

含 RGD 序列的山蛭素突变体的克隆、表达及性质研究

赵菁菁 杨江峰 茹炳根*

(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 根据 LAP (leech antihemostatic protein) 理论, 在分析山蛭素和 decorsin 结构特征的基础上, 利用重组 PCR 方法, 删除了山蛭素氨基酸序列的 33 位至 35 位, 同时分别插入了 RGDS 和来源于 decorsin 的一段 PRGDADP 序列构建成为 2 种含 RGD 序列的山蛭素突变体, 分别命名为 HRGD1 和 HRGD2. 这 2 种突变体在毕赤酵母菌株 GS115 中得到成功表达. 经过超滤、阳离子交换层析和凝胶过滤层析等纯化步骤之后, 得到纯度高于 95% 的目的蛋白. 通过以 chromozym TH 为底物的凝血酶酰胺水解实验和血小板聚集抑制实验证实了其体外生物学活性, HRGD1 和 HRGD2 抑制凝血酶的动力学常数达到 10^{-13} mol/L 水平, 抑制血小板的 IC_{50} 在 10^{-6} mol/L 水平上.

关键词 山蛭素, RGD, 凝血酶抑制剂, 抗凝剂

学科分类号 Q816

目前, 从吸血动物, 包括脊椎动物^[1]、昆虫^[2,3]和水蛭^[4]中分离出多种干扰凝血系统的分子. 其中, 水蛭是抗凝血物质的丰富来源. 墨西哥水蛭 (*Haementeria officinalis*) 和巨大水蛭 (*Haementeria ghilianii*) 的唾液具有抑制 Xa 因子的活力^[5,6]. 分离自 *Macrobdella decora* 的 decorsin 是血小板膜受体 GP II b III a 的拮抗剂, 因此具有干扰血小板聚集的功能^[7]. 来源于 *Hirudo medicinalis* 的水蛭素是目前已知凝血酶的最强抑制剂^[8].

Strube 等^[9]于 1992 年在印度陆生水蛭 *Haemadipsa sylvestris* 中, 分离出一种具有抑制凝血酶活力的 57 个氨基酸的多肽, 被称作 haemadin. Richardson 等^[10]进而研究了 haemadin 和凝血酶复合物的晶体结构, 发现尽管山蛭素与水蛭素整体结构颇为相似, 但他们与凝血酶的结合方式不尽相同: 水蛭素的 C 端结合于凝血酶的纤维蛋白原外识别位点, 而山蛭素的 C 端结合于肝素外结合位点. 由于山蛭素的结合特性, 使得它可以抑制游离的和结合态的凝血酶, 但不会抑制凝血酶活化过程中产生的中间体活力. 例如, Meizothrombin, 该中间体被认为其产生的意义在于在前凝血酶活化的过程中激活蛋白 C 通路, 发挥抗凝功能^[11].

凝血酶是一种类似胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶, 在凝血过程中发挥着重要的作用. 它可以激活因子 V 和 VIII, 后两者会诱导血小板聚集, 同时, 凝血酶将纤维蛋白原转变为纤维蛋白, 临近的纤维蛋白相

互交联形成血凝块的核心^[12]. 而凝血酶一旦与位于内皮表面的凝血酶调节蛋白结合形成复合体, 立刻变为蛋白 C 强有力的激活剂^[13], 被活化的蛋白 C 进而阻遏因子 V a 和 VIII a 的蛋白水解酶功能^[14].

血小板膜受体 GP II b III a 属于细胞黏附受体的整合素家族^[15,16], 它与纤维蛋白之间的相互作用介导血小板的聚集^[17], 血小板聚集在凝血过程中是一个非常重要的步骤. Decorsin 通过阻遏纤维蛋白原与 GP II b III a 的结合来发挥抑制血小板聚集的功能^[7], 其伸展的环状结构顶端包含一段 RGD 序列^[18], 被认为是 decorsin 与 GP II b III a 结合的关键序列, 在其他 GP II b III a 配体中同样发现该序列^[19,20].

由此可见, 在凝血发生过程中, 凝血酶活化的级联放大反应和血小板的聚集是两个关键步骤. 科研工作者们设计了很多抑制这两个步骤的分子, 来实现阻止血栓形成的目的. 拮抗 GP II b III a 分子有: GP II b III a 的单克隆抗体, 含 KGD 的环状五肽, 模仿 RGD 序列的非肽类分子^[21]. 还有一类人工合成的多肽, 它们含有抑制凝血酶活性位点的 D-Phe-Pro-Arg-Pro 序列和水蛭素的 C 端来模仿水蛭素与凝血酶的作用方式^[22].

* 通讯联系人.

Tel: 010-62751842, Fax: 010-62761842

E-mail: rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2004-07-28, 接受日期: 2004-08-30

Krezel 等^[23]在分析大量来源于水蛭抗凝分子的结构特征后, 于 1994 年提出 LAP 结构理论. 基于此, 本文讨论设计的两种含 RGD 序列的山蛭素突变体, 分别以 RGDS, PRGDADP 氨基酸序列代替山蛭素的第 33 位至第 35 位序列, 得到 HRGD1 和 HRGD2. 凝血酶酰胺水解实验和血小板聚集抑制实验证实了其确实具有抑制凝血酶和血小板聚集的活力.

1 材料和方法

1.1 材料

Top10F', GS115 毕赤酵母菌株 pPICZαA 载体, Zeocin 购自 Invitrogen 公司; PCR 反应的各种组分

GCA CTC GAG AAA AGA ATT AGA TTT GGT ATG GGT AAG GTT CCA TGT CCA GAT GGT

Xho I

GAA GTT GGT TAC ACT TGT GAT TGT GGT GAA AAG ATT TGT TTG TAC GGT CAA TCT

TGT AAC GAT GGT CAA TGT TCT GGTGAT CCA AAG CCA TCT TCC GAA TTT GAA GAG

TTT GAA ATT GAT GAA GAG GAG AAG TAA TCT AGA CTC

Xba I

按照此基因序列合成 6 段重叠的 DNA 序列 (3 段正链, 3 段反链), 将它们以终浓度 50 μmol/L 混合, 加入终浓度 6 × SSC, 60℃ 水浴保温 12 h, 然后关闭水浴使温度缓慢下降至室温. 经过无水乙醇沉淀去盐, 使用 DNA 连接酶连接之后, 再次无水乙醇沉淀去盐, 即可作为 PCR 反应的模板. 5'、3'端引物序列分别为: 5' GCACTCGAGAAAAGA ATTAGATTGG, 5' GAGTCTAGATTACTTCTCCTC-TTCATC. HRGD1 的重组引物设计为: 5' GCTATCGCCACGACAAGATTGACCGTA, 5' CGT-GGCGATAGCCAAATGTTCTGGTGATC. HRGD2 的重组引物设计为: 5' ATCTGCATCACCACGCGGA-CAAGATTGACCGTAC, 5' CGCGGTGATGCAGATCC-GCAATGTTCTGGTGATCC.

所有的 PCR 反应的引物终浓度为 20 pmol/L. 变性, 94℃, 1 min; 退火, 60℃, 1.5 min; 延伸 72℃, 1.5 min. 2% 琼脂糖电泳用于分离所有 PCR 产物, 并使用博大 DNA 纯化试剂盒纯化.

1.2.2 表达载体的构建: HRGD1、HRGD2 基因克隆至 pPICZαA 的 *Xho* I 和 *Xba* I 位点之间, 转化 TOP10F' 大肠杆菌, 在含有 25 mg/L Zeocin 的低盐固体 LB 培养基上选择转化子, *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定阳性克隆, DNA 测序验证序列的正确性.

和限制性内切酶购自 TAKARA 公司; DNA 提取和纯化试剂盒由博大公司生产; 单连寡核苷酸由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; 层析介质 (S-sepharose fast flow, Sephacryl S-100, Sephadex G-25) 均来自 A. Pharmacia 公司; α 凝血酶购自 Sigma 公司; 生色底物 chromozyme TH 购自 ROCHE 公司; 超滤设备来自 Millipore 公司, EMC630 电击仪购自 BTX 公司, 酶标仪购自 TECAN 公司, 血小板凝集仪购自上海通用机电厂.

1.2 方法

1.2.1 HRGD1 和 HRGD2 基因的获得: 首先, 依照酵母偏爱密码子设计了山蛭素的基因序列, 并在序列两端加上 *Xho* I 和 *Xba* I 的酶切位点.

1.2.3 目的蛋白在毕赤酵母 GS115 中的表达: 含有 HRGD1、HRGD2 基因的重组质粒经 *Sac*I 线性化, 电击转化 GS115. 电击条件: 电压 1 500 V, 电容 25 μF, 电阻 200 Ω. 酵母感受态的制备参照实验手册 (pPICZαA, B, and C, Catalog no. V195-20 of Invitrogen). 在含有 100 mg/L zeocin 的固体 YPDS 培养基上选择转化克隆. 高表达菌株使用 100 μg/L 至 800 μg/L zeocin 浓度梯度筛选. 在 800 μg/L zeocin 浓度下生长旺盛的菌株, 进行蛋白质表达和凝血酶滴定法鉴定其具体表达水平. GS115 的表达以 1% 终浓度甲醇诱导 4 天, 收获培养物上清.

1.2.4 凝血酶滴定法: 参照文献 [24] 定性定量测定抑制凝血酶的活力. 0.5% 纤维蛋白原 0.4 ml, 加入 100 μl 待测样品, 37℃ 水浴 10 s 后, 加入 10 μl 浓度为 1 U/μl 凝血酶开始反应, 37℃ 水浴保温 1 min 后, 观察是否凝固, 如果没有凝固, 继续加入 10 μl 凝血酶直至凝块形成, 记录加入凝血酶次数. 使用公式 (1) 计算抑制凝血酶的活力.

抑制活力 (ATU/ml) = $(n - 1) \times 100 \times N$ (1)
 n 代表加入凝血酶的次数, N 表示样品稀释倍数. 抑制凝血酶的活力单位用 ATU 来表示.

1.2.5 目的蛋白的纯化: 培养物在 1 500 g 条件下离心 10 min 得到培养物上清, 经过截留分子质量

为 3 ku 和 10 ku 的两块超滤膜脱盐和浓缩, 用 6 mol/L HCl 和 5 mol/L NaCl 分别调整溶液 pH 至 3.0, 离子强度至 7 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, S-sephorose fast flow 阳离子交换柱上样, 用缓冲液 A (50 mmol/L 甘氨酸, pH 3.0) 清洗, 0 ~ 1 mol/L NaCl 梯度洗脱, 流速 1 ml/min, 收集具有凝血酶抑制活性的峰, Sephadex G-25 脱盐得到的溶液经过 Sephacryl S-100 凝胶过滤的分离, 其中具有完全抑制活力的就是目的蛋白。

1.2.6 凝血酶酰胺水解实验测定山蛭素突变体的 K_i : 根据文献 [9] 的方法进行修改, 实验在 96 孔板中进行, 使用酶标仪在 25℃ 条件下测定数据。所有溶液都以含有 0.1 mol/L NaCl 和 1% PEG6000, pH 7.8 的 50 mmol/L Tris-HCl 溶液配制。以 Tosyl-glycyl-prolyl-arginine-4-nitranilide acetate (chromozyme TH) 作为生色底物, 终浓度分别为 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 80 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 120 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。终浓度为 3.28×10^{-5} U/ml 的凝血酶和山蛭素突变体 (终浓度为 10.35 ~ 41.41 pmol/L) 的混合物于 25℃ 温浴 5 min 后, 加入相应终浓度的底物 chromozyme TH 开始反应, 初始反应速度由 405 nm 处光吸光度的变化计算得出, 其 ε_{405} 为 $10.4 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, 表示由于底物水解释放的 4-nitraniline。反应速度对应抑制剂浓度的数据带入公式 (2), 使用非线性回归得到 K_i' 。

$$v_s = (v_0/2E_t)[[(K_i' + I_t - E_t)^2 + 4K_i'E_t]^{0.5} - (K_i' + I_t - E_t)] \quad (2)$$

v_0 是没有抑制剂时的反应速度, E_t 表示全部凝血酶的浓度, K_i' 代表表观抑制常数。在不同底物浓度下测定得到的 K_i' 带入公式 (3), 得到 K_i 。

$$K_i' = K_i(1 + S/K_m) \quad (3)$$

S 是全部底物的浓度, K_m 是凝血酶对该底物的米氏常数。

1.2.7 抑制血小板聚集活力的测定: 血小板聚集实验使用富血浆血小板 (PRP) 和贫血浆血小板 (PPP) 进行测定。其制备方法如下: 抽取 50 ml 人的全血, 献血者必须在两周内没有服用任何治疗血栓的药物, 加入 1/9 体积的 3.8% 柠檬酸钠, 在 25℃ 160 g 离心 10 min 获得 PRP, 剩余上清部分在 25℃ 2 000 g 离心 25 min 获得 PPP。对 PRP 计数并用 PPP 将其稀释到 200 000/ μL 。在 280 μL PRP 中加入 3 ~ 18 μL 山蛭素突变体溶液, 并用磷酸盐缓冲液补平至 300 μL 。首先在血小板凝集仪中 37℃ 温浴 5 min, 然后加入终浓度 8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ADP 启动血

小板聚集。测定的最大聚集率表示血小板聚集的抑制程度。以抑制剂浓度对应最大聚集率线性回归作图, 确定其抑制血小板聚集的 IC_{50} 。PPP 和天然山蛭素作为阴性对照。

2 结 果

2.1 HRGD1 和 HRGD2 基因的获得

为了提高目的蛋白在毕赤酵母中的表达量, 我们将山蛭素的蛋白质序列根据酵母偏爱密码子设计为 DNA 序列。为了节约 DNA 合成的费用, 将整条序列分割为 3 段, 加上负链 3 段, 一共 6 段。6 个片段的退火温度是根据 DNAclub 软件预测的, 最终确定在 60℃。6 × SSC 是高浓度盐溶液, 它有助于互补的寡核苷酸链相互黏连。经过 12 h 退火处理, 只要微量的片段彼此相互黏连成为完整的片段。因此, 我们使用 PCR 将微量的完整片段扩增, 用以满足后续工作的需要。而重组 PCR 的方法更加方便地将插入序列替换山蛭素基因的原有序列。

2.2 表达载体的构建

在筛选阳性克隆的时候, 由于山蛭素突变体基因内部没有合适的酶切位点, 所以我们选择了基因两端的 *Xho*I 和 *Hind*III 进行双酶切鉴定。如果为插入片段的阳性质粒, 双酶切会产生大约 1.3 kb 的 DNA 片段, 如果是没有插入片段的阴性质粒, 会产生大约 1.1 kb 的 DNA 片段 (图 1)。DNA 测序证明 HRGD1, HRGD2 突变体构建正确 (图 2, 图 3)。

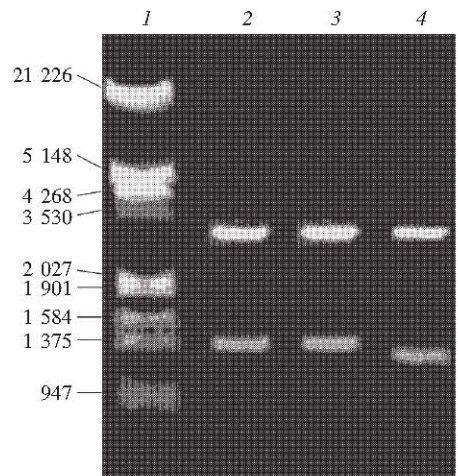


Fig. 1 The electrophoresis result of double-enzyme digestion with *Xho* I and *Hind* III

The fragments were separated by using 1% agarose gel. 1: DNA molecular mass standard; 2: pPicZ α A vector with HRGD1 gene inserted digested with *Xho* I and *Hind* III; 3: pPicZ α A vector with HRGD2 gene inserted digested with *Xho* I and *Hind* III; 4: pPicZ α A vector digested with *Xho* I and *Hind* III.

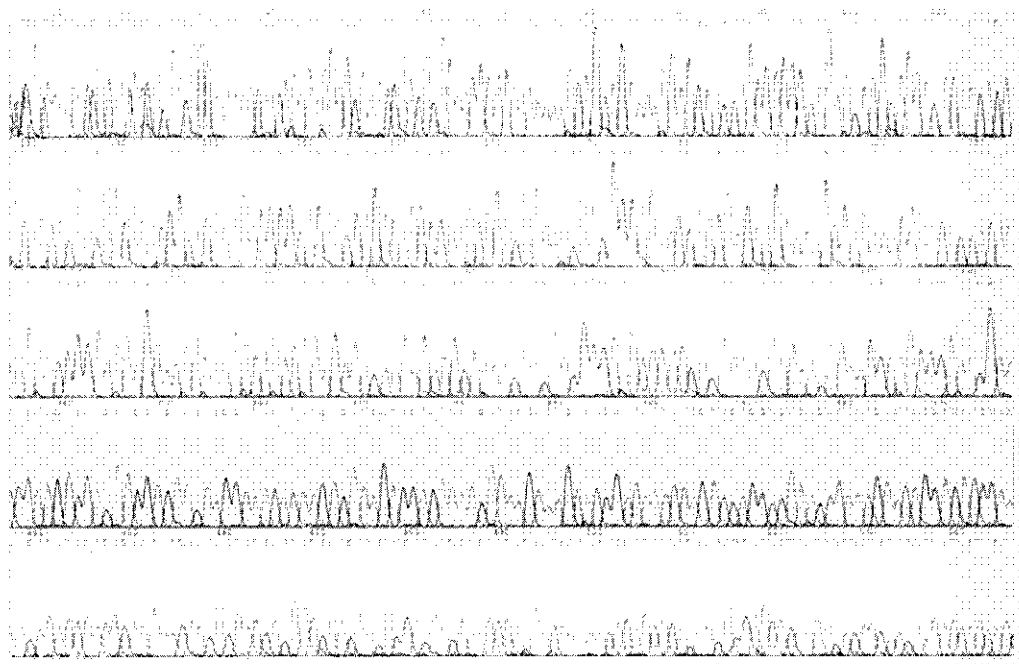


Fig. 2 DNA sequence of pPICZαA-HRGD1

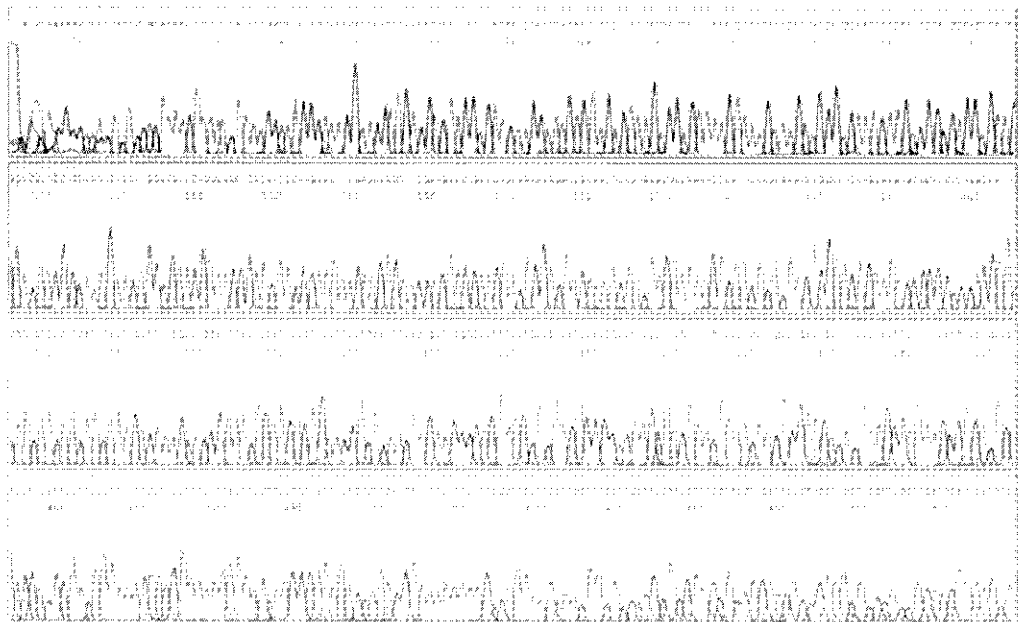


Fig. 3 DNA sequence of pPICZαA-HRGD2

2.3 目的蛋白在毕赤酵母 **GS115** 中的表达

pPicZαA 在多克隆位点上游有一段信号肽序列，该序列会引导目的蛋白穿越酵母细胞膜进入培养基，还有助于增加目的蛋白正确折叠的可能性。

信号肽在引导蛋白质跨膜之后，即被细胞中的信号肽酶切掉，产生成熟的具有天然 N 端的目的蛋白（图 4）。对目的蛋白表达量的筛选，使用 Zeocin，它对细菌、真菌、植物细胞、哺乳动物细胞都具有

广泛的毒性. Zeocin 的浓度与整合进酵母染色体中的拷贝数相关, 可以间接反映目的蛋白的表达情况. 筛选到的高表达菌株表达量在 20 mg/L, 凝血

酶滴定法测定抑制凝血酶活力单位为140 U/ml, 该方法不受溶液离子强度的影响, 因此更加易于初步确定各种溶液中抑制凝血酶物质的浓度.

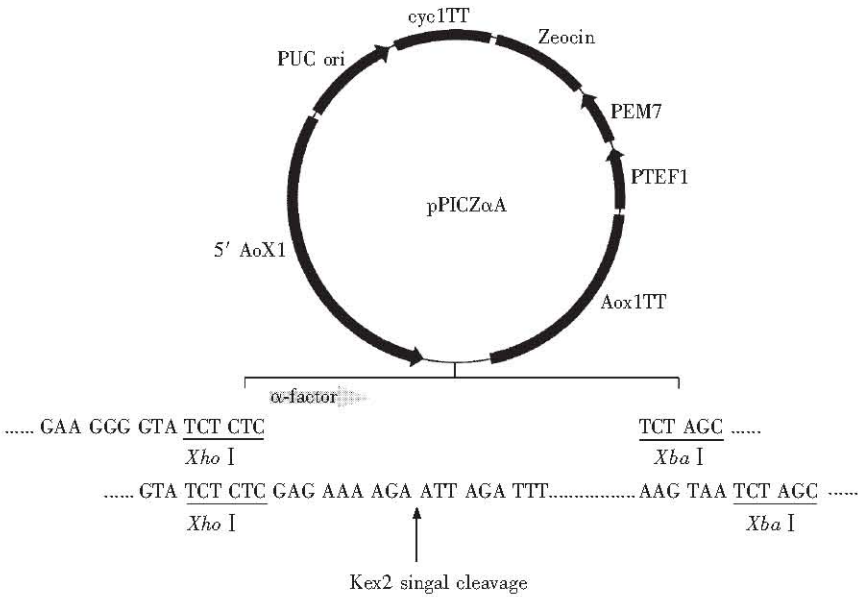


Fig. 4 Picture of construction of the expression vector

The HRGD2 gene was cloned into *Xho* I and *Xba* I sites of pPICZαA. A signal peptide, α factor will lead the target protein go through the yeast membrane and is recognized, digested by proteinase at the Kex2 signal cleavage site to generate mature protein with native N-terminal.

2.4 目的蛋白的纯化

离心收集培养上清, 进行超滤. 毕赤酵母的自身分泌蛋白大多在 30 ku 以上, 因此使用截留分子质量 10 ku 的超滤膜可以除去培养上清的大部分杂蛋白, 而截留分子质量 3 ku 的超滤膜会截流分子量 5.7 ku 的目的蛋白, 达到浓缩脱盐的目的, 使之易于后面的纯化处理. 我们选择 50 mmol/L 甘氨酸, pH 3.0 和阳离子交换层析 S-sepharose fast flow 作为第一步层析, 进一步纯化目的蛋白. 使用 0 ~ 1 mol/L NaCl 梯度洗脱, 出现的唯一洗脱峰中包含目的蛋白、色素和少量酵母的分泌蛋白, 后两者经过 Sephacryl S-100 凝胶过滤, 可以几乎完全去除, 使目的蛋白纯度达到 95% 以上. 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中, HRGD1 和 HRGD2 电泳测定分子质量比实际分子质量偏大 (图 5). 质谱测定 (图 6 和图 7) 和活性鉴定实验都证明 HRGD1、HRGD2 是以单体形式存在和发挥抑制效力, 电泳的异常行为可能是由于 HRGD1 和 HRGD2 为酸性小分子, 在 SDS-PAGE 电泳中, 分子的迁移受到本

身电荷的影响变得缓慢, 导致电泳测定分子质量偏大, 这种酸性小分子电泳异常的现象在本实验室的其他分子 (decorsin、水蛭素和 ITF) 研究中极为常见 (资料没有显示).

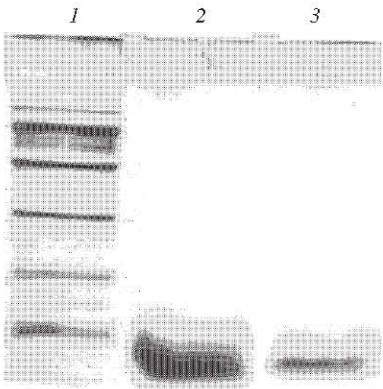


Fig. 5 SDS-PAGE of purified haemadin

Samples was prepared in ddH₂O and heated at 95°C for 5 min. The 15% gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. lane 1 is molecular mass standards (14.4 ku, 20.1 ku, 31 ku, 43 ku, 62.2 ku, 97.4 ku), lane 2 is purified HRGD2 (25 μg), lane 3 is purified HRGD1 (5 μg).

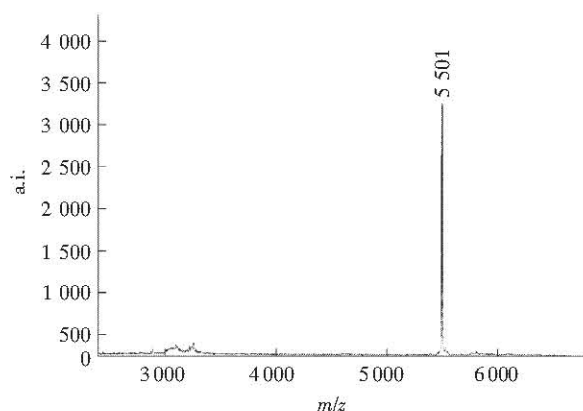


Fig. 6 The molecular mass of HRGD1 determined by mass spectrum

It is 5501D in agreement with what have been predicted.

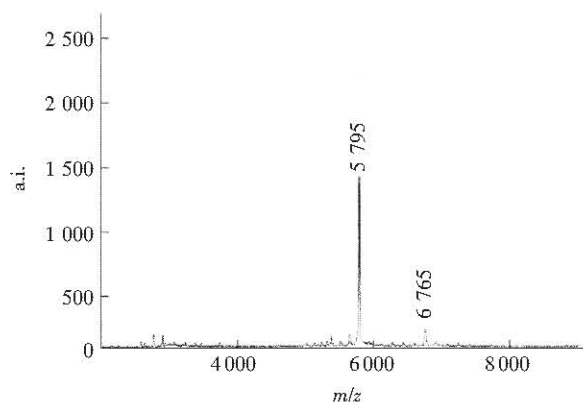


Fig. 7 The molecular mass of HRGD2 determined by mass spectrum

It is 5795D in agreement with what have been predicted.

2.5 凝血酶酰胺水解实验测定山蛭素突变体的 K_i

山蛭素是凝血酶的竞争性抑制剂。通过缓慢和紧密结合实验来确定山蛭素突变体对凝血酶的抑制常数^[9]。经计算得到 HRGD1 的 K_i 为 10.6×10^{-13} mol/L, HRGD2 的 K_i 为 9.1×10^{-13} mol/L (图8)。相比于天然山蛭素的 K_i (2.1×10^{-13} mol/L), 突变体抑制凝血酶的效率下降了 400% ~ 500%。

2.6 抑制血小板聚集活力的测定

血小板最大聚集率在一定范围内与拮抗剂的浓度成线性关系。本实验的最大聚集率为 62%, 通过拮抗剂对最大聚集率作图, 进行线性回归, 得到山蛭素突变体 (HRGD1、HRGD2) 的 IC_{50} 分别为 $55.0 \mu\text{mol/L}$ 和 $45.5 \mu\text{mol/L}$ (图9)。当天然的山

蛭素浓度在 $10 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 范围内时, 与血小板最大聚集率没有呈现任何线性关系, 可以认为, 天然的山蛭素对血小板聚集没有抑制作用, 而含有 RGD 序列的山蛭素突变体则显示出抑制血小板聚集的活力。

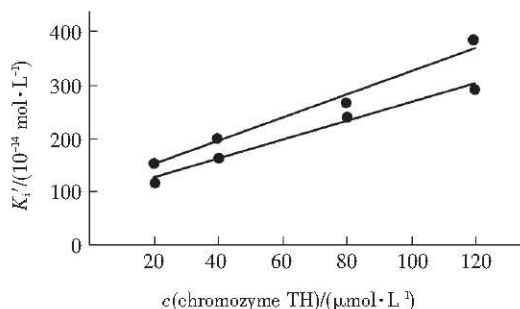


Fig. 8 A graph of K_i' against substrate concentration for HRGD2

Tight-binding assay was performed at 25°C in 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8, containing 0.1 mol/L NaCl and 1% PEG6000 with 3.28×10^{-5} U/ml thrombin, HRGD1 and HRGD2 ($10.35 \sim 41.41$ pmol/L). The data of velocity and concentration of recombinant haemadin was fitted by nonlinear regression to determine K_i' value with four substrate concentrations ($20 \mu\text{mol/L}$, $40 \mu\text{mol/L}$, $80 \mu\text{mol/L}$ and $120 \mu\text{mol/L}$). K_i' values were fitted by using linear regression to obtain K_i value.

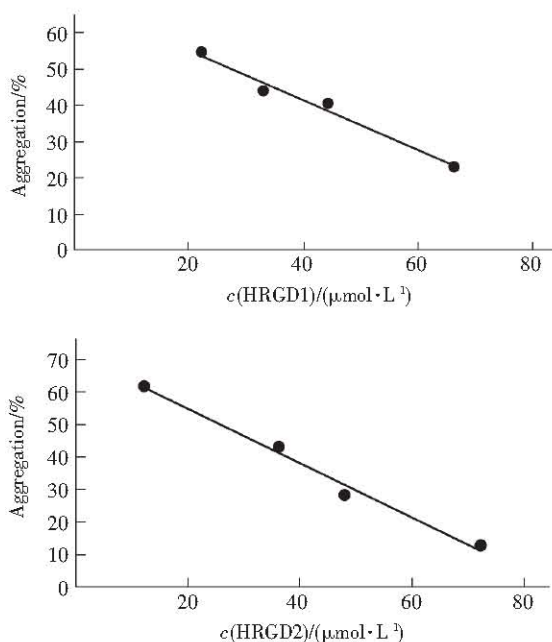


Fig. 9 Inhibition of platelet aggregation induced by ADP

Assay was performed as described in materials and method previously. The best fit of the experiment data was shown and IC_{50} was then determined.

3 讨 论

临床上对血栓类疾病治疗药物的需求促进了新型抗血栓药物研究的发展. 很多抗凝药剂, 诸如低分子质量肝素和一些凝血酶直接抑制分子都已经得到了临床上的广泛验证. 但目前还没有令人信服的证据可以证明这些新型的抗凝剂可以取代传统的抗凝剂, 比如肝素, 尽管传统抗凝剂在临床使用上仍然存在局限性^[25,26]. 所以, 新型抗栓剂仍在开发之中. 水蛭素是迄今为止已知最强的抗凝血酶专一性抑制剂之一, 其各式各样的衍生物已经通过体内试验广泛评定效力, 它们相比于肝素和低分子质量肝素, 具有一定程度的抑制血栓再生的能力^[27]. 水蛭素的 C 端与凝血酶纤维蛋白原外的结合位点结合, 而山蛭素的 C 端则与凝血酶肝素外的结合位点结合, 这种与凝血酶相互作用的不同方式赋予

了山蛭素如下特点: 可以结合游离态的和与凝血酶调节蛋白结合肽的凝血酶^[10], 而且也不影响凝血酶活化过程中产生的 *meizothrombin* 中间体, 该中间体被认为在体内具有一定的抗凝功能^[28]. 所以我们根据凝血酶和血小板聚集在凝血过程中的作用, 和来源于水蛭中抗凝分子在结构上的相似性, 选择山蛭素作为突变的模板来设计 HRGD1、HRGD2, 以期产生具有双重抗凝效果的分子.

Krezel 等^[23]在分析比较了来源于水蛭中影响凝血过程的诸多分子结构之后, 提出 LAP (leech antihemostatic protein) 理论. 这些小蛋白质无一例外都含有 6 个半胱氨酸, 按照 1~2、3~5、4~6 的顺序形成 3 对二硫键和 4 个环状结构. RGD 序列通常位于第 3 个环的顶端. 山蛭素也具有类似的结构特点 (图 10), 当它与凝血酶结合时, 第 4 个环突出在外, 并且很少与凝血酶发生作用^[10].

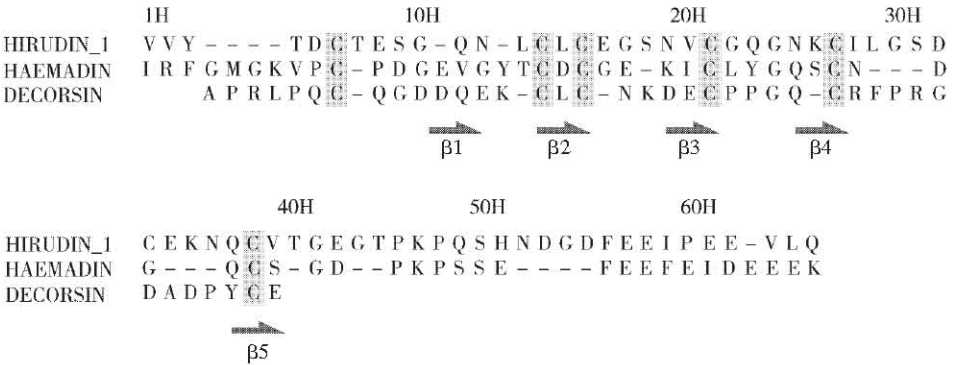


Fig. 10 A picture modified from Richardson and Krezel^[10,24] showed comparison of amino acids sequence of hirudin_1, haemadin and decorsin

The conserved cystines were boxed in yellow and red arrow indicated β-sheets.

所以, 我们删除了山蛭素第 4 个环顶端的 3 个氨基酸, 加入 RGDS 和来源于 decorsin 中的 PRGDADP 序列. 山蛭素是一种已知的小分子质量的凝血酶抑制剂^[29,30], 其抑制常数在 10^{-13} mol/L 水平上^[10].

HRGD1 和 HRGD2 抑制凝血酶的活力达到 10^{-13} mol/L 的水平, 但是相比天然的山蛭素, 突变体抑制凝血酶的能力都稍有降低. 这似乎说明插入序列正如预料的那样的确影响了山蛭素突变和凝血酶之间的相互作用. 插入的 RGD 序列则表现出应有的抑制血小板聚集的活性, HRGD2 的 RGD 序列 (PRGDADP) 来源于一种强有力的血小板抑制剂 decorsin, 经过 NMR 对其结构的研究发现, RGD

两侧的脯氨酸对于保持 RGD 序列的刚性结构具有一定作用^[23], 这更有助于保持 RGD 的构象. 这大概也可以解释 HRGD2 抑制血小板的活力要稍稍强于 HRGD1 的原因. 线性五肽 GRGDV 抑制血小板的 IC_{50} 为 $75 \mu\text{mol/L}$ ^[7], 也许能够说明山蛭素的整体结构, 对维持 RGD 构象的刚性提供结构上的支持.

HRGD1 和 HRGD2 都显示了抗血小板聚集和抑制凝血酶的活力, 所以, 目前我们正在进行 HRGD2 的体内实验来初步验证其体内活性, 以期为其作为一种新型抗栓剂在临床应用上提供一些有用的依据.

参 考 文 献

- Gardell S J, Duon L T, Diehl R E, *et al.* Isolation, characterization, and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1989, **264** (30): 17947 ~ 17952
- Waxman L, Smith D E, Arcuri K E, *et al.* GP Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*, 1990, **248** (4962): 593 ~ 596
- Jacobs J W, Cupp E W, Sardana M, *et al.* Isolation and characterization of a coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands. *Thromb Haemostasis*, 1990, **64** (2): 235 ~ 238
- Sawyer R T. Thrombolytics and anticoagulants from Leeches. *Biotechnology*, 1991, **9** (6): 513 ~ 518
- Tuszynski G P, Gasic T B, Gasic G J. Isolation and characterization of antistasin. An inhibitor of metastasis and coagulation. *J Biol Chem*, 1987, **262** (20): 9718 ~ 9723
- Condra C, Nutt E, Petroski J, *et al.* Isolation and structural characterization of a potent inhibitor of coagulation factor Xa from the leech *Haementeria ghilianii*. *Thromb Haemostasis*, 1989, **61** (3): 437 ~ 441
- Seymour J L, Henzel W J, Nevins B, *et al.* Decorsin. A potent glycoprotein II b-III a antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*. *J Biol Chem*, 1990, **265** (17): 10143 ~ 10147
- Markwardt F, Walsmann P. Reindarstellung und analyse des thrombin-inhibitors hirudin. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1967, **348** (11): 1381 ~ 1386
- Strube K H, Kroger B. Isolation, sequence analysis, and cloning of haemadin. *J Biol Chem*, 1993, **268** (12): 8590 ~ 8595
- Richardson J L, Kroger B, Hoeffken W, *et al.* Crystal structure of the human α -thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO J*, 2000, **19** (21): 5650 ~ 5660
- Margaret F D, Mann K G. Multiple active forms of thrombin. IV. Relative activities of meizothrombins. *J Biol Chem*, 1990, **265** (18): 10693 ~ 10701
- Fenton J W 2nd, Olson T A, Zabinski M P, *et al.* Anion-binding exosite of human α -thrombin and fibrin (ogen) recognition. *Biochemistry*, 1988, **27** (18): 7106 ~ 7112
- Esmen C T. Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J*, 1995, **9** (10): 946 ~ 955
- Furie B, Furie B C. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med*, 1992, **326** (12): 800 ~ 806
- Ginsberg M H, Loftus J C, Plow E F. Cytoadhesins, integrins, and platelets. *Thromb Haemost*, 1988, **59** (1): 1 ~ 6
- Hynes R O. Integrins-A family of cell-surface receptors. *Cell*, 1987, **48** (4): 549 ~ 554
- Phillips D R, Charo I F, Parise L V, *et al.* The platelet membrane glycoprotein II b/III a complex. *Blood*, 1988, **71** (4): 831 ~ 843
- Senn H, Klaus W. Determination of the disulfide bonding pattern in proteins by local and global analysis of nuclear magnetic resonance data. *J Mol Biol*, 1993, **232** (3): 907 ~ 925
- Ruoslahti E, Pierschbacher M D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 1987, **238** (4826): 491 ~ 497
- Hynes R O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 1992, **69** (1): 11 ~ 25
- Coller B S, Peerschke E I, Scudder L E, *et al.* A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets and binds to glycoproteins II b and/or III a. *J Clin Invest*, 1983, **72** (1): 325 ~ 338
- Maraganore J M, Bourdon P, Jablonski J, *et al.* Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry*, 1990, **29** (30): 7095 ~ 7101
- Krezel A M, Wagner G, Seymour-Ulmer J, *et al.* Structure of the RGD protein decorsin: conserved motif and distinct function in leech proteins that affect blood clotting. *Science*, 1994, **264** (5167): 1944 ~ 1947
- 陈华友, 邢自立, 李媛媛, 等. 凝血酶滴定法测定水蛭素活性的改进. *生物技术*, 2002, **12** (6): 24 ~ 25
- Chen H Y, Xing Z L, Li Y Y, *et al.* *Biotechnology*, 2002, **12** (6): 24 ~ 25
- Hirsh J. Heparin. *N Engl J Med*, 1991, **324** (22): 1565 ~ 1574
- Hirsh J. Oral anticoagulant drugs. *N Engl J Med*, 1991, **324** (26): 1865 ~ 1875
- Hirsh J, Weitz J. New antithrombotic agents. *The Lancet*, 1999, **353** (9162): 1431 ~ 1436
- Cote H C, Bajzar L, Stevens W K, *et al.* Functional characterization of recombinant human meizothrombin and meizo-thrombin (desF1). Thrombinmodulin-dependent activation of protein C and thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI), platelet aggregation, antithrombin-III inhibition. *J Biol Chem*, 1997, **272** (10): 6194 ~ 6200
- Electricwala A, Sawyer R T, Jones C P, *et al.* Isolation of a thrombin inhibitor from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1991, **2** (1): 83 ~ 89
- Steiner V, Knecht R, Bornsen K O, *et al.* Primary structure and function of novel O-glycosylated hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis*. *Biochemistry*, 1992, **31** (8): 2294 ~ 2298

Cloning, Expression and Identification of Bifunctional Thrombin Inhibitor HRGD2

ZHAO Jing-Jing, YANG Jiang-Feng, RU Bing-Gen *

(National Laboratory of Protein Engineering, College of Lifescience, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Two recombinants of haemadin which contain RGD amino acids sequence in its forth loop was cloned, expressed and identified on the basis of the analysis of structure and function of the haemadin and RGD sequence. The chimera genes coding for mature haemadin with inserted RGD sequence were obtained by overlapping PCR and cloned into the shuttle expression vector pPICZ α A. This process was identified by restriction endonuclease digestion and DNA sequence analysis. The recombinant plasmids were electroporated into *Pichia pastoris* strain GS115. The recombinant proteins, HRGD1 and HRGD2, were expressed and induced by methyl

alcohol, secreted into media leading by signal peptides and purified by combination of ultrafiltration, cation exchange chromatography and gel filtration chromatography. The biological activity assays approved the chimera proteins show activity not only in antithrombin but also in antiplatelet aggregation as what have been predicted.

Key words haemadin, RGD, thrombin inhibitor, anticoagulant

* Corresponding author. Tel: 86-10-62751842, Fax: 86-10-62751842, E-mail: rulab@pku.edu.cn

Received: July 28, 2004 Accepted: August 30, 2004

科学出版社生命科学编辑部新书推介 (生物减灾与防灾系列)



生物多样性公约热点研究:

外来物种入侵、生物安全、遗传资源

徐海根 王健民等 主编

7-03-013859-7/Q.1448

定价: 68.00 元

本书分三篇,共九章。第一篇介绍我国外来入侵动物、植物、微生物和海洋生物的分布、入侵途径及造成的危害;评估外来入侵物种对我国国民经济相关行业和生态系统服务功能、物种多样性、遗传资源造成的经济损失;介绍外来物种风险评估的指标体系、方法及有关案例;提出我国预防和控制外来入侵物种的对策与建议。第二篇介绍国内外转基因生物的环境释放和生产现状;分析转基因生物可能对生物多样性、生态环境和人类健康造成的不利影响;阐述世界各国对生物安全问题的态度及其深层次的社会、经济和文化背景;分析《生物安全议定书》和WTO在转基因生物贸易方面存在的共性与冲突;提出我国履行《生物安全议定书》和加强生物安全管理的对策措施。第三篇分析传统价值观和传统价值论存在的缺陷;介绍遗传资源经济价值的分类体系和评估方法,估算野生大豆等重要生物遗传资源的经济价值;揭示我国历史上和现阶段遗传资源的输出或流失情况,并以实际案例分析和总结了生物遗传资源流失的教训;系统分析国际上有关遗传资源获取与惠益分享的制度,提出我国保护与持续利用生物遗传资源的对策建议。本书可作为高等院校、科研院所专业人员及政府有关部门的决策者和管理人员的参考书,又可作为公众了解我国生物多样性保护与生物安全的通俗材料。

本系列已经出书和即将推出的图书:

生物入侵——理论与实践	徐汝梅	叶万辉	转基因植物的生物安全性	彭于发
生物入侵——数据集成、数据分析与预警		徐汝梅	重大动物疫病及其风险分析	夏红民
重要农林外来入侵物种的生物学与控制			生物安全	刘 谦
	万方浩	郑小波	郭建英	林忠平
生物入侵生态学与管理		李 博	SARS 与突发公共卫生事件应对策略	郑 力
害虫生物防治的原理与方法		庞 义	SARS 医学中的物理热学方法与应用	刘 静
森林植被防灾学	吴增志	陈东来	许中旗	吴杨哲
			传染性非典型肺炎病原学检测与诊断	康熙雄
				高 星

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。邮购地址:100717 北京东黄城根北街16号科学出版社 科学分社

联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目, 010-64012501