

人尿激酶原 cDNA 序列缺失突变体的构建及表达

韩素文 俞炜源 程度胜 胡宝成

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 采用 PCR 重叠延伸法和基因重组技术构建了人尿激酶原 cDNA 序列中缺失 150~156 位氨基酸的突变体, 以 COS-7 细胞中获得暂时性表达以及在 CHO 细胞中稳定高效表达, 其表达水平为 $450\sim 500\text{IU}/10^6\text{cell}/24\text{h}$, 表达产物经 SDS-PAGE 电转溶实验和 Western blot 分析证明, 细胞分泌的 Pro-UK 突变体与天然 Pro-UK 以及完整全长 DNA 序列表达 Pro-UK 的分子量相同, 为 54kDa, 绝大多数为单链, 比完整 cDNA 序列表达产物的单链比例明显增高, 与纤维蛋白的亲合性有所提高。

关键词 人尿激酶原, 突变体, 构建, 表达

尿激酶原 (Pro-UK) 为尿激酶前体, 亦称单链尿激酶, 它是由 411 个氨基酸残基组成的糖蛋白, 分子量为 54kDa。它与尿激酶不同, 对血栓具有特异的溶解作用, 且副作用小, 是第二代新型溶栓制剂。目前, Pro-UK 仍存在半衰期短、纤维蛋白亲和性差、治疗用量大等缺点。为了提高 Pro-UK 的半衰期及其与纤维蛋白的亲合性, 我们克隆了人尿激酶 cDNA 序列并在 CHO 细胞中获得高效表达^[1-3]。为了延长 Pro-UK 半衰期和提高对纤维蛋白的亲合性, 又对 Pro-UK cDNA 序列进行了改构研究。本文采用 PCR 重叠延伸法和基因重组技术, 构建了 Pro-UK cDNA 中缺失 150~156 位氨基酸的突变体, 并在 COS-7 和 CHO 细胞中进行了表达的研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 人尿激酶原全长 cDNA (M13-Pro-UK): 由本课题组克隆^[1]。

1.1.2 菌种和质粒: RRI 受体菌: 本室保存, pSV₂-Pro-UK 由本室李凤知构建^[3]; pSV₂-dhfr 细胞系由中国预防医学科学院病毒所任贵方教授惠赠; P^{HS-1}本室保存。

1.1.3 细胞和培养基: COS-7 细胞由本室保存; 培养基为含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基。中国仓鼠卵巢细胞二氢叶酸还原酶缺陷型 (CHO-dhfr⁻) 细胞由中国预防医学科学院病毒所任贵方教授惠赠; 培养基为内含 10% 小牛血清、“三抗”(100u/ml 青霉素, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素, 5u/ml 卡那霉素)、0.1mmol/L 甘氨酸和 L-脯氨酸、0.3mmol/L 次黄嘌呤和胸腺嘧啶的 DMEM 培养基 (pH7.4)。选择培养基为上述培养基中去除次黄嘌呤和胸腺嘧啶; 小牛血清经透析处理。

军队“八·五”医药卫生科研基金重点课题。

本文于 1996 年 4 月 18 日收到。

1.1.4 工具酶及生化试剂: 各种工具酶分别购自 Boehringer Mannheim 公司、华美生物工程公司、Biolabs 公司及 Promega 公司; $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP 购自福瑞公司; 氨甲喋呤 (MTX) 购自 Sigma 公司; DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品。其余进口和国产试剂均为分析纯。

1.1.5 其它试剂: 标准尿激酶、凝血酶及纤维蛋白原购自卫生部生物制品检定所; 抗 UK 血清和 IgG 为本室李秀珍教授制备; HRP-SPA 为卫生部兰州生物制品研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 Pro-UK cDNA 序列中缺失突变体的构建: 参照文献 [4] 进行 DNA 缺失突变体的构建; 序列分析按试剂盒提供的方法进行。

1.2.2 DNA 常规操作: 质粒 DNA 的提取、酶切、片段回收、连接转化及菌落原位杂交等技术均参照文献 [5] 进行。

1.2.3 突变体在真核细胞中的表达: 含编码缺失突变体基因的重组质粒在 COS-7 细胞中的暂时性表达采用电穿孔转染法^[6]; 突变体在 CHO-dhfr⁻ 细胞中的表达采用磷酸钙共沉淀法转染细胞^[7]; 通过选择培养基筛选 CHO-dhfr⁺ 细胞克隆, 并用逐渐增加 MTX 浓度扩增 Pro-UK 突变体基因拷贝数的方法来提高表达水平。

1.2.4 Pro-UK 及突变体表达产物的测定: 纤溶活性用纤维蛋白溶解圈法^[8]; 抗原性检测采用 ELISA 方法测定^[9]。

1.2.5 Western Blot 分析: Pro-UK 突变体表达产物经 SDS-PAGE 分离; 通过半干法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 此膜在含 3% BSA 的 Tris-HCl (pH7.4) 溶液中室温振洗 30min, 以封闭免疫球蛋白结合位点; 然后与抗 UK 血清 (1:100) 稀释液振荡过夜 (室温); 0.01mol/L PBS-Tween 20 液洗涤; 与抗 HRP-SPA 室温反应 30min; 3-3 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 2% 硫酸终止反应。

1.2.6 SDS-PAGE 纤维蛋白转溶分析: Pro-UK 突变体样品 5 μ l 细胞上清液加入等体积的二倍浓度的上样缓冲液 (4% SDS, 20% 甘油, 0.2% 溴酚蓝) 混匀, 30 $^{\circ}$ C 保温 2h 后进行 SDS-PAGE 电泳; 电泳后, 凝胶在 2.5% Triton X-100 中振洗 1h, 以除去 SDS; 在电泳凝胶上铺一层纤维蛋白琼脂糖凝胶 (含纤维蛋白原), 湿盒内 (37 $^{\circ}$ C) 过夜; 观察凝胶上溶带的位置; 根据溶带位置与标准 UK 和重组 Pro-UK 比较突变体分子量大小。

1.2.7 Pro-UK 突变体与纤维蛋白的亲性和测定: 凝集反应液 (50mmol/L Tris-HCl pH7.4, 38mmol/L NaCl, 0.014% Tween 80) 250 μ l, 内含一定量的纤维蛋白原 (0.025、0.25、0.5mg), 牛凝血酶 1u, 待测样品 (突变体和重组 Pro-UK 表达产物经透析或初步纯化处理) 10 IU, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 培育 1h, 制成人工凝块, 离心取出上清, 凝块用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后, 溶于 17mmol/L 醋酸溶液中, 测定上清和凝块中 UK 的含量及活性^[10]。

2 结 果

2.1 含编码 Pro-UK 缺失突变体基因的重组表达质粒的构建

用 PCR 和基因重组方法构建了 Pro-UK 缺失 150~156 位氨基酸的突变体基因重组质粒, 详见图 1、图 2。四个人工合成的寡核苷酸引物 A、B、C、D; A、D 引物与 Pro-

UK 载体两侧序列互补; B、C 引物彼此互补; 其序列分别为:

	147	148	149	157	158	159	160	161
B':	5'-CAG	TGT	GGC	TTT	AAG	ATT	ATT	GGG-3
	159	158	157	149	148	147	146	145
C':	5'-AAT	CTT	AAA	GCC	ACA	CTG	AAA	TTT-3

PCR 反应以含有完整 Pro-UK cDNA 序列的 M13-Pro-UK 为模板, 先用 A、B 和 C、D 引物分别进行 PCR 反应, 产物分别为 AB 片段 (~1100 bp) 和 CD 片段 (~550 bp); 再以 AB 和 CD 片段为模板, 用 A、D 引物 PCR, 获得缺失 150~156 位氨基酸的 cDNA 的 AD 片段。AD 片段以 Bgl II 和 Sal I 酶切, 回收 AD 片段中 Bgl II-Sal I 片段并插入至 pSV₂-UK 载体的 Sal I 和 Bgl II 位点上, 构建成含有 Pro-UK 缺失 150~156 位氨基酸的 cDNA 重组质粒 pMM008 转化 RRI 受菌体。该突变体经酶切、杂交及核苷酸全序列分析鉴定证实, 结果见图版 I-A。为了提高重组突变体的表达水平, 在该重组质粒的早期启动子 SV40 (含增强子) 的

下游插入一个 hMTIIA 强启动子, 构建成由 SV40 增强子和 hMTIIA 强启动子联合控制表达 Pro-UK 缺失突变体基因的重组质粒 pMM024, 详见图 2。

2.2 Pro-UK 缺失突变体在 COS-7 细胞中的表达

用电穿孔法将含 Pro-UK 缺失突变体的 pMM 024 重组质粒 DNA 转染 COS-7 细胞, 转染后 24h、48h、72h、96h 取细胞上清进行 ELISA 检测, 结果均为阳性反应; 表明该突变体可在 COS-7 细胞中暂时性表达 (图略)。

2.3 Pro-UK 突变体在 CHO 细胞中的高效表达

将 pMM₀₂₄ 质粒 DNA 和 PSV₂.dhfrDNA 用磷酸钙沉淀法转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 经选择培养基筛选, 获得 3 株表达产物中具有 Pro-UK 抗原活性和纤溶活性的细胞株, 经 MTX 加压进行基因共扩增, 其表达水平明显提高, 其中 1 株细胞 H43 表达水平较高,

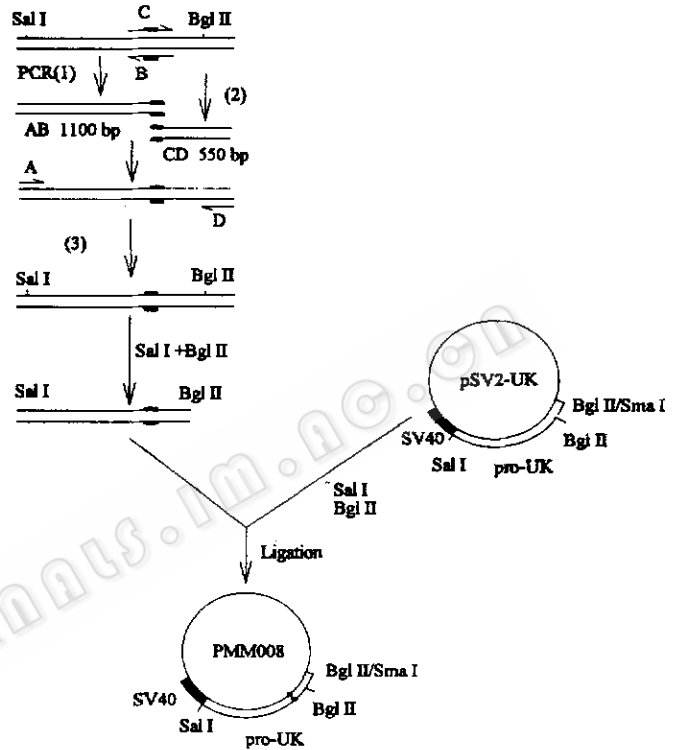


图 1 Pro-UK 缺失突变体重组质粒 PMM008 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid PMM008 encoding pro-UK deleted mutant

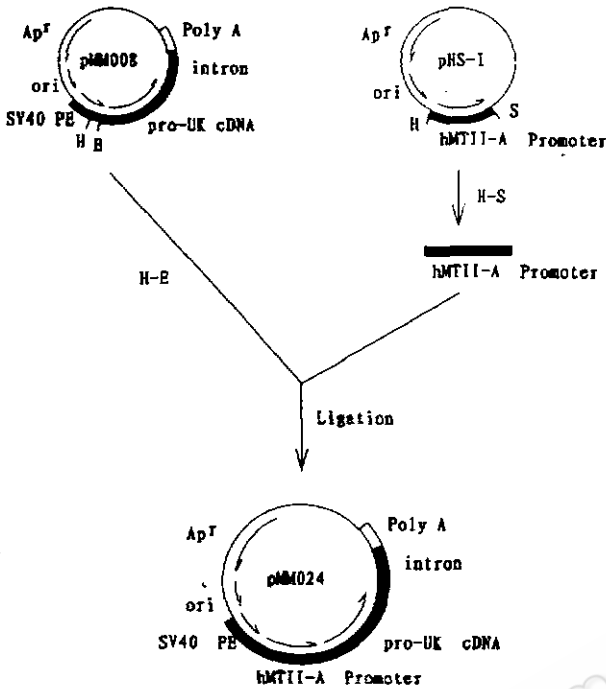


图 2 重组质粒 PMM024 的构建

Fig.2 Construction of the recombinant plasmid PMM024
H. HindIII, E. EcoRI, S. SmaI, PE. Early promoter

纤溶活性为 $450 \sim 500 \text{IU}/10^6 \text{cell}/24\text{h}$, 抗原性为 $\sim 30 \mu\text{g}/10^6 \text{cell}/24\text{h}$ 。此株细胞传代后连续培养 15d, 隔日测纤溶活性, 其表达水平均在 $400 \text{IU}/10^6 \text{cell}/24\text{h}$ 左右, 用去除 MTX 的培养基, 连续传代培养细胞 2 月以上, 细胞表达水平无明显改变, 细胞株经液氮冻存半年、一年及一年以上, 细胞表达水平仍在 $500 \text{IU}/10^6 \text{cell}/24\text{h}$ 左右。这表明缺失突变体能在 CHO 细胞中稳定地高效表达。

2.4 突变体 H43 细胞株表达产物的初步分析

突变体细胞表达产物经 SDS-PAGE 转溶试验的结果显示, 只有单一 54kDa 纤溶条带, 而标准 UK 和完整 Pro-UK cDNA 在 CHO 细胞表达产物均为 54kDa 和 32kDa (尿激酶降解产物) 两条纤溶带 (图版 I - B)。Western

blot 分析结果表明, H43 细胞表达产物在非还原和还原条件下均为单一 54kDa 条带; 而天然 UK 在非还原条件时为 54kDa, 在还原条件时为 32kDa 和 20kDa 两条带 (图版 I - C)。说明突变体表达产物的分子量与天然 UK 分子量相同, 并以单链形式存在。应用亲和层析法同时纯化少量突变体和重组 Pro-UK, SDS-PAGE 电泳结果显示, 重组突变体表达产物比完整 Pro-UK cDNA 的表达产物 (rPro-UK) 的单链比例明显增高, 还原后单链 (54kDa 带) 约占总量的 69.24%, 而 rPro-UK 只占 17% 左右 (图版 I - D), 这可能是由于缺失突变体在 158~159 位氨基酸之间蛋白酶消化处局部构型发生改变, 导致抗蛋白酶的抗性增强。突变体表达产物与纤维蛋白亲和性的实验结果见图版 I - E, 由此可见, 突变体与纤维蛋白的凝块中出现纤溶圈, 而 rPro-UK 与纤维蛋白的凝块几乎无纤溶圈。用 ELISA 法测定突变体凝块的抗原性的 P/N 值为 3.5 (阳性), rPro-UK 凝块的 P/N 值为 1.5 (阴性)。结果表明, 突变体表达产物与重组 Pro-UK 相比, 对纤维蛋白亲和性有所提高。

3 讨 论

Pro-UK 对血栓具有特异性的溶栓作用, 但对纤维蛋白的亲合力极低。朱德熙教授等对 Pro-UK 进行结构与功能分析, 认为 Pro-UK cDNA 序列中缺失 150~156 位氨基酸有可能提高对纤维蛋白的亲合力^[11]。我们的结果证明了 Pro-UK DNA 序列中缺失 150

~156 位氨基酸的突变体在 CHO 细胞中获得稳定高效表达, 表达水平为 450~500IU/ 10^6 cell/24 h, 与改构前的 Pro-UK cDNA 全长序列在 CHO 细胞中高效表达一致 (400~500IU/ 10^6 cell/24h)^[2], 接近国际最高水平^[12], 突变体对纤维蛋白的亲合力有所提高, 无论在细胞表达、产物纯化及冻存过程中, 与重组 Pro-UK 相比, 突变体不易被蛋白酶所降解而且以单链形式存在为主。其原因可能是突变体在蛋白酶降解区局部构型改变, 对蛋白酶降解有抗性, 突变体可望延长其体内半衰期。该突变体与重组 Pro-UK 在体内的半衰期及溶栓效果的研究, 目前正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] 方继明, 李秀珍, 李凤知等. 解放军医学杂志, 1990, 15: 10.
- [2] 程度胜, 俞伟源, 韩素文等. 生物工程学报, 1993, 9 (3): 204~209.
- [3] 李凤知, 李秀珍, 唐红娣等. 生物工程学报, 1991, 7: 114~119.
- [4] 黄培堂, 俞伟源. PCR 技术原理和应用. (第一版), 北京: 中国科学技术出版社, 1990.
- [5] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory Manual; 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [6] 程度胜, 张宏权, 俞伟源. 军事医学科学院院刊, 1987, 15: 320.
- [7] 韩素文, 祝庆余, 赵立权等. 生物工程学报, 1989, 5: 201~205.
- [8] 韩素文, 俞伟源, 李秀珍等. 军事医学科学院院刊, 1987, 11: 101~108.
- [9] 李秀珍, 唐红娣, 方继明. 军事医学科学院院刊, 1988, 12: 138~141.
- [10] 刘士辉, 黄培堂, 黄翠芬. 中国科学 (B 辑) 1995, 25 (4): 399~405.
- [11] 刘建宁, 朱德熙. 863 计划生物技术领域年会论文摘要, 1989.
- [12] Geory C, Dennis D, Jeff S S *et al.* Biotechnology, 1990, 8: 54~58.

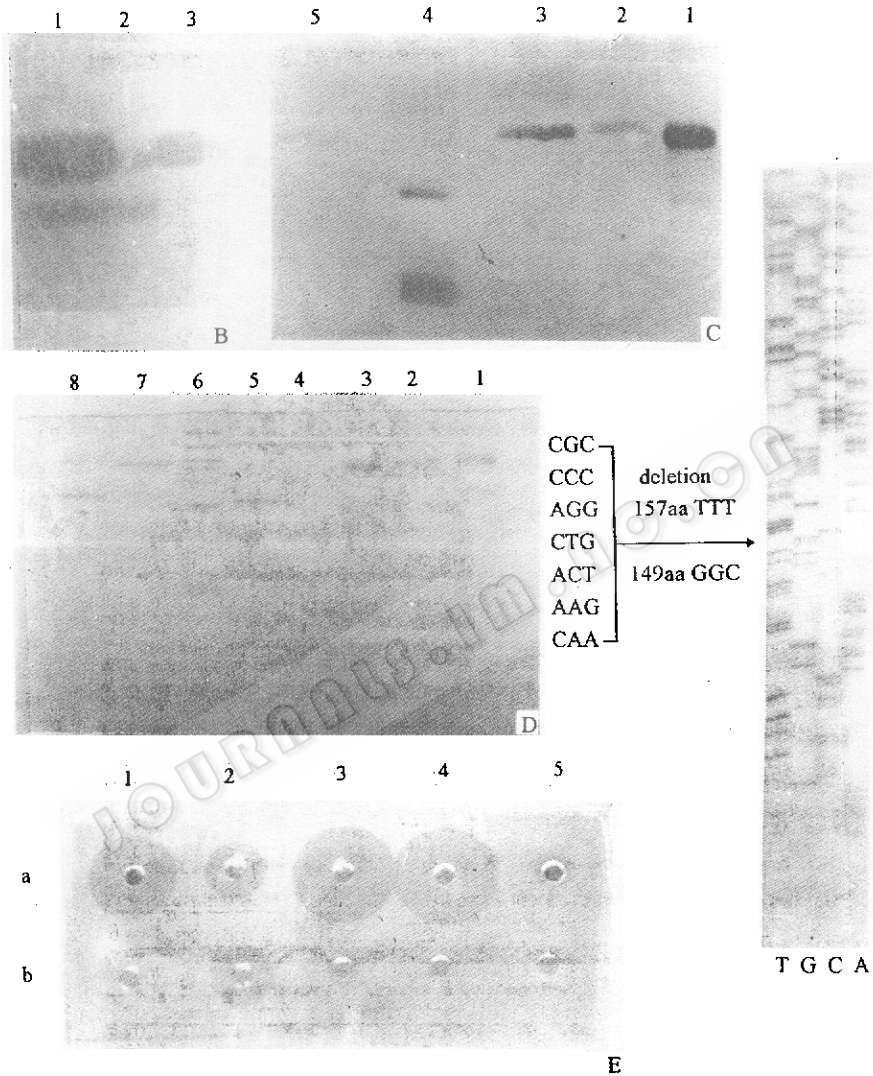
The Construction and Expression of Human Pro-urokinase cDNA Coding Deleted Mutant at 150~156 Amino Acids

Han Suwen Yu Weiyuan Cheng Dusheng Hu Baocheng

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract A recombinant cDNA encoding human pro-urokinase (Pro-UK) mutant deleted at 150~156 amino acids was constructed by PCR and DNA recombinant methods. The mutant gene was expressed transiently in COS-7 cells and constitutively in CHO cells. The expressing level in CHO cells reaches 450~500 IU/ 10^6 cells/24 h, SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the molecular weight of the recombinant mutant is about 54 kDa. Before and after purification, the recombinant mutant exists mostly in single chain form. The ratio of single chain to two chain UK is much higher in recombinant mutant than recombinant Pro-UK. The results indicates that the mutant product seems to have some resistant to proteinases and its affinity to fibrin is also a little improved.

Key words Pro-urokinase, mutant, construction, expression



- A. Sequence analysis of Pro-UK deletion region
 B. Molecular weight measurement of the Pro-UK mutant by SDS-PAGE transfer-dissolution test
 1. Recombinant Pro-UK, 2. Standard UK, 3. Mutant expressed by CHO cells
 C. Western Blot analysis of the expression products of deleted Pro-UK mutant
 1. Standard UK, 2. Deleted Pro-UK mutant, 3. Deleted Pro-UK Mutant, 4. Standard UK, 5. Deleted Pro-UK mutant (1~3. Electrophoresis under reducing condition, 4, 5. under non-reducing condition)
 D. Analysis of the purified mutant products in *H*₄₃ cell by SDS- PAGE

1. Standard UK, 2. Expression products by *H*₄₃ cells, 3. Recombinant Pro-UK, 4. None, 5. Standard UK, 6. Protein molecular weight marker, 7. Expression products of *H*₄₃ cells, 8. Recombinant Pro-UK. (1~3. Electrophoresis under non-reducing condition, 5, 7, 8. under reducing condition)
 E. Affinity analysis of the Pro-UK mutant to fibrinogen
 a. Supernatant; 1. Standard UK, 2. Standard t-PA, 3. Mutant, 4. Recombinant Pro-UK expressed by CHO cells, 5. Recombinant Pro-UK expressed by *E. coli*. ;
 b. Coagulum; 1. Standard UK, 2. Standard t-PA, 3. Mutant, 4. Recombinant Pro-UK expressed by CHO cells, 5. Recombinant Pro-UK expressed by *E. coli*.