

## 一种新型葡激酶分子的设计 基因 构建 表达纯化及性质研究

宋 钢, 于 敏, 莫 炜, 宋后燕

(上海医科大学分子遗传学研究室, 上海 200032)

**[摘要]** 在葡激酶构效关系的研究过程中发现, 葡激酶易形成二聚体, 甚至多聚体, 不利于葡激酶的临床应用。为了探究聚合体的形成机制以研制不易聚合的新型葡激酶分子, 在葡激酶 X 射线晶体衍射结构模型的基础上, 采用分子对接软件 GRAMM V1.03, 以高分辨率整体对接方式预测了葡激酶二聚体可能的结合区。结合区主要有两种可能的形成方式, 通过强疏水相互作用及氢键结合。根据模型设计了旨在降低聚合能力的葡激酶突变体 RGD-Sak, 将 F111 置换为 D111, 并且改变 K109 为 R109, 恰好使分子中形成 RGD 结构, 使新型分子还可能具有抑制血小板聚集作用。利用定点突变及 DNA 重组技术, 构建了 RGD-Sak 基因, 并利用大肠杆菌原核表达系统进行了高效表达。RGD-Sak 以包涵体形式存在, 包涵体经洗涤, 8 mol/L 尿素溶解, 稀释复性, 离子交换色谱一步分离得到电泳纯的 RGD-Sak, 纯度达 95% 以上, 分子量与理论值相符, 比活性  $5 \times 10^4$  HU/mg。RGD-Sak 与纤溶酶形成的复合物催化纤溶酶原的  $K_m$ 、 $K_{cat}$  值分别为  $12.40 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.81 \text{ s}^{-1}$ 。RGD-Sak 显示了很弱的聚合能力。此研究为研制防止二聚体形成的新型葡激酶分子打下了基础。

**[关键词]** 葡激酶; 二聚体; 分子对接; 分子设计; 定点突变

天然葡激酶 (Staphylokinase, Sak) 是金黄色葡萄球菌溶原性噬菌体合成的一种蛋白水解酶, 由 136 个氨基酸组成。Sak 本身并不是酶, 它在人血浆中与纤溶酶原 (plasminogen, plg) 形成 1:1 复合物, 该复合物被血块表面痕量的纤溶酶 (plasmin, plm) 激活为 Sak·plm, Sak·plm 是高效的纤溶酶原激活剂, 激活游离的 plg 形成 plm, 催化血栓主要基质纤维蛋白降解, 从而溶解血栓。由于 Sak 激活 plg 具有纤维蛋白专一性, 而且对陈旧性血栓和富含血小板血栓的溶解作用比其他溶栓药物更强, 因此 Sak 是一种很有希望的溶栓剂<sup>[1]</sup>。本室已实现了 Sak 在大肠杆菌中的高效表达, 并完成了中试研究, 已申报临床使用<sup>[2]</sup>。但是, Sak 是异体蛋白, 用于人体有较强的抗原性<sup>[3]</sup>, 同时葡激酶是注射用药, 其剂型不适用于血栓病的预防。我们试图在保持葡激酶溶栓活性的前提下改造葡激酶分子, 设计小分子量、低抗原性的衍生物, 以期开发

新型口服溶栓药物。

在研究过程中发现, 葡激酶易形成二聚体, 甚至多聚体。聚合体的形成很可能导致 Sak 抗原性的增强, 分子量的增加亦不利于口服制剂的研制, 而且国家生物制品规程规定, 聚合体的比例一般不能超过蛋白质总量的 10%。因此, 研究防止二聚体形成的新型葡激酶分子显得十分必要。

与清华大学饶子和教授合作, 利用 X 射线晶体衍射技术, 已经建立了 Sak 精确的三维结构模型。Sak 是一椭球状分子, 从第 21 个氨基酸残基起, 分别由 5 条、2 条  $\beta$  折叠股构成的  $\beta$  折叠片包裹在一个由 12 个残基构成的  $\alpha$  螺旋上, 而 N 端 20 个氨基酸伸向球体外, 非常柔韧, 其功能难以从晶体结构推测。Sak 呈明显的亲疏水性的不对称性, 且活性区主要在亲水一侧。

在此结构基础上, 通过计算机分子对接方法, 预测了二聚体可能的结合方式, 建立了二聚体的三

[收稿日期] 1999-07-27

[基金项目] “八六三”计划资助项目 (103-13-01-02)

[作者简介] 宋 钢 (1974-) 男, 浙江绍兴市人, 上海医科大学博士生

维结构模型, 由此设计了突变体 RGD-Sak, 并实现了在大肠杆菌中的高效表达及高度纯化。突变体 RGD-Sak 与野生型 Sak 相比, 纤溶活性虽然有所下降, 但是形成聚合体的能力明显降低, 这提示建立的二聚体结构模型基本合理, 可在 RGD-Sak 的基础上进行进一步的改造, 以期得到不产生聚合作用而活性保持的新型葡激酶分子。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 合作与开发 与清华大学饶子和教授合作, 测定了本室研制的 r-Sak 的晶体结构。分子对接软件是美国 Rockefeller 大学 I.A. Vakser 开发的 GRAMM V1.03<sup>[4]</sup>, 在 SGI 02 图形工作站上进行模建工作。

1.1.2 菌种与质粒 大肠杆菌 JM109、质粒 pUC19 为本室保存。大肠杆菌 JF1125、原核表达载体 pLY-4 由中科院生物化学研究所刘新垣教授惠赠。质粒 pST-Sak 为本室构建。

1.1.3 试剂与仪器 Sak 半成品由本室提供 (970923), 原纯度达 98% 以上, -70℃ 保存。Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System 购自 BM 公司, 核酸工具酶购自 BRL 公司, Qiagen 核酸纯化柱购自基因公司, 丙烯酰胺、尿素购自 Sigma 公司, S-Sepharose FF、ImageMaster<sup>R</sup> VDS 购自 Pharmacia 公司。5L 发酵罐、蛋白质层析系统分别为美国 NBS、Waters 公司产品。其余试剂均为国产分析纯。

1.1.4 寡聚核苷酸 由美国 Johns Hopkins 大学 DNA 合成组制备。

### 1.2 方 法

1.2.1 r-Sak 半成品的 SDS-PAGE 电泳鉴定 还原性、非还原性 SDS-PAGE, 参照分子克隆实验指南进行。翻转酪蛋白凝胶板法活性测定, 参见文献 [2]。

1.2.2 葡激酶二聚体的分子模拟 为了确定 Sak 二聚体的结合区, 以 GRAMM V1.03 软件进行分子对接, 选择一分子 Sak 为受体, 另一分子 Sak 为配体, 以 Sak 受体搜索与配体 Sak 的结合区。按笔者推荐的整体高分辨率对接参数进行对接 (表 1), 搜索了 10 个复合物的结构。

表 1 整体高分辨率对接参数

Table 1 The parameters for high-resolution generic docking

Matching mode (generic/helix) .....	mmode = generic
Grid step .....	eta = 1.7
Repulsion (attraction is always-1) .....	ro = 30
Attraction double range (fraction of single range) .....	fr = 0
Potential range type (atom radius, grid step) .....	..... crang = atom radius
Projection (blackwhite, gray) .....	ccti = gray
Representation (all, hydrophobic) .....	crep = all
Number of matches to output .....	maxm = 10
Angle for rotations, deg (10, 12, 15, 18, 20, 30, 0 - no rot) .....	..... ai = 10

### 1.2.3 RGD-Sak 基因的克隆及原核表达质粒的构建

#### 设计克隆引物:

上游引物 5'... CGC GAA TTC ATC TCA AGT TCA TTC GAC... 3'

下游引物 5'... CGC GGA TCC TTA TTT CTT TTC... 3'

突变引物 5'... TAA ATC TGG GAC GAC GTC ACC ACG TTC TGT TAT AGG... 3' 引入 Pst I 位点

质粒 pST-Sak 为模板; 以上游引物、突变引物进行第一轮扩增, 351 bp 扩增片段经琼脂糖凝胶电泳回收、纯化后, 与下游引物再次以质粒 pST-Sak 为模板进行第二轮扩增。纯化后, 所得 408 bp 片段为模板, 以上游引物、下游引物进行第三轮扩增, 产物经 Klenow 酶补平, EcoRI、BamHI 酶解后与 pUC19 重组, 酶解筛选阳性克隆, 核苷酸序列分析验证是否发生预计位置的突变, 由基康生物技术公司用 ABI377 测序仪完成序列分析。然后用 EcoRI、BamHI 将 RGD-Sak 基因切出, 连入表达载体 pLY-4 的相应位点。

1.2.4 工程菌的诱导表达 将 pLY-4-RGD-Sak 转化大肠杆菌 JF1125, 筛选高表达菌株, 然后以 5L 发酵罐进行低密度发酵, 温度诱导后, 离心收集菌体, PBS 洗涤后, -70℃ 保存待用。

1.2.5 包涵体的分离、溶解与复性 湿菌用 PB 缓冲液悬浮, 以高压匀浆泵压榨, 离心后, SDS-PAGE 分析目的蛋白的存在状态。

上述沉淀经洗涤, 离心后, 以 0.1 mol/L PB、8 mol/L 尿素、0.5% β-巯基乙醇溶解, 室温作用至澄清透明。超离后弃沉淀, 取上清稀释复性。

1.2.6 S-Sepharose FF 柱层析 以 10 倍柱体积

PB 缓冲液平衡色谱柱, 稀释复性后溶液直接上柱, Waters 色谱仪控制流速和检测蛋白峰。上样结束后, 以 PB 缓冲液洗至基线, 0~1 mol/L NaCl 梯度洗脱, 收集洗脱组分, SDS-PAGE 分析目的蛋白分布, 并测定蛋白浓度。

1.2.7 纯度鉴定及分子量测定 样品进行 15% SDS-PAGE, 考马斯亮兰 R-250 染色后, Pharmacia Imagemaster VDS 扫描测定纯度、分子量。

1.2.8 生物学活性测定 分别以纤维蛋白凝胶板溶圈法、酪蛋白凝胶板溶圈法、发色底物法测定。

1.2.9 Sak·纤溶酶复合体和 RGD-Sak·纤溶酶复合物的  $K_m$  和  $K_{cat}$  值测定 参照文献 [5] 进行。分别将 2  $\mu\text{mol/L}$  纤溶酶原与 2  $\mu\text{mol/L}$  Sak 或 RGD-Sak 在 pH 7.4, 0.1 mol/L PB, 37 $^{\circ}\text{C}$  的条件下, 混合反应 30 min, 形成与纤溶酶的复合物。然后取催化量复合物, 在 pH 7.4, 0.1 mol/L PB, 37 $^{\circ}\text{C}$  条件下, 按以下体系反应 0~10 min, 每隔 30 s 记录 405 nm 处 OD 值, 每个不同的纤溶酶原浓度重复三次, 取平均值。

反应体系	终浓度
Sak·纤溶酶 (RGD-Sak·纤溶酶)	5 mmol/L
发色底物 S-2390	1 mmol/L
纤溶酶原	1~30 $\mu\text{mol/L}$

1.2.10 聚合能力检测实验 野生型 Sak 为对照, 以生理盐水溶解, 取 30 mg/mL、3 mg/mL 高、低两种蛋白质浓度, 室温静置。每 24 h 取样, 电泳鉴定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 r-Sak 半成品蛋白质组成分析、活性测定

分别以还原性、非还原性 SDS-PAGE 电泳分析半成品蛋白质组成。电泳结束后, 以考马斯亮兰染色, 在相对分子量约 15.5 kD、31 kD、46 kD、62 kD 处出现浓集的条带 (图 1)。翻转酪蛋白凝胶板法测定活性, 在各条带相应位置均有清亮的透明溶解带。表明 r-Sak 半成品储存过程中有形成抗 SDS 聚合体的倾向, 且聚合物非常稳定, 并保持一定活性。

### 2.2 Sak 二聚体的分子模拟及突变体设计

静电势及疏水性分析表明, Sak 单体呈明显的亲疏水性的不对称性 (图 2)。Silence 等通过随机

突变的研究表明, 决定活性的氨基酸主要位于亲水一侧<sup>[6]</sup>。Sak 的疏水面有两个主要的疏水区 (Hydrophobic Region, HR), 分别位于 47~56 (HR1), 104~113 (HR2) 位残基处, 其中 HR2 疏水性更强。在模建的二聚体结构模型中, 疏水区相互作用显示重要作用, 并有 HR1-HR2、HR2-HR2 两种结合方式。由于 HR1 靠近活性区, 因此若两分子 Sak 通过 HR1-HR2 结合, 则一分子 Sak 的活性区将被遮蔽, 可能仅保留一分子 Sak 的活性; 若以 HR2-HR2 的方式结合, 活性似乎不会受到很大影响 (图 3)。

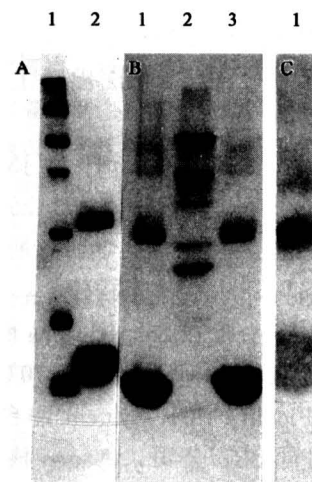


图 1 还原性、非还原性 SDS-PAGE 分析 r-Sak 及翻转酪蛋白凝胶板法测定活性

Fig.1 The reducing, non-reducing SDS-PAGE and zymography analysis of r-Sak

(A) reducing SDS-PAGE: 1—Marker (14.4 kD, 20.1 kD, 31 kD, 43 kD, 66 kD, 97.4 kD); 2—r-Sak  
(B) non-reducing SDS-PAGE: 1, 3 r-Sak; 2—Marker (14 kD, 17 kD, 24 kD, 29 kD, 36 kD, 45 kD, 66 kD)  
(C) Zymography: 1—r-Sak

蛋白质相互作用的界面通常有 6~13 nm<sup>2</sup> (600~1300 Å<sup>2</sup>), 每个蛋白质提供 10~30 个接触残基, 但是, 界面中存在所谓“热点区”, 仅 3~5 个氨基酸就提供了 80% 左右的结合能, 改变这些残基, 复合物的结合能力将显著下降<sup>[7]</sup>。因此, 二聚体无论以何种方式结合, 只要改变 HR2 的主要结合残基, 就可能阻止二聚体的形成。Phe111 位于 HR2 的核心区, 是强疏水性氨基酸, 且远离活性区, 我们将其替换为强极性氨基酸 Asp, 以破坏疏水作用, 并期望能保持活性。同时, 鉴于

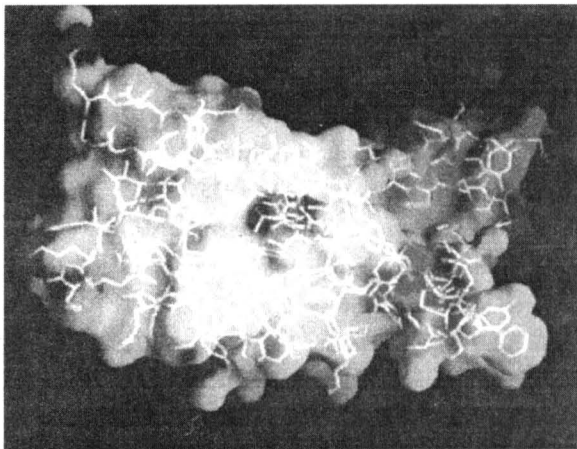


图 2 葡激酶单体的疏水面 (浅色区)

Fig.2 Hydrophobic side of staphylokinase monomer

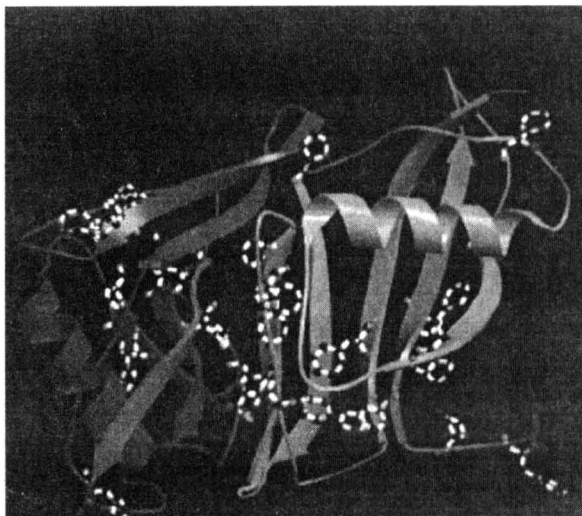


图 3 葡激酶二聚体的分子模拟 (HR2-HR2 方式)

Fig.3 Molecular modelling of staphylokinase dimer (HR2 - HR2)

RGD 序列肽可抑制血小板聚集, 而正好位于  $\beta$ -折叠的 loop 区, 构象比较自由, 因此我们亦将 Lys109 改变为 Arg, 形成 RGD 序列。

### 2.3 RGD-Sak 基因克隆及原核表达质粒构建

第一轮 PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 扩增片段约 351 bp。第二轮扩增得约 408 bp 的片段, 酶切证实已引入 *Pst* I 位点。第三轮扩增后的产物与 pUC-19 重组, 转化大肠杆菌, 酶解筛选阳性克隆, 核苷酸序列分析证实已发生设

计的突变。

目的基因与 pLY-4 重组, 转化大肠杆菌 JF1125, 提取质粒, 以 *EcoR* I、*Bam*H I 酶解, 得约 408 bp 条带; *Bam*H I、*Pst* I 酶切, 得约 340 bp 条带, 证实获得阳性克隆。

### 2.4 RGD-Sak 在大肠杆菌中的表达与鉴定

质粒 pLY-4-RGD-Sak 转化大肠杆菌 JF1125, 经温度诱导表达, SDS-PAGE 分析表达产物。电泳结束后, 一半进行考马斯亮兰染色, 可见诱导后细菌裂解液在分子量约 15.5 kD 处有一浓集的条带, 经扫描, 重组蛋白约占全菌总蛋白的 50%; 另一半洗去 SDS 后, 贴在酪蛋白凝胶板上, 37℃ 孵育数小时后, 相当于 15.5 kD 处有一明显的透亮区, 即此部位的酪蛋白已溶解, 表明 RGD-Sak 具有纤溶活性。菌体经压榨离心后, 15.5 kD 条带主要位于沉淀中, 而上清中几乎未见此条带, 说明表达产物以包涵体形式存在。

### 2.5 RGD-Sak 的分离纯化

10 L 发酵液得湿菌 80 g。取 20 g 压榨破菌, 离心, 得包涵体 5 g。经包涵体洗涤、溶解、稀释复性后, 大部分杂蛋白已被洗去或在复性过程中沉淀, 经 S-Sepharose FF 柱一步纯化至均质。

### 2.6 激活纤溶酶原试验

RGD-Sak.plasmin 激活纤溶酶原的反应符合米氏方程 (表 2)。

表 2 RGD-Sak.plasmin、Sak.plasmin 激活纤溶酶原的酶促动力学常数比较

Table 2 Kinetic analysis of activation of plasminogen by Sak moieties

	$K_m/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$K_{cat}/\text{s}^{-1}$	$K_{cat}/K_m$
Sak.plasmin	8.91	0.96	0.11
RGD-Sak.plasmin	12.40	0.81	0.07

由表 2 可见, RGD-Sak 的活性有所下降, 可能突变仍对活性区造成了影响。另一方面, Sak 在同一系统中高效表达时, 为可溶性蛋白质, 而 RGD-Sak 却形成了包涵体, 复性时折叠不够完全, 可能也是活性下降的原因。因此, 仍需进一步优化分子结构, 摸索复性条件。

### 2.7 聚合能力检测试验

在两种蛋白质浓度下, RGD-Sak 均显示了较 Sak 弱的聚合能力。Sak 的前 10 个氨基酸易被降解, 因此可见部分降解条带。采用生理盐水建立聚

合的快速检测模型,是为了更接近生理条件。

曾试图分离纯化二聚体,进行酶动力学和 X 射线晶体衍射的研究,以建立结合区的精确模型。但是,后来发现单体、聚合体随盐浓度变化呈动态平衡关系,聚合体在去盐过程中又部分解离,因此无法得到适合于结晶的高纯度无盐样品。本文得到的 RGD-Sak 的聚合能力明显降低,而且可能具备抑制血小板聚集的功能,有一定的临床应用前景,同时也表明二聚体 X 射线晶体结构得到解析之前,利用计算机模拟进行分子设计,是一种值得尝试的手段。

**致谢** 感谢中国科学院上海植物生理研究所代谢调节组茅翔博士在 SGI 工作站使用上的帮助。

#### 参考文献

- [1] Collen D. Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-specific thrombolytic agent [J]. *Nature Medicine*, 1998, 4: 279~284
- [2] 汤其群, 张小璇, 于敏, 等. 重组葡激酶的分离,

纯化和结晶 [J]. *药物生物技术*, 1997, 4 (1): 1~4

- [3] Declerck P J, Vanderschueren S, Billiet J, et al. Prevalence and induction of circulating antibodies against recombinant staphylokinase [J]. *Thromb Haemost*, 1994, 71: 129~133
- [4] Vasker I A. Long-distance potentials: an approach to the multiple-minima problem in ligand-receptor interaction [J]. *Protein Engng*, 1996, 9: 37~41
- [5] Schlott B, Hartmann M, Guhrs K H, et al. Functional properties of recombinant staphylokinase variants obtained by site-specific mutagenesis of methionine-26. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1204: 235~242
- [6] Silence K, Hartmann M, Guhrs K H, et al. Structure-function relationships in staphylokinase as revealed by "clustered charge to alanine" mutagenesis [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 27192~27198
- [7] Li B, Tom J Y K, Oare D. Minimization of a polypeptide hormone [J]. *Science*, 1995, 270: 1657~1660

## Rational Design, Over-expression and Characterization of a Novel Staphylokinase with Lower Tendency of Polymerization

Song Gang, Yu Min, Mo Wei, Song Houyan

(*Department of Molecular Genetics, School of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China*)

**[Abstract]** Staphylokinase has strong tendency to polymerize, which may hamper its clinical use. On the basis of crystal structure of staphylokinase, the dimer structure was modeled by software GRAMM V1.03 with high-resolution generic docking parameters. Two kinds of binding interfaces were generated, mainly linked by hydrophobic interaction and hydrogen bonds. The computer model of staphylokinase dimer provides a template for the design of improved staphylokinase without tendency to form polymer. A novel variant of staphylokinase (RGD-Sak) was designed based on the model. RGD-Sak gene was constructed by substitution mutagenesis of Lys-109 and Phe-111 with Arg-109 and Asp 111 respectively, confirmed by nucleotide sequencing. The mutant cDNA was ligated with prokaryotic expression vector pLY-4 and transformed into *E. Coli* JF1125. After temperature induction, over 50% expression level of RGD-Sak was achieved. RGD-Sak was isolated and purified by washing and solubilization of inclusion body, renaturation and ion exchange chromatography. The final product displayed a single band with a corresponding molecular weight of 15.5 kD in non-reducing SDS-PAGE with 95% of purity and  $5 \times 10^4$  HU/mg of specific activity. The  $K_M$ 、 $K_{cat}$  value for the activation of plasminogen with RGD-Sak was  $12.40 \mu\text{mol L}^{-1}$ 、 $0.81 \text{s}^{-1}$ , respectively. RGD-Sak show lower tendency to polymerize after incubated with 0.9% NaCl. This study provided the basis for further reconstruction of Sak by protein engineering.

**[Key words]** staphylokinase; dimer; molecular docking; molecular design; site-directed mutagenesis