

# 内生多粘芽孢杆菌 EJS-3 纤溶酶基因 在毕赤氏酵母中的表达

钱 辉 张 充 陆兆新 别小妹 赵海珍 吕凤霞\*

(南京农业大学食品科技学院 南京 210095)

**摘要** 以自构建的重组质粒 pET-DsbA/PPFE-I 为模板,扩增内生多粘芽孢杆菌纤溶酶基因 PPFE-I,构建 *Pichia pastoris* 表达载体 pPICZαA/PPFE-I,通过电击转化,pPICZαA/PPFE-I 被整合到 *Pichia pastoris* SMD1168 基因组中,抗性筛选得到的阳性转化子,用终浓度为 1% 甲醇诱导 72 h,酶活达到 286 IU/ml,是野生菌的 2.6 倍,表达产物用 SDS-PAGE 进行分析,在相对分子质量 63 kDa 处出现明显的蛋白条带,降解人血纤维蛋白试验中 rPPFE-I 最先降解人血纤维蛋白原的 α 链,其次是 β 链,而对 γ 链降解最缓慢。实现了多粘类芽孢杆菌纤溶酶基因在毕赤酵母中的表达,为植物内生菌来源溶栓药物的开发提供了新的途径。

**关键词** 纤溶酶 毕赤氏酵母 异源表达

**中图分类号** Q786

血栓性疾病发病率很高,这种疾病主要是由于体内的纤溶系统与凝血系统失调造成的,预防血栓形成及溶解血栓是防治血栓性疾病的重要手段。已有研究表明,许多中药具有抗血小板聚集、抗血栓形成的作用,包括生物碱类、黄酮类以及皂甙等化合物<sup>[1]</sup>,尤其是活血化瘀中草药具有不同程度的抗凝血、血小板聚集及溶解血栓的作用<sup>[2-5]</sup>,其中溶解血栓的药物由于具有溶解已形成血栓的能力而倍受重视。目前,我国的活血化瘀中草药已广泛用于多种心脑血管疾病的防治,并取得了良好的临床疗效<sup>[6]</sup>。生活在植物组织内的内生菌,由于内生菌与宿主植物长期协同进化过程中,彼此构成了稳定的生态关系,使内生菌具有产生某些与植物相同或相似化合物的能力<sup>[7]</sup>。有鉴于此,从中药植物内生菌资源中寻找和发现一些新型的溶栓药物具有深远理论意义和潜在的应用价值。

本实验室首次从中药植物组织中筛选分离到一株纤溶活性较高和良好体外溶栓效果的多粘类芽孢杆菌 EJS-3<sup>[8]</sup>。根据内生多粘芽孢杆菌 EJS-3 纤溶酶基因 (PPFE-I, Genbank accession NO. KC176802.1) 推导的氨

基酸序列和已经报道的纳豆激酶、豆豉溶栓酶基因的氨基酸序列比较,相似性只有 30%,与假蕈状芽孢杆菌纤溶酶 (Genbank accession NO. ACK38255) 相似性最高为 65%,其酶学性质和其它已报道的纤溶酶存在显著差异,是一种新型的纤溶酶<sup>[9]</sup>。然而,多粘类芽孢杆菌 EJS-3 的纤溶酶活性较低,采用基因工程手段提高其酶活是目前亟需解决的问题。

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统因具有表达量高、易大规模培养、生产成本低、能进行蛋白质翻译后修饰和安全性高等特点被广泛使用,可利用 AOX 强效启动子,以甲醇为唯一碳源大量表达外源蛋白<sup>[10-11]</sup>。本研究通过构建 pPICZαA/PPFE-I 表达载体,实现其在毕赤酵母中分泌表达,以期提高纤溶酶活性,为利用基因工程技术在真核系统中高效表达纤溶酶提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

*E. coli* DH5α, *P. pastoris* SMD1168, pET-DsbA/PPFE-I 为本实验室保藏;pPICZαA 为 Invitrogen 公司产品。工具酶: *Eco*RI、*Kpn*I、T4 ligase; Amp (氨苄青霉素)、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试

收稿日期:2014-08-22 修回日期:2014-10-08

\* 通讯作者,电子信箱:lufengxia@njau.edu.cn

剂盒均为上海生工生物工程公司产品;Tryptone、Yeast extract 为 Oxoid 公司产品;YNB、D-山梨醇、DTT(二硫苏糖醇)购自南京基天生物科技有限公司;zeocin 抗生素购自 Invitrogen 公司;Biotin(生物素)为 Sigma 公司产品;其他试剂均为进口或国产分析纯。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,去离子水 1 000 ml。配制固体培养基时,按每 100 ml 加入琼脂粉 2.0 g,配低盐 LLB 培养基;NaCl 减半,抗性平板中 zeocin 终浓度 25  $\mu\text{g/ml}$ ,4℃避光保存。

YPDS 培养基:酵母膏 10g,蛋白胨 20g,溶解后定容至 900 ml,高压灭菌,额外加入 100 ml 10% 葡萄糖,固体培养基中加入 2% 琼脂粉,抗性培养基中 zeocin 的终浓度为 100  $\mu\text{g/ml}$ ,4℃避光保存。

## 1.2 仪器与设备

5418 小型高速离心机, Eppendorf 公司; MicroPulse™电转仪和 0.2 cm 石英电转化杯, Bio-RAD 产品; PowerPac™Hc 型核酸水平电泳仪, Bio-Rad 生产; VE-180 型垂直电泳槽, 上海天能科技有限公司, 30 KD 超滤管, 购自 Millipore 公司。

## 1.3 方法

1.3.1 *PPFE-I* 基因的克隆 为从载体 pET-DsbA/*PPFE-I* 上克隆出 *PPFE-I* 基因, 设计上下游引物, 上游引物: GAATTCATGATTAAAGTATGGTTTCGCTTCTTG GAG, 引入 *EcoRI* 酶切位点; 下游引物: GGTACCTTAGC CTACAGCGTCAAAAGACTTGGC, 引入 *KpnI* 酶切位点。以 pET-DsbA/*PPFE-I* 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 50s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72℃ 最后延伸 10 min。PCR 扩增产物回收后, 与 PMD19-T 载体通过 T4 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 菌落 PCR 确认阳性转化子, 挑选阳性菌落提取质粒送交南京金斯瑞生物科技有限公司测序, 测序正确的质粒命名为 PMD19-T/*PPFE-I*。

1.3.2 表达载体 pPICZ $\alpha$ A/*PPFE-I* 的构建 将 PMD19-T/*PPFE-I* 载体用 *EcoRI*, *KpnI* 双酶切, 胶回收试剂盒回收 *PPFE-I*。同样将质粒 pPICZ $\alpha$ A 用 *EcoRI*, *KpnI* 进行双酶切, 回收大片段。然后将 *PPFE-I* 基因与酶切后的质粒进行连接反应, 转化 DH5 $\alpha$ , 将 DH5 $\alpha$  涂布在低盐的含 zeocin 25  $\mu\text{g/ml}$  的 LLB 培养基上于 37℃ 倒置过夜培养约 12~16 h。挑取抗性菌落, 提取质粒, 分别单酶切、双酶切鉴定, 酶切鉴定正确的送去测序, 序列正确的命名为 pPICZ $\alpha$ A/*PPFE-I*。

1.3.3 电击转化毕赤氏酵母 SMD1168 将表达载体 pPICZ $\alpha$ A/*PPFE-I* 转化 DH5 $\alpha$ , 大量提取质粒后, 用 *EcoRI* 单酶切线性化。2.0 kv、5.5 ms 条件下转化 *Pichia pastoris* SMD1168 感受态细胞。将空载体 pPICZ $\alpha$ A 作为阴性对照转化 *Pichia pastoris*, 转化物涂布于含 zeocin 25  $\mu\text{g/ml}$  YPDS 抗性平板上, 30℃ 条件培养, 约 3~4 天长出转化子。

1.3.4 酵母转化子的 zeocin 抗性梯度筛选及 PCR 验证 将 YPDS 平板(zeocin 25  $\mu\text{g/ml}$ ) 上的转化单菌落用无菌牙签依次点种到含有 zeocin 浓度分别为 100、200、500  $\mu\text{g/ml}$  的 YPDS 平板上, 30℃ 培养 2~3 天, 观察酵母转化子的生长情况, 逐级筛选生长良好重组酵母菌株, 挑取经菌落 PCR 鉴定的阳性转化子进行诱导表达。

1.3.5 *PPFE-I* 基因在毕赤酵母中的诱导表达 挑取重组酵母单菌落接种于 5 ml BMGY 培养基(1% 酵母膏、2% 蛋白胨、1.34% YNB、1% 甘油、4 mg/L 生物素、0.1 mol/L 磷酸钾, pH6.0) 中, 于 30℃、180 r/min 培养至对数生长期, 此时 OD<sub>600</sub> 约为 4.0~6.0 (24 h); 室温下离心收集菌体, 弃去上清后, 菌体用 50 ml BMMY 培养基(1% 酵母膏、2% 蛋白胨、1.34% YNB、0.5% 甲醇、4mg/L 生物素、0.1 mol/L 磷酸钾, pH6.0) 重新悬浮至 OD<sub>600</sub> 约为 1.0; 将培养物置于 250 ml 三角瓶内, 于 30℃、180 r/min 持续培养 72 h, 每 24 h 补加 100% 甲醇使其终浓度达到 1%, 从而诱导重组纤溶酶表达。

1.3.6 纤维蛋白平板法检测酶活 发酵液离心除去菌体取上清液, 采用纤维蛋白平板法<sup>[12]</sup> 检测上清液酶活。

1.3.7 重组纤溶酶的 SDS-PAGE 电泳检测 发酵液于 8000 r/min, 10min 离心除菌体, 以 30%、70% 的硫酸铵分级沉淀, 除去部分杂蛋白。蛋白沉淀溶于少量 PBS pH7.4 缓冲液中, 30 KD 超滤管 6000 r/min 离心 5 min 超滤脱盐。参照 Laemmli 报道的方法<sup>[13]</sup> 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%。电泳完毕后, 取出凝胶, 考马斯亮蓝染色、脱色。

1.3.8 重组纤溶酶对人血纤维蛋白原的作用方式 50  $\mu\text{l}$  2.5% 的人血纤维蛋白原(用 50 mmol/L pH7.4 Tris-HCl 缓冲液溶解)与 10  $\mu\text{l}$  浓度 1.36 mg/ml 纯化的重组纤溶酶置于 37℃ 保温 15 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h, 定时快速取出 10  $\mu\text{l}$  加入等体积样品稀释液, 冰浴终止酶促反应。将保温不同时间的样品进行 SDS-PAGE 垂直板电泳, 电泳时加入人血纤维蛋白原作对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PPFE-I* 基因的克隆

以本实验室前期构建的 pET-DsbA/*PPFE-I* 质粒为模板,设计特异性引物进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖电泳分析,扩增产物大小约为 1.8kb(图 1),与目的基因大小一致。产物回收后与 PMD19-T 载体连接,连接后送南京金斯瑞公司测序,测序结果表明目的基因 *PPFE-I* 已经成功连接到克隆载体 PMD19-T 上。

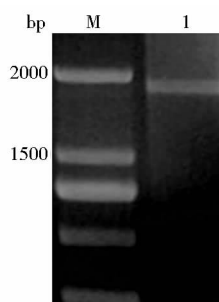


图 1 *PPFE-I* 的 PCR 扩增

Fig.1 *PPFE-I* amplification

M: marker; 1: *PPFE-I*

### 2.2 表达载体 pPICZ $\alpha$ A/*PPFE-I* 的鉴定

构建质粒 pPICZ $\alpha$ A/*PPFE-I*,连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。挑选 LLB zeocin 抗性平板上生长良好的菌落,提取重组质粒进行单酶切、双酶切鉴定,将酶切鉴定正确的单菌落提取质粒测序,测序结果表明插入的目的基因及阅读框均正确无误。

### 2.3 酵母转化子的 zeocin 抗性筛选及 PCR 验证

用牙签挑取转化单菌落依次点种在含有 zeocin 浓度分别为 100、200、500  $\mu$ g/ml 的 YPDS 平板上 3 d 后,酵母转化子在 YPDS 抗性梯度平板上的生长情况如图 2 所示。随着 zeocin 浓度的逐级增加,zeocin 浓度达到 200  $\mu$ g/ml 时转化子数目没有减少,当浓度达到 500  $\mu$ g/ml 转化子数目减少。挑取在 YPDS 平板(zeocin 浓度 500  $\mu$ g/ml)上生长较好的 4 株重组酵母单菌落,进一步进行菌液 PCR 鉴定,结果获得了预期大小的条带,说明在这些重组菌株中,*PPFE-I* 基因已经整合到酵母的基因组中。进行下一步的摇瓶甲醇诱导表达。

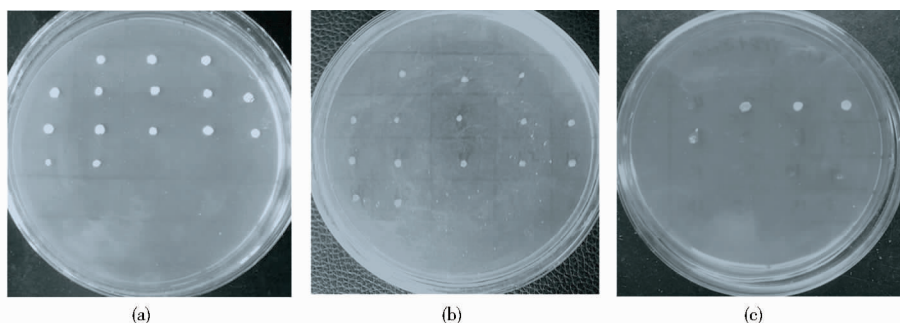


图 2 酵母转化子的 zeocin 抗性筛选

Fig.2 Screening of *P. pastoris* transformants by zeocin resistance

(a) ~ (c) Transformants grown on YPDS Plates with zeocin concentration of 100,200,500 $\mu$ g/ml

### 2.4 *PPFE-I* 基因在毕赤酵母中表达及 SDS-PAGE 电泳分析

将阳性转化子经甲醇诱导表达。发酵上清液硫酸沉淀,超滤脱盐后 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 3 所示,在 63 kDa 处有 1 条明显的特异性蛋白条带,与预测的分子量大小一致,说明 *PPFE-I* 基因在 *Pichia pastoris* 中成功表达。

用纤维蛋白平板测定表达产物纤溶活性。*PPFE-I* 重组菌的发酵上清液在纤维蛋白平板上有明显的透明

水解圈,说明表达产物具有纤溶活性,*PPFE-I* 基因获得了表达,而含空载体重组菌为对照,其上清液无透明水解圈(图 4)。纤溶活性测定结果表明,*PPFE-I* 重组菌发酵上清液纤溶酶活性达 286 IU/ml,是野生菌的酶活 110 IU/ml 的 2.6 倍。

### 2.5 重组纤溶酶降解人血纤维蛋白原

SDS-PAGE 电泳检测重组纤溶酶对纤维蛋白原的降解效果如图 5 所示,从中可以清楚地看到,15 min 后,A $\alpha$  链几乎完全降解,30 min 后,B $\beta$  链基本降解完

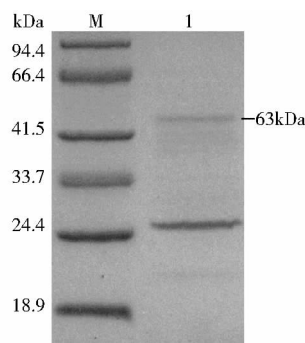


图3 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白

Fig. 3 The SDS-PAGE analysis of the expression of *rPPFE-I*

M: Marker; 1: Enzyme solution

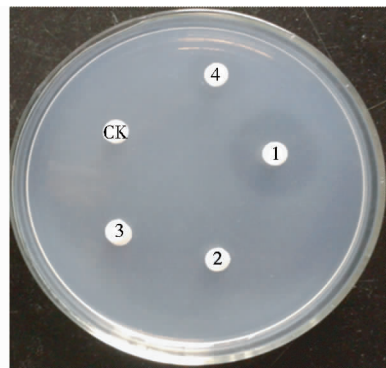


图4 纤维蛋白平板法测定纤溶活性

Fig. 4 Fibrinolytic activity assay on fibrin plate

1, 2, 3, 4: Reconstructed *P. pastoris* SMD1168/*PPFE-I*; CK: Reconstructed *P. pastoris* SMD1168/*pPICZαA*

全,从1 h到4 h,γ链逐渐降解至完全。Aα和Bβ链降解产物分子量主要在21 000~41 000Da之间,随着时间的延长,Aα和Bβ链的降解产物继续降解成更低分子量小肽分子,γ链降解产物主要是37 000和21 000Da的两个片段,与天然酶活性相似<sup>[9]</sup>。

### 3 讨论

植物内生菌作为一种新的微生物资源已引起了广泛的关注,但关于内生菌来源纤溶酶的研究报道尚不多见。Li等<sup>[14]</sup>从中药络石的组织中筛选产纤溶酶一株 *Verticillium* sp. Tj33。Ueda等<sup>[15]</sup>从芙蓉属的植物组织中筛选到一株具有较强纤溶活性 *Fusarium* sp. BLB。本实验室前期从中草药百部的根组织中分离到具有较强的纤溶活性的内生多粘芽孢杆菌 EJS-3<sup>[8]</sup>。因此,从中药植物内生菌资源中可寻找和发现一些新型的溶栓

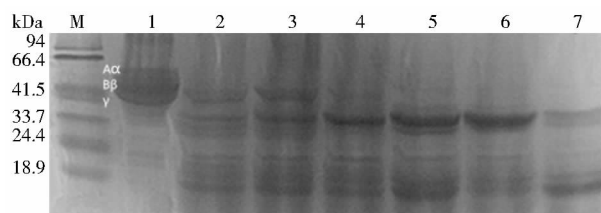


图5 重组纤溶酶降解纤维蛋白原

Fig 5 Fibrinolytic enzyme cleaved fibrinogen

1: Fibrinogen control without *rPPFE-I* after 0 min incubation; 2~7: Fibrinogenolytic products by *rPPFE-I* after 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 h incubation

药物,将为丰富中药植物内生菌物种和溶栓药物的开发提供又一重要资源。

多数天然纤溶酶在微生物体中含量较低,难以大量制备和提取纯化,限制了它作为溶栓药物在临床上的应用和推广。目前,已经有多种纤溶酶基因被获得,对纤溶酶基因表达的研究较多,主要以纤溶酶基因的原核表达系统为主,研究结果也不尽相同<sup>[16-18]</sup>。但目前还没有多粘芽孢杆菌纤溶酶基因在 *Pichia pastoris* 中异源表达的报道。

本研究通过构建质粒 *pPICZαA/PPFE-I* 转化毕赤酵母 SMD1168,经甲醇诱导72 h,酶活达到286 IU/ml 为大肠杆菌中表达的纤溶酶活228 IU/ml 的1.2倍<sup>[19]</sup>。表达产物经SDS-PAGE电泳分析,在相对分子量63 kDa处出现明显的蛋白条带,与预测的分子量大小一致,实现了内生多粘芽孢杆菌纤溶酶基因在 *Pichia pastoris* 中异源表达。同时,本研究发现植物内生菌来源真核生物,似乎适合于真核表达系统的异源表达。原因是毕赤酵母表达系统在蛋白折叠和糖基化修饰方面优于原核表达系统,更适合真核基因的生物功能研究<sup>[20-21]</sup>。

尽管内生多粘芽孢杆菌纤溶酶基因在毕赤酵母中表达时其产物以可溶形式分泌到胞外,但纤溶酶的表达量较低,如何提高产量还亟待进一步深入地研究。

### 参考文献

- [1] 何广新,容辉,张荣平.天然药物治疗心血管疾病研究进展.中国民族民间医药,2009,18(5):10-13.
- He G X, Rung H, Zhang R P. Research progress of cardiovascular diseases treated by natural medicine. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2009,18(5):10-13.

- [ 2 ] 李国贤,赵子余,袁景珊,等. 575 种中草药体外抗栓溶栓作用探讨. 中国血液流变学杂志,1995,5(2): 30-32.
- Li G X, Zhao Z Y, Yuan J S, et al. On the functional of 575 kinds of Chinese herbal medicines on extracorporeal antithrombosis and thrombolysis. Chinese Journal of Hemorheology,1995,5(2): 30-32.
- [ 3 ] 张逸凡. 血栓的形成及中药抗栓溶栓概况. 沈阳药科大学学报,1997, 14(3): 231-234.
- Zhang Y F. A survey of studies on thrombogenesis and the effect of the traditional chinese medicines on thrombosis. Journal of Shenyang Pharmaceutical University,1997, 14(3): 231-234.
- [ 4 ] 谢文光,魏钰书,王会信,等. 活血化瘀中药的纤溶和纤溶抑制作用. 中国医药学报, 1996,11(6):18-22.
- Xie W G, Wei Y S, Wang H X, et al. Fibrinolytic function and fibrinolytic inhibition effect of Chinese drug used to activate blood flow and remove blood stasis. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 1996,11(6):18-22.
- [ 5 ] 杨嘉,李宏,洪旗,等. 中药抗血栓作用的研究. 天然产物研究与开发,1997,9(2):17-20.
- Yang J, Li H, Hong Q, et al. Chinese herbal medicine research of antithrombotic effect. Natural Product Research and Development,1997,9(2):17-20.
- [ 6 ] 解庆东. 中药制剂在急性脑梗塞溶栓治疗中的应用. 中国药业, 2002, 11(12): 76-77.
- Jie Q D. Chinese medicine preparations used in thrombolytic therapy of acute cerebral infarction. China Pharmaceuticals, 2002, 11(12): 76-77.
- [ 7 ] 曾松荣,徐成东,王海坤,等. 药用植物内生真菌及其具宿主相同活性成分的机制初探. 中草药,2000,26(7):2395-2401.
- Zeng S R, Xu C D, Wang H K, et al. Medicinal plants endophytic fungi and their preliminary study on mechanism with the same active ingredient as host. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2000,26(7):2395-2401.
- [ 8 ] Lu F X, Sun L J, Lu Z X, et al. Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes. Current Microbiology, 2007, 54(6): 435-439.
- [ 9 ] Lu F X, Lu Z X, Bie X M, et al. 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.
- [10] Gasser B, Prielhofer R, Marx H, et al. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. Future Microbiology, 2013, 8(2): 191-208.
- [11] Macauley PS, Fazenda M L, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. Yeast, 2005, 22(4): 249-270.
- [12] Astru PT, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40(2): 346-351.
- [13] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature,1970,227(5259):680-685.
- [14] Li Y, Shuang J L, Yuan W W, et al. Verticase: a fibrinolytic enzyme produced by *Verticillium* sp. Tj33, an endophyte of *trachelospermum jasminoides*. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(11): 1548-1554.
- [15] Ueda M, Kubo T, Miyatake K, et al. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(2): 331-338.
- [16] Xu Z R, Yang Y M, Gui Q f, et al. Expression, purification, and characterization of recombinant lumbrokinase PI239 in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 2010, 69(2): 198-203.
- [17] 谭焕波,张国俊,徐明恺,等. 纳豆激酶基因的克隆表达以及活性分析. 食品工业科技,2012,33(18):195-198.
- Tan H B, Zhang G J, Xu M K, et al. Cloning, expression of the nattokinase gene and the activity assay. Science and Technology of Food Industry, 2012,33(18):195-198.
- [18] 张少平,陈亮,郭勇. 豆豉纤溶酶基因在大肠杆菌中的可溶性表达及纯化. 生命科学研究, 2010,14(3):208-212.
- Zhang S P, Chen L, Guo Y. Soluble expression and purification of douchi fibrinolytic enzyme gene in *Escherichia coli*, Life Science Research,2010,14(3):208-212.
- [19] Lu F X, Lu Z X, Bie X M, et al. Fusion expression of fibrinolytic enzyme gene *PPFE-I* from endophytic *Paenibacillus polymyxa* in *Escherichia coli* and activity analysis. Chinese Journal of Biotechnology, 2010, 26(8):1128-1134.
- [20] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. Biotechnology, 1993, 11(8): 905-910.
- [21] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(1): 45-66.

## Expression of *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 Fibrinolytic Enzyme Gene in *Pichia pastoris*

QIAN Hui ZHANG Chong LU Zhao-xin BIE Xiao-mei ZHAO Hai-zhen LV Feng-xia

( College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China )

**Abstract** A recombinant plasmid pET-DsbA/*PPFE-I* was constructed and used as template to amplify fibrinolytic enzyme gene *PPFE-I*. This was then used in *Pichia pastoris* expression vector pPICZ $\alpha$ A / *PPFE-I*; pPICZ $\alpha$ A / *PPFE-I* and integrated into the genome of *Pichia pastoris* SMD1168 by electroporation. Results showed that after methanol induction for 72h, enzyme activity was 286 IU / ml. When compared to the wild type, the enzyme activity had improved 2.6 fold. SDS-PAGE electrophoresis analysis showed that the recombinant fibrinolytic enzyme (*rPPFE-I*) was expressed. In human fibrin degradation test *rPPFE-I* was used to firstly degrade the  $\alpha$  chain human fibrinogen, followed by  $\beta$  chain, while the  $\gamma$  chain degradation was slowest. Endogenous *Paenibacillus polymyxa* fibrinolytic enzyme gene expression in *Pichia pastoris* was achieved, this would provide a new way to develop thrombolytic drug from endophyte sources.

**Key words** Fibrinolytic enzyme *Pichia pastoris* Heterologous expression