脂糖代谢研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001009

葡激酶聚乙二醇修饰及活性鉴定研究

白　垒[1],徐彦颖[1],汪德强[2],周建中[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院心血管内科;2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物教育部重点实验室,重庆　400016)

【摘　要】**目的**:通过对葡激酶(staphylokinase,SAK)基因序列进行定点突变,表达突变蛋白,并对其进行聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)修饰。通过分子筛分离得到较高纯度修饰蛋白,在体内外鉴定其溶栓活性。**方法**:根据 SAK 晶体结构及抗原位点选择突变位点,构建突变质粒,并在大肠杆菌中表达半胱氨酸(cysteine,Cys)突变蛋白 S-cys;分离纯化目的蛋白;对目的蛋白在不同条件下进行聚乙二醇修饰,筛选最优修饰条件;分离修饰蛋白与未修饰蛋白,得到较高纯度的修饰蛋白 peg-S-cys,通过纤维蛋白平板溶圈实验和动物栓塞模型的构建初步对其生物活性进行验证。**结果**:原核表达、纯化后得到纯度较高的 S-cys 突变体蛋白;优化筛选 S-cys 蛋白的 PEG 修饰实验参数,得到最佳修饰条件;应用分子筛分离纯化,成功获得纯度较高的 peg-S-cys 蛋白(纯度大于 90%);初步验证 peg-S-cys 具有溶栓活性。**结论**:通过对蛋白质基因序列的定点突变,成功实现了蛋白质的聚乙二醇定点修饰,在体外和体内初步验证其活性,为蛋白质改造提供了一种新的方法与思路。

【关键词】蛋白质改造;聚乙二醇修饰;定点突变;活性验证

【中图分类号】Q816　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-03-21

Study on staphylokinase pegylation and preliminary function

Bai Lei1, Xu Yanying[1], Wang Deqiang[2], Zhou Jianzhong[1]

(1. Department of Cardiovascular, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education,

Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To obtain a site-specific pegylated protein by site-specific mutagenesis to staphylokinase(SAK) protein gene sequence and to progres polyethylene glycol(PEG) on mutant protein on variant circumstances; to obtain modified protein with high purity by selecting the optimum modification condition and using molecular sieve and to identify its function in vivo and in vitro. ***Methods***: Primer was designed according to the crystal structure and antigen sites of SAK protein; the selected amino acid on SAK protein was mutant into cysteine(Cys) by PCR. Mutant plasmid was obtained and transformed into BL21(DE3) cell. Mutant protein S-cys was expressed in escherichia coli cells through prokaryotic expression technology. Purified mutant protein was obtained . Pegylation was progressed under variant circumstances, and optimum modification condition was screened. Higher purity of pegylated protein peg-S-cys was obtained through molecular sieve. Biological activity was preliminary validated by fibrin-agarose plate process and animal embolism model. ***Results***: Cys on target site was obtained successfully. High purity of S-cys protein was obtained. S-cys protein was modified, and optimal modify condition was screened. High purity of peg-S-cys protein was obtained. Thrombolytic ability of peg-S-cys was confirmed preliminary. ***Conclusion***: Site-specific pegylated protein can be successfully obtained, and the reconstructed protein is biologically active in vitro and in vivo.

【Key words】protein modification; polyethylene glycol(peg) modification; site-specific mutagenesis; active verification

蛋白质改造即通过对蛋白质化学、蛋白质晶体学和蛋白质动力学的研究,获得有关蛋白质理化特性和分子特性的信息,在此基础上对编码蛋白质的基因进行有目的的设计和改造[1]。目前蛋白质改造的手段主要有定点突变、融合蛋白、功能域表达、蛋白修饰等。研究表明,通过对蛋白质进行聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)修饰,可降低其免疫原性、延长半衰期,同时蛋白本身的活性能够得到很好的

作者介绍:白　垒,Email:estar11@163.com,
研究方向:冠心病靶向溶栓。

通信作者:周建中,Email:1115155663.qq.com。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160706.1625.002.html
(2016-07-06)

保护。目前已经有 PEG 修饰干扰素、PEG 修饰胰岛素药物问世，显著延长了药物半衰期[2]。葡激酶（staphylokinase，SAK）是一种细菌来源的、具有良好靶向性和溶栓活性的蛋白，拥有极大应用潜力。由于 SAK 是细菌来源蛋白，会在生物体内产生严重免疫反应，并且其血浆半衰期短（仅 3 min）[3]。本课题组希望能通过对其进行改造以克服其高免疫原性和半衰期短等缺点。课题组前期已经通过密码子优化等技术，获得了 SAK 的高效表达与纯化，本课题拟基于 SAK 的晶体结构对抗原表位附近的氨基酸进行突变，在保留其溶栓等活性的基础上降低其免疫原性[4-6]，为基于溶栓蛋白质的改造提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

mPEG-MAL 分子量 5 kD（厦门赛诺邦格，中国）；DPN I 酶（TAKARA，日本）；抗 His-tag 抗体（碧云天生物技术研究所，AH367，中国）；辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠 IgG（碧云天生物技术研究所，A0192，中国）；纤溶酶原、尿激酶标准品、凝血酶、纤维蛋白原（中国食品药品检定研究所）。SD 大鼠（重庆医科大学实验动物中心）。

1.2 突变 SAK 质粒的构建

依据 SAK 晶体结构及抗原位点，选择突变位于分子表面 loop 区第 75 号氨基酸——脯氨酸（Pro75Ser），按照 SAK 碱基序列设计突变引物（表 1），引物的合成与纯化由北京六合华大基因完成。

表 1 SAK 突变引物

Tab.1 Primer of SAK mutagenesis

引物	序列
Peg-S-cys-R	5'-T*TGT*AAATTCAACATAATGCGGAG-3'
Peg-S-cys-F	5'-CTCCGCATTATGTTGAATTT*ACA*ATTAAACCG GGTACC-3'

注：斜体下划线处为突变目标碱基序列

以构建好的 SAK 优化质粒[7]为模板，对目的片段进行 PCR。反应结束后向反应产物内加入 1 μL *Dpn* Ⅰ酶于 37 ℃恒温水浴箱中反应 2 h。取反应产物转入 100 μL DH5α 感受态中，均匀涂至带有卡那霉素抗性的平板上，37 ℃恒温孵育。挑取单个菌落培养，抽提质粒并测序验证。

1.3 突变蛋白 S-cys 的表达与纯化

将测序结果正确的质粒转入 BL21（DE3）感受态中，在卡那霉素抗性平板上于 37 ℃恒温孵育 12~16 h 后，挑取单个菌落，接种于 5 mL LB 培养基，于 37 ℃，200 r/min 恒温摇床培养至 OD 值为 0.6~0.8，然后转入 300 mL LB 培养基中培养至 OD 值为 0.4~0.6，向其中加入 20 mmol/L IPTG 诱导剂，于 20 ℃诱导 12~14 h。然后离心收集细菌，重悬后在冰浴中进行超声破碎 30 min。然后低温 12 000 r/min 离心 30 min，取上清液缓慢穿过镍离子亲和层析柱，洗脱杂蛋白后洗脱目的蛋白。对目的蛋白超滤脱盐后由阴离子亲和层析柱进行二次纯化得到高纯度的目的蛋白 S-cys（纯度大于 90%）。

1.4 蛋白质的 PEG 修饰及纯化

将纯化得到的 S-cys 蛋白在不同条件下进行 PEG 修饰：A 组依照修饰剂说明书于 20 ℃修饰，其中 A1~A4 组控制目的蛋白：修饰剂摩尔比均为 1:5，将修饰时间以 1、3、5、10 h 依次增加；Aa~Ad 组控制修饰时间均为 10 h，将目的蛋白：修饰剂摩尔比以 1:1、1:3、1:5、1:10 依次增加；B 组在 4 ℃、目的蛋白：修饰剂摩尔比为 1:5、修饰时间 10 h 条件下进行。修饰后蛋白经 SDS-PAGE 鉴定，使用分子筛 Superdex 75 column（GE Healthcare）进行纯化，获得纯度大于 90% 的 PEG 修饰蛋白 peg-S-cys。

1.5 修饰蛋白 peg-S-cys 的鉴定

1.5.1 修饰蛋白 I 2 染色验证 将得到的纯化后 peg-S-cys 蛋白行 SDS-PAGE 电泳，电泳后取凝胶浸于 15% $BaCl_2$ 中 20 min，然后用清水洗 3 次，每次 1 min；再将凝胶置于 I_2-KI 染剂（2% I_2，2.4% KI）中染色 3~4 h，最后用清水脱色。将脱色后的凝胶浸入考马斯亮蓝染剂中复染。

1.5.2 修饰蛋白 Western blot 验证 将纯化前的修饰产物行 SDS-PAGE 电泳，电泳后切下目的凝胶片段，于冰水浴中 90 V 转膜 80 min。转膜后将 PVDF 膜浸于 5% 脱脂牛奶中，室温封闭 1 h。将膜置于 1:1 000 稀释的抗 His-tag 抗体中，于 4 ℃孵育 12 h。将孵育完毕的膜用 TBST 洗 3 次，每次 5 min，加入 1:5 000 稀释的二抗，室温孵育 1 h。使用 ECL 试剂盒放入仪器内发光。

1.6 修饰蛋白的活性验证

1.6.1 体外活性验证 配置纤维蛋白平板：在 30 mL PBS 缓冲液（pH=7.0）中加入琼脂粉 0.35 g，加热融化至液体清亮，冷却至 35 ℃~40 ℃，加入 350 μL 纤维蛋白原、50 μL 2 mol/L 氯化钙、170 μL 纤溶酶原，轻柔混匀，加入 10 μL 凝血酶，轻柔混匀后倒入平板中，于室温静置 20 min 后放入冰箱静置 30 min。凝胶凝固后打孔，按照计算好的剂量上样，置于 37 ℃恒温孵育 3~4 h，观察溶圈效果。

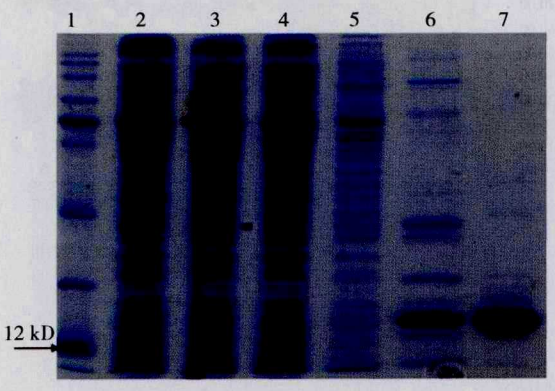
1.6.2 体内活性验证 取 SD 大鼠，使用乙醚预麻醉，然后以 0.35 mL/100 g 剂量 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉。待大鼠丧失角膜反射后，清理颈部毛发，以颈正中线为切口，行手术分离颈动脉，将其固定于 YLS-14B 小动物血栓生成仪探头上。设定参数：电压 20 mV、电击时间 20 min，开始直流电损伤血管内皮生成血栓。电击结束确认生成稳定血栓后，由尾静脉注射样品，观察溶栓效果。

2 结 果

2.1 原始 SAK 质粒定点突变与突变体表达纯化

突变质粒送华大测序，测序结果显示目标原脯氨酸碱基序列 5'-CCG-3'成功突变为半胱氨酸对应的密码子 5'-ACA-3'。

经过镍离子亲和层析柱初步纯化，14 kD 处得到了纯度较高的突变蛋白（纯度大于 85%），经过阴离子亲和层析纯化，突变体浓度进一步提高，纯度超过 90%（图 1）。



1：marker；2：破菌液；3：上清液；4：穿透液；5：杂蛋白洗脱液；6：目的蛋白洗脱液；7：阴离子亲和层析纯化蛋白

图 1 突变蛋白镍离子亲和层析和阴离子交换纯化图

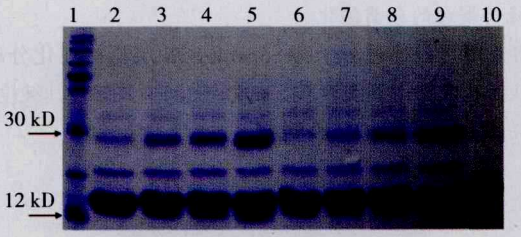
Fig.1 Purification of mutant protein

2.2 突变蛋白的 PEG 修饰

突变蛋白在不同条件下（修饰时间、蛋白质:修饰剂摩尔比、修饰温度）经 PEG 修饰后，分别行 SDS-PAGE 电泳（图 2）。电泳结果显示：在 28 kD 处有修饰蛋白条带出现，蛋白质修饰率随修饰剂摩尔比增加和时间延长上升。在蛋白质:修饰剂摩尔比为 1:10 的条件下于室温（20 ℃）反应 10 h 能够得到最高的修饰效果；而在 4 ℃条件下并未发现有修饰蛋白条带出现（图中未出示）。虽然电泳结果并未出现明显修饰率上升平台期，继续延长修饰时间或增加修饰剂浓度或许能得到更高修饰率，但考虑长时间将蛋白暴露在室温条件下，对蛋白质活性有一定影响，最终决定不再延长修饰时间或增加修饰剂浓度，将修饰条件定为：蛋白质:修饰剂摩尔比为 1:10，室温，修饰时间 10 h，修饰率约 40%。

2.3 修饰蛋白验证

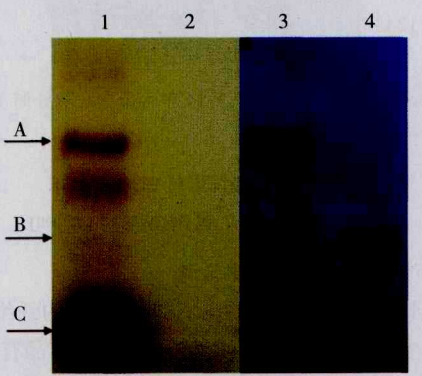
2.3.1 修饰蛋白 I_2 染色-考马斯亮蓝复染验证 I_2 染色能特异性将 PEG 成分染色而不会将蛋白质成分染色[6]，所以 I_2 染色后凝胶上只会出现修饰后目的蛋白条带、游离 PEG 条带、PEG 聚合物条带和一些杂带（图 3 中 1、2 泳道）。经过考马斯亮蓝复染后，由于蛋白质成分被染色，未修饰蛋白条带即显示出来（图 3 中 3、4 泳道）。通过前后染色的对比即可推断突变蛋白成功得到修饰。



1：marker；2：摩尔比 1:1；3：摩尔比 1:3；4：摩尔比 1:5；5：摩尔比 1:10；6：修饰时间 1 h；7：修饰时间 3 h；8：修饰时间 5 h；9：修饰时间 10 h；10：空白对照

图 2 不同条件（时间、蛋白质：修饰剂摩尔）对突变蛋白修饰结果

Fig.2 Protein pegylation under different circumstances



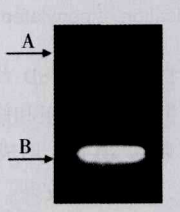
1：修饰蛋白 I_2 染色；2：未修饰蛋白 I_2 染色；3：修饰蛋白考马斯亮蓝复染；4：未修饰蛋白考马斯亮蓝复染

A 为修饰后蛋白条带，在 I_2 染色与考马斯亮蓝染色中均显示出来；B 为未修饰蛋白，在 I_2 染色中未显示条带，而经考马斯亮蓝染色后显示条带；C 为未修饰的游离 PEG 分子。由此说明，上方条带为带有 PEG 成分的蛋白质

图 3 修饰蛋白 I_2 染色与考马斯亮蓝复染

Fig.3 Identification of pegylated protein by Bal2-Coomassie blue staining

2.3.2 修饰蛋白 Western blot 验证 为了进一步验证得到的修饰蛋白确实为 peg-S-cys，对其进行 Western blot 验证。由于修饰蛋白和未修饰蛋白均含有组氨酸标签，于是使用标签抗体对其进行验证，结果显示出现两条明显条带，如图 4 所示。其中，B 条带为未修饰蛋白，A 条带为修饰蛋白，由此可证明蛋白成功得到修饰，且修饰蛋白确为 peg-S-cys。修饰蛋白 A 条带较暗可能是由于 PEG 分子拥有分子屏障效应[8]，抗 His-tag 抗体无法有效和组氨酸标签结合所致。



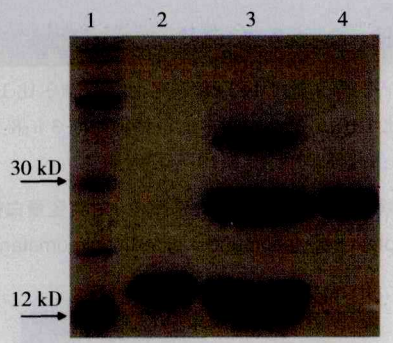
A：修饰后蛋白条带；B：未修饰蛋白条带

图 4 修饰蛋白 Western blot 验证

Fig.4 Identification of pegylated protein by Western blot

2.4 修饰蛋白的分离纯化

将修饰蛋白通过分子筛 Superdex 75 层析柱纯化分离，在 28 kD 处成功得到纯度较高的修饰蛋白(图 5)，其纯度大于 95%，完全满足后续实验要求。



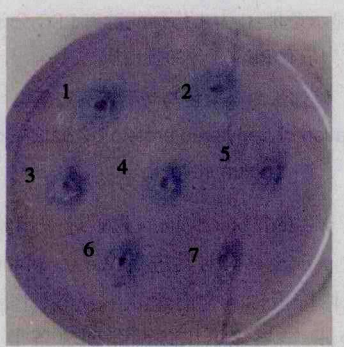
1：marker；2：修饰前蛋白；3：修饰后蛋白（未分离）；4：分子筛纯化修饰蛋白

图 5 分离后修饰蛋白 SDS-PAGE

Fig.5 Purification of pegylated protein

2.5 修饰蛋白生物活性初步验证

2.5.1 修饰蛋白体外活性验证 取配置好的纤维平板，通过调整野生型 SAK 上样量，使其与尿激酶标准品有相同的蛋白含量(图 6 中 1、2 孔)，并在 5、6 孔加入相应量的 peg-S-cys 蛋白样品。上样，于 37 ℃恒温孵育 3~4 h[9]，观察溶圈结果(图 6)。结果显示，SAK 通过改造后仍然拥有一定溶栓活性，但相比野生型，其活性有所下降。



1：尿激酶标准品 20 μL；2：野生型 S 蛋白样品 Sa；3：尿激酶标准品 10 μL；4：野生型 S 蛋白样品 Sb；5：peg-S-cys 蛋白样品 pSb；6. peg-S-cys 蛋白样品 pSa；7：BSA 缓冲液

图 6 peg-S-cys 体外活性验证

Fig.6 Activity verification of pegylated protein in vitro

2.5.2 修饰蛋白体内活性验证 将 SD 大鼠分为：空白对照组、尿激酶标准品组、野生型葡激酶组和修饰蛋白组。每组 3 只，均在 20 mV 电流下刺激 20 min 形成血栓，成栓后观察 1 h，由尾静脉注射样品，观察溶栓效果。结果如图 7 和图 8 所示(各组结果取平均值)。

结果显示，以 2 640 U/100 g 剂量注射尿激酶标准品，可以将阻塞率约 60.07%的血管疏通至阻塞率 24.41%左右，同时，等剂量的野生型葡激酶拥有与之相当的溶栓活性。相应的，修饰后的蛋白将阻塞率为 71.31%左右的血管疏通至阻塞率 57.74%左右，较野生型葡激酶活性下降约 61%，高于预期(活性下降 50%)，这可能是由于 PEG 修饰本身与实验技术、设备限制和修饰条件、修饰环境共同影响所致。结果成功证明了修饰后的 peg-S-cys 仍然保留溶栓活性。若能在更好的实验条件下对修饰环境进行优化，也许可以使修饰后蛋白保留更多溶栓活性。

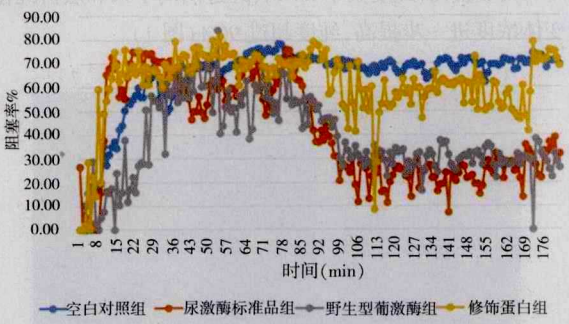


图 7 各组蛋白 SD 大鼠体内溶栓效果

Fig.7 Thrombolytic activity in SD rats

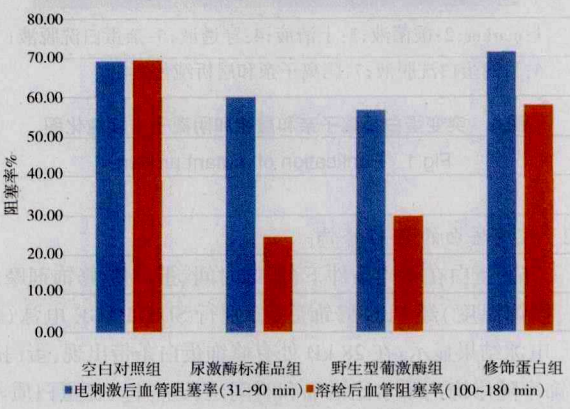


图 8 溶栓前后血管阻塞率对比

Fig.8 Comparison of vessel rcanlization ratio

3 讨 论

近年来，关于蛋白质改造的研究日益增加，蛋白质的定点突变和融合蛋白的研究得到快速发展。PEG 修饰是活化的 PEG 与蛋白质分子相偶联，不仅能将蛋白质本身的特性完整保留下来，还可使蛋白质各种生物化学性质发生改变：半衰期延长，血浆清除率降低，抵抗蛋白酶水解能力提高，免疫原性降低等[10]。PEG 修饰已迅速发展成为当今蛋白质改造的重要修饰策略[11]。本研究选择游离巯基修饰，将带有游离巯基的 PEG 修饰剂与蛋白质上的游离巯

基连接形成修饰产物。该种修饰方法具有反应效率高、反应条件温和、能够实现定点修饰等优点，适合快速高效地生产修饰位点特异的修饰产物。本课题所使用的 SAK 野生型中不含游离巯基，基于其三维结构分析，通过抗原表位定点突变为半胱氨酸的方法将游离巯基引入，实现定点 PEG 修饰[12]。修饰为较大分子量的 PEG 分子时，修饰后 PEG 分子将包裹在蛋白质分子表面，形成一层分子屏障，虽然这很好地阻碍了抗原位点的暴露，但同时遮蔽了活性位点，对蛋白质的活性有较大影响[13-14]。本研究为了达到在改造蛋白质功能的同时尽可能避免影响蛋白活性，以小分子量 PEG 分子进行修饰，实现了对抗原位点的特异性覆盖，最大限度保留了蛋白活性。

SAK拥有与链激酶相当的溶栓能力，能相对特异地作用于栓塞位点[3]；通过对基因序列的优化，实现了在大肠杆菌内高效表达，极大地降低了 SAK 的生产成本。然而，SAK 在生物体内较强的免疫反应和短暂的半衰期阻碍了其临床应用。对 SAK 进行 PEG 修饰，有望解决上述两个难题。曾有学者对其羧基端和末端氨基酸进行 PEG 修饰，但是对 SAK 的溶栓活性影响较大，而且对免疫原性的改善也很有限[15]。课题组首先实现了 S 蛋白抗原表位的定点修饰，并成功验证了修饰后蛋白存在溶栓活性。在后续实验中，我们将进一步优化修饰位点，优化修改工艺参数，评价其免疫原性和半衰期，经过进一步优化后有望获得溶栓活性强、免疫原性较弱、半衰期较长的新型溶栓药物。

参 考 文 献

[1] 罗云波，生吉萍. 食品生物技术导论[M]. 北京：中国农业大学出版社，2006.

[2] Whelan J. Beyond pegylation[J]. Drug Discovery Today，2005，10(5)：301-306.

[3] 苟冶然，周建中. 葡激酶研究进展[J]. 心血管病学进展，2014，35(6)：695-699.

[4] Chen Y，Song G，Jiang F，et al. Crystal structure of a staphylokinase variant：a model for reduced antigenicity[J]. Eur J Biochem，2002，269(2)：705-711.

[5] Collen D，De Cock F，Stassen JM. Comparative immunogenicity and thrombolytic properties toward arterial and venous thrombi of streptokinase and recombinant staphylokinase in baboons[J]. Circulation，1993，87(3)：996-1006.

[6] Collen D. Fibrin-selective thrombolytic therapy for acute myocardial infarction[J]. Circulation，1996，93(5)：857-865.

[7] 杨 可，杨 震，汪德强，等. 重组葡激酶的表达纯化及纤溶活性鉴定[J]. 重庆医科大学学报，2012，37(3)：232-235.

[8] Kurfurst MM. Detection and molecular weight determination of polyethylene glycol-modified hirudin by staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Anal Biochem，1992，200(2)：244-248.

[9] Pennica D，Holmes WE，Kohr WJ，et al. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E.coli*[J]. Nature，1983，301(5897)：214-221.

[10] Roberts MJ，Bentley MD，Harris JM. Chemistry for peptide and protein PEGylation[J]. Advanced Drug Delivery Reviews，2002，54(4)：459-476.

[11] Veronese FM. Peptide and protein PEGylation：a review of problems and solutions[J]. Biomaterials，2001，22(5)：405-417.

[12] Fee CJ，Alstine JMV. PEG-proteins：reaction engineering and separation issues[J]. Chemical Engineering Science，2006，61(3)：924-939.

[13] Vanwetsswinkel S，Plaisance S，Zhi-Yong Z，et al.Pharmacokinetic and thrombolytic properties of cysteine-linked polyethylene glycol derivatives of staphylokinase[J]. Blood，2000，95(3)：936-942.

[14] Suo XY，Lu XL，Hu T，et al. A solid-phase adsorption method for PEGylation of human serum albumin and staphylokinase：preparation，purification and biochemical characterization[J]. Biotechnol Lett，2009，31(8)：1191-1196.

[15] Mu QM，Hu T. Molecular insight into the steric shielding effect of PEG on the conjugated staphylokinase：biochemical characterization and molecular dynamics simulation[J]. PLoS One，2013，8(7)：e68559.

（责任编辑：张辉洁）