

# 一株产纤溶酶芽孢杆菌的鉴定及纤溶酶的分离纯化与性质分析

顾昌玲<sup>1</sup>, 郭晓军<sup>1</sup>, 李佳<sup>1</sup>, 赵晓瑜<sup>2</sup>, 朱宝成<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

(<sup>2</sup> 河北大学生命科学学院, 保定 071002)

**摘要** 【目的】从假蕈状芽孢杆菌 B-60 菌株中纯化具有纤溶活性的单一组分, 测定它的 N-端氨基酸序列进行比对, 并对单一组分的性质进行分析。【方法】利用纤维蛋白平板法检测纤溶酶活性, 利用硫酸铵分级沉淀和阴离子交换色谱从假蕈状芽孢杆菌 B-60 菌株中纯化纤溶酶。【结果】从该菌株的发酵液中获得了一组纤溶酶单一组分(BpFE), 它的表观分子量为 34 kDa。它在 4℃~50℃活性较稳定, 50℃以上活性急剧下降, 作用最适 pH 值为 pH5~6, 在 pH5~10 活性较稳定, 在 pH3.0 活性几乎丧失, 金属离子  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  对酶活有轻微促进作用,  $\text{Cu}^{2+}$  则强烈抑制酶活。苯甲基磺酰氟(PMSF)完全抑制它的活性。BpFE 经胰蛋白酶和胃蛋白酶降解后, 活性上升。测得 BpFE N-端 15 个氨基酸序列为 VTGTNAVGTGKGVLG, 序列比对结果表明, BpFE N-端 15 个氨基酸序列与来源于蜡状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌和乳杆菌的细菌裂解酶、中性蛋白酶、水解酶的部分序列同源性为 100%。【结论】获得了一组纤溶酶单一组分, 其 N-端序列比对结果尚未发现与其同源性较高的纤溶酶, 这为新型纤溶酶的开发提供了重要的理论依据。

**关键词:** 假蕈状芽孢杆菌, 纤溶酶, 纯化, 性质

**中图分类号:** Q814      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209(2009)04-0492-06

目前临床上使用的溶栓酶普遍存在不足, 有的副作用强, 有的半衰期短, 价格昂贵, 近年来除了利用蛋白质工程改造已有溶栓酶<sup>[1-2]</sup>, 寻找新的纤溶酶的工作一直在进行。微生物是纤溶酶的重要来源之一。对大量产生蛋白酶的微生物尤其是非致病微生物进行筛选鉴定, 以获得新型纤溶酶产生菌, 具有实际意义。已有多种纤溶酶产生菌被分离鉴定, 如链霉菌<sup>[3]</sup>、根霉<sup>[4]</sup>、枯草芽孢杆菌<sup>[5]</sup>、镰孢菌<sup>[6]</sup>、脉孢霉<sup>[7]</sup>等, 并从其发酵物中分离出纤溶酶。本实验室从自然界分离的纤溶酶产生菌芽孢杆菌 B-60 菌株, 通过对它的形态特征、生理生化特征进行鉴定, 对其 16S rDNA 序列进行测定比对, 鉴定为假蕈状芽孢杆菌(*Bacillus pseudomycoides*)。目前, 国内外以假蕈状芽孢杆菌产生的纤溶酶的研究尚未见其它报道。作

者对该菌株产生的纤溶酶进行分离纯化及酶学性质研究, 为纤溶酶的进一步开发提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) B-60 菌株, 本实验室分离保存。

**1.1.2 培养基:** 斜面培养基(NA)和液体种子培养基(NB)组成参考文献[8]。发酵产酶培养基: 蔗糖 15 g/L, 豆饼粉 15 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  3.4 g/L,  $\text{CaCl}_2$  3.3 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.8 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.4 g/L。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 纤维蛋白原(fibrinogen), 凝血酶(thrombin), 苯甲基磺酰氟(PMSF), EDTA、亮

\* 通信作者。Tel: +86-312-7528258 E-mail: zhu2222@126.com

作者简介: 顾昌玲(1976-), 女, 山东临沂人, 硕士, 研究方向为生物工程药物。E-mail: guchl2000@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-11, 修回日期: 2009-01-01

抑肽素(leupeptin)、抑肽酶(aprotinin)、大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、鸡卵类粘蛋白(Chicken ovomucoid, CHOM),Sigma公司;胰蛋白酶(trypsin)、胃蛋白酶(pepsin),天津生物化学制药厂;尿激酶(10万单位),沈阳广大制药公司产品;牛血清白蛋白, Roche公司;其他常规试剂均为国产或进口分析纯。

阴离子交换柱 DEAE Sepharose Fast Flow, Amersham pharmacia 公司;高速冷冻离心机,上海安亭实验仪器总厂;冷冻干燥机,Christ 公司;蛋白电泳仪,Bio-Rad 公司。

## 1.2 *Bacillus* B-60 菌株的鉴定

**1.2.1** *Bacillus* B-60 菌株的形态特征:将菌株接种至灭菌水,85℃~90℃加热 15 min,取 100 μL,涂 NA 平皿,放于 37℃温箱培养 1~3 d。革兰氏染色观察细菌形态。

**1.2.2** 生理生化特征:参照文献[9],对 *Bacillus* B-60 菌株进行生理生化鉴定。

**1.2.3** 16S rDNA 序列测定与比对:按常规方法<sup>[10]</sup>提取菌株的总 DNA,采用通用引物进行 16S rDNA 的 PCR 扩增,PCR 产物送上海生工测序,然后将所测得 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列进行比对。

## 1.3 *Bacillus* B-60 菌株培养方法

液体种子培养基培养方法:将斜面生长的菌株接入 50 mL 液体种子培养基,摇床转速 200 r/min,32℃培养 10 h 至对数生长期,以 3% 接种量接入发酵培养基震荡培养。

发酵产酶培养方法:培养温度 32℃,培养基初始 pH 6.5~7.0,装液量 250 mL 的三角瓶 50 mL,接种量 2%~6%,发酵时间 55 h 左右。

## 1.4 纤溶酶活性测定方法

纤维蛋白平板法<sup>[11]</sup>。用直径 3 mm 的打孔器打孔,每孔点样 10 μL 样品,18 h 测溶圈直径。

## 1.5 *Bacillus* B-60 菌株蛋白的提取、纤溶酶的纯化与性质分析

**1.5.1** *Bacillus* B-60 菌株提取物的制备:将发酵液离心去菌体后,上清液加至 20% 的硫酸铵饱和度,离心去沉淀,再将上清加至 85% 的硫酸铵饱和度,离心,弃上清液,保留沉淀。

**1.5.2** Sephacryl S-100 凝胶过滤色谱:凝胶色谱的洗脱液为 pH 8.6 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。

将硫酸铵 85% 饱和度的沉淀物用 pH 8.6 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液溶解,上凝胶过滤柱脱盐,更换样品缓冲液。

**1.5.3** DEAE-Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱:用 pH 8.6 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液充分平衡 DEAE-Sepharose Fast Flow(1.8 cm×20 cm)离子交换色谱柱。将凝胶过滤柱洗出的溶液加入阴离子交换色谱柱,NaCl 梯度洗脱(0.05,0.1,0.2,1.0 mol/L NaCl),流速为 1 mL/min。收集各峰蛋白测定分离后各组分的纤溶活性。

**1.5.4** 检测分离效果和目标蛋白的相对分子质量(Mr):12%的 SDS-PAGE(12%分离胶、4%浓缩胶),凝胶用考马斯亮蓝染色法<sup>[12]</sup>。

**1.5.5** *Bacillus* B-60 菌株纤溶酶的 N-端氨基酸序列测定:单一蛋白 SDS-PAGE 后转到 PVDF 膜上,委托北京大学生命科学学院用 PROCISE 氨基酸序列仪(Applied Biosystem,USA),Edman 降解法测定其 N-端氨基酸序列。

**1.5.6** B-60 菌株提取物纤溶比活力及分离后单一组分的纤溶比活力的测定和比较:用 Bradford 法测蛋白质浓度<sup>[13]</sup>,以尿激酶活力标准曲线测定蛋白质提取物和分离后单一组分的纤溶活力并计算比活力。

蛋白质比活力 = 相对尿激酶活力单位(U)/(蛋白质浓度(mg/mL)×点样体积(mL))。

**1.5.7** *Bacillus* B-60 菌株纤溶酶 BpFE 的酸碱稳定性和温度稳定性:酸碱稳定性的测定是用 5 μL BpFE 分别与 5 μL pH 3~10 的缓冲液混合,在 37℃温箱放置 2 h,测残余酶活。缓冲液分别为:pH3.0、pH4.0、pH5.0、pH6.0、pH7.0、pH8.0 的 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,pH9.0、pH10.0 的 0.1 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液。

温度稳定性的测定是用 5 μL BpFE 与 5 μL 灭菌水混合,分别在 4℃、18℃、37℃、50℃、63℃、75℃放置 2 h,测残余酶活。

**1.5.8** 蛋白酶抑制剂对 *Bacillus* B-60 菌株纤溶酶 BpFE 活性的影响:参照文献[14],配制 10 mmol/L 的 PMSF,5 mmol/L 20 mmol/L 的 EDTA,5 mg/mL 的亮抑肽素(leupeptin),10 mg/mL 的抑肽酶(aprotinin),30 mg/mL 的 SBTI,30 mg/mL 的鸡卵粘蛋白(CHOM),6 种溶液,其中 PMSF 用异丙醇溶解,EDTA 用 pH8.0 的 NaOH 溶液溶解,其它试剂用灭菌水溶解。每种取 5 μL,分别与 5 μL BpFE 混匀,在 37℃温箱放置 2 h,测残余酶活。

**1.5.9** 金属离子对 *Bacillus* B-60 菌株纤溶酶 BpFE 活性的影响:参照文献[15],用灭菌水配制浓度均为 10 mmol/L 的 NaCl、KCl、CaCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、

ZnCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub> 溶液。每种取5 μL ,分别与 5 μL BpFE 混匀 ,在 37℃温箱放置 2 h ,测残余酶活。

**1.5.10 胰蛋白酶和胃蛋白酶对 *Bacillus* B-60 菌株纤溶酶 BpFE 的作用 :**参照文献[ 16 ] ,用灭菌水配制浓度为 2.0 mg/mL 的胰蛋白酶( Trypsin )溶液 ,用 pH3.0、0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制浓度为 6 mg/mL 的胃蛋白酶( Pepsin )溶液。每种取 5 μL ,分别与 5 μL BpFE 混匀 ,外加 1 mg/mL 的胰蛋白酶( Trypsin )溶液做对照 ,在 37℃温箱放置 2 h ,测 3 组样品的残余酶活。

## 2 结果

### 2.1 分类鉴定

**2.1.1 *Bacillus* B-60 菌株的形态特征 :**经过高温加热后 ,*Bacillus* B-60 菌株仍然生长。革兰氏染色观察 细胞形态为短杆 ,芽孢中生 ,呈椭圆状 ,菌体多成对或链状。

**2.1.2 生理生化特征 :***Bacillus* B-60 的生理生化鉴定结果见表 1。由表 1 可知 ,*Bacillus* B-60 的生理生化特征与假蕈状芽孢杆菌很相符。

**2.1.3 16S rDNA 序列测定与比对 :***Bacillus* B-60 菌株的 16S rDNA 序列登录号为 EU746686。

*Bacillus* B-60 菌株与下列菌株的 16S rDNA 序列同源性很高 ,分别为 : *B. anthracis* 99.38%、*B. pseudomyoides* 99.38%、*B. cereus* 99.31%、*B. thuringiensis* 98.84%、*B. mycoides* 98.29%、



表 1 *芽孢杆菌 B-60* 的生理生化特征

Table 1 The physiological and biochemical characteristics of *Bacillus* B-60

Characteristics	<i>Bacillus</i> B-60
Hydrogen peroxide enzyme	+
Growth no oxygen	+
V-P mensuration	+
V-P pH < 6	+
pH > 7	-
Acid production D-Glucose	+
L-arabinose	-
D-xylose	-
D-mannose	-
Glucose Gas production	-
Casein hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Starch hydrolysis	+
Tyrosine hydrolysis	-
Phenylalanine Deaminase	-
Yolk lecithinase	+
Nitrate reduction	+
Indole production	+
Need of NaCl and KCl	-
Growth at lysozyme	+
Growth at pH6.8	+
Growth at pH5.7	+

*B. weihenstephanensis* 98.29%、*B. luciferensis* 94.79%、*B. acidicola* 93.89%。

*Bacillus* B-60 菌株与 4 株标准菌株的 16S rDNA 序列比对见图 1。

*Bacillus* B-60 菌株系统发育树状图见图 2。

形态特征、生理生化特征结合 16S rDNA 序列比对结果 ,鉴定 B-60 菌株为假蕈状芽孢杆菌( *Bacillus pseudomyoides* )。



图 1 *Bacillus* B-60 菌株与 4 株标准菌的 16S rDNA 序列比对

Fig.1 The 16S rDNA sequence alignment of *Bacillus* B-60 and four related type strains

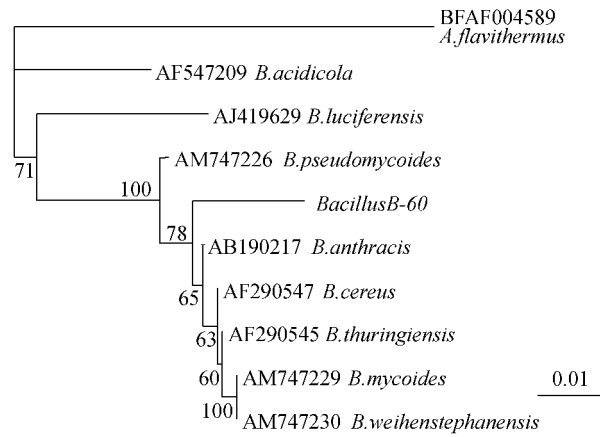


图 2 *Bacillus* B-60 菌株及相关菌株的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree showing relationship between *Bacillus* B-60 and related strains.

2.2 *Bacillus* B-60 菌株纤溶酶的纯化与性质分析

2.2.1 DEAE Sepharose FF 阴离子交换色谱 :用 pH 8.6 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 ,以 0.05、0.1、0.2、1.0 mol/L NaCl 溶液梯度洗脱 DEAE 离子交换色谱柱 ,分离图见图 3。其中未结合峰为一模糊条带 ,峰 1 组分有较强的纤溶活性 ,SDS-PAGE 为单一条带 ,分子量为 34 kDa ,命名为 BpFE ,见图 4。

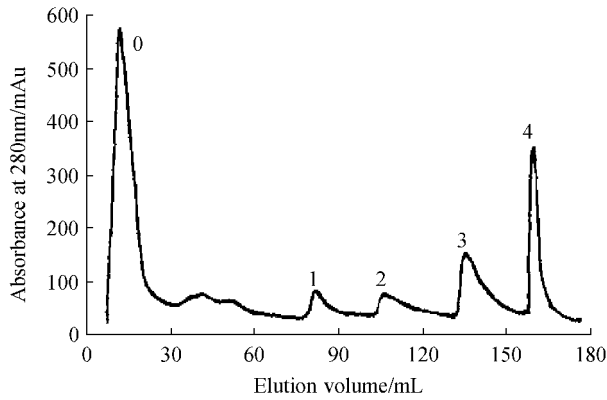


图 3 *B. pseudomycoides* B-60 菌株纤溶酶的阴离子交换色谱图谱

Fig.3 Anion-exchange chromatography of *B. pseudomycoides* B-60

2.2.2 BpFE N-端序列 :委托北京大学生命科学学院用 PROCISE 氨基酸序列仪( Applied Biosystem , USA )测定 N-末端 15 个氨基酸序列为 :N – VTGTN AVGTG KGVLG。利用 NCBI 网站的 PSI-BLAST ( Position-Specific Iterated BLAST )软件 ,对测得的 15 个氨基酸进行同源性序列比对 ,结果发现 ,此 15 个氨基酸与 bacilolysin、neutral protease、hydrolase 的部分序列同源性为 100%。与 15 个氨基酸序列 100% 同源的蛋白大部分为腊状芽孢杆菌、苏云金芽孢杆

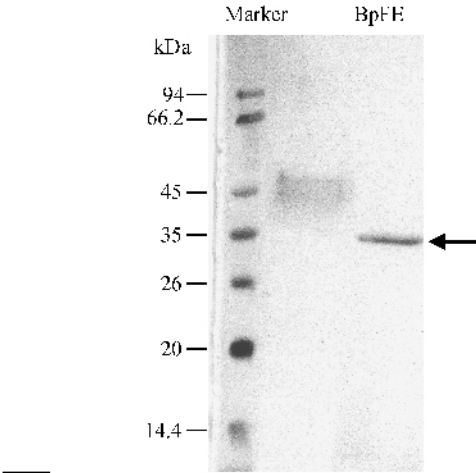


图 4 *B. pseudomycoides* B-60 菌株纤溶酶( BpFE )的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of *B. pseudomycoides* B-60 fibrinolytic enzyme ( BpFE ).

菌、炭疽杆菌和乳杆菌的一些类嗜热金属蛋白酶、水解酶及中性蛋白酶等 ,并未发现有相关纤溶酶的报道。

2.2.3 *B. pseudomycoides* B-60 菌株提取物与分离后纤溶酶单一组分比活力的测定与比较 :由牛血清蛋白标准曲线  $y = 0.5209x + 0.0065$  (  $R^2 = 0.9929$  ) ,尿激酶活力标准曲线  $y = 1\,243.4x + 2.826$  (  $y$ -溶圈有效面积 , $x$ -相对激酶活力 )计算蛋白浓度和纤溶活力 ,结果见表 2。

表 2 *B. pseudomycoides* B-60 菌株提取物分离前后组分的蛋白浓度和比活力

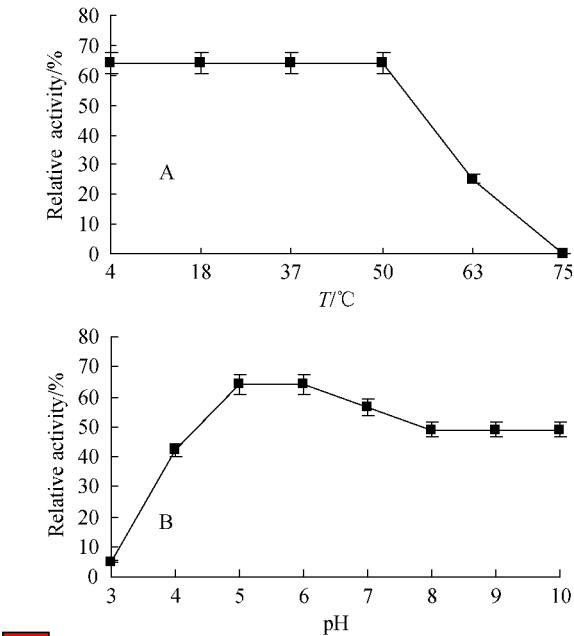
Table 2 Protein concentration and specific activity of extract and BpFE					
Component	Area of hydrolyzed circle/mm <sup>2</sup>	Comparative activity to urokinase/U	OD	Concentration of enzyme/ ( mg/mL )	Specific activity/ ( U/mg )
Extract	989.1	0.793	0.284	5.330	14.878
BpFE	285.7	0.228	0.040	0.324	70.284

2.2.4 BpFE 的温度稳定性和酸碱稳定性 :*B. pseudomycoides* B-60 纤溶酶温度稳定性和酸碱适应性见图 5-A ,图 5-B。

由图 5-A 可知 ,BpFE 在 50℃ 以下活性不变 , 50℃ 以上活性急剧下降 ,75℃ 活性完全丧失 ,说明 BpFE 有一定的耐热性。

由图 5-B 可知 ,BpFE 在 pH5.0 ,pH6.0 活性最高 ,在 pH3.0 时 ,活性几乎丧失 ,而在 pH10.0 时仍能保留大部分活性 ,说明 BpFE 比较适应中性和碱性环境。

2.2.5 蛋白酶抑制剂对 BpFE 活性的影响 :蛋白酶



5 BpFE 的热稳定性 (A)及酸碱稳定性 (B)  
Fig.5 Heat stability of BpFE (A) and pH stability of BpFE (B).

抑制剂对 *B. pseudomycoides* B-60 菌株纤溶酶活性的影响见图 6-A。

由图 6-A 可知 ,PMSF 完全抑制 BpFE 的活性 ,SBTI 抑制部分活性低浓度的 EDTA 对纤溶活性有轻微促进作用。

5 mg/mL 的亮抑肽素( leupeptin ) ,10 mg/mL 的抑肽酶( aprotinin ) ,30 mg/mL 的 SBTI ,30 mg/mL 的鸡卵类粘蛋白( CHOM )对它的活性无明显影响。

2.2.6 金属离子对 BpFE 活性的影响 :金属离子对 *B. pseudomycoides* B-60 纤溶酶活性的影响见图 6-B。

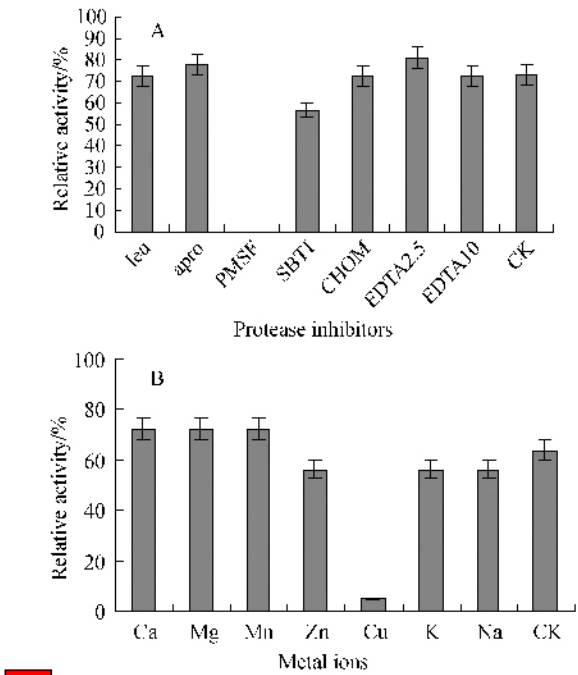
由图 6-B 可知 ,Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 对酶活有轻微促进作用 ,Cu<sup>2+</sup> 则强烈抑制酶活。

2.2.7 胰蛋白酶和胃蛋白酶对 BpFE 的作用 :实验表明 ,胃蛋白酶不水解纤维蛋白 ,BpFE 在 pH3.0 的溶液中几乎没有活性 ,而与胃蛋白酶作用后 ,活性反而上升。BpFE 在 pH3 的条件下与胃蛋白酶反应后活性约为中性环境中的 40%。胰蛋白酶能够水解纤维蛋白 ,BpFE 与胰蛋白酶反应后 ,纤溶活性大于两者之和 ,BpFE 纤溶活性约增加 50%。这说明胰蛋白酶和胃蛋白酶将 BpFE 降解后 ,部分小肽有了纤溶活性。

3 讨论

BpFE N-端 15 个氨基酸序列的比对结果 ,它与细菌裂解酶、中性蛋白酶、水解酶的部分序列同源性为 100% ,但是并没有相关纤溶酶的报道。

关于 BpFE 的酶学性质 ,现在报道的一些纤溶酶大部分属于丝氨酸蛋白酶家族。实验发现 ,丝氨酸



6 蛋白酶抑制剂 (A)及金属离子 (B)对 BpFE 的作用  
Fig.6 Influence of protease inhibitor( A)and influence of inorganic salts (B)on BpFE. Leu indicate leupeptin , apro indicate aprotinin , PMSF indicate Phenylmethyl sulfonyl fluoride , SBTI indicate soybean trypsin inhibitor , CHOM indicate chicken ovomucoid , EDTA indicate ethylene diamine tetraacetic acid , CK indicate control .

酸蛋白酶抑制剂 PMSF 溶液能完全抑制 BpFE 的活性 ,并且溶解 PMSF 的有机溶剂 50% 浓度的异丙醇不能使 BpFE 失活 ;低浓度的 EDTA 对酶活有轻微促进作用。但郭晓军等通过 *BpFE* 基因的克隆表达 ,对 BpFE 全长氨基酸序列比对 ,结果发现 BpFE 不具有丝氨酸蛋白酶结构域 ,而具有金属蛋白酶结构域 ( 另文发表 )。BpFE 的酶学性质有待分析。

*B. pseudomycoides* B-60 纤溶酶具有广泛的温度适应性和酸碱适应性 ,被胃蛋白酶、胰蛋白酶降解后活性增强 ,可能降解后部分小肽有了纤溶活性 ,这一特点与延胡索纤溶酶相似<sup>[17]</sup>。文献报道纳豆激酶 ( NK )在胃环境中活性有不可逆的钝化作用 ,而胰蛋白酶对纳豆激酶的纤溶活性无影响 ,因此纳豆激酶宜制成肠溶型制剂<sup>[15]</sup>。与 NK 相比 ,BpFE 可能更适于制成口服型或肠溶型制剂。

因为 BpFE 被胃蛋白酶、胰蛋白酶降解后活性增强 ,下一步也可考虑将 *BpFE* 基因克隆表达之后的产物 ,用胃蛋白酶或胰蛋白酶降解后再分离活性小肽做进一步的研究。

参考文献

[ 1 ] Modi NB , Eppler S , Breed J. Pharmacokinetics of a slower clearing tissue plasminoge activator variant , TNK-t PA , in patients with acute myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 1998 79( 2 ) :134 - 139.

- [ 2 ] Wu XC, Ye R, Duan Y. Engineering of plasmin-resistant forms of streptokinase and their production in *Bacillus subtilis*: streptokinase with longer functional half-life. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998 64( 3 ):824 – 829.
- [ 3 ] Chitte R, Dey S. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. *Letters in Applied Microbiology*, 2000 31 :405 – 410.
- [ 4 ] Liu XL, Du LX, Lu FP, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis*12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005 67( 2 ) :209 – 214.
- [ 5 ] Kim S, Choi N. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2000 64( 8 ) :1722 – 1725.
- [ 6 ] Sun T, Liu B, Li P, et al. New solid-state fermentation process for repeated batch production of fibrinolytic enzyme by *Fusarium Oxysporum*. *ProcBiochem*, 1998 33( 4 ) :419 – 422.
- [ 7 ] 邓永平, 刘晓兰, 田英华. 脉孢霉纤溶酶的酶学性质研究. 齐齐哈尔大学学报( *Journal of Qiqihar University* ) 2005 21( 1 ) :5 – 7.
- [ 8 ] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京:高等教育出版社, 2004 :214.
- [ 9 ] 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 2001 :43 – 65.
- [ 10 ] Fred Ausubel, Robert E Kingston, JG Seidman. 精编分子生物学实验指南. 马学军, 舒跃龙译. 北京:科学出版社, 1999 :39.
- [ 11 ] Kho CW, Park SG, Cho S. Confirmation of Vpr as a fibrinolytic enzyme present in extracellular proteins of *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*, 2005, 39 :1 – 7.
- [ 12 ] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京:科学出版社, 2000 :77 – 92.
- [ 13 ] 李建武, 肖能, 余瑞元. 生物化学试验原理和方法. 北京:北京大学出版社, 2001 :174 – 176.
- [ 14 ] Asif-Ullah M, Kim KS, Yu YG. Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus Roxburghi*. *Phytochemistry*, 2006, 67 :870 – 875.
- [ 15 ] Kim SH, Choi NS. Purification and characterization of Subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2000 64( 8 ) :1722 – 1725.
- [ 16 ] 王萍, 陈钧, 杨小明, 等. 纳豆激酶分离纯化及纤溶活性研究. 食品科学( *Food Science* ), 2005 26( 2 ) :60 – 61.
- [ 17 ] 顾昌玲, 朱宝成, 周艳芬. 延胡索纤溶酶的分离纯化及部分性质. 中国生化药物杂志( *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics* ) 2008 29( 2 ) :81 – 84.

## Identification of a fibrinolytic enzyme producing *Bacillus pseudomycoides* and purification and characterization of the enzyme

Changling Gu<sup>1</sup>, Xiaojun Guo<sup>1</sup>, Jia Li<sup>1</sup>, Xiaoyu Zhao<sup>2</sup>, Baocheng Zhu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

(<sup>2</sup> College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

**Abstract** : [ **Objective** ] To purify a single fibrinolytic enzyme from *Bacillus pseudomycoides* B-60 and to determine its N-terminal sequence and to characterize the fibrinolytic enzyme. [ **Methods** ] We examined the fibrinolytic enzyme activity by fibrin plate and purified fibrinolytic enzyme by ammonium sulfate fractional precipitation and DEAE anion exchange chromatography. [ **Results** ] Obtained a single protein fraction with fibrinolytic activity ( BpFE ) from *B. pseudomycoides* B-60. It appeared as a single band in the SDS-PAGE with a relative molecular weight of 34 kDa. The fibrinolytic activity of the protein was stable at 4 ~ 50°C and at pH 5 ~ 10. The activity sharply decreased above 50°C, and the total loss of activity at pH 3.0. The enzymatic activity was slightly enhanced by the ions of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, whereas strongly inhibited by Cu<sup>2+</sup> ion. Phenylmethyl sulfonyl fluoride ( PMSF ) could completely inhibit its activity. In addition, the activity improved when the protein was enzymatically hydrolyzed using trypsin and pepsin. The first 15 amino acids of the N-terminal sequence of the enzyme were determined to be VTGTNAVGTGKGVLG. The partial amino acids sequence alignment study of the enzyme from B-60 strain with bacilolysin, neutral protease and hydrolase which were from *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* and *Lactobacillus* sp. was carried out, and there is a 100% homogeneity between them. [ **Conclusion** ] We obtained a single fibrinolytic enzyme. Through its N-terminal sequence alignment study, a plasmin with high homogeneity to this protein was not found yet. This provided a basis for further study of new thrombolytic drugs.

**Keywords** : *Bacillus pseudomycoides*; fibrinolytic enzyme; purification; characterization

\* Corresponding author. Tel/Fax : + 86-312-7528258; E-mail : zhu2222@126.com

Received : 11 November 2008/Revised : 1 January 2009