

异硫氰酸荧光素标记尿激酶的制备与性能研究

张雅娟¹, 俞洁¹, 张冬未¹, 梁洪泽¹, 梁明明², 赵玲玲^{1*}

(1. 宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211; 2. 马鞍山市人民医院, 安徽 马鞍山 243000)

摘要: 用异硫氰酸荧光素(FITC)对溶栓蛋白药物尿激酶(uPA)进行了荧光标记, 制备了荧光素标记的尿激酶(FITC-uPA), 经核磁谱及红外谱表征证实了反应能有效进行, 其荧光素/蛋白值(F/P)值为 0.45。尿激酶经荧光素标记后, 具有良好的荧光性质, 其荧光检测下限低达 $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在 $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 荧光强度与溶液浓度具有很好的线性关系, 可用于微/痕量蛋白质的定量/定性检测和跟踪标记。荧光素标记后的尿激酶, 其流体力学直径与未标记的尿激酶基本一致, 其体外溶栓能力也与未标记的尿激酶相当, 说明 FITC 标记基本不影响尿激酶的生物活性, 是一种简单、有效的溶栓药物标记方法。

关键词: 异硫氰酸荧光素; 荧光标记; 尿激酶; 溶栓

中图分类号: TQ937

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 03-0078-05

尿激酶是我国最常用的溶栓药物, 以其有效的溶栓作用和可接受的价格为广大脑卒中患者所接受。尿激酶是从健康人尿中分离或从人肾组织中培养获得的一种蛋白酶, 能催化裂解纤溶酶原成为纤溶酶, 纤溶酶能降解纤维蛋白凝块, 以及血液循环中的纤维蛋白原、凝血因子 V 和凝血因子 VIII 等, 从而发挥溶栓作用。然而尿激酶的半衰期仅有 8~15 min, 且没有血栓靶向特异性, 溶栓的同时也增加了机体出血的风险。另外, 渗透到血管外的药物还可以参与血脑屏障破坏、水肿形成等反应过程, 加重神经系统损伤^[1]。目前, 研究者们为解决溶栓药物的弊端问题大多采取的策略主要包括药物的 PEG 化^[2-3]、构筑药物释放体系^[4-9]和结合纤维蛋白特定抗体^[10-12]。在这些方法策略中, 需要定量检测尿激酶等溶栓药物的体外释放行为, 以及溶栓药物体系的离体/体内血栓的靶向性、溶栓有效性、血栓渗透性、组织安全性等。由于尿激酶等溶栓药物是纤溶酶原激活剂, 在紫外可见光区没有强的特征吸收峰, 不能采用常规的紫外、荧光等方法进行定量/定性检测, 也不能进行体内的检测跟踪。

文献报道尿激酶等溶栓药物大多数使用高效液相色谱(HPLC)和酶联免疫试剂盒(ELISA)进行定量检测分析^[3,13], 但是 HPLC 需要专用的蛋白质分离色谱柱, 其价格都非常昂贵; ELISA 价格昂贵, 步骤冗长繁琐, 对操作人员要求较高, 且受人为和环境影响比较大。因此, 发展一种简单的、常规的尿激酶检测方法十分必要。

荧光素是一类具有光致荧光特性的染料, 由于其较高的摩尔吸收率和量子产率、良好的水溶性等特性, 在蛋白-蛋白相互作用、试样分析、DNA 标签、基因表达和分析检测等生物分析领域具有广泛的应用^[14-18]。目前, 常用于生物标记的荧光素有异硫氰酸荧光素(FITC)、四乙基罗丹明(RB200)、四甲基乙硫氰酸罗丹明(TRITC)、酶作用后产生荧光的物质如 4-甲基伞酮- β -D 半乳糖苷和铜系螯合物等^[18-21]。其中, FITC 呈明亮的黄绿色荧光, 是目前应用最广泛的荧光素, 其最大吸收光波长为 490~495 nm, 最大发射光波长为 520~530 nm, 具有较高的稳定性和蛋白质结合力, 常用于胰岛素、牛血清白蛋白(BSA)和抗体等的标记。笔者使用 FITC 对

收稿日期: 2014-12-9.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(51403108); 浙江省自然科学基金(LQ13B040001); 北京分子科学国家实验室开放基金; 宁波市自然科学基金(2013A610091); 宁波大学学科基金项目(XYL14013, XKZSC05); 宁波大学王宽诚幸福基金。

第一作者: 张雅娟(1989-), 女, 河北唐山人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 生物医用材料。E-mail: zyjsimple@163.com

*通信作者: 赵玲玲(1986-), 女, 湖南怀化人, 讲师, 主要研究方向: 生物医用材料。E-mail: zhaolingling@nbu.edu.cn

尿激酶进行荧光标记,能够很方便地利用凝胶色谱进行分离纯化,其荧光强度与蛋白浓度在一定范围内呈线性关系,可用于蛋白的荧光定量检测。且相对于纯尿激酶而言,FITC 标记尿激酶(FITC-uPA)具有相当的酶活性和体外溶栓能力,为研究者们针对溶栓药物的弊端问题进行的各类研究提供了极大的方便。

1 实验部分

1.1 原料

尿激酶(uPA),丽珠医药集团股份有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC),Sigma-Aldrich, St. Louis, US; 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和甲醇购于国药集团化学试剂有限公司,AR; 氯化铵购于宁波市化学试剂公司,AR。

1.2 FITC 标记尿激酶(FITC-uPA)的合成

FITC 标记尿激酶合成参考文献[14] FITC 血清白蛋白的合成方法。称取 100 mg uPA 置于 25 mL 单口瓶中,加入 10 mL PBS(0.01 mol·L⁻¹, pH 8.0)配成 10 mg·mL⁻¹ 溶液。将单口瓶放到 4 °C 冰水混合浴中避光搅拌,滴加 0.75 mL FITC 甲醇溶液(1 mg·mL⁻¹),反应 8 h 后,加入氯化铵(终浓度 50 mmol·L⁻¹)终止反应,继续搅拌 2 h 后,混合物通过凝胶渗透色谱柱分离,将所得到的溶液冷冻干燥得到最终产物,保存于 -20 °C 待用。

1.3 产物的结构表征及性能测试

1.3.1 核磁共振分析(NMR)

称取约 10 mg 待测样品溶于氘代试剂中,采用 Bruker AMX 400MHz 核磁共振谱仪采集。

1.3.2 红外光谱(FT-IR)分析

将冷冻干燥样品与溴化钾混合研成粉末,压片,用 Bruker Equinox 55 FT-IR 红外光谱仪分析。

1.3.3 粒径测试

采用 Brookhaven Zeta plus analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, US)进行粒径及粒径分布测试,所有样品在测试前均用 PVDF 材质的微孔滤膜过滤,孔径 0.8 μm。

1.3.4 分子荧光光谱分析

配置不同浓度的 FITC-uPA PBS 溶液,用 Cary Eclipse 荧光光谱仪(Varian, US)采集溶液的荧光发射光谱。激发波长为 495 nm,发射波长范围为 505~

600 nm,扫描速率 2 400 nm·min⁻¹,狭缝宽度为 5.0 nm,记录 520 nm 处的发射光强度 I₅₂₀,以 I₅₂₀ 对 FITC-uPA 样品浓度作图。

1.3.5 计算 FITC-uPA 中 FITC 与 uPA 的摩尔比 F/P

配制 1.0 mg·mL⁻¹ uPA/PBS 蛋白溶液,用 UV-7504 紫外可见分光光度计测其在 280 nm 处的吸光系数 E^{%0.1}; 配制 1.0 mg·mL⁻¹ FITC-uPA/PBS 样品溶液,分别测其在 280 nm 和 495 nm 处的吸光系数 A₂₈₀ 和 A₄₉₅,依照相关公式计算 FITC 与 uPA 的摩尔比 F/P^[14]。

$$C = (M_w \times E^{ \% 0.1 }) / (389 \times 195),$$

$$F / P = A_{495} \times C / (A_{280} - 0.35 A_{495}),$$

其中, M_w 为蛋白质 uPA 的分子量。

1.3.6 体外溶栓实验

血栓的制备:标本供应者均为年龄在 40~60 岁的非血液病患者,入院前没有使用任何抗凝、抗血小板或者溶栓药物等。入院后,肘前静脉抽取 4 mL 左右静脉血,放入无抗凝剂红色真空管中,室温下将标本静止放置 3 h 使其自然形成血栓,血栓成分分离待用。从血液离体到形成血栓后开始溶栓的时间为 5 h 左右。每条血栓成长条圆柱状,长约 3 cm,滤纸将表面水分吸干,小刀尽量均分成 4 等份,用精确度 1 mg 的分析天平称重每份并记录其值标记为 M₁,各组血栓间的干湿程度尽量一致。

实验步骤:将每份标本处理完后等分成 6 块血栓,分别放入 6 只 5 mL 离心管中,将离心管下端固定在有机玻璃孔板上,分为 PBS 溶液组、uPA+PBS 溶液、FITC-uPA+PBS 溶液组。分别向每只离心管中加入 1 mL 的溶液,确保每只离心管内的尿激酶当量为 3 mg,放入 37 °C 水浴缸中 2 h。取出血栓,再次用滤纸吸干表面的水分,用分析天平称重。标记为 M₂。干预后的失重标记为 M₃, M₃ = M₁ - M₂,溶栓率 = M₃ / M₁ × 100%。

2 结果与讨论

2.1 FITC 标记尿激酶(FITC-uPA)的合成

FITC 标记尿激酶(FITC-uPA)是利用 FITC 上的异硫氰酸基与尿激酶的自由氨基反应,将荧光素连接到蛋白质分子上,其反应如图 1 所示。¹HNMR 谱上化学位移 4.9 附近羟基质子峰,以及 3.2~3.7 处-NH-上质子峰的出现说明反应的发生^[16](图 2),

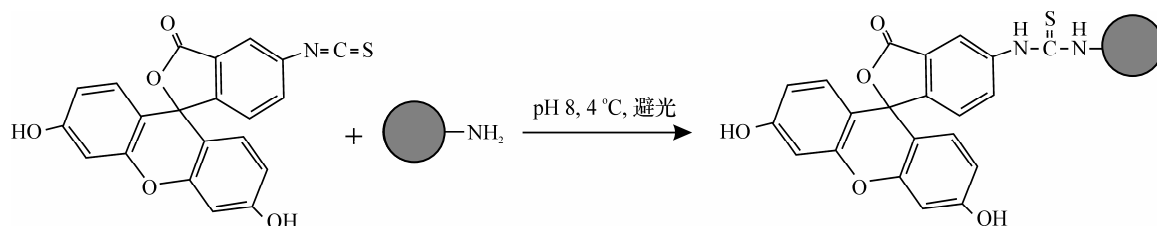


图1 FITC标记尿激酶的反应

如图3所示, 红外光谱上 1030 cm^{-1} 处归属于 FITC 上 C=S 伸缩振动峰的出现也说明 FITC 成功连接到尿激酶上^[18]. 经计算, FITC-uPA 的 F/P 值为 0.45, 激光粒度仪测得其流体力学直径为 7 nm 左右, 与未经 FITC 标记的尿激酶粒径基本一致(图4), 这也从侧面说明了 FITC 标记后对尿激酶的空间结构没

有太大影响, 对于保持尿激酶活性具有积极意义.

2.2 FITC-uPA 的荧光性质

FITC 标记赋予了尿激酶良好的荧光性质, 激发波长为 495 nm 时, 其最大发射波长在 520 nm 左右, 与 FITC 的荧光光谱性质基本一致. 当 FITC-uPA 的质量浓度低至 $10^{-6}\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 在所设测试条件下, 其荧光发射光谱图仍然很平滑, 最大荧光强度为 16.8(图5), 说明 FITC-uPA 具有良好的荧光性质, 可用于尿激酶的微/痕量定性检测和体内/外标记. 在文中测试范围 $1\sim 100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, FITC-uPA 的荧光强度与其浓度具有较好线性关系(图6), 其线性方程为 $y = 24.27x - 0.013$, 相关系数为 0.999, 可用于微/痕量蛋白质的定量检测.

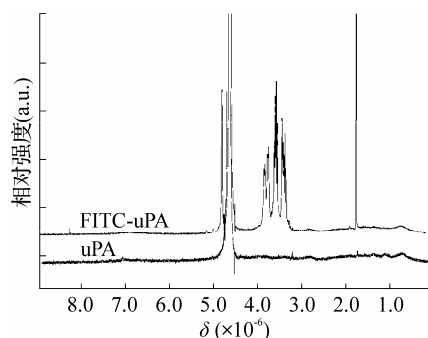
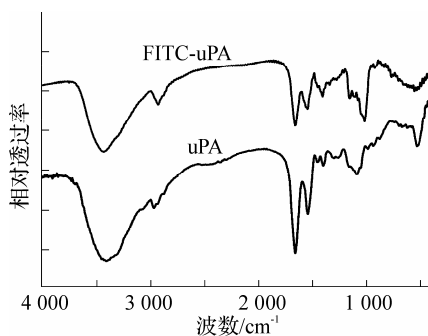
图2 FITC-uPA 和 uPA 的 ^1H NMR 谱

图3 FITC-uPA 和 uPA 的红外光谱

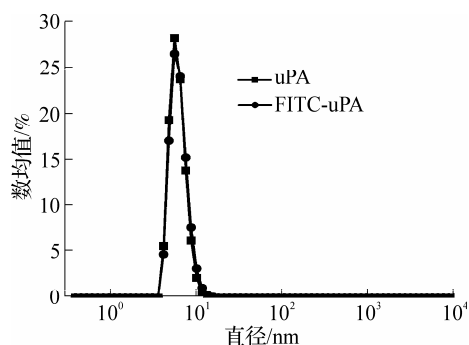


图4 FITC-uPA 和 uPA 的粒径分布

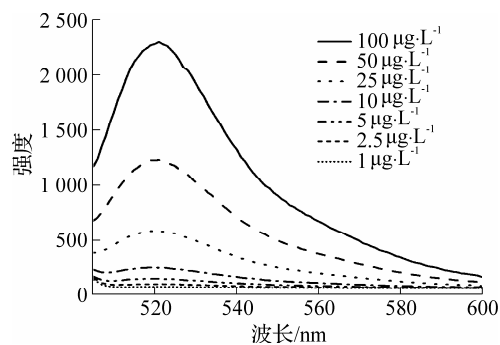


图5 不同浓度的 FITC-uPA 荧光发射光谱

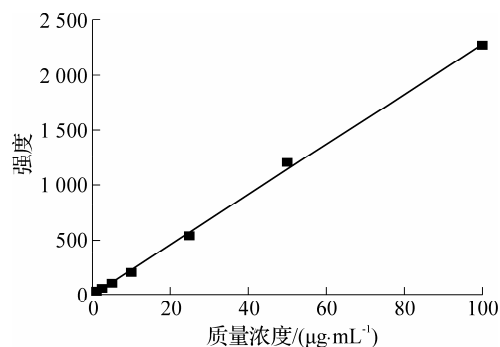


图6 FITC-uPA 溶液浓度与荧光强度的关系

2.3 FITC-uPA 的蛋白活性

用荧光素对尿激酶进行标记的目的是便于跟

踪检测蛋白质在体内外的位置及含量,其前提是要最大可能地保持蛋白质的活性,即在不丧失尿激酶作为溶栓药物性能的基础上对其进行修饰。用体外溶栓实验对 FITC-uPA 的蛋白药物活性进行了评估,以 PBS 溶液和未标记的当量尿激酶作为参照。结果表明,在本文实验条件下,未经荧光素标记的尿激酶溶栓率为 80.4%(图 7),而 FITC-uPA 的溶栓率为 76.8%,是尿激酶的 95.5%。尿激酶经 FITC 标记后,保持了较高的活性,蛋白活性的极小部分损失可能是由于荧光素修饰后引起的微小蛋白空间结构变化所引起的,有待于进一步的研究^[3,22]。然而从体外溶栓实验结果来看, FITC-uPA 仍具有与尿激酶相当的溶栓效果,有较好的溶栓能力。因此荧光素标记作为一种简单可行的蛋白质标记方法,对尿激酶的活性基本无影响,可用于下一步的溶栓药物体系离体/体内血栓的靶向性、溶栓有效性、血栓渗透性、组织安全性等研究。

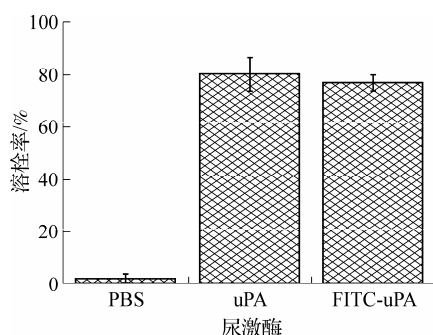


图7 FITC 标记前后尿激酶的体外溶栓率

3 结论

用异硫氰酸荧光素对溶栓蛋白药物尿激酶进行了荧光标记,制备了荧光素标记的尿激酶 FITC-uPA,经核磁、红外表征证实了反应的有效进行,其荧光素/蛋白值(F/P)值为 0.45。尿激酶经荧光素标记后,具有良好荧光性质,其荧光检测下限低达 $10^{-6} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,荧光强度与溶液质量浓度在 $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内具有很好的线性关系,可用于微/痕量蛋白质的定量/定性检测和跟踪标记。荧光素标记对尿激酶的分子结构和蛋白活性没有明显影响, FITC-uPA 的粒径约为 7 nm,与未标记的尿激酶基本一致,体外溶栓实验表明 FITC-uPA 的溶栓能力与纯尿激酶相当,很好地保持了尿激酶的蛋白活性。异硫氰酸荧光素标记是一种简单、有效、可行

的尿激酶标记方法,为尿激酶的常规测试提供了极大的便利。

参考文献:

- [1] Marler J R. Tissue-plasminogen activator for acute ischemic stroke[J]. New England Journal of Medicine, 1955, 333:1581-1587.
- [2] BERGER H, PIZZO S. Preparation of polyethylene glycol-tissue plasminogen activator adducts that retain functional activity: Characteristics and behavior in three animal species[J]. Blood, 1988, 71:1641-1647.
- [3] TAN H, JIN H Q, MEI H C, et al. PEG-urokinase nanogels with enhanced stability and controllable bioactivity[J]. Soft Matter, 2012, 8(11):2644-2650.
- [4] PIRAS A M, CHIELLINI F, FIUMI C, et al. A new biocompatible nanoparticle delivery system for the release of fibrinolytic drugs[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 357:260-271.
- [5] KIM J Y, KIM J K, PARK J S, et al. The use of PEGylated liposomes to prolong circulation lifetimes of tissue plasminogen activator[J]. Biomaterials, 2009, 30: 5751-5756.
- [6] PARK Y J, LIANG J F, YANG Z Q, et al. Controlled release of clot-dissolving tissue-type plasminogen activator from a poly(L-glutamic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogel[J]. Journal of Control Release, 2001, 75:37-44.
- [7] LIANG J F, YOON J P, SONG H, et al. Attempts: A heparin/protamine-based delivery system for enzyme drugs[J]. Journal of Control Release, 2002, 78:67-79.
- [8] ABSAR S, CHOI S, YANG V C, et al. Heparin-triggered release of camouflaged tissue plasminogen activator for targeted thrombolysis[J]. Journal of Control Release, 2012, 157:46-54.
- [9] UESUGI Y, KAWATA H, JO J, et al. An ultrasound-responsive nanodelivery system of tissue-type plasminogen activator for thrombolytic therapy[J]. Journal of Control Release, 2010, 147:269-277.
- [10] MARSH J N, SENPAN A, HU G, et al. Fibrin-targeted per-fluorocarbon nanoparticles for targeted thrombolysis [J]. Nanomedicine, 2007, 2(2):533-543.
- [11] ABSAR S, CHOI S, AHSAN F, et al. Preparation and characterization of anionic oligopeptide-modified tissue plasminogen activator for triggered delivery: An approach for localized thrombolysis[J]. Thrombosis Research, 2013, 131:e91-e99.

- [12] ABSAR S, NAHAR K, KWON Y M, et al. Thrombus-targeted nanocarrier attenuates bleeding complications associated with conventional thrombolytic therapy[J]. *Pharmaceutical Research*, 2013, 30:1663-1676.
- [13] JIN H Q, TAN H, ZHAO L L, et al. Ultra-sound-triggered thrombolysis using urokinase-loaded nanogels[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 434:384-390.
- [14] HENTZ N G, RICHARD J M, SPORTSMAN R, et al. Synthesis and characterization of insulin-fluorescein derivatives for bioanalytical applications[J]. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(24):4994-5000.
- [15] TAKAI H, KATO A, NAKAMURA T, et al. The importance of characterization of FITC-labeled antibodies used in tissue cross-reactivity studies[J]. *Acta Histochemica*, 2011, 113:472-476.
- [16] JULLIAN M, HERNANDEZ A, MAURRAS A, et al. N-terminus FITC labeling of peptides on solid support: The truth behind the spacer[J]. *Tetrahedron Letters*, 2009, 50:260-263.
- [17] GALVA C, VIRGIN G K, HELMS J B, et al. ATP protects against FITC labeling of *Solanum lycopersicon* and *Arabidopsis thaliana* Ca^{2+} -ATPase ATP binding domains[J]. *Plant Physiology Biochemistry*, 2013, 71: 261-267.
- [18] SCHACHT E, TONCHEVA V, VANDERTAELEN K, et al. Polyacetal and poly(ortho ester)-poly(ethylene glycol) graft copolymer thermogels: Preparation, hydrolysis and FITC-BSA release studies[J]. *Controlled Release*, 2006, 116:219-225.
- [19] ZHANG Y, ZENG X, MU L, et al. Rhodamine-triazine based probes for Cu^{2+} in aqueous media and living cells [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 204:24-30.
- [20] VANDALEN J P R, HAAIJMAN J J. Determination of the molar absorbance coefficient of bound tetramethyl rhodamine isothiocyanate relative to fluorescein isothiocyanate[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1974, 11(5):103-106.
- [21] BANERJEE A, MAJUMDER P, SANYAL S, et al. The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones[J]. *FEBS Open Bio*, 2014, 15(4):251-259.
- [22] TAN H, ZHAO L L, LIU W L, et al. Synthesis of thermo-responsive polymer-protein conjugates through disulfide bonding[J]. *RSC Advances*, 2014, 16(4):60413-60420.

Preparation and Property of Fluorescein Labeled Urokinase

ZHANG Ya-juan¹, YU Jie¹, ZHANG Dong-wei¹, LIANG Hong-ze¹, LIANG Ming-ming², ZHAO Ling-ling^{1*}

(1.Faculty of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Maanshan Municioal People's Hospital, Maanshan 243000, China)

Abstract: Fluorescein labeled urokinase (FITC-uPA) is synthesized by the reaction of fluorescein isothiocyanate (FITC) with urokinase (uPA), a kind of protein drug for thrombolysis. The reaction is confirmed by ^1H NMR and FT-IR. The ratio (F/P) of fluorescein over protein is 0.45. The urokinase is found to possess good fluorescent property after fluorescein is labeled, and the detection limit of fluorescence is as low as $10^{-6} \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. There is obvious linear relationship between the fluorescein intensity and concentration of FITC-uPA within the concentration range of 1-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, which can be used for qualitative/quantitative detection and tracking of micro/trace proteins. FITC-uPA has similar hydrodynamic diameter and thrombolysis efficiency with the unlabeled urokinase. Based on the study, it can be concluded that the fluorescein-label is a simple and effective method for thrombolysis drug labeling without affecting the biological active of urokinase.

Key words: fluorescein isothiocyanate; fluorescein-label; urokinase; thrombolysis

(责任编辑 章踐立)