

猪血纤维蛋白溶酶原的纯化及性质研究

刘荣华 凡开明 郑远旗

(四川大学生化教研室, 成都)

摘要 用偶联有 L-赖氨酸的 Sepharose 4B 亲和柱对猪血纤维蛋白溶酶原进行分离纯化, 所得酶原在酸性及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中显示单一蛋白质区带, 在碱性条件下电泳及等电聚焦电泳表现出较明显的不均一性。还原及非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测得酶原分子量为 88 kD, 经尿激酶激活后, 进行还原 SDS-凝胶电泳, 出现两条新的蛋白质区带, 分子量分别为 63kD 和 26kD。酶原含中性糖 1.35%, N-末端为异亮氨酸。尿激酶激活后产生的血纤维蛋白溶酶以对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯为底物, 测得 K_m 为 4.2m mol/L, V_{max} 为 13.5 IU。6-氨基己酸对酶活性有双重影响。此外, 还观察了胰蛋白酶对猪血纤维蛋白溶酶原的激活。

关键词: 猪血纤维蛋白溶酶原, 猪血纤维蛋白溶酶, 纤维溶解作用

哺乳动物血浆中普遍存在血纤维蛋白溶解系统, 它对维持血流畅通起着重要作用, 并在许多生理及病理过程中发挥重要功能, 特别是对一些出血性疾病、血栓、血纤维蛋白溶酶原 (Pg) 缺乏症的研究及治疗都具有重要意义。Pg 是纤维溶解系统的主要成份, 它被多种激活剂转化为其活性形式——血纤维蛋白溶酶 (Pm)^[1], 该酶为一丝氨酸蛋白水解酶^[2], 生理底物为血纤维蛋白^[1], 对非生理底物具有类似于胰蛋白酶的专一性^[3]。

关于人、牛等一些动物的 Pg 研究, 国外已有大量报道^[4], 而猪 Pg 的分离纯化及性质研究尚无报道, 本文即报道对猪 Pg 的研究结果。

材料与 方法

一、材料

猪血采自成都肉联厂; 尿激酶 (UK) 为日本 Green Cross Corporation 产注射用冻干粉, 6000IU/瓶, L-赖氨酸 (L-Lys) 为成都制药四厂的产品经纯化后使用; 胰蛋白酶、对甲苯磺酰 L-精氨酸甲酯 (TAME) 及标准蛋白质为上海东风试剂厂产品; Sepharose 4B、Sephadex G-25 为 Pharmacia 产品; Ampholin (pH3.5—10) 为 LKB 产品; 十二烷基硫酸钠 (SDS) 为 Serva 产品; CNBr 为 E.Merk 产品; 二甲氨基萘磺酰氯 (DNS-Cl) 为浙江黄岩化工厂产品; 标准 DNS-氨基酸为 Sigma 产品; 其余试剂均为国产分析纯或化学纯级。

收稿日期: 1989-02-10, 修回日期: 1989-09-07

二、方法

1. 猪血浆制备 猪血:3.8% 柠檬酸钠 (9:1)于4°C、3000r/min 离心15min, 上清液置-20°C保存备用。

2. 亲和柱制备 用CNBr按文献^[5]活化 Sepharose 4B,参考 Deutsh-Mertz^[6]方法偶联 L-Lys。

3. Pg的纯化 100mL Lys-Sepharose 4B与300mL血浆于4°C搅拌5h后,用预冷至4°C的pH8.0,0.1mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)抽滤洗涤至O.D₂₈₀小于0.1,装柱,于10°C用pH8.0,0.3mol/L PBS继续洗涤至O.D₂₈₀小于0.02,将温度降至4°C,用pH8.0,0.1mol/L PBS平衡后,用0.015mol/L 6-氨基己酸(ϵ -ACA)、pH8.0,0.1mol/L PBS洗脱,于280nm处检测蛋白峰,收集有活性部分。再将所得活性部分,重新上亲和柱,采用0—0.015mol/L的 ϵ -ACA线性梯度洗脱,收集蛋白峰并检查活性。

4. 电泳 按文献^[7]方法进行,采用考马斯亮兰R-250或Schiff's试剂染色^[8]。

5. 氨基酸组成分析 采用6N的HCl水解蛋白质后用日立835型氨基酸自动分析仪测定;酚-硫酸法测中性糖含量^[9];DNS-法测末端^[10];在JASCO J-500c圆二色谱仪上测定圆二色谱;Lowry法测定蛋白质浓度^[11]。

6. Pg的激活 于pH8.0,0.05mol/L Tris-HCl缓冲液中,使Pg浓度为2mg/mL,UK浓度为1200IU/mL(或胰蛋白酶浓度10 μ g/ml),37°C保温。

7. Pm活性测定 参考Sodetz^[12],Brockway^[13]的方法,以TAME为底物,在pH8.0,0.05mol/L Tris-HCl缓冲液中37°C保温10min,并测定Pm对TAME的K_m、V_{max}。

结 果

一、Pg的纯化

以猪血为原料,在Lys-Sepharose 4B亲和柱上,用0.015mol/L ϵ -ACA解吸附得一个蛋白峰,经UK激活后检查具Pm活性(Fig.1)。活性部分再次上亲和柱,采用 ϵ -ACA线性梯度

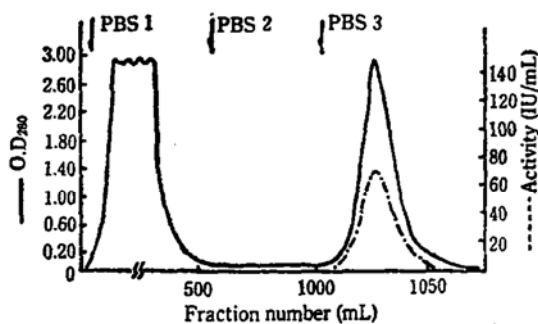


Fig. 1 Purification of porcine Pg by affinity chromatography on Lys-sepharose 4B
Column: 2.6×1.8cm, Flow rate, 50ml/h, 5ml/tube.

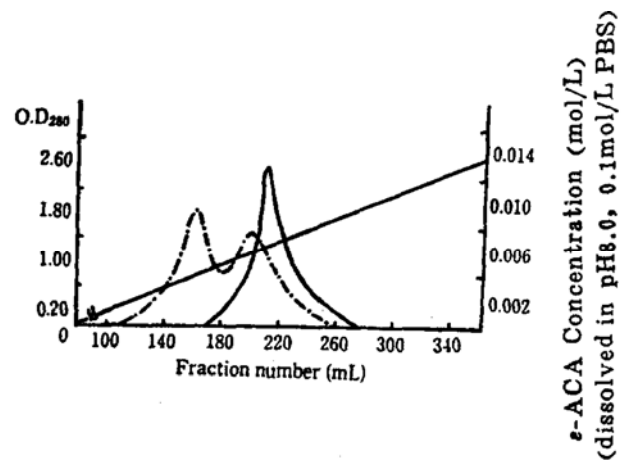


Fig. 2 Gradient elution of Pg on Lys-sepharose 4B --- Human Pg, — Porcine Pg.
Column: 2.6×1.8cm, Flow rate: 50ml/h, 5ml/tube.

洗脱仍得一个蛋白峰，而在相同条件下以人血浆为原料却获得二个蛋白峰(Fig.2)。所得样品在酸性及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)中均显示单一蛋白质区带，在碱性电泳中有4至5条相距甚近的蛋白带(Fig.3)，考马斯亮兰 R-250及 Schiff's 染色均呈阳性，证明样品为糖蛋白。

二、等电聚焦电泳

Pg 在等电聚焦电泳中显示出明显的不均一性(Fig.4)，其中有8条蛋白带含量较高，占总量的90%以上，等电点分布在 pH8.0—8.4 之间；此外有6条弱带，等电点分布 pH6.2~7.6之间。

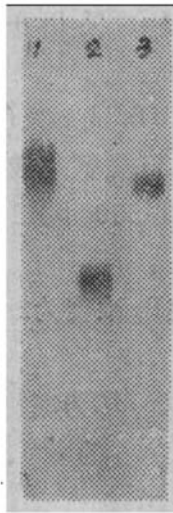


Fig. 3 Polyacrylamide electrophoreses of porcine Pg 2.5% stacking gel, 7.5% separation gel, 3.5mA/tube for 3.5h
(1) Basic PAGE (2) Acidic PAGE
(3) SDS-PAGE

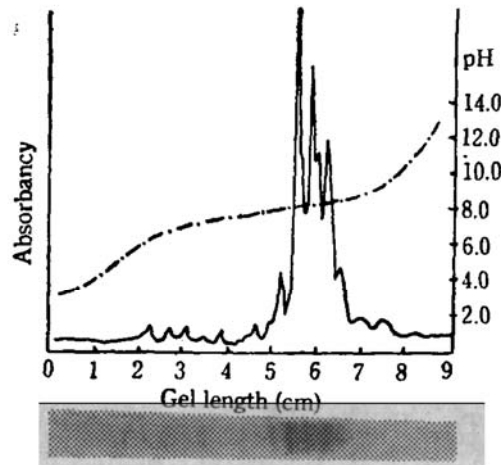


Fig. 4 Isoelectric focusing electrophoresis of porcine Pg 7.5% gel conc. and 2% Ampholin (pH3.5—10). Pg was focused Negative electrode, 1mol/L H_3PO_4 at 4°C 240V for 24 h. Positive electrode, 1mol/L NaOH The gel was scanned on a Densitometer Kemic. (Unicorder U-228)

三、Pg的激活

将不同保温时间的反应液分别取等量，经 β -巯基乙醇、SDS 处理后进行电泳。

UK 激活猪 Pg 的结果见 Fig.5。(由于未获得 UK 纯品，对观察电泳结果有干扰，故只能通过比较不同保温时间各区带量的变化来分析激活结果。)从扫描图谱可以看出，随着保温时间延长，Pg 带的扫描峰值逐渐降低，与此同时有二个蛋白质区带扫描峰值逐渐升高，可以认为这是 Pg 转化为 Pm 的结果，将新出现的两带分别定为 A、B 带，其它扫描峰值维持不变的区带为 UK 中的保护蛋白质组分。测定得 UK 激活后的 Pm 比活为 12.5 IU (TAME 为底物)。

胰蛋白酶限制性水解猪 Pg 结果见 Fig.6。作用后产生 4.2IU 的 Pm 比活。在 β -巯基乙醇存在下的 SDS-PAGE 表明，Pg 经降解后产生了二条较强的蛋白质区带(定为 a、b)以及一些很弱的区带。

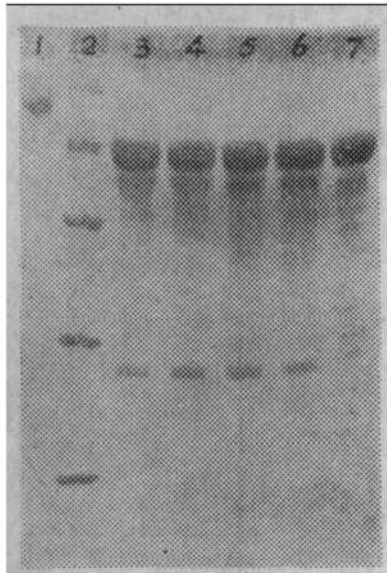


Fig. 5 Comparison of porcine Pg and its products activated by UK on slab SDS-PAGE 2.5% stacking gel, 12.5% separation gel, 30mA for 6h, The samples contain 1% SDS, 2.5% β -mercapto ethanol.

(1) Pg (2) Standard proteins (Mr, 14.4kD-94kD) (3)-(6) Activated products (all contain the same amount of initial Pg and UK conc.), activating temp. is 37°C, incubation time are 5' 10' 20' 30' respectively. (7) UK, incubated at 37°C for 30'. The gel was scanned on a Densitometer Kemic. (Unicorder U-228)

猪Pg及其激活产物的分子量测定结果见Fig.7。猪Pg的分子量为88kD,经UK激活后产生的二条带A为63kD, B为26kD。胰蛋白酶水解猪Pg产生的二个主要片段a为57kD, b为48kD。

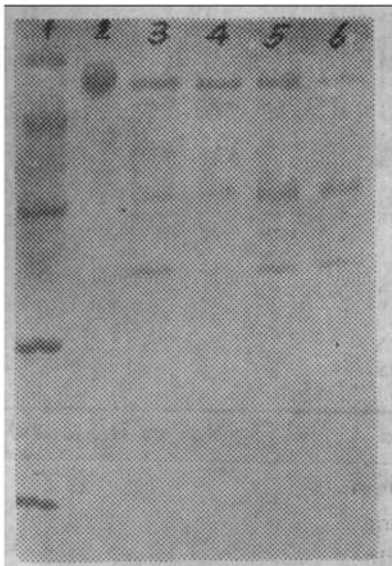


Fig. 6 Comparison of porcine Pg and its limited trypsin-digested products on slab SDS-PAGE

2.5% stacking gel, 12.5% separation gel, 30mA for 6 h. The samples contain 1% SDS, 2.5% β -mercapto ethanol.

(1) standard proteins (Mr, 14.4kD-94kD) (2) Pg (3)-(6) Hydrolysed products (all contain the same amount of initial conc. of Pg and 0.05 μ g trypsin) activating temp. in 37°C, incubation time are 5' 10' 20' 30' respectively.

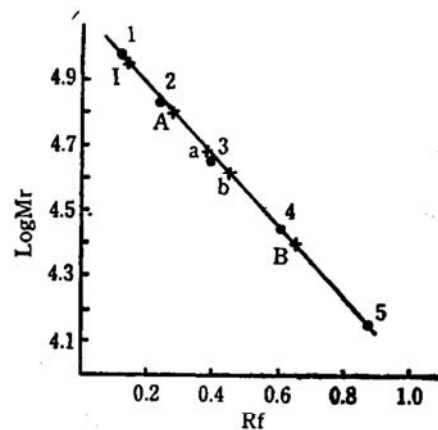
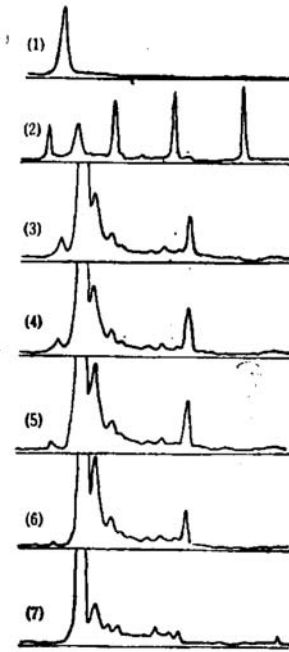


Fig. 7 Molecular weight determination of porcine Pg and its UK- and trypsin-digested products by SDS-PAGE

(1) Phosphorylase B (2) BSA (3) Ovalbumin (4) Carbonic Anhydrase (5) Lysozyme (I) Pg(A) and (B) Products of Pg activated by UK(a) and (b) The main products digested by trypsin,

四、动力学测定

以 TAME 为底物, 测定 UK 激活猪 Pg 产生 Pm 的动力学参数, 结果见 Fig. 8。测得 K_m 为 4.2 m mol/L , V_{\max} 为 13.5 IU 。

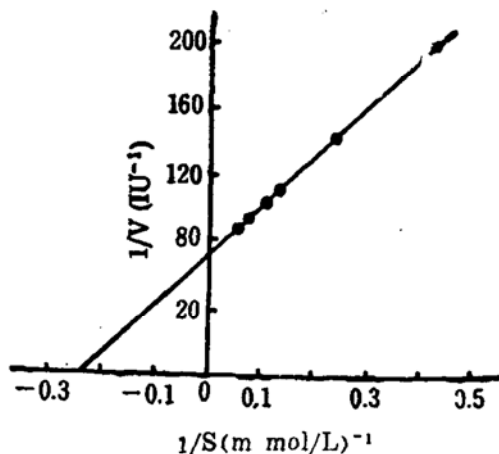


Fig. 8 Lineweaver-Burk plot of porcine plasmin-catalyzed hydrolysis of TAME
Pm is produced by activation of uk at 37°C in $\text{pH} 8.0$, 0.05 mol/L Tris-HCl buffer and the hydrolysis of TAME condition is the same.

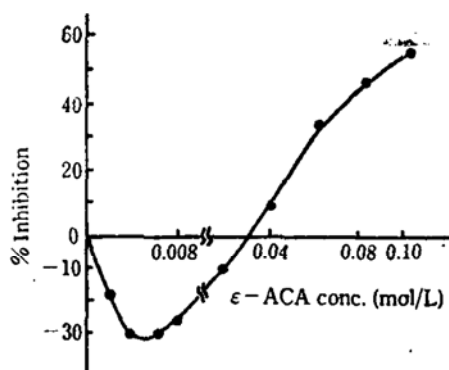


Fig. 9 The functions of ϵ -ACA to the activity of porcine Pm produced by UK

五、 ϵ -ACA酶活性的影响

在不同 ϵ -ACA 浓度下, 用 UK 激活猪 Pg 并以 TAME 为底物测定其比活作抑制率— ϵ -ACA 浓度曲线, 结果见 Fig. 9, 即当 ϵ -ACA 浓度低于 0.03 mol/L 时对酶活性具有促进作用, 高于此浓度则抑制酶活。

六、氨基酸的组成分析

结果见 Table 1。

Table 1 Amino acide composition of porcine Pg

Amino Acids	No. of Residues/Molecule*	Amino Acids	No. of Residues/Molecule**
Aspartic acids	59.16	Isoleucine	26.24
Threonine	43.90	Leucine	35.90
Serine	59.54	Tyrosine	21.32
Glutamic acids	84.14	Phenylalanine	22.10
Glycine	52.72	Lysine	47.25
Alanine	39.20	Ammonia	90.44
Cystine	7.10	Histidine	18.54
Valine	41.76	Arginine	40.28
Methionine	1.69	Proline	53.71

* The results were calculated on the basis of a molecular weight of 88 kD

** Trp is destroyed at acid hydrolysis and not determined

七、猪 Pg 的末端测定

DNS 法测得猪 Pg 的 N-末端为 Ile, 用标准的 DNS-Ile 与样品的 N-末端 DNS-氨基酸混合点样, 展层后仍得一个 ILe 斑点, 证明猪 Pg 的 N-末端为 ILe。

八、猪 Pg 的糖含量测定

酚-硫酸法测得猪 Pg 的中性糖含量为 1.35%。

九、圆二色谱分析

结果见 Fig. 10, 按文献^[14]进行近似计算得猪 Pg 含 80% 无规卷曲结构。

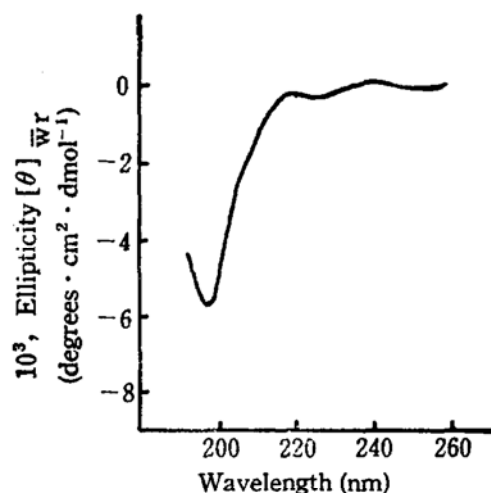


Fig. 10 Circular-dichroism spectrum in the far-ultraviolet region of porcine Pg. Pg is 1 mg/mL in pH 8.0, 0.1 mol/L PBS determined on JASCO J-500. w: residue weight.

讨 论

Brockway 和 Castellino^[15] 等用 Lys-Sepharose 4B 亲和层析纯化了人、牛、兔等许多动物的 Pg, 发现采用 ϵ -ACA 进行梯度洗脱时, 均得到二个洗脱峰, 称 Pg I 和 Pg II。我们按此条件纯化了猪 Pg 和人 Pg, 结果人 Pg 能分成二个峰, 与文献报道相同, 而猪 Pg 只能得到一个洗脱峰。而且, 在电泳行为上, 人等的 Pg I 和 Pg II 在 pH 8.9 电泳分别显示 4-5 条区带, pH 4.3 电泳分别为迁移率不同的蛋白质区带, 与本室纯化的猪 Pg 电泳结果 (Fig. 3) 比较, 似乎猪 Pg 只具有其中一种 Lys 亲和组分。

Summaria^[16]、Sodetz^[12] 等人早就发现, 人、兔、牛等的 Pg 具有不均一性, Pg I 和 Pg II 在等电聚焦电泳时分别显示出六种等电点形式。本室研究发现猪 Pg 也存在明显的不均一性, 但其表现与上述结果有所不同, 区带分为两组, 一组为主要组分 (占 90% 以上), 另一组为次要组分 (见 Fig. 4), 这可能是种属差异在 Pg 分子上的表现。

猪 Pg 的分子量为 88kD, 经 UK 激活后, 产生两条新链, 分子量分别为 63kD 和 26kD, 这与人 Pg 激活后产生二条链的 Pm, 重链分子量为 58kD~69kD, 轻链分子量为 23~26kD^[17, 18] 的结果是基本相似的。

DNS-法测得猪 Pg 的 N-末端为 ILe, 这与人、兔等的 N-Glu, 牛、猫等的 N-Asp 都不相同^[19], 说明 Pg 的 N-末端氨基酸因种属不同而存在明显差异。圆二色谱表明猪 Pg 与人 Pg 具有相似的构象^[20]。

以上结果说明猪 Pg 与其他哺乳动物的 Pg 在性质上有一定程度的相似性, 但还存在明显的差异。

用胰蛋白酶限制水解 Pg 后的产物, 能够表现出一定的 Pm 活力。电泳结果表明降解后产生了一些较小的片段 (Fig. 6), 希望通过进一步研究, 能够获得一种分子量较小, 同时又具有纤溶活性的片段, 这对理论研究及临床应用都具有一定的价值。

致谢: 本论文工作得到本室曾仲奎教授的热情帮助, 校园二色谱室、离心室的协作, 特表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Collen D. *Thromb Haemost*, 1979, 40:77.
- [2] Castellion F J. *Chemical Reviews* 1981, 81:431.
- [3] Wallen P et al. *Biochem Biophys Acta*, 1972, 258:577.
- [4] Castellino F J et al. *Methods in Enzymology*, Academic Press, N Y, 1981, 80:371.
- [5] March S C et al. *Anal Biochem*, 1974, 60:149.
- [6] Deutsch D Mertz Z T. *Science*, 1970, 170:1095.
- [7] B D哈密斯等, 蛋白质的凝胶电泳实践方法, 1986.
- [8] Zaehner R M. *Anal Biochem*, 1969, 30:148.
- [9] Dubois M. *Anal Chem*, 1956, 28:350.
- [10] 陈远聪等. 生物化学与生物物理进展, 1975, 1:38.
- [11] Lowry O H. *J Biol Chem*, 1951, 193:265.
- [12] Sodetz J M et al. *Biochemistry*, 1972, 11:4451.
- [13] Brockway W J et al. *J Biol Chem*, 1971, 246:4641.
- [14] Chen Y H et al. *Biochemistry*, 1972, 11:412.
- [15] Brockway W J et al. *Arch Biochem Biophys*, 1972, 151:194.
- [16] Summaria L et al. *J Biol Chem*, 1972, 247:4691.
- [17] Robbins K C et al. *J Biol Chem*, 1967, 242:2333.
- [18] Violand B W et al. *J Biol Chem*, 1976, 251:3906.
- [19] Summaria L. *J Biol Chem*, 1975, 250:3908.
- [20] Sjöholm I. *Eur J Biochem*, 1973, 39:471.

Purification and Characterization of Porcine Plasminogen

Liu, Rong-hua Fan, Kai-ming Zheng, Yuan-qi

(Biology Department, Sichuan University, Chengdu)

Abstract The porcine plasminogen (Pg) was purified by affinity chromatography on Lys-sepharose 4B column, and it is homogenous on acidic pH and SDS-PAGE, but it behaves obviously heterogeneous on basic PAGE and isoelective focusing electrophoreses. The molecular weight of porcine Pg determined by reduced and unreduced SDS-PAGE is 88 kD, After activation by urokinase (UK), porcine Pg yields two new bands, one is 63 kD, the other is 26 kD. The neutral saccharide content of porcine Pg is 1.35%. The porcine Plasmin activated by UK has a K_m of 4.2 mmol/L and a V_{max} of 13.5 IU in reaction with α -N-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) substrate. The activation of porcine Pg by trypsin was also noticed.

Key words: Porcine plasminogen, Porcine plasmin, Fibrinolysis