

技术与方法

尿激酶前体的纯化及其性质的研究

史 伟 张彩英 黄桂秋 王振义

(上海第二医科大学病理生理教研室, 上海 200025)

(上海血液学研究所)

提 要

尿激酶前体是与尿激酶具有共同抗原性的一种新的纤溶酶原激活物。我们从人胎肾细胞条件培养液中提纯该物质。首先用抗 UKIgG-Sepharose 亲和层析得到尿激酶抗原相关蛋白, 然后利用苯甲脒-Sepharose 柱去除尿激酶获纯化的尿激酶前体。纯化倍数达 930 倍, 得率为 18%, 所得尿激酶前体为单肽链结构蛋白质, 分子量 55kD, 比活 (11389IU/mg) 低于尿激酶, 二异丙基氟磷酸酯 (DFP) 不能抑制其活性。体外¹²⁵I-血凝块溶解试验表明尿激酶前体可特异地诱导血凝块溶解, 对血浆纤溶系统无明显激活作用, 血凝块溶解的时间曲线呈特征性“S”型。所得尿激酶前体是一种新的有别于尿激酶的纤溶酶原激活物。

关键词 尿激酶前体, 尿激酶, 纤溶酶原激活物

近年对人体血液中纤溶系统的研究发现, 体内存在着两类主要的纤溶酶原激活物: 尿激酶前体 (pro-urokinase: pro-UK) 和组织纤溶酶原激活物 (tissue-type plasminogen activator: tPA)。其中 pro-UK 最早由 Bernik (1973 年) 发现^[1], Husain 1979 年首次从人尿中将其提纯^[2], 以后其他一些实验室也分别从人胎肾细胞培养液^[3]、部分肿瘤细胞培养液^[4]、和人血浆中^[4]纯化得到 pro-UK, 最近已有报道用基因工程技术进行生产^[6]。研究表明 pro-UK 是由 411 个氨基酸组成的单链糖蛋白, 与 UK 的氨基酸组成相接近, 纤溶酶、激肽释放酶可使其水解转变成双链的 UK^[7], 并且 pro-UK 与 UK 具有共同抗原性, 在体内可能具有多种生理作用和意义^[8]。Collen 在研究中还发现 pro-UK 对纤溶酶原的直接激活效率近似于 UK, 故又建议称其为单链尿激酶型纤溶酶原激活物 (single-chain urokinase-type plasminogen activator:

scuPA)^[9]。本研究从人胎肾细胞无血清条件培养液中提纯 pro-UK, 并对其性质作初步的探讨。

材 料 和 方 法

一、材料 培养液 IMDM、抑肽酶、胰酶和 CNBr 活化的 Sepharose 4B (Sigma 公司); 蛋白 A-Sepharose 4B-CL 和苯甲脒-Sepharose 6B (Pharmacia 公司, 瑞典); 兔抗人 UK 抗血清 (由中国军事医科院惠赠); 新鲜人胎肾 (由上海第二医科大学附属仁济医院和上海第一妇幼保健院提供); 其他: 二硫苏糖醇 (DTT, Serva 公司); 二异丙基氟磷酸酯 (DFP, Carl Roth); Na¹²⁵I (中科院原子能研究所); Iodogen (申美生物制品公司) 及 UK (上海生化制药厂)。

二、胎肾细胞条件培养液的收集 将新鲜胎肾组织经 0.25% 胰酶消化处理后制成细胞悬液, 接种于培养瓶内, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱

内培养。7—10天后细胞生长呈融合状态,用Hank氏液轻洗细胞除去残留的小牛血清,再加入无血清条件培养液(含抑肽酶10KIU/ml),24h后收集培养液,连续7—9次,每次收集的条件培养液以4000r/min,4℃下离心15min除去其中的细胞碎片,并加入Triton X-100使其终浓度为0.5%,—30℃下贮存。

三、抗UK IgG-Sepharose 4B亲和层析柱的制备 将5ml兔抗人UK抗血清(滴度1:32)经蛋白A亲和层析柱纯化得抗UKIgG,取25mg IgG与7ml CNBr活化的Sepharose 4B凝胶交联^[10]得抗UKIgG-Sepharose 4B亲和凝胶柱。

四、pro-UK的纯化 纯化流程的原理是(1)利用pro-UK与UK具有共同抗原性的特点,用抗UK IgG-Sepharose亲和层析柱从人胎肾细胞条件培养液中提取UK抗原相关蛋白(主要含pro-UK,也有少量UK)。(2)由于UK可特异地与苯甲脒结合而pro-UK缺乏这一特性,故将UK抗原相关蛋白经苯甲脒-Sepharose 6B亲和层析柱去除UK获得纯的pro-UK。

具体步骤如下:(1)样品及层析柱的准备:在1000ml条件培养液中加入NaCl 11.688g,并用1mol/L HCl调节pH至7.2。另外用0.1mmol/L磷酸缓冲液(含0.4mmol/L NaCl),pH 7.2(缓冲液A)30ml平衡抗UKIgG-Sepharose 4B柱(1.4×4.2cm),再用0.1mmol/L磷酸缓冲液(含0.4mmol/L NaCl,0.5% Triton X-100,抑肽酶10KIU/ml),pH7.2(缓冲液B)平衡柱体。(2)上样:将条件培养液以36ml/h的速度上样,然后用30ml缓冲液B清洗柱床,去除未结合的杂蛋白,再用60ml缓冲液A过柱使流出液OD₂₈₀<0.02,(3)UK抗原相关蛋白的洗脱:用0.1mol/L甘氨酸-盐酸缓冲液、pH 2.5以10ml/h速度洗脱特异性结合在柱体上的蛋白,分管收集(2ml/管),并迅速用1mol/L Tris中和洗脱液使pH达7.0左右。(4)合并纤溶活性峰的各管洗脱液(含UK抗原相关蛋白),在缓冲液A中,4℃透析过夜,再经苯甲脒

Sepharose 6B柱(0.8×4cm),收集未被该柱体结合的穿过蛋白峰部分,即为pro-UK,另外用0.1mol/L甘氨酸-盐酸缓冲液、pH2.5洗脱柱体结合的蛋白,此为双链UK部分。

五、pro-UK和UK诱导血凝块溶解的特性比较 以¹²⁵I-血凝块及周围血浆组成的凝块溶解系统为模型,测定纤溶激活剂诱导凝块溶解所释出的¹²⁵I量,求得血凝块溶解百分比,观察其动态变化。与此同时检测血浆中纤维蛋白原的量以观察pro-UK及UK对血浆中纤溶系统被激活的程度(详见另文报道)^[11]。

六、纤溶活性的分析及阻断试验 纤维蛋白溶解活性采用纤维蛋白平板法测定,以商品UK的国际单位作为参考标准。纤溶活性阻断试验:①将一定量的pro-UK分别与抗UK IgG或抗tPA IgG混合,在4℃下放置2h后测活性(上述两类IgG均由本室制备)。②将0.2mmol/L DFP分别与pro-UK或UK混合4℃下24h后测活性。

七、其他:SDS-PAGE 根据Laemmli方法^[12],用12%分离胶和4%浓缩胶的平板电泳,样品还原处理用0.05mol/L DTT。等电聚焦电泳(IEF)的pH梯度为5—10范围^[13]。蛋白质含量测定用考马氏亮蓝法^[14]。

结 果

一、pro-UK的纯化 抗UKIgG-Sepharose免疫亲和柱的洗脱曲线表明洗脱的OD₂₈₀

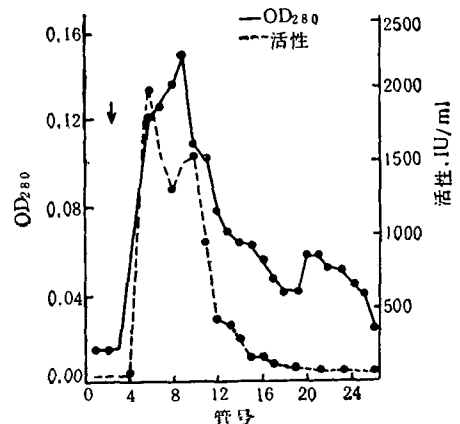


图1 抗UK-IgG-Sepharose 4B亲和层析

表 1 胎肾细胞培养液中 pro-UK 的纯化

	体积 (ml)	总活性 (IU)	总蛋白 (mg)	比活性 (IU/mg)	得率(%)	纯化倍数
胎肾细胞条件培养液	3100	44390	1386	32		
UK 抗原相关蛋白	18	23580	1.152	20469	53	640
pro-UK	15.5	8029	0.705	11389	18	930
UK	10	12950	0.300	43169	29	

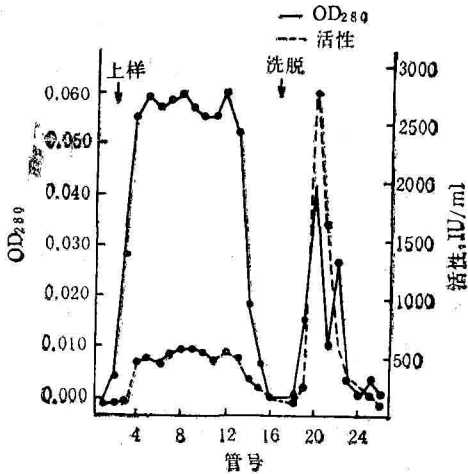


图 2 Benzamidine-Sepharose 6B 亲和层析

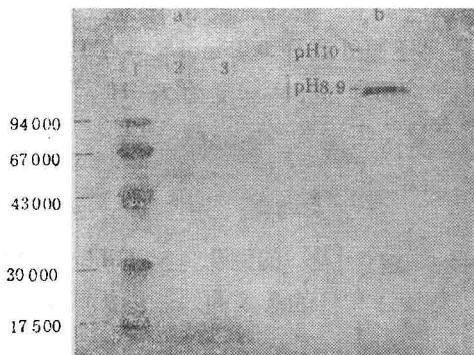


图 3 尿激酶前体的 SDS-PAGE 及等电聚焦电泳

- (a) SDS-PAGE 1.分子量标准
2.样品(非还原)
3.样品(还原)
(b) 等电聚焦电泳 (pH5-10)

峰值与纤溶活性峰相一致(图 1), 主要分布在 4—14 管, 合并这一部分 UK 抗原相关蛋白洗脱液, 用苯甲脒柱分离 pro-UK 和 UK (图 2), 可见穿过活性峰 (pro-UK) 明显低于洗脱活性峰 (UK)。有关纯化结果的各项指标见表 1。

二、pro-UK 的性质 提纯的 pro-UK 在

还原或非还原条件下, SDS-PAGE 均显示为一条区带, 位置相近, 分子量为 55kD (图 3a)。IEF 表明提纯物为一条带, 其 pI 为 8.9 (图 3B)。此外, 抗 UK IgG 可阻断 pro-UK 的活性(图 4)。0.2mmol/L DFP 虽可抑制 UK 活性但对 pro-UK 无抑制作用(图 5)。

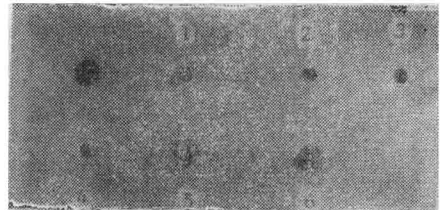


图 4 尿激酶前体纤溶活性的免疫阻断

1. 抗 UK IgG(4μg) + 尿激酶前体 (1IU)
2. 抗 UK IgG(4μg) + 尿激酶前体 (0.5IU)
3. 抗 UK IgG(4μg) + 尿激酶前体 (0.25IU)
4. 抗 UK IgG(4μg) + 尿激酶前体 (0.125IU)
5. 抗 tPA IgG(4μg) + 尿激酶前体 (1IU)
6. 尿激酶前体 (1IU)

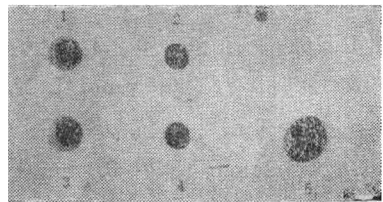


图 5 DFP 对纤溶活性影响

1. 尿激酶前体 (1IU)
2. UK(1IU) + DFP
3. 尿激酶前体 (1IU) + DFP
4. UK(2IU) + DFP
5. UK(1IU)

三、pro-UK 与 UK 的纤溶性质比较

在体外血凝块溶解系统中, pro-UK 和 UK 诱导的凝块溶解作用均与作用时间有关(图 6, 图 7)。UK 组在加药后立刻出现溶凝块作用。而 pro-UK 在加药后 2h, 凝块溶解作用才逐步加强, 因此凝块溶解时间曲线呈“S”型。与此同时

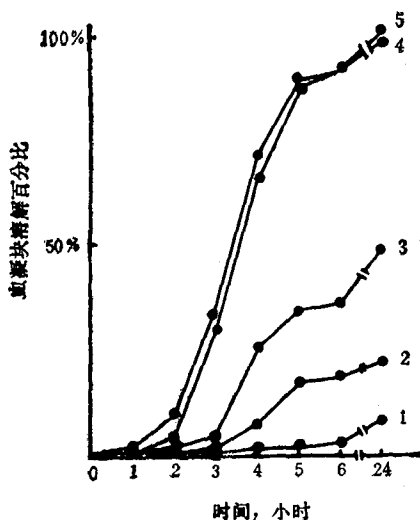


图6 pro-UK 组血凝块溶解时间曲线
pro-UK 剂量浓度 1:25IU/ml, 2: 50IU/ml
3: 75IU/ml 4: 100IU/ml 5: 150IU/ml

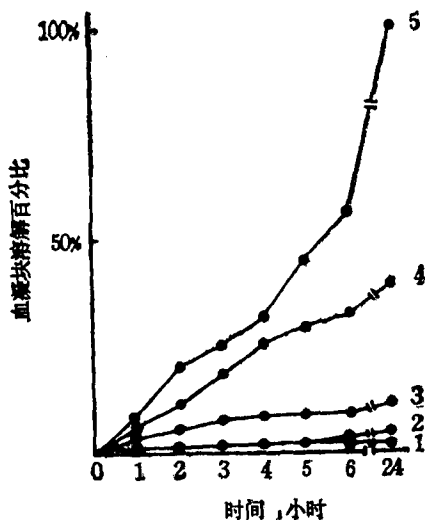


图7 UK 组血凝块溶解曲线
UK 剂量浓度 1:5IU/ml 2: 10IU/ml
3: 25IU/ml 4: 50IU/ml 5: 100IU/ml

pro-UK 对周围血浆中纤维蛋白原的降解作用不明显,约下降 10—20%。而 UK 给药组周围血浆中纤维蛋白原的含量下降 30—60%,说明血浆纤溶系统在 UK 作用下非特异性地被激活,纤维蛋白原降解明显。

讨 论

有关 pro-UK 的纯化国外近年已有介绍,

国内尚无报道。据文献介绍,纯化方法主要采用免疫亲和层析和离子交换层析,如 Wun 等报道用抗 UKIgG-Sepharose 层析和制备型 SDS-PAGE 两步方法来纯化^[15]。Stump 等报道用 Zn^{2+} -Sepharose 层析、SP-Sephadex C-50 层析、Sephadex G-100 凝胶过滤及苯甲脒-Sepharose 层析四步方法提纯 pro-UK^[5]。我们在参考文献中有关方法的基础上,采用两种层析方法的新组合(详见方法一节),提纯得到 pro-UK。这种改进的二步法,方便迅速,纯化条件较易控制,纯化产物的纯度、得率及纯化倍数接近或超过其他方法,每升胎肾细胞培养液中可得 pro-UK 200 μ g 左右。

SDS-PAGE 显示 pro-UK 的电泳谱不受二硫键还原剂的影响,提示 pro-UK 为单肽链结构蛋白质。IEF 则表明其 pI 为 8.9,与 Corti 报道的 pI9.05 相近^[16],为碱性蛋白。DFP 有不可逆地阻断丝氨酸蛋白酶活性的作用,但 pro-UK 的活性不受其影响,提示 pro-UK 的活性位点可能有别于 UK 等其他丝氨酸蛋白酶。因此 pro-UK 是一种具有 UK 抗原性,但又不同于 UK 的新型纤溶酶原激活物。

体外血凝块溶解实验表明: pro-UK 仅作用于血凝块局部,其凝块溶解时间曲线呈“S”型。对此,有人解释为 pro-UK 仅能激活结合在血凝块上的纤溶酶原,并且只有当血凝块中纤维蛋白轻度降解暴露出 C-端赖氨酸(Lys),使血浆中谷氨酸-纤溶酶原与其结合产生类似赖氨酸-纤溶酶原的构象改变后,pro-UK 才可有效地激活这种纤溶酶原,表现出较强纤溶作用,故产生“S”型溶解曲线。而 UK 则可非特异性地激活所有纤溶酶原,在诱导血凝块纤维蛋白降解的同时,也降解周围血浆中的纤维蛋白原,在临床使用中有可能产生全身纤溶系统被激活,凝血功能降低,导致出血等不良反应。因此体外溶栓实验提示 pro-UK 是一较为理想的能特异性作用于血凝块局部的溶栓药物。近年国外已将 pro-UK 试用于急性心肌梗塞的冠脉溶栓治疗,取得了良好的治疗效果^[17],表明 pro-UK 是一种优于 UK 的安全有效的溶栓剂。

细菌过氧化氢酶的分离、结晶及性质

刘昌玲 王国庆

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

提 要

过氧化氢酶又称触酶 (Catalase EC 1.11.1.6), 它广泛存在动植物和微生物的细胞内, 是一种很有用的工具酶。细菌触酶目前国内外均无产品。本文就细菌酶的分离、结晶和鉴定及性质进行了研究。

关键词 过氧化氢酶, 酶结晶, 微球菌

自 79 年以来我们发现了触酶能催化某些有机磷毒剂的水解^[1], 而细菌酶优于牛肝酶。为此建立并改进了微球菌 (*micrococcus lysodeikticus*) 的培养方法, 解决了酶源。交替用有机溶剂和盐析法, 分离提纯酶, 得到了较理想的电泳纯、高活力的结晶酶, 分子量为 235000, 稳定性好, 比活力显著超出国内外其它来源产品 5—47 倍。

材 料 和 方 法

一、材料

硫酸铵、无水乙醇、氯仿、丙酮等均为国产化学纯试剂。菌种微球菌 (本院五所细菌室提供)。紫外可见分光光度计为日本岛津 UV-250 型。

二、方法

1. 触酶活力测定 用经我们改进的光电比色法^[2]。取 0.02mol/L 的 H_2O_2 的磷酸盐缓冲液 (0.05mol/L, pH6.8) 1ml, 磷酸盐缓冲液 0.9ml 置 25℃ 孵温 3min, 加入稀释酶溶液 0.1ml 准确反应 1min, 加入 0.5mol/L H_2SO_4 1ml 终止反应。然后加 1ml 1% 钼酸铵, 1ml 6% 的柠檬酸。在 360nm 波长读数。计算活力。

2. 蛋白含量测定 用紫外 280nm 处测吸收值或用 Folin 酚定量法^[3], 以人血清白蛋白做标准曲线。

结 果 与 讨 论

一、酶的分离和结晶

细菌酶的分离参考 Herbet. D 的方法^[4], 但纯化结晶的方法是经过我们摸索, 建立了细菌触酶在蒸馏水中纯化结晶法, 得到了活力很高

参 考 文 献

- 1 Bernic MB. *J Clin Invest*, 1973; **52**: 823
- 2 Husain SS *et al.* *Arch Biochem Biophys*, 1983; **220**: 31
- 3 Sumi H *et al.* *Acta Haematol Jpn*, 1982; **45**: 119—128
- 4 Wun TC *et al.* *J Biol Chem*, 1982; **257**: 3276
- 5 Stump DC *et al.* *J Biol Chem*, 1986; **261**: 1274
- 6 Winkler ME *et al.* *Biochemistry*, 1986; **25**: 4041
- 7 Ichinose A *et al.* *J Biol Chem*, 1986; **261**: 3486
- 8 史伟. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1989; 89: 12

- 9 Collen D *et al.* *J Biol Chem*, 1986; **261**: 1259
- 10 Pharmacia Fine Chemicals Affinity chromatography principles & methods. p15—18
- 11 史伟等. 尿激酶前体与 tPA 或 UK 协同纤溶作用的研究 (待发表)
- 12 Laemmli U K. *Nature*(Lond), 1970; **227**: 680
- 13 施秉钧. 见: 上海第二医学院, 上海市免疫学研究所编, 免疫学技术 (研究生教材), 1984; 118—121
- 14 Bradford MM. *Analytic Biochem*, 1976; **72**: 248
- 15 Wun TC *et al.* *J Biol Chem*, 1982; **257**: 7262
- 16 Corti A *et al.* *Thromb Haemost*, 1986; **56**: 219
- 17 Van de Werf F *et al.* *Ann Intern Med*, 1986; **104**: 345

[本文于 1989 年 9 月 12 日收到]