

PRGDWR-尿激酶原双功能嵌合分子的性质研究

党昕 杨晶鑫 茹强 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 为赋予单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 (single chain urokinase-type plasminogen activator, scur PA, 尿激酶原) 以抗血小板聚集的功能, 在 scur PA 的 kringle 区 118 位 Gly 与 119 位 Leu 之间插入 PRGDWR 序列 (insert mutant B, InB). 利用甲醇酵母 (*Pichia pastoris*) 进行分泌表达, 经金属离子螯合亲和层析与 S 强阳离子交换层析, 得到纯蛋白. 实验测定 InB 对人工合成底物 S-2444 的酰胺解活性为 5 900 IU/mg, 动力学常数为: $K_{m, S-2444}^{InB} = 56.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $k_{cat, S-2444}^{InB} = 0.33 \text{ s}^{-1}$; 水解天然底物 plasminogen 的动力学常数为: $K_{m, plg}^{InB} = 0.397 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $k_{cat, plg}^{InB} = 0.0164 \text{ s}^{-1}$. InB 激活 plasminogen 的反应在有 fibrin 存在条件下 InB 的活性为无 fibrin 条件下的 46.3%. 该突变体在体外激活 plasminogen 的活性与同一系统表达的野生型 scur PA 基本相同. 该突变体表现出较强的抗血小板聚集活性, $IC_{50} = 12.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而野生型 scur PA 无此功能. 实验表明 scur PA 的 K 区插入突变体 InB 是一种极具潜力的双功能溶栓分子.

关键词 PRGDWR 片段, 尿激酶原, 溶栓活性, 血小板聚集

学科分类号 Q781

纤溶酶原激活剂如尿激酶、组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA)、链激酶 (streptokinase, SK)、对-甲氧苯甲酰纤溶酶原与链激酶的复合物 (anisoylated plasminogen-streptokinase complex, APSAC) 等能激活纤溶酶原为纤溶酶, 纤溶酶进一步降解纤维蛋白凝块, 是一种有效的用于临床的溶栓药物. 但是现有溶栓药物都存在一定缺陷, 主要表现为出血倾向严重及使用后形成再次栓塞^[1,2]. 鉴于此, 新型溶栓剂的构建成为研究热点. 主要研究方向为导向溶栓^[3,4]和抗血小板聚集的双功能溶栓分子^[5~7].

GP IIb/ IIIa 是血小板膜上含量最丰富的受体糖蛋白, 功能是通过与配体纤维蛋白原、纤维粘联蛋白、玻粘联蛋白的 RGD 序列相互作用从而介导血小板的聚集. 而且 GP IIb/ IIIa 与纤维蛋白原的结合是形成血小板富集的红血栓的最终途径. 因此 GP IIb/ IIIa 的拮抗剂被广泛应用于心血管疾病的治疗中^[8]. 我们希望通过在 scur PA 的 kringle 区引入 RGD 序列的方法获得具有抗血小板聚集功能的双功能溶栓分子.

在本实验室已有的工作基础上^[6,7], 我们构建了突变体 PRGDWR-scur PA (InB). 重组基因经甲醇酵母 (*Pichia pastoris*) 进行分泌表达, 经金属离子螯合亲和层析与 S 强阳离子交换层析, 得到聚丙烯酰胺凝胶电泳纯度大于 95% 的纯蛋白 (以相同方法制备的相同来源的野生型 scur PA, 其酰胺解比活为

$144 \times 10^3 \text{ IU/mg}$, 大于文献所测 $120 \times 10^3 \text{ IU/mg}$ ^[9], 蛋白质纯度达到要求). 实验证实该分子为一具有抗血小板聚集活性的双功能溶栓分子.

1 材料

1.1 质粒与细胞

质粒 pBluescript SK⁺、pPIC9K, 细胞 *E. coli* DH5 α 、*Pichia pastoris* GS115 为本实验室所存.

1.2 酶与试剂

限制性内切酶、T4 连接酶、T4 DNA 聚合酶、T4 多核苷酸激酶、Deep vent DNA 聚合酶、ATP、dNTP 购自 Biolabs 公司. 尿激酶标准品购自中国药品生物制品检定所. 人工合成发色底物 S-2444 (L-pyroglytamic-glycyl-L-arginine-p-nitroaniline hydrochloride, L-EGR-p-NA), S-2251 (H-D-Valyl-leucyl-lysine-p-nitroaniline dihydrochloride, L-VLK-p-NA) 购自 Chromogenix-Instrumentation Laborator Spa (Italy). 抑肽酶 (aprotinin)、血纤维蛋白溶酶 (plasmin, plm)、纤溶酶原 (plasminogen, plg)、纤维蛋白原 (fibrinogen)、纤维蛋白 (fibrin) 购自 Sigma 公司.

1.3 仪器

酶标仪为 TECAN Rainbow Reader (Austria).

* 通讯联系人.

Tel: 010-62751842, E-mail: Rulab@pku.edu.cn

收稿日期: 2000-05-08, 接受日期: 2000-06-09

血小板聚集仪为: TYXN-91A 智能血液凝集仪, 上海通用机电技术研究所. 紫外分光光度计 UV-240 为日本岛津公司产品. JY92-II D 型 (智能化) 超声细胞粉碎机, 为宁波科器研究所产品.

2 方 法

2.1 蛋白质浓度测定

采用 Bradford 法^[10].

2.2 InB 突变体的酰胺解活性测定

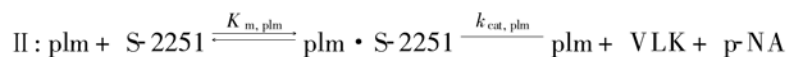
2.2.1 InB 的酰胺解比活测定: a. 尿激酶标准曲线. 分别取尿激酶标准品 0.73、1.46、2.19、2.56、2.92、3.29、3.65、4.38 IU 以 TBST ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris $\cdot$ HCl, $0.038 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.01% Tween 80, pH 7.4) 稀释至 60 μL , 加至 96 孔板中, 再加入 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ S-2444 贮液 40 μL 使 S-2444 在 100 μL 体系中的终浓度分别达到 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 混匀后于室温每隔 2 min 测定一次 405 nm 的光吸收 A_{405} , 共测 55 次. 作 $A_{405} \sim t$ 图, 斜率为以 A_{405}/min 表示的 S-2444 的水解速度 $v_{\text{S-2444}}$, 用不同尿激酶标准品单位下测得的 $v_{\text{S-2444}}$ 对尿激酶标准品单位作图即为尿激酶标准曲线; b. InB 的酰胺解比活测定. 以 Bradford 法标定蛋白质浓度. 将 InB 原液做不同稀释后每个稀释度取 30 μL , 加入 0.06 IU/ml plasmin 贮液 15 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min, 再加入 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Aprotinin 贮液 15 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 成 InB 反应液, 加至 96 孔板中, 再加入 $800 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ S-2444 贮液 40 μL 使 S-2444 在 100 μL 体系中的终浓度分别达到 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 混匀后于室温每隔 2 min 测定一次 405 nm 的光吸收 A_{405} , 共测 55 次. 作 $A_{405} \sim t$ 图,

斜率为以 A_{405}/min 表示的反应速度 $v_{\text{S-2444}}$. 依据尿激酶标准曲线计算出 InB 的酰胺解比活.

2.2.2 InB 的酰胺解动力学常数测定: a. $K_{\text{m}, \text{S-2444}}$ 的测定. 取 $48 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 InB 600 μL , 加入 0.06 IU/ml plasmin 贮液 300 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min, 再加入 $8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ aprotinin 贮液 300 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min 成 InB 反应液. 在 96 孔板中加入一定量 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ S-2444 贮液使 S-2444 在 100 μL 体系中的终浓度分别达到 320、260、220、180、140、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 若加入的 S-2444 的量不足 40 μL 则用 TBST 溶液补足至 40 μL /孔, 再加入 InB 反应液 60 μL , 混匀后于室温每隔 1 min 测定一次 405 nm 的光吸收 A_{405} , 共测 20~45 次. 作 $A_{405} \sim t$ 图, 斜率为以 A_{405}/min 表示的反应速度 $v_{\text{S-2444}}$, 再作 $v_{\text{S-2444}}$ 与 S-2444 浓度 ($[\text{S-2444}]$) 的双倒数图, 以所得直线方程的斜率除以截距可得到相应的 $K_{\text{m}, \text{S-2444}}$; b. $k_{\text{cat}, \text{S-2444}}$ 的测定. 将 S-2444 的终浓度定为 $320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使 InB 终浓度分别达到 101.8、50.9、25.6、12.7、6.4 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. InB 溶液在加入 96 孔板之前也要先后与 plasmin、aprotinin 溶液反应后, 再加入 96 孔板中. 室温下每隔 1 min 测定一次 405 nm 的光吸收 A_{405} , 测 30~45 次. 作 $A_{405} \sim t$ 图, 斜率为以 A/min 表示的 S-2444 的水解速度 $v_{\text{S-2444}}$, 根据 $v_{\text{S-2444}}$ 、 $K_{\text{m}, \text{S-2444}}$ 、 $[\text{S-2444}]$ 以及米氏公式计算出 $V_{\text{m}, \text{S-2444}}$, 以 $V_{\text{m}, \text{S-2444}}$ 对酶浓度作图, 所得直线方程的斜率为 $k_{\text{cat}, \text{S-2444}}$.

2.3 InB 激活纤溶酶原的动力学常数测定

参照我们建立的方法^[11]联合进行.



改变 plasminogen 浓度, 作 $A_{405} \sim t$ 图, 对原始数据进行多项式回归分析, 所得二次项系数为 A , 则 $v_{\text{plm}} = 2A/a$ (a 为 plasmin 水解 S-2251 反应的标准曲线经二次作图得到的常数). 作 $v_{\text{plm}} \sim [\text{plg}]$ 的双倒数图, 可得 $K_{\text{m}, \text{plg}}$. 改变 InB 浓度, 得到 v_{plm} 后, 由 v_{plm} 、 $[\text{plg}]$ 、 $K_{\text{m}, \text{plg}}$ 可得 $V_{\text{m}, \text{plg}}$, 作 $V_{\text{m}, \text{plg}} \sim [\text{InB}]$ 图, 可得 $k_{\text{cat}, \text{plg}}$.

2.4 fibrin 对 InB 水解 plasminogen 反应的影响

称取 5 mg fibrin, 加入 5 ml TBST, 超声破碎 (600 W, 工作 10 s, 间隔 10 s, 进行 200 次循环), 悬浊液经 12 000 g, 离心 5 min 后, 取上清, 测

280 nm 的光吸收, 据 $E_{280}^{1\%} = 15.0$ 计算蛋白质浓度, 以 TBST 稀释至 6 g/L. 在 90 μL 体系中加入 fibrin 悬浊液 22.5 μL (对照加入 TBST 22.5 μL , $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ S-2251 贮液 30 μL , $60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ plasminogen 溶液 15 μL , $21.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ InB 溶液 22.5 μL . 混匀后于室温下每隔 1 min 测定一次 405 nm 的光吸收 A_{405} , 共测 49 次. 作 $A_{405} \sim t$ 图, 对原始数据进行多项式回归分析, 所得二次项系数为 A , A 为 v_{plg} 的函数. Fibrin 对 InB 激活 plasminogen 反应的影响因子 $F = A_{\text{fibrin}}/A_{\text{unstimulate}}$.

2.5 InB 的抗血小板聚集实验

富血小板血浆 (PRP) 与贫血小板血浆 (PPP) 的制备及凝胶过滤洗涤血小板的方法见文献 [12]. 血小板聚集实验的方法参考文献 [13], 以 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ADP 为激活剂, 生理盐水为对照.

3 结 果

3.1 InB 突变体的酰胺解活性测定

单链形态的尿激酶型纤溶酶原激活剂对人工合成底物 S-2444 是无活性的^[9], 所以在反应之前应将单链形态的尿激酶型纤溶酶原激活剂与 plasmin 溶液保温 15 min 使之水解为双链形态. 为防止 plasmin 对 S-2444 的水解影响数据的准确性, 要在

plasmin 水解单链尿激酶型纤溶酶原激活剂反应结束后, 加入 aprotinin 溶液于 37°C 保温 5 min 以专一性抑制 plasmin 的活性.

3.1.1 尿激酶标准曲线及 InB 的酰胺解比活测定: 不同单位尿激酶 (urokinase, UK) 标准品水解 S-2444 的原始数据见图 1a, 对图 1a 中数据进行线性回归分析后得到直线方程, 斜率为以 A_{405}/min 表示的 v_{S-2444}^{UK} , 由于 v_{S-2444}^{UK} 正比于 $[\text{UK}]$ (即 UK 标准品的单位数值), 所以作 $v_{S-2444}^{\text{UK}}/[\text{UK}]$ 图 (图 1b), 对图 1b 进行线性回归分析后得到的直线方程即为尿激酶标准曲线方程: $v_{S-2444}^{\text{UK}} = 0.0014 \cdot [\text{UK}] + 0.0001$ ($R^2 = 0.9983$).

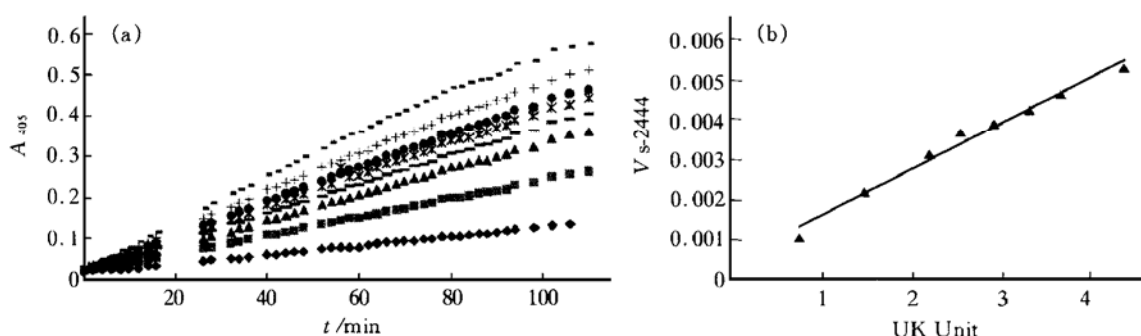


Fig.1 Standard curve of the hydrolysis reaction of S-2444 catalyzed by urokinase

(a) shows the values of A_{405} obtained at different time of the hydrolysis reaction of S-2444 catalyzed by different concentration of standard urokinase (the curves counted from the top to the bottom stand for 0.73, 1.46, 2.19, 2.56, 2.92, 3.29, 3.65, 4.38 IU of standard urokinase). (b) shows the standard curve of the hydrolysis reaction of S-2444 catalyzed by stand urokinase. The formula of the regression line in figure 1b is: $y = 0.0014x + 0.0001$ ($R^2 = 0.9983$).

将 InB 溶液分别稀释 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 倍, 测定反应速度 (原始数据见图 2, 不同稀释度下的 v_{S-2444}^{InB} 值见表 1). 取反应速度位于标准

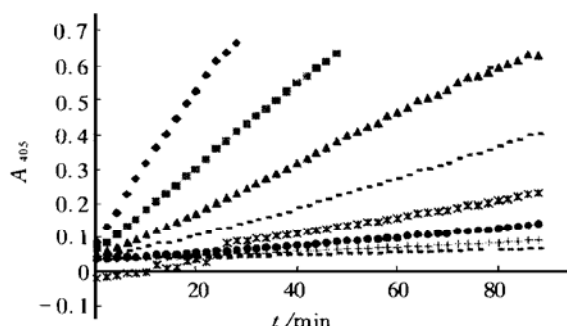


Fig.2 The values of A_{405} obtained at different time of the hydrolysis reaction of S-2444 catalyzed by different dilution of InB

The curves counted from the top to the bottom stand for the reaction catalyzed by 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 times of dilution of InB respectively.

曲线中部的 InB 的 v_{S-2444}^{InB} (0.0023), 根据标准曲线方程计算 InB 的活性 (1.57 IU). 再根据稀释度 (32 倍稀释)、InB 原液浓度 (285 mg/L) 计算出 InB 的比活为 5900 IU/mg.

Table 1 v_{S-2444} of different dilution of InB

dilution fod	2	4	8	16	32	64	128	256
v_{S-2444} ($10^{-3} A_{405}/\text{min}$)	21.2	12.2	7.1	4.2	2.3	1.3	0.7	0.3

3.1.2 InB 的酰胺解动力学常数测定: a. $K_{m, S-2444}$ 的测定. 以 3.1.1 中的方法得到 v_{S-2444} 后, 作 v_{S-2444} 与 S-2444 浓度 ($[S-2444]$) 的双倒数图 (图 3a), 以所得直线方程的斜率除以截距可得到 $K_{m, S-2444} = 56.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. b. $k_{\text{cat}, S-2444}$ 的测定. 以 3.1.1 中的方法得到 v_{S-2444} 后, 根据 v_{S-2444} 、 $K_{m, S-2444}$ 、 $[S-2444]$ 与米氏方程经计算并转换单

位后得到国际标准单位表示的 $V_{m, S-2444}$, 作 $V_{m, S-2444}$ [InB] 图 (图 3b), 所得直线方程的斜

率为 $k_{cat, S-2444} = 0.33 \text{ s}^{-1}$.

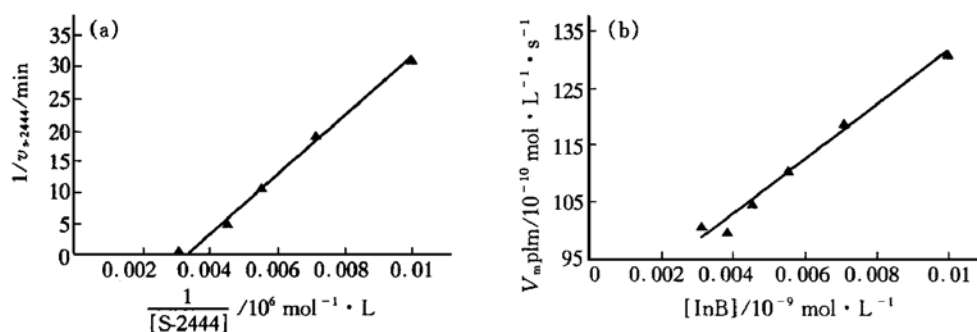


Fig. 3 Kinetic study on the reaction of hydrolysis of S-2444

(a) shows Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus [S-2444]. The formula of the regression line in Fig. 3a is $y = 4753.7x + 83.721$ ($R^2 = 0.9828$), $K_{m, S-2444} = 56.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. (b) shows the plot of $V_{m, S-2444}$ versus [InB], the slope is $k_{cat, S-2444} = 0.33 \text{ s}^{-1}$.

3.2 InB 激活纤溶酶原的动力学常数测定

v_{plg} 对 [plg] 的双倒数图见图 4a, 以斜率除以截距可得 $K_{m, plg} = 0.397 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 图 4b 为

$V_{m, plg}$ [InB] 图, 对图 4b 进行线性回归可得 $k_{cat, plg} = 0.0165 \text{ s}^{-1}$.

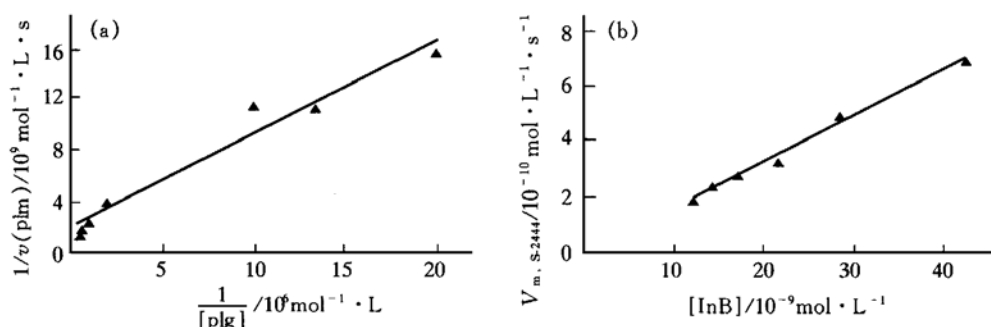


Fig. 4 Kinetic study on the activation of plasminogen by InB

(a) shows Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus [plg]. The formula of the regression line is $y = 0.735x + 1.8525$ ($R^2 = 0.9663$), and $K_{m, plg} = 0.397 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. (b) shows the plot of $V_{m, plg}$ versus [InB], the slope of the regression line is $k_{cat, plg} = 0.0165 \text{ s}^{-1}$.

3.3 Fibrin 对 InB 水解纤溶酶原的影响

Fibrin 对 InB 激活 plasminogen 的反应是一种抑制作用 (图 5, 曲线 1, 3 为未加 fibrin 的对照, 曲线 2, 4 的反应体系中存在 1.5 g/L 的 fibrin). 影响因子 $F = 0.463$.

3.4 InB 的抗血小板聚集实验

由图 6a 可看出不同浓度的 InB 对富血小板血浆有不同的抑制作用. 以抑制率对 [InB] 作图 (图 6b), 经线性回归分析得到直线方程: 抑制率 $= 1.6946 \cdot [InB] + 28.483$ ($R^2 = 0.9901$), 由该方程计算出达到 50% 抑制率的 InB 浓度 (IC_{50}) 为 $12.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

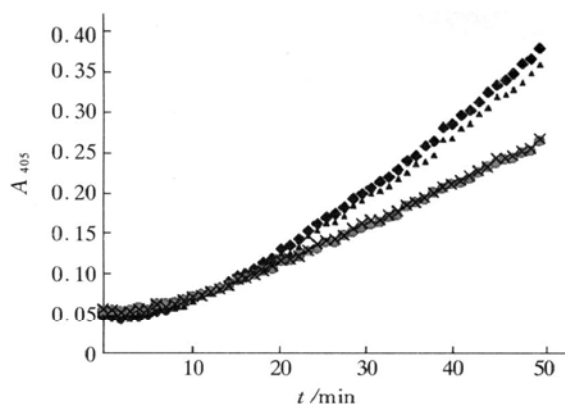


Fig. 5 Influence of fibrin on the reaction of plasminogen activated by InB

Curve 1 and 3 was the negative control without fibrin, curve 2 and 4 demonstrated that the existence of fibrin can inhibit the catalytic abilities of InB. The influence factor is $F = A_{\text{unstimulate}}/A_{\text{fibrin}} = 0.463$ (A is the coefficient of the quadratic item of the regression line). 1: $\blacklozenge$; 2: $\bigcirc$; 3: $\blacktriangle$; 4: $\times$.

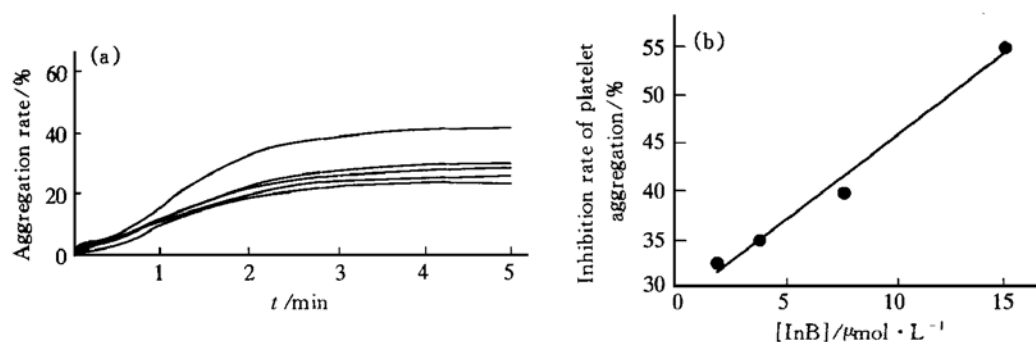


Fig.6 Result of PRP aggregation mediated by $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ADP

(a) shows the aggregation curve of PRP aggregation, curves counted from the top to the bottom is: negative control, 1.91, 3.82, 7.64, 15.29 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ InB respectively. (b) shows the plot of inhibition rate versus InB concentration, the formula of the regression line is: $y = 1.6946x + 28.483$ ($R^2 = 0.9901$), based on this formula we calculated the $IC_{50} = 12.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

4 讨 论

突变体 InB 的对 S-2444 的酰胺解比活仅为 $59 \times 10^2 \text{ IU/mg}$, 与野生型 scurPA 的比活 $144 \times 10^3 \text{ IU/mg}$ 相比相差两个数量级, 但是纤维蛋白平板测活法得到的结果确是两者处于同一数量级上 (未发表材料), 为解释这一矛盾, 我们测定 InB 对 S-2444 的酰胺解动力学常数以及 InB 激活天然底物 plasminogen 的动力学常数. 从实验结果来看, InB 水解 S-2444 的催化活性 $k_{\text{cat}, \text{S-2444}} / K_{\text{m}, \text{S-2444}} = 5.8 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 与野生型 scurPA 的 $k_{\text{cat}, \text{S-2444}} / K_{\text{m}, \text{S-2444}} = 1.2 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ [11] 确实相差两个数量级, 主要原因是 InB 的 k_{cat} 值比 scurPA 的 $k_{\text{cat}} = 7.31 \text{ s}^{-1}$ [11] 降低了两个数量级. 估计原因为 K 区的突变影响了突变体分子的反应活性 [14].

在激活天然底物 plasminogen 的活性上, InB 的 $k_{\text{cat}, \text{plg}} / K_{\text{m}, \text{plg}} = 4.16 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ 与野生型 scurPA 的 $k_{\text{cat}, \text{plg}} / K_{\text{m}, \text{plg}} = 9.66 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ [11] 相比, 虽然已经处于同一数量级, 但是还相差两倍以上. InB 激活 plasminogen 反应与纤维蛋白平板测活法相比, 该反应体系中缺少 fibrin, 所以我们又检测了 fibrin 对 InB 激活 plasminogen 反应的影响.

反应体系中存在的 fibrin 对 scurPA 及其突变体的 plasminogen 激活活性是一种抑制作用. 影响因子 $F_{\text{scurPA}} = 0.285$ (未发表材料), 而 $F_{\text{InB}} = 0.463$. 这意味着在有 fibrin 存在的条件下, 野生型 scurPA 的活性只剩下 28.5%, 而 InB 却可保留 46.3% 的活性. 为达到一个单位的 plasminogen 激活活性, 应加入 3.51 单位的野生型 scurPA, 或 2.16 单位的 InB. 根据 scurPA 及 InB 的 $k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}$ 值可推算出: 相同质

量的 scurPA 与 InB 的活性比值为 $\frac{A_{\text{scurPA}}}{A_{\text{InB}}} =$

$$\frac{k_{\text{cat}, \text{plg}}^{\text{scurPA}} / K_{\text{m}, \text{plg}}^{\text{scurPA}}}{k_{\text{cat}, \text{plg}}^{\text{InB}} / K_{\text{m}, \text{plg}}^{\text{InB}}} = \frac{9.66 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}}{4.16 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}} = 2.32,$$

所以假设: 具有 3.51 单位活性的野生型 scurPA 的质量为 m , 则相同质量 m 的 InB 的活性为 $3.51 / 2.32 = 1.51$ 单位. 据此可知: 在体外实验、有 fibrin 存在的条件下, 为达到一个单位的 plasminogen 激活活性, 突变体 InB 的用量是野生型 scurPA 的用量的 $\frac{2.16}{1.51} = 1.43$ 倍. 说明突变体 InB 与野生型 scurPA 在体外条件下的 plasminogen 激活活性确实处于同一数量级.

在体内的情况因未做动物试验, 还属未知, 但可根据 Hu 等的实验结果 [15] 与我们做的血小板聚集实验的结果作出合理的推论. Hu 等发现血小板膜受体糖蛋白 GP IIb/IIIa 上有两个结合位点, 一个专门与 fibrinogen 结合称为 F 位点, 另一个与含 RGD 序列的配体结合, 我们权且称之为 L 位点. 从我们做的血小板聚集实验结果可知: InB 具有抗血小板聚集的活性 (野生型 scurPA 无此活性, 未发表材料), 抑制 50% 血小板聚集的半抑制常数 $IC_{50} = 12.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这说明: a. 突变体 InB 与野生型 scurPA 相比具有明显的抗血小板聚集活性, 是一种双功能的溶栓分子; b. 突变体 InB 可与 GP IIb/IIIa 结合. 这说明在体内应用 InB 进行溶栓治疗时, GP IIb/IIIa 具有了一种类似于酶的定向、富集作用的功能, 它将溶栓所需的 fibrinogen、与 fibrinogen 结合的 plasminogen 以及激酶 InB 在血栓周围富集起来, 这种作用最高可将反应速度提高 10^8 倍 [16]. 所以我们认为: 突变体 InB 在体内的溶

栓活性可能远远高于野生型 scu PA.

综上所述, 我们认为单链尿激酶型纤溶酶原激活剂的 K 区插入突变体 InB 是一种极具理论意义与应用开发潜力的双功能溶栓分子.

致谢 感谢袁洪生老师的悉心指导, 肖传英、杜莉芬老师的热情帮助.

参 考 文 献

- Collen D. Thrombolytic therapy. *Thromb Haemost*, 1997, **78** (1): 742~ 746
- Chesebro J H, Knatterud G, Braunwald E. Thrombolytic therapy. *N Engl J Med*, 1988, **319** (23): 1543~ 1547
- Holvoet P, Laroche Y, Lijnen H R, *et al.* Characterization of a chimera plasminogen activator consisting of a single chain Fv fragment derived from a fibrin fragment D-dimer-specific antibody and a truncated single-chain urokinase. *J Biol Chem*, 1991, **266** (29): 19717~ 19724
- Tait J F, Engelhardt S, Smith C, *et al.* Prourokinase-annexin V chimeras: construction, expression, and characterization of recombinant proteins. *J Biol Chem*, 1995, **270** (37): 21594~ 21599
- Smith J W, Tachias K, Madison E L. Protein loop grafting to construct a variant of tissue-type plasminogen activator that binds platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem*, 1995, **270** (51): 30486~ 30490
- 孙迎庆, 郭 雁, 李令媛, 等. RGDS-尿激酶原嵌合体的构建与表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (2): 189~ 193
Sun Y Q, Guo Y, Li L Y, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, **15** (2): 189~ 193
- 钱 斌, 孙迎庆, 郭 雁, 等. 尿激酶原-RGDS 双功能分子. 构建、表达及性质研究. *中国科学 (C 辑)*, 1999, **29** (2): 125~ 131
Qian B, Sun Y Q, Guo Y, *et al.* *Sci Chin (c)*, 1999, **29** (2): 125~ 131
- Coller B S. Antiplatelet agents in the prevention and therapy of thrombosis. *Ann Rev Med*, 1992, **43**: 171~ 180
- Collen D, Zamarron C, Lijnen H R, *et al.* Activation of Plasmonogen by Pro-urokinase. II KINETICS. *J Biol Chem*, 1986, **261** (3): 1259~ 1266
- 张龙翔, 张庭芳, 李令媛主编. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997. 138~ 140
Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Experimental Method and Techniques in Biochemistry*. 2nd. Beijing: Education Press, 1997. 138~ 140
- 党 昕, 茹 强, 杨晶鑫, 等. 一种新的纤溶酶原激活反应动力学研究方法. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17** (1): 84~ 86
Dang X, Ru Q, Yang J X, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, **17** (1): 84~ 86
- Deckmyn H, Stanssens P, Hoet B, *et al.* An echistatin-like Arg-Gly-Asp (RGD) -containing sequence in the heavy chain CDR3 of a murine monoclonal antibody that inhibits platelet glycoprotein II b/ IIIa function. *Brith J Haematol*, 1994, **87**: 562~ 571
- 王鸿利, 包承鑫, 阮长耿, 等. 血栓与止血检验技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1992. 24~ 26
Wang H L, Bao C X, Ruan C G, *et al.* *Inspection Technology of Thrombus and Hemostasis*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1992. 24~ 26
- 党 昕, 茹 强, 杨晶鑫, 等. 单链尿激酶型纤溶酶原激活剂 Kringle 区催化相关功能探讨. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17** (1): 89~ 95
Dang X, Ru Q, Yang J X, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, **17** (1): 89~ 95
- Hu D D, White C A, Panzer-Knodle S, *et al.* A new model of dual interacting ligand binding sites on integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J Biol Chem*, 1999, **274** (8): 4633~ 4639
- 沈 同, 王镜岩, 赵邦梯, 等. 生物化学 (上), 第一版. 北京: 高等教育出版社, 1981. 266~ 267
Shen T, Wang J Y, Zhao B T, *et al.* *Biochemistry*. 1st. Beijing: Education Press, 1981. 266~ 267

Characterization of Bifunctional Chimeric Molecule of PRGDWR Containing Pro-Urokinase

DANG Xin, YANG Jing-Xin, RU Qiang, RU Bing-Gen*

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

Abstract In order to obtain the bifunctional chimeric molecule of single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu PA) which can inhibit platelet aggregation, PRGDWR peptide was inserted into the site between Gly¹¹⁸ and Leu¹¹⁹ (called insertion mutant B, InB). The recombinant gene of InB was expressed by *Pichia pastoris*. The secreted protein was purified by metal chelate affinity and strong cation exchange chromatography. The amidolytic ability of mutant InB is 5 900 IU/mg, the kinetic constants is: $K_{m, plg}^{InB} = 56.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $k_{cat, plg}^{InB} = 0.33 \text{ s}^{-1}$. The kinetic constants of plasminogen activation reaction is: $K_{m, plg}^{InB} =$

$0.397 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $k_{\text{cat, plg}}^{\text{InB}} = 0.0164 \text{ s}^{-1}$. Fibrin inhibit the catalytic ability of InB during plasminogen activation, the influence factor is 0.463 (means InB remain 46.3% of the catalytic ability when fibrin was involved in the reaction system). The mutant not only has almost the same catalytic ability as wild type scr-PA, but also has strong ability of anti-platelet aggregation (compared with scr-PA), IC_{50} of InB is $12.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words PRGDWR peptide, single chain urokinase-type plasminogen activator, thrombolytic ability, platelet aggregation

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

Received: May 8, 2000 Accepted: June 9, 2000

中国科协第三届学术年会在长春举行

中国科协于1999年10月在杭州、2000年9月在西安成功地举办了二届学术年会,受到广大科技工作者和社会各方面的欢迎和关注。

2001年9月13~16日,中国科协将在吉林长春市举办第三届学术年会。参加今年学术年会的报名办法,仍按前两届即向组团单位报名。各全国性学会、省、自治区、直辖市科协以及高校科协均为组团单位。各组团单位负责征集学术论文,并于2001年5月20日之前报送。欲报名参加中国科协2001年学术年会的代表,请向组团单位索要会议通知。通知对征文的主题和范围,论文及格式的要求均有详细说明。

中国科协第四届青年学术年会预计十月下旬在北京召开

中国科协于1992年、1995年和1998年分别召开了三届青年学术年会,产生了良好的社会影响。第四届青年学术年会预计十月下旬在北京召开。各全国性学会、协会、研究会,各省、自治区、直辖市科协,及有关单位均开始了报名组织工作。本届青年学术年会围绕学科发展前沿问题、国家重大科技攻关项目以及在经济建设中的应用开发成果、世界科技发展趋势、对21世纪可持续发展的探讨与展望等内容,设6个分会场展开学术交流。具体报名办法以及提交论文要求请与各报名单位联系,或与中国科协学会部联系。

中国科协学会部联系地址:北京复兴路3号中国科协学会部

邮政编码:100863

报名联系人:巩寒雪、欧鲁平 010-68518822-21809

征文联系人:李慧政、鲁颖淮 010-68518822-21814

电子信箱: qnxsnh@sina.com.cn

中国生物物理学会