



猪血中高效提纯纤溶酶原方法的建立及其功能验证

马可^{1,2}, 张磊^{2,3,4}, 郝飞^{2,3}, 谢星^{2,3}, 张珍珍^{2,3}, 邵国青^{2,3}, 陈蓉^{2,3*}, 冯志新^{1,2,3,4*}

(1. 南京农业大学生命科学学院, 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所 农业农村部兽用生物制品工程重点实验室, 南京 210014; 3. 兽用生物制品(泰州), 国泰技术创新中心, 泰州 225300; 4. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

摘要: 旨在建立从猪血中提纯纤溶酶原的高效方法。通过赖氨酸亲和层析结合凝胶过滤层析, 纯化猪血中的sPLG; 同时, 利用大肠杆菌重组表达猪组织型纤溶酶原激活剂(st-PA)和葡激酶(SAK), 并通过包涵体提取对st-PA进行纯化、镍柱亲和层析结合凝胶过滤层析纯化SAK。通过检测纤溶酶特异性底物分解曲线、纤连蛋白降解试验以及体外猪血凝块溶解试验, 评估本研究中制备的sPLG及激活剂SAK、st-PA的活性。结果发现, 本研究建立的方法高效纯化了sPLG, 每250 mL猪血浆可获得50 mg精纯的sPLG。制备的sPLG能被st-PA或SAK激活, 分解纤溶酶特异性底物、降解纤连蛋白, 并在体外溶解猪血凝块。综上, 研究建立了高效制备高纯度sPLG、st-PA和SAK的方法, 并通过st-PA和SAK验证了sPLG具备完整的纤溶酶原活性, 为sPLG在猪病原入侵机制的研究提供了原材料。

关键词: 纤溶酶原; 组织型纤溶酶原激活剂; 葡激酶; 血栓; 蛋白纯化

中图分类号: TS201.25

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0454-10

Establishing a Method for Efficient Purification of Plasminogen from Swine Blood and Verifying Its Function

MA Ke^{1,2}, ZHANG Lei^{2,3,4}, HAO Fei^{2,3}, XIE Xing^{2,3}, ZHANG Zhenzhen^{2,3}, SHAO Guoqing^{2,3}, CHEN Rong^{2,3*}, FENG Zhixin^{1,2,3,4*}

(1. School of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Key Laboratory of Veterinary Biological Products Engineering, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Guotai Technology Innovation Center of Veterinary Biological Products (Taizhou), Taizhou 225300, China; 4. College of Animal Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The purpose of this study is to establish an efficient method for purifying plasminogen from pig blood. In this study, sPLG was purified from pig blood using lysine affinity chromatography combined with size exclusion chromatography. Meanwhile, recombinant swine tissue plasminogen activator (st-PA) and staphylokinase (SAK) were expressed in *Escherichia coli*. Then, st-PA was purified by refolding of inclusion bodies, and SAK was purified by nickel column affinity

收稿日期: 2024-11-18

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(22)3029); 国家自然科学基金面上项目(32273011); 国家自然科学基金青年项目(31800160); 江苏省科协青年托举工程项目(JSTJ-23-093)

作者简介: 马可, 博士生, 主要从事动物病原与免疫研究, Email: 18112945131@163.com

* 通信作者: 冯志新, 主要从事动物支原体致病机制研究, E-mail: fzxjaas@163.com; 陈蓉, 主要从事动物支原体致病机制研究, E-mail: chenronggrape@163.com

chromatography combined with size exclusion chromatography. The activities of the prepared sPLG, SAK and st-PA were evaluated by a plasmin-specific substrate hydrolysis assay, a fibronectin degradation test, and an *in vitro* pig blood clot dissolution assay. The results showed that sPLG was highly purified by the method established by this study. Approximately 50 mg of pure sPLG was obtained from 250 mL of pig blood plasma. The purified sPLG could be activated by st-PA or SAK, and the resulting plasmin could then cleave the plasmin-specific substrate, degrade fibronectin, and lyse pig blood clots *in vitro*. In conclusion, this study established an efficient method for the preparation of sPLG, st-PA and SAK. In addition, the complete plasminogen activity of sPLG was verified using st-PA and SAK as well. This study provide essential materials for research on the mechanisms by which pathogens invade pigs via sPLG.

Keywords: plasminogen; tissue plasminogen activators; staphylokinase; thrombus; protein purification

* **Corresponding authors:** FENG Zhixin, E-mail: fzxjaas@163. com; CHEN Rong, E-mail: chenronggrape@163. com

血栓,俗称血凝块,是由纤维蛋白交联成网格状并包裹红细胞和血小板等成分产生的块状物^[1],可以抑制血液流动。纤溶酶原(plasminogen, PLG)可被组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activators, t-PA)、葡激酶(staphylokinase, SAK)^[2]等激活成纤溶酶,溶解血栓中的纤维蛋白,使血液恢复流动^[3-4]。纤维蛋白被水解后暴露出末端赖氨酸残基进一步促进纤溶酶与纤维蛋白结合并水解^[5]。纤溶酶抑制剂,如6-氨基己酸(6-ACA)^[6],可通过竞争末端的赖氨酸结合位点起抑制作用。

在一些猪病原体的研究中,猪纤溶酶原(swine plasminogen, sPLG)可作为重要受体,参与病原感染的重要过程。猪肺炎支原体表面的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)可以与PLG结合并互作,GAPDH的存在促进了PLG被t-PA激活。PLG与GAPDH结合后被激活,能够降解细胞外基质,帮助猪肺炎支原体在宿主内的传播^[7]。猪肺炎支原体的烯醇化酶(Enolase, Eno)是一种细菌表面定位蛋白^[8],Eno以剂量依赖的方式与PLG结合并促进其激活,且Eno的N端和C端在与PLG结合中具有重要作用,尤其是Eno的N端截短体与PLG的亲合力显著下降^[9]。猪链球菌是一种人畜共患病原体,其内肽酶O(SsPepO)以剂量依赖的方式与纤溶酶原结合,在激活剂的作用下生成纤溶酶,接着对补体C3b进行切割,提高猪链球菌在血液中的存活率。被SsPepO结合的PLG被激活后,生成的纤溶酶还能够降解纤连蛋白,有助于猪链球菌结合和渗透血脑屏障,导致猪链球菌脑膜炎^[10]。但是,上述研究中,使用的

大部分是价格高昂的人纤溶酶原(human plasminogen, hPLG),目前还没有商品化的sPLG可供研究使用。

且目前关于纤溶酶原纯化方法的研究仅限于hPLG,最早可以追溯到1970年,Deutsch和Mertz^[11]用赖氨酸化琼脂糖凝胶进行纯化,得到的hPLG在蛋白胶上呈现多个条带,是不同糖基化hPLG的混合物。1974年,Silverstein^[12]在此基础上进行了改良,先用离子交换层析分离出hPLG,再用赖氨酸化琼脂糖凝胶进一步纯化,分离到糖基化单一的hPLG。1990年,出现了使用径向色谱来纯化PLG的方法,对血浆中PLG的回收率可以达到85%^[13]。这些方法为sPLG的纯化提供了参考。晶体结构显示,hPLG一共由7个功能域组成,包含一个Pan-apple(PAp)功能域、5个kringle(KR)功能域和一个丝氨酸蛋白酶功能域,整个结构呈现出封锁、紧致、不易被活化的状态。此外,糖基化程度还可以影响PLG的构象,人的两种不同糖基化PLG的结构显示,其KR3功能域的位置出现了显著的差异^[14]。因此,结构复杂、精密调控的PLG不易通过重组表达而获得蛋白,目前PLG的主要来源依然是人或者动物血浆。

本研究建立了Lysine亲和层析串联凝胶过滤的方法,从猪血中高效提取和纯化了猪纤溶酶原。利用大肠杆菌重组表达并经过提纯,成功获得猪组织型纤溶酶原激活剂(swine tissue plasminogen activators, st-PA)和SAK。纯化得到的st-PA和SAK均可在体外有效激活sPLG,生成纤溶酶,降解纤溶酶特异性底物,且成功促进猪血凝块的溶解。

本研究建立了具备活性、高纯度的 sPLG、st-PA、SAK 的制备方法,为这 3 种蛋白的功能研究提供了原材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪全血来自江苏省农业科学院兽医研究所动物实验中心;SAK(NCBI 登录号:NP_999219.1)和 st-PA(NCBI 登录号:WP_000920042.1)的基因序列均连接到 pET-21a,位于酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I 之间,表达载体 SAK/pET-21a 和 st-PA/pET-21a 均由上海捷瑞生物工程有限公司合成;大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;异丙基硫代- β -半乳糖苷(IPTG)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 sPLG 的提取与纯化

取新鲜猪全血 500 mL,加入抗凝剂充分颠倒混匀后,3 000 $\times g$ 离心 10 min,上清即为猪血浆。向血浆中加入 2 倍体积的 PBS,混匀后,按比例加入蛋白酶抑制剂 PMSF,10 000 $\times g$ 离心 30 min,去除杂质和沉淀。取上清用 0.22 μ m 的滤器过滤 2 遍,然后将过滤后的血浆稀释液与 Lysine 亲和层析柱进行孵育,孵育 2~3 h 后,用 PBS 洗掉没有结合到 Lysine 柱上的蛋白,然后用 50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 的 6-氨基己酸 (6-aminocaproic acid, 6-ACA) 进行洗脱,并收集洗脱的蛋白质。用 SDS-PAGE 对收集的蛋白进行验证。使用 Superdex 200 凝胶过滤层析柱(Superdex® 200 Increase 10/300 GL, Cytiva™)对 sPLG 进行进一步纯化,结合蛋白峰的位置、SDS-PAGE 的分析结果,确定并收集经过精细纯化的 sPLG 蛋白。

1.3 SAK 的蛋白表达与纯化

SAK/pET-21a 质粒转化到菌株 BL21(DE3),使用终浓度为 0.4 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 的 IPTG 在 18 $^{\circ}$ C 进行诱导表达。收集表达的大肠杆菌的菌体,并用缓冲液 A (20 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ Tris-HCl, 300 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NaCl, pH8.0) 重悬,超声破碎后,用 0.22 μ m 的滤器过滤,然后与镍柱进行孵育,用缓冲液 A 冲洗掉没有结合到镍柱上的杂蛋白,然后分别依次用含有 20、50、100、200 和 500 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ 咪唑的缓冲液 A 进行梯度洗脱,并收集各个浓度咪唑下洗脱的蛋白。对收集的蛋白进行 SDS-PAGE 验证。随后用 Superdex 200 凝胶过滤层析柱(Superdex® 200 Increase 10/300

GL, Cytiva™) 进行纯化,结合蛋白的出峰位置、SDS-PAGE 结果,收集纯化的 SAK 蛋白。

1.4 st-PA 的蛋白表达、包涵体提取和复性

st-PA/pET-21a 质粒转化到菌株 BL21(DE3),使用 1 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 的 IPTG 在 37 $^{\circ}$ C 进行诱导表达。收集菌体后,用 PBS 重悬菌体并超声破碎,15 000 $\times g$ 离心后,弃去上清,用玻璃棒刮除沉淀表面的菌体碎片,用洗涤缓冲液 (0.5% Triton-100, 50 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ Tris, pH8.0, 300 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ NaCl, 10 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA, 10 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ DTT) 多次洗涤包涵体,最后按 30 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 加入 6 mol $\cdot$ L $^{-1}$ 盐酸胍溶解包涵体。然后将 st-PA 的包涵体在 4 $^{\circ}$ C 滴入复性液 (100 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ Tris, 400 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ L-Arg, pH8.0, 2 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ EDTA, 5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ GSH, 1 mmol $\cdot$ L $^{-1}$ GSSH, 4 mol $\cdot$ L $^{-1}$ Urea) 内进行稀释复性。复性 8 h 后,用 PBS 缓冲液透析 8 h,每隔 2 h 换一次透析液,最后将复性的 st-PA 蛋白进行 SDS-PAGE 鉴定备用。

1.5 sPLG 的激活试验

采用 96 孔微量板进行激活试验,组别设置为:1. Eno+PLG; 2. Casein+PLG; 3. Eno+PLG+st-PA/SAK; 4. Casein+PLG+st-PA/SAK; 5. Eno+st-PA/SAK; 6. Casein+st-PA/SAK。先将 sPLG、烯醇化酶 (Enolase, Eno)、酪蛋白 (Casein), 单独或者混合加入 96 孔板,其中 sPLG 的终浓度为 200 μ g $\cdot$ L $^{-1}$, Eno 为 80 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$, Casein 为 180 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$, 总体积为 100 μ L, 置于 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 h。然后向各孔加入终浓度为 5 μ g $\cdot$ mL $^{-1}$ 的 st-PA 或 SAK 或者等体积 PBS, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。最后各孔加入纤溶酶特异性底物 D-缬氨酰-L-亮氨酰-L-赖氨酸 4-硝基苯胺二盐酸盐 (D-Val-Leu-Lys-pNA 二盐酸盐), 使底物终浓度为 0.2 mmol $\cdot$ L $^{-1}$, 37 $^{\circ}$ C 孵育, 该底物被纤溶酶降解后, 生成的产物在 405 nm 处有最大吸光值。分别在 15、30、45、60 和 90 min 时, 测定各孔的 $OD_{405\text{ nm}}$ 值。

1.6 SAK、st-PA 激活 sPLG 后降解纤连蛋白 (Fn)

采用纤连蛋白 (Fn) 降解试验研究 sPLG 在激活剂的作用下是否被活化并具备蛋白酶活性, 设置 6 个分组, 6 个 EP 管中分别包含: 1. Fn; 2. sPLG; 3. SAK; 4. st-PA; 5. sPLG+SAK; 6. sPLG+st-PA。EP 管放于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 后, 通过 SDS-PAGE 检测各管反应体系中的蛋白。

1.7 sPLG 体外溶解猪血凝块

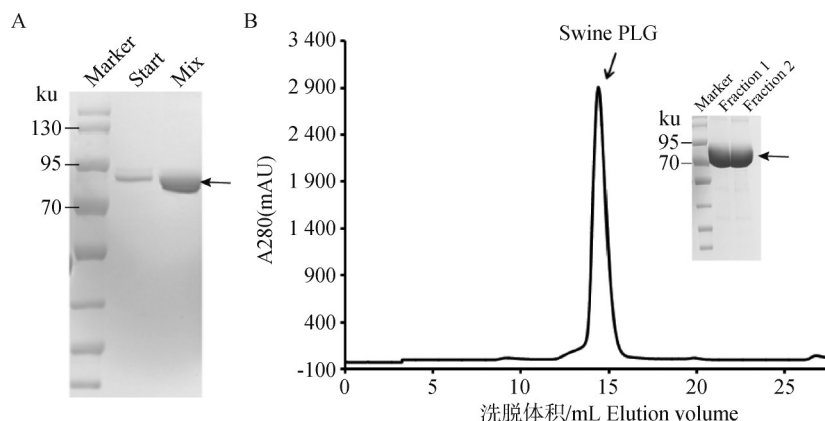
取猪血凝块切成 5 mm^3 大小的颗粒,用 PBS 清洗 3 次以上,放于 15 mL 离心管内,每管 3 粒。分成 6 个组,每管加入的成分如下:1. sPLG+SAK; 2. sPLG+st-PA; 3. PBS; 4. sPLG; 5. SAK; 6. st-PA, 并加入 PBS 使总体积为 5 mL。置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应,在 1、2、6 h 时分别观察每个离心管内的状况,并取出血凝块观察其尺寸。

2 结 果

2.1 从猪血中提取、纯化 sPLG

使用 Lysine 亲和层析柱纯化猪血浆中的 sPLG 蛋白,收集 6-ACA 洗脱下来的蛋白,进行 SDS-PAGE 鉴定,胶图显示在 70 和 95 ku 之间有一条单

一的条带,sPLG 预测的分子量约为 90 ku(图 1A),与胶图上条带显示的大小一致,提示为目的蛋白。把 Lysine 亲和层析柱洗脱下来的 sPLG 进行透析,经 BCA 测定蛋白浓度,总计获得粗纯的 sPLG 蛋白约 90 mg。为了确认 sPLG 的聚合状态以及进一步对 sPLG 进行纯化,将粗纯的 sPLG 蛋白进行分子筛层析。sPLG 在进行分子筛层析时,在 14.5 mL 处有一单峰(图 1B),该体积对应的分子量约为 90 ku,经 SDS-PAGE 鉴定为目的蛋白 sPLG。此外分子筛的结果也提示,sPLG 是以单体形式存在,且也只存在单一的糖基化修饰(hPLG 因为存在两种糖基化修饰方式,在进行分子筛层析时,会出现两个峰)。收集精纯的 sPLG,测定浓度,计算得出,从原始的 500 mL 猪血可以得到精细纯化的 sPLG 蛋白 50 mg。



A. Lysine 亲和层析柱纯化猪血浆中的 sPLG 的 SDS-PAGE 鉴定:Marker. 蛋白质分子量标准;Start. 用 6-ACA 从 Lysine 亲和层析柱上开始洗脱时收集的蛋白样品;Mix. 最终收集的总蛋白的样品。B. sPLG 的分子筛纯化,嵌入图为分子筛收集样品的 SDS-PAGE 图

A. SDS-PAGE of sPLG purified from swine plasma through a Lysine affinity chromatography column: Marker. Protein molecular weight standards; Start. Fraction collected at the initiation of elution with 6-ACA; Mix. Pooled final sample. B. Purification of sPLG by size exclusion chromatography. Eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE to assess purity

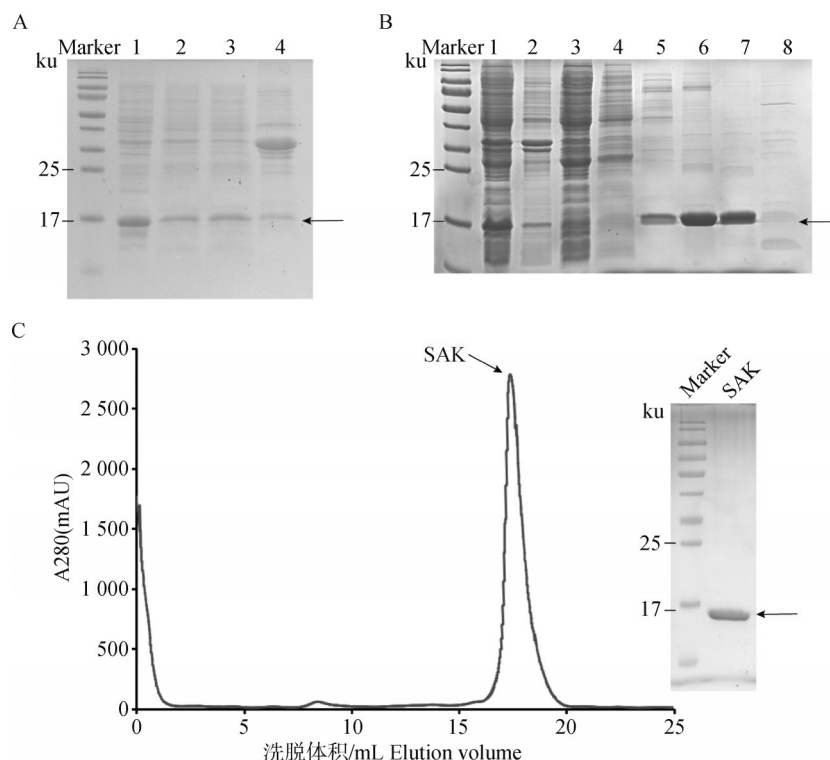
图 1 sPLG 的纯化

Fig. 1 Purification of sPLG

2.2 SAK(Staphylokinase)的表达、纯化

通过 IPTG 诱导表达 SAK 蛋白的表达,随后通过超声波破碎诱导后的 SAK/pET21a/BL21 工程菌,再通过 SDS-PAGE 鉴定破碎后 SAK 蛋白在菌体上清组分和沉淀组分的存在情况,以此来判断 SAK 在大肠杆菌的表达情况与可溶性。SAK 蛋白的分子量大小约 17 ku,根据 SDS-PAGE 电泳结果(图 2A),在 IPTG 诱导前和诱导后,SAK 蛋白都有明显表达,并且以可溶的形式表达在上清中。随后进行大量诱导表达,通过镍柱亲和层析对 SAK 蛋白进行纯化。

根据 SDS-PAGE 显示(图 2B),在 50、100、250 和 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度咪唑下,SAK 蛋白都有被洗脱下来,其中 500 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度咪唑洗脱的 SAK 蛋白量最少,50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度咪唑洗脱的 SAK 蛋白量较大但是较杂,100 和 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度咪唑洗脱的 SAK 蛋白量多且纯度相对较好。收集 100 和 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度咪唑洗脱的 SAK 蛋白进行分子筛纯化。分子筛层析的洗脱峰图显示,在大约 17 mL 体积洗脱处有一对称的单峰,其对应的分子量约为 17 ku,经 SDS-PAGE 鉴定为目的蛋白 SAK(图 2C)。



A. SAK的小量诱导表达:1. 未诱导的SAK/pET21a/BL21工程菌;2. 诱导、破碎后的全菌;3. 上清;4. 沉淀。B. SAK的镍柱亲和层析:1. 经IPTG诱导、超声破碎后工程菌的全菌;2. 上清;3. 沉淀;4. 镍柱流穿液;5. 50 mmol·L⁻¹咪唑洗脱的收集液;6. 100 mmol·L⁻¹咪唑洗脱的收集液;7. 250 mmol·L⁻¹咪唑洗脱的收集液;8. 500 mmol·L⁻¹咪唑洗脱的收集液。C. SAK的分子筛层析。峰图的横坐标为洗脱体积,峰图的纵坐标为蛋白在280 nm处的吸光值。嵌入图为分子筛收集样品的SDS-PAGE图

A. The trial expression of SAK: 1. SAK/pET21a/BL21 without IPTG induction; 2. The whole strain after IPTG induction and lysis; 3. Supernatant; 4. Pellet. B. Ni-affinity chromatography of SAK: 1. The whole of SAK-pET21a/BL21 after IPTG induction and lysis; 2. Supernatant; 3. Pellet; 4. Flow-through after Ni-column; Fractions eluting with 5. 50 mmol·L⁻¹, 6. 100 mmol·L⁻¹; 7. 250 mmol·L⁻¹; 8. 500 mmol·L⁻¹ imidazole. C. Purification of SAK by size exclusion chromatography. The abscissa is the elution volume, and the ordinate is the absorbance at 280 nm. SDS-PAGE was used to analyze the samples collected

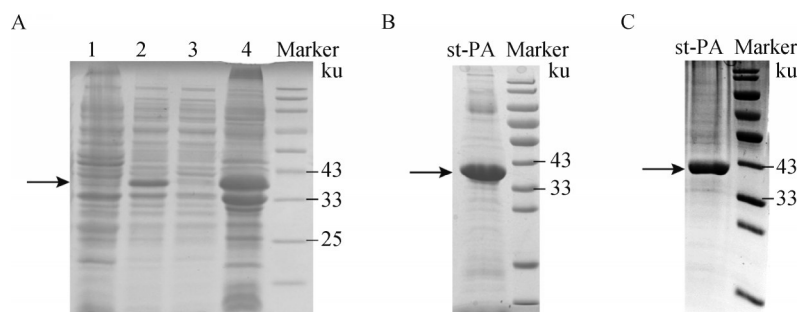
图2 SAK的表达与纯化

Fig. 2 Expression and purification of SAK

2.3 st-PA的蛋白表达、包涵体复性和纯化

先通过IPTG诱导st-PA蛋白在大肠杆菌的表达,随后超声破碎经过诱导后的st-PA/pET21a/BL21工程菌,再通过SDS-PAGE鉴定破碎后菌体的上清组分和沉淀成分中st-PA蛋白存在情况,以此判断st-PA在工程菌的表达情况与可溶性。st-PA的预测的分子量约为40 ku,根据SDS-PAGE电泳结果(图3A)可知,st-PA蛋白在IPTG诱导后,在40 ku处有明显的条带增粗,表明st-PA蛋白在诱导后成功获得表达。对比工程菌裂解后的上清和沉淀,可以看出st-PA蛋白在上清中含量非常少,主要以包涵体形式在沉淀组分中存在。对st-PA/pET21a/

BL21工程菌进行大量诱导表达,对st-PA形成的包涵体进行提取和纯化。对纯化后的st-PA包涵体进行SDS-PAGE鉴定(图3B),发现在约40 ku处有较单一的条带,且杂带较少,蛋白纯度较高,表明st-PA包涵体在提取过程中得到有效纯化。把提取的st-PA包涵体进行稀释复性,以促进st-PA在复性液中重新折叠成正确结构,从而以可溶形式存在于溶液中。复性后的组分透析换液到PBS缓冲液中,再对其中的可溶成份进行SDS-PAGE验证(图3C),胶图显示在40 ku处,有明显的蛋白条带,为目的蛋白st-PA。结果表明,采用稀释复性的方法可以使st-PA包涵体有效折叠,以可溶形式存在于PBS缓冲液中。



A. st-PA 的小量诱导表达: 1. 未诱导的 st-PA/pET21a/BL21 工程菌; 2. 诱导、破碎后的全菌; 3. 诱导、破碎后的上清; 4. 诱导、破碎后的沉淀。B. st-PA 包涵体纯化的 SDS-PAGE 鉴定。C. st-PA 包涵体复性、置换到 PBS 缓冲液后的可溶组分的 SDS-PAGE 鉴定

A. The trial expression of st-PA: 1. st-PA/pET21a/BL21 without IPTG induction; 2. The whole strain after IPTG induction and lysis; 3. Supernatant after IPTG induction and lysis; 4. Pellet after IPTG induction and lysis. B. SDS-PAGE for purified st-PA inclusion bodies. C. SDS-PAGE for refolded st-PA

图 3 st-PA 的表达与提纯

Fig. 3 Expression and purification of st-PA

2.4 sPLG 的激活试验

为了确认通过以上方法纯化的 sPLG、SAK 和 st-PA 的功能与活性,使用纤溶酶特异性底物 D-Val-Leu-Lys-pNA 二盐酸盐进行 sPLG 激活试验,来检测 sPLG 是否能够被 SAK 或 st-PA 激活,从而生成纤溶酶,降解底物^[15]。研究表明,烯醇化酶(Eno)^[16]和酪蛋白(Casein)^[17]可以与纤溶酶原结合,引发和促进纤溶酶原的激活,因此采用这两个蛋白作为纤溶酶原激活的引发剂。结果表明(图 4A, 4B),纯化所得的 st-PA 和 SAK 均能有效激活 sPLG,生成纤溶酶并降解其特异性底物, st-PA 对 PLG 的激活作用在 15~90 min 内持续增加,到 90 min 时接近最大值。SAK 对 sPLG 的激活则更加

迅速,几乎在 30 min 时 405 nm 处的吸光值就已经达到平台期,这表明 sPLG 在 SAK 的作用下,被迅速大量激活为纤溶酶,降解几乎全部的底物。而在缺乏 st-PA 或 SAK 时,即使存在 Eno 或 Casein, sPLG 也几乎不能被激活,这表明 Eno 或 Casein 只能作为 sPLG 激活的引发剂, st-PA 或 SAK 对 sPLG 激活是必须的。此外,本结果表明,通过猪血提取纯化的 sPLG、通过大肠杆菌重组表达和纯化的 SAK 以及通过包涵体纯化和复性的 st-PA 都具备其应有的活性。

2.5 sPLG 被 SAK、st-PA 激活后降解纤连蛋白(Fn)

血凝块中的纤维蛋白是维持血栓形态的主要成分,溶栓过程就是将纤维蛋白降解。因此,为研究 sPLG 在激活剂的作用下是否被活化并拥有蛋白

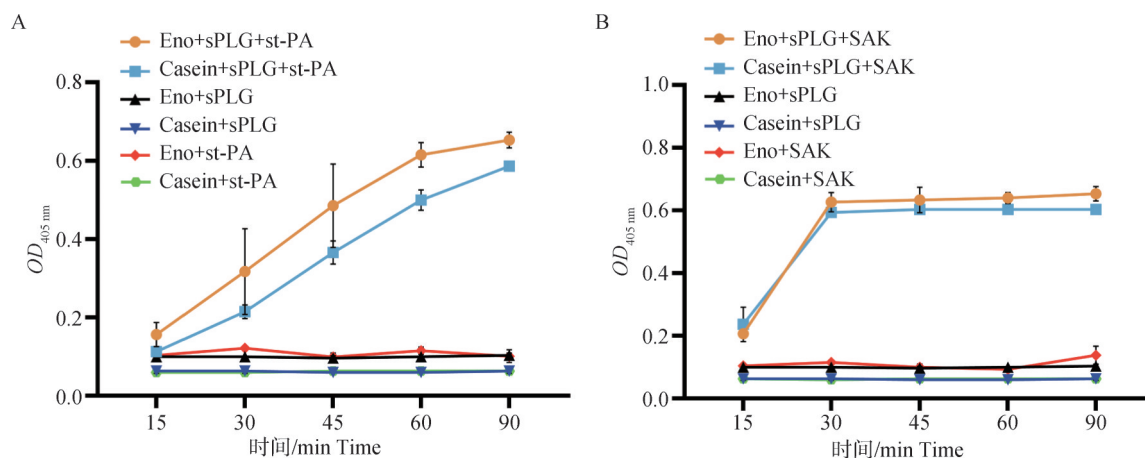
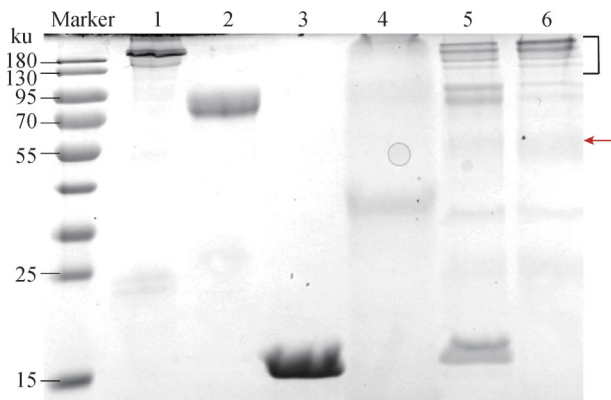


图 4 st-PA (A) 和 SAK (B) 对 sPLG 的激活试验

Fig. 4 Activation assay of sPLG by st-PA (A) and SAK (B)

酶的活性(即降解纤维蛋白),本研究将 sPLG 和两种激活剂分别混合,并向其中加入纤维蛋白的一种——纤连蛋白(Fibronectin, Fn),在 37 °C 孵育处理 3 h 后,通过 SDS-PAGE 观察纤连蛋白降解情况。由图 5 可知,与 1 泳道中未处理的纤连蛋白相比, sPLG 与 SAK(泳道 5)或 st-PA(泳道 6)孵育后,在 220 ku 到 130 ku 之间出现多条大小不一的蛋白条带,此外,在 55 ku 处也出现了反应体系中



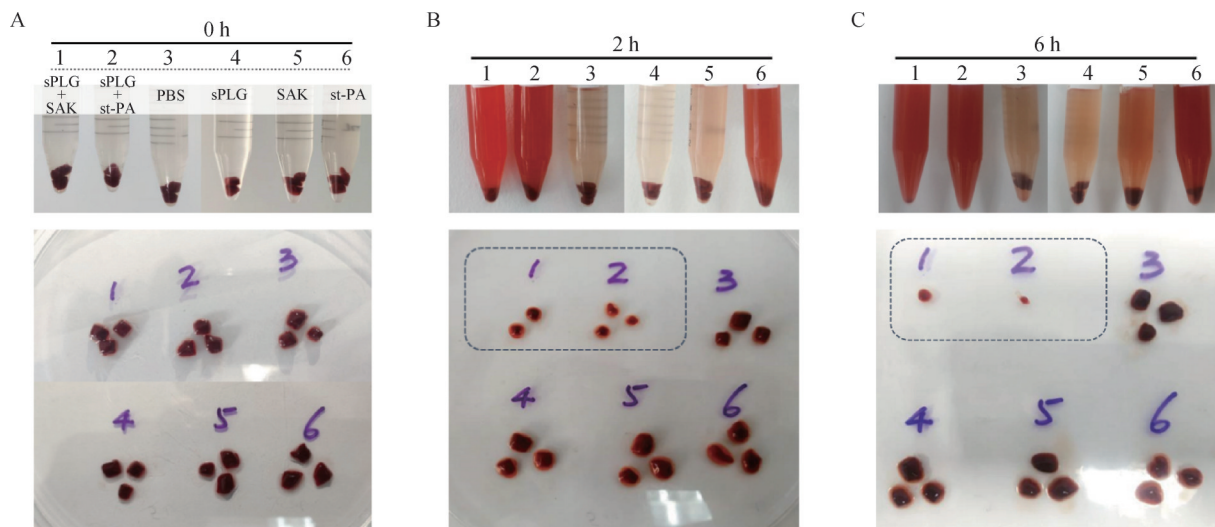
1. Fn; 2. sPLG; 3. SAK; 4. st-PA; 5. sPLG+SAK; 6. sPLG+st-PA. 红色箭头指示为 Fn 降解后的条带

图 5 SAK 或 st-PA 激活 sPLG 后对纤连蛋白 Fn 的降解作用
Fig. 5 Detection of degrading Fibronectin by sPLG activated by SAK or st-PA

原本不存在的蛋白条带,表明纤溶酶原在 SAK 或者 st-PA 的作用下,被激活变成纤溶酶,把 Fn 降解成更小的片段。因此,本试验再次证明,通过猪血提取纯化的 sPLG,具备纤溶酶原的活性,在激活剂的作用下,可以转变成纤溶酶。重组表达的 SAK 和包涵体纯化复性的 st-PA 具备纤溶酶原的激活作用,可以有效将 sPLG 激活,发挥纤溶酶的活性。

2.6 sPLG 体外溶解猪血凝块试验

为了进一步验证纯化的 sPLG, SAK 和 st-PA 的活性,本研究建立了猪血凝块溶解试验。结果显示(图 6),当同时存在 sPLG 和激活剂 SAK 或 st-PA 时,处理 2 和 6 h 后,血凝块明显随着时间的推移逐渐被溶解,体积变小,甚至处理 6 h 后,这两个组原本的血凝块已被溶解至只剩 1~2 mm³ 的体积的血凝块,其中 st-PA 组比 SAK 组溶解后的血凝块更小。而对照组的血凝块大小没有明显的变化,或者在单独 st-PA 组,有轻微的变小。sPLG 被激活后,纤维蛋白被溶解,被纤维蛋白网住滞留的血红细胞被释放出来,悬浮在缓冲液 PBS 中,导致溶液呈鲜红色。因此,组 1(sPLG+SAK)和组 2(sPLG+st-PA)的悬液呈现明显的红色。此外,值得注意的是,第 5 组(SAK)和第 6 组(st-PA)中,反应管中的溶液相



A~C. 分别为添加不同纤溶系统组分的体外溶栓系统在反应 0、2、6 h 的状态。1~6 组各组添加纤溶系统组分分别为: 1. sPLG+SAK; 2. sPLG+st-PA; 3. PBS; 4. sPLG; 5. SAK; 6. st-PA

A-C. The state at 0, 2, and 6 h after reaction of the thrombolytic system in vitro with different fibrinolytic system components added, respectively. The components added in groups 1 to 6 are as follows: 1. sPLG+SAK; 2. sPLG+st-PA; 3. PBS; 4. sPLG; 5. SAK; 6. st-PA

图 6 sPLG、SAK 和 st-PA 建立体外血凝块溶解试验

Fig. 6 Dissolving blood clots in vitro with sPLG, SAK and st-PA

比于PBS对照组,呈现出更深的红色。推测可能血凝块中残留的sPLG在接触到激活剂SAK或st-PA后,也被激活,从而溶解了部分血凝块,由于残留的sPLG较少,因此在血凝块的大小上变化不显著。根据反应管的颜色,也可看出st-PA在溶解猪的血凝块方面,比SAK具有更强促进作用。本试验进一步验证了sPLG,SAK和st-PA三者的活性,此外还建立了体外血凝块溶解试验。

3 讨 论

PLG在血浆中浓度高达 $1\sim 5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,其激活和抑制都受到精密的调控^[18-19]。当PLG与其激活剂共定位于细胞表面,才可被局部激活^[20]。此外,PLG也是病原入侵的重要靶点,如sPLG帮助猪肺炎支原体在体内传播、猪链球菌通过sPLG逃避宿主免疫。

早期的研究表明,使用赖氨酸琼脂糖凝胶,可以从340 mL人血浆中提取纤溶酶原30 mg^[11]。也有研究利用大肠杆菌表达重组人纤溶酶原,通过镍亲和层析、硫酸铵盐析和Sephadex G-75排阻柱纯化,从1 L发酵液中仅获得19 mg重组蛋白^[21]。本研究中建立的Lysine亲和层析串联分子筛层析的纯化方法,可以从猪250 mL血浆中,粗纯获得sPLG 90 mg,精纯获得sPLG 50 mg,纯化效率和收率比之前的方法有明显提高。此外,在本研究纯化sPLG的过程中,分子筛层析洗脱峰显示为单峰,这与早期试验中从人血浆中纯化纤溶酶原洗脱,出现两个峰的现象不同。hPLG的两个峰对应的两种不同大小的蛋白分别为纤溶酶原不同程度的糖基化产物,二者含有的中性糖含量相差4~5倍^[22]。推测sPLG的糖基化类型可能只有一种,因此sPLG表现出单峰,这可能是猪和人的物种差异导致。

t-PA是研究中常用的PLG激活剂。多项研究尝试通过表达重组人组织性纤溶酶原激活剂rt-PA,并进行纯化。Bhatt等^[23]从人胎盘中分离得到非糖基化的Reteplase(rPA)的cDNA,使用pET-28a作为载体进行重组蛋白表达纯化,蛋白以包涵体形式表达,经逐渐透析慢速复性获得活性rPA,产率为4.26 mg/50 mL培养物。Long等^[24]利用大肠杆菌Origami 2菌株实现了全长rt-PA的可溶性表达,之后使用镍亲和层析柱以及离子交换层析进行纯化,从1 L培养物中获得了0.9 mg可溶的活性rt-PA。此外,Nabiabad等^[25]选用转基因烟草作为

生产人rt-PA的载体,rt-PA经赖氨酸琼脂糖层析柱提取,并用HiTrap脱盐柱进一步纯化,得到的rt-PA具有较好的活性,能够将PLG激活为纤溶酶。然而,猪的t-PA的表达与纯化方法尚无研究,导致一些猪病原与PLG及其激活剂的相关研究试验中,只能使用昂贵的人t-PA作为替代。本研究使用大肠杆菌BL21(DE3)作为表达宿主菌,表达重组st-PA,对包涵体形式表达的st-PA提取和复性后,证实其具有激活PLG的活性。

sPLG及其激活剂对于人类血栓的研究也具有潜在价值。近年来,猪被用于多种人类疾病和治疗的研究,如作为器官移植供体^[26-29],猪也是血栓治疗中常用的动物模型^[30-31]。过去的研究初步支持了sPLG用于治疗人类血栓病的可行性^[32],但需要进一步测试sPLG和外源性激活剂作用于人体后的溶栓效果,并评估使用后人体的免疫反应等安全指标。此外,人和猪的PLG、t-PA具有较高的相似性。hPLG和sPLG的氨基酸序列一致性高达99.38%,预测的sPLG三级结构与hPLG的结构重叠性好,偏差仅为0.955 Å。人的t-PA和st-PA的氨基酸序列一致性也达到87.30%,预测的st-PA结构与人t-PA的结构仅偏差0.123 Å。相比于从人血和组织中提取PLG,或是生产重组hPLG,生产sPLG、st-PA的成本将大大降低。因此,未来可以尝试将猪源PLG和t-PA用于人类溶栓药物研究。

4 结 论

本研究成功建立了从猪血中高效提取和纯化猪纤溶酶原的方法,建立了用大肠杆菌表达重组st-PA和SAK并进行纯化的方法,同时sPLG激活试验、Fn降解试验、血凝块溶解试验等均证实提取和纯化的sPLG具备纤溶酶原活性,为猪源性病原与纤溶酶原互作的研究提供了研究材料,同时也为后继可能的人用猪源纤溶酶原药物的研发提供了原材料。

参考文献(References):

- [1] ALKARITHI G, DUVAL C, SHI Y, et al. Thrombus structural composition in cardiovascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(9): 2370-2383.
- [2] ALTAF F, WU S, KASIM V. Role of fibrinolytic enzymes in anti-thrombosis therapy [J]. *Front Mol*

- Biosci*, 2021, 8: 680397.
- [3] COLLEN D, LIJNEN H R. Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential [J]. *Blood*, 1994, 84(3): 680-686.
- [4] KERAGALA C B, MEDCALF R L. Plasminogen: an enigmatic zymogen [J]. *Blood*, 2021, 137(21): 2881-2889.
- [5] CESARMAN-MAUS G, HAJJAR K. Molecular mechanisms of fibrinolysis [J]. *Br J Haematol*, 2005, 129(3): 291-446.
- [6] ALKJAERSIG N, FLETCHER A P, SHERRY S. ϵ -Aminocaproic Acid: an inhibitor of Plasminogen Activation [J]. *J Biol Chem*, 1959, 234(4): 832-837.
- [7] WANG J Y, LI S, CHEN J, et al. Hijacking of host plasminogen by *Mesomycoplasma* (Mycoplasma) hyopneumoniae via GAPDH: an important virulence mechanism to promote adhesion and extracellular matrix degradation [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(3): 12.
- [8] CHEN R, YU Y F, FENG Z X, et al. Featured species-specific loops are found in the crystal structure of Mhp Eno, a cell surface adhesin from *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 209.
- [9] XIE Q Y, XING H X, WEN X, et al. Identification of the multiple roles of enolase as an plasminogen receptor and adhesin in *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. *Microb Pathog*, 2023, 174: 105934.
- [10] ZHOU Y, YAN K, SUN C, et al. Binding of plasminogen to *Streptococcus suis* protein endopeptidase O facilitates evasion of innate immunity in *Streptococcus suis* [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 694103.
- [11] DEUTSCH D G, MERTZ E T. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography [J]. *Science*, 1970, 170(3962): 1095-1096.
- [12] SILVERSTEIN R M. Ion exchange and affinity chromatography during the purification of human plasminogen on sepharose-L-lysine [J]. *Thromb Res*, 1974, 4(5): 675-686.
- [13] PLANQUES Y, PORA H, MENOZZI F D. Affinity purification of plasminogen by radial-flow affinity chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1991, 539(2): 531-533.
- [14] LAW R H, CARADOC-DAVIES T, COWIESON N, et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen [J]. *Cell Rep*, 2012, 1(3): 185-190.
- [15] CAMPBELL E E, SHIFMAN M A, LEWIS J G, et al. A colorimetric assay for releasable plasminogen activator [J]. *Clin Chem*, 1982, 28(5): 1125-8.
- [16] MILES L A, DAHLBERG C M, PLESCIA J, et al. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(6): 1682-1691.
- [17] POLITIS I, WHITE J H, ZAVIZION B, et al. Effect of individual caseins on plasminogen activation by bovine urokinase-type and tissue-type plasminogen activators [J]. *J Dairy Sci*, 1995, 78(3): 484-490.
- [18] ZHANG L, SEIFFERT D, FOWLER B J, et al. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution [J]. *Thromb Haemost*, 2002, 87(3): 493-501.
- [19] SVENNINGSSEN P, HINRICHS G R, ZACHAR R, et al. Physiology and pathophysiology of the plasminogen system in the kidney [J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(11): 1415-1423.
- [20] MILES L A, HAWLEY S B, BAIK N, et al. Plasminogen receptors: the sine qua non of cell surface plasminogen activation [J]. *Front Biosci*, 2005, 10: 1754-1762.
- [21] BIAN L J, JI X, HU W. Isolation and purification of recombinant human plasminogen Kringle 5 by liquid chromatography and ammonium sulfate salting-out [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(7): 957-965.
- [22] HAYES M L, CASTELLINO J F. Carbohydrate of the human plasminogen variants. I. Carbohydrate composition, glycopeptide isolation, and characterization [J]. *J Biol Chem*, 1979, 254(18): 8768-8771.
- [23] BHATT M, MASI H A, PATEL A, et al. Heterologous expression, purification and single step efficient refolding of recombinant tissue plasminogen activator (Reteplase) from *E. coli* [J]. *Protein Expr Purif*, 2024, 221: 106504.
- [24] LONG X B, GOU Y R, LUO M, et al. Soluble expression, purification, and characterization of active recombinant human tissue plasminogen activator by auto-induction in *E. coli* [J]. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 13.
- [25] NABIBAD H S, YAGHOobi M M, JAVARAN M J, et al. Expression analysis and purification of human

- recombinant tissue type plasminogen activator (rt-PA) from transgenic tobacco plants [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2011, 41(2):175-186.
- [26] MEURENS F, SUMMERFIELD A, NAUWYNCK H, et al. The pig: a model for human infectious diseases [J]. *Trends Microbiol*, 2012, 20(1):50-57.
- [27] PABST R. The pig as a model for immunology research[J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 380(2):287-304.
- [28] LUNNEY J K, GOOR A V, WALKER K E, et al. Importance of the pig as a human biomedical model [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(621):eabd5758.
- [29] GRIFFITH B P, GOERLICH C E, SINGH A K, et al. Genetically modified porcine-to-human Cardiac Xenotransplantation[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(1):35-44.
- [30] 李 光,方晓兰,任 仲,等. 重组葡激酶对小型猪冠脉血栓的溶栓作用研究[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(4):369-375.
- LI G, FANG X L, REN Z, et al. Thrombolytic effects of recombinant staphylokinase on coronary thrombosis in miniature pigs [J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2020, 36(4):369-375. (in Chinese)
- [31] 陈 力,陶思丰,龚渭华. 重组人类组织型纤溶酶原激活剂对家猪凝血和免疫指标的影响[J]. 浙江医学, 2003, 25:19-23.
- CHEN L, TAO S F, GONG W H. The effect of recombinant human tissue plasminogen activator on coagulation function and immune response in pigs[J]. *Zhejiang Medicine*, 2003, 25:19-23. (in Chinese)
- [32] NILSSON I M, JOHANSSON L, HEDNER U. Effects of porcine plasmin on the coagulation and fibrinolytic systems in humans [J]. *Blood*, 1978, 51(1):157-164.
- (编辑 范子娟)