

重组人组织型纤溶酶原激活剂(rht-PA)及其突变体的纯化

朱恒奇*, 徐秀英, 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

摘要 稳定高效表达重组人组织型纤溶酶原激活剂(rht-PA)的CHO细胞株和表达组合突变体的细胞株进行了3L转瓶培养.将培养上清分别进行了Lys-Sepharose 4B亲和层析和Zn²⁺-Sepharose 4B层析两步纯化,rht-PA纯度提高了534倍,比活达2.5×10⁵ IU/mg,产率为73%;突变体纯度提高了1119倍,比活达5.9×10⁵ IU/mg,产率为69%.纯化产物SDS-PAGE分析显示,rht-PA和突变体基本都呈单一条带,扫描分析均达到98%以上纯度.rht-PA和突变体在纯化系统中的行为作对照分析发现,突变体的构建思想在Lys-Sepharose 4B亲和层析过程中有充分体现.这两步层析组合是很好的纯化t-PA及其突变体的方法,尤其是Lys-Sepharose 4B纯化突变体效果更好.

关键词 组织型纤溶酶原激活剂,突变体,纯化

中图分类号 Q814.1;Q51

Purification of Recombinant Human Tissue-type Plasminogen Activator (rht-PA) and Its Mutant

ZHU Heng-qi*, XU Xiu-ying, HUANG Pei-tang

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

Abstract The CHO-rht-PA engineering cell strain 4B-3 and its mutant F-48 were cultured in the 3 L roller bottles with 10% serum Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM). rht-PA and its mutants were purified by Lys-Sepharose 4B and zinc chelate-Sepharose 4B affinity chromatography respectively, from the cell culture supernatants after 24 hours incubation. The rht-PA product had a specific activity of about 2.5×10⁵ IU/mg protein with an overall activity recovery of 73%. The specific activity of purified mutant was 5.9×10⁵ IU/mg protein with an overall activity recovery of 69%. The purified products showed either a single peak or a single band by chromatography and SDS-PAGE. The purity was over 98% measured by UV absorption method.

Key words recombinant human tissue-type plasminogen activator (rht-PA), mutant, purification

组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)在体内发挥溶栓作用,同时具有迅速被体内抑制剂(PAF1)抑制、半衰期短和易引起系统性纤溶等局限性.近年来t-PA突变体的研究非常活跃,已获得一些多种性能优越的突变体^[1,2].本研究室构建了稳定高效表达的重组t-PA和突变体Q42N/H44E/N117Q/N184Q/del(296~302)^[3].在非纯化系统中的生物学特性初步研究证明,突变体的半衰期被延长,获得了PAF1的抗性而不影响其溶栓特异性.t-PA的纯化主要采用特异性或非特异性亲和层析技术,从细胞上清中纯化t-PA主要采用的方法有肝素-Sepharose 4B加单抗亲和层析再加凝胶过滤,Concanavaline-Sepharose 4B或Lys-Sepharose 4B加肝素-Sepharose 4B,Zn²⁺chelate-Sepharose 4B加Lys-Sepharose 4B等.我们采用Lys-Sepharose

4B和Zn²⁺chelate-Sepharose 4B两步层析对rht-PA及其突变体Q42N/H44E/N117Q/N184Q/del(296~302)进行纯化研究,比较它们在纯化过程中的差异,在纯化系统中验证构建思想的正确性.

收稿日期:2002-03-27,接受日期:2002-05-16

国家高技术研究与发展计划项目资助(Z18-03-12)

*联系人:Tel:(010)66948832, E-mail:zhuhq6380@163.com

朱恒奇,男,1963年10月生,硕士,实验师

Received:March 27,2002; Accepted:May 16,2002

Supported by National Higher Technology and Development Program, No. Z18-03-12

* Corresponding author Tel:(010)66948832

E-mail:zhuhq6380@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

表达 rht-PA 的工程细胞株 4B-3 和表达突变体的细胞株 F-48 由本研究室构建^[3]。DMEM 培养基购自 Gibco/BRL 公司, BrCN 北京通县化工厂生产, 盐酸赖氨酸(Lys-HCl) 购自 Gibco/BRL 公司。蛋白测定试剂盒购自 Bio-Rad 公司。纤维蛋白原(富含纤溶酶原)、凝血酶购自中国生物制品及药品检定所, 标准 t-PA 为英国国家生物标准研究所提供(标准号为 86/670)。

1.2 仪器

ECONO 常压层析系统为 Bio-Rad 公司产品。Lys-Sephrose 4B 柱(2.6 cm ×40 cm) 自装。填料 Sepharose 4B(Pharmacia 产品); Zn²⁺-Sephrose 4B 柱(4.5 cm × 7.5cm) 自装, 填料为亚氨基二乙酸活化的 Sepharose 4B(Sigma 产品)。

1.3 细胞培养及表达产物收集

在 3 L 转瓶中用 10 % 小牛血清的 DMEM 培养基分别培养细胞株 4B-3 和 F-48。细胞贴壁长满后换 5 % 血清培养, 每 24 h 收集培养液作为纯化的初始材料。每瓶细胞培养液为 250 ml, 长满后每瓶细胞数约为 1.5×10^8 , 可连续培养 30 d。

1.4 表达产物的测定方法

纤溶活性采用纤维蛋白琼脂糖平板法(FAPA 法)^[4], 参照国际标准 t-PA 测定。以系列梯度的标准 t-PA 制备标准曲线, 求出 t-PA 活性。

1.5 Lys-Sephrose 4B 介质的制备^[5]

先用 BrCN 按经典的 NaOH 滴定法活化 Sepharose 4B, 然后立即用 Lys-HCl 偶联, 介质装柱(2.6 cm ×40 cm)。Lys-Sephrose 4B 经 75 mmol/L Lys-HCl 溶液洗脱后用平衡缓冲液(0.1 mol/L PBS, pH 7.4, 0.01 % Tween-80) 平衡即可使用。

1.6 Zn²⁺-Sephrose 4B 凝胶的制备及再生

经亚氨基二乙酸活化的 Sepharose 4B 装柱(4.5 cm ×7.5 cm), 用 ZnCl₂(1 g/L) 溶液过柱饱和, Zn²⁺ 将充分与连接在 Sepharose 4B 凝胶上的亚氨基二乙酸偶联, 用去离子水洗后即成 Zn²⁺-Sephrose 4B。用过的柱子用 0.05 mol/L EDTA (pH 8.0), 0.05 mol/L NH₄HCO₃ (pH 10.5) 和去离子水顺序洗柱, 再用 ZnCl₂(1 g/L) 溶液过柱饱和即可完成再生。

1.7 rht-PA 及其突变体的纯化

细胞培养上清离心(10 000 r/min, 转头 B2-SH) 后上 Lys-Sephrose 4B 柱, 流速为 100 ml/h, 上样过程中检测流出液中 t-PA 的活性, 当流出液中活性达上样液的 10 % 时停止上样。用平衡缓冲液平衡柱至基线, 再用 0 ~ 75 mmol/L Lys-HCl (溶于平衡缓冲液中) 线性梯度洗脱, 洗脱流速 100 ml/h, 洗脱液测活并收集活性峰。

Zn²⁺-Sephrose 4B 柱用平衡缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mol/L NaCl, 0.01 % Tween-80) 平衡后, 将 Lys-Sephrose 4B 柱层析收集的活性洗脱液上柱, 流速为 100 ml/h。上样完毕用平衡缓冲液平衡至基线, 用 0 ~ 50 mmol/L 咪唑线性梯度, 洗脱收集液用 FAPA 法测 t-PA 活性后收集活性峰。

1.8 蛋白质浓度测定

采用考马斯亮蓝 G250 染色法测定蛋白质含量^[6]。

1.9 t-PA 的纯度分析^[7]

采用 SDS-PAGE 法, 浓缩胶为 5 %, 分离胶为 10 %, 交联度为 2.6 %。以考马斯亮蓝 G250 染色后, 对染色带进行扫描。

2 结果

2.1 rht-PA 的纯化

rht-PA 的纯化结果总结为 Table 1。

Table 1 Purification of rht-PA from the culture medium of 4B-3 strain

	Volume/ml	Total protein/mg	Total activity/IU	Specific activity/IU mg ⁻¹	Purification factor	Yield(%)
Culture Medium	2500	5250	249 ×10 ⁴	473.8	1	100
Lys-Sephrose 4B	320	30.5	198 ×10 ⁴	6.5 ×10 ⁴	137	79
Zn ²⁺ -Sephrose 4B	130	7.2	182 ×10 ⁴	2.5 ×10 ⁵	534	73

4B-3 细胞株的培养液作为纯化的起始原料, t-PA 活性为 995 IU/ml, 总蛋白浓度为 2.1 mg/ml。柱体积为 200 ml(2.6 cm ×40 cm) 的 Lys-Sephrose 4B 凝胶可上样 2 500 ml(249 ×10⁴ IU), 此时在流出液中测出

10 % 上样液活性。用 0 ~ 75 mmol/L 的 Lys-HCl 600 ml 线性梯度洗脱, 共收集 50 管(10 ml/管) 洗脱液, 层析图谱见 Fig. 1。测活发现, 15 ~ 20 管高蛋白吸收峰为杂蛋白, t-PA 活性从 22 管开始出现, 主要弥散在

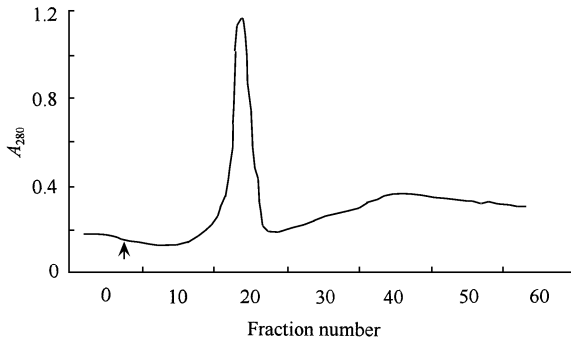


Fig. 1 Elution profile of rht-PA expressed in 4B-3 strain on Lys-Sepharose 4B column

An arrow indicates the start of gradient elution.

15th ~ 20th tube (10 ml/tube) showed a high protein peak.

The activity of t-PA emerged from 22nd tube to 45th tube.

24 ~ 45 管中, t-PA 的活性主要集中在 30 ~ 56 mmol/L Lys-HCl 洗脱梯度之中. 收集 22 ~ 53 管共 320 ml 活性洗脱液上 Zn^{2+} -Sepharose 4B 柱进一步纯化. 上柱后测流出液中 t-PA 的活性, 发现活性完全为柱吸附. 用平衡缓冲液洗柱后, 用 0 ~ 50 mmol/L 咪唑

600 ml 线性梯度洗脱, 收集 60 管 (5 ml/管) 洗脱液. 测活发现, 活性峰为 25 ~ 51 管与蛋白峰吻合, 比活值达 2.5×10^5 IU/ml. 层析图谱见 Fig. 2, 两步总回收率高达 73 %.

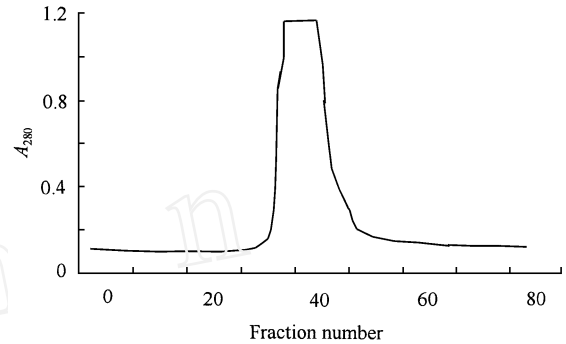


Fig. 2 Elution profile of rht-PA on Zn^{2+} -Sepharose 4B column
25th ~ 52nd tube showed a protein peak

2.2 rht-PA 突变体 Q42N/H44E/N117Q/N184Q/del (296 ~ 302) 的纯化

纯化结果总结为 Table 2.

Table 2 Purification of rht-PA mutant from the culture medium of F48 strain

	Volume/ml	Total protein/mg	Total activity/IU	Specific activity/IU mg^{-1}	Purification factor	Yield (%)
Culture medium	8130	12195	643×10^4	527	1	100
Lys-Sepharose 4B	120	27.5	495×10^4	1.8×10^5	341	77
Zn^{2+} -Sepharose 4B	70	7.6	446×10^4	5.9×10^5	1119	69

F-48 细胞株的培养上清 t-PA 活性为 791 IU/ml, 总蛋白浓度为 1.5 mg/ml. 纯化过程与结果与 2.1 基本类似, 层析图谱见 Fig. 3 和 Fig. 4. 但有如下不同:

突变体的比活值达 5.9×10^5 IU/mg, 是 rht-PA (2.5×10^5 IU/mg) 的 2.4 倍, 这可能系因 t-PA 的 K1 及 K2

区去糖基去掉了空间位阻使 t-PA 更易与纤溶酶原接近和结合, 使 t-PA 特异活性升高所致. 本文所用的 Lys-Sepharose 4B 柱可允许突变体培养液上样 8130 ml (643×10^4 IU), 多于 rht-PA (2500 ml, 249×10^4 IU), 但纯化出的蛋白含量 (7 ~ 8 mg) 及总回收率 (约 70 %) 基本一致. 这与突变体比活性高于 rht-PA 的结果相吻合. Lys 梯度洗脱后活性峰集中在 120 ml

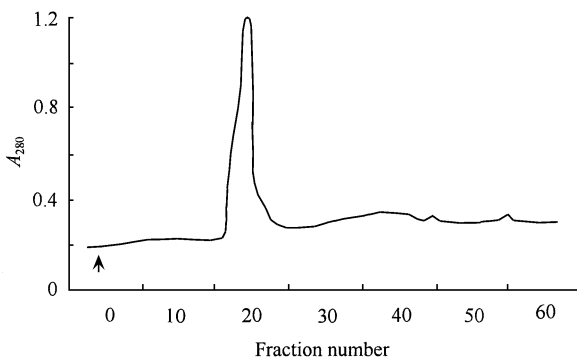


Fig. 3 Elution profile of rht-PA mutant expressed in F-48 strain on Lys-Sepharose 4B column

An arrow indicates the start of gradient elution.

17th ~ 27th tube (10 ml/tube) showed a high protein peak.

The activity of t-PA emerged from 38th tube to 54th tube.

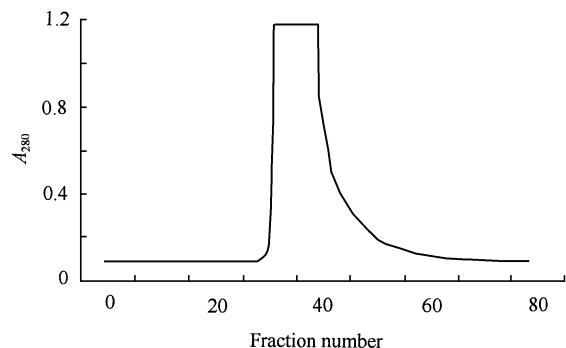


Fig. 4 Elution profile of mutant on Zn^{2+} -Sepharose 4B column
31st ~ 45th tube showed a protein peak

洗脱液,而 rht-PA 却分散 320 ml 洗脱液中. 突变体活性主要出现在 46 ~ 61 mmol/L 的 Lys-HCl 洗脱梯度中,洗脱峰后移,保留时间延长了.

2.3 t-PA 的纯度分析结果

SDS-PAGE 结合考马斯亮蓝 G250 染色扫描分析纯化产物, rht-PA 和突变体基本都呈单一条带, rht-PA 的带形较宽,反映了由于糖基化程度的差异,可能有两型 t-PA 分子存在(3 个糖基化位点均糖基化的型分子及 Asn184 位无糖基化的型分子)^[8],分子量约 70 kD,见 Fig. 5;突变体分子量基本与 rht-PA 相当,不易区分分子的相对大小. 纯化产物 SDS-PAGE 扫描结果均达到 98 % 以上纯度(Fig. 6).

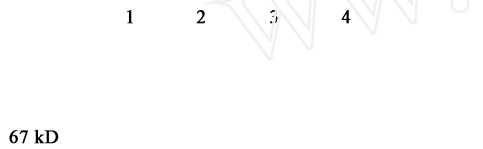


Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified products

- 1: Standard t-PA (67 kD);
2: Purified rht-PA;
3, 4: Purified mutant

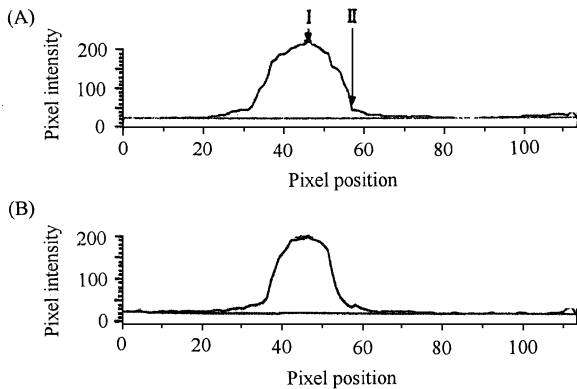


Fig. 6 Purity analysis of purified products

- (A) The purity of rht-PA is 98.5 % (Fig. 5 Lane2)
(B) The purity of mutant is 100 % (Fig. 5 Lane3)

3 讨论

由于 t-PA 的 K2 区含有 Lys 结合位点,所以 Lys-Sepharose 4B 亲和层析成为纯化 rht-PA 的较理想方法. Zn^{2+} 螯合亲和层析是非特异性的,由于起始纯化材料中杂蛋白含量高,所以纯化第一步选用的是 Lys-Sepharose 4B 亲和层析,以去除大部分杂蛋白.

由 Table 1 和 Table 2 可见,大部分杂蛋白在此步去除.

在 Lys-Sepharose 4B 层析过程中, rht-PA 的活性峰分散在 30 ~ 56 mmol/L 的 Lys-HCl 洗脱梯度之中,活性峰弥散. 可能是因为 rht-PA 的糖链糖基化程度不同,产生与 Lys 结合力不同的异型 t-PA 分子所致;而突变体活性主要出现在 46 ~ 61 mmol/L 的 Lys-HCl 洗脱梯度中,有保留时间延长,活性峰明显后移和集中的现象. Zn^{2+} 螯合层析中 rht-PA 和突变体均呈单一洗脱峰,得到进一步纯化,同时起到一定浓缩作用.

Witter 等及 Haigwood 等^[8,9] 分别证明 K₂ 区去糖基化后 t-PA 与纤维蛋白的亲合力升高,而 Lys296 ~ Gly302 的 7 个氨基酸残基的去除对 t-PA 与纤维蛋白的亲合力无明显影响^[10]. 很可能 K₁、K₂ 区去糖基化后 t-PA 更易与纤维蛋白接近而结合,表现在与纤维蛋白的亲合力升高. 纯化中在 rht-PA 的洗脱条件下(30 ~ 56 mmol/L Lys-HCl 梯度范围内)不能把突变体完全洗脱下来,因而出现突变体在柱上的保留时间延长,活性峰明显后移的现象. 我们观察到突变体活性峰出现在 46 ~ 61 mmol/L 的 Lys-HCl 梯度范围内,峰较集中. 这说明去糖基化使突变体的分子均一;同时也证明了 t-PA 突变体与固定相的结合力确实升高了. 这可能是因为 K₁、K₂ 区去糖基化去除了空间位阻的同时又引起分子三维结构的改变,导致 Lys 结合“口袋”更好暴露,使 t-PA 更易与固定相上的 Lys 配基接近而结合,表现出与固定相的结合力升高.

Haigwood 等曾在纯化系统中证实 K₁ 及 K₂ 区双糖基化位点消除的 t-PA 突变体特异活性高于野生型 t-PA (是野生型 t-PA 的 3 倍)^[9]. 我们纯化结果中突变体的比活性是 rht-PA 的 2.4 倍,两结果相吻合,可以认为特异活性的提高是 K₁ 及 K₂ 区糖基化位点去除的结果. 可能的原因如下: K₁、K₂ 去糖基化后使 t-PA 更易与纤维蛋白接近和结合. 去糖基化后可能引起 t-PA 分子三维结构轻微改变使其活性中心更易与纤溶酶原结合.

经两步层析, rht-PA 及其突变体的回收率高达 70 %. SDS-PAGE 分析显示, rht-PA 和突变体基本都呈单一条带,扫描分析均达到 98 % 以上纯度. 由于突变体 K₁ 和 K₂ 区糖基化位点被消除及缺失 K296 ~ G302 位 7 个氨基酸残基,分子量应小于 rht-PA,此情况电泳区带反映不明显. 要准确判断分子相对大小有待于将纯化产物进一步作质谱分析.

参考文献 (References)

- 1 Yamada T, Shimada Y, Kikuchi M. Integrin-specific tissue-type plasminogen activator engineered by introduction of the Arg-Gly-Asp sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **228**:306 ~ 331
- 2 Modi N B, Eppler S, Breed J, Cannon C P, Braunwald E, Love T W. Pharmacokinetics of a slower clearing tissue plasminogen activator variant, TNK-t-PA, in patients with acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 1998, **79**:134 ~ 139
- 3 刘士辉, 黄培堂, 徐秀英, 朱恒奇. 人组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 突变体的构建、表达及特性分析. 生物化学杂志 (Liu Shi-hui, Huang Pei-tang, Xu Xiu-ying, Zhu Heng-qi. Construction, expression and characterization of a combination mutant of recombinant tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Chin Biochem J*, 1995, **11**(6):625 ~ 629
- 4 韩素文, 俞炜源, 李秀珍. 细胞培养分泌的血纤维蛋白溶酶原激活物的研究. 军事医学科学院院刊 (Han Su-wen, Yu Wei-yuan, Li Xiu-zhen. Studies on plasminogen activators secreted by various cultured cells. *Bull Acad Mil Med Sci*, 1987, **11**(2):101 ~ 108
- 5 王重庆, 李云兰, 李德昌. 高级生物化学实验教程. 北京: 北京
- 6 Loffer B M, Kunze H. Refinement of the coomassie brilliant blue G assay for quantitative protein determination. *Anal Biochem*, 1989, **177**:100 ~ 102
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 Wittwer A J, Howard S C, Car L S. Effects of N-glycosylation on in vitro activity of Bows melanoma and human colon fibroblast derived tissue plasminogen activator. *Biochemistry* 1989, **28**:7662
- 9 Haigwood N L, Mullenbach G T, Moore G K, Desjardin L E. Variants of human tissue-type plasminogen activator substituted at the protease cleavage site and glycosylation sites, and truncated at the N- and C-termini. *Protein Engineering*, 1989, **2**:611
- 10 Li X-K, Lijnen H R, Nelles L, Vanhoef B, Stassen J M, Coolen D. Biochemical and biological properties of rht-PA del (K296-302), a recombinant human tissue-type plasminogen activator deletion mutant resistant to plasminogen activator inhibitor-1. *Blood*, 1992, **79**:417 ~ 423

抑制食欲的蛋白激素

科学家猜想, 身体以多条途径向脑传达过饱信息. 但是有一个研究组现在报道 20 多年前发现的 1 个蛋白激素 PYY3-36 可能是过饱信号传送到脑的基本物质. 禁食的人在餐前 2 h 接受 PYY3-36 注射后, 吃得比未注射的人少 1/3. 年轻的小鼠接受该激素每天 2 次注射, 1 星期后食欲便受抑制, 而且体重比未接受该激素注射的小鼠大大降低. 研究者将该发现及其它有关发现在 2002 年 8 月 8 日的 *Nature* 上作了报道. 他们提示, 对 PYY3-36 研究将导致出台治疗肥胖症和饮食紊乱的新方法, 因为该激素是有效的食欲抑制剂. 在许多情况下, PYY3-36 似乎是 ghrelin 的副本. ghrelin 是一种胃产生的激素, 其可传播到大脑而刺激食欲. ghrelin 在人血液中的浓度为餐前高而餐后低, 而 PYY3-36 则刚好相反. 医师们可能用 PYY3-36 或其仿制品来抑制食欲, 以取代直接阻断 ghrelin 诱导饥饿的作用. 粗略地说来, ghrelin 与 PYY3-36 效率相当. 前者提高食物摄入约为 1/3, 后者降低食物摄入也约 1/3. 20 世纪 70 年代, 科学家在猪小肠内发现 PYY3-36. 而后其他研究者发现, 每餐以后人小肠与大肠将 PYY3-36 分泌到血液中去, 其分泌量与每餐的卡路里含量成比例. 在 80 年代, 研究者将 PYY3-36 给人注射, 研究其对胃的作用, 诸如对胃酸的分泌作用. 在新的研究中, 研究者发现, PYY3-36 阻止特异性脑细胞分泌一种有效诱导食欲的化学信号. 他们也鉴定了 PYY3-36 所作用的脑细胞表面蛋白, 它是模拟 PYY3-36 的药物的有效靶子. 科学家很可能来寻找一种口服药物, 因为 PYY3-36 必须注射投药. 为了揭示 PYY3-36 该激素的所有作用, 研究者创建了缺乏 PYY3-36 的基因工程小鼠, 并指出 PYY3-36 似乎是一个消化后激素, 其关闭食欲, 延迟胃的排空, 因为足够的食物已经进入小肠, 并且因为已经吃罢而不再需要食物了, 所以胃酸分泌也抑制了. 然而, 曾经有其它公认的饱食因子轰动一时, 但都未能开发成为肥胖症的有效药物.

(李潇 摘译自 J. Travis: *Science News*, Vol. 162, Aug. 10, 2002, p.83)