

链激酶基因的分离和其在大肠杆菌 中的表达及表达产物的纯化

周俐梅 王嘉玺 邹民吉 段聚宝 赵春文

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

摘要 从化脓性链球菌的染色体 DNA 分离得到的目的基因片段定向插入载体 pBV220 中, 获得有目的基因插入的重组质粒 pBV-SK。双脱氧链终止法手工测序和 Beckman 自动测序仪分析 rSK 基因的全长序列, 测序结果表明我们所获得的 rSK 基因与文献报道的基本一致。重组质粒 pBV-SK 转化受体菌 *E. coli* DH5 α 株, 温敏诱导后表达一个分子量约 47kDa 的特异蛋白, 其表达量为 60%。表达产物以包涵体的形式存在, 包涵体经过洗涤、溶解和纯化后, 最终纯度达到 95% 以上。复性的重组蛋白用体外血块溶解法测定生物活性, 结果表明我们所获得的 rSK 蛋白具有较好的溶解血块的活性, 其比活性为 1.3×10^5 u/mg。

关键词 链激酶, 基因表达, 大肠杆菌, 血纤维蛋白溶酶原

链激酶(Streptokinase, SK)是由 β -溶血性链球菌产生的一种分泌性蛋白, 是体内血纤维蛋白溶酶原最有效的活化剂之一^[1], 其分子量为 47kDa 左右, 成熟蛋白由 414 个氨基酸组成。SK 能有效地溶解冠状动脉中的血栓, 在发病早期用 SK 治疗, 效果很显著。和安慰剂作对照比较治疗时, SK 能显著降低死亡率, 保护左心室功能, 其疗效与重组的组织型纤溶酶原激活剂(rtPA)没有显著差异, 但是价格便宜许多, 一个疗程所需的费用 rtPA 约为 SK 的 10 倍^[2]。

急性心肌梗塞是一种危害性较大的疾病, 采用 SK, rtPA 等溶栓剂进行的溶栓性治疗在近十多年来取得很大进展, 据报道 25%~75% 的患者用溶栓性因子治疗后, 体内完全堵塞的血管得到恢复, 重新变得畅通无阻。但是溶栓疗法在国内的临床实践中开展较少, 时间较晚^[4], 为促使这一疗法在我国得以广泛地开展, 我们成功地在大肠杆菌中高效表达了 SK 基因, 并获得较纯的有溶血活性的重组 SK 蛋白, 并准备进行 I、II 期临床试验, 这对于推动我国溶栓疗法的开展将大有裨益。

1 材料与方 法

1.1 材 料

化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)购自本院五所。质粒 pBV220、菌株 DH5 α 系本室保存。限制酶 BamH I、Nhe I、T4DNA 连接酶及缓冲液购自 Promega 公司, DNA 聚合酶大片段(Klenow fragment)及其余酶类购自华美生物工程公司, DNA/Hind III, λ DNA/EcoR I + Hind III + λ DNA/Hind III 酶切片段购自华美生物工程公司, RF 型

本文于 1995 年 10 月 22 日收到。

M13mp19 购自中国医科院基础所, RNaseA 购自原平公司。DNA 序列分析所用试剂为 USB 公司的 Sequenase 2.0 Kit。[α - 32 P]dATP(10 μ Ci/ μ l) 购自北京福瑞生物医学生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的钓取及重组表达质粒的构建:乙醇沉淀法从化脓性链球菌提取染色体 DNA, 以所提取的染色体 DNA 为模板, 通过 PCR 方法扩增得到相应大小的目的 SK 基因。DNA 体外重组: DNA 酶切反应、低熔点琼脂糖回收、连接反应和琼脂糖凝胶电泳方法及重组 DNA 的转化及重组质粒的筛选和鉴定均参照文献[5]。

1.2.2 重组 SK 基因的全长序列分析; 亚克隆的制备:将 PCR 产物定向插入 M13mp19 中, 获得重组子 pM19-A。然后分别用 EcoR I + Hinf I 和 BamH I + Nhe I 酶切 pM19-A, 补平后连接, 连接物转染 JM101 感受态细胞, 根据 α -互补活性挑取白色噬菌斑用 LB 培养基于 30 $^{\circ}$ C 培养, 小量抽提单链 DNA (ssDNA), 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。根据迁移快慢初步得到重组子。

序列分析:根据双脱氧链终止方法, 按照 USB 公司的测序 Kit 制备测序反应物, 在 LKB 公司的电泳装置上(LKB 2010 Macrophor sequencing system)电泳, 完毕后用保鲜膜封胶, 置曝光夹中 -20 $^{\circ}$ C 放射自显影。

SK 基因的异源性很高, 我们自己测的大部分序列表明了这一点。为了进一步确证所测序列, 并为了比较所钓取的目的基因与来自链球菌其它族 SK 基因的同源性, 我们又用 Beckman 自动测序仪对全长 SK 基因进行序列分析。

1.2.3 重组表达质粒的转化及重组蛋白的热诱导:构建好的重组表达质粒 pBV-SK 转化受体菌 DH5 α 的感受态细胞, 将含有重组表达质粒的单菌落于 LB 中 30 $^{\circ}$ C 过夜培养, 再将过夜培养物以 5% 的比例接种于 M9CA 培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 180r/min 培养至对数中期(OD₆₀₀ = 0.4 ~ 0.6), 然后转入 42 $^{\circ}$ C 水浴培养, 适当时间收获。

1.2.4 基因表达产物的电泳鉴定:收获的菌液 4 $^{\circ}$ C 离心, 沉淀用适当体积的 TE 缓冲液悬浮后加入等体积的载样缓冲液, 变性, 上样, 恒流电泳。电泳完毕后, 凝胶于考马斯亮蓝染色液中染 0.5 ~ 1.0h, 再用脱色液脱至凝胶本底透明。脱色后的凝胶用薄层扫描法确定 SK 基因表达产物占菌体总蛋白的百分含量。

1.2.5 SK 表达产物的纯化及物化测定:包涵体的制备、洗涤和变性溶解: 1000ml 的发酵培养物在 4 $^{\circ}$ C, 4000r/min 离心 30min, 沉淀悬浮于一定体积的 TE 中, 加入溶菌酶, 超声波破碎(6 \times 30s)后, 4 $^{\circ}$ C, 12000r/min 离心 15min。沉淀用 9 倍体积的 1% Triton X-100 洗涤, 分别保留上清和沉淀, 以便检测目的蛋白的洗涤程度。洗涤后的沉淀用 8mol/L 尿素溶解。

包涵体的纯化:相继采用凝胶过滤法和离子交换层析法。凝胶过滤法选用 Sephacryl S-300 (HR) (Pharmacia) 为填料, 柱体积为 3.6cm \times 100cm, 平衡液为 100mmol/L Tris-HCl, 流速控制为 30ml/h, 上样前柱子至少用 2 倍体积的平衡液平衡, 加样体积约为柱体积的 5%, 洗脱液为含有 8mol/L 尿素的平衡液。用自动收集器分管收集洗脱液, 再用 SDS-PAGE 电泳法鉴定各管组分。

阴离子交换层析法选用 DEAE-Sepharose fast flow (Pharmacia) 为填料, 平衡液为 100mmol/L Tris-HCl(pH7.0), 洗脱液为 0 ~ 1mol/L NaCl/100mmol/L Tris-HCl(pH7.0),

流速控制为 90ml/h。用平衡液充分平衡柱体后上样,用平衡液洗脱至穿过峰消失,然后用 NaCl 梯度逐步洗脱,分管收集各洗脱峰,SDS-PAGE 鉴定各个峰的组分。

分子量的测定: SDS-PAGE 电泳法测定重组蛋白的分子量。

1.2.6 重组蛋白的复性与活性测定: 重组蛋白的复性: 经过柱纯化的样品, 控制浓度在 1mg/ml 以内, 用透析法 4℃ 透析 48h, 去除尿素, 变性的重组蛋白重新回复到天然构象状态。

生物活性的测定: 复性后的样品用体外血块溶解法测定其生物学活性。大白兔静脉采血, 分离血浆, 用生理盐水稀释后加入 CaCl_2 溶液, 置于 37℃ 水浴中, 血浆逐渐凝固, 然后分别加入待测样品和标准 SK, 于 37℃ 水浴中观察血块溶解情况。标准 SK 购自 Sigma 公司, 比活性为 $1.0 \times 10^5 \text{ u/mg}$, 浓度为 0.5mg/ml。

2 结果

2.1 目的 SK 基因的获取和重组表达质粒的构建

分别合成 5'-引物和 3'-引物, 并在 5'-加上起始密码子 ATG, 在 5'-和 3'-各加上一个内切酶识别序列, 便于目的基因的插入。提取链球菌的染色体 DNA, 并以此为模板, 进行 PCR 反应, 然后在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 特异带的大小在 1.2kb 左右, 与预期结果一致, 见图版 I-B。

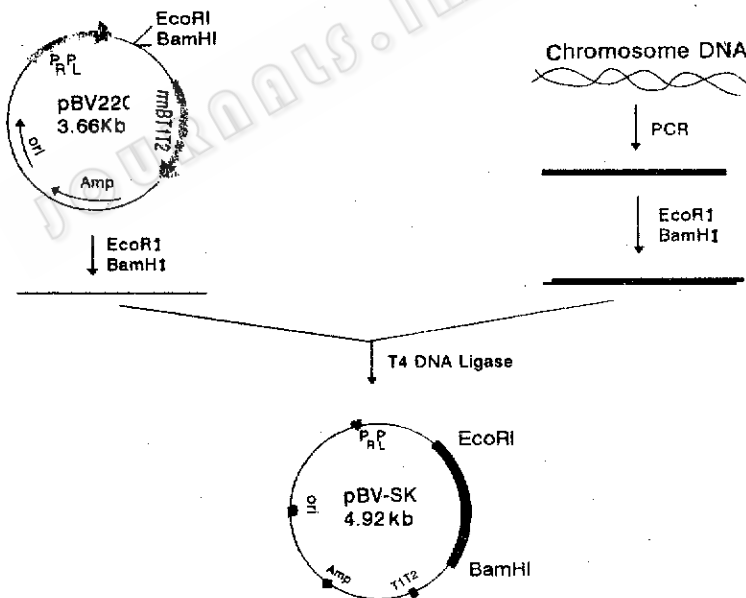


图 1 重组表达质粒 pBV-SK 的构建

Fig. 1 Scheme of the construction of the recombinant pBV-SK

PCR 产物沉淀浓缩后用 EocR I 和 BamH I 双酶切消化, 回收后的片段定向插至也经相同双酶切消化的 pBV220 中, 连接物转化 DH5 α 感受态细胞, 氨苄抗性作为筛选标记, 挑取抗性菌落培养, 快速抽提质粒 DNA, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 并用无外源基因插入

的 pBV220 作为对照,发现有两个菌落的质粒 DNA 迁移率比对照慢,初步确定这两个菌落为重组子。为了进一步确证,用 EcoR I 和 BamH I 双酶切这两个重组子和对照 pBV220,两个重组质粒 DNA 中都切下来一个 1.2kb 左右的外源片段,而对照质粒没有,如图版 I-C。因而确证这两个菌落的质粒就是有目的基因定向插入的重组质粒,命名为 pBV-SK(图 1)。

2.2 重组 SK 基因的全长序列分析

PCR 产物用 EcoR I 和 BamH I 双酶切消化,回收片段定向插入 M13mp19,获得重组子 pM19-A。用正向引物和反向引物分别从 5'-和 3'-测序。第二步获得亚克隆 pM19-B 和 pM19-C。三个克隆所测序列表明与文献报道的基本相同,但一部分碱基有变异,如图 2。

***** Sequence:RSK *****

Sequence length	1245	Residues					
	10	20	30	40	50	60	
ATTGCTGGGT	ATGGGTGGCT	ACCAGACCGT	CCACCTATCA	ATAACAGCCA	GTTAGTTGTG		
	70	80	90	100	110	120	
AGTATGGCAG	GTATCGTTGA	AGGTACCGAT	AAAAAAGTTT	TTATAAATTT	TTTTGAAATC		
	130	140	150	160	170	180	
GATCTAACAT	CACAACATGC	TCACGGAGGA	AAGACAGAGC	AGGGCTTAAG	TCCAAAATCA		
	190	200	210	220	230	240	
GAACCATTTG	CTACAGATAA	TGGCGCAATG	CCACATAAAC	TTGAAAAAGC	TGACTTATTA		
	250	260	270	280	290	300	
ACAGCTATTC	AAAAACAGCT	GATCGCTAAC	GTTACACAGTA	ACGACGGCTA	CTTTGAGGTC		
	310	320	330	340	350	360	
ATTGATTTTG	CAAGCGATGC	AACCATTACT	GATCGAAACG	GCAAGGTCTA	CTTTGCTGAC		
	370	380	390	400	410	420	
AAAGATGGTT	CGGTAACCTT	GCCGACCCAA	CCTGTCCAAG	AATTTTGTCT	AAGCGGGCAT		
	430	440	450	460	470	480	
GTGCGCGTTA	GACCATATAA	AGAAAAACCA	GTACAAAATC	AAGCGAAATC	TGTTGATGTG		
	490	500	510	520	530	540	
AAATATACTG	TACAGTTTAC	TCCTTTAAAC	CCTGATGACG	ATTCAGACC	AGGTCTCAAA		
	550	560	570	580	590	600	
GATACTAAGC	TATTGAAAAC	ACTAGCTATC	GGTGACACCA	TCACATCTCA	AGAATTACTA		
	610	620	630	640	650	660	
GCTCAAGCAC	AAAGCATTTT	AAACAAAACC	CACCCAGGCT	ATACGATTTA	TGAACGTGAC		
	670	680	690	700	710	720	
TCTCATTGGC	GGTTGACATT	TTTCCCGGAC	GATTTTACC	CGAGTGGAAAT	CCAAGAGTTT		
	730	740	750	760	770	780	
ACTTTACCGT	TTCCAAGAC	CGGGAAACAA	GCTTATGGGA	TCAATAAAAA	ATCTGGTCTG		
	790	800	810	820	830	840	
AATAAAGAAG	GAAACAACAC	TGACCTTATC	TCTGAGAAAT	ATTACATCCT	TAAAAAAGGA		
	850	860	870	880	890	900	
GAGTCTCCGT	ATGATCCCTT	TGATCGCAGT	CACTTGAAAC	TGTTACCAT	CAAATACGTT		
	910	920	930	940	950	960	
GATGTCAACA	CCAACGAATT	GCTAAAAAGC	GAGCAGCTCT	TAACAGCTAG	CGAACGTAAC		
	970	980	990	1000	1010	1020	
TTAGACTTCA	GAGATTTATA	CGATCCTCGT	GATAAGGCTA	AACTACTCTA	CAACAATCTT		
	1030	1040	1050	1060	1070	1080	
GATGCTTTTG	ATATCATGGA	CTATACCTTA	ACTGGAAAAG	TAGAGGATAA	TCACGATAAG		
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	
AATAATCGTG	TCGTCACAGT	TTATATGGGT	AAGCGCCCTA	AAGGGGCAAA	GGGTAGCTAT		
	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
CATTTAGCTT	ATGATAAAGA	TCTCTATACC	GAAGAAGAAC	GAAAAGCTTA	CAGCTACCTG		
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	
CGTTATACAG	AGACACCTAT	ACCTGATAAC	CCTAAAGACA	AATAA			

图 2 rSK 基因编码区核苷酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of the rSK gene region encoding the mature protein

为了证实所测序列与文献资料差异的真实性。用 Beckam 自动测序仪对 3 个克隆

中的外源片段重新测了一次,结果证实了差异的存在。用核酸和蛋白质序列分析软件(Goldkey)检索文献报道的 SK 基因种类,主要有 SESKG、SGSKG、SPSKA 和 SPSKA01 四种。同源性比较表明所测序列与 SESKG(来自 C 族的似马链球菌的 SK 基因)及 SGSKG(来自 G 族)同源性 87%;与 SPSK01(A 族)的同源性只有 79%;而与 SPSKA(A 族)的同源性为 91%。

2.3 重组蛋白在大肠杆菌中的表达

含有 SK 基因的重组表达质粒 pBV-SK 在宿主 DH5 α 中经温度诱导后表达一个分子量为 47kDa 的重组蛋白,与理论推算值相符合,而对照菌无此蛋白出现,经薄层扫描,特异蛋白约占菌体总蛋白 60%,如图版 I-A 和图 3。

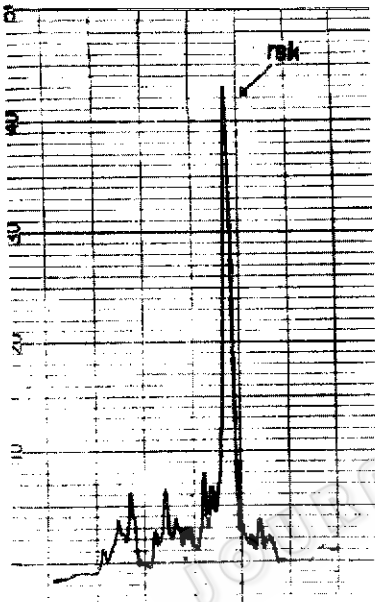


图 3 rSK 基因在 DH5 α 中表达水平的薄层扫描分析

Fig.3 Scanning figure of SDS-PAGE results of the total cell proteins in DH5 α (The arrow indicated the recombinant Streptokinase)

在 SDS-PAGE 中,根据蛋白的相对迁移率与其分子量的对数成比例关系作图进行分子量测定。按照相对迁移率 $R_f = \text{蛋白染色后迁移距离} / \text{溴酚蓝染色迁移距离}$ 进行计算,得出其分子量为 48.25kDa,而重组蛋白分子量的理论推算值为 47.1kDa,二者的差异不显著。

2.5 重组蛋白活性测定

大白兔耳缘静脉采血时加入一定量的草酸钾,防止血液凝固,通过低速离心获得的血浆是淡黄色澄清液体,加入相当的 CaCl_2 后能中和草酸钾的抗凝作用,并逐渐形成血块

重组蛋白在宿主 DH5 α 中以包涵体的形式存在,菌体裂解上清液无重组蛋白出现。在相同的诱导条件下,探讨了不同诱导时间内重组蛋白的积累量,发现在第 1~6h 内,重组蛋白处于稳定的上升趋势,第 6h 后重组蛋白的百分含量开始减少。如图版 I-D。

2.4 重组蛋白的纯化及复性

重组蛋白以包涵体形式出现,虽然于复性有一定的困难,但有助于重组蛋白的初步纯化。菌体裂解液经差速离心后可去掉一部分细胞碎片,因而能大幅度地提高包涵体的纯度,Triton X-100 洗涤能去掉一部分膜蛋白。

洗涤后的包涵体能很好地溶解于尿素,离心后沉淀几乎不含有重组蛋白。SK 的分子量较大为 47kDa,而且是处于变性状态下,故选用 S-300, SDS-PAGE 鉴定各个洗脱峰组分,合并相应含目的蛋白的洗脱峰,此时的纯度可达到 90%。合并后的目的蛋白用透析法去除尿素,用阴离子交换层析法进一步纯化。优化相应的缓冲液离子强度和 pH 值。根据等电点的不同,便可把分子量相差不明显的几种蛋白质分开,SDS-PAGE 电泳鉴定其纯度为 95% 以上。如图版 I-E。

(血栓),分别加入相同体积的标准 SK 和样品液(0.43mg/ml),并作一个空白对照,在 37℃ 水浴中形成的血块逐渐溶解,重新形成澄清的液体,而空白对照中的血块没有变化,这些表明复性后的 SK 样品具有溶解血栓的生物学活性,通过与标准品比较,发现样品液溶解等体积血块所需的时间比标准品少,或在一定时间内样品液所溶解的血块体积大于标准品所溶解的,因而定出样品液的比活性为 1.3×10^5 u/mg。如图 4。

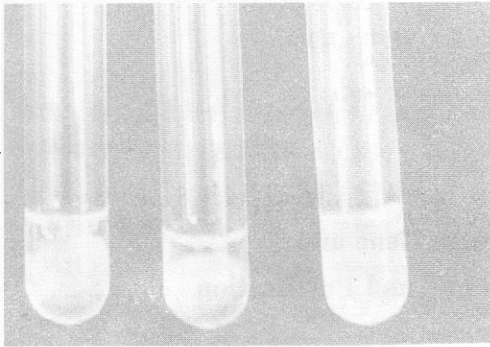


图 4 重组蛋白的活性测定

Fig. 4 The activity of rSK determined by the *in vitro* clot lysis assay

- A. The standard SK preparation was added
 B. The recombinant Streptokinase was added
 C. The negative control without any Streptokinase preparation

3 讨论

SK 是由溶血性链球菌产生的一种细胞外分泌性蛋白,与一般的分泌性蛋白一样^[6,7],在其 N-端有一个由 26 个氨基酸组成的信号肽,然而包含有信号肽序列的野生型 SK 基因在 *E. coli* 中表达是不稳定的^[8-10]。Muller 等经过深入研究分析后发现这种不稳定性与信号肽有关,即 SK 蛋白的信号肽序列与大肠杆菌的 *prlA*(Secy)(信号肽序列受体)是不相容的,因此当野生型 SK 基因在 *E. coli* 表达时,这种不相容性造成 SK 向外周间质的不完全输出,并导致 SK 高效表达载体的失稳定性。Park, S. K. 的实验也证明了这一点。因此我们在设计引物分离 SK 基因时,把信号肽序列剔除在外,PCR 反应从成熟蛋白 N-端第一个

密码子 ATT 开始;同时优化 SD 与 ATG 起始密码子之间的距离。本文所选择的含 $P_{R}P_L$ 串联启动子 pBV220 是一高效表达载体,综合各种因素,其表达水平高达 60%,均高于文献报道的表达水平^[11,12](20%~30%)。

SK 基因只存在于病原性 A、C、G 族链球菌中。不同来源的 SK 蛋白并不是等同的,即使是同一族内的 SK 在等电点和氨基酸组成上也是有差别的^[8]。单克隆技术的运用证实了不同来源的 SK 确实存在广泛的抗原变异性。这种生化性质和免疫学的异源性归根结底说明了 SK 基因在碱基组成上是有差别的,事实上,SK 基因的同源性不高,来自 A 族和 C 族链球菌的 SK 基因在核苷酸序列上只有 90% 的同源性,即使是在同一族内(如 A 族)相同或者不同血清型的菌株间也有显著的差异,我们所获得的重用 SK 基因是从化脓性链球菌(A 族)中分离到的,双脱氧链终止法手工测序和 Beckman 自动测序仪测序结果也表明了这一点。序列同源性比较得知,SK 基因的变异性不是随机的而是集中在某一区域,在其它部分序列比较保守,只有个别碱基有变化^[13]。

参 考 文 献

- [1] Rekkay K N N. *Enzyme*, 1988, 40:79~89.
 [2] Sol Sherry, *Am J Cardiol*, 1987, 59:984~989.

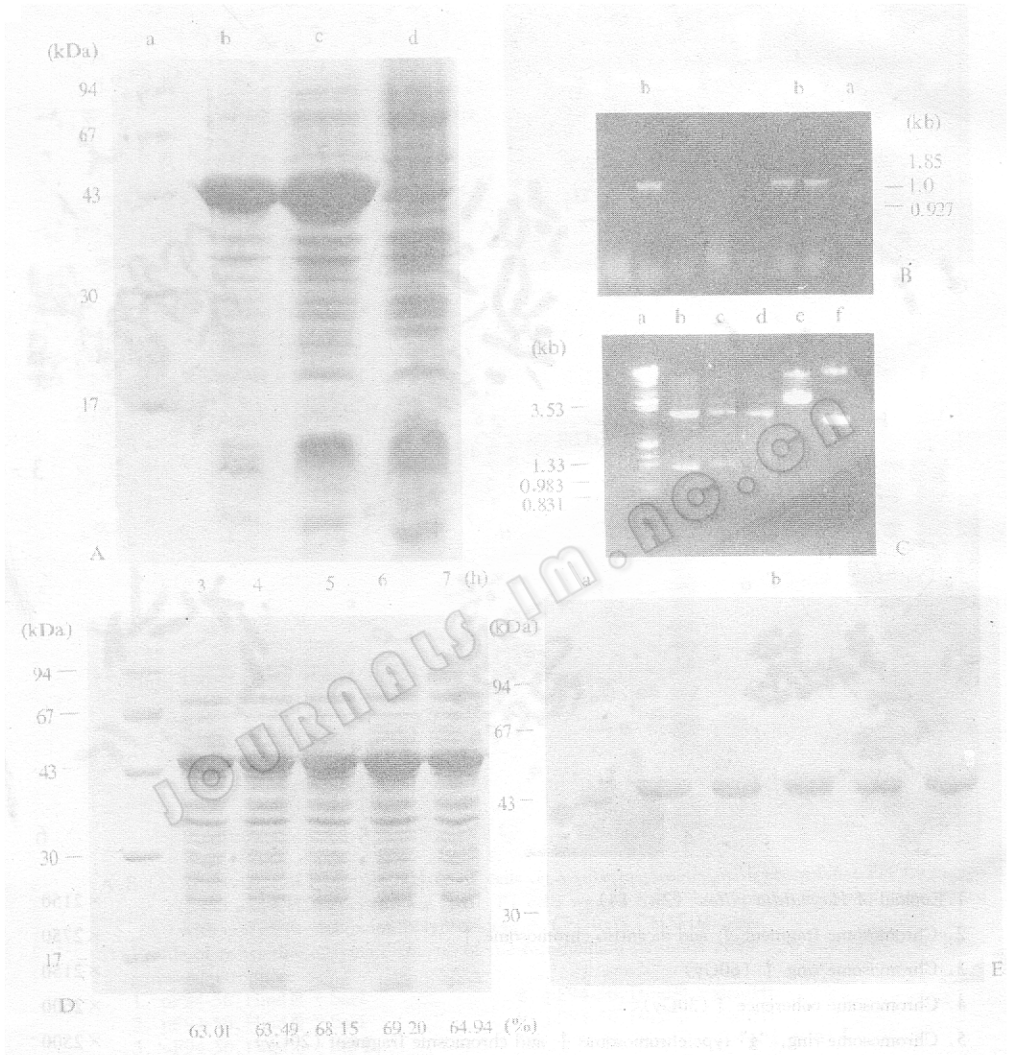
- [3] Viltaly N N. *Int J Biochem*, 1991, **24**(1):47~53.
- [4] 蒋树琪. 健康报, 1994, 8, 17, 第三版.
- [5] Sambriik *et al.* *Molecular Cloning -a Laboratory Manual*, 2nd Edition 1989, CSH.
- [6] Lila M. Gierasch *Biochemistry*. 1989, **28**:(3):923~930.
- [7] 沈同, 王镜岩主编:《生物化学》下册, 第二版, 北京:高等教育出版社, 1990.
- [8] Kenneth W J, Jordan T. *Biochemistry*, 1986, **25**:108~114.
- [9] Seung K P, Byeong R L, Si My By. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991, **174**(1):282~286.
- [10] Jorg M, Hilmer R, Horst M. *J Bacteriol*, 1989, **171**(4):2202~2208.
- [11] Horst M, Joseph J. *Ferretti Proc Natl Acael Sci USA*, 1984, **81**:3557~3561.
- [12] Hisashi O, Yuko To, Hiroshi S *et al.* *Infection and Immunity*. Jan 1992, **60**(1):278~283.
- [13] Horst M, Bruce R, Joseph J F. *Gene* 1985, **34**:357~362.

Isolation of Streptokinase Gene and Its Expression in *Escherichia coli* and Purification

Zhou Limei Wang Jiayi Zou Minji Duan Jubao Zhao Chunwen
(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850*)

Abstract Streptokinase (SK) is one of the most effective activators of human plasminogen and effective in dissolving coronary thrombi in Acute Myocardial Infarction. In order to obtain plenty of SK preparation and decrease danger in the process of the production of SK directly from streptococci, we have constructed an engineered strain *E. coli* DH5 α /pBV-SK by DNA recombinant technologies, and characterized by restriction analysis, DNA sequencing, SDS-PAGE and bioassays. The recombinant protein was over expressed in the form of Inclusion body and constituted 60% of total cell proteins, and the specific activity was 1.3×10^5 u/mg. The availability of the recombinant SK in high yield and purity offers a potentially attractive alternative source of this important therapeutic agent.

Key words Strptokinase, gene expression, plasminogen



A. pBV-SK expressed in *E. coli* DH5 α analysed by SDS-PAGE
 a. Protein molecular weight standard b. pBV-SK expressed in DH5 α c. pBV-SK expressed in DH5 α d. The control pBV220 expressed in DH5 α
 B. Identification of the PCR products by DNA agarose gel electrophoresis
 a. pBR322/BstNI, b. PCR products
 C. Identification of the recombinant pBV-SK by restriction analysis
 a. λ DNA/EcoRI + HindIII + λ DNA/HindIII b. pBV-SK/EcoRI + BamHI c. pBV-SK/EcoRI + BamHI
 d. pBV-SK/EcoRI f. pBV-SK(uncut)
 D. The influence of different inducing time to the expression of rSK gene
 E. The final purity of rSK after purification by S-300 and DEAE-Sephacel fast flow chromatographies
 a. Protein molecular weight standard b. The purified recombinant streptokinase