

t-PA 在昆虫细胞中的表达^{*}

刘军波¹, 杨 凯², 庞 义², 李宝健¹

(1. 中山大学生物工程研究中心, 广东 广州 510275;

2. 中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 将含完整阅读框架的人 t-PA (tissue-type plasminogen activator, t-PA) cDNA 克隆至昆虫细胞表达转移载体 pBacPAK8 中, 获得重组质粒 pBac-tPA. 应用脂质体共转染法, 将 pBac-tPA 和线性化杆状病毒 BacPAK6 DNA 共转染 Tn-5B-1 昆虫细胞. 经空斑筛选获得 11 株重组病毒. 经 PCR 鉴定与生物活性测定, 获得一株高效表达 t-PA 的重组病毒 BacPA3. t-PA 表达活性在感染 (MOI $\approx$ 10) 后 72 h 左右达到最高, 为 3.04×10^3 IU/mL. 经 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影分析, 相对分子质量为 68 000 左右.

关键词: t-PA; 杆状病毒; 昆虫细胞表达

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A

人组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 的主要生物学功能是激活纤溶酶原使之转变成纤溶酶, 后者能够降解血栓基质物质纤维蛋白, 从而使血管再通. t-PA 与纤维蛋白有较强的亲和力, 能特异性地激活血栓中的纤溶酶原, 不易引起系统性纤溶状态, 是一种非常理想的溶栓药物, 但 t-PA 在组织或体液中含量甚微, 从天然组织中提取不切实际, 唯有基因工程才是最有效的途径. 成熟 t-PA 是由 527 个氨基酸组成的大分子糖蛋白, 含 17 对二硫键及三个糖基化位点, 结构较复杂, 原核表达系统很难获得有活性的 t-PA^[1], 在许多哺乳动物, 如仓鼠、小鼠和猴细胞中的表达效率也都较低^[2]. 杆状病毒载体表达系统具有完备的翻译后加工修饰系统, 使得重组蛋白能够正确折叠, 形成二硫键、多聚体, 并模拟其自然状态下的翻译后加工, 从而具有天然的生物活性. 此外, 杆状病毒多角体蛋白基因启动子是迄今所发现的最强真核生物基因启动子之一, 外源基因插入其下游能够得到高效表达, 其表达水平 (0.5~500 mg/mL)^[3] 也大大优越于其他表达系统. 目前已成为最有应用前景的真核基因高效表达载体系统之一. 已有数百种外源基因在昆虫细胞中获得表达^[4]. 本实验首先构建了含 t-PA cDNA 杆状病毒转移载体, 通过共转染、空斑筛选获得重组病毒, 将其感染昆虫细胞, 经纤维蛋白板溶圈法和 S2390 底物生色法测定活性、SDS-PAGE 纤维蛋白自显影测定相对分子质量, 证实表达产物为重组 t-PA.

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌种、细胞株及质粒 JM109 由中山大学生物工程研究中心保存. Tn-5B-1 昆虫细

^{*} 基金项目: 华南生物科学与技术研究中心科技资助项目

收稿日期: 1999-12-10; 作者简介: 刘军波 (1971~), 男, 博士.

胞由中山大学生物防治国家重点实验室保存, 27 °C 培养于含 φ 为 5% 胎牛血清的 Grace's 培养基中. 杆状病毒表达转移载体 pBacBAK8 及 BacPAK6 病毒线性 DNA (Bsu 361 酶切) 购自 Clontech 公司. PXa-tPA 为含 t-PA cDNA 的克隆载体, 由刘军波构建.

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Bam*H I、*Not* I、*Bgl* II 和 *Sac* I 购自 Promega 公司. WizardTM Minipreps DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司. NucleiCleanTM 核酸快速纯化试剂盒购自 Sigma 公司. 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、Tris、甘氨酸、*D*-Val-Phe-Lys *p*-Nitroanilide (S2390) 和胰蛋白酶抑制剂购自 Sigma 公司. 标准 t-PA 购自 Chromogenix 公司. 纤溶酶原、纤维蛋白原购自 Calbiochem 公司. 凝血酶、富含纤溶酶原的牛纤维蛋白原购自中国医学科学院血液学研究所科技公司.

1.2 方 法

1.2.1 质粒纯化 按照 WizardTM Minipreps DNA 纯化试剂盒说明书操作.

1.2.2 DNA 回收 参照 NucleiCleanTM 核酸快速纯化试剂盒操作说明书.

1.2.3 重组病毒的构建 按照 BacPAKTM 杆状病毒表达系统说明书进行.

1.2.4 t-PA 活性测定 方法 1: 纤维蛋白板溶圈法, 参见文献 [5]; 方法 2: S2390 底物生色法, 参见文献 [6].

1.2.5 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影 参见文献 [7].

2 结果与讨论

2.1 pXa-tPA 构建与鉴定

根据 Pennica 等^[8] 发表的 t-PA cDNA 序列, 在其 5' 端和 3' 端设计了一对引物: 5' -AGGGACGCTGTGAAGCAAT-3' 和 5' -TTTGAGGAGTCGGGTGTTCC-3'. 通过 RT-PCR 技术从人黑色素瘤 Bowes 细胞总 RNA 中扩增出一条 1.7 kb 左右的 DNA 片段, 将其与 Pinpoint XaI T-载体相连, 转化 JM109 受体菌. 经酶切鉴定获得正向相连的重组质粒 pXa-tPA (图略). 测序结果表明, 获得的 DNA 片段与 Pennica 等^[8] 发表的 t-PA cDNA 序列完全一致, 含编码前导肽、信号肽及成熟肽的核苷酸序列 (测序结果略).

2.2 杆状病毒转移载体 pBac-tPA 的构建

将 pXa-tPA 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切, 回收 1.7 kb 左右的片段. 然后将此片段和同样由 *Bam*H I 和 *Not* I 酶切的线性杆状病毒转移载体 pBacBAK8 相连, 转化受体菌 JM109.

挑取克隆, 制备质粒, 经酶切鉴定, 得到重组质粒 pBac-tPA (图略). 该质粒经 *Bgl* II 酶切获得 5.6 kb 和 1.6 kb 两条带, 经 *Bam*H I 酶切获得一条 7.2 kb 带, 经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切获得 5.5 kb 和 1.7 kb 两条带 (图略).

2.3 重组病毒的获得及筛选

采用脂质体共转染法, 将转移载体 pBac-tPA 和经 Bsu 361 酶切的线性化野生型 BacPAK6 病毒 DNA 共同转染 Tn-5B-1 昆虫细胞株. 经过同源重组, 多角体蛋白基因启动子及其下游的 t-PA cDNA 转移至病毒基因组中, 形成重组病毒 (图略).

为了获得单个纯的重组病毒以利于以后的表达过程, 对共感染后的重组病毒混合液进行了三轮空斑筛选. 从中挑取 11 个空斑, 分别感染 Tn-5B-1 细胞后, 提取细胞总 DNA 进行 PCR 鉴定 (图 1), 并取上清分别进行活性测定. 最终筛选出表达活性最高的 3 号重组

病毒 BactPA3.

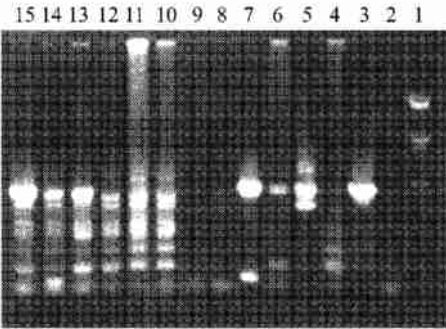


图 1 重组病毒 PCR 鉴定图

Fig 1 PCR identification of recombinant virus

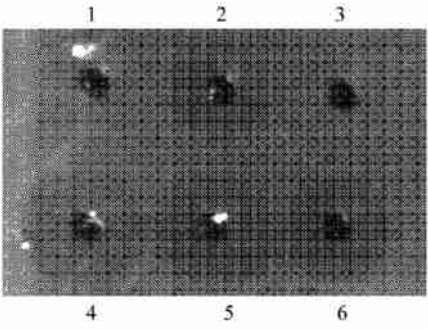


图 2 纤维蛋白板溶圈法测定表达产物的 t-PA 溶栓活性

Fig 2 Fibrin agarose plate assay for t-PA fibrinolytic activity

1 阴性对照; 2 标准 t-PA (20 μ L); 3 感染 BactPAK6 病毒的 Tn-5B1-4 昆虫细胞培养液; 4 5 感染 BaPA 的昆虫细胞培养液; 6 标准 t-PA (20 μ L)

2.4 t-PA 的分泌表达

对感染重组病毒 BactPA3 的细胞培养液上清进行纤维蛋白板溶圈法生物活性测定, 证实上清中具有溶栓活性, 说明 t-PA cDNA 获得了表达 (图 2). 收集感染重组病毒 BactPA3 的昆虫细胞, 经超声波破碎后, 取上清, 应用纤维蛋白板溶圈法测定 t-PA 生物活性. 结果未发现有生物活性, 说明 t-PA 基因在昆虫细胞中的表达属分泌型表达.

2.5 t-PA 表达动力学

将重组病毒 BactPA3 以病毒感染复数 (MOI) 为 10 左右感染细胞, 经吸附 1 h 后, 吸弃病毒液, 换以新鲜培养基. 每隔 12 h 取出 10 μ L 上清进行活性测定. 为准确定量, 采用 S2390 底物生色法. 图 3 为表达活性与感染后时间曲线图. 从图中可看出, 在感染后 24 h 左右 t-PA 才有所表达; 在感染后 36 ~ 60 h 期间, t-PA 生物活性迅速增加; 在感染后 72 h

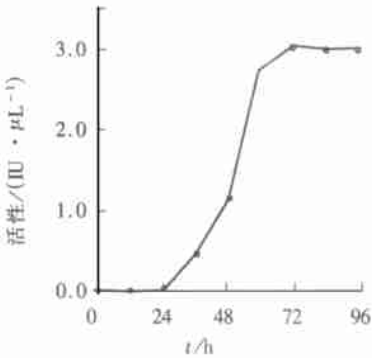


图 3 受感细胞中 t-PA 表达动力学

Fig 3 The kinetics of t-PA in insect cells

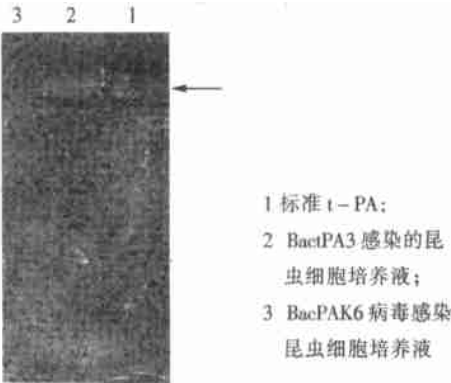


图 4 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影

Fig 4 SDS-PAGE fibrinogen autoradiography

左右表达量达到最高; 在此之后表达量有所下降. 在感染后 72 h 左右, t-PA 表达量最高为 3.04×10^3 IU/mL.

2.6 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影分析

为进一步证实表达产物的生物学活性和相对分子质量, 采用 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影方法. 图 4 为表达上清与标准 t-PA 的 SDS-PAGE 纤维蛋白自显影结果, 从中看出, 在感染野生型病毒 BacBAK6 的对照上清中无任何溶带, 而在感染重组病毒 BactPA3 的无血清培养液中则出现一条与标准 t-PA 相近的溶带. 表明表达的 t-PA 具有溶栓活性, 且相对分子质量与标准 t-PA 相近, 为 68 000 左右.

参考文献:

- [1] 熊凌霄, 黄凌霄, 董陆佳, 等. 组织型纤溶酶原激活剂 cDNA 在大肠杆菌中的表达研究[J]. 军事医学科学院院刊, 1994, 18: 249 ~ 252.
- [2] 欧阳应斌, 黄培堂, 徐秀英, 等. t-PA cDNA 在 CHO 细胞中的高效表达[J]. 生物技术通讯, 1995(6): 11 ~ 15.
- [3] 张力, 侯纬敏. 杆状病毒表达载体系统[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(5): 343 ~ 348.
- [4] LUCKOW V A, SUMMERS M D. Trends in the development of baculovirus expression vectors[J]. Biotechnology, 1988(6): 47 ~ 55.
- [5] GRANELLI-PIPERNO A, REICH E T. A study of protease and protease-inhibitor complexes in biological fluids[J]. J Exp Med, 1978, 148: 223 ~ 234.
- [6] SCHNYDER J, MARTIN R, COOPER P H, et al. Spectrometric method to quantify and discriminate urokinase and tissue-type plasminogen activators[J]. Anal Biochem, 1992, 200: 156 ~ 162.
- [7] 刘士辉, 朱恒奇, 徐秀英, 等. SDS 聚丙烯酰胺电泳纤维蛋白自显影法检测不同分子量的纤溶酶原激活剂[J]. 中国应用生理学杂志, 1994(10): 367 ~ 368.
- [8] PENNICA D, HOLMES E W, KOHR J W, et al. Cloning and expression of human t-PA cDNA in *E. coli*[J]. Nature, 1983, 301: 214 ~ 221.

Expression and Characterization of t-PA in Insect Cells

*
LIU Jun-bo, YANG Kai, PANG Yi, LI Bao-jian

Abstract: The t-PA cDNA containing whole reading frame was inserted into the transfer vector pBac-PAK8. The constructed pBac-tPA contransected Tn-5B1-4 insect cells with the linear BacPAK6 virus DNA by lipofectin-mediated transfection method. Eleven pure recombinant viruses were isolated by plaque assay, and one of them, nominated BactPA3, was selected by using PCR identification and biological activity comparison. The activity of expressed t-PA reached the highest level at 72 hours post-infection. The activity was 3.04×10^3 IU/mL. SDS-PAGE fibrin autography showed that the molecular weight of the expressed t-PA was about 68 000.

Keywords: t-PA; baculovirus; insect cell expression