

不含信号肽序列人尿激酶原全长cDNA的克隆及在大肠杆菌中的表达

胡宝成 李军 俞炜源 方继明

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

从pro-UK全长cDNA中切下包括信号肽序列的N端371bp片段,经Fnu4HI不完全酶切将信号肽序列去掉,回收304bp片段,该片段再与人工合成的含Hind III、EcoRV内切酶位点和起始密码ATG的寡核苷酸片段连接、转化得一重组质粒;该中间质粒经酶切和序列分析证明构建正确后再与pro-UK cDNA其余片段相连接,得到全长pro-UK cDNA。我们将所得不含信号肽序列的pro-UK cDNA重组到带有P₂PL启动子的原核表达载体pBV220中,转化大肠杆菌JM101,42℃诱导6h,菌体超声破碎后其上清及不溶成份均可测出尿激酶活性。用ELISA法检测尿激酶抗原性表现为强阳性;纤维蛋白溶解平板法(FAPA)测定活性可达500-1000IU/L,经复性活性可达60000IU/L,且表达产物可被抗尿激酶血清特异中和,经相差显微镜及电镜观察均证明表达蛋白绝大部分以包涵体形式存在。Western blot分析证明表达产物为单链pro-UK,分子量约为47kDa,与国外文献报导一致。

关键词 人尿激酶原cDNA;大肠杆菌;表达;复性

近年来作为第二代溶血栓制剂的尿激酶原(prourokinase)由于它具有特异的溶血栓作用,又很少引起全身系统性出血而日益受到人们的关注。但是尿激酶原在天然材料中含量很低,难于大量制备。因而通过基因工程手段获得大量的尿激酶原是一较有希望的途径^[1-6]。本实验室已于1989年在国内首先获得了pro-UK全长cDNA^[6],并在中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中表达了有生物活性的尿激酶原^[7]。但用工程细胞株生产pro-UK存在着成本高、工艺难和价格贵等缺点,如能在大肠杆菌中表达出有生物活性的pro-UK,即可简化生产程序,降低生产成本,将产生较大的社会效益和经济效益。1985年以来,已有研究者报道了pro-UK在大肠杆菌中的表达^[1,2,6],活性都比较低;1988年日本的Hibino, Y.等人报道在大肠杆菌中表达了从Ser开始的成熟pro-UK,通过复性表达水平有很大提高^[8],使大肠杆菌表达pro-UK更成为可能。我们构

建了不含信号肽序列的尿激酶原全长cDNA,并在大肠杆菌中得到了表达。

材料和方法

(一) 材料

1. 人尿激酶原全长cDNA:由本课题组克隆获得。

2. 菌种和质粒:RRI、JM101、JM103大肠杆菌(受体菌)由本室保存;pBV220质粒和DH5α(受体菌)均由中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室提供;pUC18购自医学科学院基础所。

3. 工具酶和生化试剂:各种工具酶分别购自New England Biolabs公司、Boehringer Mannheim公司、医学科学院基础所、华美生物工程公司;T7 Sequence Kit购自Pharmacia公司;(α-³²P-dATP)(比活3000Ci/mmol)购

本文于1992年2月20日收到。

自福瑞公司。生化试剂国产或进口均为分析纯。

4. 标准尿激酶、凝血酶和纤维蛋白原: 标准尿激酶购自卫生部生物制品检定所和日本(Green Cross, Osaka), 凝血酶购自天津生化制品厂; 纤维蛋白原购自中国药品生物制品检定所。

5. 抗血清、IgG和酶标SPA: 兔抗人尿激酶血清和IgG为本室制备; 辣根酶标记的SPA购自卫生部兰州生物制品研究所; 兔抗人t-PA血清由上海第二医科大学任文华教授提供。

(二) 方法

1. 质粒DNA的提取: 采用煮沸裂解法(少量提取)和温和裂解法(大量提取)^[9,10]。

2. 质粒DNA的酶解、片段回收、连接、转化和杂交筛选及酶切鉴定: 参照文献[9—11]中的方法进行或稍作改进。

3. DNA探针的制备: 按Random primer^[1,2]的方法进行。

4. DNA序列分析: 按T7 Sequencing Kit操作程序进行。

5. u-PA活性检测: 按文献[13]用ELISA法检测; 纤维蛋白溶解平板法(FAPA)按文献[14]的方法进行。

6. Western blot: 首先将样品经12%的SDS-PAGE电泳分离, 再经半干法转移到硝酸纤维素膜上, 用含3% BSA的Tri-HCl(pH7.4)封闭1h, 加兔抗UK血清(1:100), 室温反应5—6h, 0.01mol/L PBS-Tween 20洗4 min, 加酶标SPA(1:20), 室温反应1h, 二氨基联苯胺显色, 2%硫酸终止反应。

结果与讨论

(一) 含不带信号肽序列的 pro-UK

cDNA的重组质粒的构建及鉴定

1. 人工合成寡核苷酸片段退火成

5' AGCTTGATATCATG 3'

3' ACTATAGTACT 5'

其中含有HindⅢ、EcoRV限制酶位点和起始密码ATG。

2. 从pMMUK中回收所需片段: 将pMMUK(含pro-UK全长cDNA的重组质粒)用HindⅢ和Pst I双酶切, 分别回收371bp和1.2kb片段。

3. 去掉信号肽: 以Fnu4HI酶对371bp片段作不完全酶切, 回收304bp片段。用Fnu4HI不完全酶切371bp片段, 将产生6个不同大小的片段: 67bp、118bp、186bp、67+118=185bp、118+186=304bp、371bp, 收其中304bp片段, 该片段编码的第一个氨基酸即为成熟pro-UK的第一个氨基酸, 信号肽序列已被去除。

4. 构建含不带信号肽序列的pro-UK中间质粒: 将人工合成寡核苷酸片段退火, 再将pUC18用HindⅢ和Pst I双酶切, 回收2.7kb片段, 将上述两片段与回收的304bp片段连接, 转化JM101, 以 α -³²P-dATP标记的尿激酶原基因片段为探针, 对转化菌菌落点膜进行原位杂交筛选。对杂交阳性克隆菌质粒快抽鉴定大小(图略), 选分子量增大的质粒进行酶切分析, 经HindⅢ、Pst I、EcoRV、Bg1Ⅱ、Sca I、HindⅢ-Pst I酶切, 片段大小与预计的一致。该质粒进行序列分析证实构建正确(图1)。

5. 构建含不带信号肽序列的pro-UK全长cDNA的重组质粒: 将上述中间质粒用Pst I酶切后与pro-UK的Pst I-Pst I(1.2kb)片段连接后转化JM101。对转化菌进行DNA快速抽提, 用EcoRI酶切选出方向正确的重组质粒。至此我们得到了不含信号肽序列的pro-UK全长cDNA。

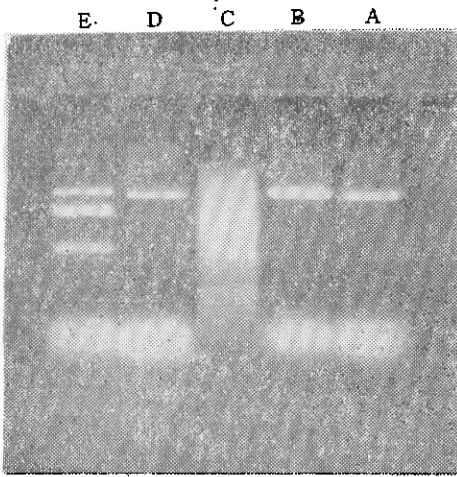


图 1 中间质粒(pUC18-UK1)酶切图谱
Fig.1 Restriction map of pUC18-UK1 (intermediate plasmid).
A. Hind III, B. Pst I, C. 1kb Ladder; D. EcoRV, E. ScaI

(二) pro-UK cDNA在大肠杆菌中的表达

1. pBV220-pro-UK表达载体的构建: pBV220是带有P_RP_L启动子和CIts857基因的原核表达载体,属温度诱导型。首先将pUC18-UK用EcoRV和Sma I 双酶切,回收1.5kb的 pro-UK 全长 cDNA; 再将 pBV220用Sma I 酶切,经 CIP处理后与1.5kb pro-UK片段连接,转化大肠杆菌DH5α;转化菌经快抽鉴定质粒大小,并用 Bgl II 酶切选出插入方向正确的重组质粒,这样 pro-UK置于 P_RP_L 启动子下游(图 2)。

2. pro-UK在大肠杆菌中的表达: 将含pBV220-pro-UK质粒的菌种在 30℃

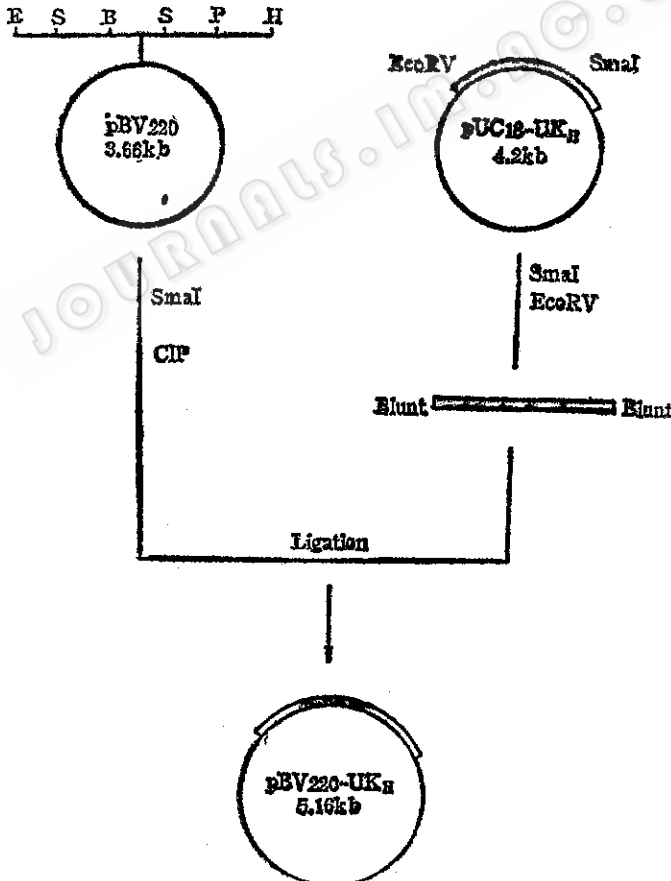


图 2 表达载体pBV220-UK_H的构建

Fig.2 Construction of expression vector pBV220-UK_H
Bgl II: 530bp,4672bp. Correct orientation 1527bp,3675bp. Reverse orientation

下摇过夜，再以5%扩大培养，待菌浓度达到 $OD_{600nm} = 0.4-0.6$ 时，迅速转到 $42^{\circ}C$ ，使CI抑制子灭活， P_L 启动子活化，继续振摇一定时间后收集菌体，经相差显微镜及电镜观察表达蛋白绝大部分以包涵体的形式存在(图片略)。菌体重悬于1/10体积的 $10mmol/L$ PBS($pH7.4$)中，加溶菌酶($1mg/ml$) $25^{\circ}C$ 作用15 min后，超声破碎($6 \times 30s$)，经差速离心收集包涵体，用洗液洗一次，再用裂解液于 $4^{\circ}C$ 下作用16—24h，然后对 $7mol/L$ 盐酸胍在 $4^{\circ}C$ 下透析2h，将透析后的溶液用复性缓冲液稀释约50倍， $17^{\circ}C$ 作用16—24h，每

步都留样进行ELISA和FAPA法测活，结果见表1。细菌培养液在诱导和不诱导时均测不到尿激酶抗原性和纤溶活性； $30^{\circ}C$ 不诱导，细菌裂解物也测不到尿激酶抗原性和纤溶活性； $42^{\circ}C$ 诱导时细菌裂解上清液和包涵体均可测到尿激酶抗原性和纤溶活性，以6h诱导为最高。

3. 不同受体菌对表达的影响：将已转入大肠杆菌DH5 α 中的表达载体pBV220-pro-UK的质粒DNA分别转化大肠杆菌RRI, JM101, JM103，经测定发现受体菌对表达水平有影响，相差大约2—4倍，其中以JM101的表达量为最高

表1 pro-UK在大肠杆菌中不同诱导时间ELISA和FAPA法测定的有关数据
Table 1 Assay of pro-UK expressed in *E. coli* using ELISA and FAPA method

Vector		pBV220-pro-UK						pBV220					
		Induced time(h)						Induced time(h)					
Experiment		0	2	4	6	8	18	0	2	4	6	8	18
ELISA	Bacterial lytic sample		0.17		1.26		1.07		0.00		0.09		0.00
	Inclusion body not renatured sample	0.00		0.56		1.19		0.00		0.00		0.04	
A _{492nm}	Bacterial lytic sample		0.35		1.20		0.61		0.11		0.12		0.13
	Inclusion body not renatured sample	0.13		0.57		1.04		0.15		0.14		0.12	
FAPA	Bacterial lytic sample		0.0		10.0		6.0		0.0		0.0		0.0
	Inclusion body not renatured sample	0.0		6.0		9.0		0.0		0.0		0.0	
Diameter of lysis zone(mm)	Bacterial lytic sample		0.0		13.0		8.0		0.0		0.0		0.0
	Inclusion body not renatured sample	0.0		8.0		10.5		0.0		0.0		0.0	

(图片略)。

4. 对表达产物的复性研究：用前面所述方法对包涵体进行复性，复性前活性仅为500—1000IU/L；用复性缓冲液作用后，活性可达60000IU/L以上，说明得到了较好复性(图片略)。ELISA法和FAPA法测定有很好的 consistency。

5. 盐酸胍对u-PA活性影响：由于盐酸胍是蛋白质的强变性剂，我们将包涵体用 $7mol/L$ 盐酸胍溶解，复性时稀释50倍。为了弄清盐酸胍对u-PA FAPA法测活是否有影响，我们做了如下实验：

将不同浓度的盐酸胍对同样量的标准尿激酶混合加样于纤溶平板上，发现不同浓度的盐酸胍对u-PA FAPA法测活有影响(图3)盐酸胍浓度从 $1.4mol/L$ 开始使溶解圈变小，到 $5.6mol/L$ 就几乎没有溶解圈出现了，而低度时影响不明显，如 $0.35mol/L$ ， $0.7mol/L$ 盐酸胍对u-PA溶解圈几乎没有影响。所以在我们复性后的溶液中盐酸胍对FAPA法测活没有影响。

(三) 表达产物的鉴定

1. 为确证引起溶解圈(FAPA)形成的表达产物是u-PA，而不是由其它蛋白

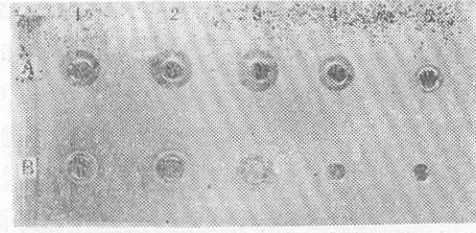


图 3 盐酸胍对UK FAPA法测活的抑制试验结果
Fig.3 Inhibition of lysis zone of standard UK by guanidine-HCl

A: 1. Control; 2. 0.35mol/L guanidine-HCl; 3. 0.7mol/L guanidine-HCl; 4. 1.4mol/L guanidine-HCl; 5. 2.8mol/L guanidine-HCl
B: 1. 5.6mol/L guanidine-HCl; 2. 7.0mol/L guanidine-HCl; 3. Control

水解酶如胰蛋白酶所引起, 我们进行了如下鉴别试验: (1) 将制好的纤溶平板于 80°C 保温1h, 使纤溶酶原灭活, 当加入纤溶酶原激活物如t-PA、u-PA时, 就不再产生溶解圈活性, 而其它蛋白水解酶如胰蛋白酶仍能形成溶解圈。灭活实验结果证实标准UK和表达的经复性的包涵体裂解物都不再产生溶解圈活性, 而胰蛋白酶仍照常形成溶解圈(图片略); (2) 抗血清中和抑制试验: 取标准UK和包涵体复性液分别与抗UK血清、抗t-PA血清及正常兔血清 37°C 保温1h; 中和后再加样于纤溶平板上, 抗UK血清能完全中和抑制标准UK及包涵体复性液的溶解圈, 而抗t-PA血清及正常兔血清无中和抑制作用(图

4)。

以上鉴定实验确证我们的大肠杆菌表达产物为u-PA。

2. Western blot 试验: 将含载体pBV220和含质粒pBV220-pro-UK的菌种在 30°C 培养, 42°C 分别诱导0h、6h, 取菌体进行SDS-PAGE电泳, 再作Western blot, 含pBV220-proUK质粒的菌诱导6h的在47kDa处呈现一条带(图片略), 而对照载体和含pBV220-proUK质粒的菌不诱导时均没有转移带出现, 说明诱导后出现的带即为表达的pro-UK带。表达产物为单链pro-UK, 分子量与国外文献报道一致。这个分子量比天然pro-UK的分子量(54kDa)低, 是由于在Asn302位没有糖基化的缘故。

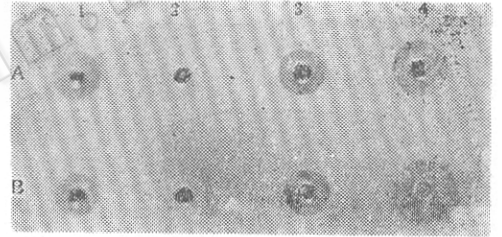


图 4 抗血清中和试验结果

Fig.4 Inhibition of lysis zone by anti-serum
A: Standard UK; B: Renatured product of inclusion bodies
1. Control; 2. Plus UK anti-serum; 3. Plus t-PA anti-serum; 4. Plus normal rabbit serum

参 考 文 献

- [1] Holmes, W.E. et al., *Biotechnology*, 3:923-927, 1985.
- [2] Jacobs, P. et al., *DNA*, 4:139-146, 1985.
- [3] Cheng, S.M. et al., *Gene*, 69:357-363, 1988.
- [4] Pierard, L. et al., *DNA*, 8:321-328, 1989.
- [5] Winkler, M.E. et al., *Biotechnology*, 3:990-1000, 1985.
- [6] 方继明等: 解放军医学杂志, 15:10, 1990.
- [7] 李凤知等: 生物工程学报, 7(2):114-119, 1991.
- [8] Hibino, Y. et al., *Agric. Biol. Chem.*, 52(2):329-336, 1988.
- [9] 彭秀玲: 基因工程实验技术, 科学出版社, pp. 59-60, 143-150, 1987.
- [10] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, pp. 88-91, 1982.
- [11] Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press pl. 25-1, 101, 1989.
- [12] Feinberg, A.P. et al., *Analytical Biochemistry*, 132:6-13, 1983.

[13] 李秀珍等: 军事医学科学院院刊, 12:138—141,1988.

[14] 韩素文等: 军事医学科学院院刊, 11:101—108,1987.

Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Human Non-signal Peptide Prourokinase cDNA

Hu Baocheng Li Jun Yu Weiyuan Fang Jiming

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Non-signal peptide human pro-urokinase cDNA was obtained using synthetic oligonucleotide and DNA recombination methods, and was successfully expressed in *E. coli*. The plasmid pMMUK which contains pro-UK cDNA (including both the entire coding sequence and the sequence for signal peptide) was digested with Hind III and Pst I, so that the N-terminal 371bp fragment could be recovered. A 304bp fragment was collected from the 371bp fragment partially digested with Fnu4HI in order to remove the signal peptide sequence. An intermediate plasmid was formed after this 304 fragment and the synthetic oligonucleotide was ligated with pUC18. Correctness of the ligation was confirmed by enzyme digestions and sequencing. Joining the Pst I -Pst I fragment of pro-UK to the intermediate plasmid, we got the final plasmid which contains the entire coding sequence of pro-UK without signal peptide. The suitable coding sequence was inserted into pBV220 just under the control of temperature-induced promoter $P_{\lambda}P_L$, mature prourokinase was expressed in *E. coli* at 42°C. Both sonicated supernatant and inclusion body of the bacterial host JM101 showed positive results by ELISA and FAPA assay. After renaturation, the biological activity of the expressed product was increased from 500—1000IU/L to about 60000IU/L. The bacterial pro-UK gives a molecular weight of about 47000 daltons by Western blot analysis and it can be completely inhibited by UK antiserum but not by t-PA antiserum and normal rabbit serum.

Key words Human pro-urokinase cDNA; *E. coli*; gene expression; renaturation