溶栓酶 AprE9912D 的纯化工艺及酶学性质考察

张　秀，张　莉，李晓媛，杜仕静，谭正怀 *
（四川省中医药科学院，四川成都 610041）

摘要：溶栓酶 AprE9912D（AprE）是由贝莱斯芽孢杆菌 9912D 分泌的碱性蛋白酶，具有纤溶活性。该研究通过比较可溶蛋白与包涵体 2 种表达形式的产量、纯化效果及其他参数来确认 AprE 后续的纯化工艺，并探究了纯化品的体外溶栓作用、溶血性和酶学性质。相较于在可溶蛋白中纯化 AprE，包涵体经过洗涤、快速透析复性和强阴离子交换色谱柱纯化，所得的 AprE 纯度达 95%以上，复性率为 52.7%，得率为 11.2%，且具有较高的酶比活（50 456.7 IU/mg）。因此，宜采用包涵体形式表达 AprE。10 000 IU/mL AprE 在体外能显著溶解陈旧血栓，溶栓率为 16.7%（P<0.001）；并且，AprE 浓度达到 2 000 IU/mL 时的溶血率也仅为 1.0%，说明其安全性良好。AprE 的最适反应温度为 35 ～ 45 ℃，最适 pH 值为 7.0 ～ 8.0。该研究为天然新型溶栓药物 AprE 的进一步开发提供了科学依据。

关键词：溶栓酶；碱性蛋白酶；纯化；溶栓；溶血；酶学性质
中图分类号：TQ461　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)02-0198-07
引用：张　秀，张　莉，李晓媛，等．溶栓酶 AprE9912D 的纯化工艺及酶学性质考察［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(2)：198-204．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.02.008

Investigation on Purification and Characterization of Thrombolytic Enzyme AprE9912D

ZHANG Xiu, ZHANG Li, LI Xiaoyuan, DU Shijing, TAN Zhenghuai*
(*Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610041*)

ABSTRACT: Thrombolytic enzyme AprE9912D (AprE), an alkaline protease secreted by *Bacillus velezensis* 9912D, shows fibrinolytic activity. The purification process of AprE was determined by comparing yields, purification levels and other parameters of soluble protein and inclusion body for the following experiment. After purification, thrombolytic effect, hemolytic property and characterization of AprE was explored *in vitro*. Compared with the purification of AprE from the soluble protein, AprE in inclusion body was obtained through washing, rapid dialysis renaturation, anion-exchange chromatography column with purity of over 95 %, renaturation rate of 52.7 %, yield of 11.2 %, and higher specific enzyme activity (50 456.7 IU/mg). Therefore, it was appropriate to express AprE in the form of inclusion bodies. *In vitro*, 10 000 IU/mL of AprE could significantly dissolve old thrombi, the thrombolysis rate was 16.7 % (P<0.001). The hemolysis rate of AprE at a concentration of 2 000 IU/mL was only 1.0%, indicated good safety. The optimal temperature and pH value for the reaction of AprE were 35 – 45 ℃ and 7.0 – 8.0, respectively. This study provided a scientific basis for the future research of the natural thrombolytic enzyme AprE.

Key Words: thrombolytic enzyme; alkaline protease; purification; thrombolysis; hemolysis; characterization

血栓性疾病可由血管壁损伤、血流变化、血液成分改变等导致，具有高发病率、高致残率、高复发率、高致死率等特点。临床常使用阿替普酶等溶栓药物治疗脑卒中等血栓性疾病。然而，由于这些溶栓药物价格贵、生产工艺复杂、治疗时间窗窄、出血发生率高[1]，临床应用十分受限。因此，从细菌、

收稿日期：2024-06-24
基金项目：四川省省级科研院所基本科研业务费项目（2022JDKY0013）
作者简介：张　秀（1986—），女，硕士研究生，专业方向：生物化学与分子生物学。
通信作者：谭正怀（1964—），男，研究员，从事中药药理与毒理研究。
E-mail：tanzhh616@sohu.com

动植物、真菌中开发天然新型溶栓药物仍是治疗血栓性疾病中重要的研究方向[1—3]。

目前，多数微生物来源的纤溶酶主要通过微生物自身胞外分泌和异源表达工程菌生产。其中，大肠埃希菌表达体系因具有异源表达水平高、成本较低等优良特性，被广泛应用于各种酶蛋白的生产。有30%～40%重组蛋白质药物使用大肠埃希菌作为表达宿主[4]。

本课题组[5]前期从中药豆豉中分离获得了具有纤溶活性的贝莱斯芽孢杆菌（*Bacillus velezensis* 9912D），克隆了碱性蛋白酶基因，再利用大肠埃希菌诱导、表达，获得了纤溶酶AprE9912D（AprE）的粗酶液，并验证其具有溶栓作用。研究显示，AprE能以可溶蛋白和包涵体2种形式表达。本研究分别以可溶蛋白和包涵体表达的AprE建立纯化工艺路线，再进行比较研究，评价AprE的溶血安全性及溶栓效果，探究其酶学性质，为后续探讨纯化后的AprE冻干粉制备、体内溶栓药效作用及溶栓作用机制奠定基础，推进天然新型溶栓药物的开发。

1 仪器与试药

HJ-CJ-2FD型双人单面净化工作台（上海沪净医疗器械有限公司）；S1000型Thermal Cycler PCR仪、ChemiDoc™ XRS+凝胶成像系统（美国BIO-RAD公司）；Scientz-ⅡD型超声波细胞粉碎仪（宁波新芝生物科技股份有限公司）；TGL-16型高速冷冻离心机（四川蜀科仪器有限公司）；AKTA Purifier UPC 100型蛋白纯化系统（美国GE公司）；24DN型垂直蛋白电泳仪（北京六一生物科技有限公司）；85-2型加热恒温磁力搅拌器（上海司乐仪器有限公司）。

2×快速扩增PCR预混液（美国MCLAB公司）；尿激酶（酶比活≥50 000 IU/mg，每瓶1 mg，上海麦克林生化科技有限公司）；卡那霉素硫酸盐、再生纤维透析袋（截留分子量10 000）均购于上海源叶生物科技有限公司；L-还原型谷胱甘肽（L-glutathione reduced，GSH）、L-氧化型谷胱甘肽（L-glutathione oxidized，GSSG）、IPTG、咪唑、EDTA均购于德国BioFroxx公司；溶菌酶［生工生物工程（上海）股份有限公司］；BeyoZonase™超级核酸酶、苯甲基磺酰氟（phenylmethanesulfonyl fluoride，PMSF）、甘氨酸、Bradford法蛋白浓度检测试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司；三羟甲基氨基甲烷［*tris*(hydroxymethyl)aminomethane，Tris，美国VWR公司］；乙酸（成都长联化工试剂有限公司）；尿素、甘油（成都市科隆化学品有限公司）；曲拉通（Triton® X-100，新西兰Unichem公司）；0.45 μm微孔滤膜（北京迈瑞达科技有限公司）；镍离子金属螯合亲和色谱介质（Nickel affinity chromatography medium，Ni-NTA）、强阴离子交换色谱介质均购于瑞典cytiva公司；Amicon® Ultra浓缩管（截留分子量10 000，德国Merck Millipore公司）；LB肉汤粉末（海博生物技术有限公司）。

引物T7（TAATACGACTCACTATAGG）和引物T7ter（TGCTAGTTATTG CTCAGCGG）由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

大肠埃希菌BL21（DE3）-pDE1-AprE9912D由本实验室构建保存。

豚鼠10只，雄性，普通级，体质量200～250 g，购于四川省实验动物专委会养殖场中心，实验动物生产许可证号SCXK（川）2021-037。动物试验方案经四川省中医药科学院实验动物伦理委员会批准，受理编号为DWSYLL-2023-056。

2 方法与结果

2.1 培养基及主要溶液的配制

LB培养基：取LB肉汤粉末25.0 g，用蒸馏水溶解并定容至1 000 mL，121 ℃高压灭菌15 min。

100 mmol/L PMSF：取PMSF 0.174 g，用无水乙醇溶解并定容至10 mL，于－20 ℃放置备用。

20 mmol/L PBS：取无水磷酸二氢钠2.4 g、无水磷酸氢二钠2.8 g，溶于超纯水中，调至pH 8.0，定容至1 000 mL。

Ni-NTA亲和色谱柱平衡溶液：取氯化钠29.2 g、甘油50 mL，溶于20 mmol/L PBS中，调至pH 8.0，定容至1 000 mL。

Ni-NTA亲和色谱柱洗脱溶液：取咪唑34.0 g，溶于Ni-NTA亲和色谱柱平衡溶液中，调至pH 8.0，定容至1 000 mL。

阴离子Q交换色谱柱平衡溶液：取磷酸二氢钠12.0 g、Tris 1.2 g，溶于超纯水中，调至pH 8.0，定容至1 000 mL。

透析复性液①：取尿素120.1 g、甘油50 mL、甘氨酸10.0 g，溶于阴离子Q交换色谱柱平衡溶液中，

调至 pH 8.0，定容至 1 000 mL。

透析复性液②：取尿素 60.1 g、甘油 50 mL、甘氨酸 10.0 g，溶于阴离子 Q 色谱柱平衡溶液中，调至 pH 8.0，定容至 1 000 mL。

50 mmol/L 枸橼酸盐 - 氢氧化钠缓冲液：取无水枸橼酸 0.096 g，溶于超纯水中，分别调至 pH 3.0、4.0、5.0，定容至 10 mL。

50 mmol/L PBS：取无水磷酸二氢钠 0.060 g、无水磷酸氢二钠 0.071 g，溶于超纯水中，分别调至 pH 6.0、7.0，定容至 10 mL。

50 mmol/L Tris- 盐酸缓冲液：取 Tris 0.061 g，溶于超纯水中，分别调至 pH 8.0、9.0，定容至 10 mL。

50 mmol/L 甘氨酸 - 氢氧化钠缓冲液：取甘氨酸 0.038 g，溶于超纯水中，调至 pH 10.0，定容至 10 mL。

以上溶液均采用 1 mol/L 氢氧化钠溶液和浓盐酸调整 pH 值。

2.2 AprE 蛋白的过表达

首先对大肠埃希菌 BL21(DE3)-pDE1-AprE9912D 进行外源基因检测。

PCR 扩增体系配制：2× 快速扩增 PCR 预混液 12.5 μL，引物 T7 1 μL，引物 T7ter 1 μL，菌液 2 μL，水 8.5 μL。

PCR 条件：98 ℃，2 min 预变性；30 个循环 (98 ℃，10 s；52 ℃，15 s；72 ℃，30 s)；72 ℃ 保温 5 min。

由北京擎科生物科技股份有限公司对 PCR 扩增产物进行 DNA 测序；利用美国国家生物技术信息中心数据库进行基因序列比对分析，结果显示测试菌株中含有编码 AprE 的外源目的片段，可进行后续试验。

取鉴定过的 BL21(DE3)-pDE1-AprE9912D 菌液，以体积比 1 ∶ 50 接种于 LB 培养基（添加卡那霉素，终浓度为 50 mg/L）中扩大培养。当菌液的 OD_{600} 达到 0.6 时，添加终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG。于 16 ℃、100 r/min 条件下诱导培养 20 h[6]。发酵结束后离心 (5 434×*g*) 10 min 收集菌体，用 20 mmol/L PBS 洗涤 2 次。

2.3 AprE 蛋白提取

取“**2.2**”项下收集的菌体，按每 1 g 菌体（湿重）加入 Ni-NTA 亲和色谱柱平衡溶液 10 ～ 40 mL 的比例，加入平衡溶液，混匀后加入 Triton® X-100（使其最终体积分数为 1%），于冰上静置 10 min。随后添加终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF，超声 (399.6 W) 3 s，间歇 8 s，共 30 min。获得的 AprE 粗酶液离心 (15 970×*g*) 30 min，收集上清液和包涵体。

2.4 可溶蛋白中 AprE 的分离和纯化

基于 AprE 的 N 端有 6×HIS 标签、等电点为 8.9、相对分子量为 36 000 等特性设计可溶蛋白的分离和纯化步骤。

取“**2.3**”项下收集的上清液，加入终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF，用 1 mol/L Tris 盐酸和 1 mol/L 乙酸调至 pH 8.0 后经 0.45 μm 滤膜过滤。滤液采用 AKTA Purifier UPC 100 蛋白纯化系统和 Ni-NTA 亲和色谱柱纯化。上样速度为 1 mL/min；上样后，用 Ni-NTA 亲和色谱柱平衡溶液淋洗杂蛋白至基线，淋洗流速为 1 mL/min；然后，用 20% Ni-NTA 亲和色谱柱洗脱溶液洗脱杂蛋白，40%～ 50% Ni-NTA 亲和色谱柱洗脱溶液洗脱目的蛋白，洗脱流速为 1 mL/min，收集洗脱液。洗脱液用 20 mmol/L PBS 稀释，经浓缩管（截留分子量 10 000）浓缩后采用再生纤维透析袋（截留分子量 10 000）过夜透析以脱盐。

采用 1 mol/L Tris 盐酸和 1 mol/L 乙酸将上述经脱盐处理的洗脱液调至 pH 8.6 或 8.0，经 0.45 μm 过滤膜过滤后，用阴离子 Q 交换色谱柱再次分离、纯化，上样体积如表 1 所示。随后收集流穿液和淋洗液，用 1 mol/L Tris 盐酸和 1 mol/L 乙酸调至 pH 8.0，再经 0.45 μm 过滤膜过滤、浓缩管（截留分子量 10 000）浓缩，收集产物。

取各纯化步骤所得的产物各 500 μL，采用 Bradford 法蛋白浓度检测试剂盒检测蛋白浓度；采用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白的分离和纯化情况及相对分子质量[7]；以尿激酶为标准品，采用纤维蛋白平板法检测纯化产物的酶活力[8]。

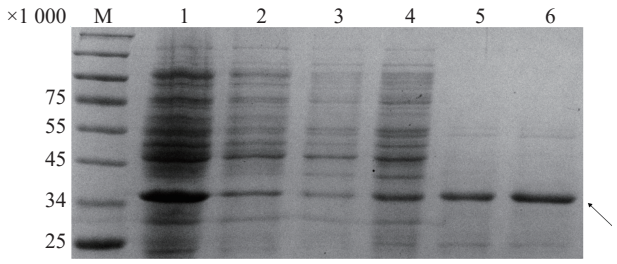
可溶蛋白的分离、纯化结果如表 1、图 1 所示，在 Ni-NTA 亲和色谱柱的纯化过程中，蛋白损耗较大，纯化效果不佳。再次采用阴离子 Q 交换色谱柱纯化，当样品溶液调整为 pH 8.0 时，目标蛋白中仍然含有较弱的杂蛋白条带（图 1 泳道 5）；当样品溶

表 1 可溶蛋白中 AprE 的纯化

Tab.1 Purification of AprE from Soluble Proteins

纯化步骤	体积 /mL	质量浓度 /(mg·mL^{-1})	总酶活力 [1]/IU	总蛋白 /mg	酶比活 /(IU·mg^{-1})	得率 /%
粗酶液	60.0	3.35	13 234 201.8	201.0	65 841.8	100
上清液	51.0	3.20	3 723 816.0	163.2	22 817.5	28.1
Ni-NTA 亲和色谱柱	15.5	3.42	529 565.4	53.0	9 991.8	4.0
透析	10.7	2.82	409 007.5	30.3	13 498.6	3.1
阴离子 Q 交换色谱柱	4.8	0.96	142 557.5	4.6	30 937.0	1.1

注：[1] 尿激酶酶活力的标准曲线方程为 y=0.032 93x+43.313，R^2=0.924 1。



注：箭头所示处表示 AprE，相对分子质量为 36 000。M—标准蛋白；1—粗酶液；2—“**2.3**”项下的上清液；3—Ni-NTA 亲和色谱柱纯化后的 AprE；4—透析后 AprE；5—上样样品调整为 pH 8.0 时，阴离子 Q 色谱柱纯化后的 AprE；6—上样样品调整为 pH 8.6，阴离子 Q 色谱柱纯化后的 AprE。

图 1 可溶蛋白中 AprE 的分离和纯化结果

Fig.1 Results of Separation and Purification of AprE from Soluble Proteins

液调整为 pH 8.6 后，目标蛋白纯度有明显提升，可达到 95％以上，且条带单一（图 1 泳道 6）。SDS-PAGE 电泳结果显示，目标蛋白的相对分子质量约为 36 000，与 AprE 的相对分子质量基本一致。纤维蛋白平板检验结果显示，最终纯化产物具有纤溶活性，酶比活为 30 937.0 IU/mg，产物得率为 1.1％，且随着纯化步骤增加，损耗不断增加。

2.5 包涵体中 AprE 的分离纯化

取“**2.3**”项下收集的包涵体，按每 100 mg 包涵体（湿重）加入阴离子 Q 交换色谱柱平衡溶液 1 mL 的比例，加入平衡溶液，使悬浮均匀，添加最终质量浓度为 1 mg/mL 的溶菌酶和 1.0 U/mL 的超级核酸酶，于 37 ℃、100 r/min 振荡条件下处理 60 min，离心（15 970×g）30 min，收集沉淀。沉淀中加入阴离子 Q 交换色谱柱平衡溶液，搅拌（100 r/min）、洗涤 1 h，离心（15 970×g）30 min，收集沉淀。沉淀中加入含 1％ Triton® X-100、1 mmol/L EDTA 和 2 mol/L 尿素的阴离子 Q 交换色谱柱平衡溶液，再搅拌（100 r/min）、洗涤 1 h，离心（15 970×g）30 min，收集沉淀，重复 1 次。所得沉淀中加入阴离子 Q 交换色谱柱平衡溶液，搅拌（100 r/min）、洗涤 30 min，离心（15 970×g）30 min，收集包涵体 [9]。

将上述洗涤后的包涵体，按每 100 mg 包涵体（湿重）加入含 8 mol/L 尿素的阴离子 Q 交换色谱柱平衡溶液 1 mL 的比例，加入平衡溶液，搅拌（100 r/min）过夜，离心（15 970×g）30 min，收集上清液。上清液采用阴离子 Q 交换色谱柱平衡溶液进行快速对半稀释，使蛋白质量浓度达到 0.1 ～ 1.0 mg/mL，添加终浓度为 0.3 mmol/L 的 GSSG 和 3 mmol/L 的 GSH，经 0.45 μm 过滤膜过滤后装于透析袋中，依次置透析复性液①、透析复性液②、阴离子 Q 交换色谱柱平衡溶液中，在 4 ℃条件下各透析复性 12 h。

收集复性液，用 1 mol/L Tris 盐酸和 1 mol/L 乙酸调至 pH 8.6，经 0.45 μm 滤膜过滤后采用阴离子 Q 交换色谱柱纯化，上样体积如表 2 所示。收集流穿液和淋洗液，用 1 mol/L Tris 盐酸和 1 mol/L 乙酸调至 pH 8.0，经 0.45 μm 过滤膜过滤、浓缩管（截留分子量 10 000）浓缩，收集产物。

同“**2.4**”项下方法，检测各个步骤产物的蛋白浓度，评估分离和纯化情况、蛋白相对分子质量及酶活性。

包涵体分离、纯化的结果如表 2、图 2 所示，包涵体在复性前经反复洗涤，可显著减少杂蛋白条带；而采用阴离子 Q 交换色谱柱对复性后的目标蛋白再次纯化，可使纯度提高。如 SDS-PAGE 电泳所示，复性后纯化产物的条带单一，纯度达到 95％，相对分子质量为 36 000。纯化后的产物表现出纤溶活性，

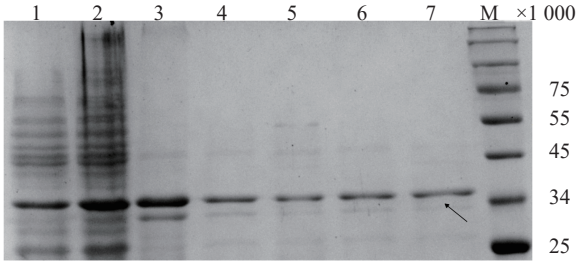
表 2　包涵体中 AprE 的纯化

Tab.2　Purification of AprE from Inclusion Bodies

纯化步骤	体积 /mL	质量浓度 /(mg·mL^{-1})	总酶活力 [1)]/IU	总蛋白 /mg	酶比活 /(IU·mg^{-1})	得率 /%	复性率 /%
复性前	35.0	1.10	—	38.5	—	—	—
复性后	35.0	0.58	1 666 768.2	20.3	82 106.8	—	52.7
阴离子 Q 交换色谱柱	3.0	1.22	186 690.0	3.7	50 456.7	11.2	—

注：[1)] 尿激酶酶活力的标准曲线方程为 y=0.032 35x+50.629，R^2=0.943 1。

酶比活为 50 456.7 IU/mg，复性率为 52.7%，得率为 11.2%。这些结果表明，从包涵体中纯化制备 AprE 的工艺路线具有纯化步骤少、成本低、纯度高等优点。



注：箭头指示处为 AprE，相对分子质量为 36 000。

1—粗酶液；2—洗涤前的包涵体；3—洗涤后的包涵体；4—复性前的包涵体；5—复性后的 AprE；6—复性后的 AprE 溶液调至 pH 8.6；7—阴离子 Q 交换色谱柱纯化后 AprE；M—标准蛋白。

图 2　包涵体中 AprE 分离、纯化的结果

Fig.2　Results of Separation and Purification of AprE from Inclusion Bodies

2.6　AprE 的体外溶栓试验

取雄性豚鼠腹主动脉血制备成新鲜混合血栓 [5]，用 0.9%氯化钠水溶液每天多次洗涤后，于 4 ℃浸泡放置 7 d，制成陈旧血栓。将陈旧血栓切成约 270 mg 的柱状血块，随机分为 3 组，每组 7 份；分别加入 0.9%氯化钠水溶液、10 000.0 IU/mL 尿激酶和“**2.5**”项下纯化后的 10 000.0 IU/mL AprE 各 1 mL，在 37 ℃温水浴中反应 18 h。照下式计算溶栓率，结果如表 3 所示。

溶栓率 =(起始血栓湿重 － 血栓残渣湿重)/ 起始血栓湿重 ×100%

本研究制备的陈旧血栓富含红细胞，具有自溶率较低（1.2%）、不易碎、弹性弱、质硬等特点，可模拟人体血管内的陈旧血栓组织，不易溶解。与 0.9%氯化钠水溶液处理组相比，AprE 处理组的陈旧血栓可见显著溶解（P<0.001），溶栓率为 16.7%。由表 3 可见，AprE 对陈旧血栓的体外溶解作用与尿激酶相近，进一步验证纯化 AprE 具有溶栓作用。

表 3　AprE 对陈旧血栓的体外溶解作用（$\bar{x}\pm s$，n=7）

Tab.3　*In vitro* Thrombolysis Effect of AprE on Old Thrombi ($\bar{x}\pm s$, n=7)

组别	剂量 /(IU·mL^{-1})	起始血栓湿重 /g	血栓残渣湿重 /g	溶栓率 /%
0.9%氯化钠水溶液	—	0.279±0.01	0.275±0.01	1.2±2.2
尿激酶	10 000.0	0.271±0.01	0.240±0.01[1)]	11.5±4.3[1)]
AprE	10 000.0	0.273±0.01	0.227±0.02[1)]	16.7±7.5[1)]

注：[1)] 与 0.9%氯化钠水溶液处理组比较，P<0.001。

2.7　AprE 的体外溶血性检测

用玻璃棒轻柔搅动进行脱纤维蛋白原处理的 2.0%雄性豚鼠红细胞混悬液，作为试验用血 [5]，随机分为 3 组，每支 2.5 mL，分别加入纯化后的 AprE（终浓度如表 4 所示）、蒸馏水和 0.9%氯化钠水溶液，并均用 0.9%氯化钠水溶液补足至总体积为 5 mL，置 37 ℃温水浴中反应 3 h，观察红细胞的聚集情况，然后离心（1 000×g）10 min，收集上清液检测 OD_{540}。照下式计算溶血率，结果如表 4 所示。

$$溶血率=(OD_{AprE}-OD_{0.9\%氯化钠水溶液})/(OD_{蒸馏水}-OD_{0.9\%氯化钠水溶液})\times100\%$$

经过 3 h 观察，2.0%红细胞悬液中没有出现红细胞聚集现象；离心后，红细胞全部下沉，上清液呈无色、澄明状。当 AprE 浓度为 2 000.0 IU/mL 时，溶血率仅为 1.0%（表 4），符合 ChP 2020 年版溶血率 <5%的要求。本试验结果表明，纯化后的 AprE 是安全性较好的溶栓酶。

2.8　AprE 的酶学性质研究

取纯化 AprE 在 35、40、45、50、55、60 ℃条件下温浴 30 min，采用纤维蛋白平板测定酶活力（以尿激酶为标准品）。检测结果以所测得的最高酶活力为 100%进行归一化处理，得相对酶活力 [10—11]。

结果如表 5 所示，AprE 在 35、40、45 ℃时的

表 4 AprE 的溶血及凝聚作用

Tab.4 Hemolysis and Coagulation of AprE

组别	剂量 /(IU·mL^{-1})	溶血观察时间 /min						聚集	OD_{540}	溶血率 /%
		30	60	90	120	150	180			
AprE9912D	2 000.0	—	—	—	—	—	—	—	0.059	1.0
	1 600.0	—	—	—	—	—	—	—	0.058	0.7
	1 200.0	—	—	—	—	—	—	—	0.057	0.7
	800.0	—	—	—	—	—	—	—	0.053	0
蒸馏水	—	+	+	+	+	+	+	—	0.702	—
0.9%氯化钠水溶液	—	—	—	—	—	—	—	—	0.053	—

注：—表示没有；+ 表示有。

残余活性能达到 90%以上；在 50 ℃时的最高残余活性约为 60%；在 55、60 ℃时酶活性完全丧失。综上所述，AprE 对高温较敏感，最适温度为 35 ℃，最适温度范围为 35 ～ 45 ℃。

表 5 温度对 AprE 酶活力的影响

Tab.5 Effect of Temperature on the Enzyme Activity of AprE

温度 /℃	透明圈面积 /mm^2	酶活力 [1]/(IU·mL^{-1})	相对酶活力 /%
35	271.7	36 580.0	100.0
40	246.1	33 125.5	90.6
45	254.5	34 258.0	93.6
50	162.9	21 925.0	59.9
55	0	0	0
60	0	0	0

注：[1] 尿激酶酶活力的标准曲线方程为 y=0.037 14x，R^2=0.908 7。

取“**2.1**”项下枸橼酸钠 - 氢氧化钠缓冲液 (pH 3.0、4.0、5.0)，PBS 缓冲液 (pH 6.0、7.0)，Tris- 盐酸缓冲液 (pH 8.0、9.0) 和甘氨酸 - 氢氧化钠缓冲液 (pH 10.0)，以体积比 1 ∶ 1 分别与纯化 AprE 混合，在 37 ℃温水浴中反应 3 h，采用纤维蛋白平板测定 AprE 的酶活力（以尿激酶为标准品）。检测结果以所测得的最高酶活力为 100%，进行归一化处理，得相对酶活力 [10—11]。

结果如表 6 所示，在 37 ℃下温浴 3 h 后，AprE 在 pH 6.0、7.0、8.0 缓冲溶液中的残余活性能达到 50%以上；在 pH 7.0 缓冲溶液中的最高残余活性约为 77.3%。综上所述，AprE 对缓冲溶液 pH 值敏感，最适 pH 值为 8.0；最适 pH 范围为 7.0 ～ 8.0。

3 讨论

本研究运用大肠埃希菌诱导表达 AprE，通过比较可溶蛋白与包涵体 2 种形式的纯化工艺，明确了后续工艺的改进方向和获得方式。

表 6 pH 值对 AprE9912D 酶活力的影响

Tab.6 Effects of pH Value on the Enzyme Activity of AprE9912D

pH 值	透明圈面积 /mm^2	酶活力 [1]/(IU·mL^{-1})	相对酶活力 /%
3.0	57.5	1 062.0	6.7
4.0	84.5	5 235.1	32.8
5.0	90.9	6 224.3	39.0
6.0	103.1	8 110.0	50.8
7.0	130.5	12 344.8	77.3
8.0	153.9	15 961.5	100.0
9.0	86.8	5 590.6	35.0
10.0	77.4	4 137.7	25.9

注：[1] 尿激酶酶活力的标准曲线方程为 y=0.032 35x+50.629，R^2=0.943 1。

与粗酶液 (201.0 mg) 相比，可溶蛋白酶活力得率为 28.1%，洗涤之后的包涵体 (38.5 mg) 得率为 19.2%。有文献 [4] 报道，可溶蛋白的表达量可累积到菌体总蛋白量的 10%～ 30%。上述结果说明，本研究的诱导表达条件良好，表达量可观，已达到可溶蛋白表达增产的瓶颈。然而，本研究在可溶蛋白发酵工艺较好情况下，只获得了较低的包涵体表达量（得率 19.2%），说明包涵体的发酵工艺仍有提升空间。

采用 Ni-NTA 亲和色谱柱从可溶蛋白中纯化得到 AprE，但损耗过大，虽对其纯化工艺进行改善，如在超声前加入去垢剂 (1% Triton® X-100)、添加蛋白酶抑制剂 PMSF，以及在 Ni-NTA 亲和色谱柱平衡缓冲液中添加 10 ～ 40 mmol/L 咪唑等措施，但仍没有完全避免损耗。主要原因是上清液中大肠埃希菌的内源性蛋白也会吸附在 Ni-NTA 亲和色谱柱上，并对目标蛋白产生降解作用，使目的蛋白产量减少；蛋白酶抑制剂 PMSF 虽能一定程度抑制内源性蛋白酶的降解作用，但同时也会抑制目的蛋白。

对包涵体中的 AprE 进行分离、纯化，虽然一定程度上可克服以上问题，但洗涤和复性是后续工艺的难点。包涵体洗涤可将纯度提升到 80%～ 90%，简化后续纯化步骤，但损耗量大。而包涵体复性在目前的蛋白复性研究中仍很棘手，本研究采用快速稀释和复性透析结合的方式将操作时间缩短为 36 h，复性率为 52.7%。相较于已有文献 [12] 的报道，包涵体复性还有较大提升空间。与已报道的纤溶酶纯化步骤比较，无论是针对可溶蛋白还是包涵体，采用 Ni-NTA 亲和色谱柱快速洗脱和 / 或阴离子 Q 色谱柱流穿纯化 AprE 都能简化纯化步骤，且从可溶蛋白中纯化 AprE 所需的时间更短。从可溶蛋白中获得 AprE 的酶比活为 30 937.0 IU/mg，从包涵体中获得 AprE 的酶比活为 50 456.7 IU/mg。说明后者可获得更多具有酶活力的目的蛋白。在相同酶活力的情况下，从包涵体中纯化获得的产物酶比活是从 *Bacillus subtilis* DC27[8] 中纯化所得产物酶比活（11 274.4 IU/mg）的 4.5 倍；但与从 *Bacillus velezensis* Z01[1] 中纯化所得产物的酶比活（76 460.0 IU/mg）相比，仍然偏低，提示还要对包涵体的复性与纯化工艺进行优化。

前期研究 [5] 显示，AprE 粗酶液在体外对新鲜血栓的溶栓率达到 40.0%，与 *Bacillus* DC6[13] 的溶栓率（40.8 %）和 *Bacillus velezensis* Z01[1] 的溶栓率（51.9%）相当。而本研究结果表明，纯化后的 AprE 对不易溶解的陈旧血栓也具有溶栓作用，说明纯化后的 AprE 对血栓的溶解效果可能更佳。前期研究 [5] 还显示，AprE 粗酶液在体外的溶血率为 3.33%，而本研究结果表明，纯化后的 AprE 的溶血率降为 1.0%，比 *Bacillus velezensis* Z01 溶血率（<5%）[1] 低，说明 AprE 纯化后的安全性有所提高。

综上所述，AprE 是安全且溶栓效果较好的一类纤溶酶。未来仍需进一步结合酶学特性，探索进行真空冷冻保存纯化 AprE 的处方及其溶栓机制。

参考文献：

[1] ZHOU Y T, CHEN H Z, YU B, *et al*. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from marine *Bacillus velezensis* Z01 and assessment of its therapeutic efficacy *in vivo* [J]. *Microorganisms*, 2022, **10**(5): 843.

[2] WANG P P, PENG C Y, XIE X M, *et al*. Research progress on the fibrinolytic enzymes produced from traditional fermented foods [J]. *Food Sci Nutr*, 2023, **11**(10): 5675-5688.

[3] 彭粹盈 , 王盼盼 , 邓雄伟 , 等. 天然纤溶酶的来源及生产方法研究进展 [J]. 中国酿造 , 2024, **43**(2): 29-34.

[4] 苗朝悦 , 杜　乐 , 王佳琦 , 等. 重组蛋白质在大肠杆菌体系中的可溶性表达策略 [J]. 中国生物工程杂志 , 2023, **43**(9): 33-45.

[5] 张　秀 , 谭正怀 , 马苗苗 , 等. 豆豉 AprE9912D 血栓溶解酶的制备与活性评价 [J]. 中草药 , 2021, **52**(2): 367-377.

[6] RICHARD R B, MURRAY P D. 蛋白质纯化指南 [M]. 陈　薇 , 译. 北京 : 科学出版社 , 2013: 114-127.

[7] RICHARD J S. 蛋白质与蛋白质组学实验指南 [M]. 何大澄 , 译. 北京 : 化学工业出版社 , 2006: 35-82.

[8] YAO M J, YANG Y, FAN J, *et al*. Production, purification, and functional properties of microbial fibrinolytic enzymes produced by microorganism obtained from soy-based fermented foods: developments and challenges [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, **64**(12): 3725-3750.

[9] 常恒祯 , 常　江 , 战俊澎 , 等. 包涵体重组蛋白不同纯化方法的比较 [J]. 中国生物制品学杂志 , 2021, **34**(7): 862-867.

[10] YANG H L, YANG L, LI X, *et al*. Genome sequencing, purification, and biochemical characterization of a strongly fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* Jxnuwx-1 isolated from Chinese traditional *Douchi* [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2020, **66**(3): 153-162.

[11] LU M Y, GAO Z X, XING S Q, *et al*. Purification, characterization, and chemical modification of *Bacillus velezensis* SN-14 fibrinolytic enzyme [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, **177**(1): 601-609.

[12] 邹一飞 , 高向东 , 林福玉 , 等. 蛋白质复性技术研究进展 [J]. 药物生物技术 , 2022, **29**(2): 201-208.

[13] 余东梅 , 赵俊梅 , 韩国全 , 等. 一株新型芽孢杆菌纤溶酶的酶学性质及体外溶栓研究 [J]. 基因组学与应用生物学 , 2021, **40**(Z4): 3558-3565.