

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/68

C07K 1/18



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02153848.4

[43] 公开日 2004年6月16日

[11] 公开号 CN 1504568A

[22] 申请日 2002.12.5 [21] 申请号 02153848.4

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

[72] 发明人 王锋 望超 李梅 张季平
桂璐璐 常文瑞

[74] 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司

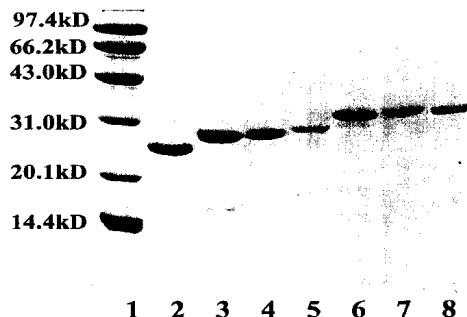
代理人 张爱群

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

[54] 发明名称 蚯蚓纤溶酶多种组分及其分离、纯化、制备工艺

[57] 摘要

本发明公开了蚯蚓纤溶酶多种组分及其分离、纯化、制备工艺，该工艺包括(1)粗分离：蚓激酶粗品过阴离子交换层析柱，得到三个活性峰，D1，D2，D3；(2)精细纯化：D1过阴离子交换层析柱，得到三个活性峰，每个活性峰分别过疏水层析柱得到纯品：EFE-f，EFE-e，EFE-d；D2过疏水层析柱，收集活性峰过阴离子交换层析柱纯化，得到活性组分EFF-a纯品；D3过疏水层析柱得到两个活性峰：D3H1、D3H2，将D3H1过阴离子交换层析柱纯化，得到活性组分EFE-b和EFE-c纯品；将D3H2过疏水层析柱收集活性峰，得到活性组分EFE-g的纯品。本发明的优点是：能系统地获得纯度和活性都较高的蚯蚓纤溶酶的七个组分，可满足实验室规模的制备，经适当放大可适应生产规模的制备。



1、蚯蚓纤溶酶多种组分的分离、纯化、制备工艺，其特征在于该工艺包括如下步骤：

(1) 粗分离：溶解蚓激酶粗品，用阴离子交换层析柱进行粗分离，得到三个活性峰，D1，
5 D2，D3；

(2) 精细纯化：

D1 过阴离子交换层析柱，得到三个活性峰：DIRQ1，DIRQ2，DIRQ3，每个活性峰分
别过疏水层析柱得到纯品：DIRQ1H 即 EFE-f，DIRQ2H 即 EFE-e，DIRQ3H 即 EFE-d；

D2 过疏水层析柱，收集活性峰过阴离子交换层析柱纯化，得到一活性组分纯品，即
10 EFE-a；

D3 过疏水层析柱得到两个活性峰：D3H1、D3H2，将 D3H1 过阴离子交换层析柱纯化，
得到两个活性组分纯品：D3H1M1 即 EFE-b，D3H1M2 即 EFE-c；将 D3H2 过疏水层析柱收
集活性峰，得到一活性组分的纯品 D3H2P1 即 EFE-g。

2、根据权利要求 1 所述的工艺，其特征在于：所述的阴离子交换层析柱选自 DEAE 柱、
15 RESOURCE Q 柱、SOURCE 15 Q 柱和 Mono Q 柱。

3、根据权利要求 1 所述的工艺，其特征在于：所述的疏水层析柱选自 RESOURCE ISO
柱、RESOURCE PHE 柱和 SOURCE 15 PHE 柱。

4、根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的工艺制备的蚯蚓纤溶酶七种组分。

5、根据权利要求 4 所述的七种组分，其特征在于它们分别具有下列分子量、N 末端序
20 列和等电点值：

(1) EFE-a, 24663, VIGGTNASPGEFPPWQLQ, 3.46;

(2) EFE-b, 29515, IVGGIEARPYEFPPQVSVR, 3.50;

(3) EFE-c, 29690, IVGGIEARPYEFPPQVSVR, 3.50;

(4) EFE-g, 29595, IVGGIEARPYEFPPQVSVR, 3.46;

25 (5) EFE-d, 24201, IIGGSNASPGEFPPWQL, 3.68;

(6) EFE-e, 24170, IIGGSNASPGEFPPWQL, 3.62;

(7) EFE-f, 23028, VVGGSDDTTKGQYP, 3.94.

蚯蚓纤溶酶多种组分及其分离、纯化、制备工艺

5 技术领域

本发明公开蚯蚓纤溶酶多种组分及其分离、纯化、制备工艺，属于生物化学制药技术领域。

背景技术

10 自从1983年日本Mihara等发现蚯蚓体内存在强烈溶解血纤维蛋白及血栓作用的蛋白酶以来 (Mihara H, Sumi H, Akazawa T, et al. Fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm .Thromb Haemostas, 1983, 50:258-263.), 蚯蚓纤溶酶在国内外得到了广泛的研究, 并作为新型溶栓药物被应用于临床, 中科院生物物理所赤子爱胜蚓 (*Eisenia Fetida*) 为原料已制成用于预防和治疗血栓病的口服胶囊。该胶囊的主要成分(蚓激酶粗品)中含有多种活性组分。但是, 到目前为止, 蚯蚓纤溶酶究竟有多少种组分, 哪种组分具有纤溶酶原激
15 种活性组分。但是, 到目前为止, 蚯蚓纤溶酶究竟有多少种组分, 哪种组分具有纤溶酶原激
化物活性等重要问题并未得到详细的研究, 各种组分的生化性质国内外的报道也并不一致
(从玉文, 刘耀明, 陈家佩. 蚓激酶的研究进展. 中国生化药物杂志, 2001, 21(3): 159-162.),
除Mihara等1993年比较全面地报道了 *Lumbricus rubellus* 蚯蚓纤溶酶各组分外, 其它关于蚯
蚓纤溶酶的报道都不够系统、深入。这使得对蚯蚓纤溶酶, 特别是我国广泛使用的 *Eisenia*
20 *Fetida* 蚯蚓纤溶酶进行进一步系统、深入的研究成为必要, 包括该酶各组分的生化性质、药
理、药效、毒理实验以及蚯蚓纤溶酶的结构与功能的研究等, 而对于所有这些研究, 制备大
量的蚯蚓纤溶酶各组分的纯品都是首要的前提。

CN1089369C的专利公开了一种蚓激酶粗品的制备方法, 但是目前尚未见关于赤子爱胜蚓
中蚯蚓纤溶酶各组分精确的分子量、N端序列、等电点以及可以规模化地从赤子爱胜蚓中系
25 统地分离、纯化、制备蚯蚓纤溶酶各个组分生产工艺的报道。

发明内容

本发明的目的是提供来自赤子爱胜蚓的蚯蚓纤溶酶七种组分精确的分子量、N端序列和
等电点。

本发明的另一个目的是提供一种以蚓激酶粗品为原料制备蚯蚓纤溶酶各组分纯品的工
30 艺, 且制备工艺可根据需要逐级放大。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

蚯蚓纤溶酶多种组分及其分离、纯化、制备工艺，该工艺包括如下步骤：

- (1) 粗分离：溶解蚓激酶粗品，用阴离子交换层析柱进行粗分离，得到三个活性峰，D1，D2，D3；
- 5 (2) 精细纯化：
- D1 过阴离子交换层析柱，得到三个活性峰：DIRQ1，DIRQ2，DIRQ3，每个活性峰分别过疏水层析柱得到纯品：DIRQ1H 即 EFE-f，DIRQ2H 即 EFE-e，DIRQ3H 即 EFE-d；
- D2 过疏水层析柱，收集活性峰过阴离子交换层析柱纯化，得到一活性组分纯品，即 EFE-a；
- 10 D3 过疏水层析柱得到两个活性峰：D3H1、D3H2，将 D3H1 过阴离子交换层析柱纯化，得到两个活性组分纯品：D3H1M1 即 EFE-b，D3H1M2 即 EFE-c；将 D3H2 过疏水层析柱收集活性峰，得到一活性组分的纯品 D3H2P1 即 EFE-g。

所述的阴离子交换层析柱选自 DEAE 柱、RESOURCE Q 柱、SOURCE 15 Q 柱和 Mono Q 柱。

- 15 所述的疏水层析柱选自 RESOURCE ISO 柱、RESOURCE PHE 柱和 SOURCE 15 PHE 柱。

根据所述的工艺制备的蚯蚓纤溶酶多种组分，它们分别具有下列分子量 (MOLDI-TOF MS 测定值)、N 末端序列和等电点值：

- (1) EFE-a, 24663, VIGGTNASPGEFPWQLQ, 3.46;
- 20 (2) EFE-b, 29515, IVGGIEARPYEFPPQVSVR, 3.50;
- (3) EFE-c, 29690, IVGGIEARPYEFPPQVSVR, 3.50;
- (4) EFE-g, 29595, IVGGIEARPYEFPPQVSVR, 3.46;
- (5) EFE-d, 24201, IIGGSNASPGEFPWQL, 3.68;
- (6) EFE-e, 24170, IIGGSNASPGEFPWQL, 3.62;
- 25 (7) EFE-f, 23028, VVGGSDDTKGQYP, 3.94。

- 本发明的优点是：1. 首次公开了来源于赤子爱胜蚓的蚯蚓纤溶酶 7 种组分的精确分子量、N 端序列、等电点；2. 通过本流程可以系统地制备 7 个组分 EFE-a、EFE-b、EFE-c、EFE-d、EFE-e、EFE-f、EFE-g。3. 通过本流程制备的活性组分纯度较高。每种组分在 15% 的 SDS-PAGE 上均为一条带 (见说明书附图)，高效液相层析呈现一个峰的水平 (EFE-d、
- 30 EFE-e 除外)，在适宜条件下都可以结晶，表明其纯度较高，且处于活性形式。4. 本流程制

备的各组分用纤维平板法测得其纤溶活性从每 mg250 尿激酶活性单位到 800 尿激酶活性单位。5. 本流程可以直接满足实验室规模的制备, 对于生产规模的制备经适当调整相应放大后也可满足。

下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明, 但本发明不受实施例的限制。

5

附图说明

图 1 为本发明纯化组分的 SDS-PAGE 电泳图

具体实施方式

10 实施例 1: 蚯蚓纤溶酶多种组分的分离、提纯、制备工艺

一、材料:

1、蚓激酶粗品, 中科院生物物理所蚯蚓纤溶酶研究组提供。

2、层析柱: HiPrep16/10 DEAE 柱, 阴离子交换层析柱
RESOURCE Q (6ml), 阴离子交换层析柱
15 Mono Q HR5/5, 阴离子交换层析柱
RESOURCE ISO, 疏水层析柱
RESOURCE PHE, 疏水层析柱

以上层析柱均购自 Pharmacia Biotech 公司。

3、溶液: (1) 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5;

20 (2) 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5, 含 1mol/L NaCl;

(3) 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5;

(4) 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5, 含 1 mol/L NaCl;

(5) 0.1mol/L Na-Pi Buffer, pH7.0, 含 3.0 mol/L(NH₄)₂S₀4;

(6) 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0, 含 1.5 mol/L(NH₄)₂S₀4;

25 (7) 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0。

二、方法:

1、样品的准备:

取蚓激酶粗品 5 克, 用 20 mmol/L pH7.5 的 Tris-HCl Buffer 溶解, 配成 50mg/ml 的溶液。

2、层析柱的使用: 以下所用层析柱(均为 Pharmacia Biotech 公司预装柱)的使用均按照层析柱
30 所附说明书进行。

3、粗分离:

采用 HiPrep 16/10 DEAE 柱进行粗分离。每次取上述溶解好的样品 4ml (200mg) 上样。以 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5 为初始缓冲液, 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5, 含 1mol/L NaCl 为洗脱缓冲液进行 NaCl 梯度洗脱, 流速为 3ml/min, 温度为 19°C, 得到三个活性峰, D1, D2, D3。

4、精细纯化:

(1) D1 浓缩后对 50mmol/L NH_4HCO_3 透析, 然后冻干。每次取冻干产物 15mg 溶解在 20 mmol/L pH8.5 的 Tris-HCl Buffer 中, 过 RESOURCE Q (6ml) 柱, 以 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5 为初始缓冲液, 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5, 含 1mol/L NaCl 为洗脱缓冲液进行 NaCl 梯度洗脱, 流速为 3ml/min, 温度为 19°C, 得到三个活性峰: DIRQ1, DIRQ2, DIRQ3;

每个活性峰浓缩、换缓冲液至 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5 后与含有 3.0mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.1mol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 等体积混合, 然后过 RESOURCE ISO 柱, 以 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 含 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为初始缓冲液, 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 为洗脱缓冲液进行 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度洗脱, 流速为 1ml/min, 温度为 23°C, 得到纯品: DIRQ1H (即 EFE-f), DIRQ2H(即 EFE-e), DIRQ3H(即 EFE-d);

(2) D 2 浓缩后对 50mmol/L NH_4HCO_3 透析, 然后冻干。每次取冻干产物 3mg 溶解在 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0, 含 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中过 RESOURCE ISO 柱, 以 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 含 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为初始缓冲液, 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 为洗脱缓冲液进行 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度洗脱, 流速为 1ml/min, 温度为 23°C, 收集活性峰, 浓缩、换缓冲液至 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5 后过 Mono Q HR5/5 纯化, 以 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5 为初始缓冲液, 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5, 含 1mol/L NaCl 为洗脱缓冲液进行 NaCl 梯度洗脱, 流速为 0.5ml/min, 温度为 19°C, 得到一活性组分纯品, 即 EFE-a;

(3) 将 D3 浓缩、换缓冲液至 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5 后 (总体积 80ml) 与含有 3.0mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.1mol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 等体积混合。每次取混合好的样品溶液 1ml, 上 RESOURCE ISO 柱, 初始缓冲液为 50 mmol/L Na-Pi Buffer, 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0, 洗脱缓冲液为 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0, 采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度洗脱, 流速为 1ml/min, 温度为 23°C, 得到两个活性峰: D3H1、D3H2;

将 D3H1 浓缩、换缓冲液至 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5 后过 Mono Q HR5/5 纯化, 以 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5 为初始缓冲液, 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5, 含 1mol/L

NaCl 为洗脱缓冲液进行 NaCl 梯度洗脱, 流速为 0.5ml/min, 温度为 19°C, 得到两个活性组分纯品: D3H1M1(即 EFE-b), D3H1M2(EFE-c);

将 D3H2 浓缩后对 50mmol/L NH_4HCO_3 透析, 然后冻干。每次取冻干产物 3mg 溶解在 50 mmol/L Na-Pi Buffer, 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0 中, 过 RESOURCE PHE, 初始缓冲液为 50 mmol/L Na-Pi Buffer, 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0, 洗脱缓冲液为 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0, 采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度洗脱, 流速为 1ml/min, 温度为 23°C, 收集活性峰, 得到一活性组分的纯品 D3H2P1 (即 EFE-g)。

三、结果:

通过以上流程, 得到各活性组分 EFE-a 10.2mg, EFE-b 7.3mg, EFE-c 11.3mg, EFE-d 14.2mg, EFE-e 8.6mg, EFE-f 5.2mg, EFE-g 8mg。

实施例 2: 蚯蚓纤溶酶多种组分的分离、提纯、制备工艺

一、材料:

- 1、蚓激酶粗品, 购自中国科学院生物物理所百奥公司。
 - 2、层析柱: HiPrep16/10 DEAE 柱, 阴离子交换层析柱, RESOURCE Q (6ml), 阴离子交换层析柱 Mono Q HR5/5, 阴离子交换层析柱 RESOURCE ISO, 疏水层析柱 RESOURCE PHE, 疏水层析柱
- 以上层析柱均购自 Pharmacia Biotech 公司。

- 3、溶液: (1) 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5;
- (2) 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5;
- (3) 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5, 含 1 mol/L NaCl;
- (4) 0.1mol/L Na-Pi Buffer, pH7.0, 含 3.0 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- (5) 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0, 含 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- (6) 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0;

二、方法:

2. 样品的准备:

取蚓激酶粗品 5 克, 用 20 mmol/L pH8.5 的 Tris-HCl Buffer 溶解, 配成 50mg/ml 的溶液。

3. 层析柱的使用: 以下所用层析柱 (均为 Pharmacia Biotech 公司预装柱) 的使用均按照层

析柱所附说明书进行。

4. 粗分离:

采用 HiPrep 16/10 DEAE 柱进行粗分离。每次取上述溶解好的样品 4ml (200mg) 上样。以 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5 为初始缓冲液, 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5, 含 1mol/L NaCl 为洗脱缓冲液进行 NaCl 梯度洗脱, 流速为 3ml/min, 温度为 19°C, 得到三个活性峰, D1, D2, D3。

4. 精细纯化:

(1) D1 浓缩后换缓冲液至 20 mmol/L pH8.5 Tris-HCl Buffer (总体积 26ml), 每次取 750ul, 过 RESOURCE Q (6ml) 柱, 以 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5 为初始缓冲液, 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5, 含 1mol/L NaCl 为洗脱缓冲液进行 NaCl 梯度洗脱, 流速为 3ml/min, 温度为 19°C, 得到三个活性峰: DIRQ1, DIRQ2, DIRQ3;

每个活性峰浓缩、换缓冲液至 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5 后与含有 3.0mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.1mol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 等体积混合, 然后过 RESOURCE ISO 柱, 以 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 含 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为初始缓冲液, 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 为洗脱缓冲液进行 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度洗脱, 流速为 1ml/min, 温度为 23°C, 得到纯品: DIRQ1H (即 EFE-f), DIRQ2H (即 EFE-e), DIRQ3H(即 EFE-d);

(2) 将 D3 浓缩、换缓冲液至 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH7.5 后 (总体积 80ml) 与含有 3.0mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.1mol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 等体积混合。每次取混合好的样品溶液 1ml, 上 RESOURCE ISO 柱, 初始缓冲液为 50 mmol/L Na-Pi Buffer, 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0, 洗脱缓冲液为 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0, 采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度洗脱, 流速为 1ml/min, 温度为 23°C, 得到两个活性峰: D3H1、D3H2;

将 D3H1 浓缩、换缓冲液至 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5 后过 Mono Q HR5/5 纯化, 以 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5 为初始缓冲液, 20 mmol/L Tris-HCl Buffer, pH8.5, 含 1mol/L NaCl 为洗脱缓冲液进行 NaCl 梯度洗脱, 流速为 0.5ml/min, 温度为 19°C, 得到两个活性组分纯品: D3H1M1 (即 EFE-b), D3H1M2 (EFE-c);

将 D3H2 浓缩、换缓冲液至 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 后与含有 3.0mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 0.1mol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0 等体积混合过 RESOURCE PHE, 初始缓冲液为 50 mmol/L Na-Pi Buffer, 1.5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7.0, 洗脱缓冲液为 50 mmol/L Na-Pi Buffer, pH 7.0, 采用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 梯度洗脱, 流速为 1ml/min, 温度为 23°C, 收集活性峰, 得到一活性组分的纯品 D3H2P1 (即 EFE-g)。

三、结果:

通过以上流程,得到各活性组分 EFE-b 6.0mg, EFE-c 9.9mg, EFE-d 25.2mg, EFE-e 6.7mg, EFE-f 2.7mg, EFE-g 10.9mg。

备注:基于实验目的,本实施例未对 EFE-a 进行纯化;如需纯化,其方法同实施例 1。

5

实施例 3: 蚯蚓纤溶酶多种组分的鉴定

1、分子量、N 末端序列和等电点测定

通过以上流程制备的七种组分 (EFE-a、EFE-b、EFE-c、EFE-d、EFE-e、EFE-f、EFE-g) 的精确分子量 (MOLDI-TOF MS 测定值)、N 末端序列和等电点如下:

10

种类	分子量	N端序列	等电点
EFE-a	24663	VIGGTNASPGEFPPWQLQ	3.46
EFE-b	29515	IVGGIEARPYEFPPQVSVR	3.50
EFE-c	29690	IVGGIEARPYEFPPQVSVR	3.50
EFE-g	29595	IVGGIEARPYEFPPQVSVR	3.46
EFE-d	24201	IIGGSNASPGEFPPWQL	3.68
EFE-e	24170	IIGGSNASPGEFPPWQL	3.62
EFE-f	23028	VVGGSDTTKGQYP	3.94

2、纯度测定

按照常规操作进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶浓度 15%,点样量 25ug/孔。结果如图 1 所示,其中 1 为 Marker, 2 为 EFE-f, 3 为 EFE-e, 4 为 EFE-d, 5 为 EFE-a, 6 为 EFE-b, 7 为 EFE-c, 8 为 EFE-g, 每种组分在 15% 的 SDS-PAGE 上均为一条带。

15

对各组分进行高效液相层析,呈现一个峰的水平 (EFE-d、EFE-e 除外),各组分在适宜条件下都可以结晶,表明其纯度较高,且处于活性形式。

3、活性测定

本流程制备的各活性组分用纤维平板法测得其纤溶活性从每 mg250 尿激酶活性单位到 800 尿激酶活性单位。

20

序列表

- <110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 蚯蚓纤溶酶多种组分及其分离、纯化、制备工艺
 5 <130>
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 赤子爱胜蚓 (*Eisenia Fetida*)
- <220>
 15 <221> EFE-a 的N末端序列
 <222> (1)..(17)
 <223> VIGGTNASPGEFPWQLQ
- <400> 1
 20
 Val Ile Gly Gly Thr Asn Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Leu
 1 5 10 15
 Gln
- 25
 <210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 赤子爱胜蚓 (*Eisenia Fetida*)
 30

<220>

<221> EFE-b 的 N 末端序列

<222> (1)..(19)

<223> IVGGIEARPYEFPQVSVR

5

<400> 2

Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg Pro Tyr Glu Phe Pro Pro Gln Val

1 5 10 15

10 Ser Val Arg

<210>` 3

<211> 19

<212> PRT

15 <213> 赤子爱胜蚓 (*Eisenia Fetida*)

<220>

<221> EFE-c 的 N 末端序列

<222> (1)..(19)

20 <223> IVGGIEARPYEFPQVSVR

<400> 3

Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg Pro Tyr Glu Phe Pro Pro Gln Val

25 1 5 10 15

Ser Val Arg

<210> 4

30 <211> 19

<212> PRT

<213> 赤子爱胜蚓 (*Eisenia Fetida*)

<220>

5 <221> EFE-g 的 N 末端序列

<222> (1)..(19)

<223> IVGGIEARPYEFPPQVSVR

<400> 4

10 Ile Val Gly Gly Ile Glu Ala Arg Pro Tyr Glu Phe Pro Pro Gln Val

1 5 10 15

Ser Val Arg

15 <210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 赤子爱胜蚓 (*Eisenia Fetida*)

20 <220>

<221> EFE-d 的 N 末端序列

<222> (1)..(16)

<223> IIGGSNASPGAFPWQL

25 <400> 5

Ile Ile Gly Gly Ser Asn Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Leu

1 5 10 15

<210> 6

30 <211> 16

<212> PRT

<213> 赤子爱胜蚓 (*Eisenia Fetida*)

<220>

5 <221> EFE-e 的 N 末端序列

<222> (1)..(16)

<223> IIGGSNASPGAFPWQL

<400> 6

10 Ile Ile Gly Gly Ser Asn Ala Ser Pro Gly Glu Phe Pro Trp Gln Leu

1 5 10 15

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

15 <213> 赤子爱胜蚓 (*Eisenia Fetida*)

<220>

<221> EFE-f 的 N 末端序列

<222> (1)..(13)

20 <223> VVGGSDDTKGQYP

<400> 7

Val Val Gly Gly Ser Asp Thr Thr Lys Gly Gln Tyr Pro

1 5 10

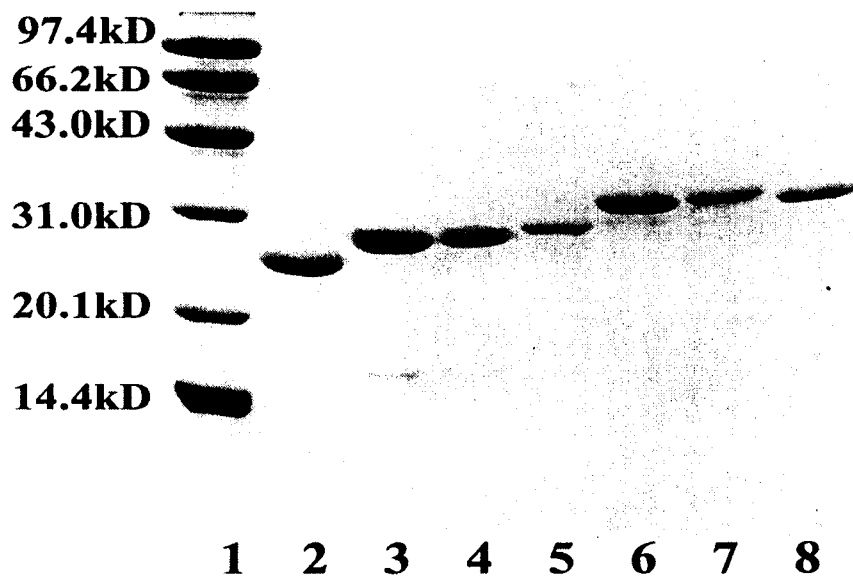


图 1