

# 一种来自海洋细菌的血纤维蛋白溶酶的分离纯化及性质研究\*

魏 香<sup>1,2</sup> 刘晨光<sup>1</sup> 刘万顺<sup>1</sup> 刘成圣<sup>1</sup> 韩宝芹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 青岛海洋大学生命学院生化室 266003)

(<sup>2</sup> 清华大学生物科学与技术系 北京 100084)

**摘要** 利用硫酸铵分级盐析、DEAE 纤维素阴离子交换层析、Sephadex G75 凝胶层析法对由海洋细菌 FE 92-8 分泌的纤维蛋白溶酶进行了分离纯化, 结果得到 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳单一区带。性质研究发现, 该酶分子量为 12.6 kD, 等电点为 7.45, 琼脂糖-纤维蛋白平板法测得该酶作用的最适温度为 50 °C, 最适 pH 为 8.0。在 37 °C, pH 为 8.0 的情况下表现出很好的稳定性, 温度超过 50 °C 热稳定性较差, 在碱性环境中稳定性较在酸性环境中稳定性强。阴性平板和阳性平板对比实验发现, 该酶只有纤溶活性而无激酶活性, 体外实验发现, 该酶具有快速溶解血栓的能力。

**关键词** 血纤维蛋白溶酶, 分离纯化, 不同性质

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

在最适条件下进行液体发酵培养所得发酵液。GE-20 型冷冻离心机, LGF 冷冻干燥机, 排阻分子量为 8 kD 的透析袋, Sephadex G75, DEAE DE52 (Pharmacia 公司进口分装), DYYIII 28B 型夹心式垂直板电泳槽, DYYIII 6B 型稳压稳流电泳仪 (北京市六一仪器厂)。丙烯酰胺 (Ac)、甲叉双丙烯酰胺 (Bis) (Sigma 公司产品)。十二烷基硫酸钠 (SDS) (天津市化学试剂二厂产品经重结晶)。低分子量标准蛋白试剂盒 (94 kD ~ 14.4 kD) (中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂)。等电点标准蛋白 (pH 3.5 ~ 9.5) (Pharmacia 公司)。凝血酶 (Thrombin)、纤维蛋白原 (Fibrinogen) (Sigma 公司产品)。琼脂糖 (Agarose) (北京中山生物技术有限公司)。纤溶酶原 (Plasminogen) (牛血) (购自中国药品生物制品鉴定所)。试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 分段盐析参照文献[1]。

1.2.2 DEAE 纤维素阴离子交换柱层析参照文献[2,3], 初始缓冲液 0.01 mol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液, 用 0 ~ 1.0 mol/L NaCl 连续混合梯度洗脱, 洗脱条件: 灵敏度 0.5 A, 流速 0.4 ml/(min·管), 琼脂糖-纤维蛋白平板法测酶活, 收集活性峰。

1.2.3 Sephadex G75 柱层析参照文献[2,3], 用 0.1 mol/L pH 7.4 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液作为洗脱缓冲液。洗脱条件: 灵敏度 0.5 A, 流速 7 滴/min, 10 ml/min/管, 琼脂糖-纤维蛋白平板法测酶活, 收集活性峰。

1.2.4 酶活性峰的纯度鉴定用聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以牛血清白蛋白为标准[3-5]。采用不连续系统, 分离胶终浓度 7.5%, 浓缩胶终浓度 3.75%, 上样 10 μl (约含样品 10 μg), 电泳 6 h, 0.05% 考马斯亮蓝 R250 染色, 7% 乙酸脱色。

1.2.5 分子量测定用 SDS-PAGE[3-5]。采用不连续系统, 浓缩胶 3%, 电流 10 mA, 分离胶 10%, 电流 25 mA。用中分子量标准蛋白 (94 ~ 14.4 kD) 作为对照。

1.2.6 等电点测定参照文献[5,6]进行。

1.2.7 酶活力测定采用 Astrub T. 等 1952 年, Reiland, J. W. B. 1971 年报道的琼脂糖-纤维蛋白平板法。琼脂糖-纤维蛋白平板组成为: 1% 琼脂糖 180 ml, 20 mg/ml 纤维蛋白原 20 ml, 0.8 mg/ml 凝血酶 2.2 ml, 相当于 203.6 尿激酶活力单位 (IU), 纤溶酶原 2 支 (16 IU) 2.2 ml, 以上试剂均用 0.02 mol/L pH 8.0 的

\* 国家海洋 863 青年基金资助项目 819-Q10 号。

收稿日期: 2000-10-30; 修回日期: 2000-12-18

Tris-HCl 缓冲液配制。平板制作方法为:首先将 1% 琼脂糖加热溶解后放 45 °C 水浴中 30 min, 再将纤维蛋白原溶液放 45 °C 水浴中保温 10 min, 然后将凝血酶加入到琼脂糖中充分搅拌, 同时将纤溶酶原溶液加入到琼脂糖中, 在 45 °C 混匀, 然后迅速倒入 10 个直径 8.5 cm 的玻璃平皿中, 室温放置 1 h 后, 在已凝固的平板上打直径 3 mm 的小孔, 将待测样品各 10  $\mu$ l 点在孔内, 放置 10 min 后移入 37 °C 恒温箱中, 18 h 后取出, 测定溶圈的垂直直径以表示其活力大小。阴性平板在制作过程中不加纤溶酶原, 用于测定酶的直接纤溶活性。

1.2.8 酶作用的最适温度和最适 pH 参照 Lae mml 1970 年的方法进行。

1.2.9 体外溶栓实验参照武祥福 1981 年的报道。

## 2 结果与讨论

2.1 纤维蛋白溶酶粗品的制备, 将发酵液 4 °C 5 000 r/min 离心 30 min 后, 分段盐析发现: 同一初始 pH 下, 随着  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和度的提高, 上清液中蛋白质含量和酶活力均出现下降趋势。在同一  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  饱和度下, 随着 pH 由 3~8 的变化, 上清液中蛋白含量呈逐渐升高趋势, 说明 pH 越低越有利于蛋白质的沉淀, 酶活性也呈现这种变化趋势。

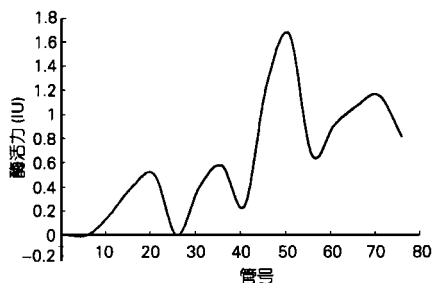


图 1 DEAE 纤维素柱层析酶活力曲线  
Fig.1 Enzyme activity curve from DEAE cellulose ionexchange column chromatography

2.2 进行大量发酵, 发酵液调 pH 3~4, 用 100% 饱和度的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 °C 盐析, 离心后沉淀用少量水溶解, 用截留分子量为 8 kD 的透析袋 4 °C 透析除盐, 冷冻干燥, 得粗酶制剂。将粗酶上 DEAE 纤维素阴离子交换柱 (3 cm  $\times$  16 cm), 洗脱结果如图 1 所示。收集活性峰 III。峰 III 上 Sephadex G75 层析柱, 结果如图 2 所示。由图可知, 洗脱后得到一个主要蛋白峰和一个主要活力峰。收集该峰, 作纯度检测。

2.3 峰 III 经 SDS-PAGE 的电泳区带比标准分子

量蛋白中分子量最小的 (14.4 kD) 还靠近染料前沿, 即分子量还小。用标准分子量蛋白制作相对迁移率-分子量的对数标准曲线, 根据样品的相对迁移率找出相对应的分子量为 12.6 kD。

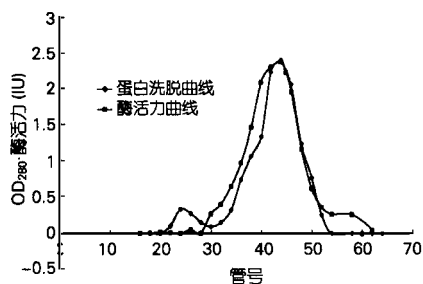


图 2 Sephadex G75 柱层析蛋白洗脱曲线和酶活力曲线  
Fig.2 Protein curve and enzyme activity curve from Sephadex G75 gel column chromatography

2.4 峰 III 经过等电聚焦电泳, 根据已知等电点标准蛋白的迁移情况制作标准曲线, 得出等电点为 pI 7.45。

2.5 酶纤溶活性与激酶活性比较实验结果表明, 阳性平板中的平均溶圈面积为 24.39  $\text{mm}^2$ , 阴性平板上的平均溶圈面积为 22.92  $\text{mm}^2$ , 两者无显著差异 ( $P > 0.1$ )。

2.6 酶作用的最适温度和最适 pH 温度如图 3、图 4 所示。

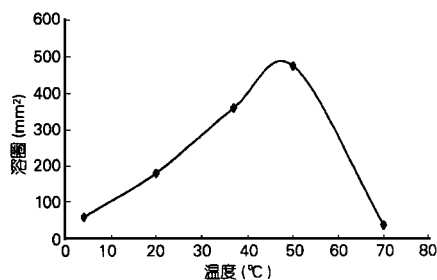


图 3 酶作用的最适温度  
Fig.3 The optimum temperature of the enzyme

2.7 体外溶栓实验结果发现, 不同浓度的溶栓酶在 12 h 内均能将血栓全部溶解, 高剂量的酶在 2 h 内即可将血栓全部溶解, 而对照组蛇毒抗栓酶经 30 h 只有 1/3 的血栓被溶解, 由此可见, 该酶的溶栓作用明显优于蛇毒抗栓酶, 可能成为一种理想的溶栓剂。样品纯化结果如表 1 所示。统计结果表明, 发酵液经

过一系列纯化过程,样品纯化倍数为3.28,蛋白回收率为32.76%,得到了较好的纯化。分子量测定结果表明,该物质比已知的几种溶栓剂分子量都小(UK MW54kD, tPA MW72kD, 蚓激酶 MW29kD),对于今后成为溶栓药物而应用于临床提供了有利条件。等电点测定结果表明,该酶是一种弱碱性蛋白。阳性平板和阴性平板比较实验发现,该酶只有纤溶活性而无激酶活性。由温度曲线和pH曲线可以看出,50℃是酶作用的最适温度,此结果比程牛亮等1990年报道的双胸蚓纤溶酶的最适作用温度(55~60℃)要低。该酶在中性和碱性条件下活力远远大于在酸性条件下的活力,说明该酶是一种偏碱性蛋白酶。酶的热稳定性实验表明,该酶在37℃以下比较稳定,当温度超过50℃时酶活力下降明显,说明该酶为一种热不稳定性蛋白。

对于该酶的氨基酸顺序、分子结构、酶的细胞及体内实验、药理、毒理等,以及在此基础上对该酶进行

的结构和功能上的合理的有针对性的改造等方面还有待于深入研究,以进一步提高该酶的活力及作用的目标性。对该酶的深入研究和应用将有助于推动治疗心血管疾病药物的发展。

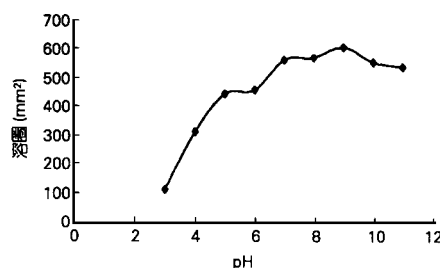


图4 酶作用的最适 pH

Fig.4 The optimum pH of the enzyme

表1 酶的分离纯化结果

Tab.1 Result of isolate and purify of plasmin

纯化步骤	蛋白液体积 (ml)	总蛋白量 (mg)	总活力 (IU)	比活力 (IU/mg 蛋白)	纯化倍数	蛋白回收率 (%)
发酵液	380.00	257.70	3800	14.75	1.00	100.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 盐析所得沉淀	54.00	110.00	2890	26.27	1.78	42.70
DEAE 纤维素层析活力峰 III	45.00	45.60	2168	47.54	3.22	33.22
Sephadex G-75 活力峰	100.00	43.30	2098	48.45	3.28	32.76

#### 参考文献

- 1 苏拔贤主编.生物化学制备技术.北京:科学出版社,1998.51~61
- 2 张承圭等.生物化学仪器分析及技术.北京:高等教育出版社,1990.172~214
- 3 李健武等.生化实验原理与方法.北京:北京大学出版社,1994.43~57,189~196
- 4 张龙翔等.生化实验方法和技术.北京:人民教育出版社,1981.124~132
- 5 张立名,王贤舜编著.现代生物化学分析原理.合肥:中国科技大学出版社,1991.107~110
- 6 郭尧君编著.蛋白质电泳试验技术.北京:科学出版社,1999.161~213.

## PURIFICATION AND PROPERTY OF A PLASMIN FROM A MARINE BACTERIA

WEI Xiang<sup>1,2</sup> LIU Cheng-guang<sup>1</sup> LIU Wan-shun<sup>1</sup> HU Cheng-sheng<sup>1</sup> HAN Bao-qin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Marine Life, Qingdao Ocean University, 266003)

(<sup>2</sup>Biological Science and Technology Department of Tsinghua University, Beijing, 100084)

Received: Oct., 30, 2000

Key Words: Plasmin, Isolate and purify, Different property

### Abstract

The plasmin was purified from the fermentation solution by using of ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose ionexchange column chromatography and Sephadex G75 gel filtration column chromatography. The purified enzyme showed

a single band on PAGE and a level of fibrinolysis activity about 5.16 times that of the crude enzyme. The molecular weight was 12.6 kD determined by SDS-PAGE. The isoelectric point(pI) was proved to be 7.45 by fast polyacrylamide isoelectric focus electrophoresis. The fibrinolysis activity was determined by agarose-fibrous protein plate method. The optimum temperature and pH were 50 °C and 8.0 respectively. It is stable in the basic solution. According to the control of activity of this enzyme between positive and negative plate, this enzyme had high affinity to fibrin, and the ability of activating plasminogen was low. *In vitro*, this enzyme had strong ability to hydrolyze artificial thrombus.

( 本文编辑 :刘珊珊)