

纤溶酶产生菌—藤黄微球菌的筛选、 鉴定及纤溶酶基因的克隆

肖璐^{1,2} 张仁怀² 张义正^{2*}

(1. 湖南科技大学生命科学学院 湘潭 411201)

(2. 四川大学生命科学学院 四川省分子生物学及生物技术实验室 成都 610064)

摘要: 通过血粉培养基富集、纤维蛋白培养基筛选, 从自然环境中分离到一株纤溶酶产生菌, 命名为 ML909。利用传统细菌分类鉴定方法对其形态和生理生化特征进行了研究, 发现其与藤黄微球菌的特征相符, 16S rDNA 序列分析的结果也表明它与藤黄微球菌的 16S rDNA 序列的同源性高达 99%, 因此该菌在系统分类学上属于微球菌属(*Micrococcus* Cohn)藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)。通过 PCR 方法对其纤溶酶的编码区序列进行了克隆和序列分析, 基因登录 GenBank, 登录号为 EU232121。

关键词: 纤溶酶, 基因克隆, 16S rDNA, 藤黄微球菌

Isolation of a *Micrococcus luteus* Strain with Producing Fibrinolysin and Cloning of Fibrinolytic Enzyme Gene

XIAO Lu^{1,2} ZHANG Ren-Huai² ZHANG Yi-Zheng^{2*}

(1. College of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201)

(2. College of Life Science, Sichuan University, Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, Chengdu 610064)

Abstract: A strain, producing a fibrinolytic enzyme, was isolated from the nature environment by using blood powder plates gathering and fibrin plates screening, and was named ML909. All results from morphological, physiological and biochemical characterization, the 16S rDNA sequence and phylogenetic assay identified that the strain belongs to *Micrococcus luteus*. The DNA fragment encoding mature peptide of fibrinolytic enzyme was cloned by PCR and sequenced. The gene sequence was registered in GenBank of NCBI and the accession number is EU232121.

Keywords: Fibrinolytic enzyme, Gene cloning, 16S rDNA, *Micrococcus luteus*

血栓栓塞性疾病如心肌梗塞、脑栓塞等是当前危害人类健康, 导致死亡率最高的疾病之一。目前, 治疗此类疾病的主要手段之一是溶栓疗法即注射溶栓剂使血管再通。尽管已有不少的溶栓药物用于临

床治疗, 但这些药物各自都存在不同程度缺陷, 如有的有出血毒副作用, 有的用药后会再栓塞, 有的是酶的稳定性差、半衰期短, 有的是价格昂贵。因此, 研究开发新型溶栓药物具有巨大的发展潜力和

* 通讯作者: Tel: 028-85412738; ✉ yizzhang@scu.edu.cn
收稿日期: 2007-10-20; 接受日期: 2008-04-30

应用前景。由于微生物能够产生大量的胞外蛋白酶,它已经成为开发新型溶栓药物的重要来源。除早期发现的 β -溶血链球菌^[1]产生的链激酶和金黄色葡萄球菌^[2]产生的葡激酶外,近年来又陆续筛选到可产生纤溶酶活性的芽孢杆菌^[3-5]、放线菌^[6]、黄青霉菌^[7]、尖镰孢菌^[8]、镰孢菌^[9]、旋孢霉菌^[10]、蘑菇^[11]、海藻^[12]和海洋假单胞菌^[13]。与此同时,在溶栓酶基因的克隆表达方面也取得了一些成果。1992年,Nakamura T等^[14]用鸟枪法克隆了纳豆激酶全长基因序列,2003年,彭勇等^[15]克隆了豆豉溶栓酶基因Subtilisin DFE。本研究首次从自然环境中分离筛选到一株纤溶酶产生菌,通过对其形态、生理生化特征及16S rDNA序列的分析研究,将其鉴定为藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*),并克隆了其纤溶酶成熟肽的编码序列。

1 材料与方法

1.1 材料和培养基

1.1.1 试剂:纤维蛋白原、凝血酶、尿激酶购自中国药品生物制品检定所;纤维蛋白为Sigma公司产品;pMD18-T、Taq DNA聚合酶、限制性核酸内切酶及其它分子生物学试剂购自大连TaKaRa公司;引物由赛百盛公司合成。

1.1.2 富集培养基:猪血粉2%,蛋白胨1%,NaCl 5%,琼脂2%,pH 7.2

1.1.3 纤维蛋白培养基:纤维蛋白2%,蛋白胨10%,NaCl 0.5%,琼脂2%,pH 7.2

1.2 菌株

解淀粉芽孢杆菌DC-4,本室从豆豉中分离,藤黄微球菌ML909本室从自然环境中分离,大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 α 为本室保存。

1.3 菌种的分离

根据本实验室建立的一套纤溶酶产生菌的筛选方法^[16],先用血粉琼脂平板在自然环境中富集,然后在纤维蛋白培养基平板上初筛,再通过摇瓶复筛,取上清液用纤维蛋白平板测定纤溶活性。

1.4 纤溶酶活性的测定

纤溶酶活性测定见文献^[17]。

1.5 形态及理化鉴定

参阅《伯杰氏细菌鉴定手册》^[18]。

1.6 分离菌株G+C mol%

细菌总DNA提取采用氯仿苯酚混合提取法制备

^[19],DNA溶于0.1 \times SSC溶液中。确定T_m采用热变性解链法。G+C mol%含量按照经验公式0.1 \times SSC G+C % = 2.44(T_m-53.9)计算^[20]。

1.7 16S rDNA和纤溶酶基因的克隆与测序

1.7.1 16S rDNA的扩增和序列测定:扩增16S rDNA的引物为细菌通用引物:上游引物为:5'-ATGGATCCGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'下游引物为:5'-TATCTGCAGTGGTGTGACGGCGGTGT-3'。50 μ L反应体系中含有0.2 mmol/L dNTPs, DNA模板100 ng,引物0.2 mmol/L, Taq DNA聚合酶1.5 U, 1/10体积的10 \times PCR缓冲液, 1.5 mmol/L MgCl₂。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性40 s, 54 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸8 min。PCR产物-20 $^{\circ}$ C冻存待用。PCR产物经0.7%琼脂糖凝胶电泳后,采用冻融法从琼脂糖凝胶里回收目的片段,16S rDNA PCR产物与pMD18-T载体的连接,方法见宝生物公司连接Kit:溶液I 5 μ L, 胶回收的PCR产物1 μ L, pMD18-T载体0.5 μ L, 补水至10 μ L, 16 $^{\circ}$ C左右保温14 h~16 h。

用连接反应产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,通过蓝白菌落筛选,选取少量白色菌落与一个蓝色菌落,用小量提取法提取其质粒,经电泳初步鉴定重组子的大小。然后通过与对照质粒比较,选取重组质粒进行酶切及PCR分析,鉴定重组子。将鉴定的重组子质粒,用通用引物M13(+), M13(-), 根据双脱氧链终止法进行正反双向测序。

1.7.2 纤溶酶基因的克隆与测序:扩增纤溶酶基因的上游引物:5'-CGCCATGGCGCAGTCCGTGCCTTAC-3', 下游引物:5'-GTCGGATCCTTACTGAGCTGCCGCCTGTAC-3', 反应体系同上。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。PCR产物-20 $^{\circ}$ C冻存待用。PCR产物的克隆、重组子筛选、鉴定及测序方法同上。

所测序列提交GenBank数据库,用Blast进行相似性搜索和同源性比对。用MEGA4进行多序列比对,并以距离矩阵法中的邻接法(neighbor-joining method)构建进化树。

2 结果

2.1 形态学特征

经富集和分离,获得一株纤溶酶产生细菌—菌

株 ML909, 革兰氏染色反应呈阳性, 菌体细胞为球形, 直径 0.5 μm~2 μm, 成对、四联体或成簇出现, 但不成链, 不运动, 不生芽孢。

2.2 生理生化特征

接触酶阳性, 氧化酶阳性, 抗溶菌酶, 详细结果见表 1。

表 1 ML909 菌株的生理生化特征与藤黄微球菌的比较		
Table 1 Characteristics comparison of isolated ML909 and <i>M. luteus</i>		
特征 Characteristics	菌株 ML909 Strain ML909	藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>
菌落颜色 Colour of colony	黄色	黄色
产酸: Producing acid		
葡萄糖 Glucose	-	-
甘油 Glycerin	-	-
甘露糖 Mannose	-	-
乳糖 Lactose	-	-
水解明胶 Hydrolyzing gelatin	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	-
生长: Growth		
无机氮琼脂 Inorganic nitrogen agar	+	+
柠檬酸琼脂 Citric acid agar	-	-
7.5% NaCl 营养琼脂 Nutrient agar containing 7.5% NaCl	+	+
37	+	+

2.3 分离菌株的 G+C mol% 含量

由热扫描曲线得出菌株 ML909 的 T_m 值为 81.8。由公式计算得 DNA 中的 G+C mol% 为 68%。符合微球菌属 (*Micrococcus* Cohn,1872) 的 G+C mol% 含量特征。

2.4 16S rDNA 的克隆及序列分析

以总 DNA 为模板, 采用按细菌 16S rDNA 保守序列设计的引物进行 PCR 扩增, 扩增出大小约 1.4 kb 的一条特异带(图 1), 将其纯化后克隆在 pMD18-T 载体上, 筛选有插入 DNA 片段的重组子, 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后, 切出约 1.4 kb 的插入片段, 与预期片段大小一致(图 2)。对鉴定的重组质粒进行正反向测序(图 3)。

序列测定结果表明, ML909 菌株的 16S rDNA 序列长为 1386 bp。用 Blastn 程序对 ML909 的 16S rDNA 序列和 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行核苷酸同源性比对, 结果发现, 同源性达到

99%以上的均为藤黄微球菌的 16S rDNA 序列, 将该序列输入 RPD— 数据库进行同源性比对, 结果与 GenBank 中的比对结果一致, 结合生理生化特征, 将该菌初步鉴定为藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*), 命名为 ML909。

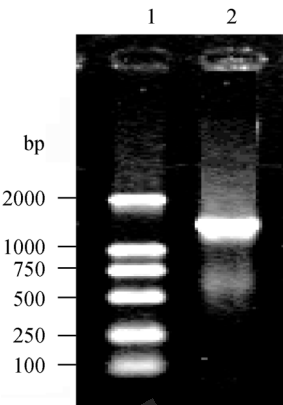


图 1 16S rDNA 的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of 16S rDNA PCR product
1: DL2000 DNA marker; 2: 1.4 kb PCR product of 16S rDNA

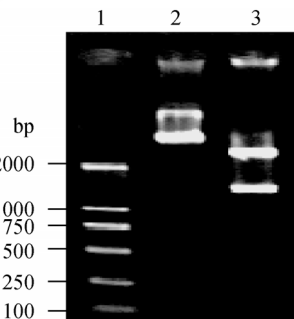


图 2 克隆 16S rDNA 的重组子酶切电泳鉴定
Fig. 2 Agarose gel electrophoretogram of restriction endonuclease digested recombinant plasmid
1: DL2000 DNA marker; 2: Recombinant plasmid; 3: Fragments of recombinant plasmid digested by *Bam*H I and *Sal* I

2.5 菌株 ML909 的系统发育分析

将 ML909 的 16S rDNA 序列与微球菌属及其它菌属中的不同菌株的 16S rDNA 用 MEGA4 进行比对, 再用程序包中的 N-J 进化树程序构建系统发育树。结果表明菌株 ML909 与藤黄微球菌聚成一群, 结合其生理生化及形态特征, 可推断 ML909 是藤黄微球菌的一个株系。

2.6 纤溶酶的克隆与序列分析

按豆豉溶栓酶基因序列设计一对引物, 以 ML909 菌株的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 同时

1 ATGGATCCGA GAGTTTGATC CTGGCTCAGG ATGAACGCTG GCGGCGTGCT
51 TAACACATGC AAGTCGAACG ATGAAGCCCA GCTTGCTGGG TGGATTAGTG
101 GCGAACGGGT GAGTAACACG TGAGTAACCT GCCCTTAACT CTGGGATAAG
151 CCTGGGAAAC TGGGTCTAAT ACCGGATAGG AGCGTCCACC GCATGGTGGG
201 TGTTGGAAAG ATTTATCGGT TTTGGATGGA CTCGCGGCCCT ATCAGCTTGT
251 TGGTGAGGTA ATGGCTCACC AAGGCGACGA CGGGTAGCCG GCCTGAGAGG
301 GTGACCGGCC ACACCTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC
351 AGCAGTGGGG AATATTGCAC AATGGGCGCA AGCCTGATGC AGCGACGCCG
401 CGTGAGGGGT GACGGCCTTC GGGTTGTAAA CCTCTTTTCAG TAGGGAAGAA
451 GCGAAAGTGA CGGTACCTGC AGAAGAAGCA CCGGCTAACT ACGTGCCAGC
501 AGCCGCGGTA ATACGTAGGG TGCGAGCGTT ATCCGGAATT ATTGGGCGTA
551 AAGAGCTCGT AGGCGGTTTG TCGCGTCTGT CGTGAAAGTC CGGGGCTTAA
601 CCCC GGATCT GCGGTGGGTA CGGGCAGACT AGAGTGCAGT AGGGGAGACT
651 GGAATTCCTG GTGTAGCGGT GGAATGCGCA GATATCAGGA GGAACACCGA
701 TGGCGAAGGC AGGTCTCTGG GCTGTAAC TGACGCTGAGGA GCGAAAGCAT
751 GGGGAGCGAA CAGGATTAGA TACCCTGGTA GTCCATGCCG TAAACGTTGG
801 GCACTAGGTG TGGGGACCAT TCCACGGTTT CCGCGCCGCA GCTAACGCAT
851 TAAGTGCCCC GCCTGGGGAG TACGGCCGCA AGGCTAAAAC TCAAAGGAAT
901 TGACGGGGGC CCGCACAAAGC GCGGAGCAT GCGGATTAAT TCGATGCAAC
951 TGCAAGAACC TTACCAAGGC TTGACATGTT CTCGATCGCG GTAGAGATAC
1001 GGTTTCCCTT TTGGGGCGGG TTCACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT
1051 CGTGTCTGTA GATGTTGGGT TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTCGTTC
1101 CATGTTGCCA GCACGTAGTG GTGGGGACTC ATGGGAGACT GCCGGGGTCA
1151 ACTCGGAGGA AGGTGAGGAC GACGTCAAAT CATCATGCCC CTTATGTCTT
1201 GGGCTTCACG CATGCTACAA TGGCCGGTAC AATGGGTTGC GATACTGTGA
1251 GGTGGAGCTA ATCCCAAAAA GCGGGTCTCA GTTCGGATTG GGGTCTGCAA
1301 CTCGACCCCA TGAAGTCGGA GTCGCTAGTA ATCGCAGATC AGCAACGCTG
1351 CGGTGAATAC GTTCCCGGGC CTTGTACACA CCGCCCGTCA CACCACTGCA
1401 GATA

图 3 菌株 ML909 的 16S rDNA 基因序列
Fig. 3 The 16S rDNA gene sequence of strain ML909

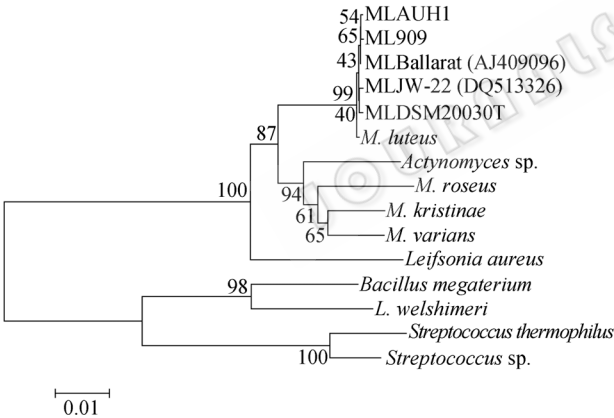


图 4 菌株 ML909 的系统发育学地位
Fig. 4 The phylogenetic position of strain ML909

以解淀粉芽孢杆菌 DC-4 为正对照, 结果从 ML909 中扩增的特异性的 DNA 片段约 828 bp(见图 5), 与 豆豉溶栓酶(DFE)成熟肽基因片段大小完全相同, 将 PCR 产物纯化后克隆在 pMD18-T 载体上, 重组质粒经酶切鉴定后(见图 6), 再进行测序(图 7)。

测序结果表明, 该基因全长 828 bp, 编码由 275 个氨基酸残基组成的酶蛋白, 即藤黄微球菌纤溶酶, 将其命名为 ML-FE。它与豆豉溶栓酶基因成熟肽长度完全相同, 同源性达到 99%。碱基组成上仅有 2 个碱基的差异(图 7 中黑方框内的碱基), 即 215 位碱

基由解淀粉芽孢杆菌的 T 转变成 C, 与此相对应导致一个氨基酸的不同, 即 72 位的 Val 变成了 Ala; 456 位由 A 转变成 G, 该位点碱基的变化并没有引起氨基酸的变化, 该基因在 GenBank 中的登录号为 EU232121。

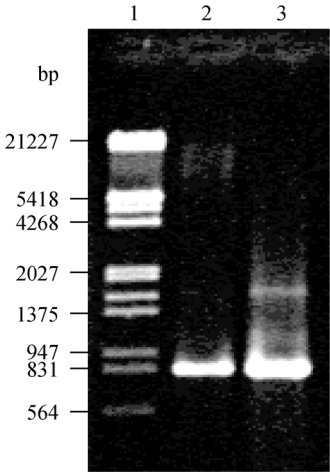


图 5 溶栓酶 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig. 5 Agarose gel of PCR products of fibrinolytic enzyme from the strain ML909
1: λ DNA/*Eco*RI/*Hind* III marker; 2: PCR products of fibrinolytic enzyme from the strain ML909; 3: PCR products of fibrinolytic enzyme from the strain DC-4

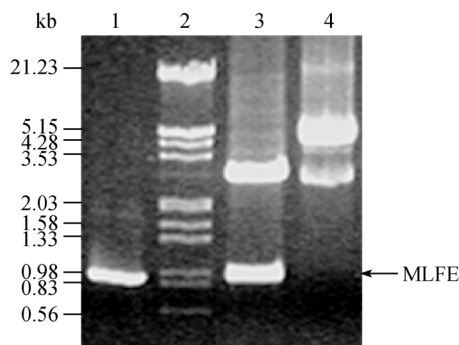


图 6 重组质粒的酶切电泳鉴定

Fig. 6 Agarose gel electrophoretogram of restriction endonuclease digested recombinant plasmid

1: PCR products of fibrinolytic enzyme from the strain ML909; 2: λ DNA/*Eco*R I+*Hind* III marker; 3: The recombinant plasmid digested by *Nco* I+*Bam*H I; 4: The recombinant plasmid

通过与 11 个细菌蛋白酶基因成熟肽核苷酸序列和氨基酸序列的比对，其中 BA-DFE^[21]、BS-DFE^[22]分别由本实验从一株解淀粉芽孢杆菌和一株枯草杆菌中克隆的溶栓酶，结果表明，其同源性均在 80%以上。尽管这些蛋白酶无论是核苷酸还是氨基酸一级结构都很相似，但蛋白酶的功能及生物学活性却有所不同。根据蛋白酶系统进化树分析，纤溶酶聚为两大类，一类是 MLFE、BA-DFE、K-54，另一类是 NAT、BS-DFE、QK。总之，从细菌来源的溶栓酶，无论是从核苷酸还是氨基酸的组成上都明显的分成两大类，一类为豆豉溶栓酶类，另一类为纳豆激酶类。

```
1      GCGCAGTCCGTGCCTTACGGCGTATCACAGATTAAAGCCCCTGCTCTGCACCTCT
1      A  Q  S  V  P  Y  G  V  S  Q  I  K  A  P  A  L  H  S
55     CAAGGCTTACCGGATCAAATGTTAAAGTAGCGGTTATCGACAGCGGTATCGAT
19     Q  G  F  T  G  S  N  V  K  V  A  V  I  D  S  G  I  D
109    TCTTCTCATCTGATTTAAAGGTAGCAGCGGAGCCAGCATGGTTCTTCTGAA
37     S  S  H  P  D  L  K  V  A  G  G  A  S  M  V  P  S  E
163    ACAAATCCTTTCCAAGACAACAACCTCTCACGGAACCTACGTTGCCGGTACAGCT
55     T  N  P  F  Q  D  N  N  S  H  G  T  H  V  A  G  T  A
217    GCGGCTCTTAATAAAGTCAAGTGGTGTATTAGGCGTTGCGCCAAGCGCATCTCTT
73     A  A  L  N  N  S  V  G  V  L  G  V  A  P  S  A  S  L
271    TACGCTGTAAAAGTTCTCGGCGCTGACGGTTCCGGCCAGTACAGCTGGATCATT
91     Y  A  V  K  V  L  G  A  D  G  S  G  Q  Y  S  W  I  I
325    AACGGAATTGAGTGGGCGATCGCAAACAATATGGACGTTATTAACATGAGCCTC
109    N  G  I  E  W  A  I  A  N  N  M  D  V  I  N  M  S  L
379    GGCGGACCTTCTGGTTCTGCAGCGTTAAAGCGGCAGTTGACAAAGCCGTTGCT
127    G  G  P  S  G  S  A  A  L  K  A  A  V  D  K  A  V  A
433    TCCGGCATCGTAGTCGTAGCGGCGGCCGTAACGAAGGCACTTCCGGCAGCTCA
145    S  G  I  V  V  V  A  A  A  G  N  E  G  T  S  G  S  S
487    AGCACAGTGGGCTACCCTGGTAAATACCCTTCTGTCAATGCGGTAGGGGCAATT
163    S  T  V  G  Y  P  G  K  Y  P  S  V  I  A  V  G  A  V
541    AACAGCAGCAACCAAAGAGCATCTTTCTCAAGCGTAGGTTCTGAGCTTGATGTC
181    N  S  S  N  Q  R  A  S  F  S  S  V  G  S  E  L  D  V
595    ATGGCACCAGGCGTCTCTATCCAAAGCACGCTTCTTGAAACAAATACGGCGCG
199    M  A  P  G  V  S  I  Q  S  T  L  P  G  N  K  Y  G  A
649    TACAATGGTACGTCAATGGCATCTCCGCACGTTGCCGGAGCGGCTGCTTTGATT
217    Y  N  G  T  S  M  A  S  P  H  V  A  G  A  A  A  L  I
703    CTTTCTAAGCACCCGAAGTGGACAAACACTCAAGTCCGCAGCAGTTTAGAAAAC
235    L  S  K  H  P  N  W  T  N  T  Q  V  R  S  S  L  E  N
757    ACCACTACAAAACCTTGGTGATGCTTTCTACTACGGAAGGGCTGATCAACGTA
253    T  T  T  K  L  G  D  A  F  Y  Y  G  K  G  L  I  N  V
811    CAGGCGGCAGCTCAGTAA
271    Q  A  A  A  Q  *
```

图 7 ML909 纤溶酶成熟肽编码序列和推测的氨基酸序列

Fig. 7 Coding sequence of mature peptide of fibrinolytic enzyme from the stain ML909 and its amino acid sequence

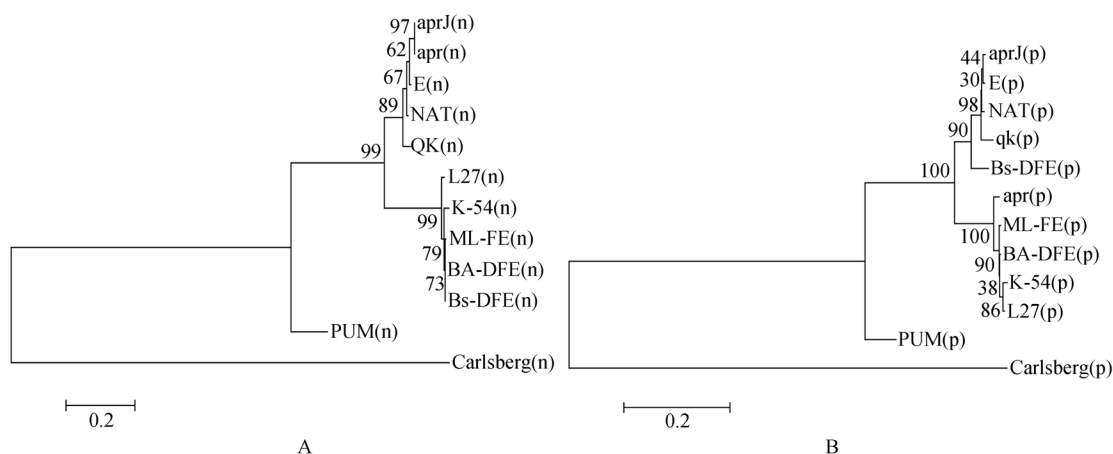


图 8 蛋白酶的核酸(A)和氨基酸序列(B)聚类分析图

Fig. 8 The phylogenetic comparative analysis of the nucleotide (A) and amino acid (B) sequences homology of proteases

2.7 ML909 纤溶酶活性的检测

在纤维蛋白培养基平板上, ML909 同解淀粉芽孢杆菌 DC-4 一样, 在菌落周围均能产生明显的水解圈, 发酵液在纤维蛋白原平板上也能产生清晰的水解圈(图 9、图 10)。

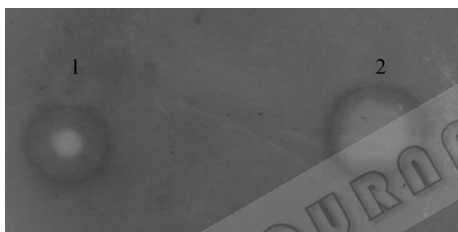


图 9 纤维蛋白培养基板上活性检测

Fig. 9 Fibrin plate assay for fibrinolytic enzyme of the strain ML909

1: The strain ML909; 2: *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4

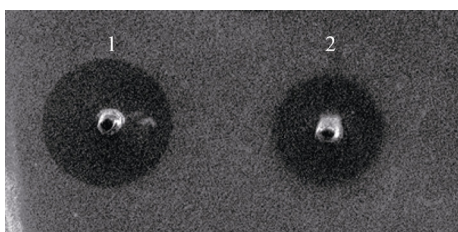


图 10 纤维蛋白原平板活性检测

Fig. 10 Fibrinogen plate assay for fibrinolytic activity

1: The supernatant of *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4; 2: The supernatant of the strain ML909

3 讨论

微生物是重要的基因资源库, 目前已从很多种

微生物中筛选到了具有溶栓活性的蛋白酶, 这些酶都属于丝氨酸蛋白酶家族。本实验首次从一株藤黄微球菌中克隆出了纤溶酶成熟肽编码序列, 尽管它与已报道的产豆豉溶栓酶的解淀粉芽孢杆菌 DC-4 无论是形态还是遗传关系都相差很大, 但是, 编码纤溶酶基因的 DNA 序列却相当保守, 只有一个氨基酸的差异, 而且, 这两种酶都与 K-54 具有极高的同源性, 但它们与纳豆激酶却明显不同。通过对一些细菌蛋白酶聚类分析表明, 目前, 由微生物产生的纤溶酶分为两类, 一类是纳豆激酶类, 另一类是 K-54 类, 两类酶都具有很强的纤溶酶活性, 而且都与其它芽孢杆菌丝氨酸蛋白酶的同源性较高, 如纳豆激酶和枯草杆菌素 E 两者在核苷酸序列组成上均有 1473 个碱基, 但仅 13 个碱基不同, 其中 12 个在成熟肽编码区, 其组成一致性达 99%。这些蛋白酶在一级结构上具有惊人的一致性, 但是它们在一些酶动力学参数及底物特异性上迥异, 这可能与酶蛋白空间构象不同有关。通过对纤溶酶蛋白基因组成的深入研究, 将有助于进一步了解其与蛋白质的空间构象之间的关系, 这对揭示纤溶酶及与纤溶酶同源性很高的其它丝氨酸蛋白酶的分子作用机制方面具有重要的价值。

为了避免 PCR 的污染, 本研究在实验中以无菌水为阴性对照, *B. amyloliquefaciens* DC-4 的基因组 DNA 为阳性对照, 用 4 对不同引物(上游引物分别按豆豉溶栓酶基因的 5'-端序列、信号肽、前导肽及成熟肽序列设计引物), 试图分别扩增藤黄微球菌纤溶酶的全基因、整个编码区序列、去掉 5'-非编码区及

信号肽的编码序列、包含前导肽和成熟肽部分的序列及只有成熟肽的序列。PCR 在阴性对照中均不能扩增出片段, 阳性对照均能扩出目的片段。在 ML909 中, 除了成熟肽序列设计引物能扩增出与 BA-DFE 成熟肽一样大小的片段外, 其它引物均不能扩增出目的带。由此也可推断, MLFE 与 BA-DFE 基因组成可能并不完全相同, 所扩增产物亦非 PCR 的污染。本实验所克隆的 MLFE 基因来自一株藤黄微球菌, 这种细菌常分离自脊椎动物皮肤和土壤, 从食品和空气中也常能分离到, 对人无致病性, 因此无论是将其作为溶血栓药物还是预防血栓病的保健食品, 都具有十分重要的开发价值。

参 考 文 献

- [1] Jackson KW, Malke H, Gerlach D, *et al.* Active streptokinase from the cloned gene in *Streptococcus sanguis* is without the carboxyl-terminal 32 residues. *Biochemistry*, 1986, **25** (1): 108–114.
- [2] Abdel-fattah AF, Ismail AS. Purification and some properties of pure *Cochliobolus lunatus* fibrinolytic enzyme. *Biotech Bioeng*, 1984, **26**(5): 407–411.
- [3] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, *et al.* A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, 1987, **43**(10): 1110–1111.
- [4] 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**(7): 2482–2488.
- [5] 彭勇, 张义正. 豆豉溶栓酶产生菌的筛选及酶学性质的初步研究. 高技术通讯, 2002, **12**(2): 30–40.
- [6] Egorov NS, Kochetov GA, Khaidarova NV. Isolation and properties of the fibrinolytic enzyme from the *Actinomyces thermovulgaris* cultural broth. *Mikrobiologiya*, 1976, **45**: 455–459.
- [7] El-Aassar SA, El-Badry HM, Abdel-Fattah AF. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **33**(1): 26–30.
- [8] Sun T, Liu BH, Li P, *et al.* New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium oxysporum*. *Process Biochem*, 1998, **33**(4): 419–422.
- [9] El-Aassar SA. Production and properties enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidoroseum*. *Biotechnol Lett*, 1995, **17**(9): 943–948.
- [10] Abdel-Fattah AF, Ismail AS. Purification and some properties of pure *Cochliobolus lunatus* fibrinolytic enzyme. *Biotech Bioeng*, 1984, **26**(5): 407–411.
- [11] Kim JH, Lee HY, Yoo KH, *et al.* The screening of fibrinolytic activities of extracts from Mushrooms in Mt. Chiak. *Kor J Mycol*, 1998, **26**: 589–593.
- [12] Matsubara K, Hori K, Matsuura Y, *et al.* A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. *Phytochemistry*, 1999, **52**(6): 993–999.
- [13] 刘晨光, 王鹏, 刘成圣, 等. 海洋假单胞菌纤溶酶的体外溶栓实验研究. 中国生化药物杂志, 2002, **23**(1): 34–35.
- [14] Nakamura T, Yamagata Y, Ichishima E. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT, aprN, of *Bacillus natto*. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56**(11): 1869–1870.
- [15] Peng Y, Yang XJ, Xiao L, *et al.* Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol*, 2004, **155**(3): 167–173.
- [16] Peng Y, Huang Q, Zhang RH, *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003, **134**(1): 45–52.
- [17] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys*, 1952, **40**(2): 346–351.
- [18] 布坎南 RE, 吉本斯 NE 等著. 中国科学院微生物研究所译. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp.660–677.
- [19] Saito H, Miura K. Preparation of transforming DNA by phenol treatment. *Biochem Biophys Acta*, 1963, **72**: 619–629.
- [20] 陈光胜, 朱厚础, 周方. 分析微生物学专辑. 北京: 科学出版社, 1988, pp.25–35.
- [21] 彭勇, 张义正. 解淀粉芽孢杆菌豆豉溶栓酶成熟肽编码序列的克隆与序列分析. 应用与环境生物学报, 2002, **8**(3): 285–289.
- [22] 彭勇, 黄庆, 张义正. 枯草杆菌 DC-2 纳豆激酶基因的克隆及其融合蛋白在 *E. coli* 中的表达. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, **18**(5): 559–563.