

重组单链抗体-低分子量尿激酶融合蛋白 在 CHO 细胞中的抗降解研究*

刘志刚 林建波 杜 韫 俞炜源**

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 抗人纤维蛋白单链抗体-低分子量尿激酶(IIn-UK)融合蛋白, 兼有单链抗体对纤维蛋白的亲性和尿激酶的溶栓活性, 有望开发成为新型导向溶栓药物。但基于通用连接肽(G_4S)₃的IIn-linker-UK融合蛋白在CHO细胞中表达时出现明显的降解。为了解决此问题, 利用分子生物学方法, 对IIn-UK融合蛋白进行了分子改造, 包括置换连接肽, 改变两个半分子(moiety)的相对位置, 以及对连接肽附近明确的蛋白酶位点进行突变等方法, 并分别研究了改造后的11种IIn-linker-UK或UK-linker-IIn突变体在CHO细胞中分泌性表达时的稳定性, 最终筛选到一种抗降解的突变体。

关键词 融合蛋白, 连接肽, 降解, CHO细胞

学科分类号 Q78

为了研制对血栓特异的新型导向溶栓制剂, 本实验室在以前的工作中, 利用噬菌体表面呈现技术, 筛选到一株对人纤维蛋白特异的鼠单链抗体^[1], 在该鼠抗体可变区进行结构建模的基础上, 对其进行了人源化改造和体外亲和力成熟, 得到亲和力和特异性较鼠抗体更好的人源化单链抗体IIn^[2,3], 并以通用柔性肽(G_4S)₃为连接肽构建了人源化单链抗体-低分子量尿激酶的融合基因(IIn-UK)。该融合基因在大肠杆菌中实现了高表达, 但由于重组蛋白含有8对二硫键, 而且大肠杆菌胞内的还原环境不利于二硫键的正确配对, 导致表达产物不能正确折叠, 表达产物主要以不溶的包涵体形式存在, 通过共表达DsbC和选用胞内还原系统缺陷的大肠杆菌菌株才实现小部分表达产物的可溶性表达^[4]。随后在CHO细胞中对该融合基因进行了高表达研究, 高表达细胞株的表达水平达到10 $\mu\text{g}/(10^6\text{cell}\cdot 24\text{h})$, 但表达产物在连接肽附近出现降解^[5], 尤其是在纯化过程中更为明显。

一般认为, 连接肽越长和柔韧性越高, 越有利于其所连接的两个半分子的独立折叠和保持生物活性, 但这种连接肽也越容易被宿主细胞的蛋白酶所降解, 因为连接肽及其附近区域通常为柔韧的松散结构, 导致其对宿主细胞的蛋白酶比较敏感。因而重组蛋白, 尤其是含有连接肽的融合蛋白在具有复杂蛋白酶系统的真核细胞表达系统中表达时, 经常在连接肽附近出现降解现象。大量的研究工作表明,

连接肽的长度、其氨基酸的组成、是否糖基化、连接肽与各个半分子间的适配性等多个方面都会影响融合蛋白的功能及稳定性^[6-8]。本研究主要从置换连接肽(linker), 改变两个半分子(moiety)的相对位置以及突变连接肽附近的蛋白酶识别位点等方法, 并最终获得了抗降解的新型单链抗体-低分子量尿激酶融合蛋白。该研究为新型导向溶栓药物的研制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 *E.coli* XL1-blue 为本室保存, 细胞株 CHO/dhfr-和 COS7 为本室保存; 质粒 pMCE-IInUK 和 pMCEd-IInUK 为本室构建的两个能够高效表达单链抗体-低分子量尿激酶融合基因的哺乳动物细胞表达载体^[9], 质粒 pMCE-proUKGD 为本室构建的 proUK-KGD 融合基因的表达载体。

常用限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、pfu DNA 聚合酶、dNTP 等购自 TAKARA 公司和上海生工生物技术公司; 血清和 IMDM 培养基购自 Hyclone 公司; 抗生素 G418 购自 Sigma 公司; 兔

*国家高技术“863”计划资助项目(2001AA215351)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-66948828, E-mail: yuwy@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2004-12-30, 接受日期: 2005-02-28

抗尿激酶 IgG 为本实验室制备；羊抗兔 IgG-HRP 购自北京中山生物技术公司；其他常用生化试剂购自军事医学科学院条件处，为分析纯。

1.2 细胞培养

CHO/dhfr⁻ 细胞常规培养采用含 4 mmol/L L-glutamine 的 IMDM 培养基，并添加 1.5 g/L NaHCO₃，0.1 mmol/L 次黄嘌呤，0.016 mmol/L 胸苷以及 10% 小牛血清。筛选在基因组中随机整合单链抗体 - 尿激酶融合基因的细胞株时，在上述的培养基中再添加 G418 至终浓度为 400 mg/L。COS7 细胞常规培养采用含 4 mmol/L L-glutamine 的 IMDM 培养基，并添加 10% 小牛血清，转染后用无血清培养基 (SFM，由本所陈昭烈研究员惠赠) 培养。

1.3 多克隆位点 (MCS) 的拼接

化学合成 2 条寡核苷酸 Pmca1 和 Pmcs2 (序列见表 1)，用 TE 稀释并等分子混合，配成终浓度都

为 0.25 μmol/L 的溶液，95℃ 处理 10 min，随后缓慢降温至室温，促使 2 片段间退火配对形成完整的多克隆位点，并在 5' 端形成 *EcoR* V 的平末端，在 3' 端形成 *Bam*H I 的粘性末端。

1.4 4 种 IIn-linker-UK 融合基因的克隆

以 pMCEd-IInUK 为模板，以 Pleader+PIIn3 (序列见表 1) 为引物，扩增出带信号肽的 IIn 基因片段 (PCR1)；同时以 pMCE-proUKGD 为模板，以 Puk1/Puk2/Puk3/Puk4+Puk0 (序列见表 1) 为引物，扩增出含 4 种不同 linker-UK 的基因片段 (PCR2)，然后将 PCR1 产物用 *Xho* I 单切，PCR2 产物分别用 *Xho* I +*Not* I 双切，同时载体 PMCEd 用 *EcoR* V +*Not* I 双切，分别回收后用 T4 DNA 连接酶进行 3 片段连接，克隆 4 种 IIn-linker-UK 融合基因，分别命名为 pMCEd-IInUK1，pMCEd-IInUK2，pMCEd-IInUK3，pMCEd-IInUK4。

Table 1 Oligonucleotides used in this work

Oligo name	Oligo sequence
Pmcs1	ATCGATGGTTACCGCTAGCGGCCGGAATTCTG
Pmcs2	GATCCGAATTCGCGCCGCTAGCGGTAACCATCGAT
Pleader	ATCGCCGCCACCATGGGATGGAG
Pleader1	AAGATATCGCCGCCACCATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTCTCTTGTCAGGAACT
Pleader3	TCTCTTTCTCTTGTCAGGAACTGGAGGTGTCCTCTCTTTAAAAATTCAGTGTGGCCAAAAAG
PIIn1	GTGAAGCTTGTTGAATCTGGTGTAAGAAGTTG
PIIn2	CAGCGCCGCTTATTTGATTTCAGCTTGGTGCTC
PIIn3	GATCTCGAGCTTGGTGCTCTGACCGAAAGTG
Puk0	CAGCGCCGCTTATCAGAGGGCCAGGCCATTCTC
Puk1	AAGCTCGAGATCAAAGTGGATATGCGTCATCTGAAATTTCACTGTGGCCAAAAGACTC
Puk2	AAGCTCGAGATCAAAGAAACCGAACTGGAAAACCTGAAATTTCACTGTGGCCAAAAGACTC
Puk3	AAGCTCGAGATCAAACGTAAAAACATGCGGATACCGCGGCGAACTGAAATTTCACTGTGGCCAAAAGACTC
Puk4	AAGCTCGAGATCAAACGTAACAACCTGGCGGGCGCGGAAGAACTGTTTGCAGCTAAATTTCACTGTGGCCAAAAGACTC
Puk5	AACAAGCTTCACCTGCGCGAGCTCTGTTTCGAGGGCCAGGCCATTCTCTTCC
Puk6	AACAAGCTTCACCTGCACCTGGCTAAAATAGAGGGCCAGGCCATTCTCTTCC
Puk7	AACAAGCTTCACTTCCGCTTCCAGACGCGCAATTTCTTCCGCACTTCCAGGCTGAGGGCCAGGCCATTCTCTTCC
Plinker1	ACAAGCTTCACCTGGCTACCTCCGCTCCGCTTCCGCCACCTCCGCTGCCTCCACCGCCGAGGGCCAGGCCATTCTC
Puk33k3	ACTGCGGCCGAGATGGAAAAAGCCCTCCTCTCCTCC
Puk33k4	ACTGCGGCCGAGATGGACAAAAGCCCTCCTCTCCTCCAGAAG
Puk33k5	GCCCTCCTCTCCTCCAGAAGAATTAATTTCACTGTGGCCAAAAGACTCTGAGGCCCCGCGATAAGATTATTGGGGGAGAATTCACC
Puk33k6	CACCCTCAAAGGCATCACCGCGGGCCAGGTG

1.5 4种 UK-linker-II α n 融合基因的克隆

以 pMCE-proUKGD 为模板, 以 Pleader3+Puk0 (序列见表 1) 为引物, 扩增出带部分信号肽的低分子质量尿激酶的基因片段 (PCR1). 然后以 PCR1 的产物为模板, 以 Pleader1+Plinker1/Puk5/Puk6/Puk7 (序列见表 1) 为引物, 扩增出含 4 种不同连接肽的 singal-UK-linker 的基因片段 (PCR2). 同时以 pMCEd-II α nUK 为模板, 以 PII α n1+PII α n2 (序列见表 1) 为引物, 扩增出 II α n 基因片段 (PCR3). 然后将 PCR2 产物分别用 *Hind* III 单切, PCR3 产物用 *Hind* III + *Not* I 双切, 同时载体 pMCEd 用 *Eco*RV + *Not* I 双切, 分别回收后用 T4 DNA 连接酶进行 3 片段连接, 克隆 4 种 UK-linker -II α n 融合基因, 分别命名为 pMCEd-UKII α n, pMCEd-UKII α n1, pMCEd-UKII α n2, pMCEd-UKII α n3.

1.6 3种蛋白酶位点突变的 II α n-UK 融合基因的克隆

以质粒 pMCE-proUK-KGD 为模板, 分别以 Puk33k3/Puk33k4/Puk33k5+Puk33k6 为引物, 扩增 UK33k, 回收, 分别命名为 UK33k1, UK33k2 和 UK33kd, 然后再以 UK33kd 为模板, 以 Puk33k4+Puk33k6 为引物进行扩增, 回收扩增产物为 UK33k3. 质粒 pMCE-II α nUK 进行 *Not* I + *Sac* II 双酶切, 同样处理回收的 UK33k1, UK33k2, UK33k3, 然后分别连接, 构建质粒 pMCE-II α nUK33k1, pMCE-II α nUK33k2, pMCE-II α nUK33k3.

1.7 蛋白质印迹检测 II α n-UK 融合蛋白的表达

取培养细胞的无血清培养上清, 然后经超滤浓缩 10 倍后, 制备样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 随后转印至硝酸纤维素膜, 封闭后, 依次加入兔抗尿激酶 IgG 和 HRP-羊抗兔 IgG, 最后加入 DAB 显色, 或者用 Santa Cruz 公司的 Luminol reagent, 然后应用 X 光片曝光检测.

2 结 果

2.1 真核表达载体 pMCEd 的构建

质粒载体 pMCEd-II α nUK 用 *Eco*RV + *Bam*H I 双酶切, 回收载体大片段, 然后参照 1.3 中方法退火形成多克隆位点, 然后连接, 构建载体 pMCEd (图 1), 随后测序表明克隆序列正确. 该载体在启动子 PCMV 下游添加了一个多克隆位点 (*Eco*RV - *Cla*I - *Bst*E II - *Nhe*I - *Not*I - *Eco*R I - *Bam*H I), 方便了随后的多种 II α n-UK 融合基因的克隆和表达. 而且该载体的 *neo* 基因的表达经过充分的弱化, 在随

机整合后所获得阳性克隆的混合表达水平比较高, 有利于表达产物的检测.

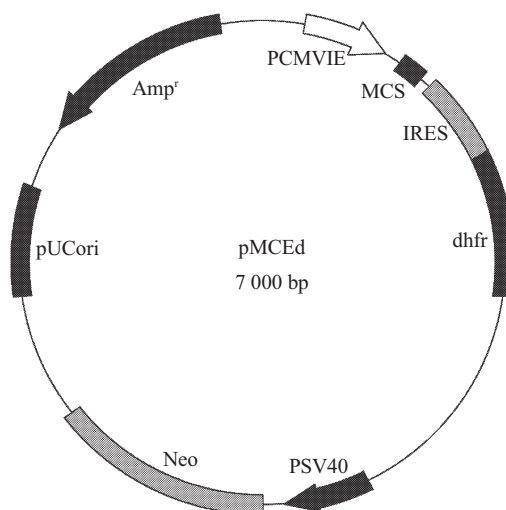


Fig.1 Illustration of plasmid pMCEd

PCMVIE: CMV major immediate early promoter/enhancer; MCS: multiplecloning site; IRES: internal ribosome entry site of the encephalomyocarditis virus (ECMV); dhfr: dihydrofolate reductase of mouse; PSV40: SV40 early promoter; Neo: neomycin phosphotransferase; pUCori: the replication origin of pUC plasmid; Amp^r: ampicillin resistance gene.

2.2 单链抗体-低分子质量尿激酶融合蛋白的抗降解研究

基于通用连接肽(G₄S)₃的单链抗体-低分子质量尿激酶融合蛋白在 CHO 细胞中分泌表达时, 出现明显的降解, 利用抗尿激酶抗体进行的蛋白质印迹分析表明, 有 2 个较明确的降解点, 而且降解点都位于连接肽附近^[9]. 为解决该问题, 本研究同时尝试了置换连接肽(linker)、改变两个半分子(moiety)的相对位置以及突变连接肽附近的蛋白酶识别位点等多种方法, 对该杂合体进行抗降解研究.

2.2.1 置换连接肽及改变两个半分子相对位置对 II α n-UK 融合蛋白在 CHO 细胞中稳定性的影响

以单链抗体(II α n)羧基端的氨基酸残基及低分子质量尿激酶(UK)的氨基端残基序列为基础, 对天然连接肽数据库 (<http://ibivu.cs.vu.nl/programs/linkerdbwww>)进行检索, 挑选了 4 个连接肽(表 2)进行研究. 参照 1.4 中的方法, 将基于 4 种不同连接肽的 II α n-linker-UK 的融合基因克隆至 pMCEd, 构建了 4 种 II α n-linker-UK 融合蛋白的 4 种表达质粒

pMCEd-IInUK1, pMCEd-IInUK2, pMCEd-IInUK3, pMCEd-IInUK4.

在挑选 UK-linker-IIn 融合蛋白中的连接肽时, 以低分子质量尿激酶 (UK) 羧基端的氨基酸残基及单链抗体 (IIn) 的氨基端残基序列为基础, 搜索天然连接肽数据库, 挑选了 3 个连接肽 (表 2) 进行研究,

同时也设计了基于通用连接肽 (G₄S)₃ 的 UK-linker-IIn 融合蛋白. 参照 1.5 中的方法, 将基于 4 种不同连接肽的 UK-linker-IIn 融合基因克隆至 pMCEd, 构建了 4 种 UK-linker-IIn 融合蛋白的表达质粒 pMCEd-UKIIn, pMCEd-UKIIn1, pMCEd-UKIIn2, pMCEd-UKIIn3.

Table 2 IIn-UK fusion genes constructed in this work

Form of fusion gene	Name of fusion gene	Sequence of linker	ID of linker
IIn-linker-UK	IInUK	GGGGSGGGSGGGGS (G ₄ S) ₃	
	IInUK1	KVDMRHL	2btvB_3
	IInUK2	KETELNL	1bjt_9
	IInUK3	RKKHADTAACL	1dcqA_1
	IInUK4	RNNLAGAEELFARKF	1bpoB_2
UK-linker-IIn	UKIIn	GGGGSGGGSGGGGS (G ₄ S) ₃	
	UKIIn1	ALEQSCAQV	1dfcA_2
	UKIIn2	LYFSQVQV	1ayrA_2
	UKIIn3	LSLEVAEEIARLEAEV	1bgxT_4

The ID and sequence of linker were quoted from <http://ibivu.cs.vu.nl/programs/linkerdbwww>.

将新构建的 8 种质粒和 pMCEd-IInUK (其克隆有基于通用连接肽 (G₄S)₃ 的 IIn-linker-UK 融合基因) 分别用 *Ssp* I 进行线性化, 然后用 Invitrogen 公司的脂质体 Lipofectin2000 转染 CHO/dhfr⁻ 细胞, 随后用 400 mg/L 的 G418 进行筛选, 待克隆形成

后, 将阳性克隆混合培养, 取无血清培养上清, 制备样品进行蛋白质印迹分析表达产物的大小. 结果显示, 新构建的 8 种基于不同连接肽及改变两个半分子相对位置的融合蛋白都出现明显的降解 (图 2).

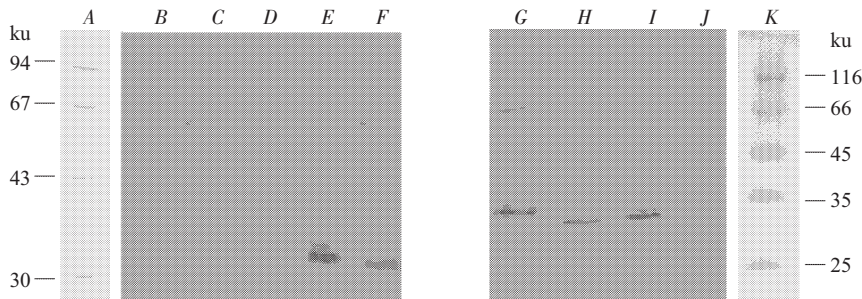


Fig.2 Western blot analysis showing the drgree of proteolysis for IIn-linker-UK and UK-linker-IIn fusion proteins expressed by CHO cells

The CHO cells that secreted IIn-linker-UK or UK-linker-IIn fusion proteins were cultured with serum free culture media . After 24 h, culture media containing secreted combinant protein were concentrated about 10 times by ultrafiltration and then subjected to Western blot analysis using anti-urokinase antibody. A and K: protein molecular marker; B: IInUK; C: IInUK1; D: IInUK2; E: IInUK3; F: IInUK4; G: UKIIn; H: UKIIn1; I: UKIIn2; J: UKIIn3.

2.2.2 突变连接肽附近的蛋白酶识别位点对 IIn-UK 融合蛋白在 CHO 细胞中稳定性的影响.

参照 1.6 构建了 3 种新的 IIn-linker-UK 融合蛋白, 此 3 种融合蛋白的共同点在于利用尿激酶原分子中的一段天然序列 (12 个氨基酸残基 ADGKKPSSPPEE) 作为两个半分子的连接肽, 该序列位于低分子质量尿激酶的氨基端, 而且其在尿激酶原分子中即是作为 Kringle 区 (Kringle region) 与尿激酶溶纤功能区 (即低分子质量尿激酶, scu-PA32k) 之间的连接肽^[9]. 在此连接肽中及低分子质量尿激酶的 N 端, 有 2 个比较明确的蛋白酶识别位点, 即 K¹³⁵~K¹³⁶ (此氨基酸序号为其在尿激酶原分子中的氨基酸序号, 下同) 的纤溶酶切割位点和 R¹⁵⁶~F¹⁵⁷ 的凝血酶切割位点^[10]. 新构建的 3 种新融合蛋白中, IInUK33k1 对此 2 个蛋白酶识别位点都未进行突变, IInUK33k2 则突变并消除 K¹³⁵~K¹³⁶ 的纤溶酶切割位点, 但保留了 R¹⁵⁶~F¹⁵⁷ 的凝血酶切割位点, 而 IInUK33k3 则突变并消除了此 2 个蛋白酶识别位点.

将新构建的质粒 pMCE-IInUK33k1, pMCE-IInUK33k2, pMCE-IInUK33k3 及质粒 pMCE-IInUK 首先转染 COS7 细胞进行瞬时表达研究, 结果表明在 COS7 细胞中, 突变蛋白酶识别位点后的融合蛋白具有明显的抗降解特点, 尤其是 2 个蛋白酶识别位点都突变的融合蛋白 IInUK33k3 (图 3).

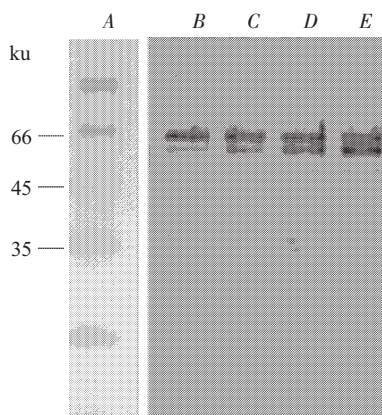


Fig.3 Western blot analysis showing the degree of proteolysis for different IIn-UK fusion protein expressed by COS7 cells

The COS7 cells were respectively transfected with plasmid DNA of pMCE-IInUK, pMCE-IInUK33k1, pMCE-IInUK33k2 and pMCE-IInUK33k3. After 24 h, the secreted IIn-UK fusion protein in serum free culture media were concentrated about 10 times by ultrafiltration and then subjected to Western blot analysis using anti-urokinase antibody. A: protein molecular marker; B: IInUK33k3; C: IInUK33k2; D: IInUK33k1; E: IInUK.

因而选择融合蛋白 IInUK33k3 在 CHO 细胞中进行稳定性分析. 首先利用 *EcoR* V + *Xba* I 双酶切将 IInUK33k3 融合基因克隆至载体 pMCEd 构建表达载体 pMCEd-IInUK33k3. 与 2.2.1 类似, 转染 CHO/dhfr⁻ 细胞并制备混合克隆的表达样品, 利用蛋白质印迹分析表达产物的大小. 结果表明, 突变 2 个蛋白酶识别位点后的融合蛋白 IInUK33k3 在 CHO 细胞中表达时主要以完整形式存在 (约 60 ku), 未见到明显的降解带出现 (图 4).

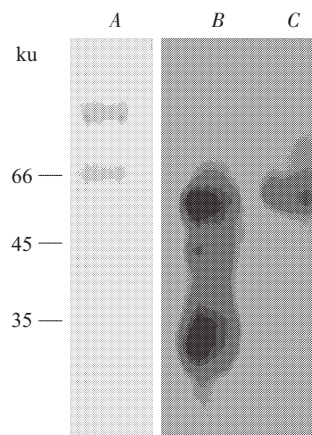


Fig.4 Western blot analysis showing the degree of proteolysis for IInUK33k3 fusion protein expressed by CHO cells

The CHO cells that secreted IInUK33k3 or IInUK fusion protein were cultured with serum free culture media. After 24 h, culture media containing secreted combinant protein were concentrated about 10 times by ultrafiltration and then subjected to Western blot analysis using anti-urokinase antibody. A: protein molecular marker; B: IInUK; C: IInUK33k3.

3 讨 论

目前, 基因融合技术已经成为生物学研究中的一个常用方法, 包括构建双功能分子, 构建融合蛋白以方便目的蛋白的表达或纯化, 或增加目的蛋白在细胞内的稳定性等, 因而其在重组蛋白药物研制, 表达调控研究等方面得到广泛的应用. 但在实际工作中, 构建的融合蛋白有时会出现降解, 尤其是在具有复杂蛋白酶系统的真核表达系统中表达重组的融合蛋白时, 而且降解位置经常出现在两个半分子的连接区. 因而在构建融合蛋白时, 选择两个半分子 (moiety) 之间的连接肽是一个很关键的环节. 一般认为, 在设计融合蛋白时, 选择的连接肽应该具有足够的长度和较好的柔韧性, 以保证连接的两个半分子能够在空间上有足够的自由度以发挥其功

能,因而在设计或选择的连接肽中应尽量避免形成 α 螺旋和 β 折叠等二级结构^[1].同时,大量的研究表明,连接肽的长度、氨基酸组成及是否糖基化等对融合蛋白的稳定性都有明显的影响^[6].目前,在互联网上有多个网站免费提供选择和设计连接肽的功能,包括 <http://ibivu.cs.vu.nl/programs/linkerdbwww> 和 <http://www.fccc.edu/research/labs/feng/linker.html> 等.

在本实验室以前的工作中,利用连接肽(G_4S)₃构建 IIn-linker-UK 融合蛋白时,发现重组的融合蛋白在 CHO 细胞中出现明显的降解.为了解决单链抗体-低分子质量尿激酶融合蛋白在 CHO 细胞中表达时的降解问题,本研究尝试了置换两个半分子间的连接肽,尽管选用了不同长度(7~15 个氨基酸)的连接肽,而且这些连接肽的柔韧性也不同,但通过置换连接肽所得到的多种突变体都依然出现明显的降解.而且改变单链抗体和尿激酶在融合蛋白中的相对位置也未能克服其降解问题,表明这些因素都不是影响单链抗体-尿激酶融合蛋白稳定性的主要因素.而在 COS7 细胞中研究蛋白酶特异性降解时,发现连接肽(ADGKKPSSPPEE)中的纤溶酶识别位点以及低分子质量尿激酶 N 端(即靠近连接肽端)的凝血酶识别位点都会出现一定程度的特异性降解,而将两者突变之后则取得明显的抗降解效果,而且 CHO 细胞中的表达结果也证实,蛋白酶的特异性降解是导致单链抗体-低分子质量尿激酶融合蛋白在 CHO 细胞中表达时不稳定的主要因素.该研究最终筛选到抗降解的新型 IIn-UK 融合蛋白分子,为其大量制备及进行体内外的活性研究创造了条件,并为研制新型导向溶栓药物奠定了基础.

参 考 文 献

1 黄君健,俞炜源,黄翠芬.应用噬菌体抗体库技术制备特异抗人

纤维蛋白鼠单链抗体.生物技术通讯,1996,7(1):1~5

Huang J J, Yu W Y, Huang C F. Letters in Biotechnology, 1996, 7 (1): 1~5

2 王国力,刘仕辉,黄君健,等.鼠抗人纤维蛋白单链 Fv 片段的三维结构模建.生物技术通讯,1996,7(1):6~9

Wang G L, Liu S H, Huang J J, et al. Letters in Biotechnology, 1996, 7 (1): 6~9

3 刘志刚,俞炜源,林建波.人源化鼠抗人纤维蛋白单链抗体的体外分子进化.遗传学报,2002,29(1):90~93

Liu Z G, Yu W Y, Lin J B. Acta Genetica Sinica, 2002, 29 (1): 90~93

4 刘志刚,林建波,袁旭东,等.人源化鼠抗人纤维蛋白单链抗体-尿激酶融合蛋白在大肠杆菌中的功能性表达.生物工程学报,2002,18(4):509~511

Liu Z G, Lin J B, Yuan X D, et al. Chinese Journal of Biotechnology, 2002, 18 (4): 509~511

5 刘志刚,林建波,张国强,等.IIn-UK 融合基因在 CHO 细胞中的高表达研究.军事医学科学院院刊,2004,28(3):209~211

Liu Z G, Lin J B, Zhang G Q, et al. Bull Acad Mil Med Sci, 2004, 28 (3): 209~211

6 Gustavsson M, Lehtio J, Denman S, et al. Stable linker peptide for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. Protein engineering, 2001, 14 (9): 711~715

7 Arai R, Ueda H, Kitayama A, et al. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. Protein Engineering, 2001, 14 (8): 529~532

8 Robinson C R, Saucer R T. Optimizing the stability of single-chain proteins by linker length and composition mutagenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (11): 5929~5934

9 Gunzler W A, Steffens G J, Otting F, et al. Structural relationship between human high and low molecular mass urokinase. Hoppe-seyler's Z Physiol Chem, 1982, 363 (2):133~141

10 de Munk G A, Groeneveld E, Rijken D C. Acceleration of the thrombin inactivation of single chain urokinase -type plasminogen activator(pro-urokinase) by thrombomodulin. J Clin Invest, 1991, 88 (5): 1680~1684

11 Xue F, Gu Z, Feng J A. LINKER:a web server to generate peptide sequences with extended conformation. Nucleic Acids Research, 2004, 32 (web server issue): W562~W565

Anti-proteolysis Study of Recombinant IIn-UK Fusion Protein in CHO Cell*

LIU Zhi-Gang, LIN Jian-Bo, Du Yun, Yu Wei-Yuan**

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract Fusion protein IIn-UK was constructed by fusing ScFv specific against human fibrin with low molecular urokinase with linker (G4S)₃, and this fusion protein was a potential targeting thrombolytic agent. But the fusion protein leaned to be proteolysed while expressed in CHO cells. To overcome this problem, four new linkers were selected from linkers database by using the program at <http://ibivu.cs.vu.nl/programs/linkerdbwww>, and four IIn-UK fusion genes were reconstructed by replacing linkers. And other four fusion genes were reconstructed by changing reletive position of two moities and replacing the linker. The degree of proteolysis of eight reconstructed IIn-linker-UK or UK-linker-IIn fusion proteins were analysed with Western blot by using anti-urokinase antibody, the results showed that all eight constructed fusion proteins were degraded partly while expressed in CHO cells. So three new IIn-linker UK fusion genes were constructed by using a new linker coming from pro-urokinase and removing one or two cleavage site of proteolytic enzyme around the linker. The Western blot showed that IIn-UK fusion protein removed two protyolitic enzyme cleavage sites had good anti-proteolysis ability in COS7 cell and CHO cell. Thus it laid a foundation for preparation of IIn-UK fusion protein in CHO cells and further research of targeting thrombolytic agent.

Key words fusion protein, linker, proteolysis, CHO cell

*This work was supported by a grant from State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA215351).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66948828, E-mail: yuwy@nic.bmi.ac.cn

Received: December 30, 2004 Accepted: February 28, 2005