

高活力蚯蚓纤溶酶的纯化及性质研究*

何执中 何执静¹ 宗瑜琮² 蒋企洲

(中国药科大学生物化学教研室, 南京 210009; ¹南京大学生物化学系, 南京 210008)

摘要 由电泳得知赤子爱胜蚓 *Eisenia Foelide* 有 6 种纤溶酶同工酶。经纯化从中得到一种具强纤溶活性的单组分酶。收率为粗酶粉总活力的 19.1%。该酶分子量为 30000 D, 比活为 6667 U/mg, 在 pH 4~11 及 25°C~55°C 温度范围内稳定。

关键词 蚯蚓; 纤溶酶; 纯化; 同工酶; 电泳

蚯蚓入药在我国已有四千多年历史。早在“神农本草经”就有记载。明代李明珍在“本草纲目”中收载了用蚯蚓治病的药方达 40 多种。世界上不少民族都有用蚯蚓治病和保健的历史^[1,2]。

1993 年日本宫崎医科大学美原恒 (Mihara H) 报道从蚯蚓中提取了具较高活性的纤溶酶以来, 国内外的研究空前活跃。大量研究表明, 蚯蚓纤溶酶无论给动物口服或静脉注射, 均有抗栓溶栓作用。该酶作为新的抗栓药源, 开发前景十分广阔^[2~4]。

美原恒、路英华、周元聪、徐健民和熊毅等人用盐溶液提取蚯蚓纤溶酶, 继而用多种层析及 HPLC FPLC 乃至亲和层析等手段从不同品系的蚯蚓中获得了多种纤溶酶单纯组分。但操作麻烦、流程长, 故活力回收不高。比活力也不高, 一般在 200~900 U/mg^[5~8,11]。

本文仅用提取、沉淀、凝胶层析和离子交换等方法便得到了单组分酶, 比活力达 6667 U/mg, 活力收率为粗酶粉的 19.1%。

1 仪器与试药

1.1 仪器

自动部分收集器 (BS-100A): 上海沪西电机厂; 电泳仪: 北京生化仪器厂; 梯度混合仪: 上海医疗器械十厂; 电热恒温水浴: 江苏

医疗器械厂; 752 紫外光栅分光光度计: 上海第三分析仪器厂, ZK 组织捣碎机: 江苏盐城龙冈医疗器械厂。DY YIII 28A 型电泳槽: 北京市六一仪器厂。

1.2 材料与试剂

赤子爱胜蚓 (*Eisenia foelide*) 南京农业大学养殖中心提供); 葡聚糖凝胶 Sephadex G-75, Sephadex G-100 Pharmacia 公司进口分装; DEAE-52 离子交换纤维素: Whatman 产品; 尿激酶 (Urokinase UK): 南京大学制药厂; 凝血酶: 南京比尔乐生化制药厂; 牛血纤维蛋白原 (每支含可溶蛋白 80 mg); 中国药品生物制品检定所; 琼脂糖: 上海试剂厂 Serva 进口分装。

其它试剂: 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠、盐酸、氯化钠、三羟甲基氨基甲烷、甘氨酸、PEG-10000 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺均为分析纯试剂。

2 方法

2.1 纤溶酶活性测定

参考 Astrup 法制备纤维蛋白平板^[9], 用微量注射器注射酶样品于平板中直径为 5 mm 的滤纸片上, 将 400, 300, 200, 120, 80 U/ml 的尿激酶 (UK) 标准品与样品液在纤维蛋白板上同时点样, 37°C 保温 18 h 后测量溶圈面积, 以溶圈面积对单位数作标准曲线。

* 收稿日期 1997-07-07 ² 中国药科大学 97 届毕业生

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.

($\text{m m}^2\text{-U/ml}$) 根据标准曲线计算样品活力 ($Y = 1.2997X + 27.836, r = 0.9968$)

2.2 同工酶分析

参考采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳 (PAGE), 高 pH 不连续系统 分离胶浓度 10%, 交联度 2.5%, 电极液为 pH 8.7 Tris-甘氨酸缓冲液。样品为蚯蚓粗提液 加样量 25 μl 孔。电压 280V, 电流 10 mA, 时间约 3 h 电泳完毕后用 Astrup 纤维平板法^[9]显示同工酶。

2.3 蛋白质电泳

同“2.2”进行电泳, 考马斯亮兰显色^[10]。

2.4 蛋白质含量测定

用紫外吸收法测 A_{280} ^[10]。

2.5 蚯蚓纤溶酶活力测定

用 Astrup 纤维蛋白平板法^[9]。

2.6 蚯蚓纤溶酶粗酶粉的制备

冻存蚯蚓 (*Eisenia Foelide*)解冻后加 2~3 倍生理盐水匀浆, 抽提 2~4 h, 离心去渣, 上清液加 3~4 倍冷丙酮沉淀粗酶, 抽滤, 滤饼分散后真空干燥成粗酶粉。

3 结果与讨论

3.1 蚯蚓纤溶酶同工酶谱

见图 1 图中显示出清晰的 6 条纤溶透明带。大多作者报道的赤子爱胜蚓纤溶酶组分一般为 3~6 个。因分离手续复杂, 时间长, 多有丢失^[5~7]。偶有报道 9 个纤溶酶组分的, 可能是在纯化过程中酶被降解之故^[8]。本文采取冰冷快速提取全蚓的方法, 酶丢失和降解的可能性极小。

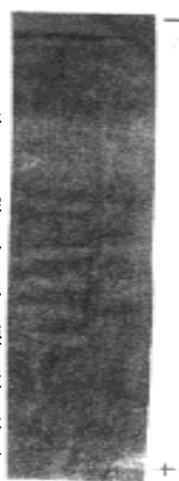


Fig. 1. Fibrinolytic isoenzyme-gram

3.2 凝胶层析

将粗酶粉 0.20 g 溶于 3 ml 0.02 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲液, 离心后上柱。用 260 ml 上述缓冲液洗脱 (4 ml/管), 用紫外分

光光度计测 A_{280} , 纤维蛋白平板法测定流出液之纤溶活力。结果如图 2 所示, 只有第 3 峰 (R_{II}) 有活力。

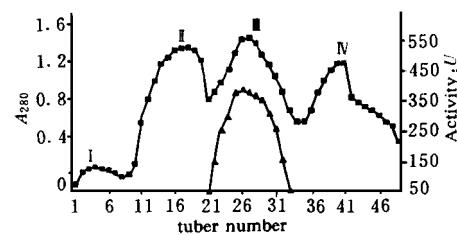


Fig. 2. Gel filtration of preparation samples of fibrinolytic enzyme from *Eisenia foelide*
Sephadex G-100 column $\Phi 2.0 \times 100 \text{ cm}$, flow rate 18 ml/h.
(—■—) A_{280} ; (—▲—) Activity

3.3 离子交换层析

合并上述第三峰 (R_{II}) 洗脱液, 上 DEAE-52 柱 (预先用 0.05 mol/L, pH 7.0 的磷酸缓冲液平衡 (24 h)) 上样后先用 100 ml 不含 NaCl 的磷酸缓冲液进行洗涤, 再用 NaCl 300 ml 浓度从 0.3~0.60 mol/L 的磷酸缓冲液作梯度洗脱, 收集洗脱液 (4 ml/管), 共 70 管, 紫外检测 A_{280} , 有 7 个吸收峰, 其中第 3、4、5 三峰 (R_{III-3} 、 R_{III-4} 、 R_{III-5}) 有活力 (图 3)

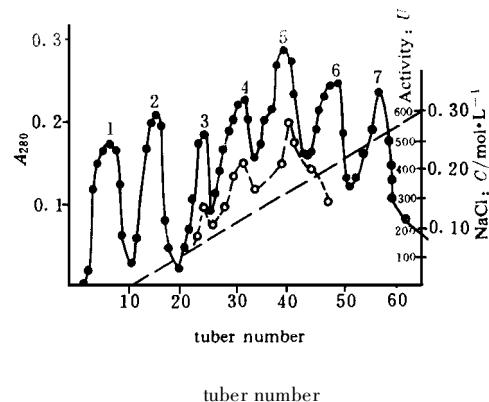


Fig. 3. DEAE-C-DE 52 ion-exchange chromatography of peak III.
(—●—) A_{280} ; (—○—) Activity; (—) NaCl conc. flow rate 18 ml/h

3.4 纯度检查

聚丙烯酰胺电泳图谱显示 R_{II-4} 为均一蛋白

质组分(图4)

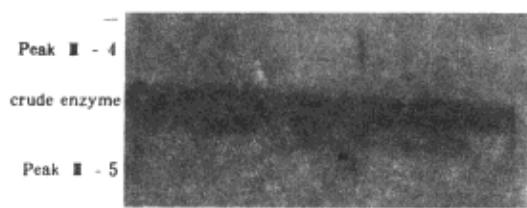


Fig 4. PAGE Protein-gram

另外,用 SDS-PAGE法测得 $\text{P}_{\text{III}-4}$ 组分分

Tab 1. Summary of Purification Procedure

Group	Total protein, mg	Total activity, IU	Specific activity, IU/mg	Activity recovery, %	Purification times
Crude enzyme	160	38400	240		
Cel filtration	56	28170	503	73.3	2.1
$\text{P}_{\text{III}-4}$	1.1	7330	6667	19.1	27.7
$\text{P}_{\text{III}-5}$	2.6	14760	5678	38.4	23.6

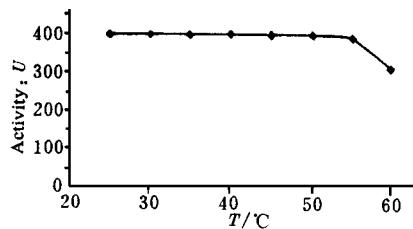


Fig 5. Effect of temperature on enzyme activity

结果表明,该酶的热稳定性比较好;在25~50℃之间保温2 h,活力基本不变,当温度达到55℃以上,活力开始迅速下降,与文献报道相似。

2.6 酶的 pH稳定性

取上述 $\text{P}_{\text{III}-4}$ 样品液(400 u/ml)各0.30 ml置于8支试管中,再分别加入pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11的缓冲液0.20 ml,30℃放置24 h后用纤维平板法测定纤溶活力,结果如图6所示,在所测定的pH范围内,活力变化很小,pH 8~9时该酶稳定性最好,活力较高,与文献报道一致。

子量约为30000 D,等电聚焦(IEF)法测得其等电点(pI)值为3.3,与文献报道接近。

3.5 酶纯化过程的活力追踪

见表1

3.6 酶的热稳定性

取样品 $\text{P}_{\text{III}-4}$ 适量用0.02 mol/L, pH 7.0的磷酸缓冲液稀释至400 u/mg,各取0.5 ml置于8支试管中,分别于25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60℃保温2 h后测定活力(Astrup平板法,37℃放置18 h),结果见图5

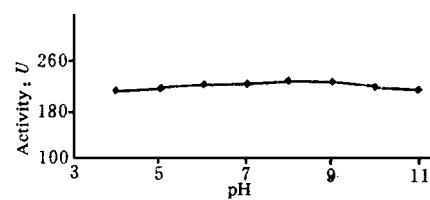


Fig 6. Stability of enzyme on different pH values

本文采用的纤溶酶纯化方法费时少,操作简便,收得率较高,比活比文献报道高5~10倍。由于酶的稳定性好,还可以在室温及较为宽松的实验条件下进行,比较贴近生产实际。

参考文献

- 1 单中平,张国娥,徐芹.蚯蚓养殖学.湖北人民出版社.1982
- 2 张理平,李如辉.地龙药理研究及临床应用概况.福建中医药.1990,21(6): 52
- 3 金鸣.蚯蚓溶栓酶研究进展.中草药.1994,25(1): 45
- 4 马卓,刘小平,冯汉鸽.地龙的化学及药理研究概况.湖北中医杂志.1991,13(2): 44

- 5 Mihara H. Thrombotic Proteases from earthworm. *Fur Pat Appl.* Ep 105092 (C1 C12N964) 11, Apr 1984
- 6 路英华,金汝成,吴应文. 矩齿远蚓纤溶酶的分离纯化及若干性质. 生物化学杂志. 1988, 4(2): 160
- 7 周元聪,朱洪,陈远聪. 赤子爱胜纤溶酶的分离纯化, 生物化学与生物物理学报. 1988, 20(1): 35
- 8 徐建民,张国桢,陈松鹤. 赤子爱胜蚓纤溶酶的亲和层析和理化性质. 上海医科大学学报, 1991, 18(4): 252
- 9 Astrup T, and Sten M uller. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biophys.* 1952, 40 346
- 10 徐秀兰,何执中,吴梧桐. 生物化学实验指导. 北京: 中医药出版社. 1994第 1版
- 11 熊毅,杨四成,刘晓英. 蚯蚓纤溶酶的分离纯化及部分序列的测定. 生物化学杂志, 1997, 13(3): 292

Purification and Characterization of Potent Fibrinolytic Enzyme from Earthworm

He Zhizhong, He Zhijing¹, Zhong Yuchong, Jiang Qizhou

Department of Biochemistry China Pharmaceutical University, Nanjing 210009,
Nanjing University 210008

Abstract Six fibrinolytic isoenzymes in earthworm (*Eisenia foelide*) were exhibited by PAGE. A potent hemogenous fibrinolytic enzyme component with MW 30000 D was purified from crude enzyme. The yield from crude enzyme is 19.%, and the specific activity is 6667 IU/mg. This enzyme is stable in pH 4–11, and in temperature 25–55°C.

Key words Earthworm (*Eisenia foelide*), Fibrinolytic enzyme, Isoenzyme, Purification

【文摘 040】 肾病病人专用低磷钾奶粉的制备工艺研究 郎晓怡,高向东,赵国良. 中国生化药物杂志, 1997, 18(3): 142

通过去脂、沉淀大分子物质后,以盐、碱处理及钙结合法去除鲜牛奶或奶粉中的磷、钾、钠,制备供肾病或其它限制磷、钾摄入的病人使用的低磷钾奶粉。所选用的工艺使鲜牛奶和不同品牌奶粉中的磷含量降低 6%~7%,钠含量降低 17%~53%,铁含量基本不变,而钙含量增加 20%~174%。

【文摘 041】 神经营养因子研究进展 刘晓军,吴梧

桐. 中国生化药物杂志, 1997, 18(4): 213

对神经营养因子的生理、生化性质、构效关系、作用机理及临床等方面的研究现状进行综述,并介绍了解决神经营养因子来源、有效药物设计和寻找替代治疗剂等方面的一些进展。

【文摘 042】 番红花挥发油 GC-MS分析测定 周素娣,陈祝林,彭建和. 中草药, 1987, 28(9): 537

国产番红花经水蒸汽蒸馏的挥发油,用 SE-30 石英毛细管高效 GC-MS 数据系统联用技术分析出 15 个化学成分以及各组分的百分含量。