

人肾小球系膜细胞纤溶酶原激活物抑制物 cDNA 克隆和高效表达*

邓义斌 陈香美** 廖洪军 叶一舟 徐启河 于力方

(解放军总医院肾科, 北京 100853)

摘要 利用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)方法,从中国正常人肾小球系膜细胞总 RNA 中扩增出人纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)基因 cDNA 编码区序列,并定向亚克隆至 pUC19 质粒,克隆的 PAI-1 cDNA 去除了信号肽核苷酸序列并加入新的起始密码 ATG,编码区序列与文献报道的人内皮细胞 PAI-1 cDNA 序列完全相同.将 PAI-1 cDNA 定向亚克隆至原核表达质粒 pBV220,构建了重组 PAI-1 基因表达质粒 pBV220-PAI-1,在大肠杆菌中得到了高效表达,重组 PAI-1 蛋白表达占菌体总蛋白 45%. Western blotting 检测,在分子量约为 43.0ku 处出现一特异性蛋白质条带.对形成包涵体的表达产物进行变复性处理及 FPLC 纯化,获得纯度 97% 以上的潜伏态重组 PAI-1. 经 4 mol/L 盐酸胍激活后,重组 PAI-1 具有与天然 PAI-1 同样的生物学活性,对尿激酶型纤溶酶原激活物(u-PA)具有显著抑制活性.

关键词 人纤溶酶原激活物抑制物基因 分子克隆 高效表达 抑制活性

纤溶酶原激活物抑制物(Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)是组织型纤溶酶原激活物(t-PA)和尿激酶型纤溶酶原激活物(u-PA)的生理性特异抑制物^[1]. 在疾病状态下,PAI-1 的异常改变可以导致肾小球细胞外基质(ECM)合成与降解失衡,引起肾小球 ECM 积聚、肾小球硬化等病理变化,是最终进展为肾功能衰竭的重要病理生理因素. 肾小球系膜细胞是肾小球硬化进程中的特殊间质效应细胞,是肾小球 ECM 合成的主要部位,在 PAI-1 介导的 ECM 降解中起重要调控作用^[2].

近年,国外报道了用来源于人内皮细胞 PAI-1 基因在大肠杆菌中表达后,得到可溶性状态的 PAI-1,但均未获得高表达量,难以满足研究与应用的需^[3-5]. 因此,有必要利用基因工程技术获得大量 PAI-1. 本项研究利用培养的人肾小球系膜细胞,在国内首次克隆了人 PAI-1 cDNA,构建了原核表达质粒,并获得了高效表达. 为阐明 PAI-1 在肾小球硬化发生发展中的作用与机制,为研究 PAI-1 的结构与功能及其 PAI-1 的应用,提供了物质基础.

1997-02-27 收稿

* 中国人民解放军“九五”重点课题基金(96Z056),国家自然科学基金优秀中青年人才基金资助项目(批准号:39400061)

** 联系人

1 材料与方法

1.1 材料

RNAzolTMB 购自美国 TEL-TEST INC, 蛋白质标准分子量为 Amersham 公司产品, 实验中所用的逆转录酶、各种限制性内切酶、T₄ 连接酶等购自 Promega 公司, GeneClean 试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, Taq plus II DNA 聚合酶购自加拿大 Sangon 公司. pUC19 质粒由本室保存, pBV220 质粒由中国预防医学科学院病毒基因工程国家重点实验室张智清教授惠赠, 抗人 PAI-1 单克隆抗体由北京大学生命科学院胡美浩教授惠赠, 大肠杆菌 DH5 α 来自美国 Vanderbilt 大学.

1.2 引物设计与合成

根据文献[6]报道的内皮细胞来源的人纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)核苷酸序列设计引物由美国 Cybersyn 公司合成. 5'端引物为: 5'-AGGAATTCATGGTGCACCATCC-CCCATCCT-3'(30mer, 196~214), 3'引物为: 5'-CGGGATCCTCAGGGTTCATCACTTG-3'(25mer, 1335~1318). 在5'端引物设计中去掉N末端信号肽序列, 并加入EcoR I酶切位点和起始密码ATG, 在3'端引物终止密码后设计了BamH I酶切位点(划线部分).

1.3 人系膜细胞 RNA 的提取、RT-PCR 及产物酶切图谱分析、鉴定

按照本室常规方法培养正常人系膜细胞, 取第4代培养的系膜细胞, 用RNAzolTMB提取细胞总RNA. 经M-MLV逆转录酶合成cDNA第1链, 然后进行PCR. PCR条件: 变性94℃, 30 s; 退火65℃, 45 s; 延伸72℃, 90 s, 共30次循环后, 于72℃延伸5 min. PCR产物长度应为1162bp(含酶切位点). 计算机分析人PAI-1基因编码区酶切位点如下: EcoR I, Sac I (253, 909bp); Sac I, Sal I (605, 256, 306bp); Sal I, BamH I (291, 871bp). 分别用相应限制性内切酶酶切RT-PCR产物, 以证明PAI-1cDNA酶切图谱的正确性.

1.4 PAI-1 cDNA 基因克隆及亚克隆

按分子克隆手册^[7]进行, 将PAI-1 cDNA片段酶切后克隆至pUC19, 获得重组质粒pUC19-PAI-1, 3个亚克隆pUC19-PAI-ES, pUC19-PAI-SS和pUC19-PAI-SB(图1).

1.5 DNA 序列分析

用PE公司生产的DyeDeoxyTM terminator cycle sequencing kit, 以正反pUC19通用引物分别对3个亚克隆插入片段进行核苷酸序列分析, 测定具体方法参照373A自动测序仪操作手册进行. DNA分析软件分析测定结果.

1.6 原核表达质粒的构建

用EcoR I和BamH I双酶切pUC19-PAI-1和pBV220质粒, GeneClean回收PAI-1 cDNA和pBV220, 将PAI-1 cDNA片段定向克隆至pBV220, 转化感受态大肠杆菌DH5 α , 筛选重组子, 制备质粒DNA, 酶切鉴定有无插入片段, 构建原核表达质粒pBV220-PAI-1(图2).

1.7 重组 PAI-1 的表达及产物的分离

pBV200-PAI-1菌株(DH5 α)在含有50 μ g/mL氨苄青霉素的LB培养基中, 30℃培养12 h后, 按1:50放大培养至A_{600nm}为0.3~0.4, 立即转到热诱导温度为42℃继续培养6 h. 离心收集菌体, 用溶菌酶和超声波破碎细菌. 离心收集包涵体, 0.05 mol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素

(pH8.0)溶解包涵体,经变、复性处理,透析去除尿素,获得重组 PAI-1 的粗提液。粗提液经快速蛋白液相分离仪(FPLC), Superose 12 凝胶分子筛柱纯化。

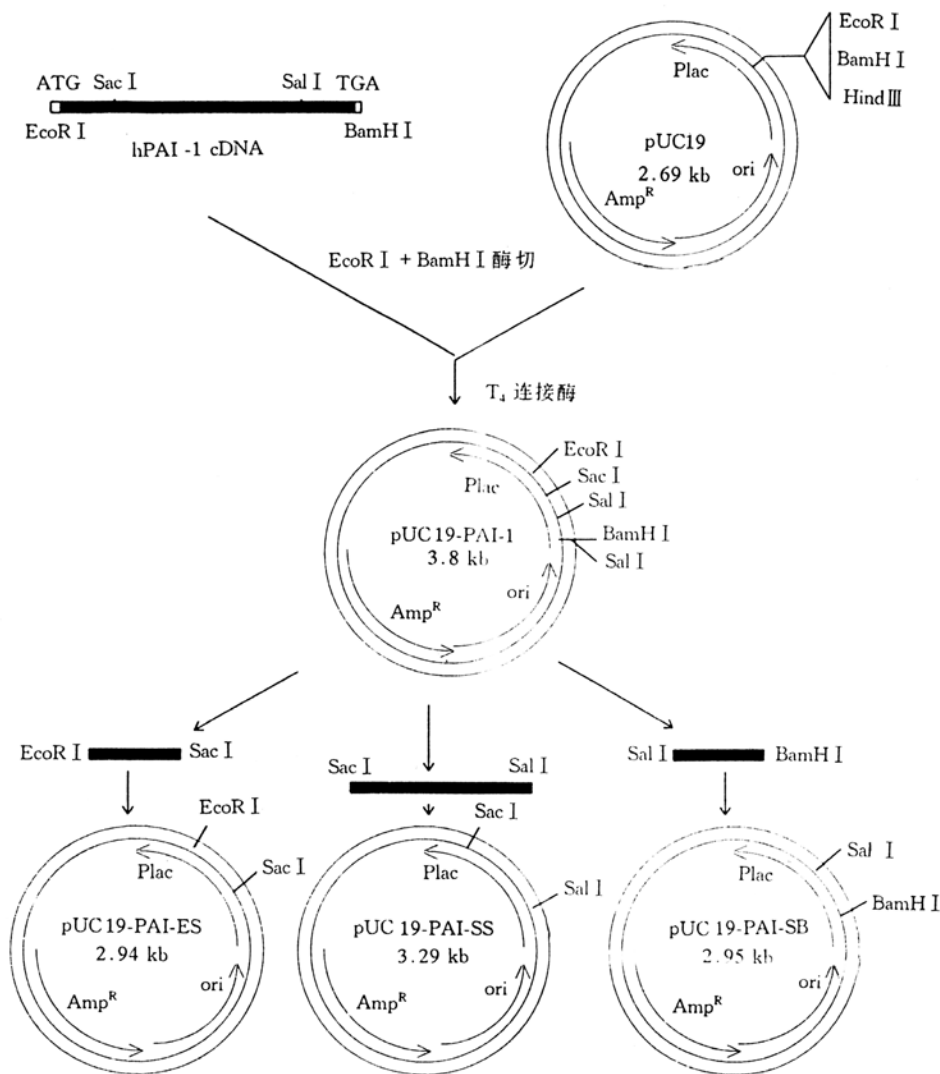


图1 pUC19-PAI-1 重组质粒及其亚克隆构建示意图

1.8 SDS-PAGE 及 Western blotting^[7]

15%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)对表达细菌的全菌体、溶解上清液及包涵体等成分进行鉴定薄层扫描进行含量与纯度分析。

Western blotting:经 SDS-PAGE 电泳后的凝胶与硝酸纤维素滤膜相贴,在冷室恒流 100 mA,转移 12 h,将蛋白质转印到硝酸纤维素滤膜,经 3% 小牛血清白蛋白封闭,加入 PAI-1 的单克隆抗体,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG,显色检测。

1.9 重组 PAI-1 生物学活性分析

一定量的重组 PAI-1 经 4 mol/L 盐酸胍在 37℃ 激活后,与等量 u-PA 混合,25℃ 反应 30

min 后,加入纤维蛋白测定,37℃ 恒温 14~16 h,检测残留 u-PA 活性.

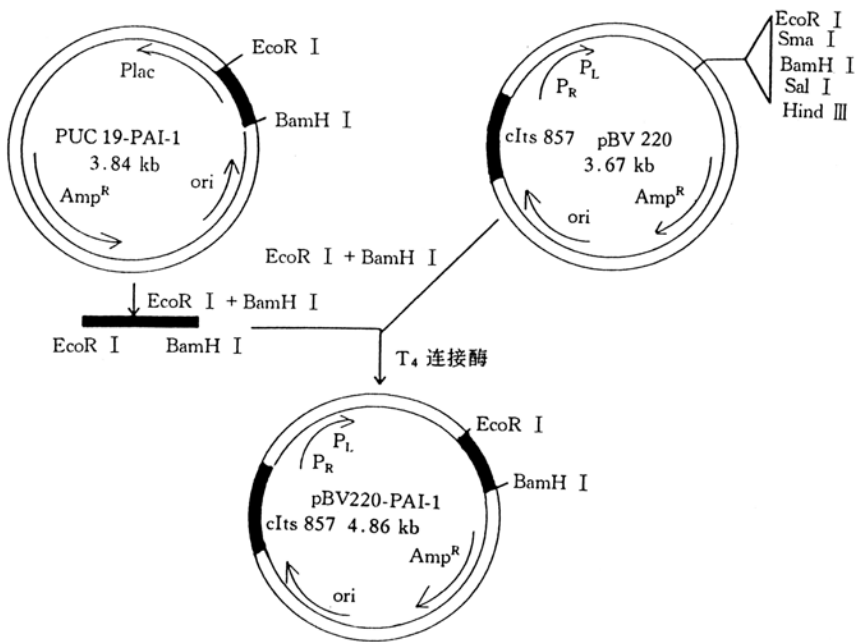


图 2 pBV220-PAI-1 重组质粒构建示意图

2 实验结果

2.1 RT-PCR 反应扩增人 PAI-1 cDNA

PCR 产物电泳显示约在 1.2 kb 处出现特异的扩增条带,而总 RNA 不经 RT,直接 PCR,电泳结果未见任何条带. RT-PCR 产物用 Sa I 和 Sac I 酶切,切出 605,256 和 306 bp 片段.

2.2 人 PAI-cDNA 克隆及亚克隆

PCR 产物经 EcoR I 和 BamH I 酶切后电泳, GeneClean 方法回收约 1.2 kb 的 DNA 片段,定向克隆至同样双酶切的质粒 pUC19,获得重组质粒 pUC19-PAI-1. EcoR I 和 BamH I 酶切鉴定重组子有约 1.2 kb 的插入片段. 全长 cDNA 片段经限制性内切酶 EcoR I 和 Sac I, Sac I 和 Sal I, Sal I 和 BamH I 分别酶切后,获得待克隆 252,605 和 299 bp 片段,定向克隆至相应酶切的质粒 pUC19,获得亚克隆质粒 pUC19-PAI-ES, pUC19-PAI-SS 和 pUC19-PAI-SB,并经酶切图谱确认.

2.3 序列分析

373A 自动测序仪测序结果表明,克隆的 PAI-1 cDNA 去掉了 5'端信号肽序列,加入了新的起始密码 ATG,并保持原 PAI-1 cDNA 自信号肽之后到终止密码的阅读框架. 克隆的中国人肾小球系膜细胞 PAI-1 cDNA 序列与文献报道的人内皮细胞完全相同(图 3).

2.4 原核表达质粒 pBV220-PAI-1 的构建及鉴定

选择 DNA 测序鉴定的 pUC19-PAI-1,经 EcoR I 和 BamH I 酶切,获得 PAI-1 EcoR I - BamH I 片段,定向插入 pBV220 多克隆位点 EcoR I 和 BamH I 之间,获得重组质粒

pBV220-PAI-1,酶切证实有约 1.2 kb 插入片段.

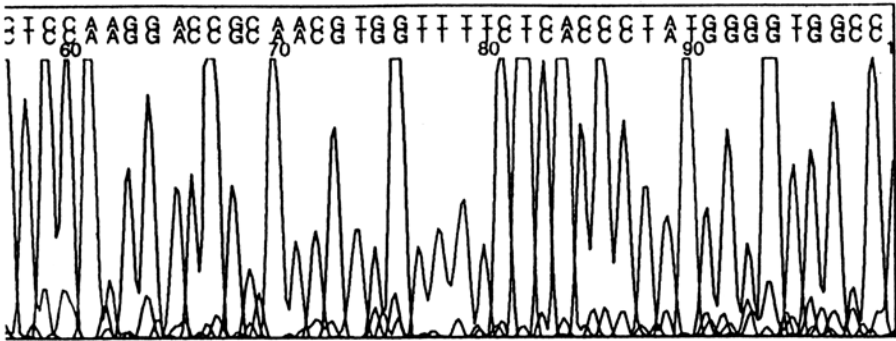


图 3 人 PAI-1 cDNA 自动测序部分激光扫描图

2.5 重组 PAI-1 SDS-PAGE 及 Western blotting

SDS-PAGE(图 4)表明质粒 pBV220-PAI-1 经 42℃ 热诱导后, 约在 43ku 处有一特异蛋白质条带, 不含 PAI-1 基因的质粒 pBV220 则无该特异蛋白质条带. 凝胶薄层扫描分析表明, 重组 PAI-1 的最高表达量约占菌体总蛋白量的 45%. 经 Western blotting(图 4 带 2)检测, 重组 PAI-1 的蛋白条带位于分子量约为 43ku 证明重组蛋白的特异性.

2.6 重组 PAI-1 的生物学活性

经盐酸胍激活后的重组 PAI-1 对 u-PA 有明显的抑制活性, 并有一定的剂量依赖性, 未激活的 rPAI-1 对 u-PA 无抑制活性(图 5).

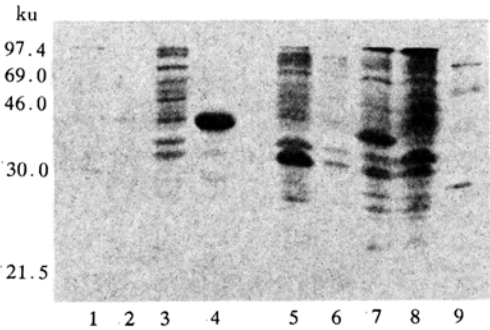


图 4 重组 PAI-1 SDS-PAGE 及 Western blotting 结果

1 为标准分子量;2 为重组 PAI-1 Western blotting;3 为含 pBV220-PAI-1 质粒在 42℃ 诱导的大肠杆菌裂解物上清液;4 为含 pBV220-PAI-1 质粒在 42℃ 诱导的大肠杆菌包涵体裂解物;5 为不含 pBV220-PAI-1 质粒在 42℃ 诱导的大肠杆菌裂解物;6 为不含 pBV220-PAI-1 质粒在 30℃ 诱导的大肠杆菌裂解物;7 为含 pBV220-PAI-1 质粒在 42℃ 诱导的大肠杆菌裂解物;8 为含 pBV220-PAI-1 质粒在 30℃ 诱导的大肠杆菌裂解物;9 为标准分子量

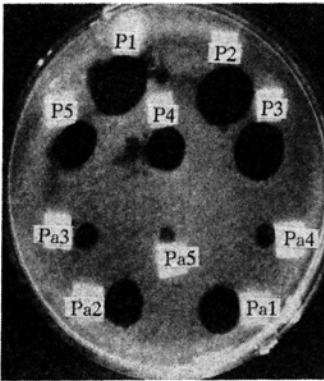


图 5 纤维蛋白平板法测定 u-PA 与重组 PAI-1 作用后的残留活性分析
P1~P5 为 0.03IU u-PA 分别与 0, 20, 40, 60 和 80ng 未激活的重组 PAI-1 作用; Pa1~Pa5 为 0.03IU u-PA 分别与 0, 20, 40, 60 和 80ng 激活的重组 PAI-1 作用

3 讨论

3.1 PAI-1 cDNA 克隆与序列分析

Pannekoek 等^[6,8,9] 3 个实验室首先从抗 PAI-1 单克隆抗体着手,分别从人内皮细胞 cDNA 文库筛选出 PAI-1 cDNA 阳性克隆; PAI-1 cDNA 全长 2 868 bp,包括 69 bp 的 5'端非编码区,1 206 bp 开放阅读框架序列和 1 590 bp 的 3'端非编码区. PAI-1 基因的初产物是 1 条由 402 个氨基酸残基组成的 pre-PAI-1 多肽,由 23 个氨基酸残基的信号肽和 379 个氨基酸残基的成熟 PAI-1 组成.

我们首次利用 RT-PCR 方法从培养的中国人肾小球系膜细胞克隆了 PAI-1 cDNA 核苷酸编码序列,共 1 137 bp(不含信号肽),分析了克隆的中国人肾小球系膜细胞 PAI-1 核苷酸序列,结果证实,与文献报道的人内皮细胞完全相同.

3.2 PAI-1 基因在大肠杆菌的高效表达

近年,国外曾报道了 PAI-1 基因在大肠杆菌中的表达,重组 PAI-1 以可溶性状态存在,但均未达到高表达量,低于菌体总量的 10%^[2~4]. 本实验选用了预防医学科学院病毒研究所构建的含 P_RPL 启动子的原核表达质粒 pBV220,经 42℃ 诱导,获得了 PAI-1 基因在大肠杆菌的高效表达,结果表明重组 PAI-1 表达量占菌体总蛋白 45% 以上. 我们在克隆人的 PAI-1 cDNA 去掉 N 端信号肽核苷酸序列,加入了新的起始密码 ATG 和 EcoR I 酶切位点,使得 PAI-1 cDNA 能以最佳 SD 距离插入质粒 pBV220 多克隆位点 EcoR I,这可能是 PAI-1 基因获得高效表达的关键,在研究中发现,大肠杆菌 DH₅ α 表达的 rPAI-1 既存在于可溶性蛋白成分中,也形成不溶性的包涵体(图 4). 包涵体的形成,有利于表达产物的分离、纯化,但其中的重组蛋白不具有天然的构象和活性,必须经过变性剂和氧化还原剂处理,才能得到有天然构象和生物学活性的重组产物. 包涵体经初步分离, rPAI-1 可达总蛋白 85% 以上,经 FPLC 纯化后,可获得 97% 以上的 rPAI-1. PAI-1 不含有半胱氨酸,不形成二硫键,因此,在大肠杆菌表达的 rPAI-1 复性比较容易,实验证实 rPAI-1 经 8 mol/L 尿素处理过夜,透析去除尿素,即可达到很好的复性.

3.3 重组 PAI-1 分子的存在状态与生物学特性

天然 PAI-1 分子含 379 个氨基酸,分子量为 50.0ku. 利用大肠杆菌得到的重组 PAI-1,以非糖基化形式存在,分子量约为 43.0ku, PAI-1 活性中心的氨基酸为 Arg346-Met347,它可以与 t-PA 或 u-PA 活性中心的丝氨酸发生不可逆的共价结合,形成对 SDS 稳定的复合物,导致 t-PA 或 u-PA 失活. PAI-1 分子有 3 种存在状态,即活性态(active form),潜伏态(latent form)和底物态(substrate form). 只有活性态的 PAI-1 可以抑制 t-PA 或 u-PA,潜伏态的 PAI-1 不能与 t-PA 或 u-PA 结合. 底物态的 PAI-1 是近期发现的一种非天然的 PAI-1 形态,不能抑制 t-PA 或 u-PA,但可以被 t-PA 或 u-PA 从 Arg346-Met347 之间的肽键切开,形成不能再被活化的低分子量 PAI-1 降解物. 活性态、潜伏态和底物态的 PAI-1 是同一分子的 3 种存在形式,通过构象的改变相互转化,而不需要肽键的断裂或修饰^[10]. 从人的内皮细胞中得到的 PAI-1 主要为潜伏态. 大肠杆菌合成的重组 PAI-1,以活性态或潜伏态存在的情况均有报道. 本项研究得到的分子量约为 43.0ku 的重组 PAI-1 经变性剂盐酸胍激活后,能够显示对 u-PA 的特异性抑制作用,在 37℃ 恒温过程中,一部分活性态 PAI-1 自发转变为潜伏态 PAI-1,

未经变性剂激活的重组 PAI-1 对 u-PA 无抑制作用,提示从大肠杆菌得到的重组 PAI-1 多数以潜伏态存在。重组 PAI-1 经激活后,具有与天然 PAI-1 同样的生物学特性,并且能够在潜伏态和活性态之间转变。已有研究证明,PAI-1 是否糖基化对其生物学活性并无显著影响^[11]。因此,从大肠杆菌获得大量具有生物学活性的重组 PAI-1 是一条经济、简便的重要途径。

致谢 北京大学生命科学院胡美浩教授在实验中曾给予帮助,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Sprenger E K, Kluft C. Plasminogen activator inhibitor. *Blood*, 1987, 69:381~387
- 2 Wong A P, Cortez S L, Baricos W H. Role of plasmin and gelatinase in extracellular matrix degradation by cultured rat mesangial cells. *Am J Physiol*, 1992, 263(6 Pt2):F 1 112~1 118
- 3 Reilly T M, Seetharam R, Duke J L, et al. Purification and characterization of recombinant plasminogen activator inhibitor-1 from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1990, 265:9 570~9 574
- 4 Sisk W P, Davis G L, Kingsley D, et al. High-level synthesis of biologically active human plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1) in *Escherichia coli*. *Gene*, 1990, 96:305~309
- 5 Seetharam R, Dwivedi A, Duke J L, et al. Purification and characterization of active and latent forms of recombinant plasminogen activator inhibitor 1 produced in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1992, 31:9 877~9 882
- 6 Pannekoet H, Veerman H, Lambers H, et al. Endothelial plasminogen activator inhibitor(PAI): a new member of the serpin gene family. *The EMBO Journal*, 1986, 5:2 539~2 544
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 8 NY T, Sawdey M, Lawrence D, et al. Cloning and sequence of a cDNA coding for the human β -migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83:6 776~6 780
- 9 Ginsburg D, Zeheb R, Yang A Y, et al. cDNA cloning of human plasminogen activatorinhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest*, 1986, 78:1 673~1 680
- 10 Declerck P J, Demolm M, Vaughan D E, et al. Identification of a conformationally distinct form of plasminogen activator inhibitor-1 acting as a noninhibitory substrate for tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem*, 1992, 267:11 693~11 696
- 11 Reilly T M, Mousa S A, Seetharam R, et al. Recombinant plasminogen activator inhibitor type I: a review of structural, functional, and biological aspects. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1994, 5:73~81