

Separation and Selective Immobilization of *Candida rugosa* Lipase Isoenzymes. XIN Jia Ying, XU Yi, LI Shu Ben, WANG Lai Lai (State Key Laboratory for Oxo Synthesis and Selective Oxidation, Lanzhou Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China).

Abstract By “interfacial affinity chromatography” on GDX101 column, commercial *Candida rugosa* lipase (CRL) is fractionated into four fractions containing three isoenzymes (CRL-1, CRL-2 and CRL-3). They have different enantioselectivity for the asymmetric hydrolysis of (R, S)-Naproxen methyl ester in the aqueous-organic solvent biphasic system. As analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing and organic solvent treatment, slight structural difference among these isoenzymes has been found. CRL-1 and CRL-2 are associated noncovalently with low molecular mass

acidic components in different degree, CRL-3 is disassociated with the low molecular mass acidic components. Because of the perhaps hamper of the low molecular mass acidic components, the open extent of hydrophobic pocket around active site on CRL-3 is bigger than on CRL-1 and CRL-2. According to the slight structural difference, isoenzymes with different enantioselectivity for hydrolysis of Naproxen ester have been immobilized selectively on different hydrophobic supports (GDX101 and YWG-NH₂). Via a sample and easily performed selectivity adsorption step, the purification can be combined with the immobilization. This new method seems to be very suitable for an easily separation of such isoenzymes with slightly different structure.

Key words CRL isoenzymes, separation, interfacial affinity chromatography, selectivity immobilization

尖吻蝮蛇毒抗凝血因子II与活化凝血因子X的结合性质

徐小龙 刘清亮¹⁾ 吴双顶

(中国科学技术大学化学系, 合肥 230026)

摘要 皖南尖吻蝮蛇毒抗凝血因子II (ACF II) 与活化凝血因子X (FXa) 在钙离子作用下形成了1:1的复合物, 从而延长凝血时间. 这个复合反应是依赖于钙离子的, ACF II在没有钙离子存在条件下不能与FXa形成复合物. ACF II是凝血因子IX或凝血因子X结合蛋白家族中一个新发现的成员, 其相对分子质量为29 468.1. ACF II分子中含有251个氨基酸残基, 其氨基酸组成与这一家族中其他成员十分相似. ACF II在抗凝血反应中存一临界浓度(12 nmol/L), 只有在高于其临界浓度时, 才表现出显著的抗凝血活性.

关键词 结合蛋白, 抗凝血因子, 活化凝血因子X, 钙离子

学科分类号 Q51

蛇毒对凝血系统有广泛的影响, 有的促进血液凝固, 有的则有抗凝作用. 深入研究这一类物质对于进一步认识凝血机理以及开发新的抗栓药物具有重要意义. 路阳等^[1]从皖南尖吻蝮 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒中分离出一种抗凝血因子 ACF (anticoagulant factor). 本实验室对 ACF 的结构和性质已作过一些报道^[2-4]. 最近我们不仅用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法发现 ACF 与活化凝血因子 X (FXa) 在钙离子作用下形成 1:1 的复合物, 从而延长凝血时间; 而且通过对分离纯化方法的改进从

皖南尖吻蝮蛇毒中分离纯化出一个新的抗凝血因子 ACF II (anticoagulation factor II). 因而将前者重新命名为抗凝血因子 I (ACF I). ACF I 和 ACF II 都具有显著的抗凝血活性, 都没有出血活性和毒性, 是一种潜在的高效蛇毒抗栓药物.

本文对 ACF II 的抗凝血机理进行了研究, 发现 ACF II 与 FXa 在钙离子作用下也形成了 1:1 的

¹⁾ 通讯联系人.

Tel: (0551) 3603214, E-mail: qliu@ustc.edu.cn

收稿日期: 1999-08-23, 修回日期: 1999-12-24

复合物. 并测定了 ACF II 的准确相对分子质量和氨基酸组成, 以便与凝血因子 IX 或凝血因子 X 结合蛋白质家族中其他成员进行比较.

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

尖吻蝮蛇毒冻干粉购于安徽屯溪蛇伤研究所, 丙烯酰胺为 Sigma 公司产品, 甲叉双丙烯酰胺、 β -巯基乙醇和考马斯亮蓝 R-250 为 Fluka 公司产品, 兔脑凝血活酶为天津血液研究所产品, 低分子质量标准蛋白为中国科学院上海生物化学研究所东风试剂公司产品, F X a 为中国科学院生态环境中心赵超先生惠赠, 其他试剂均为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 ACF II 的分离纯化: 采用 DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-75 和 CM-Sephadex C-50 三步层析方法.

1.2.2 ACF II 与 F X a 之间结合分析: 采用聚丙烯酰胺不连续平板电泳 (PAGE) 方法. 分离胶: $C = 2.5\%$, $T = 7.5\%$; 浓缩胶: $C = 2.5\%$, $T = 2.5\%$; 电极缓冲液: Tris-甘氨酸 (pH 8.3). 为了保证在整个电泳过程中存在一定浓度的钙离子, 在样品液、电极缓冲液、分离胶和浓缩胶中均添加 1 mmol/L 钙离子.

1.2.3 抗凝血活性测定: 参考 Cheng 等^[5] 方法并加以改进, 测定血浆凝血酶原时间 (PPT). 将 0.8 ml 生理盐水、 0.1 ml 兔血浆、 0.1 ml 蛇毒组分和 0.1 ml 兔脑凝血活酶溶液 (25 g/L) 混合后, 37°C 温浴 1 min , 再加入 0.025 mol/L CaCl_2 0.1 ml , 立即测定凝固时间, 反应在 37°C 水浴中进行, 以生理盐水对照.

1.2.4 ACF II 相对分子质量测定: 用 LDI1700-MALDI-TOF-MS (Linear Scientific Inc., USA) 仪器测定, 样品以双蒸水溶解, 以 Sa 为基质, 质谱信号累加 30 次.

1.2.5 ACF II 氨基酸组分分析: 样品用恒沸 HCl 在 110°C 水解 24 h 后, 用 Waters 600 E HPLC (Waters, USA) 分析氨基酸组分. 样品先用过甲酸氧化后, 再用恒沸 HCl 水解测定半胱氨酸含量; 色氨酸含量采用 Spande^[6] 的 NBS 修饰法测定.

1.2.6 ACF II 和 F X a 浓度测定: 用 280 nm 紫外吸收方法测定: $A_{280}^{1\%}(\text{ACF II}) = 30$, $M_r(\text{ACF II})$ 由上述相对分子质量测定的结果给出; $A_{280}^{1\%}(\text{F X a}) = 10$, $M_r(\text{F X a}) = 45\,300$.

2 结果与讨论

2.1 PAGE 分析 ACF II 与 F X a 的结合反应

我们用聚丙烯酰胺不连续平板电泳方法分析 ACF II 与 F X a 之间结合反应. 结果表明 (图 1), ACF II 和 F X a 混合后在未添加钙离子情况下在 PAGE 图谱上呈现二条带 (图 1a-2), 分别对应 ACF II 和 F X a 的区带 (图 1a-1, 3), 表明 ACF II 与 F X a 在此条件下不发生复合反应. 在 1 mmol/L Ca^{2+} 的条件下, ACF II 和 F X a (摩尔比为 1:1) 混合物, 在 PAGE 图谱上呈现一条带 (图 1b-4), 虽然它与 F X a 区带 (图 1b-3) 处于大致相同的位置, 但没有呈现对应于 ACF II 的区带. ACF II 和 F X a (摩尔比为 2:1) 混合物, 在 PAGE 图谱上呈现二条带 (图 1b-2), 分别对应 ACF II 和 ACF II 与 F X a 混合物的区带 (图 1b-1, 4). 由此可见, ACF II 与 F X a 在 1 mmol/L Ca^{2+} 的条件下形成了 1:1 的复合物.

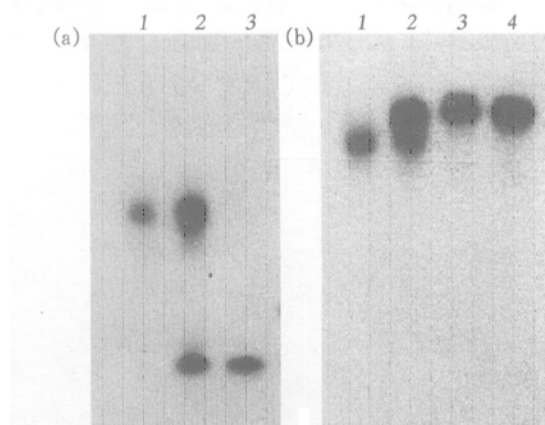


图 1 聚丙烯酰胺凝胶不连续平板电泳图谱

(a) 电泳体系不含 Ca^{2+} : 1: $10 \mu\text{M}$ ACF II; 2: $10 \mu\text{M}$ ACF II + $10 \mu\text{M}$ F X a; 3: $10 \mu\text{M}$ F X a. (b) 电泳体系中含 1 mmol/L Ca^{2+} : 1: $10 \mu\text{M}$ ACF II; 2: $20 \mu\text{M}$ ACF II + $10 \mu\text{M}$ F X a; 3: $10 \mu\text{M}$ F X a; 4: $10 \mu\text{M}$ ACF II + $10 \mu\text{M}$ F X a. ACF II 和 F X a 的浓度均为 $30 \mu\text{mol/L}$.

2.2 PPT 试验分析 ACF II 与 F X a 结合反应

为了进一步验证上述结果, 我们测定了血浆凝血酶原时间 (PPT) 与 ACF II 浓度的依赖关系, 结果见图 2. 从曲线 1 看出, 血浆凝血酶原时间 (PPT) 与 ACF II 浓度的关系中存在一临界浓度 (12 nmol/L). 当 ACF II 浓度低于临界浓度时, PPT 保持不变; 当其高于 12 nmol/L 后, 对应的 PPT 呈指数上升. 据报道血浆中凝血因子 X 的含

量约为 6~8 mg/L 时^[7], 当它全部被激活后, 则反应液中 F X a 浓度约为 9~12 nmol/L, 此值与 ACF II 的临界浓度十分接近. 如果 ACF II 与 F X a 形成 1:1 的复合物, 则当 ACF II 低于临界浓度时, 血浆中只有部分 F X a 与 ACF II 结合, 剩下的 F X a 仍然可以与其他凝血因子激活凝血酶原, 使纤维蛋白原凝结, 因此 PPT 不受 ACF II 影响. 由于反应液中 F X a 的含量与 ACF II 的临界浓度接近相等, 当 ACF II 高于临界浓度时, 如果 ACF II 与 F X a 形成 1:1 的复合物, 则绝大部分 F X a 与 ACF II 结合, 剩下的 F X a 量极少, 影响其激活凝血酶原速度, 使之成为限速步骤, 因而, 随着 ACF II 浓度增大 PPT 呈指数增加. 图 2 中曲线 2 为在反应液中添加 5 nmol/L F X a 后 PPT 与 ACF II 浓度的关系曲线, 发现它与曲线 1 形状相似, 但向右位移了 5.8 nmol/L. 相应地 ACF II 的临界浓度也增加了 5.8 nmol/L, 此值与添加的 F X a 浓度相当. 在反应液中添加 5 nmol/L F X a 后, 要使绝大部分 F X a 与 ACF II 形成复合物, 必须增加等量的 ACF II, 因此 ACF II 的临界浓度相应地增大了 5.8 nmol/L. 这进一步证实了 ACF II 与 F X a 形成 1:1 的复合物.

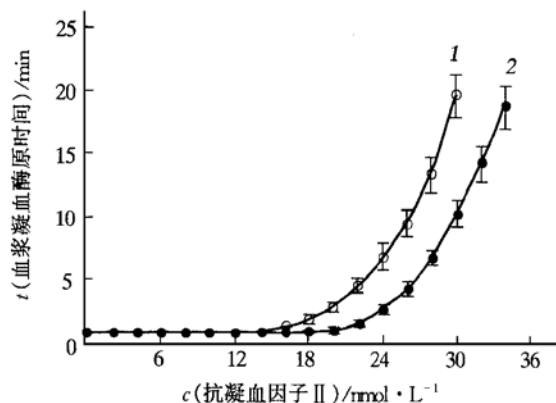


图 2 血浆凝血酶原时间与 ACF II 浓度关系及 F X a 对 ACF II 的抗凝血活性影响

1: 未加 F X a; 2: 添加 5 nmol/L F X a.

2.3 ACF II 相对分子质量的测定

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 具有高分辨、高灵敏度、快速、准确的优点, 其测定的结果见图 3. 图 3 中峰 3 为 ACF II 的质子化分子离子峰即 $[M+H]^+$, 表明 ACF II 的相对分子质量为 29 468.1. $m/z = 7 370.1$ 、 $m/z = 14 743.9$ 、 $m/z = 44 212.8$ 、 $m/z = 58 946.7$ 和 $m/z = 88 486.5$ 的质谱峰分别

是 ACF II 的四电荷质谱峰 $[M+4H]^{4+}$ 、双电荷质谱峰 $[M+2H]^{2+}$ 、三聚体双电荷质谱峰 $[3M+2H]^{2+}$ 、二聚体单电荷质谱峰 $[2M+H]^+$ 和三聚体单电荷质谱峰 $[3M+H]^+$.

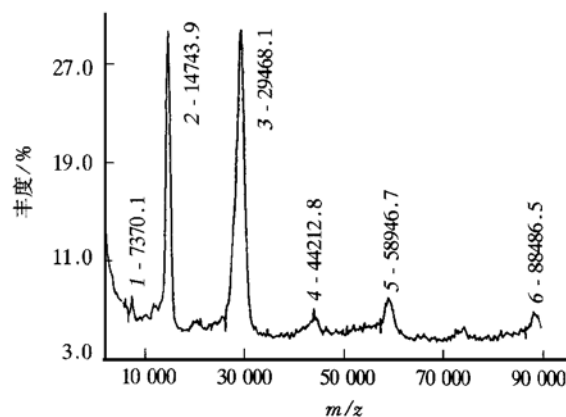


图 3 ACF II 的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱
基质: 芥子酸; 激光器: N₂; 激光能量: (0.85 ± 0.31) μ J;
吸引电压: 9.3 kV; 排斥电压: 30.0 kV.

2.4 ACF II 氨基酸组分分析

氨基酸组成分析结果见表 1, ACF II 由 251 个氨基酸残基组成, 其中谷氨酸 (含谷氨酰胺)、天冬氨酸 (含天冬酰胺)、丝氨酸和苯丙氨酸含量较多, 占总含量的 39.0%. 另外色氨酸含量高, 因而 ACF II 在 280 nm 处有很强的紫外吸收系数 ($A_{280}^{1\%} = 30$).

Atoda 等^[8]从日本黄绿烙铁头蛇毒中纯化出一种抗凝血蛋白. 这种抗凝血蛋白通过与凝血因子 IX (F IX) 或凝血因子 X (F X) 在钙离子的作用下形成 1:1 的复合物而延长凝血时间, 因此被称为凝血因子 IX 或凝血因子 X 结合蛋白 habu IX/ X-bp (coagulation factor IX/factor X-binding protein). 随后人们分别从黄绿烙铁头蛇毒、美洲矛头蝮蛇毒和锯鳞蝰蛇毒中分离出具有类似性质的蛋白质 IX-bp^[10]、jararaca IX/ X-bp^[11] 和 ECLV IX/ X-bp^[9]. 这些蛋白质属于 C 型凝集素超家族中一个独特的亚家族^[12]. 除 IX-bp 只与 F IX 或 F IXa 结合外, 另二者都分别可以与 F IX、F IXa、F X 或 F Xa 结合. 所有这些结合反应都是依赖于钙离子的. ACF II 在钙离子作用下也可以与 F X a 发生结合反应, 所以它与 ACF I 一样都是这一家族的成员.

ACF II 的氨基酸组成与 habu IX/ X-bp, ECLV IX/ X-bp 和 IX-bp 的氨基酸组成都很相似 (表 1), 它们都含有较多的谷氨酸、天冬氨酸、丝

氨酸和色氨酸. Habu IX/ X-bp 和 ECLV IX/ X-bp 分子中都含有 14 个半胱氨酸, 因此它们具有相同的七对二硫键结构^[9]. ACF II 也含有 14 个半胱氨酸, 是否也有相同的二硫键结构; ACF II 是否可以与 F X、F IX 或 F IXa 结合; 钙离子在结合反应中,

是通过诱导作用改变蛋白质构象, 起着“钥匙与锁”的作用, 还是在 ACF II 和 F X a 之间起着“桥”的连接作用. 对这些问题进一步研究, 将有助于阐明蛇毒蛋白抗凝机理和蛋白质的结构与功能关系.

表 1 ACF II 的氨基酸组成

氨基酸	ACF II	habu IX/ X-bp ^[8]	ECLV IX/ X-bp ^[9]	IX-bp ^[10]
天冬氨酸 ¹⁾	20.3 (20)	23	18	22
丝氨酸	25.3 (25)	25	27	26
谷氨酸 ²⁾	30.1 (30)	37	35	37
甘氨酸	14.2 (14)	14	18	16
组氨酸	8.4 (8)	6	7	6
精氨酸	6.8 (7)	8	6	7
苏氨酸	12.3 (12)	8	12	9
丙氨酸	17.1 (17)	20	12	19
脯氨酸	4.3 (4)	4	6	6
半胱氨酸	14.1 (14) ³⁾	14	14	14
酪氨酸	14.4 (14)	11	9	11
缬氨酸	10.7 (11)	15	13	14
蛋氨酸	2.4 (2)	5	1	4
赖氨酸	17.9 (18)	16	29	16
异亮氨酸	9.4 (9)	6	6	6
亮氨酸	9.3 (9)	11	13	10
苯丙氨酸	23.2 (23)	15	13	15
色氨酸	14 ⁴⁾	14	17	14
合计	251	252	256	252

¹⁾ 包括天冬酰胺; ²⁾ 包括谷氨酰胺; ³⁾ 样品经过过甲酸氧化后测得; ⁴⁾ 由 Spande^[6] 方法测得.

参 考 文 献

- 1 Lu Y, Huang W Z, Wang C, *et al.* Purification and double chain structure of anticoagulant factor from five pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom. In: Pirkle H, Markland F S Jr, eds. Hemostasis and Animal Venoms. New York: Marcel Dekker Inc, 1987. 349 ~ 360
- 2 刘清亮, 徐晓龙, 王 淳, 等. 稀土及过渡金属离子对蛇毒内抗凝血因子荧光光谱的影响. 中国稀土学报, 1992, **10** (2): 106~ 109
Liu Q L, Xu X L, Wang C, *et al.* J Chin Rare Earth Soci, 1992, **10** (2): 106~ 109
- 3 刘清亮, 徐晓龙, 王 淳. 皖南尖吻蝮蛇 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒内抗凝血因子 (ACF) 的拉曼光谱研究. 生物化学与生物物理学报, 1993, **25** (3): 281~ 286
Liu Q L, Xu X L, Wang C. Acta Biochim Biophys Sin, 1993, **25** (3): 281~ 286
- 4 刘清亮, 徐晓龙, 余华明, 等. 尖吻蝮蛇毒抗凝血因子 (ACF) 含量和钙离子含量的定量测定及钙离子结合位点的研究. 无机化学学报, 1993, **9** (1): 71~ 76
Liu Q L, Xu X L, Yu H M, *et al.* J Inorg Chem, 1993, **9** (1): 71~ 76
- 5 Cheng H C, Ouyang C. Isolation of coagulant and anticoagulant principles from the venom of *Agkistrodon acutus*. Toxicon, 1967, **4** (4): 235~ 243
- 6 Spande T F, Witkop B. Determination of the tryptophan content of protein with N-Bromosuccinimide. In: Hirs C H W ed. Methods Enzymol, 11. New York and London: Academic press, 1967. 498~ 506
- 7 覃公平主编. 中国蛇毒学. 南宁: 广西科学技术出版社, 1995. 648
Tan G P. Chinese Viper. Nanning: Guangxi Science & Technology Publishing House, 1995. 648
- 8 Atoda H, Morita T. A novel blood coagulation factor IX/ factor X-binding protein with anticoagulant activity from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake): isolation and characterization. J Biochem, 1989, **106** (5): 808~ 813
- 9 Chen Y L, Tsai I H. Function and sequence characterization of coagulation factor IX/ factor X-binding protein from the venom of *Echis carinatus leucogaster*. Biochemistry, 1996, **35** (16): 5264 ~ 5271
- 10 Atoda H, Ishikawa M, Yoshihara E, *et al.* Blood coagulation factor IX-biding protein from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*: purification and characterization. J Biochem, 1995, **118** (5): 965~ 973

- 11 Sekiya F, Atoda H, Morita T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, 1993, **32** (27): 6892~ 6897
- 12 Sekiya F, Yamashita T, Morita T. Role of calcium (Ca^{2+}) ions in the recognition of coagulation factor IX and X by IX/X-bp, an anticoagulant from snake venom. *Biochemistry*, 1995, **34** (31): 10043~ 10047

The Binding of the Anticoagulation Factor II from the Venom of *Agkistrodon acutus* with Activated Factor X. XU Xiao-Long, LIU Qing-Liang, WU Shuang-Ding (Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China).

Abstract Anticoagulation factor II (ACF II) from the venom of *Agkistrodon acutus* forms a 1:1 complex with activated coagulation factor X (F Xa)

in the presence of Ca^{2+} ions. The result that ACF II fails to form a complex with F Xa in the absence of Ca^{2+} ions indicates that the binding is in the Ca^{2+} -dependent manner. ACF II is a new member of the IX/X-bp family, and has a similar amino acid composition to the other members of this family. It is composed of 251 amino acid residues with a relative molecular mass of 29 468.1, determined by MALDI-TOF-MS. ACF II prolongs plasma prothrombin time (PPT) in the dose-dependent fashion and exhibits marked anticoagulant activity only at the concentration higher than the critical concentration (12 nmol/L) of ACF II.

Key words binding protein, anticoagulation factor, activated coagulation factor X, calcium ion

蛋白凝胶基质的制备与基质内的血管生成反应*

李福洋 药立波 杨静华

(第四军医大学生物化学与分子生物学教研室, 西安 710032)

摘要 利用肝素亲和层析从血清中提取玻璃粘连蛋白 (vitronectin), 以硫酸铵沉淀法从血浆中粗提含纤维蛋白原的复合蛋白质组分, 向血浆蛋白、胎牛血清和 DMEM 组成的复合成分中加入凝血酶, 制成蛋白质凝胶。观察血管内皮细胞在此基质上或在基质中的生长及在碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 的诱导下形成的血管样结构。结果表明血管内皮细胞可粘附在此凝胶基质表面正常生长, 在 bFGF 的诱导下, 内皮细胞向胶内迁移、生长并形成管状结构, 多个管状结构连接、融合形成毛细血管网状结构。

关键词 血管生成, 细胞外基质, 凝胶基质

学科分类号 Q71

血管生成, 即从原有毛细血管或毛细血管后血管生长出新血管的过程, 这个过程主要包括内皮细胞的活化、血管基底层降解、内皮细胞的沿细胞外基质迁移和增殖、相连并分化形成管状结构, 然后血管外基质层的形成以及基质细胞的聚集包裹等形成成熟的血管^[1]。在血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导的血管生成过程中, 渗漏到血管外的血浆蛋白通过纤维蛋白原的聚合形成胶状细胞外基质, 可作为内皮细胞迁移和形成血管的结构支架^[2, 3]。本研究从血浆中粗提含纤维蛋白原的复合蛋白质组分并在体外进行蛋白质聚合过程制备蛋白质凝胶, 并尝试以此凝胶模拟细胞外基质的作用, 观察血管内皮细胞在此基质中的血管生成。

1 材料和方法

1.1 材料

人血浆由第四军医大学西京医院血库提供, 牛血浆由西安高新技术开发区奶业所提供。凝血酶、胶原酶为 Sigma 公司产品, 胎牛血清、DMEM 培养基及碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 为 Gibicol 公司产品, 肝素-Sepharose 4B 为 Pharmacia 公司产品; 24 孔培养板为美国 Nunc 公司产品。

BT325 细胞株由北京神经外科研究所惠赠。

* 国家杰出青年自然科学基金资助课题 (39825113, 39625023)。

Tel: (029) 3374513, E-mail: Bioyao@fmmu.edu.cn

收稿日期: 1999-08-23, 修回日期: 2000-01-06