

链霉菌产生的新型纤溶酶的纯化和性质的研究*

王 骏 王 敏 王以光**

(中国协和医科大学中国医学科学院医药生物技术研究所 北京 100050)

摘 要 从一株土壤链霉菌(*Streptomyces sp.*)Y405 的发酵液中通过硫酸铵分级盐析、290 树脂脱色、Sephadex G-75 凝胶过滤、DEAE-Sephadex A-25 阴离子交换层析和 Lysine-Sephadex 4B 亲和层析,获得一种新型的具有纤溶活性的蛋白酶 SW-1。每升发酵液中可获得 4.2mg SW-1 样品,回收率为 12.0%,每毫克蛋白活力达 2952.3 尿激酶单位,以发酵液作为起始,所获得样品纯度提高 230.6 倍,HPLC 检测纯度约为 83.5%。SW-1 在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳中是单肽链蛋白,分子量为 30kD,等电点为 8.5,测定其 N-端 17 个氨基酸序列为 Arg/Asn/Phe-Pro/Asp-Gly-Met-Thr-Met-Thr-Ala-Ile-Ala-Asn-Gln-Asn-Thr-Gln-Ile-Asn-,N 端第一和第二残基具有不均一性,根据氨基酸组成分析推算 SW-1 由 262 个氨基酸组成。SW-1 的纤溶活性可被 10mmol/L PMSF、1mmol/L EDTA 和 1mol/L 赖氨酸完全抑制,表明 SW-1 其赖氨酸结合位点与活性有关。SW-1 的纤溶活性在 4~37℃ 和 pH4.0~9.0 具有较好的稳定性,最适 pH 为 8.0。在纤维蛋白加热平板上,SW-1 和 SW-1 与纤溶酶原的混合液显示相同的纤溶活性,表明 SW-1 对纤维蛋白具有直接的降解作用,而不具有激活纤溶酶原的活性,因而 SW-1 是一种纤溶酶而不是纤溶酶原激活剂。

关键词 链霉菌 纤溶酶 纤溶酶原激活剂

分类号 Q784 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0147-53

溶栓疗法是早期急性心肌梗塞和其他血栓栓塞性心血管疾病的常规治疗方法^[1]。从作用机理上溶栓药物可分为两类:一类是纤溶酶原激活剂,如组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)、尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA)和酰化纤溶酶原链激酶激活剂复合物(APSAC)等^[2];另一类是纤溶酶类物质,可直接降解血块中的纤维蛋白,溶解血栓,如纳豆激酶(Nattokinase)^[3]、蚯蚓纤溶酶^[4]、蛇毒纤溶酶^[5~8]等。

微生物是溶栓药物的重要来源。除早期发现的 β -溶血链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)产生的链激酶(Streptokinase)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)产生的葡激酶(Staphylokinase)以及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)产生的纳豆激酶(Nattokinase)外,近年来又陆续筛选到可产生纤溶活性物质的芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)^[9]、曲霉菌(*Aspergillus sydowii*)^[10]和镰孢菌(*Fusarium pallidoroseum*)^[11]。

我所 1994 年利用自行设计的纤溶物质筛选模型从云南土壤中筛选到一株可产生纤溶活性物质的链霉菌(*Streptomyces sp.*)Y405,本文报道从该菌发酵液中分离纯化纤溶活性蛋白的方法,并对其性质和纤溶机理进行了初步研究。

* 中国医学科学院科研基金资助(No. 971007)。

收稿日期:1998-02-26,修回日期:1998-12-08。

** 通讯作者。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基：链霉菌 Y405 由本所筛出，保存于合成五号培养基^[12]，发酵培养基含葡萄糖 2.0%，可溶性淀粉 0.7%，黄豆饼粉 2.0%，NaCl 0.4%，CaCO₃ 0.6%，pH7.3。

1.1.2 试剂：290 树脂是南开大学树脂厂产品，Sephadex G-75 和 DEAE Sephadex A-25 是 Pharmacia 公司产品，Lysine-Sepharose 4B 由北京大学提供，SynChropak AX-10 是 Varian 公司产品，丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺、TEMED 是 BRL 公司产品，蛋白质分子量标准是 Promega 公司产品，Bio-Lyte 3/10 两性电解质、等电聚焦电泳标准是 Bio-Rad 公司产品，Folin-酚试剂是北京奥尼斯生物技术开发公司产品，PMSF(苯甲基磺酰氟)是 Sigma 公司产品，牛血纤溶酶原、牛血纤维蛋白原、凝血酶、尿激酶(标准品)是中国药品生物制品检定所产品。

1.1.3 仪器：蛋白质高效液相色谱分析用 Varian 公司的 5000 型 HPLC 系统，蛋白质等电聚焦电泳用 Bio-Rad 公司的 111Mini IFF Cell 产品。蛋白质 N-端氨基酸序列测定用 Applied Biosystems 公司的 477A 型蛋白质测序仪。氨基酸组成分析用 HITACHI 公司的 L-8500 型氨基酸自动分析仪。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质浓度的测定：按文献 13 进行，以牛血清白蛋白为标准。

1.2.2 纤溶活性的测定：参照 Astrup 和 Mullertz 方法^[14]，以尿激酶(标准品)作纤溶活性标准曲线。加热纤维蛋白平板按文献 15,16 制备。

1.2.3 蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳：按照文献 17 方法进行，凝胶用硝酸银溶液进行染色。

1.2.4 蛋白质高效液相色谱分析：利用 Varian 公司的 5000 型 HPLC 系统和 Syn-Chropak AX-10 阴离子交换柱(4cm×30cm)对样品进行纯度鉴定和进一步纯化，上样后用 400mL 10mmol/L 99% Na₂HPO₄-1% KH₂PO₄ 至 10% Na₂HPO₄-90% KH₂PO₄ 线性梯度洗脱，流速为 8mL/min，工作压力为 42 大气压，检测波长为 280nm。

1.2.5 蛋白质等电聚焦电泳：制备含 2% Bio-Lyte 3/10 两性电解质的 5% 聚丙烯酰胺凝胶，在凝胶中部点样，100V 电泳 15min，400V 电泳 1h。

1.2.6 蛋白质 N-末端氨基酸序列测定：将蛋白质纯品溶于三氯乙酸中，加到 ProBlott 膜上，按照测序仪说明书操作。

1.2.7 氨基酸组成分析：将蛋白质纯品用 6.0mol/L 盐酸在真空条件下 110℃ 水解 24h，分析水解产物中的氨基酸组成，计算氨基酸的相对百分含量，并参照文献 18 的方法推算各种氨基酸的残基数。

2 实验结果

2.1 链霉菌纤溶活性蛋白的分离纯化

2.1.1 硫酸铵分级盐析：链霉菌 Y405 的 96h 发酵液经离心(4000×g, 15min)去除菌丝

后,冰浴中边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 40% 饱和度,用 3mol/L 氨水调节 pH 值 7.5,冰浴静置 2h,离心(9000 × g, 15min)收集上清,上清液中继续加入硫酸铵粉末至 80% 饱和度,收集 40% ~ 80% 饱和度区间的沉淀,溶于 0.1mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液(pH7.5)中。活性蛋白回收率约为 78%。

2.1.2 290树脂脱色:深褐色的活性蛋白溶液加于 290 阴离子交换树脂柱(1.8cm × 30cm),用无离子水洗脱,收集 280nm 光吸收峰部分溶液(呈浅黄色),经透析脱盐和冷冻干燥后即获得纤溶活性蛋白的粗品。

2.1.3 Sephadex G75 凝胶过滤:Sephadex G75 层析柱(2.6cm × 52cm)用 20mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.1mol/L NaCl 缓冲液充分平衡,将溶于该缓冲液的活性蛋白粗品上样,用同种缓冲液洗脱,收集活性部分经冷冻干燥浓缩后用 20mmol/L Tris-HCl, pH9.0 缓冲液透析。

2.1.4 DEAE Sephadex A25 阴离子交换层析:DEAE Sephadex A25 阴离子交换柱(1.4cm × 21cm)用 20mmol/L Tris-HCl, pH9.0 缓冲液平衡,上样后先以 2 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤以洗脱未吸附蛋白,再用 200mL 0 ~ 1.0mol/L NaCl 线性梯度洗脱,流速为 0.6mL/min,活性蛋白被 0.1~0.2mol/L NaCl 洗脱。收集活性部分经冷冻干燥浓缩后再用 20mmol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液透析。

2.1.5 Lysine Sepharose 4B 亲和层析:Lysine Sepharose 4B 亲和层析柱(0.8cm × 25cm)用 20mmol/L Tris-HCl, pH7.5 缓冲液平衡,上样后先用 5 倍柱体积的平衡缓冲液充分洗脱非特异吸附蛋白,然后用 200mL 0 ~ 0.5mol/L NaCl 线性梯度洗脱,流速为 0.3mL/min,活性蛋白高峰可被 0.2~0.3mol/L NaCl 洗脱。SDS-PAGE 显示活性成分为单一区带(图 1)。

利用上述纯化流程,从每升发酵液中可获得 4.2mg 活性蛋白,每毫克蛋白活力达 2952.3 尿激酶单位,纯度提高 230.6 倍,回收率为 12.0%(表 1)。将获得的纯品进行高效液相色谱分析,主要成分的保留时间约为 4.1min,纯度约为 83.5%(图 2)。

2.2 链霉菌纤溶活性蛋白 SW-1 的性质

2.2.1 分子量和等电点:在 15% SDS-PAGE 中,无论有无还原剂 2-巯基乙醇,SW-1 均呈现一条区带,说明 SW-1 为单肽链蛋白质,计算其分子量为 30kD。等电聚焦电泳显示,SW-1 的等电点约为 8.5。

2.2.2 N-端氨基酸序列:测定 SW-1 N-端 17 个氨基酸残基的序列为 $\text{NH}_2\text{-Arg/Asn/Phe-Pro/Asp-Gly-Met-Thr-Met-Thr-Ala-Ile-Ala-Asn-Gln-Asn-Thr-Gln-Ile-Asn-}$,其中 N-端第一残基测得有精氨酸、天冬酰胺和苯丙氨酸 3 种氨基酸,第二残基有脯氨酸和天冬氨酸两种氨基酸,可能存在 N-端序列的不均一性。

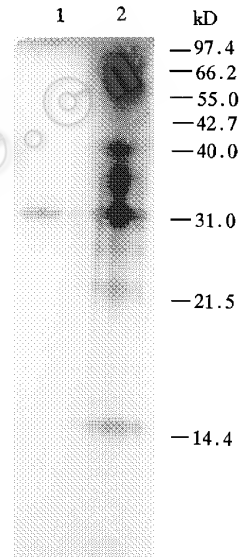


图 1 纤溶活性蛋白 SW-1 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis pattern of fibrinolytic protein SW-1

表 1 链霉菌纤溶活性蛋白 SW-1 的纯化

Table 1 Purification of SW-1 from the fermentation broth of *Streptomyces sp.* Y405

Purification step	Total protein /mg	Total activity /u	Specific activity (u/mg)	Yield /%	Purification factor
Fermentation broth	32200.0	413000	12.8	100.0	1.0
Ammonium sulphate precipitation	9100.0	322000	35.4	78.0	2.8
290 resin	8900.0	318000	35.7	77.0	2.8
Sephadex G75	1785.0	198100	111.0	48.0	8.7
DEAE sephadex A25	148.2	72700	490.4	17.6	38.3
Lysine sepharose 4B	16.8	49600	2952.3	12.0	230.6

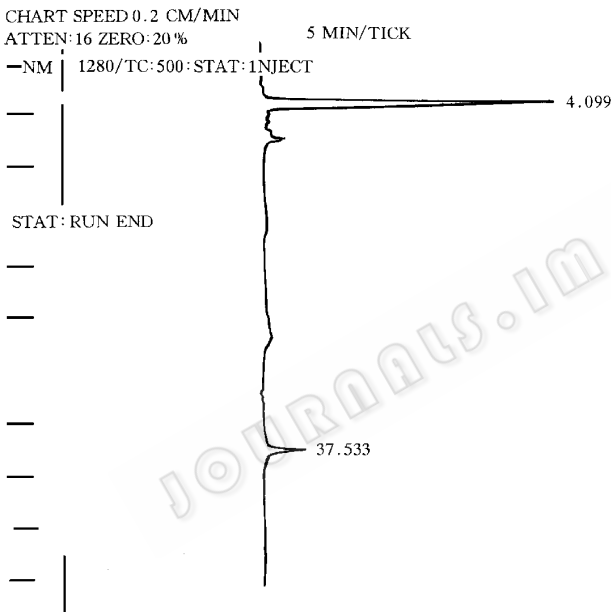


图 2 纤溶活性蛋白 SW-1 纯度的 HPLC 检测

Fig. 2 Homogeneity determination of the purified fibrinolytic protein SW-1 by HPLC on SynChropak AX-10

2.2.3 氨基酸组成分析: SW-1 盐酸水解产物中检测到 15 种氨基酸, 计算各种氨基酸的相对百分含量, 并推算出各种氨基酸的残基数, 总计 262 个氨基酸残基(表 2), 据此计算其分子量约为 28.8kD, 略低于由 SDS-PAGE 测得的表观分子量。

2.2.4 抑制剂: SW-1 的纤溶活性可分别被 10mmol/L PMSF、1mmol/L EDTA、1.0mol/L 赖氨酸安全抑制。PMSF 是丝氨酸蛋白酶的抑制剂, 说明 SW-1 活性部位可能有丝氨酸残基, 属于丝氨酸蛋白酶。EDTA 是金属离子的螯合剂, 表明 SW-1 纤溶活性必需某种金属离子, 因而可能是一种金属蛋白酶。

高浓度赖氨酸对 SW-1 纤溶活性的抑制显示 SW-1 的赖氨酸结合位点与酶活有关, 但可能不位于催化中心。

2.2.5 热稳定性: SW-1 经 65°C 3h、55°C 9h 或 45°C 12h 的加热即完全丧失活性, 在 37°C 放置 48h 后仍保持约 85% 的活性, 在室温(20~25°C)放置 7d 或在 4°C 放置 8 个月, 未见活性明显下降。说明该蛋白有较好的热稳定性。

2.2.6 pH 稳定性: SW-1 在 pH4.0~9.0 范围内保持 60% 以上的活性, 最适 pH 值为 8.0, 活力达 114%(以 pH7.5 时的活力为 100%), pH3.0 时残留活力不到 50%, pH10.0~11.0 时残留活力不足 10%。

2.2.7 体外纤溶性质: 由于通常使用的纤维蛋白原等试剂中混杂有少量的纤溶酶原, 在由此制备的纤维蛋白平板上, 纤溶酶原激活剂如尿激酶和纤溶酶均可形成溶圈, 因而无法

表 2 纤溶活性蛋白 SW-1 的氨基酸组成分析
Table 2 Amino acid composition analysis of SW-1

Name	nmol	ng	Relative ratio /%	Residue number	
				Experimental	Theoretical
Asp	1.580	210.4	9.2	23.9	24
Thr	1.468	174.9	8.5	22.2	22
Ser	2.192	230.4	12.7	33.2	33
Glu	1.428	210.1	8.3	21.6	22
Gly	3.078	231.1	17.9	46.6	47
Ala	1.168	104.1	6.8	17.7	18
Val	0.787	92.2	4.6	11.9	12
Ile	0.844	110.7	4.9	12.8	13
Leu	0.894	117.2	5.2	13.5	14
Tyr	0.286	51.9	1.7	4.3	4
Phe	0.450	74.3	2.6	6.8	7
Lys	1.721	251.6	10.0	26.1	26
His	0.338	52.4	2.0	5.1	5
Arg	0.309	53.9	1.8	4.7	5
Pro	0.651	74.9	3.8	9.9	10
Total	17.194	2308.1	100	—	262

判断 SW-1 是纤溶酶还是纤溶酶原激活剂(图 3A)。经 85℃ 加热 30min 以上,纤维蛋白平板中混杂的纤溶酶原被破坏,尿激酶本身不形成溶圈,而它与纤溶酶原的混合液表现出纤溶活性。与尿激酶不同,SW-1 本身在加热平板上仍形成溶圈,与纤溶酶原混合后纤溶活性并未提高(图 3B),说明 SW-1 直接降解纤维蛋白而无激活纤溶酶原的作用,因而是一种纤溶酶,而不是纤溶酶原激活剂。

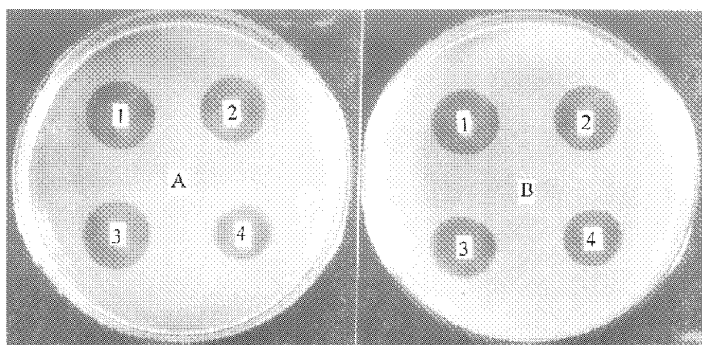


图 3 用纤维蛋白平板(A)和纤维蛋白加热平板(B)对 SW-1 纤溶活性的检测

Fig. 3 Assay of the fibrinolytic activity of SW-1 on a fibrin plate(A) and a plasminogen-free fibrin plate(B) which was heated at 85°C for more than 30 min

1. SW-1 (100u/mL), 2. SW-1 (100u/mL) and plasminogen(10u/mL),
3. Urokinase (100u/mL) and plasminogen (10u/mL), 4. Urokinase (100u/mL)

3 讨 论

查专利文献(1985年至1998年9月),未见报道过从链霉菌发酵液中分离纯化出具纤溶活性的蛋白。因此本研究中所建立的纯化流程完全是根据自己的实验结果所得。将测得的SW-1 N-端氨基酸序列与目前已知的多种纤溶酶(如多种蛇毒溶栓剂)和纤溶酶原激活剂(尿激酶与链激酶)的序列进行了对比,未发现相同或相似的序列,因而认为SW-1可能是一种新型的具有纤溶活性的蛋白酶。

推算的SW-1氨基酸组成,其分子量约为28.8kD,低于由SDS-PAGE测得的表观分子量30kD。由于在酸水解蛋白质过程中,全部的色氨酸,5%~10%的苏氨酸、丝氨酸和酪氨酸被破坏,甲硫氨酸和半胱氨酸被氧化为甲硫氨酸砒和半胱磺酸,约损失20%。因而由酸水解产物推算的苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸和半胱氨酸残基数可能存在一定的误差,且无法计算色氨酸的残基数。因此由酸水解蛋白质测得的氨基酸组成常常不能完全代表其实际的组成。

致 谢 我所心血管组王敏副教授提供链霉菌 Y405 菌种,徐小敏副主任技师改进发酵培养基配方,北京大学周先宛老师提供 Lysine Sepharose 4B,唐庆平老师协助进行 HPLC 分析,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] D. Collen, D. C. Stump, H. K. Gold. *Annu. Rev. Med.*, 1988, **39** :405~423.
- [2] D. J. Collen. *Cell Biochem.*, 1987, **33** :77~86.
- [3] M. Fujuta, K. Hong, Y. Itom *et al. Biol. Pharm. Bull.*, 1995, **18** :1387~1391.
- [4] O. H. Jeon, W. J. Moon, D. S. Kim. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 1995, **28** :138~142.
- [5] G. Datta, A. Dong, J. Witt *et al. Arch. Biochem. biophys.*, 1995, **317** :365~373.
- [6] B. S. Hahn, J. M. Chang, Y. S. Kim. *Toxicon*, 1995, **33** :929~941.
- [7] T. S. Markland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996, **391**(Natural Toxins 2) :427~438.
- [8] E. Siigur, A. Aaspollu, A. T. Tu *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996, **224** :229~236.
- [9] W. Kim, K. Chio, Y. Kim *et al. Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, **62** :2482~2488.
- [10] S. A. Maksoud, N. H. Tharwat. *Acta Pharm. Turc.*, 1995, **37** :114~129.
- [11] S. A. El-Aassar. *Biotechnol. Lett.*, 1995, **7** :943~948.
- [12] 龚利民, 王以光. *生物工程学报*, 1986, **2**(2) :24~30.
- [13] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr *et al. J. Biol. Chem.*, 1951, **193** :265~275.
- [14] T. Astrup, S. Mullertz. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1952, **40** :346~351.
- [15] 路英华, 金汝成, 吴应文. *生物化学杂志*, 1988, **4**(2) :166~172.
- [16] 周元聪, 朱 洪, 陈远聪. *生物化学与生物物理学报*, 1998, **20**(1) :35~41.
- [17] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, 2nd ed., New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, **18** :47~18.59.
- [18] 徐秀璋等著. *蛋白质顺序分析技术*, 北京 :科学出版社, 1988, pp. 25~43.

Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Streptomyces* sp. *

Wang Jun Wang Min Wang Yiguang

(Institute of Medicinal Biotechnology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

Abstract A novel protease with fibrinolytic activity, designated as SW-1, was isolated and purified from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. strain Y405, a soil isolate. The purification procedure involved ammonium sulphate fractionation, decolorization on 290 resin, gel filtration on Sephadex G75, anion-exchange chromatography on DEAE Sephadex A25 and affinity chromatography on Lysine Sepharose 4B. About 4.2 mg purified enzyme was obtained from a liter of fermentation broth and the recovery yield was 12.0%. The purified enzyme showed the specific activity of 2952.3 urokinase units per milligram, which increased by 230.6 fold over the fermentation broth. The purity determined by HPLC was 83.5%. SW-1 is a single chain polypeptide with a predicted molecular weight of 30kD in SDS-PAGE and an isoelectric point of 8.5. The N-terminal sequence of SW-1 is Arg/Asn/Phe-Pro/Asp-Gly-Met-Thr-Met-Thr-Ala-Ile-Ala-Asn-Gln-Asn-Thr-Gln-Ile-Asn-. There may be nonhomogeneity in the first and second amino acid residue of its N-terminal sequence. The analysis of amino acid composition showed SW-1 consisted of 262 amino acids. The fibrinolytic activity of SW-1 was entirely inhibited by 10mmol/L PMSF, 1mmol/L EDTA and 1mol/L lysine respectively, suggesting that SW-1 is a serine protease and metalloprotease, and that the lysine binding site might play a role in activity. The fibrinolytic activity of SW-1 is stable between 4~37°C and pH4.0~9.0, and the optimum pH is 8.0. On plasminogen-free fibrin plates, SW-1 showed the same fibrinolytic activity as mixture of SW-1 and plasminogen, indicating that SW-1 is a fibrinolytic enzyme which degrades fibrin directly, but not a plasminogen activator which degrades fibrin by activating plasminogen.

Key words *Streptomyces*, fibrinolytic enzyme, plasminogen activator

* This Research Was Supported by the Grant from Chinese Academy of Medical Sciences(No. 971007).