

一种分离人血浆纤溶酶原的改良方法

李小明, 喻红, 欧阳静萍

(武汉大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 湖北省武汉市 430071)

[关键词] 临床诊断学; 纤溶酶原; 纯化; 亲和层析

目的 目前国内外分离纯化人血浆纤溶酶原一般直接采用亲和层析法,但由于纤溶酶原与脂蛋白(a)的载脂蛋白(a)具有高度同源性,均含有多个能与赖氨酸结合的 Kringle 结构,因此用赖氨酸(Lys)亲和层析法不能将二者完全分开,得到的纤溶酶原常

有载脂蛋白(a)的污染。本实验尝试建立一种快速、简单分离高纯度纤溶酶原的有效方法。方法 采用多聚阴离子沉淀并结合 Lys-Sepharose 4B 亲和层析法,分离纯化人血浆纤溶酶原。新鲜人血浆于 0.4% 磷钨酸钠、50 mmol/L 氯化镁的作用下沉淀含载脂蛋白 B 的脂蛋白[包括脂蛋白(a)],4℃离心,上清液取出,经透析、浓缩后的样品由 Lys-Sepharose 4B 亲和层析柱吸附 4h,先以 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4,含 500 mmol/L NaCl)洗脱非特异结合蛋白质,再用含 200 mmol/L 6-氨基正己酸的磷酸盐缓冲液洗脱特异结合的纤溶酶原,收集的洗脱液用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4,含 150 mmol/L NaCl)充分透析、浓缩。样品经 10% SDS-PAGE、Western blotting 鉴定纤溶酶原分子质量及纯度,并以尿激酶激活纤溶酶原,水解底物 S-2251 产生发色基团 P-NA 的发色底物法测定纤溶酶活性。结果 分离的蛋白样品于 SDS-PAGE 鉴定,显示只有一条蛋白带,分子质量约为 85 kDa。Western blotting 也证实无载脂蛋白(a)的污染。纯化的蛋白显示具有较高的纤溶酶活性。结论 利用多聚阴离子沉淀结合亲和层析法优化了分离纯化人血浆纤原的常规方法,从而获得无载脂蛋白(a)干扰的高纯度的纤溶酶原,为进一步研究相关的脂蛋白(a)的结构、性质和功能奠定一定的基础。

(此文编辑 胡必利)