

蚯蚓纤溶酶组分的分离纯化和分析

赵晓瑜* 静天玉

(河北大学生命科学学院生物工程研究所, 保定 071002)

摘要 通过以大豆胰蛋白酶抑制剂为配基的亲和层析, 从蚯蚓 (大平二号, 即赤子爱胜蚓) 纯化出的纤溶酶是一组非均一的纤维蛋白水解酶。经 DEAE-纤维素离子交换和制备电泳进一步分离纯化, 得到 12 个单一组分。这些组分的等电点 (pI) 按照它们在聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 图谱上的顺序从 4.0 开始依次降低; SDS-PAGE 证明, 除 3、4 外, 其余组分均只含一种多肽链, 分子质量在 22~34 ku 之间; 用 shift 试剂和酚-硫酸染色, 显示 1、2、6.5 和 7 是糖蛋白, 其中 7 的糖含量最高; 以 BAEE、Chromozym UK 和 Chromozym PL 为底物测定, 7 的纤溶酶活性最高。

关键词 蚯蚓, 纤溶酶, 组分, 分离, 纯化, 纤溶酶酶活

学科分类号 Q55

蚯蚓纤溶酶 (earthworm fibrinolytic enzyme, EFE) 组分随制备方法的不同而异^[1~5]。本文通过以大豆胰蛋白酶抑制剂为配基的亲和层析, 从大平二号纯化出来的 EFE 是一组非均一的纤维蛋白水解酶, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 图谱上呈现为 11~13 条蛋白质区带^[5], 其中能明显分开的有 9 条主带, 按电泳迁移率由小到大分别命名为 1~9 组分。经 DEAE-纤维素离子交换层析和制备电泳将 EFE 进一步分离纯化, 得到了 12 个单一组分: 除 1~9 外, 还有位于 4 和 5 之间的 4.5, 位于 6 和 7 之间的 6.5 以及组成 5 的 5a 和 5b。本文对这些组分进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

EFE, 本室制备; DEAE-32, Whatmen 公司; 纤维蛋白原 (牛血, 86 mg/支)、纤维蛋白溶酶原 (牛血, 14 U/支), 中国药品生物制品检定所产品; 凝血酶 (牛血, 100 U/支), 天津生化制品厂产品; N^α-苯甲酰-L-精氨酸乙酯盐酸盐 (BAEE), 上海东风制药厂产品; Chromozym UK、Chromozym PL, 购自 Boehringer Mannheim 公司; 分子质量标准蛋白, 购自北京天象人公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 离子交换层析: DEAE-32 用磷酸缓冲液平衡, EFE 上柱后用 NaCl 浓度梯度洗脱或分步洗脱, PAGE 检查分离效果。

1.2.2 制备电泳: 按 Eugenio 等^[6]方法并做适当改进, 将样品经 PAGE 后反染^[6], 准确切出所需区

带, 置电泳洗脱槽 (Bio-Rad 公司), 进行电泳洗脱。回收样品, 4℃保存。

1.2.3 蛋白质浓度、等电点和 BAEE 水解活性的测定以及活性印迹实验, 同前文所述^[5]。按 Chromozym UK、Chromozym PL 使用说明测定样品的纤溶酶和尿激酶活性。

1.2.4 糖蛋白的鉴定: 样品经 PAGE 后, 用 shift 试剂^[7]和百里苯酚-硫酸^[8]染色。

1.2.5 蛋白质分子质量的测定: 利用 SDS-PAGE, 根据分子质量标准蛋白做标准曲线。

2 结果

2.1 组分的分离纯化

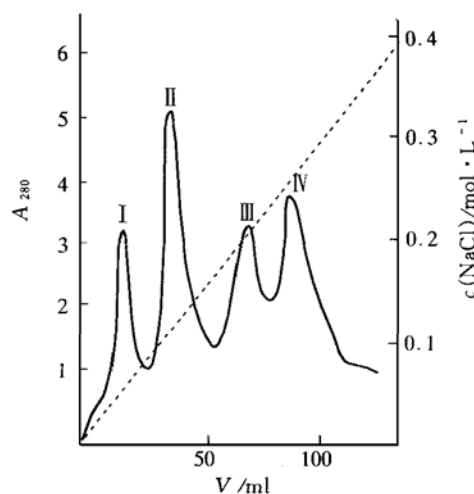


Fig. 1 The elution profile of EFE from DEAE-cellulose

* 通讯联系人。

Tel: 0312-5079735, E-mail: jing@nic.hbu.edu.cn

收稿日期: 2000-03-12, 接受日期: 2000-06-07

通过 DEAE-32, 利用 NaCl 浓度梯度洗脱可以将 EFE 分离成 5 大部分: 只含 1 的过柱液, 含 2 的峰 I, 3、4 的峰 II, 4.5、5a 和 5b 的峰 III, 以及其余组分的混合峰 IV (图 1). 在此基础上, 将上述含混合组分的部分第二次上柱, 采用分步洗

脱, 纯化到各单一组分. 但 6.5、7、8 和 9 很难分离, 采用制备电泳获得纯品. 从图 2a 可以看到纯化样品与对照呈阶梯式一一对应. 在活性印迹图 (图 2b) 中也显示了这种阶梯, 说明它们均有纤溶酶活性, 只是 5b、8 和 9 的活性相对要小.

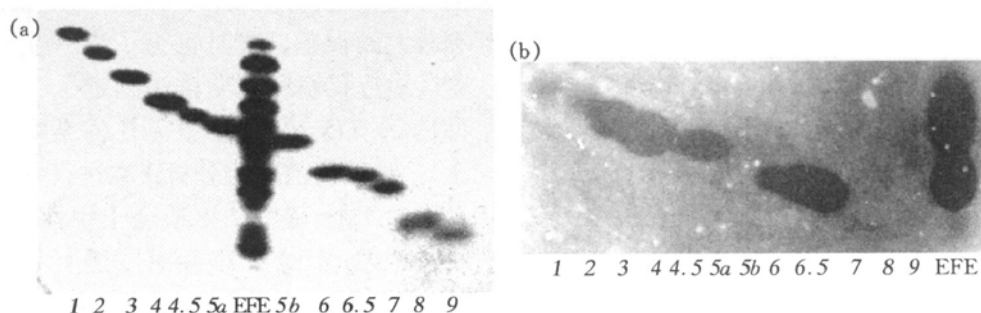


Fig.2 PAGE (a) and fibrinolytic activity blotting (b) of purified EFE components

2.2 组分分析

2.2.1 糖蛋白的鉴定: 将上述分离纯化的样品进行 PAGE (根据蛋白质浓度调整点样量, 每孔 5 μ g). 电泳后按 1.2.4 用 shift 试剂进行糖染色.

结果 1、2、6.5 和 7 呈明显的红色区带, 尤其是 7 (图 3a). 用百里苯酚-硫酸法, 仅有 6.5 和 7 显红色区带 (图 3b).

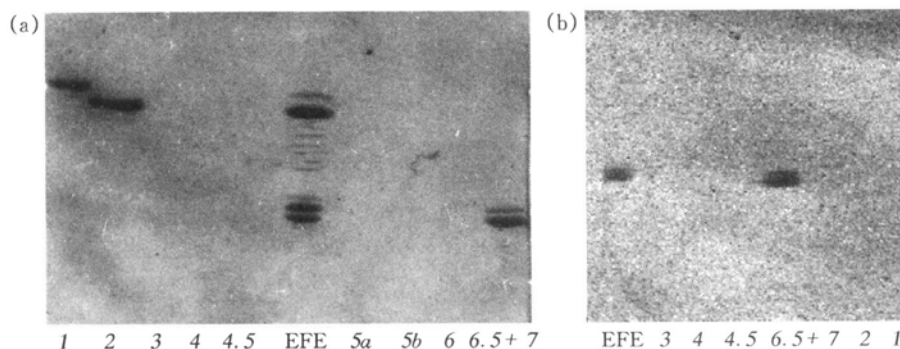


Fig.3 Glycoprotein identification of EFE components using shift reagent (a) and thymol/sulfuric acid (b) after PAGE

2.2.2 蛋白质分子质量的测定: 同样这些样品进行 SDS-PAGE. 除 3 和 4 外, 各组分均显示单条多肽 (图 4). 采用不同浓度的胶电泳, 分子质量基本相同. 测定结果列入表 1.

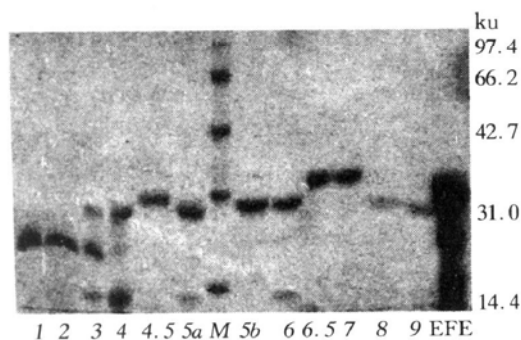


Fig.4 SDS-PAGE of EFE components

Table 1 Molecular weights of EFE components

No	1	2	3	4	4.5	5a	5b	6	6.5	7	8	9
M/ku	22	22	13	13	30	26	28	28	33	34	28	26
			19	19								
			26	26								

2.2.3 等电点: 由等电聚焦电泳实验结果证明, EFE 各组分的等电点都在 4.0 以下, 如图 5 所示: 随着组分序号的增加, pI 值从 4.0 逐渐降低, 排列顺序与电泳迁移率和 DEAE-纤维素离子交换层析洗脱顺序一致.

2.2.4 BAEE 水解活性、纤溶酶和尿激酶活性的测定: 由 BAEE 和 Chromozym UK 和 Chromozym

PL 为底物, 对各组分分别测定相应活性, 结果见表 2.

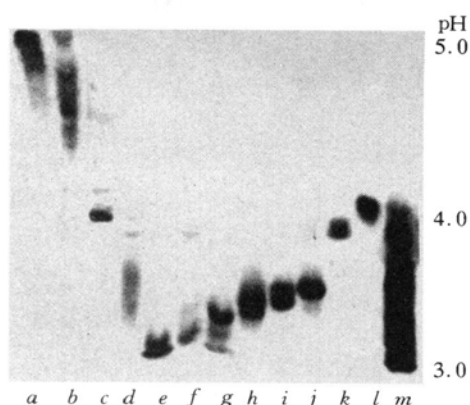


Fig. 5 Isoelectric focusing electrophoretogram (IEF) of EFE components

m: ampholyte (3.0~5.5); *a*: human serum albumin (pI: 4.9); *b*: soybean trypsin inhibitor (pI: 4.4); *c*: histone (pI: 4.0); *d*: fetuin (pI: 3.4~3.5).

Table 2 Enzyme activity of EFE components

Component	A (BAEE) 253 _{nm}	A (Chromozym UK) 405 _{nm}	A (Chromozym PL) 405 _{nm}
1	22	1.4	7
2	29	0.6	0.5
3	6.5	0.05	0.2
4	12.5	0.18	0.3
4.5	0	0.08	0.05
5a	15	0.24	0.3
5b	6	1.5	1
6	17	4	3
6.5	23	20	320
7	26	450	330
8	2	—	—
9	2	—	—
EFE	6.4	430	332

Unit of enzyme activity: $\Delta A \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$

3 讨 论

从蚯蚓体内提取溶栓成分的研究有很多报道, 而且粗提物已经成为临床上应用的溶栓药物, 然而有关纤溶酶活性组分分离纯化和分析的报道却不多见.

由表 2 看出, EFE 的组分主要为胰蛋白酶类, 但 4.5 除外; EFE 的纤维蛋白水解能力由纤溶酶和类尿激酶活性 (即直接溶解活性和激活活性) 组

成, 其中 7 的两种活性均最高. 7 的分子质量与 Mihara^[1]等报道的纤溶活性最高组分 F- III-1 一样, 同时 N 端分析也相同 (另文发表). 然而 Mihara 等并未指出 F- III 是糖蛋白, 而且二者的等电点也不相同. 不过 Jeon 等^[2]报道了 31.6 ku (SDS-PAGE) 的单体糖蛋白. 考虑到 SDS-PAGE 法测定分子质量有较大的误差, 同时也为了进一步验证样品的纯度, 最近我们利用质谱法测定了 7 的精确分子质量是 29 775 u, 图谱中无任何杂峰 (结果另文发表). 对于 7 的糖链分析正在进行中.

由于酚/硫酸法更适合于中性糖的测定, 在用百里苯酚/硫酸法对各组分进行糖染色时, 只有 6.5 和 7 有明显的红色, 说明 6.5 和 7 的中性糖含量较高.

上述初步研究证实, EFE 的各组分的性质不尽相同, 其纤溶酶活性大小也各异. 通过对 EFE 的组分分离和分析, 可望找到一个最好的溶栓组分.

致谢 97 届生物系毕业生徐军和赵占学参加了部分纯化工作.

参 考 文 献

- Mihara H, Sumi H, Yoneta H, *et al.* A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japanese Journal of Physiology*, 1991, **41** (3): 461~472
- Jeon O H, Moon W J, Kim D S. An autocoagulant/fibrinolytic proteinase from *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol*, 1995, **28** (2): 138~142
- 杨嘉树, 李玲媛, 茹炳根. 蚯蚓体内一种纤溶酶原激活剂 (ϵ -PA) 的分离纯化. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, **14** (2): 156~162
Yang J S, Li L Y, Ru B G. *Chin J Biochem Mol Biol*, 1998, **14** (2): 156~162
- 周元聪, 朱 洪, 陈远聪, 等. 赤子爱胜蚓 (*Eisenia faetida*) 纤溶酶的分离纯化. *生物化学与生物物理学报*, 1988, **20** (1): 35~41
Zhou Y C, Zhu H, Chen Y C, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 1988, **20** (1): 35~41
- 赵晓瑜, 静天玉. 蚯蚓纤溶酶的成分分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 1998, **14** (4): 407~411
Zhao X Y, Jing T Y. *Chin J Biochem Mol Biol*, 1998, **14** (4): 407~411
- Eugenio H, Hector S, Angela S H, *et al.* Recovery of biologically active proteins detected with imidazole-sodium dodecyl sulfate-zinc (reverse stain) on sodium dodecyl sulfate gel. *Analytical Biochemistry*, 1996, **240** (1): 150~152
- Hartmut G, David M N J. Glycoproteins of cell surface. *J Biol Chem*, 1971, **246** (20): 6339~6340
- David R. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. *Anal Biochem*, 1979, **99**: 474~476

Separation, Purification and Analysis of the Components of Earthworm Fibrinolytic Enzymes

ZHAO Xiao-Yu^{*}, JING Tian-Yu

(*Biotechnology Institute, Life Science College of Hebei University, Baoding 071002, China*)

Abstract The earthworm fibrinolytic enzymes (EFE) were separated by affinity chromatography using soybean trypsin inhibitor as a matrix. The enzymes were further separated and purified into 12 components after DEAE-32 chromatography and preparative electrophoresis. The *pI* of these components gradually decreased from pH 4.0 according to electrophoresis mobility from higher to lower on PAGE. The molecular weights were in the range of 22~34 ku. 6.5 and 7 were glycoproteins proved by staining with the Schiff reagent and thymol/sulfuric acid. The fibrinolytic activity of 7 was highest as determined using chromzym UK and chromzym PL as specific substrates.

Key words earthworm, fibrinolytic enzyme, component, separation, purification, fibrinolytic activity

^{*} Corresponding author. Tel: 86-312-5079735, E-mail: jing@nic.hbu.edu.cn

Received: March 12, 2000 Accepted: June 7, 2000