

人组织型纤溶酶原激活剂  
在鸡体内的表达特性

王晓利  
廖成水  
著

tissue-type  
plasminogen activator



中国原子能出版社  
China Atomic Energy Press

# 人组织型纤溶酶原激活剂 在鸡体内的表达特性

王晓利  
廖成水

著

tissue-type  
plasminogen activator



中国原子能出版社  
China Atomic Energy Press

## 图书在版编目(CIP)数据

人组织型纤溶酶原激活剂在鸡体内的表达特性/王晓利,  
廖成水著. -- 北京:中国原子能出版社,2016.11

ISBN 978-7-5022-7637-9

I. ①人… II. ①王…②廖… III. ①组织促凝血酶原激酶—研究 IV. ①Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 271586 号

## 人组织型纤溶酶原激活剂在鸡体内的表达特性

---

出 版 中国原子能出版社(北京市海淀区阜成路 43 号 100048)  
责任编辑 肖 萍  
印 刷 河南承创印务有限公司  
经 销 全国新华书店  
开 本 710mm × 1010mm 1/16  
印 张 12  
字 数 175 千字  
版 次 2016 年 11 月第 1 版 2016 年 11 月第 1 次印刷  
书 号 ISBN 978-7-5022-7637-9  
定 价 36.00 元

---

出版社网址: <http://www.aep.com.cn> E-mail: [atomep123@126.com](mailto:atomep123@126.com)

发行电话: 010-68452845

版权所有 侵权必究

## 前 言

人组织型纤溶酶原激活剂(tissue - type plasminogen activator, tPA)是广泛存在于人体组织和体液中的生理性纤溶酶原激活剂,主要由血管内皮细胞合成、分泌的一种丝氨酸单链糖蛋白酶。Matsuo 等 1981 年将 tPA 用于治疗兔肺部血栓,首次证明了 tPA 的溶栓作用。1983 年,美国国立卫生研究所冠状动脉研究组的 Sobel BE 首次将 tPA 用于急性心肌梗死的治疗试验并取得良好效果。随后大量实验研究证明 tPA 具有与纤维蛋白有较高的亲和力、引起全身出血倾向小、溶解血栓能力较强等特点,是一种高效、特异的溶血栓药物,在临床上被广泛用于心脑血管疾病的治疗。除此之外,tPA 还与组织再造、记忆形成、神经突触重塑、排卵、细胞迁移、激肽产生、补体激活、肿瘤侵袭等一些重要的生理与疾病过程密切相关。然而,目前在临床上治疗血栓性疾病的 tPA 还是主要靠大规模培养哺乳动物细胞得到的。由于利用哺乳动物细胞来生产具有高成本、低浓度、低产量等缺陷,所以 tPA 的价格较昂贵,临床上的治疗费也相当高。

随着转基因技术的发展,将转基因动物作为生物反应器受到越来越多的关注。目前用的生物反应器主要有哺乳动物的乳腺和家禽的输卵管。将转基因动物作为生物反应器来生产药用蛋白具备以下优点:产量高、生产周期短、浓度高、成本低。迄今为止,已有多种药用蛋白在哺乳动物的乳腺组织中得到了高效表达。因此,利用转基因动物作为生物反应器的特点与 tPA 的特点结合起来大量生产 tPA,用于临床上心血管疾病的治疗,已经吸引了国内外许多研究者和规模性医药公司的关注。总之,利用转基因动物作为生物反应器来批量生产 tPA 具有非常广阔的前景。



产蛋鸡在肝脏合成的胆固醇酯、磷脂、甘油三酯等脂蛋白以 VLDLy 的形式组装并定向转运到卵母细胞,沉积到卵黄中,卵黄的主要前体物为 VLDLy 和卵黄蛋白原(VTG),其中 VLDLy 占卵黄干物质的 60%。VLDLy 的组装和分泌过程大致分为两步。第一步是在 apo - B100 翻译的过程中形成 pre - VLDL 雏形,在粗面内质网合成的 apo - B100 载脂蛋白穿过内质网膜进入滑面内质网,pre - VLDL 雏形就是在此过程中由 apo - B100 摄取脂肪形成;第二步是初步形成 VLDLy<sup>[10]</sup>。中性脂肪颗粒将与 pre - VLDL 进一步组装形成 VLDLy,然后被运至高尔基复合体,通过继续摄取脂肪,经过加工修饰最后被释放入血液。研究发现,VLDLy 是以完整的脂蛋白颗粒形式,通过卵母细胞膜上的凹陷小泡以内吞的形式进入生长中的卵母细胞,沉积在卵黄中。

沙门氏菌是一种胞内侵袭性细菌,通过基因缺失手段减毒的沙门氏菌,可显著降低其毒力,但不影响其侵袭能力并对黏膜组织有强嗜性。能够有效地持续刺激机体产生强有力的细胞免疫、体液免疫以及局部黏膜免疫。既可作为针对同源抗原的活疫苗,也可作为表达外源抗原的宿主菌,具有作为活载体有效地呈递抗原、发挥免疫佐剂以及激发黏膜免疫的优势,目前被广泛用于新型 DNA 口服疫苗载体的研究。尤其是成功构建载体 - 宿主平衡致死系统以来,通过基因工程减毒的鼠伤寒沙门氏菌作为载体已被广泛应用于细菌、病毒、寄生虫的抗原,甚至肿瘤抗原,显示出良好的应用前景。

虽然对转基因家禽研究已经几年时间,但缺乏有效的外源基因导入手段,使得转基因家禽的进展一直不尽如人意。鉴于此,本书将 apo - B100 作为引导序列,与 tPA 基因融合构建绿色荧光真核表达载体 pEGFP - N1 - apo - tPA,电转化至减毒鼠伤寒沙门氏菌  $\Delta crp$  SL1344。有望通过 VLDLy 的组装过程使 tPA 融合基因进入发育的卵巢,为 tPA 及其他功能基因的表达转运探索新的途径。

最后,谨希望本书的出版能够让更多的科研工作者和临床医务工作者关注 tPA 的研究和临床应用价值开发。但需要指出的是,在本书中侧

重介绍减毒鼠伤寒沙门氏菌  $\Delta crp$  SL1344 携带 tPA 在鸡体内的表达及特性,未来需要更多的相关科学研究进一步探索减毒鼠伤寒沙门氏菌  $\Delta crp$  SL1344 携带 tPA 在鸡体内的转运机制及其具体生物学功能。同时,因知识和能力有限,虽然做了最大的努力,本书仍然存在许多错误的地方,望广大专家和读者批评指正。

王晓利 廖成水

河南科技大学

2016年9月18日

# 目 录

# Contents

## 第一章 绪 论

|       |                                  |    |
|-------|----------------------------------|----|
| 1.1   | tPA 的研究进展 .....                  | 4  |
| 1.1.1 | tPA 发展简史 .....                   | 4  |
| 1.1.2 | tPA 的生物学活性 .....                 | 5  |
| 1.1.3 | tPA 的功能及应用 .....                 | 6  |
| 1.2   | 产蛋鸡卵黄中营养物的转运与沉积的研究 .....         | 8  |
| 1.2.1 | apo - B100 对 VLDLy 组装过程的影响 ..... | 8  |
| 1.2.2 | VLDLy 在卵黄中沉积的过程 .....            | 9  |
| 1.3   | 绿色荧光蛋白的研究进展 .....                | 11 |
| 1.3.1 | 绿色荧光蛋白的特点 .....                  | 11 |
| 1.3.2 | 绿色荧光蛋白的应用 .....                  | 12 |
| 1.4   | 减毒沙门氏菌载体系统 .....                 | 15 |
| 1.4.1 | 沙门氏菌的侵入途径 .....                  | 15 |
| 1.4.2 | 减毒沙门氏菌的研究 .....                  | 16 |
| 1.4.3 | 减毒沙门氏菌作为载体的研究 .....              | 17 |
| 1.5   | 转基因家禽生物反应器的研究进展 .....            | 20 |
| 1.5.1 | 转基因动物作为生物反应器 .....               | 20 |
| 1.5.2 | 家禽作为生物反应器的独特优势 .....             | 21 |
| 1.5.3 | 家禽转基因技术面临的困境 .....               | 21 |
| 1.5.4 | 常规转基因动物技术在家禽转基因应用中的局限性 ...       | 23 |



|                              |    |
|------------------------------|----|
| 1.6 利用转基因动物生物反应器生产 tPA ..... | 25 |
| 1.6.1 tPA 在原核和真核细胞中的表达 ..... | 25 |
| 1.6.2 tPA 在转基因动物乳腺中的表达 ..... | 25 |
| 1.6.3 tPA 的纯化和检测 .....       | 26 |
| 1.7 问题与展望 .....              | 28 |
| 参考文献 .....                   | 29 |

## 第二章 pCDNA3 - apo - $\Delta$ tPA 特异性表达载体的构建

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1 材料与方法 .....                                                                   | 38 |
| 2.1.1 主要试剂 .....                                                                  | 38 |
| 2.1.2 主要溶液及配制方法 .....                                                             | 38 |
| 2.1.3 主要仪器设备 .....                                                                | 40 |
| 2.1.4 DNA 分析软件 .....                                                              | 40 |
| 2.2 试验方法 .....                                                                    | 41 |
| 2.2.1 试验设计 .....                                                                  | 41 |
| 2.2.2 引物设计与合成 .....                                                               | 42 |
| 2.2.3 对 apo - B100 和 $\Delta$ tPA 目的基因分别进行扩增、回收纯化、<br>克隆 .....                    | 43 |
| 2.2.4 连接产物的转化、质粒提取、酶切鉴定 .....                                                     | 46 |
| 2.2.5 apo - $\Delta$ tPA 基因融合与 pCDNA3 - apo - $\Delta$ tPA 载体构建<br>.....          | 50 |
| 2.3 结果与分析 .....                                                                   | 51 |
| 2.3.1 目的基因的克隆和重组质粒的酶切鉴定 .....                                                     | 51 |
| 2.3.2 pMD18 - T - apo - $\Delta$ tPA 和 pMD18 - T - $\Delta$ tPA 质粒的酶切<br>鉴定 ..... | 51 |
| 2.3.3 pMD18 - T - apo - $\Delta$ tPA 和 pMD18 - T - $\Delta$ tPA 质粒的酶切<br>鉴定 ..... | 52 |





## 第四章 减毒鼠伤寒沙门氏菌 $\Delta crp$ SL1344 作为载体的研究

|       |                  |    |
|-------|------------------|----|
| 4.1   | 材料与试剂            | 84 |
| 4.1.1 | 材料               | 84 |
| 4.1.2 | 主要培养基及抗生素的配制     | 84 |
| 4.2   | 试验方法             | 86 |
| 4.2.1 | 重组减毒沙门氏菌的稳定性     | 86 |
| 4.2.2 | 重组菌的转染           | 86 |
| 4.2.3 | 重组减毒沙门氏菌分布检测     | 86 |
| 4.2.4 | 减毒鼠伤寒沙门氏菌作为载体的研究 | 87 |
| 4.3   | 结果与分析            | 88 |
| 4.3.1 | 重组减毒沙门氏菌的稳定性     | 88 |
| 4.3.2 | 重组减毒沙门氏菌分布检测     | 88 |
| 4.3.3 | 减毒鼠伤寒沙门氏菌作为载体的研究 | 89 |
| 4.4   | 讨论               | 91 |
| 4.5   | 小结               | 93 |
|       | 参考文献             | 94 |

## 第五章 重组菌 $\Delta crp$ SL1344 (pEGFP - N1 - apo - tPA) 在鸡胚成纤维细胞的表达检测

|       |                                                            |     |
|-------|------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1   | 材料                                                         | 98  |
| 5.1.1 | 试验材料                                                       | 98  |
| 5.1.2 | 主要试剂                                                       | 98  |
| 5.2   | 试验方法                                                       | 102 |
| 5.2.1 | 鸡胚成纤维细胞的分离和体外培养                                            | 102 |
| 5.2.2 | 重组菌 $\Delta crp$ SL1344 (pEGFP - N1 - apo - tPA) 感染鸡胚成纤维细胞 | 103 |

|       |                              |     |
|-------|------------------------------|-----|
| 5.2.3 | 鸡胚成纤维细胞中表达产物的定性检测 .....      | 103 |
| 5.2.4 | 鸡胚成纤维细胞中表达产物的 ELISA 检测 ..... | 104 |
| 5.2.5 | 鸡胚成纤维细胞中表达产物的体外活性检测 .....    | 105 |
| 5.3   | 结果与分析 .....                  | 106 |
| 5.3.1 | 鸡胚成纤维细胞的体外培养 .....           | 106 |
| 5.3.2 | 表达产物的 SDS - PAGE 电泳检测 .....  | 107 |
| 5.3.3 | 表达产物的荧光显微镜检测 .....           | 107 |
| 5.3.4 | 表达产物的 ELISA 检测 .....         | 107 |
| 5.3.5 | 表达产物的活性检测 .....              | 108 |
| 5.4   | 讨论 .....                     | 109 |
| 5.5   | 小结 .....                     | 112 |
|       | 参考文献 .....                   | 113 |

## 第六章 重组菌 $\Delta crp$ SL1344 (pEGFP - N1 - apo - tPA) 在鸡体内表达及卵黄中沉积

|       |                                      |     |
|-------|--------------------------------------|-----|
| 6.1   | 试验方法 .....                           | 119 |
| 6.1.1 | 材料 .....                             | 119 |
| 6.1.2 | 主要器械及仪器 .....                        | 119 |
| 6.1.3 | 主要溶液及配制方法 .....                      | 119 |
| 6.2   | 试验方法 .....                           | 121 |
| 6.2.1 | 采用减毒鼠伤寒沙门氏菌介导法 .....                 | 121 |
| 6.2.2 | 融合蛋白在鸡蛋中的定性表达检测 .....                | 121 |
| 6.2.3 | 融合蛋白在鸡蛋中的定量检测 .....                  | 122 |
| 6.2.4 | 融合蛋白在卵黄中的活性表达检测 .....                | 123 |
| 6.3   | 结果分析 .....                           | 124 |
| 6.3.1 | 卵黄中融合蛋白的 SDS 电泳及其荧光镜检 .....          | 124 |
| 6.3.2 | apo - tPA - GFP 融合蛋白在卵黄表达含量的检测 ..... | 125 |
| 6.3.3 | 融合蛋白在卵黄中的活性表达检测 .....                | 126 |



|              |     |
|--------------|-----|
| 6.4 讨论 ..... | 127 |
| 6.5 小结 ..... | 134 |
| 参考文献 .....   | 135 |

## 第七章 展 望

|            |     |
|------------|-----|
| 参考文献 ..... | 142 |
|------------|-----|

## 附 录

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| 附录一 英文缩写词表 .....                 | 147 |
| 附录二 pMD 18 - T Vector 碱基序列 ..... | 149 |
| 附录三 pcDNA3.1 ( - ) 碱基序列 .....    | 152 |
| 附录四 pEGFP - N1 载体序列 .....        | 157 |
| 附录五 tPA 碱基序列 .....               | 161 |
| 附录六 tPA 氨基酸序列 .....              | 164 |
| 附录七 apo 碱基序列 .....               | 165 |
| 附录八 apo 氨基酸序列 .....              | 175 |
| 后记 .....                         | 179 |

# 第一章

## 绪 论



随着转基因技术的发展,将转基因动物作为生物反应器受到越来越多的关注。目前用的生物反应器主要有哺乳动物的乳腺和家禽的输卵管。将转基因动物作为生物反应器来生产药用蛋白具备以下优点:产量高、生产周期短、浓度高、成本低。迄今为止,已有多种药用蛋白在哺乳动物的乳腺组织中得到了高效表达。人组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)是一种高效、特异的溶血栓药物,实验证明tPA具有与纤维蛋白有较高的亲和力、引起全身出血倾向小、溶解血栓能力较强等特点,在临床上被广泛用于心脑血管疾病的治疗。然而,目前在临床上治疗血栓性疾病的tPA还是主要靠大规模培养哺乳动物细胞得到的。由于利用哺乳动物细胞来生产具有高成本、低浓度、低产量等缺陷,所以tPA的价格较昂贵,临床上的治疗费也相当高。因此,利用转基因动物作为生物反应器的特点与tPA的特点结合起来大量生产tPA,用于临床上心血管疾病的治疗,已经吸引了国内外许多研究者和规模性医药公司的关注。总之,利用转基因动物作为生物反应器来批量生产tPA具有非常广阔的前景。



## 1.1 tPA 的研究进展

### 1.1.1 tPA 发展简史

人 tPA 是广泛存在于人体组织和体液中的生理性纤溶酶原激活剂,主要由血管内皮细胞合成、分泌的一种丝氨酸单链糖蛋白酶<sup>[1]</sup>,存在于优球蛋白中。tPA 是一种特异高效的溶血栓药物,与血栓中的纤维蛋白-纤溶酶原复合物具有较强的亲和力。当 tPA 与血栓接触后,能迅速形成纤维蛋白-tPA-纤溶酶原复合物,有选择性催化无活性的纤溶酶原转化为有活性的纤溶酶,水解血栓中的纤维蛋白,进而使血栓溶解<sup>[2]</sup>。但是 tPA 不能激活机体内原来的纤溶系统,不会引起全身出血,是一种理想的溶血栓药物,Astrup 等早在 1947 年在组织碎片中首次发现这种存在于动物体内的活性因子,起初称为血纤维蛋白激活酶,它能激活体内的纤溶酶原。以后,相继有人报道从不同动物组织如猪的心脏、卵巢中分离和纯化到 tPA。Rijken DC<sup>[3]</sup>等首次从人的子宫中分离到高纯度的 tPA。1981 年 Rijken 和 Collen 首次成功从培养的黑色素瘤细胞中提取出 tPA。同年 Dingeman 将从人子宫中分离出的 tPA 与从黑色素瘤细胞中分离出来的 tPA 进行比对,发现它们氨基酸序列和纤溶特性完全相同。用子宫中分离到的 tPA 做抗血清试验,从免疫学特征上发现在血管灌注液 tPA、子宫中分离到的 tPA 和血液 tPA 具有相同的特性<sup>[4]</sup>。Matsuo 等<sup>[5]</sup>1981 年将 tPA 用于治疗兔肺部血栓,首次证明了 tPA 的溶栓作用。1983 年,美国国立卫生研究所冠状动脉研究组的 Sobel BE 首次将 tPA 用于急性心肌梗死

的治疗试验并取得良好效果。

### 1.1.2 tPA 的生物学活性

#### (1) tPA 基因的克隆和序列分析

人类 tPA 基因位于第 8 号染色体上,基因全长 20 000 bp,包括 14 个外显子和 13 个内含子<sup>[6]</sup>。1983 年,Pennica 等首先完成了 tPA 基因的克隆与序列分析。结果表明,tPA cDNA 序列全长为 2 530 bp,只有一个开放阅读框,起始于 85 ~ 87 位的 ATG,终止于 1 771 ~ 1 773 位的 TGA。1986 年,Salldra 等测得人 tPA 基因全序列,包含的 13 个内含子将 tPA 基因分为 14 个外显子,内含子与外显子紧密组织在一起。外显子长度范围为 43 ~ 914 bp,3' 端 uTR 包含在最大的外显子中。内含子长度范围为 111 ~ 14 257 bp,约占 tPA 基因全长的 92%。人类 tPA 基因有典型的 TATAbox 和 CAAT box,前者位于 -22 ~ -29,靠近上游的 TATAAAAA,后者在 -112 ~ -116 部位,与上游的 CAATG 邻近。两个 boxes 都是转录的原始位置,在 tPA 的表达调控中起着非常重要的作用,具有增强转录调控作用。

#### (2) tPA 基因形态结构和作用原理

tPA 分子高效专一的溶纤效能是由其复杂的分子结构决定的。tPA 的前体有 562 个氨基酸,经翻译后修饰,重新剪切连接而成,等电点 pH 7.5。成熟的 tPA 由 527 个氨基酸序列组成的糖蛋白,其相对分子质量大小为 62 000 ~ 70 000 kDa,有 34 个半胱氨酸之间形成 17 对二硫键。

单链 tPA 分子在血流中可被游离的纤溶酶和蛋白酶在 Arg275Ile276 处切断,形成一个以二硫键相连的由重链(H)和轻链(L)组成的双链分子,活性区在 L 链。tPA 由 5 个相对独立的蛋白质结构域组成,这 5 个结构域从 N 端开始依次为指结构域(F 区,1 ~ 51 aa),内皮生长因子(EGF 区,51 ~ 87 aa),两个环柄结构域(K<sub>1</sub> 区,88 ~ 176 aa 和 K<sub>2</sub> 区,177 ~ 262 aa),丝氨酸蛋白酶结构域(p 区,276 ~ 527 aa)。F 区:与纤维蛋白的