

doi:10.3969/j.issn.1007-7162.2012.03.017

一种改良的纤维平板法

黄明星,叶 韵,谭竹钧,韩雅莉

(广东工业大学 轻工化工学院,广东 广州 510006)

摘要: 介绍一种改良的用以快速地定性和半定量检测纤溶活性蛋白的纤维平板法. 对该方法中的几个关键因素作了详细的研究和探讨. 纤维平板中纤维蛋白原和纤溶酶原的浓度对裂解面积不产生任何影响,但是纤维蛋白原的浓度会对裂解圈的观察产生影响,纤维蛋白原浓度低于 0.2 mg/mL 时会使背景色过淡而不能清晰地观察到裂解圈. 尿激酶浓度在 2 ~ 250 mU/ μ L 范围时,尿激酶浓度的对数和裂解圈相互垂直的两条直径乘积的对数之间存在明显的线性关系. 在本实验设计方案下,尿激酶的最佳使用浓度为 10 ~ 20 mU/ μ L. 同时,本文还探讨了纤维平板中纤溶酶原的去活条件,当琼脂纤维平板凝固后很难完全去活纤溶酶原,但是,在琼脂纤维蛋白原混合物凝固前于 95 $^{\circ}$ C 持续温浴 40 min,则能彻底去活纤维蛋白原中残留的纤溶酶原.

关键词: 纤维平板法;纤维蛋白原;纤溶酶原;尿激酶

中图分类号: Q67

文献标志码: A

文章编号: 1007-7162(2012)03-0087-05

An Improved Fiber Plate Method

Huang Ming-xing, Ye Yun, Tan Zhu-jun, Han Ya-li

(School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: It establishes an improved fiber plate method, which can be used for qualitative and semi-quantitative analysis. Several key factors were studied and discussed. The concentration of fibrinogen and plasminogen contained in the fibrin plate did not have any effect on the fibrinolytic area. However, the concentration of fibrinogen had influence on the observation and image gathering of fibrinolytic zones. It was difficult to clearly observe the fibrinolytic zones when the concentration of fibrinogen was below 0.2 mg/mL. The logarithm of the product of the two perpendicular diameters was linearly related to the logarithm of the concentration of urokinase when the concentration of urokinase was among 2 ~ 250 mU/ μ L. In the experiment, the optical concentration of urokinase was among 10 ~ 20 mU/ μ L. It is found that it is hard to denature plasmin by heating the agar-fibrin plate after the agar is solidified. However, the plasmin is completely denatured when heated at 95 $^{\circ}$ C for 40 minutes before the agar is solidified.

Key words: fibrin plate method; fibrinogen; plasminogen; urokinase

迄今为止,对纤溶活性蛋白(fibrinolytic protein)的检测主要有 4 种方法:纤维平板法(fibrin plate method)、显色底物法(colorimetric assay using chromogenic substrates)、反相纤维蛋白自显影法(reverse fibrin autography)和纤维蛋白酶谱法(fibrin zymography). 反相自显影法和纤维蛋白酶谱法则是两种较新的技术,主要用来对纤溶活性蛋白进行定性分析.

纤维平板法可以用来快速判断样品是否具有纤溶活性,同时,纤维平板法和显色底物法也可以用来对纤溶活性蛋白进行半定量分析. 与显色底物法相比,纤维平板法具有成本低、分辨率高和操作简单等优点,所以其在国内被广泛应用.

纤维平板法由 Permin^[1-3] 于 1947 建立,并在 1950 年的两篇论文中又进一步论述了此方法. 在

1952年, Astrup^[4]对纤维平板法进行了全面的分析和探讨,并给出了几个重要因素的最佳条件. 为了能够区分纤维蛋白溶解酶和它的激活物,就需要制备不含有纤维蛋白溶解酶原的纤维平板. Lassen^[5]发现当纤维平板凝结好后,将其适当加热,就能有效破坏掉纤维平板中纤维蛋白溶解酶原的活性. 1966年, Walton^[6]首次将琼脂糖(agarose)用来作为纤维平板的固定介质,从而增加了纤维平板的刚度,使其不容易破碎. 由于纤维平板上的裂解圈不容易被看清楚,一般要在透射光下才能比较清晰地看见,所以,对实验结果的拍照就相当困难. 同年, Barta^[7]发现,将纤维平板用常规的考马斯亮蓝染色法染色后,裂解圈就能够被清晰地显示出来. 因为裂解圈中的纤维蛋白已经变成了很小的碎片,其染色能力下降. 所以在深蓝色的背景下就能清晰地显示出淡蓝色的裂解圈. 之后对此技术的研究主要集中于对最优条件的分析. 1983年, Jespersen 和 Astrup^[8]对此技术进行了一次总结,对该方法的最优条件、可重复性和准确度做了全面的论述. 近年来,虽然对该方法进行单独的研究并不多见,但是在许多对纤维蛋白研究的文章中仍可以看到该方法的应用^[9-14].

虽然,前人已经对纤维平板法做了大量的研究,但是,这些研究都集中在20世纪70~90年代. 这些研究都有一个共同的特点,那就是纤维平板法中所需的几个重要的酶——纤维蛋白原(fibrinogen)、纤溶酶原(plasminogen)、凝血酶(thrombin)和尿激酶(urokinase)都由各自实验室自己制备,各自的制备方法和工艺存在很大的差别,所以,他们所得结果常常存在较大的差异. 近20年,随着科技的进步和各种生物公司的崛起,纤维蛋白原、凝血酶和尿激酶的制备工艺已经十分成熟,这些已经商业化的实验试剂的纯度也今非昔比,所以,前人的一些实验结果也不一定再适用. 本文对该技术的各个方面进行了全面的分析和研究,并建立了一套最优的实验方案.

1 材料和方法

1.1 材料

纤维蛋白原、凝血酶、纤溶酶原和尿激酶购自Sigma公司. 琼脂(agar)购自Biowest,其它试剂均为国产分析纯.

PBS: 50 mM NaH_2PO_4 + 0.15 M NaCl, 用1M的NaOH调pH到7.2, 高温灭菌后4℃储存. 纤维蛋白原: 用万分位分析天平称取100 mg, 溶解于10 mL

PBS溶液中, 浓度为10 mg/mL; 按0.5 mL每份进行分装, -80℃冻存. 凝血酶(1 000 U/支): 用10 mL PBS溶解, 浓度为100 U/mL; 按100 μL 每份进行分装, -80℃冻存. 尿激酶(830 U/支): 用2.075 mL PBS溶解, 浓度为400 U/mL; 按20 μL 每份进行分装, -80℃冻存. 纤溶酶原(10 U/支): 用1 mL PBS溶解, 浓度为10 U/mL; 按50 μL 每份进行分装, -80℃冻存.

1.2 纤维平板的制备和活性检测

用PBS配制1%的琼脂, 加热使其完全融化, 取15 mL于一个小烧杯中, 待冷却至40℃左右, 再加入10 μL 凝血酶和0.5 mL纤维蛋白原, 搅拌均匀后立即倒入直径9 cm的玻璃培养皿中. 待琼脂完全凝固后, 将培养皿放在一张印有1.5 cm $\times$ 1.5 cm小正方形矩阵的白纸上, 用直径为2 mm的玻璃小管在矩阵点上打上小孔, 打完孔后用10 μL 的移液枪小心将孔中的液体吸干. 在小孔中加入4 μL 待测样品后, 将纤维平板放入37℃培养箱培养18 h, 用考马斯亮蓝染色液染色(考马斯亮蓝R-250 0.25%, 冰醋酸5%, 甲醇4.5%) 15 min, 然后用洗脱液脱色至能看见清楚的裂解圈. 测量裂解圈相互垂直的两直径值.

1.3 纤溶酶原灭活

用PBS配制1%的琼脂, 加热使其完全融化, 取15 mL于一个小烧杯中, 立即加入0.5 mL纤维蛋白原, 搅拌均匀后用铝箔密封烧杯口, 放入50~95℃的烘箱中温浴10~120 min. 加热灭活后, 待其冷却至40℃左右, 再加入10 μL 凝血酶, 搅拌均匀后立即倒入直径9 cm的玻璃培养皿中. 用不加热灭活的纤维平板作为阳性对照, 来测量温度和时间梯度下的灭活情况.

2 结果

2.1 纤维蛋白浓度对实验结果的影响

为了检测纤维蛋白浓度对实验结果的影响, 制备了一系列不同纤维蛋白浓度(0.05~0.50 mg/mL)的纤维平板. 实验中发现纤维平板中纤维蛋白原的浓度不影响裂解圈的大小, 但是会影响裂解圈的清晰度. 因为裂解圈是通过纤维平板的深蓝色背景衬托出来的, 随着纤维蛋白原浓度的降低, 背景色逐渐变浅, 直到无法观察到裂解圈. 通过纤维蛋白浓度梯度测试, 能清晰显示裂解圈的最低纤维蛋白原浓度为0.15 mg/mL. 为了避免试剂的反复冻融, 在后面的实验中, 每次使用一只预分装的0.5 mL纤维蛋白原

(10 mg/mL),所以在纤维平板中纤维蛋白原的终浓度为0.333 mg/mL.

2.2 尿激酶最佳使用浓度检测

为了得到尿激酶浓度和裂解面积之间的关系,我们对尿激酶进行了一系列的稀释(表1).尿激酶母液(U_0)的浓度为400 mU/ μ L.将2 μ L U_0 和398 μ L PBS混合得到尿激酶稀释液a(U_a),其浓度为2 mU/ μ L.将2 μ L U_0 和18 μ L PBS混合得到尿激酶稀释液b(U_b),其浓度为40 mU/ μ L.表1中编号1~9是用尿激酶稀释液b(U_b)稀释得来,编号10~17是用尿激酶稀释液a(U_a)稀释得来,编号18~25是尿激酶稀释母液 U_0 稀释得来.

为了便于计算,用裂解圈相互垂直的两条直径的乘积来代替其面积,记为 a ;尿激酶浓度记为 c .尿激酶浓度在0.25~400 mU/ μ L范围时,尿激酶浓度的对数(log c)和裂解圈相互垂直的两条直径乘积的对数(log a)之间不存在明显的线性关系,进行5阶回归后回归曲线近似S型曲线(图1(a)).但是,当尿激酶浓度在2~250 mU/ μ L范围时,log a 与log c 则表现出明显的线性关系(图1(b)).尿激酶浓度在5~40 mU/ μ L范围时在纤维平板上的裂解情况如图2所示.

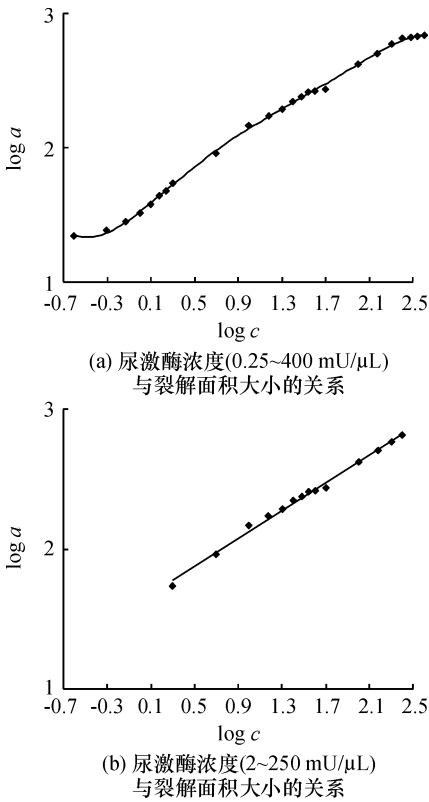
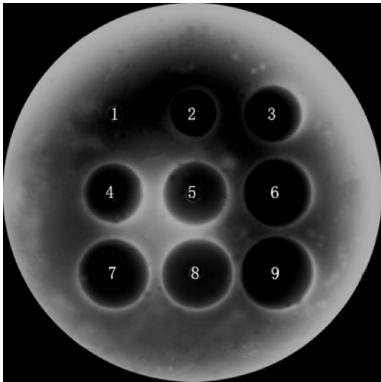


图1 尿激酶浓度与裂解面积大小的关系

Fig.1 The relationship between fibrinolytic area and concentration of urokinase



每个小孔加样量为4 μ L,37 $^{\circ}$ C培养18 h后,用考马斯亮蓝R-250染色液染色15 min后洗脱.1表示阴性对照PBS;2~9依次表示尿激酶浓度为5 mU/ μ L、10 mU/ μ L、15 mU/ μ L、20 mU/ μ L、25 mU/ μ L、30 mU/ μ L、35 mU/ μ L、40 mU/ μ L.

图2 尿激酶(5~40 mU/ μ L)在纤维平板上的裂解情况

Fig.2 The fibrinolytic zones by urokinase with concentration of 5~40 mU/ μ L

表1 尿激酶浓度稀释梯度

Tab.1 The gradient dilution of urokinase

编号	U_a 、 U_b 、 U_0 体积/ μ L	PBS 体积 / μ L	酶量 /mU	酶浓度/ (mU $\cdot$ μ L $^{-1}$)
1	0	4	0	0
2	0.5	3.5	1	0.25
3	1	3	2	0.5
4	1.5	2.5	3	0.75
5	2	2	4	1
6	2.5	1.5	5	1.25
7	3	1	6	1.5
8	3.5	0.5	7	1.75
9	4	0	8	2
10	0.5	3.5	20	5
11	1	3	40	10
12	1.5	2.5	60	15
13	2	2	80	20
14	2.5	1.5	100	25
15	3	1	120	30
16	3.5	0.5	140	35
17	4	0	160	40
18	0.5	3.5	200	50
19	1	3	400	100
20	1.5	2.5	600	150
21	2	2	800	200
22	2.5	1.5	1 000	250
23	3	1	1 200	300
24	3.5	0.5	1 400	350
25	4	0	1 600	400

2.3 纤维平板中纤溶酶原浓度对试验结果的影响

为了提高纤维平板法的精确度和可重复性,进

一步考察了纤维平板中纤溶酶原浓度对试验结果的影响. 在制作纤维平板时, 额外加入一定量的纤溶酶原, 共检测了 6 个纤溶酶原梯度, 每个纤溶酶原梯度下测试了 8 个尿激酶浓度, 结果如表 2 所示. 从表 2

可以看出, 纤维平板中纤溶酶原的浓度对试验结果几乎没有任何影响. 在同一尿激酶浓度下, 不同纤溶酶原浓度所产生的裂解圈面积只有较小的波动, 都是在可允许的误差范围内.

表 2 纤溶酶原浓度与裂解圈面积的关系
Tab. 2 The relationship between fibrinolytic area and concentration of plasminogen

纤溶酶原浓度 /(mU · mL ⁻¹)	尿激酶浓度/(U · mL ⁻¹)								
	0	5	10	15	20	25	30	35	40
0	0	91.0	146.3	172.8	191.5	222.3	238.9	257.5	262.6
2	0	91.3	146.2	172.9	191.8	222.1	238.7	257.6	262.4
4	0	91.5	146.6	172.6	191.9	221.9	238.5	257.8	262.1
6	0	90.9	146.4	173.1	192.0	222.0	238.9	257.4	262.5
8	0	91.3	146.4	172.8	191.7	222.1	239.1	257.4	262.1
10	0	91.2	146.2	172.9	191.7	222.3	238.7	257.9	262.4

2.4 纤维平板中纤溶酶原的去活

从前面的几个实验可以发现, 即使纤维平板中不加入纤溶酶原, 纤维平板也能用来检测纤溶酶激酶. 这样一来就使得纤维平板法无法分辨被检测物到底是属于纤溶酶还是纤溶酶激酶. 去除纤维蛋白原中的纤溶酶原最简单的方法就是加热法, 但是, 当纤维平板中的琼脂凝固后, 加热就很难使纤溶酶完全失活了. 相反, 当琼脂没有凝固时, 加热则能有效地让其中的纤溶酶完全失活. 用不加热的纤维平板做为阳性对照, 将这时的活性记为 100%, 然后用这一裂解面积去评价不同温度梯度和不同加热时间下纤溶酶失活的情况(图 3). 从图 3 可以看出, 在 95 ℃ 下只需要 40 min 就能将纤溶酶彻底去除, 但是当温度较低时, 即使加热时间非常长, 也不能完全去除纤溶酶.

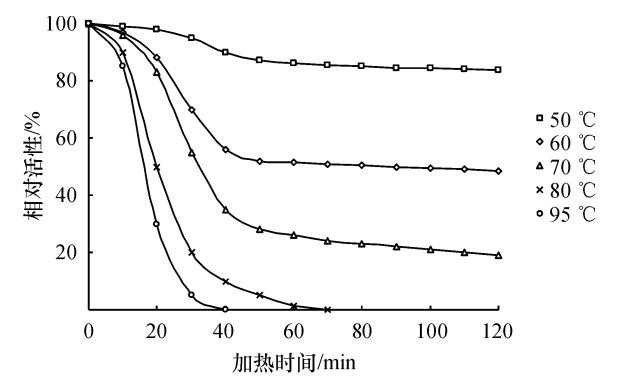


图 3 不同温度下纤溶酶原活性与加热时间的关系
Fig. 3 The relationship between activity of plasminogen and heated time under different temperature

3 讨论

在对纤维平板进行染色时, 应该注意下面几点.

1) 配制好的考马斯亮蓝染色液一定要用滤纸过滤, 否则容易使纤维平板产生杂斑. 2) 马斯亮蓝染色液最好不要重复使用, 因为琼脂纤维凝胶的韧性远不如聚丙烯酰胺凝胶, 在染色过程中容易有小块凝胶脱落. 3) 染色时间对裂解斑的显示也非常重要, 如果时间过短, 背景色会很淡; 若时间过长, 则后续的脱色就需要更长的时间. 最后, 发现含甲醇的脱色液脱色效果比含乙醇的脱色液效果好, 含乙醇的脱色液会使裂解斑的边缘模糊.

很多研究者在使用纤维平板法时会加入额外的纤溶酶原, 这是不必要的. 迄今为止没有任何一种方法可以得到不含纤溶酶原的纤维蛋白. 这一点很早就有人证实过, 通过本文的实验也同样能证实这一点. 所以, 在用纤维平板法检测纤溶活性蛋白时, 一定要做纤维平板灭活对照, 以确定所检测的物质是属于纤溶酶还是其激活物. Lassen^[5]是对凝固的纤维平板进行加热来灭活纤溶酶, 这一方法的效率不是很高, 也不能彻底灭活纤维蛋白中残留的纤溶酶. 凝固后的琼脂纤维平板即使再加热到 95 ℃, 其还是固体状态; 而未凝固的琼脂纤维蛋白混合物在 95 ℃ 温浴时会一直保持液体状态. 为什么后者能使纤溶酶有效地失活呢? 笔者推测水分子在酶失活过程中具有一定的作用, 因为在琼脂凝固后, 水分子在一定程度上被固定. 这一点能被其它事实所佐证, 比如酶制剂常常以高浓度保存, 因为低浓度的酶溶液很容易导致酶失活; 而冷冻干燥为粉末的酶能保存更长的时间.

在检测最佳尿激酶使用量时发现, 在很宽的浓度范围内, 尿激酶浓度的对数 (log c) 和裂解圈相互垂直的两条直径乘积的对数 (log a) 之间不存在明

显的线性关系,进行5阶回归后回归曲线近似S型曲线(图1(a)).当尿激酶浓度很低时,其所产生的裂解圈很小,那么中心小孔的2 mm直径相对于裂解圈的直径就不是一个可以忽略的值了,所以,这时所得的结果比实际偏大.当尿激酶浓度很高时,由于琼脂凝胶中所含的纤溶酶原有限,所以,随着尿激酶的增加,纤溶酶原就可能被完全消耗殆尽,这时所得结果比实际偏小.

参考文献:

- [1] Permin P M. Properties of the fibrinokinase-fibrinolysin system[J]. *Nature (Lond)*, 1947(160): 571-572.
- [2] Permin P M. The fibrinolytic activator in animal tissue[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1950(21): 159-167.
- [3] Permin P M. 2 simple methods of determining fibrinolytic enzymes[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1950(20): 388-393.
- [4] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952(40): 346-351.
- [5] Lassen M. Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1953(27): 371-376.
- [6] Walton P L. An improved fibrin plate method for assay of plasminogen activators[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1966(13): 680-684.
- [7] Barta G. Dyed fibrin plate assay of fibrinolysis[J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1966(44): 233-240.
- [8] Jespersen J, Astrup T. A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents-optimal conditions, reproducibility and precision[J]. *Haemostasis*, 1983(13): 301-315.
- [9] Fossum S, Hoem N O. Urokinase and non-urokinase fibrinolytic activity in protease-inhibitor-deprived plasma, assayed by a fibrin micro-plate method [J]. *Immunopharmacology*, 1996(32): 119-121.
- [10] Zhao M, Pan Y, Wang Y, et al. Establishment of a sensitive method, thin polyacrylamide fibrin plate assay for detection of fibrinolysis activity in vitro[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2005(40): 302-304.
- [11] Kim S-R, Sim J-S, Ajjappala H, et al. Expression and large-scale production of the biochemically active human tissue-plasminogen activator in hairy roots of oriental melon (*cucumis melo*) [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012(113): 106-111.
- [12] Park J, Yoon S, Kim S, et al. Characterization and fibrinolytic activity of acetobacter sp. FP1 isolated from fermented pine needle extract [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012(22): 215-219.
- [13] Simkhada J R, Cho S S, Mander P, et al. Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel streptomyces enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model [J]. *Thrombosis Research*, 2012(129): 176-182.
- [14] Uesugi Y, Kawata H, Saito Y, et al. Ultrasound-responsive thrombus treatment with zinc-stabilized gelatin nano-complexes of tissue-type plasminogen activator [J]. *Journal of Drug Targeting*, 2012(20): 224-234.