

纳豆激酶的分离纯化及体外溶栓特性研究

陈晓飞, 周伏忠, 陈国参, 谢宝恩, 宁 萌

(河南省科学院 生物研究所, 河南省微生物工程重点实验室, 河南 郑州 150008)

摘 要:通过硫酸铵分步沉淀和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析, 分离纯化纳豆激酶, 并用 SDS-PAGE 和 PAGE 电泳检测纯化效果, 体外溶栓试验检测纳豆激酶的溶栓特性。SDS-PAGE 显示纳豆激酶为单一条带, 分子量为 33kDa, 而 PAGE 至少有 3 个具有纤溶活性的区域, 表明纳豆激酶可能由几种同工酶组成, 体外溶栓结果表明: 与蚓激酶相比, 纳豆激酶具有较强的体外溶栓和抗凝作用, 并有一定的溶血作用。

关键词:纳豆激酶; 分离纯化; 体外溶栓

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2010)02-0295-04

Purification and Thrombolysis Effect of Nattokinase *in vitro*

CHEN Xiao-fei, ZHOU Fu-zhong, CHEN Guo-can, XIE Bao-en, NING Meng

(Biology Institute of Henan Academy of Sciences, Key Laboratory of Microbial Engineering of Henan Province, Zhengzhou 450008, Henan, China)

Abstract: Nattokinase was purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fractional precipitation and Sephadex G-100 gel filtration from crude Nattokinase liquid and its thrombolytic experiment *in vitro* were conducted. The purified nattokinase showed a single band on SDS-PAGE with the molecular mass of 33 kDa, while the samples showed three bands on PAGE, which suggested that the Nattokinase was consisted of several isoenzymes. *in vitro* experiments showed Nattokinase had significant role in thrombolysis and anticoagulation effect, and has some hemolysis effect on rabbit blood cell. Nattokinase maybe have some isoenzymes, which are very important for thrombolysis and anticoagulation.

Key words: Nattokinase; Purification; Thrombolysis *in vitro*

纳豆激酶(Nattokinase, 简称 NK)是日本的传统食品——纳豆(Natto)在发酵过程中, 由纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)产生的具有纤溶活性的丝氨酸蛋白酶^[1-3], 该酶不但具有明显的溶栓活性, 而且还可以激活体内的纤溶酶原, 增加内源性溶纤酶的含量, 具有降血压、抗氧化、抗肿瘤及重要的溶解血栓等医药功效; 且与传统的溶栓制剂相比, 有不易引起出血、无抗原性、半衰期长、安全无毒且成本低廉和能口服吸收溶栓等优点^[4], 因而具有广阔的开发前景, 可能成为新一代的溶栓药物。自 1987 年 Dr. Sumi 首次从日本传统发酵食品纳豆中发现并分离出纳豆激酶以来, 便受到世界相关研究人员的广泛关注^[5]。而有关纳豆激酶分离纯化的研究中, 目前常用的方法有过滤、离心、盐析、超滤、凝胶过滤、层析分离。其中阎家麒等^[6-7]将发酵液通过硫酸铵盐析沉淀, 超滤除盐, 经过 Sephadex G-100 层析柱后, 再经过 Sephacryl S-200 层析柱得到 31 020 U · mg⁻¹ 的冻干产物, 其纯化方法最好, 产物活性最高。

采用自选菌株, 通过固体发酵的方法产纳豆激酶, 生理盐水提取后, 对粗酶进行分离纯化, 经 SDS-

PAGE 测定其分子量; 并对酶液做了体外抗凝、溶栓和溶血实验, 以期为进一步开发利用纳豆激酶提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 所用菌株为实验室分离的、产酶活性较高的菌株。

1.1.2 试剂 牛纤维蛋白原、凝血酶和标准尿激酶, 均购自中国药品生物制品检定所, 葡聚糖凝胶(Sephadex G-100)为 Pharmacia 公司产品, 低相对分子质量标准蛋白为上海东风生化试剂厂产品, 蚓激酶为市售国药, 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 纳豆激酶的提取 将常温干燥后的发酵成熟物粉碎, 取 1 g 粉碎物, 加入 10 mL 生理盐水中, 混匀, 4℃ 冰箱静置 4 h 后, 5 000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 上清液即为 NK 粗酶液(蚓激酶采用相同的提取方法)。

收稿日期: 2009-04-27

基金项目: 河南省省属科研单位社会公益项目(0641180203)。

第一作者简介: 陈晓飞(1978-)女, 硕士, 研究方向为微生物发酵工程。E-mail: chenfaye0318@163.com。

通讯作者: 周伏忠, 研究员。E-mail: zdsyszfz001@163.com。

1.2.2 纳豆激酶活性测定 根据改进的 Astrup 的方法^[8],将尿激酶标准品(20、40、60、80、100、120 TU·mL⁻¹)各 10 μL 点样于新配制的纤维蛋白平板上,静置 10 min,37℃ 恒温培养 18 h,取出测定溶解圈直径,计算溶解圈面积。以标准酶活力对数为横坐标,以溶解圈面积对数为纵坐标,绘制尿激酶标准曲线。

吸取粗酶液 10 μL,点样于纤维蛋白平板上,静置 10 min,37℃ 恒温培养 18 h,测定透明圈的直径。根据标准曲线,计算纤溶酶的活力,参考周伏忠^[9]等的方法。

1.2.3 纳豆激酶的分离纯化 硫酸铵盐析浓缩:在磁力搅拌下,向纳豆激酶粗酶液中缓慢加入研磨过的 (NH₄)₂SO₄,至其饱和度为 25%,4℃ 冰箱中净置过夜,8 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,收集上清液,以除去部分杂蛋白;按照同样的方法,向收集的上清液中继续加入研磨过的 (NH₄)₂SO₄,至饱和度为 65%,4℃ 冰箱中净置过夜,12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,弃上清,用 0.01 mol·L⁻¹ pH7.4 的 PBS 溶解沉淀和壁附物(溶液浓缩 10 倍)。浓缩后的酶液放入 0.01 mol·L⁻¹ pH7.4 的 PBS 中,透析除去 (NH₄)₂SO₄。

Sephadex G-100 凝胶层析分离纯化:按照王萍^[10]等的方法,将溶胀吸水后的 Sephadex G-100 装柱(1.0×30 cm);将 1 mL 透析后的 NK 浓缩液加入层析柱,至样品全部进入凝胶后,开始收集洗脱液,控制流速 3 mL·10 min⁻¹,每 10 min 收集 1 管(约 3 mL),并按照洗脱顺序编号,直至洗脱液中检测不到蛋白质为止,共收集洗脱液 20 管。

SDS-PAGE 测定 NK 分子量并检测纯化效果:参考文献[11],将柱层析后的洗脱液(每管约 3 mL)置于透析袋中,聚乙二醇浓缩 10 倍左右后,用纤维蛋白平板检测其 NK 活性,得到的高活性样品(2、3、4、5、6 号管),通过 SDS-PAGE(12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶)检测其纯化效果。

纳豆激酶的活性电泳(PAGE):按照文献[12-13],在配制 10% (W/V) 聚丙烯酰胺分离胶时,加入终浓度为 0.012% 的牛纤维蛋白原,电泳结束后,置于 0.01 mol·L⁻¹ pH7.4 的 PBS 缓冲液中,37℃ 保温 8 h,考马斯亮蓝 R-250 染色 1 h,脱色后,观察胶的未着色区带。

1.2.4 纳豆激酶体外抗凝、溶栓、溶血的初步观察 根据王萍等和段智变等^[14-15]的方法,进行体外抗凝、溶栓、溶血试验。

体外抗凝:将适当稀释的各组粗酶液各取 1 mL

加入洁净试管内;大白兔心脏取血,将部分新鲜兔血 1 mL 迅速加入各个预加有不同浓度 NK 粗酶液或生理盐水的试管内,轻微震荡、混匀,室温放置(20~25℃),观察纳豆激酶的抗凝效果。

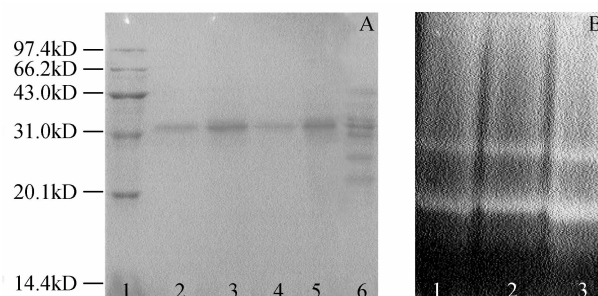
体外溶栓:取部分新鲜兔血,自然凝固后,切成 2~5 mm³ 的小血凝块,用吸水纸吸干表面水分,称重后,加入含有 1 mL 不同浓度粗酶液的试管中,同时设生理盐水为空白对照,放于 37℃ 温箱内,定时观察纳豆激酶的溶栓效果,并于 4 h 后取出试管中的血块,用吸水纸吸干表面水分称重。

对兔血红细胞的影响:取部分新鲜兔血迅速加入带有玻璃珠的三角瓶内,振荡 10 min 脱纤,2 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,红细胞沉淀物用生理盐水洗涤离心数次,直至离心上清液不再显红色为止,后用 0.9% 氯化钠配置 2% 红细胞悬液;取不同浓度的纳豆激酶粗酶液或生理盐水各 1 mL,与 1 mL 红细胞悬液混合,放于 37℃ 培养箱中,定时观察各试管的变化。

2 结果与分析

2.1 纳豆激酶的纯化

NK 粗酶液经过硫酸铵盐析浓缩、Ephadex G-100 凝胶层析纯化后,SDS-PAGE 电泳显示为 1 条分子量约 33KD 的单一蛋白条带(图 1A);而经 PAGE 活性电泳显示,则有 3 条具明显纤溶酶活性的区带(图 1B),说明纳豆激酶可能由几种同工酶组成。



A:1. 蛋白质分子量 Marker; 2、3、4、5. 分别为 Sephadex G-100 柱层析 2、3、4、5 号洗脱液; 6. 粗酶液

B:1、2、3 分别为 Sephadex G-100 柱层析 2、3、4 号洗脱液

A:1. Protein marker; 2、3、4、5. Purification of Nattokinase by Sephadex G-100; 6. Crude nattokinase

B:1、2、3 Purified NK samples from Sephadex G-100

图 1 SDS-PAGE 分析(A)和 PAGE 分析(B)

Fig.1 SDS-PAGE Analysis (A) and PAGE Analysis (B)

2.2 纳豆激酶体外抗凝、溶栓、溶血效果

2.2.1 体外抗凝特性 兔血加入等体积水中,瞬时全部凝固;生理盐水中加入的兔血,在 2 min 内全部凝固;发酵产生的纳豆激酶粗酶液的 5 倍和 10 倍

稀释液,以及蚓激酶提取液的 2 倍、5 倍和 10 倍稀释液,均在 10 min 内凝固;NK 粗酶液和 2 倍稀释液以及蚓激酶提取液样品中的兔血,在 10 min 时开始出现不同程度的凝固。表 1 和图 2 分别为 8 h 后凝固的兔血称重结果和所拍照片,由此可以看出,纳豆激酶的抗凝能力较蚓激酶强。

表 1 体外抗凝试验

Table 1 Anticoagulation effect of crude Nattokinase and Lumbrokinase

样品 Samples	稀释倍数 Dilution factor	纤溶活性 Fibrinolytic activity/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	兔血重量 Weight of blood clot/g
纳豆激酶	-	5441.2	0.180
Crude	2	2720.6	0.265
	5	1088.2	0.614
	10	544.1	0.707
Nattokinase	-	5076.7	0.423
蚓激酶溶液	2	2538.4	0.769
	5	1015.3	1.033
	10	507.7	1.022
Lumbrokinase	-	0	0.555
0.9% NaCl	-	0	0.626
水 Water	-		

表 2 纳豆激酶和蚓激酶的溶栓效果

Table 2 Thrombolysis effect of crude Nattokinase and Lumbrokinase

样品 Samples	稀释倍数 Dilution factor	前期兔血重量 First weight of blood clot/g	最后兔血重量 Last weight of blood clot/g	溶解兔血重量 Weight of dissolved blood clot/g	相对溶解率 Relative dissolve efficiency/%	绝对溶解率 Absolute dissolve efficiency/%	溶解红细胞浓度 Concentration of dissolved blood cell (entries/mL)
Crude Nattokinase	-	0.524	0.051	0.473	90.3	74.2	1.56×10^8
	2	0.499	0.069	0.430	86.2	70.1	8.48×10^8
	5	0.48	0.245	0.235	49.0	32.9	2.96×10^8
	10	0.50	0.342	0.158	31.6	15.5	1.60×10^8
Solution of Lumbrokinase	-	0.490	0.062	0.428	87.3	71.3	4.00×10^8
	2	0.434	0.153	0.281	64.7	48.6	2.56×10^8
	5	0.446	0.295	0.151	33.9	17.8	7.20×10^7
	10	0.559	0.360	0.199	35.6	19.5	1.34×10^8
0.9% NaCl	-	0.461	0.387	0.074	16.1	-	5.20×10^7

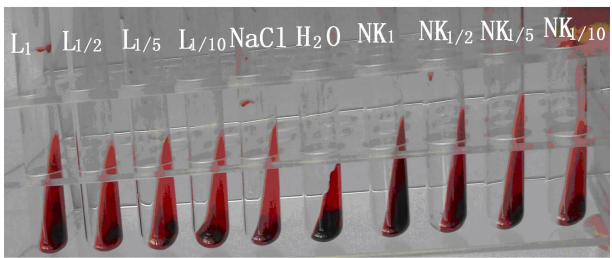


图 3 不同浓度纳豆激酶和蚓激酶的体外溶栓效果

Fig. 3 Thrombolysis effect of crude Nattokinase and Lumbrokinase

2.2.3 纳豆激酶体外溶血特性 红细胞溶血实验,37℃保温 4 h 后,结果如图 3。兔血红细胞在蒸

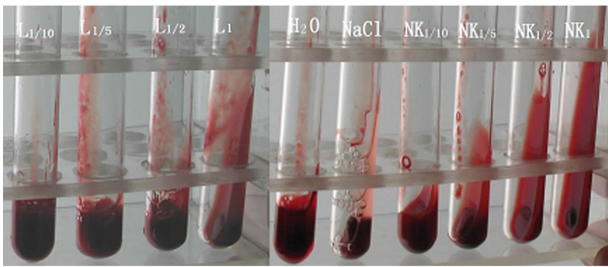


图 2 不同浓度纳豆激酶和蚓激酶的体外抗凝效果

Fig. 2 Anticoagulation effect of crude Nattokinase and Lumbrokinase

2.2.2 体外溶栓特性 纳豆激酶和蚓激酶提取液溶解兔血凝块。表 2 和图 3 分别为 37℃ 溶解兔血凝块 4 h 后称重结果和所拍照片,由二者可知,实验室发酵产生的 NK 的溶栓能力较国药蚓激酶强;结合血块溶解量与溶出红细胞的浓度,可以发现,纳豆激酶和蚓激酶血凝块溶解量与其溶出红细胞的浓度并不成正比,表明在酶浓度较高时,对溶出的红细胞具有一定的裂解作用。

馏水中瞬间破裂,形成血红色液体,生理盐水试管组,兔血红细胞在 30 min 时出现明显分层,4 h 红细胞几乎全部沉淀,而蚓激酶提取液、2 倍稀释液和 5 倍稀释液,以及 NK 提取液和 2 倍稀释液中的红细胞可能已经全部破裂,液体呈暗红色;蚓激酶 10 倍稀释液和 NK 的 5 倍、10 倍稀释液中出现明显的分层现象。结果表明高浓度的蚓激酶和纳豆激酶对血红细胞均有一定破坏作用,而低浓度的蚓激酶和纳豆激酶对红细胞的破坏作用则相对较小。

结合体外抗凝、溶栓和溶血试验发现,纳豆激酶抗凝和溶栓能力均较蚓激酶强,这为纳豆激酶的产业化生产奠定了坚实的基础。

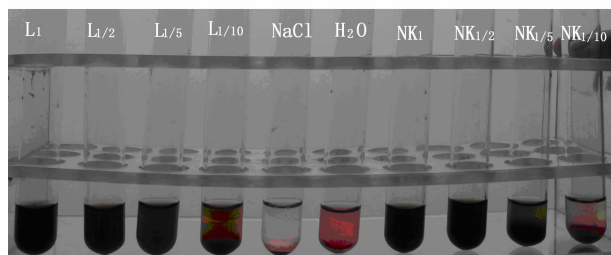


图4 不同菌株所产纳豆激酶的溶血结果

Fig.4 Hemolysis effect of crude Nattokinase and Lumbrokinase on rabbit blood cell

3 讨论

纯化后的纳豆激酶样品,经 SDS-PAGE 呈单一条带,分子量约为 33 kDa;但 PAGE 活性电泳后,显示至少有 3 条具有纤溶活性的区带,这与凌洪博^[12]单一活性组分的结果不同,表明该试验所用菌株发酵产生的纳豆激酶,可能由几种同功酶组成。体外抗凝,溶栓结果与王萍等^[14]的结果基本一致,表明纳豆激酶具有非常显著的体外抗凝和溶栓作用,为纳豆激酶的产业化奠定了坚实的基础;但溶血结果发现,高浓度纳豆激酶对红细胞具有一定的破坏作用。因此,开发纳豆激酶溶栓药物或食品,必须研究血液中纳豆激酶可以达到的最高浓度。

参考文献

- [1] 张锋,金杰,安莹,等. 纳豆激酶高活性菌株的筛选及其液体发酵条件的优化[J]. 食品研究与开发,2006(4):27-30. (Zhang F, Jin J, An Y, et al. Screening of the strain with strong Nattokinase activity and optimization of its liquid fermentation conditions[J]. Food Research and Development, 2006(4):27-30.)
- [2] 鲁艳莉,宁喜斌. 发酵豆制品中产溶纤酶菌株的筛选[J]. 中国调味品,2005(8):13-31. (Lu Y L, Ning X B. Screening of fibrinolytic enzyme-producing strain from sour soybean[J]. China Condiment, 2005(8):13-31.)
- [3] Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, et al. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of Nattokinase[J]. Acta Haematol, 1990, 84: 139-143.
- [4] 刘柳,郭勇. 层析法分离纳豆激酶的研究[J]. 现代食品科技, 2007,23(1):17-19. (Liu L, Guo Y. Separation and purification of Nattokinase with Chromatography[J]. Modern Food Science and Technology, 2007,23(1):17-19.)
- [5] 马明,杜金华,于玲,等. 高纳豆激酶酶活枯草芽孢杆菌的筛选及菌种鉴定[J]. 中国食物与营养,2006(8):29-32. (Ma M, Du J H, Yu L, et al. Breeding and identification of high Nattokinase activity of Bacillus[J]. Nutrition in China, 2006(8):29-32.)
- [6] 张新. 豆豉纤溶酶的研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(20):6008-6010. (Zhang X. Research progress of fibrinolytic enzyme in fermented soy sauce[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2007,35(20):6008-6010.)
- [7] 阎家麒,童岩,臧莹安. 豆豉纤溶酶的纯化及其性质研究[J]. 药物生物技术,2000,7(3):149-152. (Yan J Q, Tong Y, Zang Y A. Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme in fermented soya beans[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2000,7(3):149-152.)
- [8] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952,40:346-351.
- [9] 周伏忠,贾蕴莉,陈国参,等. 纤溶酶高产菌株筛选及其液体发酵条件研究[J]. 河南科学,2008(1):125-130. (Zhou F Z, Jia Y L, Chen G C, et al. Study on strains selection and liquid fermentation conditions of fibrinolytic enzyme[J]. Henan Science, 2008(1):125-130.)
- [10] 王萍,陈钧,杨小明,等. 纳豆激酶分离纯化及纤溶活性研究[J]. 食品科学,2005,25(2):59-63. (Wang P, Chen J, Yang X M, et al. Research on purification and fibrinolytic activity assay of Nattokinase from Natto[J]. Food Science, 2005,25(2):59-63.)
- [11] Urano T. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from bacillus subtilis cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type [J]. Biological Chemistry, 2001, 276(27):24690-24694.
- [12] 凌洪博,郑喜群,连桂香,等. 脉孢菌纤溶酶的纯化和性质初步研究[J]. 齐齐哈尔大学学报,2002,18(4):5-8. (Ling H B, Zheng X Q, Lian G X, et al. Preliminary studies on purification of a fibrinolytic enzyme from Neurospora sp. [J]. Journal of Qiqihar University, 2002,18(4):5-8.)
- [13] Kim S H, Choi N S, Lee W Y. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzyme on gels[J]. Analytical Biochemistry, 1998,263:115-116.
- [14] 王萍,陈钧,陈红斌. 纳豆激酶分离纯化及体外溶栓和溶血作用研究[J]. 中国药理学杂志,2005,40(21):1669-1671. (Wang P, Chen J, Chen H B. Purification and Its thrombolytic effect of Nattokinase in vitro[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2005,40(21):1669-1671.)
- [15] 段智变,江江湖,张书霞,等. 纳豆激酶纤溶功能及其机理研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(2):1-5. (Duan Z B, Jiang H H, Zhang S X, et al. Studies on fibrinolytic function of Nattokinase and its mechanism[J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(2):1-5.)