

清中制备天然的 angiostatin 应该是当前的首选.

天然的 angiostatin 来源于血浆中的纤溶酶原 (plasminogen), 但在体内的产生机理尚未阐明. Cao 等^[4]发现弹性蛋白酶水解纤溶酶原得到的 K1~3 和 K1~4 片段有较强的抑制血管内皮细胞增殖活性. 利用纤溶酶原对 L 型赖氨酸的高亲和性我们制备了 L 型赖氨酸偶联 Sepharose 4B, 以亲和层析法从人血浆中提取和纯化纤溶酶原, 利用弹性蛋白酶有限水解产生 angiostatin 片段; 这些片段实际上都是由赖氨酸结合结构域组成, 因而可以赖氨酸 Sepharose 亲和层析柱进一步纯化获得, 实验结果表明所制备的蛋白质有较强的体外抑制血管内皮细胞增殖和体内抑制鸡胚血管生成活性^[1]. 制备过程中我们发现, 纤溶酶原纯化后去除 6-氨基己酸这一步骤既费事又降低产率, 在实际操作中我们尝试省略这一过程, 即第一步纯化纤溶酶原中不把纤溶酶原洗脱下来, 而是在原位进行弹性蛋白酶有限消化, 产生 angiostatin 片段, 最后特异性洗脱获得, 这等于将二步亲和层析过程简化为一步亲和层析过程. 这一改进简化了制备过程, 极大地缩短了制备的时间, 使小量制备过程由原来的 3~4 d 缩短到 1~2 d; 同时该方法使产率也提高约 30%. 本实验方法更加简单、可行, 为实验研究应用型制备和实际应用性生产提供有价值的参考.

参 考 文 献

- 1 Li F Y, He P, Liu X P, *et al.* The preparation of angiostatin and its antiangiogenic effects. *J Fourth Med*, 1999, **20** (10): 832~834
- 2 Jar-Chister J, Lars R. Protein Purification: principles, High Resolution Methods and Applications. New York: VCH publisher Inc, 1989. 275~330
- 3 Folkman J. Long term primary culture of vascular endothelial cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76** (10): 5217~5221

- 4 Cao Y H, Ji R W, Davidson D, *et al.* Kringle domain of human angiostatin: characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** (46): 29461~29467
- 5 Brook P C, Montgomery A M, Rosenfeld M, *et al.* Aantagonists of integrin disrupt angiogenesis *in vivo*. *Cell*, 1994, **79** (4): 1157~1164
- 6 Sim B K L, O'Reilly M S, Liang H, *et al.* A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Research*, 1997, **57** (4): 1329~1334
- 7 Wu Z G, O'Reilly M S, Folkman J, *et al.* Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Comm*, 1997, **236** (2): 651~654

Single-step Method to Prepare Native Angiostatin From Human Plasma. LI Fu-Yang, HE Peng, LIU Xin-Ping, ZHANG Ying-Qi¹⁾, YANG Jing-Hua²⁾, FAN Dai-Ming²⁾, YAO Li-Bo (The Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Fourth Military Medical University; ¹⁾ The Center of Biotechnology; ²⁾ The Institute of Gastrology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China).

Abstract As a specific angiogenesis inhibitor, angiostatin can inhibit new vascular formation, and it has potential clinical practical value. Human plasminogen was purified from human plasma by affinity chromatograph, and then in situ digestion of plasminogen by elastase was carried out to produce angiostatin fragments. After washing, angiostatin was eluted specifically by 0.2 mol/L 6-aminocaproic acid solution. This improvement made this method be simpler, rapider and more efficient. *In vitro* and *in vivo* experiments indicated that this purified protein has potent antiangiogenic activity.

Key words angiostatin, angiogenesis, protein, purification

红细胞嘧啶-5'-核苷酸酶的纯化及其抗血清的制备

黄建国¹⁾ 李建婴 闵碧荷

(第二军医大学长海医院血液科, 上海 200433)

摘要 利用 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析的方法纯化正常人红细胞嘧啶-5'-核苷酸酶 (P5'N, EC. 3.1.3.5). 结果表明: 利用 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析柱可有效、专一性吸附 P5'N, 纯化液经聚丙烯酰胺凝胶电泳显

¹⁾ 现工作单位: 兰州军区乌鲁木齐总医院血液内分泌科, 乌鲁木齐 830000.

示一条蛋白质带,测定纯化物相对分子质量 28×10^3 ,等电点 (pI) 5.2. 纯化物免疫家兔后,得兔抗人 P5'N 抗血清,为探讨遗传性及获得性 P5'N 缺陷奠定了基础.

关键词 红细胞, 嘧啶-5'-核苷酸酶, 亲和层析

学科分类号 R331.141

人红细胞嘧啶-5'-核苷酸酶 (P5'N) 先天性缺陷可导致溶血性贫血、智力障碍等临床病症. 这是仅次于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷和丙酮酸激酶缺陷的第三位可导致溶血性贫血的常见遗传性红细胞酶病^[1]. 在某些疾病,如急性白血病和铅中毒, P5'N 活力可明显下降^[2,3]. 目前,国外已对 P5'N 进行了部分纯化并研究其生物化学特征,但由于纯化手段的限制,难以获得完全纯化的 P5'N,使 P5'N 的研究不能进一步深入,在成功制备 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析柱的基础上,利用亲和层析方法,获得了完全纯化的 P5'N,从而为进一步研究 P5'N 的生物学特征,测定其蛋白质一级结构和基因序列创造了条件. 用 P5'N 免疫家兔,获得兔抗人 P5'N 抗血清,为研究先天性及获得性 P5'N 缺陷奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜正常成人血液由第二军医大学长海医院血库提供,电泳仪器和试剂为 Pharmacia 公司产品. 亲和层析试剂为 Sigma 公司产品,标准分子质量蛋白为上海东风试剂厂产品.

1.2 方法

1.2.1 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析柱的制备: a. Sepharose4B 的活化: 11.5 ml Sepharose4B 用双蒸水洗涤 5 次,加 11.5 ml $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液 (pH 11.0) 混和,加入装有 pH 计电极并置于冰浴的反应烧杯中,取充分粉碎的溴化氰 2.3 g (200 mg 溴化氰每毫升 Sepharose4B),用少许乙醇溶解后加入上述悬浮液中,搅拌,用 8 mol/L NaOH 不断调整 pH 使其维持在 11.0 左右,直至不再变酸,整个反应约 10 min. 然后烧杯从冰浴中取出,室温再反应 10 min. 立即将凝胶倒入砂芯漏斗,用 250 ml 预冷的 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液 (pH 11.0) 抽滤洗涤,整个洗涤过程在 90 s 内完成. b. ADH-Sepharose4B 的合成: 将凝胶立即倒入 11.5 ml 己二酰肼 (ADH) 溶液 (pH 10.0, ADH 1.0 g 溶于 0.11 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲液) 中,4℃ 搅拌过夜,倾入砂芯漏

斗,大量蒸馏水抽滤洗涤至中性,4℃ 保存. c. UMP 与 ADH-Sepharose4B 的偶联: 21.1 mg 尿苷酸 (UMP) 钠盐溶于 7 ml 双蒸水中,加 11.5 mg NaIO_3 混匀溶解. 0℃ 避光氧化 90 min. 倒入 25 ml 0.1 mol/L NaAc/HAc 缓冲液 (pH 5.0) 中, (取样测 A_{262} 光吸收值,计算 UMP 含量). 加入经 0.2 mol/L NaCl 及 0.1 mol/L NaAc/HAc 缓冲液 (pH 5.0) 洗涤之 ADH-Sepharose4B, 4℃ 避光搅拌 4~6 h,倾入砂芯漏斗,用 1 mol/L NaCl 及双蒸水各 200 ml 抽滤洗涤,收集抽滤液,测 A_{262} 光吸收值,计算交联率. 凝胶加入 25 ml 预冷的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 中,分三次加入 NaBH_4 共 115 mg (总量 10 g/L Sepharose4B), 4℃ 搅拌,每次间隔 1 h, 4℃ 双蒸水洗涤后,加入 NaN_3 (终浓度 0.02%), 以 2 ml 为单位分装, 4℃ 保存备用.

1.2.2 P5'N 的纯化: 按国际血液学标准化委员会 (ICSH) 推荐的等量 α -纤维素、微晶纤维素过滤法^[4,5] 除去白细胞、血小板后,溶解红细胞,离心,弃沉淀, 2.5 cm $\times$ 20 cm DEAE-SephadexA-50 层析柱洗脱血红蛋白,再用含 200 mmol/L NaCl 浓度的 Tris-马来酸缓冲液 (pH 7.2) 洗脱并收集洗脱液,即得无血红蛋白的粗制酶溶液,洗脱液经硫酸铵分级分离沉淀后,沉淀用少量预冷的 Tris-马来酸缓冲液 (pH 7.2) 溶解后, 1.5 cm $\times$ 15 cm SephadexG-25 层析柱脱盐,透析,聚乙二醇 20 000 快速浓缩,上预先平衡好的 1.5 cm $\times$ 20 cm DEAE-SephadexA-50 层析柱,经梯度洗脱 (0~200 mmol/L) NaCl 浓度的 Tris-马来酸缓冲液 (pH 7.2),收集酶活高峰管. 再经硫酸铵分级分离沉淀,溶解沉淀后, 1.5 cm $\times$ 15 cm SephadexG-25 层析柱脱盐,透析,聚乙二醇 20 000 快速浓缩,约得 1 ml 左右含 P5'N 液,取 UMP-ADH-Sepharose4B 2 ml 装入 0.5 cm $\times$ 5 cm 层析柱中, Tris-马来酸缓冲液 (pH 7.2) 平衡后,加入含 P5'N 液, Tris-马来酸缓冲液 (pH 7.2) 10 ml 洗脱,出现第一个蛋白质峰,然后用含 20 mmol/L α -磷酸甘油的 Tris-马来酸缓冲液 (pH 7.2) 10 ml 洗脱. 最后取含 20 mmol/L UMP 的 Tris-马来酸缓冲

液 (pH 7.2) 10 ml 洗脱, 出现第二个蛋白质峰, 分别收集各组洗脱液上样后之流出液, 测定 P5'N 及酸性磷酸酶 (ACP) 活力. 合并含 P5'N 液, 聚乙二醇 20 000 快速浓缩, 约得 400 μ g 左右含 P5'N 液, -20°C 冰冻备用.

1.2.3 兔抗人 P5'N 抗血清的制备: 纯化的 P5'N 溶液与牛血清白蛋白经碳二亚胺盐酸盐偶联后, 加入福氏不完全佐剂, 制成乳剂, 采用微量注射法免疫家兔, 用免疫扩散技术测定血清效价, 得满意效价后, 颈动脉采血, 取血清. 加入 NaN_3 (终浓度 0.1%), -20°C 冰冻备用.

1.2.4 P5'N 活力测定 参照文献 [6] 进行.

1.2.5 P5'N 纯度鉴定、分子质量及等电点测定: 使用 Phastsystem 半干式电泳系统, 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (10%) 电泳鉴定纯度及测定分子质量, 经 Phast Gel (3~9) 凝胶测定等电点 (PhastsystemTM User Manual).

2 结果

2.1 UMP-ADH-Sepharose4B 交联结果

交联量 6.04 mmol/L Sepharose4B, 交联率 78%.

2.2 P5'N 纯度鉴定、分子质量及等电点测定

2.2.1 P5'N 纯度鉴定, 见图 1.

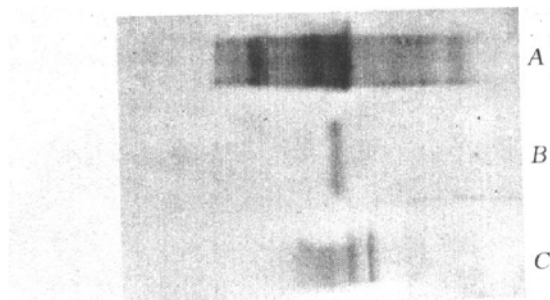


图 1 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
A: 红细胞脱血红蛋白液; B: 亲和层析含 P5'N 液;
C: 离子层析含 P5'N 液.

2.2.2 P5'N 分子质量、等电点测定: 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 测得 P5'N 分子质量为 28×10^3 . 经 Phast Gel (3~9) 凝胶电泳, 测得 P5'N 等电点为 5.2.

3 讨论

自 1974 年 Valentine^[1] 首次报道了由于红细胞 P5'N 缺陷所致非球形溶血性贫血以来, 迄今已报告了 60 多例约 30 个家系. 国内也有两例报告. 近

年来, 对 P5'N 及其同工酶生物化学特征的研究有了很大发展, 而 P5'N 含量极微, 提纯困难. 用 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析法可以在较短时间内获得足够量的纯化 P5'N 以供进一步研究.

P5'N 有两种同工酶, P5'N-I 和 P5'N-II, 分别具有不同的生物学特征, P5'N 缺陷主要是 P5'N-I 缺乏而 P5'N-II 完全正常. 前者最适 pH 为中性, 仅催化嘧啶类核苷酸脱磷酸水解, 而 P5'N-II 又称脱氧核苷磷酸化酶, 最适 pH 为酸性, 对嘌呤和嘧啶类核苷酸均有作用.

制备 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析柱的目的是为了纯化 P5'N, 所以选择的配基必须能达到 P5'N 的活性位置和调节位置, 通过 P5'N 对这一位置的特异性识别来达到特异性吸附的目的. 由于引入了“手臂”己二酰肼 (ADH), 减少了载体的立体障碍, 增加了配基的活动度. 同时, 根据 P5'N 的特性, 选择它的特异性底物 UMP 作为配基, 以 Sepharose4B 作为载体.

Sepharose4B 本身没有活性基团, 在碱性条件下, 溴化氰与 Sepharose4B 的羟基反应形成活性基团, 与作为“手臂”含有游离氨基的己二酰肼结合, 得 Sepharose4B 的氨基乙酰衍生物. UMP- Na_2 经 NaIO_4 氧化后能与 ADH-Sepharose4B 的活化基团在酸性条件下有机结合, 形成 UMP-ADH-Sepharose4B.

在采用凝胶层析、离子层析去除了红细胞中绝大部分杂蛋白后, 采用 UMP-ADH-Sepharose4B 亲和层析柱, 利用 P5'N 能与 UMP 特异性结合的特性, 非专一性吸附的杂蛋白则随着缓冲液被洗脱下来. 用含 20 mmol/L α -磷酸甘油的缓冲液 (pH 7.2) 洗脱非特异性与 UMP 结合的酸性磷酸酶 (ACP). 同时, 因 ACP 最适 pH 在 6.8 以下, 保持缓冲液 pH 在 7.2 以上, 剩存 ACP 活力几乎下降为 0, 不与 UMP 非特异性结合. 可随缓冲液被洗脱下来. 以含有 P5'N 底物 UMP 的缓冲液洗脱, 使 P5'N 解吸, 被洗脱下来.

P5'N 与 pH 6.5~7.5 之间最稳定, 最适 pH 在 7.5. Mg^{2+} 浓度在 0.05 mmol/L 时 P5'N 活力最大^[7]. 另据文献报道: P5'N 为 Zn^{2+} 依赖金属酶, 锌离子浓度下降可使 P5'N 活力下降. 而其他金属离子, Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 则能显著抑制 P5'N 活力, 甚至破坏 P5'N 结构^[1,3,6]. 在实验操作过程中, 所有缓冲液及透析液均加入 1 mmol/L 2-巯基乙醇及 2.7 mmol/L EDTA. P5'N 活力测定时, 样

品于含 $MgCl_2$ 的透析液中透析, 则能更准确地测定 P5'N 的活力.

大分子物质的免疫原性除与抗原决定簇有关外, 分子质量的大小也有很大作用, 由于 P5'N 分子质量较小, 免疫家兔时, 以牛血清白蛋白为载体, 经偶联剂碳二亚胺盐酸盐的偶联作用, 合成载体抗原, 增强其免疫原性. 对载体蛋白的要求是本身具有抗原性, 而且免疫动物能产生与其结合的抗原没有任何影响的抗体. 结果表明, 制成载体抗原后采用微量注射法, 6 周后即可得到满意的抗体效价.

参 考 文 献

- 1 Valentine W N, Fink K, Paglia D E, *et al.* Hereditary haemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. Clin J Invest, 1974, **54** (7): 866~ 879
- 2 Viesscorron J L, Hirano A, Pujades A, *et al.* Characteristic of red cell pyruvate kinase (PK) and pyrimidine 5'-nucleotidase (P5'N) abnormalities in acute leukemia and chronic lymphoid diseases with leukemia expression. Brit J Haemat, 1987, **66** (2): 173~ 180
- 3 Paglia D E, Valentine W N. Characteristics of a Pyrimidine specific 5'-nucleotidase in human erythrocytes. J Biol Chem, 1975, **250** (12): 7973~ 7979
- 4 Beutler E, Blume K G, Kaplan J C, *et al.* International committee for standardization in haematology: recommended methods for red cell enzyme analysis. Brit J Haemat, 1977, **35** (2): 331~ 340
- 5 Hirano A, Fujii H, Natori H, *et al.* Chromatographic analysis of human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase from five patients with pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. Bri J Haema, 1987, **65** (1): 35~ 41
- 6 李津婴, 万树栋. 人红细胞嘧啶 5'-核苷酸酶活力测定. 中华医学检验杂志, 1990, **13** (4): 235~ 236
Li J Y, Wan S D. Chin J Medical Laboratory Sciences, 1990, **13** (4): 235~ 236
- 7 Torrance D, Whittaker D, Beutler E. Purification and properties of human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase. Proc Natl Acad Sci USA, 1977, **74** (9): 3701~ 3704

Purification of Human Erythrocyte Pyrimidine 5'-Nucleotidase and Preparation of Rabbit Antibody Specific for Human P5'N. HUANG Jian-Guo, LI Jin-Ying, MIN Bi-He (*Department of Haematology, Changhai Hospital, Shanghai 200433, China*).

Abstract After the UMP-ADH-Sephsrose 4B column was made as the affinity material, human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase (P5'N EC 3.1.3.5.) was purified from the blood of normal subjects by a combination of DEAE-cellulose chromatography, ammonium sulfate fractionation, ion-exchange and affinity chromatography. The results show that the P5'N can adhere to the UMP-ADH-Sephsrose 4B column tightly with high specificity. Polyacrylamide electrophoresis of the purified material shows one strong protein band. The enzyme has *pI* of 5.2 and a relative molecular mass of 28 000 by polyacrylamide electrophoresis. The antibody was obtained after the rabbits were immunized with the purified enzyme. It might play an important role in clinical study on hereditary or acquired erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency.

Key words erythrocyte, pyrimidine 5'-nucleotidase, affinity chromatography, purification