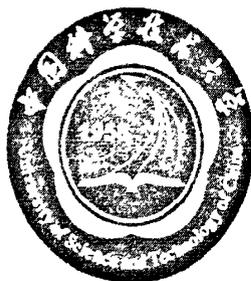


Y1909070

University of Science and Technology of China
A dissertation for doctor's degree



**Identification of anticoagulant
hypotensive effect of FIX/FX-bps from
the venom of Agkistrodon acutus and
Conformation-specific affinity
purification of factor IX and factor X**

Author's Name : Shen Dengke
speciality : Analytical Chemistry
Supervisor : Assoc. Prof. Xu Xiaolong Prof. Su Qingde
Finished time: May 3th, 2011



中国科学技术大学学位论文原创性声明

本人声明所呈交的学位论文,是本人在导师指导下进行研究工作所取得的成果。除已特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含任何他人已经发表或撰写过的研究成果。与我一同工作的同志对本研究所做的贡献均已在论文中作了明确的说明。

作者签名: 沈登科

签字日期: 2011.6.9

中国科学技术大学学位论文授权使用声明

作为申请学位的条件之一,学位论文著作权拥有者授权中国科学技术大学拥有学位论文的部分使用权,即:学校有权按有关规定向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅,可以将学位论文编入《中国学位论文全文数据库》等有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人提交的电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

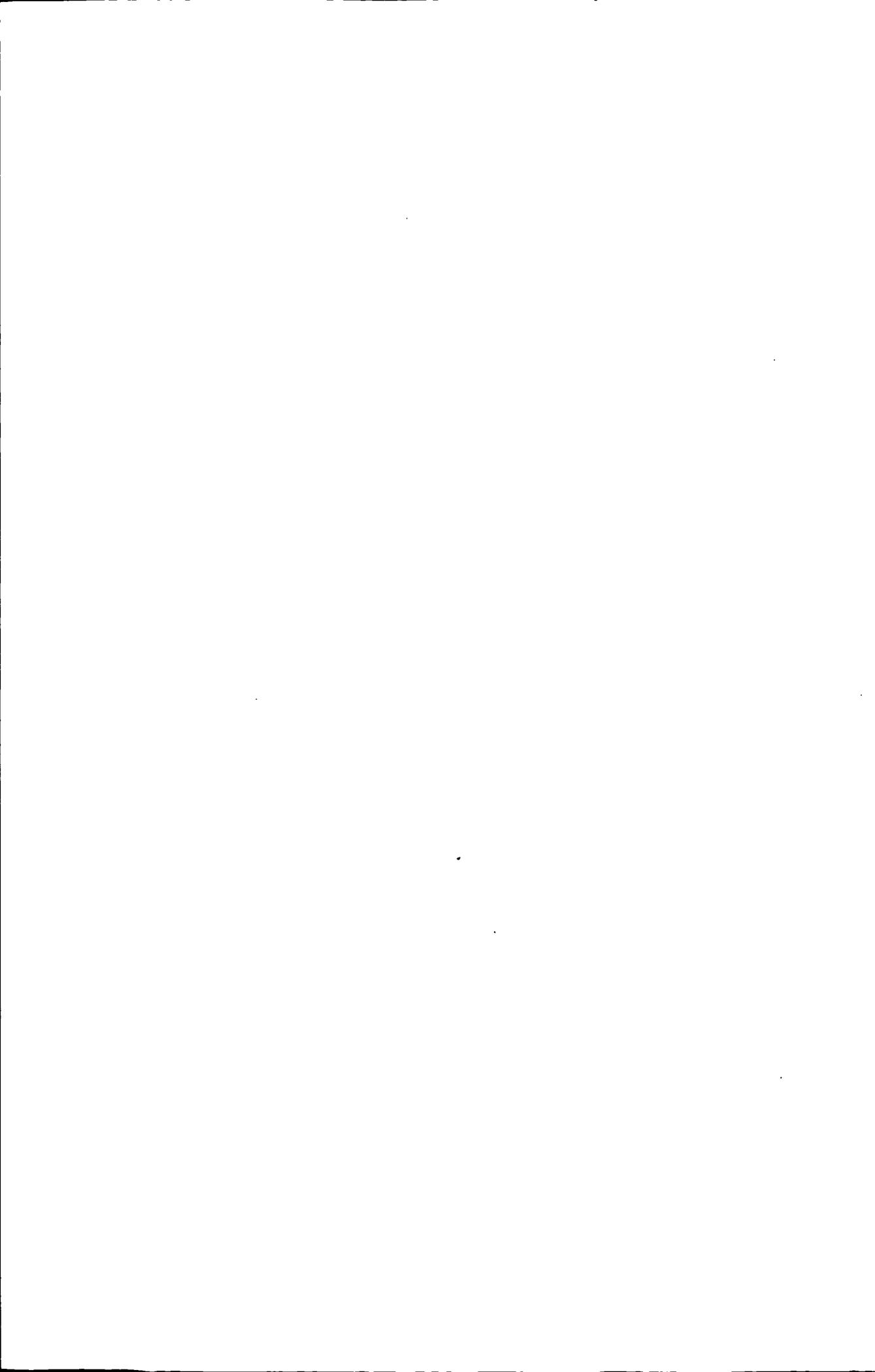
公开 保密(____年)

作者签名: 沈登科

导师签名: 徐小虎

签字日期: 2011.6.9

签字日期: 2011-6-9



目 录

第一章 综述	1
1.1 血液凝固与蛇毒调节凝血蛋白的研究进展	1
1.1.1 血液凝固的生理过程	1
1.1.2 调节血液凝固过程的 C-型凝集素类似蛋白	3
1.2 凝血因子 IX/X 结合蛋白家族的研究进展	6
1.2.1 凝血因子 IX/X 结合蛋白家族的发现	6
1.2.2 凝血因子 IX/X 结合蛋白家族的生理生化性质	8
1.3 凝血因子 IX 和凝血因子 X 及它们纯化方法的研究进展	11
1.3.1 凝血因子 IX 研究进展	11
1.3.2 凝血因子 X 研究进展	14
1.3.3 凝血因子 IX 的纯化	16
1.3.4 凝血因子 X 的纯化	18
第二章 蛇毒抗凝血因子 ACF II 抗凝血活性及其机理、结构稳定性及其影响因素对活性的影响	27
2.1 引言	27
2.2 实验仪器和材料	27
2.2.1 实验仪器	27
2.2.2 实验材料	28
2.3 实验方法	28
2.3.1 ACF I 和 ACF II 的纯化	28
2.3.2 ACF I 和 ACF II 的对大鼠在体抗凝血实验	29
2.3.3 ACF II 和 FX 的电泳结合实验	29
2.3.4 表面等离子体共振法 (SPR) 测定 ACF II 和 FX 的结合动力学	29
2.3.5 表面等离子体共振法 (SPR) 测定 ACF II 和 FIX 的结合动力学	30
2.3.6 等温滴定微量热法 (ITC) 测定 ACF II 和金属离子的结合动力学	30
2.3.7 荧光分光光度法测定金属离子对 ACF II 的热力学稳定性和的影响	31

2.3.8 荧光分光光度法测定金属离子对 ACF II 的化学稳定性的影响	32
2.3.9 圆二色谱法 (CD) 测定金属离子对 ACF II 的热稳定性的影响	33
2.3.10 圆二色谱法 (CD) 测定金属离子对 ACF II 的化学稳定性的影响	33
2.3.11 差示扫描微量热法 (DSC) 测定金属离子对 ACF II 的热稳定性的影响	34
2.4 实验结果	35
2.4.1 ACF I 和 ACF II 的纯化	35
2.4.2 ACF I 和 ACF II 的对大鼠在体抗凝血实验	37
2.4.3 ITC 检测金属离子与 ACF II 的结合	40
2.4.4 金属离子结合 ACF II 对其结构的影响	43
2.4.5 通过 PAGE 检测金属离子调控 ACF II 和 FX 结合	45
2.4.6 使用 SPR 分析金属离子对 ACF II 与 FXa 结合反应的影响	46
2.4.7 通过 PAGE 检测金属离子调控 ACF II 和 FIX 结合	48
2.4.8 使用 SPR 分析金属离子对 ACF II 与 FIXa 结合反应的影响	49
2.4.9 荧光检测金属离子对 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠的影响	51
2.4.10 CD 分析金属离子对 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠的影响	53
2.4.11 金属离子对 ACF II 热稳定性的影响	55
2.4.12 DSC 分析金属离子对 ACF II 热稳定性的影响	57
2.5 实验讨论	61
第三章 高效亲和层析纯化凝血因子 IX 和凝血因子 X	69
3.1 引言	69
3.2 实验仪器和材料	70
3.2.1 实验仪器	70
3.2.2 实验材料	71
3.3 实验方法	71
3.3.1 CNBr-activated Sepharose 4B 偶联 ACF I 的制备	71
3.3.2 血液的采集和血浆的制备	71
3.3.3 钡盐吸附法获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物	72
3.3.4 Sephadex A-50 柱层析法获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物	72
3.3.5 ACF I-Sepharose 4B 亲和色谱	72
3.3.6 凝血因子 X 的活性检测	73
3.3.7 凝血因子 IX 的活性检测	73

3.3.8 快速蛋白质液相层析 (FPLC) 分离 FIX 和 FX·····	74
3.3.9 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法 (LC-ESI-MS/MS) 分析·····	74
3.3.10 表面等离子体共振法 (SPR) 测定 ACF II 与 FIX/FX 的结合活性·····	75
3.4 实验结果·····	75
3.4.1 凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物的分离制备·····	75
3.4.2 FPLC 对凝血因子 IX 和凝血因子 X 进一步纯化·····	77
3.4.3 测定酶活力并计算两步色谱法的收率·····	78
3.4.4 鸟枪法蛋白质组学鉴定凝血因子 IX 及凝血因子 X·····	79
3.4.5 SPR 鉴定凝血因子 IX 及凝血因子 X 与 ACF II 的结合活性·····	82
3.5 实验讨论·····	83
第四章 蛇毒多功能蛋白 ACF II 降血压活性及其机理·····	89
4.1 引言·····	89
4.2 实验仪器和材料·····	89
4.2.1 实验仪器·····	89
4.2.2 实验材料·····	89
4.3 实验方法·····	90
4.3.1 大鼠在体心血管实验·····	90
4.3.2 离体血管环的舒张实验·····	90
4.3.3 数据统计与分析·····	91
4.4 实验结果·····	91
4.4.1 ACF II 对麻醉的正常血压大鼠的降血压作用·····	91
4.4.2 ACF II 介导 NO 释放的降血压作用·····	94
4.4.3 ACF II 对苯肾上腺素预收缩的动脉血管环的舒张作用·····	96
4.4.4 NO 介导 ACF II 对动脉血管环的舒张作用·····	98
4.5 实验讨论·····	99
致谢·····	106
在读期间发表的学术论文与取得的其他研究成果·····	107



摘 要

C-型凝集素类似蛋白具有与 C-型凝集素类似的结构,但没有凝集素活性。蛇毒中 C-型凝集素类似蛋白具有多种生物活性,包括抗凝血和血小板调节活性。凝血因子 IX/凝血因子 X 结合蛋白属于 C-型凝集素类似蛋白,它们广泛存在于蝰科蛇毒中。它们都是通过与血液中凝血因子 IX 或者凝血因子 X 结合来抑制凝血反应,所有结合反应都依赖于 Ca^{2+} 等离子。尖吻蝮蛇毒中抗凝血因子 I (ACF I) 和抗凝血因子 II (ACF II) 是凝血因子 IX/X 结合蛋白家族中的两个新成员。本论文主要研究金属离子对 ACF I 和 ACF II 的结构稳定性和功能的影响、ACF I 和 ACF II 对血液循环系统的影响以及它们在亲和纯化凝血因子 IX 和凝血因子 X 方面的应用。全文分为四章。

第一章:我们对凝血过程分子机理、凝血因子 IX 和凝血因子 X 等重要凝血因子的性质和功能、凝血因子 IX 和凝血因子 X 纯化技术、C-型凝集素类似蛋白以及凝血因子 IX/X 结合蛋白家族等进行了综述。

第二章:我们研究了 ACF I 和 ACF II 在体内抗凝血活性、碱土金属离子与 ACF I 和 ACF II 的结合反应以及它们对 ACF I 和 ACF II 的结构稳定性和功能的影响。ACF I 和 ACF II 在老鼠体内表现出显著的抗凝血活性,它们都显著延长 APTT 和 PT,都对 TT 没有影响,表明它们的抗凝血作用与抑制凝血因子 IX/X 活性有关。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和表面等离子共振的结果都显示,ACF II 与 FXa 结合反应不是绝对依赖于 Ca^{2+} , Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 也可以诱导 ACF II 与 FXa 结合反应。与 ACF II 结合的金属离子半径不仅显著影响金属离子与 ACF II 结合亲和性,而且也显著影响 ACF II 抗 GdnHCl 变性和热变性的结构稳定性。而与凝血因子 X 结合的金属离子半径显著影响 ACF II 与 FX 结合亲和性。金属离子对 ACF II 亲和性强弱和金属离子诱导 ACF II 结构稳定性的能力大小遵循相同顺序: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ 。而金属离子诱导的 ACF II 与 FX 结合反应的能力大小为: $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ 。虽然 Mg^{2+} 对 ACF II 的亲和性最低,但 Mg^{2+} 诱导 ACF II 与 FX 结合反应能力最强。我们的实验结果表明,金属离子与 ACF II 结合能显著增强 ACF II 结构稳定性,但金属离子与 ACF II 的结合反应不是 ACF II 与 FXa 发生结合反应的前提条件;金属离子与 FXa 结合反应才是 ACF II 与 FXa 相互识别的前提条件。另外,ACF II 是基于金属离子半径选择结合 Ca^{2+} 。

第三章:我们利用凝血因子 IX/X 结合蛋白作为亲和配基,建立了快速高效亲和纯化凝血因子 IX 和凝血因子 X 的方法。新配基结合凝血因子 IX 及凝血因子 X 的亲和能力强,而且在温和的条件下就可以方便地洗脱下来凝血因子 IX 和

凝血因子 X。通过凝血因子 IX/X 结合蛋白亲和柱层析,可以直接从任何血浆中分离出仅含有凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物。再经过 FPLC 共两步色谱就可同时得到高纯度的凝血因子 IX 和凝血因子 X。该方法纯化效率和产率与单克隆抗体亲和层析方法相当。单克隆抗体的制备方法繁琐,抗体价格昂贵,而抗体不稳定。而新配基凝血因子 IX/X 结合蛋白是天然配基,长期稳定,价格便宜,很方便大规模工业制备。另外,用单克隆抗体亲和层析只能从一个特定动物血浆中纯化一种凝血因子,而用新亲和层析方法可以从任何血浆和溶液中同时纯化出凝血因子 IX 和凝血因子 X。因此新亲和层析方法可在工业上用来大规模纯化凝血因子 IX 和凝血因子 X,以便为 B 型血友病患者提供高纯而廉价的凝血因子 IX。

第四章: 我们研究了 ACF I 和 ACF II 对大鼠血液循环系统的影响,发现 ACF II 具有显著的降血压活性,但对心率没有产生显著的影响。静脉注射 ACF II 能迅速导致大鼠血压显著下降并在几十秒后达到最大下降幅度,接着血压缓慢升高,恢复到明显低于给药前水平的平台值,并长期维持这个较低血压的平台状态。在体外,ACF II 能诱导血管舒张。血管内皮细胞中有一氧化氮(NO)合成酶,该酶合成 NO。NO 是信号分子,它能诱导血管平滑肌舒张。N-硝基精氨酸甲酯(L-NAME)是 NO 合成酶抑制剂。在体外,L-NAME 能显著抑制 ACF II 的舒张血管活性;在体内,L-NAME 能显著抑制 ACF II 的降血压活性。由此可知,ACF II 通过 NO 信号途径诱导血管舒张从而导致血压下降。因此 ACF II 是凝血因子 IX/X 结合蛋白家族中一个独特的多功能蛋白,它通过不同途径作用于血液系统,兼具抗凝血和降血压双重活性。尽管 ACF I 和 ACF II 具有十分相似的空间结构,但 ACF I 没有任何降压活性。

Abstract

C-type lectin-like proteins (CLPs) have similar structures to that of C-type lectins, but they have no lectin activity. The CLPs from snake venom have a variety of biological activities, including anticoagulant- and platelet-modulating activities. A family of coagulation factor IX/factor X-binding protein (IX/X-bp) which belongs to CLPs has been identified from the venoms of different snake species. IX/X-bps interact with the γ -carboxyglutamic acid (Gla) domain of factor IX/IXa and/or factor X/Xa in a Ca^{2+} -dependent manner and thereby block the amplification of the coagulation cascade. Anticoagulation factor I (ACF I) and anticoagulation factor II (ACF II) purified from the venom of *Agkistrodon acutus* are two members of the IX/X-bp protein family. In this thesis, the effects of metal ions on the structural stability and function of ACF I and ACF II, the hypotensive effects of ACF I and ACF II on the cardiovascular system, and their application in the purification of coagulation factor IX and coagulation factor X have been investigated. The whole thesis is divided into four chapters.

The first chapter gives a brief overview of the molecular mechanism of coagulation process, the character and function of the important coagulation factors, especially on coagulation factor IX and coagulation factor X, the purification technology of coagulation factor IX/X, C-type lectin-like proteins, and coagulation factor IX/X-binding protein family.

In the second chapter, the anticoagulant activity of ACF I and ACF II *in vivo*, the thermodynamics of the binding of alkaline earth metal ions to ACF II and their effects on the stability of ACF II and the binding of ACF II to FXa were investigated by isothermal titration calorimetry, fluorescence, differential scanning calorimetry and surface plasmon resonance, respectively. Both ACF I and ACF II exhibit high anticoagulation activity *in vivo*. The binding of ACF II to FXa does not have an absolute requirement for Ca^{2+} . Mg^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} can induce the binding of ACF II to FXa. The radii of the cations bound in ACF II crucially affect the binding affinity of ACF II to cations and the structural stability of ACF II against GdnHCl and thermal denaturation, while the radii of cations bound in FXa markedly affect on the binding affinity between ACF II and FXa. The binding affinities of ACF II for cations and the capacities of metal-induced stabilization of ACF II follow the same trend $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$

> Ba²⁺. The metal-induced binding affinities of ACF II to FXa follow the trend Mg²⁺ > Ca²⁺ > Sr²⁺ > Ba²⁺. Although Mg²⁺ shows significantly low binding affinity with ACF II, Mg²⁺ is the most effective to induce the binding of ACF II with FXa. Our observations suggest that in blood, the bindings of Ca²⁺ in two sites of ACF II increase the structural stability of ACF II, but these bindings are not essential for the binding of ACF II with FXa, and that the binding of Mg²⁺ and Ca²⁺ to FXa may be essential for the recognition between FXa and ACF II. Like Ca²⁺, the abundant Mg²⁺ in blood also plays an important role in the anticoagulation of ACF II.

In the third chapter, we have developed an rapid affinity chromatography procedure using coagulation factor IX/factor X-binding proteins as novel affinity ligands to isolate coagulation factor IX and coagulation factor X from plasma. The native affinity ligands efficiently bind FIX/FX and release them under very mild conditions. FIX and FX can be simultaneously purified from unclarified plasma by IX/X-bps affinity chromatography followed by HPLC with a purification factor and yield similar to that of monoclonal antibody immunoaffinity chromatography. In contrast to monoclonal antibody that is cumbersome, expensive and suffer from its instability, the novel affinity ligands IX/X-bps are long-term stable and cheap to prepare in large scale. In addition, monoclonal antibody immunoaffinity chromatography is used to purify FIX only from the specific plasma, while the new affinity chromatography can be used to purify both FIX and FX from any unclarified plasma or solutions. This new affinity chromatography has potential application for the industrial scale purification of FIX and FX for specific replacement therapy in hemophilia B and patients with FX deficiency.

In the fourth chapter, the effects of ACF I and ACF II on the mean arterial blood pressure (MABP) and heart rate (HR) in anesthetized rats have been investigated. The results indicate that ACF II induces a dose-dependent response in rats with a short fast drop of MABP followed by an increase and then a longer lasting slight decrease in MABP, but does not obviously affect HR. ACF II-induced hypotension is significantly blocked by the NO synthase inhibitor N-omega-L-arginine methyl ester (L-NAME). ACF II produces a concentration-dependent relaxation of rat aortic rings with functional-endothelium. The ACF II-induced vasodilatation is completely inhibited by removal of endothelium and significantly inhibited by pretreatment with L-NAME. These observations demonstrate that ACF II induces hypotension through an endothelium-dependent vasodilation, which is strongly mediated by the release of NO

from endothelium. Therefore, ACF II is so far identified as the first unique bifunctional protein in the IX/X-bp family that has both anticoagulant and hypotensive effects on the blood of rats through different pathways. However, ACF I does not show any hypotensive effect in rats.



第一章 绪论

1.1 血液凝固与蛇毒调节凝血蛋白的研究进展

1.1.1 血液凝固的生理过程

血液凝固反应是人或动物的一个重要的自我保护的生理反应,血液凝固过程的生理意义在于,它在血管损伤后维护一个完整封闭的高压循环系统。血管壁的损伤和血液从血管的外渗都会迅速触发凝血反应,完成修复和止血作用 [1, 2]。血液凝固的过程,是血液经一系列酶促反应,纤维蛋白原转变为不溶解的纤维蛋白,血液由溶胶状态转变为凝胶状态的生化过程 [3]。凝血系统的功能正常与否严重影响人类的健康,很多疾病都和凝血系统有着直接或是间接的联系,所以深入研究凝血系统意义重大。

正常的凝血过程是血液中一系列凝血因子相继酶解激活的过程,最终形成纤维蛋白。参与凝血的因子有十余种,除 Ca^{2+} 和磷脂外其余凝血因子均为蛋白质,其中起到关键作用的有多个凝血因子,包括:一,凝血因子I,纤维蛋白原(fibrinogen),其 γ 链C端氨基酸与血小板糖蛋白IIb/IIIa结合,从而诱发血小板的聚集,同时纤维蛋白原也参与凝血反应的其他多个过程 [4]。二,凝血因子II,凝血酶原(prothrombin),其273位精氨酸-274位苏氨酸键处可以被活化凝血因子X-活化凝血因子V复合物(FXa-FVa)裂解而激活成为凝血酶。凝血酶的结构含有重链A及轻链B,由二硫键连接,分子量为36 kD,其主要生理活性是激活多种凝血因子并诱导血小板的聚集反应 [5]。三,凝血因子III,组织因子(tissue factor, TF),它是一种穿膜糖蛋白,由263个AA组成,其N端有一219个氨基酸残基的肽段,在膜外,则是FVII及FVIIa的受体 [6]。TF在外源凝血系统中起重要作用,细胞表面的TF与血浆中的凝血因子VII(FVII)结合形成的复合物,在活化凝血因子X(FXa)的作用下,可激活为TF-FVIIa,后者参与活化凝血因子IX(FIX)及凝血因子X(FX),活化凝血因子IX(FIXa)与活化因子VII(FVIIa)所形成的复合物又可激活FX [7]。四,凝血因子V(Factor V, FV),由2196个AA组成的单链糖蛋白,其分子量为330 kD [8]。FV有A、B、C三个结构区,排列顺序为 $A_1-A_2-B-A_3-C_1-C_2$ 。在凝血酶作用下,FV裂解除去B区形成重链 A_1-A_2 (分子量105 kD)及轻链 A_3-C_2 (分子量73 kD)由 Ca^{2+} 连接。另外,FXa及纤溶酶也能激活FV。FVa能够与FXa形成复合物,从而激活凝血酶原成为凝血酶 [9]。

五, 凝血因子VII (Factor VII, FVII), 其轻链上的上皮生长因子 (EGF) 结构域有一个非谷氨酸依赖的 Ca^{2+} 结合部位, 这是FVII 被活化所必需的。TF-FVIIa复合物在凝血过程的引发起始阶段中发挥重要作用, 它可以激活FX和FIX。此外, FVIIa在磷脂和 Ca^{2+} 存在的条件下也能够活化FX。六, 凝血因子VIII (Factor VIII, FVIII), 由 2332 个氨基酸组成的单链糖蛋白, 其分子量为 320 kD [10]。FVIII有 A、B、C三个结构区, 排列顺序为 $A_1-A_2-B-A_3-C_1-C_2$ 。活化凝血因子VIII (FVIIIa) 可以在磷脂表面与FIXa形成FVIIIa-FIXa复合物, 该复合物具有激活FX的作用 [11]。FVIII的基因突变、缺失、插入异常片段、重排都有可能诱发血友病A型 [12, 13]。七, 凝血因子IX (Factor IX, FIX), 是分子量在 56 kD左右的单链糖蛋白, 它可以被TF-FVIIa复合物或者活化的凝血因子XI (FXIa) 激活 [14]。血友病B型的是由遗传性缺乏凝血因子IX引起的, 其发病机制可以是基因缺失、点突变 [13, 15]。八, 凝血因子X (Factor X, FX), 是一个结构与凝血因子IX类似的分子量在 59 kD左右的双链糖蛋白, FXa-FV复合物能够激活凝血酶原形成凝血酶 [16, 17]。九, 凝血因子XI (Factor XI, FXI), 是由二个相同的亚基通过两对二硫键连接而成, 其中每一亚基由 607 个AA组成。活化的凝血因子XI (FXIa) 不仅能够激活凝血因子IX, 还能激活FXII [18, 19]。十, 凝血因子XII (Factor XII, FXII), FXII被带负电荷的表面接触激活。活化的凝血因子FXII (FXIIa) 是由重链和轻链组成, 其生理作用发生在凝血的初始步骤 [2]。

血浆的凝血过程可以分为两个阶段: 引发起始阶段和扩大凝固阶段。图 1.1 表示了血浆凝血过程的起始阶段, 图 1.2 表示的是血浆凝血过程的扩大阶段。当组织和血管损伤后, 会释出组织因子 (TF), 凝血过程的起始阶段从TF的产生开始, TF激活的凝血因子FVII (FVIIa) 形成复合物 (TF-FVIIa), 该复合物可激活凝血因子X和凝血因子IX。活化态的凝血因子X与凝血因子V结合形成FXa-FV的复合物, 这个复合物可以催化凝血酶原转变为凝血酶。凝血酶是凝血过程发挥非常重要的作用, 它可以活化多个凝血因子, 其中包括凝血因子V、凝血因子VIII和凝血因子XI, 从而将凝血反应带入扩大阶段 [20]。活化的凝血因子XI会激活凝血因子IX, 而被激活的凝血因子IX和被激活的凝血因子VIII, 会形成FIXa-FVIIIa复合物, 这个复合物再将凝血因子X活化。与引发起始阶段一样, 活化的凝血因子X和活化的凝血因子FV结合形成复合物FXa-FVa, 这个复合物又激活凝血酶原转变为凝血酶。从这里可以看出, 引发起始阶段的凝血酶原被激活, 导致扩大凝固阶段激活更多的凝血酶原, 并使这个瀑布反应迅速扩大。而无论是起始阶段还是扩大阶段, 凝血酶原的激活都需要凝血因子的X的参与, 所以, 凝血因子X是调控凝血过程的一个关键因子。

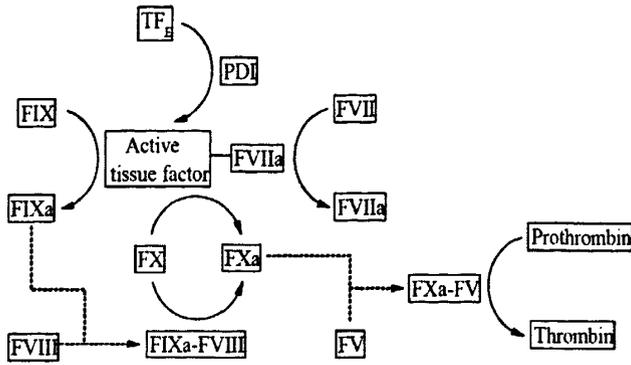


图 1.1 血液凝固过程的引发起始阶段

Fig.1.1 The Mechanism of Initiation of Thrombin Production

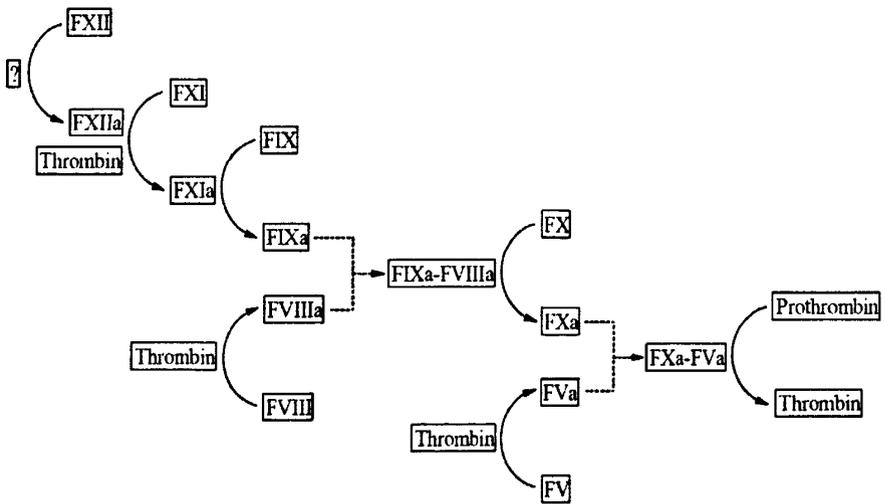


图 1.2 血液凝固过程的扩大凝固阶段

Fig.1.2 Amplification: Burst of Thrombin Production

1.1.2 调节血液凝固过程的 C-型凝集素类似蛋白

C-型凝集素类似蛋白 (CLP) 具有多种生物活性, 包括抗凝血和血小板调节活动, 但没有凝集素的活性 [21, 22]。在过去的几十年里, 从各种蛇的毒液都发

现了具有各种生理活性的C-型凝集素类似蛋白家族成员。CLP由异源二聚体或异源多聚体组成,而蛇毒来源的CLP都是金属离子依赖性的二聚体或多聚体。这些CLP包括凝血因子IX/X的结合蛋白 [23]、凝血因子X激活剂 [24]、凝血酶原激活剂 [25]等等。蛇毒中发现的CLP的基本结构包括两个同源亚基:亚基a (A链) 14-15 kDa和的亚基b (B链) 13-14 kDa。这些亚基均含有一个离子依赖性的糖类识别结构域,CLP会发生在各种各样的低聚,包括 $\alpha\beta$, $(\alpha\beta)_2$, $(\alpha\beta)_4$ 。这些CLP的各个亚基通过二硫键相互连接 [26, 27]。

CLP构成的新蛋白质家族,成为阐明凝血和血小板活化所涉及的机理的有用工具,并可以用来研究凝血因子和血小板糖蛋白的结构与功能的关系。

表 1.1 对凝血系统具有调节作用的蛇毒来源的 C-型凝集素 (CLP)

功能	蛋白	结构	结合受体或作用底物	引文
抗凝血	IX/X-bp, IX-bp	$\alpha\beta$	Factor IX	[28, 29]
	IX/X-bp, X-bp	$\alpha\beta$	Factor X	[30, 31]
	Bothrojaracin	$\alpha\beta$	a-Thrombin	[32]
促凝血	RVV-X	$\alpha\beta$ /metalloprotease	Factor X	[24]
	Carinactivase-1	$\alpha\beta$ /metalloprotease	Prothrombin	[33]
血小板激动剂	Botrocetin, biltiscetin	$\alpha\beta$	vWF	[34]
	Alboaggregin-B	$\alpha\beta$	GPIba	[35]
	Agglucetin	Tetrameric	GPIba	[36]
	Aggregin/rhodocytin	$\alpha\beta$	GPIa/IIa	[37]
	Convulxin	$(\alpha\beta)_4$	GPVI	[38]
血小板拮抗剂	Echicetin	$\alpha\beta$	GPIba	[39]
	Flavocetin-A	$(\alpha\beta)_4$	GPIba	[40]
	EMS 16	$\alpha\beta$	GPIa/IIa	[41]

表 1.1 中列出了一系列影响凝血系统的 CLP,按它们的生理活性可以分为四类:抗凝血活性,促凝血活性以及血小板活性的调制器(激动剂和拮抗剂)。

第一类，抗凝血活性蛋白，包括凝血因子X结合蛋白（X-bp） [30]，凝血因子IX结合蛋白（IX-bp） [28]，和凝血因子IX/X结合蛋白（IX/X-bp） [42]，它们都是二硫键相连的异二聚体的C-型凝集素类似蛋白，它们的抗凝血活性大部分是Ca²⁺依赖型的。另外，bothrojaracin，是一个具有抗凝血活性的类水蛭素凝血酶抑制剂。虽然它也是CPL，但是其生物活性并不受Ca²⁺的调控和影响 [32]。

第二类，促凝血活性蛋白，比如具有凝血因子X的激活活性的RVV-X [24]、具有凝血酶原的激活活性的carinactivase-1 [33]，它们都是金属蛋白酶，RVV-X的C-型凝集素类似蛋白结构域可以特异性的识别凝血因子X的Gla结构域，carinactivase-1的C-型凝集素类似蛋白结构域可以特异性的识别凝血酶原。

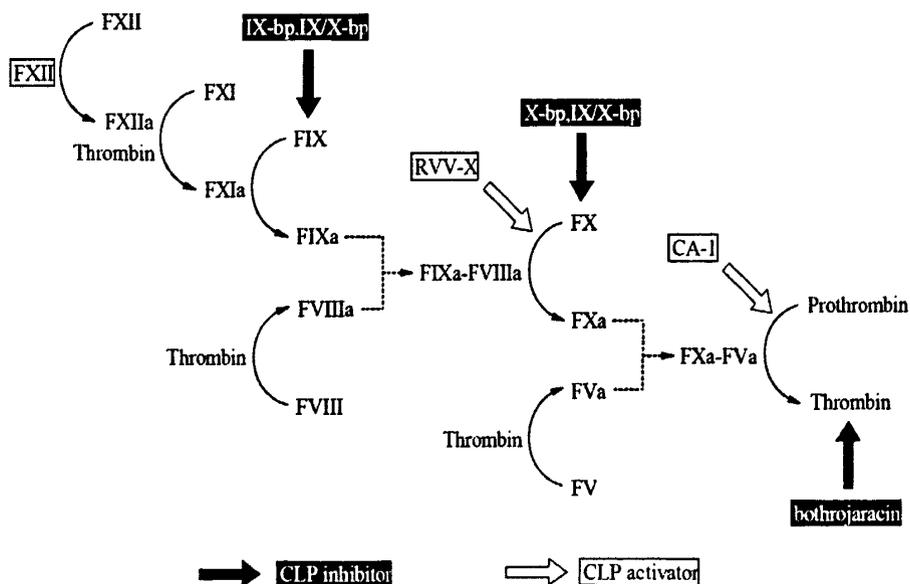


图 1.3 作用凝血过程的 CLP

Fig.1.3 Effects of inhibitors and activators of venom CLPs on reactions in the blood coagulation cascade.

第三类，血小板活性激动剂，它们在血小板上的受体是血小板细胞膜上的糖蛋白。Botrocetin和bitiscetin会诱导血友病因子（vWF）和血小板细胞膜上的糖蛋白Ib（GPIb）结合从而激活血小板的聚集，而Alboaggregin-B则直接结合GPIb诱导血小板聚集 [34, 35, 43, 44]。

第四类, 血小板活性拮抗剂, 这也是一类作用于血小板细胞膜上的糖蛋白的 CLP, 但是它们产生的生理作用是抑制血小板聚集。Echicetin, agkicetin和 flavocetin-A都可以通过与GPIb结合而延缓血小板聚集 [39, 40, 45, 46]。

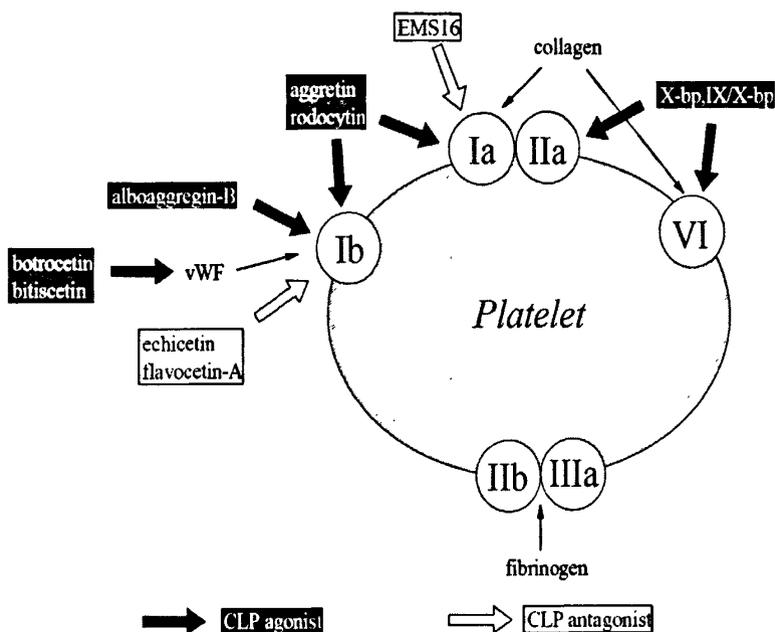


图 1.4 作用于血小板的CLP [47]

Fig.1.4 CLPs from snake venom that modulate the platelet function [47]

1.2 凝血因子 IX/X 结合蛋白家族的研究进展

1.2.1 凝血因子 IX/X 结合蛋白家族的发现

凝血因子IX/X结合蛋白是一类通过结合凝血因子IX或者凝血因子X而具有抗凝血活性的蛋白。最初, Ouyang等人从尖吻蝮蛇 (*Agkistrodon acutus*) 蛇毒中纯化到一种不具有酶活性的抗凝血成分, 并发现其可以抑制凝血酶原的激活 [48]。随后, Teng等人报道, 尖吻蝮蛇蛇毒中的抗凝血活性成分是通过可逆性的结合凝血因子X而抑制凝血酶原激活的 [49]。

表 1.2 部分凝血因子 IX/X 结合蛋白

来源	结合配体	名称	文献
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	FIX/FX	huba IX/X-bp	[42]
<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	FIX	huba IX-bp	[28]
<i>Bothrops jararaca</i>	FIX/FX	jararaca IX/X-bp	[50]
<i>Echis carinatus leucogaser</i>	FIX/FX	ECLV IX/X-bp	[29]
<i>Agkistrodon acutus</i>	FIX/FX	ACF I	[51]
<i>Agkistrodon acutus</i>	FIX/FX	ACF II	[31]
<i>Agkistrodon halys Pallas</i>	FIX/FX	AHP IX/X-bp	[52, 53]
<i>Scapharca broughtonii</i>	FX	SCBR X-bp	[30]
<i>Deinagkistrodon acutus</i>	FX	X-bp	[54]

1989年Atoda等人报道,从黄绿烙铁头(*Trimeresurus flavoviridis*, habu snake)蛇毒中分离纯化出一种不具有酶活性的抗凝血成分,其抗凝血的机理是这个蛋白在 Ca^{2+} 存在的条件下可以与凝血因子IX或者凝血因子X分别结合形成1:1的复合物,于是将这个蛋白命名为habu凝血因子IX/X结合蛋白(huba IX/X-bp) [42]。随后,Atoda实验组完成了对huba IX/X-bp的全部氨基酸序列的测定 [26],并将huba IX/X-bp结构中两个二硫键连接的模式与其他的C-型凝集素比对 [55],于是将IX/X-bp鉴定为C-凝集素类似蛋白。1993年, Sekiya等人从美洲矛头蝮蛇(*Bothrops jararaca*)蛇毒中也纯化得到了一个结构和功能与huba IX/X-bp相似的抗凝血蛋白,并命名为jararaca IX/X-bp [50]。1995年,Atoda等人从黄绿烙铁头蛇毒中纯化得到另一个具有抗凝血活性的蛋白,并报道其只能与凝血因子IX结合,而不能与凝血因子X结合,故命名为hahu IX-bp [28]。1996年,Chen等人从锯鳞蝮蛇(*Echis carinatus leucogaser*)蛇毒中纯化得到一种结构和功能与huba IX/X-bp相似的抗凝血蛋白,并命名为ECLV IX/X-bp [29]。

此后,在其他蛇毒中陆续发现了多种凝血因子 IX/X 结合蛋白,它们大部分

都与最先发现的 huba IX/X-bp 有着类似的结构和功能,是由两个二硫键连接的两个同源性很高的亚基,在 Ca^{2+} 存在的条件下和凝血因子 IX 或者凝血因子 X 发生 1: 1 的结合。部分目前已经报道的凝血因子 IX/X 结合蛋白列在表 1.2 中。

1.2.2 凝血因子 IX/X 结合蛋白家族的活性及其生化性质

凝血因子 IX/X 结合蛋白最主要的活性就是与凝血因子 IX 或者凝血因子 X 的结合。这个结合反应可以通过非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)、酶联免疫法 (ELISA), 高效液相色谱法 (HPLC) 进行定性定量的测定, 等温滴定微量热 (ITC) 和表面等离子体共振 (SPR) 也可以应用到测定结合反应的动力学参数。

最早对凝血因子 IX/X 结合蛋白与凝血因子 IX 或者凝血因子 X 的结合进行定量研究的是 Atoda 实验组, 他们通过酶联免疫法 (ELISA) 定量分析了 hahu IX/X-bp 与凝血因子 IX/X 的结合亲和力, 并发现 hahu IX-bp 与凝血因子 IX 或凝血因子 X 的结合亲和力有一定的差异 [56]。后来, 一系列的研究表明, 大部分凝血因子 IX/X 结合蛋白对凝血因子 IX 或者凝血因子 X 的结合亲和力是不同的, huba IX/X-bp, ECLV IX/X-bp, jararaca IX/X-bp 与凝血因子 IX 的亲性和高于它们与凝血因子 X 结合的亲和性 [29, 50], 而 huba IX-bp 只与凝血因子 IX 结合不与凝血因子 X 结合 [28]。

随着对凝血因子 IX/X 结合蛋白家族研究的深入, 凝血因子 IX/X 蛋白的晶体结构及其与凝血因子的 γ -羧基谷氨酸 (γ -carboxyglutamic acid, Gla) 结构域结合的复合物晶体结构纷纷被解析 [23, 57], 从来证明了凝血因子 IX/X 结合蛋白与凝血因子 IX 或者凝血因子 X 结合的位点是凝血因子 IX/X 蛋白的双链中间的凹形表面与凝血因子 IX/X 的 Gla 结构域。其结合的晶体结构如图 1.5 所示。

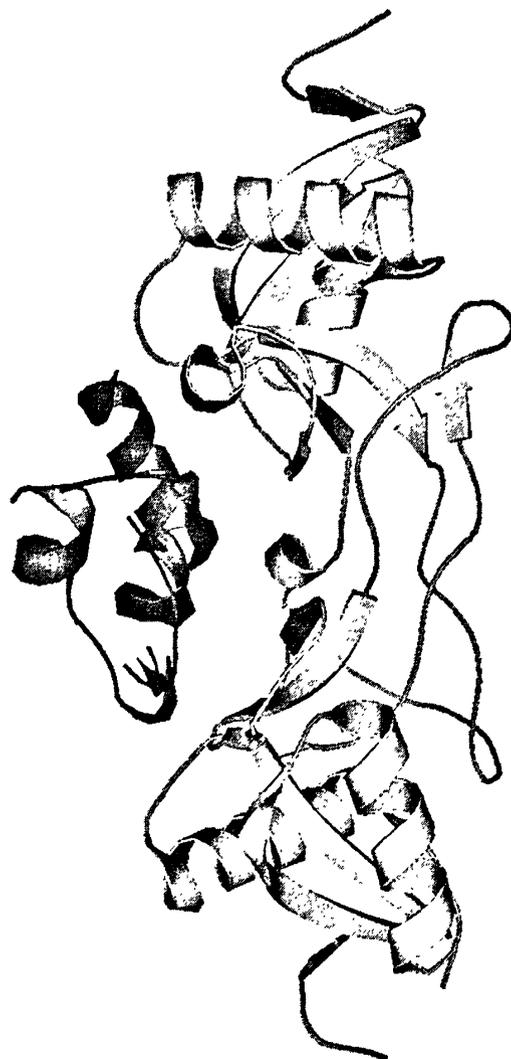


图 1.5 凝血因子 IX/X 结合蛋白与凝血因子 IX 的 Gla 结构域结合的晶体结构 (蛋白质银行号: 1J34)

凝血因子 IX/X 结合蛋白的结构都非常相似, 它们的分子量都在 30 kd 左右, 大部分都是由同源性很高的两个亚基通过两个二硫键连接的连接在一起。凝血因子 IX/X 蛋白大部分都是金属蛋白, 而且大多数结合是两个钙离子。很多研究表明, 凝血因子 IX/X 蛋白上的两个 Ca^{2+} 结合位点的结合能力是各不相同的, 一个对 Ca^{2+} 离子结合亲和力较强, 一个对 Ca^{2+} 的结合亲和力较弱[28, 29, 50, 58, 59]。金属离子的结合是凝血因子 IX/X 维持其构象的关键, Mizuno 与 1991 年成功生长出 habu IX/X-bp 的晶体, 并发现 habu IX/X-bp 必须在 3 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在下才能维持其稳

定的构象生长单晶 [60]。更多的研究表明,结合金属离子可以提高凝血因子IX/X蛋白的稳定性。我们实验室的Xu等人曾经报道,通过对ACF I热变性和化学变性过程的研究,证明 Ca^{2+} 对ACF I结构稳定性具有重要贡献 [58, 61]。

蛋白质的结构和功能常常是联系在一起,金属离子的结合对凝血因子IX/X结合蛋白的意义并不仅仅是结构的稳定,也是它们活性所需要的。大部分凝血因子IX/X结合蛋白在生理浓度的 Ca^{2+} 存在条件下即可以获得与凝血因子IX或者凝血因子X结合的最大亲和力。而将凝血因子IX/X结合蛋白天然状态下的金属离子脱去,则其分子成为无定形的松散结构,并丧失活性;如果再补充天然状态下配位的金属离子,则可以使蛋白质分子恢复具有活性的稳定构象。通过脱去凝血因子IX/X结合蛋白天然状态下的金属离子并用其他金属离子结合可以进一步研究金属离子对凝血因子IX/X结合蛋白的结构和功能的影响。不同的凝血因子IX/X结合蛋白可以在不同金属离子存在的条件下,其与凝血因子IX或凝血因子X发生结合的情况存在比较大的差异,例如jararaca IX/X-bp在仅存在 Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 的时候也可以与凝血因子IX发生结合反应,但是在仅存在 Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 的时候jararaca IX/X-bp不能与凝血因子X结合 [50]。中国科学技术大学生物系牛立文实验组在江浙蝮蛇 (*Agkistrodon halys Pallas*) 蛇毒中纯化得到一种具有抗凝血活性的蛋白,这是一个在天然状态下结合一个 Ca^{2+} 和一个 Zn^{2+} 的凝血因子IX/X结合蛋白成员,它仅在 Zn^{2+} 条件下结合凝血因子IX,在 Ca^{2+} 或 Zn^{2+} 都不能与凝血因子X发生结合,于是命名AHP IX-bp [52]。近年,我们实验组的吴昊通过深入的实验发现,AHP IX-bp虽然天然配位的 Ca^{2+} 或者 Zn^{2+} 存在的条件下不能与凝血因子X结合,但是在非天然配位的1 mmol/L Mg^{2+} 存在的条件下可以与凝血因子X结合 [53]。这一发现,使人们对金属离子调控凝血因子IX/X结合蛋白的结构与功能有了新的认识,同时也说明金属离子调控凝血因子IX/X结合蛋白的结构与功能还有很多的工作需要深入研究。

1.3 凝血因子 IX 和凝血因子 X 及它们纯化方法的研究进展

1.3.1 凝血因子 IX 研究进展

凝血因子 IX (FIX) 为分子量在 56000 左右的单链糖蛋白, 例如人的凝血因子 IX 的分子量为 56 kD 并有大约 17% 含糖量 [62, 63]。在正常人的血浆中, 凝血因子 IX 的含量通常为 5 $\mu\text{g/ml}$ [64]。如图 1.6 所示, 人凝血因子 IX 包括 415 个氨基酸, 其序列是由基因组结构所决定的。人凝血因子 IX 的氨基末端第一位为酪氨酸, 前 46 个残基, 作为第二和第三外显子的产物, 组成了 γ -羧基谷氨酸结构域 (Gla 结构域)。第 47 到 127 位残基代表两个同源上皮生长因子结构域 (EGF 结构域), 其中包括几个半胱氨酸残基。128 位到 195 位之间的氨基酸为外显子编码六, 具有两个代表活化裂解位点的精氨酰键, 和两个主要的糖侧链。最后 220 个残基是最后两个外显子的产物, 其含有活性部位成分, 包括 FIXa 的类胰岛素样和催化部分。人凝血因子 IX 的羧基端残基, 第 415 号为苏氨酸 [65]。

在人凝血因子 IX 的 Gla 结构域中有 12 个 γ -羧基谷氨酸残基, 这些残基的分布从第 7 位残基开始至第 40 位。Gla 结构域是较为保守的结构域, 在此结构域中, 人凝血因子 IX 和牛凝血因子 IX 仅有三个不同的残基, 分别为第 11 位, 第 19 位和第 37 位。在 Gla 结构域的第 18 位和第 23 位有两个半胱氨酸残基, 最有可能形成一个二硫键。在人凝血因子 IX 的 Gla 结构域中, 有多个二价金属离子的结合位点, 其中有两个为高亲和力的 Ca^{2+} 结合位点 [66]。Gla 结构域的功能是与磷脂单层形成钙桥 [67], Ca^{2+} 的结合可以使 Gla 结构域的构象发生改变, 而这种 Ca^{2+} 依赖型的构象, 才会将磷脂的结合位点暴露在表面 [68]。除了 Ca^{2+} , Mg^{2+} 也结合凝血因子 IX 的 Gla 结构域, 并对其构象产生影响, 同时结合 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 的 Gla 结构域较仅有 Ca^{2+} 结合的 Gla 结构域具有更强生物学活性, 并能与结合蛋白产生更强的亲和力 [57]。

人凝血因子 IX 的第二和第三结构域是两个 EGF 结构域。在整个凝血因子 IX 分子中一共含有 22 个半胱氨酸残基, 而 EGF 结构域就包含了 12 个。这些半胱

氨酸通过二硫键两两连接，在 EGF 结构域形成多个二硫环。人源凝血因子 IX 和牛源的凝血因子 IX 在这两个结构域中，81 个残基共有 12 个残基不同，具有 15% 的差异。

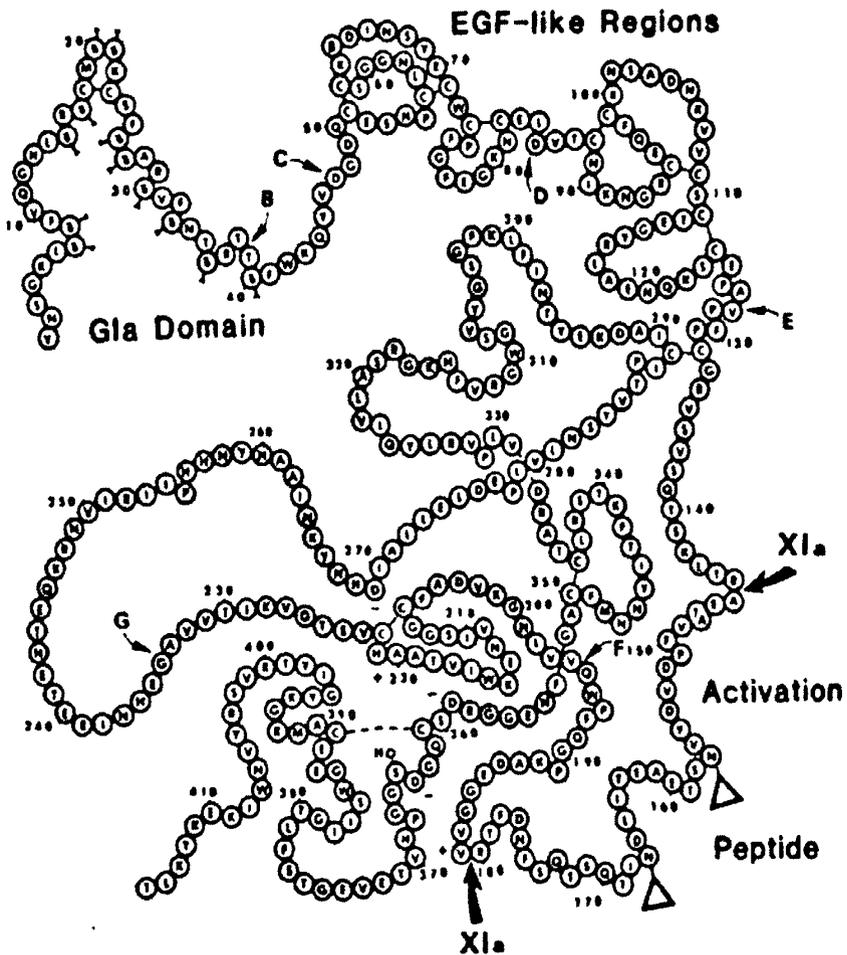


图 1.6 凝血因子IX的氨基酸序列及功能区域 [65]

Fig.1.6 Amino acid sequence of human factor IX [65]

在 EGF 后面就是凝血因子 IX 的激活肽区，其中包含两个活化断裂位点和旁侧序列。如图 1.7 所示，凝血因子 IX 被 FXIa 激活的反应分二步：首先是凝血因子 IX 分子中第 145-146 位的 Arg-Ala 肽键被活化物水解断裂，形成由二硫键联结的双链 FIX α ，这是一个不具有酶活性的中间体；随后 Arg (180) -Val (181) 肽键也被水解断裂，形成具酶活性的 FIX (即 FIX $\alpha\beta$)，同时释出一个分子量为 11 kD、

长度为 35AA 的肽段。这两步水解的顺序有可能会前后互换，但最终的结果都是会将单链的 FIX 断裂成为一个二硫键连接的双链 FIX_a，并暴露其活性位点，并切去一个 35AA 的肽段。此外，RVV-X（Russell Viper Venom 中的凝血因子 X 的活化剂）可以只水解 FIX 分子中的 Arg（180）-Val（181）肽键，形成 FIX_α 较 FIX_{αβ} 的活性低很多 [69]。其他一些蛋白内切酶也能水解 FIX 的激活肽区，如 FXa、胰蛋白酶、糜蛋白酶等，但 FXa 只水解 Arg（145）-Ala（146）肽键，形成不具酶活性的 FIX_α，胰蛋白酶、糜蛋白酶，则并非特异地水解 Arg-Val 肽键，故也不能使 FIX 活化。

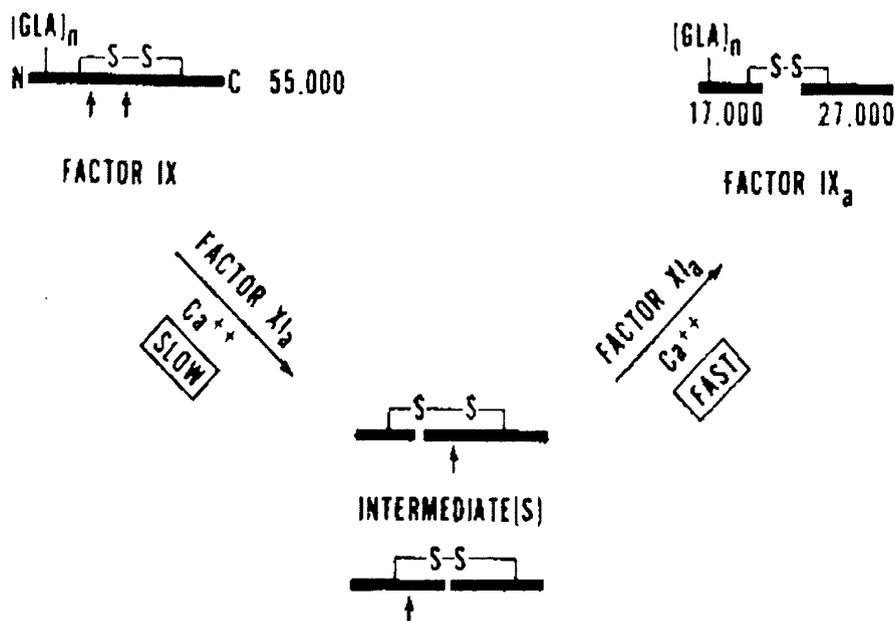


图 1.7 凝血因子 IX 的氨基酸序列及功能区域 [64]

Fig.1.7 Schematic model of the polypeptide structure of Factor IX and activated Factor IX [64]

FIX_a 是一个具有酶活力的双链分子，其具有一条分子量为 27.5 kD 的重链和分子量为 17.7 kD 的轻链，两条链以二硫键连接。FIX_a 可以特异性的激活凝血因子 X，在有磷脂和 Ca²⁺ 存在的情况下，FIX_a 的催化活性可以增强。

凝血因子 IX 基因突变导致的功能缺失是引发血友病 B 的原因，其具体可能是基因缺失、基因插入、基因置换 [15, 70]。目前对血友病 B 患者的治疗方法有补

充天然来源纯化的人凝血因子IX或重组人凝血因子IX，以及基因治疗 [71-73]。

1.3.2 凝血因子 X 研究进展

凝血因子X (FX)，是一种维生素K依赖的丝氨酸蛋白酶原。在凝血系统中处于内源、外源和共同途径的衔接部位[2]，故在血液凝固的链锁反应中起关键性作用。人凝血因子X是一个由 306 氨基酸残基组成的分子量为 59 kD的双链糖蛋白，其含糖量为 15%，其结构由重链（分子量 42000）和轻链（分子量 16200）经二硫键连接组成 [74]。在正常人的血浆中，凝血因子X的含量通常为 10 μg/ml。

凝血因子 X 的基因位于第 13 号染色体 (13q) 上，大小约 22 kb，含 8 个外显子和 7 个内含子。凝血因子 X 由肝脏合成，它在合成时其前体为一单链多肽原，出现在血液中的凝血因子 X 以双链形式存在。单链的凝血因子 X 从 N 末端到 C 末端的结构域依次为信号肽结构域、前肽结构域、γ-羧基谷氨酸 (Gla) 结构域、芳香族氨基酸集中结构域、上皮生长因子结构域 (EGF)、酶原活化结构域及催化结构域等结构功能区。

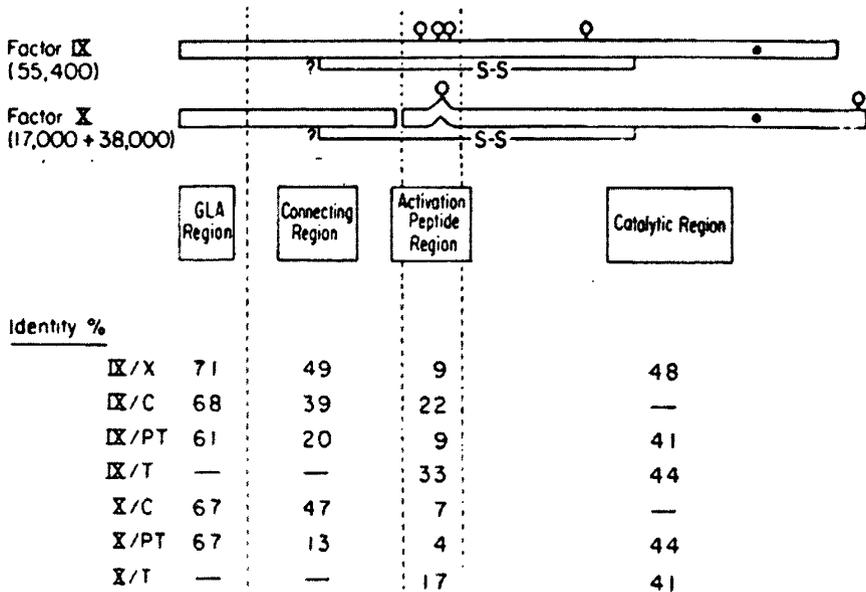


图 1.8 凝血因子IX与凝血因子X的功能区比对 [75]

Fig.1.8 Schematic comparison of the zymogens of FX and FIX [75]

凝血因子 X 的序列结构和其他维生素 K 依赖性的凝血因子具有很高的同源性。其前肽结构域和 Gla 结构域都是维生素 K 依赖性凝血因子的才具有的结构，其前肽结构域中含有 γ -羧化识别位点 (γ -CRS)，参与成熟凝血因子 X 的 N 端谷氨酸残基的羧化。人凝血因子 X 的 Gla 结构域含有 11 个 γ -羧基谷氨酸，并结合多个 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子。凝血因子 X 的 Gla 结构域结合磷脂表面需要通过结合在 Gla 结构域上的 Ca^{2+} 形成钙桥。凝血因子 X 也具有两个同源上皮生长因子 (EGF) 结构域，分别为两段外显子编码。每个 EGF 结构域内含有 3 个二硫键。此结构可能参与凝血因子 X 与特异细胞表面的蛋白结合或与其它凝血因子如凝血因子 VIII、凝血因子 V 上的受体区域结合。酶原活化结构域，是凝血因子 X 活化的酶切点。

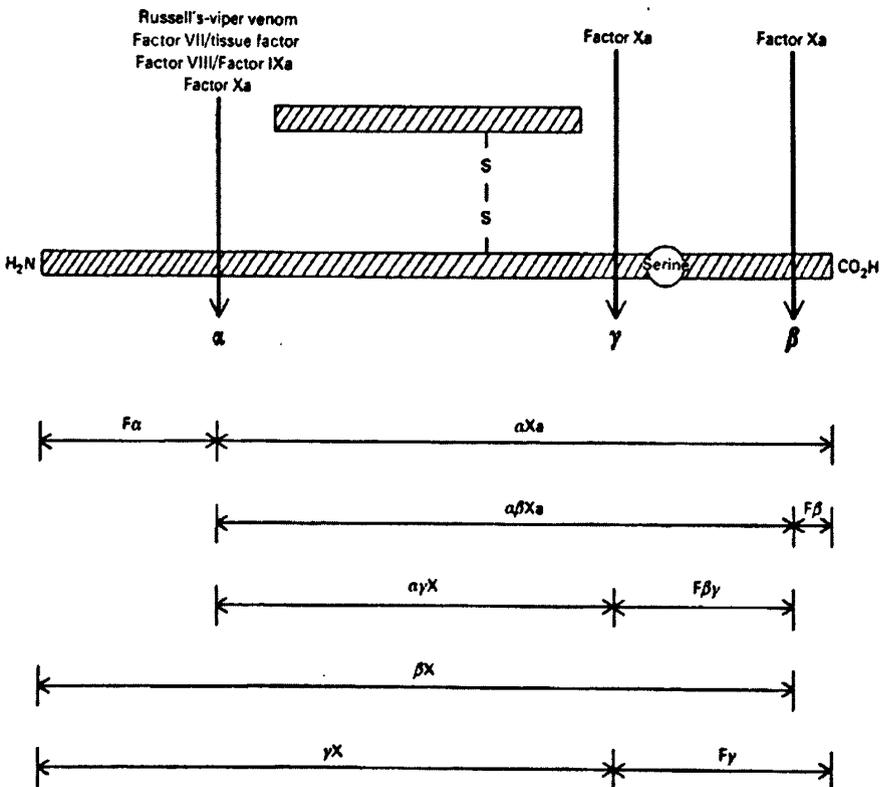


图 1.9 凝血因子 IX 与凝血因子 X 的功能区比对 [76]

Fig.1.9 Schematic representation of the human Factor X molecule [76]

凝血因子 X 的激活具有多条途径，内源性途径是被 FIXa-FVIIIa 和磷脂的复合

物激活的，外源性途径是通过组织因子（TF）与FVIIa的复合物激活的。鲁氏蝰蛇（Russell's Viper Venom, RVV）中凝血因子X激活蛋白RVV-X等也可激活凝血因子X。如图 1.9 所示，凝血因子X的重链上有三个位点可以发生蛋白水解，我们分别命名为 α -位点、 β -位点、 γ -位点，其中在N末端的为 α -位点，在C末端的为 β -位点 [74]。在这三个蛋白水解位点中， α -位点的断裂将凝血因子X活化成为FXa，而FIXa-FVIIIa和磷脂的复合物、TF-FVIIa的复合物、RVV-X均可以特异性水解这个位点将重链的N末端切除一个 52 个氨基酸残基的多肽。由于凝血因子X的三个蛋白水解位点，所以，凝血因子可以水解形成多个活化或者非活化的凝血因子X，而值得注意的是凝血因子X的 β -位点、 γ -位点的活化剂真是其自身FXa，所以，凝血因子X是个半衰期很短的具有很强自水解活性的蛋白质。

由凝血因子 X 不正常而导致的疾病并不多见。凝血因子 X 活性缺失或减少，见于先天性和获得性，前者是一种常染色体隐性遗传性疾病，发病率约为五十分之一，非常罕见，后者见于维生素 K 缺乏症、肝脏疾病、DIC、原发性和继发性淀粉样变。而凝血因子 X 活性异常增高，则见于高凝状态和血栓栓塞性疾病。

1.3.3 凝血因子 IX 的纯化

凝血因子 IX 是一个非常重要的药物，在临床上被用作治疗 B 型血友病。

上个世纪七十年代，牛的凝血因子IX首次从牛血浆中被纯化出来，所使用的方法为硫酸钡沉淀结合多步层析法 [77]。随后，人的凝血因子IX也使用大致相同的方法从人血浆中成功分离纯化出来 [63, 78]。其大致步骤是先在血浆中加入硫酸钡粉末吸附维生素-K依赖性凝血因子，再用柠檬酸三钠将吸附的蛋白洗下，随后使用DEAE-Sephadex A-50 作一次吸附-洗脱过程，接着用DEAE-Sephadex A-50 阴离子交换色谱作初步分离，然后用硫酸葡聚糖-琼脂糖再做粗分离，最后用肝素-琼脂糖树脂作亲和色谱完成纯化。

1989 年，Burnouf等人报道了一种可以应用于大规模生产的制备临床用凝血因子IX的三步层析法 [79]，首先将新鲜冰冻血浆 2℃融化，冷冻离心去除冷沉淀后用DEAE-Sephadex A-50 初步分离，再经DEAE-Sephadex FF进一步分离，加S/D

后经过肝素-Sepharose CL 6B最终纯化，制得高纯度的凝血因子IX制剂。使用该三步层析法平均，其对凝血因子的收率为每升血浆纯化得到 (320 ± 28) IU，比酶活力可达 (119 ± 10) IU/mg。

多步层析法步骤繁琐，回收率低，即使经过三步层析法比酶活力达到 200 IU/mg，仍会含有少量杂质（如蛋白 C 和 α -胰蛋白酶抑制剂等），而且有造成病毒感染和形成血栓的潜在危险。1984 年，Liebman 等人制备了 Ca^{2+} 依赖型的单克隆抗体，并成功的用 Ca^{2+} 依赖型的单克隆抗体作为亲和配基完成对凝血因子 IX 的亲和色谱。它的优点非常特出，经过一次色谱过程即可以获得比酶活力超过 150 IU/mg 的纯蛋白，可以很好解决多步层析中出现一些问题。而且， Ca^{2+} 依赖型的单克隆抗体与凝血因子 IX 的结合-解离条件简单温和，在含有 Ca^{2+} 的缓冲溶液中抗体可以和抗原特异性结合，将淋洗液换成含有 EDTA 的缓冲溶液即可以洗脱下抗原。使用凝血因子 IX 的单克隆抗体做亲和层析可以直接对血浆完成色谱操作而不需要任何前处理，而且，在纯化得到的蛋白中检出不带病毒。但是，单克隆抗体造价昂贵，且稳定性较差，最终产品中可能有少量小鼠蛋白存在，如在临床使用可能会引起异种蛋白过敏，综合起来，以单克隆抗体为配基的免疫亲和层析也难以大量应用到工业大批量生产。

另一种在纯化凝血因子 IX 中常用的亲和配基是肝素。肝素是由二种多糖交替连接而成的多聚体，是 AT-III 的辅因子，也是许多凝血因子的抑制剂，可以通过静电和亲和相互作用可分离血浆中的很多凝血因子。肝素便宜易得，但是亲和的特异性较差，作为亲和色谱的配基分离的能力有限，通常只能作为多步色谱法的最后一步。

此外，被报道应用于凝血因子IX纯化的色谱柱还包括金属螯合色谱 [80]、Fractoget EMD-Amino(HAP)径向色谱柱、octyl-Sepharose CL 4B疏水色谱柱 [81]。

目前，虽然有报道基因治疗对凝血因子 IX 缺乏的 B 型血友病具有不错的疗效，但是大部分 B 型血友病的患者还是依赖静脉注射天然或重组的凝血因子 IX。所以探寻新的凝血因子 IX 亲和配基，不仅可以应用在纯化天然来源的凝血因子 IX，也可以在表达重组凝血因子 IX 的纯化过程中发挥作用。

1.3.4 凝血因子 X 的纯化

凝血因子 X 的突变在临床上非常罕见，所以凝血因子 X 极少作为药物在临床上使用。但是凝血因子 X 作为一个选择性很高的限制性内切酶，在实验研究中仍具有广泛的用途。

凝血因子 X 在血浆中的含量大约是凝血因子 IX 的两倍，而它的纯化工艺的发展也基本和凝血因子 IX 大致相同。1963 年，Jackson 等人首次报道了从牛血浆中纯化凝血因子 X 的工艺 [82]，其纯化的路线图如图 1.10 所示，采用的是硫酸钡沉淀结合多步层析法，通过硫酸钡吸附、洗脱后分别经过二乙氨基乙基纤维素柱层析的梯度洗脱和 Sephadex G-100 分子筛柱层析得到凝血因子 X。

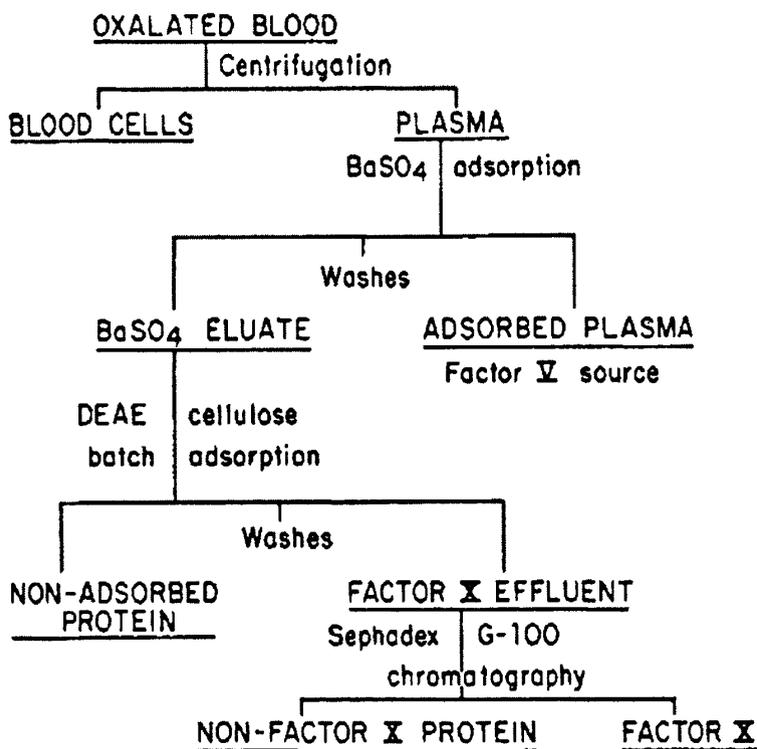


图 1.10 硫酸钡沉淀结合多步层析法对凝血因子的纯化路线图 [82]

Fig.1.10 Flow diagram of the factor X purification scheme. [82]

Husi等人通过对几种亲和介质和疏水介质的色谱特性进行的研究表明,在凝血因子X和凝血因子IX的纯化工艺中,肝素也是一个有力的工具 [83, 84],但是其由于其亲和的特异性较差,所以必须结合其他色谱才能获得纯度较高的凝血因子。单克隆抗体作为高度特异性的亲和配基,也被报道在凝血因子X的纯化中被使用 [85]。虽然单克隆抗体亲和色谱纯化凝血因子X具有良好的分离效果,且分离过程简单而高效,但是存在的问题依旧是凝血因子X的单克隆抗体的制备过程较为繁琐。所以探寻廉价易得且色谱效果和单克隆抗体类似的凝血因子X亲和配基,在纯化凝血因子X中具有很重要的意义。

参考文献

1. Esnouf, M.P., The blood clotting mechanism [J]. *Prog Clin Biol Res*, 1976. 5: p. 69-84.
2. Furie, B. and B.C. Furie, Mechanisms of thrombus formation [J]. *N Engl J Med*, 2008. 359(9): p. 938-49.
3. Seegers, W.H., Blood clotting mechanisms: three basic reactions [J]. *Annu Rev Physiol*, 1969. 31: p. 269-94.
4. Gerrits, W.B., Fibrinogen and its derivatives in intravascular coagulation. A review [J]. *Neth J Med*, 1975. 18(1): p. 31-44.
5. Ofori, F.A., Review: Laboratory markers quantifying prothrombin activation and actions of thrombin in venous and arterial thrombosis do not accurately assess disease severity or the effectiveness of treatment [J]. *Thromb Haemost*, 2006. 96(5): p. 568-77.
6. Daubie, V., et al., Tissue factor: a mini-review [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007. 1(3): p. 161-9.
7. Kjalke, M., et al., The effects of activated factor VII in a cell-based model for tissue factor-initiated coagulation [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1998. 9 Suppl 1: p. S21-5.
8. Rosing, J. and G. Tans, Coagulation factor V: an old star shines again [J]. *Thromb Haemost*, 1997. 78(1): p. 427-33.
9. Duga, S., R. Asselta, and M.L. Tenchini, Coagulation factor V [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(8): p. 1393-9.
10. Lenting, P.J., J.A. van Mourik, and K. Mertens, The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function [J]. *Blood*, 1998. 92(11): p. 3983-96.
11. Chavin, S.I., Factor VIII: structure and function in blood clotting [J]. *Am J Hematol*, 1984. 16(3): p. 297-306.
12. Antonarakis, S.E., Molecular genetics of coagulation factor VIII gene and hemophilia A [J]. *Thromb Haemost*, 1995. 74(1): p. 322-8.
13. Lawn, R.M., The molecular genetics of hemophilia: blood clotting factors VIII and IX [J]. *Cell*, 1985. 42(2): p. 405-6.
14. Taran, L.D., Factor IX of the blood coagulation system: a review [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 1997. 62(7): p. 685-93.
15. vandeWater, N.S., et al., Factor IX gene mutations in haemophilia B: A New Zealand population-based study [J]. *Haemophilia*, 1996. 2(1): p. 24-27.
16. Jackson, C.M., Characterization of two glycoprotein variants of bovine factor X and

- demonstration that the factor X zymogen contains two polypeptide chains [J]. *Biochemistry*, 1972. 11(26): p. 4873-82.
17. Jesty, J. and M.P. Esnouf, The preparation of activated factor X and its action on prothrombin [J]. *Biochem J*, 1973. 131(4): p. 791-9.
 18. Gailani, D., Activation of factor IX by factor XIa [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2000. 10(5): p. 198-204.
 19. Minnema, M.C., H. Ten Cate, and C.E. Hack, The role of factor XI in coagulation: a matter of revision [J]. *Semin Thromb Hemost*, 1999. 25(4): p. 419-28.
 20. Walsh, P.N. and S.S. Ahmad, Proteases in blood clotting [J]. *Essays Biochem*, 2002. 38: p. 95-111.
 21. Drickamer, K., C-type lectin-like domains [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1999. 9(5): p. 585-590.
 22. Morita, T., C-type lectin-related proteins from snake venoms [J]. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2004. 4(4): p. 357-73.
 23. Mizuno, H., et al., Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Glu domain of factor X [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(13): p. 7230-4.
 24. Takeya, H., et al., Coagulation Factor-X Activating Enzyme from Russells Viper Venom (Rvv-X) - a Novel Metalloproteinase with Disintegrin (Platelet-Aggregation Inhibitor)-Like and C-Type Lectin-Like Domains [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992. 267(20): p. 14109-14117.
 25. Yamada, D., F. Sekiya, and T. Morita, Prothrombin and factor X activator activities in the venoms of Viperidae snakes [J]. *Toxicon*, 1997. 35(11): p. 1581-1589.
 26. Atoda, H., M. Hyuga, and T. Morita, The primary structure of coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Homology with asialoglycoprotein receptors, proteoglycan core protein, tetranectin, and lymphocyte Fc epsilon receptor for immunoglobulin E [J]. *J Biol Chem*, 1991. 266(23): p. 14903-11.
 27. Fukuda, K., et al., Crystal structure of flavocetin-A, a platelet glycoprotein Ib-binding protein, reveals a novel cyclic tetramer of C-type lectin-like heterodimers [J]. *Biochemistry*, 2000. 39(8): p. 1915-1923.
 28. Atoda, H., et al., Blood-Coagulation Factor Ix-Binding Protein from the Venom of *Trimeresurus-Flavoviridis* - Purification and Characterization [J]. *Journal of Biochemistry*, 1995. 118(5): p. 965-973.
 29. Chen, Y.L. and I.H. Tsai, Functional and sequence characterization of coagulation factor IX factor X-binding protein from the venom of *Echis carinatus leucogaster* [J]. *Biochemistry*.

1996. 35(16): p. 5264-5271.
30. Jung, W.K., et al., A novel anticoagulant protein from *Scapharca broughtonii* [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2002. 35(2): p. 199-205.
 31. Xu, X.L., et al., Purification and characterization of anticoagulation factors from the venom of *Agkistrodon acutus* [J]. *Toxicon*, 2000. 38(11): p. 1517-1528.
 32. Zingali, R.B., et al., Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition [J]. *Biochemistry*, 1993. 32(40): p. 10794-802.
 33. Yamada, D. and T. Morita, CA-1 method, a novel assay for quantification of normal prothrombin using a Ca²⁺-dependent prothrombin activator, carinactivase-1 [J]. *Thromb Res*, 1999. 94(4): p. 221-6.
 34. Read, M.S., et al., Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of botrocetin and von Willebrand factor [J]. *Blood*, 1989. 74(3): p. 1031-5.
 35. Usami, Y., et al., Primary structure of alboaggregin-B purified from the venom of *Trimeresurus albolabris* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 219(3): p. 727-33.
 36. Wang, W.J., Agglucetin, a tetrameric C-type lectin-like venom protein, regulates endothelial cell survival and promotes angiogenesis by activating integrin alpha v beta 3 signaling [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008. 369(2): p. 753-760.
 37. Bergmeier, W., et al., Rhodocytin (aggrexin) activates platelets lacking alpha(2)beta(1) integrin, glycoprotein VI, and the ligand-binding domain of glycoprotein Ib alpha [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(27): p. 25121-25126.
 38. Polgar, J., et al., Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(21): p. 13576-13583.
 39. Peng, M.L., et al., Echicetin - a Snake-Venom Protein That Inhibits Binding of Vonwillebrand-Factor and Alboaggregins to Platelet Glycoprotein-Ib [J]. *Blood*, 1993. 81(9): p. 2321-2328.
 40. Taniuchi, Y., et al., Flavocetin-a and Flavocetin-B, 2 High-Molecular-Mass Glycoprotein Ib Binding-Proteins with High-Affinity Purified from *Trimeresurus-Flavoviridis* Venom, Inhibit Platelet-Aggregation at High-Shear Stress [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1995. 1244(2-3): p. 331-338.
 41. Horii, K., et al., Structural characterization of EMS 16, an antagonist of collagen receptor (GPIa/IIa) from the venom of *Echis multisquamatus* [J]. *Biochemistry*, 2003. 42(43): p. 12497-12502.

42. Atoda, H. and T. Morita, A novel blood coagulation factor IX/factor X-binding protein with anticoagulant activity from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake): isolation and characterization [J]. *J Biochem*, 1989. 106(5): p. 808-13.
43. Hamako, J., et al., Purification and characterization of bitiscetin, a novel von Willebrand factor modulator protein from *Bitis arietans* snake venom [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996. 226(1): p. 273-279.
44. Peng, M., W. Lu, and E.P. Kirby, Alboaggregin-B: a new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein Ib [J]. *Biochemistry*, 1991. 30(49): p. 11529-36.
45. Navdaev, A., et al., Echicetin, a GPIb-binding snake C-type lectin from *Echis carinatus*, also contains a binding site for IgM kappa responsible for platelet agglutination in plasma and inducing signal transduction [J]. *Blood*, 2001. 97(8): p. 2333-2341.
46. Chen, Y.L. and I.H. Tsai, Functional and Sequence Characterization of Agkicetin, a New Glycoprotein Ib Antagonist Isolated from *Agkistrodon Acutus* Venom [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995. 210(2): p. 472-477.
47. Morita, T., Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities [J]. *Toxicon*, 2005. 45(8): p. 1099-1114.
48. Ouyang, C. and C.M. Teng, Purification and properties of the anticoagulant principle of *Agkistrodon acutus* venom [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1972. 278(1): p. 155-62.
49. Teng, C.M. and W.H. Seegers, *Agkistrodon acutus* snake venom inhibits prothrombinase complex formation [J]. *Thromb Res*, 1981. 23(3): p. 255-63.
50. Sekiya, F., H. Atoda, and T. Morita, Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca* [J]. *Biochemistry*, 1993. 32(27): p. 6892-7.
51. Lu, Y., et al., Purification and double chain structure of anticoagulant factor from five-pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom [J]. *Hemostasis and Animal Venoms*, 1987: p. 12.
52. Zang, J., M. Teng, and L. Niu, Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of AHP IX-bp, a zinc ion and pH-dependent coagulation factor IX binding protein from *Agkistrodon halys Pallas* venom [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003. 59(Pt 4): p. 730-3.
53. Wu, H., et al., Mg(II)-induced binding of factor IX-binding protein from the venom of *Agkistrodon Halys Pallas* with factor Xa [J]. *Toxicon*, 2010. 55(7): p. 1358-64.
54. Atoda, H., et al., Coagulation factor X-binding protein from *Deinagkistrodon acutus* venom is a Gla domain-binding protein [J]. *Biochemistry*, 1998. 37(50): p. 17361-17370.

55. Atoda, H. and T. Morita, Arrangement of the disulfide bridges in a blood coagulation factor IX/factor X-binding protein from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* [J]. *J Biochem*, 1993. 113(2): p. 159-63.
56. Atoda, H., et al., Binding-Properties of the Coagulation-Factor-Ix Factor-X Binding-Protein Isolated from the Venom of *Trimeresurus-Flavoviridis* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994. 224(2): p. 703-708.
57. Shikamoto, Y., et al., Crystal structure of Mg²⁺- and Ca²⁺-bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(26): p. 24090-24094.
58. Xu, X., Q. Liu, and Y. Xie, The effect of calcium (II) on the binding of anticoagulation factor I with activated coagulation factor X [J]. *J Protein Chem*, 2001. 20(1): p. 33-7.
59. Atoda, H., et al., Calcium-binding analysis and molecular modeling reveal echis coagulation factor IX/factor X-binding protein has the Ca-binding properties and Ca ion-independent folding of other C-type lectin-like proteins [J]. *FEBS Lett*, 2002. 531(2): p. 229-34.
60. Mizuno, H., H. Atoda, and T. Morita, Crystallization and preliminary X-ray study of blood coagulation factor IX/factor X-binding protein with anticoagulant activity from Habu snake venom [J]. *J Mol Biol*, 1991. 220(2): p. 225-6.
61. Zhang, L.Y., et al., Small-molecule reductants inhibit multicatalytic activity of AA-NADase from *Agkistrodon acutus* venom by reducing the disulfide-bonds and Cu(II) of enzyme [J]. *Biopolymers*, 2010. 93(2): p. 141-9.
62. Fryklund, L., H. Borg, and L.O. Andersson, Amino-terminal sequence of human factor IX: presence of gamma-carboxyl glutamic acid residues [J]. *FEBS Lett*, 1976. 65(2): p. 187-9.
63. Andersson, L.O., H. Borg, and M. Miller-Andersson, Purification and characterization of human factor IX [J]. *Thromb Res*, 1975. 7(3): p. 451-9.
64. Osterud, B., B.N. Bouma, and J.H. Griffin, Human blood coagulation factor IX. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XI [J]. *J Biol Chem*, 1978. 253(17): p. 5946-51.
65. Thompson, A.R., Structure, function, and molecular defects of factor IX [J]. *Blood*, 1986. 67(3): p. 565-72.
66. Morita, T., et al., Derivatives of blood coagulation factor IX contain a high affinity Ca²⁺-binding site that lacks gamma-carboxyglutamic acid [J]. *J Biol Chem*, 1984. 259(9): p. 5698-704.
67. Nelsestuen, G.L., et al., On the role of gamma-carboxyglutamic acid in calcium and

- phospholipid binding [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975. 65(1): p. 233-40.
68. Furie, B., et al., Conformation-specific antibodies: approach to the study of the vitamin K-dependent blood coagulation proteins [J]. *Methods Enzymol*, 1982. 84: p. 60-83.
 69. Lindquist, P.A., K. Fujikawa, and E.W. Davie, Activation of bovine factor IX (Christmas factor) by factor XIa (activated plasma thromboplastin antecedent) and a protease from Russell's viper venom [J]. *J Biol Chem*, 1978. 253(6): p. 1902-9.
 70. Mukherjee, S., et al., Structural analysis of factor IX protein variants to predict functional aberration causing haemophilia B [J]. *Haemophilia*, 2008. 14(5): p. 1076-1081.
 71. Schneider, H., et al., Therapeutic plasma concentrations of human factor IX in mice after gene delivery into the amniotic cavity: A model for the prenatal treatment of haemophilia B [J]. *Journal of Gene Medicine*, 1999. 1(6): p. 424-432.
 72. Aznar, J.A., et al., Pharmacokinetic study of a high-purity factor IX concentrate (Factor IX Grifols (R)) with a 6-month follow up in previously treated patients with severe haemophilia B [J]. *Haemophilia*, 2009. 15(6): p. 1243-1248.
 73. Pipe, S.W., Recombinant clotting factors [J]. *Thrombosis and Haemostasis*, 2008. 99(5): p. 840-850.
 74. Di Scipio, R.G., et al., A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S [J]. *Biochemistry*, 1977. 16(4): p. 698-706.
 75. Katayama, K., et al., Comparison of amino acid sequence of bovine coagulation Factor IX (Christmas Factor) with that of other vitamin K-dependent plasma proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(10): p. 4990-4.
 76. Mertens, K. and R.M. Bertina, Pathways in the activation of human coagulation factor X [J]. *Biochem J*, 1980. 185(3): p. 647-58.
 77. Fujikawa, K., et al., Isolation and characterization of bovine factor IX (Christmas factor) [J]. *Biochemistry*, 1973. 12(24): p. 4938-45.
 78. Modi, G.J., M.A. Blajchman, and F.A. Ofose, The isolation of prothrombin, Factor IX and Factor X from human Factor IX concentrates [J]. *Thromb Res*, 1984. 36(6): p. 537-47.
 79. Burnouf, T., et al., Properties of a highly purified human plasma factor IX:c therapeutic concentrate prepared by conventional chromatography [J]. *Vox Sang*, 1989. 57(4): p. 225-32.
 80. Feldman, P.A., et al., Large-scale preparation and biochemical characterization of a new high purity factor IX concentrate prepared by metal chelate affinity chromatography [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1994. 5(6): p. 939-48.
 81. Hoffer, L., H. Schwinn, and D. Josic, Production of highly purified clotting factor IX by a

- combination of different chromatographic methods [J]. *Journal of Chromatography A*, 1999. 844(1-2): p. 119-128.
82. Jackson, C.M., T.F. Johnson, and D.J. Hanahan, Studies on bovine factor X. I. Large-scale purification of the bovine plasma protein possessing factor X activity [J]. *Biochemistry*, 1968. 7(12): p. 4492-505.
83. Husi, H. and M.D. Walkinshaw, Separation of human vitamin K-dependent coagulation proteins using hydrophobic interaction chromatography [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999. 736(1-2): p. 77-88.
84. Husi, H. and M.D. Walkinshaw, Purification of factor X by hydrophobic interaction chromatography [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001. 755(1-2): p. 367-71.
85. Church, W.R. and K.G. Mann, A simple purification of human factor X using a high affinity monoclonal antibody immunoabsorbant [J]. *Thromb Res*, 1985. 38(4): p. 417-24.

第二章 抗凝血因子 ACF II 抗凝血活性机理及金属离子对其结构稳定性和活性的影响

2.1 引言

蝮蛇的蛇毒具有很强的抗凝血活性。近几十年来,十余种具有抗凝血活性的蛋白从多种蝮蛇的蛇毒中被纯化出来,如从黄绿烙铁头(*Trimeresurus flavoviridis*, habu snake)蛇毒中纯化出的habu IX/X-bp、habu IX-bp、从江浙蝮蛇(*Agkistrodon halys Pallas*)蛇毒中纯化出的AHP IX/X-bp以及从皖南尖吻蝮蛇(*Agkistrodon acutus*)蛇毒中纯化出的ACF I和ACF II等等 [1-6]。

通过研究这些抗凝血活性蛋白的结构以及它们的目标靶蛋白,发现这些抗凝血活性蛋白结构相似、氨基酸序列同源性较高,这些蛋白被归为凝血因子 IX/X 结合蛋白 (IX/X-bp) 家族。它们通过结合凝血因子 IX、或者凝血因子 X、或者同时结合凝血因子 IX 和凝血因子 X 阻断凝血反应,从而发挥其抗凝血活性。

ACF I最早在 1987 年由Lu等人从皖南尖吻蝮蛇蛇毒中纯化得到 [5], 2002 年,徐小龙又从皖南尖吻蝮蛇中纯化出另一个和ACF I结构相似、分子量非常接近的抗凝血蛋白,命名为ACF II [6]。ACF I和ACF II同源性非常高,仅在 α -链具有 9 个不同的氨基酸残基,ACF I和ACF II都是通过与凝血因子X结合,从而具有显著的抗凝血活性。

本章对 ACF I 及 ACF II 与凝血因子 IX 及凝血因子 X 的结合反应、ACF I 及 ACF II 在体抗凝血活性以及金属离子对其结构稳定性和抗凝血活性影响进行了进一步的研究,以便深入了解它们抗凝血作用机理,并为凝血因子 IX/X 结合蛋白家族的应用提供理论依据。

2.2 实验仪器和材料

2.1.1 实验仪器

MicroCal VP-ITC 等温滴定微量热仪 (MicroCal, LLC, 美国); Biacore 3000 表面等离子体共振仪 (Biacore, 美国); UV-2100 紫外-可见分光光度计 (岛津, 日本); RF-5000 荧光分光光度计 (岛津, 日本); AEL-160 电子天枰 (岛津, 日

本); PHS-2 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂); DY-A 型电泳仪 (上海康达电子仪器厂); BS-100A 型自动部分收集器 (上海沪西电子厂); Z 型系列层析柱 (上海锦华实验器械厂); L-1 型蠕动泵 (上海新波无线电厂); 2000 mL 梯度混合器 (上海西巴斯生物技术开发公司); Anke DL-6000B 冷冻离心机 (上海安科公司); 单道可调手动移液枪 (Eppendorf, 德国); 微量进样器 (上海医用激光仪器厂); 超滤离心管 (3 kD) (Minipore, 中国)。

2.1.2 实验材料

皖南尖吻蝮蛇蛇毒粗毒冻干粉购自安徽屯溪蛇伤研究所; DEAE-Sephadex A-50 和 DEAE-Sephadex C-50 树脂购自 GE 公司; Chelex-100 购自 Bio-Rad 公司 (Richmond, CA, USA); 盐酸胍 (GdnHCl)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自 Sigma 公司 (St Louis, MO, USA); β -巯基乙醇和 R-250 考马斯亮蓝购自 Fluka 公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自上海生工试剂公司; 溴酚蓝购自丽宝生化制药厂 (珠海, 广东); 其他试剂均为分析纯。实验用 Wistar-Imamichi 大白鼠 (180-250 g, 7-8 周大, 由安徽医科大学实验中心提供)。

2.3 实验方法

2.3.1 ACF I 和 ACF II 的纯化

参考 xu 等的方法 [6], 并适当加以简化, 将皖南尖吻蝮蛇蛇毒通过两步离子交换层析, 纯化得到 ACF I 和 ACF II。

第一步为 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析。将皖南尖吻蝮蛇粗毒冻干粉溶解在缓冲溶液 0.02 mol/L Tris-HCl (pH=8.0) 中后上样。A-50 层析柱的流速设定为 30ml/h, 自动部分收集器的转速为每 15min 一管。洗脱程序为 0-0.5 mol/L 的 NaCl, 使用 2 个柱体积完成盐梯度的线性改变, 所用缓冲体系为 0.02 mol/L Tris-HCl (pH=8.0)。

第二步为 DEAE-Sephadex C-50 离子交换层析。将 A-50 分离出的 ACF I 和 ACF II 的混合部分, 脱盐浓缩并将缓冲体系改变为 0.02 mol/L Tris-HCl (pH=6.0) 后上样。C-50 层析柱的流速设定为 30 ml/h, 自动部分收集器的转速为每 15min 一管。洗脱程序为 0-0.5mol/L 的 NaCl, 使用 4 个柱体积完成盐梯度的线性改变, 洗脱过程所用缓冲体系为 0.02mol/L Tris-HCl (pH=6.0)。

将纯化的 ACF I 和 ACF II 分别收集, 浓缩脱盐, 并做非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳验证纯度, 最后冷冻干燥备用。

2.3.2 ACF I 和 ACF II 的对大鼠在体抗凝血实验

使用 25%乌拉坦加 1%水合氯醛的麻醉剂以 5 ml/kg 的剂量将大鼠麻醉后,从尾静脉分别注射不同剂量的 ACF I 或 ACF II。给药 10 分钟过后,从大鼠腹主动脉采血。使用 3.8%柠檬酸钠为抗凝剂的、采血量为 2 ml 的真空取血管,从每个大鼠样本取血 2ml。血液样本迅速离心,获得血浆,并立即在自动凝血分析仪 (Sysmex CA-1500, 美国产) 上测定活化部分凝血活酶时间 (APTT), 凝血酶原时间 (PT) 和凝血酶时间 (TT)。

2.3.3 ACF II 和 凝血因子 X 及凝血因子 IX 的结合反应实验

使用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 ACF II 与 FX/FIX 的结合,在电泳过程中所使用的分离胶、浓缩胶、电极缓冲液、加样缓冲液中均加入金属离子,以便检测金属离子对该结合反应的影响。

其电泳条件为:分离胶的丙烯酰胺浓度为 10%,缓冲体系为 1.5 mol/L Tris-HCl (pH=8.8),含浓度为 1 mmol/L 的碱土金属离子氯化物;浓缩胶的丙烯酰胺浓度为 3%,缓冲体系为 1.0 mol/L Tris-HCl (pH=6.8),含浓度为 1 mmol/L 的碱土金属离子氯化物;电极缓冲液为 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH=8.8),含浓度为 1mmol/L 的碱土金属离子氯化物;2 倍加样缓冲液中含 50 mmol/L Tris-HCl (pH=6.8), 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油, 1 mmol/L 的碱土金属离子氯化物;电泳电压为 100 V。

2.3.4 表面等离子体共振法 (SPR) 测定 ACF II 和 FX 的结合反应

表面等离子体共振 (SPR) 是一种检测蛋白质相互作用的方法。SPR 的原理是将被研究的两种蛋白质分子中的一种通过反应以酰胺键连接在芯片的高分子膜表面,然后将另一种蛋白质分子的溶液通过流动池流经芯片表面,如果这两种蛋白质具有相互作用,则会引起表面等离子体共振角的变化而获得信号。根据等离子体共振角信号的强弱及其随时间的变化,再通过浓度等信息,可以计算获得这两种蛋白质分子相互作用的动力学信息,如亲和力、结合动力学常数、解离动力学常数等等。

我们使用 SPR 检测 ACF II 与凝血因子 X 的结合动力学,所用仪器型号为 Biocore 3000 (瑞士产)。该实验选择使用 CM-5 芯片,首先将 FX 连接到 CM-5 表面,偶联条件为 pH=5,偶联流速为 10 μ L/min;偶联结束后,封闭芯片上未偶联蛋白的活性基团,封闭剂为 N-hydroxysuccinimide,封闭流速为 10 μ L/min [7]。FX 偶联完成后,将不同浓度 (0-4 μ mol/L) 的脱去离子的 ACF II (apo-ACF II)

依次注入并流经芯片表面,流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$,结合 2min,解离 2min,再生液为 2 mol/L NaCl和 10 mmol/L EDTA,流动相和样品缓冲液都是 PBS (pH=7.4)。通过在 apo-ACF II 溶液中加入最终浓度为 1 mmol/L 的不同金属离子,可以检测不同金属离子对这两个蛋白质结合和解离的影响。



2.3.5 表面等离子体共振法 (SPR) 测定 ACF II 和 FIX 的结合反应

使用 SPR 检测 ACF II 与凝血因子 IX 的结合动力学。仪器型号为 Biocore 3000 (瑞士产),芯片型号为 CM-5 芯片。在 pH=5,流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的偶联条件下,将 FIX 连接到 CM-5 表面;偶联结束后,用 N-hydroxysuccinimide 封闭芯片上未偶联蛋白的活性基团,封闭流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。FX 偶联完成后,将不同浓度 (0-4 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 的脱去离子的 ACF II (apo-ACF II) 依次注入流经芯片表面,流速为 30 $\mu\text{L}/\text{min}$,结合 3 min,解离 3 min,再生液为 2 mol/L NaCl 和 10 mmol/L EDTA,流动相和样品缓冲液都是 PBS (pH=7.4)。通过在 apo-ACF II 溶液中加入最终浓度为 1 mmol/L 的不同金属离子,可以检测不同金属离子对这两个蛋白质结合和解离的影响。

2.3.6 等温滴定微量热法 (ITC) 测定 ACF II 和金属离子的结合反应

等温滴定微量热法 (ITC) 是一种检测两种分子相互作用过程中热力学变化的有效方法,其原理是在恒温条件下,通过向一种物质中逐渐加入另一种物质,来检测这一过程的放热或者吸热变化。通过热量变化的数据,就可以计算得到分子之间的相互作用的所有热力学数据[8, 9]。

我们使用 ITC 检测 ACF II 和金属离子的相互作用,使用仪器为 MicroCal VP-ITC 微量热仪。实验条件为,检测池中加入 1.42 ml 浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 apo-ACF II,滴定针中加入 0.5 mmol/L 的金属离子氯化物溶液,缓冲体系为 0.02 mmol/L Tris-HCl (pH=7.4)。每次由滴定针向检测池中滴入 8 μL 金属离子氯化物溶液,检测池中的搅拌速度为 307 rpm,每次滴定的间隔平衡时间为 120 s,共计滴定 34 次。另做一组,检测池中为没有蛋白的缓冲溶液,可得到空白背景滴定数据。将样品数据扣除对应的背景数据,并在 Origin 7.0 中对得到数据加以拟合。通过实验数据拟合可得热力学参数焓 N 、 K_A 和 ΔH , ΔG 和 ΔS 可以通过下面的

两个公式计算得到。

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (2.2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.3)$$

2.3.7 荧光分光光度法测定金属离子对 ACF II 的热力学稳定性和的影响

构成蛋白质分子的部分氨基酸含有荧光的发色基团, 比如色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基。其中色氨酸残基是研究蛋白质内源性荧光的常用检测对象, 其在 295 nm 波长的激发光下, 能够在 335-360 nm 之间发射出高强度的荧光。变性、金属离子的结合或者解离常常会引起蛋白质结构的改变, 而这种结构改变常常会引起色氨酸残基在蛋白质表面的暴露或隐藏, 从而导致蛋白质内源性荧光的强度和最大发射波长的改变。所以, 通过检测蛋白质内源性荧光的变化可以间接推测蛋白质结构的改变。

加热会导致蛋白质原本的空间结构改变而发生可逆或不可逆变性, 通过荧光的测定可以推测该变性发生的过程, 进而可研究金属离子对 ACF II 的热力学稳定性的影响。加热升温诱导的蛋白质变性过程可以用两态变性机制来进行分析, 以 N 表示天然态, D 表示变性态, 则变性的过程可以描述为: N→D

平衡常数定义为:

$$K = [D]/[N] = (F_{obs} - F_N)/(F_D - F_{obs}) \quad (2.4)$$

其中 F_{obs} 为测得的荧光强度, F_N 为没有加热的蛋白质的荧光强度, F_D 为升到高温后蛋白质已经完全变性时的荧光强度。天然态和变性态的吉布斯自由能 ΔG 可以通过下面的公式表示

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln [(F_{obs} - F_N)/(F_D - F_{obs})] \quad (2.5)$$

其中 R 是气体常数, T 是绝对温度, ΔG 代表的物理意义为蛋白质在热变性过程中的吉布斯自由能变化。 ΔG 和转变温度 T_m 之间关系可以用下面的公式表示

$$\Delta G = \Delta H_m(1-T/T_m) + \Delta C_p[T - T_m - T \cdot \ln(T/T_m)] \quad (2.6)$$

转变温度 T_m 是开始热变性的温度和完成热变性的温度的中间值, ΔH_m 是 T_m 时的热变性焓变, ΔC_p 是 T_m 时的热容。综合 (2.5) 和 (2.6), 可以得到拟合方程:

$$Y_{obs} = \{(Y_N + m_N \times T) + (Y_D + m_D \times T) \times \exp[(\Delta H_m(1/T_m - 1/T) + \Delta C_p(T_m/T - 1) + \ln(T/T_m))/R]\} / \{1 + \exp[(\Delta H_m(1/T_m - 1/T) + \Delta C_p(T_m/T - 1) + \ln(T/T_m))/R]\} \quad (2.7)$$

其中 m_N 和 m_D 分别表示蛋白质热变性前后的基线斜率。通过在 origin 6.0 对方程 (2.7) 进行非线性拟合, 可以得到热力学常数 ΔH_m and ΔC_p 。

实验使用仪器为 RF-5000 荧光分光光度计, 荧光池光径为 1 cm, 激发波长为 295nm, 发射扫描范围为 300-450 nm, 激发和发射的狭缝宽度都设置为 2 nm。平行配制 5 组浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 apo-ACF II, 其中 4 组分别加入最终浓度为 1mmol/L 的 MgCl_2 、 CaCl_2 、 SrCl_2 、 BaCl_2 , 最后一组不加入任何金属离子。水循环控温, 升温速度为 $5^\circ\text{C}/10\text{min}$, 每 10min 扫描一次。每组均有 3 个样品, 数据为三个样品测量的平均值。

2.3.8 荧光分光光度法测定金属离子对 ACF II 的化学稳定性的影响

变性剂可以诱导蛋白质的解折叠而使其发生可逆或不可逆变性, 常用的化学变性剂包括尿素、盐酸胍 (GdnHCl) 等。化学变性剂的诱导蛋白质解折叠的过程可以用两态解折叠机制来进行分析 [10], 以 N 表示天然态, U 表示解折叠态, 则解折叠的过程可以描述为: $\text{N} \rightarrow \text{U}$

平衡常数定义为:

$$K = [\text{U}]/[\text{N}] = (\text{F}_{\text{obs}} - \text{F}_{\text{N}})/(\text{F}_{\text{U}} - \text{F}_{\text{obs}}) \quad (2.8)$$

其中 F_{obs} 为测得的荧光强度, F_{N} 为没有加入变性剂的蛋白质的荧光强度, F_{U} 为加入高浓度变性剂后蛋白质已经完全解折叠时的荧光强度。天然折叠态和完全解折叠态的吉布斯自由能 ΔG 可以通过下面的公式表示

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln [(\text{F}_{\text{obs}} - \text{F}_{\text{N}})/(\text{F}_{\text{U}} - \text{F}_{\text{obs}})] \quad (2.9)$$

其中 R 是气体常数, T 是绝对温度, ΔG 为蛋白质在化学变性过程中的吉布斯自由能变化。 ΔG 也可以用下面的公式表示

$$\Delta G = \Delta G^0 + m[\text{U}] = m(\text{C}_m - \text{C}) \quad (2.10)$$

其中 ΔG^0 是蛋白质在没有化学变性剂存在的情况下的解折叠过程的自由能变化, C_m 是开始解折叠的变性剂浓度和完成解折叠的变性剂浓度的中间值, m 的物理意义是变性剂浓度为 C_m 时解折叠曲线的斜率。综合以上方程, 得到数据拟合方程如下:

$$\text{F}_{\text{obs}} = \{(\text{F}_{\text{N}} + m_{\text{N}}[\text{U}]) + (\text{F}_{\text{U}} + m_{\text{U}}[\text{U}]) * \exp((m[\text{D}] - \Delta G^0)/RT)\} / (1 + \exp((m[\text{D}] - \Delta G^0)/RT)) \quad (2.11)$$

其中 m_{N} 和 m_{U} 分别表示蛋白质解折叠前后的基线斜率。

本实验使用 GdnHCl 诱导 ACF II 解折叠, 配置每组 21 个浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 apo-ACF II 的溶液, 其中每个样品溶液含有 0-5 mol/L 范围的不同浓度的 GdnHCl, 缓冲溶液为 0.02 mol/L 的 Tris-HCl (pH=7.4)。总测定 5 组样品, 其中 4 组分别加入最终浓度为 1mmol/L 的 MgCl_2 、 CaCl_2 、 SrCl_2 、 BaCl_2 , 最后 1 组不加入任何金属离子溶液配置后, 在 4°C 放置 12 小时使蛋白质的解折叠状态稳定后用荧光测定。实验使用仪器为 RF-5000 荧光分光光度计, 荧光池光径为 1cm, 激发波长为

295 nm, 发射扫描范围为 300-450 nm, 激发和发射的狭缝宽度都设置为 2 nm, 扫描速度为 100 nm/min [11]。每组样品均有 3 次重复, 数据取三个样品测量的平均值, 并扣除背景进行拟合计算。

2.3.9 圆二色谱法 (CD) 测定金属离子对 ACF II 的热稳定性的影响

圆二色性(circular dichroism, CD) 是对R和L两种圆偏振光吸收程度不同的现象。这种吸收程度的不同与波长的关系称圆二色谱, 是一种测定分子不对称结构的光谱法。在分子生物学领域中, CD主要用于测定蛋白质的二级结构, 如 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角。当蛋白质在加热过程中, 其二级结构会发生改变。通过检测蛋白质在程序升温下的CD光谱的改变, 可以研究其热稳定性及其影响因素 [12]。加热升温诱导的蛋白质变性过程可以用两态变性机制来进行分析, 以N表示天然态, D表示变状态, 则变性的过程可以描述为: N \rightarrow D

平衡常数定义为:

$$K = [D]/[N] = (Y_{obs} - Y_N)/(Y_D - Y_{obs}) \quad (2.12)$$

其中 Y_{obs} 为测得的 222nm 椭圆率数值, Y_N 为没有加热的蛋白质的 222 nm 椭圆率数值, Y_D 为升到高温后蛋白质已经完全变性时的 222 nm 椭圆率数值。天然态和变状态的吉布斯自由能 ΔG 可以通过下面的公式表示

$$\Delta G = -RT \ln K = -RT \ln [(Y_{obs} - Y_N)/(Y_D - Y_{obs})] \quad (2.13)$$

和荧光分光光度法的计算方法类似, 可以得到

$$\Delta G = \Delta H_m(1-T/T_m) + \Delta C_p[T-T_m-T \cdot \ln(T/T_m)] \quad (2.14)$$

并进而得到拟合方程:

$$Y_{obs} = \{(Y_N + m_N \times T) + (Y_D + m_D \times T) \times \exp[(\Delta H_m(1/T_m - 1/T) + \Delta C_p(T_m/T - 1) + \ln(T/T_m))/R]\} / \{1 + \exp[(\Delta H_m(1/T_m - 1/T) + \Delta C_p(T_m/T - 1) + \ln(T/T_m))/R]\} \quad (2.15)$$

实验使用仪器为 Jasco J-810 圆二色谱仪, 扫描范围为 200-260 nm。平行配制 5 组浓度为 15 μ mol/L 的 apo-ACF II, 其中 4 组分别加入最终浓度为 1 mmol/L 的 MgCl₂、CaCl₂、SrCl₂、BaCl₂, 最后一组不加入任何金属离子。水循环控温, 升温速度为 5 $^{\circ}$ C/10min, 每 10 min 扫描一次。每组均有 3 个样品, 数据取三个样品测量的平均值。

2.3.10 圆二色谱法 (CD) 测定金属离子对 ACF II 的化学稳定性的影响

通过检测蛋白质在化学变性过程中的 CD 光谱的改变, 可以研究其化学稳定性。与前面的利用荧光光谱法测定蛋白质化学变性公式推导类似, 可以得到拟合方程:

$$Y_{obs} = \{(Y_N + m_N[U]) + (Y_U + m_U[U]) * \exp((m[D] - \Delta G^0)/RT)\} / (1 + \exp((m[D] - \Delta G^0)/RT)) \quad (2.16)$$

本实验通过 CD 检测 GdnHCl 诱导 ACF II 解折叠的情况, 使用仪器为 Jasco J-810 圆二色谱仪, 扫描范围为 200-260 nm。配置每组 21 个浓度为 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 apo-ACF II 的溶液, 其中每个样品含有 0-5 mol/L 范围的不同浓度的 GdnHCl, 缓冲溶液为 0.02 mol/L 的 Tris-HCl (pH=7.4)。共测定 5 组样品, 其中 4 组分别加入最终浓度为 1 mmol/L 的 MgCl_2 、 CaCl_2 、 SrCl_2 、 BaCl_2 , 最后 1 组不加入任何金属离子溶液配置后, 在 4 $^\circ\text{C}$ 放置 12 小时使蛋白质的解折叠状态稳定后用 CD 测定。每组样品均重复实验 3 次, 数据取 3 次测量的平均值, 并扣除背景进行拟合计算。

2.3.11 差示扫描微量热法 (DSC) 测定金属离子对 ACF II 的热稳定性的影响

差示扫描微量热法 (DSC) 是现在研究相变化过程中热量变化最常用的一种方法。加热导致蛋白质空间构象的改变而发生变性过程也是一种相变化, 这种变化会吸收或释放热量。通过对热量变化的检测, 可以获取与蛋白质热变性相关的大量信息, 如热变性动力学等。

本实验通过 DSC 检测金属离子对 ACF II 热稳定性的影响。实验所用扫描量热仪的型号为 MicroCal VP-DSC, 扫描升温程序为 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$, 温度变化范围为 10-80 $^\circ\text{C}$ 。共测试 5 组样品和 5 组空白, 样品组是浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 apo-ACF II, 其中 4 组分别加入最终浓度为 1 mmol/L 的 MgCl_2 、 CaCl_2 、 SrCl_2 、 BaCl_2 , 最后一组不加入任何金属离子, 空白组是没有蛋白的背景对照。

DSC 的数据分析也是在 origin 7.0 平台上完成的, 通过扣除背景、校正浓度和热量池体积归一化计算获得摩尔热容。 C_p 的最大值所在的温度即为表观转变温度 T_m , 焓变 ΔH_C 则是通过积分热熔峰面积得到的。根据文献 [13, 14] 提供的公式可以计算范德霍夫焓变:

$$\Delta H_V = 4RT_m^2 C_{p,max} / \Delta H_C \quad (2.17)$$

其中 $C_{p,max}$ 为 T_m 处温度变化曲线中热熔的最大值, ΔH_C 为焓变, 即热变性过程的曲线峰面积。 ΔH_V 为范德霍夫焓变。通过范德霍夫焓变与积分焓变的比值可以得到热变性过程的过渡状态的信息。

2.4 实验结果

2.4.1 ACF I 和 ACF II 的纯化

皖南尖吻蝮蛇粗毒经 DEAE-Sephadex A-50 柱层析后, 分出 14 个蛋白峰, 如图 2.1 所示。通过测定抗凝血活性和 SDS-PAGE 对分子量的分析, 可以推测 ACF I 和 ACF II 在第 6 峰和第 7 峰中。

收集第 6 峰和第 7 峰, 再经过 DEAE-Sephadex C-50 柱层析后, 分出 2 个主要成分。如图 2.2 所示, 第 1 峰即为 ACF I, 第 2 峰为 ACF II。

通过非变性 PAGE 和未还原的 SDS-PAGE 的验证, ACF I 和 ACF II 均为单一条带, 已经达到电泳纯的纯度。图 2.3 为电泳胶片的扫描图片, 其中 A 为非变性 PAGE, B 为未还原的 SDS-PAGE。

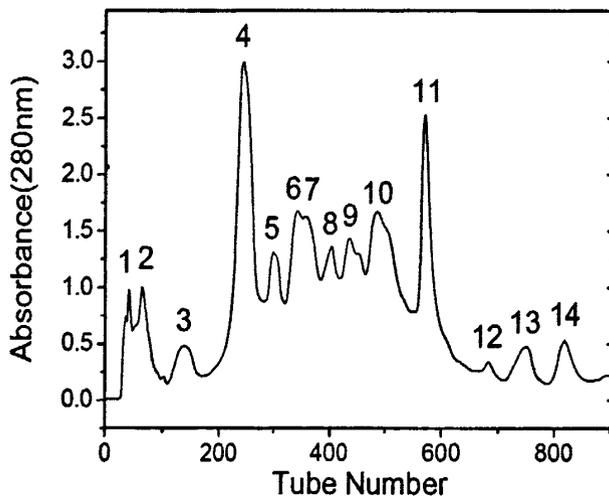


图 2.1 DEAE-Sephadex A-50 分离皖南尖吻蝮蛇蛇毒的层析图谱

Fig.2.1 Chromatography of *Agkistrodon acutus* venom on a DEAE-Sephadex A-50

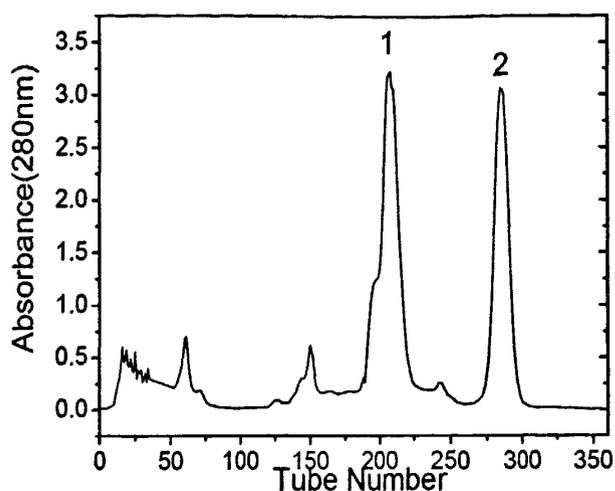


图 2.2 DEAE-Sephadex C-50 分离图 2.1 中第 6 峰和第 7 峰的层析图谱

Fig.2.2 Chromatography of the mixture of ACF I and ACF II obtained from the column of DEAE-Sephadex A-50 on a DEAE-Sephadex C-50 column

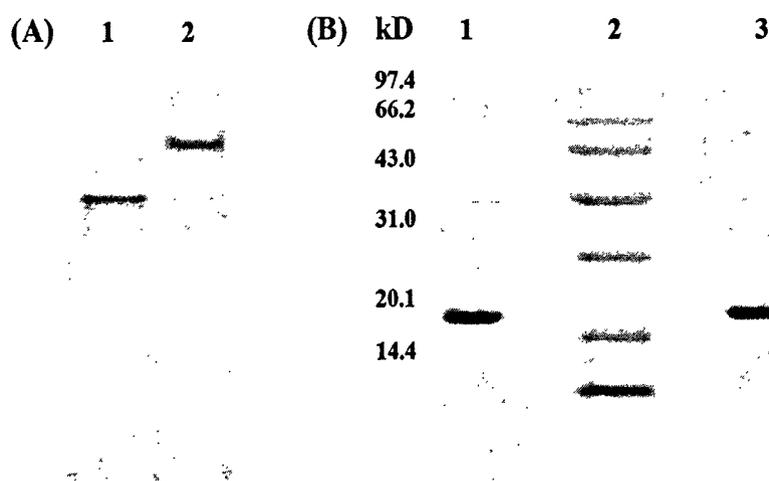


图 2.3 ACF I 和 ACF II 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及 SDS-变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig.2.3 Native-PAGE and SDS-PAGE of ACF I and ACF II. Purified ACF I and ACF II were electrophoresed in 12 % polyacrylamide gels without SDS for native-PAGE (A) and containing 0.1% SDS under nonreducing condition for SDS-PAGE (B), respectively. (A) Lane 1, ACF I; lane 2, ACF II. (B) Lane 1, ACF I; lane 2, molecular mass markers; lane 3, ACF II.

2.4.2 ACF I 和 ACF II 的对大鼠在体抗凝血实验

ACF I 和 ACF II 都表现了很强的在体抗凝血活性。实验中分别测定了 ACF I 和 ACF II 对 APTT、PT 以及 TT 的影响。尾静脉注射生理盐水的空白对照组的 APTT、PT 和 TT 分别为 18.4 ± 1.4 秒、 14.6 ± 1.7 秒、 42.8 ± 6.4 秒。如图 2.4、2.5、2.7、2.8 所示, ACF I 和 ACF II 对 APTT 和 PT 都有显著的延长作用, 而且它们的活性都具有量效关系。以 1.65 mg/kg 的剂量对大鼠尾静脉注射 ACF I 可以使 APTT 延长 5 倍, 而达到同样药效则需要 5 mg/kg 的 ACF II 剂量。对 PT 的延长作用, ACF I 和 ACF II 大致相同, 都是 5 mg/kg 的剂量延长一倍。但是 ACF I 和 ACF II 对 TT 都没有任何显著的作用。这说明 ACF I 和 ACF II 的抗凝血机理都是只作用于外源性凝血通路, 这也与 ACF I、ACF II 属于凝血因子 IX/X 结合蛋白家族相吻合。

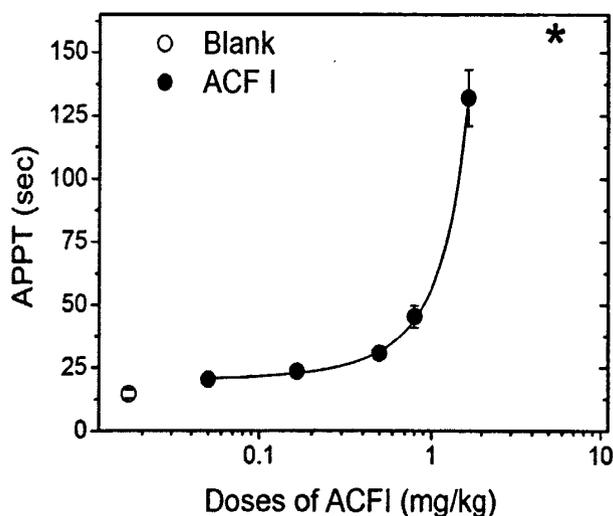


图 2.4 尾静脉注射 ACF I 对大鼠 APTT 的影响 (图中*表示凝血时间超过测定仪器的响应时间)

Fig.2.4 Effect of ACF I on APTT in vivo after i.v. administration of ACF I in anesthetized rats. ACF I was administered through the caudal vein in anaesthetized rats at selected doses. Blood samples were taken out 10 min after administration of ACF I, and then APTT was measured. Means \pm S.E.M., $n=5$

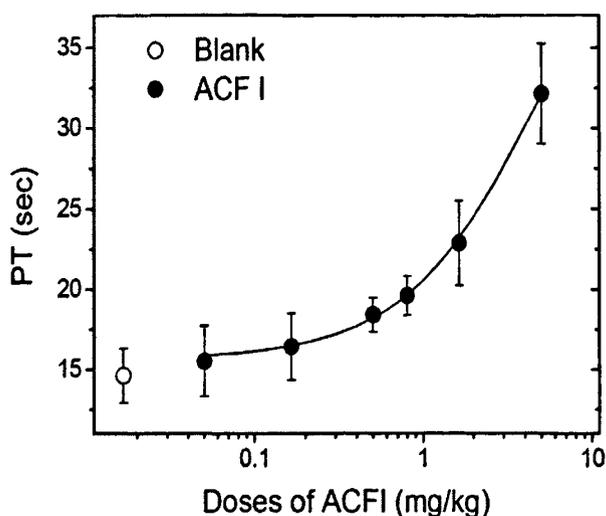


图 2.5 尾静脉注射 ACF I 对大鼠 PT 的影响

Fig.2.5 Effect of ACF I on PT in vivo after i.v. administration of ACF I in anesthetized rats. ACF I was administered through the caudal vein in anaesthetized rats at selected doses. Blood samples were taken out 10 min after administration of ACF I, and then PT was measured. Means \pm S.E.M., n=5

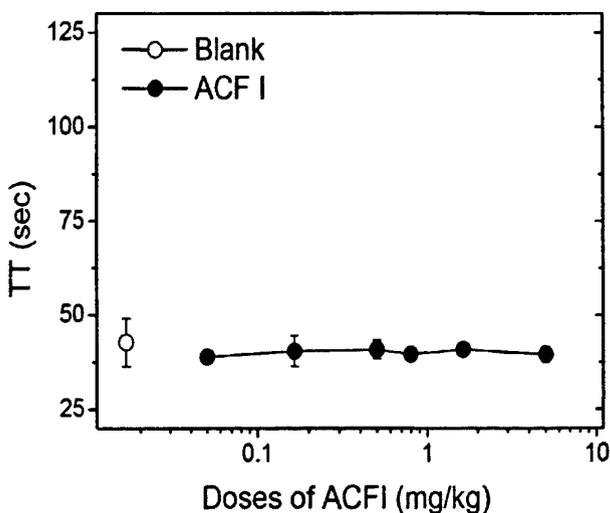


图 2.6 尾静脉注射 ACF I 对大鼠 TT 的影响

Fig.2.6 Effect of ACF I on TT in vivo after i.v. administration of ACF I in anesthetized rats. ACF I was administered through the caudal vein in anaesthetized rats at selected doses. Blood samples were taken out 10 min after administration of ACF I, and then TT was measured. Means \pm S.E.M., n=5

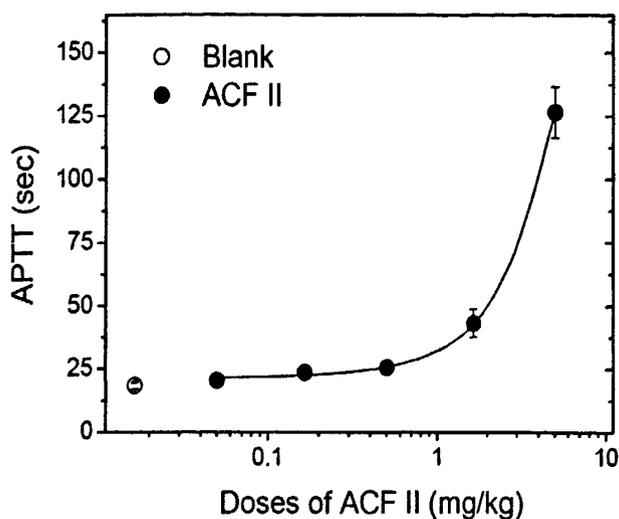


图 2.7 尾静脉注射 ACF II 对大鼠 APPT 的影响

Fig.2.7 Effect of ACF II on APPT in vivo after i.v. administration of ACF II in anesthetized rats. ACF II was administered through the caudal vein in anaesthetized rats at selected doses. Blood samples were taken out 10 min after administration of ACF II, and then APPT was measured. Means±S.E.M., n=5

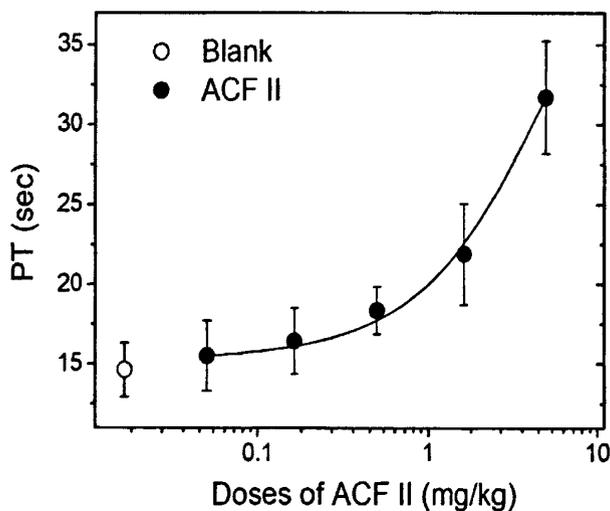


图 2.8 尾静脉注射 ACF II 对大鼠 PT 的影响

Fig.2.8 Effect of ACF II on PT in vivo after i.v. administration of ACF II in anesthetized rats. ACF II was administered through the caudal vein in anaesthetized rats at selected doses. Blood samples were taken out 10 min after administration of ACF II, and then PT was measured. Means±S.E.M., n=5

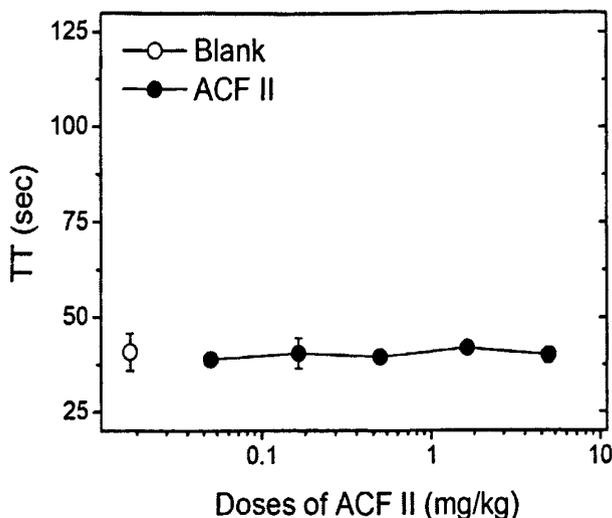


图 2.9 尾静脉注射 ACF II 对大鼠 TT 的影响

Fig.2.9 Effect of ACF II on TT in vivo after i.v. administration of ACF II in anesthetized rats. ACF II was administered through the caudal vein in anaesthetized rats at selected doses. Blood samples were taken out 10 min after administration of ACF II, and then TT was measured. Means±S.E.M., n=5

2.4.3 ITC 检测金属离子与 ACF II 的结合

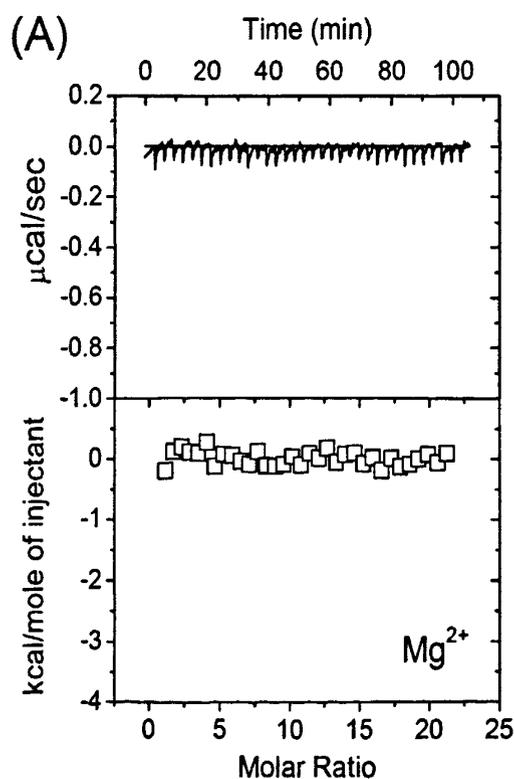
在 ACF II 中, 有两个金属离子结合位点, 天然态的 ACF II 含有两个 Ca^{2+} 。通过 ITC 实验, 我们定量的检测了 Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 与 apo-ACF II 的结合情况。图 2.10 为各种金属离子与 apo-ACF II 滴定放热曲线图, 在每一个图上, 上半部分为滴定放热曲线, 下半部分为金属离子和蛋白质的摩尔比。图 2.10A 为 Mg^{2+} 与 apo-ACF II 的放热曲线图, 其每一次滴定的放热都接近于零, 整体放热曲线显示不出任何结合模式, 这表明 Mg^{2+} 与 apo-ACF II 的结合非常弱。图 2.10B-D 分别为 Ca^{2+} , Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 与 apo-ACF II 的放热曲线图, 使用两点拟合模式可以完成对 Ca^{2+} , Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 与 apo-ACF II 的结合放热曲线的拟合, 得到结合反应的热力学参数 (K_A , ΔG , ΔH 和 ΔS), 具体数据见表 2.1。ITC 结果表明, ACF II 可以结合两个 Ca^{2+} , 而这两个结合位点对 Ca^{2+} 的亲合力是不同的。从热量变化图可得, ACF II 的两个结合位点在结合 Ca^{2+} 的时候都是放热的。 ΔH 和 ΔS 均为负值, 表明 Ca^{2+} 与 apo-ACF II 的两个结合位点的结合都是焓驱动的, 而熵对结合是不利。ACF II 也可以结合两个 Sr^{2+} 或者两个 Ba^{2+} , 其结合模式与 Ca^{2+} 的结合模式类似, 也是两个亲合力不同的放热结合位点。与 Ca^{2+} 结合不同的是, 虽然焓驱动是 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 与 ACF II 结合的主要驱动力, 但熵也会对结合有驱动作用。

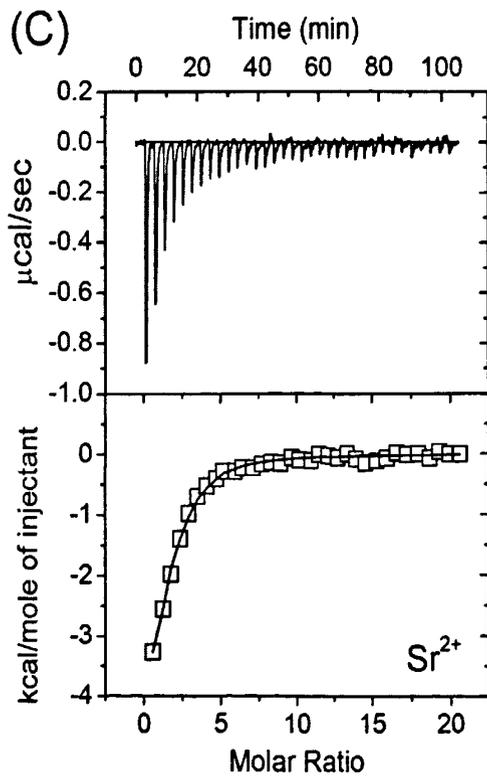
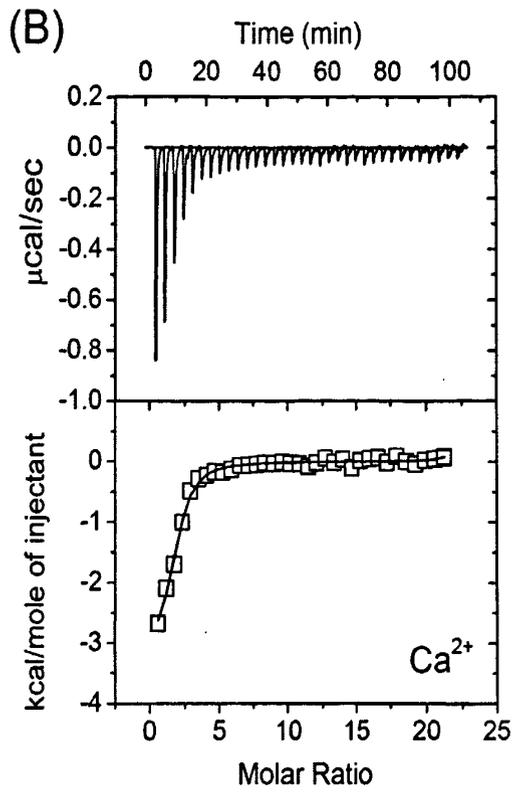
表 2.1 ITC 测定金属离子与 apo-ACF II 结合的热力学数据

Table 2.1. Thermodynamic parameters for metal ion binding to metal-free ACF II (apo-ACF II) at pH 7.6 obtained from isothermal titration calorimetry measurements in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) at 25 °C

金属离子	位点	K_A (M^{-1})	ΔG ($kcal\ mol^{-1}$)	ΔH ($kcal\ mol^{-1}$)	ΔS ($cal\ mol^{-1}\cdot K^{-1}$)	$T\Delta S$ ($kcal\ mol^{-1}$)
Ca^{2+}	I	$(3.20\pm 0.38)\times 10^5$	-7.50 ± 0.12	-9.18 ± 0.73	-5.60 ± 0.60	-1.67 ± 0.47
	II	$(4.14\pm 0.36)\times 10^3$	-4.92 ± 0.14	-7.12 ± 0.68	-7.38 ± 0.45	-2.20 ± 0.14
Sr^{2+}	I	$(1.05\pm 0.24)\times 10^5$	-6.86 ± 0.23	-6.74 ± 0.53	0.40 ± 0.20	0.12 ± 0.05
	II	$(2.96\pm 0.31)\times 10^3$	-4.74 ± 0.10	-4.19 ± 0.25	1.84 ± 0.31	0.55 ± 0.09
Ba^{2+}	I	$(6.91\pm 0.67)\times 10^4$	-6.60 ± 0.18	-4.24 ± 0.41	7.95 ± 0.73	2.37 ± 0.24
	II	$(2.21\pm 0.26)\times 10^3$	-4.56 ± 0.16	-3.11 ± 0.42	4.83 ± 0.62	1.44 ± 0.21

All values represent the average of triplicate determinations





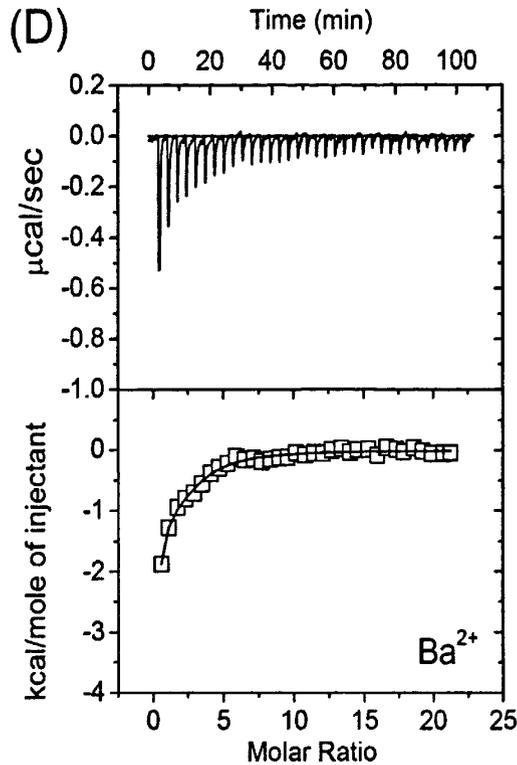


图 2.10 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 滴定 apo-ACF II 的 ITC 图

Fig.2.10 Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements of Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Sr^{2+} (C) and Ba^{2+} (D) binding to metal-free ACF II (apo-ACF II). Raw ITC data for injecting 0.6 mM alkaline earth metal ions in 20 mM Tris-HCl, pH 7.6 into 12 μ M ACF II in the same buffer at 25°C (Upper panels). Normalized ITC data for titrations versus molar ratio of metal-ion to apo-ACF II (Lower panels). Data analysis using Origin 7.5 software package indicates that the binding data fit well to a two sequential sites model.

2.4.4 金属离子对 ACF II 对其结构的影响

从前面的ITC实验我们已经得到各种碱土金属离子与apo-ACF II的结合信息。我们接着通过CD实验研究这些金属离子与apo-ACF II的结合对其二级结构的影响。如图 2.11A所示, apo-ACF II和 Ca^{2+} -ACF II的CD光谱图非常接近, 而在apo-ACF II的溶液中加入最终浓度为 1mmol/L的 Mg^{2+} , Sr^{2+} 或者 Ba^{2+} 都不使其CD光谱图发生显著的变化。这说明, 这些金属离子都不对ACF II的二级结构产生影响。色氨酸残基的荧光变化可以很灵敏的反应蛋白质结构的细微变化[15, 16]。分别测定不含任何金属离子的apo-ACF II及存在 1 mmol/L Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} 或者 Ba^{2+} 的apo-ACF II溶液的荧光, 并比较它们的荧光变化。图 2.11B为ACF II在

295nm波长的激发光下检测到的发射光谱,其中,不含任何金属离子的apo-ACF II的最大发射波长为 339nm;加入 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 离子的溶液荧光强度分别增强11%、10%、8%,而最大发射波长没有发生改变;加入 Mg^{2+} 离子的溶液荧光没有明显变化。这表明, Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 离子与apo-ACF II的结合会诱导ACF II的部分色氨酸残基的微环境发生改变。虽然这个改变没有影响色氨酸周围环境疏水性的改变,但是有可能导致色氨酸周围原本的荧光淬灭基团发生了移动。这个移动可能减弱了荧光淬灭基团的淬灭作用,所以导致了荧光强度增强的结果。而 Mg^{2+} 没有诱导荧光发生变化,这与其不结合apo-ACF II的ITC结果吻合。

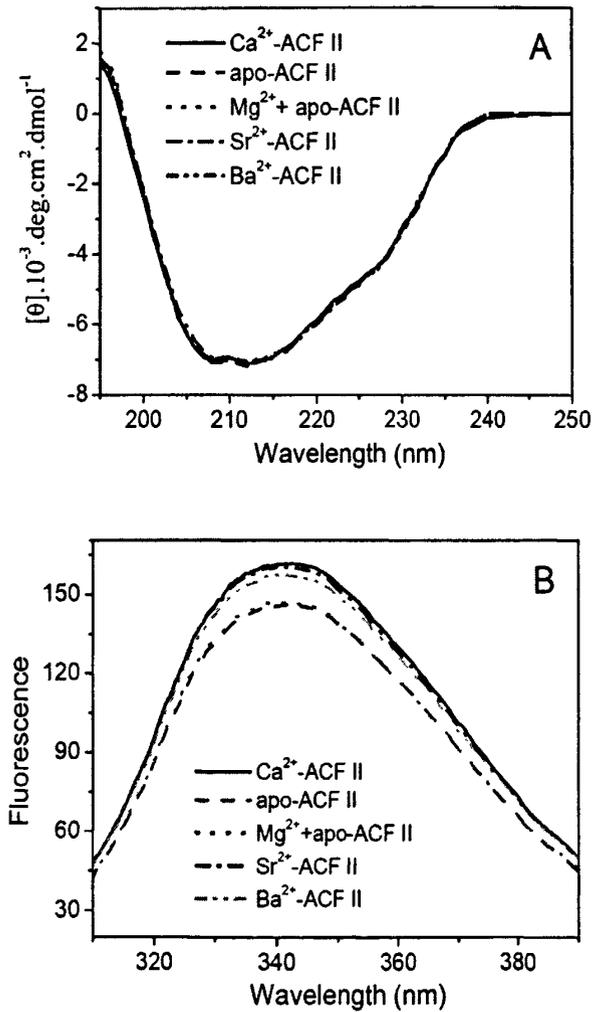


图 2.11 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 对 apo-ACF II 的圆二色谱图和荧光光谱图的影响

Fig.2.11 The effects of metal ions on the far-UV circular dichroism spectrum

and fluorescence of ACF II. (A) The far-UV circular dichroism spectra of 10 μM apo-ACF II in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) at 25 °C in the absence and presence of 1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} , respectively. (B) The intrinsic fluorescence spectra of apo-ACF II (1 μM) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) in the absence and presence of 1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} , respectively, after excitation at 295 nm.

2.4.5 通过 PAGE 检测金属离子调控 ACF II 和 FX 结合

ACF II在 Ca^{2+} 存在的情况可以与FXa形成 1: 1 结合的复合物 [17]。我们通过非变性的PAGE来检测在 Mg^{2+} , Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 存在的情况下, apo-ACF II和FXa的结合情况。电泳的检测方式非常直观, 如图 2.12A所示, 第 1 道和第 4 道分别为 apo-ACF II和FXa, apo-ACF II和FXa (摩尔比 1: 1) 在 1 mmol/L的 Mg^{2+} 存在的情况下形成的复合物产生了一条新的条带(图 2.12A, 第 2 道), 同时 apo-ACF II和FXa原本对应的条带都消失了。当 apo-ACF II和FXa的摩尔比为 1: 2 的时候, 在 1 mmol/L的 Mg^{2+} 存在的情况下, 既有复合物的条带, 也有FXa的条带(图 2.12A, 第 3 道)。以上结果证明 apo-ACF II和FXa在 1mmol/L的 Mg^{2+} 存在的情况下会 1: 1 结合形成复合物。图 2.12 的B和C分别证明了在 1 mmol/L的 Sr^{2+} 或者 Ba^{2+} 存在的情况下, apo-ACF II和FXa也都会形成 1: 1 结合的复合物。

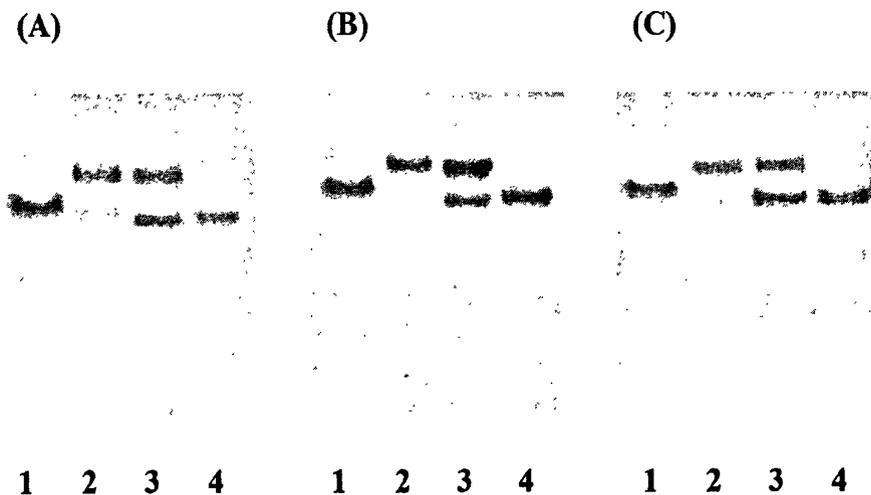


图 2.12 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 对 apo-ACF II 与 FXa 结合的影响

Fig.2.12 Analysis of the effects of metal ions on the binding of ACF II to FXa by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis: Samples were electrophoresed in the presence of 1 mM Mg^{2+} (A), Sr^{2+} (B) or Ba^{2+} (C). Lane 1 contained 4 μl apo-ACF II; lane 2 contained 4 μl apo-ACF II and 4 μl FXa; lane 3 contained 4 μl apo-ACF II and 8 μl FXa; Lane 4 contained 4 μl FXa. The concentrations of both

apo-ACF II and FXa are 20 μ M.

2.4.6 SPR 分析金属离子对 ACF II 与 FXa 结合反应的影响

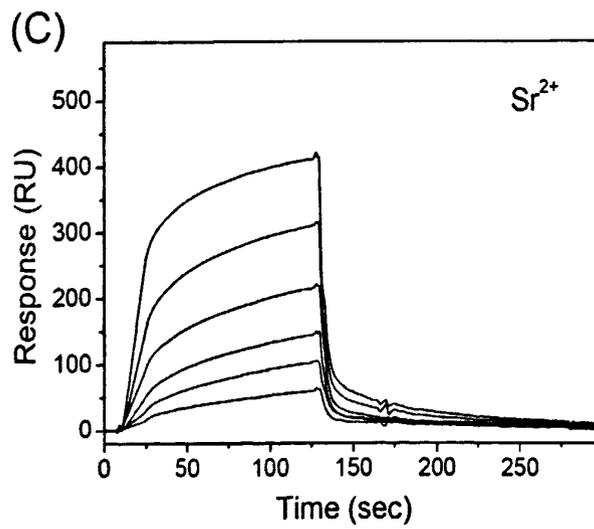
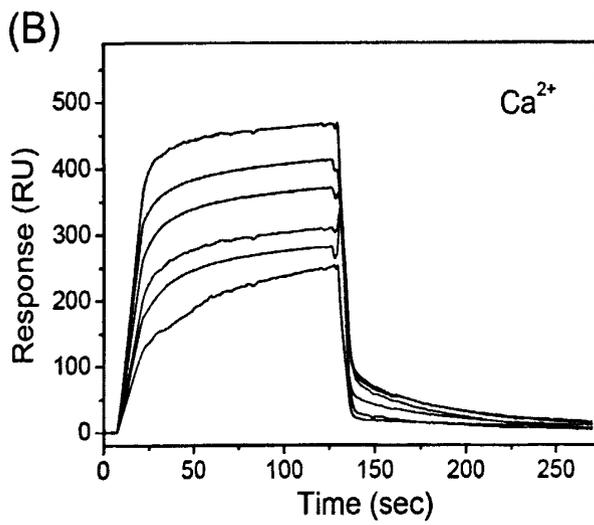
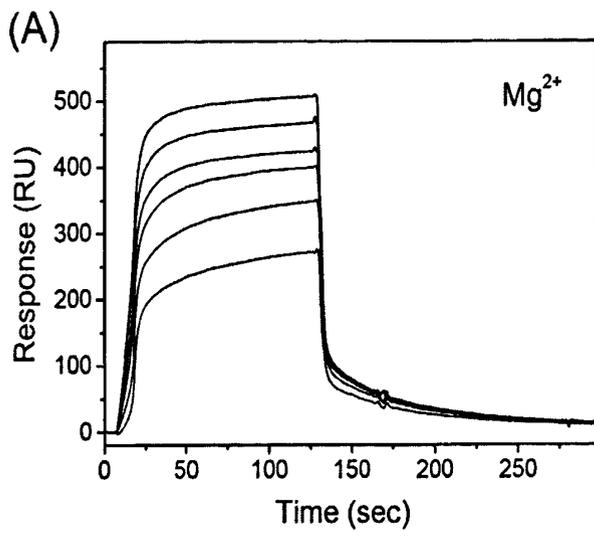
前面的聚丙烯酰胺凝胶电泳显示 apo-ACF II 与 FXa 在 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 存在的条件下都会发生 1:1 的结合, 而它们的结合的动力学参数可以通过 SPR 实验来进一步获得。图 2.13 为在 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 存在的条件下, apo-ACF II 和 FXa 的结合曲线和解离曲线。在 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 存在的条件下, apo-ACF II 与 FX 都会发生特异性结合, 但是在不同的金属离子条件下, 它们的结合亲和力是不同的。使用 1:1 Langmuir 模型对结合曲线和解离曲线进行拟合可以计算得到结合的动力学参数, 如结合速度常数 (k_{on}), 解离速度常数 (k_{off}), 结合常数 (K_A), 解离常数 (K_D)。具体数据列在表 2.2 中。我们可以发现, 金属离子诱导的 apo-ACF II 和 FXa 的结合反应的亲和力大小为 $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$ 。

表 2.2 不同金属离子存在条件下, SPR 测定 ACF II 与 FXa 结合动力学的数据

Table 2.2 Effect of metal ions on kinetic parameters for binding of ACF II with FXa in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) determined by surface plasmon resonance.

Metal ion	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)
Mg^{2+}	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^5$	$(5.8 \pm 0.5) \times 10^{-2}$	$(3.0 \pm 0.3) \times 10^6$	$(3.3 \pm 0.3) \times 10^{-7}$
Ca^{2+}	$(4.4 \pm 0.3) \times 10^4$	$(2.7 \pm 0.5) \times 10^{-2}$	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^6$	$(6.0 \pm 0.9) \times 10^{-7}$
Sr^{2+}	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^4$	$(4.7 \pm 0.4) \times 10^{-2}$	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^5$	$(4.3 \pm 0.3) \times 10^{-6}$
Ba^{2+}	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^3$	$(7.7 \pm 0.6) \times 10^{-2}$	$(1.9 \pm 0.1) \times 10^3$	$(5.4 \pm 0.4) \times 10^{-4}$

All values represent the average of triplicate determinations.



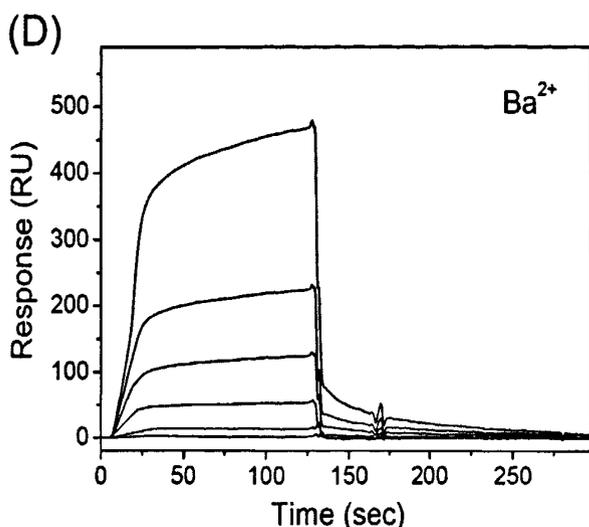


图 2.13 SPR 分析 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 对 apo-ACF II 与 FXa 结合动力学的影响

Fig.2.13 Surface plasmon resonance kinetic analysis of the effect of metal ions on the interaction of ACF II with FXa. Apo-ACF II in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing 1 mM Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Sr^{2+} (C) or Ba^{2+} (D) was injected over an immobilized FXa surface at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 μM for 2 min, and dissociation was monitored for 3 min. The kinetic parameters were obtained from each interaction by fit of the data to a 1:1 Langmuir model.

2.4.7 通过 PAGE 检测金属离子调控 ACF II 和 FIX 结合

我们在前面已经详细研究了 ACF II 与凝血因子 X 结合反应,但 ACF II 与凝血因子 X 的结合情况没有被报道。我们通过非变性的 PAGE 来检测在 Ca^{2+} 存在的情况下, ACF II 和 FIX 的结合情况。电泳的检测结果如图 2.14 所示,第 1 道和第 4 道分别为 ACF II 和 FIX;在第 3 道中 ACF II 和 FIX(摩尔比 1:1)在 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在的情况下形成的复合物产生了一条新的条带,同时 apo-ACF II 和 FXa 原本对应的条带都消失了;在 2 道中 ACF II 和 FIX 的摩尔比为 1:2 的时候,在 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在的情况下,既有复合物的条带,也有 FIX 的条带。所以, ACF II 和 FIX 在 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在的情况下也会 1:1 结合形成复合物。

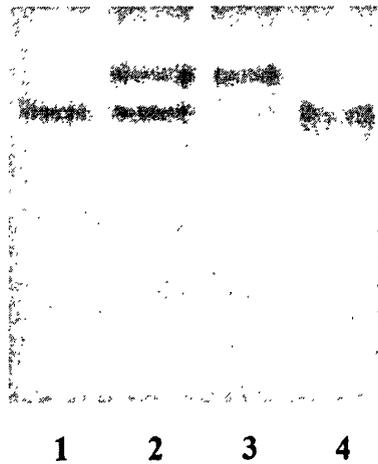


图 2.14 通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析在 Ca^{2+} 存在的条件下 ACF II 与 FIX 结合

Fig.2.14 Analysis of the effects of metal ions on the binding of ACF II to FIX by non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 1 mM Ca^{2+} .

Lane 1 contained 4 μl ACF II; lane 2 contained 4 μl ACF II and 8 μl FIX; lane 3 contained 4 μl ACF II and 4 μl FIX; Lane 4 contained 4 μl FIX. The concentrations of both ACF II and FIX are 20 μM .

2.4.8 SPR 分析金属离子对 ACF II 与 FIX 结合反应的影响

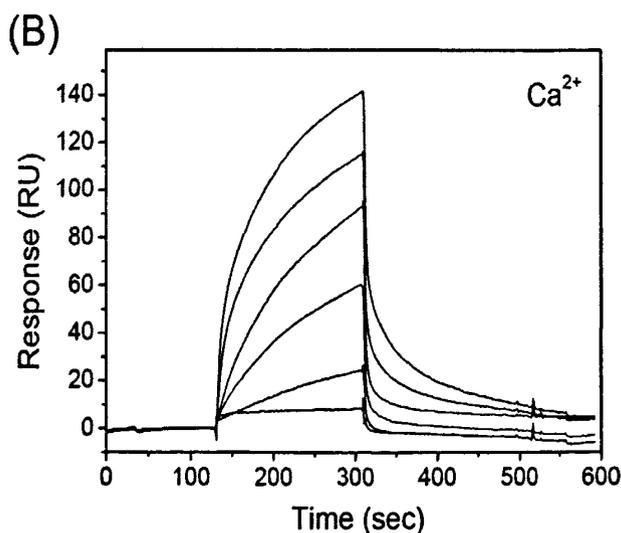
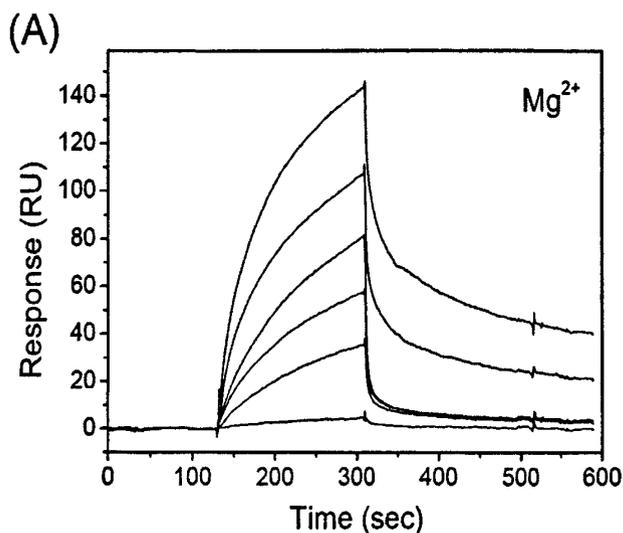
前面的聚丙烯酰胺凝胶电泳显示在 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在的情况下 ACF II 与 FIX 会发生 1:1 的结合。我们通过 SPR 实验可以进一步研究不同金属离子对 ACF II 与 FIX 结合反应的影响, 并获得它们的结合的动力学参数。图 2.15 为在 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 存在的情况下, apo-ACF II 和 FIX 的结合曲线和解离曲线。在 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 存在的情况下, apo-ACF II 与 FIX 都会发生特异性结合, 但是在不同的金属离子条件下, 它们的结合亲和力是不同的。使用 1:1 Langmuir 模型对结合曲线和解离曲线进行拟合可以计算得到结合的动力学参数, 如结合速度常数 (k_{on}), 解离速度常数 (k_{off}), 结合常数 (K_A), 解离常数 (K_D)。具体数据列在表 2.3 中。我们可以发现, 金属离子诱导的 apo-ACF II 和 FIX 的结合反应的亲和力大小为 $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ 。

表 2.3 不同金属离子存在条件下, SPR 测定 ACF II 与 FIX 结合动力学的数据

Table 2.3 Effect of metal ions on kinetic parameters for binding of ACF II with FIX in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) determined by surface plasmon resonance.

Metal ion	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_A (M^{-1})	K_D (M)
Mg^{2+}	$(3.55 \pm 0.2) \times 10^4$	$(7.26 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	$(4.89 \pm 0.3) \times 10^6$	$(2.05 \pm 0.3) \times 10^{-7}$
Ca^{2+}	$(1.97 \pm 0.3) \times 10^4$	$(1.91 \pm 0.5) \times 10^{-3}$	$(1.03 \pm 0.2) \times 10^6$	$(9.7 \pm 0.9) \times 10^{-7}$
Sr^{2+}	$(2.16 \pm 0.1) \times 10^3$	$(3.67 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$(5.89 \pm 0.1) \times 10^5$	$(1.7 \pm 0.3) \times 10^{-6}$
Ba^{2+}	$(4.29 \pm 0.2) \times 10^2$	$(5.03 \pm 0.6) \times 10^{-3}$	$(8.53 \pm 0.1) \times 10^4$	$(1.17 \pm 0.4) \times 10^{-5}$

All values represent the average of triplicate determinations.



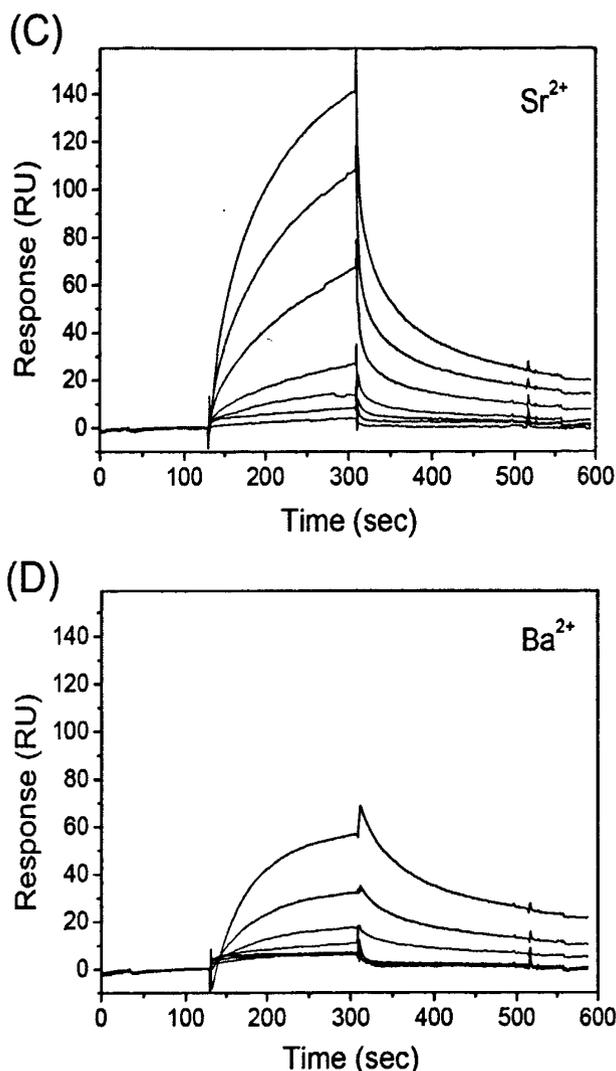


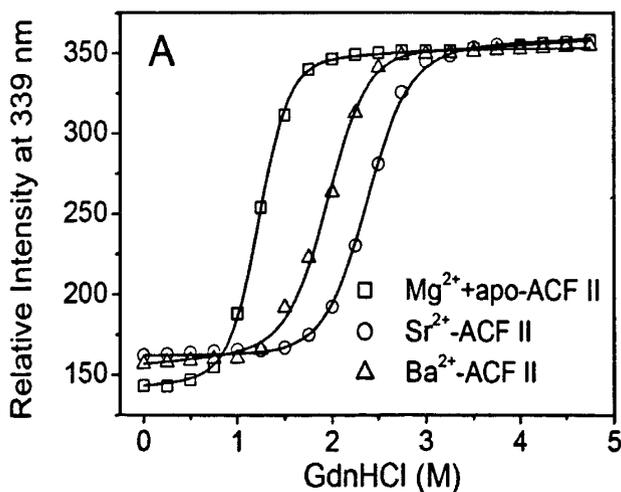
图 2.15 SPR 分析 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 对 apo-ACF II 与 FIX 结合动力学的影响

Fig.2.15 Surface plasmon resonance kinetic analysis of the effect of metal ions on the interaction of ACF II with FIX. Apo-ACF II in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing 1 mM Mg^{2+} (A), Ca^{2+} (B), Sr^{2+} (C) or Ba^{2+} (D) was injected over an immobilized FXa surface at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 μM for 3 min, and dissociation was monitored for 3 min. The kinetic parameters were obtained from each interaction by fit of the data to a 1:1 Langmuir model.

2.4.9 荧光检测金属离子对 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠的影响

我们以前的结果显示 apo-ACF II 在 GdnHCl 的诱导下发生的两态解折叠，其

ΔG^0 为 4.60 ± 0.08 kcal/mol, 而 Ca^{2+} -ACF II 在 GdnHCl 的诱导下会发生三态的解折叠过程, 其 $\Delta G_{\text{total}}^0$ 为 6.37 ± 0.13 kcal/mol [10]。现在我们进一步通过测定色氨酸的内源性荧光来研究 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 对 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠过程的影响。ACF II 含有 14 个色氨酸残基, 荧光光谱强度的变化和平均发射波长(AEW) 的位移都可以用来表征 ACF II 蛋白结构发生的变化。图 2.16 中的三条曲线分别为在 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 存在的情况下 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠过程中 339 nm 处荧光强度变化曲线, 它们均为没有明显中间态的两态解折叠过程。在 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 存在下, 当 GdnHCl 浓度为 0.65 mol/L 时, apo-ACF II 开始解折叠, 当 GdnHCl 的浓度达到 1.90 mol/L 时, apo-ACF II 完成解折叠, 这个解折叠过程伴随着 AEW 的红移 ($356.7 \text{ nm} \rightarrow 362.8 \text{ nm}$)。我们发现, 在 Mg^{2+} 存在的情况下, apo-ACF II 的解折叠曲线和 apo-ACF II 在没有任何金属离子存在下的解折叠曲线是非常接近的 [10]。 Sr^{2+} -ACF II 的解折叠过程开始于 1.50 mol/L GdnHCl, 在 3.25 mol/L 的 GdnHCl 浓度时完成解折叠, AEW 的红移为 $356.7 \text{ nm} \rightarrow 362.8 \text{ nm}$ 。 Ba^{2+} -ACF II 的解折叠过程开始于 1.25 mol/L GdnHCl, 在 2.90 mol/L 的 GdnHCl 浓度时完成解折叠, AEW 的红移为 $356.7 \text{ nm} \rightarrow 362.8 \text{ nm}$ 。通过两态拟合模式 ($\text{N} \leftrightarrow \text{D}$), 可以计算获得 apo-ACF II 在各个金属离子存在的条件下解折叠的动力学参数。具体动力学数据都列于表 2.4 中。我们通过比较可以发现, 在 Mg^{2+} 存在的情况下, apo-ACF II 的解折叠动力学参数, 如 ΔG^0 、 C_m 、 m , 分别和 apo-ACF II 在没有任何金属离子存在下的解折叠动力学参数非常接近的 [10]。而 Sr^{2+} -ACF II 和 Ba^{2+} -ACF II 的 ΔG^0 都大于 apo-ACF II 的 ΔG^0 , 这个结果可以证明, Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 与 Ca^{2+} 一样, 都对 ACF II 的结构起稳定性作用。



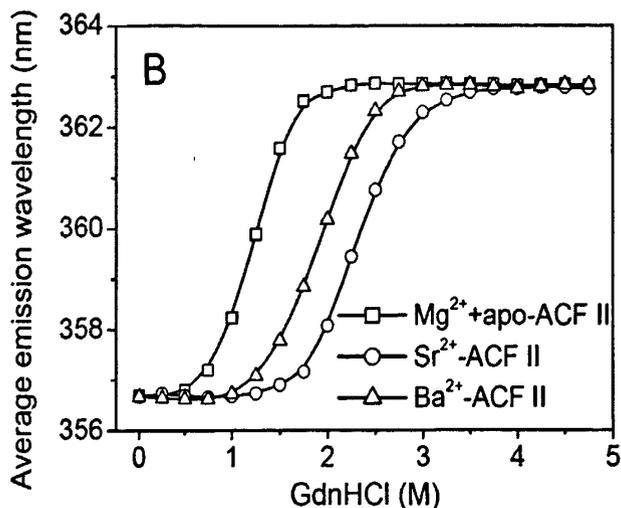


图 2.16 通过荧光研究金属离子对 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠的影响

Fig.2.16 The effects of metal ions on GdnHCl-induced unfolding of ACF II (1 μ M) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6, 25°C). Unfolding transitions of apo-ACF II in the presence of 1 mM Mg^{2+} , Ba^{2+} -ACF II in the presence of 1 mM Ba^{2+} and Sr^{2+} -ACF II in the presence of 1 mM Sr^{2+} were monitored by measurement of fluorescence at 339 nm (A) and average emission wavelength (AEW) (B) after exciting at 295 nm. The curves in figure (A) are the fitting curves based on experimental points by nonlinear least-squares analysis for each two-state transition. AEW (mean of the integral between 300 and 450 nm) was calculated as: $AEW = (\sum F(\lambda) \times \lambda) / \sum F(\lambda)$, where $F(\lambda)$ is the point fluorescence at wavelength λ [18]

2.4.10 CD 分析金属离子对 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠的影响

为了分析由荧光光谱测定的 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠过程是整体结构变化还是局部解折叠, 我们通过 CD 谱检测 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠过程。图 2.17 为检测不同 GdnHCl 浓度下蛋白质在 222 nm 的椭圆率的变化曲线图。在 1 mmol/L Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 存在的情况下, apo-ACF II 的 CD 变化曲线都是没有中间态的一步变化过程。和荧光的拟合方式类似, 也使用两态拟合模式, 计算得到 ΔG^0 、 C_m 、 m 。在表 2.4 中, 把通过 CD 检测 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠过程得到的数据拟合出的动力学参数和通过荧光检测 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠过程得到的数据拟合出的动力学参数放在一起。通过比较 CD 椭圆率变化曲线图 (图 2.17) 和荧光强度变化曲线图 (图 2.16A), 我们发现, CD 和荧光对 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠过程的检测结果是大致吻合的。比较表 2.4 中计算的动力学参数, CD 法和荧光法最后得到的 ΔG^0 、 C_m 、 m 结果也是大致相同的。

通过 CD 和荧光共同证明了 apo-ACF II 在 Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 存在条件下的化学变性是一个两态过程, Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 可以像 Ca^{2+} 一样提高 apo-ACF II 的化学稳定性, 而 Mg^{2+} 对 apo-ACF II 化学稳定性不做贡献。以上结果表明, 荧光光谱检测的 ACF II 的解折叠过程是蛋白质整体结构变化过程。

表 2.4 荧光分析不同金属离子存在条件下 apo-ACF II 化学变性的热力学数据

Table 2.4 Thermodynamic parameters for unfolding equilibria of Mg^{2+} + apo-ACF II, Sr^{2+} -ACF II and Ba^{2+} -ACF II in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) induced by GdnHCl at 25 °C, monitored by measurements of fluorescence at 339 nm and by the measurements of ellipticity at 222 nm.

样 品	C_m (M)	m (kcal M^{-1} mol $^{-1}$)	ΔG^0 (kcal mol $^{-1}$)
Mg^{2+} +apo-ACF II*	1.20 ± 0.03	3.74 ± 0.09	4.62 ± 0.08
Mg^{2+} +apo-ACF II**	1.24 ± 0.01	3.52 ± 0.04	4.38 ± 0.05
Sr^{2+} -ACF II*	2.38 ± 0.06	2.54 ± 0.07	6.03 ± 0.16
Sr^{2+} -ACF II**	2.42 ± 0.03	2.46 ± 0.03	5.96 ± 0.11
Ba^{2+} -ACF II*	1.95 ± 0.05	2.77 ± 0.04	5.43 ± 0.05
Ba^{2+} -ACF II**	1.99 ± 0.02	2.66 ± 0.02	5.29 ± 0.07

All values represent the average of triplicate determinations.

* The values were monitored by measurement of the fluorescence at 339 nm.

** The values were monitored by the measurements of ellipticity at 222 nm.

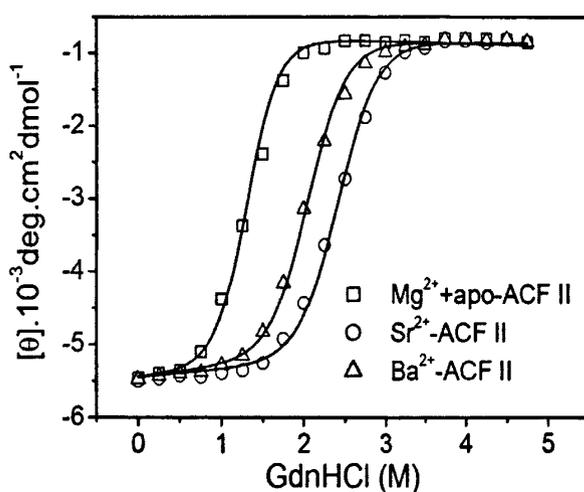


图 2.17 通过 CD 研究金属离子对 GdnHCl 诱导 apo-ACF II 解折叠的影响

Fig.2.17 GdnHCl-induced changes of the far-UV CD spectra of ACF II (10 μM) in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, 25°C. Unfolding transitions of apo-ACF II in the presence of 1 mM Mg^{2+} , Ba^{2+} -ACF II in the presence of 1 mM Ba^{2+} and Sr^{2+} -ACF II in the presence of 1 mM Sr^{2+} were monitored by measurement of far-UV CD ellipticity at 222 nm. The curves are the fitting curves based on experimental points by nonlinear least-squares analysis for each two-state transition.

2.4.11 金属离子对 ACF II 热稳定性的影响

前面讨论的是 ACF II 的化学稳定性,这里我们通过荧光和 CD 来检测 ACF II 的热变性过程。图 2.18A 为没有任何金属离子存在的 apo-ACF II 以及 apo-ACF II 在 1mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 存在下 339 nm 的荧光强度随温度变化曲线。在没有金属离子存在的情况下, apo-ACF II 表现出二个步骤的解折叠过程。在 40 °C 到 51 °C, apo-ACF II 在 339 nm 的荧光强度出现了缓慢的增长,从 51 °C 到 59 °C 增长则非常迅速,并在 59 °C 达到平台值。在 70 °C 到 90 °C 的时候, apo-ACF II 的荧光强度突然急剧下降,这是由于在 70 °C 以上的高温环境下,蛋白质会发生聚集。在 apo-ACF II 溶液中加入 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 后,其荧光强度随温度变化曲线和没有加任何金属离子溶液的曲线基本相同。这表明, Mg^{2+} 对 apo-ACF II 的热稳定性没有贡献。而在 apo-ACF II 溶液中分别加入 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或者 Ba^{2+} 会使荧光强度随温度变化曲线中的两个解折叠区域都向高温移动,这说明 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 都会增强 apo-ACF II 的热稳定性。和 apo-ACF II 一样, Ca^{2+} -ACF II、 Sr^{2+} -ACF II 或者 Ba^{2+} -ACF II 也会在 70 °C 以上发生聚集。

通过两态拟合模式计算,可以得到荧光分光光度法测定的热变性过程的热力学参数 ΔC_p 、 ΔH_m 和 T_m , 具体数值列在表 2.5 中。

图 2.18B 为没有任何金属离子存在的 apo-ACF II 以及 apo-ACF II 在 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 存在时 222 nm 的椭圆率随温度变化曲线。图中的五条椭圆率升温变化曲线均表现为一步解折叠过程。和荧光得到的结果类似,没有金属离子的 apo-ACF II 和加入 Mg^{2+} 的样品所测得的椭圆率升温变化曲线大致相同。而加入 1 mmol/L Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 的样品,其椭圆率随温度变化曲线中的解折叠区域显著的向高温方向移动了。使用两态拟合模式计算,可以得到 CD 法测定的热变性过程的热力学参数,具体数值和荧光法测得的一起列在表 2.5 中。CD 的实验结果和荧光的实验结果比较吻合,共同论证了,不与 apo-ACF II 结合的 Mg^{2+} 对 apo-ACF II 的热稳定性没有影响,与 apo-ACF II 结合的 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 都会增强 apo-ACF II 的热稳定性。

表 2.5 荧光和 CD 分析不同金属离子存在条件下 apo-ACF II 热变性的热力学数据

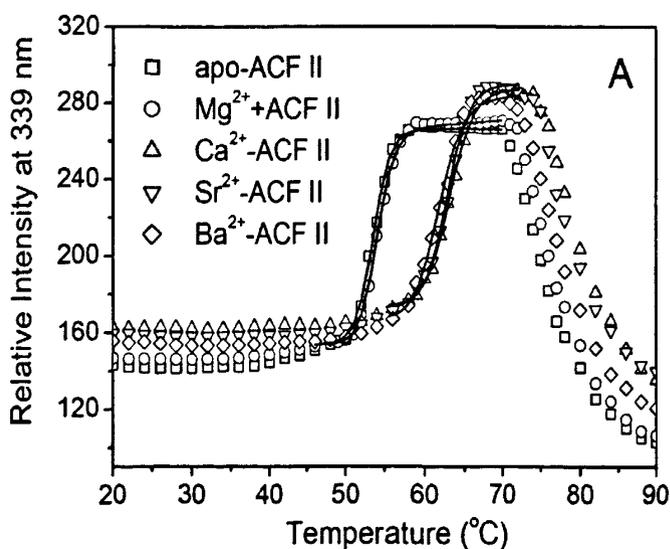
Table 2.5 Thermodynamic parameters for the thermal denaturation of apo-ACF II, Mg^{2+} -ACF II, Sr^{2+} -ACF II and Ba^{2+} -ACF II in 20 mM Tris-HCl at pH 7.6, monitored by measurements of fluorescence at 339 nm and by measurements of ellipticity at 222 nm.

样品	ΔC_p kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	ΔH_m kcal·mol ⁻¹	T_m °C
Apo-ACF II*	0.31 ± 0.04	129.4 ± 1.5	53.02 ± 0.17
Apo-ACF II**	0.15 ± 0.01	104.2 ± 0.8	52.17 ± 0.20
Mg^{2+} -apo-ACF II*	0.42 ± 0.03	135.1 ± 1.4	53.39 ± 0.13
Mg^{2+} -apo-ACF II**	0.16 ± 0.02	105.1 ± 1.1	52.91 ± 0.18
Ca^{2+} -ACF II*	0.58 ± 0.03	227.4 ± 1.0	63.17 ± 0.29
Ca^{2+} -ACF II**	0.34 ± 0.01	215.3 ± 2.1	63.84 ± 0.15
Sr^{2+} -ACF II*	0.49 ± 0.02	233.7 ± 0.8	62.98 ± 0.18
Sr^{2+} -ACF II**	0.42 ± 0.03	231.2 ± 1.9	63.20 ± 0.27
Ba^{2+} -ACF II*	0.55 ± 0.01	250.6 ± 1.5	62.03 ± 0.12
Ba^{2+} -ACF II**	0.49 ± 0.01	244.5 ± 2.3	61.77 ± 0.29

All values represent the average of triplicate determinations.

* The values were monitored by measurement of the fluorescence at 339 nm.

** The values were monitored by the measurements of ellipticity at 222 nm.



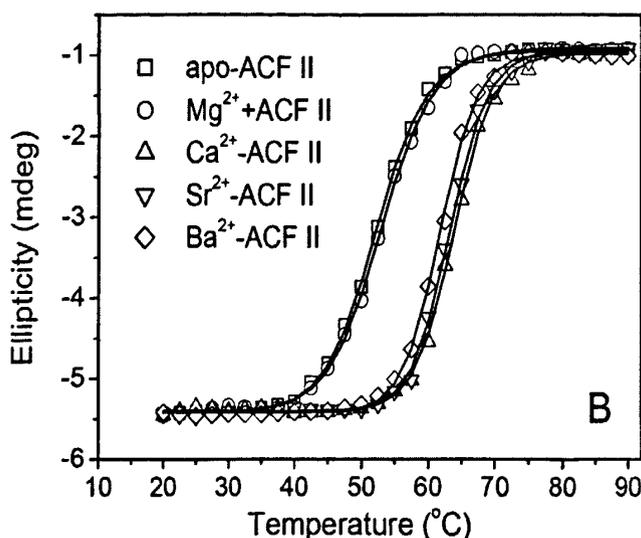


图 2.18 通过荧光和圆二色谱研究金属离子对 apo-ACF II 热变性解折叠的影响

Fig.2.18 Thermal-induced unfolding of ACF II in 20 mM Tris-HCl, pH 7.6 followed by fluorescence. (A) The fluorescence of 1 μM apo-ACF II in the absence and presence of 1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} or Ba^{2+} was measured at 339 nm as a function of temperature, using a linear temperature ramp of 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (B) The ellipticities of 10 μM apo-ACF II in the absence and presence of 1 mM Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} or Ba^{2+} were measured at 222 nm as a function of temperature, using a linear temperature ramp of 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The lines are nonlinear least squares fits of Equation 6 (Materials and methods) to the experimental data.

2.4.10 DSC 分析金属离子对 ACF II 热稳定性的影响

使用 DSC 可以深入研究 ACF II 热变性过程中的每一个相变。图 2.19 中的五幅图分别为没有任何金属离子存在的 apo-ACF II 或是含有 1 mmol/L 的 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 的 apo-ACF II 的 DSC 热量变化曲线（已经修正了基线，并做了蛋白质浓度归一化）。Apo-ACF II 的热量变化曲线可被拟合为三个两态转变过程，其拟合得到的热力学参数见表 2.5。

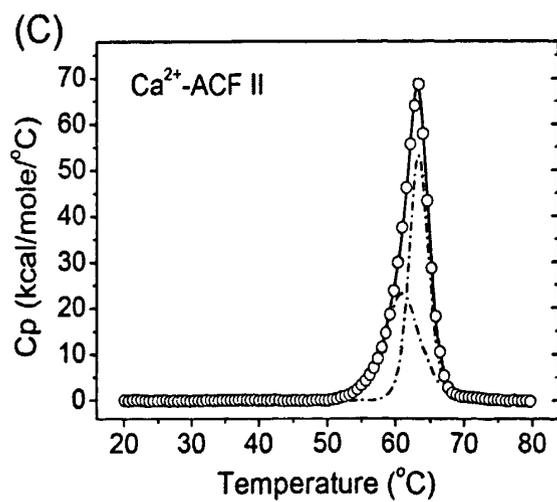
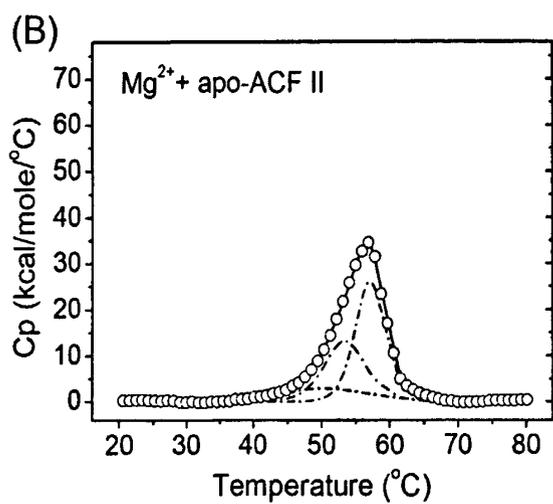
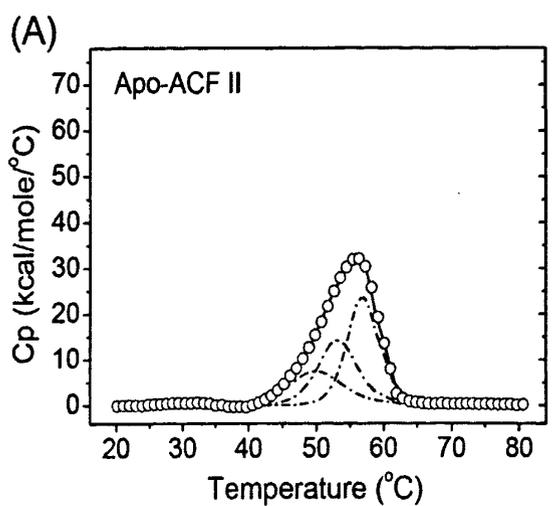
表 2.6 DSC 分析不同离子存在的情况 apo-ACF II 的热变性的热力学数据

Table 2.6. Thermodynamic parameters for the thermal denaturation of apo-ACF II, Mg^{2+} + apo-ACF II, Sr^{2+} -ACF II and Ba^{2+} -ACF II monitored by differential scanning calorimetry in 20 mM Tris-HCl at pH 7.6.

Species	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kcal·mol ⁻¹)	ΔH_{vH} (kcal·mol ⁻¹)	$\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$
Apo-ACF II	50.02±0.10	78.2±1.3	81.8±1.8	0.96
	53.23±0.09	110±9	119±3	0.92
	56.90±0.03	143±8	144±13	0.99
Mg ²⁺ +apo-ACF II	50.65±0.18	48.8±0.8	51.0±1.1	0.96
	53.50±0.05	105±6	114±1	0.92
	57.14±0.02	159±8	172±7	0.92
Ca ²⁺ -ACF II	61.05±0.09	143±5	131±9	1.09
	63.44±0.01	209±5	237±3	0.88
Sr ²⁺ -ACF II	60.46±0.30	127±4	133±3	0.95
	63.40±0.04	219±14	209±5	1.05
Ba ²⁺ -ACF II	58.78±0.19	159±9	145±10	1.10
	62.25±0.03	228±9	209±3	1.09

All values represent the average of triplicate determinations.

这三个两态转变的 T_m 分别为 50.02±0.10 °C, 53.23±0.09 °C 和 56.90±0.03 °C。含有 1 mmol/L Mg²⁺的 apo-ACF II 的热量变化曲线与不含 Mg²⁺时的曲线非常接近, 也被拟合为三个两态转变过程, 且拟合得到的三个 T_m 值也很接近(见表 2.6)。当 apo-ACF II 与 Ca²⁺、Sr²⁺ 或者 Ba²⁺ 结合以后, 其热量变化曲线只能拟合为两个两态转变过程, 且 T_m 值都有显著的增加(见表 2.6)。这些结果进一步证明了 Ca²⁺、Sr²⁺ 和 Ba²⁺ 与 apo-ACF II 结合以后会增加其热力学稳定性。通过计算 $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ 的比例可以推测协同单元的数目 [19, 20]。对于一个严格的两态转变, 其 $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}=1$ 。如果 $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}>1$, 说明在整个过程中有一个或者多个中间态; 如果 $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}<1$, 则表示分子间有相互作用。没有任何金属离子存在的 apo-ACF II 以及含有 1 mmol/L 的 Mg²⁺、Ca²⁺、Sr²⁺ 或 Ba²⁺ 的 apo-ACF II 的所有热量变化曲线的所有转变峰的 $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ 都接近于 1, 这说明这些转变都是近似的两态转变过程。



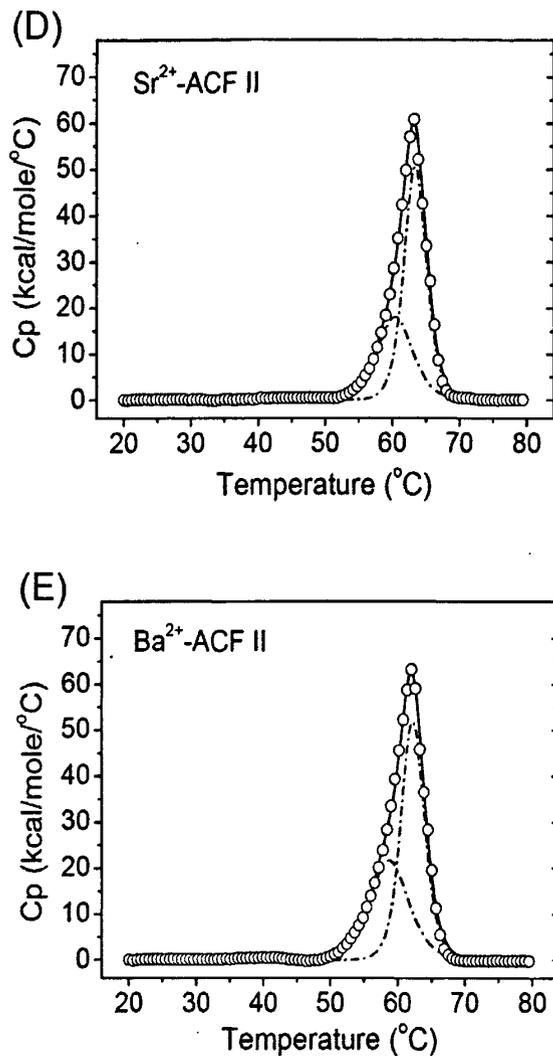


图 2.19 DCS 分析金属离子对 apo-ACF II 热变性解折叠的影响

Fig.2.19 The effects of metal ions on thermal-induced unfolding of ACF II in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6). Unfolding transitions of 40 μ M apo-ACF II in the absence (A) and presence of 1 mM Mg^{2+} (B), 1 mM Ca^{2+} (C), 1 mM Sr^{2+} (D) and 1 mM Ba^{2+} (E) were monitored by differential scanning calorimetry (DSC). The data points are shown as open circles, and the solid line is the best fit of the DSC data to models of three two-state transitions for (A and B) or two two-state transitions for (C, D and E). Dashed lines represent the predicted C_p curve of each of the two-state transitions in which the global curve can be deconvoluted. Scan rate is 60 °C/h.

2.5 实验讨论

这一章节的工作主要研究碱土金属离子和 ACF II 结合的热力学性质以及这些金属离子对 ACF II 与 FXa 结合的亲和力和 ACF II 的结构稳定性的影响。我们的研究表明, 溶液中 Ca^{2+} 的存在并不是 ACF II 和 FXa 结合的必须条件, Mg^{2+} , Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 都可以诱导 ACF II 和 FXa 结合。在不同的金属离子存在的条件下, ACF II 和 FXa 结合的亲和力是不同的, 其亲和力的大小和金属离子的半径相关。金属离子对 ACF II 热稳定性和化学稳定性的提高作用, 也与金属离子的半径密切相关。我们通过实验结果也证明了, 金属离子与 ACF II 的结合并不是 ACF II 与 FXa 结合的前提条件, 而金属离子与 FXa 结合才是 ACF II 与 FXa 结合的前提条件。

我们实验中所测试的碱土金属离子都是相同价态的硬酸, 包括: Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} 和 Ba^{2+} , 但它们的离子半径不同, 分别为 0.078 nm, 0.106 nm, 0.127 nm 和 0.143 nm (www.chemsoc.org)。ITC 结果表明, 离子半径比 Ca^{2+} 小的 Mg^{2+} 与 apo-ACF II 结合的亲和力极弱, 而离子半径比 Ca^{2+} 大的 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 可以占据 ACF II 中的两个 Ca^{2+} 的结合位点。 Mg^{2+} 与 apo-ACF II 的亲和力极弱, 其原因可能在于 Mg^{2+} 的离子半径较 Ca^{2+} 小了很多, 所以难以匹配 ACF II 上的 Ca^{2+} 结合位点。从离子半径的数据上来看, Sr^{2+} 的离子半径和 Ca^{2+} 的离子半径最为接近, 所以, Sr^{2+} 与 ACF II 上的两个结合位点的结合常数 K_{A1} 和 K_{A2} 与 Ca^{2+} 结合 ACF II 的常数也非常接近 (表 2.1)。作为对比, Ba^{2+} 的离子半径比 Ca^{2+} 的离子半径要大很多, 所以, Ba^{2+} 与 ACF II 的两个结合位点的结合常数 K_{A1} 和 K_{A2} 与 Ca^{2+} 的结合常数之间有很大的差异。 Ba^{2+} 取代 Ca^{2+} 导致 K_{A1} 和 K_{A2} 的下降说明, ACF II 上的 Ca^{2+} 特异性结合位点对 Ba^{2+} 的亲和力较低。这些结果说明, ACF II 依据金属离子半径的大小选择结合金属离子。

虽然 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 与 ACF II 的结合对其二级结构都没有影响, 但是这些金属离子的结合会诱导 ACF II 上色氨酸残基的微环境发生改变。以前, 我们已经证明 Ca^{2+} 的结合能增强 ACF II 的结构稳定性 [10]。如图 2.20 所示, ACF II 的 A-链的 N 末端的第二个 α -螺旋通过一个 Ca^{2+} 和 A-链的 C 末端紧密结合, 类似的, B-链的 N 末端的第二个 α -螺旋通过另一个 Ca^{2+} 和 B-链的 C 末端紧密结合。 Ca^{2+} 像锁一样增强 ACF II 结构稳定性。 Ca^{2+} 也可以增强 hahu 蛇毒中 habu IX/X-bp 的结构稳定性 [21]。Habu IX/X-bp 在结合 Ca^{2+} 以后其结构稳定性获得增强, 必需在 3 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在的情况下 habu IX/X-bp 才能够形成晶体, 这表明在 Ca^{2+} 存在的情况下 habu IX/X-bp 才能形成一个更刚性的构型。我们也观察到, Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 能增强 ACF II 在 GdnHCl 诱导的解折叠过程中的结果稳定性。

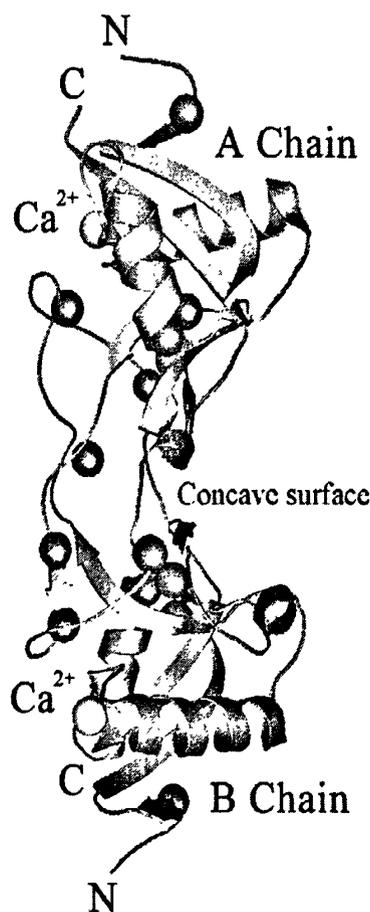


图 2.20 ACF II 的晶体结构 (蛋白质银行号: 1Y17)

Fig.2.20 Ribbon model of the heterodimer polypeptide chains of ACF II. The Ca^{2+} ions and Trp residues are indicated as yellow balls and green balls, respectively. The picture was drawn with a Protein Data Bank file 1Y17.

有趣的是,我们发现就是金属离子的半径对 ACF II 结构稳定性又显著的影响。通过用荧光检测 GdnHCl 诱导的 Ca^{2+} -ACF II, Sr^{2+} -ACF II 和 Ba^{2+} -ACF II 解折叠过程中自由能的变化,我们发现, Sr^{2+} -ACF II 的 ΔG^0 比 Ca^{2+} -ACF II 的 $\Delta G_{\text{total}}^0$ 要略小,两者差值为 $0.34 \pm 0.16 \text{ kcal mol}^{-1}$, 而 Ba^{2+} -ACF II 的 ΔG^0 比 Ca^{2+} -ACF II 的 $\Delta G_{\text{total}}^0$ 要小得多一些,两者差值为 $0.94 \pm 0.13 \text{ kcal mol}^{-1}$ 。这些结果表明 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 都可以提高 apo-ACF II 在抗 GdnHCl 变性过程中的稳定性,其中 Ca^{2+} 提高能力最强, Sr^{2+} 次之, Ba^{2+} 最弱。ACF II 分子中的 Ca^{2+} 被 Sr^{2+} 替换后,替换前后的结构稳定性变化最小,其原因在于 Sr^{2+} 的离子半径和 Ca^{2+} 的离子半径非常接近。而 Ba^{2+} 的离子半径比 Ca^{2+} 的离子半径大很多,所以, ACF II 分子中的 Ca^{2+}

被 Ba^{2+} 替换后, 替换前后的结构稳定性变化比较大。我们也用 CD 光谱检测了, 在不同金属离子存在情况下, GdnHCl 诱导 ACF II 化学变性的过程, 其结果和我们用荧光检测的基本一致。

在 ACF II 的热变性过程中, 我们也观察到碱土金属离子诱导的结构稳定性。通过荧光和 CD 光谱, 检测蛋白质在热变性过程中的 T_m 值, 我们发现, apo-ACF II 在结合 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 以后, 其 T_m 值较 apo-ACF II 的 T_m 有显著的上升 (表 2.5)。这揭示了, Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或 Ba^{2+} 与 apo-ACF II 的结合可以提高 apo-ACF II 对抗热变性的结构稳定性。比较 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 对 ACF II 的 T_m 值提升的差异, 我们发现, 金属离子提高 apo-ACF II 对抗热变性的结构稳定性与金属离子的半径相关。 Ca^{2+} 作为 ACF II 在天然状态下所结合的金属离子, Ca^{2+} -ACF II 的热变性 T_m 值是最高的。 Sr^{2+} 与 Ca^{2+} 的离子半径非常接近, 通过荧光和 CD 检测的 Sr^{2+} -ACF II 的热变性 T_m 值与 Ca^{2+} -ACF II 的热变性 T_m 值也非常接近。 Ba^{2+} 的离子半径比 Ca^{2+} 的大很多, 通过荧光和 CD 检测的 Ba^{2+} -ACF II 的热变性 T_m 值与 Ca^{2+} -ACF II 的 T_m 值要低一些。使用 DSC 可以进一步研究蛋白质在热变性中的转变细节。DSC 得到的结果表明, apo-ACF II 在结合 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 或者 Ba^{2+} 以后, 其热变性的中间转变过程和最高转变过程的 T_m 值都显著的增高了, 这也进一步说明 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 都对 ACF II 的结构稳定性做出贡献, 以提高 ACF II 热变性的转变温度。由 DSC 测得的 Ca^{2+} -ACF II, Sr^{2+} -ACF II, Ba^{2+} -ACF II 的热变性的 T_m 值也证明了 ACF II 的结构稳定性与其结合的金属离子的半径相关。ACF II 在天然状态下的结合离子为 Ca^{2+} , 通过 DSC 测得的 Ca^{2+} -ACF II 的所有转变过程热变性 T_m 值都是最高的。 Sr^{2+} 的离子半径比 Ca^{2+} 的微小, 通过 DSC 检测 Sr^{2+} -ACF II 热变性中间转变过程和最高转变过程的 T_m 值也都比 Ca^{2+} -ACF II 的得到 T_m 值略小。 Ba^{2+} 的离子半径比 Ca^{2+} 的大很多, 通过 DSC 检测 Ba^{2+} -ACF II 的热变性 T_m 值与 Ca^{2+} -ACF II 的热变性 T_m 值比都要低一些。

金属离子不仅影响 ACF II 的结构稳定性, 而且对 ACF II 与 FXa 结合的亲和力也有影响。PAGE 和 SPR 实验都显示 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} 都能诱导 ACF II 和 FXa 的结合, 这说明 Ca^{2+} 的存在并不是 ACF II 与 FXa 结合的必须条件。在不同金属离子存在的条件下, ACF II 与 FXa 结合的亲和力是具有差异的, 其大小变化的规律为 $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ 。

据文献报道, 从 Deinagkistrodon 蛇毒中纯化出一种凝血因子 X 结合蛋白, Deinagkistrodon X-bp, 其两条链中间的凹形表面与 FX 的 Gla 结构域发生结合[22]。于此类似的是, 从 habu 蛇毒中纯化出的一种凝血因子 IX 结合蛋白, habu IX-bp, 这个蛋白与 FIX 的 Gla 结构域发生结合的也是它的两条链中间的凹形表面[23]。ACF II 和 Deinagkistrodon X-bp 具有 84.5% 的氨基酸序列同源性, 因此我们有理由

去推测ACF II也可能利用双链中间的凹形表面与FX的Gla结构域结合。FXa的Gla结构域具有多个 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 离子结合位点 [24, 25], 而Gla结构域也负责与 Ca^{2+} 依赖性的磷脂膜结合 [22]。 Sr^{2+} 可以取代FX中的 Ca^{2+} , 而不影响其与磷脂膜结合的活性 [26]。FXa与 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 的结合可能是FXa与ACF II相互识别的前提条件。虽然 Mg^{2+} 在与ACF II的结合中表现了很弱的亲和力或者可以说是与ACF II基本不结合, 但是在 Mg^{2+} 存在的条件下, ACF II和FXa发生结合的亲和力最强。这个结果说明, 金属离子与ACF II的结合并不是ACF II与FXa结合的必须条件, 而金属离子与FXa的结合才是ACF II与FXa结合的关键条件。 Mg^{2+} 可以结合FXa的Gla结构域并促进ACF II与FXa之间的结合。 Ca^{2+} 在正常血浆中的浓度为2.2 ~ 2.6 mmol/L, 而 Mg^{2+} 的浓度为0.8 ~ 1.2 mmol/L [27]。和 Ca^{2+} 类似, Mg^{2+} 与FX的Gla结构域的结合是其识别ACF II的关键条件。因此, 血液中丰富的 Mg^{2+} 也在ACF II抗凝血作用中发挥重要作用。我们通过图 2.20 可以看出, ACF II的两个金属离子结合位点距离它两条链间的凹形表面很远, 而凹形表面应是ACF II与FX的Gla结构域结合的部位。所以, ACF II与两个金属离子的结合可能并不涉及ACF II与FXa的结合过程, ACF II与两个金属离子的结合也不是ACF II与FXa结合的提前条件。由此可以解释为什么 Mg^{2+} 难以与ACF II结合, 但 Mg^{2+} 可以诱导ACF II与FXa发生高亲和力的结合。通过分析在不同金属离子存在条件下ACF II与FXa的结合常数(K_A)与金属离子之间的关系, 我们发现 K_A 的数值随着金属离子半径的增大而减小, 这说明与FXa结合的金属离子的半径影响ACF II和FXa的结合亲和力。

2.5 小结

我们研究了ACF I和ACF II在体内抗凝血活性、碱土金属离子与ACF I和ACF II的结合反应以及它们对ACF I和ACF II的结构稳定性和功能的影响。ACF I和ACF II在老鼠体内表现出显著的抗凝血活性, 它们都显著延长APTT和PT, 都对TT没有影响, 表明它们的抗凝血作用与抑制凝血因子IX/X活性有关。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和表面等离子共振的结果都显示, ACF II与FXa结合反应不是绝对依赖 Ca^{2+} , Mg^{2+} 、 Sr^{2+} 和 Ba^{2+} 也可以诱导ACF II与FXa结合反应。与ACF II结合的金属离子半径不仅显著影响金属离子与ACF II结合亲和性, 而且也显著影响ACF II抗GdnHCl变性和热变性的结构稳定性。而与凝血因子X结合的金属离子半径显著影响ACF II与FX结合亲和性。金属离子对ACF II亲和性强弱和金属离子诱导ACF II结构稳定性能力大小遵循相同顺序: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ 。而金属离子诱导的ACF II与FX结合反应的能力大小为: $\text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} >$

$\text{Sr}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ 。虽然 Mg^{2+} 对 ACF II 的亲水性最低, 但 Mg^{2+} 诱导 ACF II 与 FX 结合反应能力最强。我们的实验结果表明, 金属离子与 ACF II 结合能显著增强 ACF II 结构稳定性, 但金属离子与 ACF II 的结合反应不是 ACF II 与 FXa 发生结合反应的前提条件; 金属离子与 FXa 结合反应才是 ACF II 与 FXa 相互识别的前提条件。另外, ACF II 是基于金属离子半径选择结合 Ca^{2+} 。

参考文献

1. Atoda, H. and T. Morita, A novel blood coagulation factor IX/factor X-binding protein with anticoagulant activity from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake): isolation and characterization [J]. *J Biochem*, 1989. 106(5): p. 808-13.
2. Atoda, H., et al., Blood-Coagulation Factor Ix-Binding Protein from the Venom of *Trimeresurus-Flavoviridis* - Purification and Characterization [J]. *Journal of Biochemistry*, 1995. 118(5): p. 965-973.
3. Zang, J., M. Teng, and L. Niu, Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of AHP IX-bp, a zinc ion and pH-dependent coagulation factor IX binding protein from *Agkistrodon halys* Pallas venom [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2003. 59(Pt 4): p. 730-3.
4. Wu, H., et al., Mg(II)-induced binding of factor IX-binding protein from the venom of *Agkistrodon Halys* Pallas with factor Xa [J]. *Toxicon*, 2010. 55(7): p. 1358-64.
5. Lu, Y., et al., Purification and double chain structure of anticoagulant factor from five-pace snake (*Agkistrodon acutus*) venom [J]. *Hemostasis and Animal Venoms*, 1987: p. 12.
6. Xu, X.L., et al., Purification and characterization of anticoagulation factors from the venom of *Agkistrodon acutus* [J]. *Toxicon*, 2000. 38(11): p. 1517-1528.
7. Manak, M.S. and R.J. Ferl, Divalent cation effects on interactions between multiple *Arabidopsis* 14-3-3 isoforms and phosphopeptide targets [J]. *Biochemistry*, 2007. 46(4): p. 1055-1063.
8. Camci-Unal, G. and N.L.B. Pohl, Thermodynamics of binding interactions between divalent copper and chitin fragments by isothermal titration calorimetry (ITC) [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010. 81(1): p. 8-13.
9. Mukherjee, M., X. Zhu, and M.Y. Ogawa, Cd²⁺-induced conformational change of a synthetic metalloprotein: Slow metal binding followed by a slower conformational change [J]. *Inorganic Chemistry*, 2008. 47(11): p. 4430-4432.
10. Xu, X.L., Q.L. Liu, and Y.S. Xie, Metal ion-induced stabilization and refolding of anticoagulation factor II from the venom of *Agkistrodon acutus* [J]. *Biochemistry*, 2002. 41(11): p. 3546-3554.
11. Muzammil, S., Y. Kumar, and S. Tayyab, Anion-induced stabilization of human serum albumin prevents the formation of intermediate during urea denaturation [J]. *Proteins-Structure Function and Genetics*, 2000. 40(1): p. 29-38.

12. Vaz, D.C., et al., Enthalpic and entropic contributions mediate the role of disulfide bonds on the conformational stability of interleukin-4 [J]. *Protein Science*, 2006. 15(1): p. 33-44.
13. Taka, J., et al., Stabilization due to dimer formation of phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Thermus thermophilus* HB8: X-ray Analysis and DSC experiments [J]. *J Biochem*, 2005. 137(5): p. 569-78.
14. Martinez, J.C., et al., A calorimetric study of the thermal stability of barnase and its interaction with barnase [J]. *Biochemistry*, 1995. 34(15): p. 5224-33.
15. Byrne, S.L. and A.B. Mason, Human serum transferrin: a tale of two lobes. Urea gel and steady state fluorescence analysis of recombinant transferrins as a function of pH, time, and the soluble portion of the transferrin receptor [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2009. 14(5): p. 771-781.
16. Talmard, C., R.L. Yona, and P. Faller, Mechanism of zinc(II)-promoted amyloid formation: zinc(II) binding facilitates the transition from the partially alpha-helical conformer to aggregates of amyloid beta protein(1-28) [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2009. 14(3): p. 449-455.
17. Xu, X.L. and Q.L. Liu, Binding of anticoagulation factor II from the venom of *Agkistrodon acutus* with activated coagulation factor X [J]. *Toxicon*, 2001. 39(9): p. 1359-1365.
18. Lakey, J.H., R. Maget-Dana, and M. Ptak, The lipopeptide antibiotic A21978C has a specific interaction with DMPC only in the presence of calcium ions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1989. 985(1): p. 60-6.
19. DeKoster, G.T. and A.D. Robertson, Thermodynamics of unfolding for kazal-type serine protease inhibitors: Entropic stabilization of ovomucoid first domain by glycosylation [J]. *Biochemistry*, 1997. 36(8): p. 2323-2331.
20. Svensson, G., S. Linse, and K. Mani, Chemical and Thermal Unfolding of Glypican-1: Protective Effect of Heparan Sulfate against Heat-Induced Irreversible Aggregation [J]. *Biochemistry*, 2009. 48(42): p. 9994-10004.
21. Mizuno, H., H. Atoda, and T. Morita, Crystallization and Preliminary-X-Ray Study of Blood-Coagulation Factor-Ix Factor-X-Binding Protein with Anticoagulant Activity from Habu Snake-Venom [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991. 220(2): p. 225-226.
22. Mizuno, H., et al., Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. 98(13): p. 7230-7234.
23. Shikamoto, Y., et al., Crystal structure of Mg²⁺- and Ca²⁺-bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(26): p.

24090-24094.

24. Persson, E. and A. Ostergaard, Mg²⁺ binding to the Gla domain of factor X influences the interaction with tissue factor [J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007. 5(9): p. 1977-1978.
25. Sunnerhagen, M., et al., The relative orientation of Gla and EGF domains in coagulation factor X is altered by Ca²⁺ binding to the first EGF domain. A combined NMR-small angle X-ray scattering study [J]. *Biochemistry*, 1996. 35(36): p. 11547-59.
26. Nelsestuen, G.L., M. Broderius, and G. Martin, Role of gamma-carboxyglutamic acid. Cation specificity of prothrombin and factor X-phospholipid binding [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1976. 251(22): p. 6886-93.
27. Sekiya, F., et al., Localization of the specific binding site for magnesium(II) ions in factor IX [J]. *Febs Letters*, 1996. 392(3): p. 205-208.

第三章 高效亲和层析纯化凝血因子 IX 和凝血因子 X

3.1 引言

凝血因子IX和凝血因子X都是维生素K依赖因子，它们都是由肝细胞合成并分泌到血液中，并在凝血反应中发挥各自的活性[1]。FIX和FX都是糖蛋白，人源FIX的分子量为56 kD，含多糖17%左右[2]；人源FX的分子量为59 kD，含多糖10%左右[3]。

凝血因子IX和凝血因子X在凝血的瀑布反应中，位于内外源通路的交汇点，所以对凝血过程有着非常重要的作用。凝血因子IX在血浆中的含量一般有5毫克/升左右，而凝血因子X在血浆中的含量为10毫克/升左右。

凝血因子IX是一个非常重要的药物，在临床上被用作治疗B型血友病。B型血友病（也称作Christmas病）是一种非常严重的疾病。B型血友病患者的血液在体内和体外凝血活性降低，而他们的一生都必须在严格的医疗监控下度过。这些患者必须补充外源的正常血浆中提取的凝血因子IX，才可以让凝血时间恢复正常，且目前没有其他任何替代品。

凝血因子X虽然没有作为药物在临床使用，但是FX是个使用范围广泛的生化试剂。FX作为凝血通道上的重要环节，是一个很好的抗凝血药物的设计靶标。同时，FX也是一个选择性很高的精氨酸肽键水解酶，可以作为融合基因表达的融合蛋白的限制性内切酶。

因此，从血浆中高效率纯化制备FIX和FX是非常意义的。

自上世纪七十年代FIX、FX第一次被纯化[4, 5]发展到今天，国内外现在已经有多种从血液中纯化天然FIX、FX的方法。单纯的多步离子交换层析，或是离子交换层析和亲和层析相结合的方法，是当前普遍认可的从血液中提取高纯度FIX和FX的有效方法。多步离子交换层析，步骤繁琐，需要耗费较长的时间[6, 7]。FIX、FX都是酶原，在长时间的纯化处理过程中，它们会被活化成FIXa、FXa，所以，使用多步离子交换层析很难得到纯度较高的未被活化的FIX、FX。FIXa和FXa是具有生物学活性的水解酶，在临床使用的FIX中如果含有部分FIXa，则有可能在体内触发凝血反应形成血栓。FX虽然大部分情况是作为实验试剂被使用，但对纯度的要求也是很高的。离子交换层析和亲和层析相结合的方法较单纯的多步离子交换层析步骤简化，可以很大程度上解决多步离子交换层析费时的问题，且亲和配基对FIX或FX的特异性结合更有利于获得高纯度的FIX或FX[8]。在目前已有的技术中，亲和效果最好的配基为Ca²⁺依赖型的单克隆抗体，其结合-

解离条件简单温和, 在含有 Ca^{2+} 的缓冲溶液中抗体可以和抗原特异性结合, 将淋洗液换成含有EDTA的缓冲溶液即可以洗脱下抗原。但是, 单克隆抗体造价昂贵, 且稳定性较差, 难以大量应用到工业大批量生产。肝素是另一种亲和配基, 它是一种带负电荷的多聚物, 是抗凝血酶III (AT-III) 的辅因子, 又是许多凝血因子的抑制剂, 可以通过静电和亲和相互作用分离血浆中的很多凝血因子。肝素价格较便宜, 但是亲和特异性比较差。

我们实验室长期从事蛇毒中凝血因子IX/凝血因子X结合蛋白家族的研究, 徐小龙教授在2000年从皖南尖吻蝮蛇蛇毒中纯化了两种凝血因子IX/凝血因子X结合蛋白 (FIX/FX-bp), 分别命名为ACF I和ACF II [9], 此后实验组不仅对ACF I、ACF II进行了深入的研究 [10, 11], 同时也对不同蛇毒来源的FIX/FX-bp都进行了深入的研究, 如江浙蝮蛇蛇毒中的AHP FIX/FX-bp [12], 竹叶青中的FIX/FX-bp等等。蛇毒中凝血因子IX/凝血因子X结合蛋白家族属于C型凝集素类似蛋白家族, 我们实验组研究的多个FIX/FX-bp, 分子量均为30kD左右, 都有 α 和 β 两条多肽链, 都是 α 链和 β 链通过二硫键连接。FIX/FX-bp大多具有两个金属离子的结合位点, 其在天然状态下就结合两个金属离子。FIX/FX-bp在特定金属离子存在的条件下既可以结合FIX, 也可以结合FX, 在特定金属离子不存在的条件下, 会迅速和已经结合的FIX或FX发生解离 [13]。FIX/FX-bp与FIX、FX都有很高的结合活性, 且其特异性仅限于FIX和FX。FIX/FX-bp作为毒蛇的外分泌蛋白, 具有很好的稳定性, 且廉价易得。

因此, 我们尝试将FIX/FX-bp作为新型的亲和配基从血浆中高效率纯化制备FIX和FX。

3.2 实验材料

3.2.1 实验仪器

AKTA explorer100 快速纯化工艺开拓系统 (AKTA, 美国); PHS-2 型 pH 计 (上海雷磁仪器厂); DY-A 型电泳仪 (上海康达电子仪器厂); BS-100A 型自动部分收集器 (上海沪西电子厂); Z 型系列层析柱 (上海锦华实验器械厂); L-1 型蠕动泵 (上海新波无线电厂); 2000 mL 梯度混合器 (上海西巴斯生物技术开发公司); Anke DL-6000B 冷冻离心机 (上海安科公司); 单道可调手动移液枪 (Eppendorf, 德国); 微量进样器 (上海医用激光仪器厂); 超滤离心管 (3 kD) (Minipore, 中国)。

3.2.2 实验材料

CNBr-activated Sepharose 4B、DEAE-Sephadex A-50 树脂购自 GE 公司；十二烷基硫酸钠 (SDS)、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自 Sigma 公司 (St Louis, MO, USA)；SPECTROZYME® FXa 及 SPECTROZYME® FIXa 购自 American Diagnostica；三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自上海生工试剂公司；其他试剂均为分析纯。

3.3 实验方法

3.3.1 CNBr-activated Sepharose 4B 偶联 ACF I 的制备

称取所需量的 CNBr 活化 Sepharose-4B 粉末，将其缓慢倒入 10 倍凝胶体积 4 °C 的 1 mmol/L HCl 溶液中，轻微搅拌、分散凝胶颗粒。接着在室温下溶胀凝胶约 15min，再用 4 °C 的 1 mmol/L HCl 溶液流洗凝胶，最后用 10 倍凝胶体积的 4 °C 偶联缓冲液 (0.2 mol/L 硼酸-硼砂，pH=8.0) 清洗凝胶。4 °C 下将 ACF I 溶液加到 1 体积平衡好的活化琼脂糖中，低速搅拌偶联 16~20h。取反应上清液，测定 Abs (280 nm) 值，若其值接近 0 则表示偶联完全。偶联完全以后用偶联缓冲液清洗凝胶。用过量乙醇胺封阻载体上剩余的 CNBr 活化基团，4 °C 下加入 pH=8.0, 0.5 mol/L 乙醇胺即可，然后依次用高和低 pH 的缓冲液 (含 0.5 mol/L NaCl 的 pH=4.0, 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液；含 0.5 mol/L NaCl 的 pH=8.3, 0.1 mol/L 硼酸-硼砂缓冲液) 交替清洗凝胶三次，再用平衡缓冲液 (含 0.02 mol/L Tris-HCl, pH=7.4, 0.2 mol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂) 清洗，最后将其浸泡在含 0.1% 叠氮化钠的平衡缓冲液中，4 °C 保存。

3.3.2 血液的采集和血浆的制备

猪血和牛血采集自屠宰厂。用冰水浴的塑料桶接取切断颈动脉流出的新鲜血液，使血液迅速降温，并迅速向每升血液中加入 100 ml 的抗凝剂 (含 0.2 mol/L 柠檬酸三钠、17000 units/L 肝素，0.2 mol/L 苯甲脒，10000 units/L 大豆胰蛋白酶抑制剂)。运回实验室的新鲜血液立即在冷冻离心机中离心 (4 °C, 1000 r/min, 10 min)，先得到富含血小板的血浆，再继续离心 (4 °C, 3000 r/min, 40 min)，得到血小板和亮黄色血浆。血小板用作其他实验。检测血浆中凝血因子 X 和凝血因子 IX 的活性，-20 °C 冷冻保存备用。人血浆直接从安徽省合肥市血液中心购买临床用袋装血浆。

3.3.3 钡盐吸附法获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物

向每升血浆中滴加 100 毫升 1 mol/L BaCl₂ 溶液, 并且温和地搅拌。加完 BaCl₂ 溶液再搅拌 1 小时。静置过夜。

在 4℃ 条件下离心得到吸附维生素 K 依赖的凝血因子的柠檬酸钡沉淀。用含 0.9 % 氯化钠和 0.02 mol/L 柠檬酸三钠的溶液洗涤柠檬酸钡沉淀, 尽可能使沉淀颗粒变细悬浮在溶液中, 向每升溶液中再滴加 100 毫升 BaCl₂ 溶液, 再在 4℃ 条件下离心去除洗涤液。重复上述操作, 直至将沉淀洗至泛白色为止。

将吸附有蛋白的柠檬酸钡沉淀直接加入到 30 % 饱和度的硫酸铵溶液, 搅拌 5 小时, 使柠檬酸钡沉淀完全转化为硫酸钡沉淀。

在 4℃ 条件下离心去除沉淀, 取清液。再向离心后的清液中边搅拌边滴加饱和硫酸铵溶液(用氨水调至 pH=7.0 左右), 使溶液中的液硫酸铵饱和度达 70 %。滴加完饱和硫酸铵溶液后, 再搅拌 30 分钟, 静置 2 小时, 在 4℃ 条件下离心去除清液, 收集蛋白沉淀。再将蛋白沉淀溶解在浓度为 50 mmol/L 的 Tris-HCl (pH=8.0) 溶液中, 脱盐浓缩, 冷冻干燥, -20℃ 保存以备后用。检测由每升血浆处理得到的溶液中的 FX 和 FIX 的活性。

3.3.4 Sephadex A-50 柱层析法获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物

按每升血浆对应 3g DEAE-Sephadex A-50 的量, 向血浆中加入已经平衡到 pH=7.4 的 A-50 树脂, 并温和搅拌 1 小时。将吸附了蛋白的 A-50 树脂装柱, 并用平衡缓冲液(含 0.2 mol/L NaCl, 0.01 mol/L 柠檬酸三钠, 0.01 mol/L Tris-HCl, pH=7.4) 充分清洗 A-50 层析柱直到流出液的 Abs (280nm) 值接近于 0。用洗脱缓冲液(含 2 mol/L NaCl, 0.01 mol/L 柠檬酸三钠, 0.01 mol/L Tris-HCl, pH=7.4) 对 A-50 层析柱进行洗脱。收集蛋白洗脱液, 脱盐浓缩, 冷冻干燥, -20℃ 保存以备后用。检测由每升血浆处理得到的溶液中的 FX 和 FIX 的活性。

3.3.5 ACF I-Sepharose 4B 亲和色谱

ACF I-Sepharose 4B 亲和树脂对钡盐吸附法和 Sephadex A-50 柱层析法获得凝血因子 IX 和凝血因子 X 混合粗提物分别进行亲和层析。取凝血因子 IX 和凝血因子 X 混合粗提物, 在亲和缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl, pH=7.4, 5 mmol/L CaCl₂) 环境下, 加入 ACF I-Sepharose 4B 并温和搅拌。随后用亲和缓冲液彻底清洗亲和着凝血因子 IX 和凝血因子 X 的 ACF I-Sepharose 4B, 大约需要 10 倍床体积的亲和缓冲液。接着使用洗脱缓冲液(0.02 mol/L Tris-HCl, pH=7.4, 5 mmol/L EDTA) 洗脱与 ACF I-Sepharose 4B 的结合蛋白, 大约需要 2 倍床体积即

可完成洗脱。该洗脱下的蛋白，只剩下凝血因子 IX 和凝血因子 X，收集并脱盐浓缩，最后冷冻干燥。检测由每升血浆处理得到的溶液中的 FX 和 FIX 的活性。

直接使用 ACF I-Sepharose 4B 亲和树脂对血浆中的凝血因子 IX 和凝血因子 X 进行亲和层析。在血浆中直接加入 ACF I-Sepharose 4B 亲和树脂并温和搅拌，随后用亲和缓冲液（0.02 mol/L Tris-HCl, pH=7.4, 5 mmol/L CaCl₂）彻底清洗亲和着凝血因子 IX 和凝血因子 X 的 ACF I-Sepharose 4B，大约需要 10 倍床体积的亲和缓冲液。接着使用 2 倍床体积洗脱缓冲液（0.02 mol/L Tris-HCl, pH=7.4, 5 mmol/L EDTA）完成对 ACF I-Sepharose 4B 的结合蛋白的洗脱，收集洗脱液并脱盐浓缩，最后冷冻干燥。检测由每升血浆处理得到的溶液中的 FX 和 FIX 的活性。

3.3.6 凝血因子 X 的活性检测

检测凝血因子 X 的方法可以用无凝血因子 X 的血浆，通过样品加入后，观测纤维蛋白沉淀的时间来确定。但凝血因子 X 缺省的血浆国内没有，进口价格极贵，且不宜保存，本研究采用较简单的底物法进行检测。

凝血因子 X 在 Ca²⁺离子存在条件下，可以被鲁氏蝮蛇蛇毒（Russell viper venom, RVV）中的 FX 活化酶（RVV-X）所活化。底物 SPECTROZYME® FXa（American Diagnostica Inc），其结构式为 MeO-CO-D-CHG-Cly-Arg-pNA.AcOH，在钙离子存在条件下，可以被 FXa 特异性水解，生成的产物有对硝基苯胺，可以用紫外可见分光光度计在 405nm 波长处测定其吸光度的增加。

具体操作为：将 25 μl 底物溶液和 20 μl 酶溶液加入 200 μl 反应缓冲液（含 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 8.4）中，10 分钟后，加入 25 μl 乙酸终止反应，并测定 405nm 吸光度。对硝基苯胺的 $A_{405\text{nm}} = 9650 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ，通过测定样品在 405nm 吸光度的值，可以得到每分钟内催化底物转化为产物的 μmol 数，即酶活力单位，根据溶液中的酶量可以计算得到每 mg 酶具有多少酶活力单位，计算公式为 3.1。

$$U = A_{ob} / (A_p \cdot m) \quad (3.1)$$

其中，U 为每 mg 酶具有的酶活力单位，A_{ob} 为检测到的样片吸光度，A_p 为对硝基苯胺的 A_{405nm}，m 为溶液中的酶的质量。

3.3.7 凝血因子 IX 的活性检测

检测凝血因子 IX 的活性也使用底物光谱法，通过对 405 nm 吸光度的检测计算单位时间里酶催化水解产生的对硝基苯胺。使用底物为 SPECTROZYME®

FIXa (American Diagnostica Inc) , 其结构式为 MeSO₂-D-CHG-Gly-Arg-pNA.AcOH, 在钙离子存在条件下, 可以被 FIXa 特异性水解, 生成的产物有对硝基苯胺, 可以用紫外可见分光光度计在 405nm 波长处测定其吸光度的增加。

检测时将 25 μ l 底物溶液和 20 μ l 酶溶液加入 200 μ l 反应缓冲液 (含 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 33% 乙二醇, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) 中 [14], 10 分钟后, 加入 25 μ l 乙酸终止反应, 并测定 405nm 吸光度。对硝基苯胺的 $A_{405\text{ nm}} = 9650 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 通过测定样品在 405nm 吸光度的值, 可以得到每分钟内催化底物转化为产物的 μ mol 数, 即酶活力单位, 根据溶液中的凝血因子 IX 的质量可以计算得到每 mg 酶具有多少酶活力单位, 计算公式为 3.1。

FIX 可以被活化的 FXIa 完全激活成为 FIXa β , 也可以被 RVV-X 所活化成为 FIXa α , 而被 RVV-X 活化的形成 FIXa α 的特异性活性是 FIXa β 的 50% [15]。我们在实验中选择 RVV-X 作为 FIX 的活化剂。

3.3.8 快速蛋白质液相层析 (FPLC) 分离 FIX 和 FX

通过 ACF I-Sepharose 4B 亲和柱层析得到的蛋白质, 仅含有凝血因子 IX 和凝血因子 X, 我们通过 FPLC 进行分离提纯, 即可以获得高纯度的凝血因子 IX 和高纯度的凝血因子 X。所用 FPLC 仪器型号为 AKTA explorer100 (美国), 使用柱型号为 HiTrap Mono Q 5ml。进样体积为 1ml, 流速选择 5 ml/min。流动相 A 为 20 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0; 流动相 B 为 1 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH=8.0。洗脱程序为: 第一步, 0%B, 洗脱体积 33ml; 第二步, 0% B 到 30% B, 洗脱体积 22 ml; 第三步, 30% B 到 80% B, 洗脱体积 87ml; 第四步, 100% B, 洗脱体积 38 ml。检测吸收波长为 280 nm。

将纯化的凝血因子 IX 和凝血因子 X 分别收集, 浓缩脱盐, 并做 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳验证纯度, 检测由每升血浆处理得到的凝血因子 IX 和凝血因子 X 的活性, 最后冷冻干燥用作其他的实验。

3.3.9 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法 (LC-ESI-MS/MS) 分析

用 50 mmol/L NH₄HCO₃ 稀释样品蛋白溶液, 并加入最终浓度为 10 mmol/L 的新配制二硫苏糖醇 (DTT)。将混合溶液在 50 $^{\circ}$ C 下处理 15 分钟使蛋白变性并被还原。等蛋白样品冷却到室温, 加入新配制的碘乙酰胺 (IAM) 使其在溶液中的浓度达到 30 mmol/L, 在室温下避光 15 分钟完成烷基化反应。然后, 按酶和蛋白 1: 50 的比例加入降解氨基酸序列的胰蛋白酶, 并在 37 $^{\circ}$ C 温浴旋转过夜 (约

16 到 18 小时)。温浴结束后, 将胰蛋白酶裂解的肽段混合物用蚁酸稀释到 50 $\mu\text{mol/L}$ 或者高一点的浓度。最后, 使用配置 ESI 源的 Thermo Finnigan™ 线性 IT 质谱对完成前处理的样品进行 LC-MS/MS 分析 [16]。

将多肽的质谱信号与数据库中的质谱数据进行比对, 确定样品蛋白。

3.3.10 表面等离子体共振法 (SPR) 测定 ACF II 和 FX 的结合动力学

表面等离子体共振 (SPR) 是一种检测蛋白质相互作用的方法。SPR 的原理是将被研究的两种蛋白质分子中的一种通过反应以酰胺键连接在芯片的高分子膜表面, 然后将另一种蛋白质分子的溶液通过流动池流经芯片表面, 如果这两种蛋白质具有相互作用, 则会引起表面等离子体共振角的变化而获得信号。根据等离子体共振角信号的强弱及其随时间的变化, 再通过浓度等信息, 可以计算获得这两种蛋白质分子相互作用的动力学信息, 如亲和力、结合动力学常数、解离动力学常数等等。

我们使用 SPR 检测我们纯化出的凝血因子 IX 及凝血因子 X 与 ACF II 的结合活性, 所用仪器型号为 Biocore 3000 (瑞士产)。该实验选择使用 CM-5 芯片, 首先将凝血因子 IX 或凝血因子 X 连接到 CM-5 表面, 偶联条件为 $\text{pH}=5$, 偶联流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$; 偶联结束后, 封闭芯片上未偶联蛋白的活性基团, 封闭剂为 N-hydroxysuccinimide, 封闭流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ [17]。偶联完成后, 将不同浓度 (0-4 $\mu\text{mol/L}$) 的脱去离子的 ACF II (apo-ACF II) 依次注入流经芯片表面, 流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 结合 3min, 解离 3min, 再生液为 2 mol/L NaCl 和 10 mmol/L EDTA, 流动相和样品缓冲液都是 PBS ($\text{pH}=7.4$)。通过在 apo-ACF II 溶液中加入最终浓度为 1 mmol/L 的不同金属离子, 可以检测不同金属离子对这两个蛋白质结合和解离的影响。



3.4 实验结果

3.4.1 凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物的分离制备

凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物的获得有三种方法, 一是先通过钼盐吸附法获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物再通过 ACF I-Sepharose 亲和层析得到凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物, 二是先通过 Sephadex A-50 柱层析获得维

生素-K 依赖性蛋白混合粗提物再通过 ACF I-Sepharose 亲和层析得到凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物，三是直接对血浆进行 ACF I-Sepharose 亲和层析得到凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物。

先通过钡盐吸附法获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物再通过 ACF I-Sepharose 亲和层析得到凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物的方法处理步骤最多，耗时最久，得到的凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物不仅收率低，而且其中不可避免的有一部分已经被活化，所以很难再进一步纯化。

表 2.1 凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物的分离制备

Table 2.1. Purification of FIX and FX from 200 ml human plasma

	钡盐吸附-亲和法	A-50 柱层析-亲和法	直接亲和法
蛋白质量, mg	1.9	2.6	2.8

先通过 Sephadex A-50 柱层析获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物再通过 ACF I-Sepharose 亲和层析得到凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物的方法，和直接对血浆完成 ACF I-Sepharose 亲和层析的方法收率非常接近，且得到的混合物中凝血因子 IX 和凝血因子 X 极少被活化。通过测试，直接将 ACF I-Sepharose 多次加入血浆后，其亲和能力基本没有变化。考虑到直接对血浆完成 ACF I-Sepharose 亲和层析最方便而直接，所以，将优化选择将直接对血浆的血浆的亲和层析作为第一次色谱制备凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物。

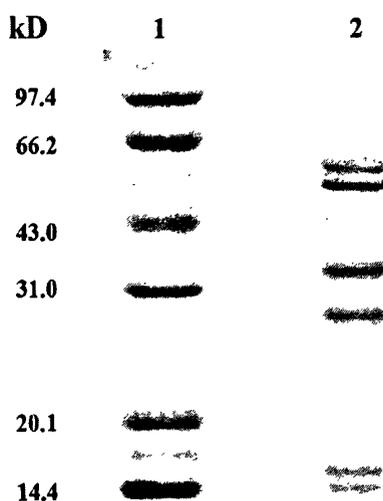


图 3.1 SDS-PAGE 鉴定钡盐吸附-亲和法获得的凝血因子的纯度

Fig.3.1 SDS-PAGE of coagulant factors. FIX and FX were electrophoresed in 12 % polyacrylamide gels containing 0.1% SDS under nonreducing condition and reducing condition for SDS-PAGE, respectively. SDS-PAGE under nonreducing condition (lane 1, molecular mass markers; lane 2, FIX and FX)

3.4.2 FPLC 对凝血因子 IX 和凝血因子 X 进一步纯化

使用 ACF I-Sepharose 直接从血浆纯化得到的凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物，从电泳结果上看，为纯度很高的两个条带，即分别为凝血因子 IX 和凝血因子 X。我们为了将凝血因子 IX 和凝血因子 X 分离开，采用 FPLC 对其进行进一步纯化。其分离结果如图 3.2，得到了两个对称的色谱峰，用电泳的方法对这两个峰的纯度进行测定，结果见图 3.3

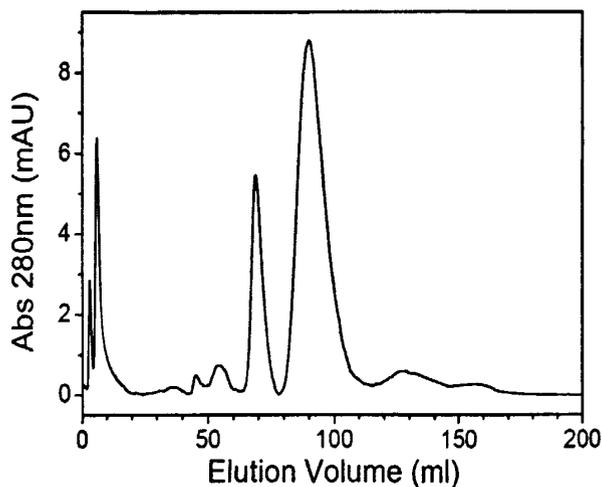


图 3.2 FPLC 对凝血因子 IX 和凝血因子 X 分析色谱图

Fig.3.2 Purification of FIX and FX. Chromatography of the fraction from ACF I-Sepharose affinity column on FPLC.

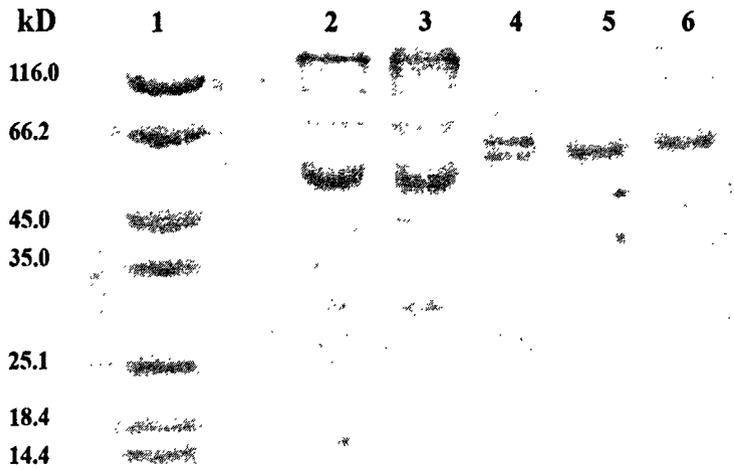


图 3.3 SDS-PAGE 鉴定凝血因子纯度

Fig.3.3 SDS-PAGE of coagulant factors. Purified FIX and FX were electrophoresed in 12 % polyacrylamide gels containing 0.1% SDS under nonreducing condition and reducing condition for SDS-PAGE, respectively. SDS-PAGE under nonreducing condition (lane 1, molecular mass markers; lane 2, plasma; lane 3, unbound proteins after affinity chromatography; lane 4, affinity chromatography eluate; lane 5&6, fractions containing FIX and FX after HPLC).

3.4.3 测定酶活力并计算两步色谱法的收率

使用临床医用 200 ml 装人血浆，使用 ACF I- Sepharose 亲和色谱及 FPLC 阴离子交换色谱的两步色谱法提纯凝血因子 IX 和凝血因子 X，对过程中每步产物进行酶活力测定，并计算收率，统计如表 3.2 所示。

表 3.2 两步色谱法纯化过程中 FIX 及 FX 的活性及收率

Table 3.2. Purification of FIX and FX from 200 ml human plasma

	蛋白质量, mg		活性, UI/mg		回收率, %	
	FIX	FX	FIX	FX	FIX	FX
Plasma		10926	0.007	0.065	100	100
Affinity chromatography		2.8	25	210	92	83
FPLC	0.9	1.6	76	362	89	81

3.4.4 鸟枪法蛋白质组学鉴定凝血因子 IX 及凝血因子 X

样品蛋白溶液经过前处理后,使用高效液相色谱-电喷雾串联质谱法(LC-ESI-MS/MS)对其碎片肽段进行分析。检出结果分别与凝血因子 IX、凝血因子 X 相匹配,匹配肽段如下用灰色背景标出,肽段的质谱信息见图 3.4。

人凝血因子 IX 的全长序列

Sequence of Human Coagulation Factor IX

10	20	30	40	50
MQRVNMIMAE	SPGLITICLL	GYLLSAECTV	FLDHENANKI	LNRPKRYNSG
KLEEFVQGNL	ERECMEEKCS	FEEAREVFEN	TERTTEFWKQ	YVDGDQCESN
PCLNGGSCKD	DINSYECWCP	FGFEGKNCEL	DVTCNIKNGR	CEQFCKNSAD
NKVVCSTEG	YRLAENQKSC	EPAVPFPCGR	VSVSQTSKLT	RAETVFPDVD
YVNSTEAETI	LDNITQSTQS	FNDFTRVVGG	EDAKPGQFPW	QVVLNGKVDA
FCGGSIVNEK	WIVTAAHCVE	TGVKITVVAG	EHNIEETEHT	EQKRNVIKII
PHHNYNAAIN	KYNHDIALLE	LDEPLVLSY	VTPICIADKE	YTNIFLKFGS
GYVSGWGRVF	HKGRSALVLQ	YLRVPLVDRA	TCLRSTKFTI	YNNMFCAGFH
EGGRDSCQGD	SGGPHVTEVE	GTSFLTGIIS	WGEECAMK GK	YGIYTKVSRY
VNWIKEKTKL	T			

人凝血因子 X 的全长序列

Sequence of Human Coagulation Factor X

10	20	30	40	50
MGRPLHLVLL	SASLAGLLLL	GESLFIRREQ	ANNILARVTR	ANSFLEEMKK
GHLERECMEE	TCSYEEAREV	FEDSDKTNEF	WNKYKDGQDC	ETSPCQNQ GK
CKDGLGEYTC	TCLEGFEGKN	CELFTRKLC S	LDNGDCDQFC	HEEQNSVVCS
CARGYTLADN	GKACIPTGPY	PCGKQTLERR	KRSVAQATSS	SGEAPDSITW
KPYDAADLDP	TENPFDLLDF	NQTQPERGDN	NLTRIVGGQE	CKDGECPWQA
LLINEENEGF	CGGTILSEFY	ILTAAHCLYQ	AKRFKVRVGD	RNTEQEEGGE
AVHEVEVVIK	HNRFTKETYD	FDIAVLR LKT	PITFRMNVAP	ACLP ERD WAE
STLMTQKTGI	VSGFGRTHEK	GRQSTR LKML	EVVYVDRNSC	KLSSSFIITQ
NMFCAGYDTK	QEDACQGDSG	GPHVTRFKDT	YFVTGIVSWG	EGCARKGKYG
IYTKVTAFLK	WIDRSMKTRG	LPKAKSHAPE	VITSSPLK	

Reference Scans	Peptide	MH+	z	P (pro)	Score	Coverage		MW	Accession	Ions
						DeltaCn	SP			
12254	KDDINSYECWCPFGFEGKN	2123.84742	2	5.93E-07	4.23	0.59	1208.1	4503649	1	20/32
8829	KFGSGYVSGWR.V	1172.54833	1	5.62E-02	2.02	0.28	137.9		2	10/20
8797	KFGSGYVSGWR.V	1172.54833	2	2.33E-08	4.08	0.48	1620.8		1	19/20
10038	KFTIYINIMFCAGFHEGGR.D	2036.87421	2	1.73E-08	4.40	0.62	763.0		1	21/32
11487	KFTIYINIMFCAGFHEGGR.D	2036.87421	2	2.22E-14	4.83	0.60	2416.0		1	26/32
6725	KGKYGIYTKV	929.50909	2	4.95E-03	2.83	0.43	588.5		1	12/14
7938	KITVAGEHNIEETEHEQK.R	2164.05167	3	1.17E-07	3.98	0.47	922.3		1	29/72
7943	KITVAGEHNIEETEHEQK.R	2164.05167	2	4.52E-12	5.52	0.67	2487.1		1	24/36
7863	KITVAGEHNIEETEHEQK.R	2320.15278	2	7.38E-10	5.00	0.56	1544.1		1	21/38
7858	KITVAGEHNIEETEHEQK.R	2320.15278	3	4.32E-11	5.02	0.61	1332.3		1	34/76
8267	KNCELDVTGNIK.N	1365.61378	2	6.65E-05	3.87	0.43	1859.6		1	17/20
7908	KNCELDVTGNIKGR.C	1692.77929	2	1.07E-01	2.98	0.28	1621.2		1	20/26
7054	KNSADNKVVCSTEGYR.L	1859.80114	3	9.26E-05	3.80	0.45	989.7		1	25/60
7052	KNSADNKVVCSTEGYR.L	1859.80114	2	5.74E-08	4.04	0.61	1488.0		1	22/30
8637	KSCEPAVPCGR.V	1376.60864	2	1.32E-08	3.13	0.35	939.0		1	19/22
8459	KVDAFCGGSIVIEK.W	1395.65733	1	1.29E-03	1.93	0.42	331.2		2	12/24
8487	KVDAFCGGSIVIEK.W	1395.65733	2	2.35E-09	4.54	0.59	1811.6		1	21/24
6014	KVVCSTEGYR.L	1230.52424	2	9.94E-07	3.14	0.48	1220.7		1	16/18
8939	KWIVTAAHCVETGVK.I	1570.80466	2	1.38E-08	4.11	0.53	1809.5		1	20/26
13304	KYIHIDIALLEDEPLVNSVYTFICADKE	3228.64973	3	1.11E-16	6.34	0.72	1782.3		1	38/108
7298	RIPPHNYIAANK.Y	1504.80192	2	1.09E-05	2.97	0.40	623.8		1	20/24
10597	R.SALVLOYL.R	1062.63051	2	1.15E-03	3.44	0.33	1166.9		1	14/16
12442	R.VVGGEDAKPGGFVQVVLNGK.V	2225.17133	3	1.89E-13	4.55	0.44	1104.8		1	37/80
12468	R.VVGGEDAKPGGFVQVVLNGK.V	2225.17133	2	7.45E-07	5.39	0.57	835.3		1	20/40

Reference Scan(s)	Peptide	MH+	z	P (pro) P (pep)	Score XC	Coverage DeltaCn	MW Sp	Accession RSp	peptide (Hits)
	coagulation factor X precursor prothrombinase factor Xa [Homo sapiens]								
7972	KACIPTGYPYCGKQ	1320.60758	2	2.50E-12	250.32	0.55	54695.6	4503625	199 0 0 0
10853	KCKDGLGEYTCLEGFEGK N	2223.93562	2	1.67E-08	3.28	0.62	830.9	1	19/22
12773	KDTYFVTGIVSWGEGCAR K	1917.88001	2	1.52E-04	3.84	0.69	685.4	1	16/36
11490	KETYDFDIAMRL	1341.66851	1	1.97E-10	4.60	0.48	2292.6	1	25/32
11174	KETYDFDIAMRL	1341.66851	2	5.02E-07	2.12	0.33	268.9	1	15/20
6725	KGKYGIYK V	929.50909	2	2.74E-06	3.30	0.43	1172.8	1	16/20
12632	KLSSSFIITQIMFCAGYDTK Q	2183.01479	3	4.95E-03	2.83	0.45	588.5	1	12/14
12642	KLSSSFIITQIMFCAGYDTK Q	2183.01479	2	2.86E-07	4.37	0.68	1332.6	1	34/72
9004	KMLEVPYVDR N	1137.56087	2	3.34E-08	5.90	0.33	1043.3	1	23/36
9390	KMLEVPYVDR N	1121.56596	2	1.48E-04	3.00	0.40	824.3	1	14/16
7643	KNCELFTR K	939.43531	1	2.00E-05	2.91	0.22	192.8	1	10/12
7707	KIICELFTR K	939.43531	2	1.56E-01	1.94	0.22	900.1	1	11/12
6034	KOEDACQGDGGPHVTR F	1713.72457	2	1.87E-03	2.89	0.56	724.8	1	23/30
8058	KTGIVSGFGR T	893.48394	1	2.09E-08	3.93	0.38	184.5	1	11/16
8162	KTGIVSGFGR T	893.48394	2	6.31E-02	2.07	0.54	995.2	1	15/16
7834	KTNEFWIKY	938.43666	2	8.29E-06	2.83	0.25	628.5	2	11/12
8179	R DWAEESTLMTQKT	1325.60419	2	3.15E-03	2.65	0.58	1473.8	1	17/20
9255	R DWAEESTLMTQKT	1309.60928	2	6.51E-05	3.66	0.50	1969.4	1	17/20
12843	R FKDTYFVTGIVSWGEGCAR K	2193.04339	3	3.27E-04	3.75	0.42	1367.5	1	32/72
11337	R FKDTYFVTGIVSWGEGCAR K	2193.04339	2	5.69E-06	5.21	0.59	2952.2	1	27/36
9102	R LKM*LEVPYVDR N	1717.87956	2	2.23E-11	6.47	0.54	2057.3	1	22/26
7682	R I M*NVAPACLPER D	1378.73990	2	1.55E-11	4.99	0.27	1562.5	1	17/20
9793	R I M*NVAPACLPERDWAESTLMTQKT	1273.60279	2	4.38E-04	3.36	0.46	1014.9	1	17/20
10440	R I M*NVAPACLPERDWAESTLMTQKT	2580.18914	2	3.28E-07	3.37	0.53	131.7	1	16/42
8234	R I M*NVAPACLPERD	2564.19423	2	4.11E-03	2.90	0.42	200.8	1	17/42
10587	R I M*NVAPACLPERDWAESTLMTQKT	2548.19931	3	5.15E-04	3.00	0.42	826.4	1	17/20
9977	R I I TEQEEGGEAVHEVVK H	2096.01422	2	6.18E-05	3.04	0.51	757.5	1	24/84
9799	R VGDRNTEQEEGGEAVHEVVK H	2523.23215	2	1.73E-03	4.78	0.55	1765.0	1	22/36
9778	R VGDRNTEQEEGGEAVHEVVK H	2523.23215	3	1.81E-09	5.75	0.54	699.6	1	22/44
				1.93E-04	4.30	0.35	1153.7	1	31/88

图 3.3 鸟枪法蛋白质组学分析凝血因子 IX 及凝血因子 X, 配对肽段的质谱信息

Fig.3.3 Sequence of FIX and FX, the information of peptides identified by LC-MS/MS.

3.3.5 SPR 鉴定凝血因子 IX 及凝血因子 X 与 ACF II 的结合活性

纯化出的凝血因子 IX 及凝血因子 X 与 ACF II 的结合活性通过 SPR 实验来验证。图 3.5 为在 1 mmol/L 的 Ca^{2+} 存在的情况下, apo-ACF II 和凝血因子 X 及凝血因子 X 的结合曲线和解离曲线。检测结果表明, 通过两步色谱法纯化出的凝血因子 IX 及凝血因子 X 都具有和 ACF II 结合的活性。

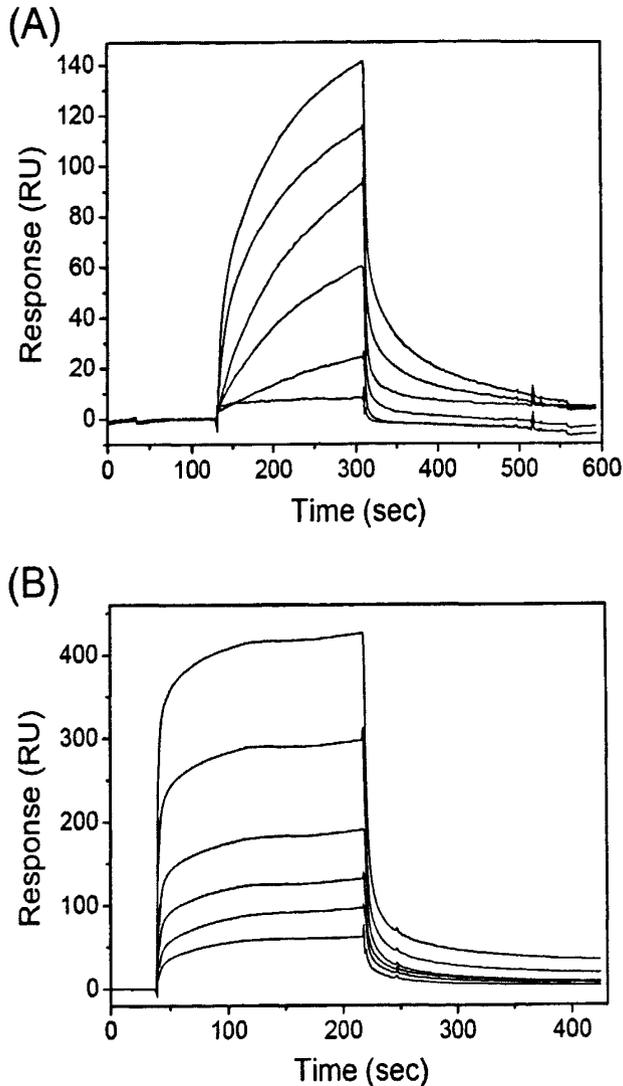


图 3.5 通过 SPR 分析两步色谱纯化得到的凝血因子 IX 和凝血因子 X 与 apo-ACF II 的结合

Fig.3.5 Surface plasmon resonance analysis of the binding of ACF II with FIX (A) and FX (B). Apo-ACF II in 20 mM Tris-HCl (pH 7.6) containing 1 mM Ca^{2+} was injected over an immobilized FIX or FX surface at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 μM for 3 min, and dissociation was monitored for 3 min

3.5 实验讨论

上个世纪七十年代, 凝血因子IX和凝血因子X从血浆中首次被成功分离纯化 [4, 5]。此后的几十年中, 分离科学技术不断发展, 而凝血因子IX和凝血因子X的纯化工艺也不断出现新方法提高分离效率、降低分离成本。硫酸钡沉淀结合多步层析法是凝血因子IX和凝血因子X最初的提纯方法, 其纯化步骤包括钡盐的吸附、离子交换色谱柱层析、亲和色谱柱层析。经过多年改进后, 一种可以应用到工业级制备凝血因子IX的三步层析法被报道 [18], 这个方法将血浆冷冻离心去除沉淀后分别经过DEAE-Sephadex A-50、DEAE-Sephadex FF、肝素-Sephadex CL 6B三次柱层析, 最终可以得到酶活力可达 (119 ± 10) IU/mg的凝血因子IX, 收率为每升血浆得到 (320 ± 28) IU。当然, 凝血因子X也可以使用多步层析法纯化。虽然多步层析法可以得到纯化较高的凝血因子IX和凝血因子X, 但是步骤繁琐, 回收率低, 仍会含有少量杂质(如蛋白C和 α -胰蛋白酶抑制剂等) [18], 特别是在临床上使用纯度不够高的凝血因子IX, 会造成缺乏凝血因子IX的B性血友病患者有被病毒感染的潜在危险。多步层析法生产临床用凝血因子IX的另一个问题是, 其纯化工艺时间比较长, 在长时间的色谱过程中部分凝血因子IX会被活化, 而B性血友病患者使用了FIXa含量增高的FIX, 则有可能在体内触发凝血反应形成血栓。

亲和色谱的发展, 改进了凝血因子IX和凝血因子X的纯化方法, 并已经广泛应用在血浆蛋白的分离制备中 [8, 19, 20]。目前已经有多种用于纯化凝血因子IX/X的亲配基, 其中使用较多的是肝素和单克隆抗体。其实, 肝素作为亲和配基, 早在凝血因子IX或者X最初纯化的文章就被报道 [21, 22], 肝素是一种带负电荷的多聚物, 是AT-III的辅因子, 也是许多凝血因子的抑制剂, 可以通过静电和亲和相互作用可分离血浆中的很多凝血因子。肝素便宜易得, 但是亲和的特异性很差, 将肝素-琼脂糖作为亲和介质, 其分离的色谱效率并不高。而免疫亲和色谱, 即使用单克隆抗体作为亲和配基连接到固相树脂上, 利用抗原-抗体专一的特异性结合可以直接从复杂混合物中直接获得高纯度的抗原, 所以免疫亲和色谱是一种非常高效的分离纯化手段。Goodall 等人报道了凝血因子IX的单克隆抗体, 并使用凝血因子IX的单克隆抗体将血浆中所有凝血因子IX直接完全清除 [23]。Liebman等人制备了 Ca^{2+} 依赖型的单克隆抗体, Ca^{2+} 依赖型的单克隆抗体依赖 Ca^{2+} 形成稳定构象与凝血因子IX的特异性结合, 在没有 Ca^{2+} 的情况下已经结合的抗原-抗体复合物随即发生解离。所以使用 Ca^{2+} 依赖型的单克隆抗体为亲和配基做免疫亲和色谱时的结合-解离条件非常简单温和, 在含有 Ca^{2+} 的缓冲溶液中抗体可以和抗原特异性结合, 将淋洗液换成含有EDTA的缓冲溶液即可以洗脱并获得高纯度的抗原。它的优点非常突出, 经过一次色谱过程即可以获得比酶

活力超过 150 IU/mg 的高纯度凝血因子 IX [8], 时间短效率高。不需要任何前处理, 直接对血浆使用凝血因子 IX 的单克隆抗体-琼脂糖树脂完成色谱操作, 也是可行的, 而且, 使用这种方法纯化得到的蛋白中检出不到病毒。但是, 单克隆抗体造价昂贵, 且稳定性较差, 最终产品中可能有少量小鼠蛋白存在, 所以免疫亲和层析技术仅局限在了实验室中 [24]。

在本章中, 我们建立了以天然凝血因子 IX/X 结合蛋白作为亲和配基纯化凝血因子 IX 和凝血因子 X 方法。凝血因子 IX/X 结合蛋白, 存在于多种蝮蛇及蝰蛇的蛇毒中, 目前国内多个实验组报道不同蛇毒中近十个凝血因子 IX/X 结合蛋白 [25-28], 我们实验室也对这个蛋白家族做过深入研究。大部分凝血因子 IX/X 结合蛋白是由同源性很高的两个亚基通过二硫键连接在一起的金属蛋白。凝血因子 IX/X 结合蛋白与凝血因子 IX 或者凝血因子 X 的结合的部位是它们两条链中间的凹形表面, 该凹形表面与凝血因子 IX 或者凝血因子 X 的的 γ -羧基谷氨酸 (γ -carboxyglutamic acid, Gla) 结构域发生结合 [29, 30]。它们与凝血因子 IX 或者凝血因子 X 的结合通常都是金属离子依赖性的。我们选择了 ACF I 作为亲和配基, 利用它与凝血因子 IX/X 的亲和结合反应的金属离子依赖性的特点, 设计了通过金属离子调控色谱过程, 即可以选择合适的亲和平衡缓冲液和洗脱缓冲液进行结合和解离过程。实验结果表明, 使用 ACF I-Sepharose 亲和树脂, 可以从钡盐吸附法获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物、Sephadex A-50 柱层析法获得维生素-K 依赖性蛋白混合粗提物中一次纯化得到凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物。我们用 ACF I-Sepharose 直接从没有任何前处理的血浆中成功纯化出凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物, 随后使用 FPLC 很轻松的将凝血因子 IX 和凝血因子 X 分离开, 通过两步色谱同时得到高纯度的凝血因子 IX 及凝血因子 X。

我们测定了由上述两步色谱法从血浆里纯化得到凝血因子 IX 和凝血因子 X 的纯化, 并对其做了特异性蛋白水解酶活性测定。结果表明, 通过两步色谱法纯化的凝血因子 IX 平均酶活力为 76 IU/mg (由于活化方式的不同, 实际酶活力应该在 150 IU/mg 左右), 凝血因子 X 的平均酶活力为 362 IU/mg。我们也通过鸟枪法蛋白质组学分别对我们纯化得到的凝血因子 IX 和凝血因子 X 进行了鉴定。

我们发现, 凝血因子 IX/X 结合蛋白在与凝血因子 IX 或者凝血因子 X 结合时, 其结合反应的特点与 Liebman 等人制备了 Ca^{2+} 依赖型的单克隆抗体非常相似, 它们都会在特定金属离子存在的条件下对凝血因子 IX、凝血因子 X 有着特异性的高亲和力, 而在没有特定金属离子存在的条件下与 FIX、FX 则不发生结合。通过凝血因子 IX/X 结合蛋白亲和纯化得到产物与 Ca^{2+} 依赖型的单克隆抗体免疫亲和色谱得到的产物比较, 酶活力和产率都非常接近。

凝血因子 IX/X 结合蛋白与单克隆抗体相比, 有一个非常显著的优势。单克

隆抗体作为配基其高度的特异性也使其具有一定的局限性,只能和一个抗原发生特异性亲和反应,如 anti-human FIX 只能和人源的凝血因子 IX 特异性结合,却不能和牛血浆中的凝血因子 IX 特异性结合。而我们在实验中所使用的 ACF I,与任何来源的凝血因子 IX 和凝血因子 X 都有很高的特异性亲和力,并且这种亲和力都是受到特定金属离子的调控。故新型的配基 ACF I 具有非常广泛的用途。另外,由于 ACF I 是来源于爬行动物的外分泌蛋白,所以,它的化学性质较一般的抗体蛋白要稳定,而且,它来源丰富,从天然蛇毒中纯化获得 ACF I 的成本远低于制备单克隆抗体。所以,凝血因子 IX/X 结合蛋白必将成为凝血因子 IX/X 的单克隆抗体的替代品而大大促进凝血因子 IX/X 的纯化工艺的发展。

3.6 小结

我们利用凝血因子 IX/X 结合蛋白作为亲和配基,建立了快速高效亲和纯化凝血因子 IX 和凝血因子 X 的方法。新配基结合凝血因子 IX 及凝血因子 X 的亲合能力强,而且在温和的条件下就可以方便的洗脱下来凝血因子 IX 和凝血因子 X。通过凝血因子 IX/X 结合蛋白亲和柱层析,可以直接从任何血浆中分离出仅含有凝血因子 IX 和凝血因子 X 的混合物。再经过 FPLC 共两步色谱就可同时得到高纯度的凝血因子 IX 和凝血因子 X。该方法纯化效率和产率与单克隆抗体亲和层析方法相当。单克隆抗体的制备方法繁琐,抗体价格昂贵,而抗体不稳定。而新配基凝血因子 IX/X 结合蛋白是天然配基,长期稳定,价格便宜,很方便大规模工业制备。另外,用单克隆抗体亲和层析只能从一个特定动物血浆中纯化一种凝血因子,而用新亲和层析方法可以从任何血浆和溶液中同时纯化出凝血因子 IX 和凝血因子 X。因此新亲和层析方法可用来工业上大规模纯化凝血因子 IX 和凝血因子 X,以便为 B 型血友病患者和提供高纯而廉价的凝血因子 IX。

参考文献

1. Furie, B. and B.C. Furie, Mechanisms of thrombus formation [J]. *N Engl J Med*, 2008. 359(9): p. 938-49.
2. Thompson, A.R., Structure, function, and molecular defects of factor IX [J]. *Blood*, 1986. 67(3): p. 565-72.
3. Mertens, K. and R.M. Bertina, Pathways in the activation of human coagulation factor X [J]. *Biochem J*, 1980. 185(3): p. 647-58.
4. Fujikawa, K., M.E. Legaz, and E.W. Davie, Bovine factors X 1 and X 2 (Stuart factor). Isolation and characterization [J]. *Biochemistry*, 1972. 11(26): p. 4882-91.
5. Fujikawa, K., et al., Isolation and characterization of bovine factor IX (Christmas factor) [J]. *Biochemistry*, 1973. 12(24): p. 4938-45.
6. Howard, J.B. and G.L. Nelsestuen, Isolation and characterization of vitamin K-dependent region of bovine blood clotting factor X [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. 72(4): p. 1281-5.
7. Esnouf, M.P., P.H. Lloyd, and J. Jesty, A method for the simultaneous isolation of factor X and prothrombin from bovine plasma [J]. *Biochem J*, 1973. 131(4): p. 781-9.
8. Liebman, H.A., et al., Immunoaffinity purification of factor IX (Christmas factor) by using conformation-specific antibodies directed against the factor IX-metal complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(11): p. 3879-83.
9. Xu, X.L., et al., Purification and characterization of anticoagulation factors from the venom of *Agkistrodon acutus* [J]. *Toxicon*, 2000. 38(11): p. 1517-1528.
10. Xu, X., et al., Effect of metal ion substitutions in anticoagulation factor I from the venom of *Agkistrodon acutus* on the binding of activated coagulation factor X and on structural stability [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2009. 14(4): p. 559-71.
11. Xu, X.L., et al., Metal ions- and pH-induced conformational changes of acutolysin a from *Agkistrodon acutus* venom probed by fluorescent spectroscopy [J]. *Biopolymers*, 2007. 85(1): p. 81-90.
12. Wu, H., et al., Mg(II)-induced binding of factor IX-binding protein from the venom of *Agkistrodon Halys Pallas* with factor Xa [J]. *Toxicon*, 2010. 55(7): p. 1358-64.
13. Shen, D., et al., Identification of a nitric oxide-dependent hypotensive effect of anticoagulation factor II from the venom of *Agkistrodon acutus* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010. 79(3): p. 498-506.

14. Sturzebecher, J., et al., Dramatic enhancement of the catalytic activity of coagulation factor IXa by alcohols [J]. *FEBS Lett*, 1997. 412(2): p. 295-300.
15. Lindquist, P.A., K. Fujikawa, and E.W. Davie, Activation of bovine factor IX (Christmas factor) by factor XIa (activated plasma thromboplastin antecedent) and a protease from Russell's viper venom [J]. *J Biol Chem*, 1978. 253(6): p. 1902-9.
16. Chen, M., et al., Analysis of human liver proteome using replicate shotgun strategy [J]. *Proteomics*, 2007. 7(14): p. 2479-2488.
17. Manak, M.S. and R.J. Ferl, Divalent cation effects on interactions between multiple Arabidopsis 14-3-3 isoforms and phosphopeptide targets [J]. *Biochemistry*, 2007. 46(4): p. 1055-1063.
18. Burnouf, T., et al., Properties of a highly purified human plasma factor IX:c therapeutic concentrate prepared by conventional chromatography [J]. *Vox Sang*, 1989. 57(4): p. 225-32.
19. Josic, D., F. Bal, and H. Schwimm, Isolation of plasma proteins from the clotting cascade by heparin affinity chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1993. 632(1-2): p. 1-10.
20. Belattar, N., Affinity adsorption of human vitamin K-dependent coagulation factor IX onto heparin-like poly (styrene sodium sulfonate) adsorbent [J]. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, 2007. 27(4): p. 849-854.
21. Andersson, L.O., H. Borg, and M. Miller-Andersson, Purification and characterization of human factor IX [J]. *Thromb Res*, 1975. 7(3): p. 451-9.
22. Jackson, C.M., T.F. Johnson, and D.J. Hanahan, Studies on bovine factor X. I. Large-scale purification of the bovine plasma protein possessing factor X activity [J]. *Biochemistry*, 1968. 7(12): p. 4492-505.
23. Goodall, A.H., et al., Preparation of factor IX deficient human plasma by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody [J]. *Blood*, 1982. 59(3): p. 664-70.
24. Kim, H.C., et al., Purified factor IX using monoclonal immunoaffinity technique: clinical trials in hemophilia B and comparison to prothrombin complex concentrates [J]. *Blood*, 1992. 79(3): p. 568-75.
25. Atoda, H. and T. Morita, A novel blood coagulation factor IX/factor X-binding protein with anticoagulant activity from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (Habu snake): isolation and characterization [J]. *J Biochem*, 1989. 106(5): p. 808-13.
26. Sekiya, F., H. Atoda, and T. Morita, Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca* [J]. *Biochemistry*, 1993. 32(27): p. 6892-7.

27. Atoda, H., et al., Blood-Coagulation Factor Ix-Binding Protein from the Venom of *Trimeresurus-Flavoviridis* - Purification and Characterization [J]. *Journal of Biochemistry*, 1995. 118(5): p. 965-973.
28. Chen, Y.L. and I.H. Tsai, Functional and sequence characterization of coagulation factor IX factor X-binding protein from the venom of *Echis carinatus leucogaster* [J]. *Biochemistry*, 1996. 35(16): p. 5264-5271.
29. Mizuno, H., et al., Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(13): p. 7230-4.
30. Shikamoto, Y., et al., Crystal structure of Mg²⁺- and Ca²⁺-bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(26): p. 24090-24094.

第四章 蛇毒多功能蛋白 ACF II 降血压活性及其机理

4.1 引言

凝血因子IX/X结合蛋白家族广泛存在于各种蝮蛇和蝰蛇的蛇毒中,这个蛋白家族的成员都有着非常高的同源性,都可以在 Ca^{2+} 或其他金属离子存在的条件下和凝血因子IX或者凝血因子X形成1:1结合的复合物 [1-7]。进一步的研究表明,凝血因子IX/X结合蛋白是通过其双链之间的凹形表面与凝血因子IX或者凝血因子X的 γ -羧基谷氨酸(Gla)结构域发生结合的,而且这种结合反应依赖与 Ca^{2+} 等离子的存在。在生理 Ca^{2+} 浓度的条件下,该结合反应就会发生并阻断凝血过程。因此,凝血因子IX/X结合蛋白具有显著的抗凝血活性。

ACF I和ACF II都是从皖南尖吻蝮蛇(*Agkistrodon acutus*)蛇毒中纯化得到的凝血因子IX/X结合蛋白家族的成员,它们都可以通过结合凝血因子X而具有很强的抗凝血活性 [8, 9]。ACF I和ACF II都不具有任何酶活力。通过比对序列可以发现,ACF I和ACF II的氨基酸序列的同源性非常高, α -链中仅有9个不同的氨基酸残基, β -链的序列则完全相同。如图4.1所示,ACF II具有凝血因子IX/X结合蛋白家族的经典结构(PDB code 1Y17)。ACF II是由两个同源性很高的单链亚基通过二硫键连接的异二聚体,而每个单链亚基都有一个 Ca^{2+} 结合位点。 Ca^{2+} 不仅对ACF II的空间构象及结构的稳定性有重要的贡献,而且是ACF II与凝血因子X结合的前提条件[10]。

虽然凝血因子 IX/X 结合蛋白的结构及它们的抗凝血机理都有了深入的研究,但它们在血液循环系统还未见报道。在本章,我们将研究 ACF I 和 ACF II 对心率及血压的影响,并探讨其作用的机理。

4.2 实验材料

4.2.1 实验仪器

Statham P23D 型压力换能器(美国); BIOPAC 系统 MP100A 型波谱记录仪(美国); JH-2 型张力换能器(中国); SKY-A8 型生物电信号处理系统(中国)。

4.2.2 实验材料

皖南尖吻蝥蛇蛇毒粗毒冻干粉购自安徽屯溪蛇伤研究所；ACF I 和 ACF II 按第二章的方法分离纯化。牛血清白蛋白、乙酰胆碱、盐酸苯肾上腺素、水合硝普钠 (SNP)、N-硝基精氨酸甲酯 (L-NAME) 购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)；三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 购自上海生工试剂公司；其他试剂均为分析纯。实验用 Wistar-Imamichi 大白鼠 (180-250 g, 7-8 周大, 由安徽医科大学实验中心提供)。

4.3 实验方法

4.3.1 大鼠在体心血管实验

用 25%乌拉坦加 1%水合氯醛的麻醉剂以 5 ml/kg 的剂量通过腹腔注射将大鼠麻醉后, 将其固定于解剖台上。气管插管以保持大鼠呼吸畅通。分别对大鼠的股动脉和股静脉进行插管, 其中股动脉的插管用于测量大鼠的血压, 股静脉的插管用于注射给药[11]。在股动脉插管成功后, 立即从插管向动脉注射 0.2ml 浓度为 125 IU/ml 的肝素钠, 以防止血液凝固。动脉插管连接已经预先校准过的压力换能器 (Statham P23D, 美国产)。压力换能器连接 BIOPAC 系统的波谱记录仪 (MP100A, 美国产) 记录血压和心率。在开始实验前, 动物需要先稳定 30 分钟, 并记录一段动物正常的血压和心率。然后, 从股静脉注射给药, 注射时将一定剂量的 ACF I 或者 ACF II 一次全部给药。对于事先给予 N-硝基精氨酸甲酯的实验组, 其实验方法参照 Rees 等人的方法[12, 13], 按 50 mg/kg 的剂量从股静脉的插管注射。注射 N-硝基精氨酸甲酯后, 大鼠的血压会显著的升高, 并伴随轻微的心率降低, 这些血压和心率的变化大约在 2 分钟后进入一个平台期。注射 N-硝基精氨酸甲酯 10 分钟后, 通过股静脉注射 ACF II。每只大鼠, 只用做一次实验。

4.3.2 离体血管环的舒张实验

处死大鼠, 并迅速切下胸主动脉, 并放入冰的 Krebs 溶液中。Krebs 溶液 (pH=7.4) 中含有 118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.1 mmol/L MgSO₄, 1.2 mmol/L KH₂PO₄, 1.5 mmol/L CaCl₂, 25 mmol/L NaHCO₃ 和 10 mmol/L 葡萄糖。在冰的 Krebs 溶液中小心清理胸主动脉, 去除血管上的连接组织和脂肪, 然后将胸主动脉切成若干个宽度为 3mm 左右的血管环。所有的解剖过程必须非常小心, 以保护内皮细胞不受到损伤。如需要剥离内皮细胞, 使用塑料管在血管环内腔的表面轻轻摩擦几下即可将内皮细胞破坏。将血管环悬浮在 37℃ 的 Krebs 溶液中, 并将两个“L”型的不锈钢钩子插入血管环的内腔, 其中一个钩子固定好, 另一个

钩子连接张力换能器 (JH-2, 中国产)。血管环浴液中持续充入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体 [11]。调节血管环的基线张力为 1 g。张力的变化由张力换能器记录, 并连接到生物电信号处理系统 (SKY-A8, 中国产)。判定血管内皮的完整性是将预收缩后的血管环用 1 μmol/L 乙酰胆碱 (Ach) 处理后可以获得 70% 以上的舒张, 而确定血管内皮缺失是将预收缩后的血管环用 1 μmol/L 乙酰胆碱 (Ach) 处理后其舒张小于 10%。血管环需要预先和各种药物接触 30 分钟, 然后加入累计浓度的 ACF II 做血管舒张实验。实验最后, 使用浓度为 100 μmol/L 的硝普钠 (SNP) 使血管环获得最大舒张, 这个舒张度计算为 100% 舒张。每次测试结束后, 血管环需要用新鲜的 Krebs 溶液清洗 3 次, 并平衡 30 分钟以后才可以继续使用 [14, 15]。

4.3.2 数据统计与分析

所有的在体实验数据, 包括血压和心率, 都用多导生理记录仪系统 (BIOPAC systems, 美国) 检测并记录, 所得到的实验数据通过脱机数据视图软件 AcqKnowledge 进行分析。数据统计采取平均值±标准误差。根据情况, 选择配对 T 检验或不配对 T 检验来检验平均值之间是否具有显著性差异, 当 $P < 0.05$ 则认为具有统计学上的显著性差异。

4.4 实验结果

4.4.1 ACF II 对麻醉的正常血压大鼠的降血压作用

我们研究了 ACF I 和 ACF II 对心血管系统的作用, 作用对象为麻醉的正常血压大鼠。由于 ACF I 和 ACF II 对于大鼠都属于异种来源的蛋白质, 所以, 选用牛血清白蛋白作为对照组。图 4.2 显示了对正常血压大鼠分别给予 ACF I (8 mg/kg)、ACF II (4-8 mg/kg) 和牛血清白蛋白 (8 mg/kg) 后其心率 (HR) 和平均动脉压 (MABP) 的变化。正常血压大鼠的平均动脉压基准值为 96.6 ± 4.8 mmHg, 心率的基准值为 360 ± 14 beats/min。如图 4.2A 所示, 对照组的牛血清白蛋白会轻微升高大鼠的平均动脉压和心率, 这个结果和 Hayashida 等人报道的情况一致 [16]。在注射牛血清白蛋白后, 大鼠血压和心率升高, 大约在 100 秒以后达到最大, 平均动脉压升高 $8.1 \pm 0.3\%$, 心率升高 $4.0 \pm 0.1\%$, 并进入平台期。大鼠在静脉注射剂量为 8 mg/kg 的 ACF I 后, 血压和心率都没有发生显著的变化。

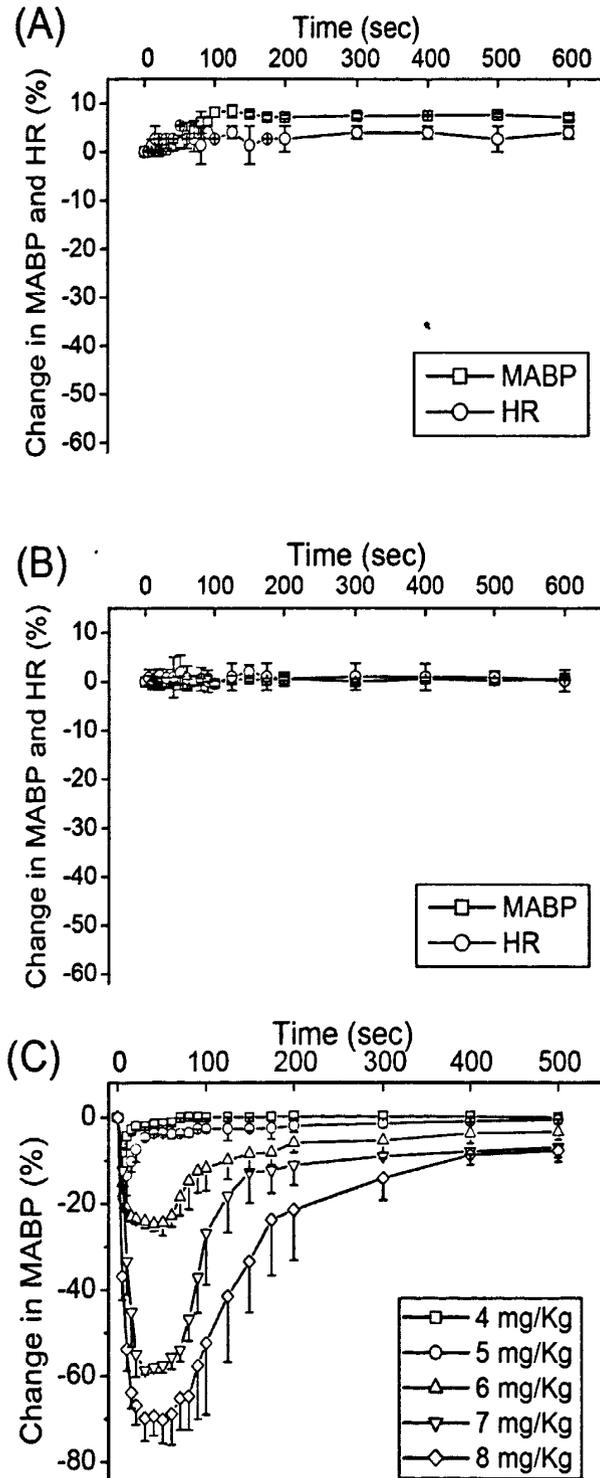
我们发现, 静脉注射 ACF II 会引起具有量效关系的血压降低 (图 4.2C)。在注射低剂量 (4-5 mg/kg) 的时候, ACF II 就可以导致平均动脉压发生显著下降,

给药 5 秒后达到最大的降血压效果，然后血压开始恢复。1 到 2 分钟后，血压会恢复到略低于给药前水平的一个平台值，然后慢慢的恢复到原始给药前的基准水平。当静脉注射 ACF II 的剂量达到 6-8 mg/kg 的时候，血压会在给药后持续下降，到 30 至 50 秒的时候达到最低血压，然后血压再开始恢复。3 到 6 分钟后，平均动脉压会恢复到明显低于给药前的的平台值，并持续两个小时以上直到实验结束。在图 4.2D 中将各个剂量的 ACF II 和牛血清白蛋白所导致收缩压、舒张压和平均动脉压的最大变化都用柱状图表示在一起。当静脉注射剂量为 7 mg/kg 时平均动脉压从 96.8 ± 5.7 mmHg 最多下降到 43.7 ± 4.9 mmHg，最大降幅为 54.9 ± 3.3 %。当 ACF II 的给药剂量超过 8 mg/kg 的时候，大鼠的血压降到极低且很不稳定并可能导致死亡。根据上面的结果，我们选择 7 mg/kg 作为进一步研究 ACF II 的实验中所用的剂量。这些结果都显示，ACF II 在给药后血压会先出现一个快速的下降，然后又增长恢复，最后长时间维持在略低于给药前的血压水平。如图 4.2C 中显示，ACF II 诱导的这种长时间维持在略低于给药前血压的降低幅度，也是与药物剂量相关的。所以，ACF II 是一个同时具有抗凝血活性和降血压活性的双功能蛋白。然而，在 ACF II 各个剂量（4-8 mg/kg）的实验中，ACF II 均没有表现出任何对心率的影响。



图 4.1 ACF II 的罗宾模型图像，蛋白质银行文件号 1Y17

Fig.4.1 Ribbon model of the heterodimer polypeptide chains of anticoagulation factor II (ACF II). The Ca^{2+} ions are indicated as yellow balls. The residues S5, A16, A24, A52-H53, K108-A109, R112 and R122 in A-chain of ACF II that are different from those of ACF I are marked in green. The picture was drawn with Protein Data Bank file 1Y17



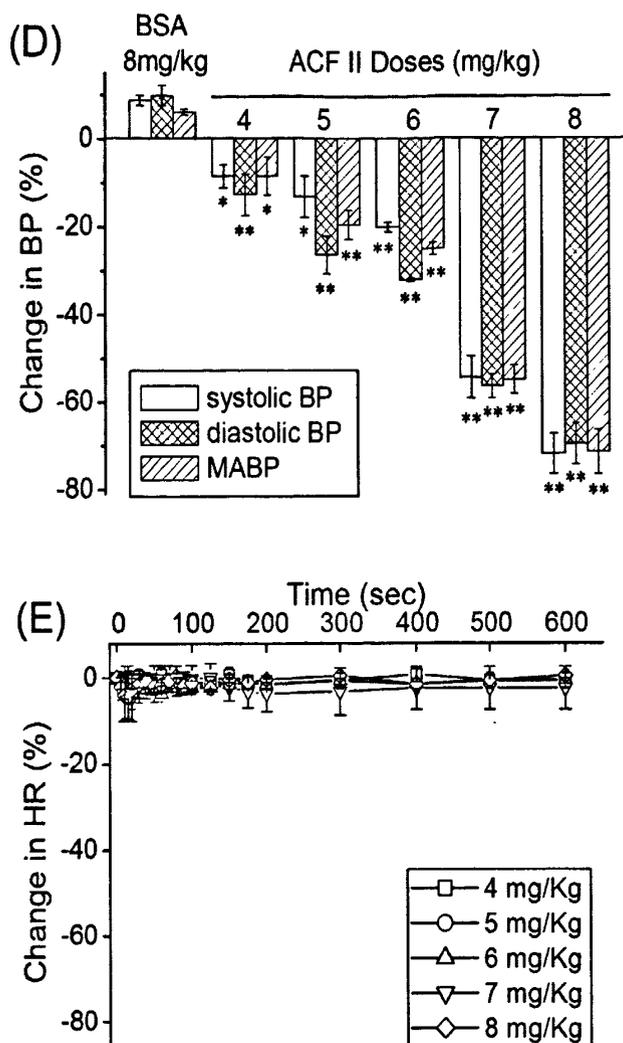


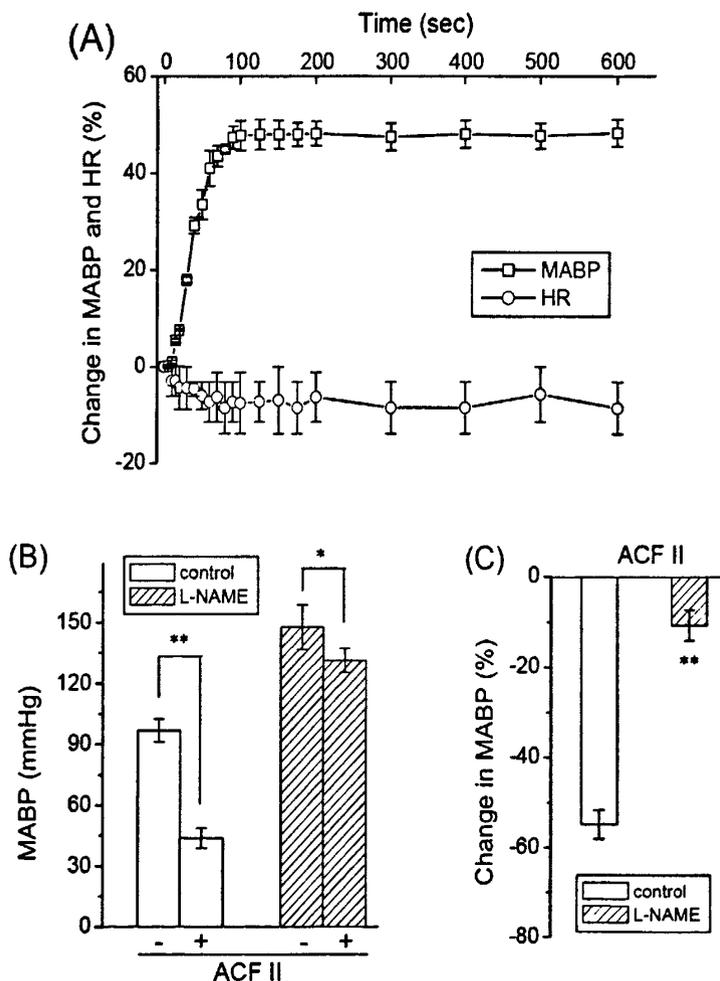
图 4.2 ACF I 和 ACF II 的对大鼠血压和心率的影响

Fig.4.2 Effect of ACF I and ACF II on arterial blood pressure and heart rate of rats. Time courses of the changes in MABP and HR in response to intravenous injection of BSA (8 mg/kg) (A) and ACF I (8 mg/kg) (B). Time courses of the changes in MABP (C) and HR (E) in response to intravenous injection of ACF II (4-8 mg/kg). (D) Maximum changes in BP in response to the intravenous injection of BSA (8 mg/kg) and ACF II (5-8 mg/kg). Means± S.E.M., n=5, *P<0.05, **P<0.01. vs. BSA-treated group (Dunnett's test).

4.4.2 ACF II 介导 NO 释放的降血压作用

NO是心、脑血管调节中一个具有重要功能的信号分子，NO在维持血管张力的恒定和调节血压的稳定性中起着重要作用。NO的合成依赖于—氧化氮合成酶，

底物为L-精氨酸 [17]。N-硝基精氨酸甲酯 (L-NAME) 是一氧化氮合成酶的抑制剂, 它被用作研究ACF II的降血压作用是否由NO的释放所诱导的试剂。参考Rees等人的方法 [12, 13, 16], 我们对大鼠预先给予 50 mg/kg剂量的N-硝基精氨酸甲酯, 10 分钟后静脉注射剂量为 7 mg/kg的ACF II, 并研究平均动脉压随时间的变化过程。图 4.3 显示了N-硝基精氨酸甲酯对ACF II降血压作用的影响。由于N-硝基精氨酸甲酯会抑制一氧化氮合成酶的活性, 使血管平滑肌缺失舒张调节, 从而导致平均动脉压上升, 并引起心率轻微下降, 心率的轻微下降则可能是机体对血压升高的负反馈调节的结果 (图 4.3A), 这与Hayashida等人得到实验结果一致 [16]。对于L-NAME实验组的大鼠, 平均动脉压的基准值由 96.6 ± 4.8 mmHg上升到 157.1 ± 5.0 mmHg。比较没有预先注射L-NAME的实验组和预先注射了L-NAME的实验组, 我们可以发现ACF II的降血压作用在L-NAME实验组大鼠的身上严重降低了 (图 4.3, B和C)。图 4.3D为平均动脉压随时间变化的曲线, 我们从中可以看出ACF II的整个降血压过程都被N-硝基精氨酸甲酯抑制了。这些结果表明, ACF II在体降血压作用是基于ACF II介导的NO释放。



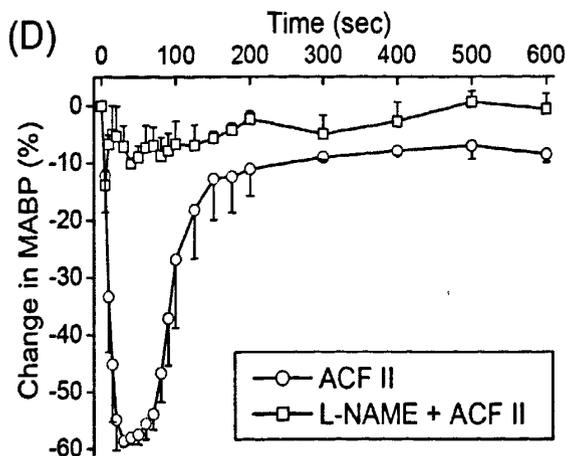


图 4.3 NO 合成酶抑制剂对 ACF II 降血压活性的影响

Fig.4.3 Influence of nitric oxide (NO) synthase inhibitor on the hypotensive effect of ACF II. (A) Time courses of the changes in MABP and HR in response to intravenous injection of L-NAME (50 mg/kg). Actual values in MABP (B) and maximum changes in MABP (C) in response to the intravenous injection of ACF II (7 mg/kg) were measured in the presence or absence of N-omega-L-arginine methyl ester (L-NAME: 50 mg/kg iv). (D) Time courses of the changes in MABP in response to intravenous injection of ACF II (7 mg/kg) in the presence or absence of L-NAME (50 mg/kg iv). Means \pm S.E.M., $n=5$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. vs. control (Dunnnett's test).

4.4.3 ACF II 对苯肾上腺素预收缩的动脉血管环的舒张作用

血管内皮细胞以L-精氨酸为底物合成NO。NO是血管舒张因子，它在血管功能调控中发挥关键作用 [12]。为了检测ACF II是否会诱导血管舒张，我们研究了内皮完整的动脉血管环和内皮被破坏的动脉血管环对ACF II的应答。取下胸主动脉，并用 $1 \mu\text{mol/L}$ 的苯肾上腺素预收缩，使其在实验过程中产生一个稳定不变的收缩力。图 4.4A显示，对于苯肾上腺素预收缩的内皮完整的胸主动脉血管环，ACF II可以诱导其发生具有量效关系的舒张。ACF II对苯肾上腺素预收缩的内皮完整的胸主动脉血管环的舒张 EC_{50} 值为 $30.0 \pm 9.4 \mu\text{mol/L}$ 。当胸主动脉血管环的内皮组织被破坏，ACF II就不能诱导血管舒张（图 4.4, B和C）。每次舒张的实验最后，都是用浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 的硝普钠使被预收缩的血管环获得最大舒张。这些结果表明，ACF II降血压作用是由于其诱导的内皮依赖性的血管舒张而引起的。

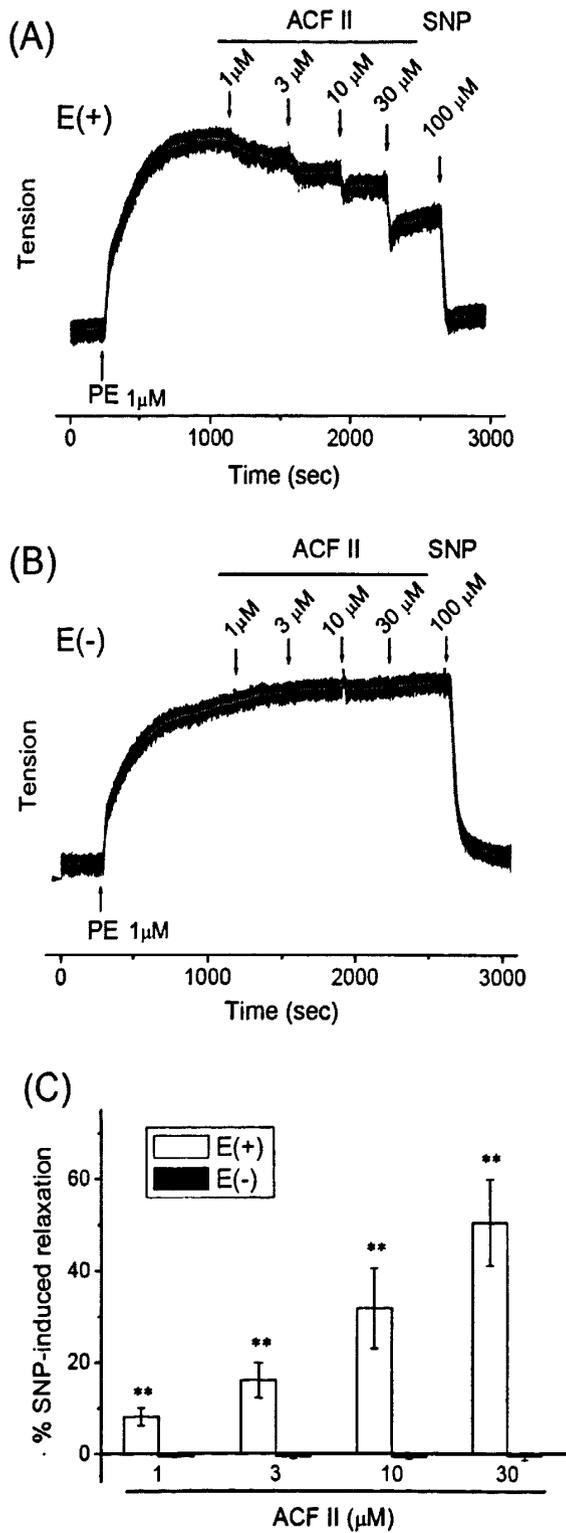


图 4.4 ACF II 诱导大鼠胸主动脉血管环的舒张

Fig.4.4 ACF II-induced relaxation in the rat thoracic aorta. The typical responses to ACF II were determined in endothelium-intact (E+) (A) and endothelium-denuded (E-) (B) aortic rings precontracted with phenylephrine (PE), respectively. (C) Data are expressed in terms of relative relaxation using the maximum relaxation induced by sodium nitroprusside (SNP) as references (100%). Means± S.E.M., n=8, *P<0.05, **P<0.01. vs. endothelium-denuded group (unpaired t-test).

4.4.4 NO 介导 ACF II 对动脉血管环的舒张作用

前面我们已经通过在体实验证明了, ACF II在体降血压作用是基于ACF II诱导的NO释放; 我们又通过离体的血管环实验证明了, ACF II的降血压作用是由于其诱导的内皮依赖性的血管舒张而引起的。现在我们进一步研究, 在N-硝基精氨酸甲酯存在的情况下, ACF II诱导内皮完整的动脉血管环的舒张情况。如图4.5, 当胸主动脉血管环用浓度为100 μmol/L的N-硝基精氨酸甲酯预处理后, ACF II对其的舒张作用被抑制了56%。我们以乙酰胆碱作为阳性对照, 乙酰胆碱是通过NO通路诱导血管舒张。100 μmol/L的N-硝基精氨酸甲酯可以抑制5 μmol/L乙酰胆碱92%的舒张活性, 这和文献中报道的一致[12]。这些结果显示, ACF II诱导的血管舒张是通过NO信号途径实现的。

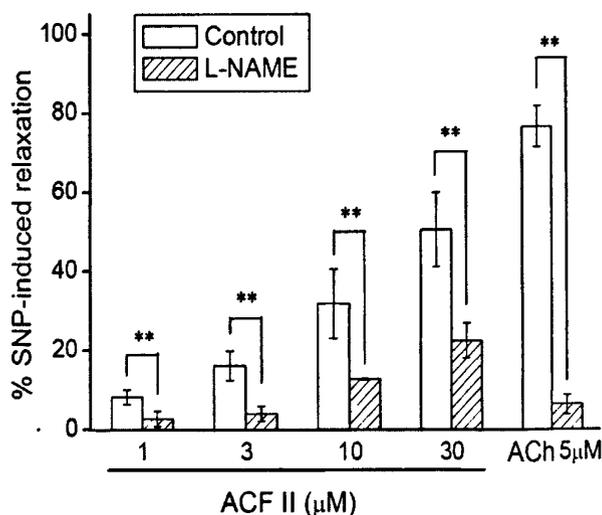


图 4.5 NO 合成酶抑制剂对 ACF II 诱导的血管环舒张活性的影响

Fig.4.5 Effect of the NO synthase inhibitor on ACF II-induced relaxation in the rat thoracic aorta. The responses of endothelium-intact aortic rings to ACF II were determined in the presence or absence of L-NAME (100 μM). The segments of aorta for ACF II and acetylcholine experiments were from the same rat. Means± S.E.M., n=8, *P<0.05, **P<0.01. vs. control (Dunnett's test).

4.5 实验讨论

ACF II作为凝血因子IX/X结合蛋白家族的成员,可以特异性结合凝血因子IX或者凝血因子X,从而产生显著的抗凝血活性 [9]。在这个章节的研究中,我们发现,ACF II是一个多功能的蛋白,它不仅可以结合凝血因子IX/X阻断凝血的瀑布反应,还具有显著的降血压作用。目前,在凝血因子IX/X结合蛋白家族里,只有ACF II具有降血压活性。因此,ACF II是一个特殊的双功能蛋白,而且有意思的是其抗凝血活性和降血压活性都是和循环系统相关的。ACF II没有出血活性 [8],我们在ACF II的在体实验过程中也没有发现任何大的或小的出血症状。ACF II的功能多样性可能为设计抗凝血或是抗高血压药物提供有力线索。

皖南尖吻蝮蛇毒中的另一个凝血因子IX/X结合蛋白,ACF I [8],和ACF II有着类似的 $\alpha\beta$ 双链结构,也可以结合凝血因子X而具有抗凝血活性 [18]。尽管ACF I和ACF II的氨基酸序列有很高的同源性,但是,ACF I却没有表现出任何降血压活性(图 4.2B)。这说明,凝血因子X与ACF II的降血压活性无关。

如图 4.2C所示,静脉注射ACF II会导致具有量效关系的平均动脉压的下降。将一定剂量的ACF II通过静脉一次性注射后,立即导致一个快而短暂的血压下降,接着发生恢复性回升,随后长时间维持在一个低于给药前的血压水平。由ACF II导致的快而短暂的血压下降和长时间维持的低血压,这两个过程的降血压幅度都是随ACF II剂量增加而增加的。血压的下降常常会导致机体出现代偿反应,比如交感神经的兴奋,而引发心动过速。例如,胫屈嗪直接舒张血管平滑肌引起血压降低的同时会反射性使心率上升。另一个药物的例子是阿片受体兴奋剂,吗啡,静脉注射吗啡会抑制交感神经兴奋,同时降低血压和心率 [16]。有趣的是,ACF II在降低血压的过程中,对心率没有任何显著的影响(图 4.2E),这说明静脉注射ACF II导致血压下降的机理和胫屈嗪、吗啡的机理都是不同的。ACF II可诱导大鼠长时间维持在低血压状态,这说明ACF II的降血压作用是长效性的。

有文献报道,凝血酶受体激活肽(TRAP)也可以诱导类似ACF II的降血压作用 [19],其机理是由于TRAP会通过内皮释放NO。NO是一种心血管调节的重要信号分子,它作为内皮细胞血管舒张因子,具有舒张血管和调节血管紧张性的生理作用 [17]。所以,我们研究了NO是否参与了ACF II的降血压作用。如图 4.3,ACF II诱导的在体降血压活性会明显的被NO合成酶抑制剂——N-硝基精氨酸甲酯所抑制,这说明NO在ACF II发挥降血压作用的过程中发挥重要作用。

在离体的实验中(图 4.4),ACF II对苯肾上腺素预收缩的内皮完整的大鼠

胸主动脉血管环表现了舒张血管环作用,且这种舒张作用具有量效关系。破坏血管环的内皮细胞,可以彻底阻断 ACF II 对血管环的舒张活性,这说明 ACF II 的舒张血管作用是依赖于内皮细胞的。为了研究 NO 是否在 ACF II 的舒张血管作用中发挥作用,我们在离体实验中也使用 N-硝基精氨酸甲酯作为抑制剂来考察其对 ACF II 舒张血管活性的影响。实验证明,用浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 N-硝基精氨酸甲酯预处理内皮完整的大鼠胸主动脉血管环,ACF II 对其的舒张活性可以显著的被抑制。这说明,NO 很可能在 ACF II 舒张血管的过程中传递信号。这些在体和离体的实验一起证明了,ACF II 是通过 NO 信号途径诱导血管舒张而使血压下降的。

乙酰胆碱通过 NO 信号途径诱导血管舒张。L-NAME 在体外实验中对乙酰胆碱的舒张血管活性具有极大的抑制作用,而 L-NAME 在相同条件下对 ACF II 的舒张血管活性的抑制作用要小一些(图 4.5)。这个结果说明,ACF II 诱导的降血压作用并非完全是通过 NO 信号途径。在 ACF II 的降血压过程中可能还有其他未知的途径。

相比众多具有降血压活性的化学小分子,仅有为数不多的几个天然蛋白质具有降血压活性。非常有趣的是,这些蛋白质大部分都是多功能的,它们在具有降血压活性的同时还会具有其他的生理活性。例如,有五种具有降血压活性的丝氨酸蛋白酶都为多功能蛋白质,它们包括凝血酶 [19, 20], 胰蛋白酶 [21], 纤维蛋白溶解酶 [22], 人中心粒细胞弹性蛋白酶和胰凝乳蛋白酶 [23]。这五种蛋白酶都是具有多种功能活性的酶 [24-28]。凝血酶是一个被研究较多的多功能蛋白质,它可以结合各种类型细胞的不同受体,并发挥不同的生理活性,其作用的细胞包括内皮细胞、平滑肌细胞和血小板 [29, 30]。然而,目前报道的没有酶活性且具有降血压活性的蛋白仅有一个,就是牛乳铁蛋白 [16]。乳铁蛋白是一种存在于乳液、中性粒细胞和其他体液的多功能蛋白。乳铁蛋白分子的结构为一条含有 689 个氨基酸残基的单链,其为铁离子结合的糖蛋白 [31]。乳铁蛋白的主要功能是其对铁离子的转运,此外,乳铁蛋白通过介导 NO 的生成,产生内皮依赖性的血管舒张,并最终导致血压下降。有文献报道,具有调节血压作用的内源性 NO 是由内皮 NO 合成酶合成的 [32]。乳铁蛋白可能是直接作用 NO 合成酶,也可能是通过相关受体间接激活 NO 合成酶的,从而导致血压的下降 [16]。而另一篇文章中则提到了牛乳铁蛋白可以选择性的激活神经 NO 合成酶而加速 NO 的合成 [33]。

目前的研究显示,ACF II 是第二个被证明具有在体降血压活性且没有酶活性的蛋白质。和乳铁蛋白类似,ACF II 通过介导 NO 的生成导致内皮依赖性的血管舒张而引发血压下降。同样是以麻醉状态的正常血压大鼠为实验对象,从皖南尖吻蝮蛇毒中的 ACF II 在 7 mg/kg 的剂量时会导致平均动脉血压产生 54.9 ± 3.3

%的下降,而来源于牛奶的乳铁蛋白在以 1280 nmol/kg 的剂量静脉注射的时候会使平均动脉压的下降幅度只达到 35% [16]。这一数据表明,ACF II 的降血压作用较乳铁蛋白更为高效。

ACF II 作为一个没有任何酶活力的蛋白,其抗凝血活性的机理是与凝血因子 IX 或者凝血因子 X 发生 1:1 的结合形成复合物,从而阻断血液凝固过程中瀑布反应 [9]。ACF II 在没有任何凝血因子存在的 Krebs 溶液中对苯肾上腺素预收缩的内皮完整的大鼠胸主动脉血管环产生舒张作用,这说明,ACF II 的舒张血管活性和其抗凝血活性并不是通过同一途径。在第二章中,我们对 ACF II 的在体抗凝血活性进行了深入的探讨,以 1.65 mg/kg 的剂量对大鼠尾静脉注射 ACF II 仅可以使 APTT 延长 2 倍不到,而静脉注射 ACF II 的剂量达到 5mg/kg 的时候 APTT 可以延长 5 倍。在降血压实验中,我们发现,ACF II 产生轻微降血压的最小剂量为 4 mg/kg,而这个剂量在抗凝血实验中已经为极强生理作用的高剂量。前面我们已经得到结论,ACF II 的抗凝血活性和降血压活性为两个不同的通路,结合我们在第二章节、第三章节所完成的 ACF II 和凝血因子 X 及凝血因子 IX 结合反应的动力学实验,我们推测,ACF II 在进入循环系统中以后,既可以和凝血因子 IX/X 结合发挥其抗凝血活性,又可以和血管内皮细胞上的受体作用导致血管舒张而引起血压下降。对于在这两个作用对象,ACF II 可能会优先选择与它亲和力更高的凝血因子 IX/X。所以,ACF II 在低剂量时,只呈现抗凝血活性,在高剂量时才表现出降血压活性。

值得我们留意的是,皖南尖吻蝮蛇毒中,另一个与 ACF II 同源性极高的另一种凝血因子 IX/X 结合蛋白 (ACF I) 不具有降血压活性。ACF I 和 ACF II 仅在 α -链上有 9 个不同的氨基酸残基,而这 9 个不同的氨基酸残基正是 ACF I 没有降血压活性而 ACF II 有降血压活性的内在原因。目前我们还不知道 ACF II 诱导血压下降的详细作用机理,但以上结果表明 ACF II 通过多靶点作用血液循环系统,是一个多功能蛋白质,它通过不同的途径发挥抗凝血和降血压两种不同作用。ACF II 多功能作用机理有待更进一步深入研究。

4.6 实验讨论

我们研究了 ACF I 和 ACF II 对大鼠血液循环系统的影响,发现 ACF II 具有显著的降血压活性,同时对心率没有产生显著的影响。静脉注射 ACF II 能迅速导致大鼠血压显著下降并在几十秒后达到最大下降幅度,接着血压缓慢升高,恢复到明显低于给药前水平的平台值,并长期维持这个较低血压的平台状态。在体外,ACF II 能诱导血管舒张。血管内皮细胞中有一氧化氮 (NO) 合成酶,该酶

合成 NO。NO 是信号分子，它能诱导血管平滑肌舒张。N-硝基精氨酸甲酯 (L-NAME) 是 NO 合成酶抑制剂。在体外，L-NAME 能显著抑制 ACF II 的舒张血管活性；在体内，L-NAME 能显著抑制 ACF II 的降血压活性。由此可知，ACF II 通过 NO 信号途径诱导血管舒张从而导致血压下降。因此 ACF II 是凝血因子 IX/X 结合蛋白家族中一个独特的多功能蛋白，它通过不同途径作用与血液系统，兼具抗凝血和降血压双重活性。尽管 ACF I 和 ACF II 具有十分相似的空间结构，但 ACF I 没有任何降压活性。

参考文献

1. Atoda, H., et al., Coagulation factor X-binding protein from Deinagkistrodon acutus venom is a Gla domain-binding protein [J]. *Biochemistry*, 1998. 37(50): p. 17361-70.
2. Gopinath, S.C., et al., Snake-venom-derived Factor IX-binding protein specifically blocks the gamma-carboxyglutamic acid-rich-domain-mediated membrane binding of human Factors IX and X [J]. *Biochem J*, 2007. 405(2): p. 351-7.
3. Mizuno, H., et al., Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. 98(13): p. 7230-7234.
4. Zang, J.Y., M.K. Teng, and L.W. Niu, Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of AHP IX-bp, a zinc iron and pH-dependent coagulation factor IX binding protein from Agkistrodon halys Pallas venom [J]. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 2003. 59: p. 730-733.
5. Suzuki, N., et al., pH-dependent structural changes at Ca²⁺-binding sites of coagulation factor IX-binding protein [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005. 353(1): p. 80-87.
6. Mizuno, H., et al., Structure of coagulation factors IX/X-binding protein, a heterodimer of C-type lectin domains [J]. *Nature Structural Biology*, 1997. 4(6): p. 438-441.
7. Mizuno, H., et al., Crystal structure of coagulation factor IX-binding protein from habu snake venom at 2.6 Å: implication of central loop swapping based on deletion in the linker region [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999. 289(1): p. 103-112.
8. Xu, X.L., et al., Purification and characterization of anticoagulation factors from the venom of Agkistrodon acutus [J]. *Toxicon*, 2000. 38(11): p. 1517-1528.
9. Xu, X.L. and Q.L. Liu, Binding of anticoagulation factor II from the venom of Agkistrodon acutus with activated coagulation factor X [J]. *Toxicon*, 2001. 39(9): p. 1359-1365.
10. Xu, X.L., Q.L. Liu, and Y.S. Xie, Metal ion-induced stabilization and refolding of anticoagulation factor II from the venom of Agkistrodon acutus [J]. *Biochemistry*, 2002. 41(11): p. 3546-3554.
11. de Siqueira, R.J.B., et al., Cardiovascular effects of the essential oil of Croton zehntneri leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats [J]. *Life Sciences*, 2006. 78(20): p. 2365-2372.
12. Rees, D.D., et al., Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo [J]. *Br J Pharmacol*, 1990. 101(3): p. 746-52.

13. Desai, K.M., et al., EDHF-mediated rapid restoration of hypotensive response to acetylcholine after chronic, but not acute, nitric oxide synthase inhibition in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006. 546(1-3): p. 120-6.
14. Moon, M.K., et al., Vasodilatory and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of rhubarb via a NO-cGMP pathway [J]. *Life Sciences*, 2006. 78(14): p. 1550-1557.
15. Liew, H.C., et al., Synergism between hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) in vasorelaxation induced by stonustoxin (SNTX), a lethal and hypotensive protein factor isolated from stonefish *Synanceja horrida* venom [J]. *Life Sci*, 2007. 80(18): p. 1664-8.
16. Hayashida, K., et al., Bovine lactoferrin has a nitric oxide-dependent hypotensive effect in rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. 286(2): p. R359-65.
17. Calver, A., J. Collier, and P. Vallance, Nitric-Oxide and Cardiovascular Control [J]. *Experimental Physiology*, 1993. 78(3): p. 303-326.
18. Shen, D., et al., Identification of a nitric oxide-dependent hypotensive effect of anticoagulation factor II from the venom of *Agkistrodon acutus* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010. 79(3): p. 498-506.
19. Sicker, T., et al., Systemic vascular effects of thrombin and thrombin receptor activating peptide in rats [J]. *Thrombosis Research*, 2001. 101(6): p. 467-475.
20. Tang, M., et al., Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure [J]. *Nature Medicine*, 2003. 9(12): p. 1506-1512.
21. Cicala, C., Protease activated receptor 2 and the cardiovascular system [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2002. 135(1): p. 14-20.
22. Wakabayashi, I. and H. Masuda, Association of pulse pressure with fibrinolysis in patients with type 2 diabetes [J]. *Thrombosis Research*, 2007. 121(1): p. 95-102.
23. Williams, J.C., et al., Acute Blood-Pressure Effects of Selected Serine Proteases in Normotensive Rats and Dogs [J]. *Pharmacology*, 1991. 43(4): p. 199-209.
24. Huntington, J.A., How Na⁺ activates thrombin - a review of the functional and structural data [J]. *Biological Chemistry*, 2008. 389(8): p. 1025-1035.
25. Wang, Y., W. Luo, and G. Reiser, Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: Proteolysis and cellular functions [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008. 65(2): p. 237-252.
26. Fay, W.P., N. Garg, and M. Sunkar, Vascular functions of the plasminogen activation system [J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2007. 27(6): p. 1231-1237.
27. Henriksen, P.A. and J.M. Sallenave, Human neutrophil elastase: Mediator and therapeutic target in atherosclerosis [J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2008. 40(6-7): p. 1095-1100.

28. Thrower, E., S. Husain, and F. Gorelick, Molecular basis for pancreatitis [J]. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2008. 24(5): p. 580-585.
29. Luo, W., Y.F. Wang, and G. Reiser, Protease-activated receptors in the brain: Receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection [J]. *Brain Research Reviews*, 2007. 56(2): p. 331-345.
30. Wang, H. and G. Reiser, Thrombin signaling in the brain: The role of protease-activated receptors [J]. *Biological Chemistry*, 2003. 384(2): p. 193-202.
31. Moore, S.A., et al., Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 angstrom resolution [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997. 274(2): p. 222-236.
32. Prieto, D., Physiological regulation of penile arteries and veins [J]. *International Journal of Impotence Research*, 2008. 20(1): p. 17-29.
33. Tsuchiya, T., et al., Milk-derived lactoferrin may block tolerance to morphine analgesia [J]. *Brain Research*, 2006. 1068(1): p. 102-108.

致 谢

本论文是在徐小龙副教授和苏庆德教授的悉心指导和关怀下完成的。徐老师和苏老师深厚的学术功底，严谨的工作态度和敏锐的科学洞察力使我受益良多。衷心感谢他们多年来给予我的悉心教导和热情帮助。

感谢我的父亲——安徽中医学院临床二系的沈德凯教授提供心血管生理实验的条件，并对实验进行了悉心的指导。感谢中国科学技术大学化学系的刘扬中老师在实验仪器上的支持和帮助，为我的实验提供了很多便利条件。感谢中国科学技术大学理化实验中心、生命科学实验中心以及化学系实验中心的罗昭峰、吴高、周宏敏、欧惠超、何海辉、丁延伟、余华明、孙梅、罗如莉、李薇薇等老师在样品测试和仪器操作上的大力帮助。

感谢本实验室的张立云、彭莉莉、宋佳佳、张燕等同学在实验和生活中的帮助。感谢刘扬中老师实验组的郑玉船、闵元增、马国林、李婵、鲍珣、黄蓉蓉、陈思明、潘妍等同学在实验中对我提供的热心帮助。感谢我的室友陆杨在生活和学习中给予我的帮助，使寝室成为一个充满科研气氛的温暖的家。

在整个论文的完成过程中，得到了家人的理解和全力支持，向他们表示深深的感谢。

本课题得到了国家自然科学基金的资助。

最后，感谢所有关心过我的人。

中国科学技术大学 化学系 博士研究生

沈登科

2011年5月于科大东区

博士期间完成的工作

已发表的文章

Shen D, Xu X, Wu H, Peng L, Zhang Y, Song J, Su Q. Metal ion binding to anticoagulation factor II from the venom of *Agkistrodon acutus*: stabilization of the structure and regulation of the binding affinity to activated coagulation factor X. *J Biol Inorg Chem* 16(4), 523-537, 2011.

Shen D, Xu X, Zhang L, Wu H, Peng L. Identification of a nitric oxide-dependent hypotensive effect of anticoagulation factor II from the venom of *Agkistrodon acutus*. *Biochem Pharmacol* 79(3), 498-506, 2010.

Xu X, Shen D, Zhang L, Wu H. Sr^{2+} -induced stabilization and refolding of anticoagulation factor I from the venom of *Agkistrodon acutus*. *Journal of University of Science and Technology of China* 38(6), 706-710, 2008.

Wu H, Xu X, Shen D, Peng L, Song J, Zhang Y. Binding of Ca^{2+} and Zn^{2+} to factor IX/X-binding protein from venom of *Agkistrodon halys Pallas*: stabilization of the structure during GdnHCl-induced and thermally induced denaturation. *J Biol Inorg Chem*, 16(1), 69-79, 2011.

Wu H, Xu X, Zhang L, Shen D, Peng L, Zhang Y, Song J. Mg(II)-induced binding of factor IX-binding protein from the venom of *Agkistrodon Halys Pallas* with factor Xa. *Toxicon* 55(7), 1358-1364, 2010.

Zhang LY, Xu XL, Luo ZF, Wu H, Shen DK, Peng LL, Liu YZ. Small-molecule reductants inhibit multicatalytic activity of AA-NADase from *Agkistrodon acutus* venom by reducing the disulfide-bonds and Cu(II) of enzyme. *Biopolymers* 93(2), 141-149, 2010.

Xu X, Zhang L, Shen D, Wu H, Peng L, Li J. Effect of metal ion substitutions in anticoagulation factor I from the venom of *Agkistrodon acutus* on the binding of activated coagulation factor X and on structural stability. *J Biol Inorg Chem* 14(4), 559-571, 2009.

Zhang L, Xu X, Luo Z, Shen D, Wu H. Identification of an unusual AT(D)Pase-like activity in multifunctional NAD glycohydrolase from the venom of *Agkistrodon acutus*. *Biochimie* 91(2), 240-251, 2009.

Xu X, Zhang L, Shen D, Wu H, Liu Q. Oxygen-dependent oxidation of Fe(II) to Fe(III) and interaction of Fe(III) with bovine serum albumin, leading to a hysteretic effect on the fluorescence of bovine serum albumin. *J Fluoresc* 18(1), 193-201, 2008.

Xu X, Chen J, Zhang L, Wang S, Shen D, Liu Q. Calcium ion-induced stabilization and refolding of agkisacutacin from *Agkistrodon acutus* venom studied by fluorescent spectroscopy. *J Fluoresc* 17(2), 215-221, 2007.

待发表的文章

Shen D, Xu X, Peng L, Zhang Y, Song J, Guo M, Yan X, Su Q. Conformation-specific affinity purification of factor IX and factor X using native factor IX/factor X-binding proteins. (待投稿)

申请中国发明专利

一种高效提取纯化凝血因子IX和凝血因子X的方法, 发明人: 徐小龙、沈登科, 申请号 201110001483.3