

鹿茸菇子实体新纤溶酶的高效分离纯化

陈嘉欣¹, 邓永平^{1, 2*}, 李冠龙^{1, 2}, 刘晓兰^{1, 2*}, 肖凯¹

¹齐齐哈尔大学食品与生物工程学院; ²黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 齐齐哈尔 161006

摘要:采用层析分离法从食药兼用真菌鹿茸菇(*Lyophyllum decastes*)的子实体中纯化得到了一种新纤溶酶, 采用Edman降解法测定了该酶N-端氨基酸序列。结果显示, 鹿茸菇子实体经干燥、粉碎、浸提后获得的含纤溶酶的粗酶液, 依次经过盐析、Octyl-Sepharose Fast Flow 疏水相互作用层析、SP-Sepharose High Performance 离子交换层析和Source 15PHE 疏水相互作用层析分离后获得单一组分的纤溶酶, 酶比活力达到了4 105.78 U/mg, 纯化倍数为206.09, 酶活力回收率为30.91%。Native-PAGE电泳和SDS-PAGE电泳检测结果均表明, 该纤溶酶纯度达到了电泳纯, 相对分子量为30.9 kDa。Edman降解法测定纤溶酶的N-端氨基酸序列为: Gly-Ala-Val-Thr-Gln-Cys-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu, 经过NCBI数据库比对, 该纤溶酶为一种新纤溶酶。本文的研究为纤溶酶的研发提供了新的思路和方法。

关键词:鹿茸菇子实体; 纤溶酶; 分离纯化; 血栓溶解

中图分类号: Q814.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)11-1947-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.11.013

Efficient isolation and purification of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of *Lyophyllum decastes*

CHEN Jia-xin¹, DENG Yong-ping^{1, 2*}, LI Guan-long^{1, 2}, LIU Xiao-lan^{1, 2*}, XIAO Kai¹

¹College of Food and Biotechnology, Qiqihar University;

²Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China

Abstract: A novel fibrinolytic enzyme was isolated and purified from the fruiting bodies of *Lyophyllum decastes*. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was determined by Edman degradation method. The fruiting bodies of *Lyophyllum decastes* was dried, crushed and extracted with phosphate solution to obtain crude enzyme solution. The crude enzyme solution was isolated and purified by using ammonium sulfate precipitation, Octyl-Sepharose Fast Flow hydrophobic chromatography, SP-Sepharose high performance ion chromatography and Source 15PHE hydrophobic chromatography to obtain a single component with fibrinolytic activity. The specific activity of the enzyme was 4 105.78 U/mg, the purification fold was 206.09, and the recovery rate of the activity was 30.91%. Native-PAGE and SDS-PAGE showed that the fibrinolytic enzyme reached electrophoretic purity and the molecular weight was 30.9 kDa. The N-terminal sequences of the fibrinolytic enzyme were determined by the Edman degradation method, and the sequences was Gly-Ala-Val-Thr-Gln-Cys-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu. By NCBI database comparison, it was found that the fibrinolytic enzyme was a novel fibrinolytic enzyme. The research provides a new idea and method for the research and development of fibrinolytic enzyme.

Key words: fruiting bodies of *Lyophyllum decastes*; fibrinolytic enzyme; purification; thrombolysis

血栓栓塞性疾病致残、致死率极高^[1]。血纤维蛋白是构成血栓的主要成分, 因此, 促进血纤维蛋白降解是预防和治疗血栓性疾病的常见手段^[2]。外

源纤溶酶, 如尿激酶(UK)、链激酶(SK), 因其能够间接或直接水解纤维蛋白而被广泛应用于血栓栓塞性疾病的临床治疗中。虽然它们具有显著的溶栓疗效, 但也有一定的应用局限性如半衰期短、副作用较大等^[3]。因此, 寻找专一性强、安全性好、副作用低的新型纤溶酶成为目前的研究热点。

食用菌富含蛋白质、多糖、萜类、氨基酸、甾醇

收稿日期: 2023-03-10 接受日期: 2023-07-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31301414)

*通信作者 Tel: 86-452-2742731; E-mail: 913913_monkey@163.com, liuxiaolan001@126.com

类、核苷类等物质,具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节、神经调节等多种生理功能^[4,5]。目前食用菌来源的纤溶酶及其功能性质的研究受到广泛关注。已有报道从多种食用菌中分离提取到了纤溶酶,如香菇(*Lentinus edodes*)^[6]、蛹虫草(*Cordyceps militaris*)^[7]、茶树菇(*Agrocybe aegerita*)^[8]、黄绿口蘑(*Tricholoma sejunctum*)^[9]、紫丁香蘑(*Lepista nuda*)^[10]、阿魏菇(*Pleurotus ferulae*)^[11]等。

鹿茸菇是一种木腐型食药兼用菌,广泛分布于北半球温带地区,具有抗氧化、提高免疫功能、抑制肿瘤、降血脂等生理功能^[12]。在前期的实验中发现,鹿茸菇子实体浸提液中含高活力纤溶酶,显著高于现有报道的其他食用菌来源的纤溶酶。本文介绍了鹿茸菇子实体中纤溶酶的分离纯化方法,并对该酶进行了初步鉴定,目前本课题组尚未见与鹿茸菇纤溶酶相关的其他报道。本文的研究可为开展鹿茸菇纤溶酶的溶栓抗栓功能性试验提供基础,也可为其用于开发功能性食品奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鹿茸菇子实体(批号:6951370171033,古田县天鲜农产品有限公司);Octyl-Sepharose Fast Flow (Octyl-Sepharose FF) 疏水相互作用层析介质(批号:10012531,GE Life Sciences);SP-Sepharose High Performance (SP-Sepharose HP) 强阳离子交换层析介质(批号:10020356,GE Life Sciences);Source 15PHE 疏水相互作用层析介质(批号:10070744,GE Life Sciences);牛血清白蛋白(批号:20200508,含量:97%,上海生工生物工程公司);(NH₄)₂SO₄(色谱纯)(批号:1919BA0020,上海生工生物工程公司);NaCl(色谱纯)(批号:1429BA0015,上海生工生物工程公司);SDS-PAGE 电泳标准蛋白(批号:BC02DA0005,上海生工生物工程公司);纤维蛋白原(批号:B20220901,上海经科生物有限公司);凝血酶(批号:720220502,上海经科生物有限公司);其他试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

低压色谱柱 XK 16/20(批号:512377,GE Life Sciences);低压色谱柱 HR 16/10 CR21G(批号:10012158,GE Life Sciences);高速冷冻离心机(CR22N型,日本日立公司);TU1810 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);AKTA prime 蛋白纯化系统(GE Life Sciences)。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白质浓度和纤溶酶活力测定

采用 Folin-酚法^[13]测定蛋白质浓度,以牛血清白蛋白为标准蛋白,测定 640 nm 下吸光值;采用血纤维蛋白平板法测定纤溶酶活力,具体方法见文献^[13]。

1.3.2 鹿茸菇纤溶酶的分离纯化

1.3.2.1 粗酶液的制备

鹿茸菇子实体晾干粉碎,取 45 g 子实体粉末以 1:10(m/V) 比例加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)(0.02 mol/L,pH 7.4),4 °C 下浸提 4 h,4 °C、10 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液置于 4 °C 冰箱中备用。

1.3.2.2 盐析条件的确定

将粗酶液分装至 10 mL 的离心管中,每管 2 mL,按照硫酸铵饱和度表(0 °C)分别向各管中添加不同质量的 (NH₄)₂SO₄,使其中 (NH₄)₂SO₄ 饱和度分别为 0%、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 和 100%,置于 4 °C 冰箱中盐析 24 h,在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 20 min 得上清液和沉淀,沉淀用 2 mL 的 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液(pH 7.4)溶解,分别测定不同 (NH₄)₂SO₄ 饱和度的上清液以及沉淀复溶样品的纤溶酶活力和可溶性蛋白质含量,绘制 (NH₄)₂SO₄ 盐析曲线。

1.3.2.3 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析条件优化

将盐析后的粗酶液中硫酸铵饱和度分别调整至 30% 和 25%,进行 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析分离,确定样品的适宜初始盐浓度。柱型:Φ1.6 cm×20 cm,柱床高度 15 cm,蛋白质浓度 4.85 mg/mL,上样量 100 mL,起始缓冲溶液为含有硫酸铵饱和度 30% 的 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液(pH 7.4);洗脱液为 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液(pH 7.4);流速 2 mL/min,线性梯度洗脱 8 倍柱床体积,收集活性组分,测定纤溶酶活力和可溶性蛋白质含量。

1.3.2.4 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析预装柱优化分离条件

将疏水相互作用层析收集的活性组分用 Sephadex G-25 凝胶层析进行脱盐并交换缓冲溶液,然后进行强阳离子交换层析法分离。柱型:1 mL 预装柱,蛋白浓度 0.47 mg/mL,上样量 84 mL。起始缓

冲溶液为 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液 (pH 6.0、pH 5.2);洗脱液为含有 1 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液 (pH 6.0、pH 5.2);流速 1 mL/min,线性梯度洗脱 8 倍柱床体积,收集活性组分,测定纤溶酶活力和可溶性蛋白质含量。

1.3.2.5 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析条件放大优化

将疏水相互作用层析收集的活性组分用 Sephadex G-25 凝胶层析进行脱盐并交换缓冲溶液,研究强阳离子交换层析法的放大实验条件。柱型:Φ1.6 cm × 20 cm,柱床高度 15 cm,蛋白浓度 0.47 mg/mL,上样量 84 mL。起始缓冲溶液为 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液 (pH 5.2);洗脱液为含有 0.3 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液 (pH 5.2);流速 2 mL/min,线性梯度洗脱 8 倍柱床体积,收集活性组分,测定纤溶酶活力和可溶性蛋白质含量。

1.3.2.6 Source 15PHE 疏水相互作用层析条件优化

将离子交换层析收集到的活性组分调整硫酸铵进行 Source 15PHE 疏水相互作用层析分离,柱型:Φ1.6 cm × 10 cm,柱床高度 5 cm,蛋白浓度 1.2 mg/mL,上样量 5 mL,起始缓冲溶液为含有硫酸铵饱和度 25%、10% 的 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液 (pH 7.4);洗脱液为 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲溶液 (pH

7.4);流速 2 mL/min,线性梯度洗脱 8 倍柱床体积,收集活性组分,测定纤溶酶活力和可溶性蛋白质含量。

1.3.3 纤溶酶的纯度和相对分子质量的测定

参考 Liu 等^[7]的方法,采用 Native-PAGE 电泳,观察样品是否为单一条带判断纤溶酶纯度;采用 SDS-PAGE 电泳法测定纤溶酶的相对分子质量^[7]。

1.3.4 纤溶酶的 N-端序列测定

采用 Edman 降解法测定纤溶酶的 N-端序列。将纤溶酶溶液滴在 PVDF 膜上,放置到 PPSQ33A 全自动蛋白质/多肽测序仪反应器中,通过软件 PPSQ-30 Analysis 设置参数进行测定。

2 结果与讨论

2.1 鹿茸菇纤溶酶的分离纯化

2.1.1 硫酸铵盐析条件的确定

盐析是对蛋白质分离纯化研究中常用的粗分离方法,具有操作条件较温和,蛋白质不易变性的优点。经过盐析可以使粗酶液由大体积转入小体积操作,有利于后续的纯化操作,还能够去除一部分杂质。不同的蛋白质由于含有的疏水性氨基酸数量往往不同,因此表现出不同的盐析性质,因此,在对未知蛋白质盐析时需要测定其盐析曲线。鹿茸菇纤溶酶盐析曲线见图 1。

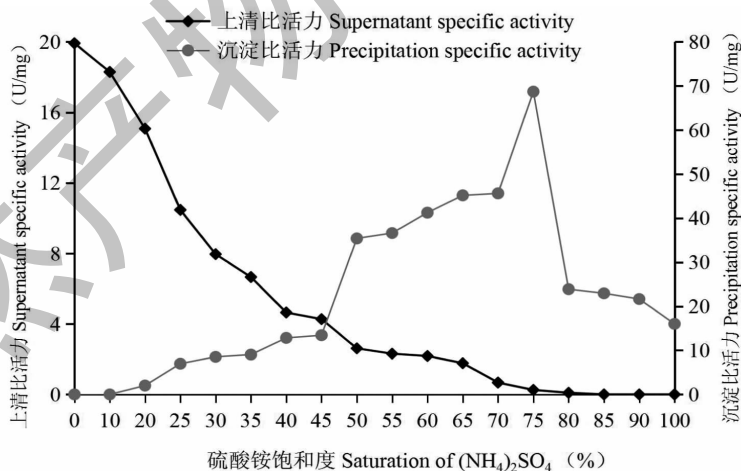


图 1 纤溶酶盐析曲线图谱

Fig. 1 Salting out curve of the fibrinolytic enzyme

如图 1 所示,上清液中纤溶酶比活力随着硫酸铵饱和度的增加而逐渐降低,沉淀中纤溶酶比活力随着硫酸铵饱和度的增加而逐渐升高,在硫酸铵饱和度为 75% 时达到最大值,在此条件下上清液中的酶活力接近于 0,说明当硫酸铵饱和度为 75% 时,可

以使纤溶酶可逆沉淀,并去除可溶性的杂质,使粗酶液浓缩,减小了纯化体系,易于后续分离操作。

2.1.2 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析分离条件的优化

盐析后的样品复溶液中还残留少量硫酸铵,因

此选择 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析对酶进行分离,省去了脱盐的步骤,减少了酶活力的损失。该介质表面带有低密度辛基疏水基团,平均胶粒直径 $90\ \mu\text{m}$,载量大且不易造成蛋白质的变性失活,适用于粗分离阶段使用。由于盐浓度对疏水相互作用层析的分离效果影响显著,因此,研究了样品硫酸铵饱和度分别为 30% 和 25% 时的分离效果,分离图谱见图 2 和图 3。

如图 2 所示,在硫酸铵饱和度为 30% 时,部分

疏水性较弱的杂蛋白(峰 1)在衡洗阶段被去除,但是一部分杂蛋白的疏水性(峰 2、峰 4)与目标组分纤溶酶(峰 3)疏水性相似,在梯度洗脱中后期同时被洗脱出柱。盐浓度是影响蛋白质与层析介质疏水配基之间的结合能力的主要因素,当盐浓度过高时,蛋白质暴露的疏水性基团增加,就会增加蛋白与介质的结合能力,适度降低缓冲液中的盐浓度会使疏水性相对弱的杂蛋白(峰 2)与填料的结合能力降低,从而在衡洗阶段被洗出柱,实现与目标组分的分离。

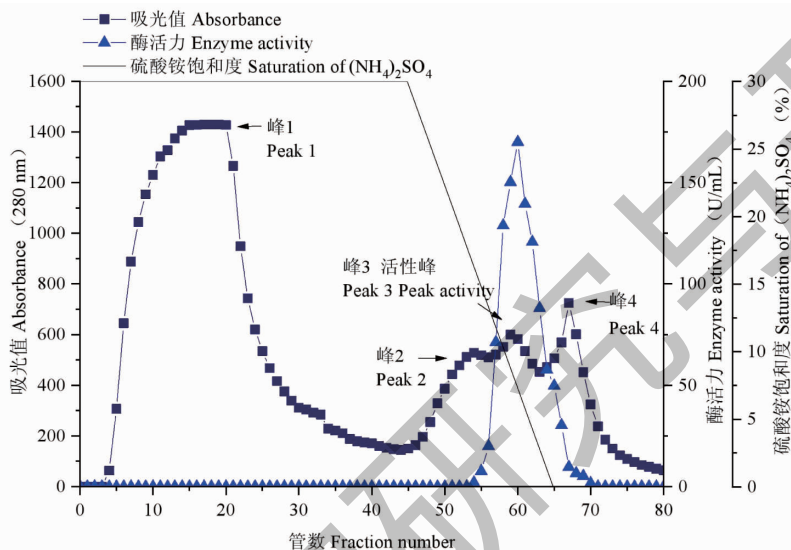


图 2 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析洗脱曲线

Fig. 2 Elution curves of Octyl-Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography

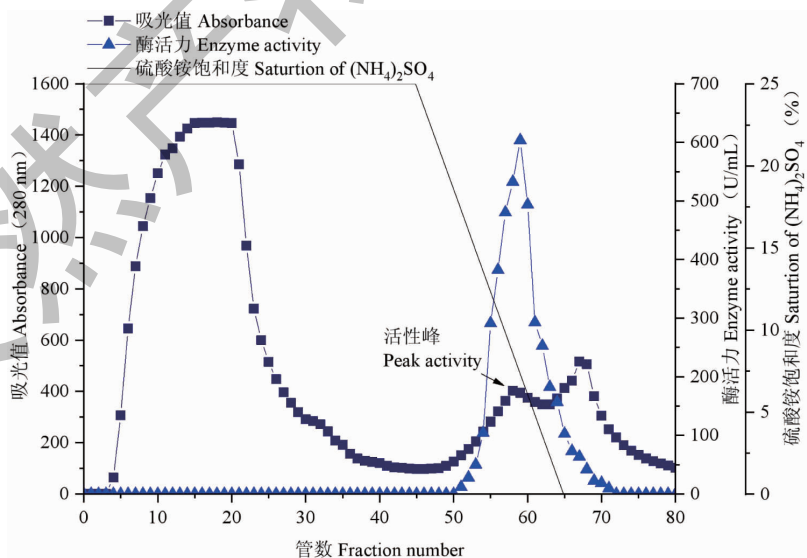


图 3 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析洗脱曲线

Fig. 3 Elution curves of Octyl-Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography

调整样品和缓冲液硫酸铵饱和度为 25% 进行层析分离,洗脱曲线见图 3。

由图 3 可以看出将硫酸铵饱和度降低至 25% 时,图 2 中的峰 2 疏水性显著下降,在衡洗阶段被洗

脱出柱,目标组分纤溶酶与疏水配基作用依然较强,在洗脱中后期与疏水性更强的杂蛋白先后被洗脱出柱。由此可以看出,鹿茸菇纤溶酶的疏水性较根霉纤溶酶强,当硫酸铵饱和度从 30% 降至 25% 时,根霉纤溶酶的疏水性减弱明显,不能与介质疏水配基发生作用。这说明目的蛋白的疏水基团裸露构象是线性的渐变过程^[14]。

经过 Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析分离去除了样品中的部分杂蛋白,但是由图 3 看出,蛋白吸收峰和活性峰没有很好对应,而且目标组分与部分杂蛋白疏水性相似,不能实现完全分离,因此,下一步拟采用离子交换层析进一步分离。

2.1.3 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析分离条件的优化

SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析介质平均胶粒直径为 34 μm ,分辨率较高,常用于纯化的中间步骤,缓冲液 pH 值和洗脱液离子强度是影响其分离效果的主要因素。

采用 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析预装柱(柱体积 1 mL)对缓冲液 pH 值进行优化。Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析分离后的样品经 Sephadex G-25 凝胶过滤脱盐和交换缓冲液(pH 6.0),进行 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析,洗脱曲线见图 4。

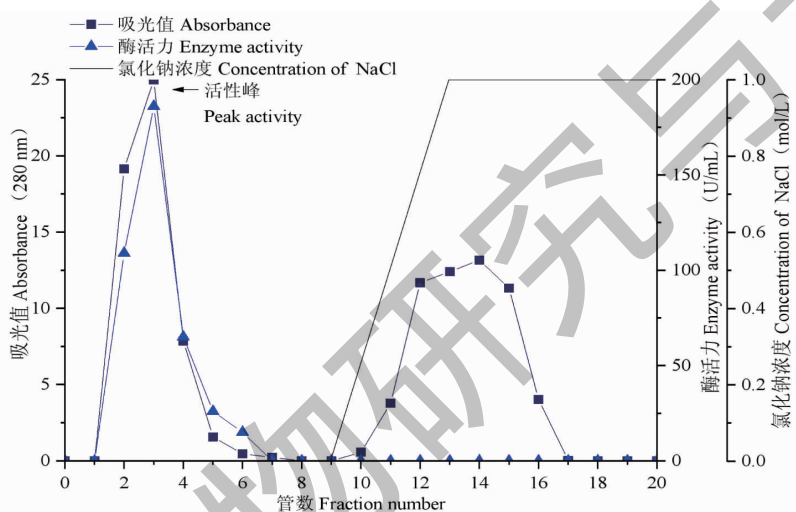


图 4 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析洗脱曲线

Fig. 4 Elution curve of SP-Sepharose HP Strong-cation exchange chromatography

如图 4 所示,目标组分纤溶酶在衡洗阶段出现,说明当缓冲液 pH 为 6.0 时,与该酶等电点差异不

大,酶分子不能与层析介质吸附,因此考虑降低缓冲液 pH 至 5.2 进行实验,得到洗脱曲线见图 5。

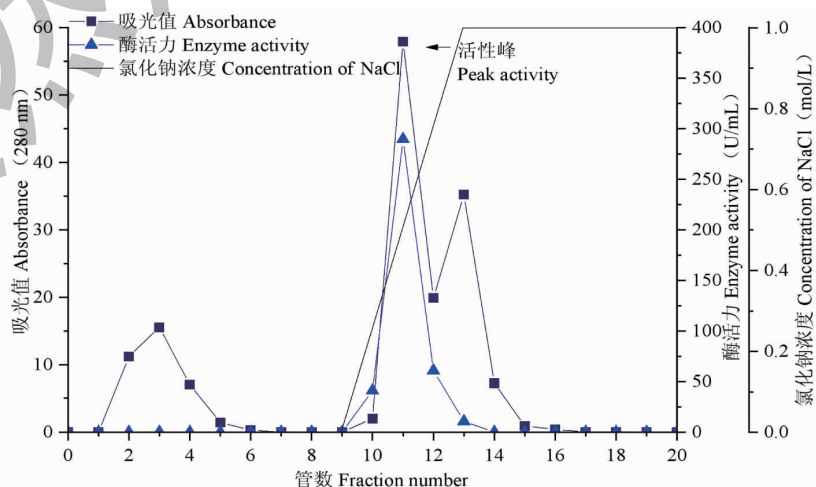


图 5 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析洗脱曲线

Fig. 5 Elution curve of SP-Sepharose HP Strong-cation exchange chromatography

如图5所示,当缓冲溶液 pH 为 5.2 时,目标组分纤溶酶带正电荷,能够与层析介质进行吸附,结合效果较好,该酶在洗脱初始阶段即从介质上解吸附,因此,确定缓冲溶液 pH 为 5.2。

将上述分离条件进行放大研究,同时将梯度洗脱的盐浓度范围由 0 ~ 1 mol/L 缩小至 0 ~ 0.3 mol/L,以期将其与之后的杂蛋白分离,得到的洗脱曲线见图6。

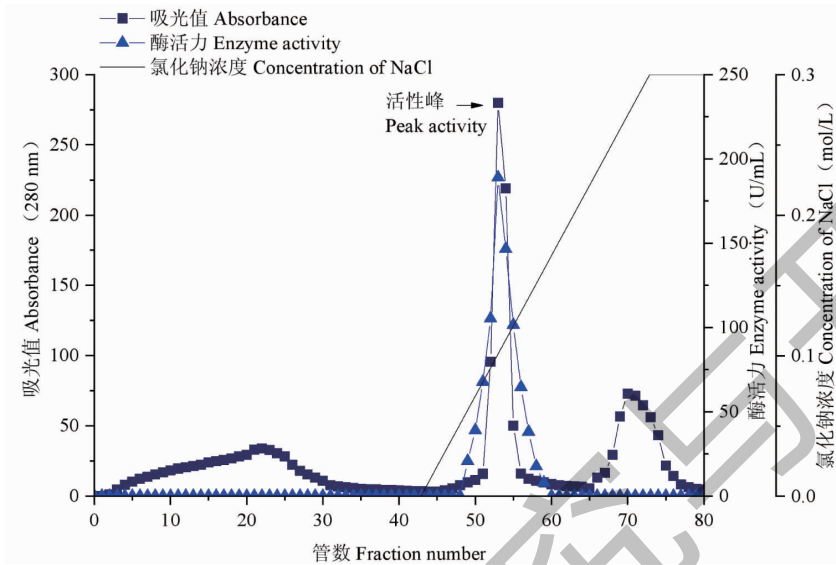


图6 SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of SP-Sepharose HP strong-cation exchange chromatography

由图6所示,经过缩小洗脱溶液的盐浓度范围后,纤溶酶组分与杂蛋白得到了较好的分离,活性峰与蛋白峰对应,获得了较好的分离效果。

2.1.4 Source 15PHE 疏水相互作用层析条件优化

将经过离子交换层析(缓冲液 pH 5.2, 洗脱液盐浓度 0.3 mol/L)分离得到的活性组分进行 Source

15PHE 疏水相互作用层析分离。疏水层析要求样品为高盐浓度,所以疏水层析常常用于盐析后或进行离子交换层析分离后。Source 15PHE 填料的颗粒直径为 15 μm , 配基密度更强,适用于精细分离。

调整活性组分溶液中硫酸铵饱和度为 25% 进行 Source 15PHE 疏水相互作用层析,洗脱图谱见图7。

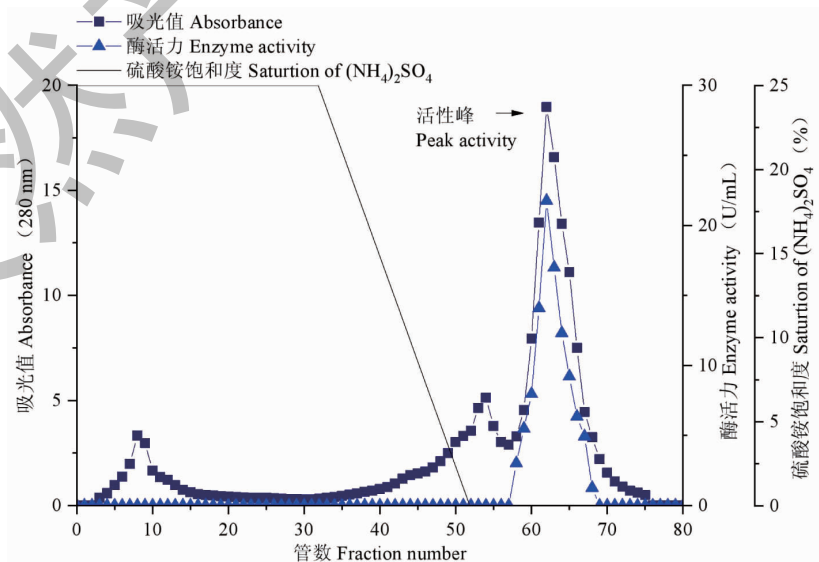


图7 Source 15PHE 疏水相互作用层析洗脱曲线

Fig. 7 Elution curves of Source 15PHE hydrophobic interaction chromatography

从图7中可以发现,当溶液中硫酸铵饱和度为25%时,目的酶疏水性较强,在洗脱结束以后才出

现,因此,考虑降低溶液中硫酸铵饱和度至10%,以减弱疏水相互作用,得到的洗脱曲线见图8。

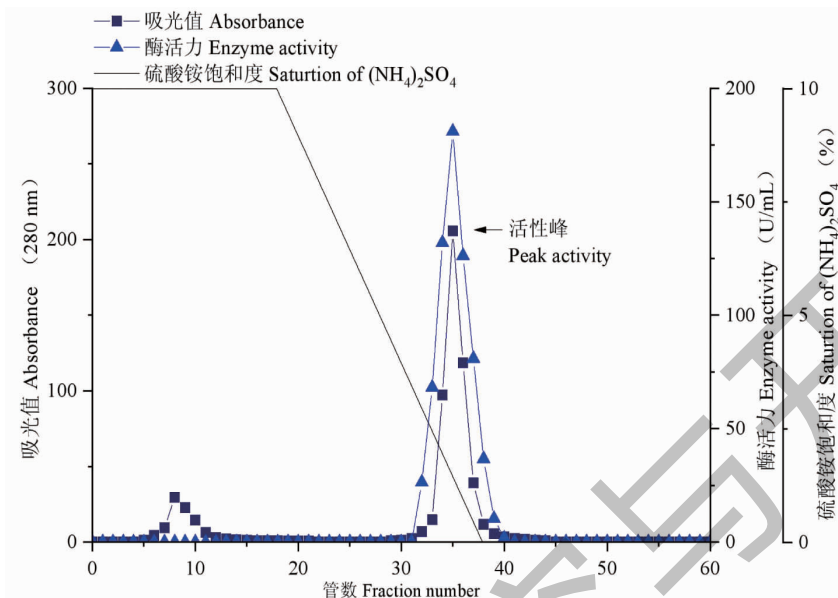


图8 Source 15PHE 疏水相互作用层析洗脱曲线

Fig. 8 Elution curves of Source 15PHE hydrophobic interaction chromatography

如图8所示,目标组分纤溶酶在梯度洗脱末期从层析柱中被洗脱出来,蛋白峰与活性峰完全对应,峰形对称,说明该酶经过此步骤分离后纯度进一步提高。

但如果盐浓度太低,目标蛋白会与介质吸附不完全^[15];在本实验中,将硫酸铵浓度降低至25%时,恰好使杂蛋白吸附减少并且使目的蛋白在洗脱中期被分离出,达到了较好的分离效果;有利于对蛋白的分离并提高分离效率。

从分离步骤中的细节优化可以发现,有些杂质与目标蛋白性质极为接近,在每一步纯化过程中都尽可能地除去与目标蛋白性质相接近的杂质。尝试改变溶液中的盐浓度会使杂质与目标蛋白之间的差异明显化。除了蛋白质和疏水性配基本身的疏水性之外,盐浓度对疏水相互作用的影响最大,在疏水层析分离过程中,盐浓度高会使疏水相互作用增强,导致蛋白难于洗脱,而且杂蛋白也容易吸附,影响蛋白

综上所述,鹿茸菇子实体中的纤溶酶依次经过硫酸铵盐析、Octyl-Sepharose FF 疏水相互作用层析、SP-Sepharose HP 强阳离子交换层析和 Source 15PHE 疏水相互作用层析分离纯化后,获得了较好的纯化效果。鹿茸菇子实体纤溶酶的活力回收率和纯化情况统计如表1所示。

表1 鹿茸菇子实体纤溶酶活力纯化表

Table 1 Purification steps of the fibrinolytic enzyme from *Lyophyllum decastes*

| 纯化步骤 Purification step | 总蛋白 Protein (mg) | 总活力 Activity (U) | 回收率 Recovery (%) | 比活力 Specific activity (U/mg) | 纯化倍数 Purification fold |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 粗酶液 Crude enzyme | 1857.39 | 37004.24 | 100.00 | 19.92 | 1.00 |
| 硫酸铵盐析 (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation | 485.65 | 33370.28 | 90.18 | 68.71 | 3.45 |
| Octyl-Sepharose FF | 82.70 | 27972.20 | 75.59 | 338.25 | 16.98 |
| SP-Sepharose HP | 12.77 | 12958.15 | 35.02 | 1015.11 | 50.958 |
| Source 15PHE | 2.79 | 11439.05 | 30.91 | 4105.78 | 206.09 |

注:表中数据为45g子实体粉末提取。

Note: The data in the table is 45 g fruiting body powder extraction.

由表1可知,经多步提纯后的鹿茸菇纤溶酶比

活力由19.92 U/mg提高到4105.78 U/mg,纯化倍

数为 206.09,回收率为 30.91%,与冬虫夏草^[16]、白灵侧耳^[17]等相比回收率较高,目的纤溶酶已经达到较好的分离状态。

2.1.5 鹿茸菇纤溶酶的纯度检验和相对分子质量确定

利用 Native-PAGE 检验了经过纯化后鹿茸菇纤溶酶的纯度情况,结果如图 9 所示。鹿茸菇纤溶酶在 Native-PAGE 电泳中呈现出单一条带,表明样品已经达到了电泳纯,并且将条带位置切下放置在血纤维蛋白平板上面,在 37 °C 环境下保温孵育,发现在血纤维蛋白平板上放置胶条的位置出现了透明溶圈,结果如图 10 所示,说明该条带具有纤溶活性,为目标蛋白。

鹿茸菇纤溶酶的 SDS-PAGE 电泳结果如图 11 所示。

由图 11 可以看出,鹿茸菇纤溶酶在变性电泳中显示为单一条带(泳道 1),结合图 9 结果分析,可确



图 9 Native-PAGE 电泳图谱

Fig. 9 Native-PAGE electrophoresis pattern

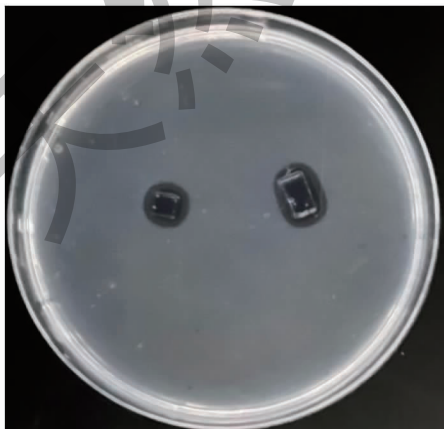


图 10 纤溶酶活性验证结果

Fig. 10 Verification result of the fibrinolytic enzyme activity



图 11 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 11 SDS-PAGE electrophoresis pattern

注:泳道 1 为样品;泳道 2 为标准蛋白 Marker。Note: Lane 1 is the sample; Lane 2 is the standard protein marker.

定鹿茸菇纤溶酶是由单亚基组成,与标准蛋白 Marker(泳道 2)对比,可判断该纤溶酶分子量约为 30.9 kDa。

目前已报道的纤溶酶分子量分布范围较广。Liu 等^[7]从蛹虫草发酵产物中分离出两种纤溶酶,分子量分别为 28 kDa 和 24.5 kDa; Duan 等^[18]从粗糙脉孢菌分离出的纤溶酶相对分子质量约为 32 kDa; Li 等^[8]从茶树菇子实体分离出的纤溶酶分子量分别为 31.4 kDa 和 21.2 kDa。Deng 等^[19]从脉孢霉发酵产物中提取的纤溶酶为二聚体蛋白,分子量分别为 30 kDa 和 17.5 kDa。很多微生物来源的纤溶酶与本实验分离出的鹿茸菇纤溶酶分子量接近;但与 Shen 等^[20]从同为离褶伞属中分离出的纤溶酶分子量差距较大,榆干离褶伞纤溶酶的分子量为 50 kDa。小分子量的纤溶酶更易被人体吸收利用,减弱免疫排斥反应。

2.1.6 鹿茸菇纤溶酶的 N-端序列分析

经过 Edman 法对该酶的 N-端氨基酸序列进行测定,其 N-端 12 个氨基酸分别为 Gly-Ala-Val-Thr-Gln-Cys-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu。通过 NCBI 数据库比对(如表 2 所示),发现从鹿茸菇子实体中提取到的纤溶酶为一种新型纤溶酶。

3 结论

本研究采用现代色谱分离技术从鹿茸菇子实体中分离纯化得到了一种纤溶酶,该纤溶酶的 N 端十二个氨基酸序列为: Gly-Ala-Val-Thr-Gln-Cys-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu,经 NCBI 数据库比对,该纤溶酶

表2 鹿茸菇纤溶酶 N-端序列与 NCBI 已知酶的对比情况

Table 2 Comparison of N-terminal sequence of fibrinolytic enzyme from *Lyophyllum decastes*

| 来源 Source | 首个氨基酸位置 Position of first aminoacid | 序列 Sequence | 同源性 Identity (%) | 相似性 Positives(%) | 编号 Accession number |
|---|---|---|------------------------|---------------------|---------------------------|
| 鹿茸菇 <i>Lyophyllum decastes</i> | 1 | Gly-Ala-Val-Thr-Gln-Cys-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu | - | - | - |
| 墨汁鬼伞 <i>Coprinopsis atramentaria</i> | 108 | Ala-Val-Thr-Gln-Ser-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu | 91 | 91 | TFK25386.1 |
| 朱红栓菌 <i>Trametes cinnabarina</i> | 113 | Ala-Val-Thr-Gln-Thr-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu | 91 | 91 | CD071600.1 |
| 灰树花菌 <i>Grifola frondosa</i> | 77 | Ala-Val-Thr-Gln-Thr-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu | 91 | 91 | OBZ79180.1 |
| 毛栓菌 <i>Trametes hirsuta</i> | 113 | Ala-Val-Thr-Gln-Thr-Asn-Ala-Pro-Trp-Gly-Leu | 91 | 91 | KAI0651894.1 |

为一种新纤溶酶。该纤溶酶比活力为 4 105.78 U/mg, 纯化倍数为 206.09, 活力回收率为 30.91%。经 Native-PAGE 电泳和 SDS-PAGE 电泳检测, 发现该纤溶酶相对分子量为 30.9 kDa。以上结果表明, 来源于鹿茸菇子实体的新纤溶酶具有良好的溶栓潜质, 可用于降低血栓倾向功能食品的开发。

参考文献

- China Cardiovascular Health and Disease Report Compilation Group. Summary of Chinese cardiovascular health and disease report 2019[J]. Cardio-Cerebrovasc. Dis Prev Treat(心脑血管病防治), 2020, 20:437-450.
- Altaf F, Wu S, Kasim V. Role of fibrinolytic enzymes in anti-thrombosis therapy[J]. Front Mol Biosci, 2021, 8:680397.
- Hébert M, Lesept F, Vivien D, et al. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA)[J]. Rev Neurol, 2016, 172:186-197.
- Assemie A, Abaya G. The effect of edible mushroom on health and their biochemistry[J]. Int J Microbiol, 2022, 2022:8744788.
- Zhou LQ, Huang Y, Lu Y, et al. Structural identification and *in vitro* antitumor activity of wild *Morchella esculenta* polysaccharide from Xiaojin County of Sichuan Province[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2022, 34:2077-2088.
- Choi JH, Kim KJ, Kim S. Purification and antithrombotic potential of a fibrinolytic enzyme from shiitake culinary-medicinal mushroom, *Lentinus edodes* GNA01 (Agaricomycetes)[J]. Int J Med Mushrooms, 2018, 20:47-59.
- Liu XL, Kopparapu NK, Li Y, et al. Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*[J]. Int J Biol Macromol, 2017, 94:793-801.

- Li GL, Liu XL, Cong SZ, et al. A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita*[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 168:631-639.
- Kim JH, Cho SK. Characterization of a fibrinolytic metalloenzyme from a wild mushroom, *Tricholomase junctum*[J]. Korean J Mycol, 2004, 32:119-124.
- Kim JH. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Lepistanuda*[J]. Korean J Mycol, 2005, 33:69-74.
- Choi JH, Kim DW, Kim S, et al. Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2016, 47:539-546.
- Zhang GP, Wang YN, Qin CQ, et al. Structural characterization of an antioxidant polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Lyophyllum decastes*[J]. J Mol Struct, 2023, 1285:135507.
- Deng YP, Che X, Ai RB, et al. Purification and fibrinolytic activity *in vitro* of fibrinolytic enzyme from *Neurospora sitophila*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2020, 32:1937-1942.
- Liu XL. Fermentation, purification characteristics of a novel fibrinolytic enzyme of *Rhizopus chinensis*[D]. Tianjin:Tianjin University of Science and Technology(天津科技大学), 2004.
- Wang QD. Study on preparation and purification of protein[D]. Beijing:Beijing University of Chemical Technology(北京化工大学), 2016.
- Zang WT, Mei YX, Liang YX. Purification and characterization of *Ophiocordyceps sinensis* plasmin from solid culture mycelia[J]. Microbiol China(微生物学通报), 2020, 47:562-570.