

基因工程链激酶 (r-SK) 纯化及其 单克隆抗体制备和鉴定

丁皓 朱运松 吴晓俐 周兴华 宋后燕

(上海医科大学分子遗传学研究室, 上海 200032)

摘要 采用 Rotofor 等电聚焦和分子筛技术纯化大肠杆菌表达的重组链激酶 (r-SK), 其纯度为 97%, 比活性 1×10^6 IU/mg, 回收率 41%。分析所纯化的 r-SK N 端氨基酸顺序证实其 1—15 个氨基酸顺序与 SK 基因的核苷酸顺序所示 3 联密码子一致。以纯化 r-SK 为抗原, 通过杂交瘤技术构建了分泌抗 r-SK 单克隆抗体 (McAb) 杂交瘤细胞 (4D₁₁)。该 McAb 属 IgG₁ 亚型, 特异地作用于 r-SK 和 C 组 β 溶血性链球菌分泌的 SK。用底物显色法测定该 McAb 可抑制 SK 对纤溶酶原的激活。Western blot 法证实该 McAb 能识别分子量为 16 250Da 的 r-SK 的 CNBr 裂解片段。推测 SK 蛋白中第 71 残基至第 237 残基间的氨基酸顺序参与 SK 与纤溶酶原的结合。

关键词 重组链激酶, 等电聚焦, 单克隆抗体, 链激酶活性

我们通过 PCR 技术扩增和克隆了链激酶 (Streptokinase, SK) 基因, 并构建了 P_RP_L 启动子及 5S RNA 基因的终止信号 t₁、t₂ 控制的 SK 基因表达质粒。该质粒用 K802E. coli 进行表达, 产物 r-SK (recombinant streptokinase) 形成包涵体, 占表达菌总蛋白的 40% 左右。根据 SK 的等电点以及包涵体的水不溶性特点, 本文采用制备型等电聚焦仪对 r-SK 进行纯化, 用纯化的 r-SK 制备了抗 r-SK 单克隆抗体 (McAb), 并对其进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 表达 r-SK 工程菌 pSTE-1 培养

另文报道。

1.2 r-SK 纯化

4g pSTE-1 菌, 用 0.05mol/L pH 7.8 Tris-HCl (含 0.02mol/L EDTA, 0.5mg/ml 溶菌酶) 20ml 悬浮, 室温搅拌 30 分钟。再加 Triton X-100 (终浓度 2%), NaCl (终浓度 0.5mol/L), 室温搅拌 30 分钟后, 离心 (20 000g) 30 分钟。沉淀用 0.05mol/L pH 7.8 Tris-HCl, 0.02mol/L EDTA 洗涤 3 次。加少量 ddH₂O 悬浮沉淀, 并对 ddH₂O 透析过夜。加尿素于透析物中 (终浓度 4mol/L) 和 Ampholine (pH 3—10, Bio-Rad) (终浓度 2%), 用 Rotofor TM 型等电聚焦仪 (Bio-Rad) 进行电泳 (12W, 4°C, 4 小时)。分管收集, 采用 SDS-PAGE (10%) 电泳鉴定每一管收集的蛋白质分子量。合并含 SK 各

管溶液, 用 0.05mol/L pH 7.4 PBS (含 0.02mol/L EDTA, 2.5mol/L 甘氨酸) 透析 (4℃) 72 小时。离心收集上清液, 超滤浓缩。然后以 6ml/h 流速通过 Sephadex G-100 (2×100cm, 0.05mol/L pH 7.4 PBS 平衡), 收集含 r-SK 部分, SDS-PAGE (12%) 电泳鉴定。

1.3 r-SK 鉴定

1.3.1 r-SK 活性鉴定: 采用发色底物法^[1], 参考 SK 活性标准品 (8×10⁵u/mg, Sigma)。

1.3.2 r-SK 蛋白定量: 采用 Bradford 法^[2]。

1.3.3 r-SK N 端氨基酸顺序分析: 纯化的 r-SK 经 SDS-PAGE (12%) 电泳后, 用半干蛋白转移仪 (Bio-Rad) 将 r-SK 转移到 PVDF 膜, 考马斯亮蓝染色。由中国科学院上海生物化学研究所夏其昌研究员做 N 端氨基酸分析。

1.4 抗 r-SK McAb 制备

r-SK (100μg) 与福氏完全佐剂混匀, 每 2 周皮下注射 Balb/c 小鼠 (8 周龄, 雌性), 反复 3 次。末次腹腔注射 100μg r-SK 后第 3 天按常规方法^[3]取免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞 (上海生物细胞所) 融合。经 ELISA 筛选和有限稀释反复克隆, 获得分泌抗 r-SK McAb 的杂交瘤细胞 (4D₁₁)。将 4D₁₁ 注入经液体石蜡油预处理的 Balb/c 小鼠腹腔中, 诱生腹水。用葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 亲和层析 (Pharmacia) 和 Water's 650 快速蛋白分离系统纯化腹水和培养液中 McAb。将 4D₁₁ 细胞无血清培养液浓缩 20 倍, 用兔抗鼠各种 Ig 及亚类抗血清 (上海生物制品研究所) 作琼脂双扩散鉴定 McAb 的亚类。按 Beatty 等^[4]改进的间接 ELISA 法测定 McAb 对 r-SK 的亲数和常数。

1.5 CNBr 裂解 r-SK

参照 Soderling 等报道的方法^[5]。

1.6 Western blot

r-SK、SK (8×10⁵u/mg, 内加白蛋白作为保护剂, Sigma) 和 r-SK 的 CNBr 裂解片段经 SDS-PAGE 电泳后, 用半干蛋白转移仪将凝胶上蛋白及裂解片段转移到硝酸纤维素滤膜上, 然后按文献 [6] 的方法用抗 r-SK McAb 与膜上的蛋白和片段进行反应。

1.7 抗 r-SK McAb 对 SK 活性的影响

参照文献 [7] 方法, 用发色底物法观察抗 r-SK McAb 对 SK 激活纤溶酶原的影响。

2 结 果

2.1 r-SK 纯化

采用低渗缓冲液和溶菌酶所制备的 r-SK 包涵体在 SDS-PAGE 电泳图中仍可见少量大于或小于 47 000Da 分子量的蛋白条带 (图版 1-A)。经 Rotofor 等电聚焦后, 大于 47000 分子量的蛋白质被去除, 但仍可见小于 47 000Da 分子量的蛋白质 (图版 1-B)。用 Sephadex G-100 可将这些小分子蛋白除去, 使纯度提高到 97% (图版 1-C)。

采用 Rotofor 等电聚焦和分子筛系统所获得的 r-SK 比活性为 1×10⁶ IU/mg, 与国外 SK 产品相同, 回收率为 41%。表 1 总结纯化过程中各步产物的 r-SK 含量、r-SK 活性、

比活性、纯化倍数及回收率。

表 1 Rotofor 等电聚焦-Sephadex G-100 系统提纯 r-SK 的结果

Table 1 The results of r-SK purified by isoelectric focusing in Rotofor cell combined with Sephadex G-100

	Protein	Total activity ($\times 10^5$) (IU)	Special activity (IU/mg)	Fold of purification	Recovery of activity (%)
Wet bacteria	14.4g	7.8	540	—	100
Inclusion body	101mg	5.6	5 500	10.1	72
Purification with Rotofor cell	46mg	4.4	95 000	175	57
Purification with Sephadex G-100	32mg	3.2	100 000	185	41

分析纯化的 r-SK N 端 15 个氨基酸, 其结果与本室以及其它文献报道⁽⁸⁾的 SK 基因核苷酸顺序所示氨基酸三联密码完全一致。

r-SK N-端氨基酸顺序: N-Val Lys Pro Val Gln Ala Ile Ala Gly Ser
核苷酸顺序: 5'-GTC AAG CCT GTC CAA GCT ATT GCT GGG TCT
Glu Trp Leu Leu Asp...
GAG TGG CTG CTA GAC...

2.2 抗 r-SK McAb 制备

取 r-SK 免疫小鼠脾细胞与 SP2/0 融合, 用 ELISA 法筛选和有限稀释克隆, 获得 1 株分泌抗 r-SK McAb 杂交瘤细胞 (4D₁₁)。4D₁₁ 细胞诱生的小鼠腹水的抗 r-SK 效价大于 10^8 , 属于 IgG₁ 亚类。Western blot 结果显示, 该 McAb 特异地识别 r-SK 和自 C 组 β 溶血性链球菌分泌的 SK (图版 I-D 中 a, b)。抗 Sk McAb 除了检测到分子量为 43kDa 的 SK 外, 还可与略低于 43kDa 的蛋白条带反应, 该蛋白条带可能为 SK 的降解产物 (图版 I-D 中 b)。采用间接 ELISA 法测定抗 r-SK McAb 与 r-SK 的亲合常数为 7.7×10^9 mol/L。

2.3 抗 r-SK McAb 对 SK 激活纤溶酶原的影响

纯化的抗 r-SK McAb (6×10^{-7} mol/L— 2.3×10^{-9} mol/L) 与 r-SK (2×10^{-12} mol/L) 作用后, 用发色底物法测定残余的 r-SK 对纤溶酶原激活的作用。结果显示 (图 1), 该 McAb 能抑制 r-SK 对纤溶酶原的激活。

2.4 抗 r-SK McAb 与 r-SK CNBr 裂解片段的反应

r-SK 分子中具有 4 个甲硫氨酸, 经 CNBr 裂解后, 可产生 5 个片段, 分子量分别为 16 250Da (CB₂)、13 250Da (CB₃)、8 950Da (CB₁)、5 180Da (CB₅) 和 2 570Da (CB₄) (图版 I-E), 与文献^(6,9)报道一致。Western blot 结果显示, 我们制备抗 r-SK McAb 可识别分子量为 16 250Da 的片段 (图版 I-E 中 b, 图中出现的大于 CB₂ 片段的条带为 SK 的 CNBr 的不完全裂解产物, 由于这些产物均包含 CB₂ 片段, 因而可与该 McAb 反应)。推测该 McAb 所识别的抗原决定簇位于 SK 分子的第 71 残基至第 237 残基间的氨基酸顺序中。

3 讨 论

如何从表达体系中纯化预期的产物是基因工程目前研究的方向之一。制备型等电聚焦电泳是利用蛋白质或其它两性分子的等电点不同, 在一个稳定的、连续的、线性的梯度中进行蛋白质的分离, 具有高度浓缩效应和抗扩散等特点, 大大提高分辨率, 因而可作为一种手段用于基因工程产物的纯化。我们利用 Bio-Rad 公司生产的 Rotofor TM 制备型等电聚焦仪对 SK 基因的表达产物进行纯化, 一步即可获得纯度约 90% 的 r-SK, 回收率为 57%。再经过分子筛可将少量的杂蛋白除去, 纯度可提高到 97%。该法简便, 上样量可达数百毫克, 为其它分离方法所不及。

以纯化的 r-SK 为抗原, 通过杂交瘤技术我们制备了抗 r-SK McAb。该 McAb 属 IgG₁ 亚型, 特异地识别 r-SK 和 C 组 β 溶血性链球菌分泌的 SK。该 McAb 尚可抑制 SK 对纤溶酶原的激活作用, 可能是由于它阻断了 SK 与纤溶酶原的结合^[10]。为了进一步确定该 McAb 作用于 r-SK 的抗原决定簇, 我们用 CNBr 裂解 r-SK, 产生分子量大小不同的 5 个片段。经 Western blot 证实, 该 McAb 特异地识别分子量 16 250Da 大小的片段, 该片段为第 71 残基至第 237 残基的氨基酸顺序。因而我们推测上述的氨基酸顺序参与 SK 与纤溶酶原的结合。

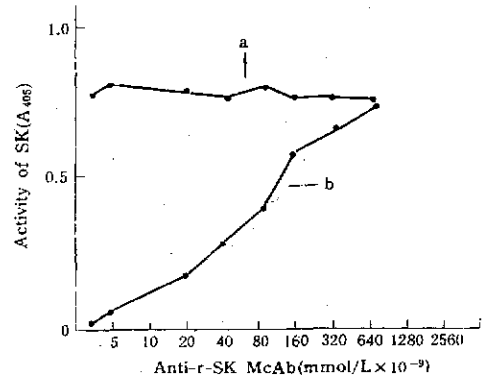


图1 抗 r-SK McAb 对 SK 激活纤溶酶原作用的影响

Fig. 1 The influence of the function of SK as a plasminogen activator by anti-r-SK McAb

- a. Anti-t-PA McAb+r-SK,
b. Anti-r-SK McAb+r-SK

参 考 文 献

- [1] Kenneth W *et al.* Biochemistry, 1986, 25: 108.
- [2] Bradford M M. Anal Biochemi, 1976, 72: 248.
- [3] Kohler G & Milstein C. Nature, 1975, 256: 495.
- [4] Beatty J D *et al.* J Immunol Methods, 1987, 100: 173.
- [5] Soderling T R *et al.* J Biol Chem, 1977, 252: 7517.
- [6] Towbin H *et al.* Proc Natl Acad. Sci. USA, 1979, 76: 4350.
- [7] 丁皓等. 生物工程学报, 1990 6 (3): 236—239.
- [8] Kenneth N J & Jordan T. Biochemistry, 1982, 21: 6620.
- [9] Horst M & Joseph J F. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81: 3557
- [10] Bakshy A K *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 1237.

Purification of Recombinant Streptokinase (r-SK) and Preparation and Characterization of Anti-r-SK Monoclonal Antibody

Ding Hao Zhu Yunsong Wu Xiaoli Zhou Xinghua Song Houyan

(Laboratory of Molecular Genetics, Shanghai Medical University, Shanghai 200032)

Abstract Isoelectric focusing in the Rotofor cell combined with molecular sieve chromatography was used for the purification of the recombinant streptokinase (r-SK) expression in *E. coli*. The purity and special activity of r-SK were 97%, 1×10^5 IU/mg, respectively. The recovery of this method was 41%. Analyses of N-terminal amino acid of purified r-SK confirmed that the residue 1 to residue 15 was identical to the codens showed by the nucleotide of SK gene. A clone (4D₁₁) producing monoclonal antibody (McAb) against SK was obtained by fusion of mouse myeloma cells (SP2/0) and spleen cells previously immunised with purified-r-SK. The McAb was IgG₁ subtype and specially reacted with r-SK and SK from group C of *Streptococcus* β -hemolyticus. The McAb also inhibited the function of SK as a plasminogen activator determined by chromogenic assay. Western blot confirmed that the McAb could recognized MWt16 250 Da fragment of SK cleaved with CNBr. It was proposed that residue 71 to 237 of SK may participate in binding of SK and plasminogen.

Key words Recombiant streptokinase, isoelectric focusing, monoclonal antibody, activity of streptokinase

图版说明

Explanation of plate

- A. Non-reducing SDS-PAGE (10%) of r-SK inclusion body
1. Marker protein; 2. JF1125 *E. coli* not transfected with pSTE-1; 3. JF1125 *E. coli* transfected with pSTE-1; 4. r-SK inclusion body
- B. SDS-PAGE analysis of protein fractions after isoelectric focusing in the Rotofor cell
- C. SDS-PAGE of purified r-SK from Sephadex G-100
1. Marker protein; 2. Purified r-SK
- D. Western blot analysis of anti-r-SK McAb
a. SDS-PAGE of r-SK expressed in *E. coli* and SK from group C *Streptococcus* β -hemolyticus
1. Marker protein 2. r-SK from *E. coli*; 3. SK from group C *Streptococcus* β -hemolyticus (Arrows indicate the position of SK)
b. Western blot of SK assayed with anti-r-SK McAb
1. r-SK form *E. coli*; 2. SK from group C *Streptococcus* β -hemolyticus
- E. SDS-PAGE analysis of CNBr-fragments of r-SK and Western blot
a. CNBr-fragments of r-SK were seperated on 20% SDS-PAGE; b. Western blot of CNBr-fragments with anti-r-SK McAb

