 参照文献 [5]。用抗 t-PA 抗体与表达上清共孵育后测活以证实溶圈活性是由 TFXH 中 t-PA 所致。

1.2.8 FXa 裂解反应: 参照文献 [6]。500 μL 样品加入 0.2u FXa 37°C 反应 30min。

1.2.9 抗凝活性测定: 参照文献 [7] 采用纤维蛋白凝块法, 取 TFXH 和经 FXa 裂解后的 TFXH 进行活性检测, 以去离子水、t-PA 和水蛭素为对照。具体方法如下: 样品进行 $2 \times$ 连续稀释, 取 10 μL 样品加入 20 μL 凝血酶 (8 IU/mL), 混匀后室温放置 10min, 加入 50 μL 纤维蛋白原 (5mg/mL), 观察纤维蛋白凝块形成。以形成纤维蛋白凝块的最后稀释度为样品的抗凝活性 (ATU/mL)。

2 结果

2.1 t-PA 基因的获取及序列测定

通过总 RNA 提取和 RT-PCR 扩增, 获得了 1700bp 的基因片段, 基因测序结果表明, 除 35 位氨基酸色氨酸与文献报道精氨酸不同之外, 其氨基酸序列组成与文献报道一致^[8]。

2.2 表达载体的构建

表达载体 pIC9K-TFXH 用 *Xho* I、*Not* I 双酶切后琼脂糖凝胶电泳图如图 1。

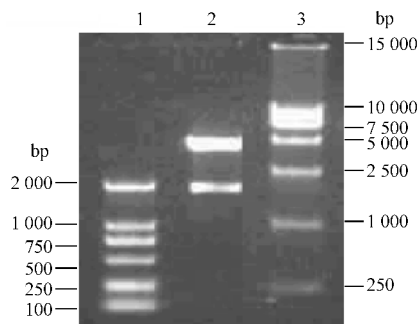


图 1 重组质粒 pIC9K-TFXH 的酶切鉴定

Fig.1 Restriction analysis of recombination plasmid pIC9K-TFXH

1: DNA marker DL2000; 2: pIC9K-TFXH; 3: DNA marker DL15000.

Xho I 和 *Not* I 双酶切得到 1900bp 的片段, 与预期目的片段 TFXH 大小相同, 表明 TFXH 基因正确构建到了载体 pIC9K 上。

2.3 菌落筛选及鉴定

每一转化子均能在 MM 和 MD 平板上快速生长, 且生长速度近似, 说明转化子是甲醇利用快型 Mut⁺。从 78 个 Mut⁺ 个转化子中经 G418 浓度梯度筛选, 在 4mg/mL G418 平板上获得了 8 个高抗性菌株。转化子 PCR 扩增分析结果得到 1900bp 片段, 与目的基因 TFXH 大小一致。

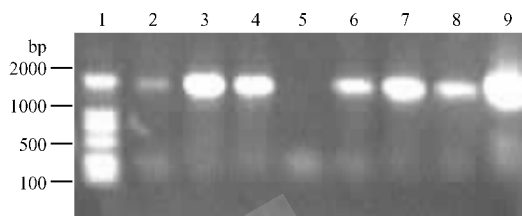


图 2 转化子 PCR 产物琼脂糖电泳

Fig.2 PCR analysis of fusion gene in GS115

1: DNA marker DL2000; 2~4 and 6~9: transformants; 5: GS115/pIC9K.

2.4 摇瓶诱导表达

每 24 h 补加甲醇前取样, 分别在诱导前、诱导 24 h、48 h、72 h、96 h 取样, 离心取上清分别进行还原性 SDS-PAGE 和非还原性 PAGE, 银染结果分别见图 3 和图 4。

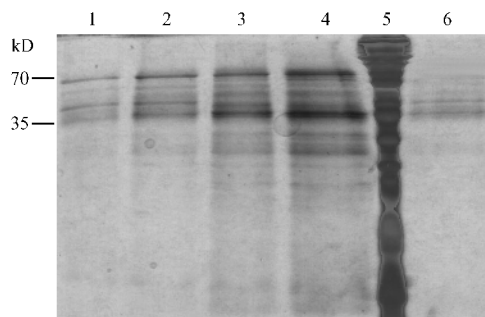


图 3 融合蛋白的还原性 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.3 Reducing SDS-PAGE of fusion protein expressed by GS115/pIC9K-TFXH

1: induced for 24h; 2: induced for 48h; 3: induced for 72h; 4: induced for 96h; 5: molecular weight standard; 6: sample before induction.

从图 3 中可看到, 在分子量约 70kD 和 35kD 处出现表达量随诱导时间延长而逐渐增多的两条蛋白带, 而在图 4 中, 只在大分子量处出现一条随诱导时间延长而逐渐增多的蛋白带。这是因为 TFXH 中的 t-PA 在 Arg275-Ile276 间可被蛋白酶裂解, 生成由一对二硫键相连的两条链^[8], 单链 t-PA 和双链 t-PA 具有相同的溶栓活性^[9]。在诱导表达过程中, 部分

t-PA可能被裂解,所以在进行还原性 SDS-PAGE 时,未被裂解的单链融合蛋白 TFXH 表现分子质量为 70kD 的蛋白带,而被裂解的双链 TFXH 中的二硫键打开形成相对分子量约为 35kD 的两条链。在非还原性 PAGE 中,单链和双链 TFXH 的电泳行为是一致的,表现为一条蛋白带。

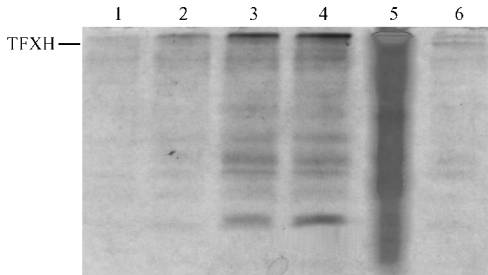


图4 融合蛋白的非还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.4 Non-reducing PAGE of fusion protein expressed by GS115/pIC9K-TFXH

1 induced for 24h ; 2 induced for 48h ; 3 induced for 72h ; 4 induced for 96h ; 5 molecular weight standard ; 6 sample before induction.

2.5 活性测定

2.5.1 溶栓活性 发酵液上清按文献^[5]描述方法,以等体积加样检测纤溶活性,结果表明随着诱导时间的增加,溶栓活性增强(图5)。当96h诱导上清与抗t-PA抗体共孵育后,其纤溶活性丧失,表明融合蛋白保留了其t-PA的活化纤溶酶原为纤溶酶的功能。

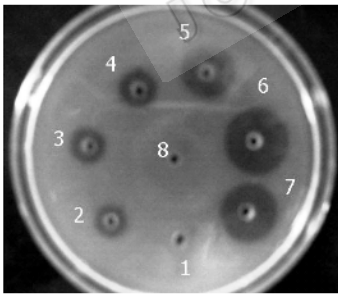


图5 融合蛋白在GS115中表达产物活性鉴定

Fig.5 Fibrinolytic activities of the expressed products of transformants

1 sample before induction ; 2 induced for 12 h ; 3 induced for 24 h ; 4 induced for 48 h ; 5 induced for 72 h ; 6 induced for 96 h ; 7 t-PA ; 8 the culture supernatant induced for 96h , bound with anti-t-PA antibody.

2.5.2 抗凝活性 各样品测定结果见图6,对照中去离子水和t-PA均无抗凝活性,水蛭素(3mg/mL)抗凝活性较高,完整融合蛋白TFXH无抗凝活性,经FXa裂解后TFXH表现出较低的抗凝活性。这说明水蛭素N-端因连接t-PA被封闭后其抗凝活性丧失,该结果与文献报道水蛭素的N-末端对其抗凝活性和功

能至关重要是一致的^[10]。经FXa裂解后TFXH表现出了一定的抗凝活性,说明水蛭素的抗凝活性被释放,其活性较低的原因可能有:TFXH的表达量较少,裂解出的水蛭素浓度较低;FXa裂解反应可能不彻底,部分TFXH未被裂解开。

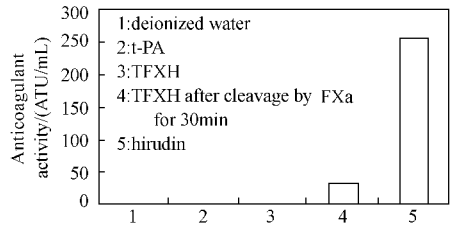


图6 融合蛋白被FXa裂解前后抗凝活性的变化

Fig.6 Anticoagulant activity of TFXH before and after cleavage by FXa

3 讨论

t-PA是临床上治疗血栓性疾病的重要溶栓药物,是对急性心肌梗死、肺梗塞等患者进行急救的首选药物。目前主要通过基因工程方法利用动物细胞培养生产t-PA,其生产周期长,易污染,成本高^[11]。而利用大肠杆菌工程菌生产则需对包涵体进行变性、复性,t-PA含有17对二硫键,活性回收率较低^[12]。水蛭素分子中有3对二硫键,与t-PA融合后的TFXH将含有20对二硫键,若以包涵体形式表达,其变性、复性将更加困难。所以我们选用毕赤酵母对融合蛋白进行表达,其优点在于:毕赤酵母属于真核表达系统,且是分泌表达,有利于保持融合蛋白的正确构象和活性。本研究成功地将融合蛋白基因导入了毕赤酵母并获得了有活性的表达产物,但摇瓶内表达量较低。随后以发酵罐进行表达,表达量未见显著提高,表达产物主要以双链形式存在,且杂蛋白增多。其原因可能是:对t-PA密码子进行分析发现,其编码精氨酸的密码子在毕赤酵母中是稀有密码子,可能影响了其表达效率,表达产物在发酵罐中降解增多,影响了最终的表达量。

目前临床所用溶栓和抗凝药物存在的普遍问题是具有出血副作用。溶栓和抗凝药联合使用,有可能使出血倾向更严重。已有研究工作者将水蛭素与溶栓药物构建融合蛋白^[13-14],结果表明将水蛭素构建至溶栓药物的下游,水蛭素将失去抗凝活性。构建至上游其活性保持良好,这样虽然能够提高溶栓效果,但水蛭素引起的出血倾向也无法避免。

本研究创新点在于在构建融合蛋白基因时将水

蛭素置于 t-PA 下游,中间连以 FXa 识别序列。其意义在于:FXa 在游离状态下活性很低,但在血栓部位其它因子的参与下,其活性将显著提高^[15]。因此,在非血栓部位,融合蛋白很少裂解,水蛭素 N 端被上游 t-PA 封闭,其抗凝活性丧失,可减少出血副作用的发生;而在血栓部位利用高活性的 FXa,将融合蛋白裂解生成 t-PA 和 HV,在血栓局部发挥溶栓和抗凝作用,提高溶栓抗凝效率,减少循环系统中 t-PA 和 HV 的浓度,从而降低出血副作用。另外,由于 HV 只有被 FXa 裂解下来后才具有抗凝活性,其裂解过程起到了缓释作用,因此也可能降低出血副作用。本研究结果显示,在体外,完整融合蛋白具有溶栓活性而无抗凝活性,但在 FXa 作用下释放出抗凝活性,这意味着在体内发生血栓时,融合蛋白可靶向性地在血栓部位体现出溶栓和抗凝的双功能,从而提高溶栓效率,减少出血副作用,这需要体内实验的进一步证实。

REFERENCES (参考文献)

[1] Verheijen J, Caspers M, Change T *et al.* Involvement of finger domain and kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator in fibrin binding and stimulation of activity by fibrin. *EMBO J*, 1986, **5**(13): 3525 - 3530

[2] Manouchehr M, Jeannette S, Claudine S *et al.* Evaluation of the inhibition by heparin and hirudin of coagulation activation during r-tPA-induced thrombolysis. *Blood*, 1989, **74**(3): 1025 - 1030

[3] Markwardt F. Hirudin and derivatives as anticoagulant agents. *Thromb Haemost*, 1991, **66**(1): 141 - 152

[4] Linder S, Schliwa M, Kube-Grandenath E. Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques*, 1996, **20**(6): 980 - 982

[5] Saksela Q. Radial caseinolysis in agarose: A simple method for detection of plasminogen activators in the presence of inhibitory substances and serum. *Anal Biochem*, 1981, **111**(2): 276 - 282

[6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[7] Markwardt F. Hirudin as an inhibitor of thrombin. *Methods in Enzymology*. New York, Academic Press, 1970, **19**: 924 - 932

[8] Diane P, William E, William J *et al.* Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature*, 1983, **301**(20): 214 - 221

[9] Wallen P, Bergsdorf N, Ranby M. Purification and identification of two structural variants of porcine tissue plasminogen activator by affinity adsorption on fibrin. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **719**(2): 318 - 328

[10] Wirsching F, Opitz T, Schwienhorst A. Display of functional thrombin inhibitor hirudin on the surface of phage M13. *Gene*, 1997, **204**(1 - 2): 177 - 184

[11] Datar RV, Cartwright T, Rosen CG. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology*, 1993, **11**(3): 349 - 357

[12] Harris T, Patel T, Marston F *et al.* Cloning of cDNA coding for human tissue-type plasminogen activator and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Biol Med*, 1986, **3**(3): 279 - 292

[13] Szarka SJ, Sihota EG, Habibi HR *et al.* Staphylokinase as a plasminogen activator component in recombinant fusion proteins. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(2): 506 - 513

[14] Wirsching F, Luge C, Schwienhorst A. Modular design of a novel chimeric protein with combined thrombin inhibitory activity and plasminogen-activating potential. *Mol Genet Metab*, 2002, **75**(3): 250 - 259

[15] Mann KG, Kalafatis M. The coagulation explosion. *Cerebrovasc Dis*, 1995, **5**(2): 93 - 97

安捷伦科技在上海成立全新科学培训中心

2005年5月,安捷伦科技宣布在上海成立全新的生命科学和化学分析技术培训中心。该中心将为亚太区的科学家提供适用于食品安全、环境检测、石化检测、药品检测和生命科学方面的主要测量技术培训。

新的培训中心位于2002年在上海成立的安捷伦研发和制造中心旁边。它将为中国及包括日本、韩国、印度、泰国、新加坡和马来西亚在内的亚太区其他国家的工业、政府及大学的科学家提供服务。在第一年内,将会有大约170人接受来自中国和其他国家的科学专家进行的培训。

学员们将得到化学分析和生命科学技术方面亲自动手的指导机会。这令他们能够对化合物进行精确鉴别、量化和分析,并推动生物科学研究的进程。这项培训将帮助科学家加速基础研究和新药品发现进程,并提升质量管理以及主要的测试与测量能力。

中国是安捷伦最大和发展最快的市场之一。培训中心的学员将大部分来自中国。中国学员将主要关注于在中国非常重要并处于发展的食品安全、环境检测、以及石化、药品及中药行业方面的技术。

上海培训中心是安捷伦在全球设立的第三家此类机构。其他两家分别位于美国和德国。

更多关于技术支持、合作伙伴以及决策管理方面的信息,请访问 www.agilent.com/go/news

(万博宣伟 供稿)