

技术与方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.012

重组葡激酶的表达纯化及纤溶活性鉴定

杨 可¹, 杨 震¹, 汪德强², 雷 寒¹, 周建中¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物实验室, 重庆 400016)

【摘 要】目的: 构建葡激酶(Staphylokinase, SAK)基因的原核表达质粒, 在大肠杆菌中表达 SAK 蛋白质, 纯化并初步鉴定其生物学活性。方法: 基于生物信息学方法分析优化基因序列, 使用基因合成技术合成 SAK 基因, 转化感受态大肠杆菌 B834 菌株, 使在其中表达, 利用离子交换柱, 分子筛(Superdex 75)等进行分离纯化, 应用纤维蛋白平板溶圈法测定评价其生物活性。结果: SAK 在大肠杆菌中以可溶上清的方式高效表达, 利用离子交换柱和分子筛等纯化效果良好, 纯度达 95%, 体外实验显示其纤溶活性与尿激酶标准品相当。结论: 应用全基因合成经过优化的基因可在大肠杆菌系统中高效上清表达具有较高纤溶活性的 SAK。

【关键词】葡激酶; 表达纯化; 体外活性

【中国图书分类法分类号】R541.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-10

Purification and fibrinolytic activity identification of recombinant staphylokinase

YANG Ke¹, YANG Zhen¹, WANG Deqiang², LEI Han¹, ZHOU Jianzhong¹

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Molecular Infectious Diseases Laboratory, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the expression vector of human staphylokinase (SAK) gene, express SAK protein in E.coli, purify recombinant SAK protein and to verify its bioactivity. Methods: On the basis of bioinformatics, gene sequence was analyzed and optimized, SAK plasmid was constructed by gene synthesis methods and the protein was expressed by B834 strain. The recombinant protein was purified by ion exchange column (DEAE) and size exclusion chromatography (Superdex 75). Soluble fibrin plate method was used to characterize its fibrinolytic activity. Results: The recombinant SAK was highly expressed in soluble supernatant by E coli system. The recombinant protein with 95% purity was obtained by using of DEAE and Superdex 75. Experiments in vitro revealed that the fibrinolytic activity of SAK was approximately equal to that of urokinase. Conclusion: The recombinant SAK with high fibrinolytic activity can be highly expressed in E coli system by utilizing sequence optimizing and gene synthesis.

【Key words】staphylokinase; expression and purification; activity in vitro

随着社会老年化人口不断增长, 冠心病已经成为威胁人类生命健康的全球卫生公共事件。冠心病导致冠状动脉血供急剧减少或中断, 造成心肌坏死, 即心肌梗死, 是导致心源性猝死的重要原因^[1]。在发生心肌梗死后, 恰当而及时的溶栓治疗能够迅速恢复心肌的血液灌注, 保护和维持心脏功能。

天然葡激酶(Staphylokinase, SAK)是金黄色葡萄球菌溶原性菌株的分泌蛋白质, 由 136 个氨基酸组成。SAK 是一种“间接型”纤溶酶原激活剂, 溶栓能力较强^[2]。与内生性的尿激

酶(Urokinase, UK)及组织型纤溶酶原激活剂(Tissue plasminogen activator, tPA)相比, SAK 没有蛋白水解活性。SAK 溶栓作用机制为: SAK 先与纤溶酶原(Plasminogen, Plg)按 1:1 比例结合形成无活性的复合物(即 SAK-Plg 复合物), 继之在少量纤溶酶(Plasmin, PLm)启动下, 形成具有蛋白水解活性的 SAK-PLm 复合物, SAK-PLm 复合物将激活纤溶酶原使其转变为纤溶酶进而溶解血栓^[3]。研究证明, 对于以血小板为主的血栓而言, SAK 较其他溶栓药物有更好的作用效果^[4]。另外 SAK 具有一定的纤维蛋白特异性, 不会耗竭纤维蛋白酶原, 对血小板富集型血栓作用强, 使其成为一种极具开发潜力的特异性溶栓剂^[4]。

研究发现, SAK 进入动物血液后会迅速刺激机体产生免

作者介绍: 杨 可(1986-), 女, 硕士,

研究方向: 冠脉溶栓治疗。

通信作者: 周建中, 男, 教授, Email: zhou_jianzhong27@yahoo.com.cn。

基金项目: 重庆市科委资助项目(编号: 2009BB5406)。

疫保护,导致难以持续给药来溶解血栓,多个课题组采用对 SAK 进行定点突变方式进行分子改造,以减低其在机体内的免疫原性。另外应用细菌表达系统获得的重组 SAK,上清表达量较低^[9]。本研究通过生物信息学对 SAK 基因序列进行优化以提高其上清表达量,采用全基因合成技术来获取 SAK 基因,以大肠杆菌 B834 为表达菌株,通过离子交换柱,分子筛等完成目的蛋白纯化,获得了高纯度高产率的重组 SAK。纤维蛋白平板体外活性检测显示本研究获得 SAK 具有较高的纤溶活性。

1 材料和方法

1.1 材料

限制性内切酶 *Sac* I, *Xho* I, T4 DNA 连接酶,高保真 rtaq 酶,dNTP,质粒纯化试剂盒,分子量蛋白 Marker,DNA Marker 等均购自 Takara 公司。质粒 pET-28a 购自 Novagen 公司。质粒提取试剂盒购自 Promega 公司。凝血酶,纤溶酶原,纤维蛋白原,尿激酶标准品等均购自中国食品药品检定院。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

水浴箱,连接仪,温箱,凝胶成像仪,PCR 仪,超声破碎仪,梯度杯,蛋白浓度检测仪。DEAE 离子交换柱、分子筛 Superdex 75 等均系 GE 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 利用基因合成技术,结合 Codon Optimization Analysis 基因优化软件分析结果,合成 SAK 全长序列,选取 *Sac* I, *Xho* I 为限制性内切酶切位点。该步骤由上海旭冠生物有限公司完成。

1.3.2 表达质粒构建 将合成的 SAK 序列与本室构建并保存的 pET-28a 质粒分别进行 *Sac* I, *Xho* I 双酶切,条件为水浴 37℃,4 h。双酶切产物于 16℃,连接过夜。

1.3.3 转化克隆菌 转化大肠杆菌 DH-5 α ,铺平板 37℃过夜。

1.3.4 筛选阳性转化菌种 设计正反向引物如下:正向引物 F (5'→3')GCGGAATTCAAAAAAGGCGATGACGCGAGTTATT;反向引物 R (5'→3')GGCGGCTCGACTTATTTCTTTT CTATAACAACCT。选取平板上单菌落接种于 3 ml LB 培养基中,置摇床 37℃×190 r/min 培养,至 OD₆₀₀ 值约 0.2 时取出。以菌液为模版行 PCR 反应,共 35 个循环。根据 PCR 反应结果筛选阳性克隆。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增结果。

1.3.5 双酶切鉴定 将 PCR 扩增结果为阳性的菌液进行过夜培养后提取质粒,操作步骤按试剂盒说明书进行。将提取的质粒,于 37℃水浴 2 h 后,琼脂糖凝胶电泳鉴定双酶切鉴定结果。

1.3.6 转化表达菌 将双酶切鉴定阳性质粒转化大肠杆菌 B834,铺平板,37℃过夜。

1.3.7 目的蛋白表达 挑取单菌落接种于 LB 培养基,于 37℃,180 r/min 条件下培养至 OD₆₀₀ 值约 0.4 时,加入 IPTG,使终浓度为 1 mmol/L,20℃低温摇床诱导 20 h。

1.3.8 目的蛋白纯化 离心收集菌体,加入 20 mmol/L,pH8.0 Tris-HCl,300 mmol/L NaCl 用玻棒搅拌均匀,冰浴中超声破碎仪破菌,至菌液清亮。破菌液留样 30 μ l。破菌液离心后取上清过镍柱,留取穿透液。以 20 mmol/L,pH 8.0 Tris-HCl 平衡 DEAE 离子交换柱,至基线平稳后,将通过镍离子交换柱的穿透液缓慢通过 DEAE 柱。再次以 20 mmol/L,pH8.0 Tris-HCl 冲洗 DEAE 柱至基线平稳。配制高盐洗脱缓冲液 A 20 mmol/L,pH8.0 Tris-HCl,200 mmol/L NaCl 和低盐洗脱缓冲液 B 20 mmol/L,pH8.0 Tris-HCl 各 300 ml,分别倒入梯度杯中。连接梯度洗脱仪各个装置,打开采集器,电脑记录洗脱峰。SDS-PAGE 蛋白电泳验证结果,将洗脱的目的蛋白留用。参考 SDS-PAGE 蛋白电泳结果,将前步所得的含目的蛋白的各管洗脱液,超滤至 1 ml。将浓缩样品用分子筛 Superdex 75 进一步纯化,电脑记录洗脱峰,以 EP 管收集洗脱样品。选取各洗脱峰尖处相应的蛋白样品分别依次取样,SDS-PAGE 蛋白电泳验证结果。目的蛋白浓缩脱盐与保存:依据分子筛纯化后 SDS-PAGE 蛋白质电泳结果,收集相应 EP 管中样品然后用进行浓缩,以等体积超滤缓冲液(5 mmol/L,pH8.0 Tris-HCl,50 mmol/L NaCl)3~5 次迭代脱盐并将目的蛋白质浓缩,将目的蛋白样品高速离心后,分装至多管于-80℃冻存。

1.3.9 目的蛋白纤溶活性测定 采用纤维蛋白平板溶圈^[6]的方法:将 0.35 g 琼脂粉加入到 30 ml 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中,微波炉加热至融化。冷却至不烫手依次加入纤维蛋白原,氯化钙,纤溶酶原,凝血酶。摇匀至产生浑浊后立即倾倒入平板,放 4℃冷却后,用打孔器打加样孔,将待测样品与尿激酶标准品分别依次加入加样孔中。将平板置于湿盒中 37℃过夜。测量比较平板上透明圈直径大小,测定样品的纤溶活性。

2 结果

2.1 表达质粒构建

以基因合成的 SAK 基因片段以进行 *Sac* I、*Xho* I 双酶切后,与载体 pET-28a 进行连接,质粒纯化后转化大肠杆菌 DH-5 α ,筛选阳性转化菌株。琼脂糖电泳结果示约在 500 bp 左右出现单一特异性条带。*Sac* I、*Xho* I 双酶切鉴定示成功构建 SAK-pET28a 表达质粒。测序结果表明与目的蛋白碱基序列相比一致。

2.2 目的蛋白质的表达与纯化

将测序正确的 SAK-pET28a 转化至大肠杆菌 B834 菌株,然后 20℃低温诱导。4℃低温离心收菌后用超声破碎,SDS-PAGE 显示目的蛋白在 B834 中大量表达。同时,低温高速离心分离上清与沉淀,SDS-PAGE 电泳结果示目的蛋白质

以可溶性蛋白的形式表达,如图 3。将破菌后的上清液通过镍柱,经 SDS-PAGE 电泳验证,低浓度咪唑梯度洗脱及高浓度咪唑洗脱均未见目的蛋白洗脱。与破菌液上清相比穿透液中目的蛋白含量未见明显变化。将通过镍柱后留取的穿透液通过 DEAE 离子交换柱,上样过程中出现明显杂蛋白峰,目的蛋白出现的洗脱峰如图 1 示。收集洗脱液,将洗脱液超滤后通过分子筛,目的蛋白进一步被纯化,洗脱峰如图 3。SAK 的洗脱体积约为 73 ml,计算发现目的蛋白在溶液中的分子量为 28.96 kD(Superdex75 标定结果: $\text{Log MW} = -0.015 \cdot 4V_e + 5.586, R^2 = 0.895$),约为其理论分子量的 2 倍,显示其在溶液中以二聚体形式存在。纯化各步骤 SDS-PAGE 检测结果如图 3,结果显示目的蛋白经过两步纯化后其纯度 90% 以上。以 Bradford 法测蛋白浓度为 2.05 mg/ml。

2.3 目的蛋白体外纤溶活性测定

使用纤维蛋白平板溶圈法测定目的蛋白体外纤溶活性^[9],结果如图 4。设计尿激酶标准品为参考,稀释后其活性约 10×10^4 IU/mg。结果显示重组的 SAK 蛋白纤溶活性与尿激酶标准品相当,其活性单位约为 10×10^4 IU/mg。

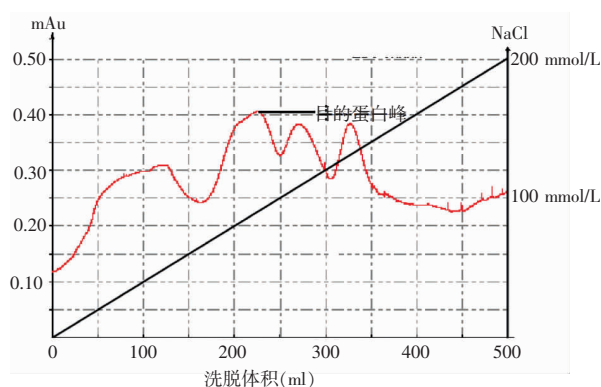
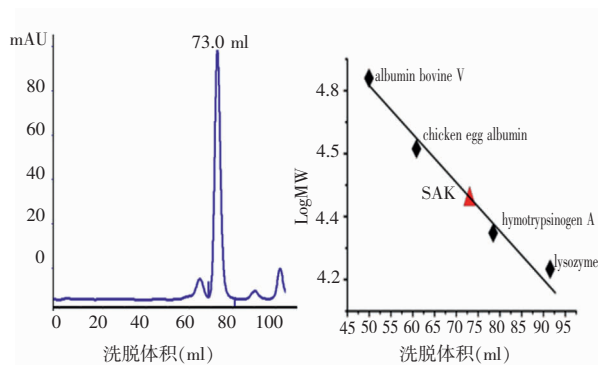


图 1 样品经 DEAE 离子交换柱纯化图

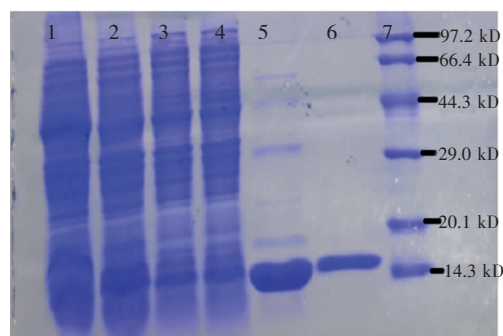
Fig.1 Purification by DEAE ion exchange column



A. Superdex 75 的洗脱图;B. Superdex75 的标定结果:albumin bovine V (66.2 kD), chicken egg albumin (44.2 kD), hymotrypsinogen A (24.5 kD) 和 lysozyme (14.4 kD)

图 2 样品经分子筛纯化图

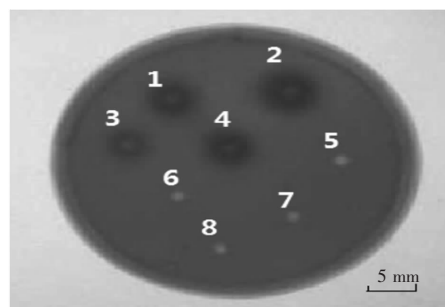
Fig.2 Purification by size exclusion chromatography



1. 未加入诱导剂 IPTG 的表达菌(对照);2. 加入 IPTG 诱导的表达菌;3. 超声破菌液上清;4. 镍柱上样后的穿透液;5. 经 DEAE 纯化样品;6. 经分子筛纯化后样品;7. 蛋白 Marker。图中所示目的蛋白约 17 kD

图 3 SAK 的表达与纯化效果图

Fig.3 Expression and purification of SAK



1、2 号孔分别为本实验所得葡激酶样品 10、20 μ l;3、4 号孔分别为稀释后尿激酶标准品 10、20 μ l;5、6 号孔为尿激酶稀释缓冲液 10、20 μ l;7、8 号孔分别为带有组氨酸标签的其他蛋白 10、20 μ l

图 4 目的蛋白体外纤溶活性结果

Fig.4 Fibrinolytic activity in vitro

3 讨论

本研究通过基因合成 SAK 基因,构建了其表达质粒 SAK-pET28a。经低温 IPTG 诱导后,SAK 成功在大肠杆菌系统中上清表达。分离纯化重组蛋白质 SAK,纤溶活性检测显示其具有很高的纤溶活性。在目的蛋白的纯化过程中,原本希望利用 pET-28a 质粒上所携带的组氨酸标签使用镍离子亲和层析柱进行纯化,但纯化结果很不理想。Yuhang Chen 等^[13]解析的 SAK 晶体结构显示,N 端 HisTag 位于二聚体界面附近,导致其不能够充分在溶液中暴露而形成了空间位阻,影响了其 HisTag 与亲和层析柱上的 Ni^{2+} 的结合,进而导致亲和层析纯化的低效率。经 ExPASy 预测,SAK 等电点为 5.17,为此利用不同蛋白质表面所带电荷的差异进行分离,应用阴离子交换层析柱进行纯化,其 NaCl 的洗脱盐浓度大约为 100 mmol/L,可以获得纯度大约为 70% 的目的蛋白质。为提高样品纯度,基于不同蛋白质在溶液中分子直径大小不同和形状

差异,应用分子筛(Superdex 75)进行深度纯化。经 SDS-PAGE 检测,本实验获得的蛋白质纯度约为 95%,可以满足后续活性检测的需要。经 Bradford 法测蛋白浓度为 2.05 mg/ml,推算出应用经过优化的表达质粒,每升 LB 培养基可以获得约 100 mg 高纯度的 SAK。与前人实验相比,本实验 SAK 蛋白质表达量有明显提高,推测与基因全合成过程中所进行的核酸序列优化有关^[5,6]。

目的蛋白质经过分子筛纯化后,结果显示,SAK 在溶液中为二聚体状态,其分子量约为 28.96 kD(约为其理论分子量 16.2 kD 的 2 倍),表明在溶液中 SAK 主要以二聚体形式存在。Yuhang Chen 等^[3]解析的 SAK 晶体结构显示存在二聚体相互作用的界面。上述实验结果表明,二聚体为 SAK 在溶液中的基本存在形式。

纤维蛋白平板溶圈法常用于测定各类溶栓药物的溶纤活性,其原理是利用 SAK 与纤溶酶原能形成分子比 1:1 的复合物,激活纤溶酶原转变为纤溶酶,从而使纤维蛋白裂解,血栓溶解。因此在纤维蛋白平板上根据溶圈直径大小,再与标准品进行比较,能够定量的得出 SAK 的活性大小。本实验获得的重组 SAK 应用体外纤维蛋白平板溶圈法实验显示其具有较高的活性(约 10×10^4 IU/mg),预示其可能具有良好的溶栓效果。临床治疗血栓过程中部分病人需要多次给药,结果发现容易诱发人体的免疫反应,导致其抗体的形成,影响了具有蛋白质水解活性的 SAK-PLm 复合物的形成,最终导致 SAK 失去了溶解血栓的功能。文献报道二聚体存在多个抗原表位,与 SAK 的免疫原性相关,如果能够减少 SAK 二聚体的形成或许能够降低其抗原性^[7]。因此如何在保障其活性的前提下减轻 SAK 在临床给药过程中的免疫应答将是今后面临的主要科学问题,也是我们下一步工作的重点。

本研究显示应用生物信息学优化基因序列并进行全基因合成获得 SAK 基因,应用大肠杆菌低温高效表达获得的 SAK 具有较高的纤溶活性。为进一步通过基于 SAK 三维结构的分子改造来降低其免疫原性并获得可望用于临床的 SAK 制剂提供了良好的研究基础。

参 考 文 献

- [1] Rosamond W, Flegal K, Friday G, et al. Heart disease and stroke statistics—2007 update: a report from the American Heart Association—Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee[J]. *Circulation*, 2007, 11(5):169–171.
- [2] Kowalski M, Brown G, Bieniasz M, et al. Cloning and expression of a new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent—a staphylokinase variant[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2009, 56(1):41–53.
- [3] Chen Y H, Song G, Jiang F, et al. Crystal structure of a staphylokinase variant[J]. *Eur. J. Biochem*, 2002, 26(9):705–711.
- [4] Jin T, Bokarewa M, Foster T, et al. Staphylococcus aureus resist human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism[J]. *Immunol*, 2004, 172(2):1169–1176.
- [5] 狄静芳, 贺进田, 谢瑞光, 等. 具有抗血小板聚集功能的新型葡激酶突变体的表达、纯化及性质[J]. *微生物学报*, 2008, 48(9):1186–1191.
- [6] 宁保安, 马 茹, 郑玉玲, 等. RGD-葡激酶突变体(K130T, K135R)的制备与活性分析[J]. *生物工程学报*, 2005, 21(3):456–460.
- [7] Chen H S, Mo W, Su H B, et al. Characterization of a novel bifunctional mutant of staphylokinase with platelet-targeted thrombolysis and antiplatelet aggregation activities[J/OL]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/8/88>. 2007–10–7.
- [8] Doctor B P, Camp S, Gentry M K, et al. Antigenic and structural differences in the catalytic subunits of the molecular forms of acetylcholinesterase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80(18):5767–5771.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》

欢迎赐稿、订阅

网址: cyxb.alljournals.ac.cn

邮发代号: 78–132