

重组尿激酶原的纯化和性质研究

叶建新 肖成祖 张正光

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 CHO 工程细胞 11G 持续表达的 pro-UK 分泌在细胞培养液的上清中, 培养液上清经过微孔玻璃 (MPG) 吸附色谱, 羧甲基阳离子交换色谱, 高压液相凝胶色谱三步纯化, 纯化倍数可达 700 倍以上, 总回收率为 46%。再经过 Benzamidine-Sepharose 6B 亲和层析去掉少量的双链尿激酶, 得到纯化尿激酶原。终产物经 SDS-PAGE 银染分析, 纯度达 90% 以上, 分子量为 52 ku, 其比活性为 51 220 U/mg。抗体中和、二异丙基氟磷酸 (DFP) 抑制等实验证明重组 pro-UK 的性质和天然 pro-UK 的性质相一致。

关键词 尿激酶原, 纯化, 微孔玻璃, Benzamidine-Sepharose 6B

尿激酶原 (pro-urokinase, pro-UK) 作为尿激酶 (urokinase, UK) 的前体形式, 是近年来发现的一种新型溶栓药物^[1], 其溶栓效果和尿激酶相似, 但和纤维蛋白的亲合力比尿激酶为高, 因而引起全身出血倾向的副作用要比尿激酶小。重组尿激酶原已经在多种宿主细胞中表达成功^[2~4], 本文从 CHO 工程细胞培养液上清中纯化重组尿激酶原, 最终产物的纯度在 90% 以上。这一工作为重组尿激酶原将来在临床上的应用打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

CHO 工程细胞为本所构建; 抗 UK 的单抗为本室制备; aprotinin (Sigma 公司); 焦谷氨酰甘氨酸 L-精氨酸对硝基苯胺 (S-2444, Sigma 公司); 微孔玻璃 (MPG, 浙江嵊县硅藻土研究所); 羧甲基阳离子交换色谱柱 (CM-15HR, Waters 公司); Sephacryl S-200, Benzamidine-Sepharose 6B (Pharmacia 公司)。

1.2 尿激酶原的纯化

CHO 工程细胞以 DMEM : F12 = 1 : 1 的培养基加 1% 小牛血清, 10 kU/ml aprotinin, 37℃ 培养。收集培养液上清, 过滤后, 上微孔玻璃 (MPG) 亲和柱 (每 50 ml 培养液用 1 g MPG), 用 0.1 mol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 25% 乙二醇洗脱。收集洗脱峰。透析后上

CM-15HR 柱, 用离子强度梯度洗脱, 收集活性峰。再过 Sephacryl S-200 凝胶色谱去掉杂蛋白。样品中所含的部分双链 UK 用 Benzamidine-Sepharose 6B 柱除去。

1.3 尿激酶原活性的测定

采用纤维蛋白平板法测定 (FP 活性)^[5]。以 S-2444 为底物测定溶酰胺活性^[6]。

1.4 抗体中和实验

不同稀释倍数的抗 UK 的单抗腹水分别和纯化 pro-UK 混合, 37℃ 放置 1 h, 然后测定残余活性。

1.5 DFP 抑制实验

50 U/ml 的 UK 和 pro-UK 各 60 μl 分别和 5 μl 二异丙基氟磷酸 (DFP) 混合, 37℃ 作用 10 h 后测定活性。

1.6 N 端氨基酸序列测定

按 Edman 降解法测定。

1.7 其他

蛋白浓度用改良 Lorrys 方法测定^[7], SDS-PAGE 根据 Laemmli 方法^[8], 等电聚焦电泳按文献 [9] 方法, 蛋白银染采用文献 [10] 方法。

2 结 果

2.1 pro-UK 的纯化

培养液上清经 MPG、CM 阳离子柱、

Sephacryl S-200 凝胶色谱三步纯化, 样品中 UK 相关蛋白的纯度已达 95% 以上 (非还原条件下), 但还含有部分双链的尿激酶, 用 Benzamidine-Sepharose 6B 亲和层析去掉双链的 UK 后, pro-UK 的比活性为 51 220 U/mg (最高为 72 300 U/mg), 总活性回收率为 36%, 这一纯化方法的流程及结果见表 1。

表 1 重组尿激酶原的纯化

流程	体积/ ml	活性/ U · ml ⁻¹	比活性/ U · mg ⁻¹	纯化 倍数	回收率/ %
上清	1000	203	70	1	100
MPG	40	4060	1750	25	80
CM 色谱	15	7714	35000	500	57
凝胶色谱	25	3735	52500	750	46

注: n=6.

最终样品经 SDS-PAGE 分析, 纯度为电泳一条带, 经银染扫描, 在非还原条件下, 纯度可达 95% 以上, 在还原条件下, 纯度在 90% 左右, 分子量为 52 ku, 还有极少量的分子以双链的形式存在. 电泳图谱见图 1. 经等电聚焦电泳证明, pro-UK 的等电点为 pH 8.9 左右, 和报

道的天然 pro-UK 的等电点相一致^[11].

2.2 pro-UK 的性质

不同稀释倍数的抗 UK 的腹水对纯化 pro-UK 的活性有不同的抑制作用, 高浓度的腹水对 pro-UK 的活性完全抑制; DFP 作为一种丝氨酸蛋白酶类抑制剂, 可以完全抑制 UK 的活性, 但不能抑制 pro-UK 的活性; pro-UK 作为 UK 的前体形式, 本身只有极低的溶纤酶活性, 只有当它被血纤维蛋白溶酶(plasmin)分解为双链 UK 之后, 其溶纤酶活性才表现出来; 重组 pro-UK N 端的 15 个氨基酸序列和天然 pro-UK 的 N 端序列完全一致^[12]. 天然 pro-UK: SNELHQVPSNCDCLN-, 重组 pro-UK: SNELHQVPSNCDCLN-. 以上性质和文献报道的结果完全一致.

3 讨 论

有关 pro-UK 的纯化近几年来已有不少介绍, 大部分采用的都是离子交换色谱、抗体亲和层析的方法. 用 MPG 纯化 pro-UK 的方法, 国内外尚未见报道, 我们首次将 MPG 用在 pro-UK 的纯化中, 取得了较好的效果, 尿激酶型纤溶酶原激活剂的三种形式 pro-UK、UK 以及低分子的 UK 和 MPG 均有很好的结合. 经此一步纯化, pro-UK 的比活性平均可提高 25 倍, 最高达到 50 倍, 回收率平均在 80% 以上. 而且此方法操作方便, 填料价廉易得, 结合量很大, 每克 MPG 可以结合 50 ml 粗制 pro-UK, 这些优点对大规模生产 pro-UK 无疑是十分有利的.

pro-UK 作为 UK 的前体形式, 两者的性质差别很小, 分离这两者的最经典方法是 Benzamidine-Sepharose 6B 亲和色谱, 我们在实验中发现: 这一方法可以去掉绝大部分双链的 UK, 但仍有极少部分的 UK 却无法去掉, Gurewich 等^[4]也发现了类似的现象, 他们采用只抗 pro-UK 而不抗 UK 的抗体亲和柱才解决了这一问题, 由于很难获得这种高度特异的抗体, 我们正在探索用其他方法完全去掉这些双链 UK.

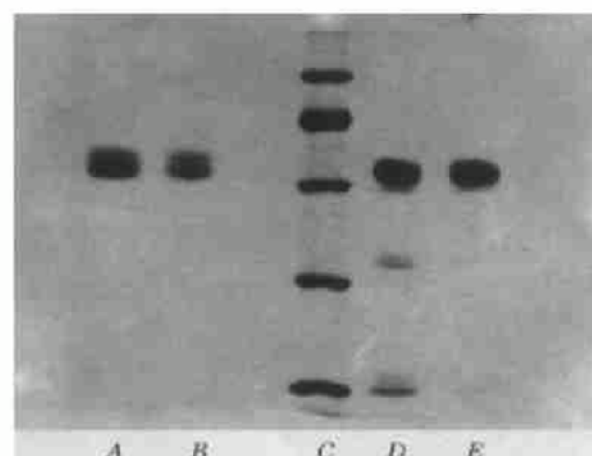


图 1 纯化 pro-UK 的 SDS-PAGE 图

A, S-200 后样品 (非还原); B, Benzamidine-Sepharose 6B 后样品 (非还原); C, 标准分子量蛋白 (94 ku, 67 ku, 43 ku, 30 ku, 17.5 ku); D, S-200 后样品 (还原); E, Benzamidine-Sepharose 6B 后样品 (还原).

参 考 文 献

- 1 Husain S S, Gurevich V, Lipinski B. Arch Biochem Biophys, 1983; 220: 31
- 2 Satoh M, Hosoi S, Miyaji H *et al.* Cytotechnology, 1993; 13: 79
- 3 Lenich C, Pannell R, Henkin J *et al.* Thromb Haemostas, 1992; 68: 539
- 4 Gurevich V, Pannell R, Broeze R J *et al.* J Clin Invest, 1988; 82: 1956
- 5 Xiao C Z, Huang Z C, Zhang Z G *et al.* Chin Med Sci J, 1994; 9: 203
- 6 Morita T, Kato H, Iwanaga S *et al.* J Biochem, 1977; 82: 1495
- 7 Hartree E F. Anal Biochem, 1972; 48: 422
- 8 Laemmli U K. Nature (Lond), 1970; 227: 680
- 9 李成文. 现代免疫化学技术, 上海: 上海科学技术出版社, 1992: 71~75
- 10 张向明. 生物化学与生物物理进展, 1983; 3: 63
- 11 史 伟, 张彩英, 黄桂秋等. 生物化学与生物物理进展, 1990; 17: 376
- 12 Kohno T, Hopper P, Lillquist J S *et al.* Bio/Technology, 1984; 2: 628

Purification and Characterization of a Recombinant Pro-urokinase. Ye Jianxin, Xiao

Chengzu, Zhang Zhengguang (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China*).

Abstract The recombinant pro-urokinase expressed in CHO cells was purified. The purification procedure was based on the following steps: micro-pore glass chromatography, CM-15HR chromatography, Sephacryl S-200 gel filtration. The yield was 46% and the purification factor was 700-fold. Small amounts of contaminating urokinase were removed by Benzamidine-Sepharose 6B affinity chromatography. Analysis by SDS-PAGE showed that the purity of pro-urokinase was 90% and the molecular weight was 52 ku. The specific activity of the purified pro-UK was 51 220 U/mg of protein. The characters of the recombinant pro-UK were consistent with that of the natural pro-UK.

Key words pro-urokinase, purification, micro-pore glass, Benzamidine-Sepharose 6B

抗 D-双聚体单抗轻链可变区基因的克隆*

官孝群 张艳玲 李 勇 丁 皓 朱运松 宋后燕

(上海医科大学基础医学院, 上海 200032)

摘要 以分泌小鼠抗人纤维蛋白降解产物 D-双聚体单克隆抗体杂交瘤细胞株的 mRNA 为模板, 用小鼠免疫球蛋白轻链可变区基因的通用引物, 通过 RT-PCR 扩增基因, 与载体重组后, 经酶切鉴定和核苷酸序列分析, 证明克隆含抗 D-双聚体单抗的轻链可变区基因, 长度为 330 bp.

关键词 抗 D-双聚体单克隆抗体, 反转录聚合酶链反应, 轻链可变区基因克隆

数十年来的临床实践证明, 溶栓治疗能显著降低急性心肌梗塞死亡率, 是心肌梗塞有效的治疗方法. 然而, 这些溶栓药物的有效程度受到诸多因素的限制, 如出血倾向、再阻塞以及溶栓滞后现象^[1]等, 要提高溶栓效率, 应改变

目前使用的溶栓药物的结构, 改进它们的药代动力学性质, 增加它们与纤维蛋白亲和和特异性

*国家“863”计划资助项目 (863-102-11-6).

收稿日期: 1995-03-14, 修回日期: 1995-09-20