

# 血管性血友病因子裂解蛋白酶的稳定表达及其活性检测

马珍妮, 董宁征, 张敬宇, 苏健, 汪安友, 阮长耿

苏州大学附属第一医院 江苏省血液研究所 卫生部血栓与止血重点实验室, 苏州 215006

**摘要:** 本研究旨在得到重组的血管性血友病因子裂解蛋白酶 (ADAMTS13), 进一步研究其在血栓止血中的作用。利用脂质体将编码 ADAMTS13 全长序列的重组质粒 pSecTag-ADAMTS13 转染 Hela 细胞, 用潮霉素 (Hygromycin-B) 筛选得到阳性克隆细胞株, 并扩大培养, 收集上清。利用 Ni-NTA 琼脂糖柱、梯度咪唑淋洗法纯化蛋白, SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定纯化产品纯度和免疫学活性, 采用 GST-His 双抗夹心法测定蛋白剪切活性。结果显示, 成功获得一株能恒定分泌重组 ADAMTS13 蛋白的细胞株 ADAMTS2-4, 每 1 L 培养上清可纯化得到 5.8 mg 重组蛋白。Western blotting 结果显示, ADAMTS13 多抗能与重组蛋白在 190 kDa 处显单一条带, 并且蛋白具有 6.4 U/mL 的剪切活性 (每毫升正常人混合血浆中 ADAMTS13 活性为 1 U)。重组蛋白具有较好的免疫原活性和酶活性, 为进一步研究 ADAMTS13 作用机理和运用奠定了良好的基础。

**关键词:** 血管性血友病因子裂解蛋白酶, 真核表达, 重组蛋白

## Stable expression and characterization of the von Willebrand factor cleaving protease

Zhenni Ma, Ningzheng Dong, Jingyu Zhang, Jian Su, Anyou Wang, and Changgeng Ruan

Key Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Ministry of Health, Jiangsu Institute of Hematology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

**Abstract:** This study was to acquire recombinant protein of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13, a disintegrin and metalloprotease with a thrombospondin type 1 motifs 13), for further studies on its biological function in thrombosis and hemostasis. We transfected the Hela cells with the plasmid pSecTag-ADAMTS13 by lipofectamine. A positive cell cloning was selected by hygromycin-B. The recombinant protein was purified with Ni-NTA agarose column by gradient imidazole. The purity and immune activity of purified products were identified with SDS-PAGE and Western blotting respectively. We also measured the enzymatic activity of recombinant protein (rADAMTS13) by GST-His two-site ELISA assay. The results showed that we successfully constructed Hela cells ADAMTS2-4 which expressed high level of rADAMTS13. We received about 5.8 mg recombinant protein in culture supernatants per liter purified with Ni-NTA column. The protein formed a main lane at the position of 190 kDa with SDS-PAGE and reacted with polyclonal antibody against ADAMTS13 by Western blotting. The amount of rADAMTS13 activity was 6.4 U/mL, according to the normal plasma defined as 1 U/mL. In conclusion, rADAMTS13 protein had high purity, immune activity and good enzymatic activity, which could establish the experimental foundation for further research on biological function and mechanism of this unique metalloprotease.

**Received:** August 27, 2009; **Accepted:** December 24, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30670904).

**Corresponding author:** Changgeng Ruan. Tel: +86-512-67780418; Fax: +86-512-65113556; E-mail: changgengruan@hotmail.com

国家自然科学基金项目 (No. 30670904) 资助。

**Keywords:** von Willebrand factor cleaving protease, eukaryotic expression, recombinant protein

血管性血友病因子裂解蛋白酶 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif, ADAMTS13, 也称 VWF-CP) 是 1996 年发现的一种血浆金属蛋白酶, 它主要将血浆中大分子量的血管性血友病因子 (von Willebrand factor, VWF) 多聚体降解成为黏附活性低的小分子片段<sup>[1]</sup>。VWF 是血浆中以多聚体形式存在的糖蛋白, 在血管壁发生损伤时, 对血小板的黏附与聚集起到至关重要的作用<sup>[2]</sup>。内皮细胞和巨核细胞内主要合成的是大分子量的 VWF 多聚体 (分子量超过 20 000 kDa), 分泌进入血液循环。VWF 多聚体的黏附活性取决于分子大小, 尤其是超大分子 VWF (UL-VWF) 在高剪切力的条件下诱发血小板过度聚集。UL-VWF 通常能被 ADAMTS13 切割成更小的片段, 以抑制血小板性血栓形成。当 ADAMTS13 活性缺失或存在抗体时, UL-VWF 得以继续残留在血液循环中, 从而引发血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)<sup>[3-5]</sup>。研究发现, ADAMTS13 的基因位于人 9 号染色体长臂 (9q34), 由 29 个外显子组成<sup>[6]</sup>。cDNA 含 4597 bp 以及一个多聚腺苷酸尾 (PolyA tail), 开放阅读框为 4284 bp (109~4392 nt), 编码 1427 个氨基酸。人 ADAMTS13 具有 9 个结构功能域, 依次为信号肽、前导肽、金属蛋白酶域、去整合素域、凝血酶敏感蛋白 1 (TSP1) 域、富半胱氨酸域、间隔区、7 个 TSP1 重复基序和 2 个 CUB 域<sup>[7]</sup>。

本研究拟在人宫颈癌 (Hela) 细胞株内获得稳定表达高水平的具有较高活性的 rADAMTS13 蛋白, 并且目的蛋白可以分泌到上清中, 在 Hela 细胞培养上清内能大规模培养、生产和纯化, 这为进一步研究 ADAMTS13 的生物学功能以及药物的开发奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞和质粒

人宫颈癌细胞株 Hela 为本室保存。质粒

pSecTag-ADAMTS13 由美国 Baylor 医学院 Dong Jingfei 教授惠赠<sup>[8]</sup>, 该质粒是由 ADAMTS13 全长基因 (GenBank Accession No. NM\_139025.3) 引入 *Hind* III 和 *Xho* I 两个限制性酶切位点, 重组构建入真核表达载体 pSecTag2 A (Invitrogen 公司), 测序结果与目的基因序列完全相同。

#### 1.1.2 主要试剂

质粒中抽试剂盒和 Ni-NTA 琼脂糖购自 Qiagen 公司。Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品。潮霉素 (Hygromycine B) 购自 Calbiochem 公司。ADAMTS13 兔抗人多抗购自 Abcam 公司。GST 鼠抗人单抗和辣根过氧化物酶标记的 6×His-Tag 单抗 (HRP-Anti-His)、羊抗鼠 IgG (HRP-GAM-IgG)、羊抗兔 IgG (HRP-GAR-IgG) 购自 Beckman-Coulter 公司。硝酸纤维素膜为 PALL 公司产品。ECL 购自上海普飞生物技术有限公司。其他各种试剂和材料均为可获得的最高标准产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 真核表达载体 pSecTag-ADAMTS13 的抽提、鉴定和纯化

将 pSecTag-ADMATS13 转化入大肠杆菌 *Escherichia coli* TG1 中, 涂板, 挑取克隆, 37℃ 扩增培养, 用质粒中抽试剂盒抽提质粒 (按试剂盒说明操作)。质粒经 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切鉴定。

#### 1.2.2 阴离子脂质体介导的 Hela 细胞的转染

Hela 细胞培养: 在六孔板中接种 Hela 细胞 ( $2 \times 10^5$ /mL) 至 40%~60% 汇合。转染制备: A 液: 用无血清 1640 培养基稀释 10  $\mu$ g 质粒至 250  $\mu$ L; B 液: 用无血清 1640 培养基稀释 10  $\mu$ L Lipofectamine 2000 至 250  $\mu$ L; 轻轻混合 A、B 液, 室温放置 15 min。转染准备: 用无血清 1640 培养基漂洗细胞 1 次, 再加入 1640 培养基。转染: 将待转染混合物缓缓加入带转染细胞中, 摇匀, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 温箱培养 6 h, 吸除上清, 换入完全培养基继续培养 18 h。阳性克隆的筛选: 将转染的细胞消化后, 接种至 35 mm 的培养皿中 ( $2 \times 10^3$ /mL), 换入筛选液 (含 400  $\mu$ g/mL Hygromycine B 的 10% 小牛血清的 1640 培养基), 至

细胞大部分死亡后换入筛选维持液 (含 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hygromycine B 的完全培养基) 维持筛选。待阳性克隆长出, 再扩大培养, 即得到稳定表达 rADAMTS13 蛋白的细胞株。

### 1.2.3 转染后的 HeLa 细胞上清的获得和浓缩

用无血清 1640 培养基驯化稳定表达重组蛋白的 HeLa 细胞, 大量培养, 收集上清。将收集的上清经 Amicon Ultra-15 离心超滤管离心浓缩, 以备纯化。

### 1.2.4 重组蛋白纯化、透析及其鉴定

上清经 Ni-NTA 琼脂糖柱, 用含不同浓度的咪唑缓冲液 (pH 8.0) 从低到高梯度淋洗, 收集蛋白所在缓冲液, 吸入透析袋, 用 5 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl (pH 8.0) 缓冲液透析过夜。

将纯化的蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜, ADAMTS13 多抗作为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, ECL 放射显影, 用 Western blotting 印迹鉴定表达的蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。

### 1.2.5 rADAMTS13 酶活性检测

ADAMTS13 能够特异地切割 VWF A2 结构域中的 Tyr1605-Met1606 肽键, 调节 VWF 在血浆中分子的大小。将 VWF73 (Asp1596-Arg1668) 的编码序列插入表达载体 pGEX-6P-1 (GE Healthcare 公司), 该载体带有谷胱甘肽 S 转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 标签, 同时设计引物在目的片段后加 6 个组氨酸 (6 $\times$ His) 的 DNA 序列, 通过大肠杆菌 BL21 表达体系, 表达重组蛋白, 通过 Ni-NTA 柱得到纯品, 浓度为 0.56 mg/mL。得到的 GST-VWF73-His 蛋白的 N 端连有 GST 标签, C 端连有 6 $\times$ His 标签。

将 50  $\mu\text{L}$  GST 单抗 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 加入 ELISA 板, 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜, 5% BSA 在 37 $^{\circ}\text{C}$  下封闭 2 h。再将浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 GST-VWF73-His 重组蛋白 (25 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 在包好的板上每孔加 50  $\mu\text{L}$ , 室温反应 1 h。洗板 3 次后, 将纯化后的重组蛋白 rADAMTS13 以 1:50 稀释后, 加入反应孔, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 h。将正常人混合血浆倍比稀释加入反应孔, 同时孵育, 作为标准曲线孔。洗板后, 加入 HRP 标记的 His 单抗 (1:1000 稀释) 反应 1 h, TMB 显色, 酶标仪读数<sup>[9]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 真核表达载体 pSecTag-ADAMTS13 的鉴定

将经 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切后的质粒 pSecTag-ADAMTS13 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 4280 bp 的目的基因条带。表明 ADAMTS13 基因重组质粒构建成功 (图 1)。

### 2.2 阳性克隆细胞上清经 Western blotting 鉴定

经 Hygromycine B 筛选, 获得一株高表达 ADAMTS13 蛋白的基因工程细胞株 ADAMTS2-4。阳性克隆细胞上清经 SDS-PAGE 电泳, 转膜, Western blotting 结果显示, 抗 ADAMTS13 的多抗能在 190 kDa 左右处显单一蛋白区带 (图 2), 说明上清中分泌的重组蛋白具有较高的免疫学活性。

### 2.3 Ni-NTA 柱纯化后的蛋白鉴定

基因工程细胞株 ADAMTS2-4 经扩大培养后, 收集无血清上清经超滤浓缩后, 上 Ni-NTA 柱, 每 1 L 培养上清液中可纯化得到 5.8 mg rADAMTS13 纯品。经 10% SDS-PAGE 电泳鉴定, 纯化产物主要在 190 kDa 处显一蛋白条带 (图 3)。

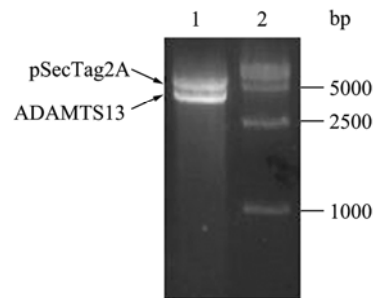


图 1 重组质粒 pSecTag-ADAMTS13 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmid pSecTag-ADAMTS13 by restriction enzyme digestion. 1: pSecTag-ADAMTS13 digested with *Hind* III and *Xho* I; 2: DL15 000 DNA marker.

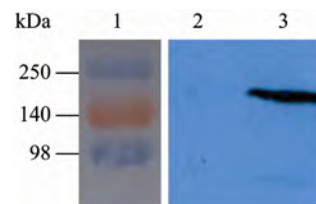
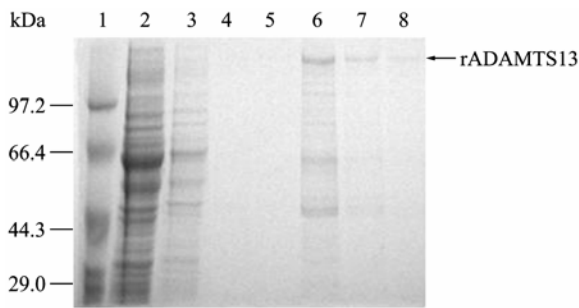


图 2 Western blotting 鉴定重组蛋白

Fig. 2 Western blotting analysis of the recombinant protein. 1: prestained protein marker; 2: supernatant from untransfected HeLa cells; 3: supernatant from transfected HeLa cells ADAMTS2-4.



**图3 SDS-PAGE 电泳检测 Ni-NTA 柱纯化后的上清蛋白**  
 Fig. 3 Reducing SDS-PAGE analysis of cell supernatant after flowing through Ni-NTA agarose column. 1: low weight protein marker; 2: supernatant flowing through the Ni-NTA agarose column without binding on it; 3-5: wash by wash buffer with iminazole (20 mmol/L); 6: eluate by eluate buffer with iminazole (50 mmol/L); 7,8: eluate by eluate buffer with iminazole (250 mmol/L).

#### 2.4 rADAMTS13 蛋白酶的活性检测

正常人混合血浆经倍比稀释, 检测值作标准曲线为  $\lg y = 0.18 - 0.67 \lg x$  ( $R^2 = 0.9465$ ,  $x = \text{ADAMTS13}$  活性百分数,  $y = OD_{450}$  值), 设定正常人混合血浆中 ADAMTS13 的活性为 1 U/mL, 代测的 rADAMTS13 的活性为 6.4 U/mL。

### 3 讨论

血浆中的 ADAMTS13 主要来源于肝脏的星状细胞 (Hepatic stellate cells, HSC), 同时在全身多个组织和脏器中均有微量的表达。ADAMTS13 基因广泛存在于哺乳动物和鸟类、鱼类中, 其中小鼠的 ADAMTS13 基因与人的具有很高的同源性。直到 1996 年, Tsai 和 Fulan 才在血浆中纯化出 ADAMTS13 蛋白<sup>[10]</sup>。直接从血浆中分离天然的 ADAMTS13 蛋白虽然活性好, 难以大量制备, 而利用体外基因重组技术可以解决这一问题。

ADAMTS13 全长序列编码 1427 个氨基酸, 预测分子量为 154 kDa 左右, 但由于糖基化和丰富的半胱氨酸, SDS-PAGE 电泳显示有 190 kDa。在真核细胞中表达, 更有利于获得活性较高并更接近与自然合成的 ADAMTS13 蛋白。利用脂质体, 将表达载体 pSecTag-ADAMTS13 导入 HeLa 细胞株, 该细胞株自身有内源性的 Furin 蛋白, 能够切割前导肽并释放成熟的蛋白到培养的上清中, 成为可溶性蛋白,

大量培养后, 收集其上清液可进行分离纯化。

本研究结果表明, 重组质粒经 lipofectamine 2000 转染 HeLa 细胞, 经 Hygromycine B 筛选, 获得一株高表达 rADAMTS13 蛋白的基因工程细胞株 ADAMTS2-4。将细胞株 ADAMTS2-4 培养无血清上清经超滤浓缩后, 利用载体上带的 6×His 标签, 经 Ni-NTA 琼脂糖柱不同浓度咪唑梯度淋洗纯化蛋白, 使蛋白处于自然状态, 保证了酶的活性。经 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 显示, 纯化的 rADAMTS13 大小约为 190 kDa, 与预期的大小相符, 并且商品化的抗 ADAMTS13 多抗能与其特异性结合。

有研究表明, VWF73 (Asp1596-Arg1668) 包含有 ADAMTS13 切割 VWF 的酶切位点 Tyr1605-Met1606, 是 ADAMTS13 作用的最小底物<sup>[11]</sup>。利用基因重组的方法, 得到了较纯的 N 端连有 GST 标签, C 端连有 6×His 的重组蛋白 GST-VWF73-His。利用 GST 单抗包板, 将 GST-VWF73-His 蛋白与之结合, 再将 rADAMTS13 与之反应, 若酶将 VWF73 的 C 末端切掉后, 再用 His 单抗检测, 读数会降低, 可以反应出 ADAMTS13 切割 VWF 的活性大小。本实验利用以上方法, 以正常人混合血浆倍比稀释, 作出标准曲线, 从而得到纯品活性为 6.4 U/mL, 可见得到的重组蛋白保持了较好的剪切活性。

总之, 基因工程细胞株 ADAMTS2-4 能稳定高表达重组蛋白 rADAMTS13, 纯化的产品具有较高的免疫学活性和生物学酶活性, 并且可长期大量获得, 为下一阶段研究 ADAMTS13 生物学功能和作用机理奠定了坚实的基础。

### REFERENCES

- [1] Dong JF. Structural and functional correlation of ADAMTS13. *Curr Opin Hematol*, 2007, **14**(3): 270-276.
- [2] Bergmeier W, Chauhan AK, Wagner DD. Glycoprotein Ibalph and von Willebrand factor in primary platelet adhesion and thrombus formation: lessons from mutant mice. *Thromb Haemost*, 2008, **99**(2): 264-270.
- [3] Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a thrombotic disorder caused by ADAMTS13 deficiency.

- Hematol Oncol Clin North Am*, 2007, **21**(4): 609–632.
- [4] Zheng XL, Sadler JE. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Pathol*, 2008, **3**: 249–277.
- [5] Desch KC, Motto DG. Thrombotic thrombocytopenic purpura in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27**(9): 1901–1908.
- [6] Levy GG, Nichols WC, Lian EC, *et al.* Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*, 2001, **413**(6855): 488–494.
- [7] Tsai HM. Current concepts in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Annu Rev Med*, 2006, **57**: 419–436.
- [8] Tao Z, Peny Y, Nolasco L, *et al.* Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions. *Blood*, 2005, **106**(13): 4139–4145.
- [9] Zhou W, Tsai HM. An enzyme immunoassay of ADAMTS13 distinguishes patients with thrombotic thrombocytopenic purpura from normal individuals and carriers of ADAMTS13 mutations. *Thromb Haemost*, 2004, **91**(4): 806–811.
- [10] Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood*, 1996, **87**(10): 4235–4244.
- [11] Wu JJ, Fujikawa K, McMullen BA. Characterization of a core binding site for ADAMTS-13 in the A2 domain of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(49): 18470–18474.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

### 堆肥微生物学原理

许修宏 李洪涛 张迪 编著

978-7-03-026451-0 ¥48.00 2010年1月出版

本书内容分为上、下两篇。上篇着重介绍堆肥的生物学原理，包括堆肥的生化过程、堆肥动力学、堆肥过程中的物质与能量平衡、堆肥微生物学、堆肥中的微生物学研究方法、堆肥中物质的降解与转化、堆肥腐熟度方面的基本原理和研究进展；下篇内容将堆肥技术与双孢蘑菇栽培技术结合起来，在介绍食用菌生物学知识和菌种制作技术的基础上，重点从培养料的堆制、发菌期管理、出菇期管理和病虫害防治四个方面介绍双孢蘑菇的栽培技术。

本书主要读者对象为环境科学、环境工程、生物工程、食用菌栽培等领域的科技人员、高等院校教师及学生。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：李韶文（010-64000849） 周文字（010-64031535）

网上订购：[www.dangdang.com](http://www.dangdang.com) [www.joy.com](http://www.joy.com) [www.amazon.cn](http://www.amazon.cn) [www.beifabook.com](http://www.beifabook.com)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目