

# 尖吻蝮蛇毒抗凝血因子(ACF)含量和 钙离子含量的定量测定及钙离子 结合位点的初步研究

刘清亮 徐晓龙 余华明 王 淳\*

(中国科技大学应用化学系, 合肥 230026)

由紫外光谱法测定蛋白质浓度, 用 ICP 测定 Ca 含量, 从而确定一个 ACF 分子中含一个钙离子。ACF 中分子中除一个高亲和性钙结合位点外, 至少还有一个低亲和性钙结合位点, 只有当过量钙离子存在时, 才可能在低亲和性钙结合位点上进一步结合钙离子。Tb<sup>3+</sup>具有比 Ca<sup>2+</sup>离子更强的键合 ACF 能力, 能定量结合在 ACF 中的两个位点上, 且能全部取代 ACF 中 Ca<sup>2+</sup>。文中提及的金属离子对 ACF 的抗凝血活性没有显著的影响。

关键词: 抗凝血因子 钙 铽 荧光

从皖南尖吻蝮蛇毒中分离出的抗凝血因子 (ACF, anticoagulation factor) 具有显著的抗凝血活性, ACF 分子量为 23400, 对 ACF 的深入研究有着重要的医学价值。ACF 的分离纯化、结构和性质方面研究已见报道<sup>(1,2,3)</sup>。

定氮法一直作为蛋白质量的标准方法, 我们通过元素分析仪测定 ACF 总氮含量定量地得到蛋白质浓度。

Tb<sup>3+</sup>在 ACF 结构研究中是一个很好的荧光探针, ACF 与 Tb<sup>3+</sup>结合后, Trp 残基与 Tb<sup>3+</sup>之间发生分子内能量转移, 导致 Tb<sup>3+</sup>在 488、545、580 和 620nm 处的 4 个特征荧光发射。我们利用 Tb<sup>3+</sup>作为荧光探针研究 ACF 中钙离子结合位点的性质。

## 实验方法

一. ACF 分离纯化: ACF 的分离按文献<sup>(1)</sup>方法进行。为了进一步提高纯度, 我们将得到的样品再经 DEAE-Sephadex A-50 (2.8 × 35cm) 离子交换梯度分离, 产品达到聚丙烯酰胺凝胶电泳均一纯。

二. ACF 含氮量测定: ACF 纯品用去离子水在 5℃ 下透析 4 天, 浓缩后冷冻抽干。取 2mg 左右 ACF 干粉用元素分析仪测定 N 含量。

三. ACF 紫外吸收标准曲线: 将与元素分析仪同样处理的 ACF 干粉, 用 0.02mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH = 7.6) 配制成浓度为 0.1mg · mL<sup>-1</sup>—0.8mg · mL<sup>-1</sup> 的一系列溶液, 由紫外分光光度计检测 280nm 和 260nm 处的吸收值, 以 0.02mol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl 作为参比液, 仪器用

本文于 1991 年 8 月 31 日收到。

国家自然科学基金资助项目。

\* 中国科技大学生物系。

标准牛血清蛋白水溶液校准。

四. ACF、游离钙存在条件下 ACF 及  $Tb^{3+}$  结合 ACF 中钙含量测定: 将 ACF 水溶液(含  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH=7.6)对大量的  $8.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $Ca^{2+}$  溶液(含  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH=7.6)透析, 每隔一天从透析袋内取出一部分, 检测其钙含量, 直到钙含量不再增加为止。另外将 ACF 和  $Tb^{3+}$  混合溶液(含  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH=7.6, [ACF]: [ $Tb^{3+}$ ]=1: 50) 放置二天, 将 ACF 溶液、ACF 与  $Tb^{3+}$  混合液分别对  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH=7.6) 缓冲溶液透析四天, 以上处理过程在  $5^\circ\text{C}$  下进行, 蛋白质浓度用  $280\text{nm}$ – $260\text{nm}$  紫外吸收确定。用等离子体原子发射光谱检测钙含量, 分别以各自的透析缓冲溶液作为空白。

五. ACF 和  $Tb^{3+}$  荧光滴定: 在  $5^\circ\text{C}$  下将一定量 ACF 及一定量  $Tb^{3+}$  混合放置二天后, 测定荧光光谱, 液池光径  $1\text{cm}$ , 激发和发射狭缝均为  $5\text{nm}$ 。用  $Tb^{3+}$  滴定 ACF 时, ACF 的浓度为  $2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 改变  $Tb^{3+}$  的浓度; 用 ACF 滴定  $Tb^{3+}$  时,  $Tb^{3+}$  的浓度为  $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 改变 ACF 的浓度。以上溶液均含有  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, 并以  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 溶液作为空白,  $Tb^{3+}$  浓度用标准浓度的 EDTA 溶液校准。

六. 抗凝血活性测定: 参考 Quick<sup>[4]</sup> 和 Cheng<sup>[5]</sup> 方法, 测定血浆凝血酶原时间 (PPT)。将  $0.1\text{mL}$  兔血浆、 $0.1\text{mL}$  ACF ( $0.5\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和  $0.1\text{mL}$  凝血活酶 ( $25\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 混合后, 再加入  $0.1\text{mL}$   $CaCl_2$  ( $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 后, 立即计时, 反应在  $37^\circ\text{C}$  水浴中进行。

七. 主要仪器及试剂: LKB 层析系统; LABconco 7502 真空冷冻干燥机; 2400CHN 元素分析仪; PLASM-100 等离子体原子发射光谱仪; 850 型荧光分光光度计; UV-240 双光束紫外分光光度计。DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-75 为 Pharmacia 公司 (瑞典) 产品。皖南兴吻蛇粗毒干粉为安徽祁门产。Tris 为西德产品 (CP)。凝血活酶为天津血液研究所产。兔血浆自制。  $Tb_4O_7$ 、 $Eu_2O_3$ 、 $Nd_2O_3$  纯度均为 99.9%。浓盐酸为 GR, 其他试剂均为国产分析纯。

## 结果与讨论

### 一. ACF 的定量公式

元素分析仪测定 ACF 中 C、H、N 含量分别为 45.93%、7.40% 和 13.89%。

每一种蛋白质都有其恒定的含氮量, 大约在 14–18%, 平均为 16%<sup>[6]</sup>, 所以样品的含氮量乘以系数 6.25, 便得到样品所含蛋白质质量。

ACF 蛋白质含量:  $13.89\% \times 6.25 = 86.8\%$

ACF 为糖蛋白<sup>[1]</sup>, 含糖量为 7.9%, 因此 ACF 纯度为:  $86.8\% / (1-7.9\%) = 94.2\%$

ACF 在  $280\text{nm}$  和  $260\text{nm}$  处的吸光度(A)与其浓度关系曲线如图 1 所示, ACF 浓度为 ACF 样品重量乘以 ACF 含量 93.9% 后所得的数值。ACF 在  $280\text{nm}$  和  $260\text{nm}$  处均有较强的吸收, 其  $280\text{nm}$  处吸光度与浓度比值为:

$$A_{280} / [\text{ACF}] = 2.67 (\text{mL} \cdot \text{mg}^{-1})$$

由于不同蛋白质中色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的含量不同, 所处的微环境也不同, 因此不同蛋白质溶液在  $280\text{nm}$  的吸光度也有差别。据初步统计<sup>[7]</sup>, 浓度为  $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液的 1800 种蛋白质及蛋白质亚基在  $280\text{nm}$  的吸光度在 0.3–3.0 之间, 通常以浓度为  $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  蛋白质溶液的  $A_{280}$  为 1.0 作为标准, 得出下述经验关系式:

$$\text{蛋白质浓度}(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

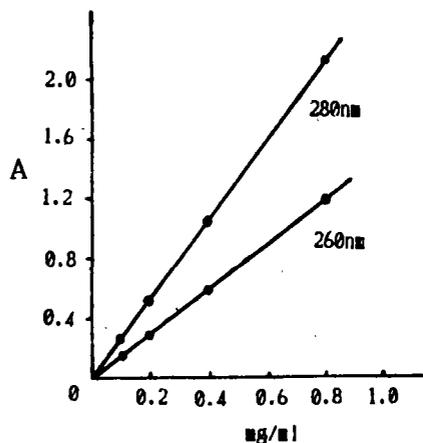


图1 ACF 在 280 和 260nm 处的吸光度与浓度的关系

Fig.1 Relations of the absorbance of ACF at 280 and 260nm to the content of ACF

用图 1 中数据代入上述经验公式, 结果将产生 170% 的正误差, 因此, 对于 ACF, 上述经验公式应乘以  $\frac{1}{2.67}$  的修正系数:

$$[\text{ACF}] (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{1}{2.67} (1.45A_{280} - 0.74A_{260})$$

本文的 ACF 浓度均由修正后的公式计算。

## 二. 游离 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下 ACF 荧光光谱

ACF 中色氨酸残基 (Trp) 是很强内源荧光发色团, 最大激发和最大发射波长分别在 282nm 和 333nm。在 ACF 纯品中加入过量游离  $\text{Ca}^{2+}$ , ACF 荧光强度增加 17%, 峰位蓝移 1nm (见图 2)。而  $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Nd}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$  对 ACF 内源荧光都有猝灭作用(这部分内容另作报道), 说明  $\text{Ca}^{2+}$  对 ACF 的空间结构有独特的作用。我们推测, ACF 在游离  $\text{Ca}^{2+}$  存在下, 还可以进一步与  $\text{Ca}^{2+}$  结合, 使 Trp 残基所在的微区构象发生变化, 导致 Trp 残基进一步进入疏水环境, 增大了 Trp 残基荧光发射量子产率。ACF 中除一个高亲和性钙结合位点外, 还有低亲和性钙结合位点。

图2 ACF 荧光发射光谱

Fig.2 Fluorescence emission spectra of ACF

Excitation wavelength is set at 282nm,

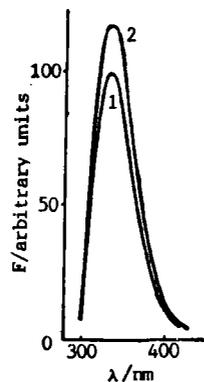
$[\text{ACF}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

1. in  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl buffer (pH = 7.6)

2. in  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl buffer with

$4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$

F = fluorescence intensity



### 三. ACF、游离 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下 ACF 及 $\text{Tb}^{3+}$ 结合 ACF 中钙含量测定

等离子体原子发射光谱(ICP)光源稳定性好,基体效应与第三元素干扰小,工作曲线动态线性范围广,可获得较高准确度。ICP 测定的结果列于表 1。

表 1 ACF、游离钙存在下 ACF 及  $\text{Tb}^{3+}$ -ACF 中钙含量

Table 1 Contents of Calcium of ACF,  $\text{Tb}^{3+}$ -ACF and ACF in Existence of Free  $\text{Ca}^{2+}$

sample	[ACF]( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	[ $\text{Ca}^{2+}$ ]( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	[ $\text{Ca}^{2+}$ ]/[ACF]
ACF	$13.8 \times 10^{-6}$	$14.75 \times 10^{-6}$	1.07
ACF+ $\text{Ca}^{2+}$	$29.5 \times 10^{-6}$	$56.5 \times 10^{-6}$	1.92
ACF+ $\text{Tb}^{3+}$	$16.3 \times 10^{-6}$	$0.98 \times 10^{-6}$	0.06

当透析达到平衡时,透析袋内游离钙离子浓度与透析袋外游离钙离子浓度相等,因此透析袋内钙离子含量减去透析袋外钙离子含量,得到的差值为透析袋内 ACF 中钙离子含量。表 1 中钙浓度为减去透析袋外透析缓冲溶液的钙离子含量后的差值。从表 1 中看出,不加游离钙离子时,每个 ACF 分子中含有一个钙离子。在  $8.01 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Ca}^{2+}$  离子存在下(此为透析袋外透析缓冲溶液中钙浓度,由 ICP 检测出,比透析前的钙浓度有所降低),一个 ACF 分子中近似含两个钙离子,进一步证实了从荧光光谱中得出的 ACF 分子中除一个高亲和性钙结合位点外,还有低亲和性结合位点的推测。ACF 中钙被  $\text{Tb}^{3+}$  取代后,钙含量接近零,表明  $\text{Tb}^{3+}$  能全部取代 ACF 中钙,且  $\text{Tb}^{3+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  有共同结合位点。

### 四. ACF 和 $\text{Tb}^{3+}$ 荧光滴定曲线

当 ACF 与  $\text{Tb}^{3+}$  结合后,由于分子内能量转移导致 Trp 残基荧光发射强度显著减弱,同时产生  $\text{Tb}^{3+}$  的特征荧光发射。为了搞清  $\text{Tb}^{3+}$  在 ACF 中结合位点情况,我们做了  $\text{Tb}^{3+}$  和 ACF 的荧光滴定曲线(见图 3)。

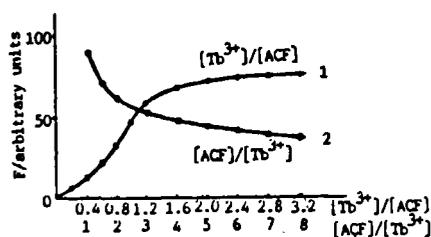


图 3  $\text{Tb}^{3+}$  与 ACF 荧光滴定曲线

Fig.3 Fluorescence titrations of ACF and  $\text{Tb}^{3+}$

Excitation wavelength and emission wavelength are set at 282nm and 545nm respectively, in  $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl buffer (pH = 7.6).

Curve 1: Fluorescence titrations of ACF with  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $[\text{ACF}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

Curve 2: Fluorescence titrations of  $\text{Tb}^{3+}$  with ACF,  $[\text{Tb}^{3+}] = 2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

曲线 1 是  $\text{Tb}^{3+}$  滴定 ACF 曲线,即 ACF 的浓度是恒定的,改变  $\text{Tb}^{3+}$  的浓度,545nm 处发射峰是  $\text{Tb}^{3+}$  的特征荧光发射峰,游离的  $\text{Tb}^{3+}$  在 282nm 激发光照射下,不存在此峰,当  $\text{Tb}^{3+}$  与 ACF 结合后,由于分子内能量转移,在 282nm 激发光照射下才有此发射峰。曲线 1 表明,1 摩尔 ACF 大致与 2 摩尔  $\text{Tb}^{3+}$  结合,且曲线 1 在  $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{ACF}] < 0.8$  范围内上升较

慢, 在  $0.8 < [Tb^{3+}] / [ACF] < 1.6$  范围内上升较快, 说明  $Tb^{3+}$  在 ACF 可能有两个结合位点且这两个结合位点对  $Tb^{3+}$  的亲合性不一样。  $Tb^{3+}$  首先结合在高亲和性结合位点上, 从曲线 1 开始时上升较慢可知, 高亲和性结合位点上  $Tb^{3+}$  与 Trp 残基之间的分子内能量转移效率较低。结合在低亲和性结合位点上  $Tb^{3+}$  与 Trp 残基之间的分子内能量转移效率较高。

曲线 2 是 ACF 滴定  $Tb^{3+}$  的曲线, 即  $Tb^{3+}$  浓度是恒定的, 改变 ACF 的浓度。曲线 2 表明在  $Tb^{3+}$  的浓度是恒定的条件下, 随着 ACF 浓度增大  $Tb^{3+}$  在 545nm 处的荧光发射强度逐渐减弱。这也说明  $Tb^{3+}$  在 ACF 中两结合位点的亲合性不一样, 且 Trp 残基与高亲和性结合位点上  $Tb^{3+}$  之间分子内能量转移效率较低。在  $Tb^{3+}$  浓度为定值条件下, ACF 浓度较低时, 高亲和性结合位点和低亲和性结合位点上都结合上  $Tb^{3+}$ , 当 ACF 浓度增大时, 低亲和性结合位点上  $Tb^{3+}$  可以解离下来, 再结合在新增加的 ACF 中高亲和性结合位点上, 这样高亲和性结合位点上  $Tb^{3+}$  含量随 ACF 浓度增大而增大, 从曲线 2 呈下降趋势可知, 高亲和性结合位点上  $Tb^{3+}$  与 Trp 残基之间的分子内能量转移效率较低。由此可以得出, 高亲和性结合位点与 Trp 残基间距离较远, 而低亲和性结合位点与 Trp 残基间距离较近。

### 五. 金属离子对 ACF 抗凝血活性影响

为测定金属离子对 ACF 抗凝血活性的影响, 首先将 ACF 溶解在生理盐水中, 再分别与不同金属离子混合, 在 5℃ 下放置 2 天, 测定血浆凝血酶原时间 (PPT), 分别以生理盐水和含有金属离子的生理盐水作为各自的空白。

从表 2 中看出,  $Tb^{3+}$ 、 $Nd^{3+}$ 、 $Eu^{3+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  均对 ACF 的抗凝血活性影响较小。

表 2 金属离子对 ACF 抗凝血活性影响

Table 2 Effect of Metal Ions on the Anticoagulant Activity of ACF

sample	PPT(%)	blank
ACF	100	0
ACF+ $Tb^{3+}$	97	0
ACF+ $Eu^{3+}$	93	0
ACF+ $Nd^{3+}$	96	0
ACF+ $Cu^{2+}$	87	0
ACF+ $Mn^{2+}$	90	0
ACF+ $Cd^{2+}$	83	0
ACF+ $Co^{2+}$	92	0
ACF+ $Zn^{2+}$	73	0

$$[M^{n+}] / [ACF] = 20$$

从上述实验结果中可知, 一个 ACF 分子中至少有两个钙离子结合位点, 结合在高亲和性钙结合位点上钙比较稳定, 只有当过量的钙离子存在时才有可能在低亲和性钙结合位点上进一步结合钙离子。  $Tb^{3+}$  能定量地结合在 ACF 的两个位点上, 且能全部取代 ACF 中  $Ca^{2+}$ 。文中提及的金属离子对 ACF 的抗凝血活性没有显著的影响。

## 参 考 文 献

- [1] Lu, Y. et al., *Animal Venoms and Hemostasis*, Pirkle, D.(ed.)(1987).  
[2] 王 芳等, *生物化学与生物物理学报*, 20 (6), 631 (1988).  
[3] 沈 慧, 硕士论文, 中国科学技术大学 (1989) .  
[4] Quick A.T., *J. Am. Med. Ass.*, 110, 1658(1938).  
[5] Cheng, U.C. et al., *Toxicon* 4, 235(1967).  
[6] Kjeldahl, J., *Z. Anal. Chem.*, 22, 366(1883).  
[7] 鲁子贤, *蛋白质和酶学研究方法*, 第一册, 科学出版社, 北京, 第 1 页(1989).

DETERMINATION OF THE CONTENTS  
OF THE  $\text{Ca}^{2+}$  ION IN ACF AND THE  
STUDY OF  $\text{Ca}^{2+}$ -BINDING SITES

Liu Qingliang   Xu Xiaolong   Yu Huaming   Wang Chun

(*Department of Applied Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026*)

The corrective coefficient of the equation on determination of the concentration of ACF by UV spectral (280nm–260nm) has been introduced. Our studies show that each ACF molecule contains one of  $\text{Ca}^{2+}$  ion, and has two  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites at least (stronger one and weaker others).  $\text{Ca}^{2+}$  ion can bind to the weaker site in ACF only in the condition of existence of excessive  $\text{Ca}^{2+}$  ion.  $\text{Tb}^{3+}$  ion is coordinated with ACF more strongly than  $\text{Ca}^{2+}$  ion, while  $\text{Tb}^{3+}$  ion can bind to ACF at both two sites quantitatively and replace of  $\text{Ca}^{2+}$  ion in ACF completely. All the metal ions mentioned in this paper do not give intensive effect on the anticoagulation activity of ACF.

**Keywords:** anticoagulation factor   calcium   terbium   fluorescence