



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 87102725.9

[51]Int.Cl⁶

C12N 15/58

[45]授权公告日 1996年6月12日

[24]颁证日 96.3.9

[21]申请号 87102725.9

[22]申请日 87.3.13

[30]优先权

[32]86.3.13 [33]AU[31]PH5017

[32]86.5.22 [33]AU[31]PH6033

[32]86.9.18 [33]AU[31]PH8100

[32]86.11.21[33]AU[31]PH9104

[73]专利权人 澳州生物科技司

地址 澳大利亚新南威尔士州

共同专利权人 澳大利亚国立大学

[72]发明人 东尼·玛丽·安塔利斯

C07K 14/81

托马斯·迈克尔·巴恩斯

C12P 21/02 A61K 38/47

米歇尔·艾莉森·克拉克

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

彼得·伦纳德·迪瓦因

代理人 曹恒兴

尼尔·霍华德·戈斯

菲利普·拉尔夫·莱尔巴赫

权利要求书 3 页 说明书 50 页 附图页数 32 页

[54]发明名称 生物合成灭活素的方法

[57]摘要

本发明涉及产生一种新的人类蛋白质-灭活素。通过重组 DNA 技术, 确定该基团的序列, 从重组宿主大量表达物纯化生物学上具有活性的灭活素。本发明还涉及纯化有生物活性的天然灭活素, 以及由灭活素及其氨基酸顺序所衍生的多肽的方法。

权 利 要 求 书

1. 一种生物合成灭活素的方法，该方法包括：

a) 用一种重组DNA 分子转化一种宿主细胞，所述重组DNA 分子包含编码具有以下氨基酸顺序的蛋白质的cDNA和载体DNA分子，

ATG GAG GAT CTT TGT GTG GCA AAC ACA CTC TTT GCC CTC AAT TTA
Met Glu Asp Leu Cys Val Ala Asn Thr Leu Phe Ala Leu Asn Leu

TTC AAG CAT CTG GCA AAA GCA AGC CCC ACC CAG AAC CTC TTC CTC
Phe Lys His Leu Ala Lys Ala Ser Pro Thr Gln Asn Leu Phe Leu

TCC CCA TGG AGC ATC TCG TCC ACC ATG GCC ATG GTC TAC ATG GGC
Ser Pro Trp Ser Ile Ser Ser Thr Met Ala Met Val Tyr Met Gly

TCC AGG GGC AGC ACC GAA GAC CAG ATG GCC AAG GTG CTT CAG TTT
Ser Arg Gly Ser Thr Glu Asp Gln Met Ala Lys Val Leu Gln Phe

AAT GAA GTG GGA GCC AAT GCA GTT ACC CCC ATG ACT CCA GAG AAC
Asn Glu Val Gly Ala Asn Ala Val Thr Pro Met Thr Pro Glu Asn

TTT ACC AGC TGT GGG TTC ATG CAG CAG ATC CAG AAG GGT AGT TAT
Phe Thr Ser Cys Gly Phe Met Gln Gln Ile Gln Lys Gly Ser Tyr

CCT GAT GCG ATT TTG CAG GCA CAA GCT GCA GAT AAA ATC CAT TCA
Pro Asp Ala Ile Leu Gln Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile His Ser
TCC TTC CGC TCT CTC AGC TCT GCA ATC AAT GCA TCC ACA GGG AAT
Ser Phe Arg Ser Leu Ser Ser Ala Ile Asn Ala Ser Thr Gly Asn

TAT TTA CTG GAA AGT GTC AAT AAG CTG TTT GGT GAG AAG TCT GCG
Tyr Leu Leu Glu Ser Val Asn Lys Leu Phe Gly Glu Lys Ser Ala

AGC TTC CGG GAA GAA TAT ATT CGA CTC TGT CAG AAA TAT TAC TCC
Ser Phe Arg Glu Glu Tyr Ile Arg Leu Cys Gln Lys Tyr Tyr Ser
TCA GAA CCC CAG GCA GTA GAC TTC CTA GAA TGT GCA GAA GAA GCT
Ser Glu Pro Gln Ala Val Asp Phe Leu Glu Cys Ala Glu Glu Ala

AGA AAA AAG ATT AAT TCC TGG GTC AAG ACT CAA ACC AAA GGC AAA
Arg Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Lys Thr Gln Thr Lys Gly Lys

ATC CCA AAC TTG TTA CCT GAA GGT TCT GTA GAT GGG GAT ACC AGG
Ile Pro Asn Leu Leu Pro Glu Gly Ser Val Asp Gly Asp Thr Arg

ATG GTC CTG GTG AAT GCT GTC TAC TTC AAA GGA AAG TGG AAA ACT
Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Thr

CCA TTT GAG AAG AAA CTA AAT GGG CTT TAT CCT TTC CGT GTA AAC
Pro Phe Glu Lys Lys Leu Asn Gly Leu Tyr Pro Phe Arg Val Asn

TCG GCT CAG CGC ACA CCT GTA CAG ATG ATG TAC TTG CGT GAA AAG
Ser Ala Gln Arg Thr Pro Val Gln Met Met Tyr Leu Arg Glu Lys

CTA AAC ATT GGA TAC ATA GAA GAC CTA AAG GCT CAG ATT CTA GAA
Leu Asn Ile Gly Tyr Ile Glu Asp Leu Lys Ala Gln Ile Leu Glu

CTC CCA TAT GCT GGA GAT GTT AGC ATG TTC TTG TTG CTT CCA GAT
Leu Pro Tyr Ala Gly Asp Val Ser Met Phe Leu Leu Leu Pro Asp

GAA ATT GCC GAT GTG TCC ACT GGC TTG GAG CTG CTG GAA AGT GAA
Glu Ile Ala Asp Val Ser Thr Gly Leu Glu Leu Leu Glu Ser Glu

ATA ACC TAT GAC AAA CTC AAC AAG TGG ACC AGC AAA GAC AAA ATG
Ile Thr Tyr Asp Lys Leu Asn Lys Trp Thr Ser Lys Asp Lys Met

GCT GAA GAT GAA GTT GAG GTA TAC ATA CCC CAG TTC AAA TTA GAA
Ala Glu Asp Glu Val Glu Val Tyr Ile Pro Gln Phe Lys Leu Glu

GAG CAT TAT GAA CTC AGA TCC ATT CTG AGA AGC ATG GGC ATG GAG
Glu His Tyr Glu Leu Arg Ser Ile Leu Arg Ser Met Gly Met Glu

GAC GCC TTC AAC AAG GGA CGG GCC AAT TTC TCA GGG ATG TCG GAG
Asp Ala Phe Asn Lys Gly Arg Ala Asn Phe Ser Gly Met Ser Glu

AGG AAT GAC CTG TTT CTT TCT GAA GTG TTC CAC CAA GCC ATG GTG
Arg Asn Asp Leu Phe Leu Ser Glu Val Phe His Gln Ala Met Val

GAT GTG AAT GAG GAG GGC ACT GAA GCA GCC GCT GGC ACA GGA GGT
Asp Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly

GTT ATG ACA GGG AGA ACT GGA CAT GGA GGC CCA CAG TTT GTG GCA
Val Met Thr Gly Arg Thr Gly His Gly Gly Pro Gln Phe Val Ala

GAT CAT CCT TTT CTT TTT CTT ATT ATG CAT AAG ATA ACC AAC TGC
Asp His Pro Phe Leu Phe Leu Ile Met His Lys Ile Thr Asn Cys

ATT TTA TTT TTC GGC AGA TTT TCC TCA CCC TAA
Ile Leu Phe Phe Gly Arg Phe Ser Ser Pro ***

- b) 在适于灭活素表达的条件下培养转化的细胞, 和
c) 回收所表达的灭活素。

说 明 书

生物合成灭活素的方法

本发明涉及到用重组 DNA 技术生产一种新的人蛋白 — 灭活素 (minactivin) 及其基因 DNA 序列的确定, 以及具有生物活性的灭活素在重组宿主中的大量表达及纯化。本发明也涉及到有生物活性的天然灭活素及其多肽的纯化和它们的氨基酸顺序。

灭活素 (DAI - 2) 是一种天然存在的尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物的失活剂。这一类型的血纤维蛋白溶酶原激活物在许多主要的人癌尤其是肺、结肠、乳腺及前列腺癌中其含量异常高。血纤维蛋白溶酶原激活物是一些丝氨酸蛋白酶, 它们参与细胞转位、迁移和侵袭中的蛋白多级降解过程。因此, 它们似乎是与组织的破坏和重建有关, 并参与了肿瘤的生长和转移, 也可能在炎症反应中起作用。

血纤维蛋白溶酶原激活物一般有两种类型: 1) 尿激酶型及 2) 组织型。组织型血纤维蛋白溶酶原激活物主要见于血和血管壁中, 它负责激活血纤维蛋白溶解的防卫系统防止血栓形成。尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物在正常的血栓溶解过程中不起作用, 但它却参与侵袭和组织破坏的病理变化, 尤其是参与肿瘤转移和炎症反应的病变过程。

已报道的几种血纤维蛋白溶酶原激活物的特异性抑制剂, 其中有自胎盘中分离的抑制剂 (Holmberg, L. *Biochim. Biophys. Acta* 544, 128—137 (1978)) 和在培养的血管内壁细胞中产生的抑制剂 (PAI-1) (Van Mourik, J. A., Lawrence, D. A., Loskutoff, D. J., *J. Biol. Chem.* 259, 14914—14921 (1984))。灭活素发现于人血单核细胞和

U 937细胞中，并与来自胎盘的抑制剂呈免疫学相关。这些抑制剂彼此之间的关系目前还不清楚。

灭活素也象大多数其他有生物活性的蛋白一样，在体内的产生量是非常低的。因此难以用常规的生化方法进行纯化和鉴定。为进一步评价它的性质和在临床应用中的功效，需要制备大量的纯品。利用重组DNA技术，即通过把这种基因克隆到另一宿主如细菌或动物细胞中，以获得这一蛋白产物。为了克隆这一基因，需先对能获得的少量的天然灭活素纯化成均质，以便制备抗体，获得肽段及氨基酸顺序和合成寡核苷酸。从而为克隆路线提供依据。

缩写词

HPLC :	高压液相色谱
Mr :	相对分子量
MW :	分子量
PMA :	十四酰佛波乙酸酯 (4-Phorbol-12-myristate-13-acetate)
SDS-PAGE :	十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳
TFA :	三氟醋酸 (trifluoroacetic)
HPA :	人血纤维蛋白溶酶原激活物
bp :	碱基对
Kb :	千碱基对
PU :	Ploug

本发明的首要实施是提供一种DNA顺序，它包含作为为灭活素氨基酸顺序编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的第一DNA顺序，和同所述第一DNA顺序杂交的DNA顺序，及一种由

突变（包括单个或多个碱基替换、缺失、插入和倒位）产生的与上述第一 DNA 顺序有关或能够杂交的 DNA 顺序，或者是在表达时为灭活素多肽编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的一种 DNA 顺序，或者它所编码的多肽能显示出与灭活素有类似的免疫学或生物学活性。该顺序为：

1
GTCAGACAGCAACTCAGAGAATAACCAGAGAACAACCAGATTGAAACA

49

ATG GAG GAT CTT TGT GTG GCA AAC ACA CTC TTT GCC CTC AAT TTA
Met Glu Asp Leu Cys Val Ala Asn Thr Leu Phe Ala Leu Asn Leu

94

TTC AAG CAT CTG GCA AAA GCA AGC CCC ACC CAG AAC CTC TTC CTC
Phe Lys His Leu Ala Lys Ala Ser Pro Thr Gln Asn Leu Phe Leu

139

TCC CCA TGG AGC ATC TCG TCC ACC ATG GCC ATG GTC TAC ATG GGC
Ser Pro Trp Ser Ile Ser Ser Thr Met Ala Met Val Tyr Met Gly

184

TCC AGG GGC AGC ACC GAA GAC CAG ATG GCC AAG GTG CTT CAG TTT
Ser Arg Gly Ser Thr Glu Asp Gln Met Ala Lys Val Leu Gln Phe

229

AAT GAA GTG GGA GCC AAT GCA GTT ACC CCC ATG ACT CCA GAG AAC
Asn Glu Val Gly Ala Asn Ala Val Thr Pro Met Thr Pro Glu Asn

274

TTT ACC AGC TGT GGG TTC ATG CAG CAG ATC CAG AAG GGT AGT TAT
Phe Thr Ser Cys Gly Phe Met Gln Gln Ile Gln Lys Gly Ser Tyr

319

CCT GAT GCG ATT TTG CAG GCA CAA GCT GCA GAT AAA ATC CAT TCA
Pro Asp Ala Ile Leu Gln Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile His Ser

364

TCC TTC CGC TCT CTC AGC TCT GCA ATC AAT GCA TCC ACA GGG AAT
Ser Phe Arg Ser Leu Ser Ser Ala Ile Asn Ala Ser Thr Gly Asn

409

TAT TTA CTG GAA AGT GTC AAT AAG CTG TTT GGT GAG AAG TCT GCG
Tyr Leu Leu Glu Ser Val Asn Lys Leu Phe Gly Glu Lys Ser Ala

454

AGC TTC CGG GAA GAA TAT ATT CGA CTC TGT CAG AAA TAT TAC TCC
Ser Phe Arg Glu Glu Tyr Ile Arg Leu Cys Gln Lys Tyr Tyr Ser

499

TCA GAA CCC CAG GCA GTA GAC TTC CTA GAA TGT GCA GAA GAA GCT
Ser Glu Pro Gln Ala Val Asp Phe Leu Glu Cys Ala Glu Glu Ala

544

AGA AAA AAG ATT AAT TCC TGG GTC AAG ACT CAA ACC AAA GGC AAA
Arg Lys Lys Ile Asn Ser Trp Val Lys Thr Gln Thr Lys Gly Lys

589

ATC CCA AAC TTG TTA CCT GAA GGT TCT GTA GAT GGG GAT ACC AGG
Ile Pro Asn Leu Leu Pro Glu Gly Ser Val Asp Gly Asp Thr Arg

634

ATG GTC CTG GTG AAT GCT GTC TAC TTC AAA GGA AAG TGG AAA ACT
Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Thr

679

CCA TTT GAG AAG AAA CTA AAT GGG CTT TAT CCT TTC CGT GTA AAC
Pro Phe Glu Lys Lys Leu Asn Gly Leu Tyr Pro Phe Arg Val Asn

724

TCG GCT CAG CGC ACA CCT GTA CAG ATG ATG TAC TTG CGT GAA AAG
Ser Ala Gln Arg Thr Pro Val Gln Met Met Tyr Leu Arg Glu Lys

769

CTA AAC ATT GGA TAC ATA GAA GAC CTA AAG GCT CAG ATT CTA GAA
Leu Asn Ile Gly Tyr Ile Glu Asp Leu Lys Ala Gln Ile Leu Glu

814

CTC CCA TAT GCT GGA GAT GTT AGC ATG TTC TTG TTG CTT CCA GAT
Leu Pro Tyr Ala Gly Asp Val Ser Met Phe Leu Leu Leu Pro Asp

859

GAA ATT GCC GAT GTG TCC ACT GGC TTG GAG CTG CTG GAA AGT GAA
Glu Ile Ala Asp Val Ser Thr Gly Leu Glu Leu Leu Glu Ser Glu

904

ATA ACC TAT GAC AAA CTC AAC AAG TGG ACC AGC AAA GAC AAA ATG
Ile Thr Tyr Asp Lys Leu Asn Lys Trp Thr Ser Lys Asp Lys Met

949

GCT GAA GAT GAA GTT GAG GTA TAC ATA CCC CAG TTC AAA TTA GAA
Ala Glu Asp Glu Val Glu Val Tyr Ile Pro Gln Phe Lys Leu Glu

994

GAG CAT TAT GAA CTC AGA TCC ATT CTG AGA AGC ATG GGC ATG GAG
Glu His Tyr Glu Leu Arg Ser Ile Leu Arg Ser Met Gly Met Glu

1039

GAC GCC TTC AAC AAG GGA CGG GCC AAT TTC TCA GGG ATG TCG GAG
Asp Ala Phe Asn Lys Gly Arg Ala Asn Phe Ser Gly Met Ser Glu

1084

AGG AAT GAC CTG TTT CTT TCT GAA GTG TTC CAC CAA GCC ATG GTG
Arg Asn Asp Leu Phe Leu Ser Glu Val Phe His Gln Ala Met Val

1129

GAT GTG AAT GAG GAG GGC ACT GAA GCA GCC GCT GGC ACA GGA GGT
Asp Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Gly Thr Gly Gly

1174

GTT ATG ACA GGG AGA ACT GGA CAT GGA GGC CCA CAG TTT GTG GCA
Val Met Thr Gly Arg Thr Gly His Gly Gly Pro Gln Phe Val Ala

1219

GAT CAT CCT TTT CTT TTT CTT ATT ATG CAT AAG ATA ACC AAC TGC
Asp His Pro Phe Leu Phe Leu Ile Met His Lys Ile Thr Asn Cys

1264

ATT TTA TTT TTC GGC AGA TTT TCC TCA CCC TAA AAC TAA GCG TGC
Ile Leu Phe Phe Gly Arg Phe Ser Ser Pro ***

1309

TGCTTCTGCAAAAGATTTTTGTAGATGAGCTGTGTGCCTCAGAATTGCTATTTCAAATTG

1369

CCAAAAATTTAGAGATGTTTTCTACATATTTCTGCTCTTCTGAACAACCTTCTGCTACCCA

1429

CTAAATAAAAACACAGAAATAATTAGACAATTGTCTATTATAACATGACAACCCTATTAA

1489

TCATTTGGTCTTCTAAAATGGGATCATGCCCATTTAGATTTTCCTTACTATCAGTTTATT

1549

TTTATAACATTAACTTTTACTTTGTTATTTATTATTTTATATAATGGTGAGTTTTTAAAT

1609

TATTGCTCACTGCCTATTTAATGTAGCTAATAAAGTTATAGAAGCAGATGATCTGTTAAT

1669

TTCCATCTAATAAATGCCTTTAATTGTTCTCATAATGAAGAATAAGTAGGTATCCCTCC

1729

ATGCCCTTCTGTAATAAATATCTGGAAAAACATTAAACAATAGGCAAATATATGTTATG

1789

TGCATTTCTAGAAATACATAACACATATATATGTCTGTATCTTATATTCAATTGCAAGTA

1849

TATAATGTCATAATTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATAGCGAAACCCTACCTCCACTAAA

1909

AATACAGAAATGAGCCGGGAGTGGTGGCAAAGTGGTGAGCACCTGTGATCCCAGCCACTG

1969

TGGAGGCCGAGGCAGGACAATCACTTGAACCCAGGAGGCCGAGGCTGCAGTGAGCTGAGA

2029

TCGCTCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGATTCCATCTCAAATACATTAAA

2089

AAAAAAAACCTATCTGAGGACTCTGAAAAGTAAATGGTAGCAGATAGATTTGAGAAGGGA

2149

ACTAGAACTTGAAGCACAATCTATCTGGTGCTCTTTCTTACTTTTGCTTGTTTTCTCCCA

2209

ATCTTCCAGTCTGGATACAAAGGCAGCCCAATTTCTAGAAATGTATACCAGCCATGAAGA

2269

GATAAAGCTCCAAGAGGAGATTTCTCTTTCTGGTATAAGGTATGTGTGTGTATATGGGGG

2329

GCGATAAGGTTGGGAGTGTGAGGAATACAGAGTCGGAGAAATCCATTATTTCCACCCTCT

2389

CTCTTGCCATTGCAACCAGAC 或是它的一个片段。

按本发明提出的这种 DNA 顺序、片段及其衍生物编码的多肽显示出灭活素的免疫学或生物学活性。

这种 DNA 顺序可从哺乳动物细胞中通过提取总的 DNA 获得，并借助标准技术分离这些顺序，以便制备重组 DNA 分子。

本发明还包含从一组 DNA 顺序中筛选出具有编码灭活素免疫学或生物学活性肽的 DNA 顺序的方法，此方法包括这样的步骤：测定上述 DNA 顺序中哪一种能同已知的编码活性肽的 DNA 顺序杂交。

选出的顺序可以取自天然材料、合成的 DNA 顺序、重组体 DNA 分子中的 DNA 顺序及其组合。

本发明较好的实施是提供一种制备编码灭活素氨基酸顺序的 cDNA 顺序的方法，此方法包括的步骤为：刺激细胞产生灭活素；从上述刺激细胞中获得 RNA；从其中分离 mRNA；由 mRNA 制备 cDNA。较可取的细胞是 U 937 细胞。

灭活素 cDNA 分子克隆和在重组体宿主中蛋白表达的较好方法包括下述程序：

1. 诱导细胞刺激灭活素的产生和表达。
2. 从适宜的细胞株中分离 mRNA。
3. mRNA 的体外翻译及通过与尿激酶形成复合物免疫沉淀灭活素翻译产物。
4. 从(2)项分级分离 mRNA 并鉴定含灭活素翻译活性的组分。
5. 由(2)和(4)所得的 mRNA 构建 cDNA 文库。

6. 将(5)所得的 cDNA 文库克隆至适宜的宿主中, 如大肠杆菌和 λ 噬菌体。

7. 鉴定含灭活素基因的克隆:

a) 用(3)法进行杂交筛选翻译;

b) 与化学合成的 DNA 顺序探针杂交, 尤其指选用按本发明使用的合成的寡核苷酸探针;

c) 使用诱导和非诱导 mRNA 合成的标记 cDNA 进行鉴别杂交。

d) 利用抗灭活素抗体或抗其他免疫学相关分子进行免疫筛选可表达的 cDNA 文库。

e) 用标记的尿激酶或尿激酶及其抗体对可表达的 cDNA 文库进行生物活性筛选;

8. 利用由部分灭活素基因顺序所得的寡核苷酸引物, 尤指利用在本发明范围内提供的寡核苷酸顺序, 通过构建 cDNA 文库扩宽克隆基因。

9. 测定灭活素基因的核苷酸顺序。

10. 灭活素基因在大肠杆菌中表达和折叠以获得有生物活性的产品。

11. 通过克隆至另外的宿主如真核细胞, 表达有生物活性的重组灭活素。

12. 纯化重组灭活素并对其生物学性质进行临床评价。

本发明的第二种实施是提供一种重组 DNA 分子, 它包含作为为灭活素氨基酸顺序编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的第一 DNA 顺序, 和同所述第一 DNA 顺序杂交的 DNA 顺序,

及一种由突变（包括单个或多个碱基替换、缺失、插入和倒位）产生的与上述第一 DNA 顺序有关或能够杂交的 DNA 顺序，或者是在表达时为灭活素多肽编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的一种 DNA 顺序，或者它所编码的多肽能显示出与灭活素有类似的免疫学或生物学活性。

本发明提出的较好的重组 DNA 分子包括一种表达调控顺序，通过实验操作将其连接到第一 DNA 顺序上。这种第一 DNA 顺序包含作为灭活素氨基酸顺序编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的第一 DNA 顺序，和同所述的第一 DNA 顺序杂交的 DNA 顺序，及一种由突变（包括单个或多个碱基替换、缺失、插入和倒位）产生的与上述第一 DNA 顺序有关或能够杂交的 DNA 顺序，或者是在表达时为灭活素多肽编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的一种 DNA 顺序、或者它所编码的多肽能显示出与灭活素有类似的免疫学或生物学活性。

本发明提出的较好的重组 DNA 分子是一种质粒，它能为灭活素的氨基酸顺序编码。

本发明提出的较好的质粒有第一 DNA 顺序，编码一种控制 DNA 顺序表达的手段，该顺序与本发明的表达顺序相连接。

本发明也同样提供一种融合基因，它含有一种便携式启动子、翻译起始位点及人的灭活素编码的基因。

本发明范围内也包括一种制备重组体 DNA 分子的方法，该方法包含的步骤：把第一 DNA 顺序引入克隆载体，这种 DNA 顺序包含作为为灭活素氨基酸顺序编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的第一 DNA 顺序，和同所述的第一 DNA 顺序杂交的 DNA 顺

序，及一种由突变（包括单个或多个碱基替换、缺失、插入和倒位）产生的与上述第一DNA顺序有关或能够杂交的DNA顺序、或者是在表达时为灭活素多肽编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的一种DNA顺序，或者它所编码的多肽能显示出与灭活素有类似免疫学或生物学活性。

该方法最好也包括把一种表达控制顺序引入克隆载体中的步骤。

本发明进一步提供一种制备质粒的方法。该质粒编码灭活素的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的氨基酸顺序。该方法包含使质粒同上述编码氨基酸顺序的DNA顺序相结合，并同表达控制顺序结合。该DNA顺序最好选用一种cDNA顺序。

本发明的第三实施是提供一种、至少可用一重组DNA分子进行转化的宿主。这种DNA分子包括第一DNA顺序，它作为为灭活素氨基酸顺序编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的第一DNA顺序，和同所述的第一DNA顺序杂交的DNA顺序，及一种由突变（包括单个或多个碱基替换、缺失、插入和倒位）产生的与上述第一DNA顺序有关或能够杂交的DNA顺序，或者是在表达时为灭活素多肽编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的一种DNA顺序，或者它所编码的多肽能显示出与灭活素有类似免疫学或生物学活性。

适宜的宿主包括细菌、酵母菌、其他真菌、小鼠或其他动物宿主，植物宿主，昆虫宿主及其他真核宿主，如哺乳动物，包括人的组织细胞。适宜的细菌包括大肠杆菌、假单胞菌和芽孢杆菌。

带有这种遗传信息的一种微生物特别适合用来合成这种灭活素。

本发明也包含一种转化宿主的方法，此方法包括的步骤为：把重

组 DNA 分子引入宿主，该分子包括一种基本的 DNA 顺序，其中有一种作为为灭活素氨基酸顺序编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的第一 DNA 顺序，和同所述的第一 DNA 顺序杂交的 DNA 顺序，及一种由突变（包括单个或多个碱基替换、缺失、插入和倒位）产生的与上述第一 DNA 顺序有关或能够杂交的 DNA 顺序，或者是在表达时为灭活素多肽编码的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的一种 DNA 顺序，或者它所编码的多肽能显示出与灭活素有类似免疫学或生物学活性。

本发明也提供一种制备带有这种遗传信息的微生物的方法，所制备的这种微生物用于合成灭活素的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合。制备方法包括用一种质粒或其他载体转化微生物，这种质粒或载体编码灭活素的全部、部分、类似物、同源物、或其组合独特的氨基酸顺序。

这一方法的较好实施包括：

- a) 培养能够表达灭活素的细胞株；
- b) 收获培养上清；
- c) 浓缩上清；
- d) 将上清透析，离心除去上述培养上清中残存的细胞碎片和在透析过程中发生沉淀的蛋白质；
- e) 通过层析和电泳分级分离培养上清；
- f) 浓缩含灭活素活性的部分；
- g) 分析含灭活素活性部分以确定其纯度；
- h) 分析灭活素独特的氨基酸顺序。

该方法的优选形式包括：

- a) 制备产生灭活素的培养物或细胞株；
- b) 收获培养上清并浓缩该培养上清；
- c) 将培养上清透析，尔后离心以除去残存的细胞碎片和在透析中发生沉淀的蛋白质；
- d) 通过离子交换层析分级分离培养上清；
- e) 合并并浓缩具最高灭活素比活性的洗脱液；
- f) 凝胶过滤层析分离合并浓缩的洗脱液；
- g) 浓缩洗脱液，尔后进行等电聚焦；
- h) 用抗灭活素的抗体检测等电聚焦凝胶上分离的各组分，以确定灭活素区带的位置。
- i) 浓缩含灭活素活性的部分；
- j) 进一步用分配层析法分级分离含灭活素活性部分，尔后通过凝胶电泳分析纯化的含灭活素活性的部分；
- k) 降解纯化过的灭活素并通过分配层析分离所产生的肽段。

优先选用人巨噬细胞株 U 937 进行培养。选用的培养条件包括在无血清或有足量的一种或多种抑制尿激酶产生或诱导灭活素组成型产生的物质或两种条件相结合进行培养。为此目的选用地塞米松是适宜的。适用浓度为 $1 \mu\text{M}$ 。该培养物也同样可以在 PMA 存在下生长。

PMA 在培养物中的浓度范围是 $1-300 \text{ ng/ml}$ ，以 $10-30 \text{ ng/ml}$ 更佳。

收获培养上清的体积以 4—5 升为宜。第一步浓缩为 10 倍。适宜的浓缩装置是一种 Amico DC2 中空纤维透析 / 浓缩 单元，装有一种截留 30000 分子量的孔径的滤筒。

按步骤 c) 用透析液如 50 mM 甘氨酸， $\text{pH } 7.8$ 透析。至少用

与样品体体相等体积的透析液透析。

按步骤 d) 进行离子交换层析，最好选用苯基—琼脂糖柱，采用 pH 梯度洗脱。对 pH 梯度洗脱而言，上清液的离子强度应调至 2M，可加固体 NaCl，尔后用柠檬酸调至 5.5。用 50 mM 柠檬酸钠 pH 5.5，2 M NaCl 和 1 mM EDTA 平衡苯基—琼脂糖柱。起始洗脱用平衡缓冲液，尔后用 50 mM 柠檬酸钠，pH 5.5，并含 0.5 M NaCl 和 1 mM EDTA 的缓冲液洗脱，最后用 50 mM 甘氨酸，pH 9.0 溶液进行洗脱。

按步骤 g) 选用 Amicon YM10 膜浓缩样品，最后体积为 3 ml。在含两性电解质 (Ampholines) pH 4.5—6.0 的 Ultrodex 制备平板胶上进行等电聚焦。在 LKB Multiphor 等电聚焦装置上于 10 °C 等电聚焦 23 小时。用 10 ml 含 1 mM EDTA pH 9.0 的 1 M 甘氨酸溶液自等电聚焦的凝胶中洗脱蛋白。按步骤 h) 用适宜的抗体包括羊抗胎盘抑制剂抗体进行探测定位。

按步骤 i) 进行浓缩可采用 Amicon YM10 膜。

按步骤 j) 选用 HPLC 进行分配层析，最好用 Waters 高压液相色谱在 Vydac C-4 反相柱上进行。洗脱梯度宜用 0.1% TFA 配制不同浓度的乙腈溶液。按步骤 j) 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

按步骤 k) 用内蛋白酶 Lys C 消化纯化的灭活素。适宜的消化条件为 3—5 μ g 灭活素加 0.1 μ g 内蛋白酶 Lys C 于 20 mM Tris-HCl pH 8.5，5 M 尿素，总体积 50 μ l，22 °C 下反应 8 小时。分配层析的适宜形式是反相 HPLC，尤其要用 Synchro-pak RP-P(C-8) 柱，用 0.1% TFA 配制的乙腈梯度液进行洗脱。

本发明的第五实施是提供基本上是纯品的灭活素。所述灭活素最

好应纯化至均质。

本发明的第六实施是提供按本发明方法制备时的纯化的灭活素。

本发明的第七实施是提供来自纯化的灭活素的多肽，和具有与上述多肽具有相似免疫学或生物学活性的多肽。

按本发明的较好多肽包括下述顺序的多肽：

AQILELPY-GDV-MFLLLP-E...

GRANFSGMSE-NDLF...

MAE-EVEVYIPQFKLEE-Y...

LNIGYIEDLK

IPNLLPEG-V

本发明还提供按本发明方法制备的多肽。

本发明的第八实施是提供一种微生物学方法制备的肽，其全部或部分肽含有灭活素的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的氨基酸顺序。

本发明还包含具有灭活素免疫学或生物学活性的肽和片段及其衍生物。

较好的肽或片段或其衍生物是由同作为灭活素氨基酸编码顺序杂交的一种DNA顺序编码的，并且具有灭活素的生物学或免疫学活性。其免疫学活性又可被抗灭活素的抗体所破坏。

本发明还提供一种未糖基化灭活素的全部、部分、类似物、同源物、衍生物及其组合的制备方法，此方法包括的步骤为：用来自单核细胞谱系的mRNA获得合成的灭活素的遗传信息；把生成的基因引入微生物中；选择和培养所述微生物以生产所述的灭活素；收集所述灭活素。

本发明进一步提供了一种灭活素免疫学或生物学活性肽的制备方

法，此方法包括的步骤为：培养用重组 DNA 分子转化的宿主，所用重组 DNA 分子包括含有灭活素全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的氨基酸第一编码顺序的 DNA 顺序和同上述第一 DNA 顺序杂交的 DNA 顺序及一种由突变（包括单个或多个碱基替换、缺失、插入和倒位）产生的与上述第一 DNA 顺序有关或杂交的 DNA 顺序，或者是一种多肽的全部、部分、类似物、同源物、衍生物或其组合的表达编码顺序，这种多肽即是灭活素或是能显示其类似的免疫学或生物学活性的一种多肽。

本发明也提供一种在组织学标本或体内确定肿瘤界限的试剂，这一试剂含有适当标记的灭活素，尤其包含用重组 DNA 技术得到的灭活素或灭活素片段。并且还提供有关在组织学标本中或在体内确定肿瘤界限的方法，该方法包含适当标记的灭活素或其片段的用法及其后成像测定标记物的集中部位。

本发明进一步提供一种抑制肿瘤侵袭和治疗肿瘤的方法，包括对需要这样治疗的病人所用灭活素的有效治疗量、适当标记的灭活素、灭活素片段或标记的灭活素片段；还提供一种治疗慢性炎症如类风湿关节炎的方法，包括对需要这样治疗的病人所用的灭活素或灭活素片段的有效治疗量；还提供一种检查慢性炎症的方法，包括用制备的抗灭活素或灭活素片段的抗体来检测体液和组织标本中的灭活素。

本发明还包含制备抗灭活素，包括重组灭活素、纯化的天然灭活素及其片段的抗体制剂。本发明还提供治疗、诊断或预防的组合物，它包含灭活素、主要是重组 DNA 产生的灭活素、灭活片段或抗灭活素或灭活素片段的抗体以及能够作为药用的无毒载体或其稀释剂。

本发明进一步提供合成的寡核苷酸探针，按本发明所述探针顺序

含有为一种表达多肽的氨基酸顺序编码的第一核苷酸顺序和与所述第一核苷酸顺序足够相关或杂交的一种DNA顺序或由突变（包括单个或多个碱基插入、倒位、缺失或替换）产生的与所述第一核苷酸有关的一种DNA顺序。

本发明还包括生产所述合成寡核苷酸探针的方法，包括测定纯化的灭活素肽段的氨基酸顺序和合成相应的寡核苷酸。所述的合成是用Applied Biosystems公司产的380A DNA合成仪完成的。

本发明提供包含按本发明合成寡核苷酸探针的配方。

所述配方宜用作诊断试剂。

本发明也同样提供一种检测人癌症和炎症情况及其易感性的方法，包括在测定中使用含所述合成的为检出灭活素编码DNA而设计的寡核苷酸探针的配方。组织缺乏产生灭活素的能力可能与对癌和炎症的易感性有关。检测出有这种情况的病人，可用纯化的灭活素进行治疗，还可作为一种受到癌和炎症影响的组织标志。

图1 灭活素活性曲线，以PMA对灭活素分泌影响表示。

图2是对分级分离的灭活素mRNA制剂分子大小的凝胶分析。

图3是分级分离的mRNA体外翻译后免疫沉淀物的放射自显影，表明灭活素mRNA结集于18S rRNA部位。

图4是免疫沉淀翻译产物的放射自显影，用抗尿激酶抗体与尿激酶形成复合物以表明其特异性。

图5是免疫沉淀翻译产物的放射自显影，表明用抗胎盘抑制剂抗体同尿激酶形成复合物的特异性（放射自显影表明用抗胎盘抑制剂抗体和用抗尿激酶抗体所得结果相同）。

图6 放射自显影表明在还原条件下，通过比较尿激酶存在与否

情况下的免疫沉淀物来鉴别灭活素翻译产物。

图 7 表示用血纤维蛋白覆盖技术区分不同种类尿激酶的凝胶图。

图 8 表示与总蛋白洗脱液相比，富含灭活素活性洗脱的 Sep-hacryl S-200 层析图。

图 9 表示在不同洗脱条件下，从苯基硼酸盐琼脂糖中分段洗脱灭活素活性。

图 10 层析图谱表示灭活素活性的洗脱与从层析聚焦柱中总蛋白洗脱的关系，与洗脱液的 pH 呈函数相关。

图 11 系一叠加图，表示自等电聚焦凝胶中分离的蛋白组分在凝胶上的灭活素活性，以确定蛋白含量与灭活素活性的比值。

图 12 a 免疫亲和柱洗脱轮廓图，表明灭活素活性的洗脱情况。

图 12 b 自免疫亲和柱洗脱的灭活素的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果和这一凝胶的 Western 蛋白免疫吸印转移结果。

图 13 I¹²⁵ 标记的尿激酶在 SDS-PAGE 上的放射自显影，显示出分子量高低不同的形式及高分子量形式在还原条件下的解离。

图 14 显示出灭活素活性和蛋白自苯基琼脂糖柱中的 pH 阶梯洗脱。

A: 用 50 mM 柠檬酸钠, pH 5.5, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl 洗脱。

B: 用 50 mM 甘氨酸, pH 9.0 洗脱。

图 15 等电聚焦分离的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后，叠加灭活素活性，以确定其比活性。

图 16 表示在图 15 显示的用等电聚焦所分离的蛋白组分，经 Western 吸印转移到硝酸纤维素滤膜上，并用抗胎盘抑制剂抗体进

行免疫检测。

图 1 7 表示自 Vydac C-4 反相高压液相层析制备高纯度灭活素的洗脱结果。

图 1 8 代表图 1 7 所示的自 HPLC 流出液第五峰所得的均一灭活素 SDS-PAGE 电泳结果。

图 1 9 表示自 Synchropak RP-P (C-8) 柱高压液相层析洗脱的灭活素多肽的洗脱结果。

图 2 0 含灭活素基因片段克隆的限制性核酸内切酶图谱及其顺序分析路线。

图 2 1 表示灭活素 mRNA 的杂交选择翻译。

图 2 2 表示含有连续的灭活素基因的质粒 pBTA 438 的构建。

图 2 3 表示灭活素基因的完整 cDNA 及该灭活素蛋白推断的氨基酸顺序。划线部分是氨基酸顺序分析所得的 5 种肽段。

图 2 4 表示灭活素表达载体 pBTA 444、和 pBTA 447 的构建。

图 2 5 表示 pBTA 444 和 pBTA 447 所表达的灭活素的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、Western 免疫吸印分析及 S³⁵ 脉冲标记蛋白分析结果。

图 2 6 表示杂合蛋白表达载体 a) pBTA 440 和 b) pBTA 586 的构建。

图 2 7 表示 pBTA 440 和 pBTA 586 表达的灭活素杂合蛋白的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 Western 免疫吸印分析及 S³⁵ 脉冲标记蛋白分析结果。

图 2 8 表示含灭活素基因的哺乳动物克隆载体 pBTA 587、

pBTA 588 和 pBTA 590 的构建。

图 29 在尿激酶存在与否的情况下，免疫沉淀哺乳动物细胞表达灭活素的放射自显影结果。

实施本发明的最好模式

诱导 U 937 细胞株以增加灭活素的合成。

已发现灭活素可通过诱导人单核细胞，某些巨噬细胞及单核细胞谱系的转化细胞（参看国际专利申请 W086/01212）产生。在地塞米松（dexamethasone）存在的情况下，转化的细胞株 U 937（ATCC CRL 1593）组成型地产生灭活素。在无血清条件下，这些细胞分泌灭活素的水平大约仅占分泌总蛋白的 0.06%。通过加入 1,4 酰佛波乙酸酯（PMA）可使这一水平增至 0.4%（约增加一个数量级）。PMA 对灭活素分泌的影响随着时间的变化出现一种双相过程，开始有一个 6 小时的迟缓期，继之以出现灭活素活性的线性增加，直达 60 小时（图 1）。PMA 浓度由 10 ng/ml 增加到 30 ng/ml，结果无差别。而且，据测定佛波醇酯同细胞紧密结合，因为放射性标记的 PMA，即使 17 小时以后，也只能在培养基中测到很小量（不到 10%）。

以下例子是本发明最优的实施方案的说明。但这些实例不能被解释为对本发明范围的限制。除非另有所述，所有分数和百分数均按重量计。

实例 1

细胞培养

人的巨噬细胞株，U 937，培养在 RPMI 1640 培养液中，内含 10% 胎牛血清和 1 μ M 地塞米松，用 T 175 培养方瓶或 10 立

升 Braun 发酵罐培养。细胞密度维持在 $1-3 \times 10^6$ 细胞/ml。虽然在此生长期细胞也能分泌灭活素，但为了纯化灭活素，仍需将细胞转移到无血清培养基中以获得上清。收集细胞，洗一次，悬于含 $1 \mu\text{M}$ 地塞米松的 RPMI 1640 液中，并培养三天。在无血清条件下，这些细胞分泌灭活素的水平可通过加入 PMA 而增加大约一个数量级，可达 0.4%。

此后收获细胞，其上清用以下实例所述方法进行纯化。

实例 2

均质灭活素的纯化

a) 浓缩无血清培养液上清中的灭活素

典型的做法是取 4 至 5 升培养液上清，用 Amicon DC2 中空纤维透析/浓缩装置（带有截留分子量为 30000 的滤筒）浓缩 10 倍。浓缩液对至少为等体积的 50 mM 甘氨酸，pH 7.8 的溶液进行透析，以除尽染料残迹。

b) 离心灭活素浓缩液

透析后的浓缩液用 JA10 转头， 4°C 8000 rpm 离心 30 分钟，除去残存的细胞碎片和在透析期间发生沉淀的蛋白。此后将清亮上清分装并冰冻于 -20°C 下，以备其后纯化。

c) 用阶梯 pH 洗脱法进行苯基-琼脂糖层析

在无 PMA 条件下培养细胞所得的上清液，经 10 倍浓缩，用来进一步通过 pH 阶梯洗脱使用苯基-琼脂糖纯化，其方法如下。

取上清（200 ml；12000 单位；比活性 102 单位/mg）加固体 NaCl，调整离子强度至 2 M，并用柠檬酸调至 pH 5.5。这种溶液用于上苯基-琼脂糖柱（4.4 cm × 5.0 cm），该柱予先用 50 mM

柠檬酸钠，pH 5.5，2 M NaCl 和 1 mM EDTA 平衡。上柱后用同样缓冲液洗脱，直到 280 nm (A 280) 光吸收指示返回到基线。此后用 50 mM 柠檬酸钠，pH 5.5，含 0.5 M NaCl 和 1 mM EDTA 的溶液洗脱，并用 A 280 进行吸收检测，直到光吸收指示返回到基线。尔后用 50 mM 甘氨酸，pH 9.0 溶液洗脱灭活素。洗脱图象如图 1 4 所示。

用这一方法回收 9553 单位灭活素，相当于上柱活性单位的 80%。收集高比活样品 (6700 单位，比活为 1343 单位/mg)，并用 Amicon YM 10 膜浓缩至 3 ml。

d) Sephacryl S-200 凝胶渗透层析

合并浓缩的灭活素液，上 2.2×78 cm Sephacryl S-200 柱，该柱予先用 0.1 M 硼酸钠，pH 9.0 平衡。流速为 0.46 ml/分钟，按每管 5.0 ml 进行部分收集。图 8 表明灭活素洗脱于主要蛋白峰的尾部边缘。合并含灭活素活性部分 (4480 单位；比活为 1355 单位/mg)，并用 YM10 膜浓缩至 3 ml。用已知相对分子量 (M_r) 标准物校正该柱，表明灭活素 M_r 为 4.5—4.8 万道尔顿。

e) 等电聚焦

浓缩的灭活素溶液用于上含两性电解质 (Ampholines, pH 4.5—6.0) 的 Ultraspeed 制备型平板胶。10°C 下于 LKB Multiphor 等电聚焦装置上进行等电聚焦 23 小时。电泳结束后，分 30 横条切下，用 10 ml 1 M 甘氨酸，1 mM EDTA，pH 9.0 溶液从每一胶条中洗脱其蛋白。各取一定量用于测定灭活素活性，并于 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳，以确定蛋白所在位置。

图 1 5 证实有相当数量的蛋白已从含灭活素活性部分除去。在这些条

件下，灭活素于 pH 5 和 5.2 之间聚焦，并在这一凝胶区内回收上样总活性的 15%。

事实上，在含灭活素活性的等电聚焦的凝胶区段内，只有两条可见的蛋白带（图 15）。为了确定哪一条带为灭活素带，将等量的聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素上，并用羊抗胎盘抑制剂抗体进行探测。由于有类似的生物学性质，可认为两种蛋白能够呈免疫学相关。如图 16 所示， $M_r = 4.5 - 4.8$ 万道尔顿的蛋白带同抗胎盘抑制剂抗体有特异性交叉反应，表明这一蛋白带即是灭活素带。况且，这一观察结果是同凝胶过滤色谱对天然灭活素测定的 M_r 为 4.5—4.8 万道尔顿的结果是一致的。

f) 高压液相色谱

自上述等电聚焦回收的含灭活素活性部分，在 Amicon YM10 超滤膜上浓缩 10 倍，并进一步用 Waters 高压液相色谱在 Vydac C-4 反相柱上进一步分级分离。用 0.1% TFA 配制的乙腈梯度溶液自反相柱中洗脱蛋白，如图 17 所示。通过 SDS-PAGE 检查每一吸收峰，表明第五峰含纯的灭活素（图 18）。

实例 2 A

a) 凝胶过滤

无细胞上清按 W086/01212 实例 2 纯化所述，通过步骤 (a) 和 (b) 处理，尔后按 W086/01212 实例 1 纯化所述，通过苯基-琼脂糖柱，用阶梯 pH 洗脱处理。合并灭活素活性的部分，用 85% 饱和硫酸铵沉淀，上 2.2 cm × 80 cm Sephacryl S-200 柱，予先用 0.1 M 硼酸钠 pH 9.0 液平衡。以 0.46 ml/分钟的流速，按每管 3.5 ml 进行分部收集。图 8 表明灭活素在主要蛋白尾部边缘

被洗脱，并有一个 2206 单位/mg 的特异性活性峰，表明比活性总共增加 3.1 倍。在这些条件下，灭活素的行为像一个自由流体分子，具有 Stokes 半径，与鸡卵清白蛋白相似，表明分子大小为 $4.5 - 4.9 \times 10^3$ 道尔顿。

b) 苯基-硼酸盐琼脂糖层析

无细胞上清液按 W086/01212 实例 2 纯化所述，通过步骤 (a) 和 (b) 处理。取 1 ml 上清加 $MgCl_2$ 至 10 mM，并用氢氧化钠调至 pH 8.5。用于上苯基-硼酸盐琼脂糖-30 (PBA 30) ($0.8 \text{ cm} \times 2.5 \text{ cm}$) 柱，予先用 50 mM 甘氨酸，pH 8.5，10 mM $MgCl_2$ 缓冲液于 4℃ 平衡。用 9 ml 上述缓冲液洗柱，后用下述溶液依次洗脱。

- a) 10 ml 50 mM 甘氨酸，pH 8.5，10 mM EDTA
- b) 10 ml 50 mM 甘氨酸，pH 8.5，100 mM 山梨醇
- c) 10 ml 100 mM Tris-HCl，pH 8.5
- d) 10 ml 50 mM 醋酸钠，pH 5.0

按每份 5 ml 进行部分收集，并在灭活素活性和蛋白测定前，于 4℃ 对 50 mM 甘氨酸 pH 7.8 溶液透析过夜。图 9 中的结果表明，在不同条件下得到两种不同的洗脱活性峰。第一峰（洗脱液含 EDTA）含上柱总活性的 3.5%，比活性增加 1.4 倍。第二峰含起始活性的 3.2%，比活性增加 4.4 倍。

c) 层析聚焦

无细胞上清按 W086/01212 实例 2 纯化所述，通过步骤 (a) 和 (b) 处理，取 4 ml 上清对 25 mM 盐酸咪唑缓冲液 pH 7.4 透析，此后上 PBE 9.4 层析聚焦柱 ($1 \text{ cm} \times 2.7 \text{ cm}$)，先以上述缓冲液平

衡。尔后用 200 ml Polybuffer pH 4.0 建立线性 pH 梯度，并按每份 4 ml，部分收集于 4 ml 1 M Tris - HCl，pH 7.5 溶液中。每 10 个部分合并在一起，于 Centricon 30 上浓缩并洗出，测定灭活素活性及蛋白浓度。图 10 表明主要洗脱活性靠近 pH 5。总回收活性为 82%，比活性增加 2 倍。

d) 等电聚焦

无细胞上清按 W086/01212 实例 2 纯化所述，通过步骤 (a) 和 (b) 处理。此后过苯基琼脂糖凝胶柱，按 W086/01212 实例 1 纯化所述用阶梯 pH 溶液洗脱。合并含灭活素活性部分，用 85% 饱和硫酸铵沉淀浓缩，并对 50 mM 甘氨酸 pH 9.0 液透析过夜。此溶液用含两性电解质 (Ampholines) pH 4.5—6.0 的 Ultrodex 制备平板胶，在 LKB Multiphor 等电聚焦装置上，10℃，聚焦 23 小时。电泳结束后，将凝胶横切 30 条，并用 10 ml 1 M 甘氨酸，含 1 mM EDTA pH 9.0 的溶液从每一条带中洗脱蛋白。各取一定量用于测定灭活素活性，并在 15% SDS - 聚丙烯酰胺凝胶中电泳，以确定蛋白所在位置。图 11 表明有相当数量的蛋白已从含灭活素活性部分除去。在这些条件下，灭活素聚焦于 pH 5 和 pH 5.2 之间，并可从这一凝胶区内回收上样总活性的 39%。

e) 免疫亲和层析

无细胞上清液按实例 1 纯化处理。取 4.6 ml 灭活素制备物 (2300 单位，2.25 mg，比活性为 1020 单位/mg)，制成含 0.05 M 磷酸钠，0.5 M NaCl，0.01% Triton X-100；0.1% 叠氮化钠，1 mM EDTA 溶液，并调至 pH 7.5。用上述缓冲液将该溶液稀释至 15 ml，并加至 15 ml 已偶合 10 mg 抗胎

盘抑制剂抗体的 Sepharose 4 B 中。该浆液于 4 °C 振摇过夜。尔后注入 2.5 cm × 3.1 cm 柱中。未结合的蛋白由柱中排出，用缓冲液洗柱，直到 280 nm 吸收值回到基线。用含 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 的 3 M KSCN 洗脱。洗脱曲线见图 1 2。将 KSCN 洗脱部分用 Centri con 10 浓缩 8.5 倍，用 40 mM 甘氨酸 pH 7.8 洗，分析灭活素活性，并进行 SDS - PAGE 电泳。大部分灭活素活性没有结合到抗体柱上。然而，有少量灭活素活性（8.5 单位）被特异地结合并被 3 M KSCN 洗脱。这表明在这样的条件下，灭活素对抗体柱已超载。此外，在相同时间内，在 KSCN 存在条件下，灭活素丧失其活性的 90%。这表明灭活素活性回收低，可能是由于灭活素分子在 KSCN 中失活所致。SDS - PAGE 结果表明，绝大多数的蛋白均未被阻留地从柱中洗脱。然而，KSCN 洗脱物中所含主要蛋白的分子量大约是 45000，与凝胶过滤的结果相似（见实例 2 A (a)）（图 1 2 a）。Western 蛋白转移分析灭活素制备物，显示出—条单一的免疫交叉反应带，与 SDS - PAGE 电泳后所观察到的蛋白带着相同的迁移（12 b）。

在某些条件下，所观察到的灭活素的分子大小大约为 60—70000（详见 PCT 191-85）。这种差异可能是由于灭活素糖基化程度改变了其迁移率所致。

实例 3

灭活素肽段的分离及顺序分析

按上述实例 2 所述，从 PMA 诱导的 U 9 3 7 细胞纯化灭活素。取纯化的灭活素（3—5 μg）用蛋白内切酶 Lys C（0.1 μg）在 20 mM Tris - HCl, pH 8.5, 5 M 尿素溶液中，终体积 50 μl。

于 22℃ 水解 8 小时。通过反相高压液相色谱，在 Synchropak RP-R (C-8) 柱上，用以 0.1% TFA 配制的乙腈梯度液分离酶解肽段 (图 19)。用 Applied Biosystem 470A 气相测序仪测定了以星号标明的肽段，其氨基酸顺序：

肽 13: AQILELPY-GDV-MFLLLP-E...
肽 11: GRANFSGMSE-NDLF...
肽 10: MAE-EVEVYIPQFKLEE-Y...
肽 6: LNIGYIEDLK
肽 9: IPNLLPEG-V

实例 4

灭活素的分子克隆

a) mRNA 的提取

由图 1，PMA 诱导的 U 937 细胞转录的最适时间可估计为 15—25 小时。因此，密度为 1.2×10^6 细胞/毫升的 4 升无血清培养的 U 937 细胞在含 PMA 的培液中孵育 19 小时后，即可收获并迅速冻存于液氮中备用。未经 PMA 刺激的 U 937 细胞经 3 天无血清培养后一并收获以提取 mRNA。人血单核细胞按国际专利申请 WO86/01212 中所述制备，体外培养 3 天后亦用作 mRNA 来源。

以上各种来源的总 RNA 的抽提按改良的盐酸-胍法进行。将细胞悬于 20 倍体积 (每克重量) 含 4 M 异硫氰酸胍，50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M β -巯基乙醇的缓冲液中，于组织捣碎器中在 4℃ 低速处理 3 分钟。悬液离心 10 分钟以除碎片，向上清中加入醋酸至 25 mM 及 0.75 倍体积的冷乙醇并置 -20℃ 过夜以沉淀核酸。悬液于 -10℃ 离心 30 分钟，将沉淀溶于 20% 原体积的含 7.5 M 盐酸胍，20 mM 醋

酸钠 pH 5.0, 1 mM 二硫苏糖醇的缓冲液中。离心除净不溶物后, 将 RNA 重新沉淀于 0.5 5 倍体积的冷乙醇中, 置 -20°C 1—3 小时, RNA 经离心收集后重新溶于盐酸胍缓冲液并再次沉淀。此最后步骤重复 3 次后, 将沉淀溶于 20 mM EDTA, pH 7.0, 以等体积氯仿 : 正丁醇 (4 : 1) 抽提, 向水相中加入 pH 5.0 的醋酸钠至 0.3 M 和 2 倍体积的冷乙醇, 置 -20°C 过夜使 RNA 沉淀。离心收集 RNA 并加入 100 mg/ml 蛋白酶 K (配于 20 mM HEPES, pH 7.4, 0.5% 十二烷基磺酸钠溶液中), 50°C 作用 4 小时以除净残留的蛋白质。加入醋酸钠至 0.2 M, pH 5.0 和 2 倍体积冷乙醇并置 -20°C 使 RNA 沉淀。离心收集后, 用 3 M 醋酸钠, pH 6.0, 于 4°C 过夜沉淀 RNA, 以除净残留的 DNA。离心所得 RNA 沉淀于 0.25 N 氯化钠和 2 倍体积的乙醇中, 再次离心收集 RNA。POLY A⁺ mRNA 的提取经过 2 次 Oligo (dT) 一纤维素柱的吸附与洗脱即可完成。

用蔗糖密度梯度离心将 POLY A⁺ mRNA 富集 10 至 20 倍以制备灭活素 mRNA。样品加于 15—34% 的蔗糖梯度上, 并于 4°C 用 Beckman SW 41 转头以 33000 rpm 离心 16 小时。图 2 表示按分子大小片段分离的 mRNA 制备物在变性条件下的凝胶电泳分析结果。由体外翻译和免疫沉淀方法 (下述如图 3) 测得灭活素 mRNA (组分 16 和 17) 集中在标准品 18 S 核糖体 RNA 所在位置的周围。

b) 灭活素翻译产物的鉴定

通过无细胞的网织红细胞溶胞体系中进行体外翻译以及灭活素翻译产物和其天然底物尿激酶的免疫沉淀反应进行灭活素 mRNA 的鉴

定。

兔网织红细胞溶胞产物从 Amersham 公司购得，基本按厂家说明书介绍使用，并加入 100 ng/ml 的牛肝 tRNA (Boehringer Mannheim 产品)。加入浓度为 2 mci/ml 的 ^{35}S - 旦氨酸，用放射自显影进行翻译产物的检测。按上述方法制备的 POLY A⁺ mRNA 在 30°C 以 50 mg/ml 的浓度翻译 90 分钟。每次取 $25 \mu\text{l}$ 的翻译混合物进行免疫沉淀反应。与经过洗涤的金黄葡萄球菌 (*staphylococcus aureus* 商品名 Pansorbin, 由 Calbiochem 产) 完整细胞孵育后再除去菌体，以减少非特异性结合，样品与 50 mPU 尿激酶 (Calbiochem) 于室温共同孵育 90 分钟，该步反应使灭活素的翻译产物与尿激酶形成复合物。加入 $1-2 \mu\text{l}$ 抗尿激酶的抗血清 (Green Cross Corp.) 或抗胎盘抑制剂 (Placental inhibitor) 的抗体，在室温孵育 30 分钟并置 4°C 过夜后，加入 25 ul 洗涤过的 Pansorbin 以沉淀溶液中的复合物。离心后洗涤灭活素 - 尿激酶 - 抗体 - Pansorbin 复合物沉淀，于 2% SDS 和 β -巯基乙醇中煮沸分解，产物通过凝胶电泳和放射自显影进行分析。

^{35}S 标记的翻译产物与抗尿激酶抗体的免疫沉淀反应获得尿激酶特异性的翻译产物，其 M_r 为 69000 和 79000，这些蛋白区带代表灭活素与尿激酶的特异性复合物，因为：

- 1) 当尿激酶或 mRNA 不存在时，它们也不存在；
- 2) 没有抗体时，它们不产生沉淀，并且
- 3) 它们与未标记的纯灭活素及胎盘抑制剂 (Calbiochem) 制备物在结合尿激酶中发生竞争作用 (图 4)。

实验结果表明免疫沉淀的反应产物占经 PMA 诱导 U 937 细胞后提取的 mRNA 所合成的总蛋白质的 0.05%，未经诱导的 U 937 细胞的 mRNA 反应物中没有检测到免疫沉淀产物，这可能是由于该制备物中灭活素 mRNA 的水平降低所致。

用胎盘抑制剂抗体免疫沉淀尿激酶 - 灭活素翻译产物产生相同的结果。几种抗胎盘抑制剂抗体制剂所沉淀的尿激酶 - 灭活素的独特翻译产物复合物，其分子量在 69000 和 79000（图 5）。

如图 6 所示，当存在或缺乏尿激酶的条件下所得免疫沉淀产物进行比较时，使我们可直接鉴定灭活素的翻译产物。此翻译产物以不同的带出现，Mr 为 43000。该分子量似略小于天然蛋白质，可能是由于糖基化作用，该带在尿激酶存在下消失，而在 Mr = 69000 处可检测到特异的尿激酶 - 灭活素翻译产物。另一早先观察到的 Mr = 79000—80000 的蛋白带似乎代表复合物的非还原态，因样品分析系在部分还原的条件下进行。

并且，我们还发现与灭活素翻译产物形成复合物需依赖于尿激酶的低分子量形式 (HPA 33) 的存在。从 Calbiochem 公司所得的 HPA 52 和 HPA 33 的纯制备物，用纤维蛋白覆盖术证明大多同属一种或另一种。此外，向 HPA 33 中加入纤维蛋白溶酶原/纤维蛋白溶酶可使制备物中残留痕量的 HPA 52 转变为低分子量类型。只有当所用尿激酶制备物中含有 HPA 33 时，才有 Mr = 69000 的特异的尿激酶 - 灭活素翻译产物复合物出现。该结果的解释仍不清楚。向溶胞混合物中加入 trasylol 以抑制可能的蛋白水解作用，当对该结果并没有影响。

综上所述，U 937 细胞 mRNA 的体外翻译显然产生一种具有生

物活性的相对分子量约为 43000 的翻译产物，该产物可与尿激酶可形成特异性的 $M_r = 69000$ 的复合物，故很易进行鉴定。

c) 互补 DNA 文库的构建

cDNA 文库是按传统但经改进的方法由总 Poly A⁺ mRNA 或由蔗糖密度梯度分离而来的 mRNA 构建的。例如，第一条互补 DNA 链通常由 mRNA 利用引物启动反转录酶而合成，第二条链的合成有如(1)利用 DNA 聚合酶或反转录酶的常规的发夹—环引导的 DNA 合成法；(2) RNase H-DNA 聚合酶 I 介导的第二条链合成法或(3) 5'-加尾引物法。经 S1 核酸酶处理(如果需要)后使 DNA 甲基化，并用经典的补平方法，如 DNA 聚合酶、Klenow 片段或 T₄-聚合酶所产生平末端。其后，cDNA 即可按传统方法与适当的质粒(如 PBR 322, PUC 或 PUR 系统)或噬菌体(如 λ gt11)载体通过互补同聚物接尾或粘性末端(可由含有合适的限制位点的人工接头片段产生)进行连接，并转化合适的宿主而完成克隆。

实例 5

以下是本法优选的构建 cDNA 文库的一种方法。用莫洛尼氏小鼠蛋白血病病毒(Moloney murine leukemia virus)反转录酶(BRL, 200 U/ μ g mRNA)从 6 μ g 总 Poly A⁺ mRNA 合成 cDNA，反应系统含 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 3 mM MgCl₂, 各 1 mM 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP, 10 μ g/ml Oligo (dT)₁₂₋₁₈ 和 100 μ g/ml BSA, 200 μ l 反应体积于 37 °C 保温 40 分钟。第二条链由发夹环引导法合成，用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段催化，反应混合物在 70 °C 加热 10 分钟使 DNA/RNA 双链解聚，稀释至 2 倍体

积并加入 Klenow 片段至 325 U/ml 和 $10 \mu\text{Ci dATP}$ (1800 Ci/m mole), 使反应混合物于 15°C 保温 1 小时。经酚:氯仿 (1:1) 抽提和乙醇沉淀后, 将 DNA 溶解并加入 80 U S1 核酸酶 (P/L Biochemicals 产) 以除发夹环结构, 反应系统含 0.2 M NaCl , 50 mM 醋酸钠 $\text{pH } 4.5$, 1 mM ZnSO_4 和 0.5% 甘油, 如前述沉淀 DNA。

在含有 $100 \text{ mM Tris-HCl pH } 8.0$, 10 mM EDTA 和 $80 \mu\text{M S-腺苷甲硫氨酸}$ 的反应液中用 20 单位 EcoR I 甲基化酶 (BioLabs) 使双链 DNA 甲基化。DNA 的修复在含有 $33 \text{ mM Tris-醋酸, pH } 8.0$, 66 mM 醋酸钾, 10 mM 醋酸镁, 0.5 mM 二硫苏糖醇, 0.1 mg/ml BSA 和各 0.5 mM 的 dATP , dCTP , dGTP 和 dTTP 及 2.5 单位的 T_4 DNA 聚合酶的反应液中进行, 于 37°C 反应 1 小时后加入 T_4 多核苷酸激酶 (20 单位) 和 0.1 mM ATP 。经酚:氯仿 (1:1) 抽提和乙醇沉淀重新溶解 DNA 后加入 EcoR I 人工接头 ($2 \mu\text{g}$ 接头 / $1 \mu\text{g}$ DNA) 和 T_4 DNA 连接酶 (IBI; $1.2 \text{ U}/\mu\text{g}$ DNA), 溶液中 DNA 浓度为 $167 \mu\text{g/ml}$, 反应在 26°C 进行 4 小时。经 EcoR I 处理后, 游离的接头经 $\text{BioGel A } 150 \text{ M}$ 层析而与 cDNA 分离。合并平均长度大于 1000 b. p. 的含 cDNA 的组分, 加入 2 倍体积乙醇使 cDNA 浓缩、沉淀。cDNA 产量为 $2.5 \mu\text{g}$ 。

cDNA 文库由 $\lambda \text{gt } 11$ 和 $\lambda \text{gt } 10$ 两种载体制备。cDNA (100 ng) 与经 EcoR I 酶解、磷酸化的 $\lambda \text{gt } 11$ ($1 \mu\text{g}$) 连接, DNA 浓度为 $220 \mu\text{g/ml}$, 于 4°C 反应 16 小时。DNA 的包装用载体克隆系统 (Vector Cloning System) 的包装制备物进行。

噬菌体吸附在大肠杆菌菌株 Y 1088 中扩增，并在 Y 1090 中筛选，在 λ gt 11 文库中，每微克 cDNA 含约 8×10^6 重组子（占总噬菌体的 94%）。含 cDNA 重组子的百分率由将此文库与 cDNA（合成时掺入 α [^{32}P] - dATP）进行（杂交）筛选而测得。约 90% 的白色噬菌斑与该探针杂交。

在 λ gt 10 中制备的文库，其 cDNA (200 ng) 与经 EcoRI 酶解、磷酸化的 λ gt 10 (1 μg) 连接，DNA 浓度为 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，于 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 小时。DNA 的包装按上述进行，所用大肠杆菌菌株为 C 600 hfl。

λ gt 10 文库中每微克 cDNA 约含 7.5×10^6 重组子。含 cDNA 重组子的百分率由将此文库与用放射性标记的 cDNA 进行筛选而测得。高于 90% 的噬菌斑与该探针杂交。

实例 6.

含灭活素基因克隆的鉴定

含有编码灭活素基因的克隆可如以下所述按传统方法用探针进行鉴定。

实例 6a

杂交—选择翻译

含有与灭活素 mRNA 互补的 cDNA 克隆可由杂交选择鉴定。克隆 DNA 经变性固定于固相基质如硝酸纤维素膜上，与总 mRNA 制备物杂交。将 RNA/DNA 双链加热以释放出 mRNA，后者如前所述在无细胞的网织红细胞溶胞系统中进行体外翻译，翻译产物即可按例 4b 所述进行鉴定。

实例 6b

与灭活素基因顺序互补的 DNA 探针

如例 3 所述，利用从灭活素多肽所得的氨基酸顺序，可推知编码该氨基酸的寡核苷酸顺序，进而可方便地用传统方法合成寡核苷酸探针。

利用这些数据，在 Applied Biosystem 380A DNA 合成仪上合成了几种寡核苷酸探针，其顺序为：

1. TT(G) AA(C) TG(A) ACI AT(G) TA
 (A) (T) (G) (A)
 (C) (T)
2. TA(T) AC(C) TC(T) AC(T) TC
 (A) (A)
 (G) (T) (G) (C)
 (C) (C)
3. TC(T) A(G)I AT(C) TG(C) GC
 (G) (A) (A) (A)
 (T) (G)
 (C) (T)
4. TTG AA(C) TGI ACI ATG TAI AC(C) TCI AC(C) TC
 (T) (T) (T)
5. TC(C) TCI AT(G) TA(A) CCI AT(G) TT
 (T) (A) (C) (A)
 (G)
6. AAI TT(A) GCI C(T)(A) CC
 (T) (T)
 (C) (G)(C)
 (G) (G)
7. ATA TGT TTC CTC GAG CTT GAA CTG AGG GAT GTA CAC CTC GAC
 TTC GCT CTC TGC CAT
8. TTC ATC AGG CAA CAG GAG GAA CAT GCT CAC ATC TCC GGC GTA
 AGG GAG TTC CAG GAT CTT CAT TTT
9. CTC CTC CAG CTT GAA CTG GGG GAT GTA GAC CTC CAC CTC

10. CTT GAA CTG (A)GG (A)AT GTA (G)AC CTC CAC CTC

这些特异性的寡核苷酸探针可经放射标记后按传统方法与细菌或噬菌体进行原位杂交以筛选 cDNA 文库，鉴定含有全部或部分灭活素基因的克隆。

实例 6c

免疫学筛选

克隆可按传统方法用与天然灭活素蛋白发生交叉反应的抗体进行筛选。

抗灭活素的抗体按传统方法制备，如每只兔以 10 至 100 μg 纯灭活素和适量的佐剂如福氏完全佐剂或褐煤酸 (Montanide) 进行免疫，约 4 周后给以等量的抗原作一次加强免疫，其后即可取兔血清检测灭活素抗体。

实例 6d.

用生物活性进行筛选

含有灭活素基因的克隆可通过用放射标记的尿激酶或尿激酶与尿激酶抗体检测或筛选灭活素的生物活性，可利用传统的免疫筛选技术来完成。尿激酶和尿激酶抗体有商品出售。放射标记的尿激酶可按下述方法制得。

市购尿激酶 (Calbiochem 产) 按已发表方法 [Holmberg, L., Bladh, B., Astedt, B. *Biochim. Biophys. Acta* 445, 215—222 (1976) 和 Goldfarb, R. H., Quigley, J. P. *Biochemistry* 19, 5463—5471 (1980)] 经 P-aminobenzamide sepharose 亲和层析而纯化。75 Plouge 单位的纯化尿激酶与 N-succinimidyl

3 - (4 - hydroxy, 5 - [^{125}I]idophenyl) propionate 结合而碘化, 反应按 Bolton Hunter 法进行。 ^{125}I 标记的尿激酶经 Sephadex G - 25 (中粒度) 柱而与未标记的分离, 该柱平衡于 0.1 M 磷酸钠, pH 7.0, 0.4 M NaCl, 0.1% Triton X 100 及 1% 载体牛血清白蛋白。

^{125}I 标记的尿激酶制备物在非还原条件下的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明: 有特异的高分子量 ($M_r = 55000$) 和低分子量 ($M_r = 33000$) 形式的尿激酶出现 (图 13)。在还原条件下, 高分子量形式解离为其特异的 $M_r = 33000$ 和 $M_r = 22000$ 亚单位。按 Coleman 与 Green 法 [Ann. N. Y. Acad. Sci. (1981) 370, 617] 测得尿激酶制备物的碘化引起其纤维蛋白溶酶原激活物活性降低 10% 至 15%, 但不影响灭活素对该酶的抑制作用。滤膜点杂交 (dot blot) 实验中将不同稀释度的灭活素点于硝酸纤维素膜上与放射标记的尿激酶保温过夜, 洗涤、干燥并自显影后的结果表明放射性标记的尿激酶可以检测结合在固相上的灭活素, 其灵敏度为 10 mu 或 0.1 ng 灭活素。

实例 7

灭活素基因的鉴定

鉴定灭活素基因的优选方法如下: 实例 6b 所述的寡核苷酸探针 7—10 合成后, 以聚丙烯酰胺凝胶电泳纯化, 使用多核苷酸激酶 (IBI 产, 1 U / pmole DNA) 和 $\gamma - ^{32}\text{P} - \text{ATP}$ 进行标记, 最终通过离子交换层析标准方法进行纯化。

应用标准实验方法进行原位杂交筛选实例 5 所述及的 λ gt 10 文库 杂交条件调节到能在最低的本底上发生特异的结合, 具体条件

如下:

探针7和8: 先于42℃、在6×SSC、5×Denhardt's、0.5% SDS、0.2 mg/ml 剪切过的小牛胸腺DNA中预杂交1小时, 再于50℃在6×SSC、5×Denhardt's、0.1% SDS、20 μg/ml tRNA中杂交3小时。

探针9和10: 在10×Denhardt's、5×SSC、0.05% 焦磷酸钠中37℃杂交16小时。

³²P标记的寡核苷酸探针比活性超过10⁸ cpm/μg, 使用浓度约为0.5 pmole/ml。在提高温度的条件下使用含有0.1% SDS的0.5×或2×SSC洗涤滤膜时, 以便能更严格地筛选阳性克隆。

挑出有阳性信号的噬菌斑, 再度筛选, 然后应用标准方法纯化噬菌体DNA (参见Maniatis, T 等著《分子克隆》一书1982)。

得到两个含有能相互杂交的DNA序列的重组噬菌体克隆, MIN1D和MIN611。分别带有2100和1060 bp的cDNA插入片段, 两侧含EcoRI人工接头。这两个插入片段再亚克隆入质粒puc18, 从而构建了质粒pBTA440和pBTA441, 其限制性内切酶酶切图谱见图20。克隆MIN1D的Southern blot分析说明寡核苷酸探针7和8的结合区定位于一个320 bp的XbaI - NcoI片段内, 见图20。

通过杂交—选择翻译和DNA序列分析证实了这些克隆含有灭活素基因。

杂交选择翻译

纯化的pBTA440以每3 mm×3 mm滤膜20 μg的浓度固定于

硝酸纤维素滤膜上 (Maniatis, T. 等, 《分子克隆》, 1982)。洗涤之后, 每一个滤膜与 50 μ g 的总 mRNA 在 50° 杂交 3 小时。经彻底洗涤后, 用煮沸法洗下特异杂交到膜上的 mRNA, 并使用市售的兔网织细胞胞溶物 (Amersham 产品) 进行体外翻译。

如图 2 1, 凝胶电泳分析表明杂交后解离的 mRNA 特异编码一种相对分子量为 43000 的蛋白质, 此即实例 4b 所述的灭活素翻译产物所具有的特征。进而, 在尿激酶的存在下, 该电泳条带消失, 而在相对分子量为 69000 部位可检出尿激酶 — 灭活素特有的复合物。

DNA 序列分析

将 pBTA 440 的限制性片段亚克隆在单链噬菌体载体 M13mp9、M13mp18 和 M13mp19 中, 并使用 Sanger 链终止法确定 2100 bp 插入片段的 DNA 序列。DNA 序列的检查说明 2100 bp 的插入片段并不含有完整灭活素基因的编码序列。

引物延伸

为得到编码灭活素 N-端区的剩余部分 DNA 序列, 应用引物延伸方法构建了第二个 cDNA 文库。这种文库的制备是通过在 5 μ g 的 poly A⁺ mRNA 上用寡核苷酸 5' TTC CAG TAA ATA ATT CCC TGT GGA TGC ATT 3' 作引物 (该段寡核苷酸与已测序列的第 391—420 位核苷酸互补)。应用标准技术将连有 EcoRI -接头的 cDNA 片段克隆入 λ gt 10。

使用第二个寡核苷酸探针 5' GCC TGC AAA ATC GCA TCA GGA TAA CTA CC 3' (与第 310—335 位核苷酸互补) 从已得到的 7.2×10^4 个克隆中筛选了大约 5.3×10^3 个克隆。100 个阳性克隆中, 15 个被纯化, 而带有最大 cDNA 插入 (430 bp)

的克隆(克隆13)再亚克隆入pUC18,构建了质粒pBTA442。pBTA442的DNA序列测定如上所述。(参见图20)。

含于pBTA440和pBTA443中的灭活素基因的编码序列通过重组一定的DNA限制性片段而使它们成为一连续的基因序列,产生pBTA438,如图22。pBTA443是在pUC18中含有430bp的5'侧灭活素基因的质粒,但与pBTA442的该片段的插入方位相反。含有pBTA438质粒的大肠杆菌K-12, JM109菌株存于“美国标准培养物收藏库”ATCC, (12301 Park-Lawn Drive, Rockville, Maryland 20852), 收藏日期1987年2月11日,目录号为ATCC 53585。

灭活素基因的完整cDNA序列和由此导出的灭活素蛋白质的氨基酸序列见图23。完整的翻译产物由415个氨基酸组成($M_r = 46543$)。由图23所示的天然灭活素氨基酸序列分析知该基因编码5个多肽。

DNA序列分析说明灭活素是丝氨酸蛋白酶超家族(称作Serpins)中的一员,尽管它专作用于尿激酶型纤维蛋白溶酶原激活剂。

实例8

有生物活性的灭活素的表达

如将pBTA438的全长cDNA整合入各种载体中,这些载体能在细菌或真核细胞(例如用载体转染或转化哺乳动物细胞)各种宿主中指导蛋白质的合成,便可获得具有生物活性分子的高水平表达。载体宜含有控制编码灭活素基因表达的核苷酸序列。另一个核苷酸序列也应包括在载体中,如启动子序列,多聚腺苷酸加合信号的序列,或可使该蛋白与另一蛋白融合作为一种杂交分子进行表达的序列。

实例 9

在细菌中表达灭活素

总的的方法是制备能在大肠杆菌中复制的表达载体或克隆载体，这些载体含有编码灭活素的 DNA 序列。

灭活素或以天然形式或以与另一蛋白融合的杂合形式表达。这些构建方法见于图 2 4 和 2 6。

使用 λ PL 表达载体 PLK 5 7 和 PLK 5 8 (Botterman 等, Gene 37: 229—239, 1985) 构建一系列质粒，以表达天然或近似天然 (N-端氨基酸被修饰) 的灭活素。

如图 2 4 所示，使用 EcoRI 和 DraI 酶切 pBTA 4 3 8，可由琼脂糖凝胶中分离到一个 1610 bp EcoRI-DraI 的限制性片段。用 T₄ 连接酶将该片段与 EcoRI 和 EcoRV 酶切的载体 PLK 5 7 相连。所得到的质粒 pBTA 4 4 4 含有控制天然灭活素表达的 λ PL 启动子。

表达载体 pBTA 4 4 4 转化大肠杆菌 K-12 N 4830 菌株 (Joyce 等, PNAS 80, 1830—1834, 1983)，该菌株含有 λ 的对热不稳定 CI 阻遏物。被 pBTA 4 4 4 转化的细胞在含 100 μ g/ml 的氨苄青霉素的 MEB 培养基 (Mott 等 PNAS 82, 88—92, 1985) 上 28℃ 过夜培养。次日将过夜培养的细菌稀释在 MEB 培养基中，复在 28℃ 培养，直至 OD₆₀₀ 值达到 1.0。此时加入等量的预热到 65℃ 的 MEB 培养基，使培养温度为 42℃。

42℃ 培养 4 小时后收获细胞，并将洗过的细胞 (-70℃ 冰冻与融解) 重新悬浮于 200 μ l 的 20% 蔗糖、pH 8.1, 30 mM Tris-HCl 及 mg/ml 溶菌酶溶液中，再加入 3 ml pH 7.3 3M EDTA,

从而制备膜与可溶性蛋白部分。细胞提取物经短时超声波处理后，离心沉淀膜与不可溶蛋白 ($27000 \times g$, 60分钟)。在上清中加入三氯醋酸 (10% w/v) 沉淀可溶性蛋白质，沉淀再溶于水。沉淀的膜也溶于水。在诱导细胞 ($42^\circ C$) 和非诱导细胞 ($28^\circ C$) 中的这些组分的样品，经 SDS — 聚丙烯酰胺凝胶电泳和应用抗人胎盘抑制物抗血清进行的 Western 印迹转移免疫检测分析其中的灭活素，如图 2 5 所示，使用抗人胎盘抑制物抗体和碱性磷酸酶 (Sigma) 偶联的兔抗山羊 IgG 抗体在 Western 印迹转移中可显示在诱导条件 ($42^\circ C$) 下，细胞的可溶性组分和膜组分中都有一条灭活素蛋白带 ($M_r = 40000 - 50000$) 出现。

另一生产天然灭活素的方法如图 2 4 所示。用 Xho II 酶切 pBTA 4 4 2 后，由琼脂糖凝胶中可纯化得到一个 2 4 3 bp 的 Xho II 限制性片段。将该片段用 T_4 连接酶与已被 Bgl II 酶切的载体 BLK 5 8 相连接。产生的质粒 pBTA 4 4 5 用 Pvu II 和 Sma I 酶切，经纯化得到的一个 2800 bp 的片段，用 T_4 连接酶与 pBTA 4 3 8 的 1320 bp Pvu II - Dra I 限制性片段相连。所得质粒 pBTA 4 4 6 再用 Bgl II 切成线性，然后与一段合成的含有一个细菌核糖体结合位点和天然灭活素基因起始核苷酸的 26 个寡核苷酸双链 DNA 相连接；构建质粒 pBTA 4 4 7。当 pBTA 4 4 7 转化到一个合适的宿主，如 N 4830，经上述方法诱导和分析，灭活素的产生如图 2 5 所示。在含 pBTA 4 4 4 和 pBTA 4 4 7 的细胞中，灭活素均出现在诱导条件 ($42^\circ C$) 下细胞的可溶性组分和膜组分中。

为测定大肠杆菌 N 4830 中产生的灭活素活性，可溶性组分和膜组分与高或低分子量的尿激酶 (见实例 4) 一起温育 90 分钟。然后

用丙酮沉淀样品，再将其悬浮于水中，并在还原条件进行 SDS — 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。灭活素及灭活素 — 尿酸酶复合物经上述 Western 印迹转移法显示。如图 2 5 所示，含 pBTA 4 4 7 的大肠杆菌 N 4830 经诱导产生的可溶性组分中的灭活素和尿酸酶，在标准测定条件下可形成复合物。这说明这些细胞产生的灭活素具有生物学活性。

以下是生产灭活素融合蛋白方法中的两个例子。它含有与之融合的蛋白全部或部分基因编码顺序，以及灭活素基因全部或部分编码顺序。如图 2 6，质粒 pBTA 4 4 0 用 Ssp I 和 Dra I 酶切，由琼脂糖凝胶分离到一个 1110 bp 的片段。将该片段与 Eco R V 酶解的载体 pBTA 4 4 9 相连，构成 pBTA 4 5 0。pBTA 4 5 0 再用 Ava I 消化，将纯化的 2800 bp 的片段与事先用 Ava I 酶切的质粒 PLK 5 7 相连，产生质粒 pBTA 5 8 6。这使得部分灭活素编码序列在 λ P1 启动子的控制之下，并与 traT 基因的前 80 个氨基酸编码序列相融合。traT 基因产物的前 20 个氨基酸构成一个与大肠杆菌外膜相融合的信号序列。这个信号序列在输送到外膜的过程中被切掉；traT 蛋白正常定位于外膜中。

当质粒 pBTA 5 8 6 转化到一个适当宿主时，如 N 4830，经过上述方法升温诱导，traT - 灭活素融合蛋白便出现在外膜，见图 2 7。

本法的第二个例子便是生产融合蛋白，如图 2 6。在质粒 pBTA 4 4 0 中，灭活素编码序列与质粒 Puc 1 8 上的部分 β - 半乳糖苷酶基因以正常阅读框架融合。

当质粒 pBTA 4 4 0 转化到合适的宿主时，如 JM 101，或任何

含有 LacI^q 基因的大肠杆菌，通过加入异丙基 - 硫代 - β - D - 半乳糖苷 IPTG (终浓度 1 mM)，灭活素的产生可由上述方法检测出来 (图 27)。

实例 10

灭活素重组基因在真核细胞中的表达

一个含有灭活素完整编码序列的 pBTA 438 的片段插入一系列载体，能在哺乳动物细胞中稳定整合和表达真核基因。它们包括，

1) pKC3 (由 pko-neo 衍变而来, Van Doren, Hanahan, D., Gluzman, Y., J. Virol. 50: 606—614 (1984))。灭活素 cDNA 序列置于 SV 40 早期启动子控制之下; 2) pZip-NeoSV (X) 1 (Cepko, C. L., Roberts, B. E., Mulligan, R. C., Cell 37, 1053—1062 (1984)), 莫洛尼鼠白血病毒病素衍变的逆转录病毒穿梭系统, 其中灭活素基因在逆转录病毒 LTR 启动子的下游, 其筛选根据 neo 基因使微生物具卡那霉素抗性而真核细胞有 G 418 抗性; 3) pMSG (由 Pharmacia 购得), 其中灭活素表达的调节是通过使用一个包含在小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 5' - LTR 中的可被地塞咪松诱导的启动子。

这三种载体的构建见图 28, 其细节如下: 灭活素基因的编码区从 pBTA 438 分离得到, 为一个 1610 bp 的 EcoRI / DraI 片段, 并将其插入下列载体。

1610 bp EcoRI — DraI 片段与已用 EcoRI 和 SmaI 酶切的 pKC3 相连接, 然后转化到大肠杆菌 C 600 γ 。所产生的质粒称为 pBTA 587。

第二种构建法: 用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段将 1610 bp 的

EcoRI—DraI片段两端补平，然后克隆到pMSG的SmaI位点，再转化一个合适的大肠杆菌K-12宿主。在pMSG中含有灭活素基因的克隆的检测可应用实例7描述的³²P-标记寡核苷酸(29聚合体，与第310—335位核苷酸互补)进行菌落杂交。重组质粒称为pBTA588。

第三种构建方法：上述补平末端的EcoRI—DraI片段克隆到已用HincII酶切的pUC7中，产生质粒pBTA589。由于pUC7的HincII位点两侧有BamHI位点，因此能用BamHI酶切后分离得到灭活素基因，然后将其克隆到pZIPNeoSV(X)1的BamHI切点。转化合适的大肠杆菌K-12宿主，含有灭活素基因的菌落可通过上述的菌落杂交法筛选。得到的重组质粒称为pBTA590。

转染真核细胞

所有质粒通过磷酸钙法转染到真核细胞中。大约 $1-2 \times 10^9$ 细胞接种于T25培养瓶之中，其内装5ml Dulbecco改良的Eagle培养液，并含10% (V/V)的胎牛血清，3.6 mM谷氨酰胺，200 mM，45 IU/ml青霉素和45 μ g/ml的链霉素(完全培养基)。用大约1—5 μ g CsCl梯度纯化的重组质粒DNA以磷酸钙沉淀，然后加入细胞。4小时后，细胞经甘油休克处理后，继而在完全培养基中培养3天。取培养物的上清以测定暂时性表达。然后用胰蛋白酶处理细胞，取其1/3转入T75培养瓶中，内装有含适当的抗生素优选的完全培养基(见下)。细胞每6—7天用同样的培养基洗涤一次，在14—28天挑取转染子，并分别单独培养，直至细胞生长至融合。

pBTA587、pBTA588和pBTA590的转染条件如下：

pBTA 587。由于 pKC3 (T) 含选择标记，可将 pBTA 587 与 PZIPNeoS_V (X) 1 以 7.5 : 1 的克分子比例进行共转染。转染子在含 0.4 mg/ml 的 G 4 1 8 完全培养基上筛选。转染在猴肾 COS 细胞中进行。

pBTA 588。由于 pMSG 所含大肠杆菌的黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸戊糖转移酶 (gpt) 基因在 SV 40 早期启动子控制下表达，所以稳定转染细胞可在含次黄嘌呤、氨基嘌呤和霉酚酸的 HAT 培养基上筛选。转染使用 NIH3T3 大鼠成纤维细胞。

pBTA 590。使用含 0.4 mg/ml 的 G 4 1 8 的完全培养基筛选转染子。转染在 NIH3T3 细胞中进行。

灭活素重组基因在真核细胞中表达的分析

转染后，在 ³⁵S - 甲硫氨酸和抗胎盘抑制物抗体（基本上按实例 4b 所述）与重组标记灭活素形成特异免疫沉淀存在下，培养细胞，以检测重组灭活素的暂时性表达。如在 pBTA 587 转染 COS 细胞后 48 小时，取出上清，将细胞在有 1 ml 无甲硫氨酸的 EMEM (Flow 公司) 但辅以含 S³⁵ - 甲硫氨酸 (Amersham 产) 的条件下培养。用 50 mg 羊抗胎盘抑制物抗体和 200 ml 洗过的 Pansorb-in 免疫沉淀后，复合物经 SDS - 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析（还原条件）然后用图 29 所示的自显影法显示结果。重组灭活素作为一条相对分子量的 45000—48000 的带而被检测出来，而该带在仅含载体 (pKU3) 的相应对照中却不出现。在免疫沉淀之前于上清中加入尿激酶 (15 Plough 单位, Calbiochem)，该带消失，这正是有生物学活性灭活素的特征。在相对分子量 Mr = 69000 处出现一条带，表明有尿激酶灭活素复合物存在；但由于一条非特异蛋白

带出现于同一位置而使之略为模糊。一些重组灭活素在加入尿激酶制备物后出现蛋白水解造成的断口，可由检测到相对分子量 35000—37000 的条带证实。

通过无血清培养 4 小时细胞，经实例 1 所述的比色法定量分析灭活素对尿激酶活性抑制方法，可确定生产的重组灭活素具有生物学活性。所检测出的抑制水平相当于高出本底约 1 单位/ml 的灭活素活性。

使用放射性标记尿激酶也可用来分析含灭活素基因的转染细胞中的灭活素活性，其放射性标记尿激酶是根据实例 6 或 Baker 的方法制备。培养物上清与放射性标记尿激酶共同温育，以使重组灭活素与尿激酶形成复合物。然后加入兔抗尿激酶抗体 (Green Cross 公司)，再加入洗过的 Pansorbin 或与免疫珠 (Biorad 公司) 共价相连的抗兔抗体而沉淀复合物，从而自溶液中取出该复合物。离心后，洗涤灭活素—尿激酶—抗体沉淀块，再通过 2% SDS 煮沸解连。产物用凝胶电泳后以自显影分析。由转染细胞产生的具生物学活性的重组灭活素可从尿激酶的相对分子量由 55000 (或 33000) 升至 69000—92000 而得到证实 (见例 4b)，此即灭活素—尿激酶复合物形成的特征。

实例 1 1

生物学活性的蛋白质纯化与回收

在大肠杆菌中建立高水平表达灭活素的条件后，在对数后期收获含有编码灭活素基因质粒的细胞。收集的细胞悬浮于两倍体积的裂解缓冲液 (含 1 mM EDTA 和 1 mM 甲基苯磺酸氟的 0.1 M 磷酸钠，pH 7.0) 中并通过高压细胞破碎器 French Press，每平方英寸

15000磅压差三次裂解。23000 × g 离心悬浮液20分钟，所得团块再悬浮于两倍体积的含5% Triton-X₁₀₀裂解缓冲液中。

23000 × g 再次离心。悬浮液20分钟，再将沉淀悬浮于3倍体积的pH 8.0含8 M 尿素和0.1 M DTT的0.1 M Tris-HCl中。用氮饱和该溶液，并在密封管中37℃温育2小时。温育后，每ml溶液加50 ml冰醋酸使pH降至3.5。悬浮液再经上述离心，将上清用0.1 M醋酸平衡的Sephadex-G-75柱(3.2 cm × 90 cm)分离。以SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳定位含灭活素部分。合并含有灭活素的部分，用含8 M 尿素和0.1 mM DTT的pH 8.0、10 mM Tris-HCl在室温下透析16小时。透析后的溶液再经上述缓冲液平衡的DEAE-Sephadex柱(2.2 cm × 25 cm)分离，然后洗脱未结合物质。再用同一缓冲液中从0至0.5 M氯化钠线性梯度洗脱灭活素。经SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳确定含灭活素部分，并用蒸馏水充分透析。在本过程中沉淀的蛋白质通过冻干回收。冻干的蛋白溶于0.1%的三氟醋酸中，然后过与Water高压液相相连的Vydac C-4反向柱。用0.1%三氟醋酸含0至80%线性梯度的乙腈洗脱得到纯化灭活素。相应于灭活素的A₂₂₀峰用SDS—PAGE确定，合并后冻干。

冻干、提纯的灭活素以10 mg/ml的浓度溶于含8 M 尿素的0.1 M pH 8.0 Tris-HCl中，然后用含1 mM还原谷胱甘肽和0.1 mM氧化谷胱甘肽的pH 8.0、0.1 M Tris-HCl将其稀释到10 mg/ml。重新折叠反应在室温下进行24小时，然后浓缩浓液，并用YM10膜在Amicon搅拌器中以pH 7.0的0.1 M磷酸钠透析。含活性灭活素溶液用上述方法确定(例1)。

可应用实例2所述从U937细胞纯化天然灭活素的方法回收哺乳动物细胞中高水平分泌的生物学活性灭活素。其中包括开始用配备了一个30000道尔顿截留滤器的Amicon DC中空纤维浓缩装置使无细胞上清浓缩10倍之多。再用至少等体积的50 mM甘氨酸(pH 7.8)透析浓缩物,以除去所有染料。透析的浓缩物用JA10转头在4℃离心30分钟,转速为8000 rpm,以离心下残余细胞碎片和在透析过程中沉淀的蛋白质。分装离心所获上清,并置于-20℃,供进一步纯化。

从十倍浓缩培养物上清进一步提纯灭活素,这是应用苯基-Sephacryl进行pH梯度洗脱,如下述:

通过加入固体NaCl将上清的离子强度调至2 M,并用枸橼酸调节pH至5.5。该溶液过50 mM pH 5.5枸橼酸钠、2 M NaCl和1 mM EDTA溶液平衡的苯基-Sephacryl柱(4.4 cm × 5.0 cm),并用同一缓冲液洗脱至280 nm吸收回至基线水平。然后用50 mM甘氨酸(pH 9.0)洗脱下灭活素。合并含有最高比活性的灭活素部分,并在Amicon YM10膜上浓缩。

合并、浓缩的灭活素经0.1 M硼酸钠(pH 9.0)平衡的Sephacryl S-200柱(2.2 cm × 78 cm)分离。在流速为0.46 ml/分时,每5.0 ml分管收集。合并含灭活素活性部分,并用YM10膜浓缩至3 ml。用已知的分子量标准标定该柱,表明灭活素的相对分子量为45000—48000道尔顿。

将浓缩的灭活素加到Ultradex制备型平板凝胶上,其中含pH范围为4.5至6.0的两性电解质Ampholines,并在LKB Multiphor等电聚焦仪上10℃聚焦电泳23小时。电泳后,把

凝胶带横切成30条，并用含有1 mM EDTA、pH 9.0的1 M甘氨酸10 ml洗脱每一条带。测定各个部分的灭活素活性，并经15% SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳确定蛋白的位置。在这些条件下，灭活素在pH 5和5.2聚集，并是高度纯净的。所得样品再次于Amicon YM 10膜上浓缩，并在-20℃贮于含1 mM EDTA和50%甘油的50 mM甘氨酸(pH 9.0)中。

工业应用

灭活素是尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物的一种特异失活剂，它作为临床试剂有诊断和治疗人类不同癌症与炎症的一系列潜在应用价值。

通过肿瘤病毒(Ossowski, I等, J. Exp. Med. 137, 112, 1973)和化学致癌物质(Sisskin et al. Int. J. Cancer, 26:331, 1980)体外转化细胞研究，表明血纤维蛋白溶酶原激活物的分泌是与转化相关的最一致的早期生化指标。进而还发现细胞株在体内癌转移能力与表达血纤维蛋白溶酶原激活物的能力有关(Wang等, Cancer Research 40:288, 1980)。人们也非常清楚地确定人类最常见的癌症中的几种肿瘤细胞，即肺癌、乳腺癌、前列腺癌和直肠癌细胞，可产生高水平的尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物(Duffy, M. J., O'Grady, P. Eur. J. Clin. Oncol. 20(5)577—582, 1984)。

以前我们关于结肠粘膜恶变和对恶变易感条件，即腺瘤样息肉、结肠息肉病以及像Crohn氏病和溃疡性结肠炎这类炎性状态的研究，已证明人结肠癌比邻近的未病变组织产生明显多的尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物。发现灭活素能与这种肿瘤相关的血纤维蛋白溶酶原

激活物相结合并抑制其活性 (Stephens 等, Blood 66, 333—337, 1985)。所以灭活素无论在体内或在组织标本上作为确定肿瘤和它的界限的诊断试剂而具工业应用价值。为了显现体内肿瘤, 灭活素可用适当的同位素, 如锝 (Technetium) - 99m (Richardson, V. J. Brit. J. Cancer, 40, 35, 1979) 或 I¹³¹ (Begent, R. H. J. Lancet, Oct 2, 1982), 进行标记。在施用灭活素制剂后, 肿瘤的位置与边界便可通过已知的放射性同位素进行监测, 如 γ -影相图。所以灭活素为确定小的转移恶性肿瘤, 尤其是那些术后出现的癌, 提供了敏感的检测方法。在分析组织化学标本中, 灭活素或其抗体可用如 I¹³¹ 的同位素标记, 或与适当的酶或其他试剂相连。对于组织标本, 如活组织检查, 灭活素与肿瘤型血纤维蛋白溶酶原激活物在其分泌部位相结合, 从而可确定肿瘤边界与潜在的肿瘤转移状态。除应用于诊断外, 灭活素也可用于直接治疗肿瘤。作为参与肿瘤侵袭周围组织过程中的酶 (Dano, K. 等, Adv. in Cancer Res. 44. 139, 1985) 的特异抑制物, 有调整和特别是抑制肿瘤生长和转移的功效。此外, 灭活素可作为一个药物运载系统, 而将植物血凝素或毒素直接运至正在生长的肿瘤部位。更值得一提的是该系统在特异性与有效的治疗肿瘤方面具有许多优点。

尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活物参与的其他生物学过程包括组织浸润与破坏, 如类风湿性关节炎等慢性炎症状态。由于灭活素是宿主对组织降解自然反应的一个组成部分, 它将被证明是一个监测治疗过程中疾病状态的有用标志。由灭活素衍生的标记抗体或 DNA 探针作为监测血浆中、和活检组织标本巨噬细胞中和在疾病状态的滑液中

Et

的灭活素水平的诊断试剂有工业价值。同样，灭活素本身在应用于体内改善这些状态时将起着治疗作用。

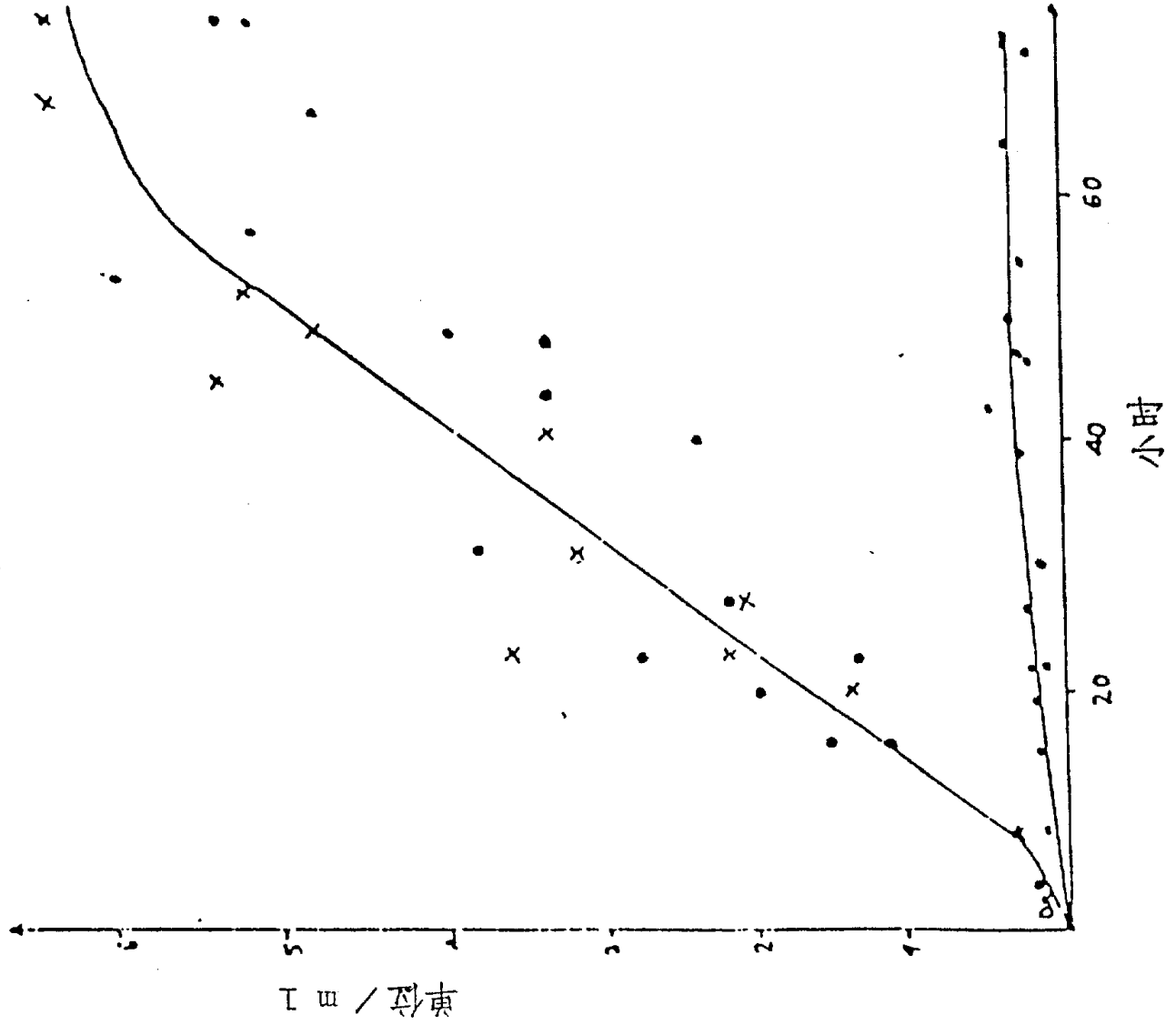


图 1

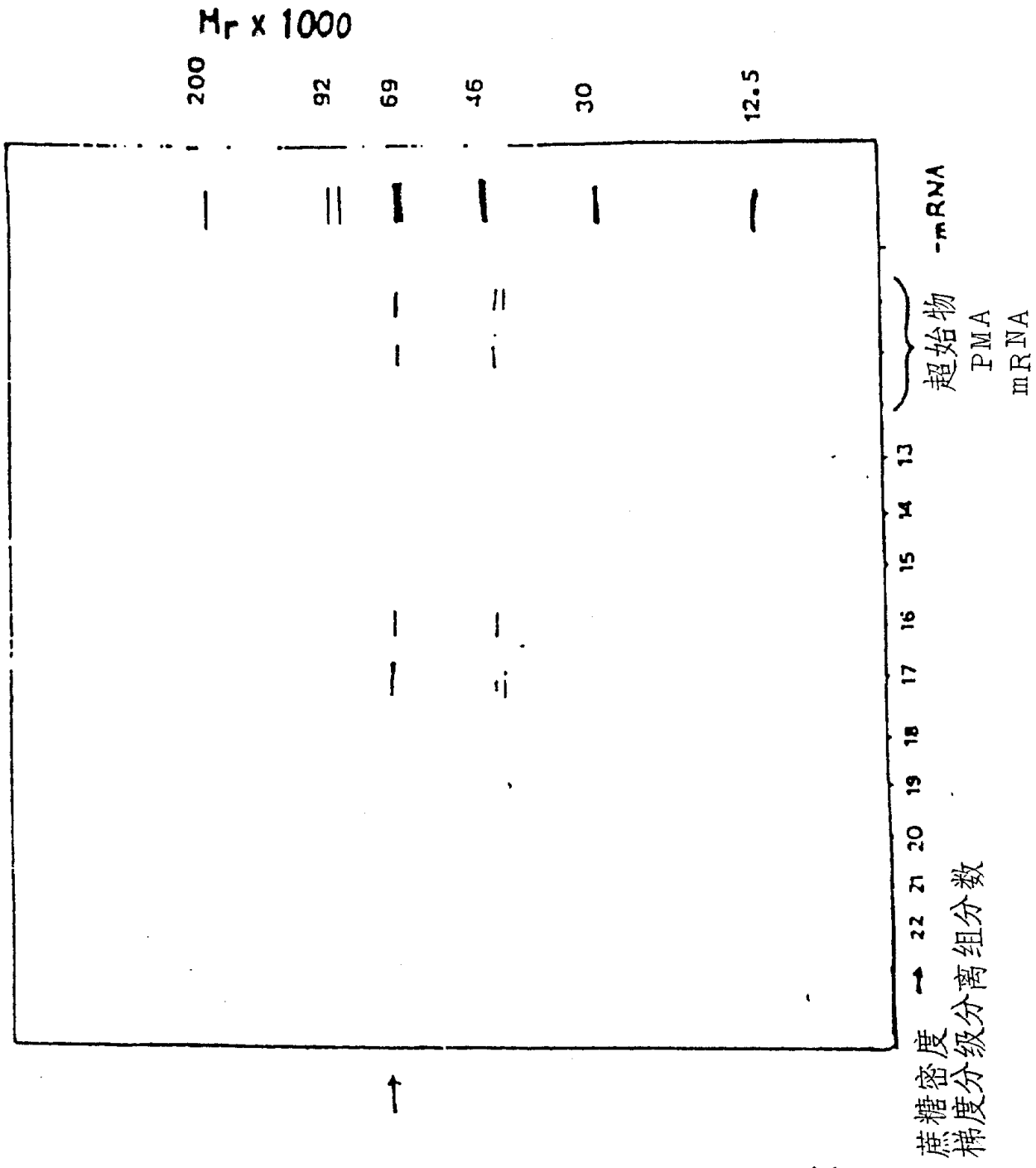
28S-

18S-



11 14 15 16 17 18 19 20 组分数

图 2



图

3

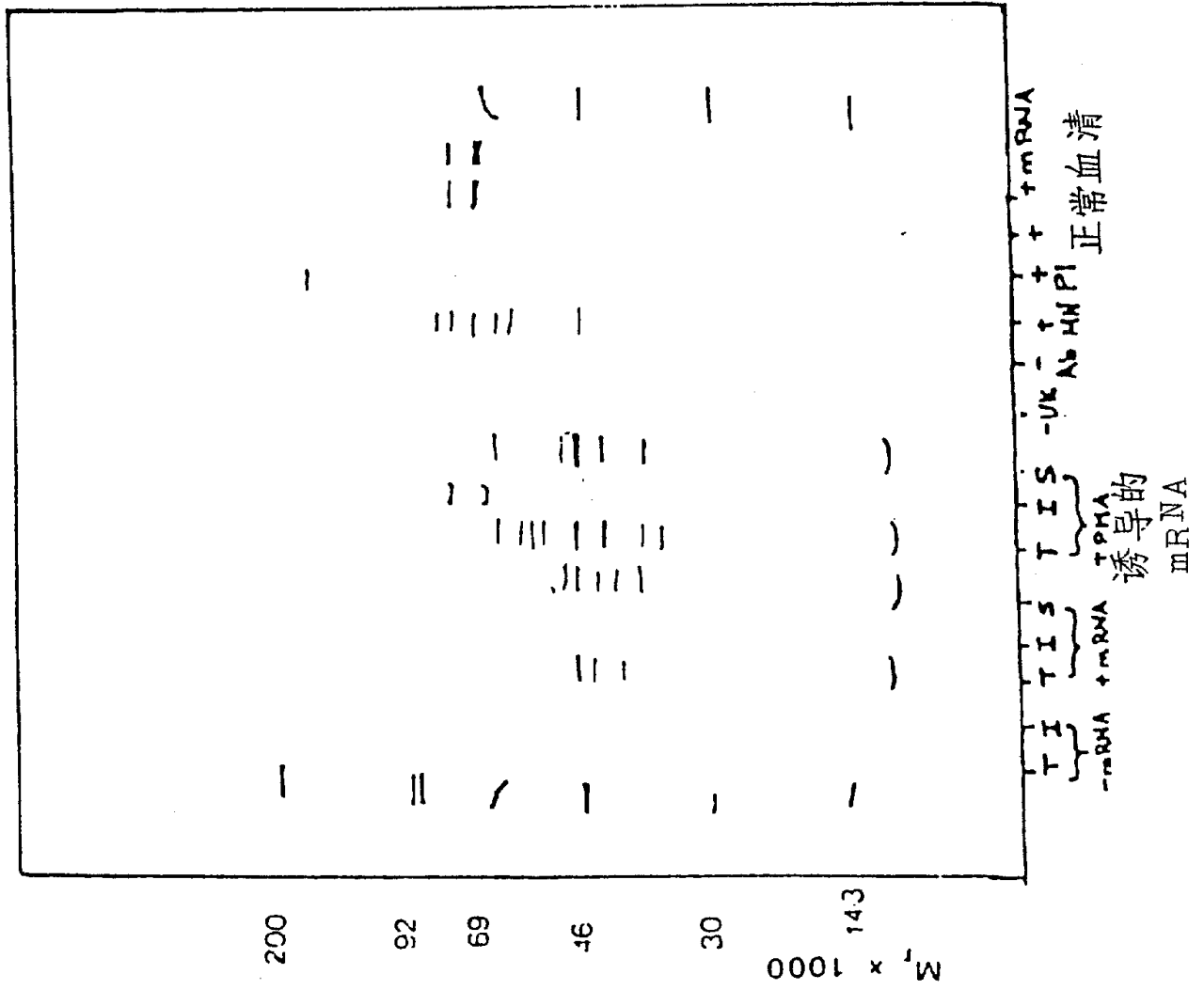
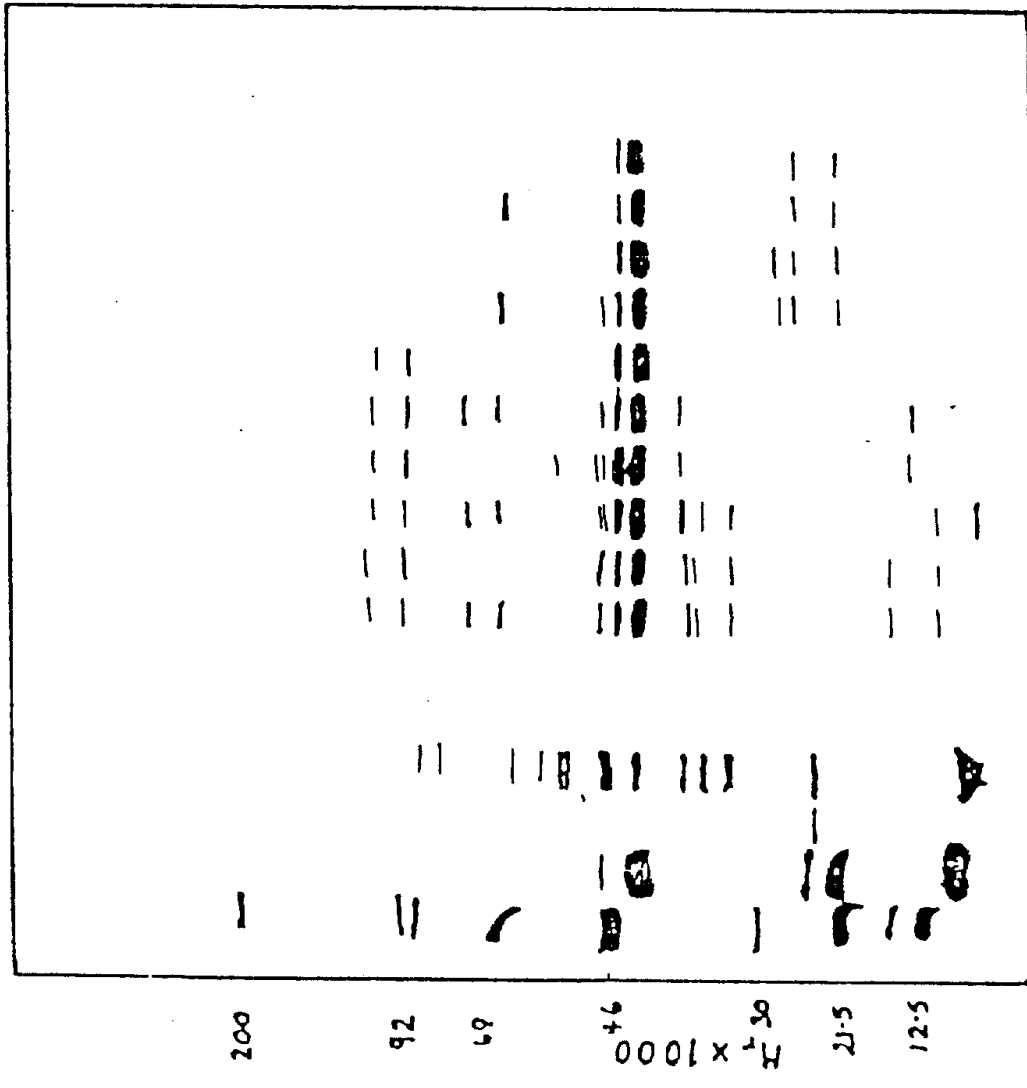


图 4

← 79000 } 复合物
 ← 69000 }



尿激酶
 总翻译产物
 免疫沉淀翻译产物
 Ab1 Ab2 Ab3 Ab4 Ab5
 正常血清

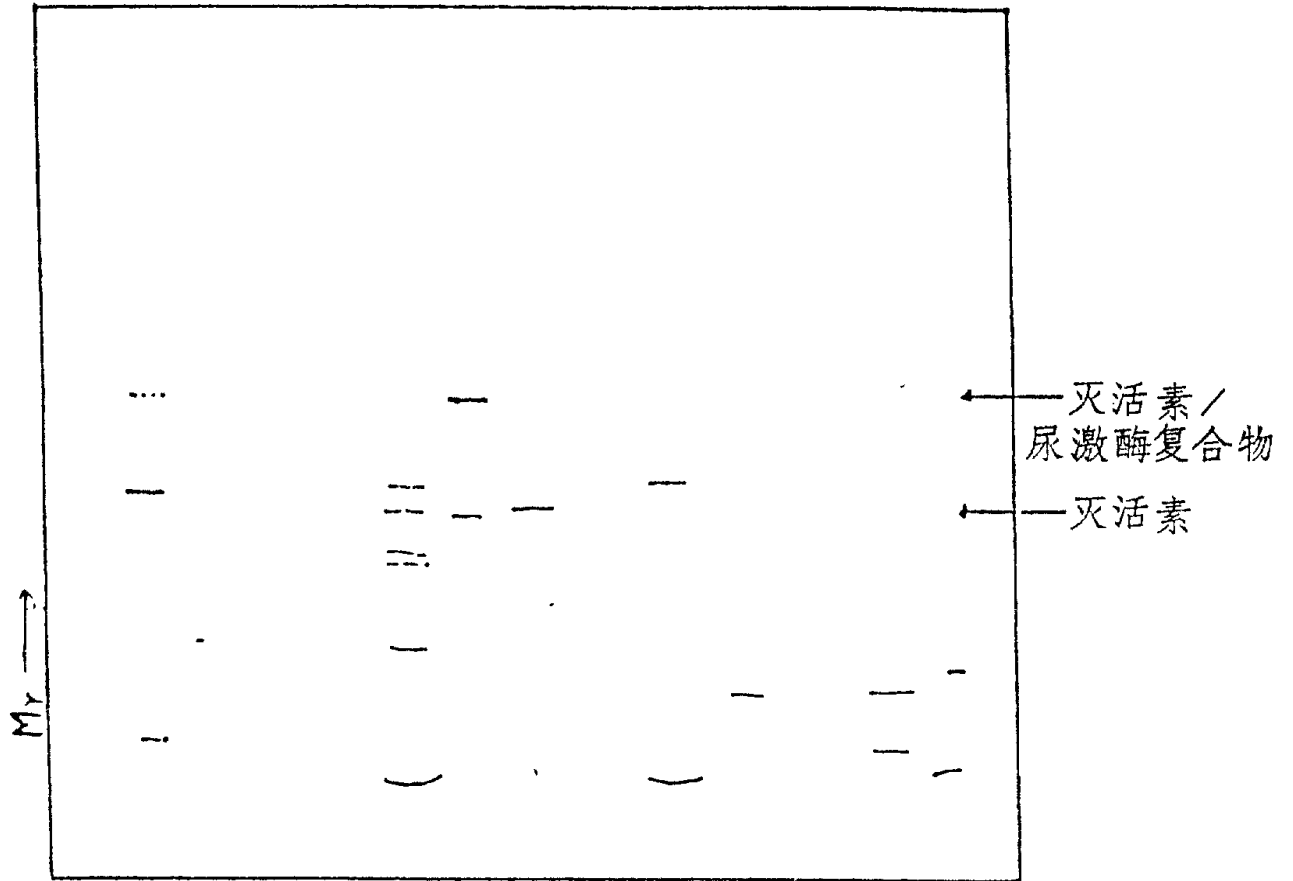


图 6

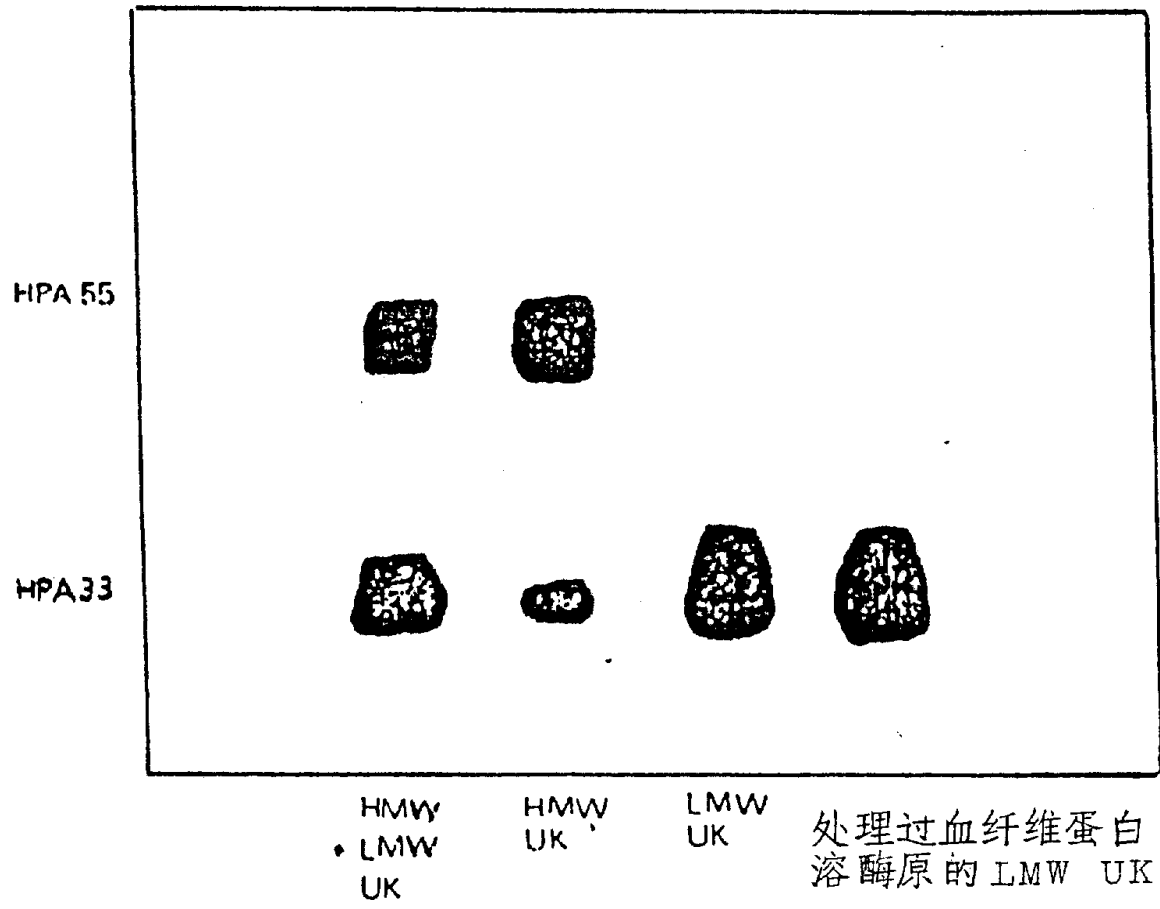


图 7

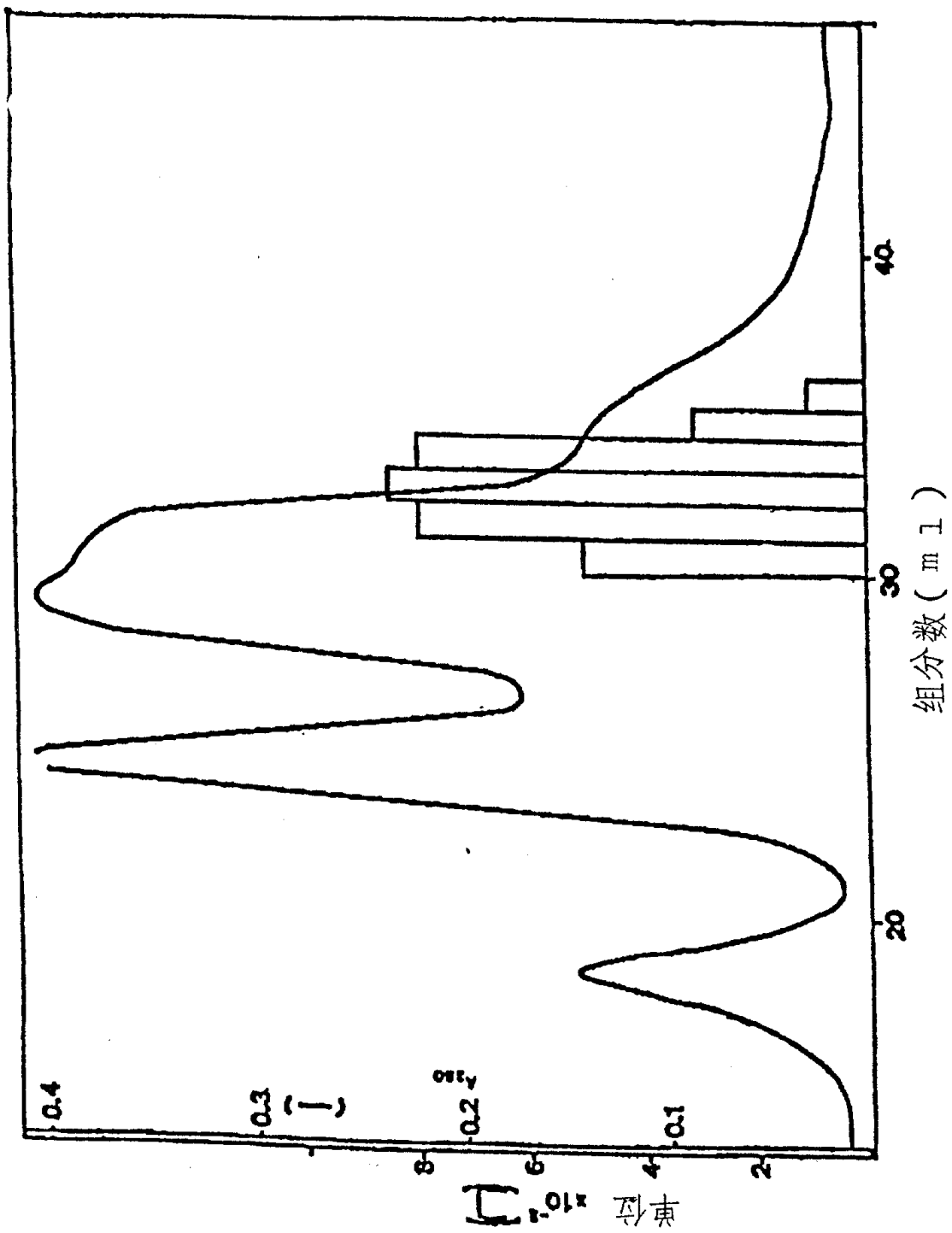


图 8

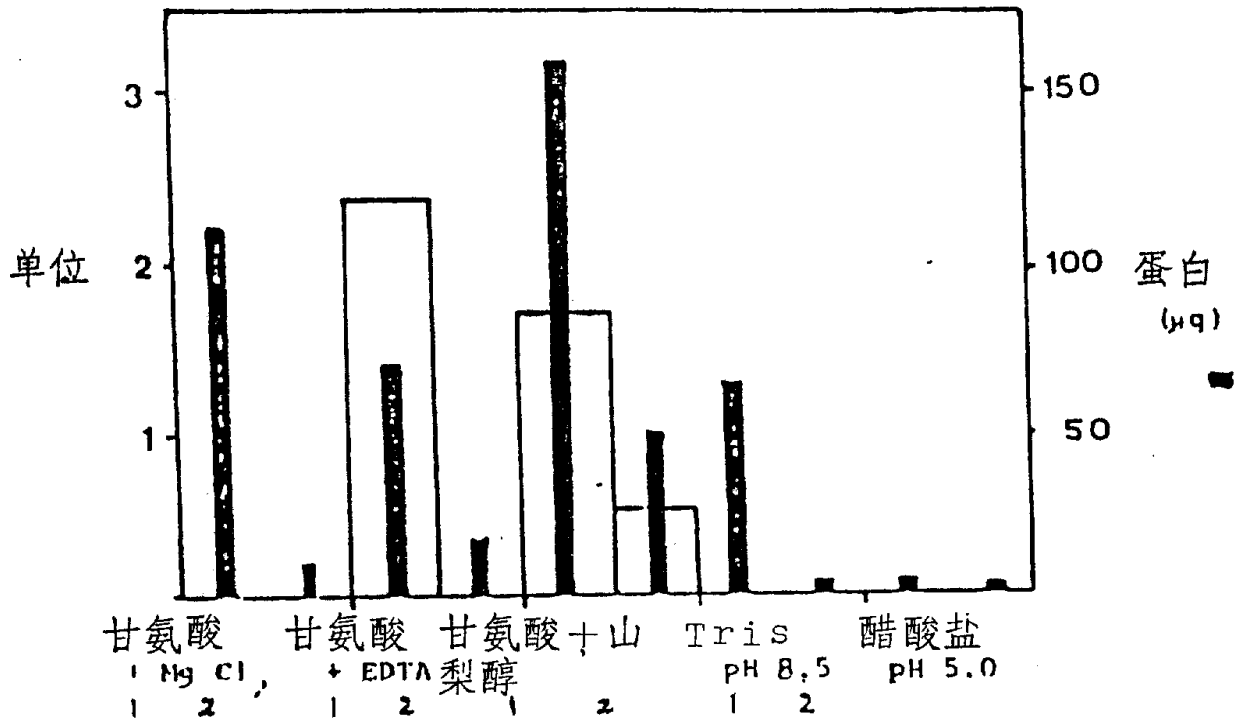


图 9

苯基硼酸盐琼脂糖层析

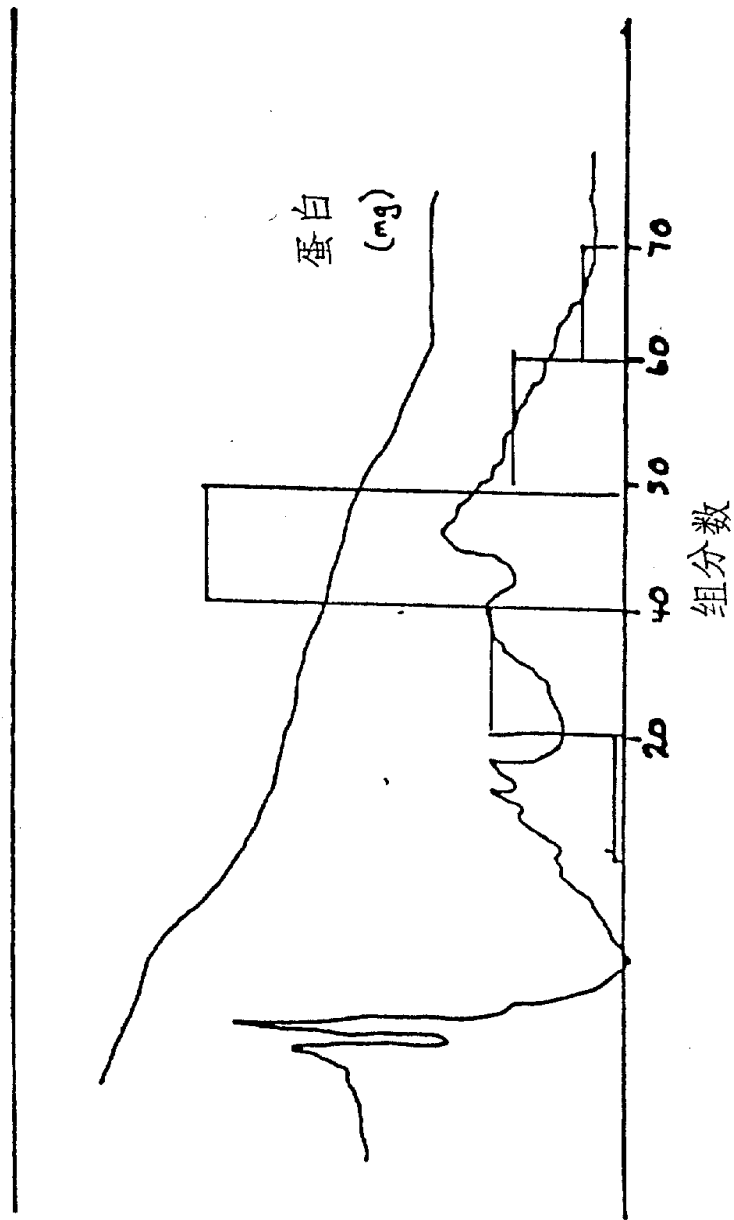


图 10

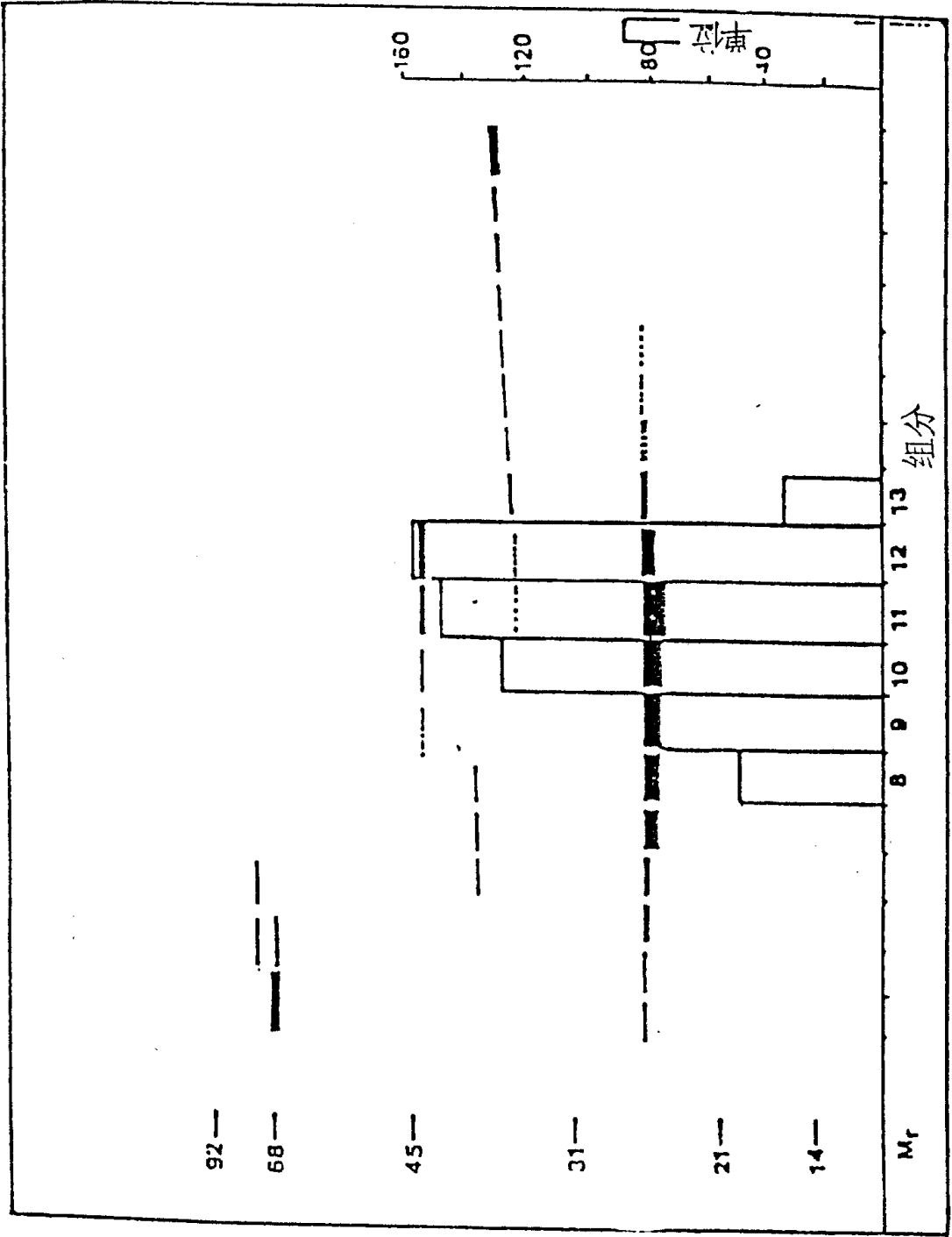
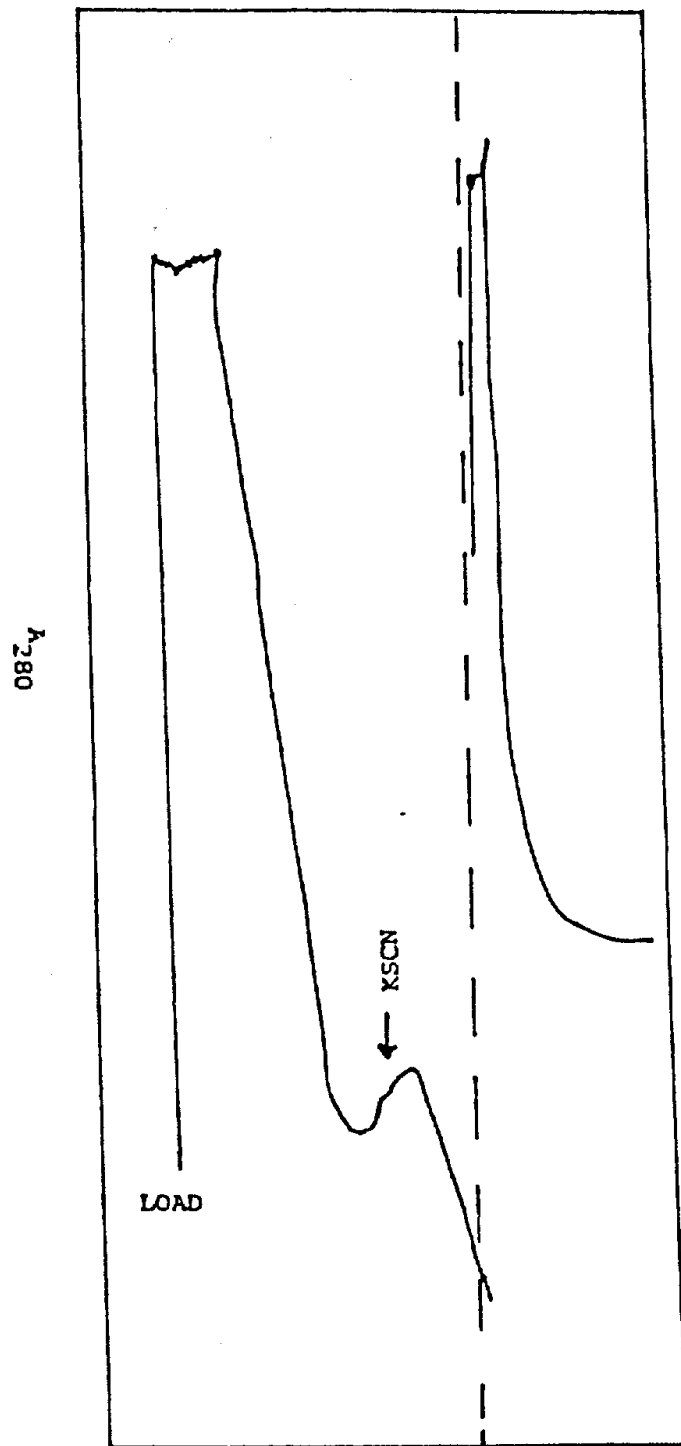
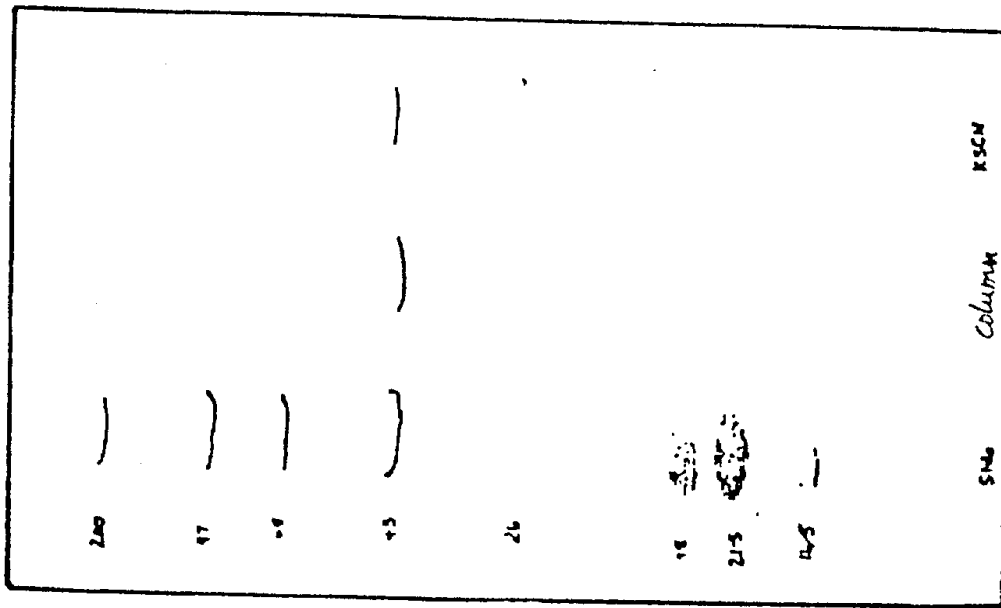


图 11

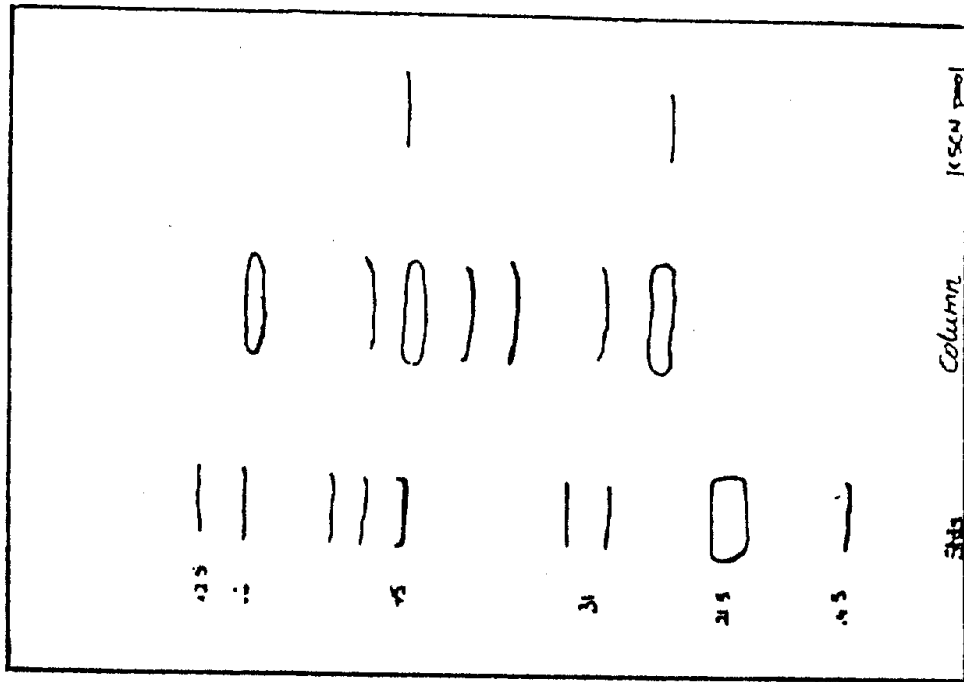


免疫亲和柱的洗脱轮廓图

图 12A



银染 SDS-TAG



Western 转移 : SDS-PAGE

图 12B

Mr
200K -

93K -

69K -

56K -

30K -

¹²⁵I UK (+ 载体)

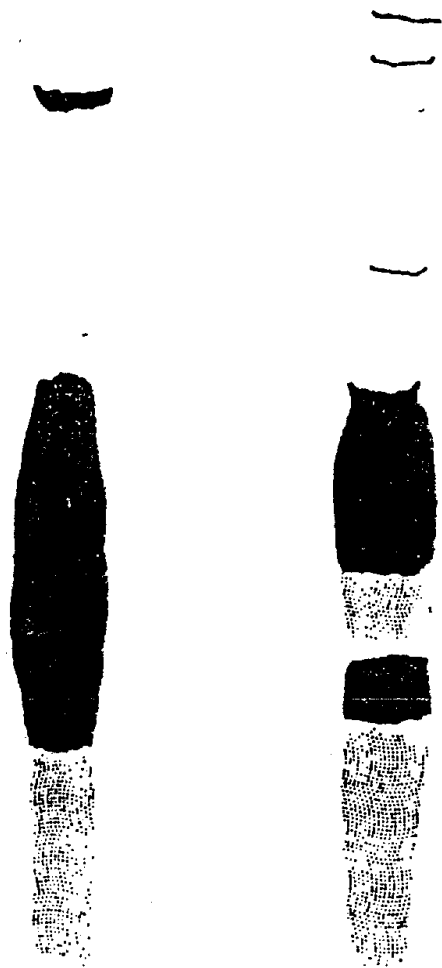


图 13

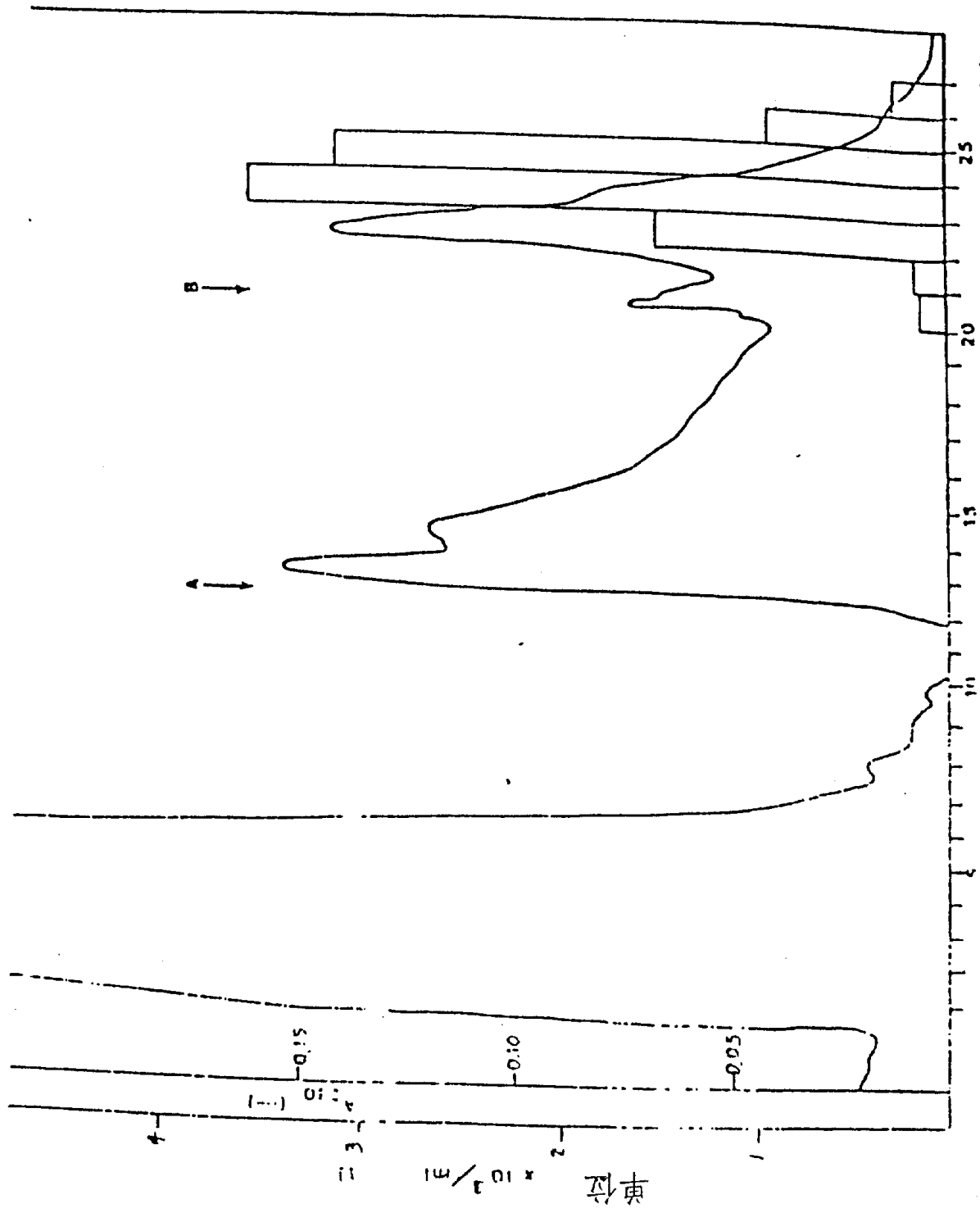


图 14

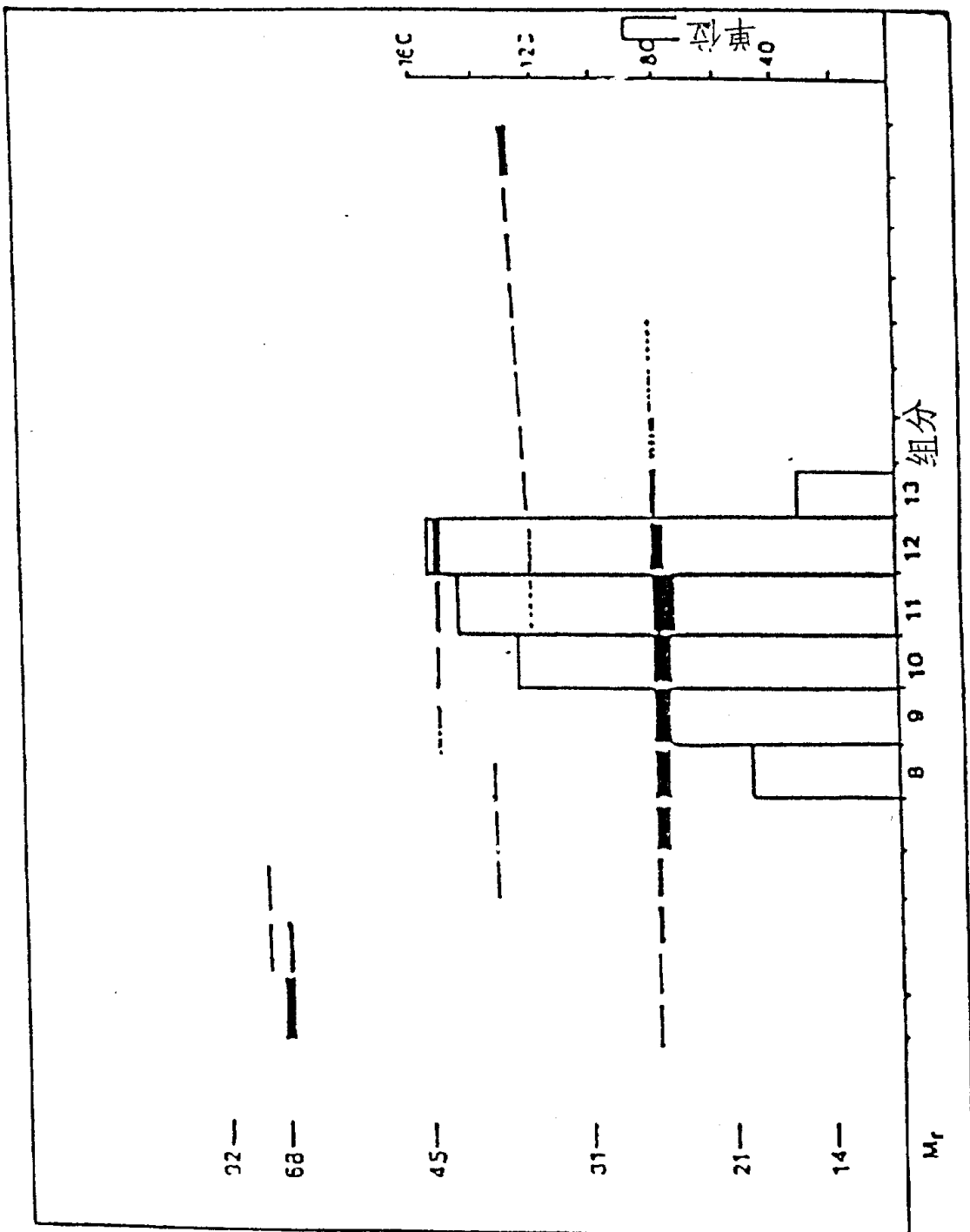


图 15

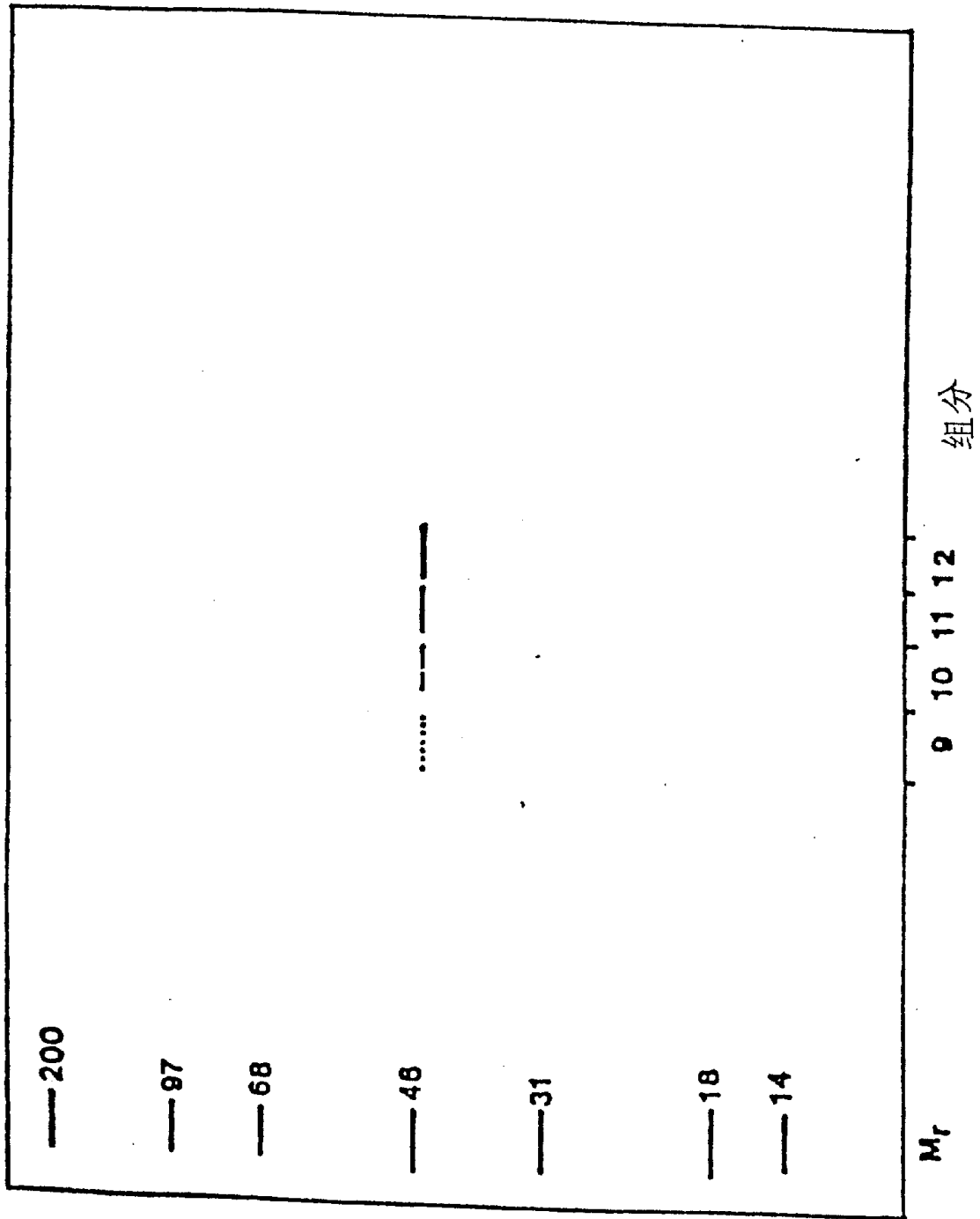


图 16

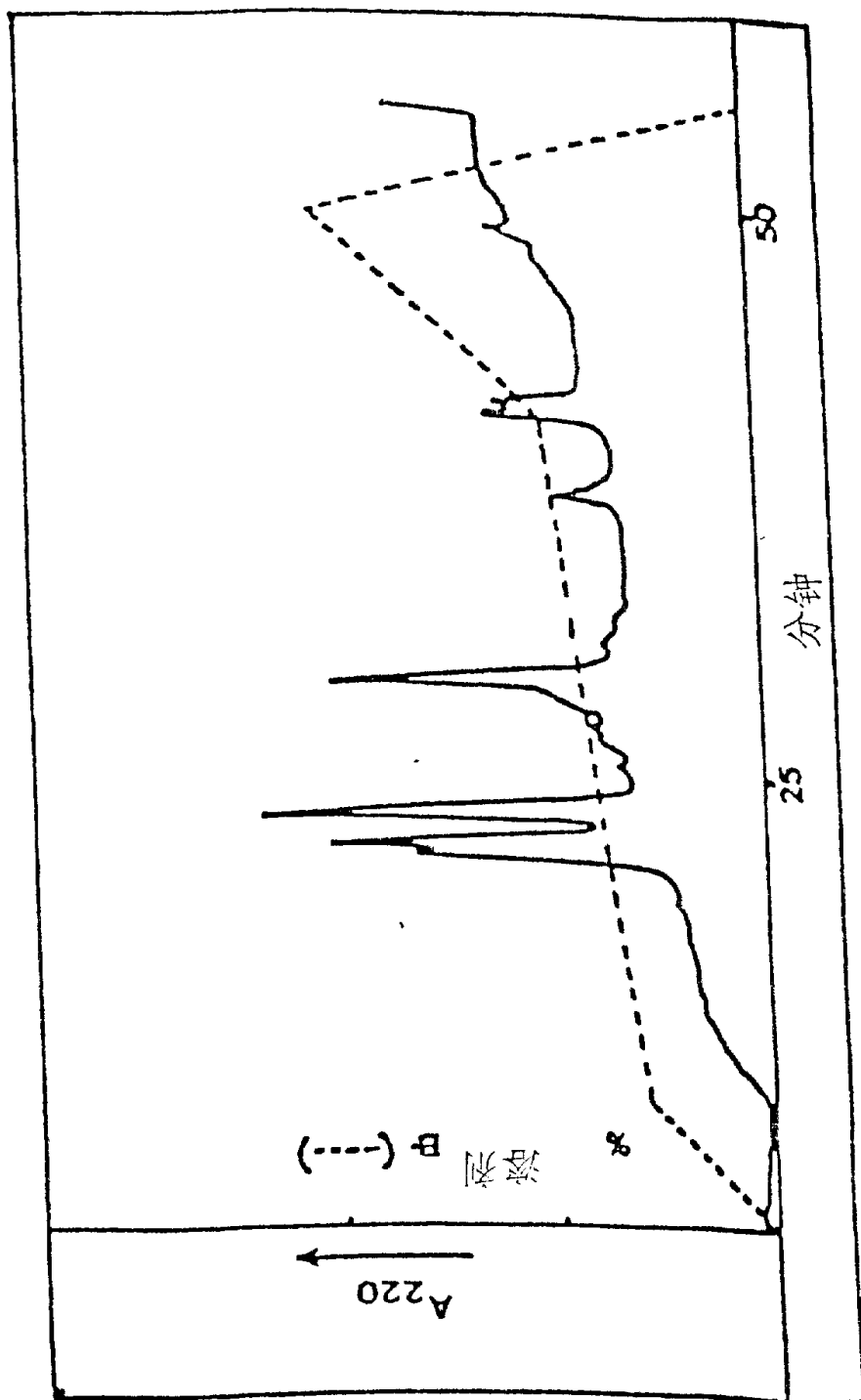


图 17

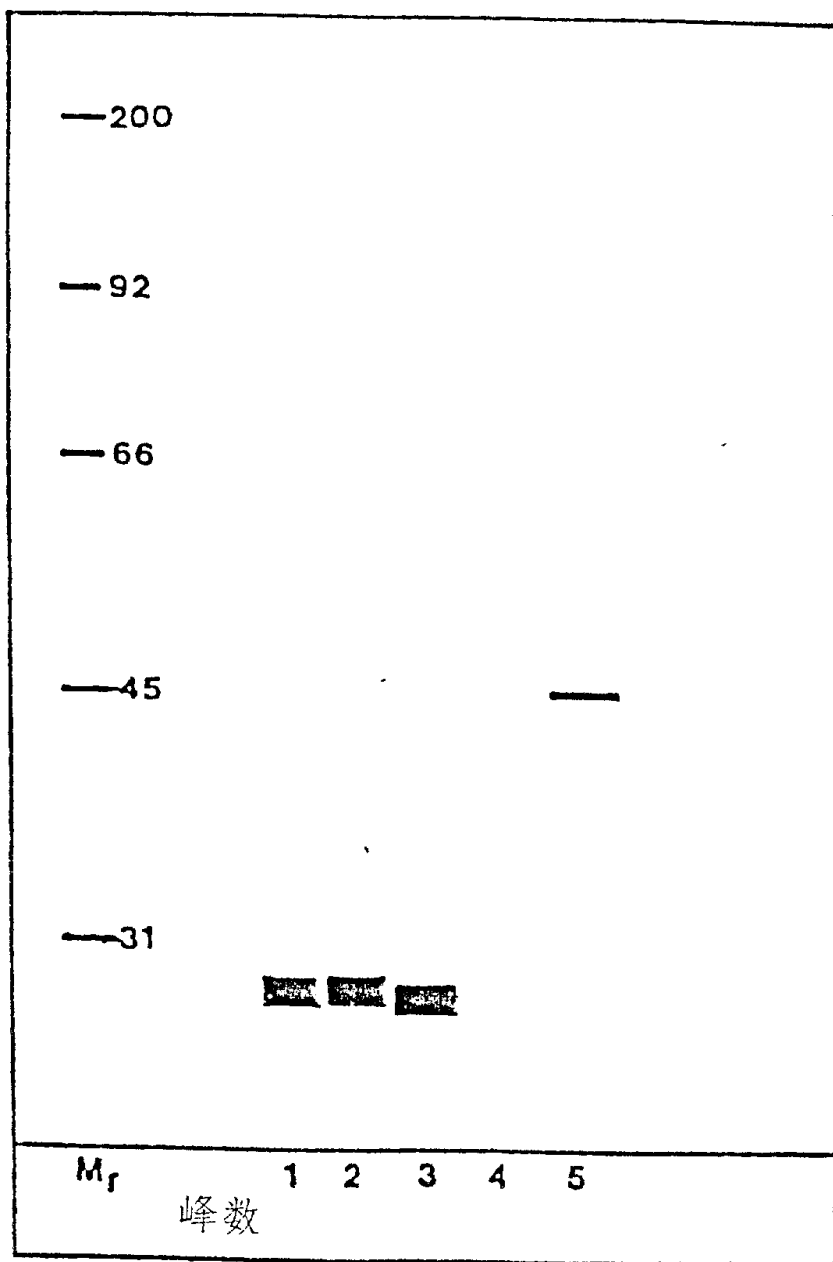
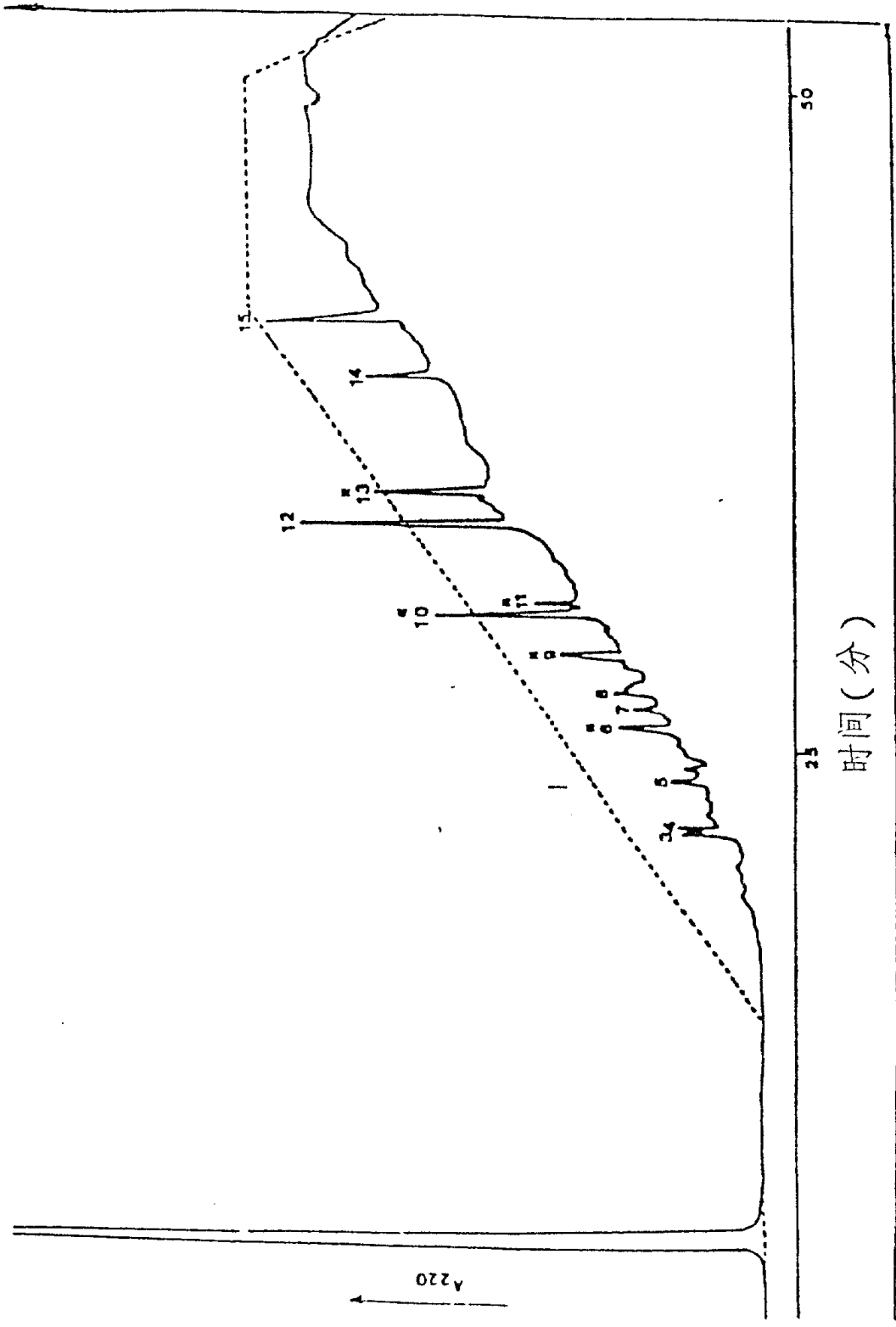


图 18



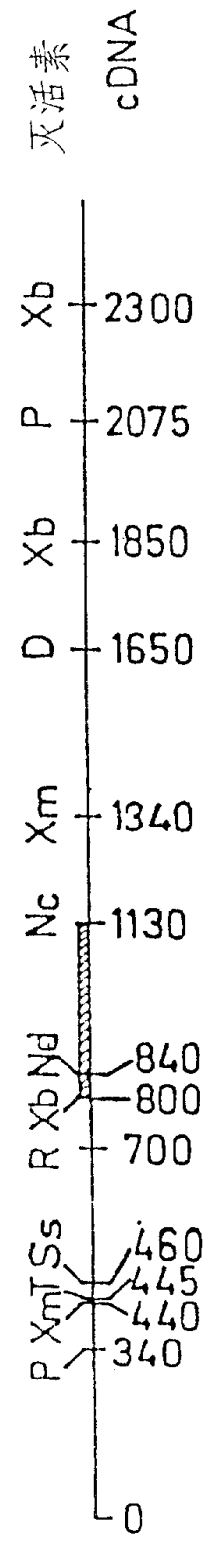
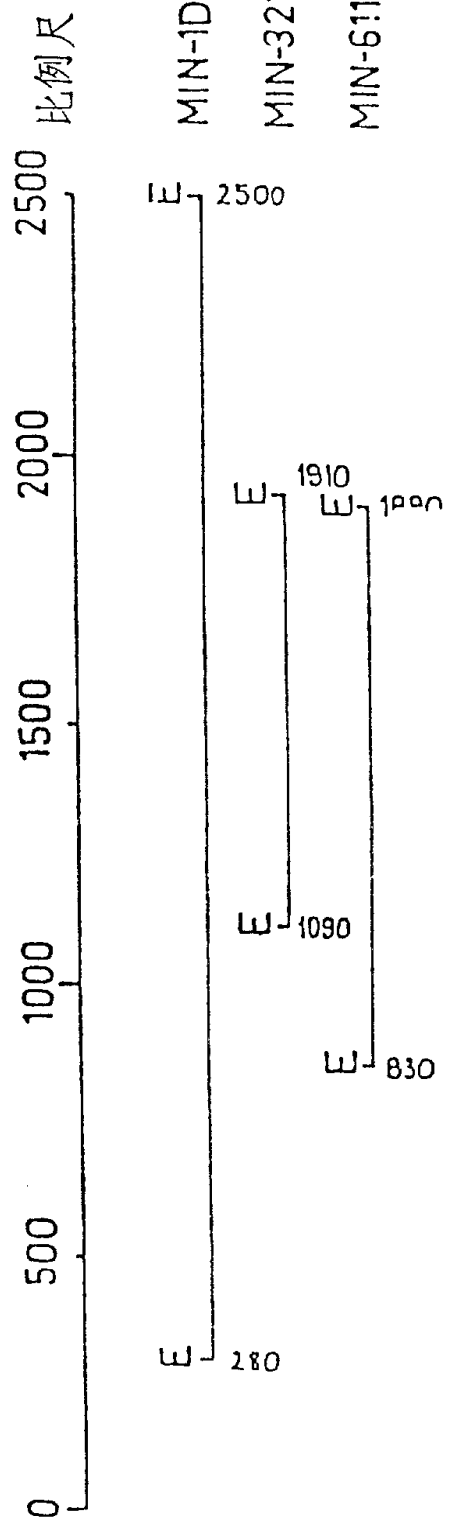


图 20

寡核苷酸(5'和3'聚体)结合区

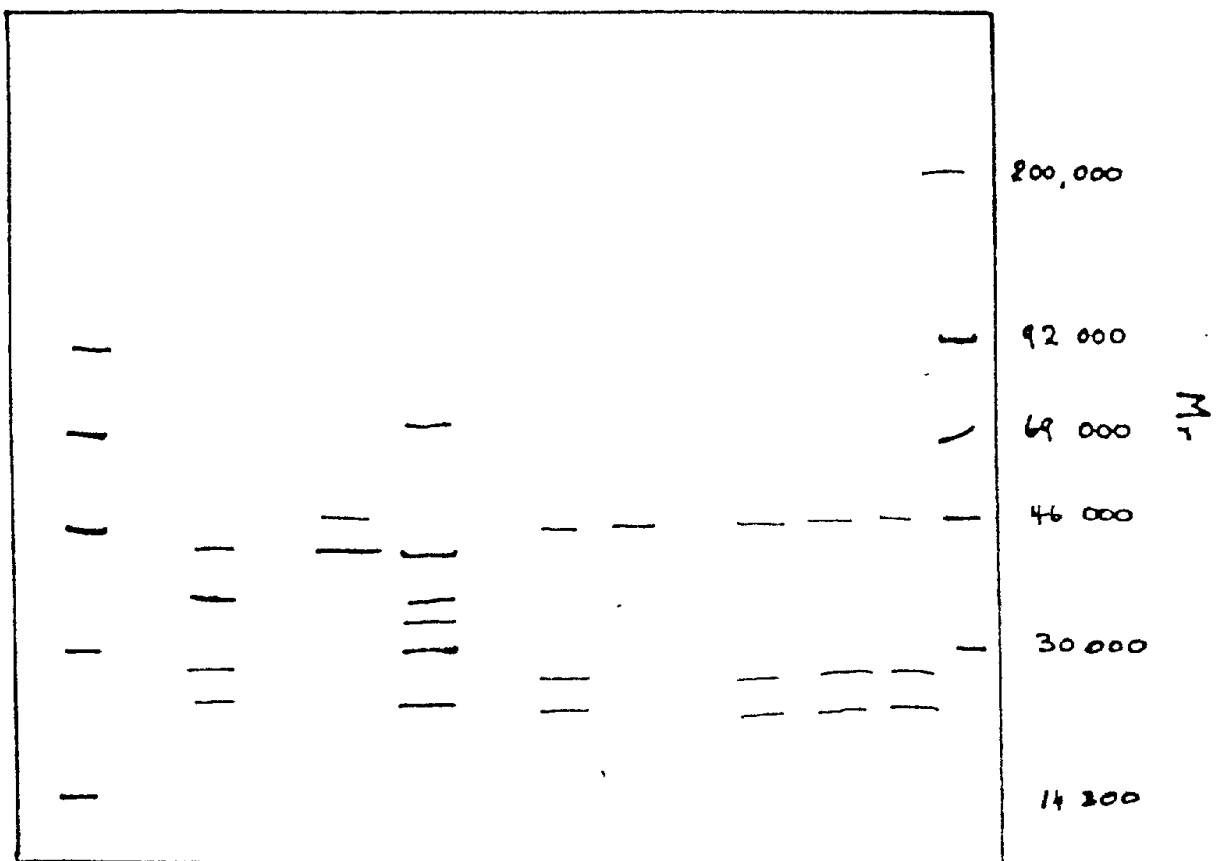


图 21

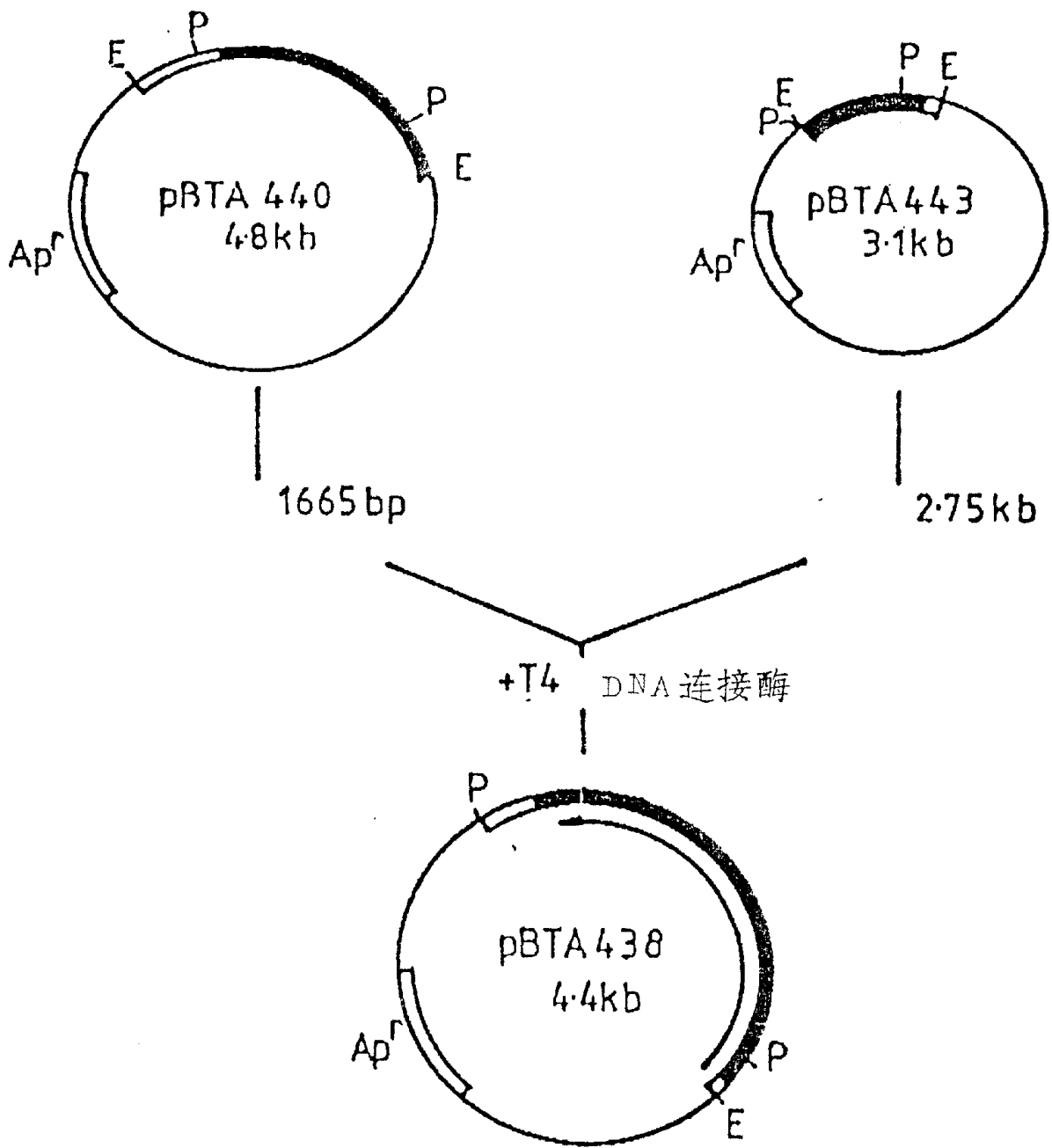


图 22

E-EcoRI, P-PstI

1 GTCAGACAGCAACTCAGAGAATAACCCAGAGAACACCAGATTGAACA

49 ATG GAG GAT CTT TGT GTG GCA AAC ACA CTC TTT GCC CTC AAT TTA TTC AAG CAT CTG GCA AAA GCA AGC CCC ACC CAG AAC CTC TTC CTC Met Glu Asp Leu Cys Val Ala Asn Thr Leu Phe Ala Leu Asn Leu Phe Lys His Leu Ala Lys Ala Ser Pro Thr Gln Asn Leu Phe Leu

139 TCC CCA TGG AGC ATC TCG TCC ACC ATG GCC ATG GTC TAC ATG GGC TCC AGG GGC AGC ACC GAA GAC CAG ATG GCC AAG GTG CTT CAG TTT Ser Pro Trp Ser Ile Ser Ser Thr Met Ala Met Val Tyr Met Gly Ser Arg Gly Ser Thr Glu Asp Gln Met Ala Lys Val Leu Gln Phe

229 AAT GAA GTG GGA GCC AAT GCA GTT ACC CCC ATG ACT CCA GAG AAC TTT ACC AGC TGT GGG TTC ATG CAG CAG ATC CAG AAG GGT AGT TAT Asn Glu Val Gly Ala Asn Ala Val Thr Pro Met Thr Pro Glu Asn Phe Thr Ser Cys Gly Phe Met Gln Gln Ile Gln Lys Gly Ser Tyr

319 CCT GAT GCG ATT TTG CAG GCA CAA GCT GCA GAT AAA ATC CAT TCA TCC TTC CGC TCT CTC AGC TCT GCA ATC AAT GCA TCC ACA GGG AAT Pro Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Gln Ala Ala Asp Lys Ile His Ser Ser Phe Arg Ser Leu Ser Ser Ala Ile Asn Ala Ser Thr Gly Asn

409 TAT TTA CTG GAA AGT GTC AAT AAG CTG TTT GGT GAG AAG TCT GCG AGC TTC CGG GAA GAA TAT ATT CGA CTC TGT CAG AAA TAT TAC TCC Tyr Leu Leu Glu Ser Val Asn Lys Leu Phe Gly Glu Lys Ser Ala Ser Phe Arg Glu Tyr Ile Arg Leu Cys Gln Lys Tyr Tyr Ser

499 TCA GAA CCC CAG GCA GTA GAC TTC CTA GAA TGT GCA GAA GCT AGA AAA AAG ATT AAT TCC TGG GTC AAG ACT CAA ACC AAA GGC AAA Ser Glu Pro Gln Ala Val Asp Phe Leu Glu Cys Ala Glu Glu Ala Arg Lys Ile Asn Ser Trp Val Lys Thr Gln Thr Lys Gly Lys

589 ATC CCA AAC TTG TTA CCT GAA GGT TCT GTA GAT GGG GAT ACC AGG ATG GTC CTG GTG AAT GCT GTC TAC TTC AAA GGA AAG TGG AAA ACT Ile Pro Asn Leu Leu Pro Glu Gly Ser Val Asp Gly Asp Thr Arg Met Val Leu Val Asn Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Lys Thr

679 CCA TTT GAG AAG AAA CTA AAT GGG CTT TAT CCT TTC CGT GTA AAC TCG GCT CAG CGC ACA CCT GTA CAG ATG ATG TAC TTG CGT GAA AAG Pro Phe Glu Lys Lys Leu Asn Gly Leu Tyr Pro Phe Arg Val Asn Ser Ala Gln Arg Thr Pro Val Gln Met Leu Tyr Leu Arg Glu Lys

769 CTA AAC ATT GGA TAC ATA GAA GAC CTA AAG GCT CAG ATT CTA GAA CTC CCA TAT GCT GGA GAT GTT AGC ATG TTC TTG TTG CTT CCA GAT Leu Asn Ile Gly Tyr Ile Glu Asp Leu Lys Ala Gln Ile Leu Glu Leu Pro Tyr Ala Gly Asp Val Ser Met Phe Leu Leu Leu Pro Asp

859 GAA ATT GCC GAT GTG TCC ACT GGC TTG GAG CTG CTG GAA AGT GAA ATA ACC TAT GAC AAA CTC AAC AAG TGG ACC AGC AAA GAC AAA ATG Gly Ile Ala Asp Val Ser Thr Gly Leu Glu Leu Leu Glu Ser Glu Ile Thr Tyr Asp Lys Leu Asn Lys Trp Thr Ser Lys Asp Lys Met

109

169

259

349

439

529

619

709

799

889

PEPTIDE 9

PEPTIDE 13

PEPTIDE 6

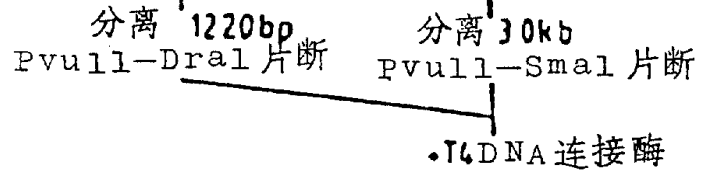
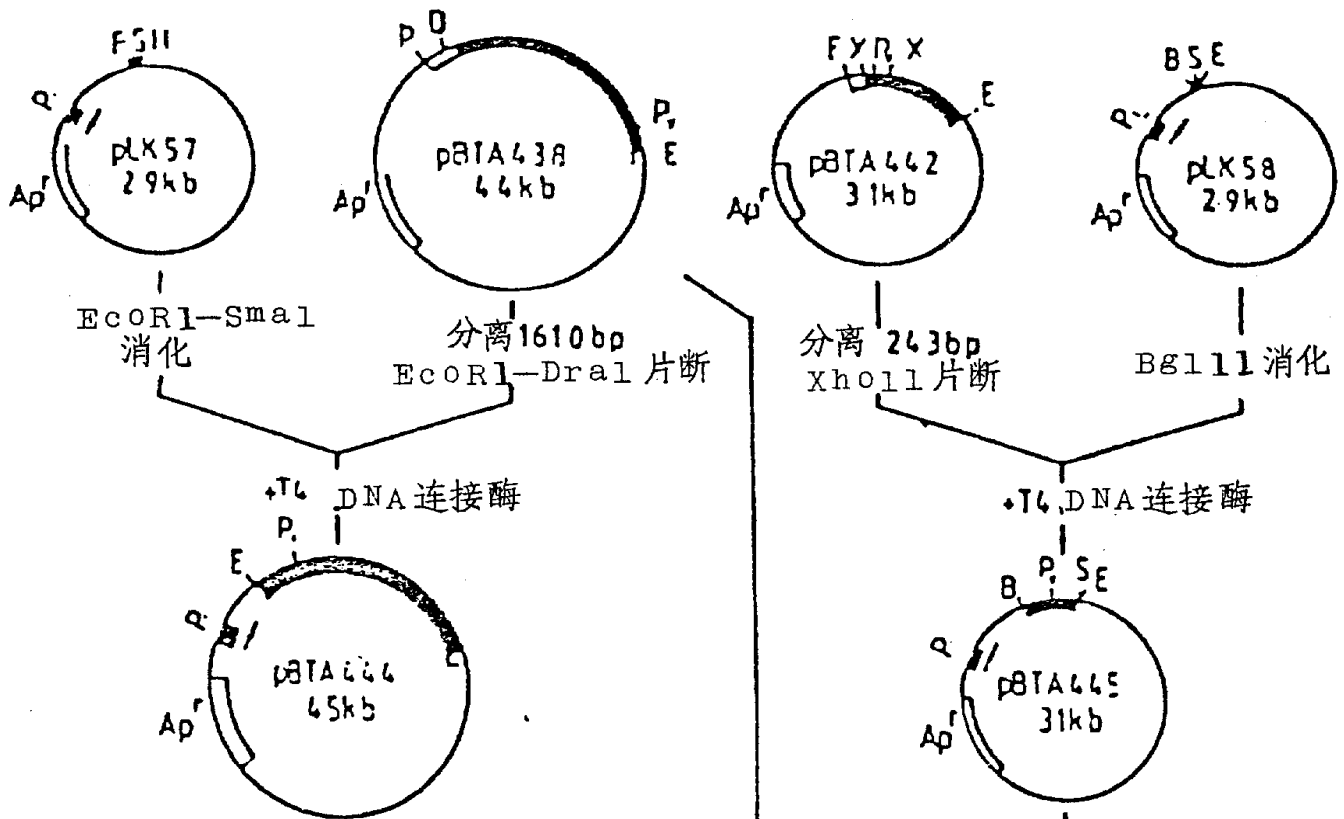
949 979 1009
GCT GAA GAT GAA GTT GAG GTA TAC ATA CCC CAG TTC ANA TTA GAA GAG CAT TAT GAA CTC AGA TCC ATT CTG AGA AGC ATG GGC ATG GAG
Ala Glu Asp Glu Val Glu Val Tyr Ile Pro Gln Phe Lys Leu Glu Glu His Tyr Glu Leu Arg Ser Ile Leu Arg Ser Met Gly Met Glu
PEPTIDE 10

1039 1069 1099
GAC GCC TTC AAC AAG GGA CGG GCC AAT TTC TCA GGG ATG TCG GAG AGG AAT GAC CTG TTT CTT TCT GAA GTG TTC CAC CAA GCC ATG GTG
Asp Ala Phe Asn Lys Gly Arg Ala Asn Phe Ser Gly Met Ser Glu Arg Asn Asp Leu Phe Leu Ser Glu Val Phe His Gln Ala Met Val
PEPTIDE 11

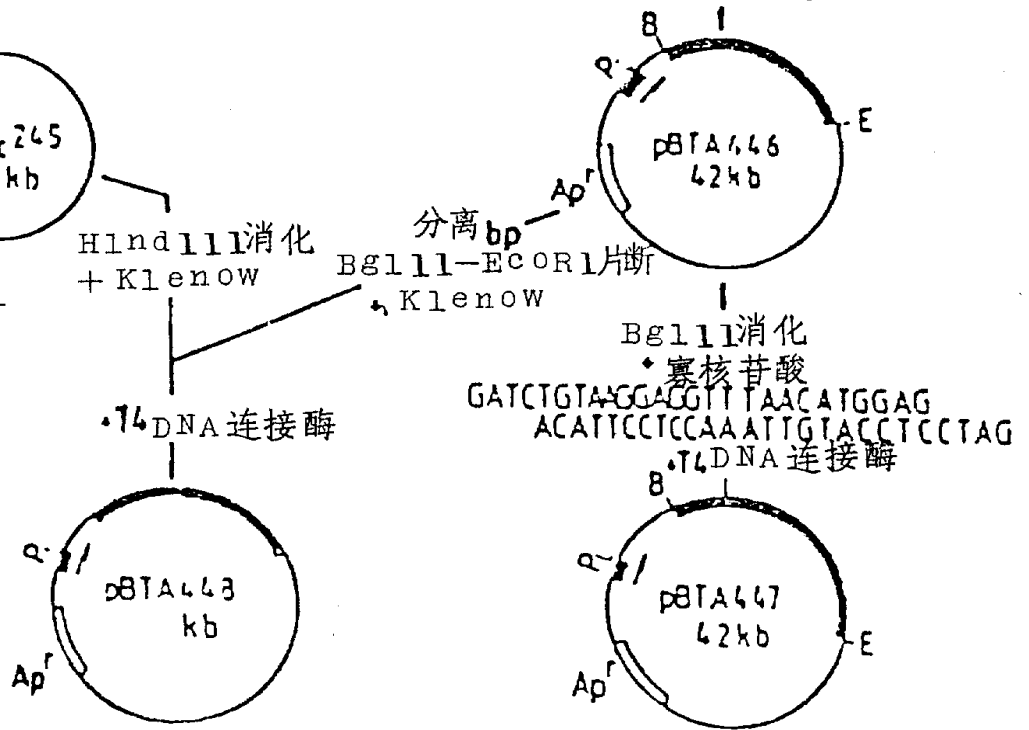
1129 1159 1189
GAT GTG AAT GAG GAG GGC ACT GAA GCA GCC GCT GGC ACA GGA GGT GTT ATG ACA GGG AGA ACT GGA CAT GGA GGC CCA CAG TTT GTG GCA
Asp Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Gly Thr Glu Gly Val Met Thr Gly Arg Thr Gly His Gly Gly Pro Gln Phe Val Ala
PEPTIDE 12

1219 1249 1279
GAT CAT CCT TTT CTT TTT CTT ATT ATG CAT AAG ATA ACC AAC TGC ATT TTA TTT TTC GGC AGA TTT TCC TCA CCC TAA AAC TAA GCG TGC
Asp His Pro Phe Leu Phe Leu Ile Met His Lys Ile Thr Asn Cys Ile Leu Phe Phe Gly Arg Phe Ser Ser Pro ***

1309 1339 1369 1399
TGCTTCTGCAAAAGATTTTGTAGATGAGCTGTGTGCTCAGAAATGCTATTTCAAAATGGCCAAAATTTAGAGATGTTTTCTACATATTTTCTGCTCTTCTGAACAACCTTCTGCTACCCCA
1429 1459 1489 1519
CTAAATAAAAACACAGAAATAATTAGACAATTTGCTATTATAACATGACAACCCCTATTTAATCATTTGGCTTCTAATAATGGGATCATGCCCCATTAGATTTTCTTACTATCAGTTTATT
1549 1579 1609 1639
TTTATAACATTAACTTTTACTTTTACTTTTATTTTATTTTATTAATGGTGAGTTTTTAAATTTATTTGCTCACTGCTTAAATGCTAATAAAGTTATAGAAAGCAGATGATCTGTAAAT
1669 1699 1729 1759
TTCCTATCTAATAAATGCTTTAATTTGTTCTCATATAATGAAGAAATAGTAGGTATCCCTCCATGCCCCCTCTGTAATAAATACTGGAAAACAATTAAACAATAGGCCAATAATATATGTATG
1789 1819 1849 1879
TGCATTTCTAGAAATACATAMCACAATATATGCTGATCTTATATTTCAATTTGCAAGTATATAATGCTATAATTTCAAGACCAGCCTGGCCAAACATAGCGAAACCCCTACCTCCACTAAA
1909 1939 1969 1999
AATACAGAAATGAGCCGGGAGTGGTGGCAMAAGTGGTGAGCACCTGTGATCCCAGCCACTGTGGAGCCGGAGGACAAATCACTTGAACCCAGGAGGCGGAGGCTGCAGTGAGCTGAGA
2029 2059 2089 2119
TCGCTCCACTGCACTCCAGCCTGGCMAACAGACAGATTCCATCTCANAATACATTTAAAAAANAANAACCTATCTGAGGACTCTGAAAAGTAAATGGTAGCAGATAGATTTTGAGAAAGGA
2149 2179 2209 2239
ACTAGAACTTGAAGCACAAATCTATCTGGTGTCTTTTCTTACTTTTGTGTTTCTCCCAATCTCCAGTGTGATACAAAGGCAGCCCAATTTCTAGAAAATGTATACCAGCCCATGAAGA
2269 2299 2329 2359
GATAAAGCTCCAAGAGGAGATTTCTCTTTCTGGTATAAGGTATGTGTGTATATGGGGGCGATAAGGTGGGAGTGTGAGGAATACAGAGTCGGAGAAATCCATTATTTCCACCCTCT
2389 2409
CTCTTGCCATTGCAACAGAC



- A-AvaI
- B-BglII
- D-DraI
- E-EcoRI
- H-HindIII
- P-PstI
- P'-PvuII
- S-SmaI, SS-SspI
- X-XhoI
- RY-EcoRV



— 灭活素基因

▨ 启动子

图 24

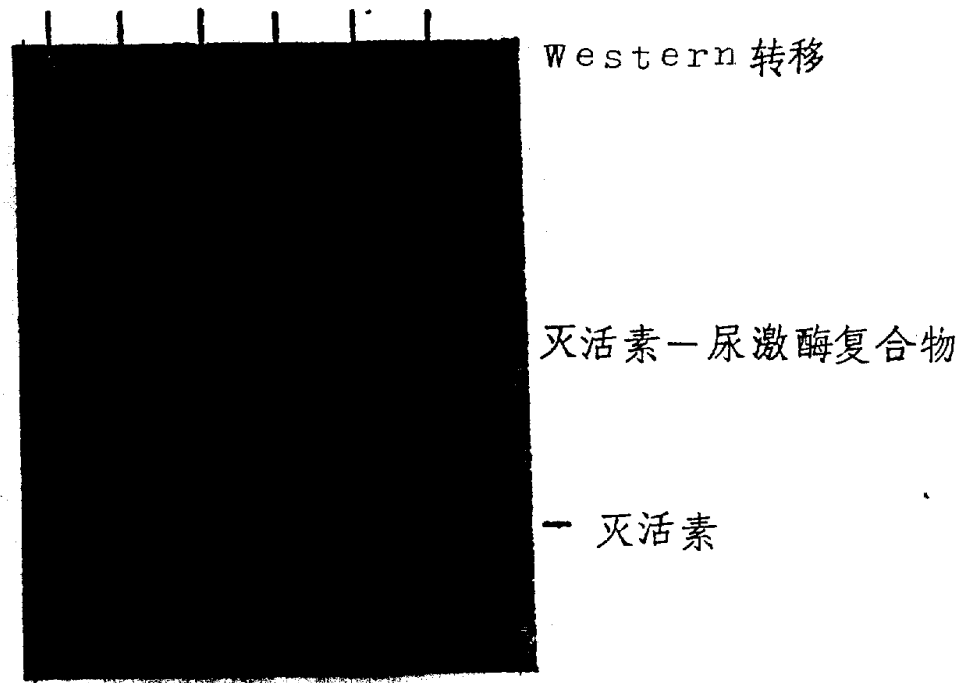
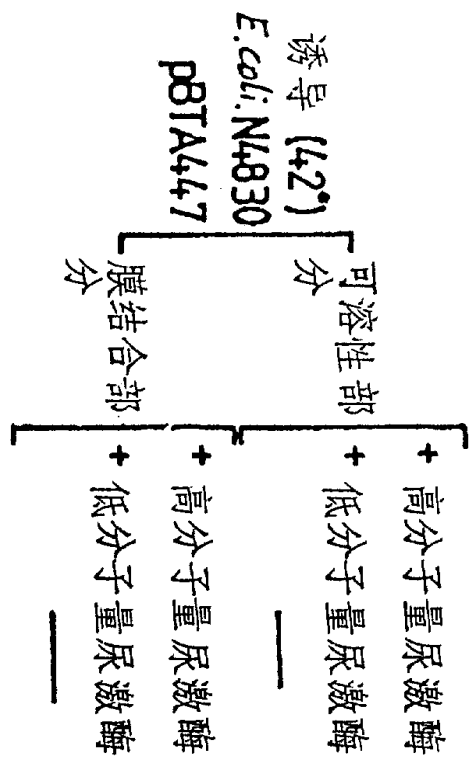
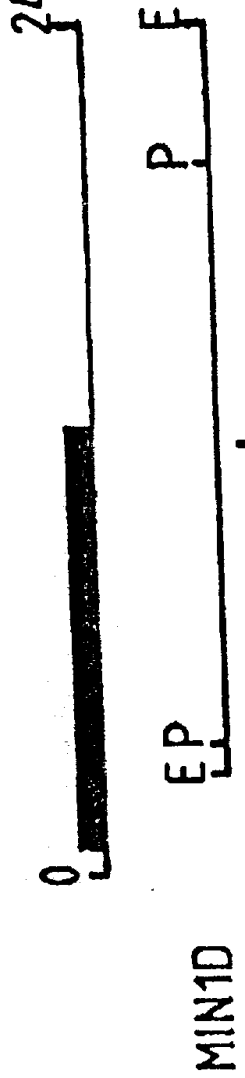
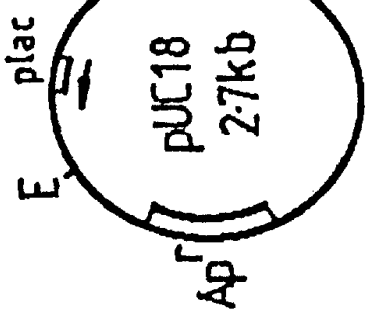


图 25

2409bp



分离 2100 bp
EcoR1 片断



消化

+T4 连接酶

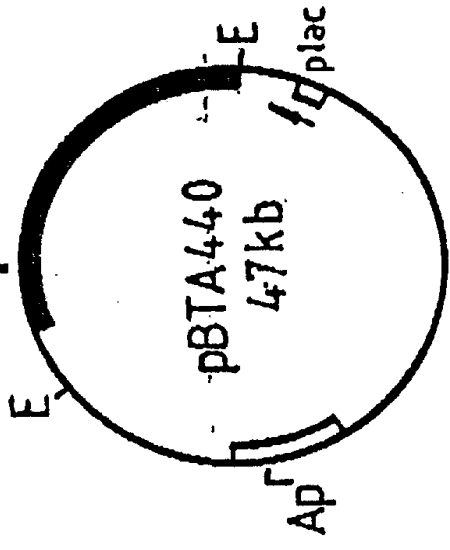
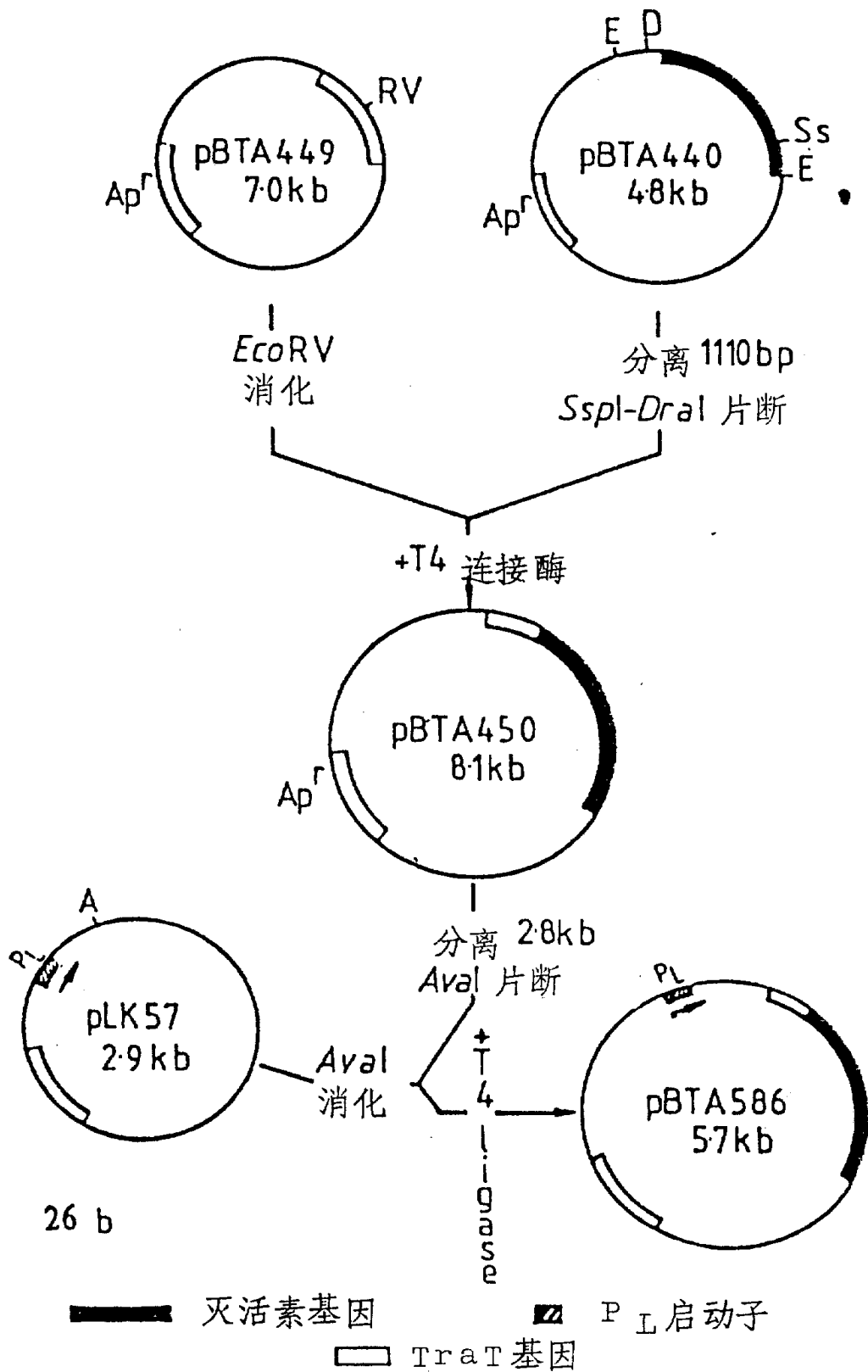


图 26a



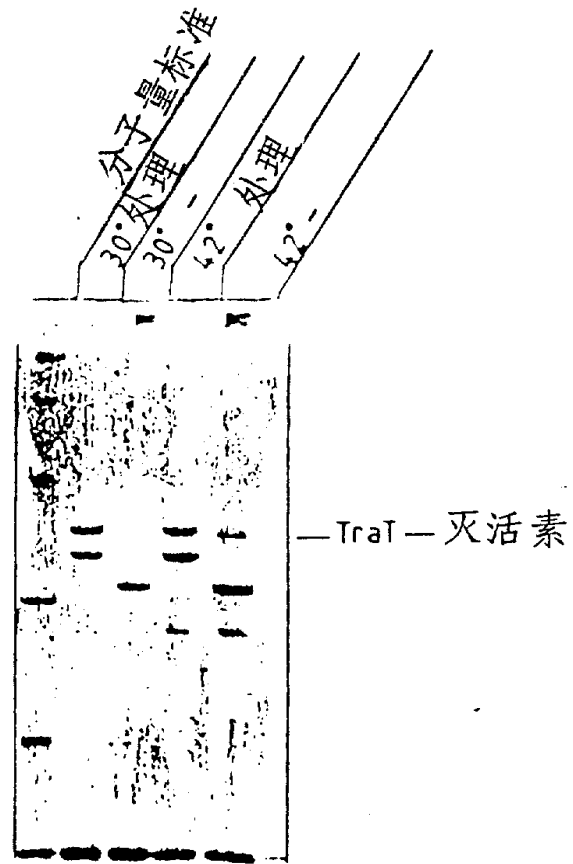


图 2 7 来自诱导 (42°C) 和未诱导 (30°C) 培养物的大肠杆菌细胞外膜

制备物: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

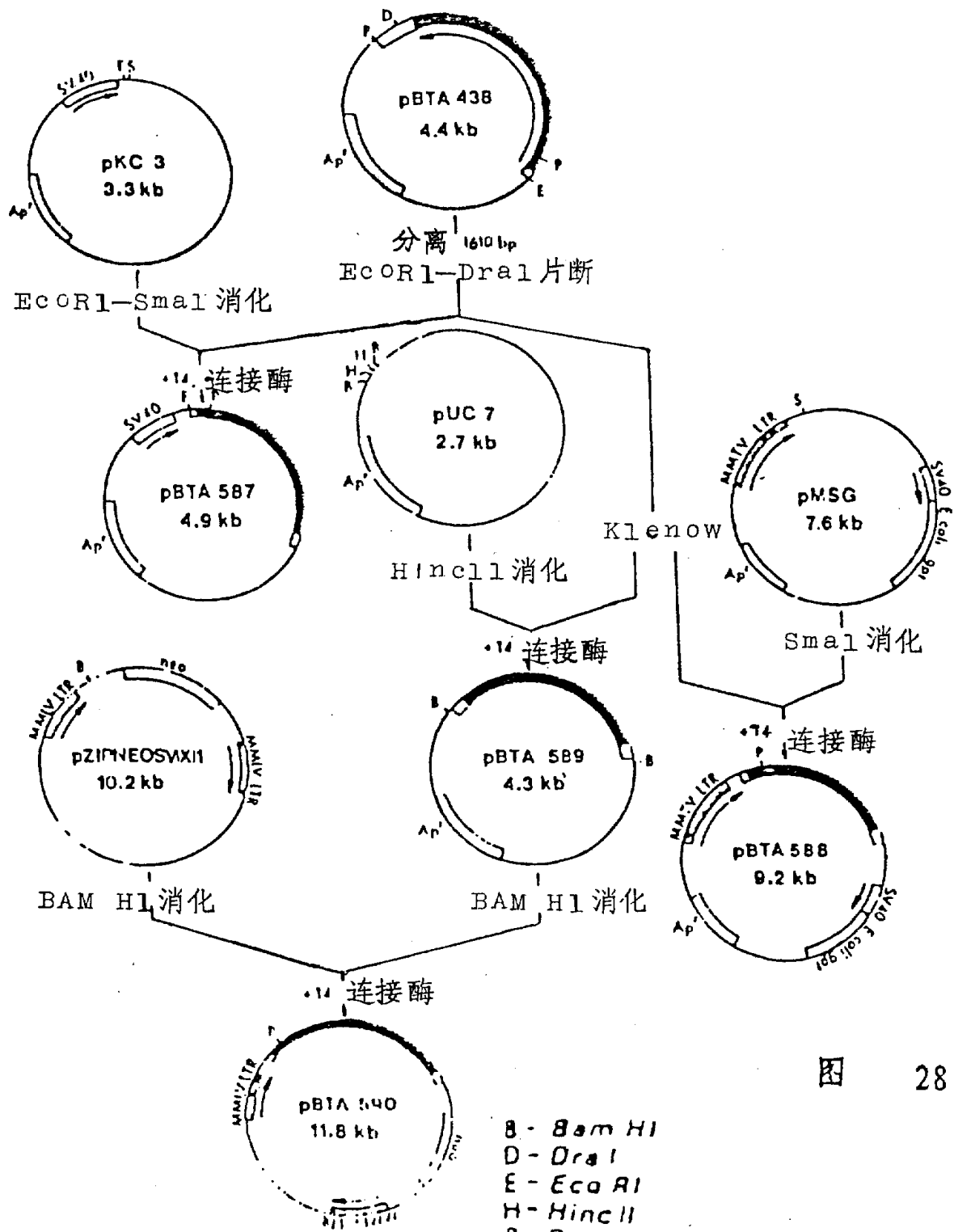


图 28

早期启动子

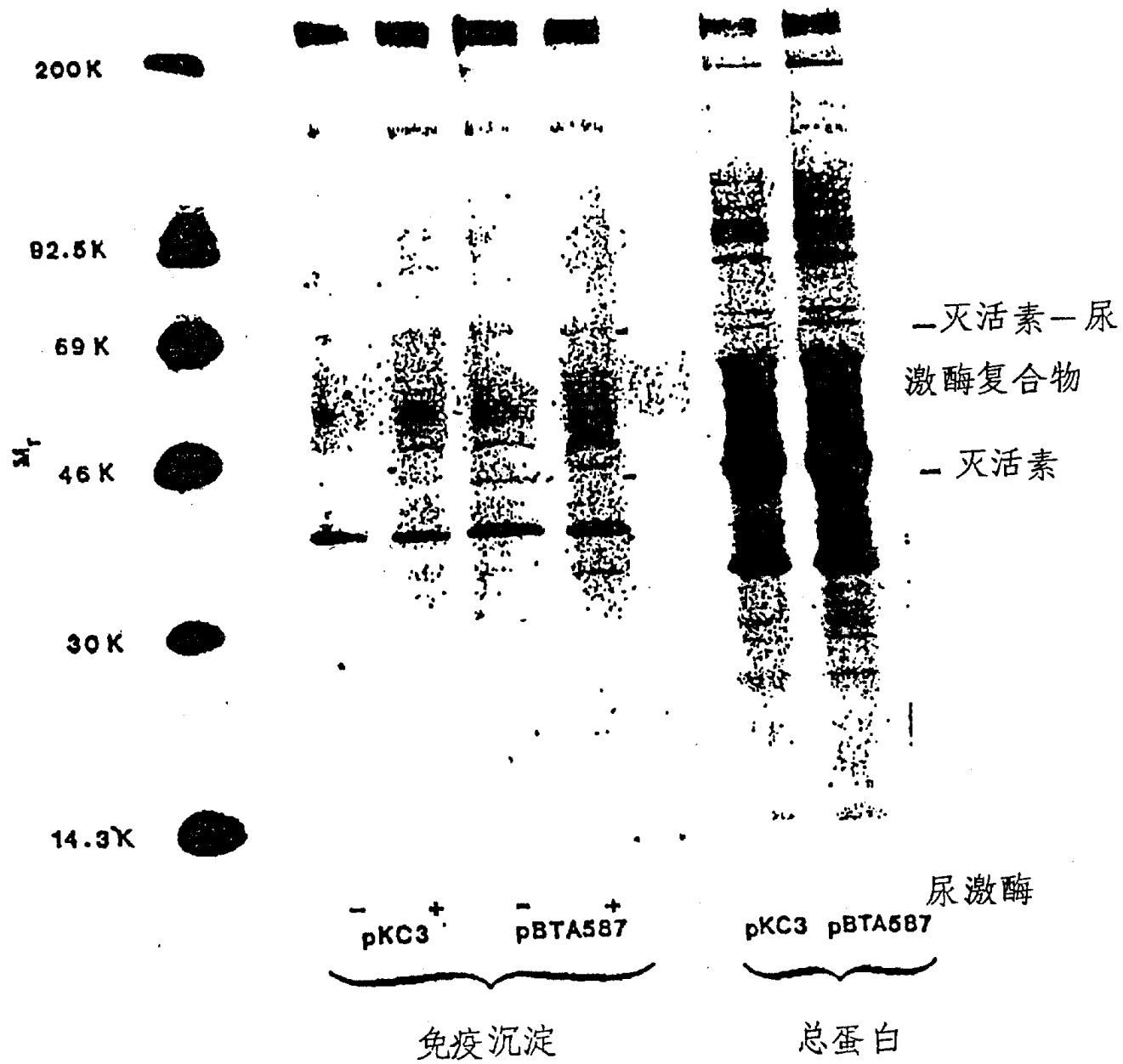


图 29