

重组 PAI-1 在大肠杆菌中的高效表达

隋广超 孙红¹ 胡美浩²

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

摘要 纤溶酶原激活物抑制因子-1 (PAI-1) 在天然状态下含量很低。为了进行 PAI-1 的结构与功能的研究, 构建了表达重组 PAI-1 的质粒 pBV220/PAI-1, 并在大肠杆菌中得到了高效表达。最高表达量为菌体总蛋白量的 49% 以上。经 Western blotting 检测, 得到了分子量为 43.0kDa 的反应条带。对形成包涵体的表达产物进行变、复性处理及 Sephadex G-75 的初步纯化, 得到了潜伏态的重组 PAI-1。用纤维蛋白平板法和显色底物法, 测定出经 4mol/L 盐酸胍激活后的重组 PAI-1 对尿型纤溶酶原激活物 (u-PA) 有明显的抑制活性。而且, 激活后的重组 PAI-1 经过 37℃ 处理, 会逐渐转变为潜伏态。

关键词 重组 PAI-1, 大肠杆菌, 高效表达, u-PA, 抑制活性

纤溶酶原激活物抑制因子-1 (简称 PAI-1) 是组织型纤溶酶原激活物 (t-PA) 和尿型纤溶酶原激活物 (u-PA) 的生理性抑制因子^[1]。PAI-1 在血液中的含量只有 20ng/ml。但患心肌梗塞、脑血栓等病的病人血液中的 PAI-1 含量会明显提高。

天然的 PAI-1 是由 379 个氨基酸组成的糖蛋白。分子量为 50.0kDa。等电点在 pH4.5~5.0。利用原核系统表达的重组 PAI-1 (即 rPAI-1) 没有糖基化, 分子量约为 43.0kDa。PAI-1 分子的活性中心是 Arg346~Met347, 它可以与 t-PA 或 u-PA 的活性中心按 1:1 的分子比例发生共价结合, 其二级反应速度常数约为 $3.5 \times 10^7 \text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[2]。

PAI-1 分子有三种存在状态, 即活性态、潜伏态和底物态^[3]。活性态的 PAI-1 可以与 t-PA 或 u-PA 不可逆的结合, 潜伏态的 PAI-1 需经过某些变性剂 (如盐酸胍, 尿素, 硫氰酸钾等) 处理, 才可以抑制 t-PA 或 u-PA。底物态的 PAI-1 是经过一定的体外处理得到的。尚未发现天然存在的底物态 PAI-1。底物态 PAI-1 可以被 t-PA 或 u-PA 从 Arg346~Met347 处切断, 形成无活性的低分子量 PAI-1。活性态和潜伏态的 PAI-1 有相似的二级结构。底物态的 PAI-1 则与它们区别较大^[4]。

PAI-1 是丝氨酸蛋白酶抑制剂 (Serpins) 家族中的一员。对 PAI-1 结构与功能的研究, 可以增进对 Serpins 家族的认识。同时, 也可以为研制抗 PAI-1 的溶血栓药物提供理论依据。因此, 有必要用基因工程方法来大量合成 PAI-1。

近几年, 国外曾有文献报道过 PAI-1 基因在大肠杆菌中的表达^[5~7], 重组 PAI-1 都是以可溶性状态存在, 均未能达到高表达量。我们利用带有 P_R、P_L 启动子的表达质粒 pBV220, 使 PAI-1 在大肠杆菌中得到了高效表达, 表达产物主要以潜伏态存在, 激活后

· 本文为欧共体资助项目。

1. 现为中国科学院上海生物化学研究所研究生。

2. 本文联系人。

本文于 1993 年 12 月 24 日收到。

能够抑制 u-PA, 并可以回转为潜伏态。

1 材料与方 法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 (*E. coli* K12) DH5 α 用作重组及表达的宿主菌。PAI-1 的 cDNA、标准 PAI-1 及其单克隆抗体由比利时鲁文 (Leuven) 大学 P. Declerck 教授赠送。表达载体 pBV220 由中国预防医学科学院病毒学研究所侯云德教授赠送^[3]。

1.2 DNA 的制备

限制酶和 T4 DNA 连接酶均为 Bio-labs 公司生产。质粒转化为文献 [9] 中的 CaCl₂ 法。

1.3 重组 PAI-1 的表达及产物的分离

带有重组 PAI-1 质粒的菌株于含有 100 μ g/ml 氨卞青霉素的 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 过夜培养。次日按 1:50 扩大培养到 OD_{600nm}=0.3~0.4, 立即转到热诱导温度 42 $^{\circ}$ C 继续培养 6 h。离心收集菌体, 用溶菌酶和超声波破碎, 离心收集包涵体 (Inclusion bodies), 用 8mol/L 尿素, 0.05mol/L Tris-HCl, pH8.0 进行变、复性处理后, 得到含 60%~70% rPAI-1 的粗提液。经 Sephadex G-75 柱层析, 可得到纯度为 80%~90% 的 rPAI-1。

1.4 SDS-PAGE 及 Western blotting

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (即 SDS-PAGE): 参照文献 [9] 的方法, 对表达菌的全菌体, 包涵体及层析后的蛋白组成进行鉴定, 并用薄层扫描进行含量及纯度分析。

Western blotting: 把 SDS-PAGE 后的凝胶与硝酸纤维素滤膜相贴, 在低温下, 恒压 60V, 电转移 4 h, 将蛋白样品转印到硝酸纤维素滤膜上, 经 2% 的牛血清白蛋白封闭后, 与 PAI-1 的单克隆抗体作用, 再与酶联第二抗体结合, 加底物显色。

1.5 重组 PAI-1 活性态与潜伏态的互变和抑制活性的测定^[10]

标准尿型纤溶酶原激活物 (u-PA)、纤溶酶原以及纤维蛋白平板法测活的试剂盒均购自中国药品生物制品检定所。显色底物 S-2403 为瑞典 Kabi Vitrum AB 公司产品。

将一定浓度的 rPAI-1 与等体积的含 8mol/L 盐酸胍的 TST 缓冲液 (0.05mol/L Tris-HCl, pH7.6, 0.15mol/L NaCl, 0.01% Tween-80) 混合后, 于 37 $^{\circ}$ C 搅拌 2 h, 再对 TST 缓冲液透析过夜。激活后的 rPAI-1 分装成小管, 于 -70 $^{\circ}$ C 存放。

活化后的 rPAI-1 在 37 $^{\circ}$ C 保温, 不同时间取样, 立即冻存, 以得到不同程度从活性态转变为潜伏态的 rPAI-1。

将待测定的 rPAI-1 与略过量的 u-PA 混合, 于 25 $^{\circ}$ C 保温 30min, 用纤维蛋白平板法或显色底物法测定 u-PA 的残留活性。

纤维蛋白平板法测活: 将样品加在纤维蛋白测活板的加样孔中, 37 $^{\circ}$ C 恒温 12~14 h, 测量溶圈的直径。

显色底物法测活: u-PA 可以将纤溶酶原激活为纤溶酶, 再作用于纤溶酶的显色底物 S-2403。在这一体系中加入 rPAI-1, 就可以根据底物 S-2403 的显色变化来测定 rPAI-1 对 u-PA 的抑制作用。

将样品与等体积的底物溶液(含 $1\mu\text{mol/L}$ 纤溶酶原, 0.6mmol/L S-2403)混合,每隔 15min 测量波长 410nm 下的光吸收值,共计 2~3 h。

2 结果与讨论

2.1 表达质粒 pBV220/PAI-1 的构建

将含有 PAI-1 基因的质粒 pUC18/PAI-1 用 EcoRI 和 BamHI 双酶切,回收 PAI-1 基因 (1.2kb),再将 PAI-1 基因与用同样的酶双酶切后的 pBV220 载体进行连接,筛选出带有重组质粒的 pBV220/PAI-1 (4.96kb) (图 1) 的菌体。经酶切鉴定 (图版 I-D) 后,用于 rPAI-1 的表达。

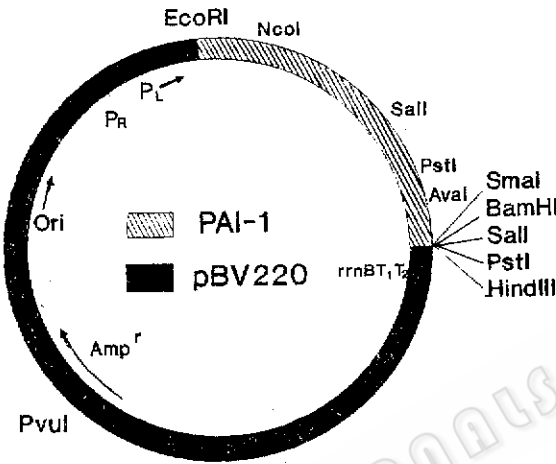


图 1 重组表达质粒 pBV220/PAI-1 的结构

Fig. 1 Structure of recombinant expression

blasmid pBV220/PAI-1

株中的表达情况时发现, rPAI-1 既存在于可溶性蛋白成分中,也可以形成不溶性的包涵体 (图版 I-B)。大肠杆菌中的包涵体是由于外源蛋白被大量合成而聚集成的不溶性颗粒,并混杂有菌体的蛋白质、核酸等,其中的重组蛋白不具有天然的构象和活性。

包涵体的形成与蛋白的氨基酸组成、培养条件、宿主菌的选择等,有很大关系^[11]。一般来说,半胱氨酸的涵量越多、培养温度越高,就越容易形成包涵体,而且,高表达量 (大于菌体总蛋白的 15%) 的目的蛋白,一般都以包涵体形式存在。国外有关 PAI-1 在大肠杆菌中表达的报道都是在不高于 37°C 进行的,表达量不高 (低于菌体总蛋白的 10%),而且也由于 PAI-1 分子中不含有半胱氨酸,因此难以形成包涵体。

在我们的实验中,采用了 42°C 诱导,表达量占菌体总蛋白的 49% 以上,导致了部分 rPAI-1 形成了包涵体。

在破碎细菌后,形成的包涵体可以经一步离心就与多种菌体蛋白分开,有利于表达产物的分离纯化。但由于包涵体中的蛋白质不具有天然构象,必须要经过变性剂和氧化、还原剂的处理,才能得到有天然构象的重组产物。PAI-1 分子不含半胱氨酸,使得用大肠杆菌表达的 rPAI-1 复性比较容易,只需将包涵体用 8mol/L 尿素处理过夜,再透析除去尿素即可。

在质粒 pBV220 启动子后, EcoRI 位点是最佳的外源基因插入位置,它使得启动子的 SD 序列与 ATG 具有最佳的距离,这也是 rPAI-1 达到高表达量的关键。

2.2 重组 PAI-1 在大肠杆菌中的表达

我们所用的 PAI-1 基因删除了信号肽所对应的一段 DNA 序列,表达后的 rPAI-1 应含有 379 个氨基酸。SDS-PAGE (图版 I-A) 及凝胶薄层扫描的结果表明, rPAI-1 的最高表达量约占菌体总蛋白量的 49%,经 Western blotting (图版 I-C) 检测, rPAI-1 的反应条带位于分子量 43.0kDa 处,而天然 PAI-1 则接近 50.0kDa。这与文献报道的结果基本相符。

在分析 rPAI-1 在大肠杆菌的 DH5 α 菌

2.3 重组 PAI-1 的活化及活性测定

PAI-1 由潜伏态向活性态的转变需要有变性剂的作用。由活性态回复到潜伏态，则是一种自发的过程，受到盐浓度、温度和 pH 值的影响。已有报道，PAI-1 分子中的 Arg30 和 Glu350 在活性态与潜伏态的互变过程中起到了重要作用^[12]。较高温度和 pH 值，以及低盐溶液，易于活性态的 PAI-1 转变为潜伏态^[13]。用 4mol/L 盐酸胍激活后的 rPAI-1，在中等盐浓度，较低的 pH 下冻存，抑制活性的损失很小。

图 2 为纤维蛋白平板法的测活的结果。激活后的 rPAI-1 对 u-PA 有明显的抑制活性，而未活化的 rPAI-1 几乎不影响 u-PA 的活性。

显色底物法测活，OD_{410nm} 的变化速度与 u-PA 的残留量成正比，与 PAI-1 的抑制活性成反比。从底物法测活所得到的曲线（图 3）可以明显地看出：激活后的 rPAI-1 对 u-

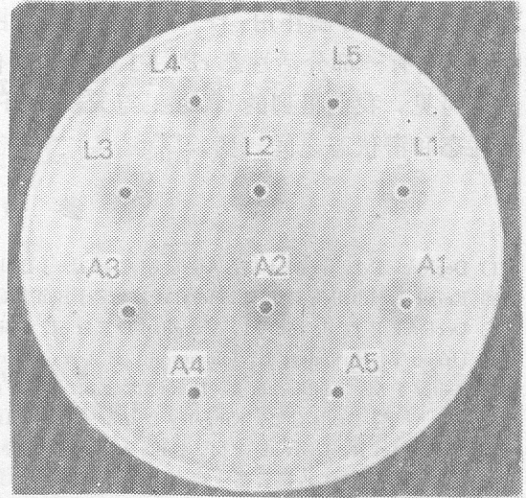


图 2 纤维蛋白平板法测定 u-PA 与重组 PAI-1 作用后的残留活性

Fig. 2 Fibrin plate assay for testing the residual activity of u-PA after treated with rPAI-1.

A1~A5: 0.025 IU u-PA treated with 0, 25, 50, 75, and 100 ng active rPAI-1, respectively.
L1~L5: 0.025 IU u-PA treated with 0, 25, 50, 75, and 100 ng latent rPAI-1, respectively.

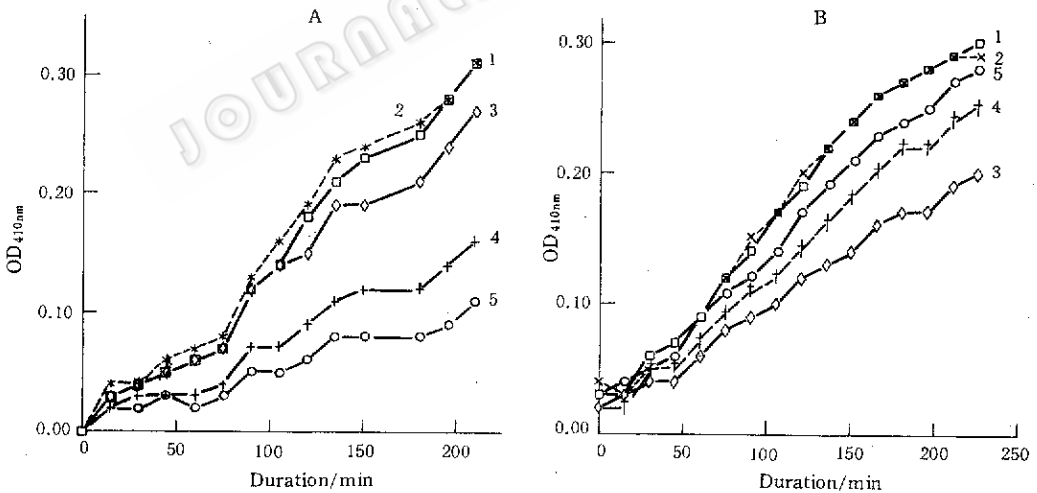


图 3 显色底物法测定重组 PAI-1 对 u-PA 的抑制活性

Fig. 3 Measurement of rPAI-1 inhibitory activity towards u-PA by chromogenic substrate.

A. Inhibition of different doses of rPAI-1 towards 0.025 IU u-PA.

1. Without rPAI-1,
2. Treated with 60ng latent rPAI-1 (l-rPAI-1),
- 3, 4, 5. Treated with 20, 40 and 60 ng active rPAI-1 (a-rPAI-1), respectively.

B. Inhibition of rPAI-1 after incubated at 37°C for different durations towards 0.25 IU u-PA

1. Without rPAI-1,
2. Treated with 60ng latent rPAI-1,
- 3, 4, 5. Treated with 60 ng active rPAI-1 after incubated at 37°C for 0, 30 and 60 min, respectively.

PA 的活性有抑制作用, rPAI-1 的抑制活性与 rPAI-1 的剂量成正比 (图 3A)。经 37°C 保温后, 会有一部分活性态 rPAI-1 转变为潜伏态, 使得对 u-PA 的抑制活力下降 (图 3B)。由此可见, 我们得到的 rPAI-1 与天然 PAI-1 一样, 激活后可以抑制 u-PA, 并且能够在活性态和潜伏态之间转变。

参 考 文 献

- [1] Declerck P J, de Mol M, Alessi M C *et al.* J Biol Chem, 1988, **263** (30): 15454.
- [2] Keijer J, Ehrlich H J, Linders M *et al.* J Biol Chem, 1991, **266** (16): 10700.
- [3] Declerck P J, de Mol M, Vaughan D E *et al.* J Biol Chem, 1992, **267** (17): 11693.
- [4] Urano T, Stranderg L, Johansson L B A *et al.* Eur J Biochem, 1992, **209**: 985.
- [5] Reilly T M, Seetharam R, Duke J L *et al.* J Biol Chem, 1990, **265** (16): 9570.
- [6] Sisk W P, Davis G L, Kingsley D *et al.* Gene, 1990, **96**: 305.
- [7] Seetharam R, Dwivedi A M, Duke J L *et al.* Biochemistry, 1992, **31**: 9877.
- [8] 张智清, 姚立红, 侯云德. 病毒学报, 1990, **6**: 111.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, Laboratory Manual, 2nd Cold Spring Hgbrbor Laboratory Press, 1989.
- [10] Ehrlich H J, Gebbink R K, Keijer J *et al.* J Biol Chem, 1990, **265** (22): 13029.
- [11] 隋广超, 胡美浩. 生物技术. 1993, **3** (2): 6.
- [12] Lawrence D A, Palaniappan S and Ginsburg D. Thromb Haemostas, 1993, **69** (6): 758.
- [13] Munch M, Heegaard C, Jensen P H *et al.* FEBS Lett, 1991, **295**: 102.

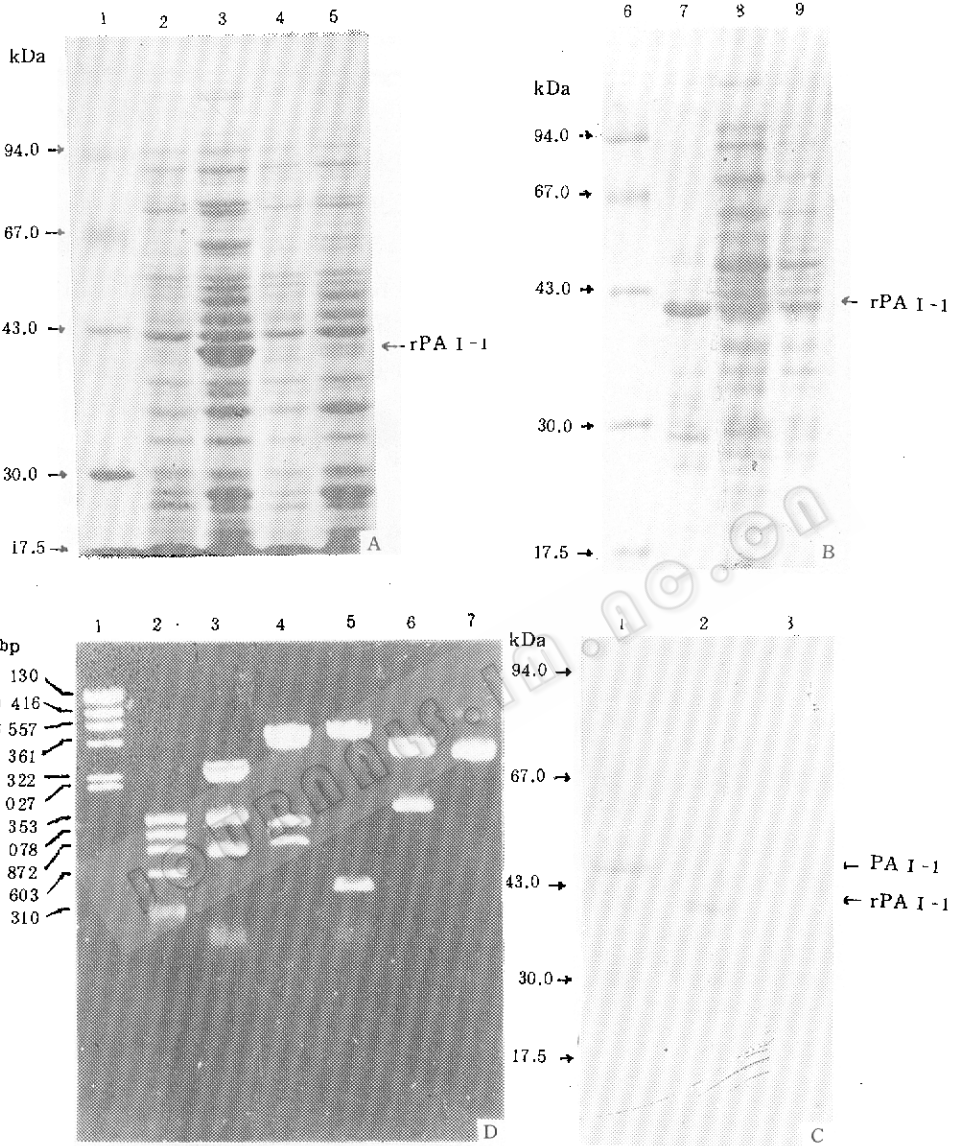
High Level Expression of Recombinant PAI-1 in *Escherichia coli*

Sui Guangchao Sun Hong Hu Meihao

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract To study the structure and function of plasminogen activator inhibitor (PAI-1), a high level expression plasmid, pBV220/PAI-1, was constructed, which yielded over 49% of total cell proteins of *Escherichia coli* as recombinant PAI-1 (rPAI-1), and part of the product stayed in inclusion bodies. In Western blotting assay, rPAI-1 exhibited a band at molecular weight 43.0 kDa. Latent form rPAI-1 was harvested after renaturation and Sephadex G-75 chromatography. After the latent rPAI-1 was treated with 4mol/L guanidine HCl, it was transformed to active form, which had the ability to inhibit urine-type plasminogen activator, and the active form might decayed to latent form gradually when it was incubated at 37°C.

Key words Recombinant PAI-1, high level expression, u-PA, activity of inhibition, *Escherichia coli*.



A, B. SDS-PAGE analysis of the expression product of pBV220/PAI-1

1, 6. Low molecular weight protein markers

2, 3. Total cell proteins of DH5 α containing pBV220/PAI-1 before the induction and after 6 hours induction

4, 5. Total cell proteins of DH5 α containing pBV220 before the induction and after 6 hours induction

7, 8, 9. Proteins in inclusion bodies, lysis supernatant and total cell of DH5 α containing pBV220/PAI-1

C. Western blotting analysis of the expression product of pBV220/PAI-1

1. Native PAI-1

2, 3. Proteins of expressed DH5 α containing pBV220/PAI-1 and pBV220

D: Identification of pBV220/PAI-1 on a 0.7% agarose gel after restrictive enzyme digestion

1. λ DNA digested by Hind III

2. Φ X174 digested by Hae III

3 ~ 6. pBV220/PAI-1 digested by EcoRI & Hind III, EcoRI & BamHI, PstI and SacI & BamHI, respectively

7. pBV220/PAI-1