

用基因重组 α -半乳糖苷酶进行 B $\rightarrow$ O 血型改造

章扬培^① 杨 军^① 高 新^① 贾延军^① 季守平^① 宫 锋^① 任会明^①

刘泽澎^① 李素波^① 兰炯采^② 曹 琼^②

(^①军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850; ^②第一军医大学南方医院, 广州 510515. E-mail: zhangyp@nic.bmi.ac.cn)

摘要 α -半乳糖苷酶是进行 B $\rightarrow$ O 血型改造的工具酶。采用 RT-PCR 方法, 从中国海南 Catimor 咖啡豆中克隆了全长 1.1 kb 的 α -半乳糖苷酶 cDNA, 并构建了其表达载体。电穿孔法将载体导入毕赤酵母 GS115 细胞, 筛选出重组 α -半乳糖苷酶菌株。离子交换层析纯化出 α -半乳糖苷酶, 酶比活性从 15 U/mg 提高到 28.14 U/mg。进一步鉴定了酶的生物化学性质, 其 $K_m = 0.275$, $V_{max} = 0.014 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。据此确定了 B $\rightarrow$ O 血型改造的条件: pH 5.5~5.6, 每毫升红细胞使用 100 U α -半乳糖苷酶, 26 $^{\circ}\text{C}$, 4 h。经动物输血实验初步证明, 酶解反应后的通用 O 型血(enzymatically converted group O red blood cells, ECORBC)是安全的。

关键词 B $\rightarrow$ O 血型改造 重组 α -半乳糖苷酶

血型匹配是安全输血的前提。在中国人群中, O 型、A 型、B 型和 AB 型血的人分别占 32%, 30%, 28% 和 10%。血站采血、医院储血一般遵循这一比例。但在特殊情况下, 如自然灾害、恐怖袭击、突发事件、战争爆发等, 大量伤员突然出现, 急需输血, 在极短时间内打破了平时采供血的规律, 经常造成某种血型血液供不应求, 而另几种血型血液却无法应用的情况。通用的 O 型血在紧急抢救中显得十分重要。ABO 血型抗原是由红细胞表面糖链结构决定的。B 型血与 O 型血的差别仅仅是红细胞表面糖链最末端多出一个以 α -1,3-糖苷键相连接的半乳糖基。如何将这个半乳糖基去除, 是实现 B $\rightarrow$ O 血型改造的关键^[1~3]。美国纽约血液研究中心发现, 使用从咖啡豆中制备的 α -半乳糖苷酶(α -galactosidase)可以有效地清除 B 抗原最外端的 α -半乳糖, 进行 B $\rightarrow$ O 的血型改造^[4~6]。本研究用 RT-PCR 方法获得了 B $\rightarrow$ O 血型改造的工具酶——中国海南咖啡豆 α -半乳糖苷酶的 cDNA, 研究了 α -半乳糖苷酶的纯化方法, 并进行了 B $\rightarrow$ O 血型改造的实验研究。

1 材料与方法

(i) 中国海南 Catimor 咖啡豆总 RNA 的提取。采摘生长在海南兴隆的新鲜 Catimor 咖啡豆, 剥皮去壳, 于液氮中研磨, 经有机溶剂丙酮、苯酚浸提去除丹宁和色素, 用 RNAgentsTM Total RNA Isolation System (Promega 公司)试剂盒提取咖啡豆总 RNA。

(ii) α -半乳糖苷酶 cDNA 的 RT-PCR 扩增。根

据 Santos 咖啡豆 α -半乳糖苷酶 cDNA 序列, 设计与其 5' 和 3' 端匹配的上、下游引物。由于 α -半乳糖苷酶 cDNA 全长 1.1 kb, 所以在 α -半乳糖苷酶 cDNA 中间区段设计了 2 条中间引物 m3' 和 m5' (图 1)。

利用 5' 引物与 m3' 引物和 3' 引物与 m5' 引物, 反转录 PCR, 扩增出 α -半乳糖苷酶 cDNA 的 5' 端和 3' 端序列, 然后用 *Ava* I 分别切割 2 条序列, 并用 DNA 连接酶连接。最终获得了 α -半乳糖苷酶全长 cDNA。将其克隆到 pGEM-T Easy (Promega 公司)中进行序列测定。

(iii) 重组 α -半乳糖苷酶表达载体的构建。选用嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的分泌型表达载体 pPIC9K 构建 α -半乳糖苷酶的表达载体, 此载体利用乙醇氧化酶 *AOX1* 启动子调控外源基因的表达。我们在 α -半乳糖苷酶编码序列前端增加 2 个氨基酸的编码序列 AAA 和 AGA, 在下游 TGA 终止密码子后接入 *Eco*R I 酶切位点, 将 α -半乳糖苷酶 cDNA 插入到 pPIC9K 的 *Xho* I 与 *Eco*R I 酶切位点之间, 构建重组表达载体 pPIC9K-Gal (图 2)。

(iv) 毕赤酵母 α -半乳糖苷酶重组表达菌株的制备及诱导表达。pPIC9K-Gal 经 *Sal* I 酶切后, 电穿孔法(1500 V, 25 μF , 200 Ω)将目的 cDNA 导入毕赤酵母 GS115 细胞, 经 G418 和 α -半乳糖苷酶生色底物 5-溴-4-氯-3-吡啶- α -半乳糖苷(1 mg/mL, pH 6.5) 2 轮筛选, 获得毕赤酵母 α -半乳糖苷酶重组转化细胞。转化细胞接种于 BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌株密度 $A_{600 \text{ nm}}$ 为 10~20, 离心后, 将转化细胞重悬于 BMMY 培养

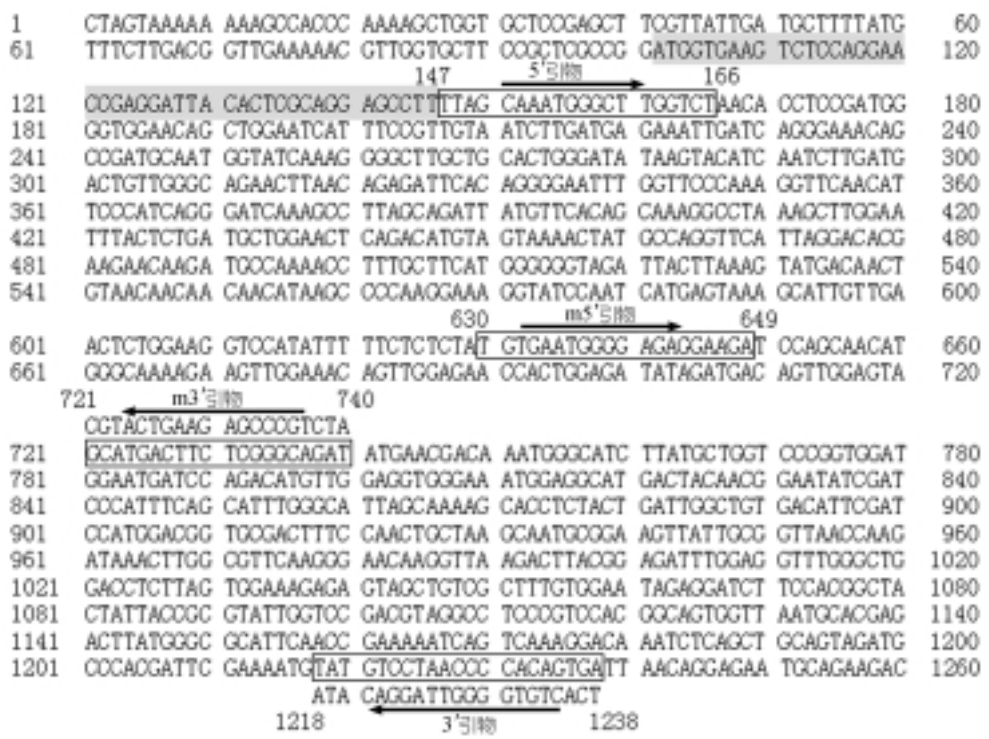


图 1 α -半乳糖苷酶 cDNA 的 RT-PCR 引物设计
阴影部分示信号肽

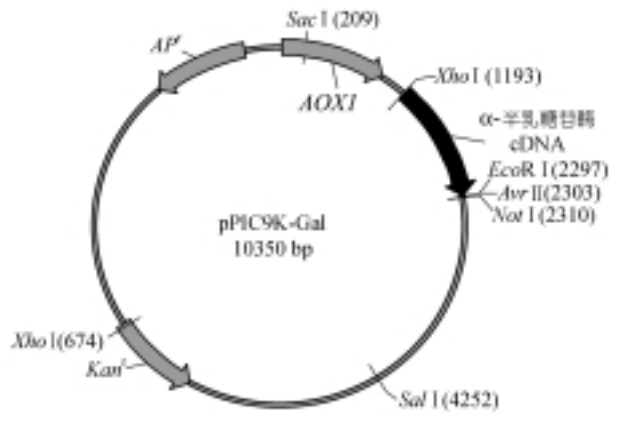


图 2 α -半乳糖苷酶重组表达载体

基中, 28℃诱导表达, 每 24 h 补加甲醇至终浓度为 0.5%, 连续观察 7 d, 每天留取样品. 10% SDS-PAGE 分析重组 α -半乳糖苷酶的表达水平.

(v) 重组 α -半乳糖苷酶的纯化. 含 α -半乳糖苷酶的培养液上清经浓缩后, 用 20 mmol/L 的 NaAc 平衡, 然后使用 Pharmacia AKTA FPLC 层析系统, 以阳离子交换介质 HiTrap SP Sepharose 纯化 α -半乳糖苷酶. 缓冲液为 20 mmol/L HAc-NaAc (pH 3.8), 最后用 15%~45% NaCl 洗脱.

(vi) α -半乳糖苷酶生化性质鉴定. 纯化的 α -半乳糖苷酶与专一底物对-硝基-苯基- α -D-吡喃半乳糖苷(1.25 mmol/L, pH 6.5)混合, 26℃温育 1 h, 硼酸钠缓冲液终止反应, 测定 $A_{405\text{ nm}}$ 值. 每一个酶活力单位定义为在此反应条件下, 每分钟水解 1 mmol/L 底物所需要的 α -半乳糖苷酶的量.

α -半乳糖苷酶的米氏常数 K_m , 最大酶促反应速度 V_{max} , 反应最适温度及最适 pH, 温度稳定性, pH 稳定性的测定按常规方法进行.

(vii) α -半乳糖苷酶酶解 B 型红细胞. 取健康人 B 型红细胞, 用等渗磷酸-柠檬酸缓冲液(pH 5.5~5.6)洗涤数次, 至 pH 平衡后, 加入纯化的重组 α -半乳糖苷酶(100 U/mL 红细胞)于 26℃进行酶解反应. 反应完成后, 用 pH 7.3 的磷酸-氯化钠缓冲液将残存的 α -半乳糖苷酶清洗干净.

(viii) 动物输血实验. 用吸收放散法鉴定广州九佛灵长类动物研究所饲养的猕猴和食蟹猴的血型. 取一只类人 B 型猕猴红细胞 3 mL, 以 50 U/mL α -半乳糖苷酶酶解类 B 红细胞, 其他酶解反应与人 B $\rightarrow$ O 酶解反应相同. 类人 B 猕猴红细胞酶解后, 输给另一只血型为类人 A 型的猕猴, 观察输血反应. 同样, 将

3 mL 经 α -半乳糖苷酶酶解后的类人 B 型食蟹猴的红细胞, 输给另一只血型为类人 A 型的食蟹猴, 观察输血反应. 评价使用 α -半乳糖苷酶酶解后的通用型血 ECORBC 进行动物输血的安全性.

2 实验结果

2.1 α -半乳糖苷酶 cDNA

咖啡豆研磨后, 经有机溶剂、RNA 试剂盒提取, 获得的咖啡豆 RNA $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.7$, 变性凝胶电泳呈现 28 S, 18 S, 5 S 三条典型的植物 RNA 条带.

RT-PCR 扩增的 5' 端序列(550 bp)和 3' 端序列(609 bp)经 *Ava* I 酶切和 DNA 连接酶连接后, 得到全长为 1.1 kb 的 α -半乳糖苷酶 cDNA(图 3).

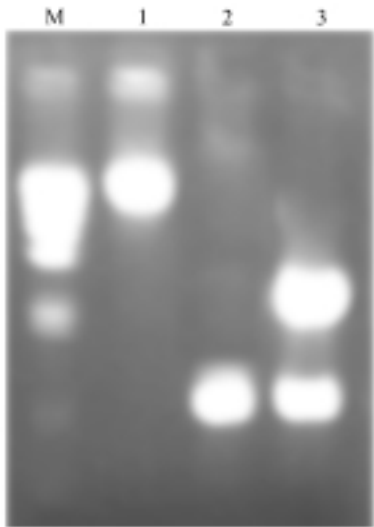


图 3 α -半乳糖苷酶 cDNA 电泳

M 示 λ DNA/*Hind* III Marker, 1 示重组菌株基因组 DNA, 2 示 α -Gal PCR 结果, 3 示 pT-Gal/*Eco*R I

α -半乳糖苷酶 cDNA 克隆到测序载体 pGEM-T Easy 中, 测序结果表明, 中国海南 Catimor 咖啡豆 α -半乳糖苷酶 cDNA 编码区序列与文献[7]报道的 Santos 咖啡豆 α -半乳糖苷酶 cDNA 有不同之处. 在 798 bp 处 T $\rightarrow$ C, 编码氨基酸相同, 均为 Leu; 在 912 bp 处 G $\rightarrow$ A, 编码氨基酸由 Ala 变为 Thr^[8]. 由于咖啡豆的品种、 α -半乳糖苷酶 cDNA 获取方法、基因和蛋白序列均与文献报道的不同, 因此, 我们申报了中国专利, 具有自主知识产权.

2.2 α -半乳糖苷酶

α -半乳糖苷酶 cDNA 经电穿孔法导入毕赤酵母 GS115, 通过 G418 和生色底物 2 次筛选, 获得了毕赤酵母 α -半乳糖苷酶重组菌株. 此菌株经连续 7 d 甲醇诱导后, 取培养液上清用 SDS-PAGE 检测, 结果显示, 重组菌株有分子量约为 41 kD 的特异表达条带, 与文献[9]报道的天然 α -半乳糖苷酶分子量相符. 上清总蛋白浓度约为 1.2 mg/mL, 酶活性为 15 U/mg (18 U/mL). 经 HiTrap SP Sepharose 层析, 纯化出 α -半乳糖苷酶, 其比活性由 15 U/mg 提高到 28.14 U/mg, 纯度提高了 1.87 倍. 纯化后的 α -半乳糖苷酶用考马斯亮蓝染色和银染均呈现单一条带(图 4).

经分析, 基因重组的咖啡豆 α -半乳糖苷酶的 $K_m = 0.275$, $V_{max} = 0.014\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 与对-硝基-苯基- α -D-吡喃半乳糖苷有很强的专一性, 酶在 26 $^{\circ}\text{C}$ 附近接近最大的反应速度, 37 $^{\circ}\text{C}$ 时最大, 50 $^{\circ}\text{C}$ 开始下降; 酶解反应最适 pH 为 6.4; 在 pH 5.5~5.6 时有很好的稳定性, 酶在 26 $^{\circ}\text{C}$ 的稳定性优于 37 $^{\circ}\text{C}$.

2.3 α -半乳糖苷酶酶解 B $\rightarrow$ O 血型改造

根据分析 α -半乳糖苷酶的生物化学特征, 确定

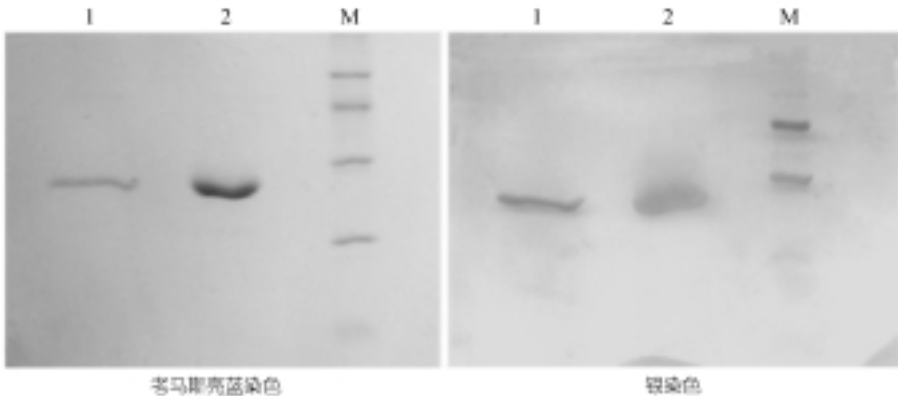


图 4 α -半乳糖苷酶纯度鉴定

1 示培养上清, 2 示纯化后的 α -半乳糖苷酶, M 示蛋白标准分子量

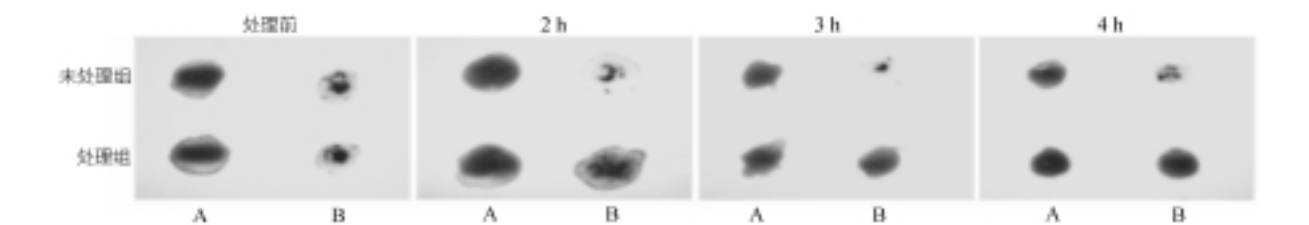


图 5 酶解前后 B 型红细胞与抗 A, 抗 B 血清的凝集反应
A 示抗 A 血清, B 示抗 B 血清

在以下条件进行 B→O 酶解实验: 26℃, pH 5.5~5.6, 等渗磷酸-柠檬酸-氯化钠缓冲液, 每毫升红细胞用 100 U α-半乳糖苷酶, 反应时间 4 h.

多次酶解实验证明, 在上述反应条件下, 酶解后的 B 型红细胞与抗 A, 抗 B 抗体均无凝集反应, 说明 B 型红细胞已改造成 O 型红细胞(图 5).

B 型红细胞, 经 100 U/mL α-半乳糖苷酶酶解后, 按 20, 200 和 400 μL 的量分别加入盛有 5 mL A, B, O 及 AB 四种血型的血液中, 模拟向体内进行少量、1 和 2 U 全血输血. 实验证明, 酶解后红细胞输注到 A, B, O 及 AB 四种血型血液中, 均未出现凝集反应和溶血现象, 而对照组未经酶解的 B 型红细胞, 与 A, O 型血液出现凝集反应. 说明酶解后的 B 型红细胞已改造成 O 型(表 1).

供体血型	受体血型			
	A	B	AB	O
B 红细胞	+	-	-	+
B→O 酶解后通用血				
20 μL	-	-	-	-
200 μL	-	-	-	-
400 μL	-	-	-	-

2.4 B→O 通用型血的结构与功能

经鉴定, α-半乳糖苷酶酶解后的通用型血的结构(渗透脆性、自身溶血、乙酰胆碱酯酶、胆固醇)、功能(ATP, 2,3-DPG, P50, 高铁血红蛋白)以及变形性等 9 项指标均与正常红细胞相同, 证明酶解制备的通用型血的结构和功能均正常.

2.5 动物输血实验

吸收放散法确定的类人 B 型猕猴、类人 B 型食蟹猴的红细胞, 经α-半乳糖苷酶酶解后, 分别回输类人 A 型的猕猴和食蟹猴, 输血后 1 h 内未出现颤抖、血尿、烦躁等急性输血反应, 持续观察 1 周, 也未发

生异常症状. 输血受血猴血常规各项指标均正常(包括红细胞总数、白细胞总数、粒细胞总数及百分数、淋巴细胞总数及百分数、中性粒细胞总数及百分数、血红蛋白、红细胞比容、红细胞平均容积、红细胞平均血红蛋白量、红细胞平均血红蛋白浓度、红细胞平均宽度、平均血小板容积、血小板总数及比容、血小板分布密度), 输血后受体猴尿常规各项指标均正常(包括红细胞, 白细胞, 管型细胞, 上皮细胞, 尿葡萄糖, 尿胆红素, 尿酮体, 比重, pH, 尿蛋白量, 尿胆元, 亚硝酸盐, 尿红细胞定性, 尿白细胞定性等). 输血后受体猴血液各项指标均正常(包括钙, 镁, 磷, 血清铁, 尿素氮, 肌酐, 总 CO₂, 葡萄糖, 尿酸, 血淀粉酶, 总胆固醇, 甘油三酯, 高密度低密度及极低密度脂蛋白, 胆固醇, 载脂蛋白 A 及 B, 总胆红素, 总蛋白, 白蛋白, 球蛋白, 谷丙转氨酶, 谷草转氨酶, 总酸性磷酸酶, 肌酸激酶, α-羟丁酸脱氢酶, 碱性磷酸酶, γ-谷氨酰转肽酶, 心型肌酸激酶, 总胆汁酸和 L-乳酸脱氢酶). 动物实验充分证明, α-半乳糖苷酶酶解改造的红细胞输注到不同血型的受试动物体内是安全的(数据未显示).

以上实验结果说明, 我们使用基因重组咖啡豆α-半乳糖苷酶, 实现了人血红细胞 B→O 的血型改造.

3 讨论

(i) 自 1900 年奥地利维也纳大学 Landsteiner 发现人类 ABO 血型系统以来, 血型检查并匹配就成为临床输血的首要程序. 红细胞血型抗原是由其表面糖链结构决定的(图 6). 从图 6 可见, B 型血红细胞表面糖链比 O 型血红细胞糖链多了一个半乳糖, A₁ 型比 O 型多了一个 N-乙酰半乳糖胺, A₂ 型则又多了几个糖. 如果将 A 型和 B 型红细胞表面抗原结构改造得与 O 型一致, 就可以实现 A→O 和 B→O 的血型转变. 从抗原结构的差异看, 可以设计制备通用 O 型血的 2 条技术路线: (1) 选择合适的工具酶, 把 A 或 B

