

根霉 12[#] 发酵产生纤溶酶的酶学性质

Characteristics of a New Fibrinolytic Enzyme Produced from *Rhizopus chinensis* 12[#]

杜连祥¹, 刘晓兰^{1,2*}, 路福平¹, 肖 静², 郑喜群²

DU Lian-Xiang¹, LIU Xiao-Lan^{1,2*}, LU Fu-Ping¹, XIAO Jing² and ZHENG Xi-Qun²

1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222

2. 齐齐哈尔大学生命科学与工程学院, 齐齐哈尔 161006

1. Bioengineering College, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China

2. College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China

摘 要 溶栓疗法是血栓性疾病安全有效的治疗手段, 开发新型纤溶酶具有实际应用意义。分离自南方小酒药的根霉 12[#] 以豆粕和麸皮为原料可产生纤溶酶。已采用盐析、疏水层析、离子交换层析和凝胶层析方法对纤溶酶分离提纯。提纯的纤溶酶比活力 2143u/mg(尿激酶单位), 有直接溶解血栓和激活纤溶酶原的双重溶栓作用, 降解纤维蛋白 α 、 β 和 γ 肽链速度快; 最适作用温度 45℃, 适宜作用 pH 范围 6.8~8.8; 等电聚焦方法测定该酶等电点 8.5 ± 0.1 ; 只分解生色底物 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, 其米氏常数 K_m 为 0.23mmol/L, 酶转换数 K_{cat} 为 $16.36 s^{-1}$; Molish 实验和甲苯胺蓝实验均证明该酶为糖蛋白, 地衣酚-硫酸法测得该酶含糖量 4.70%; EDTA、PMSF、PCMB 对该纤溶酶有抑制作用, 说明活性中心含有巯基、金属和丝氨酸; N 端 12 个氨基酸序列为 NH₂-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly, 与其它生物来源的纤溶酶相比较没有同源性。根霉 12[#] 产生的纤溶酶为新型纤溶酶, 有希望开发成溶栓药物。

关键词 根霉, 发酵, 纤溶酶, 酶学性质

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0323-05

Abstract As a therapeutic agent in thrombosis the fibrinolytic enzymes are of interest and the search for a new enzyme continues. A novel fibrinolytic enzyme was produced from *Rhizopus chinensis* 12[#], which was screened from the starter for brewing rice wine in the South of China, by solid fermentation, and purified through ammonium sulfate precipitation, hydrophobic interaction, ionic exchange and gel filtration chromatographies. The purified enzyme hydrolyzed fibrin, it cleaved the α -, β - and γ -chains of fibrinogen simultaneously, and it also activated plasminogen to plasmin. The enzyme hydrolyzed N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, and K_m was 0.23mmol/L and K_{cat} $16.36 s^{-1}$. The optimal temperature of the enzyme for hydrolyzing fibrin was 45℃, and the optimal pH range of 6.8~8.8. The isoelectric point of the enzyme estimated by isoelectric focusing electrophoresis was 8.5 ± 0.1 . The enzyme was a glycoprotein. EDTA, PCMB, PMSF inhibited the activity of the enzyme, and SBTI, Lys, TPCK, Aprotinine had none obvious inhibition, which suggested that the activity centre of the enzyme had hydrosulfuryl, metal and serine. The first 12 amino acids of the N-terminal sequence of the enzyme were NH₂-Ser-Val-Ser-

Received: October 8, 2004; Accepted: November 22, 2004.

This work was supported by Grants from the Natural Science Fund of Tianjin City (No.023803411), the Natural Science Fund of Heilongjiang Province (No. D0228), and the Teacher Fund of Heilongjiang Province Education Bureau.

* Corresponding author. Tel: 86-452-2717645; E-mail: liuxiaolan001@126.com

天津市自然科学基金资助项目(No.023803411), 黑龙江省自然科学基金资助项目(No. D0228)和黑龙江省普通高校骨干教师创新能力资助计划项目。

本科生盛广焕、刘玲玲和张超参与了本文的部分实验工作。

Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly, and had none homology with that of other fibrinolytic enzyme from other microbes. The novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12[#] has potential to become a therapeutic agent in thrombosis.

Key words *Rhizopus chinensis*, fibrinolytic enzyme, characterization

血栓栓塞性疾病是危害人类生命和健康的严重疾病,溶栓疗法是血栓性疾病安全有效的治疗手段。国内外已正式批准临床使用的溶栓药物有尿激酶(UK)、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)等,这些药物疗效肯定,但还存在许多缺陷,而且价格昂贵,因此,开发新型溶栓剂很有必要。根霉(*Rhizopus chinensis*)12[#]是天津科技大学应用微生物教研室从南方小酒药中分离的,该菌株以豆粕和麸皮为原料发酵可产生纤溶酶。已采用盐析、疏水层析、离子交换层析和凝胶层析方法对纤溶酶提纯^[1],采用凝胶层析和 SDS-PAGE 法^[2]测定的纤溶酶分子量分别为 16.6kD 和 18.0kD,表明根霉产生的纤溶酶是单亚基蛋白质。本文报道根霉 12[#] 发酵产生纤溶酶的酶学性质,为纤溶酶的分子结构生物学的认识和研究提供依据,为它的进一步临床利用奠定基础。目前,国内外以根霉(*Rhizopus chinensis*)为菌株产生新型纤溶酶的性质研究还未见其它报道。

1 材料与方法

1.1 材料和主要设备

1.1.1 试剂:凝血酶为中国医学科学院天津血液研究所产品,尿激酶为南京大学制药厂产品,牛血纤维蛋白原、TPCK、PCMB、N-Benzoyl-DL-Arginine P-Nitroanilide、N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe P-Nitroanilide、N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester、D-Ile-Phe-Lys P-Nitroanilide、D-Ile-Pro-Arg P-Nitroanilide 和 N-Benzoyl-Val-Gly-Arg P-Nitroanilide 为 Sigma 公司产品, PMSF 为 AMRESCO 产品;载体两性电解质(pH 3~10)为中国军事医学科学院产品;等电点标准蛋白质(pI 3.5~9.3)为 Pharmacia 产品,其它试剂均为进口或国产生化或分析纯试剂。

1.1.2 主要仪器:PE 公司的 ABI491A 氨基酸序列分析仪。

1.2 方法

1.2.1 纤溶酶活力的测定:参考 Astrup T^[3] 血纤维蛋白平板法。

1.2.2 蛋白质浓度的测定:Lowry 法^[4],以牛血清白蛋白为标准。

1.2.3 纤溶酶的发酵制备方法:参考文献^[5]。

1.2.4 纤溶酶等电点(IEF)的测定:等电聚焦法^[6]。

1.2.5 根霉纤溶酶对人纤溶酶原激活活性的测定:用加热平板法^[7]。

1.2.6 根霉纤溶酶对人血纤维蛋白原的作用方式:参考文献^[8]。将 2% 人血纤维蛋白原溶液 200 μ L 与 60 μ L 0.2mol/L 酶液混匀,置 37 $^{\circ}$ C 保温不同时间,定时快速取出 10 μ L,冰浴终止酶促反应。将反应不同时间的样品进行 SDS-PAGE 垂直板电泳,用凝胶成像系统分析电泳结果。

1.2.7 根霉纤溶酶对合成生色底物的专一性:反应体系 0.4mL,其中根霉纤溶酶 20 μ L(浓度 0.015mg/mL),0.8mmol/L

生色底物 380 μ L,反应温度 37 $^{\circ}$ C, N-Benzoyl-L-Tyrosine ethyl ester 的反应体系缓冲液为 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.4),其它生色底物反应体系缓冲液为 0.05mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)。将配制好的底物溶液先预热到 37 $^{\circ}$ C,混合底物溶液和酶液, N-Benzoyl-L-Tyrosine ethyl ester 在 237nm、其它生色底物在 405nm 进行 10min 的时间扫描,记录吸光度的变化。各反应条件用缓冲溶液作对照。

1.2.8 根霉纤溶酶对合成生色底物 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 的动力学参数测定:将配制好的底物溶液先预热到 37 $^{\circ}$ C,在 0.5mL 的比色杯中顺次加入 380 μ L 的底物溶液和 20 μ L 的酶液,混匀,在 405nm 进行 4min 的时间扫描。各反应条件用缓冲溶液做对照。

1.2.9 糖蛋白定性方法: Molish 方法和甲苯胺蓝染色方法。

1.2.10 糖蛋白定量方法:地衣酚-硫酸法。

1.2.11 纤溶酶的 N 端氨基酸序列测定:用 PE 公司的 ABI491A 氨基酸序列分析仪测定。

2 结果与讨论

2.1 根霉纤溶酶等电点

通过对比等电聚焦电泳纤溶酶样品与标准蛋白质 pI(3~10)的位置,用凝胶成像系统分析出其等电点为 8.5 ± 0.1 。该根霉纤溶酶是一种碱性蛋白酶,其等电点与纳豆激酶^[9](pI 8.6 ± 0.3)和台湾学者 Chang C T^[10]报道的用 *Bacillus subtilis* IMR-NK1 产生的纤溶酶等电点 pI8.3 接近。

2.2 纤溶酶对人纤溶酶原激活的作用

市售的血纤维蛋白原中含有纤溶酶原,因此配制的血纤维蛋白平板中含有纤溶酶原,这种平板我们称为阳性平板。阳性平板置 85 $^{\circ}$ C 保温 30min,冷却至室温制成阴性平板。阳性平板反映了纤溶酶直接溶解纤维蛋白和激活纤溶酶原成纤溶酶间接溶解纤维蛋白的双重溶栓作用,而阴性平板中纤溶酶原受热失活,仅反映酶的直接纤溶活性。

用加热平板法测定根霉纤溶酶对纤溶酶原激活作用的

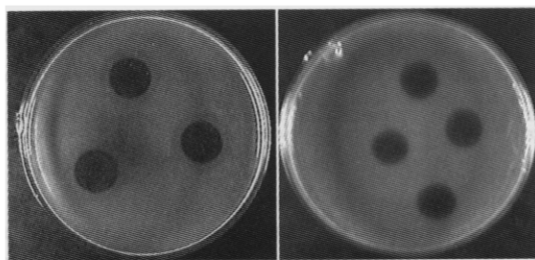


图1 根霉纤溶酶对人纤溶酶原的激活作用

Fig.1 Activation of plasminogen by the fibrinolytic enzyme produced by *Rhizopus chinensis* 12[#]

结果见图 1。阳性平板上纤维蛋白的溶解方式和阴性平板上有差别,阳性平板上纤维蛋白溶解圈比阴性平板上大,而且在透明圈外还有一个晕圈,说明阳性平板和阴性平板上的酶降解纤维蛋白肽链的切割作用位点不同。根霉纤溶酶除直接降解纤维蛋白作用外,还可激活血纤维蛋白溶酶原成纤溶酶,从而间接降解纤维蛋白。这一特点与纳豆激酶^[9]作用于纤维蛋白的特点相似。

2.3 纤溶酶对人血纤维蛋白的作用方式

纤维蛋白是分子结构没有发生根本变化的纤维蛋白原的多聚物,二者具有相同特点的 X 射线衍射图谱。纤溶酶对纤维蛋白和纤维蛋白原的降解产物大同小异,所以常常通过考察纤溶酶对纤维蛋白原的降解来了解对纤维蛋白的降解方式^[11]。图 2 为根霉纤溶酶对人血纤维蛋白原作用不同时间的电泳结果。可以清楚地看到,纤溶酶对人血纤维蛋白原作用 15min 后,α 链几乎完全降解,α 链降解产物分子量主要在 31 000~37 000 D 之间;1 h 后,β 链基本降解完全,β 链降解产物分子量主要集中在 30~38 kD 之间;从 1h 到 9h,γ 链逐渐降解至完全,γ 链降解产物主要是 29 400 和 36 800 D 的两个片段,在此期间,α 和 β 链的降解产物继续降解成更低分子量小肽分子。人纤溶酶降解纤维蛋白时的特点是顺次降解纤维蛋白原的 α、β 和 γ 链^[11],这一点看,根霉纤溶酶顺次降解纤维蛋白各亚基的情况与人纤溶酶的顺次降解方式相似。

在文献报道中,多数外源性纤溶酶能降解纤维蛋白的 α 和 β 链,特别是 α 链,其松散的 C 末端容易受到纤溶酶的切割,能降解 γ 链的纤溶酶则很少见。如 Gasmi^[12] 和 Ene Siigur^[13] 报道的从突尼西亚沙漠蝰蛇 (*Vipera lebetina*) 蛇毒中分离出的血纤溶酶能水解纤维蛋白原的 Aα 链和 Bβ 链;Lee J W^[14] 从蝮蛇 (*Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*) 提取出的纤溶酶能裂解纤维蛋白原 α 和 β 链,但不能作用于 γ 链;Kiminori Matsubara^[15,16] 从海洋绿藻 (*Codium divaricatum*) 中分离到一种纤溶酶 *C. divaricatum* 蛋白酶(CDP)能高效地水解纤维蛋白原 α 链,但对 β 链和 γ 链水解活性较低。

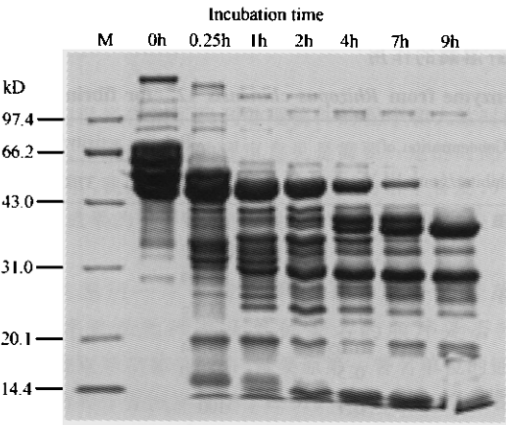


图 2 根霉纤溶酶对人血纤维蛋白原降解情况
Fig. 2 Analysis of the pattern of fibrinogenolysis by the fibrinolytic enzyme

2.4 纤溶酶的最适作用温度和热稳定性

根霉纤溶酶最适作用温度和热稳定性实验结果见图 3 和图 4。纤溶酶最适作用温度为 45℃,在 37℃ 保温 4h 酶活力保持 84%,42℃ 和 47℃ 下保温 4h 酶活力保持 70% 和 53%,52℃ 下保温 1h 酶活力保持 40%,保温 2h 后,酶完全失活,该酶对高温较为敏感。

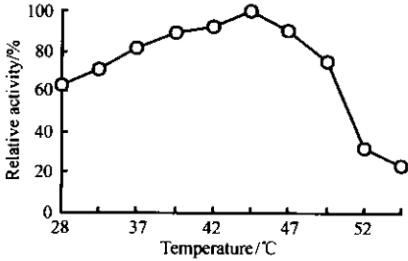


图 3 根霉纤溶酶最适作用温度
Fig. 3 The optimum temperature of the fibrinolytic enzyme

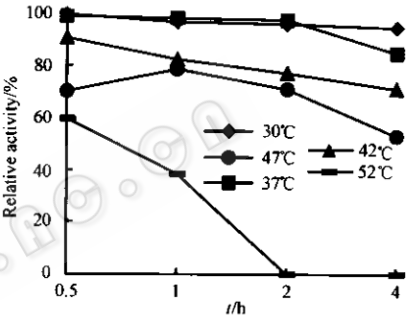


图 4 根霉纤溶酶温度稳定性
Fig. 4 Effect of temperature on the fibrinolytic enzyme stability at pH7.6

2.5 纤溶酶的最适作用 pH 和 pH 稳定性

根霉纤溶酶最适作用 pH 和 pH 稳定性实验结果见图 5。其最适作用 pH 为 10.8,pH7.8~11.8 范围内的相对酶活均在 80% 以上,生理 pH 在它的适宜作用 pH 范围。根霉纤溶酶的 pH 稳定性曲线是典型的钟罩形曲线,该酶最稳定的 pH 范围是 6.8~8.8,37℃ 保温 24h,酶活力保存 94% 以上,pH 稳定性很好。

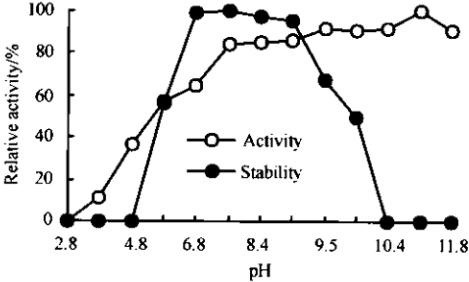


图 5 根霉纤溶酶的最适作用 pH 和 pH 稳定性
Fig. 5 Effect of pH on fibrinolytic activity and stability of the enzyme from *Rhizopus chinensis* 12^o at 37℃

2.6 根霉纤溶酶的底物作用专一性及酶反应动力学

2.6.1 纤溶酶对蛋白酶生色底物的作用专一性:根霉纤溶酶对几种合成生色底物的作用结果如表 1 所示。

表 1 根霉纤溶酶对几种合成色底物酰胺键和脂键的水解情况

Table 1 Comparative Amidolytic and ester bond activity of the fibrinolytic enzyme from <i>Rhizopus chinensis</i> 12 [*] for the hydrolysis of several synthetic substrates	
Synthetic substrate	Substrate hydrolysis/(nmol·mL ⁻¹ ·min ⁻¹)
N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (for subtilisin or chymotrypsin)	18.78
D-Ile-Phe-Lys-pNA (for human plasmin)	0
N-Benzoyl-DL-Arg-pNA (for trypsin)	0
D-Ile-Pro-Arg-pNA (for t-PA)	0
N-Benzoyl-Val-Gly-Arg-pNA (for UK)	0
N-Benzoyl-L-Tyrosine ethyl ester	0

实验范围内根霉纤溶酶只作用于 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA,该底物是胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶的最适底物,也是纳豆激酶的最适底物⁹,说明根霉纤溶酶降解血纤维蛋白的作用位点是羧基侧为疏水氨基酸的肽键^[17],该酶对人纤溶酶、尿激酶、t-PA 的特异生色底物均不作用,说明其纤溶活性与这三种纤溶酶的作用方式不同;该酶与胰蛋白酶的特异性生色底物 N-Benzoyl-DL-Arg-pNA 和 N-Benzoyl-L-Tyrosine ethyl ester 不反应,说明该纤溶酶的活性中心结构与胰蛋白酶不同,不作用于羧基侧为碱性氨基酸的肽键。该酶的底物专一性较强。

2.6.2 根霉纤溶酶对生色底物 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 作用动力学:经预实验确定底物浓度在 0.05~0.8 mmol/L;纤溶酶浓度采用 2.4590×10⁻⁵ mmol/L;反应条件控制在 37℃、pH7.4,即人体生理温度和 pH 值。各反应体系的时间扫描曲线表明各底物浓度反应释放的对硝基苯胺(p-nitroanilide)而引起 405nm 吸光度的变化呈线性关系。利用 Hanes 作图法,以[S]为横坐标,[S]/V 为纵坐标作图 6。

求得 $K_m = 0.226\text{mmol/L}$, $V_{\max} = 4.023 \times 10^{-4} (\text{mmol/L})/\text{s}$; $K_{cat} = 16.36 \text{ s}^{-1}$, $K_{cat}/K_m = 7.24 \times 10^4 \text{ L}/(\text{s}\cdot\text{mol})$ 。

表 3 蛋白酶抑制剂对根霉纤溶酶的作用

Table 3 Effect of various inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>Rhizopus chinensis</i> 12 [*] for fibrin hydrolysis			
Concentration of inhibitor/(mmol/L)		Relative activity/%	
		37℃ 15min	37℃ 30min
Lys	1	105.71	107.00
	5	20.00	17.65
EDTA	2.5	60.93	41.20
	1.25	68.63	64.49
	2	97.62	88.25
TPCK	0.5	98.18	95.91
	0.1	95.28	92.17
	0.4	99.02	104.17
SBTI	0.2	95.96	100
	0.1	98.74	102.77
PCMB	5	30.07	0
	2.5	103.77	0
PMSF	4	10.69	8.85
	1	22.53	16.51
	0.05	99.44	81.89
Aprotinine	0.5	88.80	94.30
	0.1	100	83.90
	0.02	96.10	102.22
Pepstatin	0.5	103.42	164.12
	0.1	106.91	165.39
	0.02	121.79	166.04

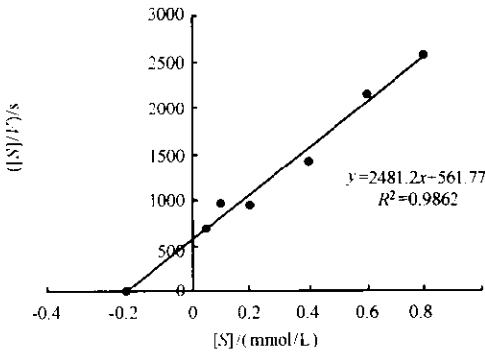


图 6 根霉纤溶酶与 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 反应的动力学常数测定

Fig. 6 Determination of the kinetic parameters of the reaction of the fibrinolytic enzyme and N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

根霉纤溶酶对该生色底物的 K_m 比较小,表明根霉纤溶酶对该底物有较好的亲和性。生色底物 N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA 同时又是纳豆激酶和枯草杆菌变种 *B. subtilis* IMR-NK1 产生纤溶酶的最适底物,这三种纤溶酶对该底物动力学常数的比较见表 2。根霉纤溶酶的 K_m 更小,而 K_{cat} 值与这两种纤溶酶的相近^{9,10}。

表 2 根霉纤溶酶、纳豆激酶及枯草杆菌变种纤溶酶的动力学常数

Table 2 Kinetic constants of the fibrinolytic enzymes from <i>Rhizopus chinensis</i> 12 [*] and <i>B. subtilis</i> IMR-NK1 and NK from <i>B. natto</i>					
Fibrinolytic enzyme from <i>Rhizopus chinensis</i> 12 [*]		Fibrinolytic enzyme from <i>B. subtilis</i> IMR-NK1		NK from <i>B. natto</i>	
$K_{cat}/(\text{s}^{-1})$	$K_m/(\text{mmol/L})$	$K_{cat}/(\text{s}^{-1})$	$K_m/(\text{mmol/L})$	$K_{cat}/(\text{s}^{-1})$	$K_m/(\text{mmol/L})$
16.36	0.23	21.08	0.34	17.87	0.52

2.7 根霉纤溶酶为糖蛋白的定性与定量

实验均以含糖的人血纤维蛋白原做对照。莫氏(Molish)

实验结果表明,根霉纤溶酶和人血纤维蛋白原溶液与硫酸层界面均有紫色环出现;甲苯胺蓝染色实验结果表明,根霉纤溶酶及人血纤维蛋白原在红紫的底色上都清楚地呈现出蓝色区带,确证根霉纤溶酶为糖蛋白。地衣酚-硫酸法测得该酶含糖量为 4.70%。

2.8 蛋白酶抑制剂对根霉纤溶酶的作用

蛋白酶抑制剂对根霉纤溶酶作用的情况如表 3 示。

由表 3 可知,EDTA、PMSF、PCMB 对根霉纤溶酶有抑制作用,其它抑制剂对根霉纤溶酶无明显的抑制作用。可见根霉纤溶酶的活性中心含有巯基、金属和丝氨酸,活性中心不含有赖氨酸结合位点。

2.9 根霉纤溶酶的 N 端序列

委托上海生化蛋白质组学研究分析中心用 PE 公司的 ABI491A 氨基酸序列分析仪测定的根霉纤溶酶 N 端 12 个氨基酸序列为: NH₂- Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln- Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly。与其它生物来源的纤溶酶没有同源性。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Liu XL(刘晓兰), Du LX(杜连祥), Lu FP(路福平) *et al.* Purification and partial characteristics of fibrinolytic enzyme produced from *Rhizopus chinensis* 12#. *Journal of Wuxi University of Light Industry*(无锡轻工大学学报), 2003, **23** (3): 26-31
- [2] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680-686
- [3] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys*, 1952, **40**: 346-351
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, **193**: 264-275
- [5] Liu XL(刘晓兰), Du LX(杜连祥), Lu FP(路福平) *et al.* Solid substrate cultivation of *Rhizopus Chinensis* 12# for production fibrinolytic enzyme. *Mycosystema*(菌物系统), 2003, **22** (3): 481-488
- [6] Wang CQ(王重庆), Li YL(李云兰), Li DC(李德昌). Advanced Laboratory Course of Biochemistry(高级生物化学实验教程). Beijing: Beijing University Press, 1994
- [7] Yang JS(杨嘉树), Li LY(李令媛), Ru BG(茹炳根). Purification of a plasminogen activator from *Eisenia fetida*. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*(中国生物化学与分子生物学报), 1998, **14** (2): 156-163
- [8] Koh YS, Chung KH, Kim DS. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme from snake. *Toxicon*, 2001, **39**: 555-560
- [9] 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **197**(3): 1340-1346
- [10] Chang CT, Fan MH, Kuo FC *et al.* Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agric Food Chem*, 2000, **48**: 3210-3216
- [11] Wang ZS(王中枢). Biochemistry of Fibrin Hydrolysis(纤维蛋白溶解的生物化学). Beijing: Science Press, 1991
- [12] Gasmi A, Karoui M, Benlasfar Z *et al.* Purification and characterization of a fibrinogenase from *Vepra lebetina* (desert adder) venom. *Toxicon*, 1991, **27** (7): 827-836
- [13] Ene S, Andres M, Juri S. β -Fibrinogenase from the venom of *Vipera lebetina*. *Toxicon*, 1991, **29** (1): 107-118
- [14] Lee JW, Seu JH, Rhee IK *et al.* Purification and characterization of brevinase, a heterogeneous two-chain fibrinolytic enzyme from the venom of Korean snake, *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **260**: 665-670
- [15] Matsubara K, Hori K, Matsuura Y *et al.* A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. *Phytochemistry*, 1999, **52**: 993-999
- [16] Matsubara K, Hori K, Matsuura Y *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine alga, *Codium divaricatum*. *Comp Biochem Physiol (Part B)*, 2000, **125**: 137-143
- [17] Zhang SZ(张树政). Enzyme Preparation Industry(酶制剂工业)(down volume). Beijing: Science Press, 1984