

# 读书汇报

穆广亚2016. 11. 26



# Expression, Purification, and Characterization of a Recombined Fibrinolytic Enzyme from Endophytic *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 in *Escherichia coli*

Fengxia Lv, Chong Zhang, Fangfang Guo, Yingjian Lu, Xiaomei Bie, Hui Qian, and Zhaoxin Lu

Received March 28, 2014; revised May 17, 2014; accepted July 7, 2014; published online February 28, 2015

© KoSFoST and Springer 2015

当前位置: [首页](#) > [师资力量](#) > [吕凤霞](#)

姓名: 吕凤霞

学历: 博士

职称: 教授

职务:

部门: 生物工程

邮件: [lufengxia@njau.edu.cn](mailto:lufengxia@njau.edu.cn)

办公电话: 025-84395963

办公地址: 食品院426

研究方向: 食品微生物与生物技术、食品酶工程

暂无图片

南京农业大学食品科技学院

## 承担科研项目：

- (1) 国家自然科学基金：鱼腥藻**脂肪氧合酶**催化机制及其分子改造研究（主持，编号31671800，在研）
- (2) 国家科技支撑计划-子课题：水产品肉类绿色化学保鲜剂的研发(主持，编号2015BAD16B04，在研)
- (3) 国家自然科学基金：鱼腥藻**脂肪氧合酶**热稳定性提高及其分子机理研究（主持，编号31470095，在研）
- (4) 江苏省科技支撑计划：新型面粉品质改良酶制剂**脂肪氧合酶**生产关键技术及其应用（主持，编号BE2011390，在研）
- (5) 国家自然科学基金：重组鱼腥藻**脂肪氧合酶**的面粉强筋机理研究（主持，编号31071605，已结题）
- (6) 横向课题：**脂肪氧合酶**生产关键技术及其应用（主持，2012-2015，已结题）
- (7) 苏州市科技支撑计划：新型重组**脂肪氧合酶**改良面粉品质的技术研究（主持，编号SN201105，已结题）
- (8) 江苏省科技支撑计划：**脂肪酶**催化猪油合成抗坏血酸脂肪酸酯关键技术的研究（主持，编号BE2008308，已结题）
- (9) 国家“863”子课题：生物酶法食品添加剂和配料高效安全制造（主持，编号2007AA100401，已结题）
- (10) 国家科技部“十二五”项目：食品防腐剂生物制造及食品安全控制（主要参加人员，编号2011BAD23B05，已结题）
- (11) 国家自然科学基金：枯草杆菌surfactin合成的分子调控机理研究（主要参加人员，编号30871753，已结题）
- (12) 国家“863”项目：高效广谱食品生物防腐和抑菌剂生产关键技术（主要参加人员，编号2006AA10Z346，已结题）

[4]Lv Fengxia, Zhang Chong, Fangfang Guo, Bie Xiaomei, Haizhen Zhao, Lu Zhaoxin\*. Expression, purification, and characterization of a recombinant fibrinolytic enzyme from endophytic *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 in *Escherichia coli* Food Science and Biotechnology, 2015, 24(1):125-131(SCI)

[9]Fengxia Lu, Zhaoxin Lu, Xiaomei Bie, Zhengying Yao, Yufeng Wang, Yaping Lu and Yao Guo. Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. Thrombosis Research , 2010, 126(5): 349-355(SCI)

**内生细菌多粘类芽孢杆菌EJS-3产生的新抗凝剂和纤维蛋白溶解酶的纯化和表征**

**来自无花果曲霉AF-98的木聚糖纯化和表征**

[10]Lu Fengxia, Lu Mei, Lu Zhaoxin, Bie Xiaomei, Zhao Haizhen, WangYi. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. Bioresource Technology, 2008, 99 (13):5938-5941 (SCI)

[11]Fengxia Lu, Lijun Sun, Zhaoxin Lu, Xiaomei Bie, Yaowei Fang, Shu Liu. Isolation and Identification of an endophytic Strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes. Current Microbiology, 2007, 54:435-439 (SCI)

**分离和鉴定内生菌株EJS-3产生新的纤维蛋白溶解酶**

背景

01

方法

02

结果

03

# 大纲

Contents

背景

01  
part

01

心血管疾病（CVD）是全世界死因之首

02

CVD主因是动脉中纤维蛋白聚集形成血管内血栓

03

血栓溶解剂已广泛用于治疗血栓形成

04

纤维蛋白溶解酶被认为是治疗血栓形成的重要溶栓剂



中药名称	太子参	属	孩儿参属
别名	孩儿参、童参、双批七、四叶参、米参	种	孩儿参
界	植物界	分布区域	辽宁、内蒙古、河北、陕西、山东、江苏、安徽、浙江、江西、河南、湖北、湖南、四川
门	被子植物门	采收时间	夏季茎叶大部分枯萎时采挖
纲	双子叶植物纲	用量	9~30g
目	中央种子目	贮藏	置通风干燥处，防潮，防蛀
科	石竹科		

01

多粘芽孢杆菌  
EJS-3是从太子参根部分离出的内生菌。

02

EJS-3具有抗凝血和纤维蛋白溶解活性。

03

野生菌株纤维蛋白酶活性较低。



方法

02  
part

# 技术路线



## 📌 克隆PPFE-I基因

提取多粘芽孢杆菌EJS-3的DNA

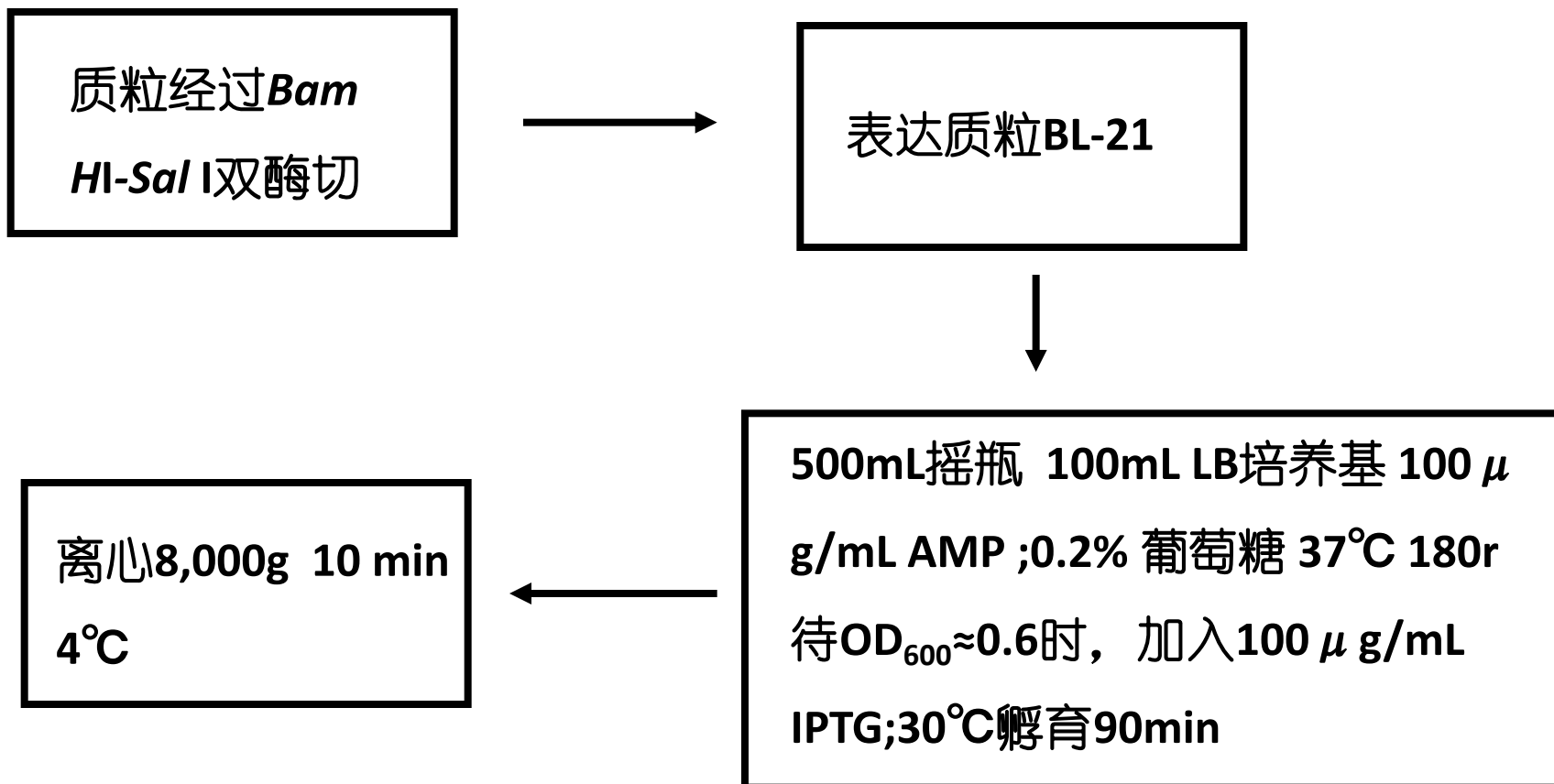
Genbank查询，根据多粘类芽孢杆菌（Genbank登录号D00861.1）设计引物P1&P2

PCR扩增

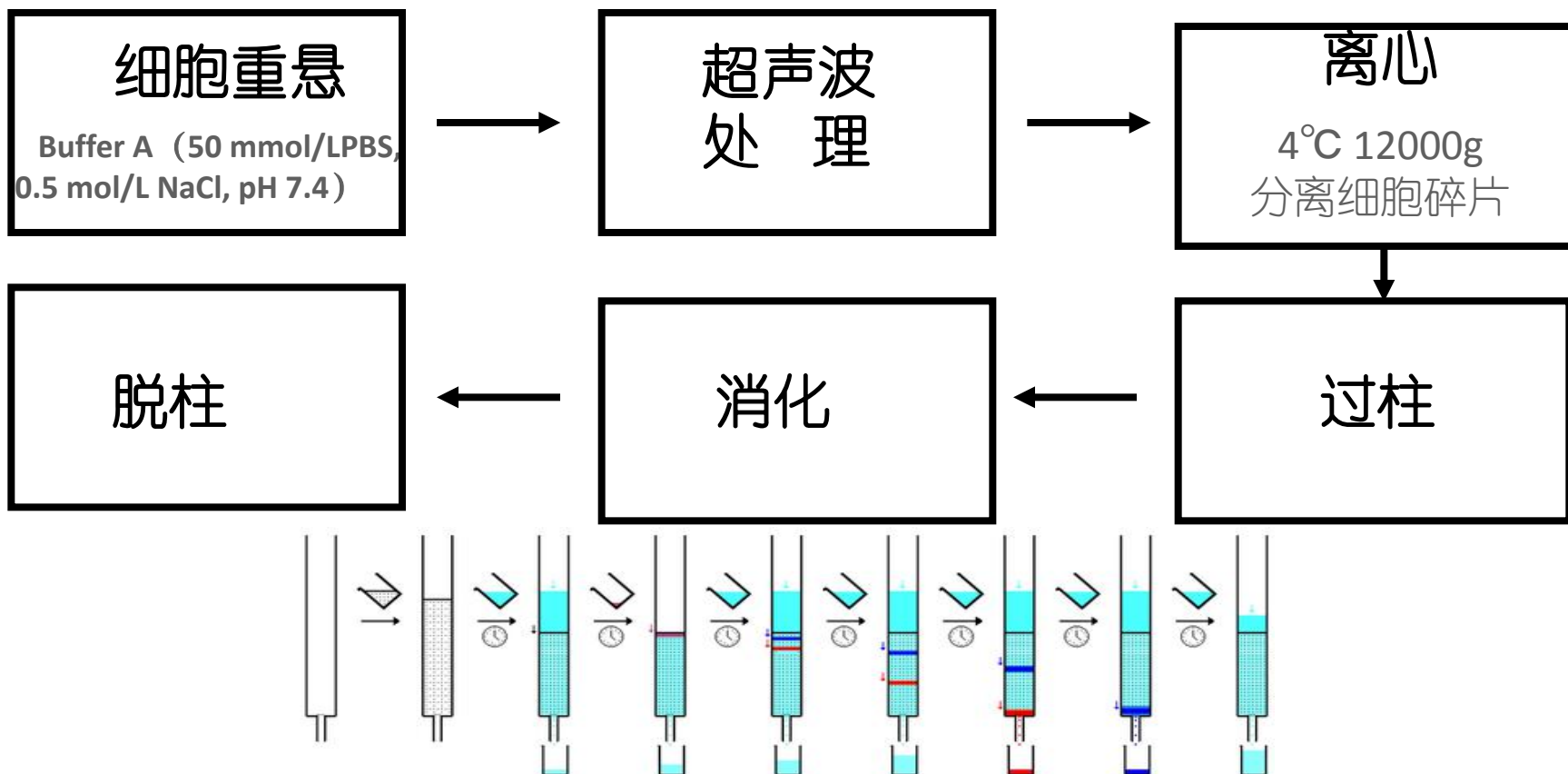
P1:CGCGGATCCATGAT  
TAAAGTATGGTTTTTC  
P2:CGGACTAGTTTAGC  
CTACAGCGTCAAAAG

扩增产物连接到pMD19-T载体中，转化到大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中，测序。

## 📌 重组酶的异源表达



## 📌 重组酶rPPFE-I的纯化



<https://www.zhihu.com/question/3224319>

## 📌 重组酶rPPFE-I的表征

表  
征

### 1、温度

最适温度：基于在25-60°C的温度下孵育18小时

热稳定性：30、37、40、50 & 60 °C孵育150min

### 2、pH

最适pH：在37°C下在4.0-11.0的pH范围内

pH稳定性：37°C下用不同缓冲液孵育24小时

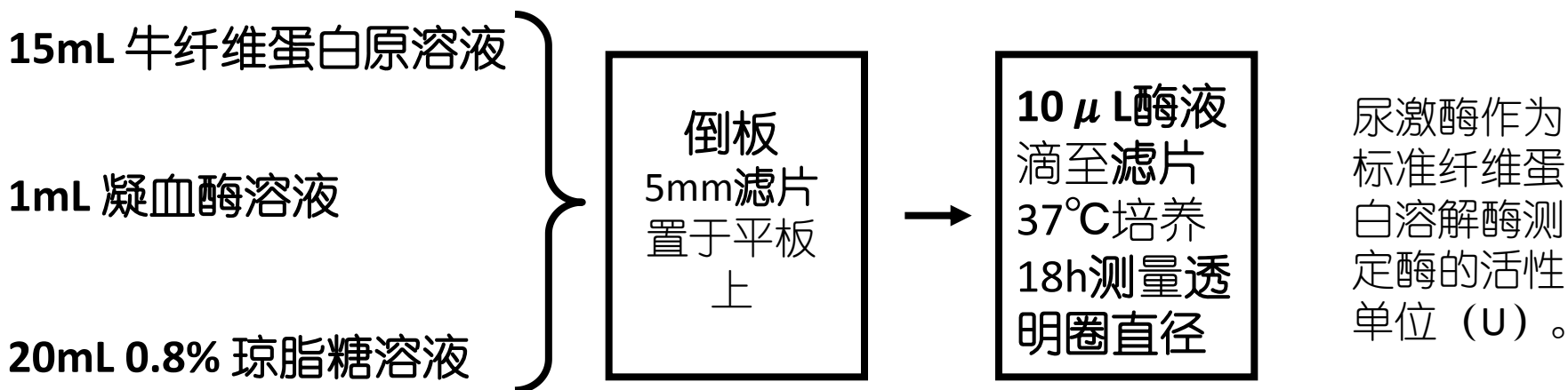
### 3、金属离子 和抑制剂

5mM六种不同金属离子37°C孵育6h

测相对酶活，未添加金属离子和抑制剂的酶活定为100%

使用四种抑制剂37°C温育30min测定相对酶活

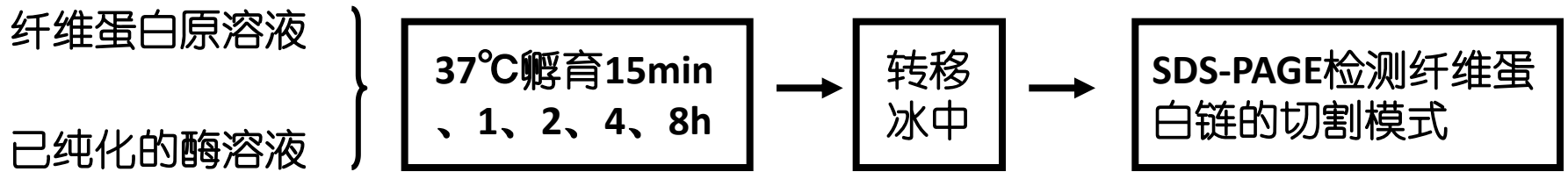
## 📌 纤维蛋白板法测酶活和蛋白浓度测定



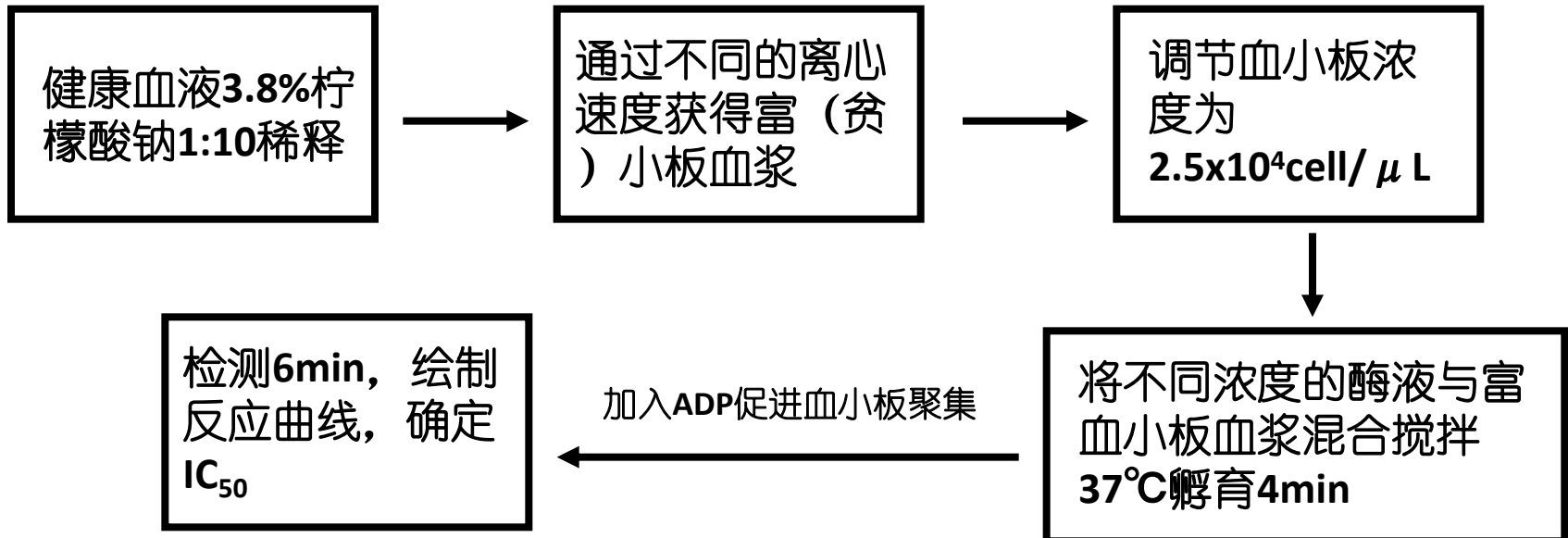
### 蛋白浓度的测定：

使用牛血清白蛋白作为标准品作对照，超微量分光光度计于 $A_{280}$ 处的吸光度来测定蛋白质浓度。

## 🔥 纤维蛋白酶活性测定



## 🔥 血小板聚集试验





结果

03  
part

01

使用P1和P2对多粘芽孢杆菌ESJ-3 DNA进行PCR得到1800bp片段。

02

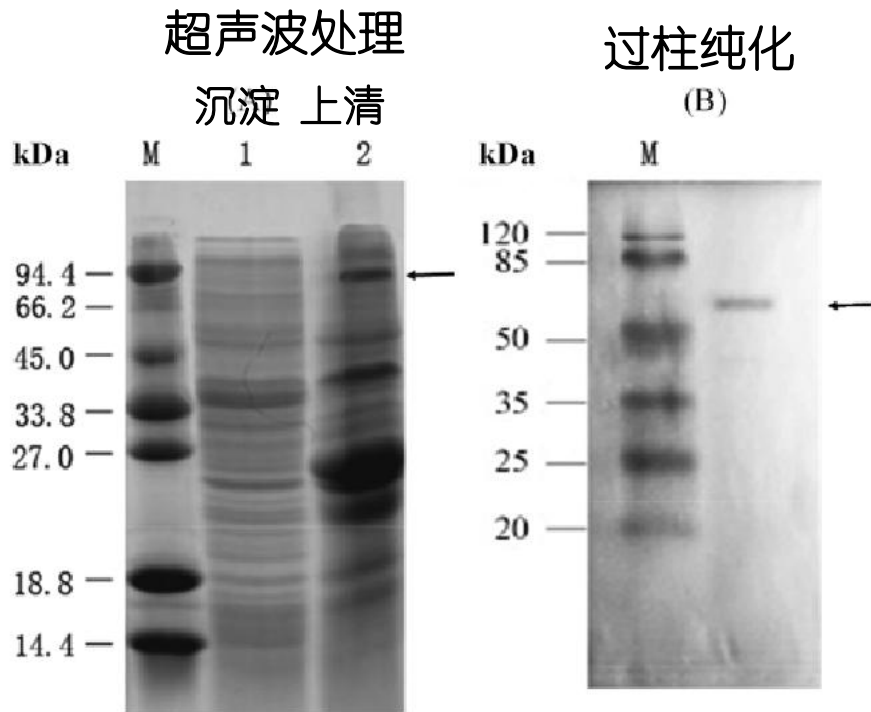
PCR产物克隆到pMD19-T，使用Bam HI和Sal I进行验证，测序。

03

测序结果表明片段长度为1770bp，编码590个氨基酸。

04

多粘芽孢杆菌纤维蛋白酶命名为PPFE-I，编码基因被指定为PPFE-*i*。



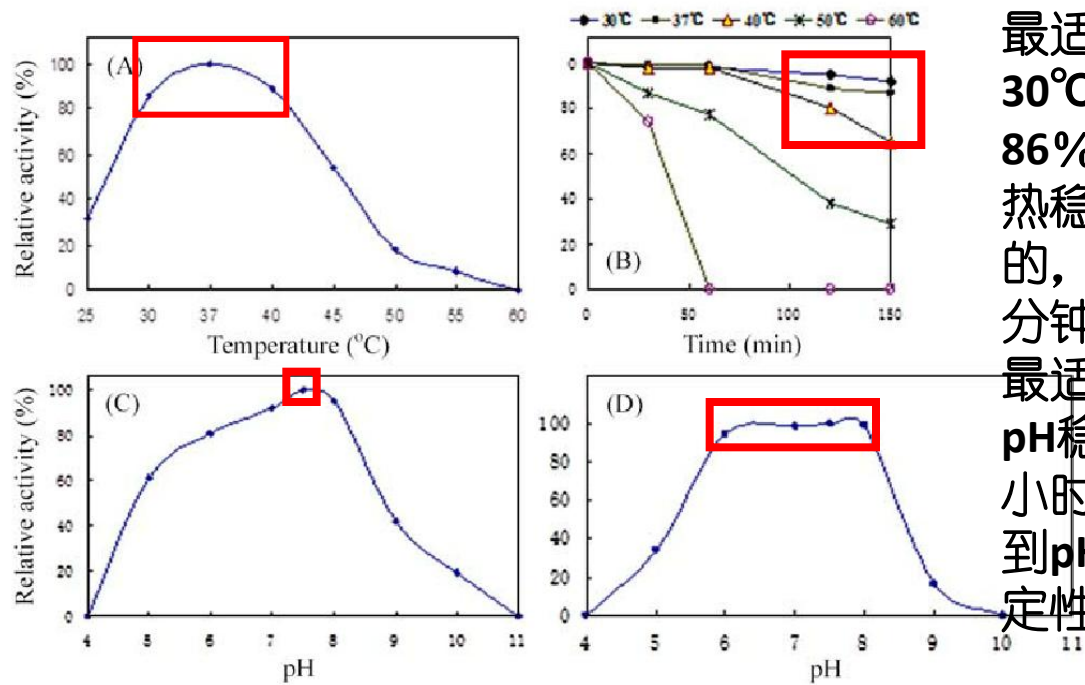
**Fig. 1. (A) SDS-PAGE analysis of the expression of rPPFE-I in *E. coli* BL21 (DE3) and (B) Purification of rPPFE-I using Ni affinity chromatography and sephadex G-100 gel-filtration. M, Protein Mw marker; line 1, precipitate after sonication and centrifugation of *E. coli* BL21 (DE3)/pET-DsbA-PPFE-I; line 2, Supernatant after sonication and centrifugation of *E. coli* BL21(DE3)/pET-DsbA-PPFE-I**

图1A 从SDS-PAGE估计的分子量为88kDa。显示靶蛋白存在于上清液中，表明在大肠杆菌中表达的靶蛋白是可溶的。

图1B SDS-PAGE分子量为63kDa。来自内生细菌多粘类芽孢杆菌EJS-3的纤维蛋白溶解酶PPFE-I显示出纤维蛋白溶解活性。rPPFE-I的成功表达和纯化。

**Table 1. Summary of the purification of rPPFE-I**

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specify activity U/mg	Degree of Purification (x)	Enzyme yield (%)
Culture supernatant	12,359.6	206.0	60.0	1	100
Ni affinity of chromatography	5,592.6	5.9	947.9	15.8	45.2
Sephadex G-100	4,224.0	2.1	2,011.4	33.5	34.2



**最适温度：**最适温度为**37°C**，在**30°C**和**40°C**下的相对酶活分别为**86%**和**89%**  
**热稳定性：**在**30-40°C**下是稳定的，并且在**50**和**60°C**下孵育**150**分钟后**31**和**0%**的相对活性。  
**最适pH：**酶的最适pH为**7.5**  
**pH稳定性：**酶在**37°C**下孵育**24**小时，**pH6.0-8.0**较为稳定，但到**pH 6.0**以下和**pH 8.0**以上酶稳定性突然降低。

**Fig. 2. The enzymatic properties of rPPFE-I.** (A) The effect of temperature on the activity of rPPFE-I (B) The effect of temperature on the stability of rPPFE-I (C) The effect of pH on the activity of rPPFE-I (D) The effect of pH on the stability of rPPFE-I

**Table 2. Effect of metal ions and protease inhibitors on the fibrinolytic activity of rPPFE-I<sup>1)</sup>**

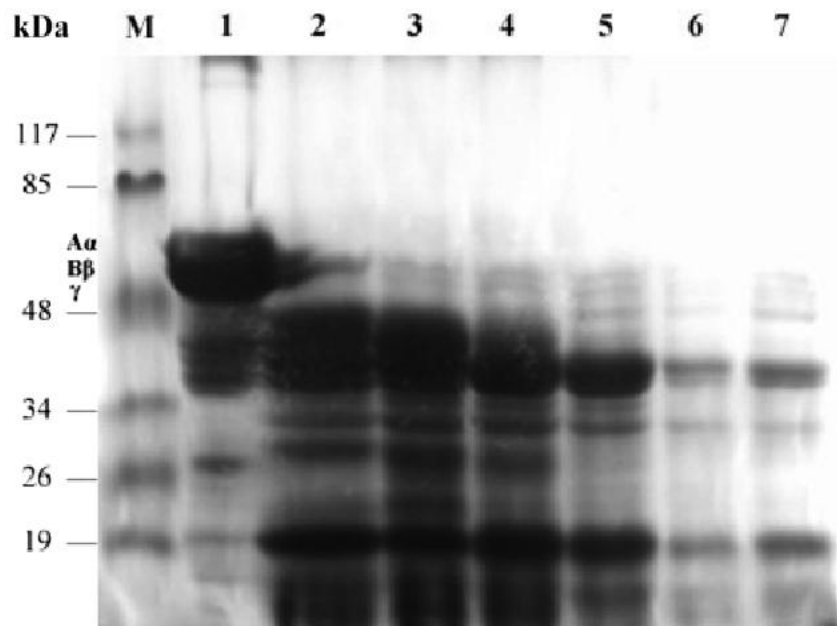
Chemicals	Concentration (mmol/L)	Relative activity (%)
Control	-	100 <sup>b</sup>
Ca <sup>2+</sup>	5	83.6±3.1 <sup>c</sup>
Zn <sup>2+</sup>	5	112.5±2.3 <sup>a</sup>
Cu <sup>2+</sup>	5	71.0±0.3 <sup>d</sup>
Mg <sup>2+</sup>	5	113.8±3.5 <sup>a</sup>
Mn <sup>2+</sup>	5	95.2±3.2 <sup>b</sup>
Fe <sup>2+</sup>	5	110.2±1.6 <sup>a</sup>
EDTA	1	76.8±0.5 <sup>d</sup>
PMSE 丝氨酸蛋白酶抑制剂		ND <sup>2)</sup>
DTT	1	94.9±1.9 <sup>b</sup>
Pepstatin A 胃蛋白酶抑制剂		92.9±1.1 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>*p*<0.05

<sup>2)</sup>ND, not detected

金属离子对rPPFE-1的纤维蛋白酶酶活影响：在不同金属离子在37°C下孵育6小时后的相对活性测定来研究。加入Zn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和Fe<sup>2+</sup> (*p* < 0.05) 增强酶活性，Ca<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>离子抑制酶活性。

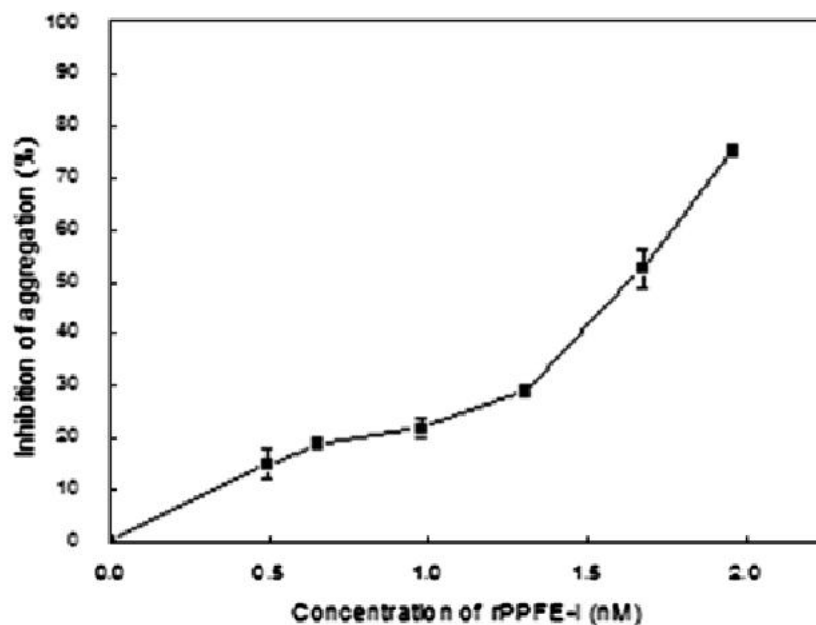
来自芽孢杆菌KA38的新型纤维蛋白溶解酶。在发酵中，其活性由Zn<sup>2+</sup>增强，被Ca<sup>2+</sup>抑制，表明rPPFE-1与芽孢杆菌KA38的酶活性位点类似。通过抑制剂实验rPPFE-1是丝氨酸蛋白酶。



**Fig. 3. Analysis of the pattern of fibrinogenolysis of rPPFE-I.** Lane 1: Fibrinogen control without rPPFE-I after 0 min of incubation; lanes 2-7: Fibrinogenolytic products of rPPFE-I after 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 8 h of incubation, respectively.

### SDS-PAGE分析rPPFE-1的纤维蛋白原分解活性

。rPPFE-I首先切割纤维蛋白原的A $\alpha$ 链，随后快速切割B $\beta$ 链，缓慢水解 $\gamma$ 链。然而，所有链在用rPPFE-I孵育4小时后完全水解。因此，rPPFE-1具有与天然酶的活性相当的酶活性，其基于纤维蛋白原A $\alpha$ ，B $\beta$ 和 $\gamma$ 链的快速水解显示很强的纤维蛋白原分解活性。



**Fig. 4. Effects of rPPFE-I on inhibition of human platelet aggregation.** The extent of the inhibition of platelet aggregation was assessed based on comparison with the maximal aggregation induced by a control dose of ADP. The IC<sub>50</sub> value of rPPFE-I determined from the curve was 1.54 nM.

rPPFE-1对人血小板聚集抑制的作用。基于ADP诱导的最大聚集的比较来评估血小板聚集的抑制程度。由曲线确定的rPPFE-1的IC<sub>50</sub>值为1.54nM。

# 阅读思考

- 📌 1. 为什么读这篇文章
- 📌 一方面，研究产酶内生菌；另一方面，我近期所做实验也包括基因克隆，希望能通过这篇文章学习并且查找我实验中的不足之处。
- 📌 2. 读了这篇文章的收获
- 📌 在阅读过程中遇到了一些之前没接触过的实验方法，进行查阅，这个过程中增长了自己的知识储备。

*Thank you*

@穆广亚