

尿激酶催化结构域在毕氏酵母中的表达、纯化及结晶^{*}

赵更香 袁 彩 卞传兵 江龙光 叶晓明 黄子详 黄明东^{**}

(中国科学院福建物质结构所, 结构化学国家重点实验室, 中国科学院研究生院, 福州 350002)

摘要 利用重叠延伸 PCR 方法扩增尿激酶催化结构域的突变体基因片段, 将其克隆至表达载体 pPICZ α A 上, 转化酵母 X-33, 用 Zeocin 筛选高拷贝数的酵母菌落. 重组蛋白通过阳离子琼脂糖柱纯化, 纯度达到 99%, 该仅含尿激酶催化结构域的突变体 (C279A/N302Q), 无需激活即具有尿激酶活性. 用气相扩散法获得蛋白质晶体, 其衍射分辨率达 1.45Å.

关键词 尿激酶, *Pichia pastoris*, 纤溶酶原, 重叠延伸 PCR, 结晶

学科分类号 Q71

尿激酶型纤溶酶原激活剂 (urokinase, uPA), 简称尿激酶, 是由 411 个氨基酸组成, 分子质量约 54 ku 的丝氨酸蛋白酶, 其 N 端包含负责与受体结合的氨基端片段 (amino terminal fragment, ATF, 氨基酸 1~135), C 端包含一个含有水解催化活性的丝氨酸蛋白酶片段 (serine protease domain, 氨基酸 159~411)^[1,2]. 活性 uPA 能使纤溶酶原激活成纤溶酶, 后者能降解细胞外基质和基膜成分, 如纤维蛋白、层粘连蛋白等, 这种蛋白质降解作用最终导致肿瘤细胞发生侵袭和转移^[3~5]. 肿瘤细胞分泌的 uPA 与细胞表面的高亲和性受体 (uPAR) 特异结合形成复合物, 该复合物能通过内吞受体进入细胞内, 受体可再循环返回至细胞表面, 这种内吞效应调节 uPA 的活性和受体在细胞表面位置的变化, 同时提高了局部 uPA 浓度和纤溶酶产生的速度和含量, 以适应肿瘤细胞的侵袭和转移^[6]. 现已公认, 尿激酶抑制剂通过特异性结合 uPA, 从而抑制肿瘤侵袭和转移^[7,8]. 因此, 以 uPA 三维结构为基础的尿激酶抑制剂的设计筛选有广阔的前景和临床价值^[9~11].

目前, 国外已陆续有对尿激酶及其与小分子抑制剂或衍生物复合物结构的研究^[12,13]. 然而, 仍存在以下方面的问题: 蛋白质结晶时, 必需添加抑制剂; 易形成叠晶, 为晶体衍射造成困难; 结构中溶剂通道非常狭窄, 不易抑制剂分子的进入, 为研究

复合物内相互作用造成很大的障碍. 再者, 由于尿激酶中含有多个二硫键, 在大肠杆菌中的表达, 产物不能正确折叠, 且有不溶的包涵体形式存在, 不仅影响其可溶性, 也影响其生物活性^[14], 为研究尿激酶结构功能造成障碍. 因此, 本文采用毕氏酵母表达系统, 表达了具有活性的尿激酶催化结构域的突变体 (C279A/N302Q), 并纯化、结晶, 得到了分辨率达 1.45Å 的该突变体晶体. 尿激酶催化结构域突变体晶体的结构具有小肽分子自由出入的溶剂通道, 为从三维结构方面研究尿激酶催化结构域以及抑制剂与抑制剂的相互作用奠定了基础, 并进一步为抗肿瘤药物的筛选提供了理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

Pichia pastoris 菌株 X-33、大肠杆菌 Top10F'、pPICZ α A 质粒均购自 Invitrogen 公司; 含全长 uPA 的质粒由 University of Pennsylvania, Douglas B Cines 提供. Pfu DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司; DNA 的合成与序列测定由上海生工生物工程有限公司完成; YNB 为 Sigma 公司产品; 生物素

^{*}国家自然科学基金重点资助项目(30430190), 结构化学国家重点实验室项目(021061)和中国科学院百人计划资助项目.

^{**} 通讯联系人. Tel: 0591-83705814, E-mail: mhuang@fjirsm.ac.cn

收稿日期: 2005-11-08, 接受日期: 2005-12-31

Biotin 为日本进口; S-2444 发色底物购于 Chromogenix 实验室; 纤维蛋白购于上海生物试剂公司; 纤溶酶原购于中国药品生物制品检定所; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建. 以全长 uPA 为模板, 设计引物扩增 uPA 的 159~405 催化结构域片段, 并通过重叠延伸 PCR 突变 C279A、N302Q, 通过 *Xho* I 酶切, 连接入同样酶切的 pPICZαA 载体, 构建重组质粒。

1.2.2 转化酵母细胞及高抗性转化子的筛选. 以限制性内切酶 *Sac* I 将重组 pPICZαA 质粒线性化后, 与经处理的酵母细胞混合, 用电转仪电击, 参数为: 1 500 V, 25 μF, 200 Ω. 电击后, 经温育, 取 200 μl 菌液分别涂布于含抗生素 Zeocin 0.1 g/L、2.0 g/L 的 YPDS 平板上, 30℃温育 2~3 天, 筛选抗性强的转化子。

1.2.3 重组质粒在酵母 X-33 中的表达. 重组酵母在 5ml BMGY 中培养至 $A_{600}=3\sim5$, 离心收集菌体, 重悬于 10 ml BMMY 于 30℃诱导 96 h, 取 1 ml 培养液离心取上清, 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。

1.2.4 表达蛋白的纯化. 甲醇诱导表达的该突变体蛋白分泌到酵母细胞培养液中, 4 天后收获. 培养液离心, 取清液加 3 倍体积水稀释, 过阳离子亲和层析柱, 用 200 ml 起始缓冲液 (20 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH, pH 6.5) 洗柱后, 以洗脱缓冲液 (20 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH, 0.5 mol/L NaCl, pH 6.5) 进行洗脱, 收集洗脱峰处蛋白质, SDS-PAGE 和凝胶层析柱 Superdex75 检测洗脱峰分子质量及纯度。

1.2.5 表达蛋白的活性测定. a. 纤维蛋白-琼脂糖平板法: 纯化的蛋白质在 20 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH, pH 7.4 条件下与纤溶酶 (0.12 U/μl) 按体积比 1:1 混合, 点纤维蛋白-琼脂糖平板, 37℃温育, 培养过夜, 实验重复 5 次, 并设相应对照. b. 发色底物法: 纯化的蛋白质在 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 条件下与发色底物 S-2444 (1 g/L) 反应, 以终浓度 1 mol/L NaOAc 中止反应, 测其 A_{405} 吸收值, 实验重复 5 次, 并设相应对照。

1.2.6 表达蛋白的结晶. 纯化的蛋白质经透析钮扣脱盐, 浓缩至 10 g/L, 用 2 μl 蛋白质与等体积母液混合, 对 1 ml 母液 (1.8 mol/L 硫酸铵, 5% PEG400, 20 mmol/L 柠檬酸钠, pH 4.6) 进行平衡

扩散、结晶, 2~3 天后, 长成大小 0.35 mm × 0.35 mm × 0.5 mm 的晶体。

2 结 果

2.1 重组质粒的构建与鉴定

重组质粒抽提, 用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Eco*R V 进行酶切, 出现约 2 200 bp 和 1 800 bp 片段, 与分析结果一致, 测序结果也表明重组入表达质粒的目的基因序列与设计一致, 其中编码 279 位 Cys 的基因 TGC 突变为编码 Ala 的基因 GCC, 编码 302 位 Asn 的基因 AAT 也突变为编码 Gln 的基因 CAA。

2.2 重组质粒在酵母 X-33 细胞中的转化和高拷贝筛选

重组质粒电转入酵母 X-33, 不同浓度抗性筛选的菌株, 甲醇诱导表达, 第 4 天取样的上清经 15% SDS-PAGE 检验 (图 1), 实验结果表明: 尿激酶催化结构域突变体在酵母细胞 X-33 中得到分泌性表达, 其分子质量约 29 ku, 而且, 抗生素 Zeocin 筛选的高拷贝菌株, 表达量远大于低拷贝菌株。

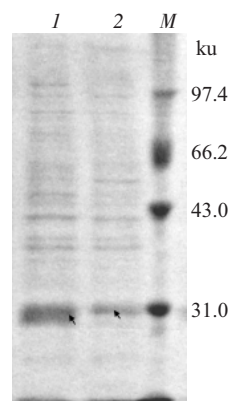


Fig. 1 15% SDS-PAGE analysis of X-33 cells culture medium induced by 0.5% methanol

M: Protein molecular mass marker; 1: Transfected *Pichia pastoris* clone selected with 2.0 g/L Zeocin; 2: Transfected *Pichia pastoris* clone selected with 0.1 g/L Zeocin (Arrows indicate urokinase catalytic domain mutant band).

2.3 表达蛋白的纯化

尿激酶是一个碱性蛋白酶, 根据这个特性, 我们采用阳离子层析柱纯化捕获分泌在培养基中的尿激酶催化结构域突变体蛋白, 收集峰处蛋白质, 上凝胶层析柱 Superdex 75 和 15% SDS-PAGE (图 2) 检测蛋白质纯度, 如图 3 所示, 出现 13.53 ml 洗脱的单一峰, 从电泳和凝胶层析柱结果中得出, 仅通过一步的离子交换, 蛋白质纯度已达到 98% 以上。

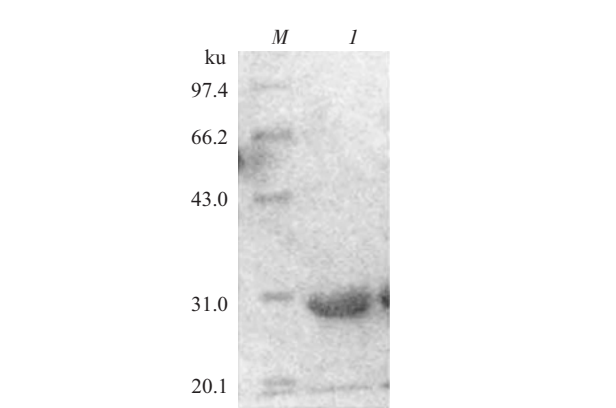


Fig. 2 15% SDS-PAGE analysis of collected protein captured from cation exchange chromatography SPFF
M: Protein molecular mass marker; I: Fragment from cation exchange chromatography SPFF.

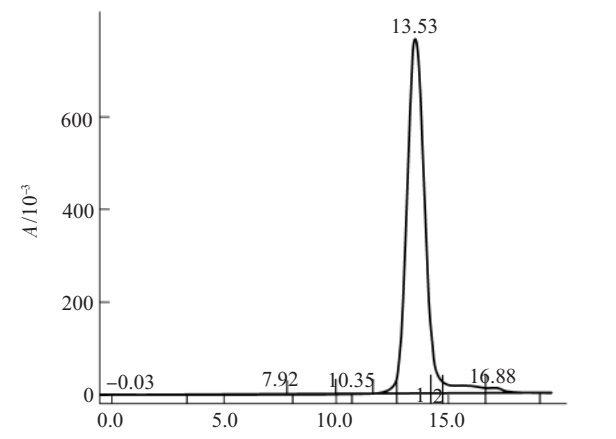


Fig. 3 Gel-filtration chromatogram analysis of uPA catalytic domain mutant captured by cation column SPFF
The eluted peak corresponds to a molecular mass of about 29 ku.

2.4 表达蛋白的活性测定

2.4.1 纤维蛋白 - 琼脂糖平板法测其纤溶活性. 活性的尿激酶催化结构域能使纤溶酶原激活成纤溶酶, 后者能降解纤维蛋白, 从而在纤维蛋白 - 琼脂糖平板上形成鲜明的透明圈. 从图 4 可以看出, 表达的尿激酶催化结构域无需激活, 就能将纤溶酶原激活.

2.4.2 发色底物 S-2444 测其活性. 表达蛋白与发色底物 S-2444 混合反应后, 溶液由无色变为黄色, 测定混合物波长 405 nm 处的吸光度, 计算其活性为 3×10^4 U/mg.

由以上两种活性测定的结果得出, 该蛋白质的两个氨基酸的突变并未影响其活性.

2.5 该突变体蛋白的结晶

用坐滴 - 水蒸气扩散法进行该突变体蛋白的结

晶, 2~3 天出现晶体, 晶体体积为 $0.35 \text{ mm} \times 0.35 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ (图 5). 该晶体经 X 射线衍射, 分辨率达 $1.45 \text{ \AA}$, 空间群确定为 R3, 单胞参数为 $a = b = 120.48 \text{ \AA}$, $c = 42.45 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90.0^\circ$, $\gamma = 120.0^\circ$.

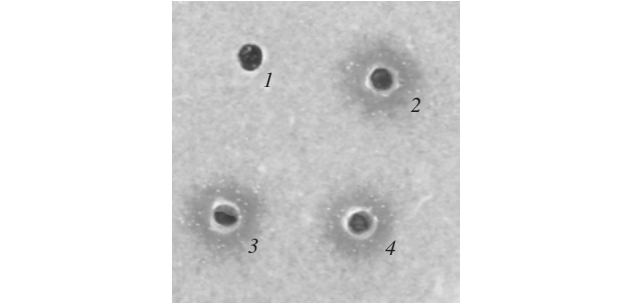


Fig. 4 Fibrin-agar plate analysis of the activity of urokinase catalytic domain mutant
1: Mixture of water with plasminogen; 2: Mixture of standard active urokinase with plasminogen; 3,4: Mixture of expressed urokinase catalytic domain mutant with plasminogen.

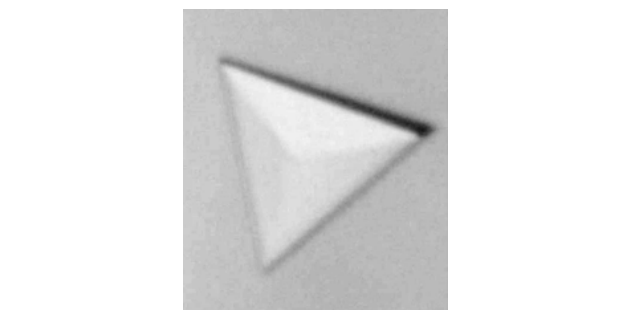


Fig. 5 The crystal of urokinase catalytic domain mutant obtained by the method of sitting-drop vapor diffusion

3 讨 论

巴斯德毕赤酵母表达系统是一类能以甲醇为唯一碳源和能量来源的酵母菌, 和其他真核、原核表达系统相比, 它具有以下独特的优点: 高表达, 高稳定, 高分泌, 表达蛋白的加工, 高密度发酵培养, 培养成本低, 产物易纯化, 糖基化程度低^[15]. 所以, 本文采用酵母表达系统表达该蛋白质. 首先, 在设计催化结构域突变体上游引物时, 在表达蛋白基因 5' 端的 *Xho* I 酶切位点之前直接引用了 Lys-Arg 两个氨基酸的基因, 它们是 *Kex2* 切割酶特异性识别的氨基酸, 因此在表达过程中, 被分泌到胞外的蛋白质是含天然 N 端的尿激酶催化结构域蛋白, 这样表达的蛋白质无需激活即有活性, 可用于尿激酶抑制剂的高通量筛选, 且表达的蛋白质均一性好, 为下一步蛋白质的纯化结晶提供良好前提.

同时, 本文采用重叠延伸 PCR 方法定点突变 Cys279Ala 与 Asn302Gln. 279 位游离半胱氨酸的存在, 是尿激酶在溶液中不稳定、容易形成聚集体的主要原因, 该位点的突变提高了蛋白质均一性. 蛋白质的糖基化往往导致蛋白质构象和电荷的多样性, 进而影响蛋白质晶体的生长或晶体的 X 射线衍射能力^[16], 将 302 位的天冬酰胺这个糖基化位点突变为谷氨酰胺, 去除了糖基化位点, 也提高了蛋白质的均一性, 为结晶蛋白质、研究结构做充分的准备条件.

本文在尿激酶催化结构域突变体蛋白在酵母 X-33 表达的同时, 为提高蛋白质的表达产量, 对其进行高拷贝筛选, 得到表达量大大提高的高拷贝菌株.

采用坐滴法得到了该突变体蛋白质晶体, 其分辨率达 1.45Å, 为本实验室结晶此蛋白质与抑制剂的复合物晶体奠定了方法基础, 为尿激酶抑制剂的设计、开发提供了一个研发平台.

参 考 文 献

- Lesuk A, Terminiello L, Traver J H. Crystalline human urokinase: some properties. *Science*, 1965, **147** (3660): 880~882
- Llinas P, Le Du M H, Gardsvoll H, *et al.* Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *Embo J*, 2005, **24** (9): 1655~1663
- Schmitt M, Janicke F, Moniwa N, *et al.* Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1992, **373** (7): 611~622
- Matsuzaki H, Kobayashi H, Yagyu T, *et al.* Reduced syndecan-1 expression stimulates heparin-binding growth factor-mediated invasion in ovarian cancer cells in a urokinase-independent mechanism. *Oncol Rep*, 2005, **14** (2): 449~457
- Mengele K, Harbeck N, Reuning U, *et al.* Tumor-associated prognostic factors of the plasminogen activator family: determination and clinical value of u-PA, t-PA, PAI-1, and PAI-2. *Hamostaseologie*, 2005, **25** (3): 301~310
- Yamamoto M, Sawaya R, Mohanam S, *et al.* Activities, localizations, and roles of serine proteases and their inhibitors in human brain tumor progression. *J Neurooncol*, 1994, **22** (2): 139~151
- Jedinak A, Maliar T. Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma*, 2005, **52** (3): 185~192
- Magdolen V, Kruger A, Sato S, *et al.* Inhibition of the tumor-associated urokinase-type plasminogen activation system: effects of high-level synthesis of soluble urokinase receptor in ovarian and breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Recent Results Cancer Res*, 2003, **162**: 43~63
- Spraggon G, Phillips C, Nowak U K, *et al.* The crystal structure of the catalytic domain of human urokinase-type plasminogen activator. *Structure*, 1995, **3** (7): 681~691
- Zeslowska E, Jacob U, Sturzebecher J, *et al.* The crystal structures of 3-TAPAP in complexes with the urokinase-type plasminogen activator and picrate. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **16** (1): 228~234
- Rockway T W, Nienaber V, Giranda V L. Inhibitors of the protease domain of urokinase-type plasminogen activator. *Curr Pharm Des*, 2002, **8** (28): 2541~2558
- Nienaber V, Wang J, Davidson D, *et al.* Re-engineering of human urokinase provides a system for structure-based drug design at high resolution and reveals a novel structural subsite. *J Biol Chem*, 2000, **275** (10): 7239~7248
- Huang M, Mazar A P, Parry G, *et al.* Crystallization of soluble urokinase receptor (suPAR) in complex with urokinase amino-terminal fragment (1~143). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2005, **61** (Pt 6): 697~700
- Liu Z G, Lin J B, Yuan X D, *et al.* The functional expression of humanized ScFv-urokinase fusion protein in *Escherichia coli*. *Chin J Biotechnology*, 2002, **18** (4): 509~511
- Yu Z H, Wang H N. Advances of expressing heterologous protein in *pichia pastoris*. *Letters in Biotechnology*, 2004, **15** (6): 614~616
- 袁 彩, 刘 钊, 黄明东. 分子生物学在蛋白质结晶中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (2): 111~115
Yuan C, Liu S, Huang M D. *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32** (2): 111~115

Expression, Purification and Crystallization of Urokinase Catalytic Domain in *Pichia pastoris**

ZHAO Geng-Xiang, YUAN Cai, BIAN Chuan-Bing, JIANG Long-Guang,
YE Xiao-Ming, HUANG Zi-Xiang, HUANG Ming-Dong**

(State Key Laboratory of Structural Chemistry, Graduate University of The Chinese Academy of Sciences,
Fujian Institute of Research on The Structure of Matter, The Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002, China)

Abstract The gene fragment of urokinase catalytic domain mutant (C279A/N302Q) was amplified by the site-mutated PCR method and was cloned into pPICZαA secretory expression plasmid. The recombinant plasmid was transformed into yeast X-33 and selected with Zeocin. The recombinant protein was captured by the cation

exchange chromatography SPFF and was purified to 99% of purity. The recombinant mutant protein was crystallized by the method of sitting-drop vapor diffusion. These crystals diffracted to 1.45 Å with synchrotron X-ray.

Key words urokinase, *Pichia pastoris*, plasminogen, site-mutated PCR, crystallization

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30430190), State Key Laboratory of Structural Chemistry (021061), Hundred Talents Project of The Chinese Academy of Sciences.

**Corresponding author . Tel: 86-591-3705814, E-mail: mhuang@fjirsm.ac.cn

Received: November 8, 2005 Accepted: December 31, 2005