

枯草芽孢杆菌 BS-26 菌株纤溶酶的性质分析及活性组分的分离纯化

牛术敏^{1,2}, 郭晓军¹, 李术娜¹, 袁洪水¹, 朱宝成^{1*}

(¹河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

(²河北省保定第一中学, 保定 071000)

摘要:【目的】溶栓疗法是血栓性疾病安全且有效的治疗手段, 从微生物中寻找溶栓药物是一种理想有效的途径, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) BS-26 菌株发酵液具有很强的体外纤溶活性, 本文分析了发酵液中纤溶酶的性质并对活性组分进行了分离纯化。【方法】利用纤维蛋白平板法检测纤溶酶活性, 利用硫酸铵分级盐析、DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析和聚丙烯酰胺制备电泳等方法, 进行分离纯化。【结果】此菌株产生的纤溶酶在 50℃ 以下和 pH5.0~11.0 范围内具有较好的稳定性, 最适作用温度为 42℃; 最适 pH 值为 9.0; Mg²⁺、Ca²⁺ 对此酶有明显的激活作用, 而 Cu²⁺ 能完全抑制酶的活性; 174.2 μg/mL 的苯甲基磺酰氟、1000 μg/mL 的鸡卵类粘蛋白和 1000 μg/mL 大豆胰蛋白酶抑制剂能完全抑制酶活性, 初步说明此酶属于丝氨酸蛋白酶类; 体外溶纤作用表明, 该酶溶解纤维蛋白的方式是直接溶解, 而不是通过激活纤溶酶原。从该菌株的发酵液中获得了一种纤溶酶组分, 比活力达 8750 U/mg, 回收率为 3.2%, 所获得样品纯度相对于发酵液提高了 41 倍, 该酶在 SDS-PAGE 中是单肽链蛋白, 分子量为 32 kDa。【结论】获得了一种纤溶酶的单一组分, 为纤溶酶发酵产品的大规模纯化及进一步研制和开发新的溶栓药物提供重要理论依据。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 纤溶酶; 分离纯化; 性质

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1387-06

心脑血管栓塞性疾病已成为人类死亡的主要原因之一, 其病因是纤维蛋白聚集于动脉管壁所导致^[1]。溶解血栓是治疗这一类疾病的重要手段, 但目前临床上使用的溶栓药物存在着半衰期短, 缺乏纤维蛋白特异性, 引起出血反应^[2], 价格昂贵等缺点, 难以成为适用的大众药品。因此, 寻找有效的治疗药物, 是国内外医学界重点攻关的内容之一。纤溶酶 (Fibrinolytic Enzyme, FE) 是一种催化纤维蛋白水解并导致血管内血凝块溶解的蛋白水解酶, 广泛存在于生物体中, 动物如蚯蚓纤溶酶^[3]; 植物如蒲黄“纤溶酶”^[4]; 微生物如纳豆激酶^[5]。

微生物是溶栓药物的重要来源, 目前已从许多微生物如枯草芽孢杆菌^[5]、链霉菌^[6]、产芽孢梭菌^[7]、海洋

假单胞菌^[8]、根霉^[9]等中分离纯化出了纤溶酶, 并进行了酶学性质研究。本实验室筛选出一株高产纤溶酶菌株 BS-26, 已鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[10], 并已对该菌株产纤溶酶的发酵条件进行了优化^[11]。本文在此基础上对该菌株产生的纤溶酶酶学性质进行了分析, 并探讨了从其发酵液中分离纯化纤溶酶的方法, 为纤溶酶发酵产品的大规模纯化及进一步研制和开发新的溶栓药物提供重要理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与培养基: 菌种: 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus*

*通讯作者。Tel: +86-312-7528258; E-mail: zhu2222@126.com

作者简介: 牛术敏(1979-), 女, 河北保定人, 在读硕士生, 主要从事微生物与生化药学研究。

收稿日期: 2008-03-24; 修回日期: 2008-06-12

subtilis, BS) BS-26 菌株, 本实验室分离保存。发酵培养基: 糊精 3%、酵母粉 1%、 Na_2HPO_4 0.4%, NaH_2PO_4 0.2%、 CaCl_2 0.02%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07%, pH7.0~7.2。

1.1.2 主要试剂和仪器: DEAE-Sephrose Fast Flow, Whatman 公司; 尿激酶标准品, 沈阳广大制药公司产品; 凝血酶、血纤维蛋白原, 大豆胰蛋白酶抑制剂 (SBTI) 为 Sigma 公司; 纤溶酶原, 中国药品生物制品检定所; 牛血清白蛋白, Reche 公司; 胃抑肽素 (Pepstatin)、苯甲脒 (Benzamidine) 为 Amresco 产品; 分子量标准蛋白, 北京天根试剂公司; 其他产品均为国产分析纯。AKTA explorer 蛋白高压液相色谱仪, Amersham Biosciences 公司; 阴离子交换柱 DEAE Sepharose Fast Flow, Amersham pharmacia 公司; 高速冷冻离心机, 上海安亭实验仪器总厂; 冷冻干燥机, Christ 公司; 蛋白电泳仪, Bio-Rad 公司。

1.2 纤溶酶活性的测定

参照 Astrup 的方法, 并稍加修改^[12]。将待测样品液及标准品尿激酶 20, 40, 60, 80, 100 U/mL 各 10 μL 点在琼脂糖纤维蛋白平板孔中, 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 18 h, 测定溶圈的直径, 计算各溶圈面积, 并以标准尿激酶活力为纵坐标, 溶圈面积为横坐标作图, 根据标准曲线计算样品相对于尿激酶的纤溶酶活力。

1.3 蛋白质浓度的测定

依据考马斯亮蓝法^[13], 以牛血清白蛋白为标准品, 制作标准曲线。

1.4 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶的制备

1.4.1 纤溶酶产生菌的发酵培养: 从新鲜的斜面培养物中, 挑取一环接种于液体培养基中, 37 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养至对数生长末期, 在 500 mL 三角瓶中, 装液量为 150 mL 条件下, 以 6% 接种量接入发酵培养基, 相同条件振荡培养 60 h 后, 将发酵液于 4 $^\circ\text{C}$ 、8000 r/min 离心 10 min 去除菌体, 收集上清液。

1.4.2 硫酸铵分级盐析: 分别取离心除菌体上清液 20 mL 于十只大试管中, 依次缓慢加入硫酸铵至各个不同饱和度, 用震荡混匀器混匀, 于 4 $^\circ\text{C}$, 静置 12 h。以 12000 r/min, 离心 15 min 后, 分别收集发酵上清液和沉淀。将沉淀用等体积的 0.02 mol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液溶解。分别检测上清液和沉淀溶解液的纤溶酶活性, 并根据相对活力分布与硫酸铵饱和度绘制出此纤溶酶的盐析曲线图。

将硫酸铵沉淀溶于 0.02 mol/L pH7.5 的 Tris-HCl

缓冲液, 并用截留分子量为 8000~14000 kDa 的透析袋透析除盐。然后采用真空冷冻干燥法进行浓缩, 将冻干的粗蛋白放于 -20 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.5 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶的纯化

将处理好的 DEAE-Sephrose 树脂装柱, 进行阴离子交换层析, 用 0.01 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液充分平衡色谱柱 (1.5 cm \times 20 cm), 至 OD_{280} 基线, 将粗酶液上柱, 然后用 Tris-HCl 缓冲液平衡, 待未吸附组分流出后, 采用 NaCl 梯度洗脱, 浓度依次为 0.05、0.1、0.3、0.45、0.6、1.0 mol/L (用 0.01 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制), 流速为 3 mL/min, 紫外 280 nm 波长检测。收集各洗脱峰, 透析、冷冻真空干燥, 纤维蛋白平板检测其纤溶活性。

按 Eugenio 等的方法^[14]并做适当改进后进行 PAGE 制备电泳, 将 DEAE 柱层析分离的活性组分经 PAGE 后, 凝胶先用 0.2 mol/L 的咪唑固定 10 min, 然后用 0.2 mol/L 的 ZnCl_2 染色直到胶上出现清晰透明的蛋白条带, 对应 PAGE 电泳染色的活性蛋白条带, 准确切出所需区带, 将胶放入透析袋内, 内装少量 pH8.7 的 Tris-Gly 电极缓冲液, 置电泳回收槽内电泳洗脱, 维持电流 5 mA, 4 $^\circ\text{C}$ 电泳过夜, 第二天将电极反插, 继续电泳 10 min, 回收样品, 透析冻干, 检测活性。

参照文献 [13] 测定酶的纯度及相对分子质量, 浓缩胶浓度 4%, 分离胶浓度 12%, 考马斯亮兰 R250 染色。

2 结果和分析

2.1 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶的制备

按照硫酸铵分级盐析方法, 得到 *B. subtilis* BS-26 菌株发酵上清液和沉淀中纤溶酶的相对活力与硫酸铵饱和度的关系, 可知随着硫酸铵饱和度的增加, 上清液中纤溶酶活性逐渐减少, 沉淀中纤溶酶活性逐渐增加。(NH₄)₂SO₄ 饱和度在 30% 以下时, 沉淀中酶活力相对含量较少, 而饱和度大于 60% 时, 沉淀中酶活力相对含量并没有显著增加, 因此在分离纯化过程中, 首先采用 30% 饱和度的 (NH₄)₂SO₄ 沉淀除去杂蛋白, 在上清液中继续加 (NH₄)₂SO₄ 至 60% 饱和度。收集 30%~60% 饱和度区间的纤溶酶沉淀, 用 pH7.5、0.02 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液溶解, 并对相同缓冲液透析, 然后真空冷冻干燥备用。

2.2 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶的性质

2.2.1 纤溶酶的作用最适温度: 将纤溶酶冻干粉溶于

0.02 mol/L pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液中,用纤维蛋白平板法分别在不同温度下保温 18 h 测定酶活力,得知该酶作用的最适温度为 42℃。

2.2.2 纤溶酶的温度稳定性:将纤溶酶冻干粉溶于 0.02 mol/L pH7.5 Tris-Cl 缓冲液中,分别置于 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃的水浴锅中保温 10、20、30、60 min,纤维蛋白平板检测酶活,可知该酶在 30℃以下比较稳定,活力基本不变,40℃保温 1 h 酶活损失不大,酶活还剩 80.08%。50℃时随时间延长酶活力下降较快,1 h 后酶活剩 58.89%,超过 60℃时酶活力急剧下降,60℃保温 20 min,70℃保温仅 10 min 酶完全失活,说明该酶不耐高温。

2.2.3 纤溶酶的作用最适 pH 值及酸碱稳定性:将纤溶酶冻干粉分别溶于 0.05 mol/L、pH 分别为 3.0、4.0、

5.0、6.0、7.0、8.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液和 pH 分别为 9.0、10.0、11.0 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液,37℃保温 6 h,纤维蛋白板检测不同 pH 条件下酶活力,得知该酶作用的最适 pH 为 9.0,酶在 pH5.0~11.0 范围内保持稳定,酶活保持在 80%以上。

2.2.4 金属离子对纤溶酶活力的影响:将 CaCl_2 、 CuSO_4 、 MgCl_2 、 MnCl_2 、 FeCl_2 、 ZnCl_2 、 KCl 、 NaCl 分别溶于 0.02 mol/L pH9.0 的 Tris-HCl 缓冲液中,加入适量纤溶酶液,使各金属离子终浓度为 5 mmol/L、25 mmol/L。各混合物在 37℃水浴中保温 30 min 后,检测纤溶活性,以不加金属离子的酶液为对照。结果见表 1。从表中可以看出,金属离子 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 对此酶有明显的激活作用, Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对酶有部分抑制作用。

表 1 不同金属离子对 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶活性的影响

Table 1 Effect of various metal ions on the activity of fibrinolytic enzyme of *B. subtilis* BS-26 strain

Ions	Relative activity/%	
	5mmol/L	25mmol/L
Control	100.0±3.5	100.0±2.5
Zn^{2+}	94.1±1.3	88.4±0.5
Na^+	103.6±1.8	111.0±2.3
K^+	106.0±2.5	118.6±1.8
Mn^{2+}	101.2±0.8	106.0±1.7
Ca^{2+}	118.6±3.2	131.9±3.8
Cu^{2+}	0	0
Fe^{2+}	88.4±3.2	82.9±3.0
Mg^{2+}	112.2±0.5	125.2±1.2

2.2.5 抑制剂对纤溶酶活力的影响:选用 7 种蛋白酶抑制剂:苯甲基磺酰氟(PMSF)、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na_2)、胃蛋白酶抑制剂(Pepstatin)、亮抑肽素(Leupeptin)、大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, SBTI)、苯甲脒(Benzamidine)、抑肽酶(Aprotintin)、鸡卵类粘蛋白(CHOM),分别配成不同浓度和酶液混合,纤溶酶液终浓度为 0.6 mg/mL,以加抑制剂的酶液为对照,37℃放置 30 min 后,测定剩余纤溶酶活性,结果如表 2。由表 2 可见,丝氨酸蛋白酶抑制剂:174.2 $\mu\text{g/mL}$ 的 PMSF、1000 $\mu\text{g/mL}$ 的 CHOM 和 1000 $\mu\text{g/mL}$ SBTI,能完全抑制酶活性,但金属蛋白酶抑制剂 EDTA 部分抑制酶活,由此可推测该酶属于丝氨酸蛋白酶类。

2.2.6 纤溶酶溶解纤维蛋白的作用方式:根据纤溶机制研究,目前降解纤维蛋白主要有两种方式:一类是将纤溶酶原激活为纤溶酶,从而降解构成血栓骨架的纤维蛋白;另一类是直接降解血块中的纤维蛋白。由于市售纤维蛋白

表 2 不同蛋白酶抑制剂对 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶活性的影响

Table 2 Effects of various protease inhibitors on the activity of fibrinolytic enzyme of *B. subtilis* BS-26 strain

Inhibitors	c/($\mu\text{g/mL}$)	Residue activity/%
Aprotintin	10.0	100±0.5
	100.0	92.5±3.2
Leupeptin	2.5	100.0±2.0
	5.0	64.6±2.5
Benzamidine	1566.1	64.6±1.8
	15661	49.0±1.6
SBTI	1000	10.2±0.5
	10000	0
CHOM	1000	0
	10000	0
PMSF	174.2	0
	1742	0
EDTA	292.3	88.8±1.8
	2923	64.6±2.4
Control	0	100±0.5

原中混有少量纤溶酶原,所以不能判断纤溶酶的活性是激活还是直接溶解作用。因此将纤维蛋白平板经 85℃加热 60 min 制成加热平板,纤溶酶原因加热失活,另做一个含 6.0 U 纤溶酶原的纤维蛋白平板。分别在这两个平板上点 BS-26 菌株纤溶酶的粗酶液和尿激酶,测其酶活力。如图 1 所示:在不含纤溶酶原的加热平板上尿激酶无活性,而在含纤溶酶原的纤维蛋白平板上有溶纤活性,说明尿激酶的溶纤作用是通过激活纤溶酶原。而 BS-26 菌株纤溶酶无论在加热平板上还是在含纤溶酶原的平板上都表现出溶纤活性,前者溶圈直径是 15.3 mm,后者溶圈直径

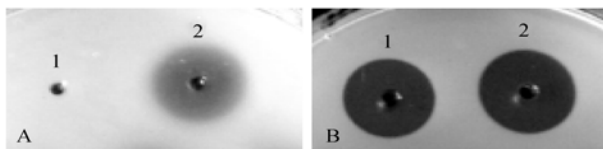


图 1 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶溶解纤维蛋白的作用方式

Fig. 1 Mode of dissolving fibrin protein of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* BS-26 strain. A: Plasminogen-free fibrin plate; B: Plasminogen-containing fibrin plate. 1. UK; 2. Fibrinolytic enzyme from strain BS-26.

是 16.2 mm,两者并无显著差异,说明 BS-26 菌株纤溶酶的溶纤方式是直接溶解纤维蛋白,而不是激活纤溶酶原形成纤溶酶而水解纤维蛋白。在加热平板上 BS-26 菌株纤溶酶形成的溶圈不透明,这可能是由于高温改变了纤维蛋白的结构。

2.3 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶的纯化

将 30%~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度区间的纤溶酶冻干粉用 0.02 mol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 溶解后,进行 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析分离,层析结果如图 2。

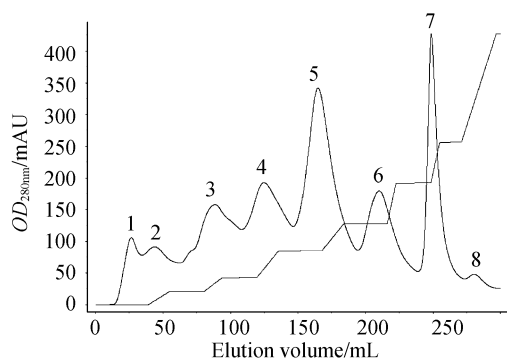


图 2 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶的 DEAE-Sepharose Fast Flow 层析图

Fig. 2 Elution profile of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* BS-26 strain by DEAE-Sepharose FF chromatography.

收集各峰,透析冷冻干燥,纤维蛋白平板检测纤溶活性,发现除组分 8 外,其余各组分均有活性。但在 0.5 mol/L

NaCl 溶液梯度下洗脱出的活性组分 7 经 PAGE 后,凝胶用考马斯亮兰染色,胶上显示出六条蛋白带(如图 3-A)。

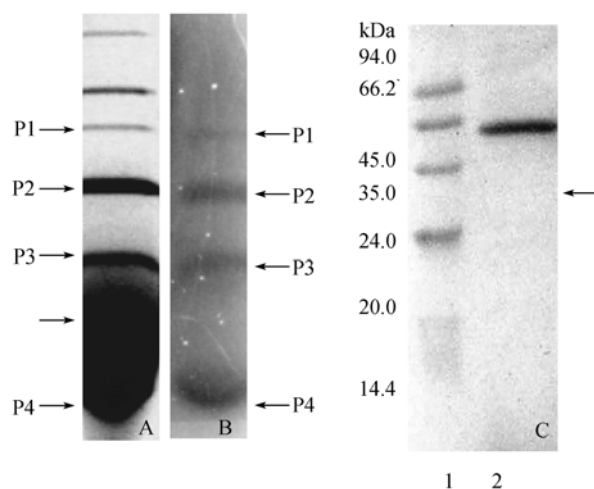


图 3 离子交换组分 7 的 PAGE 胶(A)及在纤维蛋白板上的纤溶活性图(B)和制备 PAGE 后 P2 组分的 SDS-PAGE 电泳图(C)
Fig. 3 PAGE gel(A) and fibrinolytic activity on fibrin plate(B) profile of the fraction 7 by DEAE chromatography and SDS-PAGE profile of the fraction P2 by preparative PAGE. 1. Marker; 2. Purified fibrinolytic enzyme of the fraction P2.

底物平板印迹显示四条带有纤溶活性(如图 3-B,分别记为 P1、P2、P3、P4),并且带与带之间距离较远,适合用制备 PAGE 进一步纯化。而其它峰 PAGE 电泳条带复杂,不适合采用制备电泳继续分离。离子交换组分 7 经制备 PAGE 后,凝胶用咪唑-锌反染时,P1 带的位置没出现透明带,可能是由于 P1 蛋白含量低且凝胶厚的缘故。胶下部 P3 至 P4 带之间的区域,反染时出现一片透明,无法准确切出活性条带,可能是由于两带之间有一些降解蛋白或一些粘性蛋白的影响(如图 3-A 中 P3 与 P4 带之间的箭头所示)。所以分离纯化蛋白时为尽量避免蛋白质的降解,应一次收集大量样品,分装后低温冷冻保藏,并在操作过程中避免反复冻融。综上,只成功回收了 P2 组分,透析冻干,检测活性。

回收的组分 P2,经纤维蛋白平板检测,具有很强的纤溶活性。经 SDS-PAGE 检测,显示为单一条带,如图 3-C,说明纯化出的纤溶酶为单链蛋白。根据分子量标准蛋白做标准曲线,得知纯化的纤溶酶相对分子质量约为 32 kDa。

计算各纯化步骤酶的活力和比活力,结果如表 3,由表 3 可知,枯草芽孢杆菌 BS-26 菌株发酵液经 30%~60% 硫酸铵分级盐析、DEAE-Sepharose 阴离子交换层析和制

表 3 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶的分离纯化结果
Table 3 Purification of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis* BS-26 strain

Step	Total protein/mg	Total activity/U	Specific activity/(U/mg)	Purification factor	Yield/%
Culture supernatant	1536.3	3.28×10^5	213.5	1	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	184.0	2.20×10^5	1195.7	5.6	67.1
DEAE-Sepharose FF	13.0	5.19×10^4	3992.3	18.7	15.8
Preparative PAGE	1.2	1.05×10^4	8750.0	41.0	3.2

备电泳后,纯化出的 BS-26 纤溶酶 P2 回收率为 3.2%, 纯化倍数为 41.0%, 纯化效果明显。

3 讨论

BS-26 菌株纤溶酶因能被丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF、SBTI 等完全抑制,初步说明属于丝氨酸蛋白酶类,又因金属蛋白酶抑制剂 EDTA 能部分抑制此纤溶酶酶活,且随着 EDTA 浓度的增大抑制程度加强,表明此酶还可能是一种金属蛋白酶。这与解淀粉芽孢杆菌 DC-4^[16]、芽孢杆菌 CK11-4^[17]、纳豆杆菌^[5]、链霉菌 C-3662^[18]、根霉 12 #^[9]产生的纤溶酶属于丝氨酸蛋白酶类,枯草芽孢杆菌 QK02^[19]、A1^[20]产生的纤溶酶属于金属蛋白酶有所差别。BS-26 菌株纤溶酶水解纤维蛋白的方式是直接水解而不是激活纤溶酶原,这与蚓激酶^[3]、纳豆激酶^[5]、链激酶 CGW-3^[18]不同,三者不仅具有直接降解纤维蛋白作用,而且能够激活纤溶酶原。BS-26 菌株纤溶酶最适作用温度为 42℃,最适作用 pH 值为 9.0,这与彭勇报道的豆豉纤溶酶 BA-DFE 最适反应温度 48℃^[16], Ju Ho Ko 报道的纤溶酶 QK-2 最适反应温度 55℃^[19], Kim S H 报道的 DJ-4 纤溶酶最适反应温度 40℃、最适反应 pH 值 10^[21], Kim W 报道的 CK 纤溶酶最适反应温度 70℃、最适反应 pH 值 10.5^[17], Kim. J.H 报道的蘑菇中的 AMMP 纤溶酶最适反应温度 33℃、最适反应 pH 值 6.0 都不同^[22]。并且 *B. subtilis* BS-26 菌株纤溶酶在 pH5.0~11.0 范围内相对稳定,酸碱耐受范围广,有望成为新型纤溶酶。

分离纯化过程中发现 BS-26 菌株的 30%~60% 硫酸铵饱和度区间的纤溶酶,经纤维蛋白-PAGE 电泳,显示出 5 条活性带,活性组分多,与大多数产纤溶酶菌株不同。但由于每种纤溶酶的等电点未知,所以离子交换层析时缓冲液的 pH 值不易选择。本实验首先选用 DEAE-Sepharose 阴离子交换层析,分别用 pH7.5、8.0、8.5、9.0 的 Tris-HCl 缓冲液进行分离纯化的预实验,结果发现采用 pH8.0 的缓冲液时蛋白分离效果好。但在

DEAE-Sepharose 层析时,除 1 mol/L NaCl 溶液洗脱峰外,其它洗脱峰均有纤溶活性,这可能与发酵液中的粘稠物质有关。层析后的活性组分 7 经 PAGE 发现目标蛋白带与其他蛋白带相隔一定距离,适合采用制备 PAGE 进一步分离。PAGE 是一种分辨率很高的分离手段,能够将差别很小的蛋白质分离为不同的条带。回收在聚丙烯酰胺凝胶上的单一条带,通常能够得到高纯度的蛋白质。因此,从电泳后的聚丙烯酰胺凝胶中直接回收目标蛋白,已经成为一种蛋白质的快速纯化方法。经过上述纯化步骤从 BS-26 菌株中得到了一种电泳纯的纤溶酶,该酶纯化了 41 倍,纯化效果明显。

该文从 *B. subtilis* BS-26 菌株发酵液中纯化出的纤溶酶 P2,是由单肽链组成的蛋白,分子量约为 32 kDa。比日本学者从枯草芽孢杆菌发酵液中得到的纤溶酶——纳豆激酶,分子量 27.7 kDa^[5];韩国学者从 CK11-4 芽孢杆菌中得到的纤溶酶 CK,分子量 28.2 kDa^[17],都大。但比报道的 Shiokara 中的纤溶酶(35 kDa)分子量小^[23],与已报道的纤溶酶 IMR-NK1(31.5 kDa)分子量相近^[24],但与其纤溶酶的氨基酸序列是否具有同源性或一致,还需经实验证明。本文从 BS-26 菌株的发酵液中只纯化出了一种纤溶酶,其他纤溶组分还有待于进一步分离,纯化出的纤溶酶的酶学性质及纯酶在体内的溶栓作用还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 罗明典. 微生物制药研究新进展. 微生物学通报 (*Microbiology*), 1998, 25(1): 61-62.
- [2] 熊强, 梁剑光, 熊晓辉. 微生物——几种溶栓药物的重要来源. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2003, 30(5): 116-119.
- [3] 严宜明, 孔键, 李红, 等. 蚯蚓纤溶酶原激活剂的分离纯化及其性质. 中国生物化学与分子生物学报 (*Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2005, 21(4): 537-545.
- [4] 裴光源, 王中枢. 蒲黄“纤溶酶”的分离纯化及部分性质的研究. 生物化学与生物物理学报 (*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*), 1991, 23(1): 14-19.
- [5] Fujita M, Nomura K, Hong K. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 197(3): 1340-1347.
- [6] 龚勇, 王以光. 一种来源于链霉菌的纤溶酶的纯化及其基因的

- 克隆. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2001, 41(2): 186–190.
- [7] 赵红, 程洁, 陆俭, 等. 产芽胞梭菌纤溶酶的纯化及特性. 中国生物制品学杂志(*Chin J Biologicals*), 2002, 15(1): 27–31.
- [8] 璩竹玲, 刘赛, 董河, 等. 海洋假单胞菌碱性蛋白酶对实验性家兔股动脉血栓的溶解作用. 中国海洋药物(*Chin J Mar Drugs*), 2005, 24(3): 10–14.
- [9] 杜连祥, 刘晓兰, 路福平, 等. 根霉 12#发酵产生纤溶酶的酶学性质. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 2005, 21(2): 323–327.
- [10] 牛术敏, 李淑娜, 郭晓军, 等. 一株产纤溶酶菌株 BS-26 的分离和纯化. 中国生化药物杂志(*Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*), 2008, 29(3): 164–167.
- [11] 牛术敏, 袁洪水, 李淑娜, 等. 纤溶酶产生菌株 BS-26 的发酵工艺优化. 中国生化药物杂志(*Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*), 2008, 29(1): 29–32.
- [12] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys*, 1952, 40: 346–354.
- [13] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 第二版. 北京: 高等教育出版社, 1997.
- [14] Eugenio H, Hector S, Angela S H, et al. Recovery of biologically active proteins detected with imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc (reverse stain) on sodium dodecyl sulfate gel. *Analytical Biochemistry*, 1996, 240(1): 150–152.
- [15] 熊晓辉, 李睿, 陆利霞, 等. 纳豆激酶的分离纯化及其特性研究. 食品与发酵工业(*Food and Fermentation Industries*), 2006, 32(1): 122–125.
- [16] Peng Y, Huang Q, Zhang YZ, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefa-*
- ciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp Biochem Physiol (Part B)*, 2003, (134): 45–52.
- [17] Kim W, Choi K, Kim Y, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 2482–2488.
- [18] 武临专, 王以光. 链霉菌 C-3662 产生的纤溶活性蛋白酶的纯化与理化性质. 中国生物化学与分子生物学报(*Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2001, 17(1): 85–90.
- [19] Ju H K, Jun P Y, Lei Z, et al. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. *Comp Biochem Physiol (Part C)*, 2004, 137:65–74.
- [20] Jeong Y K, Kim J U, Gal S W, et al. Molecular cloning and characterization of the gene encoding a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* strain A1. *World J Microbiol Biotech*, 2004, 20: 711–717.
- [21] Kim S H, Choi N S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci Biotech and Biochem*, 2000, 64: 1722–1725.
- [22] Kim. J.H, Kim Y. S. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mella*. *Biosci Biotech and Biochem*, 1999, 63: 2130–2136.
- [23] Sumi H, Nakajima N and Yatagai C. A unique strong fibrinolytic enzyme (Katsuwokinase) in skipjack “shiohara” a Japanese traditional fermented food. *Comp Biochem Physiol*, 1995, 112(3): 543–547.
- [24] Chang C T, Fan MH, Kuo FC, et al. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(8): 3210–3216.

Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BS-26

Shumin Niu^{1,2}, Xiaojun Guo¹, Shuna Li¹, Hongshui Yuan¹, Baocheng Zhu^{1*}

⁽¹⁾ College of Life Science, Agriculture University of Hebei, Baoding 071001, China)

⁽²⁾ No.1 Middle School of Baoding, Baoding 071000, China)

Abstract: [Objective] Thrombolytic therapy is a safe and effective treatment for thrombotic diseases. Microorganisms are possible sources of thrombolytic drugs. We purified and characterized fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain BS-26. [Methods] We examined the fibrinolytic enzyme activity by fibrin plate and purified fibrinolytic enzyme by ammonium sulfate fractional precipitation, anion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose Fast Flow and preparative PAGE. [Results] The fibrinolytic enzyme of the strain BS-26 was stable below 50°C and pH 5.0–11.0, the optimal temperature was 42°C and optimal pH was 9.0. Ca²⁺ and Mg²⁺ ions enhanced the fibrinolytic activity, whereas Cu²⁺ completely inhibited the enzyme. Phenylmethylsulfonyl fluoride (174.2 µg/mL), chicken ovomucoid (1000 µg/mL) and soybean trypsin inhibitor (1000 µg/mL) could inhibit enzyme activity, which indicated that the enzyme belonged to serine protease group. On plasminogen-free fibrin plates and plasminogen fibrin plates, the fibrinolytic activity had no obvious difference, indicating that the enzyme was a fibrinolytic enzyme which degraded fibrin directly, but not a plasminogen activator which degraded fibrin by activating plasminogen. A fibrinolytic enzyme was purified from the fermentation broth with recovery yield of 3.2%, purification factor of 41.0 fold and the specific activity 8750.0 U/mg. SDS-PAGE analysis of the purified protein showed only one band with molecular mass of 32 kDa. [Conclusion] A single fibrinolytic enzyme was purified, which provided the basis for large-scale production of fibrinolytic enzyme.

Keywords: *Bacillus subtilis*; fibrinolytic enzyme; purification; characterization JAK3 promoter

*Corresponding author. Tel: +86-312-7528258; E-mail: zhu2222@126.com
Received: 24 March 2008/ Revised: 12 June 2008