

N-末端引入 RGD 序列的葡激酶突变体表达、纯化及性质研究^①

狄静芳^② 贺进田^③ 徐瑞光 陈 希 赵宝华^③

(河北师范大学生命科学学院 石家庄 050016)

摘 要 为解决葡激酶存在的溶栓后再栓塞问题,利用 PCR 介导的定点突变技术,在野生型葡激酶(wt-SAK)N-末端的第 3、4 位氨基酸之间插入 Arg-Gly-Asp(RGD)序列构建了葡激酶突变体 MD2-SAK,另将 N-末端的前 3 位氨基酸替换为 RGD 序列构建了葡激酶突变体 MD4-SAK。将突变体基因分别连接表达载体 pBV220,转化大肠杆菌 DH5 α ,经过热激诱导后,突变体均以可溶性形式得到高效表达,表达蛋白占菌体总蛋白的 50% 以上。破菌上清液通过 SP-Sepharose FF、Sephadex G-50 和 Q-Sepharose FF 三步连续的色谱层析纯化得到纤溶活性分别为 10.1×10^4 AU/mg、 11.2×10^4 AU/mg,纯度均大于 96% 的突变体蛋白。进一步研究了突变体的性质,结果表明葡激酶突变体不仅保留了野生型葡激酶的纤溶酶原激活活性,并具有较强的抗血小板聚集活性。同时发现,葡激酶突变体的 N-末端序列会影响其 N-末端甲硫氨酸的酶切加工。

关键词 葡激酶, Arg-Gly-Asp(RGD), 抗血小板聚集

0 引 言

葡激酶(stapylokinase, SAK)是金黄色葡萄球菌分泌的一种蛋白,可用于急性心肌梗死(AMI)的治疗,并有治疗外周血管血栓及由血栓引起的缺血性组织坏死类疾病的应用前景^[1]。它与目前临床使用的链激酶(streptokinase, SK)、重组链激酶(recombinant streptokinase, r-SK)、尿激酶(urokinase-type plasminogen activator, UK)、组织纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)相比,具有溶血栓速度快、生产成本低且易于生产等优点。但是,使用后仍有一定的再栓塞率^[2,3]。因此,现在各国学者正在积极探索利用分子生物学手段将不同溶栓剂的功能结构域联合制成融合蛋白,来提高溶栓剂的功效^[4,6]。Arg-Gly-Asp(RGD)序列可与纤维蛋白原竞争结合与血小板聚集相关的膜受体 GPIIb/IIIa,阻断血栓形成的最后共同通路,其模拟物临床上常用于预防再栓塞。有研究者将 RGD 序列融合在 SAK 的 C-末端,但此突变造成了溶栓活性的降低^[7];也有人尝试将其引入到 SAK 分子的内部,但很难想象单个的这种融合分子能够既发挥溶栓功能,同时又发挥抑制血小板聚集的功能。近年来将 RGD 序列引入 SAK N-

末端的研究报道甚少,且有文献报道,RGD 序列的 C-末端引入疏水性氨基酸时,其抑制活性会增加,RGDW 与 RGDF 的抑制活性要明显高于 RGDS 和 RGDV^[8]。综上,本实验设计在野生型葡激酶(wt-SAK)分子 N-末端的第三、四位氨基酸之间插入 RGD 序列,与其第四位的苯丙氨酸形成 RGDF 序列;另外,又将野生型葡激酶分子 N-末端的前三位氨基酸替换为 RGD 序列,与其第四位的苯丙氨酸形成 RGDF 序列。据此构建两个突变体 MD2-SAK 和 MD4-SAK,并对它们的生物学活性进行进一步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、wt-SAK 质粒由本实验室分离并保存,葡激酶标准品购自中国生物制品检定所,pfu DNA 聚合酶和引物合成均由上海生物工程公司提供, pBV220 载体质粒购自 Promega 公司, SP-Sepharose FF、Sephadex G-50 和 Q-Sepharose FF 均为 Amersham Biosciences 公司产品; LBY-NJ 血液凝聚仪(北京普利生公司)、HPLC 荧光检测仪 LC-10AT 为岛津公司产品,质谱仪 ZMD MS 为 Waters 公司产品。

① 河北师范大学应用开发(L2005K04)资助项目。

② 女,1981 年生,硕士;研究方向:生物化学与分子生物学研究。

③ 通讯作者, E-mail: he-jintian@sina.com; zhaobaohua86178@sohu.com
(收稿日期:2007-12-25)

1.2 突变体表达质粒的构建及序列测定

实验室保存的 SAK 系通过设计上下游引物(5'-TCAAGTTCATTCGACAAAGGAAAAT-3' 和 5'-GGGAAGCTTATTTCTTTTCTATAACAACCTTTG-3') 从金黄色葡萄球菌的基因组 DNA 中克隆得到,与已知的 SAK 序列(NCBI 上公布的序列号为 AF332691)比对,证实为 wt-SAK 基因。

以 wt-SAK 质粒为模板,用 PCR 介导的定点突变法在野生型 SAK N-末端的第三、四位氨基酸之间插入 RGD 序列,所使用的突变引物为 P1: 5'-GCG-GAATTCATGTCAAGTTCACGCGGAGATTTCGA-CAAAGGA-3', 下游引物为 P2: 5'-GCGGGATCCTTATTTCTTTTCTATAACAACC-3' (下划线部分为突变位点,粗体部分分别为限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切位点)。DNA 片段的回收、质粒的提取与纯化均按分子克隆实验指南^[9]及相应试剂盒操作手册进行。MD2-SAK DNA 片段经过限制性内切酶 *EcoR*I、*Bam*H I 酶切回收后与相同酶切回收的 pBV220 载体连接,构建重组表达质粒 pBV220-MD2-SAK,然后转化大肠杆菌 DH5 α ,PCR 筛选阳性克隆, LB 震荡培养后提取质粒,将经酶切鉴定的阳性克隆送大连宝生物公司测序。同样,将野生型葡激酶 N-末端前三位氨基酸序列替换为 RGD 序列,所使用的突变引物为 P3: 5'-GCGGAATTCATGCGCGGA-GATTTTCGACAAA-3', 下游引物为 P4: 5'-GCGGGATCCTTATTTCTTTTCTATAACAACC-3', 构建的重组表达质粒命名为 pBV220-MD4-SAK。

1.3 突变体蛋白的诱导表达与鉴定

挑取单菌落,在 5 mL LB 培养基(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中 37℃ 培养过夜,按 2% 的比例接种到 200 mL 具有氨苄抗性的 M₉CA (0.08 M Na₂HPO₄, 0.02 M KH₂PO₄, 0.05 M NaCl, 0.02 M MgSO₄, 1% Glucose, 1% Casin, 1.1 mg/mL Vitm B₁, 0.1% NH₄Cl, 100 mg/L Amp, pH6.8) 培养基中,30℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 1.6 时,升温至 42℃ 诱导培养 3h;然后离心收集菌体,PBS 缓冲液洗涤后超声破碎,最后离心收集上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析。

1.4 突变体表达产物的纯化

采用阳离子交换层析、凝胶过滤与阴离子交换层析三步纯化:

SP-Sepharose FF 阳离子交换柱:先用 20 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH5.6)平衡后,将超声破碎后收集的上清(1~2 mg/mL 左右)上样,然后用上述缓冲液洗脱未结合的蛋白,洗脱峰恢复至基线后,用含 0~

0.3 mol/L NaCl 的平衡缓冲液梯度洗脱,在 280 nm 的光吸收值处,根据 UV 检测器指示,分部收集各洗脱峰。

Sephadex G-50 分子筛凝胶柱:用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.8)平衡后,将 SP-Sepharose FF 收集的活性组分合并上样,用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.8)洗脱,在 280 nm 的光吸收值处,根据 UV 检测器指示,收集各洗脱峰。

Q-Sepharose FF 阴离子交换柱:用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.8)平衡后,将凝胶过滤的活性峰上样,用含 0~0.3 mol/L NaCl 的平衡缓冲液梯度洗脱,在 280 nm 的光吸收值处,按 UV 检测器指示,收集各洗脱峰。

用 18% SDS-PAGE 分析纯化过程中各蛋白洗脱峰,纤维蛋白溶圈法测定各组分的纤溶活性,Bradford 法测定蛋白含量。计算样品纯化过程中各步样品的浓度、比活性、总活性及样品活性得率,检定样品质量。

1.5 突变体纯化产物的鉴定

调整样品浓度大于 1 mg/mL,经 G-50 脱盐后直接上样。Micromass ZMD 质谱检测器检测条件为:使用电喷雾电离源(ESI),电喷雾电压 3.0kV,电喷雾接口干燥气流速 300L/h,脱溶剂温度 200℃,碰撞诱导解离电压(CID)55V,离子源温度 90℃,毛细管电压 28V,质谱质量数范围 800~1500。

HPLC 条件如下:反相 C₁₈ 色谱柱(Waters),孔径 3.5 μ m, 2.1 $\times$ 100mm,检测波长 280nm;色谱分离条件:A 相(0.1%甲酸的水溶液),B 相(0.1%甲酸的乙腈溶液),30min 内 A 相由 100%降到 0%,B 相由 0%升高到 100%,流速 0.2ml/min,样品室温度 10℃,柱温 20℃。

1.6 突变体溶栓活性的测定

纤维蛋白溶圈法,即在含有纤维蛋白原、人纤溶酶和凝血酶的凝胶板上打孔,将 SAK 突变体蛋白稀释后每孔加入 10 μ l,置于湿盒中 37℃ 孵育过夜。测量溶圈直径,同时采用系列稀释的葡激酶标准品做一标准曲线,根据得出的标准曲线计算 SAK 突变体的纤溶活性。

1.7 突变体与纤溶酶原相互作用过程监测

突变体 MD2-SAK、MD4-SAK 和 wt-SAK 按摩尔浓度 5:1 的比例分别与纤溶酶原 37℃ 混合孵育,分别在 0、2、4、8、16、32 和 60min 取样,与 5 $\times$ 蛋白上样 Buffer 混合,沸水浴 5min,用 18% SDS-PAGE 监测突变体 MD2-SAK、MD4-SAK 和 wt-SAK 在此作用过程

中的变化。

1.8 突变体抗血小板聚集活性的测定

将 20mL 柠檬酸钠处理的新鲜健康人血液 800r/min 离心 10min, 取上清为富血小板血浆 (PRP)。样品与纤溶酶原按摩尔浓度 5:1 混合孵育 60min。取 200 μ l PRP 分别加入 10 μ l 混合孵育后的样品和未混合孵育的样品, 37 $^{\circ}$ C 温育 5min, 加入致聚剂 ADP 至终浓度为 10 μ mol/L。使用血小板聚集仪于 490nm 波长处测透射率, 根据光透射率的增加来检测血小板的聚集率。使用生理盐水组和 wt-SAK 组作为对照。使用 SAS 软件中的方差分析功能对所得实验数据进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 突变体表达质粒的构建

以本室保存的 SAK 质粒为模板, 用包含突变位点的设计引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳结果显示, 在约 500bp 左右出现单一特异性条带 (结果未显示)。以 *EcoR* I、*Bam*H I 酶解后与 pBV220 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性转化子。测序结果表明, 除突变位点外, 无其它非特异突变, 如图 1A 和图 1B 所示。证实获得阳性克隆 MD2-pBV220 和 MD4-pBV220。

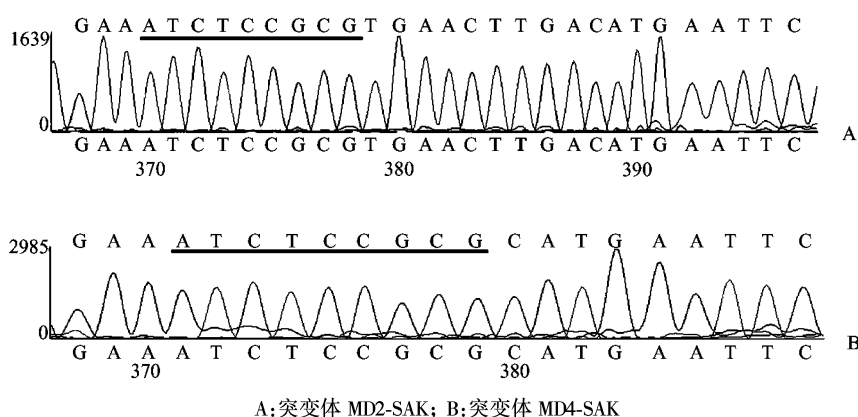


图 1 突变体的部分测序结果 (突变序列区用下划线标出)

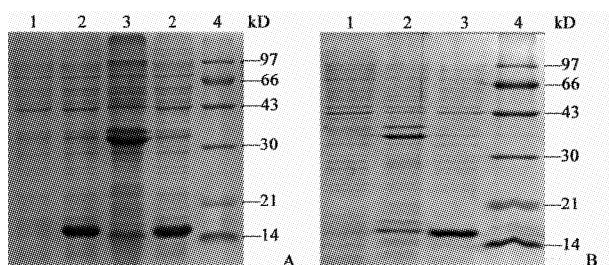
2.2 突变体的表达和表达产物存在形态的鉴定

热激诱导含有表达质粒的大肠杆菌 DH5 α , 突变体蛋白获得高效表达, 其分子量约为 15kD。凝胶扫描结果表明, 重组蛋白占菌体总蛋白的 50% 以上, 离心收集菌体, 超声波破碎后, 分别对上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 表达产物主要以可溶性蛋白为主, 结果如图 2 所示。

2.3 突变体蛋白的纯化

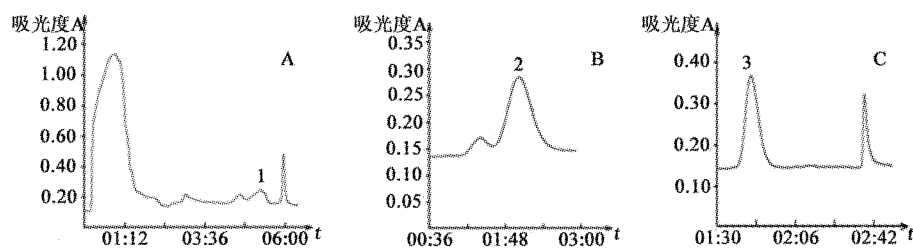
MD2-SAK 破菌上清首先通过 SP-Sepharose FF 阳离子交换层析, 上样过程中出现一个明显的杂蛋白峰, 即可除去多数杂蛋白, 含 0.20M NaCl 的缓冲液洗脱出目的蛋白峰 1, 如图 3A 所示; 收集洗脱峰蛋白通过凝胶柱 Sephadex G-50, 蛋白进一步被纯化, 目的蛋白出现在洗脱峰 2, 见图 3B; 将洗脱峰 2 的样品通过 Q-Sepharose FF 阴离子交换层析, 含 0.24 M NaCl 的缓冲液洗脱出目的蛋白峰 3, 如图 3C 所示。

MD2-SAK 纯化过程的 SDS-PAGE 检测结果如图 4A 所示。经过三步纯化可以对目的蛋白进行有效纯化, 最终获得纯度达 96% 以上的蛋白。测定 MD2-SAK 纯化过程各收集组分的浓度、活性和比活性, 计算得率, 各步纯化数据见表 1。MD4-SAK 突变体的纯化过程和 MD2-SAK 突变体相类似, SDS-PAGE 检测结果如图 4B 所示。



A: 突变体 MD2-SAK 表达产物 1: 未经诱导的 MD2-SAK; 2: 诱导后破菌所得的沉淀; 3: 诱导后破菌所得的上清; 4: 低分子量蛋白标准; B: 突变体 MD4-SAK 表达产物 1: 未经诱导的 MD4-SAK; 2: 诱导后破菌所得的沉淀; 3: 诱导后破菌所得的上清; 4: 低分子量蛋白标准

图 2 SAK 突变体蛋白表达产物的 SDS-PAGE 分析



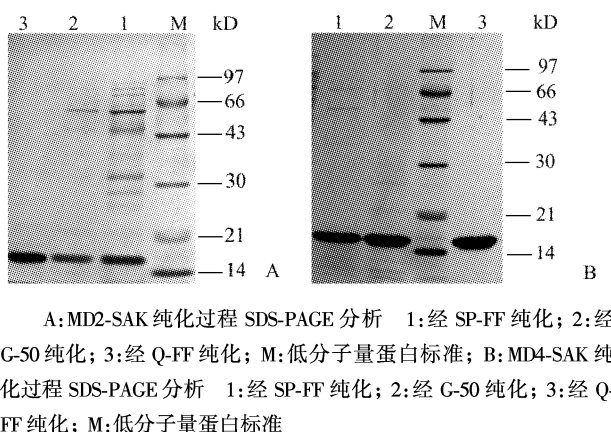
A: MD2-SAK 经 SP-FF 的纯化过程; B: MD2-SAK 经 G-50 的纯化过程; C: MD2-SAK 经 Q-FF 的纯化过程

图 3 MD2-SAK 突变体蛋白纯化过程

表 1 MD2-SAK 蛋白纯化过程中各步纯化数据表^a

纯化步骤	样品体积(mL)	总蛋白(g)	纯度 ^b (%)	比活性 ($\times 10^4$ AU/mg)	活性收率(%)	纯化倍数
破菌上清液	2000	3.86	52%	5.60	100%	—
阳离子交换层析	180	2.01	83%	7.68	71.4%	1.60
凝胶过滤层析	320	1.32	92%	9.20	56.2%	1.11
阴离子交换层析	290	0.98	97%	10.1	45.8%	1.05

^a对发酵液离心后所得的 42g 湿菌进行纯化; ^b蛋白纯度测定通过对 SDS-PAGE 蛋白条带光密度扫描和 HPLC 确定。

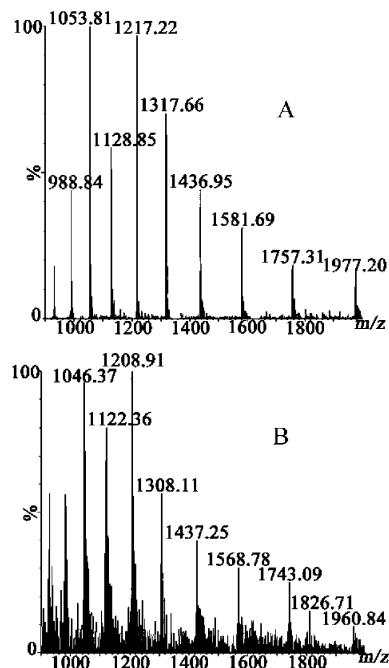


A: MD2-SAK 纯化过程 SDS-PAGE 分析 1: 经 SP-FF 纯化; 2: 经 G-50 纯化; 3: 经 Q-FF 纯化; M: 低分子量蛋白标准; B: MD4-SAK 纯化过程 SDS-PAGE 分析 1: 经 SP-FF 纯化; 2: 经 G-50 纯化; 3: 经 Q-FF 纯化; M: 低分子量蛋白标准

图 4 SAK 突变体蛋白纯化过程的 SDS-PAGE 分析

2.4 突变体蛋白分子量的鉴定

MD2-SAK 和 MD4-SAK 突变体蛋白质谱分别如图 5A 和图 5B 所示。根据质谱结果计算, MD2-SAK 突变体蛋白分子量为 15799.9, 与其切掉 N-末端甲硫氨酸的突变体蛋白的理论值 15810.4 的质量数差别在本方法允许的误差范围内; 而 MD4-SAK 突变体蛋白分子量的计算值为 15702.8, 与其未切掉 N-末端甲硫氨酸的突变体蛋白的理论值 15708.4 的质量数差别在误差允许范围内。结果表明, MD2-SAK 的 N-末端甲硫氨酸在转译完成后已经被细胞内的肽酶正确切除, 而 MD4-SAK 的 N-末端甲硫氨酸没有切除。由此推断, N-末端 3 个连续的丝氨酸对甲硫氨酸的正确酶切加工是重要, 用 RGD 序列替换掉 3 个丝氨酸会影响 N-末端甲硫氨酸的正确酶切加工。



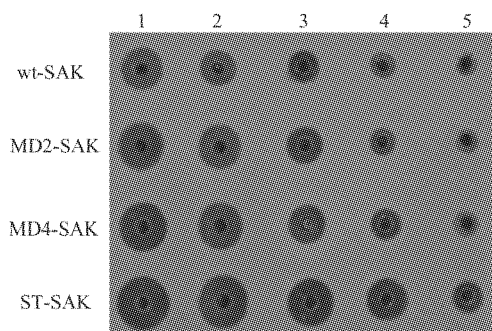
A: MD2-SAK 突变体的蛋白质谱; B: MD4-SAK 突变体的蛋白质谱

图 5 SAK 突变体蛋白的质谱分析

2.5 突变体蛋白体外纤溶活性测定

使用纤维蛋白溶圈法测定葡激酶突变体蛋白体外纤溶活性, 结果如图 6 所示。测量溶圈直径, 根据葡激酶标准品活性曲线, 计算各突变体的活性; 用 Bradford 法测定蛋白含量; 最后用纤溶活性除以蛋白含量得出样品的比活性; 同时设计 wt-SAK 作为参考, 结果所获得突变体蛋白的活性均比 wt-SAK 略有增大, 分别为 10.1×10^4 AU/mg、 11.2×10^4 AU/mg, wt-SAK 为 9.8×10^4 AU/mg。说明此突变并未降低其

纤溶活性。

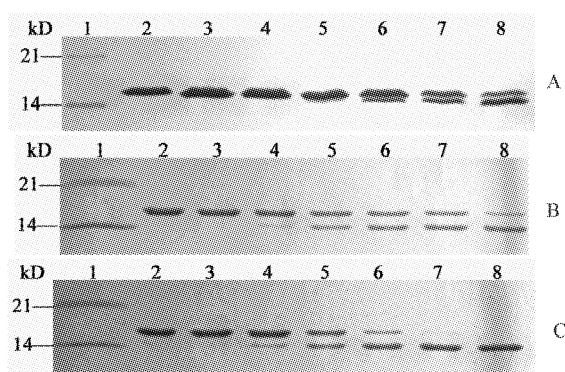


wt-SAK 1-5: wt-SAK 蛋白的浓度分别为 3.17×10^{-3} mg/mL, 1.90×10^{-3} mg/mL, 9.50×10^{-4} mg/mL, 4.75×10^{-4} mg/mL, 3.17×10^{-4} mg/mL; **MD2-SAK 1-5:** MD2-SAK 突变体蛋白的浓度分别为 1.37×10^{-3} mg/mL, 8.20×10^{-4} mg/mL, 4.10×10^{-4} mg/mL, 2.05×10^{-4} mg/mL, 1.36×10^{-4} mg/mL; **MD4-SAK 1-5:** MD4-SAK 突变体蛋白的浓度分别为 2.07×10^{-3} mg/mL, 1.24×10^{-3} mg/mL, 6.20×10^{-4} mg/mL, 3.10×10^{-4} mg/mL, 2.07×10^{-4} mg/mL; **ST-SAK 1-5:** 葡激酶标准品的活性分别为 1000 AU/mL, 800 AU/mL, 400 AU/mL, 200 AU/mL, 100 AU/mL

图 6 SAK 突变体纤溶活性的测定

2.6 SDS-PAGE 检测突变体与纤溶酶原相互作用过程

突变体蛋白与纤溶酶原混合孵育后,激活纤溶酶原为纤溶酶,经过纤溶酶切加工后,葡激酶的 N-末端前 10 位氨基酸被切除。SDS-PAGE 可以明显将葡激酶及酶切加工后的低分子量葡激酶分开,wt-SAK、MD2-SAK 及 MD4-SAK 与纤溶酶原相互作用过程分别如图 7A、图 7B 及图 7C 所示。结果表明 N-末端所进行的突变并没有降低纤溶酶加工葡激酶 N-末端的速度,这与纤溶活性测定的结果是一致的。



A: wt-SAK 和纤溶酶原混合孵育过程 1:低分子量蛋白标准; 2-8:wt-SAK 和纤溶酶原混合孵育 0, 2, 4, 8, 16, 32, 60 min; **B:** MD2-SAK 和纤溶酶原混合孵育过程 1:低分子量蛋白标准; 2-8:MD2-SAK 和纤溶酶原混合孵育 0, 2, 4, 8, 16, 32, 60 min; **C:** MD4-SAK 和纤溶酶原混合孵育过程 1:低分子量蛋白标准; 2-8:MD4-SAK 和纤溶酶原混合孵育 0, 2, 4, 8, 16, 32, 60min

图 7 葡激酶蛋白和纤溶酶原作用过程的 SDS-PAGE 分析

2.7 血小板聚集抑制试验

样品和 ADP 分别加入 PRP 后,设定血小板聚集仪检测时间为 5 min,检测结果如表 2 所示。结果表明,野生型 SAK 在测定条件下抑制血小板聚集的活性很低;与纤溶酶原共同孵育的 SAK 突变体组对血小板聚集的抑制活性高于 SAK 突变体组,且二者的抑制活性均显著高于野生型 SAK。

表 2 SAK 突变体蛋白血小板聚集抑制活性测定结果

样品	终浓度 (mol/L)	抑制率 (%)
生理盐水	—	3.47 ± 1.28
wt-SAK	2	3.98 ± 1.05
MD2-SAK	2	14.32 ± 3.25
MD2-SAK ^a	2	23.36 ± 2.48
MD4-SAK	2	11.06 ± 1.81
MD4-SAK ^a	2	21.65 ± 4.75

^a样品预先和纤溶酶原混合孵育 60min

每组实验重复 3 次,使用方差分析,结果表明野生型 SAK 组与 SAK 突变体组和 SAK 突变体与纤溶酶原共同孵育组之间有显著差异(* $P < 0.05$)

3 讨论

SAK 与其他溶栓药物相比,具有分子量小、特异性高、疗效安全等优点,并且稳定性强^[10]。一些研究显示 SAK 有良好的溶栓作用和很少的副作用^[11,12],对血小板功能无明显影响,不会引发系统纤溶^[13]。但是临床实验表明,SAK 使用后仍存在着一定程度的再栓塞问题,因此,一些研究者尝试在 SAK 基础上,构建融合蛋白^[4,6,14],使其同时具有溶栓和抗凝的双重功效。RGD 肽类物质是一种具有抑制血小板的聚集功能的活性肽序^[15]。构建 SAK-RGD 融合蛋白是解决溶栓后的再栓塞问题的一种积极策略。本实验利用 PCR 介导的定点突变的方法成功构建了两个 SAK 突变体,均获得高效表达,目的蛋白表达量为 50% 以上。经离子交换层析、凝胶过滤层析三步法纯化后,两个突变体均得到了纯度高于 96% 的纯品。对这两个突变体的活性研究结果表明,其溶解纤维蛋白的活性相当或者优于 wt-SAK,并都具有明显的抗血小板聚集效应;对其质谱分析发现,N-末端的突变影响了转译完成后细胞内的肽酶对 N-末端甲硫氨酸的切除,突变体 MD2-SAK 的 N-末端甲硫氨酸得到了正切的酶切加工,并且其抗血小板聚集活性明显高于 MD4-SAK,很有可能成为较为理想的兼具溶栓和抗栓效应的双功能分子,

并为临床治疗和预防血栓性疾病开发新药物奠定了基础。

参考文献

- [1] Keeley E C, Boura J A, Grines C L. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*, 2003, 361 (9351): 13-20
- [2] Vanderschueren S, Barrios L, Kerdinichai P, et al. A randomized trial of recombinant staphylokinase versus alteplase for coronary artery patency in acute myocardial infarction. *Circulation*, 1995, 92(10):2044-2049
- [3] Vanderschueren S, Stockx L, Wilms G, et al. Thrombolytic therapy of peripheral arterial occlusion with recombinant staphylokinase. *Circulation*, 1995, 92(10):2050-2057
- [4] Szemraj J, Walkowiak B, Kawecka I, et al. A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity--a staphylokinase variant. I. In vitro study. *J Thromb Haemost*, 2005, 3(10):2156-2165
- [5] Wu S C, Castellino F J, Wong S L. A fast-acting, modular-structured staphylokinase fusion with Kringle-1 from human plasminogen as the fibrin-targeting domain offers improved clot lysis efficacy. *J Biol Chem*, 2003, 278 (20): 18199-18206
- [6] Chiou J F, Woon M D, Cheng S N, et al. Staphylokinase-annexin XI chimera exhibited efficient in vitro thrombolytic activities. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71 (5): 1122-1129
- [7] Van Zyl W B, Pretorius G H, Hartmann M, et al. Production of a recombinant antithrombotic and fibrinolytic protein, PLATSAK, in *Escherichia coli*. *Thromb Res*, 1999, 88:419-426
- [8] Ojima I, Chakravarty S, Dong Q. Antithrombotic agents: from RGD to peptide mimetics. *Bioorg Med Chem*, 1995, 3 (4):337-60
- [9] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [10] Lijnen H R, Vanlinthout I. Comparative fibrinolytic properties of staphylokinase in animal models of venous thrombosis. *Thromb Haemost*, 1991, 66:468-473
- [11] Collen D, Cock F, Stasse J M. Comparative immunogenicity and thrombolytic properties toward arterial and venous thrombin of streptokinase and recombinant staphylokinase in baboons. *Circulation*, 1993, 87(5):996-1006
- [12] Collen D, Vande W F. Coronary thrombolysis with recombinant staphylokinase in patients with evolving myocardial infarction. *Circulation*, 1993, 87(9):1850-1856
- [13] Hauptmann J, Glusa E. Differential effects of staphylokinase, streptokinase and tissue-type plasminogen activator on the lysis of retracted human plasma clots and fibrinolytic plasma parameters in vitro. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1995, 6:579-583
- [14] Shi B, Yu A, Liu Y, et al. Locally activity-released bifunctional fusion protein enhances antithrombosis and alleviates bleeding risk *Thromb. Thrombolysis*, 2007, 24(3):283-292
- [15] Ruoslahti E, Pierschbacher M D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 1987, 238:491-497

Expression, purification and characterization of novel staphylokinase variants with RGD motif at their N-terminus

Di Jingfang, He Jintian, Xu Ruiguang, Chen Xi, Zhao Baohua

(Department of microbiology, College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016)

Abstract

To develop target thrombolytic agents with fibrinolytic activity and antiplatelet aggregation activity, two staphylokinase variants containing Arg-Gly-Asp (RGD) motif at the N-terminus were constructed. The staphylokinase variants were successfully overexpressed in *E. coli* DH5 α as soluble cytoplasmic proteins that accounted for more than 50% of the total cellular protein. The expressed proteins were subsequently purified by using a three-step chromatographic purification. The purification process resulted in greater-than-96% pure proteins. The fibrinolytic activity of the two variants was comparable to that of wild-type staphylokinase. Both of the variants could significantly inhibit the platelet aggregation at a final concentration of 2 μ M. These results confirm that it is possible to design and produce a bifunctional protein that possesses fibrinolytic and antiplatelet aggregation activities. Furthermore, it was found that mutations at the N-terminus significantly affected N-terminal methionine excision and serines at the N-terminus of Sak played an important role in the process of Met-cleavage.

Key words: staphylokinase, Arg-Gly-Asp (RGD), anti-platelet aggregation