

# 中国传统发酵食品中溶栓酶活性检测方法比较<sup>\*</sup>

邵荣军, 陈 斌, 郝友进, 何正波

(重庆师范大学 重庆高校生物活性物质工程研究中心, 重庆 400047)

**摘要:**通过正交实验设计建立最佳琼脂糖-纤维蛋白平板法,并比较改进的纤维蛋白平板法和四肽底物法测定中国传统发酵食品中溶栓酶的活性的线性和精密度,以找出一个灵敏易操作、经济实惠、快速准确地标示溶栓酶效价的活性检测方法。实验结果显示纤维蛋白平板法和四肽底物法分别在  $50 \sim 800 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.03 \sim 2.60 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内具有良好的线性关系,且日间和日内变异系数均小于 6%。因此,纤维蛋白平板法与四肽底物法均能用于溶栓酶的活性检测,前者测定结果比较直观,但四肽底物法操作比较简单,经济成本相对较低,灵敏度高,更适合溶栓菌株的高通量筛选。

**关键词:**溶栓酶;纤维蛋白平板法;四肽底物法

**中图分类号:**Q503;Q556

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-6693(2012)04-0088-05

随着生活水平的日益提高,人们患心血管疾病的风险性越来越高<sup>[1]</sup>。血栓性疾病是中老年人群的高发病,而溶解血栓是治疗此类疾病的重要手段。1987年,日本人须见洋行<sup>[2]</sup>等首先发现纳豆中含有一种高纤溶活性的酶,可治疗和预防血栓病,并将其命名为纳豆激酶。这种酶不仅具有水解体内血栓的能力,而且能将体内的纤溶酶原激活为纤溶酶<sup>[3]</sup>。此后,在传统的发酵食品中分离出许多产溶栓酶的菌株,如从韩国大豆酱分离出的产CK纤溶酶菌株CK-11-4<sup>[4]</sup>;从韩国 Doen-Jang 中筛选出的菌株DJ-4<sup>[5]</sup>;从中国豆豉中筛选出的菌株DEF<sup>[6]</sup>;等等。这些产溶栓酶的菌株经鉴定属于枯草芽孢杆菌<sup>[7]</sup>。因此,在高效溶栓菌株的筛选及药物开发过程中,酶活检测技术是关键技术之一,溶栓酶活性测定方法大致可分为两类:一是通过生物学方法,利用纳豆激酶溶解纤维蛋白的特性测定其纤溶活性,如纤维蛋白平板法<sup>[8]</sup>、纤维蛋白块溶解时间法<sup>[9]</sup>等;二是以纳豆激酶的水解活性为基础来测定,如甲基苯磺酰-L-精氨酸甲酯(TAME)法<sup>[10]</sup>、酪蛋白水解法<sup>[11]</sup>、四肽底物法<sup>[12]</sup>等。目前,溶栓酶活性测定方法常见的有纤维蛋白平板法、纤维蛋白块溶解时间法、四肽底物法、酶联免疫吸附法<sup>[13]</sup>、血清法<sup>[14]</sup>等。本研究通过

比较优化的纤维蛋白平板法和四肽底物法,以便找出一个灵敏、易操作、经济实惠、快速、准确地标定纳豆激酶效价的活性检测方法,用于纳豆激酶类溶栓酶的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

尿激酶标准品(Urokinase)购于中国药品生物制品检定所;纤维蛋白原(Fibrinogen),凝血酶(Thrombin)及四肽底物购于Sigma公司;其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 纤维蛋白平板法

1)琼脂糖-纤维蛋白平板的制备。纤维蛋白平板的主要成分是纤维蛋白原和琼脂糖,纤维蛋白原在凝血酶的作用下被水解成纤维蛋白,琼脂糖是作为纤维蛋白平板的支架。因此,在优化纤维蛋白平板法时需要考察纤维蛋白原和琼脂糖两个因素。通过正交试验设计两因素3水平多组实验,从中找出一个最佳的纤维蛋白平板方案用于溶栓酶活性的检测。

取一定量的琼脂糖置于小烧杯中,加入磷酸盐

\* 收稿日期:2011-11-23 修回日期:2012-02-05 网络出版时间:2012-07-04 11:15:00

资助项目:重庆市自然科学基金(No. CSTC2008BA5030)

作者简介:邵荣军,男,硕士研究生,研究方向为基因工程;通讯作者:陈斌,E-mail: c\_bin@hotmail.com

网络出版地址: [http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120704.1115.201204.88\\_016.html](http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20120704.1115.201204.88_016.html)

缓冲液(pH 值为 7.4),加热至完全溶解,冷却至 55~60 ℃,加 50  $\mu\text{L}$  的凝血酶( $200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。迅速加入预先配好的纤维蛋白原溶液,混匀后倒入直径为 11 cm 的平皿中,静置凝结成体积为 11 mL 乳白色凝块,打孔,放 4 ℃ 冰箱备用。

用磷酸盐缓冲液(pH 值为 7.4)配制  $1\,000 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  尿激酶标准溶液并进行浓度梯度稀释,各取 10  $\mu\text{L}$  滴加到纤维蛋白平板的小孔中,37 ℃ 倒置孵育 18 h 后,测量透明圈直径,并计算透明圈的面积。

以尿激酶活力单位为横坐标,透明圈的面积为纵坐标,绘制标准曲线。待测样品溶液形成的透明圈按同样的方法测定,并计算形成的透明圈的面积,根据最佳纤维蛋白平板的标准曲线以尿激酶活力单位来表示其纤溶活性。

2)尿激酶标准曲线的建立。参照 Asrup<sup>[15]</sup> 对纳豆激酶的测定方法,对纤维蛋白平板法进行优化改进,从而能准确地计算待测样品的纤溶活力。

3)纤维蛋白平板法的线性及精密度。

用磷酸盐缓冲液(pH 值为 7.4)将待测样品梯度稀释为 1/6 原液、1/4 原液、1/3 原液和 1/2 原液;将各梯度稀释液和原液各取 10  $\mu\text{L}$  滴加到含纤维蛋白的平板上,测量透明圈的面积。每个梯度浓度重复 3 次取平均值,并用 SPSS 软件对样品溶液浓度与对应的透明圈面积进行回归分析<sup>[15]</sup>。批次间的变异系数(CV)由日内和日间 3 次测量值确定。

1.2.2 四肽底物法 四肽底物是人工合成的小肽,已知纳豆激酶对四肽底物最为敏感,可以将该底物水解生成对硝基苯胺(p-NA)而使溶液呈黄色,根据单位时间内对硝基苯胺的释放量来计算酶的活性。使用 Tris- $\text{CaCl}_2$  缓冲液(含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris,  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 值为 8.0)将四肽底物(Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA)稀释为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。在 37 ℃ 条件下,取不同浓度的标准品溶液各 10  $\mu\text{L}$  加入微孔板中,同时加入 190  $\mu\text{L}$  的  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的四肽底物溶液,混匀,以 415 nm 为测定波长,用酶标仪测定 1 min 内酶促反应速度(单位: $\text{mOD} \cdot \text{min}^{-1}$ )。活力单位定义为,在 37 ℃ 条件下,1 min 时间内 1 mL 反应体系中,水解四肽底物生成 1 mmol 对硝基苯胺

的酶活为 1 U。

1)四肽底物法的线性及精密度。用 Tris- $\text{CaCl}_2$  缓冲液(含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris,  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 值为 8.0)将待测样品梯度稀释为 1/6 原液、1/4 原液、1/3 原液和 1/2 原液,测定原液及稀释液酶促反应的速度,重复 3 次取平均值。回归分析及批次间的差异分析方法纤维蛋白平板法。

2)纤维蛋白平板法和四肽底物法测定值的相关性。用 SPSS 软件对纤维蛋白平板法和四肽底物法的测定结果进行相关性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 纤维蛋白平板法

2.1.1 最佳纤维蛋白平板的优化及标准曲线的建立 根据正交试验设计得出的 9 组实验产生透明圈的效果如图 1。

由图 1 可以看出,实验 5 产生的透明圈边缘比

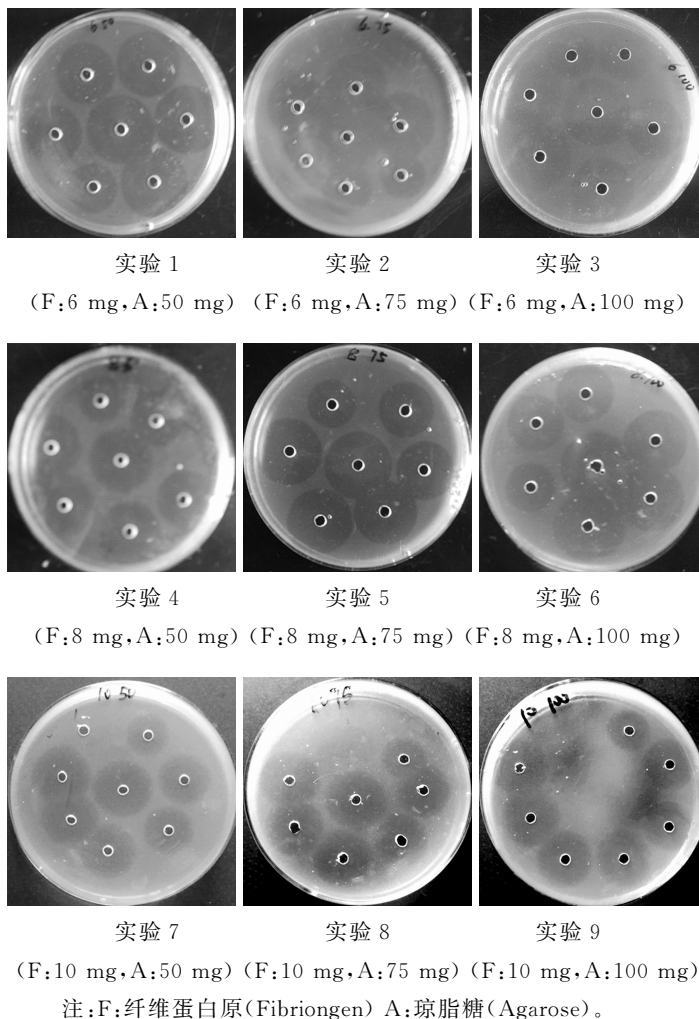


图 1 纤维蛋白平板溶栓效果图

较清晰,效果最好,容易测量。且每个平板的纤维蛋白原用量只有 8 mg,与国内杨明俊等<sup>[16]</sup>所制备的纤维蛋白平板(100 mg)和齐香君<sup>[17]</sup>等制备的纤维蛋白平板(45 mg)相比较,实验成本大幅度降低。因此,最佳的纤维蛋白平板制备方案是:纤维蛋白原为 8 mg,琼脂糖为 75 mg,总体积为 11 mL。

图 2 显示,在 50~800 IU·mL<sup>-1</sup> 浓度范围内,尿激酶活力单位与透明圈的面积呈线性关系。

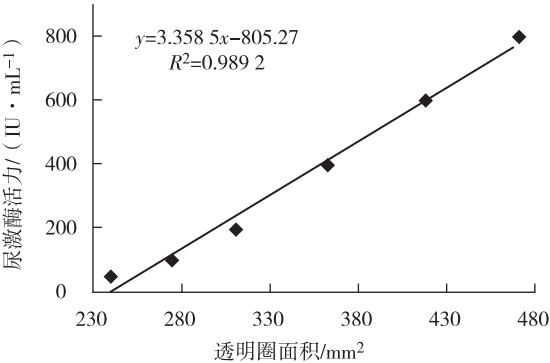


图 2 尿激酶活性标准曲线

2.1.2 纤维蛋白平板法的线性及精密度 通过对样品稀释后的相对浓度与透明圈面积的关系作图,发现各浓度与相应的透明圈面积呈良好的线性关系,如图 3 所示。

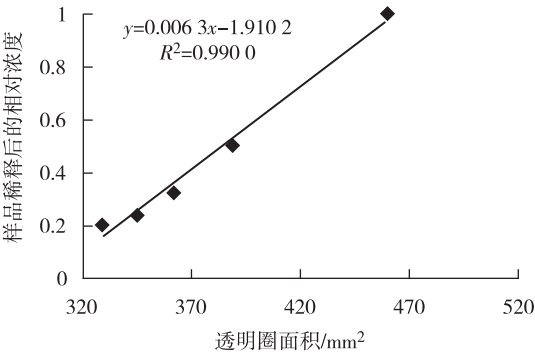


图 3 样品溶液稀释后的相对浓度与透明圈之间的关系

各浓度梯度的样品溶液在日内和日间分别重复 3 次测定,其结果如表 1。从表 1 结果可以看出,批间 CV 值较小,均小于 4%;且随着样品溶液相对浓度的增加,CV 值也明显降低。因此,该方法具有较高的精密度。该法在样品相对浓度低时,其变 CV 值较高的原因是由于样品溶液形成的透明圈的边界较模糊容易引起测量误差,且低浓度的样品形成的透明圈较小,该误差对测定结果的影响也就很明显。因此,在使用该法测量样品活性时,应尽量避免样品溶液的浓度过低。

表 1 纤维蛋白平板法的日内和日间精密度分析

| 样品溶液<br>相对浓度 | 日内                  |      | 日间                  |      |
|--------------|---------------------|------|---------------------|------|
|              | 透明圈面积               | 变异系数 | 透明圈面积               | 变异系数 |
|              | 平均值/mm <sup>2</sup> | CV/% | 平均值/mm <sup>2</sup> | CV/% |
| 1/6 样品原液     | 257.2               | 3.82 | 271.6               | 3.24 |
| 1/4 样品原液     | 292.4               | 3.73 | 292.4               | 3.73 |
| 1/3 样品原液     | 311.4               | 1.67 | 310.3               | 3.10 |
| 1/2 样品原液     | 344.1               | 1.92 | 342.9               | 2.96 |
| 样品原液         | 460.1               | 0.91 | 452.9               | 1.64 |

2.2 四肽底物法

2.2.1 吸光值标准曲线 不同浓度的对硝基苯胺与其相应的吸光值的关系如图 4 所示。对硝基苯胺在 0.03~0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的浓度范围内,其吸光值与相对应的浓度呈线性关系。

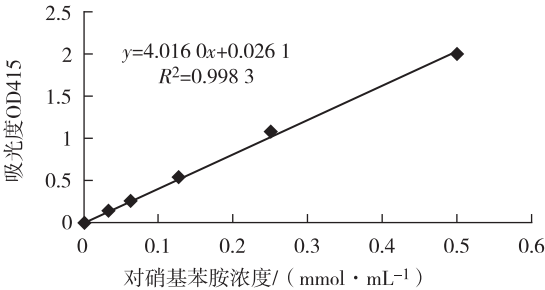


图 4 对硝基苯胺溶液吸光值的标准曲线

2.2.2 四肽底物法的线性及精密度 以样溶液的浓度与相应的酶促反应速度作图结果如图 5 所示。由图 5 可知,样品溶液的浓度与相应酶促的速度呈线性关系。通过 SPSS 进行回归,其显著性概率小于 1%,具有极显著的回归关系。

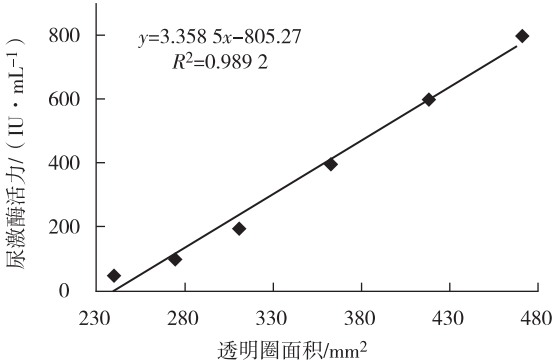


图 5 样品溶液浓度与反应速度的关系

将样品的各浓度分别在日内和日间各进行 3 次重复实验测定,其结果见表 2。通过对数据进行分析,在日内和日间进行 3 次实验,其 CV 值均小于 6%,因此,该方法具有较高的精密度,符合样品测定要求,且随着样品浓度的升高,其 CV 值明显降低。

表 2 四肽底物法的日内和日间精密度分析

| 样品溶液<br>相对浓度 | 日内                                 |            | 日间                                 |            |
|--------------|------------------------------------|------------|------------------------------------|------------|
|              | 反应速度                               | 变异         | 反应速度                               | 变异         |
|              | 平均值/<br>(mOD · min <sup>-1</sup> ) | 系数<br>CV/% | 平均值/<br>(mOD · min <sup>-1</sup> ) | 系数<br>CV/% |
| 1/6 样品原液     | 255                                | 6.09       | 264                                | 5.46       |
| 1/4 样品原液     | 286                                | 4.25       | 290                                | 4.19       |
| 1/3 样品原液     | 317                                | 2.69       | 314                                | 3.97       |
| 1/2 样品原液     | 387                                | 2.11       | 394                                | 2.27       |
| 样品原液         | 548                                | 1.67       | 552                                | 2.67       |

2.3 纤维蛋白平板法与四肽底物法测定值之间的相关性

图 6 显示,在样品溶液相同浓度梯度下,将两种方法测得的结果进行相关性统计分析,其结果呈显著的正相关关系( $p<0.05$ ),因此,四肽底物法也可以用来测定溶栓酶的纤溶活性,两种方法之间的关系如图 6 中的方程所示。

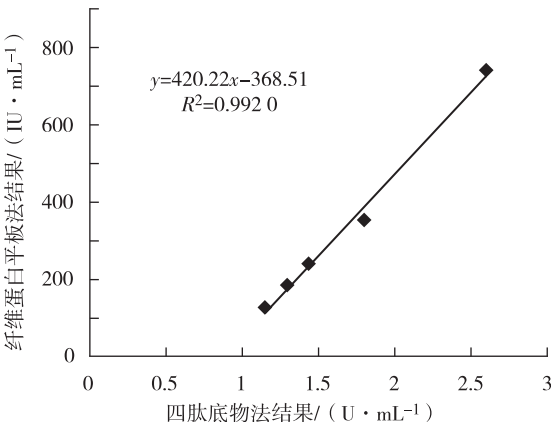


图 6 纤维蛋白平板法和四肽底物法测定结果的关系

3 讨论与结论

纳豆激酶在中国具有广阔的开发前景,它所具有的独特优点使之很有可能成为一种预防和治疗血栓及栓塞性疾病的理想药物,具有潜在的药物开发价值。国内外学者已相继从传统的发酵食品中筛选出多株产溶栓酶菌株<sup>[4-6]</sup>。由于高效溶栓菌株筛选的工作量很大,而溶栓酶活性检测是高效菌株筛选和药物开发的一个非常重要的环节;因此,溶栓酶的活性检测备受关注。目前纳豆激酶活性的测定大多从测定溶栓作用入手,如纤维蛋白平板法<sup>[8]</sup>、纤维蛋白块溶解时间法<sup>[9]</sup>等,通过参考尿激酶标准品来定出活性。这些方法直观,但测定值受温度的影响较大,难以进行大批量样品的高通量筛选。四肽底物

法则可进行高通量筛选,且实验操作简便、快速。但由于该法并非直接测定溶栓活性,而是测定待测酶的酰胺水解活性,因而测定结果是否可代表纳豆激酶的溶栓作用一直受到质疑。

本研究通过优化纤维蛋白平板法并与四肽底物法对溶栓酶样品的活性进行检测,从线性和精密度两个方面对两种方法进行了比较,并分析了两种方法测定结果间的相关性。结果显示,纤维蛋白平板法和四肽底物法分别在 50~800 IU · mL<sup>-1</sup> 和 0.03~2.60 U · mL<sup>-1</sup> 范围内具有良好的线性关系。两方法测定所得结果间具有显著的正相关关系( $p<0.05$ ),二者关系为:纤维蛋白平板法测定值(单位:IU)=420.22 四肽底物法测定值(单位:U)-368.51, $R^2=0.9920$ 。由此本文认为,四肽底物法可适用于溶栓酶菌株的高通量筛选。

参考文献:

[1] Kim W,Choi K,Kim Y,et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus sp.* strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang[J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(7):2482-2488.

[2] 付利,杨志兴. 纳豆激酶的研究与应用[J]. 生物工程进展,1995,15(54):6-49.

[3] Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochem Biophys Res Commun,1993,197(3):1340-1347.

[4] Kim S H, Choi N S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus sp.* strain DJ-4 screened from Doen-Jang[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2000,64(8):1722-1725.

[5] Peng Y,Huang, Q,Zhang, R H,et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food [J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,2003,134(1):45-52.

[6] Zhang R H, Xiao L, Peng Y, Gene expression and characteristics of a novelfibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) in *Escherichia coli* [J]. Lettersin Applied Microbiology, 2005,41:190-195.

[7] Choi N S, Chang K T, Maeng P J. Cloning, expression, and fibrin (ogen) olytic properties of a subtilisin DJ-4 gene from *Bacillus sp.* DJ-4 [J]. FEMS Microbiology Letters,2004,236:325-331.

[8] 李江伟,冉国侠,陈新梅. 豆豉溶栓酶的分离纯化及其体

- 外溶栓作用[J]. 中国生化药物杂志, 1999, 20(3): 148-150.
- [9] 须见洋行, 中岛伸佳, 田谷直俊. 血栓溶解酵素ナシトウキナ活性測定法[J]. J Brew Soc Japan, 1993, 88(6): 482-486.
- [10] 王怡鑫, 尹宗宁, 张霞. 纳豆激酶体外活性测定及影响因素考察[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(3): 168-171.
- [11] 陈颖萍, 李延辉, 李瑞芬. 酪蛋白为底物测定豆豉溶栓酶活性的实验研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21(6): 924-925.
- [12] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto. Atypical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia, 1987, 43(10): 1110-1111.
- [13] Yuki Y, Nakagawa T, Fujita M, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for natto[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(2): 366-370.
- [14] Hara T, Tadokoro Y, Satoyama T. A simple, easy and routine assay of fibrinolytic enzyme activity[J]. Jpn Sol Food Sci Tech, 1996, 43(2): 172-175.
- [15] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys, 1952, 40: 346-351.
- [16] 杨明俊, 杨晓彤, 冯慧琴, 等. 两种纳豆激酶活性测定方法对比及相关性分析[J]. 食品研究与开发, 2009, 29(2): 137-138.
- [17] 齐香君, 桂丽. 纳豆激酶活性测定的方法学研究[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(10): 769-771.

## Comparison between Methods of Detecting Thrombolytic Enzyme Activity in Chinese Traditional Fermented Food

SHAO Rong-jun, CHEN Bin, HAO You-jin, HE Zheng-bo

(Chongqing Engineering Research Centre of Bioactive Substance, Chongqing Normal University,  
Chongqing 400047, China)

**Abstract:** To seek a convenient, fast and accurate method for detecting fibrinolytic activity in Chinese traditional fermented food, the improved fibrin plate method and tetra-peptide substrate method were evaluated and compared between the linearity and the precision, and their results' correspondence was also investigated. The results showed that the activity linear ranges were  $50 \sim 800 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$  for fibrin plate method and  $0.03 \sim 2.60 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  for tetra-peptide substrate method respectively, while both CVs were less than 6% in within-day and day-to-day tests. Therefore, the fibrin plate method and the tetra-peptide substrate method are both applicable for detecting fibrinolytic activity in Chinese traditional fermented food. The fibrin plate method can directly reflect fibrinolytic activity in Chinese traditional fermented food. The tetra-peptide substrate method was a convenient, economic, fast, sensitive and suitable approach for high-throughput screening of bacterial strains in Chinese traditional fermented food showing thrombolytic activity.

**Key words:** thrombolytic enzyme; fibrin plate method; tetra-peptide substrate method

(责任编辑 方 兴)