

凝血酶产品中的 α -2 巨球蛋白活性研究

黄耀江^{1,2*}, 刘丽娜¹, 瞿桂香¹, 米佳¹, 张琳霞¹, 刘越¹, 冯金朝¹

1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

2. 中国民族地区环境资源保护研究所, 北京 100081

[摘要] 凝血酶作为一种快速止血药, 主要从血液中提取, 而血液中的血浆蛋白有 100 多种, 因此国内生产的凝血酶不可避免地含有多种血浆杂质蛋白。 α -2 巨球蛋白 (α -2 M) 是一种重要的血浆蛋白之一。由于巨球蛋白保护胰蛋白酶, 用大豆胰蛋白酶抑制剂灭活未被保护的胰蛋白酶后, 利用 Na-benzoy-DL-arginine-pnitroanilide (BAPNA) 作为底物检测凝血酶中巨球蛋白的活性的方法, 证明了从血浆中提取的凝血酶易存在 α -2 巨球蛋白, 从而为凝血酶进一步纯化提供了研究方向。

[关键词] 凝血酶; α -2 巨球蛋白; BAPNA

[中图分类号] R973.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2007)17-0043-03

The Research on α -2 Macroglobulin in the Thrombin

HUANG Yaojiang^{1,2}, LIU Lina¹, QU Guixiang¹, MI Jia¹, ZHANG Linxia¹, LIU Yue¹, FENG Jinchao¹

1. College of Life and Environment, Central University for Nationalities, Beijing 100081, China

2. Chinese Institute of Environment and Resources Protection for Minority Areas, Beijing 100081, China

Abstract: Thrombin as a hemostatic drug can be extracted from blood. Because there are more than 100 plasma proteins in blood, it is natural for thrombin to contain some plasma proteins. α -2 macroglobulin is one of the important plasma proteins and it can pavilion and protect trypsin. Soybean trypsin inhibitors are used to inactivate the trypsin that can not be pavilioned, and then the activity of α -2 macroglobulin included in the thrombin mixture is detected by using the special substance-BAPNA. It shows that the thrombin extracted from blood does contain the α -2 macroglobulin. This work provides some guidance for thrombin purification.

Key Words: thrombin; α -2 macroglobulin; BAPNA

CLC Number: R973.1

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2007)17-0043-03

0 引言

凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶, 在临床上几乎适合于各种原因引起的出血, 效果明显^[1]。国内厂家大多以猪血为原料, 采用不同的工艺提取纯化凝血酶。由于凝血酶质量标准未规定产品的纯度, 只对比活力做了规定, 即冻干品每 1 mg 效价不得少于 10 单位(此标准较易达到), 所以国产凝血酶的纯度相对不高, 凝血酶中含有一定的杂质^[2]。血液中的血浆蛋白有 100 多种, 国内生产的凝血酶不可避免地含有多种血浆杂质蛋白。 α -2 巨球蛋白 (α -2 M) 是一种广谱蛋白酶抑制剂, 在有纤维蛋白原存在的情况下, 与凝血酶形成复合物, 使凝血酶

失去作用^[3]。因此, α -2 M 的这些特点对于凝血酶的提纯及稳定性的提高具有重要意义。

α -2 M 可以与组织中的蛋白酶相结合, 形成“笼形结构”包裹蛋白酶, 阻断蛋白酶活性中心与底物蛋白质的接触, 从而达到调节组织中蛋白酶活性的作用。但小分子底物, 如仅含有几个氨基酸的小肽, 仍可以穿过 α -2 M 蛋白笼形结构的屏蔽与蛋白酶相接触发生反应^[4]。利用 α -2 M 的这一特点, 在进行活性检测时, 首先将待测血浆样品与一定浓度的标准蛋白酶溶液混合, 使血浆中可能存在的 α -2 M 与蛋白酶分子充分结合, 然后加入过量的大分子的蛋白酶抑制剂, 如大豆蛋白酶抑

收稿日期: 2007-06-08

基金项目: 北京市教育委员会共建项目专项资助, 985 工程资助 (CUN985-3-3)

作者简介: 黄耀江, 北京市海淀区中关村南大街 27 号中央民族大学生命与环境科学学院, 教授级高工, 研究方向为遗传多样性与蛋白质工程; E-mail: yaojiangh@hotmail.com

制因子。这些大分子抑制剂直接作用于蛋白酶活性中心使之失活。但由于分子量巨大,同样不能穿过 α -2 M 屏蔽,因此,未与 α -2 M 结合的游离蛋白酶被抑制失活。而被 α -2 M 结合的蛋白酶活性则得到保护。当加入小分子底物时,检测失活处理后的酶溶液是否仍具有蛋白酶活性,以判断样品中是否存在 α -2 M。

1 材料和方法

1.1 试剂

凝血酶,北京典奥东方生物科技有限公司产品;牛胰蛋白酶(Trypsin),美国 Amresco 公司产品;大豆蛋白酶抑制剂(Soybean Trypsin Inhibitor,SBTI),美国 Amresco 公司产品;BAPNA (Na-benzoy-DL-arginine-pnitroanilide HCL),上海楷洋生物技术有限公司产品;Tris,美国 Novon 公司产品;其余均为国产分析纯。

1.2 仪器

紫外分光光度计(上海分析仪器),8200 型超滤杯

(德国密理博)。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂准备

0.05 mol/L, pH 8.1 Tris_HCl 缓冲溶液, 0.5 mg/mL 的胰蛋白酶溶液, 0.5 mg/mL 的 SBTI, 1 mg/mL BAPNA。上述试剂均以 0.05 mol/L, pH 8.1 Tris_HCl 缓冲溶液配制; 0.9% 的 NaCl 溶液, 凝血酶样品溶液, 称取凝血酶冻干品 20 mg, 加入 1 mL 0.9% 的 NaCl 溶液, 充分溶解(溶液较澄清)。

1.3.2 α -2 M 活性检测

向凝血酶样品溶液中加入 0.5 mg/mL 胰蛋白酶溶液 0.4 mL, 37°C 保温 10 min, 加入 0.5 mg/mL 的 SBTI 0.8 mL, 37°C 保温 10 min。加入 1 mg/mL BAPNA 2 mL, 37°C 保温, 立刻用紫外分光光度计测定不同时间 410 nm 的吸光值。空白对照以等量 0.05 mol/L, pH 8.1 Tris_HCl 缓冲溶液代替血浆加入反应体系。此检测方法参照 1992 年 Armstrong 的方法^[5], 并有所修改。

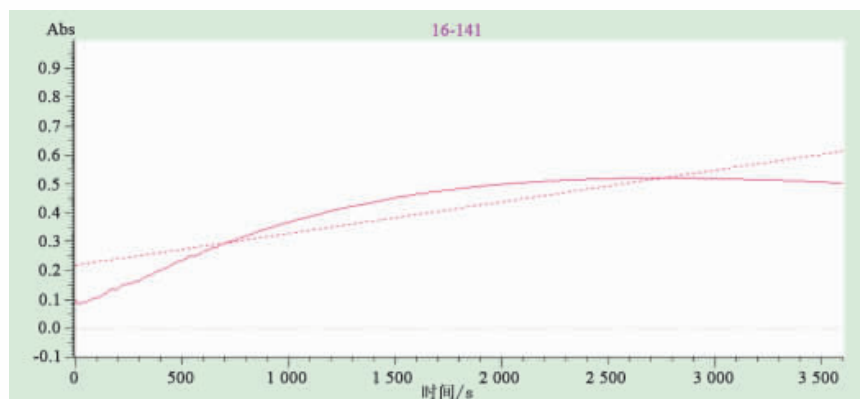


图 1 比活为 68.9 IU/mg 的凝血酶样品 α -2 M 活性测定

Fig. 1 Activity determination of the α -2 Macroglobulin from the thrombin sample with specific activity of 68.9 IU/mg

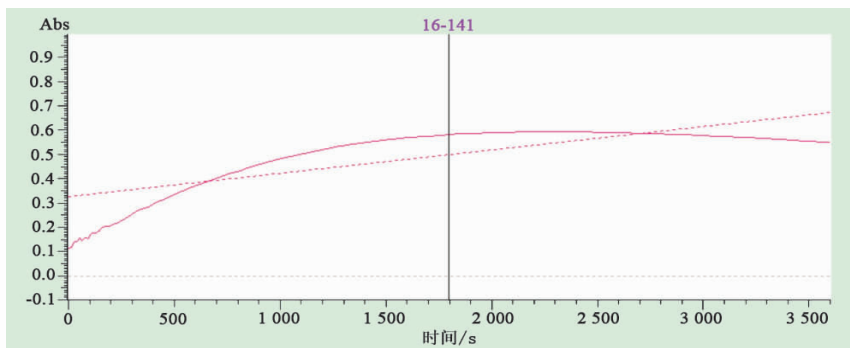


图 2 比活为 130 IU/mg 的凝血酶样品 α -2 M 活性测定

Fig. 2 Activity determination of the α -2 M from the thrombin sample with specific activity of 130 IU/mg

表 1 不同比活的凝血酶样品的 α -2 M 活性测定
Table 1 Activity detemination of the α -2 macroglobulin from the thrombin

比活 IU/mg	410 nm 吸光值					一次 函数	α -2 M 活性
	500 s	1 000 s	1 500 s	2 000 s	2 500 s		
68.9	0.235	0.368	0.451	0.497	0.517	$y=0.000266x+0.102$	1.6
79.1	0.548	0.706	0.797	0.845	0.865	$y=0.000316x+0.390$	1.9
130	0.334	0.482	0.560	0.589	0.591	$y=0.000296x+0.186$	1.8
142.96	0.412	0.479	0.490	0.481	0.468	$y=0.000134x+0.345$	0.8
339.69	0.503	0.555	0.539	0.506	0.471	$y=0.000104x+0.451$	0.7
420	0.276	0.287	0.288	0.289	0.290	$y=0.000022x+0.265$	0.2
476.66	1.959	1.969	1.974	1.977	1.981	$y=0.00002x+1.949$	0.2

2 结果

不同比活的凝血酶样品 α -2 M 活性的检测结果分别见图 1,图 2 和表 1。从图中可以看出,样品中加入过量胰蛋白酶抑制剂后,虽然经过了彻底的失活处理,但溶液仍然表现出胰蛋白酶的活性。说明有一部分胰蛋白酶得到了血浆中 α -2 M 分子的保护,大分子的胰蛋白酶抑制剂不能使这些胰蛋白酶失活。胰蛋白酶水解活力在反应开始后的 40 min 左右保持稳定,水解产物的积累与时间成正比关系。我们定义 α -2 M 保护的胰蛋白酶在 37℃,1 min 水解 BAPNA 底物使 410 nm 光吸收增加 0.01 个吸光度单位的酶量为 1 个 α -2 M 活力单位。实验中测得的不同比活凝血酶样品的 α -2 M 活性如表 1 所示。

3 结论

实验中用到的凝血酶质量比较好,溶解后,溶液较澄清,对比离心前后的溶液,基本一致,因此不必离心。但与对照组相比,溶液的透光度仍存在差别,对实验结果也会有影响。不过,样品溶液的吸光值随时间延长而不断增大的趋势是不变的。

由于 α -2 M 是一种非特异性的蛋白酶抑制剂,而凝血酶与胰蛋白酶一样都属于丝氨酸蛋白酶, α -2 M 也能与凝血酶相结合,形成“笼形结构”包裹蛋白酶。图中反应的 α -2 M 的活性比实际的要低。但 BAPNA 是胰蛋白酶的专一性底物,凝血酶并不能分解 BAPNA,因此,样品溶液的吸光值随时间延长而不断增大的趋势是不变的。随着凝血酶比活的增大,其吸光值也逐渐减小,即凝血酶比活越大,产品的纯度越高,含有的杂质蛋白也越少,巨球蛋白的活性降低。

目前所分离得到的 α 巨型蛋白可分为两类:一类含有分子内硫酯键;绝大多数的 α 巨型蛋白都属于另一类不含有分子内硫酯键,只发现了存在于鸡蛋清中

的 Ovostatin。本文中的 α -2 M 含有分子内硫酯键。

血液中的血浆蛋白有 100 多种,因此国内生产的凝血酶不可避免的含有多种血浆杂质蛋白。 α -2 M 是一种广谱蛋白酶抑制剂,与凝血酶相互作用,因此该结果对凝血酶的提纯及稳定性的提高具有一定的理论和实践意义。

参考文献 (References)

- [1] 庄秀华. 局部止血药——凝血酶简介[J]. 海峡药学, 2002, 14 (5): 93-94.
ZHUANG Xiuhua. The brief introduction of a part hemostatic drug-thrombin [J]. Strait Pharmaceutical Journal. 2002, 14(5): 93-94.
- [2] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 北京化学工业出版社, 1995: 1128-1129.
The People's Republic of China Medical Dictionary Committee. Chinese pharmacopoeia [M]. Beijing: Industrial Publisher of Chemistry in Beijing, 1995: 1128-1129.
- [3] 杨彬, 刘增延, 王旭英. 血浆抗凝物质及花生四烯酸代谢产物在高脂血症患者的临床意义 [J]. 实用医技杂志, 2004, 11 (12): 2626-2627.
YANG Bin, LIU Zengyan, WANG Xuying. Significance of plasmatic anticoagulation substance and metabolic products of arachidonic acid in patient with hyperlipoidemia [J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2004, 11(12): 2626-2627.
- [4] QUIGLEY J P, Armstrong P B. A homologue of α -2 macroglobulin purified from the hemolymph of the horseshoe crab limulus polyphemus [J]. J Biol Chem, 1985, 260(23): 12715-12719.
- [5] ARMSTRONG P B. Humoral immunity: α -2 macroglobulin activity in the plasma of mollusks[J]. Veliger, 1992, 35(3): 161-164.

(责任编辑 李慧政)