文章编号:1000-5404(2007)13-1353-02

技术方法

人胎盘纤溶酶原的分离纯化

张 勇[1],杨海泉[2],先正元[2],冯赞杰[1],钱民章[1] (遵义医学院:[1]基础医学部生物化学教研室,[2]第一附属医院放射科,遵义 563003)

提 要:目的 建立从人胎盘组织中分离纯化天然型纤溶酶原的方法。**方法** 采用Lys-sepharose 4B亲和层析和Sephadex G-25层析法分离纯化纤溶酶原。采用发色底物法测定纤溶酶原活性,SDS-PAGE鉴定纤溶酶原纯度。**结果** 获得电泳纯天然型纤溶酶原(Glu-plg),比活441.520%/mg。**结论** 该法原料来源丰富、成本低廉、操作简单,为获取纤溶酶原提供了新方法。

目前国内用人血液为原料提取纤溶酶原(plasminogen,PLG),成本昂贵。本室采用人胎盘为原料,建立了从中提取谷-纤溶酶原(Glu-PLG)的方法,获得电泳纯Glu-PLG产品,活性较高,分子量与文献[1]报道相符,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

健康新鲜胎盘(遵义医学院第一附属医院产科)。主要试剂:6-氨基己酸(上海试剂三厂),Lys-Sepharose 4B和Sephadex G-25(Pharmacia公司),蛋白标准品、Lys-纤溶酶原标准品和Glu-纤溶酶原标准品(Sigma公司),纤溶酶原活性试剂盒(上海太阳生物技术公司)。主要仪器:层析冷柜(北京博医康技术公司),冷冻离心机(BUG公司),冷冻真空干燥机(上海精密仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 胎盘纤溶酶原的分离纯化 胎盘纤溶酶原粗提物的制备:新鲜人胎盘-76 ℃冻成冰块后,切成小块,制成组织匀浆,加入2倍体积生理盐水。3 500×g离心30 min;弃上清,加2倍体积生理盐水溶解沉淀后,加入6-氨基己酸(EACA)使浓度至0.05 mol/L,搅拌3 h,1 500×g离心20 min,取上清加$(NH_4)_2SO_4$至饱和度为40%,搅拌30 min,4 000×g离心20 min。用0.01 mol/L PBS(pH 7.4)溶解沉淀,透析(时间控制在2 h以内)。

亲和层析分离Glu-PLG:透析袋内样品与Lys-sepharose 4B混匀,搅拌6 h,静止至上下层分界清晰后,吸弃上清,沉淀物装柱。用0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗脱杂蛋白至$D(280)<0.05$后,再用0.01 mol/L PBS(pH 7.4,含0.2 mol/L EACA)洗脱,收集两蛋白洗脱峰液,经纤溶酶原活性鉴定,保留活性峰液,冷冻干燥成粉。

凝胶过滤纯化Glu-PLG:用PBS液溶解亲和层析获得的活性峰样品(干粉),上样于用PBS液平衡好的sephadex G-25层析柱,用0.005 mol/L PBS(pH 7.4)洗脱,去除EACA杂质,收集$D(280)$活性峰液,冷冻干燥成粉;-20 ℃存放。分离纯化全过程均在4 ℃进行。

1.2.2 蛋白浓度测定 采用改良Lowry法。

1.2.3 胎盘纤溶酶原活性测定 采用发色底物法。

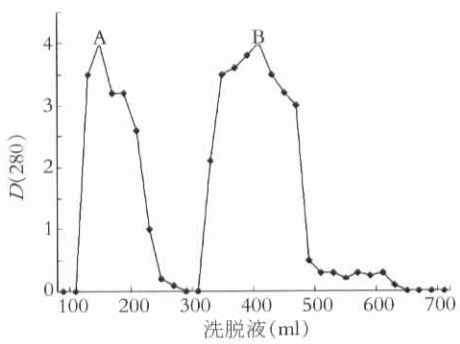
1.2.4 EACA测定 采用茚三酮法测定样品是否存在EACA杂质。

1.2.5 胎盘纤溶酶原纯度及亚基分子量鉴定 按文献[2]方法,进行0.1% SDS-PAGE;根据标准蛋白质与人胎盘PLG的迁移率,按文献[3]的方法计算相对分子质量。

2 结果

2.1 人胎盘纤溶酶原的分离纯化

人胎盘匀浆经硫酸铵沉淀后得到胎盘纤溶酶原粗提物,经透析除盐后用Lys-sepharose 4B柱层析得到2个洗脱峰(图1),经纤溶酶原活性测定,B峰有纤溶活性为纤溶酶原,A峰无纤溶活性为杂蛋白。有活性样品(B峰)经sephadex G-25柱层析进一步纯化,收集无EACA的纤溶酶原活性峰。



A:杂蛋白;B:纤溶酶原活性峰

图1 人胎盘Glu-PLG的Lys-sepharose 4B柱层析洗脱曲线

基金项目:贵州省省长科技教育人才专项基金[黔科教办(2001)3号]
Supported by the Nomarch Funds for Sci & Tech Teachers of Guizhou Province [(2001)3]

作者简介:张 勇(1973-),男,贵州省遵义市人,讲师,主要从事心血管疾病防治方面的研究。电话:(0852)8609445
通讯作者:钱民章,电话:(0852)8609792

收稿日期:2006-08-30;**修回日期**:2007-01-29

2.2 样品蛋白含量及纤溶酶原活性测定

平均1个人胎分离纯化后，能获得大量Glu-PLG（约8.0 g）。人胎盘纤溶酶原分离纯化过程中各阶段样品总蛋白、总活力、比活性、活力回收及提纯倍数结果见表1。

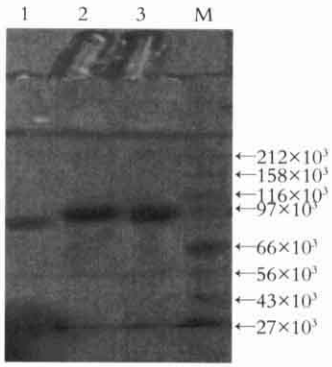
表1 人胎盘的纤溶酶原的分离纯化结果

提纯步骤	体积(ml)	总蛋白(g)	总活力($\times10^6$%)	比活(%/mg)	活力回收(%)	提纯倍数
胎盘匀浆	1 000	212.50	6.868	32.320	…	…
亲和层析	470	9.977	4.013	402.321	58.4	12.44
B峰浓缩样	10	8.823	3.616	409.838	52.6	12.68
G-25层析	110	8.054	3.556	441.520	51.2	13.66

2.3 人胎盘纤溶酶原的纯度鉴定

纯化后的样品与人天然型纤溶酶原标准品在0.1% SDS-PAGE凝胶上的电泳迁移率相同，均为单一色带（图2），表明纤溶酶原只有1种亚基，与国内外报道的人纤溶酶原由2个相同亚基组成相符。根据标准分子量迁移率制备标准曲线，求得人胎盘纤溶酶原亚基分子量为45×10^3。

纯化后的样品在0.1% SDS-PAGE凝胶上的位置较Lys-PLG标准品后，只在Glu-PLG标准品的相应位置上有条带，而在Lys-PLG标准品的相应位置上没有条带（图2），表明纯化后样品中Glu-PLG未向Lys-PLG转化，没有Lys-PLG存在。



M：蛋白分子标准品；1：Sephadex G-25层析纯化后的人胎盘Glu-PLG；2：人Glu-PLG标准品；3：人Lys-PLG标准品

图2 人胎盘Glu-PLG SDS-PAGE电泳图

3 讨论

国外曾有用人胎盘提取PLG的报道，但获得的产品为Glu-PLG和Lys-PLG的混合物。本法与国外报道的方法相比较，改良了分离纯化过程的环境温度及透析时间。全过程控制在4 ℃进行，透析不超过2 h，避免了Glu-PLG向Lys-PLG的转化[1]，得到电泳纯的Glu-PLG；此外，本法取新鲜胎盘即刻在-76 ℃冰冻成块后制备组织匀浆，降低了制备匀浆过程中的温度，减少了PLG的变性。由于EACA可特异地与PLG结合，我们在匀浆液中加入EACA搅拌，使更多的PLG分子从组织中分离出来，增加了匀浆上清液中的PLG量，有利于提高得率。待分离样品与Lys-sepharose 4B搅拌后一起装柱，再洗脱，使配体与受体充分结合，也是本方法特点之一。

用本法从人胎盘中提取的Glu-PLG产品，成分单一，纯度较高。如以人血为原料提取同样的Glu-PLG样品，成本将高出60倍。在溶栓治疗研究中，PLG的应用日益受到重视[4]。采用本方法制备Glu-PLG，原料来源丰富、成本低廉、操作简单、产品质量较高，为获取PLG提供了新的思路。

关键词：纤溶酶原；胎盘；纯化；层析

中图法分类号：R446.1 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] 陈维金，孙 宏，关 峰，等. Lys-纤溶酶原的制备及其活力稳定性[J]. 中国生物制品学杂志，2000，13(4)：221-223.

[2] 马卫列，刘 芳，何承伟. 用硫氧还蛋白融合表达系统表达小鼠内皮抑素的方法研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(14)：1476-1478.

[3] 沈继龙. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法[M]//汪 谦. 现代医学实验方法. 北京：人民卫生出版社，1998：410-413.

[4] 陈康宁. 神经内科医生应重视脑血管疾病的血管内治疗[J]. 第三军医大学学报，2002，24(12)：1383-1384.

（编辑 汪勤俭）

参考文献类型及标识

根据GB 3469规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著，论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母"A"；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母"Z"

对于数据库（database）、计算机程序（computer program）及电子公告（electronic bulletin board）等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部