

## 有效成分。

## 沙蚕纤溶酶的一种纯化方法

张伟云,陈 颖,汪水娟,夏仲豪,谭仁祥  
(南京大学生命科学院,南京 210093)

**摘要:**目的 从双齿围沙蚕体内提取并纯化一种新的纤溶酶。方法 应用硫酸铵沉淀、透析、凝胶柱层析 (Sephadex G-100)以及电泳等生化手段对沙蚕纤溶酶进行分离纯化。用平板法测定它降解纤维蛋白的活性。结果 得到纯的沙蚕纤溶酶,测出其等电点为 4.5左右,由两条肽链组成,其相对分子量分别为 33 000 u和 14 400 u。结论 该酶为首次从沙蚕中发现的一种新的纤溶酶。

**关键词:** 双齿围沙蚕;纤溶酶;分离纯化

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)08-0673-02

### Purification of fibrinolytic enzyme from *Perinereis aibuhitensis*

ZHANG Wei-yun, CHEN Ying, WANG Shui-juan, XIA Zhong-hao, TAN Ren-xiang

(College of Life Science, Nanjing University, Nanjing Jiangsu 210093, China)

**Abstract Object** To extract and purify a novel fibrinolytic enzyme from *Perinereis aibuhitensis* Grube. **Methods** The enzyme was precipitated from the extract by ammonium sulfate, dialyzed, chromatographed on Sephadex G-100 column, and then purified by polyacrylamide gel electrophoresis. Its fibrinolytic activity was assessed with fibrin plate method. **Results** The purified enzyme showed an isoelectric point (PI) around 4.5 as tested by gel isoelectric focusing. It consisted of two polypeptide chains with molecular weights around 33 000 u and 14 400 u, respectively. **Conclusion** This was a novel fibrinolytic enzyme discovered from *P. aibuhitensis* for the first time.

**Key words** *Perinereis aibuhitensis* Grube; fibrinolytic enzyme; isolation and purification

双齿围沙蚕 *Perinereis aibuhitensis* Grube 是属于多毛纲的环节动物,普遍分布于江苏省海岸潮间带,主要栖息于泥沙滩的平均高潮线附近滩面。国内外有关沙蚕的研究报道不多,目前国际上对沙蚕的研究主要集中在日本。日本学者从几种沙蚕中分离出了多种具有生物活性的多肽,这些多肽的生物活性主要表现在对环节动物的食管具有较强的收缩作用<sup>[1]</sup>,有望开发为新型胃动力药。此外有少数文献报道,从沙蚕体内纯化出一些蛋白质<sup>[2,3]</sup>。本研究从双齿围沙蚕体内提取一种能降解纤维蛋白的纤溶酶,这在国内外尚未见报道。我们对沙蚕激酶进行了提取,并对其粗提物的分离纯化作了初步探索,为沙蚕的开发利用提供一定的实验基础。

#### 1 仪器和试剂

RC-22E 离心机 (Hitachi), Labconco 冷冻系统, U-3000型紫外可见分光光度计 (Hitachi), PHS-

2C型精密酸度计 (上海雷磁仪器厂), DYY-III 5型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂)。

双齿围沙蚕 *Perinereis aibuhitensis* Grube 产于江苏如东,由本校孟文新副教授鉴定。牛纤维蛋白原 (Sigma), 牛凝血酶 (中国药品生物制品检定所), Sephadex G-100 (Pharmacia), 十二烷基硫酸钠 (Serva), 标准分子量蛋白质 (上海丽珠东风生物技术有限公司), 载体两性电解质 (上海丽珠东风生物技术有限公司)。

#### 2 实验方法

2.1 平板法测纤维蛋白活性: 在直径为 10.5 cm 平皿里,加入 17 mL 0.25% 纤维蛋白原溶液,再加入 0.4 mL 凝血酶溶液 (60 NIH/mL), 快速摇匀,静置 30 min,凝结束后平板基本透明无色。用微量进样器点样 20  $\mu$ L, 盖上玻盖,于 37  $^{\circ}$ C 保温 18 h 后取出,用卡尺测出溶圈垂直两直径,相乘得一积

收稿日期: 2000-10-26

基金项目: 国家海洋 863 资助项目 (819-0-16)

作者简介: 张伟云 (1964-), 女, 江苏人, 毕业于南京大学生命科学院, 获博士学位, 现为南京大学医学院副教授, 主要从事天然产物中生物大分子的研究。Tel: 025-3593192

2.2 提取:将活的双齿围沙蚕用清水泡洗数次,沥干后称重,置 $-35^{\circ}\text{C}$ 备用,或直接用高速组织捣碎机匀浆,加2~5倍体积的预冷的 $0.02\text{ mol/L}$ 磷酸盐缓冲液(PBS)进行提取,于 $4^{\circ}\text{C}$ 静置6h以上,8000 r/min离心15 min,收集上清液,再用提取液洗一遍沉淀,离心,合并上清液,用硫酸铵分级沉淀,取20%~70%饱和度的沉淀,以少量 $0.02\text{ mol/L}$  PBS溶解, $4^{\circ}\text{C}$ 透析脱盐。冷冻干燥,得粗酶品

2.3 柱层析:称取粗酶50 mg,溶解于2 mL  $0.02\text{ mol/L}$  PBS中,加样于Sephades G-100层析柱(2.6 cm $\times$ 100 cm),以 $0.02\text{ mol/L}$  PBS洗脱,流速约16 mL/h,用部分收集器收集,每管约4 mL,280 nm紫外检测,分别收集各个组分,透析,冻干,进行活性测定

2.4 电泳制备:以10%聚丙烯酰胺凝胶制成垂直平板,厚度为3 mm,堆积胶浓度为5%,堆积胶浓度为5%。称取由凝胶柱层析所得的活性成分20 mg,溶解于20%蔗糖溶液中,离心去沉淀,加样于制好的平板上,加少许溴酚蓝于电极液中,以150 V电压进行电泳。当溴酚蓝接近底部时,停止电泳,取下胶,从一侧切下一窄条,其余置 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。将切下的部分于1%考马斯亮蓝R-250中染色0.5~1 h,快速脱色。对照染色后显出的条带,在保留的胶上分别切下对应位置的胶,置于试管中,捣碎。然后用 $0.01\text{ mol/L}$  NaCl浸泡抽提, $4^{\circ}\text{C}$ 过夜。离心,取上清液,超滤脱盐。测各组分纤溶活性,将有活性的组分冷冻干燥

2.5 等电聚焦:采用管式凝胶等电聚焦方法<sup>[4]</sup>测定样品的等电点。

2.6 SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳:用12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳测上述电泳制备的样品。以低分子量标准蛋白对照,其中含有兔磷酸化酶B(97 400)、牛血清白蛋白(66 200)、兔肌动蛋白(43 000)、牛碳酸酐酶(31 000)、胰蛋白酶抑制剂(20 100)、鸡蛋清溶菌酶(14 400)。标准品与样品同时电泳,以分子量对数对迁移距离作标准曲线。

### 3 结果

3.1 纯化:粗酶品经过Sephades G-100柱层析分离,在280 nm处检测出有4个吸收峰,如图1所示。由活性测定得知,第2组分(G-II)含活性成分,收集此组分,透析,冷冻干燥。凝胶柱层析得到的活性组分GH经聚丙烯酰胺凝胶电泳制备,有3条主带,经抽提得到3个组分,活性测定发现,第2条带的浸出液能溶解纤维蛋白。

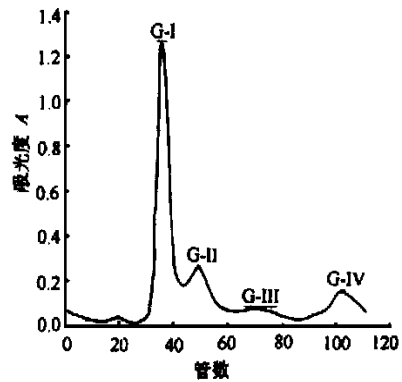


图1 Sephadex G-100分离纤溶酶粗品的洗脱曲线

3.2 等电点和相对分子量的测定:用管式凝胶等电聚胶法对电泳制备的沙蚕激酶纯品进行等电聚胶,结果显示,电泳制备的样品只有一条带,其等电点PI约为4.5。用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳测定相对分子量,以标准蛋白质的分子量对数对迁移距离作标准曲线。电泳制备样品经SDS检测有两条带,对应的相对分子量分别为33 000 u和14 400 u

### 4 讨论

本文所报道的沙蚕纤溶酶是我们首次从我国丰产的双齿围沙蚕体内发现的一种新的纤溶酶,对它进行了分离纯化,初步发现它是一种酸性蛋白,并且它是由两条肽链组成。由于它的结构和性质的复杂性,有关沙蚕激酶的工作还有待于进行深入细致的工作,进一步完善纯化工序,提高产量,使之适应大规模生产。双齿围沙蚕在我国资源十分丰富,但它们的利用率很低,除了少数沙蚕出口日本用作钓饵外,绝大多数未得到充分利用,处于自生自灭状态,造成资源的严重浪费。进一步研究沙蚕纤溶酶并将其开发为一种新的溶栓药物,将为我国的海洋资源的开发及医药事业的发展作出一点贡献。

#### 参考文献:

- [1] Takahashi T, Furukawa Y, Muneoka Y, et al. Isolation and characterization of four novel bioactive peptides from a polychaete annelid, *Perinereis vancaurica* [J]. Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1995, 110(3): 297-304.
- [2] Ebina S, Matsubara K, Nagayama K, et al. Carbohydrate gluing, an architectural mechanism in the supramolecular structure of an annelid giant hemoglobin [J]. Proc Natl Acad Sci, 1995, 92(16): 7367-7371.
- [3] Matsubara K, Yamaki M, Nagayama K, et al. Wheat germ agglutinin-reactive chains of giant hemoglobin from the polychaete *Perinereis aiuhitensis* [J]. Biochem Biophys Acta, 1996, 1290: 215-223.
- [4] 张承圭,王传怀,袁玉茹,等.生物化学仪器分析及技术[M].北京:高等教育出版社,1994.