

可溶性尿激酶受体的表达、纯化和结晶*

袁 彩^{1,3)} 淮 清²⁾ 卞传兵^{1,3)} 黄明东^{1)**}

¹⁾中国科学院福建物质结构研究所, 结构化学国家重点实验室, 福州 350002;

²⁾ Center for Haemostasis and Thrombosis Research, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA;

³⁾中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 克隆尿激酶受体可溶区域 (suPAR) 到果蝇胚胎细胞分泌表达载体 pMT/Bip/v5-his, 重组质粒与 pCoHygro 共转染果蝇 S2 细胞, 筛选多拷贝稳定表达细胞系 suPAR S2. suPAR 表达蛋白经尿激酶 N 端片段亲和柱、ResourceQ 阴离子交换柱两步纯化后, 得到高纯度的、稳定的 suPAR 单体. 纯化后的蛋白质, 与其抗体 ATN615 及尿激酶 N 端片段结构域等摩尔混合, 浓缩至 10 g/L, 以透析法进行该三元复合物晶体生长, 获得衍射分辨率为 1.9 Å 的蛋白质晶体.

关键词 可溶性尿激酶受体, 纯化, 复合物结晶

学科分类号 Q71

尿激酶受体 (urokinase receptor, uPAR) 又称 CD-87, 是一种高度糖基化的膜蛋白, 它以其 C 端糖基化磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定在膜上, 主要介导纤溶酶原的活化, 并与细胞迁移、细胞黏附、肿瘤生长及转移、化学趋向等过程密切相关^[1]. 不含磷脂酰肌醇锚链的可溶性尿激酶受体 (soluble urokinase receptor, suPAR) 在正常的生理条件下可以被检测到, 而在恶性肿瘤等病理条件下浓度显著增加, 因此, 抑制尿激酶-尿激酶受体的相互作用已被公认为抑制肿瘤转移的方向之一. suPAR 与尿激酶的结合常数等特征均和野生型的全长 uPAR 接近, 是研究尿激酶受体与其配体相互作用的适合对象^[2]. 工程菌中表达的 suPAR 蛋白经常出现聚集和降解等现象, 这些因素造成的蛋白质不均一^[3~5], 是难以得到 suPAR 单体的主要原因, 给 suPAR 的结构研究造成很多困难. 本文采用果蝇 S2 细胞表达系统制备了糖基化均一的 suPAR, 并发展了一种纯化方法, 得到了稳定的、适合进行蛋白质晶体生长的 suPAR 单体蛋白, 该蛋白质与其抗体 (ATN615) 及尿激酶 N 端片段 (amino terminal fragment of uPA, ATF) 复合物生长出的晶体, 分辨率达 1.9 Å, 为研究尿激酶受体与肿瘤的关系及肿瘤的药物筛选奠定重要基础.

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 *Drosophila* S2 细胞、Top10F'、质粒 pMT/Bip/v5-his、pCoHygro 均购自 Invitrogen; 含全长 uPAR 的质粒由本室保存. Pfu DNA 聚合酶购自 Stratagene; FuGENE 6 脂质体转染试剂购自 Roche 公司; Hygromycin B、果蝇细胞培养所用培养液购自 Invitrogen; DNA 的合成与序列测定由上海生工生物工程有限公司完成; AKTA-FPLC 蛋白纯化系统、溴化氰活化琼脂糖凝胶 4FF 为 Amersham Biosciences 公司产品; ATN615 抗体由 Attenuon LLC 公司提供; ATF 蛋白由本室表达、纯化. 晶体生长用透析钮扣购自 Hampton Research 公司.

1.2 方法

1.2.1 suPAR-pMT/Bip 表达载体的构建. 以全长 uPAR 为模板, 设计引物扩增 uPAR 成熟肽 1~277 可溶性区域, 通过 *Bgl* II/*Xho* I 酶切, 连接入同样酶切的 pMT/Bip/v5-his 载体, 构建载体

*国家自然科学基金重点项目(30430190).

** 通讯联系人. Tel: 0591-3704996, E-mail: mhuang@fjirsm.ac.cn

收稿日期: 2005-11-08, 接受日期: 2005-12-30

suPAR-pMT/Bip.

1.2.2 suPAR 在 S2 细胞中的表达. suPAR-pMT/Bip 与 pCoHygro 以质量比 19:1 混合, 通过 FuGENE 6 脂质体转染试剂共转染 S2 细胞. 转染 3 天后, 以终浓度 300 mg/L 的 hygromycin B 进行筛选, 每隔 4 天换液, 通过 4 周的筛选获得含多拷贝 suPAR 基因的稳定细胞系 suPAR S2. suPAR S2 细胞以无血清 S2 细胞培养液培养, 终浓度 0.5 mmol/L 的硫酸铜诱导表达, 每天取样, 上清用 8%~25% SDS-PAGE 梯度胶进行检测.

1.2.3 suPAR 的纯化.

a. 尿激酶 N 端片段 (amino terminal fragment of uPA, ATF) 亲和层析柱纯化.

ATF 亲和层析柱的制备: 称取 1 g 溴化氰活化琼脂糖凝胶 4FF 酸洗 5 次后, 加入 15 ml 离心管中, 取 40 mg ATF 用 3 ml 偶联缓冲液 (0.1 mol/L NaHCO₃, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0) 溶解, 并转移至离心管中, 调节 pH 至 8.0, 4℃ 缓慢震荡过夜. 偶联反应中止后, 用 5 倍柱体积偶联缓冲液洗去多余的 ATF, 加入阻断缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0) 孵育 2 h 以结合未反应的基团. 20 ml 冲洗缓冲液 (0.1 mol/L NaAC, 0.5 mol/L NaCl, pH 3.5) 和 20 ml 偶联缓冲液交替洗凝胶 3 次, 脱气后装柱备用.

ATF 亲和柱纯化 suPAR: 硫酸铜诱导表达的 suPAR 分泌到无血清 S2 细胞培养基中, 5 天后收获. 培养液用 1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0 调 pH 接近 8.0, 离心, 取上清液过 ATF 亲和层析柱, 用 100 ml 起始缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, pH 8.0) 洗柱后, 以洗脱缓冲液 (0.1 mol/L NaOAc, 0.5 mol/L NaCl, pH 3.5) 进行洗脱, 收集洗脱峰蛋白.

b. 阴离子交换柱 (ResourceQ) 纯化. ATF 亲和柱纯化收集的蛋白质溶液用平衡液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8) 透析后, 上 ResourceQ 阴离子交换柱, 用 70 个柱体积, 盐梯度 8%~30% 洗脱液 (20 mmol/L Tris-HCl, 1.0 mol/L NaCl, pH 8) 进行洗脱, 收集洗脱峰蛋白质, SDS-PAGE 和凝胶层析柱 Superdex75 检测各洗脱峰分子质量及存在形式.

1.2.4 suPAR 的活性及稳定性检测.

a. suPAR 的活性检测. 纯化的 suPAR 在 pH 8.0 条件下与 ATF 按摩尔比 1.1:1 混合, 凝胶层析柱 Superdex75 检测两者是否结合.

b. suPAR 的稳定性检测. ATF 柱一步纯化和

ATF 柱结合离子交换柱纯化的 suPAR 在 4℃ 放置一段时间, SDS-PAGE 检测蛋白质的稳定性.

1.2.5 suPAR-ATF-ATN615 的晶体生长和数据收集. suPAR-ATF-ATN615 复合物用离心浓缩器浓缩到 10 g/L, 用 Hampton 透析钮扣进行复合物晶体生长, 以 5 ml 结晶母液 (4% PEG4K, 5% 乙二醇, 5% 甲醇, 0.05% 叠氮化钠, 50 mmol/L 甲次砷酸钠, pH 6.5) 对 10 μl suPAR-ATF-ATN615 复合物透析, 挑取长出的晶体用 SDS-PAGE 检测, 选择合适的晶体浸泡到防冻液 (15% 甘油, 4% PEG4K, 5% 甲醇, 50 mmol/L 甲次砷酸钠, pH 6.5) 中, 液氮下冷冻, 晶体的 X 光衍射数据从 APS SER-CAT 同步辐射线收集.

2 结 果

2.1 suPAR 在 S2 细胞中的表达

suPAR-pMT/Bip 与 pCoHygro 共转染 S2 细胞, 抗菌素 hygromycin B 筛选获得稳定细胞系 suPAR S2. 稳定细胞系无血清培养液培养, 硫酸铜诱导表达, 每天取样的上清用 8%~25% 的 SDS-PAGE 梯度胶 (图 1) 检测, 结果表明 suPAR 在 S2 中得到分泌表达, 其分子质量约为 35 ku.

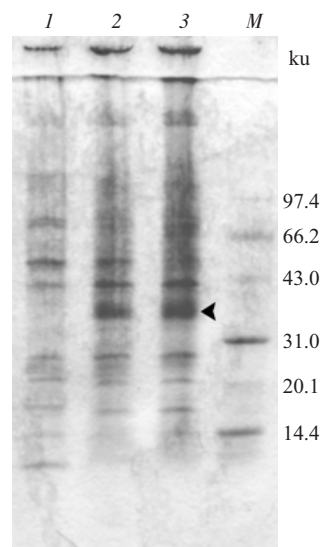


Fig. 1 SDS-PAGE of S2 cells culture medium stably transfected with suPAR-pMT/Bip vector and induced with 0.5 mmol/L CuSO₄

M: Protein molecular mass marker; 1: Untransfected S2 cell (Control); 2: Supernatant after two days induction; 3: Supernatant after four days induction (The arrow indicates the suPAR band).

2.2 suPAR 的纯化

suPAR 与其配体 (尿激酶) 有很强的结合力, 解离常数低于 nmol/L 数量级. 尿激酶的 N 端片段

(amino terminal fragment of uPA, ATF) 是受体的主要结合位点, 其对受体的结合能力与全长的尿激酶完全相同, 因此可以使用 ATF 亲和柱进行 suPAR 的纯化. 我们使用 ATF 亲和柱从 S2 细胞上清液中捕获出 suPAR 蛋白, 经 ResourceQ 阴离子交换柱进一步纯化, 在 12.91 ml、25.15 ml、30.95 ml 处出现明显的峰 (图 2), 收集各洗脱峰, SDS-PAGE

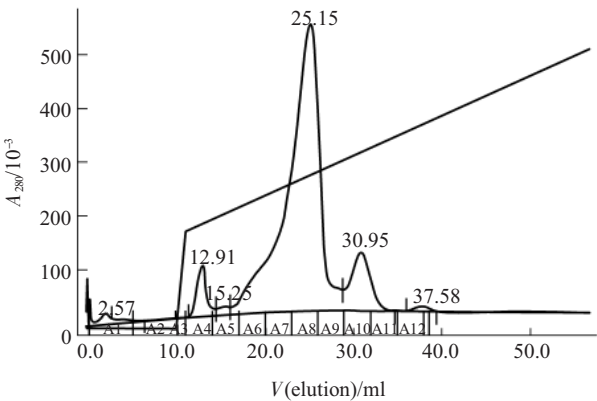


Fig. 2 suPAR captured from ATF-affinity column was further purified on an anion exchange column Resource Q

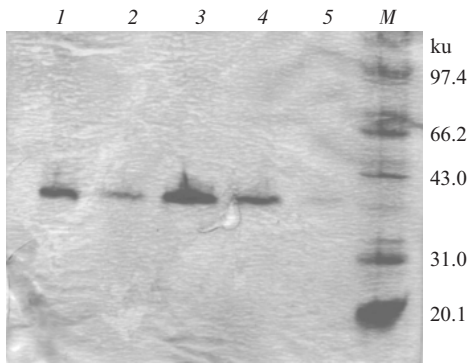


Fig. 3 SDS-PAGE of suPAR purified through Resource Q
1: Fraction from ATF-affinity column; 2~5: Fractions from Resource Q (2: 12.91ml; 3: 25.15 ml; 4: 30.95 ml; 5: 37.58 ml); M: Protein molecular mass marker.

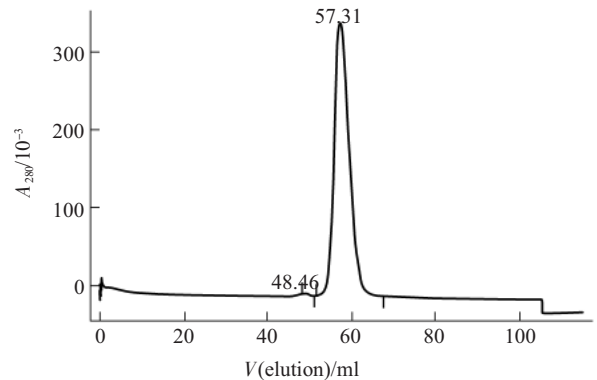


Fig. 4 Gel filtration chromatogram shows suPAR from Resource Q is monomeric

结果显示 (图 3) 各个峰的分子质量相同, 均在 35 ku 左右, 推测各个峰为 suPAR 不同存在形式. 用凝胶层析柱 Superdex75 检测分子质量, 其中 Resource Q 纯化 30.95 ml 处的洗脱峰在 57.31 ml 处出峰 (图 4), 推算其分子质量约为 35 ku, 与理论值相近, 为 suPAR 单体.

2.3 suPAR 的活性及稳定性检测

使用 Superdex 75 检测 suPAR 单体与其配体 ATF 结合情况 (图 5), 从图 5 可见, suPAR 单体可与 ATF 结合, 两者结合后出峰位置由 57.3 ml 前移至 53.6 ml 处, 表明纯化的 suPAR 具有生物学活性, 而相应的 suPAR 聚集体则不能与 ATF 结合.

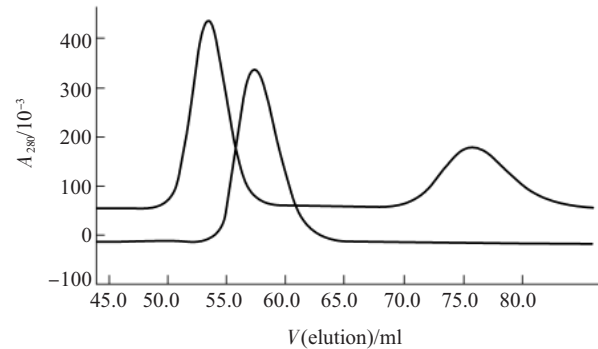


Fig. 5 Gel filtration chromatogram (superdex 75) shows that suPAR (eluted at 57.1 ml) binds with ATF (eluted at 76 ml, in excess) to form suPAR-ATF complex (eluted at 53.6 ml)

ATF 柱一步纯化和 ATF 柱结合 Resource Q 阴离子交换柱纯化的 suPAR 4℃ 条件下稳定性 SDS-PAGE 检测表明 (图 6), 亲和柱和离子交换柱结合纯化得到的蛋白质在 4℃ 条件下稳定, 而仅用亲和柱纯化得到的蛋白质出现降解.

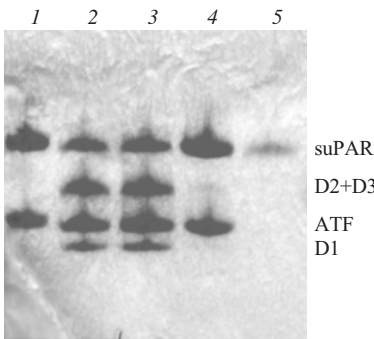


Fig. 6 Detection of the stability of suPAR after purification
1: suPAR-ATF complex (control); 2,3: suPAR-ATF in which suPAR was from ATF-column and stored in 4℃ for 1 day (lane 2) or 2 days (lane 3); 4: suPAR-ATF in which suPAR from ATF-column and Resource Q column and stored at 4℃ for a week; 5: suPAR.

2.4 suPAR-ATF-ATN615 的晶体生长和数据收集

用透析法进行复合物晶体生长, 3~7 天出现晶体, 晶体最大可达到 $(0.03 \times 0.05 \times 0.1) \text{ mm}^3$ (图 7). 对晶体进行 SDS-PAGE, 出现 3 种蛋白质分子质量相应的条带 (图 8), 表明其确实为三元复合物晶体. 用同步辐射收集数据, 分辨率达到 $1.9 \text{ \AA}$, 空间群为 $P2_1$ (表 1).

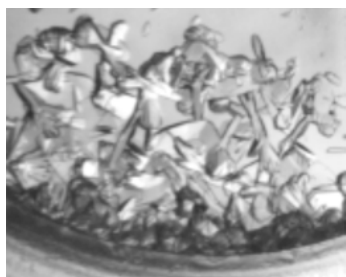


Fig. 7 suPAR-ATF-ATN615 complex forms protein crystals by microdialysis method

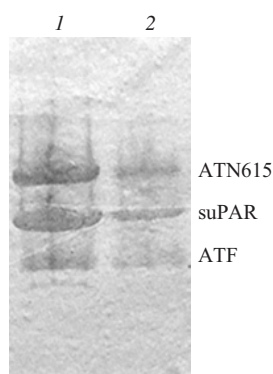


Fig. 8 SDS-PAGE shows that the crystals contain suPAR, ATF and ATN615

1: Starting complex for crystallization; 2: Washed crystals of suPAR-ATF-ATN615 complex.

Table 1 Statistics on diffraction data of suPAR-ATF-ATN615 crystals

Space group	$P2_1$
Unit cell	$51.792 \text{ \AA}, 86.805 \text{ \AA}, 124.690 \text{ \AA}, 90^\circ, 94.54^\circ, 90^\circ$
Resolution	$1.9 \text{ \AA}$
Total measurements	273 350
Unique reflections	86 852
Completeness /%	94.5 (77.5)*
Average I/σ	16.1 (1.97)*
R_{merge}	0.064 (0.338)*

*The numbers in parentheses are for the highest resolution shell.

3 讨 论

果蝇表达系统是与昆虫杆状病毒表达系统十分接近的一套表达系统, 能对蛋白质进行正确的翻译后加工, 且不存在过度糖基化, 表达产物异质性小. 同时果蝇表达系统结合了昆虫高水平表达和哺乳动物稳定表达的优点. 该系统以金属硫蛋白为启动子, 能够使重组蛋白稳定, 并短时高水平表达. 通过共转染筛选的稳定细胞系能连续扩增, 以产生高表达量的目的蛋白. 采用果蝇表达系统我们成功地表达了 suPAR, 并分泌到培养上清, 便于进一步的纯化.

在体内 suPAR 以单体和二聚体形式存在, 而在体外尤其是在高浓度条件下, 它们很容易形成多聚体. 纯化浓缩过程中容易形成聚集体, 使获得大量的 suPAR 单体尤为困难. 传统上都是采用抗体亲和柱进行 suPAR 的纯化^[6,7], 这种纯化方法并不能有效地分离 suPAR 单体和聚集体. 本文采用尿激酶 ATF 片段能与 suPAR 单体特异结合的特点^[8], 用 ATF 亲和层析柱捕获 suPAR 单体, 但是 ATF 纯化获得的 suPAR 单体很容易重新发生聚集, 且易被水解, 从分子质量推测可能是 suPAR 在结构域 1 和结构域 2 之间发生降解 (图 6). 经过进一步的离子交换, 我们获得了高纯度的 suPAR 单体, 且蛋白质的稳定性好 (图 6), 可能是 Resource Q 的进一步纯化去除了 ATF 亲和柱纯化后仍残留的蛋白酶, 这种纯化方法解决了纯化过程中 suPAR 单体、二聚体难以分离及易被水解的问题.

采用透析法我们获得 suPAR-ATF-ATN615 的三元复合物晶体, 其衍射分辨率达到 $1.9 \text{ \AA}$, 我们已将该结构成功解析出来^[9], 为研究尿激酶受体与肿瘤的关系及肿瘤的药物筛选提供了研究平台.

参 考 文 献

- 1 卞传兵, 袁 彩, 赵更香, 等. 尿激酶 / 尿激酶受体结构研究进展. 中国生物工程杂志, 2005, **25** (1): 144~147
- 2 Ploug M. Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor. Curr Pharm Des, 2003, **9** (19): 1499~1528
- 3 Bdeir K, Kuo A, Mazar A, *et al.* A region in domain II of the urokinase receptor required for urokinase binding. J Biol Chem, 2000, **275** (37):28532~28538
- 4 Tarui T, Mazar A P, Cines D B, *et al.* Urokinase-type plasminogen activator receptor (CD87) is a ligand for integrins and mediates cell-cell interaction. J Biol Chem, 2001, **276** (6):3983~3990

- 5 Gardsvoll H, Werner F, Sondergaard L, *et al.* Characterization of low-glycosylated forms of soluble human urokinase receptor expressed in *Drosophila* Schneider 2 cells after deletion of glycosylation-sites. *Protein Expr Purif*, 2004, **34** (2):284~295
- 6 Hansen L V, Gardsvoll H, Nielsen B S, *et al.* Structural analysis and tissue localization of human C4.4A: a protein homologue of the urokinase receptor. *Biochem J*, 2004, **380** (Pt 3):845~857
- 7 Ploug M, Kjalke M, Ronne E, *et al.* Localization of the disulfide bonds in the NH₂-terminal domain of the cellular receptor for human urokinase-type plasminogen activator. A domain structure belonging to a novel superfamily of glycolipid-anchored membrane proteins. *J Biol Chem*, 1993, **268** (23): 17539~17546
- 8 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
- 9 Huai Q, Mazar A, Kuo A, *et al.* Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science*, 2006, **311** (5761): 656~659

The Expression, Purification and Crystallization of Monomeric Soluble Human Urokinase Receptor^{*}

YUAN Cai^{1,3}, HUAI Qing², BIAN Chuan-Bing^{1,3}, HUANG Ming-Dong¹**

⁽¹⁾ State Key Laboratory of Structural Chemistry, Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, Fuzhou 350002, China;

⁽²⁾ Center for Haemostasis and Thrombosis Research, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA;

⁽³⁾ The Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Soluble form of human urokinase receptor was cloned into *Drosophila* Schneider 2 secretion expression vector pMT/Bip/v5-his, and co-transfected with pCoHygro into S2 cells, to establish stably S2 cells line. The expressed suPAR from such procedure tends to form oligomer and is unstable, presenting difficulties for its structural studies. Here a purification procedure that yields monomeric suPAR was reported. SuPAR obtained through such procedure is monomeric and quite stable. SuPAR complex with amino terminal fragment (ATF) of uPA and an anti-suPAR antibody (ATN615) was crystallized by dialysis method into diffracting crystals (1.9 Å).

Key words soluble human urokinase receptor, S2 cells, purification, crystallization

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30430190).

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

Received: November 8, 2005 Accepted: December 30, 2005