

具有抗血小板聚集功能的新型葡激酶突变体的表达、 纯化及性质

狄静芳, 贺进田*, 徐瑞光, 陈希, 赵宝华*

(河北师范大学生命科学院, 石家庄 050016)

摘要:【目的】为解决溶栓后再栓塞问题, 构建 N-端含 RGD(Arg-Gly-Asp)序列的葡激酶双功能突变体。研究突变体的表达和纯化, 并进行性质分析。【方法】将突变后的葡激酶突变体序列连入 pBV220 质粒, 转化大肠杆菌 BL21 进行表达。阳离子交换、凝胶过滤和阴离子交换三步层析法纯化表达产物, 采用溶圈法对纯化产物进行生物学活性测定, 并测定纯化产物对血小板聚集的抑制效应。【结果】PAGE 扫描结果显示, 葡激酶突变体蛋白在大肠杆菌 BL21 中的表达量约占菌体蛋白总量的 40%~50%; 三步层析纯化后, HPLC 测定其纯度可达 95%。酪蛋白凝胶板溶圈法测得其比活性分别为 10.8×10^4 和 11.0×10^4 HU/mg, 与野生型葡激酶活性相当; 且具有明显的抗血小板聚集活性, 血小板聚集仪测定其血小板聚集抑制率分别为 10.72% 和 19.71%, 明显高于野生型葡激酶血小板聚集抑制率。本实验利用 pBV220 载体高效表达了葡激酶突变体基因, 得到了高纯度、高活性的突变体蛋白, 为葡激酶生产产业化和临床应用奠定了良好的基础。

关键词: 葡激酶; RGD; 抗血小板聚集

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1186-06

天然葡激酶 (staphylokinase, SAK) 是金黄色葡萄球菌溶原性噬菌体合成的一种蛋白水解酶, 由 136 个氨基酸组成。SAK 是一种“间接型”纤溶酶原激活物, 它不能直接使纤溶酶原 (Plg) 转变为纤溶酶 (plasmin, Plm), 而是先与纤溶酶原按 1:1 比例结合形成无活性的复合物 SAK·plg, 继之在少量纤溶酶启动下, 纤溶酶原活性部位暴露, 由单链变为双链的纤溶酶, 形成活性 SAK·plm 复合物, 后者进一步激活纤溶酶原分子, 使之转变为纤溶酶并进一步溶解血栓。在血浆中, SAK·plm 很快被 α_2 -抗纤溶酶抑制, 不激活纤溶系统; 有血栓存在时 SAK·plm 复合物与血栓中的纤维蛋白结合, α_2 -抗纤溶酶对 SAK·plm 复合物的抑制速度会下降 100 倍, 因此 SAK 是一种高效的溶栓剂^[1]。SAK 溶栓疗效至少与重组组织纤溶酶原激活剂 (r-tPA) 相当, 且较 r-tPA 具有更高的血栓

选择性, 对富含血小板的动脉血栓疗效更佳^[2]。SAK 不激活系统纤溶, 溶栓后出血并发症少, 无显著促凝作用, 具有高度的纤维蛋白特异性, 并可防止用药后出血倾向的发生^[3-5]。正是由于 SAK 具有纤维蛋白特异性高, 纤维蛋白原降解少, 价格便宜, 对血小板富集型血栓作用强等优点, 使其成为一种极具潜力的特异性溶栓剂。但是, 临床试验表明使用重组葡激酶后仍有一定的再梗塞率^[6]; 血小板介导的动脉血栓的形成是导致梗塞和成功溶栓后再梗塞的主要原因, 而活化后血小板聚集反应是动脉血栓形成的前提, 因此, 在溶栓的同时进行抗凝、抗血小板聚集治疗是一种积极的防再梗塞治疗策略。近年来, 靶向溶栓剂的研究引人注目。RGD (Arg-Glu-Asp) 序列是血小板膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 结合基序, 存在于纤维蛋白原 (Fgn)、纤维粘联蛋白等分子中, Fgn 与活化血小板的

*通讯作者。Tel/Fax: +86-311-86268434; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com; he_jintian@sina.com

作者简介: 狄静芳(1981-), 女, 河北秦皇岛人, 硕士, 主要从事微生物分子生物学研究。E-mail: fangfangxiaodi@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-05-08; 修回日期: 2008-05-23

GPIIb/IIIa 结合是血小板聚集的前提,因此外源 RGD 肽序通过与 Fgn 竞争结合活化血小板表面的 GPIIb/IIIa,可以抑制活化血小板聚集,从而抑制血栓的形成。有研究者尝试将 RGD 序列导入溶栓药物的内部或 C-端,期望所得的突变体具有溶栓、防栓的双重功能,但效果并不是很理想^[7,8]。到目前为止,将对 RGD 序列引入 SAK N-末端的研究报道甚少,因此,本实验设计了突变体 MD1-SAK(将葡激酶的 N 末端前 10 位氨基酸序列由 S¹S²S³F⁴D⁵K⁶G⁷K⁸Y⁹K¹⁰突变为 S¹S²R³G⁴D⁵F⁶D⁷K⁸G⁹K¹⁰Y¹¹K¹²)和突变体 MD3-SAK(将葡激酶的 N 末端前 10 位氨基酸序列突变为 M¹S²R³G⁴D⁵F⁶D⁷K⁸G⁹K¹⁰Y¹¹K¹²),研究其表达、纯化,并进行性质分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21、野生型葡激酶 SAK-pBV220 质粒由本实验室分离并保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: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 载体质粒均购自 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 购自岛津公司,质谱仪 ZMD MS 为 Waters 公司产品。

1.2 突变体表达质粒的构建及序列测定

应用 PCR 介导的定点突变技术,以野生型葡激酶 SAK-pBV220 质粒为模板,以上游引物、下游引物进行 PCR 扩增。DNA 片段的回收、质粒的提取与纯化均按分子克隆实验指南^[4]及相应试剂盒操作手册进行^[9]。纯化后所得片段经 *EcoR*、*BamH* 酶水解后,与经同样酶水解的载体 pBV-220 相混合,加入 T4 DNA 连接酶,16 连接过夜,将连接产物转化 *E.coli* BL21,选择重组子接种 LB 培养基培养,提取质粒 DNA,经酶切鉴定和核苷酸序列分析证实已发生设计的突变,序列分析由大连宝生物生物技术公司完成。所述寡核苷酸由上海生工生物工程公司合成。突变体 MD1-SAK:上游引物:GCGGAATTCATGTCAAGTCGCGGAGATTCAATTCGACAAA,下游引物:GCGGGATCCTTATTTCTTTTCTATAACAACC。突变

体 MD3-SAK:上游引物:GCGGAATTCATGTCAACGCGGAGATTCAATTCGACAAAAGGA,下游引物:GCGGGATCCTTATTTCTTTTCTATAACAACC。下划线部分为突变位点,粗体部分分别为限制性内切酶 *EcoR*、*BamH* 酶切位点。

1.3 突变体蛋白的诱导表达与鉴定

用上述筛选得到的突变质粒转化大肠杆菌 DH5 α ,LBA 平板筛选得到单克隆,挑取单克隆接种摇瓶中的 M₉CAA (0.08 mol/L Na₂HPO₄,0.02 mol/L KH₂PO₄,0.05 mol/L NaCl,0.02 mol/L MgSO₄,1% Glucose,1% Casin,1.1 mg/mL Vitm B1,0.1% NH₄Cl,0.1% trace element solution,100 mg/mL Amp,pH 6.8) 液体培养基中,30 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 1.6 时,升温至 42 诱导培养 3 h;然后离心收集菌体,PBS 缓冲液洗涤后进行 18% 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 层析柱先后用 10 倍柱床体积 0.1 mol/L pH 5.6 NaAc-HAc 和 0.02 mol/L pH 5.6 NaAc-HAc 缓冲液平衡。将超声破碎离心后的上清液用 0.02 mol/L HCl 调 pH 至 5.6,样品以 8 mL/min 流速上样,0.02 mol/L pH 5.6 NaAc-HAc 缓冲液洗脱至基线,以含 0~0.3 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L pH 5.6 NaAc-HAc 缓冲液连续梯度洗脱,分部收集洗脱组分,18% SDS-PAGE 鉴定目的蛋白分布,合并含目的蛋白的收集液。用 10 倍柱床体积 0.01 mol/L pH 7.8 PB 缓冲液平衡 Sephadex G-50 层析柱,并将含目的蛋白的收集液用 0.2 mol/L Na₂HPO₄ 调 pH 至 7.8,3 mL/min 速度进样,使用 0.01 mol/L pH 7.8 PB 缓冲液以 3 mL/min 的流速洗脱。分部收集洗脱组分,18% SDS-PAGE 鉴定目的蛋白分布,合并含目的蛋白的收集液。用 10 倍柱床体积 0.1 mol/L pH 7.8 PB 缓冲液平衡 Q-Sepharose FF 层析柱,并将含目的蛋白收集液以 5 mL/min 流速上样,0.01 mol/L pH 7.8 PB 洗脱至基线,以含 0~0.3 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L pH 7.8 PB 缓冲液进行洗脱,分部收集洗脱组分,18% SDS-PAGE 鉴定目的蛋白分布,合并含目的蛋白收集液。并以 Bradford 法测定蛋白浓度,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。将纯化后的目的蛋白分装,冷冻抽干。

调整样品浓度约为 1~2 mg/mL 左右,经 G-50 脱

盐后即可直接上样。质谱条件为：使用电喷雾电离源 (ESI), 电喷雾电压 3.0 kV, 电喷雾接口干燥气流速 300 L/h, 脱溶剂温度 200 °C, 碰撞诱导解离电压 (CID) 55 V, 离子源温度 90 °C, 毛细管电压 28 V, 质谱质量数范围 800~1500。

色谱分离条件：反相 C₁₈ 色谱柱 (Waters), 孔径 3.5 μm, 2.1 mm×100 mm; 检测波长：280 nm; A 相 (0.1% 甲酸的水溶液), B 相 (0.1% 甲酸的乙腈溶液), 30 min 内 A 相由 100% 降到 0%, B 相由 0% 升高到 100%, 流速 0.2 mL/min, 样品室温度 10 °C, 柱温 20 °C。

1.5 突变体表达产物溶栓活性测定

酪蛋白凝胶板溶圈法：凝胶含 1.6% 脱脂奶粉, 1% 琼脂糖, 0.02% NaN₃ 和 5 g/mL 纤溶酶原。

脱脂奶粉溶于 0.05 mol/L pH 7.4 PB, 于 60 °C 水浴; 琼脂糖溶于 0.05 mol/L pH 7.4 PB, 加热溶解, 冷却至 60 °C 后与前一溶液混合, 加入 NaN₃ 和纤溶酶原, 混匀, 浇灌于平板上。凝胶形成后用打孔器打直径 3~4 mm 小孔。在各孔中加等体积标准品或样品倍比稀释液, 37 °C 湿盒保温过夜。测定各孔溶圈直径, 以标准品活性的对数和溶圈直径的对数作标准曲线, 计算样品的活性单位。

1.6 SDS-PAGE 检测突变体与纤溶酶原相互作用过程

将终浓度为 1.0 mg/mL 的 MD1-SAK 和 MD3-SAK 与终浓度为 0.2 mg/mL 的纤溶酶原于 37 °C 下混合, 分别于 0、2、4、8、16、32、60 min 留样, 18% SDS-PAGE 分析样品。

1.7 血小板聚集抑制试验

取健康人新鲜血液, 加入 0.1 体积 3.8% 枸橼酸钠抗凝, 低速离心 (72×g, 10 min), 分离富含血小板血浆 (PRP)。200 μL PRP 加入比色杯, 在连续搅拌的条件下, 葡激酶突变体 (终浓度均为 2 μmol/L)、突变体与纤溶酶原的作用产物 (突变体终浓度均为 2 μmol/L) 分别与 200 μL PRP 37 °C 孵育 5 min 后, 加入 ADP 5 μL (终浓度 10 μmol/L)。多能双通道血小板聚集仪测定 5 min 内血小板聚集率变化, 以最大聚集率 (PAGm) 为观察指标, 测定最大血小板聚集率。以 2 μmol/L 野生型 SAK 和生理盐水组作为对照。

2 结果

2.1 表达质粒的构建

以本室构建的 SAK-pBV220 质粒为模板, 用包含突变位点的引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳结果显

示, 在约 500 bp 左右出现单一特异性条带。以 *EcoR*、*BamH* 酶解后与 pBV220 连接, 转化 *E.coli* BL21, 筛选阳性转化子。测序结果表明, 除突变位点外, 无其他非特异突变。证实获得阳性克隆 MD1-pBV220 和 MD3-pBV220。

2.2 突变体的诱导表达

热激诱导含有重组质粒的 *E.coli* BL21, 突变体蛋白获得高效表达, 与对照相比, 出现明显的特异表达条带。其分子量约为 15 kDa, 色谱扫描仪检测显示, 突变体蛋白占菌体总蛋白的 40%~50%。

2.3 突变体蛋白的纯化

在通过 SP-Sepharose FF 层析柱的上样过程中即出现一个明显的杂蛋白流出峰, 多数杂质蛋白被除去, 含 0.18 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱出目的蛋白峰;

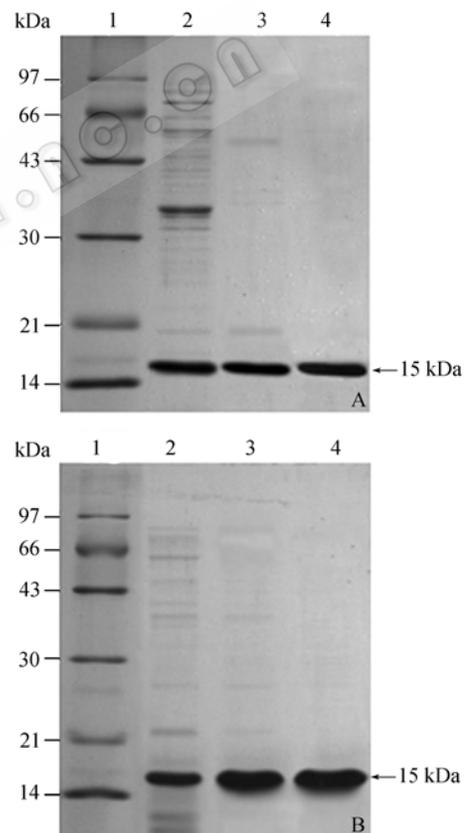


图 1 SAK 突变体蛋白纯化过程的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of SAK mutant after purified by SP-FF, G-50 and Q-FF. A: SDS-PAGE analysis of MD1-SAK after purified by SP-FF, G-50 and Q-FF. 1: low molecular weight protein markers; 2: SDS-PAGE analysis after purified by SP-FF; 3: SDS-PAGE analysis after purified by G-50; 4: SDS-PAGE analysis after purified by Q-FF; B: SDS-PAGE analysis of MD3-SAK after purified by SP-FF, G-50 and Q-FF. 1: low molecular weight protein markers; 2: SDS-PAGE analysis after purified by SP-FF; 3: SDS-PAGE analysis after purified by G-50; 4: SDS-PAGE analysis after purified by Q-FF.

收集 SP-Sepharose FF 层析纯化后的含目的蛋白的样品峰通过 Sephadex G-50 凝胶柱, 蛋白进一步被纯化, 最后将凝胶纯化后的样品上 Q 柱, 含 0.22 mol/L NaCl 的缓冲液洗脱出目的蛋白峰。MD1-SAK 纯化过程的 SDS-PAGE 检测结果如图 1-A 所示。经三步

纯化, SDS-PAGE 中的杂蛋白条带逐渐消失, 最后一步纯化后只有目的条带存在, HPLC 分析其纯度为 95%。纯化全过程分析结果见表 1。MD3-SAK 的 SDS-PAGE 检测结果如图 1-B 所示, HPLC 确定其纯度为 95%。

表 1 MD1-SAK 蛋白纯化过程中各步纯化数据表

Table 1 Recovery of MD1-SAK after each chromatographic separation step used for its purification from the lysate of transformed *E.coli* cells^a

Step	Sample vol. /mL	Total protein /g	Purity ^b /%	10 ⁻⁴ ×Specific activity /(HU ^c /mg)	Activity recovery /%	Purification factor (-fold) ^d
Lysate	2000	3.21	56	6.84	100.00%	—
SP-Sepharose FF	150	2.16	82	7.25	71.32%	1.46
Sephadex G-50	270	1.23	91	9.62	53.89%	1.11
Q-Sepharose FF	220	0.87	96	10.80	42.80%	1.06

^a Purification was from 38 g of cells wet weight. ^b Protein quantities were estimated from densitometric measurements using 18% (w/v) SDS-PAGE or determined by HPLC analysis. ^c Abbreviation: HU, home units (arbitrary units in comparison with a home standard). ^d Calculated as the fold increase in protein purity (percentage purity in the purification step divided by percentage purity in the preceding step).

2.4 突变体蛋白分子量的鉴定

电喷雾质谱法测定突变体蛋白分子量的结果如图 2 所示, 测定的 MD1-SAK 和 MD3-SAK 分子量分

别为: 15802.9 和 15800.5, 根据氨基酸序列计算的结果分别为: 15810.4 和 15795.5, 质谱测定的数据与理论值的质量数差别在误差允许范围内, 并且根据质谱测定结果可以推断, MD1-SAK 的 N-末端甲硫氨酸在转译完成后已经被细胞内的肽酶所切除, 而 MD3-SAK 的 N-末端甲硫氨酸在转译完成后未被细胞内的肽酶切除。

2.5 突变体蛋白体外纤溶活性测定

纤维蛋白凝胶溶圈法测定结果如图 3 所示, 突变体 MD1-SAK、MD3-SAK 和野生型 WT-SAK 的比活性分别为 10.8×10^4 、 11.0×10^4 和 10.1×10^4 HU/mg。

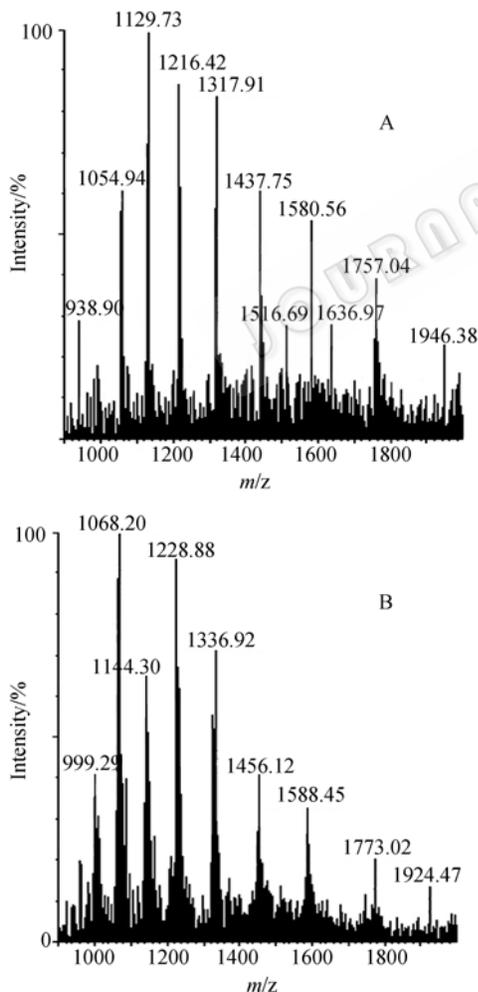


图 2 SAK 突变体的质谱分析

Fig. 2 MS analysis of SAK mutant. A: MS analysis of MD1-SAK; B: MS analysis of MD3-SAK.

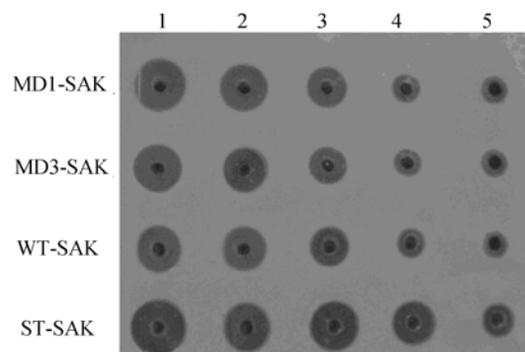


图 3 SAK 突变体纤溶活性的测定

Fig. 3 Fibrinolytic activity of the purified SAK mutants by radial caseinolytic assay. MD1-SAK 1-5: Concentration of MD1-SAK was 1.43×10^{-3} mg/mL, 8.60×10^{-4} mg/mL, 4.30×10^{-4} mg/mL, 2.15×10^{-4} mg/mL, 1.43×10^{-4} mg/mL, respectively. MD3-SAK 1-5: Concentration of MD3-SAK was 1.93×10^{-3} mg/mL, 1.16×10^{-3} mg/mL, 5.80×10^{-4} mg/mL, 2.90×10^{-4} mg/mL, 1.93×10^{-4} mg/mL, respectively. WT-SAK 1-5: Concentration of WT-SAK was 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, respectively. ST-SAK 1-5: Specific activity of the standardized SAK was 1000 HU/mL, 800 HU/mL, 400 HU/mL, 200 HU/mL, 100 HU/mL, respectively.

实验结果表明, MD1-SAK 和 MD3-SAK 与野生型葡激酶溶解纤维蛋白的活性相比, 优于野生型葡激酶, 此突变并未影响其体外纤溶活性。

2.6 SDS-PAGE 监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, 从而切除突变体 N 末端的十肽。野生型葡激酶 WT-SAK 及突变体 MD1-SAK、MD3-SAK 与纤溶酶原相互作用过程的监测分别如图 4 所示。结果表明突变体激活纤溶酶原后对 N-末端十肽的切除速度不高于野生型葡激酶, 32 min 后, MD1-SAK、MD3-SAK 的 N-末端被纤溶酶酶切完全, 比野生型略快。

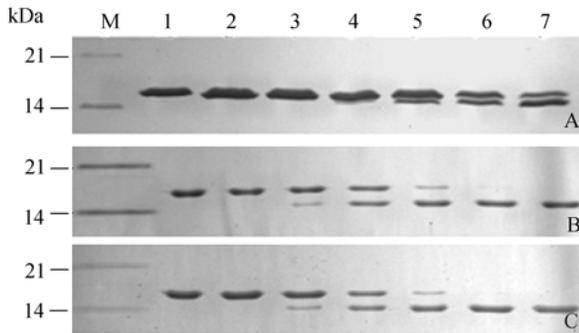


图 4 葡激酶蛋白被纤溶酶切掉 N 末端的 SDS-PAGE 分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of activation of plasminogen with SAK and the mutants. A: WT-SAK; B: MD1-SAK; C: MD3-SAK; M: low molecular weight protein markers; 1-7: 0, 2, 4, 8, 16, 32, 60 min.

2.7 血小板聚集抑制试验

结果显示, 纤溶酶原作用前后的葡激酶突变体 MD1-SAK 和 MD3-SAK 与野生型 SAK 相比均表现明显的抗血小板聚集活性。未经过纤溶酶原作用的葡激酶突变体 MD1-SAK 和 MD3-SAK 的抗血小板聚集活性 ($8.86 \pm 1.19\%$ 和 $9.86 \pm 1.84\%$) 明显低于经过纤溶酶原作用 N-末端已经切除的葡激酶突变体样品的抗血小板聚集活性 ($10.72 \pm 2.58\%$ 和 $19.71 \pm 3.09\%$) (表 2)。

表 2 SAK 突变体蛋白血小板聚集抑制活性测定结果
Table 2 The effects of SAK and the variants in platelet aggregation assay. Platelet aggregation was ADP-induced. Maximal aggregations were measured after incubation at 37°C for 15 min. Data were the mean of 3 independent samples. (* $p < 0.05$)

Sample	Final concentration/(mmol/L)	Inhibition/%
Saline	—	3.47 ± 1.28
WT-SAK	2	3.98 ± 1.05
MD1-SAK	2	8.86 ± 1.19
MD1-SAK ^a	2	10.72 ± 2.58
MD3-SAK	2	9.86 ± 1.84
MD3-SAK ^a	2	19.71 ± 3.09

^a the samples had incubated with plasminogen for 60 min as described in the material and methods.

3 讨论

近年来新型溶栓药物的研制已取得一定进展, 但临床研究结果表明目前还没有任何一种溶栓药物能在临床上取得十分理想的溶栓效果。理想的溶栓药物应该具备以下特征: 快速溶栓以迅速恢复血供; 纤维蛋白专一性的靶向于血栓以降低对全身性纤溶系统的激活; 持续起效以维持血管开放并避免再栓的发生; 避免对纤维蛋白原和凝血因子的影响以保护系统的凝血功能; 降低出血的危险性; 无抗原性且价格低廉^[10]。虽然 SAK 是一种高效特异的溶栓剂, 临床研究表明它具有至少与 t-PA 相当的溶栓疗效, 且较 t-PA 有更高的纤维蛋白专一性, 但是, 还存在着不容忽视的再栓塞问题^[6]。

本实验利用 PCR 介导的定点突变的方法成功构建了 SAK 突变体的表达菌株, 表达产物经阴、阳离子交换层析和凝胶过滤层析三步法纯化后, 可得到较高纯度样品。突变体在 SAK 分子的 N-末端引入了一个 RGD 序列, 体外实验表明其具有高纤溶活性和显著的抗血小板聚集活性, 具有溶解血栓和预防再栓塞的双重功效。SDS-PAGE 结果证实与野生型葡激酶相比, N-末端甲硫氨酸的切除与否并不影响突变体在激活血栓上的纤溶酶原时, 被纤溶酶切去 N-末端前 10 位氨基酸的速度。抑制血小板聚集实验表明 RGDF (MD3-SAK) 的抗血小板聚集活性高于 RGDS (MD1-SAK), 但质谱结果验证了 N-末端的突变会影响其末端甲硫氨酸的酶切加工, 突变体 MD3-SAK N-末端的甲硫氨酸未被正确切除。综上, 突变体 MD1-SAK 具有较好的开发前景, 为产业化和临床应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Collen D. Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent. *Nature Medicine*, 1998, 4: 279-284.
- [2] 李春坚, 黄峻. 葡激酶的研究进展. *心血管病学进展(Advance in Cardiovascular Diseases)*, 2002, 23(2): 110-113.
- [3] 刘明河. 葡萄球菌激酶作为新型溶栓剂的研究进展. *微生物学杂志(Journal of Microbiology)*, 2005, 25(3): 73-76.
- [4] Collen D, Lijnen HR. Thrombolytic agents. *Thrombosis and Haemostasis*, 2005, 93(4): 627-630.
- [5] Verstraete M. Third generation thrombolytic drugs. *AMERICAN Journal of MEDICINE*, 2000, 109(1): 52-58.
- [6] Vanderschueren S, Barrios L, Kerdinchai 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.
- [7] 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.
- [8] Chiou JF, Woon MD, Cheng SN, *et al.* Staphylokinase-annexin XI chimera exhibited efficient in vitro thrombolytic activities. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(5): 1122–1129.
- [9] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] WF Baker Jr. Thrombolytic therapy: clinical applications. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 2003, 17(1): 283–311.

Expression, purification and characterization of a novel staphylokinase with anti-platelet aggregation activity

Jingfang Di, Jintian He^{*}, Ruiguang Xu, Xi Chen, Baohua Zhao^{*}

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

Abstract: [Objective] To investigate construction and expression of novel staphylokinase (SAK) mutants with Arg-Gly-Asp (RGD) motif at its N-terminus, and to develop a novel thrombolytic agent with fibrinolytic activity and anti-platelet activity. [Methods] The fragments of SAK mutants were inserted into expression plasmid pBV220 and recombinant vectors were transformed into *E. coli* BL21, The SAK mutants could be expressed by rose of the culture temperature from 30°C to 42°C. After purified by a 3-step chromatography, their fibrinolytic and anti-platelet aggregation activity were analyzed. [Results] SDS-PAGE analysis indicated that the SAK mutants occupied 50% of the total proteins in *E. coli* BL21. After purified by the 3-step chromatography, the purity of SAK mutants were more than 95%. The Specific fibrinolytic activities of SAK mutants purified were 10.8×10^4 and 11.0×10^4 HU·mg⁻¹. Anti-platelet aggregation activity were 10.72% and 19.71%, which were significantly higher than that of wild-type SAK. Thus the SAK variants were successfully expressed, and purified. The high purity and bioactivities of staphylokinase variants lay a good basis for manufacture and clinical application.

Keywords: staphylokinase; RGD(Arg-Gla-ASP); anti-platelet aggregation

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-311-86268434; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com; he_jintian@sina.com
Received: 6 April 2008/ Revised: 23 May 2008

《微生物学报》答作者问——关于投稿

问: 我的文章现已审查完毕, 并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询, 如果文章修改后, 再次投递, 是否还需要交稿件受理费? 是否仍然用原论文编号提交?

答: 这要分两种情况,

- (1) 如果你的文章已经被通知“退稿”了, 那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理, 从程序上来讲和新投稿件是一样的, 仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理, 请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。
- (2) 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”, 则不作为新稿处理, 请作者直接将修改稿上传到远程系统中, 不再另交稿件受理费。

问: 投稿《微生物学报》有没有字数的限制? 是否要按照正式出版时的格式排版?

答: 投稿时没有字数上的限制, 稿件的学术质量是第一位的, 其次要注意写作质量。我们建议作者注意几点。

- (1) 在投稿时首先考虑如何将你工作内容和创新点表达清楚, 以便审稿人可以清楚地判断稿件水平。
- (2) 在文章评审通过之后, 编辑部要通知作者修改, 届时会提出字数等方面的具体要求。
- (3) 投稿时也不需要按本刊出版物上的字号、字号、双栏形式排版, 可适当放大字号, 具体要求详见“投稿要求”, 以便于专家阅读。