

# 一种新的纤溶酶原激活反应动力学研究方法

党昕, 纪建国, 茹强, 杨晶鑫, 俞梅敏, 茹炳根\*

(北京大学 蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

**摘要** 在溶栓研究中, 纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA) 激活纤溶酶原(plasminogen, Plg) 反应的动力学常数的测定占有重要地位. 在前人的研究中, 虽然进行了这项实验, 但是并未给出一个方便、快捷的测定方法. 所以建立一种更准确, 更适合一般的实验室条件的PA 分子激活Plg 反应动力学常数的测定方法是必要的. 在对该反应进行数学分析的基础上, 得到由可测量表示的纤溶酶(plasmin, Pm) 生成速度( $v(Pm)$ ) 的计算公式, 由 $v(Pm)$  及相应已知量可进一步推导出 $K_m$ 、 $k_{cat}$  的表达式, 最终测得相应动力学常数. 用这种方法测定的由甲醇酵母(*Pichia pastoris*) 表达的人单链尿激酶型纤溶酶原激活剂(human single chain urokinase-PA, scu-PA) 激活Plg 的反应的 $K_m = 0.648 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $k_{cat} = 0.0626 \text{ s}^{-1}$ , 与文献报导相符( $K_m = 0.4 \sim 1.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $k_{cat} = 0.02 \sim 0.093 \text{ s}^{-1}$ ), 说明此方法是可靠的. 又因该法只需相应底物及酶标仪且为连续测定, 所以十分简便.

**关键词** 纤溶酶原, 动力学常数, 单链尿激酶型纤溶酶原激活剂, 纯化, 性质

中图分类号 Q55

## A New Method of Kinetic Study on the Reaction of Plasminogen Activation

DANG Xin, JI Jian-guo, RU Qiang, YANG Jing-xin, YU Mei-min, RU Bing-gen\*

(National Laboratory of Protein Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

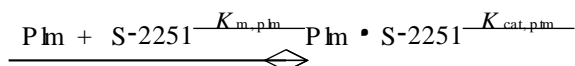
**Abstract** In the study of the activity of all kinds of plasminogen activator, it is important to determine the kinetic constants of the plasminogen activation catalyzed by plasminogen activator. But there is no suitable method for this experiment. To find an expedite, shortcut plasminogen activation study method is very important. Expression of plasmin generating rate ( $v(Pm)$ ) expressed in detectable variable was derived from mathematics reasoning of this reaction, the kinetic constants  $K_m$  and  $k_{cat}$  can be easily calculated by the value of  $v(Pm)$  and other known quantities. This method was used to determine the kinetic constant of the reaction of plasminogen activation which was catalyzed by *Pichia pastoris* expressed human single chain urokinase-type plasminogen activator. The result is:  $K_m = 0.648 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $k_{cat} = 0.0626 \text{ s}^{-1}$  coincidental with the former result ( $K_m = 0.4 \sim 1.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $k_{cat} = 0.02 \sim 0.093 \text{ s}^{-1}$ ), which means this method is reliable. This method is also expedite for it only needs some kinds of substrate and a microreader.

**Key words** plasminogen, kinetic constant, single-chain urokinase type plasminogen activator, purification, characterization

纤溶酶原激活剂(PA), 如尿激酶型纤溶酶原激活剂(U-PA)、组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type-plasminogen activator, t-PA) 等能激活纤溶酶原为纤溶酶, 并进一步降解纤维蛋白凝块. 这两种溶栓药物的研究已成为溶栓研究中的焦点. 这类研究中的一个必测项目为PA 激活纤溶酶原的动力学常数测定, 这个结果可以定量反映PA 分子对纤溶酶原的亲合性和催化活性.

由于PA 激活纤溶酶原的反应速度不可直接测量, 而只能通过反应产生的纤溶酶(plasmin, Pm) 催

化有色合成底物 S-2251 (H-D-V-allyl-leucyl-lysine-p-nitroaniline dihydrochloride) 水解的生色反应:



收稿日期: 2000-04-07, 接受日期: 2000-05-24

\* 联系人: Tel: (010)62751842, Fax: (010)62751842

E-mail: ru@public.east.cn.net

党昕, 男, 1970年3月生, 博士生

Received: April 7, 2000; Accepted: May 24, 2000

\* Corresponding author. Tel: (010)62751842

Fax: (010)62751842, E-mail: ru@public.east.cn.net

$Pm + VLK (ValLeuLys) + (p\text{-nitroaniline}) p\text{-NA}$

产生有色的对硝基苯胺( $p\text{-NA}$ )在 405 nm 的光吸收来间接测量,所以这项测量存在一定难度.文献报导的方法有:

(1) 在反应进程的不同时间从反应混合物中取出一小份,稀释后认为  $Plg$  激活反应终止,通过测定该稀释物的  $Pm$  浓度,进而做  $[Pm] - t$  图,求出  $v(Pm)$  [1,2].

(2) 在反应进程的不同时间,从反应混合物中取出一小份,加入人尿激酶的专一性抑制剂,终止  $Plg$  的激活反应,测定  $[Pm]$ ,做  $[Pm] - t$  图,求出  $v(Pm)$  [3~6].

(3) 将两个反应联合进行,在反应起始混合液中加入过量  $\alpha\text{-antiplasmin}$ ,反应产生的纤溶酶,立即与  $\alpha\text{-antiplasmin}$  形成复合物,失去活性.在反应的不同时间,取出一小份反应物,加入链激酶(streptokinase, SK),SK 与  $Plg$  形成复合物并水解  $Plg$  为  $Pm$ ,形成的  $Pm$  继续与 SK 形成抗  $\alpha\text{-antiplasmin}$  的复合物.测定该复合物活性,得到  $[Pm]$ ,再求出  $v(Pm)$  [7].

(4) 对两个联合进行的反应做数学分析,得到公式后再经一系列繁琐运算,由  $v_c$ 、 $\epsilon$  以及比色杯宽度  $L$  计算出国际单位表示的  $v$ ,最后由 Lineweaver-Burk 作图法得到  $K_{m,PA}$  与  $k_{cat,PA}$  [8~10].

以上 4 种方法都存在一定的缺陷:第一种稀释法不准确;第二及第三种方法所用的 UK 及纤溶酶的专一性抑制剂较难得到,且实验步骤多易引入较大误差;第四种方法较准确,但由于现在为节约样品,一般用 96 孔板进行测定,由于水对塑料的浸润作用,故极难得到准确的光程  $L$  值,所以也不适合一般实验室应用.

我们经过理论推导与实验验证,给出了一个快速、准确,且适合一般实验室条件的 PA 激活纤维蛋白溶酶原反应的  $K_m$  与  $k_{cat}$  的方法.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 尿激酶型纤溶酶原激活剂(U-PA)由本实验室构建的表达载体 pPIC9K-UPA 经甲醇酵母(*Pichia pastoris*)表达后,纯化得到(对 S-2444 的酰胺解活性为 144 000 U/mg).

1.1.2 S-2251 购自 Chromogenix-Instrumentation Laborator Spa(意大利),纤溶酶(5.7 U/mg)、纤溶

酶原购自 Sigma 公司.所有试剂均以 TBST (50 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Tris  $\cdot$  HCl, 0.038 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NaCl, 0.01% Tween 80, pH 7.4) 溶解并稀释.

1.1.4 酶标仪为 TECAN Rainbow Reader(奥地利).

### 1.2 方法

#### 1.2.1 理论推导

反应 I:  $PA + Plg \xrightarrow{K_{m,PA}} PA \cdot Plg \xrightarrow{k_{cat,PA}} PA + Pm$

和反应 II:

$Pm + S\text{-}2251 \xrightarrow{K_{m,Pm}} Pm \cdot S\text{-}2251 \xrightarrow{k_{cat,Pm}} Pm + VLK + p\text{-NA}$

都遵循米氏动力学,由反应 I 可得到在任意时间  $t$  的  $p m$  生成速度  $v_t(Pm)$ :

$$v_t(Pm) = \frac{d[Pm]_t}{dt} = \frac{V_{m,PA} \cdot [P]g]_t}{K_{m,PA} + [P]g]_t}$$

又因为  $V_{m,PA} = k_{cat} \cdot [PA]$ ,所以由式对  $t$  积分有:

$$[Pm] = \frac{d[Pm]_t}{dt} \cdot dt = \frac{k_{cat,PA} \cdot [PA] \cdot [P]g]_t}{K_{m,PA} + [P]g]_t} \cdot dt$$

其中  $[P]g]_t = [P]g]_0 - \int_0^t v_t(Pm) \cdot dt < [P]g]_0 - v_0(Pm) \cdot t$ ,又已知天然 scu-PA 激活  $Plg$  的  $K_m$  在 0.4~1.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  之间,  $K_{cat}$  在 0.02~0.093  $\text{s}^{-1}$  之间 [3,6],所以在  $[P]g]_0 = 0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $[PA] = 1.4 \times 10^{-9} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的条件下  $v_0(Pm) = 0.02 \times 1.4 \times 10^{-9} \times 0.1 \times 10^{-6} / [(0.4 + 0.1) \times 10^{-6}] = 5.6 \times 10^{-12} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的纤溶酶原可供反应 17 857 s 或 297 min,在反应的前 40 min 生成纤溶酶  $5.6 \times 10^{-12} \times 60 \times 40 = 1.344 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  相比可以忽略不计.所以在反应的前 40 min 内,可以认为  $[P]g]_t = [P]g]_0$ ,并设为  $[P]g]$ ,将此式代入  $[p m]$  的积分式,可得到:

$$[Pm] = \frac{k_{cat,PA} \cdot [PA] \cdot [P]g]}{K_{m,PA} + [P]g]} \cdot dt = \frac{k_{cat,PA} \cdot [PA] \cdot [P]g]}{K_{m,PA} + [P]g]} \cdot t + C_1$$

式中  $C_1$  为常数.

又因为  $\frac{k_{cat,PA} \cdot [PA] \cdot [P]g]}{K_{m,PA} + [P]g]} = v(Pm)$  所以式可变化为

$$[Pm] = v(Pm) \cdot t + C_1$$

又由反应 II 可知,  $p\text{-NA}$  的生成速度  $v(p\text{-NA}) = \frac{V_{m,Pm} \cdot [S\text{-}2251]}{K_{m,Pm} + [S\text{-}2251]} = \frac{K_{cat,Pm} \cdot [Pm] \cdot [S\text{-}2251]}{K_{m,Pm} + [S\text{-}2251]}$  在

实验条件下, 由于  $[S-2251] (1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$  远远大于  $p\text{-NA}$  水解  $S-2251$  的  $K_{m, Pm} = 250 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 所以可认为  $v(p\text{-NA}) = k_{cat, Pm} \cdot [Pm]$ , 由此式对  $t$  积分可得:

$$[p\text{-NA}] = \frac{d[p\text{-NA}]}{dt} \cdot dt = k_{cat, Pm} \cdot [Pm] \cdot dt$$

在反应 I、II 联合进行的条件下  $[Pm]$  为时间的函数, 关系为 式所示. 将 代入 可得:

$$[p\text{-NA}] = k_{cat, Pm} \cdot [v(Pm) \cdot t + C_1] \cdot dt =$$

$$\frac{1}{2} k_{cat, Pm} \cdot v(Pm) \cdot t^2 + k_{cat, Pm} \cdot C_1 \cdot t + C_2$$

$p\text{-NA}$  发色集团产生的最强光吸收  $A_{405} = \epsilon \cdot L \cdot [p\text{-NA}]$ , 其中  $\epsilon$  为  $p\text{-NA}$  的摩尔消光系数,  $L$  为反应液在 96 孔板中的高度. 所以由 式可得到  $A_{405}$  与  $t$  的关系为:

$$A_{405} = 0.5 \epsilon L \cdot k_{cat, Pm} \cdot v(Pm) \cdot t^2 + \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot C_1 \cdot t + \epsilon \cdot L \cdot C_2$$

简写为:

$$A_{405} = A \cdot t^2 + B \cdot t + C$$

其中  $A = 0.5 \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot v(Pm)$ ;  $B = \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot C_1$ ;  $C = \epsilon \cdot L \cdot C_2$  由 式可知在反应 I、II 联合进行的条件下  $A_{405}$  与  $t$  是一种二阶多项式关系, 二阶项系数为  $A$ . 为消掉  $\epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm}$ , 应引入纤溶酶水解  $S-2251$  的标准曲线. 方法如下:

由 式可知在  $[Pm]$  为定值的条件下,  $[p\text{-NA}] = k_{cat, Pm} \cdot [Pm] \cdot t + C$ , 所以  $A_{405}$  与  $t$  的关系为:

$$A_{405} = \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot [Pm] \cdot t + C_3$$

简写为  $A_{405} = K \cdot t + C_3$ , 其中  $K = \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot [Pm]$ ,  $C_3 = \epsilon \cdot L \cdot C$ .

由 式可知: 对某一固定浓度的  $[Pm]_n$ , 作纤溶酶水解  $S-2251$  的  $A_{405}-t$  图, 则可得到与  $[Pm]_n$  相关的斜率  $K_n = \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot [Pm]_n$ . 如果用  $K_n$  与  $[Pm]_n$  进行二次作图则可得到方程为  $K_n = \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot [Pm]_n$  的直线, 设斜率为  $a$ , 则有:  $a = \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm}$  又  $A = 0.5 \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot v(Pm)$ , 所以由此二式可得

$$v(Pm) = 2A/a$$

根据 式可计算出不同  $[Plg]$  浓度下的  $v(Pm)$ , 再根据 Lineweaver-Burk 作图法可得方程为:  $\frac{1}{v(Pm)} =$

$\frac{K_{m, PA}}{V_{m, PA}} \cdot \frac{1}{[Plg]} + \frac{1}{V_{m, PA}}$  的直线. 以该直线的斜率除以截距即可得到 PA 激活纤溶酶原的  $K_{m, PA}$  值.  $K_{m, PA}$

为已知后, 对于某一固定浓度的  $[PA]_n$ , 可由  $v$

$(Pm) = \frac{V_{m, PA} \cdot [Plg]}{K_{m, PA} + [Plg]}$  计算出  $V_{m, PA}$ . 再用  $V_{m, PA}$  对

$[PA]$  作图, 应得到方程为  $V_{m, PA} = k_{cat, PA} \cdot [PA]$  的直线, 该直线的斜率为  $k_{cat, PA}$ .

### 1.2.2 实验设计

#### 1.2.2.1 纤溶酶水解 S-2251 的标准曲线

在 96 孔板中加入  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $S-2251$  贮液  $45 \text{ } \mu\text{l}$ , 再加入  $45 \text{ } \mu\text{l}$  不同浓度的纤溶酶溶液, 使纤溶酶的终浓度分别达到  $42.34, 37.63, 32.93, 28.22, 23.52, 18.82, 14.11, 9.41 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 每个浓度做两个平行样, 混匀后室温条件下在酶标仪上每隔一分钟测定一次  $A_{405}$ , 共测 45 次.

#### 1.2.2.2 PA 激活纤溶酶原反应的 $K_{m, PA}$ 值的测定

在 96 孔板中加入  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $S-2251$  贮液  $45 \text{ } \mu\text{l}$ , 再加入  $30 \text{ } \mu\text{l}$  不同浓度的纤溶酶原溶液, 使纤溶酶原在  $90 \text{ } \mu\text{l}$  反应体系中的终浓度分别达到  $2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 最后加入  $8.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 PA 溶液  $15 \text{ } \mu\text{l}$ , 使其终浓度达到  $1.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 混匀后室温条件下在酶标仪上每隔一分钟测定一次  $A_{405}$ .

#### 1.2.2.3 PA 激活纤溶酶原反应的 $k_{cat, PA}$ 值的测定

在 96 孔板中加入  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $S-2251$  贮液  $45 \text{ } \mu\text{l}$ , 再加入  $30 \text{ } \mu\text{l}$  不同浓度的 PA 溶液, 使 PA 在  $90 \text{ } \mu\text{l}$  反应体系中的终浓度分别达到  $14.7, 11.02, 8.82, 7.35, 5.51, 4.9, 4.41 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最后加入  $3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  纤溶酶原溶液  $15 \text{ } \mu\text{l}$  使其终浓度达到  $0.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 混匀后室温条件下在酶标仪上每隔一分钟测定一次  $A_{405}$ .

## 2 结果

### 2.1 纤溶酶标准曲线

将 1.2.2.1 中不同时间测得的不同浓度纤溶酶水解  $S-2251$  反应的  $A_{405}$  数据作  $A_{405}-t$  图 (见 Fig. 1). 对 Fig. 1 中各浓度纤溶酶的  $A_{405}-t$  图经线性回归后求得直线斜率  $K_n = \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot [Pm]_n$  单位为  $\text{min}^{-1}$ , 数值列于 Table 1. 再根据 Table 1 作  $K-[Pm]$  图 (Fig. 2), 经线性回归后求得直线斜率为  $a = \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} = 3.4 \times 10^5 A_{405} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ . 该  $a$  值为定值, 可为后续实验直接引用.

### 2.2 PA 水解纤溶酶原反应的 $K_m (K_{m, PA})$ 值的获得

在反应 I、II 联合进行的条件下,  $A_{405}$  与  $t$  是一种二阶多项式的函数关系 (原始数据见 Fig. 3), 二阶项系数为  $A = 0.5 \epsilon \cdot L \cdot k_{cat, Pm} \cdot v(Pm)$ . 由于最终

的  $A_{405}$  值已超出酶标仪的量程, 成为水平线, 所以应取反应初始阶段作二次回归.  $A$  值确定后, 根据  $v(\text{PIm}) = 2A/a$  计算  $v(\text{PIm})$  (数值见 Table 2). 最后进行  $v(\text{PIm})$  与  $[\text{PIg}]$  的双倒数作图 (Fig. 4), 经线性回归后以直线方程的斜率除以截距即得到  $K_{m, \text{PA}} = 0.648 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

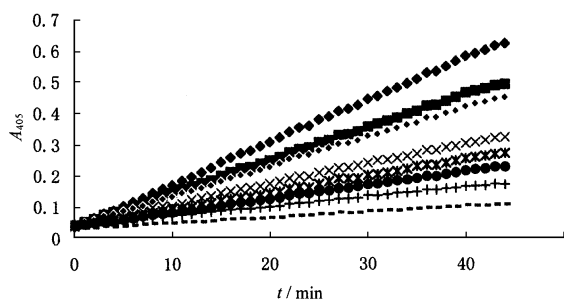


Fig 1 Plot of  $A_{405}$  versus  $t$  of the hydrolysis reaction of S-2251 by different concentration of plasmin

The slope of the regression formula is  $K_n$  ( $K_n = a \cdot k_{\text{cat, PIm}} \cdot [\text{PIm}]_n$  is the function of  $[\text{PIm}]$ ). From the top to the bottom is curve 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Table 1 The values of  $K_n$  at different concentration of plasmin

Curve number	1	2	3	4	5	6	7	8								
$[\text{PIm}]/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	42	34	37	63	32	93	18	22	23	52	28	82	14	11	9	41
$K_n (A_{405} \cdot t^{-1}) / 10^{-3} \text{min}^{-1}$	14	10	55	9	45	6	65	5	4	4	4	3	4	2	1	

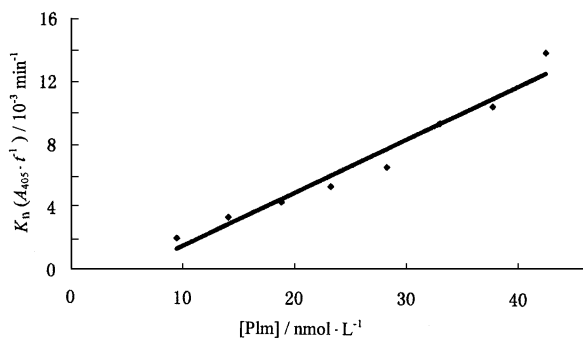


Fig 2 Plot of  $K_n$  versus  $[\text{PIm}]$

The slope of the regression line stand for the value of  $a$

### 2.3 PA 水解纤溶酶原反应的 $k_{\text{cat}}$ ( $k_{\text{cat, PA}}$ ) 值的获得

反应 I、II 联合进行, 对反应初始阶段  $A_{405} \cdot t$  曲线 (原始数据见 Fig 5) 进行多项式回归, 求出二次项系数  $A$ . 根据  $v(\text{PIm}) = 2A/a$ , 求出  $v(\text{PIm})$ , 再根据  $K_{m, \text{PA}} = 0.648 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  以及米氏方程计算出

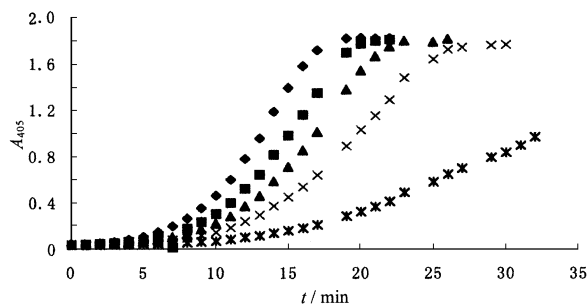


Fig 3 Plot of  $A_{405}$  versus  $t$  of the combination reaction of reaction I and II at different concentration of plasminogen. The coefficient of quadratic item is  $A = 0.5 a \cdot k_{\text{cat, PIm}} \cdot v(\text{PIm})$ . Curves counted from the left to the right is the curve numbered 1, 2, 3, 4, 5 respectively

$V_{m, \text{PA}}$  (数据见 Table 3), 作  $V_{m, \text{PA}} - [\text{PA}]$  图 (Fig 6), 经线性回归后得到斜率为  $k_{\text{cat, PA}} = 0.0626 \text{ s}^{-1}$  的直线方程.

Table 2 The coefficient of quadratic item value  $A$  and  $v(\text{PIm})$  derived from  $A$  at different concentration of plasminogen

Curve number	1	2	3	4	5
$[\text{PIg}]/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2	1.5	1	0.5	0.1
$A (10^{-4} A_{405} \cdot t^{-2}) / \text{min}^{-2}$	86.5	66	55	36.5	12.5
$v(\text{PIm}) / \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	0.848	0.647	0.539	0.358	0.123

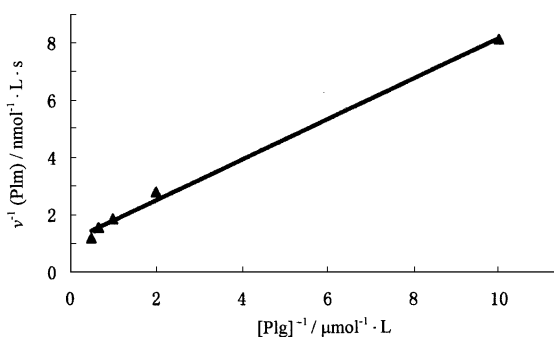


Fig 4 Double-reciprocal plot of initial velocity versus  $[\text{PIg}]$

with equation of  $y = 0.7083x + 1.0937 (R^2 = 0.9952)$

$K_{m, \text{PA}} = 0.648 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Table 3 The coefficient of quadratic item value  $A$  and  $V_{m, \text{PA}}$  derived from  $A$  at different concentration of plasminogen activator (PA)

Curve number	1	2	3	4	5	6	7
$[\text{PA}]/\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	14.7	11.02	8.82	7.35	5.51	4.9	4.41
$A (10^{-3} A_{405} \cdot t^{-2}) / \text{min}^{-2}$	4.05	2.55	1.75	1.55	1.3	1.1	1.1
$v(\text{PIm}) / \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	0.397	0.25	0.172	0.152	0.128	0.108	0.108
$V_{m, \text{PA}} / \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	0.912	0.574	0.394	0.349	0.293	0.248	0.248

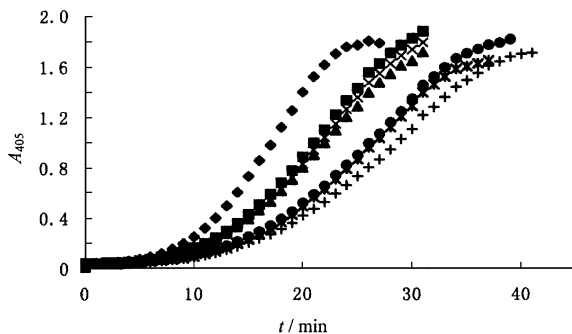


Fig 5 Plot of  $A_{405}$  versus  $t$  of the combination reaction I and II at different concentration of plasminogen activator (PA)  
Curves counted from the left to the right is the curve numbered 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 respectively

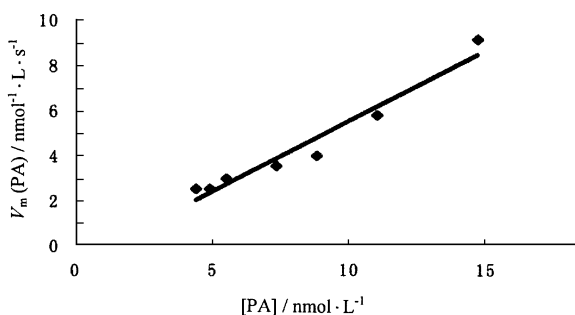


Fig 6 Plot of  $V_{m,PA}$  as the function versus the concentration of plasminogen activator ( $[PA]$ )  
The slope of the regression formulae is the catalytic constant ( $k_{cat,PA} = 0.0626 \text{ s}^{-1}$ )

### 3 讨论

应用本文所述的实验方法测定的酵母表达的人单链尿激酶型纤溶酶原激活剂激活纤溶酶原反应的动力学常数:  $K_m = 0.648 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $k_{cat} = 0.0626 \text{ s}^{-1}$ , 与文献报导相符 ( $K_m = 0.4 \sim 1.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $k_{cat} = 0.02 \sim 0.093 \text{ s}^{-1}$ )<sup>[2~4]</sup>. 这说明该方法是可靠的, 我们的推导和实验设计是正确的.

由于应用此法进行实验时仅需要一台酶标仪, 对仪器要求不高, 也不需纤溶酶或 PA 的专一性抑制剂, 所以适合一般实验室应用; 该法在操作时只需在 96 孔板中加好样品后连续测定  $A_{405}$ , 中途无须取样, 所以操作简便、快捷, 也消除了因中途取样造成的偶然误差, 又由于标准曲线的引入消除了 96 孔板的不均匀本底对实验造成的系统误差和因测量反应

液在 96 孔板中的高度而带来的偶然误差, 所以该法应是已知方法中误差较小的一种 (文中各原始数据图的回归曲线的  $R^2$  都在 0.999 以上, 最高可达 0.9998); 应用此法进行实验时反应体系仅为  $90 \mu\text{l}$ , 样品用量小, 底物也较其它方法节省很多, 所以该方法又是一种较为经济的方法.

致谢 感谢袁洪生老师的悉心指导, 肖传英、杜莉芬老师的热情帮助.

### 参考文献 (References)

- 1 Tait J F, Engelhardt S, Smith C, Fujikawa K. Prourokinase-annexin V chimeras-construction, expression, and characterization of recombinant proteins *J Biol Chem*, 1995, **270**(37): 21594~ 21599
- 2 Ellis V, Scully M F, Kakkar V V. Plasminogen activation by single-chain urokinase in functional isolation — a kinetic study. *J Biol Chem*, 1987, **262**(31): 14998~ 15003
- 3 Collen D, Zamarron C, Lijnen H R, Hoylaerts M. Activation of plasminogen by prourokinase. II. Kinetics *J Biol Chem*, 1986, **261**(3): 1259~ 1266
- 4 Stump D C, Lijnen H R, Collen D. Purification and characterization of single-chain urokinase-type plasminogen activator from human cell cultures *J Biol Chem*. 1986, **261**(3): 1274~ 1278
- 5 Lijnen H R, Zamarron C, Blaber M, Winkler M E and Collen D. Activation of plasminogen by pro-urokinase I Mechanism. *J Biol Chem*. 1986, **261**(3): 1253~ 1258
- 6 Lijnen H R, Hoef B V, Collen D. Comparative kinetic analysis of the activation of human plasminogen by natural and recombinant single-chain urokinase-type plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **884**: 402~ 408
- 7 Nelles L, Lijnen H R, Collen D, Holmes W E. Characterization of Recombinant Human Single chain urokinase-type plasminogen activator mutants produced by site-specific mutagenesis of lysine 158 *J Biol Chem*, 1987, **262**(12): 5682~ 5689
- 8 Chibber B A K, Morris J P, Castellino F J. Effects of human fibrinogen and its cleavage products on activation of human plasminogen by streptokinase *Biochemistry*, 1985, **24**: 3429~ 3434
- 9 Liu J N, Gurew ich V. The kinetics of plasminogen activation by thrombin-cleaved prourokinase and promotion of its activity by fibrin fragment E-2 and by tissue plasminogen activator. *Blood*, 1993, **81**(4): 980~ 987
- 10 Liu J N, Gurew ich V A. Comparative study of the promotion of tissue plasminogen activator and pro-urokinase-induced plasminogen activation by fragments D and E-2 of fibrin. *J Clin Invest*, 1991, **88**: 2012~ 2017