

## 研究报告



## 冬虫夏草固态培养菌丝中纤溶酶的纯化和酶学性质

臧琬婷 梅余霞\* 梁运祥

华中农业大学生命科学技术学院 微生物农药国家工程研究中心 湖北 武汉 430070

**摘要:**【背景】血栓性疾病发病率逐年递增,发病人群呈现低龄化趋势,严重地影响着人们的身心健康。因此研发高效、安全、特异性强的溶栓药物具有重要的意义,是血栓性疾病预防与治疗研究领域的热点。【目的】对冬虫夏草菌丝固态培养过程中产生的纤溶酶进行分离纯化,并对纯化的纤溶酶进行酶学性质分析。【方法】通过硫酸铵盐析、阳离子交换色谱和 Superdex 75 凝胶过滤色谱分离纯化虫草纤溶酶。采用 Bradford 法测定样品中总蛋白质浓度,纤维蛋白平板法测定纤溶酶活性,Native-PAGE 检测纯度,SDS-PAGE 测定相对分子量。【结果】在固态培养中冬虫夏草菌丝可以产生至少两种纤溶酶,分别命名为 OSP-1 和 OSP-2。纯化后 OSP-1 比活力达到 4 186.25 U/mg,纯化倍数为 41.69 倍。OSP-1 由两个亚基构成,相对分子量分别为 27.60 kD 和 23.83 kD,是一种丝氨酸蛋白酶。酶学性质分析表明,该酶最适作用温度为 40 °C,最适 pH 为 4.0。Cu<sup>2+</sup>可促进 OSP-1 酶活,而 Zn<sup>2+</sup>会抑制酶活。除了具有较高的纤溶酶活性,OSP-1 还可发挥激活纤维蛋白酶原的作用。在水解纤维蛋白酶原的过程中,该酶可依次降解  $\gamma$ 、A $\alpha$ 、B $\beta$  链。【结论】研究发现的 OSP-1 具有开发成新型溶栓药物的潜力。

**关键词:** 冬虫夏草, 纤溶酶, 分离纯化, 酶学性质

Purification and characterization of *Ophiocordyceps sinensis* plasmin from solid culture mycelia

ZANG Wan-Ting MEI Yu-Xia\* LIANG Yun-Xiang

College of Life Science and Technology, National Engineering Research Center of Microbial Pesticides, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China

**Abstract:** [Background] In recent years, thrombotic diseases have seriously affected people's health even at younger age. The research of efficient, safe and specific thrombolytic drugs will be of great significance to human health. [Objective] To establish a method for separation and purification of plasmin produced by *Ophiocordyceps sinensis* from solid culture, and to analyze the enzymatic properties of purified plasmin. [Methods] *Ophiocordyceps sinensis* plasmin was separated by ammonium sulfate salting-out, HiTrap SP cation exchange chromatography and Superdex 75 gel filtration chromatography. The protein concentration was determined by Bradford method, the plasmin activity was determined by the fibrin plate method, the purity was determined by Native-PAGE, and the relative molecular weight was determined by

**Foundation item:** Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2662015PX199)

\*Corresponding author: Tel: 86-27-87287254; E-mail: mei@mail.hzau.edu.cn

Received: 14-04-2019; Accepted: 09-08-2019; Published online: 04-12-2019

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2662015PX199)

\*通信作者: Tel: 027-87287254; E-mail: mei@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2019-04-14; 接受日期: 2019-08-09; 网络首发日期: 2019-12-04

SDS-PAGE. **[Results]** In solid culture, *Ophiocordyceps sinensis* mycelia could produce at least two plasmins, wherein the purified OSP-1 specific activity reached 4 186.25 U/mg, the purification factor was 41.69 times. OSP-1, a serine protease, is composed of two subunits with relative molecular weights of 27.60 kD and 23.83 kD respectively. The optimum temperature and pH of the enzyme were 40 °C and 4.0, respectively.  $\text{Cu}^{2+}$  promotes OSP-1 activity, while  $\text{Zn}^{2+}$  inhibits enzyme activity. It was also found that OSP-1 not only displayed the ability to degrade fibrin but also activated plasminogen. The enzyme sequentially degrades the  $\gamma$  chain, the A $\alpha$  chain, and the B $\beta$  chain in the process of hydrolyzing fibrin. **[Conclusion]** The above results provide a theoretical basis for the development of the enzyme into a new thrombolytic drug.

**Keywords:** *Ophiocordyceps sinensis*, Plasmin, Separation and purification, Enzymatic properties

随着人口老龄化趋势日益严重,以及人们生活方式和饮食习惯的改变,血栓栓塞性疾病成为全球性的重大健康问题,已经成为导致全球人口死亡的首要原因<sup>[1]</sup>。我国居民心血管疾病发病率持续上升,发病人群呈现低龄化趋势,推测 2017 年脑卒中患者多达 1 300 万<sup>[2]</sup>,其中最严重的急性缺血性脑卒中发病迅速,发病后的一年内致死/致残率甚至高达 33.8%<sup>[3]</sup>。因此,在血栓病治疗的过程中,选用快速有效的溶栓药物是重中之重。目前我国临床上使用的溶栓药物主要有重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)尿激酶和替奈普酶<sup>[3]</sup>,这两种药物虽然药效好,但是禁忌症多、预后差且价格昂贵,因此寻找和开发安全高效的溶栓药物仍然是研究者们关注的焦点。纤溶酶是指能够专一性降解纤维蛋白凝胶的蛋白水解酶,在动物、植物、微生物中均广泛存在,其中微生物来源的纤溶酶因菌株生长速度快、易于通过发酵条件的控制来获得大量目标产物而成为重点研发对象。

冬虫夏草是一种寄生在昆虫体内的子囊真菌,主要分布在海拔 3–5 km 的高原草甸,与人参、鹿茸并称中国传统名贵药材,具有抗炎<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>等多种药用功效。广义范围的虫草属真菌有 400 余种之多,研究人员已经从中分离得到多种酶学性质不同的纤溶酶。例如,张雯舒等从蛹虫草无性型深层培养液中分离得到纯化的纤溶酶,该酶是一种 32 kD 的丝氨酸蛋白酶,最适作用温度及 pH 值分别为 41 °C 和 7.4,纯化后的比活力为

800.46 U/mg<sup>[7]</sup>,而 Liu 等以深层发酵法培养蛹虫草,分离得到由分子量分别为 28 kD 和 24.5 kD 的两个亚基组成的纤溶酶,最适温度及 pH 值分别为 37 °C 和 7.2<sup>[8]</sup>。本研究将以固态培养的虫草菌丝作为研究对象,分离纯化得到虫草纤溶酶,并对纯化的纤溶酶进行酶学性质分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

菌种为华中农业大学微生物农药工程研究中心保藏的冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*),菌株编号为 FJ-01。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

牛血纤维蛋白原, Coolaber 公司; 琼脂糖, Hydragene 公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳所用试剂, Beyotime 公司; 蛋白 Marker, 北京聚合美公司; 蛋白酶抑制剂 PMSF、EDTA- $\text{Na}^+$ 、Aprotinin、Pepstatin A, TargetMol 公司; 其余试剂均为国产分析纯。HiTrap SP (5 mL)阳离子交换柱、Superdex 75 10/300 GL 凝胶柱色谱柱, GE 公司; 高速冷冻离心机、全波长酶标仪, ThermoFisher 公司; 蛋白纯化系统, Bio-Rad 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 纤溶酶活力测定

纤溶酶活力的测定采用 Astrup 等建立的纤维蛋白平板法<sup>[9]</sup>,缓冲液使用 pH 7.4 的 PBS 溶液,平板制作完成后先在 37 °C 环境中孵育 30 min,再在

80 °C 环境中保温 30 min, 使内源性纤溶酶原灭活, 以达到真实反映溶解纤维蛋白能力的目的; 待测液体在 37 °C 条件下反应 18 h, 测量透明圈直径, 计算酶活力。

1.2.2 蛋白质浓度测定

采用 Bradford 法<sup>[10]</sup>测定样品中总蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为标准蛋白, 检测 595 nm 处吸光值。

1.2.3 纤溶酶液制备与纯化

用生理盐水将新鲜的固态培养的虫草菌丝与培养基共同制成固液比为 1:10 (质量体积比)的匀浆, 在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 30 min, 取上清液备用。

将离心得到的酶提取液先进行 40%硫酸铵盐析, 4 °C 环境静置 12 h, 使其充分进行盐析, 在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液, 将硫酸铵饱和度提高至 70%, 在 4 °C 环境静置 12 h, 再次充分盐析, 盐析结束后在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 20 min, 取蛋白质沉淀, 用生理盐水复溶后备用。将样品经过 0.22 μm 孔径的滤膜后进行 HiTrap SP 阳离子交换色谱, 上样量为 1 mL, 流速为 5 mL/min, 先用 20 mmol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 6.0)洗脱, 再用含 1 mol/L NaCl 的 20 mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.0)进行洗脱, 收集活性组分并用超滤管进行浓缩。最后经过 Superdex 75 凝胶过滤

色谱进行最后一步分离, 用含 0.15 mol/L NaCl 的 50 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.0)以 0.2 mL/min 的流速进行洗脱, 收集活性组分并超滤浓缩, 检测纤溶酶纯度。

1.2.4 纤溶酶纯度测定和分子量测定

采用 Native-PAGE 电泳法, 通过观察电泳后样品是否呈单一条带来判断样品纯度; 采用 SDS-PAGE 电泳法, 测量蛋白 Marker 条带的迁移率 (蛋白条带到点样孔的距离/溴酚蓝条带到点样孔的距离×100%), 建立迁移率与分子量的对数之间的线性关系, 即可计算目的分子的分子量大小。

1.2.5 最适作用温度和热稳定性

分别在 25、30、35、40、45 °C 环境中以纤维蛋白平板法测定纤溶酶活力, 探究最适作用温度。在热稳定性实验中, 将待测酶液分别在 40、45、50、55、60、65 °C 水浴中保温 20、40、60 min, 然后在 37 °C 条件下检测纤溶酶活力, 以未经过保温的样品作对照。

1.2.6 最适作用 pH

为探究目的酶的最适 pH 值, 采用 3 种不同的缓冲体系(pH 3.0–10.0), 与待测酶液 1:1 (体积比)混合, 37 °C 条件下以纤维蛋白平板法测定纤溶酶活力。为避免液体混合后 pH 值改变对结果的影响, 在配制缓冲液时, 实际 pH 值与目的 pH 值对应关系如表 1 所示。

表 1 梯度 pH 缓冲液配制表  
Table 1 Preparations of gradient pH buffers

缓冲液	目的 pH 值	实际 pH 值
Buffer solution (0.05 mol/L)	Objective pH value	Actual pH value
柠檬酸-柠檬酸钠 Citric acid-sodium citrate	3.00	2.20
	4.00	3.30
	5.00	4.40
	6.00	5.50
Tris-HCl	6.00	1.55
	7.00	7.75
	8.00	8.85
碳酸钠-碳酸氢钠 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -NaHCO <sub>3</sub>	8.00	10.20
	9.00	10.50
	10.00	11.55

### 1.2.7 金属离子和酶抑制剂对纤溶酶活力的影响

分别用超纯水配制 4 mmol/L 的 KCl、CaCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、AlCl<sub>3</sub>、MnSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub>、CuSO<sub>4</sub>、BaCl<sub>2</sub>、ZnSO<sub>4</sub> 水溶液,将金属离子溶液分别与待测酶液 1:1 (体积比)混合,以超纯水作对照检测纤溶酶活力。使用超纯水配制 5 mmol/L 的 EDTA;用 DMSO 配制 1 mmol/L 的 Pepstatin A;用无水乙醇配制 1 mmol/L 的 PMSF;用超纯水配制 1 mg/mL 的 Aprotinin。将蛋白酶抑制剂分别与待测酶液 1:1 (体积比)混合,以各蛋白酶抑制剂所用的溶剂做空白对照,检测纤溶酶活力。

### 1.2.8 激酶活性及纤溶酶活性检测

在制备纤维蛋白平板时,除去在 80 °C 保温 30 min 这一步骤,保留原有纤溶酶原的平板称为阳性平板,用于检测目的酶是否具有激酶活性;1.2.1 中描述的平板为阴性平板,用于检测纤溶酶活性。

### 1.2.9 纤维蛋白原水解活性分析

将 1 mg 牛血纤维蛋白原和 10  $\mu$ L 待测酶液溶解于 800  $\mu$ L 20 mmol/L PBS (pH 7.4)缓冲液中,置于 37 °C 恒温水浴中计时,分别在保温 0、5、10、30、60、120、240、360、480 min 时取出 40  $\mu$ L,放置于 -20 °C 终止反应。然后将保温不同时间的样品进行 SDS-PAGE 电泳分析,观察纤维蛋白原 A $\alpha$ 、B $\beta$ 、 $\gamma$  链的降解情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤溶酶纯化结果

#### 2.1.1 硫酸铵盐析

使用不同饱和度硫酸铵溶液处理固态培养的虫草菌丝纤溶酶提取液,充分盐析后离心取上清液检测残余酶活。结果表明,硫酸铵饱和度在 40% 以下时,上清液中纤溶酶活力变化不明显,饱和度超过 40% 时残余酶活急速下降;饱和度达到 70% 时,提取液中绝大部分纤溶酶形成沉淀(图 1)。因此在分离过程中,先使用 40% 饱和度的硫酸铵溶液除去杂蛋白,再用 70% 饱和度的硫酸铵溶液使纤溶酶析出。

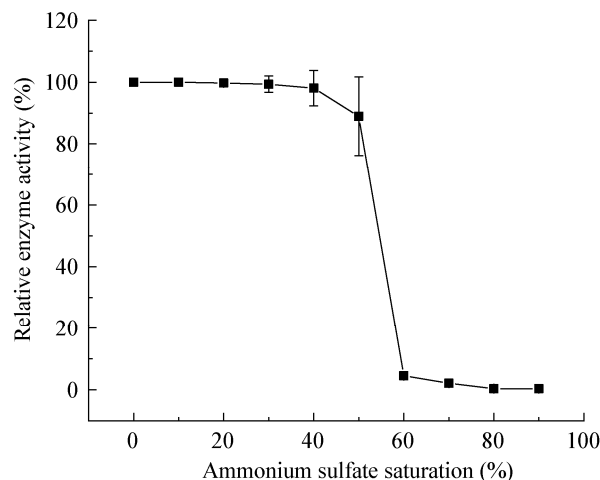


图 1 不同硫酸铵饱和度上清液中残余的纤溶酶活力

Figure 1 Residual plasmin activity in different ammonium sulfate saturation supernatants

#### 2.1.2 阳离子交换色谱

采用 HiTrap SP 阳离子交换柱对盐析后的酶液进行分离,检测各峰对应组分的纤溶酶活性。结果(图 2)显示,洗脱曲线在第 60 s 和第 330 s 分别出峰(图中箭头指示位置),经检测具有纤溶酶活力,依次命名为 OSP-1 (*Ophiocordyceps sinensis* plasmin-1) 和 OSP-2 (*Ophiocordyceps sinensis* plasmin-2), OSP-1 含量较多,比活力为 2 309.96 U/mg, OSP-2 含量极少,比活力为 2 635.81 U/mg。

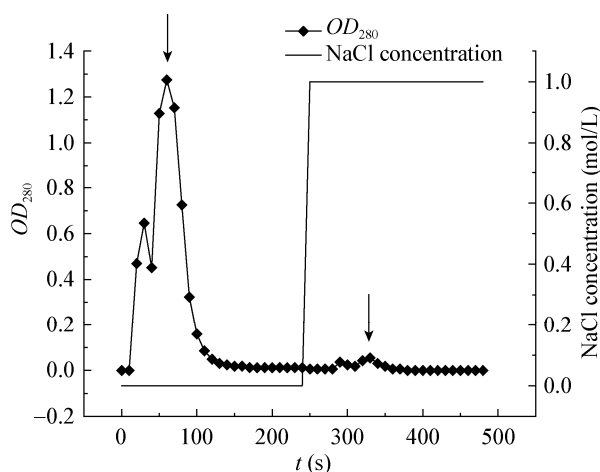


图 2 HiTrap SP 阳离子交换柱洗脱曲线

Figure 2 HiTrap SP cation exchange column elution curve

2.1.3 Superdex 75 凝胶色谱

鉴于 OSP-1 含量较多, OSP-2 含量极少, 仅对 OSP-1 进行进一步纯化。采用 Superdex 75 凝胶柱对浓缩后的 OSP-1 收集液进行分离, 然后对各峰对应的组分进行检测, 保留时间 1.32 h 左右时的峰(图 3 中箭头指示位置)具有纤溶酶活性, 收集该峰对应组分并超滤浓缩, 得到纯化的 OSP-1。

经过硫酸铵盐析、阳离子交换色谱、凝胶过滤色谱, 最终得到纯化的虫草纤溶酶 OSP-1, 比活力为 4 186.25 U/mg, 总纯化倍数为 41.69 倍(表 2)。

2.2 酶学性质分析

2.2.1 OSP-1 样品纯度检验

经 Native-PAGE 检测, OSP-1 的 Superdex 75 收集液呈单一条带(图 4), 表明样品具有较高的纯度。

2.2.2 OSP-1 的分子量大小的测定

根据 SDS-PAGE 电泳的原理可知, 待测蛋白质

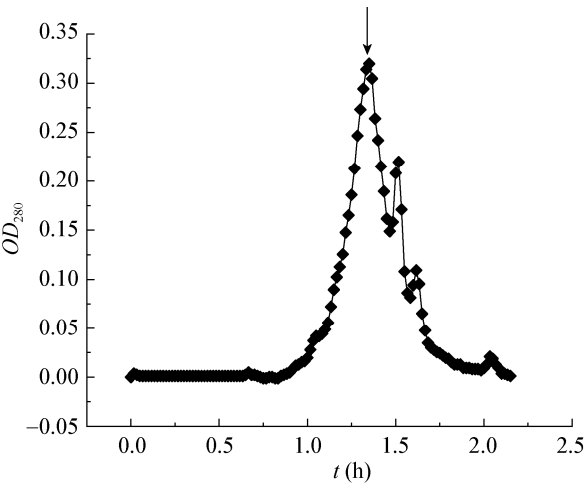


图 3 OSP-1 Superdex 75 凝胶柱洗脱曲线  
Figure 3 OSP-1 Superdex 75 gel column elution curve

表 2 虫草固态培养菌丝体中 OSP-1 纯化结果

Table 2 Purification table of OSP-1 from *Ophiocordyceps sinensis* hyphae

分离步骤 Purification step	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (U)	回收率 Recovery rate (%)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Folds
粗酶液 Crude extracts	6 877.50	690 637.50	100.00	100.42	1.00
盐析 Salted out	22.26	41 465.95	0.06	1 862.47	18.55
阳离子交换色谱 HiTrap SP	3.40	7 865.19	0.01	2 309.96	23.00
凝胶过滤色谱 Superdex 75	1.18	4 925.38	0.01	4 186.25	41.69

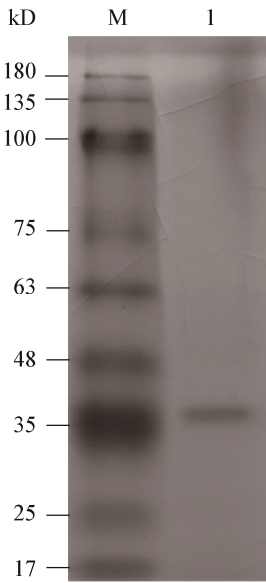


图 4 Native-PAGE 检测样品纯度  
Figure 4 Native-PAGE detection of sample purity  
Note: M: Protein marker; 1: Target protein.

的三维结构被打开为肽链, 蛋白质的不同亚基也随之分离。前述 Native-PAGE 实验中, 已经检测到样品为单一组分, 因此 SDS-PAGE 电泳中显示的两条带为该酶两个亚基(图 5)。

根据图 5 的结果在蛋白 Marker 条带的迁移率和分子量的对数之间建立线性关系(图 6), 拟合得到线性方程  $\lg Mr = 2.221\ 3 - 1.326\ 7X$ ,  $R^2 = 0.968\ 4$ 。目的蛋白两个亚基的迁移率分别为 58.8%和 63.6%, 代入到线性方程中计算, 可知 OSP-1 两亚基的分子量分别为 27.60 kD 和 23.83 kD。

2.2.3 OSP-1 的最适作用温度和热稳定性

采用纤维蛋白平板法研究不同温度对 OSP-1 酶活力的影响(图 7), 结果表明酶活力随环境温度升

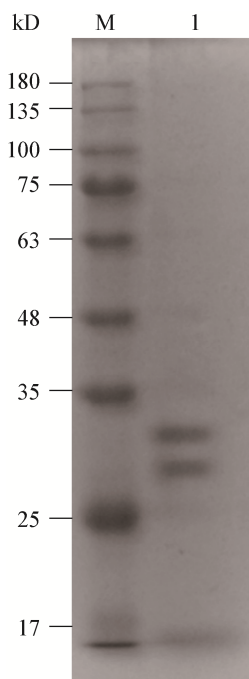


图5 SDS-PAGE 检测目的酶分子量大小

Figure 5 Detection of molecular weight of target enzyme by SDS-PAGE

Note: M: Protein marker; 1: Target enzyme.

高出现逐渐增加的趋势,在 35–40 °C 范围内表现出良好的水解纤维蛋白的能力,当环境温度超过 40 °C 以后,该酶的相对活性大幅下降,因此推测 40 °C 左右是该酶的最适温度,该温度与人体正常生理体温(37 °C)接近。

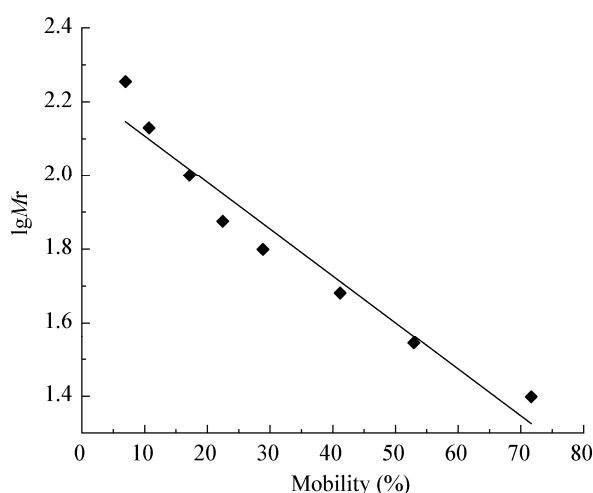


图6 SDS-PAGE 测蛋白质分子量标准曲线

Figure 6 SDS-PAGE standard curve for protein molecular weight measurement

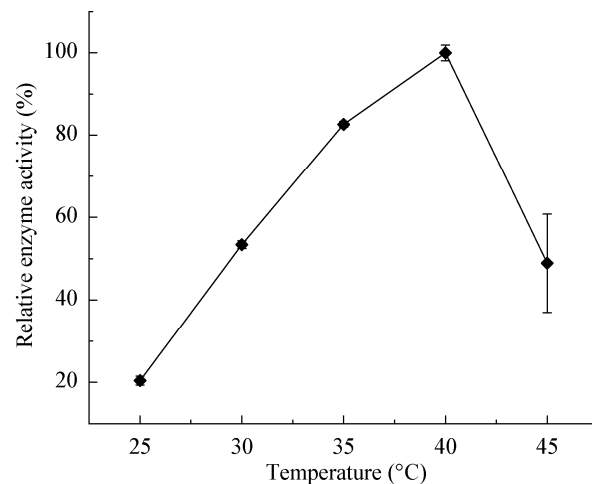


图7 OSP-1 的最适作用温度

Figure 7 Optimal temperature of OSP-1

在热稳定性实验中,将待测酶液分别在 40、45、50、55、60、65 °C 水浴中保温 20、40、60 min 后,以未经处理的酶液作对照组,37 °C 条件下检测残余酶活,结果如图 8 所示,保温温度对酶活力的影响大于保温时间对酶活力的影响:OSP-1 在 40 °C 水浴中保温 20 min 时酶活降低至 78.14%,当保温时间延长至 60 min 时,酶活仅有对照组的 50.89%;随温度继续升高,OSP-1 的酶活力大幅下降,当温度升高到 50 °C 时,保温 20 min 后酶活力仅有对照组的 12.49%;当处理温度升高到 60 °C 时,OSP-1 的活力几乎完全消失。

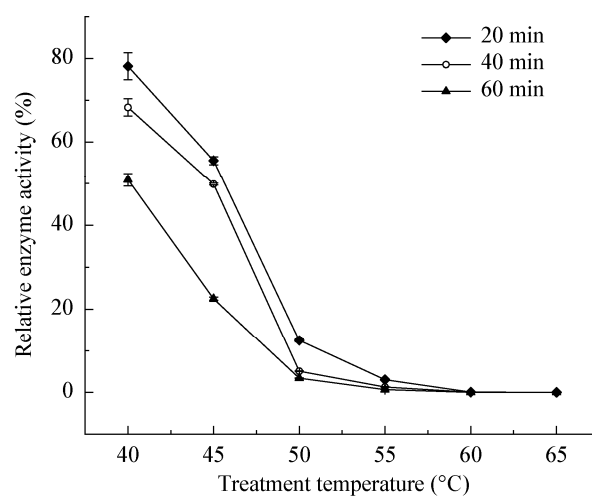


图8 OSP-1 的热稳定性

Figure 8 Thermal stability of OSP-1

综合温度对酶促反应的影响和高温环境对酶稳定性的影响两个实验结果可以得知,当环境温度低于 40 °C,OSP-1 的纤溶酶活力随温度升高呈现逐渐增加的趋势,此时温度的升高能使酶促反应加快;当环境温度超过 40 °C 以后,高温会使 OSP-1 的分子结构发生一定改变,导致活力降低。

#### 2.2.4 OSP-1 的最适作用 pH

采用 3 种不同的缓冲体系共同设置 pH 梯度,相邻的两种体系有一个 pH 单位的重复。采用纤维蛋白平板法,37 °C 条件下检测 OSP-1 的纤溶酶活性。结果表明,OSP-1 在 pH 3.0–10.0 的范围内均可表现出较高的酶活力,但是酸性条件下的活力显著高于碱性条件,并在 pH 为 4.0 时酶活力最高,为 pH 7.0 时的 127.45% (图 9)。推测 OSP-1 是一种酸性蛋白酶,其最适 pH 为 4.0。

#### 2.2.5 金属离子对 OSP-1 酶活力的影响

在探究金属离子对 OSP-1 酶活力影响的实验中,所有金属离子在检测体系中的终浓度均为 2 mmol/L,结果表明,反应体系中含有  $\text{Cu}^{2+}$  时 OSP-1 的相对酶活为 137.42%,表现为激活作用;除  $\text{Cu}^{2+}$  以外, $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  也具有促进 OSP-1 酶活的作用,相对酶活分别达到了 114.28% 和 106.84%;但  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  则不同程度地抑制了 OSP-1 的活性,相对酶活分别下降至 71.32%、83.67%、88.89% (图 10)。

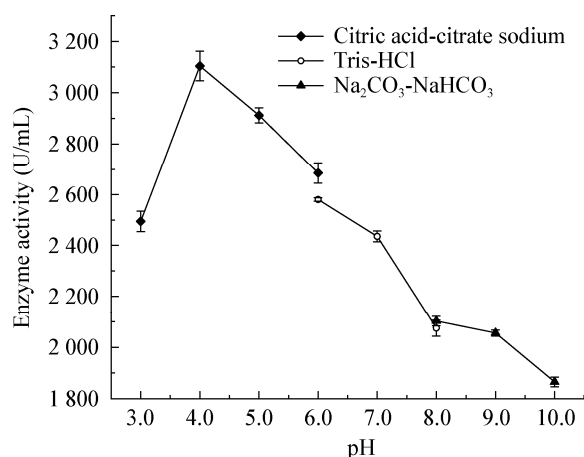


图 9 OSP-1 最适作用 pH

Figure 9 Optimal pH of OSP-1

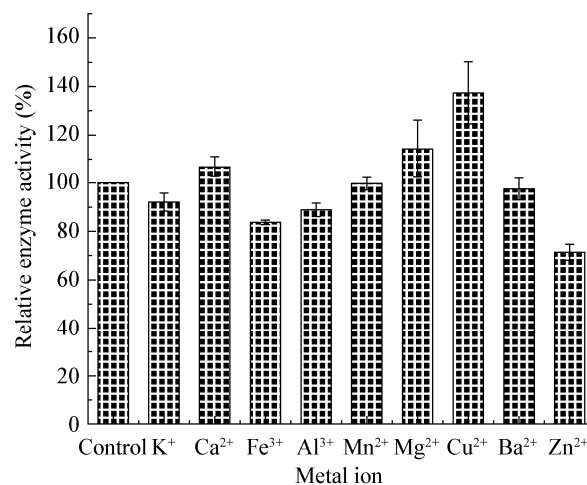


图 10 金属离子对 OSP-1 酶活力的影响

Figure 10 Effect of metal ions on OSP-1 enzyme activity

#### 2.2.6 蛋白酶抑制剂对 OSP-1 的影响

实验选择的 PMSF 可抑制丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶<sup>[11]</sup>,抑肽酶(aprotinin)抑制丝氨酸蛋白酶和胰蛋白酶<sup>[12]</sup>,EDTA- $\text{Na}^+$ 抑制金属蛋白酶,胃酶抑素 A (pepstatin A)能抑制天冬氨酰蛋白酶<sup>[13]</sup>。实验结果表明,PMSF 和抑肽酶对 OSP-1 有明显的抑制作用,而 EDTA 和胃酶抑素 A 对酶活力几乎没有影响(图 11),由此推测该酶可能是一种丝氨酸蛋白酶。

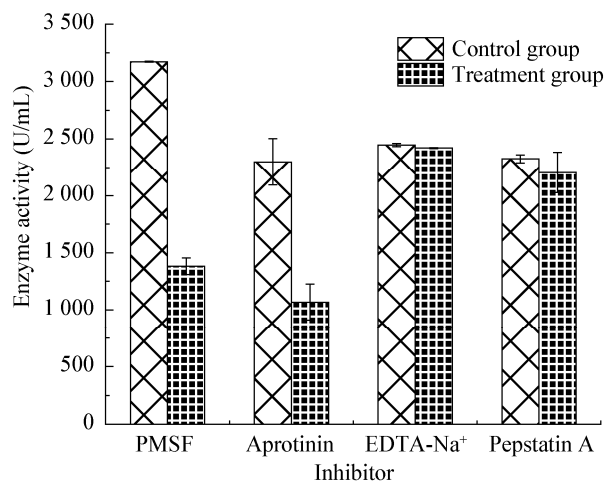


图 11 蛋白酶抑制剂对 OSP-1 酶活力的影响

Figure 11 Effect of protease inhibitors on OSP-1 enzyme activity



### 2.2.7 OSP-1 的激酶活性和纤溶酶活性检测

由于大多数购买到的血纤维蛋白商品中均含有一少部分内源性的纤维蛋白溶酶原, 在受到激酶的影响后可被激活为纤溶酶, 从而展现出纤溶酶活性。分别使用阳性纤维蛋白平板和阴性纤维蛋白平板检测 OSP-1 活性的结果显示, OSP-1 在阳性平板中的活性略高于阴性平板中的活性(图 12), 由此可推测 OSP-1 可能同时具有激酶活性和纤溶酶活性, 可以激活平板中原有的纤维蛋白溶酶原。

### 2.2.8 OSP-1 的纤维蛋白水解活性分析

由图 13 可以看出, 纤维蛋白由 A $\alpha$ 、B $\beta$  和  $\gamma$  链组成, 在反应进行至第 30 min 时,  $\gamma$  链被完全降解, 120 min 内 A $\alpha$  链被完全降解, 360 min 内 B $\beta$  链被完全降解。

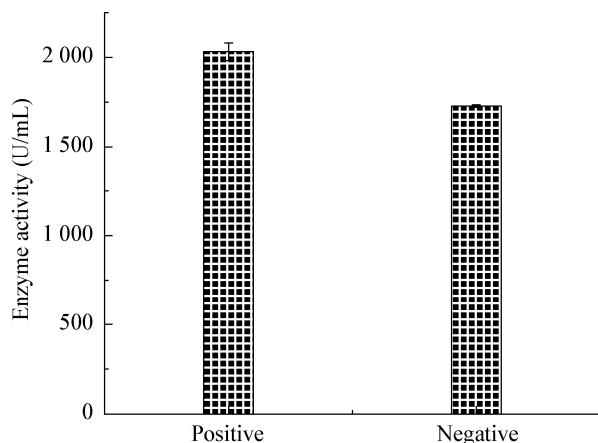


图 12 OSP-1 的激酶活性和纤溶酶活性

Figure 12 OSP-1 kinase activity and plasmin activity

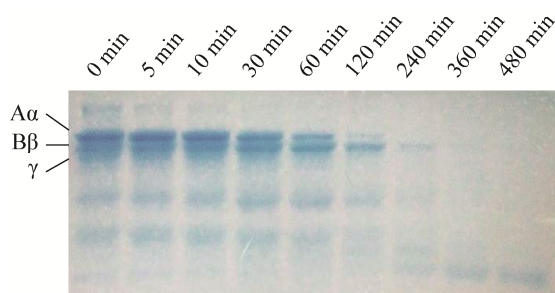


图 13 OSP-1 对牛血纤维蛋白原水解活性

Figure 13 Hydrolysis activity of OSP-1 to bovine blood fibrinogen

## 3 讨论与结论

本研究对冬虫夏草固态发酵培养物的纤溶酶进行了分离纯化, 通过阳离子交换色谱方法显示至少产生了两种纤溶酶 OSP-1 和 OSP-2, 在文献报道中, 从一种微生物中分离得到两种纤溶酶的情况并不少见: 张雯舒等<sup>[7]</sup>在蛹虫草无性型深层培养液中分离得到两种纤溶酶; 袁慎亮等<sup>[14]</sup>在沙福芽孢杆菌中分离出两种分子量分别为 33 kD 和 23 kD 的纤溶酶。本文对含量较多的 OSP-1 进行了纯化和酶学性质分析, 提纯后比活力为 4 186.25 U/mg, 是张雯舒等发现的蛹虫草纤溶酶(800.46 U/mg)<sup>[7]</sup>的 5.23 倍。

我们进一步的研究结果表明 OSP-1 由两个亚基组成, 是一种酸性丝氨酸蛋白酶, 能高效水解纤维蛋白原中 A $\alpha$ 、B $\beta$ 、 $\gamma$  链, 并且具有激酶活性, 说明 OSP-1 既可以溶解血栓中的纤维蛋白, 又可以预防血管内血栓的形成, 具有作为溶栓剂和抗凝剂的潜力; OSP-1 在 35–40 °C 具有较高的纤溶酶活力, 在 pH 3.0–10.0 范围内均可发挥纤溶作用, 并在 pH 4.0 时具有最大酶活, 而之前报道的大多数真菌来源的纤溶酶仅在 pH 7.0 左右发挥活力<sup>[15–17]</sup>; 反应体系中含有 Cu<sup>2+</sup>时, OSP-1 的相对酶活为 137.42%, 表现为激活作用。刘娜等的研究发现, 黑根霉中分离得到的酸性蛋白酶在含有 Cu<sup>2+</sup>的环境中, 相对酶活可达到 120%<sup>[18]</sup>; 但在 Choi 等的研究中, Cu<sup>2+</sup>使猴头菇菌丝中的纤溶酶活力受到抑制, 相对活性下降至 50%以下<sup>[19]</sup>。可见, 同一种金属离子对不同的纤溶酶会产生不同的激活或抑制作用。在文献报道中, 能够高效降解纤维蛋白原  $\gamma$  链的纤溶酶并不常见, 大多数纤溶酶首先降解 A $\alpha$  链, 其次是 B $\beta$  链, 最后降解  $\gamma$  链, 甚至有些纤溶酶不能降解  $\gamma$  链<sup>[15–17]</sup>。因此, 本实验结果表明 OSP-1 在水解纤维蛋白过程中, 有其他来源的纤溶酶无法替代的作用, 值得进一步研究。

目前, 已经商品化的蛇毒来源纤溶酶注射剂尽管能在血栓治疗中发挥良好作用, 但价格昂贵、成分复杂, 临床使用有一定风险, 而真菌来源的纤溶



酶还没有正式投入常规的血栓治疗<sup>[20]</sup>。因此,寻找高效、低价的纤溶酶仍是研究热点。本研究发现的OSP-1 是一种高效的酸性丝氨酸蛋白酶,其发挥最佳活力的条件符合人体内环境,可能具有开发成溶栓药物的潜力。

## REFERENCES

- [1] Expert Committee on the Guidelines for the Prevention and Treatment of Thrombotic Diseases in China. Guidelines for prevention and treatment of thrombotic diseases in China[J]. National Medical Journal of China, 2018, 98(36): 2861-2888 (in Chinese)  
《中国血栓性疾病防治指南》专家委员会. 中国血栓性疾病防治指南[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(36): 2861-2888
- [2] Chen WW, Gao RL, Liu LS, et al. Summary of <China cardiovascular disease report 2017>[J]. Chinese Circulation Journal, 2018, 33(1): 1-8 (in Chinese)  
陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1): 1-8
- [3] Society of Neurology, Chinese Medical Association, Cerebrovascular Disease Group, Society of Neurology, Chinese Medical Association. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of acute ischemic stroke 2018[J]. Chinese Journal of Neurology, 2018, 51(9): 666-682 (in Chinese)  
中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 666-682
- [4] Qian GM, Pan GF, Guo JY. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis*[J]. Natural Product Research, 2012, 26(24): 2358-2362
- [5] Yalin W, Ishurd O, Sun CR, et al. Structure analysis and antitumor activity of (1→3)-β-D-glucans (cordyglucans) from the mycelia of *Cordyceps sinensis*[J]. Planta Medica, 2005, 71(4): 381-384
- [6] Li SP, Li P, Dong TTX, et al. Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps* mycelia[J]. Phytomedicine, 2001, 8(3): 207-212
- [7] Zhang WS, Liu XL, Zheng XQ, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces militaris*[J]. Microbiology China, 2012, 39(12): 1787-1795 (in Chinese)  
张雯舒, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2012, 39(12): 1787-1795
- [8] Liu XL, Kopparapu NK, Li Y, et al. Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 94: 793-801
- [9] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40(2): 346-351
- [10] Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation[A]//Walker JM. New Protein Techniques[M]. New York: Humana Press, 1988
- [11] James GT. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers[J]. Analytical Biochemistry, 1978, 86(2): 574-579
- [12] Mahdy AM, Webster NR. Perioperative systemic haemostatic agents[J]. British Journal of Anaesthesia, 2004, 93(6): 842-858
- [13] Marciniszy J Jr, Hartsuck JA, Tang J. Mode of inhibition of acid proteases by pepstatin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1976, 251(22): 7088-7094
- [14] Yuan SL, Xing DM, Dou SH, et al. Isolation and identification of a fibrinolytic enzyme producing bacterium and its analysis of the fibrinolytic components[J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1843-1849 (in Chinese)  
袁慎亮, 邢德明, 窦少华, 等. 一株产纤溶酶菌株的分离鉴定及其纤溶组分分析[J]. 微生物学通报, 2014, 41(9): 1843-1849
- [15] Liu XL, Kopparapu NK, Zheng HC, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from the food-grade fungus, *Neurospora sitophila*[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 134: 98-104
- [16] Lv FX, Zhang C, Guo FF, et al. Expression, purification, and characterization of a recombinant fibrinolytic enzyme from endophytic *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 in *Escherichia coli*[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(1): 125-131
- [17] Jeong SJ, Cho KM, Lee CK, et al. Overexpression of *aprE2*, a fibrinolytic enzyme gene from *Bacillus subtilis* CH3-5, in *Escherichia coli* and the properties of AprE2[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(7): 969-978
- [18] Liu N, Zhang MX, Wang Y. Effects of different concentrations of metal ions on the acid protease activity[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(32): 18043-18044 (in Chinese)  
刘娜, 张美香, 王一. 不同浓度金属离子对酸性蛋白酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(32): 18043-18044
- [19] Choi BS, Sapkota K, Choi JH, et al. Herinase: A novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 170(3): 609-622
- [20] Jia DH. Fibrinolytic enzyme and its clinical application[J]. Chronic Pathematology Journal, 2004(6): 53-55 (in Chinese)  
贾东辉. 纤溶酶及其临床应用[J]. 慢性病学杂志, 2004(6): 53-55