

# 内生多粘类芽胞杆菌纤溶酶基因 *PPFE-I* 在大肠杆菌中融合表达及活性分析

吕凤霞, 陆兆新, 别小妹, 林谦, 张充, 曹林, 郭瑶, 汤彦舫

南京农业大学食品科技学院 酶工程研究室, 南京 210095

**摘要:** 以内生多粘类芽胞杆菌 EJS-3 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 *PPFE-I* 基因, 并克隆到 pMD19-T 载体上, 构建克隆载体 pMD-*PPFE-I*, 经测序正确后, 将 *PPFE-I* 基因克隆至表达载体 pET-DsbA 上构建重组表达质粒 pET-DsbA/*PPFE-I*, 将其转化至 *E. coli* BL21(DE3), 在 IPTG 诱导下实现了融合蛋白 DsbA-*PPFE-I* 的表达, 表达产物酶活性达 228 IU/mL。表达产物用 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行鉴定。SDS-PAGE 电泳检测表明融合蛋白主要以可溶形式表达, 占菌体总蛋白的 18.4%。Western blotting 结果表明在相应分子量处有一条特异性条带, 证实该蛋白为 DsbA-*PPFE-I* 融合蛋白。表达产物通过 Ni 亲和柱、凝血酶酶切及 Sephadex G-100 等步骤进行分离纯化, 并用 MALDI-TOF 质谱对重组酶进行了鉴定。纯化后的表达产物在纤维蛋白平板上表现出明显的纤溶活性。

**关键词:** 内生菌, 多粘类芽胞杆菌, 纤溶酶, 基因克隆, 融合表达

## Fusion expression of fibrinolytic enzyme gene *PPFE-I* from endophytic *Paenibacillus polymyxa* in *Escherichia coli* and activity analysis

Fengxia Lü, Zhaoxin Lu, Xiaomei Bie, Qian Lin, Chong Zhang, Lin Cao, Yao Guo, and Yanchong Tang

Laboratory of Enzyme Engineering, College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

**Abstract:** With the genomic DNA of strain EJS-3 as the template, we amplified the gene of fibrinolytic enzyme from *Paenibacillus polymyxa* (*PPFE-I*) by PCR. We purified the PCR product and ligated it into pMD19-T. After DNA sequencing, we cloned the *PPFE-I* gene into expression vector pET-DsbA and transformed it into *Escherichia coli* BL21(DE3). Upon induction of IPTG, we found that the activity of recombinant fibrinolytic enzyme fused with DsbA expressed in *Escherichia coli* was 228 IU/mL. SDS-PAGE analysis showed that the recombinant enzyme was soluble and accounted for about 18.4% of total cell protein. Western blotting demonstrated that the recombinant protein was DsbA-*PPFE-I*. We purified the recombinant enzyme by Ni affinity chromatography, thrombin digestion and sephadex G-100 gel-filtration, and identified the molecular weight of purified product to be 66.3 kDa with MALDI-TOF mass spectrometry. The purified enzyme exhibited distinct fibrinolytic activity on fibrin plate.

**Received:** February 8, 2010; **Accepted:** May 6, 2010

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2008AA10Z309), High-Tech Development Program of Jiangsu Province (No. BG2007337), Science and Technology Support Program of Jiangsu Province (No. BE2008308).

**Corresponding author:** Zhaoxin Lu. Tel/Fax: +86-25-84396583; E-mail: fmb@njau.edu.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2008AA10Z309), 江苏省高新技术计划 (No. BG2007335), 江苏省科技支撑计划 (No. BE2008308) 资助。

**Keywords:** endophytes, *paenibacillus polymyxa*, fibrinolytic enzyme, gene cloning, fusion expression

血栓栓塞性疾病严重危害人类健康和生命, 溶栓疗法是治疗血栓栓塞性疾病最为有效并且可靠的手段。溶栓疗法主要是通过药物溶解血栓中的主要基质血纤维蛋白, 或激活血液中无活性的血浆纤溶酶原, 形成有活性的纤溶酶来催化血纤维蛋白的水解, 使血栓溶解, 血管再通。目前临床应用的溶栓药物有较好的疗效, 明显降低了患者的死亡率和致残率, 但还存在特异性不高、半衰期短、易出血及再栓塞等缺点。因此迫切需要研制开发高效、特异、安全、副作用小、价廉的新型溶栓药物。已有研究表明, 许多中药具有抗血小板聚集、抗血栓形成的作用, 包括生物碱类、黄酮类以及皂甙等化合物<sup>[1]</sup>, 尤其是活血化瘀中草药具有不同程度的抗凝血、血小板聚集及溶解血栓的作用<sup>[2-5]</sup>。生活在植物组织内的内生菌, 由于内生菌与宿主植物长期协同进化过程中, 彼此构成了稳定的生态关系, 使内生菌具有产生某些与植物相同或相似化合物的能力<sup>[6]</sup>。因此, 从植物内生菌的代谢产物中寻找新型溶栓剂具有深远理论意义和潜在的应用价值。目前, 关于内生菌来源纤溶酶的研究报道尚不多见。

本研究室首次从中药植物组织中筛选分离到一株纤溶活性较高和良好体外溶栓效果的多粘类芽胞杆菌 EJS-3<sup>[7]</sup>。由于从天然产酶菌株中分离纤溶酶不仅产量低而且酶的分离纯化过程操作繁琐, 可采用基因工程技术在大肠杆菌表达系统中高效表达纤溶酶, 进一步提高酶的产量, 简化纯化过程。

本研究采用 PCR 方法克隆了内生菌多粘类芽胞杆菌纤溶酶 *PPFE-I*, 构建了 pET-DsbA/*PPFE-I* 融合表达载体, 将其转化 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 后获得可溶性表达, 实现了在大肠杆菌中有活性的表达, 并对表达产物进行分离纯化研究, 为利用基因工程技术在原核系统中高效表达纤溶酶提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

产纤溶酶芽胞杆菌 EJS-3 为本室从植物内生菌

中分离并保存, 经鉴定为多粘类芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa*; *E. coli* TOP10F' 及 *E. coli* BL21(DE3) pLysS 为本室保存。表达载体 pET-DsbA 为深圳市勤宝升生物技术开发公司产品。

#### 1.1.2 工具酶和化学试剂

限制性内切酶 *Bam* H I、*Bcu* I、T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; 高保真 DNA 聚合酶 Pfu、基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒购自上海 Sangon 公司; Western blotting 化学发光系统为 Amersham 公司产品; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜、Sephadex G-100 为 Amersham Biosciences 产品; Ni-NTA 购自 QIAGEN (德国)。其他试剂均为 Amersco 公司产品。

## 1.2 方法

### 1.2.1 目的基因的克隆及重组表达载体的构建

根据 GenBank: D00861.1 序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。P1: 5'-CGCGGATCC ATGATTAAGTATGGTTTTC-3' (下划线部分为 *Bam* H I 的酶切位点); P2: 5'-CGGACTAGTTTAGCC TACAGCGTCAAAAG-3' (下划线部分为 *Bcu* I 的酶切位点)。PCR 程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min; 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经胶回收纯化后, 与克隆载体 pMD19-T 连接, 构建克隆载体 pMD-*PPFE-I*, 阳性克隆委托上海生工公司测序。再用上述 2 种限制性内切酶酶切重组质粒 pMD19-*PPFE-I* 及 pET-DsbA 表达载体后以 T4 DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* TOP10F' 感受态细胞, 在 LB 平板上培养。挑取单个菌落, 小量提取质粒, 酶切及测序鉴定。

### 1.2.2 融合蛋白的诱导表达与可溶性分析

将重组表达质粒 pET-DsbA/*PPFE-I* 和对照质粒 pET-DsbA 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)pLysS, 分别挑取单克隆, 接入 20 mL 含氨苄青霉素 (120 μg/mL) 和葡萄糖 (0.2%) 的 LB 培养基, 30℃、80 r/min 振荡培养过夜。以 2.5% 接种量接入 100 mL 含氨苄青

霉素 (120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和葡萄糖 (0.2%) 的 LB 培养基, 35 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 2~3 h 至  $OD_{600}$  为 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 诱导表达, 不同时间取样。离心收集各菌体细胞并超声破碎, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 分析目的蛋白的表达形式, 并用纤维蛋白平板法测定其活性。

### 1.2.3 表达产物的纯化

将 10 mL 上清液上样于 2 mL 的 Ni-NTA 亲和柱。层析柱预先用亲和缓冲液 (50 mmol/L PBS, 0.3 mol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 平衡 10 个柱体积, 上样速度为 1 mL/min。上样后用 10 个柱体积亲和缓冲液洗去未吸附的杂蛋白, 再用 5 倍柱体积含有 30 mmol/L 咪唑的亲和缓冲液洗脱杂蛋白。洗脱大部分杂蛋白后, 用 3~4 倍柱体积的凝血酶缓冲液 (150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris, 2.5 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.9) 平衡柱子, 加入 2 mL 凝血酶缓冲液, 再加入 50~60 U 凝血酶, 22 $^{\circ}\text{C}$  酶切 8 h 后<sup>[8]</sup>, 用约 10 mL 凝血酶缓冲液将酶切产物冲下, 收集酶液, 用纤维蛋白平板法测定其活性。活性样品用 SDS-PAGE 电泳检测, 并进行蛋白含量的测定。

酶切后的目的蛋白经过 Sephadex G-100 凝胶过滤层析进一步纯化, 用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 缓冲液洗脱, 流速 0.5 mL/min。收集目的峰, 得到重组酶纯品, -70 $^{\circ}\text{C}$  冻存。

### 1.2.4 纤溶酶活性测定

重组纤溶酶的纤溶活性检测参照文献[9]。

### 1.2.5 蛋白质浓度测定

采用 Bradford 法<sup>[10]</sup>, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准样品。

### 1.2.6 SDS-PAGE 电泳检测

参照 Laemmli UK 报道的方法<sup>[11]</sup>进行, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%。电泳完毕后, 取出凝胶, 考马斯亮蓝染色、脱色。

### 1.2.7 重组蛋白的 Western blotting 分析

蛋白纯化产物经 SDS-PAGE 电泳分离后, 使用半干法将 SDS-PAGE 胶中融合蛋白转移至 PVDF 膜上, 5 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗抗 PPFE-I 抗血清, 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBST 洗膜 5 次, 每次 10 min,

再加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG, 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h, PBST 洗膜 3 次后, ECL 化学发光显色, 压片。

### 1.2.8 MALDI-TOF-MS 检测

根据 Kussmann 的方法<sup>[12]</sup>对重组酶纯品进行 MALDI-TOF (Time-of-Flight) 质谱分析。样品 200 ng/ $\mu\text{L}$ , 溶解于 0.1% TFA, 取 10  $\mu\text{L}$  与饱和溶解的 70% ACN/30% 0.1TFA 的介子酸等体积混合。由南京医科大学中心实验室测定。

## 2 结果

### 2.1 目的基因的克隆及重组表达载体的构建

以内生多粘类芽胞杆菌 ESJ-3 总 DNA 为模板, P1 和 P2 为引物, 进行 PCR 反应, 扩增得到 1 770 bp 的 DNA 片段, 与预期结果相符。PCR 扩增片段的序列测定和分析表明, 该序列编码区长 1 770 bp, 可编码 590 个氨基酸, 该基因编码的蛋白的分子量为 63 414.58 Da; 通过与其他纤溶酶的氨基酸序列比对 (图 1), 发现本研究得到的基因序列与 *Bacillus pseudomycolides* 纤溶酶 (GenBank Accession No. ACK38255) 的亲缘关系最近, 相似性达到 65% 以上。构建好的重组表达质粒 pET-DsbA/PPFE-I, 经 *Bam*H I 和 *Bcu* I 双酶切后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示 2 条 DNA 条带, 一条与质粒 pET-DsbA 相对分子质量相符, 约为 3 600 bp, 另一条与 PCR 产物相对分子质量一致, 约为 1 770 bp, 证明重组表达质粒 pET-DsbA/PPFE-I 已构建成功, 且 DNA 测序结果完全正确。

### 2.2 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

将重组质粒 pET-DsbA/PPFE-I 和空质粒 pET-DsbA 分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 后, 用 IPTG 进行诱导表达, 不同时间取样进行 SDS-PAGE 分析。经 IPTG 诱导后, 大量表达出分子量约为 88 kDa 的蛋白质, 并且随诱导时间的增长其表达量增加 (图 2)。这与预测的融合蛋白大小相同, 相当于 24.7 kDa 的 DsbA 和 63.4 kDa 的 PPFE-I 之和。经 Bandscan 软件分析显示, 表达的目的蛋白占菌体总蛋白的 18.4%。而对照菌 pET-DsbA 中没有出现这条带。同时, 该表达蛋白存在菌裂解液的上清液中, 而沉淀中没有出现表达区带 (图 3), 这说明该表达蛋白主要以可溶形式存在。

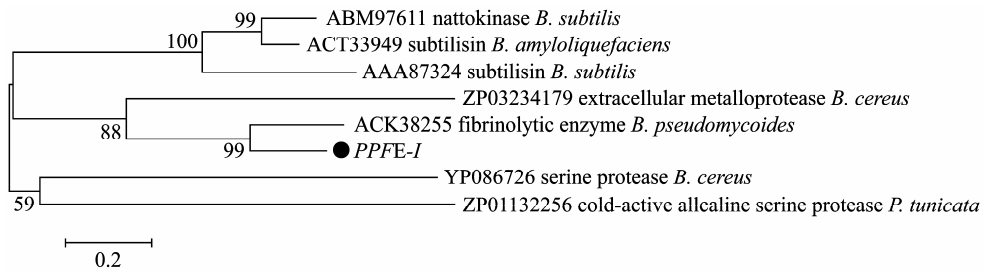


图1 *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 纤溶酶基因序列的进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of *PPFE-I* gene.

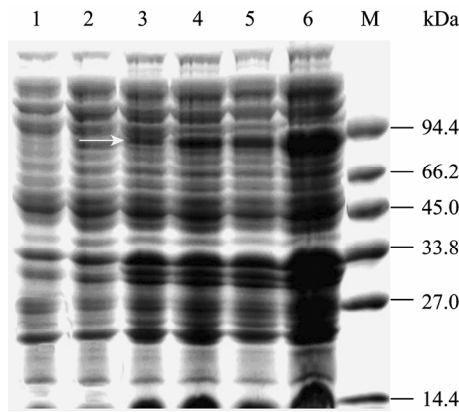


图2 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA-*PPFE-I* 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression products of *E. coli* BL21/pET-DsbA-*PPFE-I*. M: protein molecular weight marker; 1: *E. coli* BL21/pET-DsbA; 2: uninduced *E. coli* BL21/pET-DsbA-*PPFE-I*; 3-6: *E. coli* BL21/pET-DsbA-*PPFE-I* induced by IPTG for 0.5, 1, 1.5 and 2 h, respectively.

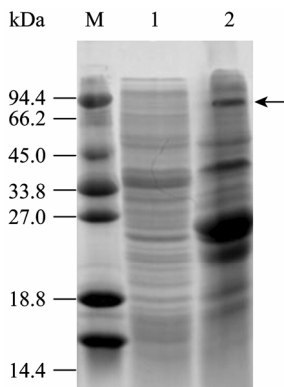


图3 *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA-*PPFE-I* 表达产物的可溶性分析

Fig. 3 Solubility analysis of *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA-*PPFE-I* expression products. M: protein molecular weight marker; 1: deposit after sonication and centrifugation of *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA-*PPFE-I*; 2: supernatant after sonication and centrifugation of *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA-*PPFE-I*.

用纤维蛋白平板测定表达产物纤溶活性。*PPFE-I*重组菌的发酵上清液在纤维蛋白平板上有明显的透明水解圈,说明表达产物具有纤溶活性,而含空载体重组菌为对照,其上清液无透明水解圈(图4)。纤溶活性测定结果表明,*PPFE-I*重组菌发酵上清液纤溶酶活性达 228 IU/mL。

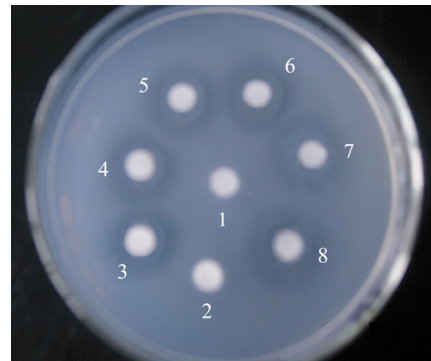


图4 纤维蛋白平板法测定纤溶活性

Fig. 4 Fibrinolytic activity assay on fibrin plate. 1, 2: supernatant after sonication and centrifugation of *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA; 3-8: supernatant after sonication and centrifugation of *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA-*PPFE-I*, respectively.

### 2.3 表达产物的纯化和鉴定

经上述 SDS-PAGE 分析,表明 pET-DsbA/*PPFE-I* 重组质粒在大肠杆菌中可以实现可溶表达。上清液进行 Ni-NTA 亲和柱纯化回收。纯化后的融合蛋白进行 SDS-PAGE 后转印 PVDF 膜,用抗 *PPFE-I* 抗体进行 Western blotting 鉴定。结果如图 5 所示,在 88 kDa 处有一条特异性条带,其大小与预测的融合蛋白是一致的,而 *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA 细胞裂解液没有检测到任何条带,表明已经成功表达了目的蛋白。

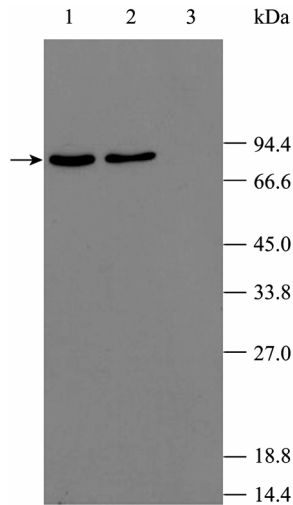


图5 DsbA-PPFE-I Western blotting 分析

Fig. 5 Analysis of DsbA-PPFE-I Western blotting. 1, 2: purified fusion protein; 3: pET-DsbA.

上清液经 Ni-NTA 亲和柱纯化时, 杂蛋白大部分可被含有 30 mmol/L 咪唑的 Binding Buffer 洗脱, 而融合蛋白不被洗脱, 融合蛋白在镍柱上经凝血酶酶切 8 h 后, 收集酶液, 用纤维蛋白平板法测定其有纤溶活性, 并用 SDS-PAGE 电泳检测 (图 6)。

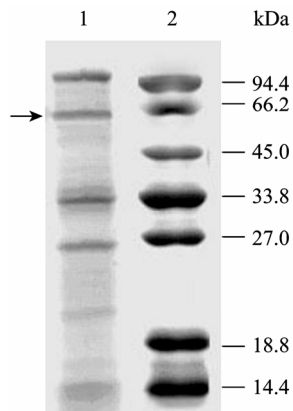


图6 凝血酶酶切后的表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of expression products by thrombin restriction. 1: recombinant enzyme with thrombin digestion; 2: protein molecular weight marker.

由图 6 可以看到, 融合蛋白经凝血酶酶切后, 除了 63 kDa 大小的重组酶, 还有其他的杂蛋白存在, 需经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析进一步纯化, 收集目的峰, 得到比活力为 2 051 IU/mg 的重组酶 (图 7), 用 MALDI-TOF 质谱鉴定纯度。质谱鉴定如图 8 所示, 结果显示其单同位素峰平均相对分子质量为 63 334, 与预测的相对分子质量 63 414 基本一致。

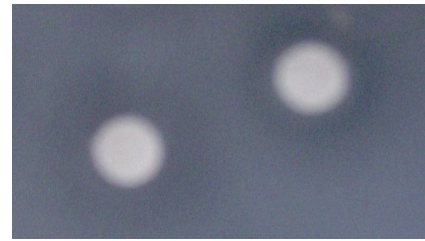


图7 纯化产物的纤溶活性测定

Fig. 7 Fibrinolytic activity assay of purified expression products on fibrin plate.

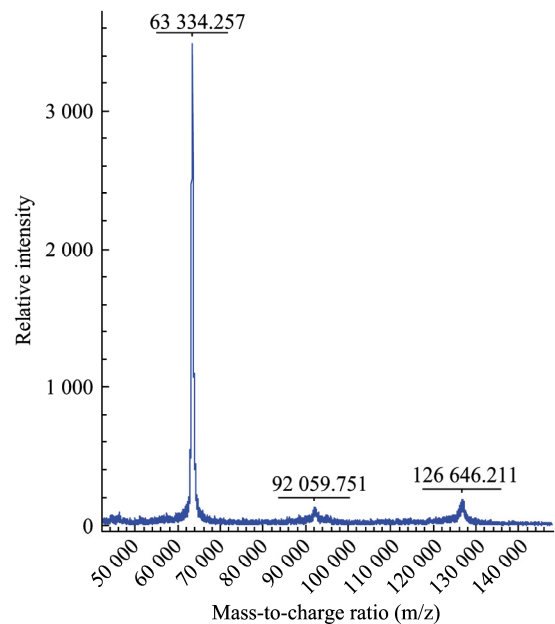


图8 重组酶的 MALDI-TOF 质谱图

Fig. 8 MALDI-TOF mass spectrum of the recombinant fibrinolytic enzyme.

### 3 讨论

自从 Nakamura 等<sup>[13]</sup>于 1992 年首次克隆了纳豆激酶基因并测定了全基因序列, 使得利用基因工程技术提高纤溶酶活性及产量成为可能。国内研究者们相继对纤溶酶基因如纳豆激酶 (NK)、豆豉溶栓酶基因的表达进行探索。本研究采用 PCR 方法克隆了内生多粘芽胞杆菌纤溶酶基因, 其推导的纤溶酶氨基酸序列和已经报道的纳豆激酶、豆豉溶栓酶基因的氨基酸序列相似性只有 30%, 与 *Bacillus pseudomycolides* (Genbank Accession No. ACK38255) 纤溶酶相似性最高为 65%, 所以内生多粘芽胞杆菌纤溶酶可能是一种新型的纤溶酶。本研究克隆的基因序列编码的纤溶酶与已经报道的芽胞杆菌纤溶酶的性质差异尚需进一步探讨。

目前对纤溶酶基因表达的研究较多, 主要以纤溶酶基因的原核表达系统为主, 研究结果也不尽相同, 主要在于纤溶酶基因表达后的产物是否有活性。本研究采用 PCR 方法克隆了内生菌多粘类芽胞杆菌纤溶酶基因, 构建了 pET-DsbA 表达载体, 采用 T7 启动子和 DsbA 基因融合表达, 将构建 pET-DsbA/*PPFE-I* 融合表达载体转化 *E. coli* BL21(DE3) 后获得可溶性表达, 表达的融合蛋白占菌体总蛋白的 18.4%, 纤维蛋白法测定显示纤溶活性, 纤溶酶活性比野生菌高 2 倍左右, 达 228 IU/mL。表达量和酶活性与张淑梅<sup>[14]</sup>、Zhang<sup>[15]</sup>等研究的表达水平相近。本研究中, 尽管表达产物以可溶性蛋白质形式表达, 且具有纤溶活性, 但融合蛋白表达量偏低。可能在于启动子强度和宿主菌的选择、质粒的拷贝数、培养条件的控制、mRNA 稳定性等几方面存在问题。此外, 本研究中的 *P. polymyxa* EJS-3 纤溶酶氨基酸编码密码子存在 6 个稀有密码子, 可能会对该基因在 *E. coli* 中的表达水平产生一定的影响。

金属螯合层析 (IMAC) 是近年来发展起来的蛋白质分离技术, 通过在 C 端或 N 端添加标签的方法简化重组蛋白质的提取过程。本研究构建了 pET-DsbA/*PPFE-I* 的重组表达载体, 在表达产物 N 端融合了 His-Tag 纯化标签, 故可利用 Ni-NTA 亲和柱来提纯表达出的融合蛋白, 同时该载体在 DsbA 编码区 3' 端的下游有一凝血酶酶切位点, 因此可用凝血酶在镍柱上将融合蛋白切割, 酶切后得到目的蛋白和 DsbA 配体, 经 Sephadex G-100 进一步纯化。通过镍亲和层析、凝血酶酶切以及分子筛层析对表达产物进行了纯化, 操作简单易行, 特别是将纯化与融合子的去除在 Ni-NTA 亲和柱上一步完成, 大大简化了纯化步骤, 为重组纤溶酶的生产提供了依据。

**致谢:** MALDI-TOF-MS 分析结果是在南京医科大学中心实验室王富强老师的帮助下完成的, 在此表示感谢。

## REFERENCES

[1] He GX, Rong H, Zhang RP. Research of the natural medicine treatment of cardiovascular diseases. *Chin J*

*Ethnomed Ethnopharm*, 2009, **5**: 10-13.

何广新, 容辉, 张荣平. 天然药物治疗心血管病研究进展. *中国民族民间医药*, 2009, **5**: 10-13.

[2] Li GX, Zhao ZY, Yuan JS, *et al.* On the function of 575 kinds of Chinese herbal medicines on extracorporeal antithrombosis and thrombolysis. *Chin J Hemorheol*, 1995, **5**(2): 30-32.

李国贤, 赵子余, 袁景珊, 等. 575 种中草药体外抗栓溶栓作用探讨. *中国血液流变学杂志*, 1995, **5**(2): 30-32.

[3] Xie WG, Wei YS, Wang HX, *et al.* Fibrinolytic function and fibrinolytic inhibition effect of Chinese drugs used to activate blood flow and remove blood stasis. *Chin J Trad Chin Med Pharm*, 1996, **11**(6): 18-22.

谢文光, 魏钰书, 王会信, 等. 活血化痰中药的纤溶和纤溶抑制作用. *中国医学报*, 1996, **11**(6): 18-22.

[4] Yang J, Li H, Hong Q, *et al.* Chinese herbal medicine research of antithrombotic effect. *Nat Prod Res Dev*, 1997, **9**(2): 17-20.

杨嘉, 李宏, 洪旗, 等. 中药抗血栓作用的研究. *天然产物研究与开发*, 1997, **9**(2): 17-20.

[5] Zhang YF. A survey of studies on thrombogenesis and the effect of the traditional Chinese medicines on thrombosis. *J Shenyang Pharm Univ*, 1997, **14**(3): 231-234.

张逸凡. 血栓的形成及中药抗栓溶栓概况. *沈阳药科大学学报*, 1997, **14**(3): 231-234.

[6] Huang RH, Liu HQ, Dilbar T, *et al.* Survey of endophytes and host plants. *J Xinjiang Norm Univ: Nat Sci Ed*, 2008, **27**(1): 76-79.

黄瑞虎, 刘会强, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 植物内生菌及其宿主植物研究概况. *新疆师范大学学报: 自然科学版*, 2008, **27**(1): 76-79.

[7] Lu FX, Sun LJ, Lu ZX, *et al.* Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes. *Curr Microbiol*, 2007, **54**: 435-439.

[8] Luo Q, Deng ZW, Wang JF. Vector construction, protein expression and purification of NAP1 (18-44). *J Beijing Norm Univ: Nat Sci Ed*, 2007, **45**(5): 538-542.

罗权, 邓志威, 王金凤. 鼻咽癌 NAP1 (18-44) 融合表达载体的构建、表达纯化及初步研究. *北京师范大学学报: 自然科学版*, 2007, **45**(5): 538-542.

[9] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys*, 1952, **40**(2): 346-351.

[10] Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254.

[11] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the

- assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680–685.
- [12] Kussmann M, Nordhoff E, Rahbek-Nielsen H, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J Mass Spectrom*, 1997, **32**(6): 593–601.
- [13] Nakamura T, Yamagata Y, Ichishima E. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT, aprN, of *Bacillus subtilis* (*natto*). *Biosci Biotech Biochem*, 1992, **56**: 1869–1871.
- [14] Zhang SM, Zhang YH, Zhao XX, *et al.* Cloning and expression of nattokinase gene. *Chin J Biochem Mol Biol*, 1999, **15**(6): 912–915.  
张淑梅, 张云湖, 赵晓祥, 等. 纳豆激酶基因的克隆与表达. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15**(6): 912–915.
- [15] Zhang RH, Xiao L, Peng Y, *et al.* Gene expression and characteristics of a novel fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) in *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*, 2005, **41**(2): 190–195.