

蛹虫草无性型深层培养液中纤溶酶的分离 纯化和酶学性质研究

张雯舒 刘晓兰* 郑喜群 时晰 董玉成

(齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院 农产品加工黑龙江省普通高校重点实验室
黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要: 【目的】确立蛹拟青霉深层培养液中高纯度、高纤溶活性纤溶酶的分离纯化方法并测定其酶学性质。【方法】采用硫酸铵盐析、Sephadex G-25 凝胶色谱、Phenyl-Sepharose HP 疏水相互作用色谱、CM-Sepharose FF 弱阳离子交换色谱和 Superdex 75 凝胶色谱对蛹拟青霉纤溶酶进行分离。用 Lowry 法测定蛋白质浓度, 纤维蛋白平板法测定其纤溶活性, SDS-PAGE 鉴定其纯度并确定其分子量, IEF 法测定其等电点。【结果】研究发现, 以蔗糖和豆饼为培养基主要基质时, 蛹拟青霉深层培养可以产生至少两种纤溶酶。提纯后的纤溶酶 II 比活力达到 800.46 U/mg, 总纯化倍数为 30.07 倍。纤溶酶 II 的相对分子量和等电点分别为 32 kD 和 9.3 ± 0.2 。纤溶酶 II 是一种糖蛋白, 总含糖量为 0.98% (W/V)。该酶可以顺次降解人血纤维蛋白(原)的 α 、 β 和 γ 链。其最适作用 pH 及温度分别为 7.4 和 41 °C。Aprotinine 与 PMSF 对该纤溶酶的活性完全抑制, 推测此纤溶酶可能是一种丝氨酸蛋白酶。【结论】单一的高纤溶活性纤溶酶的获得和酶学性质的确定, 为该酶开发成为新型溶栓药物提供了理论依据。

关键词: 蛹拟青霉, 纤溶酶, 分离纯化, 酶学性质

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31171744); 齐齐哈尔大学创新科研项目(No. YJSCX2010-009X)

*通讯作者: Tel: 86-452-2738341; 信箱: liuxiaolan001@126.com

收稿日期: 2012-04-08; 接受日期: 2012-07-13

Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces militaris*

ZHANG Wen-Shu LIU Xiao-Lan* ZHENG Xi-Qun SHI Xi
DONG Yu-Cheng

(College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, The Ordinary University Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: [Objective] Establish purification methods of fibrinolytic enzyme with high purity and fibrinolytic activity from *Paecilomyces militaris* submerged culture liquid and determine its characterization. [Methods] The fibrinolytic enzyme II of *Paecilomyces militaris* was purified by ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-25 gel filtration chromatography, Phenyl-Sepharose HP hydrophobic interaction chromatography, CM-Sepharose FF ion exchange chromatography and Superdex 75 gel filtration chromatography. The protein concentration of enzyme II was determined by Lowry method. The fibrinolytic activity was determined by Fibrin plate method. The purity and molecular weight was estimated by SDS-PAGE. The isoelectric point was estimated by isoelectric focusing electrophoresis. [Results] We found that *Paecilomyces militaris* produced at least two kinds of fibrinolytic enzymes by submerged cultivation, sucrose and bean cake as major materials. The specific activity of purified fibrinolytic enzyme II was 800.46 U/mg and the purification protocol resulted in 30.07-folds purification of the enzyme II. The molecular weight and isoelectric point of the enzyme II was 32 kD and 9.3 ± 0.2 , respectively. The enzyme II was a glycoprotein, the total sugar content of it was 0.98% (W/V). The enzyme II could degrade α , β and γ chains of human fibrinogen. The optimal pH and temperature of the enzyme were 7.4 and 41°C. The fibrinolytic activity was completely inhibited by Aprotinine and PMSF, which indicated that it might be a serine protease. [Conclusion] The acquisition of enzyme with single and high fibrinolytic activity and the determination of its characterization, which provides theoretical basis for the enzyme to become a new thrombolysis drug.

Keywords: *Paecilomyces militaris*, Fibrinolytic enzyme, Purification, Characterization

血栓性疾病严重危害人类健康, 其致残率和死亡率较高^[1], 现代医学溶栓疗法是血栓性疾病安全有效的治疗手段^[2], 国内外已应用于临床使用的溶栓剂尿激酶(UK)、链激酶(SK)、葡激酶(SAK)等虽药效肯定, 但均存在一定的缺陷, 且价格昂贵^[3-4], 因而寻找和开发高效的抗栓、溶栓药物, 仍是国内外研究学者重点关注的课题。溶栓剂来源十分广泛, 微生物来源的溶栓剂以其生

长速度快、生命活动周期短、生长条件容易控制、可以通过人工控制发酵条件获取大量的目的产物而展现出诱人的前景。

蛹虫草[*Cordyceps militaris* (L.) Link]又名北冬虫夏草, 在我国的黑龙江、吉林、辽宁等省份均有野生分布^[6], 其无性型蛹拟青霉(*Paecilomyces militaris*)^[7]隶属于囊菌门, 肉座菌目, 麦角菌科, 虫草属, 是虫草属的模式种, 名贵的食药兼用大

型真菌, 且药理作用十分广泛^[8-9]。因此, 推测由蛹拟青霉生产并分离纯化出的纤溶酶具有良好的安全可靠, 很有可能开发成为一种新型的溶栓剂或功能性食品基料, 用来防治血栓栓塞症, 前景十分广阔。

大型真菌被广泛地用作食品和中药材, 因其含有多种重要的活性成分近年来引起越来越多国内外学者的关注。本课题组近年来发现, 从大兴安岭地区采集分离的蛹虫草的无性型蛹拟青霉采用深层培养方法, 以蔗糖和豆饼为培养基主料时产生了新的纤溶酶[专利“一种真菌纤溶酶及其培制方法(200810137564.4)”^[10]]。本文报道了蛹拟青霉液体深层发酵产生的纤溶酶的分离纯化方法及相关酶学性质的研究, 为新型溶栓药物进行临床试验提供必要的理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

1.1.1 菌种: 蛹拟青霉菌株 C.LSG-1 为齐齐哈尔大学食品与生物工程学院提供。

1.1.2 试剂: 凝胶过滤色谱预装柱 Superdex 75 (1.6 cm×60 cm)、Sephadex G-25 填料、Phenyl-Sepharose HP 填料、CM-Sepharose FF 填料购自美国 GE 公司; 牛血纤维蛋白原、牛凝血酶为中国医学科学院天津血研所产品; 载体两性电解质 (pH 3-10) 为中国军事医学科学院产品; 等电点标准蛋白质 (pI 3.5-9.5) 为 Amershan 公司产品; 低相对分子质量标准蛋白质 (Marker, 14 400-97 400 D) 购自上海西巴斯生物技术开发有限公司; PMSF、TPCK、琼脂糖、丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠 (SDS) 购自 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器: AKTA prime 蛋白质纯化系统。

1.2 方法

1.2.1 纤溶酶活力测定: 参考 Astrup-T^[11] 血纤维

蛋白平板法。

1.2.2 蛋白质的测定: Lowry 法^[12], 以牛血清白蛋白为标准, 在 640 nm 处进行光吸收检测。

1.2.3 粗酶液制备方法: 培养条件为 2% (W/V) 蔗糖和 5% (W/V) 豆饼, 250 mL 锥形瓶装液量为 50 mL, 接种量为直径 1 cm 菌片 1 片, 23 °C、180 r/min 摇瓶避光培养 5 d。发酵液在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液备用。

1.2.4 分离方法: 将离心获得的粗酶液首先进行 20% 硫酸铵盐析, 4 °C 冷藏 12 h, 使其充分盐析。然后于 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min, 收集上层清液进行 Sephadex G-25 凝胶过滤色谱, 洗脱液为含 30% 硫酸铵的 20 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4)。收集活性组分进行下一步 Phenyl-Sepharose HP 疏水相互作用色谱, 用含 30% 硫酸铵的 20 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 平衡柱子, 然后用含 30%-0 硫酸铵的 20 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 以 2 mL/min 的流速进行线性梯度洗脱。收集活性组分经脱盐、冻干后进行 CM-Sepharose FF 弱阳离子交换色谱, 用 20 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 6.0) 平衡和洗脱柱子, 收集活性组分经脱盐、冻干后进行最后一步 Superdex 75 凝胶过滤色谱, 将粉末溶解于含 0.5 mol/L 氯化钠的 20 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 6.0) 中, 然后用相同的缓冲液以 1 mL/min 流速进行洗脱, 收集活性组分, 检测纤溶酶纯度。

1.2.5 纤溶酶纯度及相对分子质量测定: 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[13] (12% 分离胶, 5% 浓缩胶, 交联度为 2.6%, 灌注垂直板凝胶)。蛋白质 Marker 由兔磷酸化酶 B (97.4 kD)、牛血清白蛋白 (66.2 kD)、兔肌动蛋白 (43.0 kD)、牛碳酸酐酶 (31.0 kD)、胰蛋白酶抑制剂 (20.1 kD)、鸡蛋清溶菌酶 (14.4 kD) 组成。

1.2.6 纤溶酶等电点测定: 等电聚焦电泳 (IEF)^[14], 胶浓度为 7.5%, 交联度为 3%, 灌注水平半干式

凝胶,选择等电点 Marker 为 pI 3.5–9.5,先将载体两性电解质在 60 V 预聚焦 15 min,然后将样品先恒流 8 mA,电压升至 580 V 后恒压条件下进行 IEF 电泳。

1.2.7 糖蛋白的定性及定量: Molish 方法和蒽酮比色法。

1.2.8 纤溶酶对人血纤维蛋白(原)的降解情况: 参考文献[15]将 60 μ L 0.01 g/L 的酶液与 2% 人血纤维蛋白(原) 200 μ L 混匀置于离心管中于 37 $^{\circ}$ C 分别保温于不同时间,定时快速取出 10 μ L 加入等体积样品溶解液,沸水浴终止酶促反应。将保温不同时间的反应液进行 SDS-PAGE 垂直板电泳,电泳时加入还原的人血纤维蛋白(原)作对照,通过观察 α 、 β 和 γ 链的含量变化确定该纤溶酶对人血纤维蛋白(原)各亚基的降解情况^[16]。

2 结果与讨论

2.1 纤溶酶的纯化结果

2.1.1 20%硫酸铵盐析: 将发酵液离心,取上清液经 20%硫酸铵盐析后,置于 4 $^{\circ}$ C 冷藏 12 h,发现其液黏稠、浑浊,并伴有絮状物质悬浮其中。将经硫酸铵盐析的上清液在 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 条件下离心 20 min,分离出大部分沉淀,测定其上清液的纤溶酶活力,发现其活力较发酵液没有较大损失,说明 20%硫酸铵盐析将深层发酵过程中产生的多糖和部分杂质蛋白去除。

2.1.2 色谱分离: 蛹拟青霉以豆饼和蔗糖为主要原料的液体发酵液中存在一些色素物质。采用 Sephadex G-25 凝胶对盐析后酶液进行脱色并将样品所在的缓冲体系交换至含硫酸铵饱和度为 30%,大部分色素分子与活性组分分离,效果比较理想。收集活性组分继续进行下一步 Phenyl-Sepharose HP 疏水相互作用色谱,洗脱结果如图 1 所示,待分离的酶与疏水填料结合较好,

上样后的衡洗阶段去除了较多的疏水性弱于目标纤溶酶的杂蛋白;在硫酸铵饱和度从 30%–0 线性降低的梯度洗脱过程中分离出两个纤溶活性组分,分别命名为纤溶酶 I 和 II。纤溶酶 I 在梯度洗脱中期被洗脱下来,而且可以看出其比活力很高;纤溶酶 II 的疏水性强于纤溶酶 I,与填料结合较牢固,在梯度洗脱接近结束时被洗脱下来。纤溶酶 I 和 II 的活性峰与蛋白峰均对应良好,分离效果比较理想。纤溶酶 II 比活力达到 216.31 U/mg,纯化倍数达到 8.13 (表 1)。收集纤溶酶 II 尝试利用蛋白质间的等电点不同,选用 CM-Sepharose FF 弱阳离子色谱对纤溶酶继续进行分离。纤溶酶 II 在衡洗阶段被洗脱下来,活性峰与蛋白峰能够基本对应,目标蛋白与其等电点接近的杂蛋白分离较好,比活力达到 454.83 U/mg,纯化倍数为 17.09 (表 1),纤溶酶 II 得到进一步纯化。

收集纤溶酶 II 继续纯化,从图 2 中洗脱曲线可以看出,目标蛋白峰与杂质蛋白峰分开,对称效果良好并且与活性峰完全对应。纤溶酶 II 比活力为 800.46 U/mg,比纯化前提高 30.48 倍;纯化倍数为 30.07 (表 1)。可见最后一步选择胶粒直径只有 13 μ m、可分离分子量范围是 3 000–70 000 Da 球蛋白 Superdex 75 凝胶色谱进行精细纯化,分离效果比较理想。

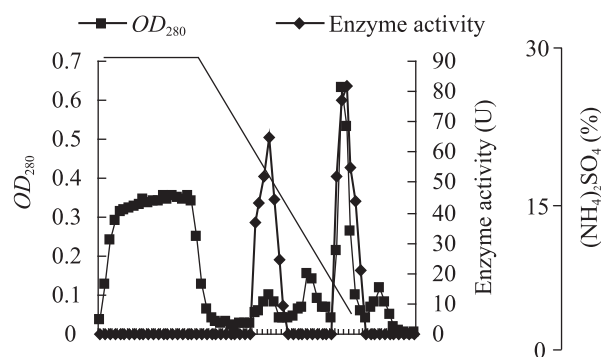


图 1 Phenyl-Sepharose HP 疏水层析洗脱曲线
Fig. 1 Elution curve of Phenyl-Sepharose HP HIC

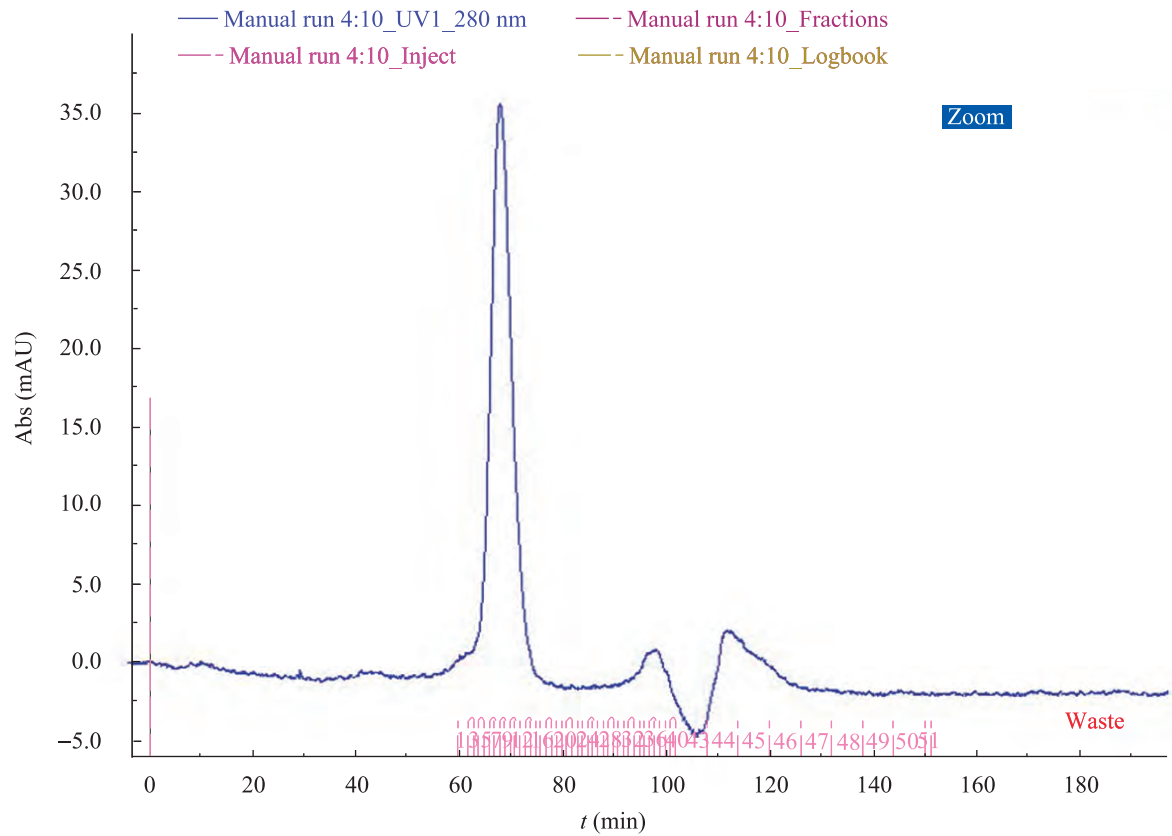


图 2 纤溶酶 II Superdex 75 凝胶层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of fibrinolytic enzyme II Superdex 75 GFC

表 1 蛹拟青霉纤溶酶 II 的纯化结果					
Table 1 Purification table of fibrinolytic enzyme II from <i>Paecilomyces militaris</i>					
分离步骤 Purification step	总蛋白 Protein (mg)	总活力 Proteolytic activity (U)	回收率 Recovery (%)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Fold
Crude extracts	296.80	7 899.84	100	26.62	1.00
Salted out	260.28	7 466.79	94.52	28.69	1.08
Phenyl-Sepharose HP	23.22	5 032.03	63.58	216.31	8.13
CM-Sepharose FF	1.98	902.73	11.43	454.83	17.09
Superdex 75	0.10	80.39	1.02	800.46	30.07

2.2 纤溶酶相对分子质量

从图 3 中可以看出，蛹拟青霉的蛋白分子可能由 1 个蛋白质亚基或分子量相同的几个蛋白质

亚基组成。应用凝胶成像系统的 Labworks 软件分析出该亚基相对分子质量为 32 kD，与已报道的海洋绿藻中提取的纤溶酶(31 kD)^[17]和枯草芽

孢杆菌中提取的纤溶酶(31.5 kD)^[18]分子质量相近,而与 Jae-Sung Kim 从蛹虫草子实体中分离纯化出的纤溶酶(52 kD)^[19]分子量不同。

2.3 纤溶酶等电点

经 IEF 电泳测定后,利用凝胶成像系统分析蛹拟青霉纤溶酶的等电点为 9.3 ± 0.2 , 为碱性蛋白酶。已报道的枯草芽孢杆菌 EM29-5 产生的纤溶酶(pI 9.0)^[20]和链霉菌产生的纤溶酶 CGW-3 (pI 9.0)^[21]均与此纤溶酶的等电点相近。

2.4 糖蛋白的定性及定量

莫氏(Molish)试验结果表明,硫酸与样品水溶液分成两层,而盛有缓冲溶液的试管液面交界处没有紫色环出现,可鉴定此纤溶酶中有糖的存在。采用蒽酮比色法测定蛹虫草无性型纤溶酶的糖含量为 0.98%。

2.5 纤溶酶对人血纤维蛋白(原)的降解情况

由电泳图 4、5 可以看出,1 min 后人血纤维

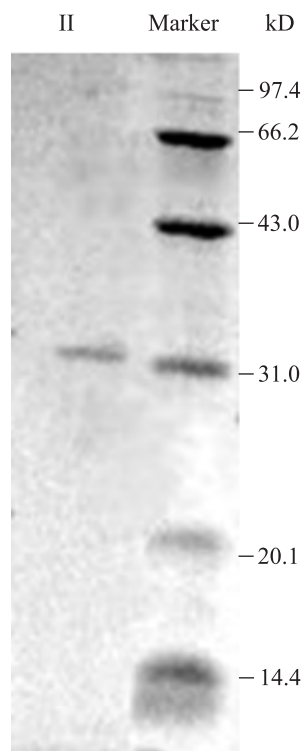


图 3 纤溶酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE of the purified enzyme

蛋白(原)的 α 链就开始降解,人血纤维蛋白原的 β 链 15 min 后完全降解, γ 链 1 h 后降解完毕,而人血纤维蛋白的 β 、 γ 链均在 1 h 后完全降解。在此纤溶酶对人血纤维蛋白(原)的降解过程中,会出现分子量大于 α 亚基的较大蛋白片段,推测可能是由于反应初期,不同的纤维蛋白(原)分子虽已发生局部降解,但相互交联的位点仍尚未被破坏,因此在电泳过程中显示出了这些大分子蛋白谱带。蛹拟青霉纤溶酶作用于人血纤维蛋白(原)各亚基次序为 α 的降解速率大于 β 和 γ 亚基,这一降解顺序与人纤溶酶降解纤维蛋白(原)各亚基的情况一致。已报道的李华平等^[22]从冬虫夏草中提取的纤溶酶, Bello 等^[23]从蛇毒中提取的纤溶酶以及邓智慧等^[24]从梗稻中提取的纤溶酶降解纤维蛋白(原)的速率也均为 α 大于 β 和 γ 亚基。

在文献报道中,多数外源性纤溶酶能降解纤维蛋白(原) α 和 β 链,特别是 α 链,其松散的 C 末端容易受到纤溶酶的切割,能降解 γ 链的纤溶酶则很少见。如从镰孢菌中提取的纤溶酶^[25]和从葡萄球菌中提取的纤溶酶^[26]能高效地水解纤维蛋白(原) α 链,而对 β 和 γ 链的水解活性较低,甚至不水解。

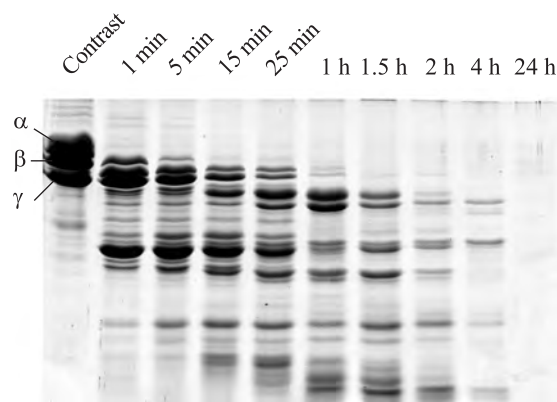


图 4 纤溶酶对人血纤维蛋白原降解图

Fig. 4 The figure of fibrinolytic enzyme hydrolyze human fibrinogen

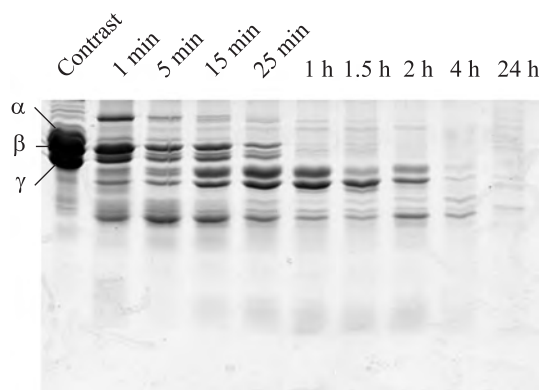


图5 纤溶酶对人血纤维蛋白降解图

Fig. 5 The figure of fibrinolytic enzyme hydrolyze human fibrin

2.6 纤溶酶最适作用温度和热稳定性

蛹拟青霉纤溶酶的最适作用温度是 41 °C, 温度在 33 °C–41 °C 范围内均表现出较好作用效果, 该范围涵盖人体正常生理体温(37 °C), 对该酶开发为溶栓剂药物十分有利(图 6)。随温度的升高, 酶促反应速度增加, 同时酶蛋白变性而失去活力的速度也迅速增加, 最适温度是这两种因素综合影响的结果。此外, 不同纤溶酶具有不同的作用方式, 在血纤维蛋白平板上形成不同状态的溶圈效果, 该纤溶酶在相对低温条件下(16 °C–41 °C), 更倾向于形成半透明溶圈, 可能由于在此温度范围内, 该酶对血纤维蛋白不同亚基降解速率不同所导致。从图 7 中可以看出, 该

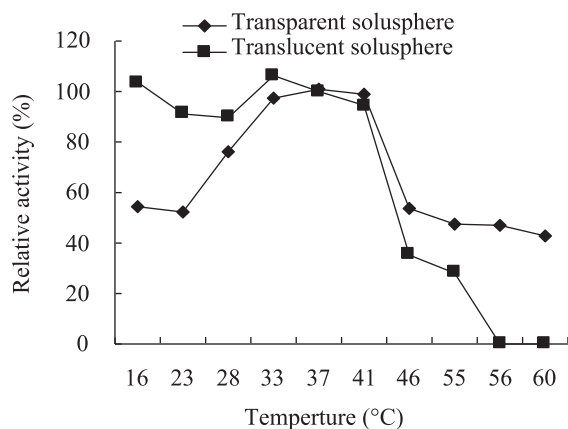


图6 纤溶酶最适作用温度

Fig. 6 Optimum temperature of the fibrinolytic enzyme

酶在相对低温条件下(33 °C 以下)较为稳定, 高温时失活较快(55 °C 以上)。其中在 42 °C 时酶活普遍较高, 因为此温度恰好为该纤溶酶最适作用温度, 可能由于实验中酶液冷却不彻底所致。

2.7 纤溶酶最适作用 pH 和 pH 稳定性

蛹拟青霉纤溶酶最适作用 pH 为 7.4, 在 pH 为 5.8–11.2 的范围内, 均表现出较好的作用效果, 如图 8 所示。此外, 该酶在碱性环境下作用效果明显优于酸性条件。纤溶酶在 pH 为 5.8–11.2 范围内比较稳定, 在此范围内该酶在碱性环境比在酸性环境中稳定。因此蛹拟青霉纤溶酶在中性偏碱环境中失活较慢, 据此推测该酶可能为碱性蛋白, 这一结论与 IEF 电泳结果相吻合(图 9)。

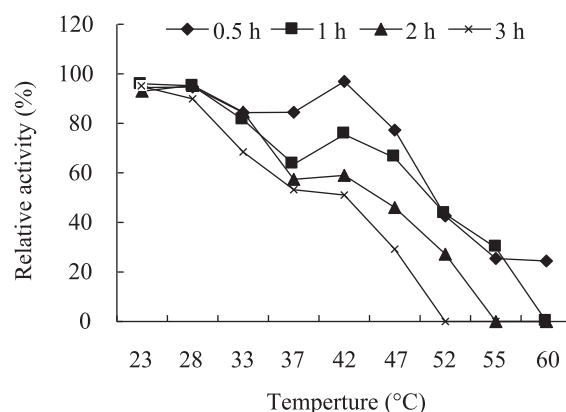


图7 纤溶酶温度稳定性

Fig. 7 Temperature stability of the fibrinolytic enzyme

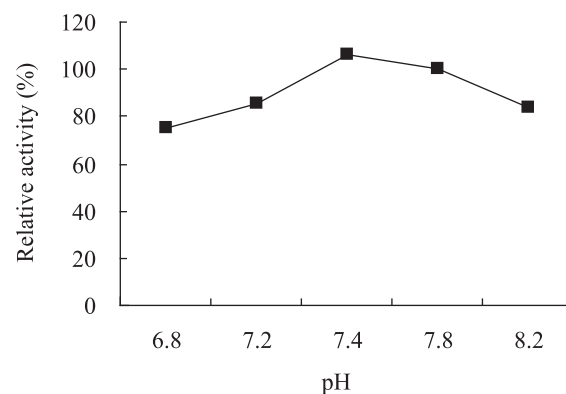


图8 纤溶酶最适 pH

Fig. 8 Optimum pH of the fibrinolytic enzyme

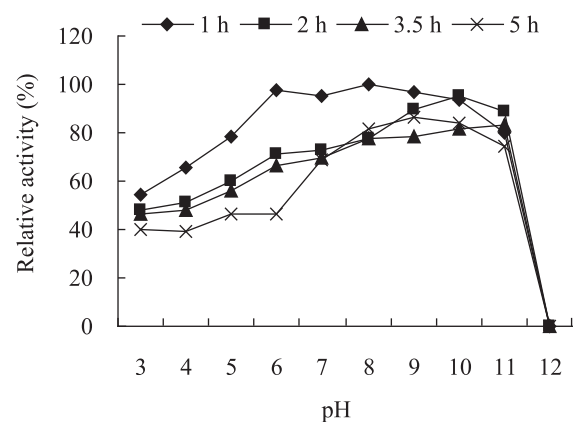


图 9 纤溶酶 pH 稳定性
Fig. 9 pH stability of the fibrinolytic enzyme

2.8 蛋白酶抑制剂对纤溶酶活力的影响

本实验选择的 EDTA-Na 抑制金属蛋白酶, PMSF (苯甲基磺酰氟)抑制丝氨酸蛋白酶和木瓜

蛋白酶, TPCK (N-甲苯磺酰 L-苯丙氨酸氯甲烷酮)抑制胰凝乳蛋白酶, Pepstatin 抑制胃蛋白酶, Aprotinine 抑制丝氨酸蛋白酶和三碱性多肽, SBTI 抑制大豆胰蛋白酶, 高浓度 Lys 抑制纤溶酶的活性。

由表 2 可以看出, PMSF 和 Aprotinine 两种抑制剂对蛹拟青霉纤溶酶有明显的抑制作用, 且抑制效果与抑制剂浓度及时间正相关, 由此推测, 蛹拟青霉纤溶酶可能为一种丝氨酸蛋白酶。此外, Pepstatin 和 SBTI 对该酶同样存在一定的抑制作用, 推测这种新型纤溶酶可能还存在与胃蛋白酶、大豆胰蛋白酶相似的活性部位。其他抑制剂对该纤溶酶均无明显的抑制作用。

表 2 蛋白酶抑制剂对蛹拟青霉纤溶酶活性的影响							
Table 2 Effect of inhibitor on the fibrinolytic enzyme from <i>Paecilomyces militaris</i>							
抑制剂浓度 Concentration of inhibitor (mmol/L)		相对酶活力		抑制剂浓度 Concentration of inhibitor (mmol/L)		相对酶活力	
		Relative activity (%)				Relative activity (%)	
		5 min	10 min			5 min	10 min
EDTA	5.0	106.62	87.97	PMSF	8.0	0	0
	2.5	112.76	103.68		4.0	38.30	0
Lys	5.0	94.22	92.13	Aprotinine	2.0	36.71	0
	2.5	103.28	115.13		8.0	0	0
TPCK	8.0	82.59	100.73	Pepstatin	4.0	24.19	0
	4.0	89.23	105.17		2.0	49.50	0
	2.0	89.85	83.25		4.0	33.68	0
SBTI	8.0	48.86	48.93	H ₂ O	2.0	34.15	0
	4.0	56.25	45.70		100	75.45	
	2.0	94.96	50.25		DMSO	64.21	52.76

参 考 文 献

[1] 王振义, 立家增, 阮长耿, 等. 血栓与止血基础理论与临床[M]. 上海: 科学技术出版社, 1996.
[2] 叶杰, 于金兰. 溶栓、抗凝在脑梗死中的应用研究进展[J]. 人民军医, 2004, 47(12): 738-739.
[3] Collen D, Stump DC, Gold HK. Thrombolytic therapy[J]. Annual Review of Medicine, 1988,

39(1): 405-423.
[4] Smalling RW. Molecular biology of plasminogen activators: what are the clinical implications of drug design?[J]. The American Journal of Cardiology, 1996, 78(12): 2-7.
[5] Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. Introductory Mycology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002.
[6] 赵荣艳, 段毅, 郜俊红. 蛹虫草的研究和产品开

- 发进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(24): 6528-6529.
- [7] 梁宗琦. 蛹虫草无性型——蛹草拟青霉的确证[J]. 食用菌学报, 2001, 8(4): 28-32.
- [8] 秦建春, 李晓明, 张鞍灵, 等. 蛹虫草发酵液抗菌活性初步研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(2): 402-406.
- [9] 刘春泉, 宋江峰, 李大婧, 等. 北冬虫夏草多糖组分的分离纯化及结构研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 370-373.
- [10] 齐齐哈尔大学. 一种真菌纤溶酶及其培制方法: 中国, 200810137564.4[P]. 2009-08-12. <http://www.soopat.com/Patent/200810137564>.
- [11] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40(2): 346-351.
- [12] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [13] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [14] 王重庆, 李云兰, 李德昌. 高级生物化学实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [15] Koh YS, Chung KH, Kim DS. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom[J]. Toxcion, 2001, 39(4): 555-560.
- [16] 郑宏臣. 脉孢霉纤溶酶的分离纯化和酶学性质研究[D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔大学硕士学位论文, 2009.
- [17] Matsubara K, Hori K, Matsuura Y, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 125(1): 137-143.
- [18] Chang CT, Fan MH, Kuo FC, et al. Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3210-3216.
- [19] Kim JK, Sapkota K, Park SE, et al. A fibrinolytic enzyme from the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*[J]. The Journal of Microbiology, 2006, 44(6): 622-631.
- [20] 埃蒂安纳, 吴自荣. 新的纤溶酶产生菌培养条件及其酶学性质研究[J]. 生物技术, 2002, 12(2): 7-10.
- [21] 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[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(1): 85-90.
- [22] Li HP, Hu Z, Yuan JL, et al. A novel extracellular protease with fibrinolytic activity from the culture supernatant of *Cordyceps sinensis*: purification and characterization[J]. Phytotherapy Research, 2007, 21(12): 1234-1241.
- [23] Bello CA, Hermogenes ALN, Magalhaes A, et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom[J]. Biochimie, 2006, 88(2): 189-200.
- [24] Deng ZH, Wang SH, Li Q, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from the polychaete, *Neanthes japonica* (Iznka)[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(6): 1954-1960.
- [25] Wu B, Wu LC, Chen DJ, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CPCC 480097[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(3): 451-459.
- [26] Choi NS, Song JJ, Chung MD, et al. Purification and characterization of a novel thermoacid-stable fibrinolytic enzyme from *Staphylococcus* sp. Strain AJ isolated from Korean salt-fermented Anchovy-joet[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(3): 417-426.