



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2014年度 2月

碩士學位論文

해양 녹조류인 구멍갈파래
(*Ulva pertusa*)로부터 혈전분해효소의
정제 및 특성분석

朝鮮大學校大學院

生命科學科

姜 聖 靈

해양 녹조류인 구멍갈파래
(*Ulva pertusa*)로부터 혈전분해효소의
정제 및 특성분석

Purification and characterization of
fibrinolytic enzyme from green algae *ulva*
pertusa

2014 年 2 月 25日

朝鮮大學校大學院

生命科學科

姜 聖 靈

해양 녹조류인 구멍갈파래
(*Ulva pertusa*)로부터 혈전분해효소의
정제 및 특성분석

指導教授 金 成 俊

이 論文을 理學碩士學位 申請論文으로 提出함


2013 年 10月


朝鮮大學校大學院


生命科學科

姜 聖 靈

姜聖靈의 碩士學位論文을 認准함.

委員長 朝鮮大學校 教授 全 暎 成 

委 員 光州大學校 教授 金 承 熙 

委 員 朝鮮大學校 教授 金 成 倚 

2013 年 11月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

목차

LIST OF TABLES.....	v
LIST OF FIGURES.....	vi
ABBREVIATIONS.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. 서론.....	1
2. 재료 및 방법.....	5
2.1. 재료 및 시약.....	5
2.2. 분석기기.....	6
2.3. 혈전분해활성 분석.....	6
2.4. 단백질분해활성 분석.....	7
2.5. 단백질 정량.....	8
2.6. 혈전분해 효소정제.....	8
2.6.1. 조단백질 분리.....	8
2.6.2. DEAE sepharose CL-6B fast flow column chromatography.....	9
2.6.3. CM Cellulose column chromatography.....	9
2.6.4. Sephadex G-75 column chromatography.....	10
2.6.5. Hiload 16/600 sephadex.....	10

2.7. 혈전분해 효소의 분자량 측정	11
2.7.1. SDS-PAGE를 이용한 분자량 측정	11
2.7.2. SDS-fibrin zymography를 이용한 분자량 측정	11
2.8. 정제된 혈전분해효소의 특성 분석	12
2.8.1. 정제된 효소의 최적활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향	12
2.8.2. 정제된 효소의 최적활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향	13
2.8.3. 정제된 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향	13
2.8.4. 정제된 효소의 활성에 미치는 단백질 분해 효소 저해제의 영향	14
2.8.5. 정제효소의 fibrin 및 fibrinogen 에 대한 분해패턴 분석	14
2.8.6. Turbidimetric lysis assay	15
2.8.7. 다양한 기질에 대한 정제효소의 특성 분석	15
2.8.8. 정제된 효소의 아미노산 서열분석	16
2.9. 정제된 효소의 in vitro 혈전 분해 분석	16
2.9.1. 정제효소에 대한 fibrin clot 분해 분석	16
2.9.2. 정제효소에 대한 mouse blood clot 분해 분석	17
2.10. 정제된 효소의 in vivo 혈전 분해 활성 분석	17
2.10.1. Carrageenan-induced mouse tail thrombosis model	17
2.10.2. Collagen/epinephrine-induced thromboembolism model	18

2.11. 정제된 효소의 항응고 활성 측정	19
2.12. 정제된 효소의 혈소판 활성	20
2.13. 정제된 효소의 지혈시간 분석	20
2.14. 통계처리	21
3. 결과	22
3.1. <i>Ulva pertusa</i> 로부터 fibrinolytic enzyme의 정제	22
3.1.1. 조단백질 분리	22
3.1.2. DEAE sepharose CL-6B fast flow column chromatography	23
3.1.3. CM cellulose column chromatography	23
3.1.4. Sephadex G-75 column chromatography	24
3.1.5. Hiload 16/600 sephadex	25
3.2. 혈전분해효소의 특성분석	25
3.2.1. 혈전분해효소의 분자량 측정 및 혈전분해 활성검색	25
3.2.2. Turbidimetric lysis assay	29
3.2.3. 온도에 의한 ulvase의 활성분석	30
3.2.4. pH에 의한 ulvase의 활성 분석	34
3.2.5. 금속 이온에 의한 ulvase의 활성 분석	35
3.2.6. 단백질 분해효소 저해제에 의한 ulvase의 활성 분석	37

3.2.7. Ulvase의 fibrin 및 fibrinogen에 대한 분해패턴 분석.....	37
a. Fibrinogenolysis.....	37
b. Fibrinolysis.....	40
3.2.8. 기질분해 특성분석.....	42
3.2.9. 아미노산 서열 분석.....	42
3.2.10. 정제된 효소의 in vitro 혈전 분해 분석.....	43
a. 정제효소에 대한 fibrin clot 분해 분석.....	43
b. 정제효소에 대한 mouse blood clot 분해 분석.....	46
3.2.11. 정제된 효소의 in vivo 혈전 분해 활성 분석.....	48
a. Carrageenan-induced mouse tail thrombosis model.....	48
b. Collagen/epinephrine-induced thromboembolism model.....	48
3.2.12. 정제된 효소의 항응고 활성 측정.....	49
3.2.13. 정제된 효소의 혈소판 활성화.....	52
3.2.14. Recalcification time assay.....	52
3.2.15. 정제된 효소의 출혈 분석.....	56
4. 고찰.....	58
5. 감사의 글.....	60
6. 참고문헌.....	61

LIST OF TABLES

Table 1. Summary of the purification of ulvase from <i>Ulva pertusa</i> .	28
Table 2. Amidolytic activity of ulvase on synthetic chromogenic substrates.	44
Table 3. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of the purified fibrinolytic enzyme from <i>Ulva pertusa</i> with algae protease and hypothetical protein.....	45
Table 5. Effects of ulvase on coagulation parameters.	53
Table 6. Analysis of platelet functions PFA-100 assay.	54

LIST OF FIGURES

Figure 1. Photograph of <i>Ulva pertusa</i>	3
Figure 2. Coagulation cascade and fibrinolytic pathway.....	4
Figure 3. Purification of fibrinolytic enzyme (ulvase) from <i>Ulva pertusa</i>	27
Figure 4. Molecular weight determination of fibrinolytic enzyme of ulvase using by SDS–PAGE and fibrin zymography.....	31
Figure 5. Fibrinolytic activity of purified enzyme on a fibrin–agarose plate.....	32
Figure 6. Fibrin clot lysis was monitored by turbidity assay.	33
Figure 7. Biochemical properties of ulvase. A–D, effects of temperature and pH on the activity and stability of ulvase.....	36
Figure 8. Effect of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>Ulva pertusa</i>	38
Figure 9. Effect of protease inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>Ulva pertusa</i>	39
Figure 10. Fibrinogenolysis (A) and fibrinolysis (B) patterns exhibited by the fibrinolytic enzyme purified from <i>Ulva pertusa</i>	41
Figure 12. Whole mouse blood clots were incubated with normal saline, ulvase(50µg/ml), ulvase(100µg/ml) and ulvase(200µg/ml) for 12h at 37°C.....	47
Figure 13. Effects of Ulvase and u–PA on thrombus formation	

induced by carrageenan in mouse tail.....	50
Figure 14. Effects of ulvase and non-treated and collagen and epinephrine-induced death in mice.....	51
Figure 15. Recalcification time.....	55
Figure 16. Effect of ulvase in tail bleeding time.	57

ABBREVIATIONS

APS	Ammonium persulfate
APMSF	4–amidophenylmethylsulfonyl fluoride
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine Serum Albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DEAE	Diethylaminoethyl
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
EGTA	Ethylene glycol tetra acetic acid
ELISA	Enzyme–linked immunosorbent assay
FPLC	Fast Protein liquid chromatography
OD	Optical Density
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PFA	Platelet function analyzer
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PMSF	Phenylmethlsulfonyl fluoride
SDS	Sodium dodecyl sulfate

TEMED	N, N, N, N' -tetramethylethylenediamine
TLCK	Tosyllysine chloromethyl keton
TPCK	Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone

ABSTRACT

Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from green algae
Ulva pertusa

Kang, Seong-Ryeong

Advisor: Prof. Kim, Sung-Jun, Ph. D.

Department of Life science

Graduate School of Chosun University

Cardiovascular disease is the leading cause of death throughout the world and is viewed as a global epidemic. Thrombosis the abnormal localized blood clot inside a blood vessel is one of the main causes of cardiovascular diseases. Currently available antithrombotic drugs have undesirable side effects. In this study, fibrinolytic activity of fibrinolytic protease from green algae *ulva pertusa* was examined using *in vitro* assays and was compared with plasmin. The fibrinolytic enzyme was

purified by using DEAE sepharose CL-6B fast flow chromatography followed by Sephadex G-75 gel filtration and MONO Q chromatography. The final specific activity of purified enzyme was 295.units per milligram and increased 57.65 fold comparing homogenate and final recovery yield was 2.5%. *Ulva pertusa* exhibited remarkably higher hydrolytic activity towards fibrin. The fibrinolytic activity of *ulva pertusa* was stronger than that of plasmin. Moreover, UPP had some plasminogen activator like activity. These results indicate that the enzyme purified from *Ulva pertusa* can be a potential candidate for the treatment of thrombosis. The apparent molecular weight of purified fibrinolytic enzyme was estimated to be about 50 kDa by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The optimal reaction pH value and temperature for the enzyme activity were pH 6.0 and 40°C, respectively. The purified enzyme had fibrinolytic activity showing that the protease rapidly hydrolyzed the A α - chain followed by the B β - chains. The purified protease also hydrolyzed fibrin, preferentially digesting the α - chain followed by the β - chains. Interestingly the γ - chains of fibrinogen and the γ - γ chains of fibrins were not hydrolyzed. The activity of the purified enzyme was totally inhibited by Fe²⁺, Cu²⁺, and moderately Mg²⁺, but enhanced by the additions of Cs⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Co²⁺,

Zn^{2+} metal ions. The protease activity was potently inhibited by APMSF, PMSF (serine protease inhibitor), and it was found to exhibit a specificity for the chromogenic substrate S-2288, S-2444, indicating that the purified enzyme is a factor serin like protease. The N-terminal amino acid sequence of purified enzyme was identified to be NYDAATLPEELYF. Therefore, the purified enzyme from *Ulva pertusa* can be an effective thrombolytic source.

1. 서론

오늘날 인류는 평균 수명의 연장에 따른 고령 인구의 증가, 식생활의 변화, 복잡한 산업화로 인해 암, 고혈압, 동맥경화증 및 당뇨병 등의 성인병이 그 어느 때보다 많아져 이로 인한 사망률이 크게 높아지고 있는 추세이다. 특히, 심혈관계 질환인 동맥경화증, 협심증, 심근경색증 등으로 사망에 이르게 되는 경우가 많다. 특히, 동맥경화증, 관상동맥성 질환(Coronary Heart Disease, CHD)이 사회·경제적 문제로 떠오르고 있으며, 이에 대한 예방 및 치료가 삶의 질 향상을 위하여 중요한 요인이 되고 있다.

생체 구성성분으로 혈액은 산소, 영양분, 노폐물의 운반 기능과 완충작용, 체온유지, 삼투압 조절 및 이온 평형유지, 수분 일정유지, 액성 조절작용, 혈압의 유지 및 조절, 생체방어 등 다양한 중요 기능을 가지고 있다. 따라서 혈액의 기능적 이상 및 혈액 순환 이상은 다양한 혈관계 질환을 유발하게 되며, 이러한 기능 및 순환 장애가 뇌 및 심장 등에서 나타나는 경우, 생명에 치명적이 되며, 그 후유증 또한 심각하다(2,3). 현재, 혈관계 질환의 사망률 합계는 악성종양에 의한 사망률 전체를 상회하고 있어, 그 대책이 시급한 실정이다(5). 정상적인 혈액 순환은 체내에서의 혈액 응고 반응계와 혈전 용해 반응계가 상호보완적으로 조절되면서 혈액 순환을 용이하게 하며, 이들 중 혈액 응고 반응계 및 기작은 혈관벽에 혈소판이 점착, 응집하여

혈소판 혈전을 형성한 후, 혈액 응고계가 활성화되어 혈소판 응집피를 중심으로 피브린 혈전이 형성되는 것으로 보고되어 있다(4). 트롬빈은 혈액 응고에 중추적 역할을 수행하는데, 피브리노겐을 피브린으로 전환하고, 교차 결합된 피브린 혈전을 생성시키며, 혈소판, V 인자, VII 인자들을 활성화시켜 혈액 응고반응을 촉진시키게 한다(Fig.2). 따라서 과다한 트롬빈의 활성화는 혈전증을 유발하게 되며, 트롬빈 활성 저해물질은 혈액 응고 이상으로 발생하는 다양한 혈전성 질환에 매우 유용한 예방 및 치료제로 사용될 수 있다.

현재까지 혈전성 질환의 예방과 치료에 헤파린, 쿠마린, 아스피린, 유로키네이즈 등의 다양한 항응고제, 항혈소판제, 혈전용해제 등이 사용되고 있으나, 이들은 가격이 매우 높을 뿐 아니라 출혈성 부작용과 위장장애 및 과민반응 등으로 그 사용이 한정되고 있는 실정이다 (7-9). 따라서, 안전성이 우수한 트롬빈 직접 저해제 개발을 목표로, 식용 및 약용 식물로부터 트롬빈 저해제 탐색 연구가 국내외에서 지속적으로 이루어지고 있다 (10-14).

본 연구에서는 천연 녹조류의 하나인 구멍갈파래(Fig.1)를 이용하여 항혈전 효과, 항응고 및 항혈소판 응집 활성을 분석하고자 하였으며, 이를 통해 기존의 여러 환경문제를 야기하는 구멍갈파래의 기능성 소재 및 약용 소재로서 활용가치를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.



Figure 1. Photograph of *Ulva pertusa*

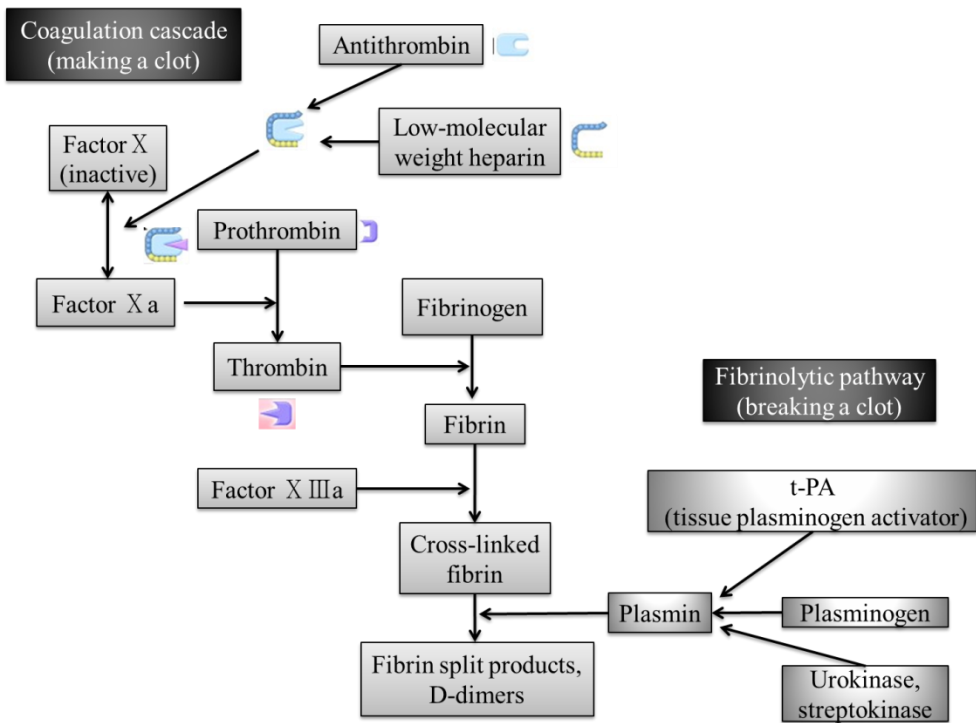


Figure 2. Coagulation cascade and fibrinolytic pathway.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 *Ulva pertusa* (ulvase: 구멍갈파래) 는 진도 우수영 해안가에서 채집하여 사용하였다. 시약으로 bovine fibrinogen, bovine thrombin (1,000 unit), human fibrinogen (2 unit/mg, plasmin (10 unit), azocasein, acrylamide, N,N' -methylenbisacrylamide, glycine, citrate monohydrate, trizma base, 4-amidophenylmethylsulfonyl fluoride (APMSF), phenylmethlsulfonyl fluoride (PMSF), tosyllysine chlorometyl keton (TLCK), tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), aprotinin, pepstain A, ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA), potassium chloride, sodium dodecyl sulfat (SDS), Urea는 Sigma-aldrich Co. (USA) 제품을 이용하였으며 Agarose는 Invitrogen, protein marker는 Thermo-scientific (USA) 사의 PageRuler™ Prestained Protein Ladder 제품을 구입하였다. 시료를 정제하기 위해서 Diethylaminoethyl (DEAE) sepharose CL-6B, CM cellulose, sephadex G-75, Hiload 16/600 sephadex 을 사용하였다.

2.2. 분석기기

단백질 정량을 위해 UV spectrometer 는 UV-1650PC (Shimadzu Co., Japan) 를 사용하였다. 효소 정제를 위한 FPLC 는 Hiload 16/600 sephadex 를 사용하였다. 항응고 활성을 측정하기 위해 coagulometer 는 Sysmex CA-1500 (Mittan Keynes, UK)를 이용하였다. 아미노산 서열 분석을 위해 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 ABI492 protein sequencer (emass, Korea)를 사용하였다. Amidolytic activity 를 측정하기 위해 ELISA plate reader (Molecular Devices. Sunnyvale, CA, USA)를 이용하였다. 항응고 활성을 측정하기 위해 blood coagulation analyzer (HOSPITEX Diagnostics, Italy)를 이용하였다. 전혈 혈소판 활성을 측정하기 위해 PEA-100 (platelet function analyzer) system (Siemens, Dade Behring, Mar-burg, Germany)를 이용하였다.

2.3. 혈전분해활성 분석

혈전분해 활성검색은 Astrup과 Müllertz의 fibrin plate법 (2) 을 수정하여 수행하였다. 1% agarose 용액 32 ml을 가열하여 녹이고 45℃에서 천천히 식히며 fibrinogen 1%를 넣고 혼합시켰다. 여기에 Thrombin (0.5

unit/ml)를 첨가하고 1시간 동안 실온에서 고화시켜 fibrin plate를 제조하였다. 제조된 fibrin plate에 구멍을 만들어 plasmin (Sigma, USA) 1.0 unit를 각각 침적하고 37°C에서 12시간 동안 반응시켜 생성된 용해환의 크기를 standard curve로 사용하였다. 조단백질 및 컬럼 분획을 필요에 따라 농축시키거나 희석하여 fibrin plate에 침적하고 그 용해환의 크기를 plasmin의 용해환과 대조한 뒤 unit로 환산하였다.

2.4. 단백질분해활성 분석

Azocasein assay 법(Patton 등, 1993)으로 단백질분해활성을 분석하였다.(3) Azocasein assay 법은 azocasein 이 분해되어 나오는 acid soluble material 양을 측정하는 방법이다. 0.1% azocasein 용액 (20mM Tris-HCl, pH 7.4) 300 μ l에 단백질 분획 50 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 냉장 처리된 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 400 μ l 를 넣고 즉시 혼합시켰다. 이 시료들은 10 분 동안 얼음에 방치하여 반응을 정지시킨 후 원심분리기에서 12,000 rpm (HMR 150IV, Hanil), 4°C로 20 분간 원심 분리하여 상층액을 366 nm 에서 측정하였고 OD₃₆₆ = 0.1 일 때 1 unit 으로 환산하였다.

2.5. 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 법에 의한 BCA 단백질정량 kit (Pierce Co., USA) 를 사용하여 측정 하였으며, 표준 단백질은 bovine serum albumin (BSA) 을 사용하였다.

2.6. 혈전분해 효소정제

2.6.1. 조단백질 분리

수집한 구멍 갈파래는 3 차 증류수로 여러 차례 씻은 후 균질화에 필요한 최소량의 증류수를 섞어 blender 로 갈아 균질화 하였으며 이를 멸균거즈를 이용하여 2 회 거르고 4℃에서 12,000 rpm 으로 30 분 동안 원심분리 (Supura21k Hanil, Korea) 하여 상층액을 회수하였다.

회수된 상층액에 -70℃로 전 처리한 에탄올 동량을 가하고 4℃에서 1 시간 교반하였다. 다시 4℃, 12,000 rpm 에서 30 분 동안 원심 분리하여 침전물은 제거하고 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70℃로 전 처리한 에탄올 동량을 가하여 최종 에탄올 농도를 75%로 적정한 후

4℃에서 1 시간 교반하였다. 이를 4℃에서 12,000 rpm 으로 30 분 간 원심 분리하여 침전물을 회수한 뒤 3 차 증류수에 현탁 하여 시료로 사용하였다.

2.6.2. DEAE sepharose CL-6B fast flow column chromatography

75% 에탄올 침전 후 증류수에 현탁한 시료를 DEAE sepharose CL-6B fast flow column (1.6 x 20cm) 에 적하 한 뒤 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer 를 이용하여 전개시켰으며 1.0M KCl (20mM Tris-HCl, pH 7.4) 의 농도구배로 용출시켜 활성 분획만을 회수하였다. 이 때 flow rate 6 ml/hr, fraction size 1 ml씩 분획하였다. 활성 분획은 탈염 후 농축하여 다음 실험에 사용하였다.

2.6.3. CM Cellulose column chromatography

75% 에탄올 침전 후 증류수에 현탁한 시료를 DEAE sepharose CL-6B fast flow column (1.6 x 20cm) 에 적하 한 뒤 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer 를 이용하여 전개시켰으며 1.0M KCl (20mM Tris-HCl, pH 7.4) 의 농도구배로 용출시켜 활성 분획만을 회수하였다. 이 때 flow rate 6 ml/hr,

fraction size 1 ml씩 분획하였다. 활성 분획은 탈염 후 농축하여 다음 실험에 사용하였다.

2.6.4. Sephadex G-75 column chromatography

활성 분획을 농축하여 20mM Tris-HCl (0.1M KCl, pH 7.4) buffer 으로 현탁한 시료를 Sephadex column (1.0 x 63cm) 에 적하하고 20mM Tris-HCl (0.1M KCl, pH 7.4) buffer 로 전개하였다. 이 때 Flow rate 6 ml/hr, fraction size 1 ml씩 분획하였다.

2.6.5. Hiload 16/600 sephadex

20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer 로 Hiload 16/600 sephadex 를 평형화 시킨 후 시료를 적하하고 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer 로 전개하였으며 1.0M KCl (20mM Tris-HCl, pH 7.4) 의 농도구배로 용출시켜 활성 분획만을 회수하였다. 이때 flow rate 0.5 ml/min, fraction size 0.5 ml씩 분획하였다.

2.7. 혈전분해 효소의 분자량 측정

2.7.1. SDS-PAGE를 이용한 분자량 측정

단백질 전기영동은 12%의 separating gel 과 5% stacking gel 로 구성된 SDS-polyacrylamide gel 을 이용하였다. 단백질 5X sample buffer (60mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM β -mercaptoethanol, 0.1% bromoph-enol blue)를 혼합하여 100°C 에서 5 분간 중탕한 후 protein marker (Thermo-scientific Co.) 와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후 gel 은 coomassie brilliant blue R-250 (CBB) 로 염색하였고 탈염색 용액으로 탈색시킨 후 단백질 밴드를 protein marker 와 비교하여 분자량을 확인하였다.

2.7.2. SDS-fibrin zymography를 이용한 분자량 측정

SDS-fibrin zymography 활성 확인법은 Leber 등 (1997) 과 Kim 등 (1998) 의 방법에 의하여 fibrinogen 농도가 0.1% (w/v) 가 되게 12% polyacrylamide 용액에 혼합한 후 0.5 micro unit thrombin 과

N',N',N',N' -tetramethylethylenediamine (TEMED) (0.028%) 를 첨가하여 gel 을 제조하고 전기영동을 수행하였다.

조제한 단백질은 SDS-PAGE 를 수행하여 분자량을 분석하였다. 전기영동이 완료된 후 SDS 에 의해 불활성화 된 효소를 재활성화 시키기 위하여 gel 을 4% triton X-100 을 포함한 20mM Tris-HCl (pH 7.4)에 넣어 1 시간 교반 하여 SDS 를 제거한 후 이어서 증류수로 15 분씩 3 차례 교반하여 triton X-100 을 제거하였다. 그리고 gel 을 활성반응 완충용액 (0.15 M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.4) 에 넣어 37°C 항온기에서 12 시간 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 gel 을 CBB 로 염색하고 탈염색 완충용액으로 탈색시켜 fibrin 분해능을 지닌 단백질의 분자량을 확인하였다.

2.8. 정제된 혈전분해효소의 특성 분석

2.8.1. 정제된 효소의 최적활성 및 안정성에 미치는 온도의 영향

Fibrinolytic activity 의 온도에 대한 의존성은 10~80°C 의 측정 조건하에서 측정하였다. 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 로 효소용액을 dilution 하여 10 μ l 를 취하고 이를 각각의 온도에서 12 시간 반응시킨 후

fibrin plate 에 침적하여 효소활성을 측정하였다. 효소의 안정성을 시험하기 위해 1/10 로 dilution 된 효소용액 10 μ l 를 10~80 $^{\circ}$ C 에서 방치한 후 반응용액을 fibrin plate 에 침적하여 최적온도에서 12 시간 동안 잔존 효소활성을 측정하였다.

2.8.2. 정제된 효소의 최적활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향

Fibrinolytic activity 의 pH 에 대한 의존성은 pH 2~11 의 범위에서 측정되었다. pH 2~5 은 0.1M sodium acetate-HCl buffer, pH 6~7 은 0.1M phosphate-NaOH buffer, pH 8~9 은 0.1M Tris-HCl buffer, pH 10~11 은 0.1M glycine-NaOH buffer 를 사용하여 효소활성을 fibrin plate 에서 측정하였으며, pH 에 대한 안정성은 pH 2~11 의 범위에서 4 $^{\circ}$ C 조건으로 24 시간 반응 시킨 후 잔존효소 활성을 fibrin plate 에 침적하여 확인하였다.

2.8.3. 정제된 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향

정제한 효소의 활성화에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위해 CsCl, MnCl₂, CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, CuSO₄, F₂ SO₄, MgCl₂ 를 ulvase 에 섞어 1 시간 동안 최적온도에서 반응 시킨 후 fibrin plate 를 수행하여 활성을 비교하였다.

2.8.4. 정제된 효소의 활성화에 미치는 단백질 분해 효소 저해제의 영향

정제한 효소의 활성화에 대한 단백질 분해 효소 저해제의 영향을 알아보기 위해 2mM EGTA, 10mM EGTA, 2mM EDTA, 10mM EDTA, 2 μM pepstain A, 0.1mM pepstain A, 1mM APMSF, 2mM PMSF, 2mM TLCK, 20mM TPCK, 0.2mM Aprotinin 의 저해제와 ulvase 을 혼합하여 37℃ 항온기에서 1 시간 동안 반응 시킨 후 단백질 분해활성을 분석하여 효소 활성화에 대한 영향을 비교하였다.

2.8.5. 정제효소의 fibrin 및 fibrinogen 에 대한 분해패턴 분석

Fibrin 및 fibrinogen 에 대한 혈전분해 특성을 분석하기 위하여 10 μl의 fibrin 및 fibrinogen 에 Thrombin (0.5 unit/ml) 를 처리하여 고화시킨

fibrin 에 ulvase (10 μg) 을 첨가하여 일정한 시간적 간격을 두고 최적온도에서 반응시킨 후 SDS-PAGE 를 이용하여 분해특성을 비교하였다. Fibrin 의 경우 stop solution (10 M Urea, 4% SDS, 4% β -mercaptoethanol) 을 첨가하여 반응을 정지 시키고 monomer fibrin 으로 전환시켜 SDS-PAGE 상에서 전개하였다. Fibrinogen 과 fibrin 의 분해패턴은 12% SDS-PAGE 상에서 전개하여 그 분석을 용이하게 하였다.

2.8.6. Turbidimetric lysis assay

Carter et al 등 의 방법으로 turbidimetric lysis assay 를 측정하였다. (13) Fibrinogen 과 thrombin 을 혼합한 후 37°C에서 2 시간 반응 시켜 fibrin clot 을 형성하였다. 형성된 fibrin clot 에 아무것도 처리하지 않은 control 과 ulvase 5 μg , 10, μg , 15 μg 를 96-well plate reader 에서 30 분 동안 흡광도 405 nm 에서 분석하였다.

2.8.7. 다양한 기질에 대한 정제효소의 특성 분석

Chromogenic substrate (Chromogenix, Italy) 을 이용하여 amidolytic activity 를 측정하였다. 활성화 측정은 0.5 mM chromogenic substrate 에 정제된 혈전분해효소 1 μ g을 첨가하여 37°C 항온기에서 10 분간 반응시킨 후 ELISA plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 를 사용하여 405 nm 에서 방출된 p-nitroaniline 의 양을 측정하였다.

2.8.8. 정제된 효소의 아미노산 서열분석

Ulva pertusa 로부터 정제된 혈전분해효소를 SDS-PAGE 전기영동 후 PVDF membrane 으로 transfer 시키고 건조시킨 후 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 N-terminal sequence analysis 를 수행하였다.

2.9. 정제된 효소의 in vitro 혈전 분해 분석

2.9.1. 정제효소에 대한 fibrin clot 분해 분석

200 μg Human fibrinogen (1%) 와 0.2 μl human thrombin (0.5 unit/ml) 를 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer (20 mM CaCl_2 +0.1 M NaCl)에 첨가한 후 37°C에서 1 시간 동안 항온기에 반응시켜 fibrin clot 을 형성시켰다. Fibrin clot 이 형성되면 ulvase (30 μg) 를 첨가하여 37°C 항온기에서 24 시간동안 반응시켰다.

2.9.2. 정제효소에 대한 mouse blood clot 분해 분석

신선한 mouse blood (300 μl) 을 37°C 항온기에서 1 시간 동안 반응시켜 blood clot 을 형성시킨 다음 각각의 농도대로 ulvase (50 μg , 100 μg , 200 μg) 를 처리한 후 37°C에서 24 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 분해 되지 못하고 남은 혈전과 음성대조군으로 사용한 mouse blood clot 을 Image J 1.46b image analysis software (Wayne Rasband, NIH, USA) 를 이용하여 mouse blood clot lysis 를 분석하였다.

2.10. 정제된 효소의 in vivo 혈전 분해 활성 분석

2.10.1. Carrageenan-induced mouse tail thrombosis model

5주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 구입하여 사용하였다. 실험 시작 전 24시간 전에 사료는 절식 시키고 물만 공급한 후 적정 환경(온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 명암은 12시간 주기)에서 사육하였다.

실험 시 각각 다른 농도의 ulvase (100, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$)와 양성군의 u-PA (300 IU/kg) 을 생리식염수에 녹여 thrombosis 유도 30 분 전에 mouse tail 정맥에 주입하였다. 주입 후 tail 에 ligation 과 4°C 의 조건을 10 분간 유지하였고 이 때 κ -carrageenan (1 mg/kg) 을 정맥으로 주사하여 thrombosis 를 유도시켰다. Thrombosis 유도 후 72 시간 동안 ulvase 와 u-PA 가 tail 에 유도된 thrombosis 에 미치는 영향을 확인하여 ulvase 의 혈전분해활성을 분석하였다.

2.10.2. Collagen/epinephrine-induced thromboembolism model

Gresele 등 (1990)의 방법으로 thromboembolism 에 대한 저해효과를 분석하였다. 5 주령의 ICR 계 흰쥐를 구입하여 실험 시작 전 24 시간 전에 사료는 절식 시키고 물만 공급한 후 적정 환경(온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 명암은 12 시간 주기)에서 사육하였다. Ulvase 는 thromboembolism 유발 1 시간 전에 intraperitoneal 을 통하여 주입하였다. ulvase 주입 1 시간 후, intraperitoneal injection 를 통해 epinephrine (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 collagen

(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 을 주입하고 최종적으로 15 분 이내에 mouse 의 mortality 와 paralysis 여부를 분석하였다.

2.11. 정제된 효소의 항응고 활성 측정

항응고 활성 중 내인성 경로 (Intrinsic pathway) 에 기인하는 recalcification time assay 는 혈장에 CaCl_2 를 첨가하여 응고되는 시간을 측정하는 방법이다. 혈장에 칼슘을 첨가하고 아무것도 처리하지 않은 control 과 ulvase 1 μg , 10 μg , 20 μg , 30 μg 를 96-well plate reader 에서 1 분 간격으로 91 분 동안 분석하였다.

aPPT 의 측정은 시료 일정농도가 함유된 건강한 성인의 혈장 (platelet poor plasma) 100 μl 를 aPPT 측정용 시약 100 μl 와 혼합하여 37°C에서 3 분간 예열한 다음 37°C에서 미리 예열된 20mM CaCl_2 100 μl 를 가한 후 blood coagulation analyzer (HOSPITEX Diagnostics, Italy)를 이용하여 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 대조군으로 시료 무첨가의 혈장 100 μl 를 사용하였다. 외인성 경로 (extrinsic pathway)에 기인하는 PT 의 측정은 시료를 함유한 혈장 150 μl 를 가한 후 blood coagulation analyzer 로 응고시간을 측정하였고 공통경로 (common pathway)에

기인하는 TT 의 측정은 시료가 함유된 혈장 150 μl 를 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3 분간 예열한 다음, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 미리 예열된 TT 측정시약 150 μl 를 가한 후 동일하게 응고시간을 측정하였다.

2.12. 정제된 효소의 혈소판 활성화

전혈 혈소판 활성화는 PEA-100 (platelet function analyzer) system (Siemens, Dade Behring, Marburg, Germany) 제조회사의 사용법에 따라 분석하였다. 채취한 혈액은 3.8% (w/v) sodium citrate 를 첨가하였다. 각각 다른 농도의 ulvase (87.5 μg , 175 μg , 262.5 μg , 350 μg) 를 collagen/EPI cartridge (Dade Behring, Marburg, Germany) 에 첨가하고 실온에서 5 분 동안 반응 시킨 후 혈소판 활성을 측정하였다. 아무것도 첨가하지 않은 혈액은 control 로 사용하여 혈소판 활성을 측정하였다.

2.13. 정제된 효소의 지혈시간 분석

Wang 등의 방법으로 실험 하기 하루 전, 20-25 g 가량의 ICR 계 mouse 에 최대한 먹이를 적게 주어 실험 결과에 영향을 줄 수 있는 요인을 줄였다.

실험 시 mouse tail vein 에 정맥주사를 이용하여 ulvase (100 μ g/kg)와 음성 대조군으로 생리식염수, 양성 대조군으로 u-PA (300IU) 를 주입하였다. 그런 다음 mouse 를 마취시킨 후 꼬리 끝 지름이 1.5 mm 되는 부분을 자른 후 즉시 증류수가 담긴 튜브에 담아 지혈시간을 측정하였다

2.14. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 \pm 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Turkey 방법으로부터 그 유의성을 나타내었다.

3. 결과

3.1. *Ulva pertusa*로부터 fibrinolytic enzyme의 정제

3.1.1. 조단백질 분리

본 실험에서는 구멍갈파래로부터 추출한 단백질이 혈전분해 활성을 가지고 있는 것을 확인하였으며, 혈전분해효소를 농축시킬 수 있는 최적의 추출조건을 확립하기 위한 다양한 농도조건의 에탄올 침전법을 수행하였다.

혈전분해효소 활성을 유지시키기 위하여 모든 정제 과정은 4℃에서 수행하였으며, 혈전분해효소가 분리되는 에탄올 농도를 측정하기 위하여 50% ~ 75% 에탄올 농도를 점진적으로 증가시켜서 분리된 단백질을 3차 증류수에 현탁하여 혈전분해활성 (fibrin plate)을 검색하기 위하여 지름 5mm의 구멍을 만들고 각 에탄올 농도에 따라 단백질 10 μ g을 양성대조군 (Human plasmin 1unit)과 함께 침적하여 37℃에서 12시간 동안 반응시킨 결과 *Ulva pertusa*로부터의 조단백질은 50%, 75% 에탄올로부터 회수된 각각의 침전물에서 혈전분해 활성을 나타냄에 따라 에탄올농도 75%의 침전물을 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)에 현탁하였다. 최종적으로 현탁액을 12,000rpm, 30min으로 원심분리하여 상층액만을 조단백질로

실험에 사용하였다. 조단백질의 단백질 총량은 1891.23mg이며 효소활성은 5.12 unit/ml로 측정되었다.

3.1.2. DEAE sepharose CL-6B fast flow column chromatography

DEAE sepharose CL6B column (1.6 x 20cm) 을 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer로 평형화 시킨 후 조효소를 적하하고 0~1.0M KCl (20mM Tris-HCl buffer, pH 7.4)으로 농도구배를 형성시켜 column을 전개하였다. 각 분획은 6ml/hr의 유속으로 1ml씩 수집하였으며 혈전분해활성은 fibrin plate를 사용하여 측정하였다. 활성분획을 확인한 결과 0M의 KCl 구획에서 혈전분해활성을 확인하였으며, 1.0M의 농도구배 구간에서는 활성분획이 존재하지 않음을 확인하였다. 0M의 KCl 구획에서 0~50 번 분획을 혈전분해 활성분획으로 회수하였고 혈전분해 활성은 조추출물에 비해 29 배 증가하였고 회수율은 42% 였다 (Fig. 3, Table 1).

3.1.3. CM cellulose column chromatography

CM cellulose column (1.6 x 20cm)을 20mM Citric acid (pH 6.8)

buffer로 평형화 시킨 후 조효소를 적하하고 0~1.0M KCl (20mM Tris-HCl buffer, pH 7.4)으로 농도구배를 형성시켜 column을 전개하였다. 각 분획은 6ml/hr의 유속으로 1ml씩 수집하였으며 혈전분해활성은 fibrin plate를 사용하여 측정하였다. 활성분획을 확인한 결과, DEAE sepharose CL6B column 과 마찬가지로 0M의 KCl 구획에서 혈전분해활성을 확인하였으며, 1.0M의 농도구배 구간에서는 활성분획이 존재하지 않음을 확인하였다. 0M KCl 농도의 0~50 번 분획을 혈전분해 활성분획으로 회수하였고 혈전분해 활성은 조추출물에 비해 57 배 증가하였고 회수율은 34% 였다 (Fig. 3, Table 1).

3.1.4. Sephadex G-75 column chromatography

이온 교환수지 크로마토그래피를 통해 얻어진 혈전분해 활성 시료를 20mM Tris-HCl (0.1M KCl, pH 7.4) buffer 로 현탁하여 Sephadex column (1.0 x 63cm) 에 적하한 후, gel filtration을 수행하여 0~50 번 분획으로부터 혈전분해 활성분획으로 회수하였다. 혈전분해 활성은 조추출물에 비해 약 57 배 증가하였으며 회수율은 7% 였다 (Fig. 3, Table 1).

3.1.5. Hiload 16/600 sephadex

Hiload 16/600 sephadex 을 시료를 20mM Tris-HCl (0.1M KCl, pH 7.4) buffer 로 평형화 시킨 후 활성단백질을 적하하고 1.0M KCl (20mM Tris-HCl, pH 7.4) 의 농도구배를 형성시켜 컬럼을 전개하였다. 이때 flow rate 0.5 ml/min, fraction size 0.5 ml씩 컬럼을 분획하였다.

혈전분해효소를 순수정제하기 위하여 Hiload 16/600 sephadex (1.6 x 60cm)을 이용하여 FPLC를 수행한 결과, 36번 분획을 혈전분해활성으로 회수하였으며 회수된 단백질 총량은 0.83mg, 효소활성은 57.65배 증가하였고 회수율은 2.5%로 확인되었다. (Fig. 3, Table 1).

3.2. 혈전분해효소의 특성분석

3.2.1. 혈전분해효소의 분자량 측정 및 혈전분해 활성검색

Hiload 16/600 sephadex column에서 정제된 단백질은 SDS-PAGE를 수행하여 분자량을 분석하였다. 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE에 정제효소 20 μ g과 5X sample buffer를 혼합하고 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 증탕하여 전기영동을 수행하였으며 protein marker를

사용하여 분자량을 확인하였다. 전기영동을 시행한 gel은 Coomassie blue R-250으로 염색하였다.

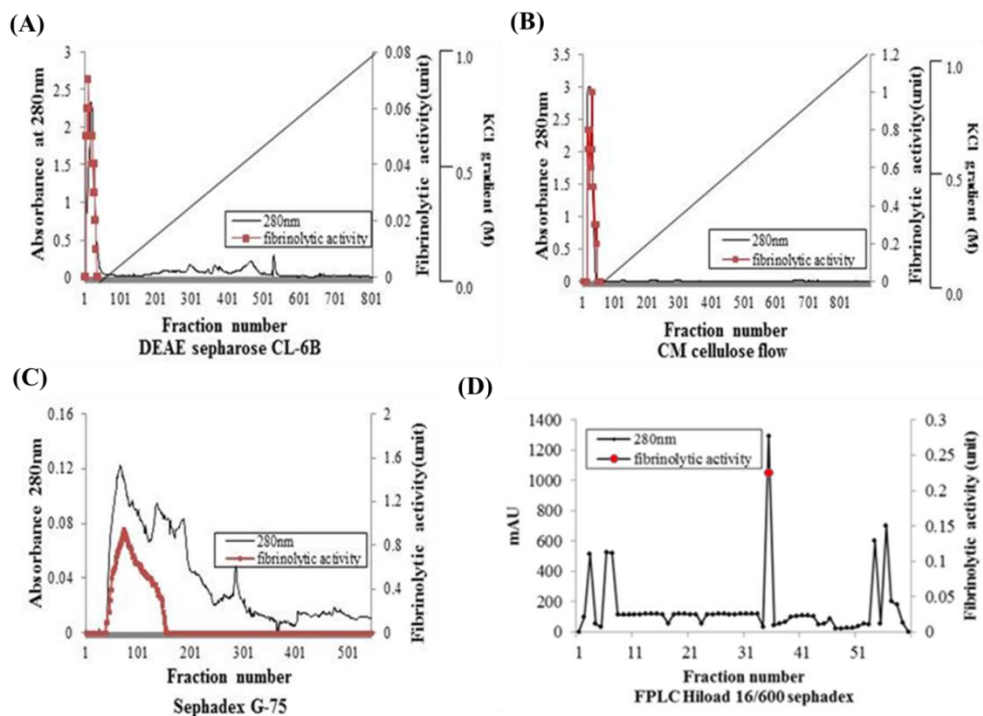


Figure 3. Purification of fibrinolytic enzyme (ulvase) from *Ulva pertusa*. (A) Anion exchange chromatography of ulvase by DEAE-Sephacel CL-6B column equilibrated with 20mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer with a linear gradient of 0-1 M KCl at a flow rate of 6ml/hr. (B) Cation exchange chromatography of ulvase by CM cellulose flow equilibrated with a linear gradient of 0-1 M KCl at a flow rate of 6ml/hr. (C) The collected fractions with fibrinolytic activity were applied to gel filtration chromatography with Sephadex G-75 column equilibrated with the same buffer at a flow rate of 6ml/hr. (D) The active fractions containing fibrinolytic activity from (C) were subjected to FPLC Hiload 16/600 sephadex equilibrated with the same buffer at a flow rate of 1.0ml/min with linear gradient of KCl (0-1.0 M).

Table 1. Summary of the purification of ulvase from *Ulva pertusa*.

The activity was measured by the enzyme activity assay as described in materials and methods. The units of activity are calculated on the basis of the plasmin standard.

Purification	Total protein (mg)	Total Activity (Unit)	Specific Activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold
Homogenate	3148.50	–	–	–	–
Crude extract	1891.23	9680	5.12	100	1
DEAE–sepharose CL6B	27.699	4050	146.21	41.8	28.56
CM–cellulose	11.22	3250	289.66	33.6	56.57
Sephadex G–75	4.711	631	291.2	6.5	56.87
Hiload 16/600 sephadex	0.83	245	295.18	2.5	57.65

정제된 혈전분해효소 단백질 band는 protein marker 55kDa 부분에서 관찰되었으며 약 55kDa 크기로 확인되었다(Fig.4). 정제된 효소의 혈전분해 활성 검색을 위하여 fibrin plate에 효소 10 μ g을 침적, 12시간 반응하여 혈전분해 활성을 검색하였다. 정제된 효소는 plasmin 1unit와 비교하여 약 1.72배 크기의 용해환을 형성하는 것으로 확인되었다(Fig.5). 이상의 정제된 효소는 fibrinolytic activity가 뛰어나므로 차후 혈전용해제제로 사용되는데 큰 이점으로 작용할 것으로 사료된다.

3.2.2. Turbidimetric lysis assay

Fibrinogen 과 thrombin 을 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 반응 시켜 fibrin clot 을 형성하였다. 형성된 fibrin clot 에 buffer 만 처리한 control 과 ulvase 5 μ g, 10, μ g, 15 μ g 를 처리한 실험군은 96-well plate reader 에서 30 분 동안 405nm 에서 분석하였다. buffer 만 처리한 control 의 경우 fibrin clot 이 형성 되어 0.9 의 흡광도가 관찰되었고 ulvase 15 μ g을 처리하였을 때는 0.6 의 수치를 보이며 fibrin 이 분해된 것을 확인하였다(Fig. 6).

3.2.3. 온도에 의한 ulvase의 활성분석

혈전분해효소 반응의 최적온도를 검토하기 위하여 정제된 효소를 10~80℃에서 각각 1시간씩 반응시킨 후 효소를 fibrin plate에 침적하고 fibrin plate assay를 12시간 진행하였다. 효소반응 최적온도는 40℃에서 가장 높은 혈전분해효소 활성을 가지는 것으로 확인하였다(Fig. 7). 또한 50℃ 이상의 온도에서는 그 활성이 급감하기 시작하여 70℃ 이상의 온도에서는 정제효소의 혈전분해활성이 모두 실활 되는 것으로 관찰되었다.

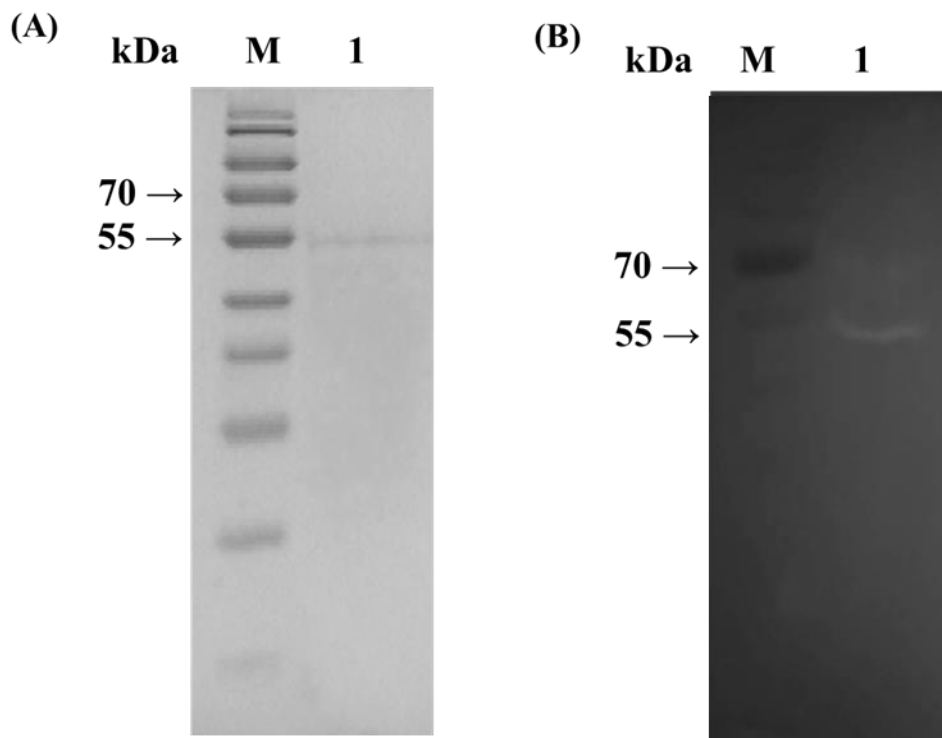


Figure 4. Molecular weight determination of fibrinolytic enzyme of ulvase using by SDS-PAGE and fibrin zymography. SDS-PAGE was carried out in 12% polyacrylamide gel. The protein in the gel was stained with coomassie brilliant blue R-250. (A) M; protein standard marker; lane 1, purified fibrinolytic enzyme from *Ulva pertusa* on SDS-PAGE; (B) M; protein standard marker; lane 1, purified fibrinolytic enzyme from *Ulva pertusa* on fibrin zymography. Fibrin zymography was carried out in 12% polyacrylamide gel containing 1% fibrin. After immersion of the gel plate in 20mM Tris-HCl (pH 7.4) to grade the fibrin, the fibrinolytic region in the gel was revealed as a colorless band with a blue background, by CBB.

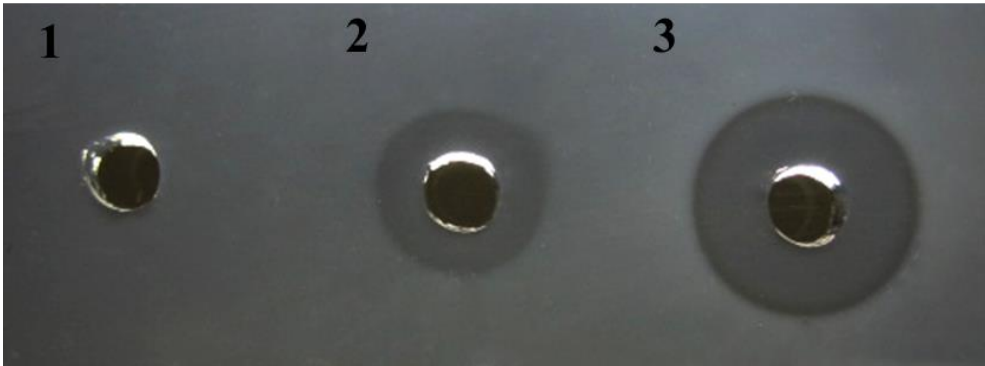


Figure 5. Fibrinolytic activity of purified enzyme on a fibrin-agarose plate. Samples were on plate and incubated for 12hr at 37°C. 1, negative control (20mM Tris-HCl buffer, pH 7.4); 2, positive control (Plasmin 1U/ μ g) ; 3, (10 μ g purified enzyme).

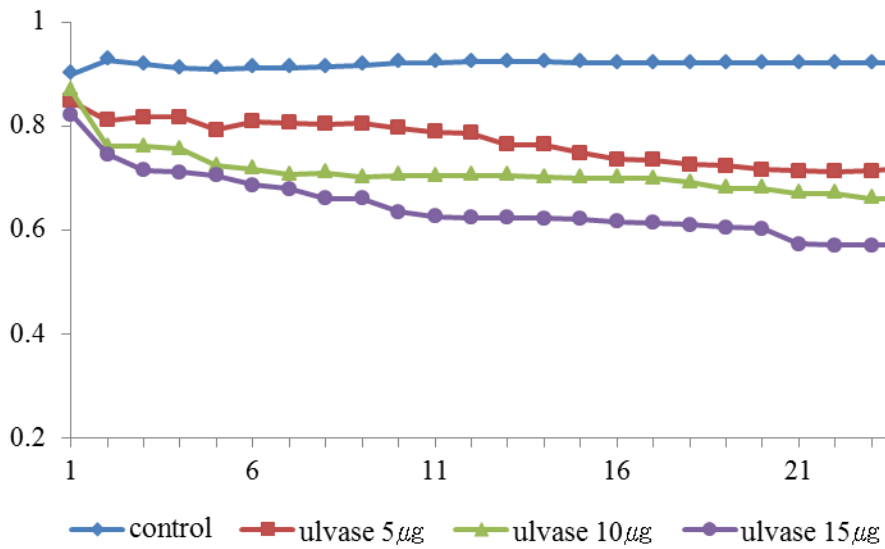


Figure 6. Fibrin clot lysis was monitored by turbidity assay. Fibrin clot was prepared as described in materials and methods by combining thrombin and fibrinogen and lysis was initiated by adding different concentrations of ulvase. The decrease in turbidity was measured at 405nm.

정제효소의 열 안정성 검토를 위해 10~80℃의 온도에서 각각 12시간씩 반응시킨 후 효소를 fibrin plate에 침적하고 fibrin plate assay를 12시간 진행하였다. 30℃~50℃ 구간에서 정제한 효소가 비교적 열에 안정적이며 높은 혈전분해활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 30℃에서 정제효소가 가장 열에 안정적이며 90% 이상의 혈전분해활성을 나타내었으며 50℃ 이상부터는 급격한 혈전분해 활성 감소를 나타내었다 (Fig.7).

3.2.4. pH에 의한 ulvase의 활성 분석

혈전분해효소 반응의 최적 pH를 검토하기 위하여 정제효소를 pH 2~11의 pH buffer에 첨가하여 1시간 반응시킨 후 fibrin plate assay를 수행하여 혈전분해활성을 확인하였다. 분리된 효소는 pH 5부터 pH 8까지 비교적 안정적인 활성을 나타내었으며 특히 pH 6에서 가장 최적의 활성을 보이는 것으로 확인되었다 (Fig.7).

정제된 효소의 pH 안정성을 검토하기 위해 정제효소를 pH 2~11까지의 pH buffer에 첨가하고 4℃ 환경에서 24시간 방치한 뒤 반응액을 pH buffer를 첨가하여 pH 5로 적정하고 fibrin plate에 침적하여 그 활성을

관찰하였다. 분리된 효소는 pH 5부터 pH 7의 범위에서 안정적인 활성을 가지고 있음이 확인되었고 pH 6에서 가장 안정적인 활성을 유지하며, 95 % 이상의 혈전분해 활성이 유지되었다 (Fig.7).

3.2.5. 금속 이온에 의한 ulvase의 활성 분석

금속 이온에 의한 혈전분해활성을 분석하기 위하여, 각각 2mM 농도의 CsCl, MnCl₂, CaCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, F₂SO₄, CuSO₄ 용액을 조제하여 최종농도가 1mM이 되도록 정제된 효소 20 μ g과 동일한 volume의 용액을 처리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시킨 후 azocasein assay를 수행하여 금속에 대한 혈전분해효소 활성을 분석한 결과 F₂SO₄, CuSO₄에 의해서 약 24% 정도 그 활성이 크게 감소하였고, MgCl₂에 의해 효소의 활성이 약 10% 감소 하였다. (Fig. 8)

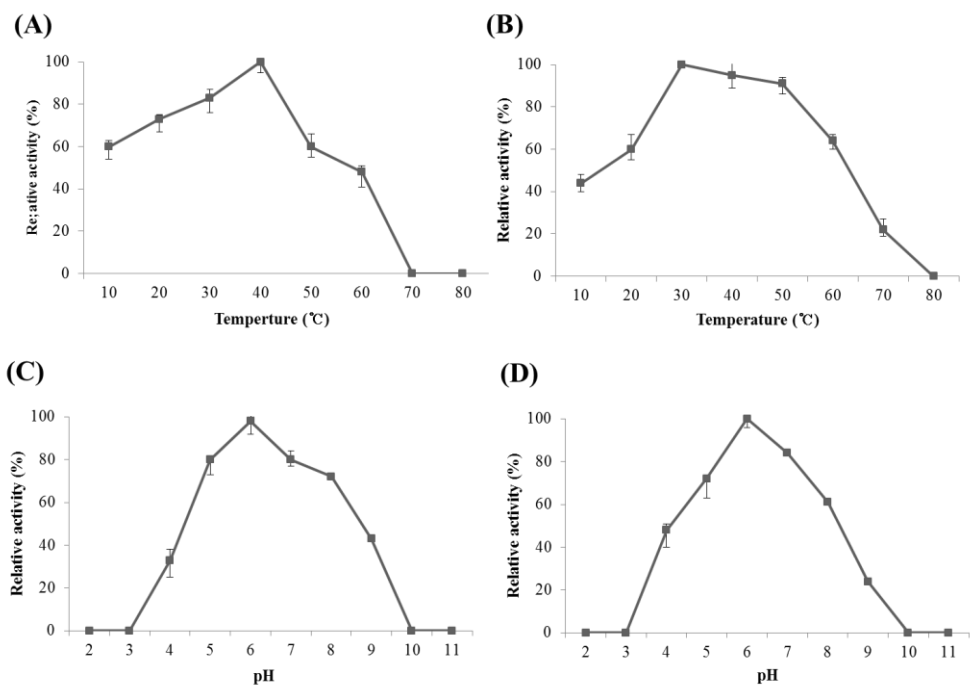


Figure 7. Biochemical properties of ulvase. A–D, effects of temperature and pH on the activity and stability of ulvase. Optimum temperature on the activity (A) and the thermostability of ulvase (B) were determined at various temperatures (10–80°C). Optimum pH (C) stability of ulvase (D) were determined by assessing the enzyme activity in the pH range of 2–5 with various pH buffers; 0.1M sodium acetate–HCl, phosphate–NaOH, Tris–HCl, glycine–NaOH.

3.2.6. 단백질 분해효소 저해제에 의한 ulvase의 활성 분석

단백질분해효소 저해제인 EGTA, EDTA, Pepstain A, APMSF, PMSF, TLCK, TPCK, Aprotinin을 정제효소에 처리한 뒤 그 활성을 관찰하였다. APMSF가 처리된 실험군에서는 정제효소의 활성이 가장 많이 실행 되는 것을 확인 할 수 있었으며 그 다음으로는 PMSF에서 정제효소의 활성이 많이 실행 되는 것을 확인하였다. 다른 실험군에서는 대조구와 비교하여 볼 때 결과의 유의성이 없는 것을 확인 할 수 있었다. Ulvase는 serine protease inhibitor 인 APMSF, PMSF, TLCK, TPCK 에 활성저해를 나타내므로 serine protease 임을 확인하였고, metalloprotease inhibitor 인 EDTA, EGTA 에 의해 활성이 다소 저해 되었으나 결과의 유의성이 없는 것을 확인하였다 (Fig. 9)

3.2.7. Ulvase의 fibrin 및 fibrinogen에 대한 분해패턴 분석

a. Fibrinogenolysis

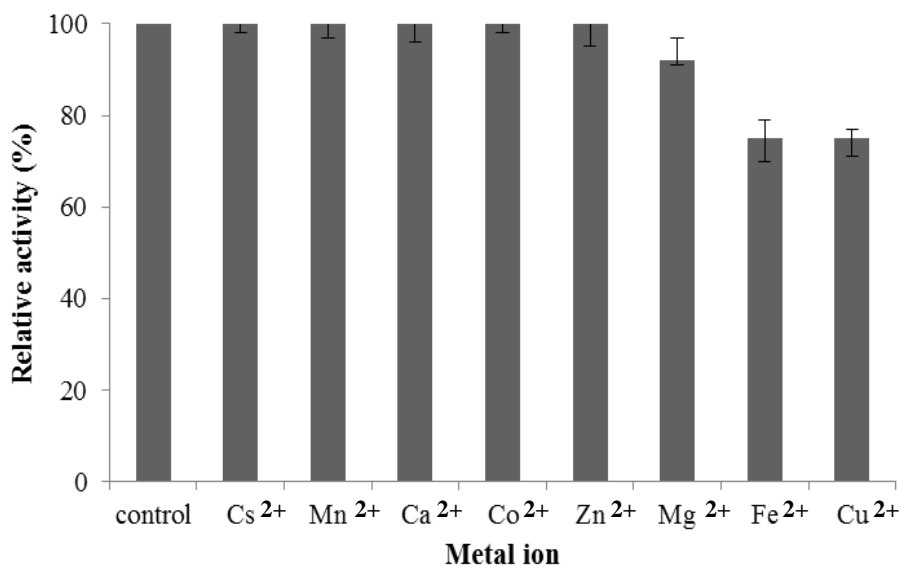


Figure 8. Effect of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme from *Ulva pertusa*. The enzyme was pre-incubated with 1mM metal ion in citric-NaOH(pH 5.0) buffer for 1h at 37°C. After incubation, the mixture was performed the fibrin plate assay. The relative activity was expressed as percentage.

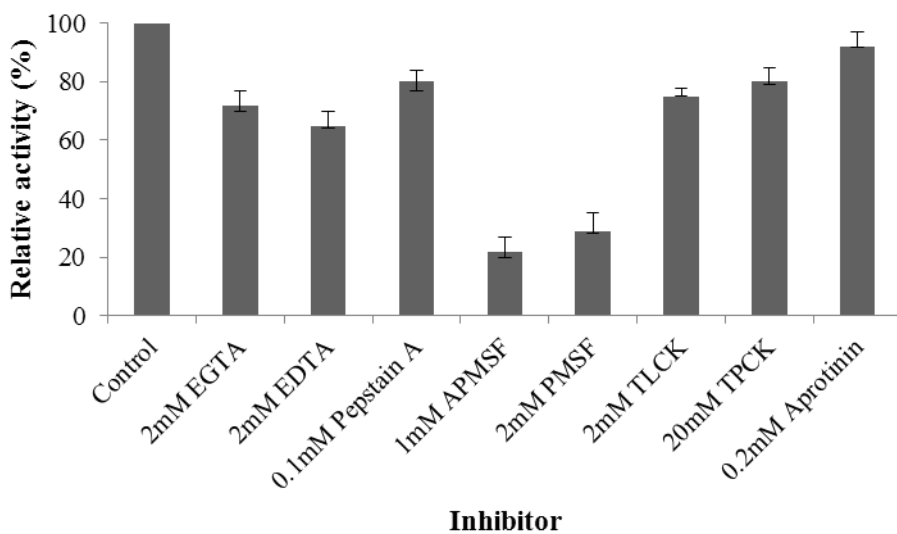


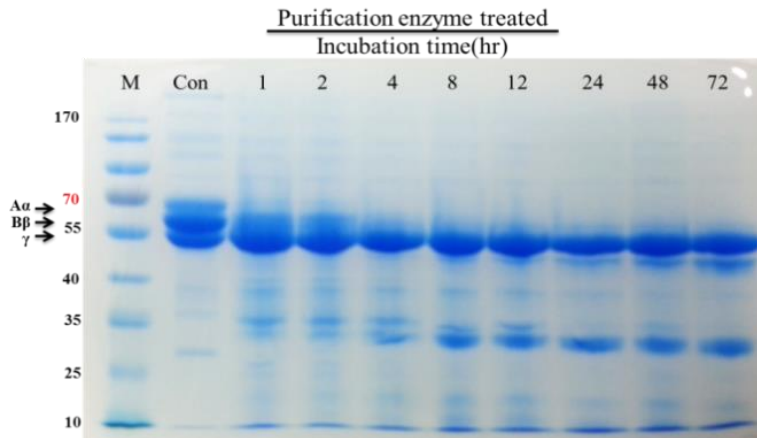
Figure 9. Effect of protease inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from *Ulva pertusa*. The enzyme was pre-incubated with various protease in citrate NaOH (pH 5.0) buffer for 1h at 37°C. After incubation, the mixture was performed to the fibrin plate assay. The results were expressed as percentage relative activity to that of none.

정제된 효소 ulvase 를 Fibrinogen (4 μ g)과 처리하여 시간 별로 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 반응시킨 후 12% SDS-PAGE 를 수행하여 fibrinogen 분해 패턴을 확인한 결과 ulvase 는 fibrinogen 의 α -chain 을 신속히 분해하였으며 β -chain 을 서서히 분해하였다 (Fig. 10. A). 특히 ulvase 는 fibrinogen 의 α -chain 과 β -chain 을 완벽히 분해하는 것을 확인하였다.

b. Fibrinolysis

Fibrinogen (4 μ g)과 thrombin (0.1unit)을 상온에서 1 시간 동안 반응시켜 fibrin 을 조제한 후 동일 양의 혈전분해효소를 처리하여 시간 별로 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 반응시킨 후 12% SDS-PAGE 를 수행하여 fibrin 분해 패턴을 확인하였다 (Fig. 10. B). 구멍 갈파래로부터 정제된 효소는 fibrin 의 α , β 그리고 γ - γ chain 을 서서히 분해하였으며 γ - γ chain 의 경우 72 시간 후 fibrin 의 모든 subchain 들이 거의 다 분해가 된 것을 확인하였다. Ulvase 는 fibrin 의 전구체인 fibrinogen 을 분해할 뿐 아니라 fibrin 을 거의 완전히 분해함에 따라 체내 혈전 용해와 혈전 형성의 예방에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

(A)



(B)

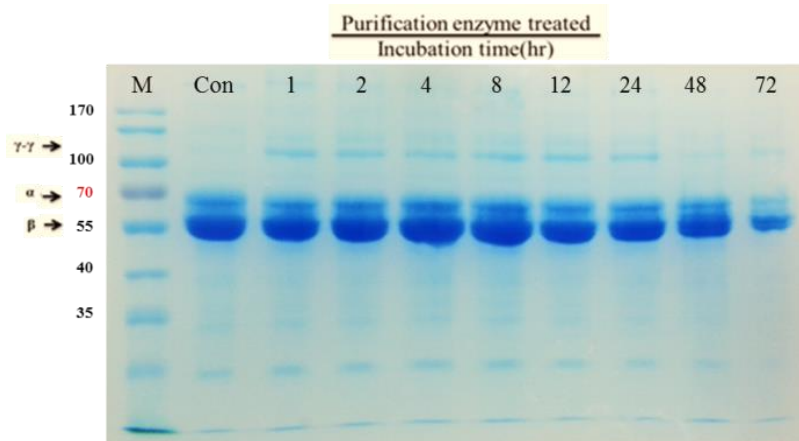


Figure 10. Fibrinogenolysis (A) and fibrinolysis (B) patterns exhibited by the fibrinolytic enzyme purified from *Ulva pertusa*. Fibrin and fibrinogen were incubated with purified fibrinolytic enzyme for various times as indicated.

3.2.8. 기질분해 특성분석

단백질분해 특성을 확인하기 위하여 tPA-like(S-2288), Urokinase-likes(S-2444), Thrombin-like(S-2238), Plasmin-like(S-2251), Factor Xa-like(S-2222) 등의 Chromogenic substrate 를 구입하여 *Ulva pertusa* 에서 분리된 혈전분해 효소와 반응시켜 특성을 분석하였다. Chromogenic substrate 중 S-2288 과 S-2444 에서 가장 높은 반응을 나타내었다. (Table. 2)

따라서 t-PA와 urokinase에 특이적인 chromogenic substrate에서 amidolytic activity가 비교적 높은 결과를 보면 분리·정제된 효소는 plasminogen activator 계열의 urokinase 또는 t-PA like protease로 작용한다는 것을 확인하였다.

3.2.9. 아미노산 서열 분석

정제된 *Ulva pertusa* 의 혈전분해효소는 SDS-PAGE 전기영동 후 PVDF membrane 에 120 mA 의 전류로 transfer 를 수행하고 염색 후 50 kDa 크기의 band 를 잘라내고 건조하여 한국질량분석기술원에 N-terminal sequence analysis 를 의뢰하였다. 정제 효소의 N-terminal amino acid

서열을 분석한 결과 Table. 2 와 같은 13 개의 아미노산 서열(NYDAATLPEELYF)을 얻을 수 있었다. 정제 효소의 amino acid 서열은 *Acinetobacter radioresistens* 에서 정제된 serine protease(NCBI NO, WP005404909)와 53.64%의 상동성을 지니는 것을 확인하였고, amoeba 의 종류인 *Entamoeba invadens* 의 serine protease(NCBI Accession, BAH98107)와도 53.84%의 상동성을 가지고 있었다. 또한 *Lactobacillus salivarius* 에서 정제된 serine protease(NCBI Accession, WP003701479)와도 53.84%의 상동성을 확인되었다(Table. 3,4).

3.2.10. 정제된 효소의 in vitro 혈전 분해 분석

a. 정제효소에 대한 fibrin clot 분해 분석

Table 2. Amidolytic activity of ulvase on synthetic chromogenic substrates.

Each value represents the mean \pm SD for three determinations.

Synthetic protease substrat	Activity (μ mol/min/mg)	Protease
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	41.2 \pm 1.5	t-PA
pyroGlu-Gly-Arg-pNA	39.7 \pm 3.3	Urokinase
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	0	Thrombin
H-D-Val-Leu-Lys-pNA	0	Plasmin
Bz-Ile-Glu-(OR)-Gly-Arg-pNA	0	Factor Xa

Table 3. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of the purified fibrinolytic enzyme from *Ulva pertusa* with algae protease and hypothetical protein.

Enzyme	Alignment of N-terminal amino acid sequence										NCBI Accession	
<i>Ulva pertusa</i>	Y	D	A	A	T	L	P	E	E	L	Y	–
Serine protease [<i>Acinetobacter radioresistens</i>]	Y	D	A	A	N	L	R	D	A	L	Y	WP005404909
Serine protease [<i>Entamoeba invadens</i>]	Y	N	S	F	T	L	P	Q	E	L	F	BAH98107
Serine protease [<i>Lactobacillus salivarius</i>]		D	V	A	T	L	K	E	E	L	Y	WP003701479

Ulvase 의 혈전을 분해능을 알아보기 위해 Human fibrinogen 과 thrombin 을 이용하여 fibrin clot 을 형성 시킨 후 ulvase (30 μ g) 를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 항온기에서 24 시간동안 시켰더니 50%의 fibrin clot lysis 를 확인하였다. 이로 인해 ulvase 가 fibrin clot 분해능이 있음이 확인되었다(Fig. 11).

b. 정제효소에 대한 mouse blood clot 분해 분석

Blood clot에 대한 직접적인 ulvase의 분해능을 확인 하기 위해 mouse blood clot에 ulvase 를 각각의 농도 (50 μ g, 100 μ g 200 μ g) 로 처리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 반응시켰더니 ulvase을 첨가하지 않은 blood clot에서 분해능이 보이지 않았고, ulvase 50 μ g을 처리한 blood clot에서는 12%의 분해를 보였고, 100 μ g을 처리한 blood clot에서는 ulvase 50 μ g을 처리했을 때 16%의 분해를 확인하였고 마지막으로 ulvase 200 μ g을 처리하였을 때에 약 48%의 blood clot을 보임으로 혈전을 분해하는데 ulvase가 활성이 있음을 확인되었다(Fig. 12).

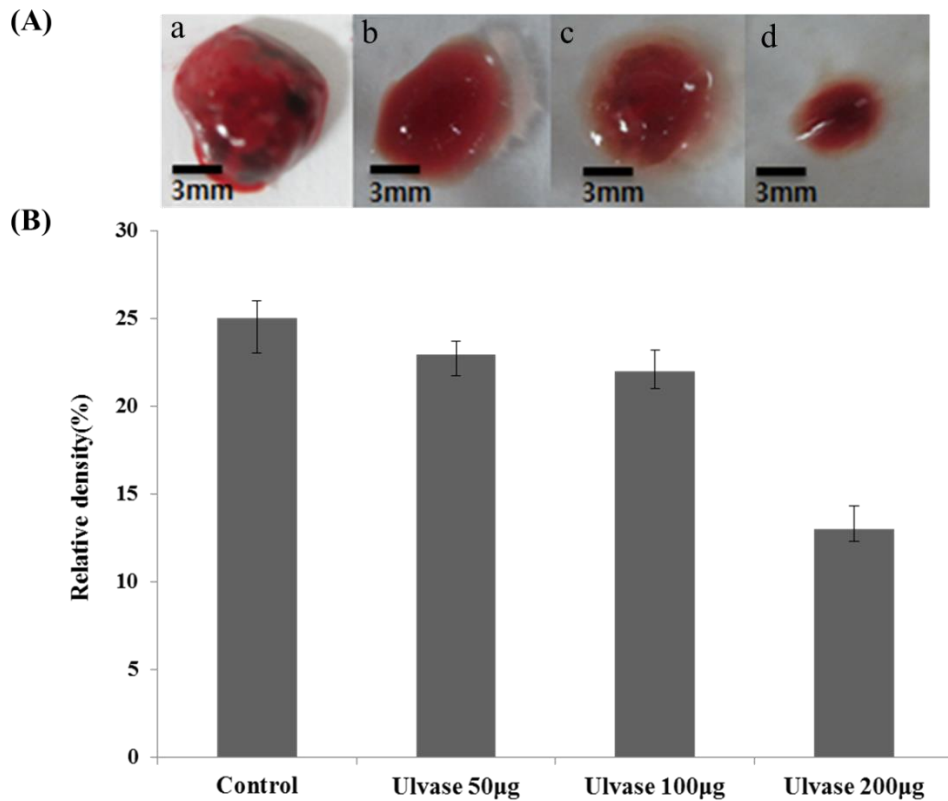


Figure 11. Whole mouse blood clots were incubated with normal saline, ulvase($50\mu\text{g/ml}$), ulvase($100\mu\text{g/ml}$) and ulvase($200\mu\text{g/ml}$) for 12h at 37°C . After incubation the residual clot was photographed with a Canon IXUS100IS digital camera.

3.2.11. 정제된 효소의 in vivo 혈전 분해 활성 분석

a. Carrageenan-induced mouse tail thrombosis model

Thrombosis 유도 후 ulvase 와 u-PA 가 tail 에 유도된 thrombosis 에 미치는 영향을 확인하여 ulvase 의 혈전분해활성을 분석하였다. Positive control 로 carrageenan 만 처리하여 tail 에 thrombosis 일으켰을 때 길이는 5cm 로 확인되었고 비교군으로 혈전분해제로 사용되는 u-PA 300IU 를 처리한 결과, thrombosis tail 의 길이가 2.2cm 로 혈전분해 효과가 있는 것으로 확인되었다. 마지막으로 ulvase 의 활성을 알아보기 위해 두 개의 농도로 주입하였다. Ulvase 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 처리하였을 때 3cm, ulvase 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 처리하였을 때 1cm 로, 혈전용해제로 사용되고 있는 u-PA 300IU 보다 높은 thrombosis 분해활성이 확인되었다(Fig. 13).

b. Collagen/epinephrine-induced thromboembolism model

Ulvase 의 anti-thromboembolism 효과를 분석하기 위해 색전증 유발 1시간 전에 복강을 통하여 ulvase를 주입하였고, 주입 1시간 후 복강주사를 이용하여 epinephrine (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 collagen (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 을 주입하여

최종적으로 15분 이내에 mouse 의 mortality 와 paralysis 여부를 분석하였다. Saline만 처리한 negative control에서는 100%의 생존율을 보였고, positive control로 epinephrine (150 μ g/ml)과 collagen (250 μ g/ml)을 주입하였을 때는 10%의 생존율만 나타냄으로써 thromboembolism model이 이상없이 유도되었음을 확인하였다. 최종적으로 ulvase가 thromboembolism model에 효과가 있는지 확인하기 위하여 복강주사를 이용하여 ulvase 100 μ g/ml를 위와 같은 방법으로 전처리하고 15분 동안 관찰한 결과, 20%가 paralysis 되었음을 확인하였고, ulvase 200 μ g/ml를 전처리 하였을 때는 10%가 paralysis 되었음을 확인하여 ulvase가 색전증 모델에 대해 80% 이상의 예방효과가 있음을 확인하였다(Fig. 14)

3.2.12. 정제된 효소의 항응고 활성 측정

항응고 활성을 측정하기 위하여 Coagulation parameters 에 ulvase 를 각각 30 μ g, 60 μ g, 90 μ g, 120 μ g 씩 첨가한 후 측정한 결과, 농도에 비례하여 응고 시간이 지연되는 것을 확인하였다. 특히 aPTT 같은 경우에는 60 μ g 이상 처리하였을 때는 분석기기가 측정할 수 있는 최대치인 180 sec 이상의 지연 반응을 보여 ulvase 의 높은 항응고 활성을 확인하였다(Table. 5).

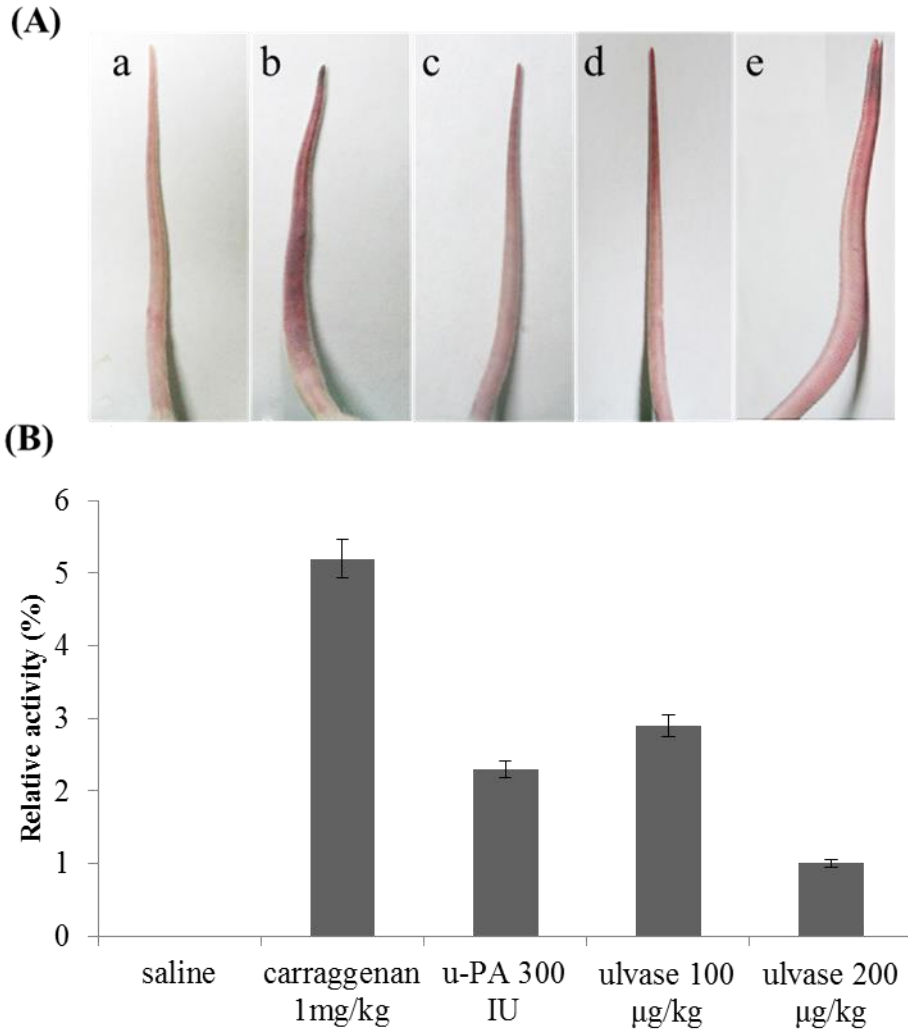


Figure 12. Effects of Ulvase and u-PA on thrombus formation induced by carrageenan in mouse tail. (A) Infracted tail of mice after injection with saline (a), carrageenan (1mg/kg) (b), u-PA (300IU/kg)+carrageenan (c), Ulvase (100µg/kg)+carrageenan (d), Ulvase (200µg/kg)+carrageenan (e). (B) Mean length of infracted tail of mice. Each value is expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

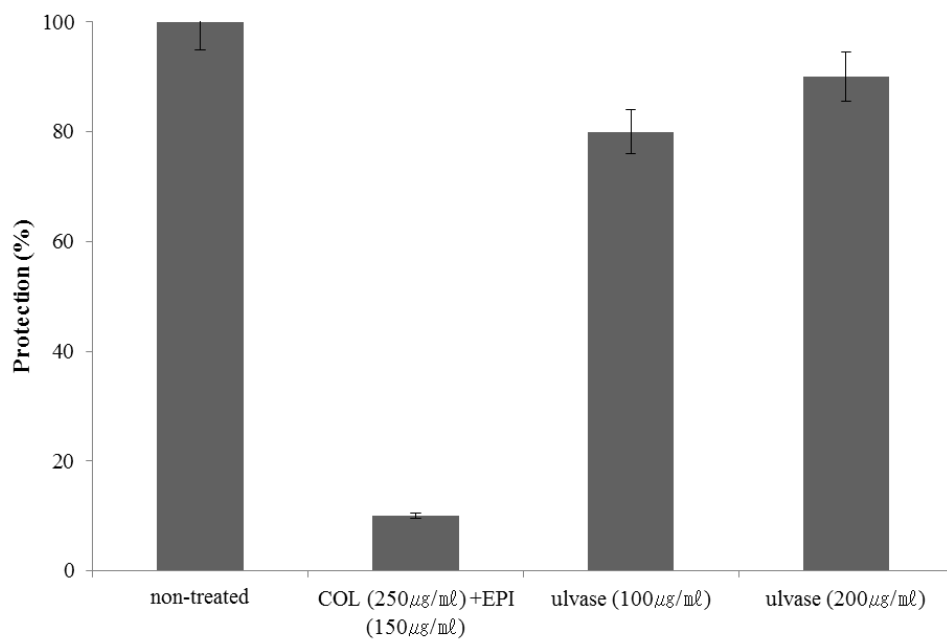


Figure 13. Effects of ulvase and non-treated and collagen and epinephrine-induced death in mice. Each value is expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

3.2.13. 정제된 효소의 혈소판 활성화

Ulvase 의 전혈 혈소판 항응집 활성을 측정하기 위하여 ulvase 30 μg , 60 μg , 90 μg , 120 μg 씩을 collagen/EPI cartridge 에 처리한 후 응고시간을 측정하였다. 그 결과, ulvase 의 농도에 비례하여 전혈 혈소판의 응고시간이 점차 지연되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 지혈 기전에 관여하는 혈소판의 응집반응이 ulvase 농도의존성 지연활성을 확인하였다(Table. 6).

3.2.14. Recalcification time assay

혈장에 동일한 양의 칼슘을 첨가한 후 ulvase 를 각각 1, 10, 20, 30 μg 의 농도로 첨가하였다. ulvase 를 첨가하지 않은 control 에서는 응고반응이 시작되어 0.16 에서 응고된 혈장의 최대 값을 확인하였고, ulvase 를 1 μg 처리 하였을 때 0.08, 10 μg 을 처리하였을 때 0.025, 20 μg 을 처리하였을 때 0.015, 30 μg 을 처리하였을 때는 혈장이 거의 응고되지 않음을 확인하였다(Fig. 15).

Table 4. Effects of ulvase on coagulation parameters.

Each value is expressed as mean \pm SD of at least independent experiments. $p < 0.05$, compared with untreated control

		Coagulation parameters (Closure time)			
		PT(sec)	aPPT(sec)	TT(sec)	Fb(mg/dL)
EPI/COL		11.7 \pm 0.12	27.30 \pm 0.23	8.6 \pm 0.75	227.5 \pm 2.0
ulvase	30 μ g	12.6 \pm 0.20	154.2 \pm 0.17	7.3 \pm 0.89	278.4 \pm 0.18
	60 μ g	13.1 \pm 0.15	> 180 \pm 0	8.0 \pm 0.19	248.0 \pm 0.98
	90 μ g	13.6 \pm 0.07	> 180 \pm 0	8.5 \pm 0.30	230.7 \pm 0.85
	120 μ g	14.4 \pm 0.25	> 180 \pm 0	9.5 \pm 0.78	202.0 \pm 0.78

Table 5. Analysis of platelet functions PFA–100 assay.

Each value is expressed as mean \pm SD of at least independent experiments. $p < 0.05$. compared with untreated control.

	Platelet closure time (sec)				
	<u>EPI/COL</u>	<u>87.5ul</u>	175ul	262.5ul	350ul
<i>Ulva pertusa</i>	111sec	154 sec	192 sec	207 sec	249 sec

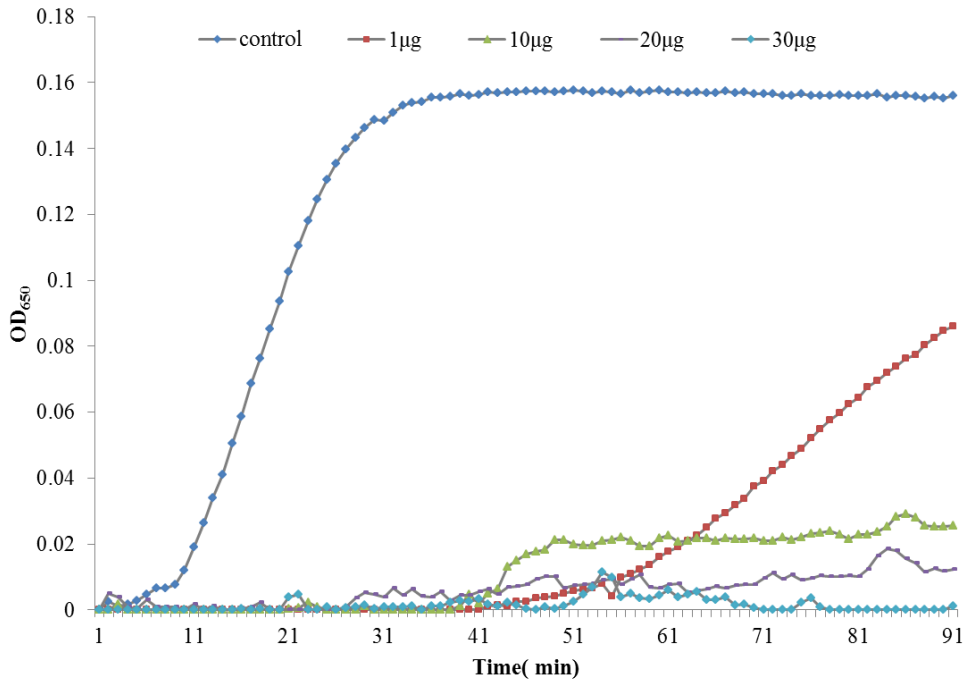


Figure 14. Recalcification time. citrated bovine plasma(30 μ L) was incubated in the absence (\blacklozenge) or in the presence of 1 μ g (\blacksquare); 10 μ g (\blacktriangle); 20 μ g (—); and 30 μ g (\bullet) of ulva extract for 10 min at 37°C prior to the addition of CaCl₂ (20mM).

3.2.15. 정제된 효소의 출혈 분석

지혈능을 측정하기 위하여 saline 과 ulvase 100 μ g, u-PA 300IU 를 각각 처리한 다음, tail 의 끝 부분을 자른 후 증류수에 담가 출혈시간을 측정하였다. 측정한 결과 saline 의 경우 약 720 초에서 지혈이 되었고, ulvase 는 1000 초, u-PA 는 1350 초에서 각각 지혈이 되는 것으로 확인되었다. 최종적으로 ulvase 는 saline 보다는 지혈되는 시간이 280 초 정도 지연되었지만 u-PA 와 비교하였을 때 350 초 정도로 지혈되는 시간이 단축되는 것을 확인하였다(Fig. 16).

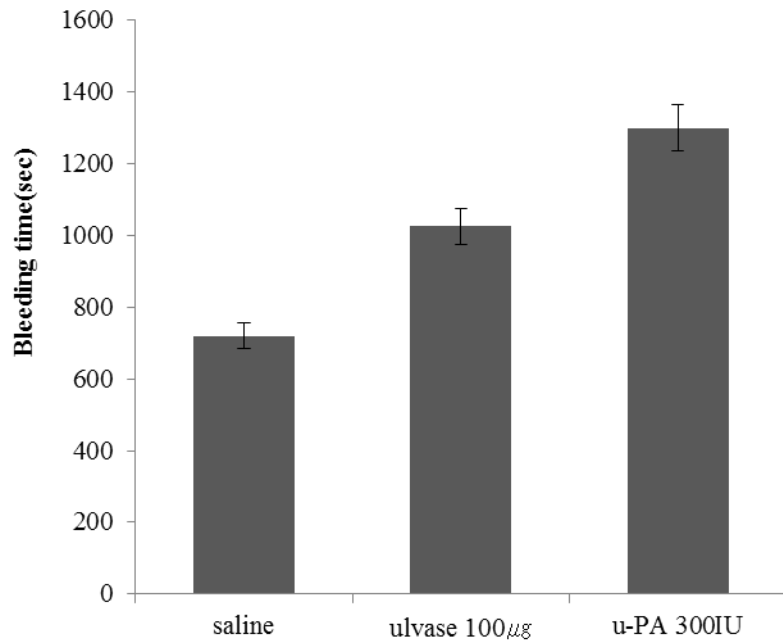


Figure 15. Effect of ulvase in tail bleeding time. Mice were injected with saline, ulvase(100 micro mol/kg), and u-PA (0.12 micro mol/kg) intravenously in the tail veins of mice. Thirty minutes later the bleeding time were recorded. Each value is expressed as mean \pm SD of at least three independent experiments. * $p < 0.05$, compared with control.

4. 고찰

전 세계 사망원인의 상위권을 다투고 있는 혈전질환관련의 질병은 최근 우리나라뿐 아니라 서구화된 식생활과 과도한 스트레스, 노인성 질환 등의 원인으로 더욱 증가되고 있는 추세이다. 현재 임상에서 사용되고 있는 plasminogen, streptokinase, urokinase, tissue specific plasminogen activator 계열의 혈전분해제들은 혈전에 대해 낮은 특이성을 가지고 있어 반감기가 짧으며, 국소적인 출혈 또는 발열, 알러지 등의 다양한 부작용을 내포하고 있다. 이러한 추세에 맞추어 직접 혈전에 작용하고 부작용을 최소화시킬 수 있으며 저렴한 가격의 혈전분해제를 개발 할 필요성이 대두되고 있다. 따라서 본 연구에서는 대량수집이 가능하고 수집 비용이 저렴한 구멍갈파래로부터 혈전분해효소를 정제하고자 하였고, 이에 따라 구멍갈파래로부터 혈전분해효소를 정제하고 그 특성을 분석하였다.

구멍갈파래의 혈전분해효소(ulvase)는 DEAE-Sephrose CL6B ion exchange column chromatography, gel-filtration, FPLC 등의 정제과정을 거쳐 분리정제 하였고 그 결과 혈전분해효소의 특이활성은 295.18unit/mg 으로 조추출물에 비하여 57.65 배 증가하였으며 회수율은 2.5% 이었다. 분리된 혈전분해 효소의 분자량은 50kDa 이었으며 최적온도 40℃, 안정온도는 30℃, pH 6 에서 최적의 효소반응을 나타내었다. 또한,

Fe^{2+} , Cu^{2+} 의 처리시 효소활성이 감소하고, Cs^+ , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 처리시 효소활성이 증가하였으며 단백질 활성 억제제의 처리시 금속 이온 등에 강하게 흡착하여 빼앗는 APMSF 와 PMSF 에 의해 혈전분해 활성이 저하되어 serine protease 임을 확인할 수 있었다.

Ulvase 의 fibrinolysis 및 fibrinogenolysis 를 분석한 결과 ulvase 는 fibrinogen 의 $A\alpha$ 단위체, $B\beta$ 단위체, fibrin 의 α 단위체, β 단위체의 chain 을 신속하게 분해함으로써 fibrinogenolytic, fibrinolytic 특성을 가지고 있음이 확인되었다. 이 결과 ulvase 가 혈전 형성에 큰 역할을 하는 fibrin 과 fibrin 의 전구체인 fibrinogen 에 대하여 직접 작용하여 분해특이성을 가짐으로써 혈전뿐만 아니라 혈전형성 예방효과를 내포하고 있는 것으로 확인하였다.

위와 같은 결과를 종합하여 볼 때 *ulva pertusa* 에서 분리된 혈전용해효소는 혈전관련질환에 대한 예방효과 및 혈전용해효과를 가진 약물개발소재로서의 가능성이 클 것으로 사료된다.

5. 감사의 글

가장 먼저 논문을 낼 수 있도록 저의 삶을 계획 해주신 하나님께 감사드립니다. 또한 이 자리에 오기까지 많은 가르침을 주신 김성준 지도교수님 및 전홍성 교수님, 정현숙 교수님, 박윤경 교수님, 이정섭 교수님께 감사의 말씀 드립니다.

대학교 4 학년 마무리 무렵 실험실에 들어와 부족한 저에게 가르침을 아끼지 않은 김승 교수님, 어렵고 지칠 때 많은 시간 같이 보내며 실험실 생활에 힘을 실어준 세은이 언니, 전반적인 실험과 논문에 있어서 많은 충고를 언제나 친절히 알려주고, 도와준 준희 오빠, 막내로서 이것저것 투정 부려도 잘 받아준 고마운 대원이 오빠, 언제나 웃으시며 논문과 실험수업을 병행 하시던 kumar 쌤, 동거동락 하며 외로운 대학원 생활을 마무리 할 수 있게 큰 힘이 되어준 식물방 심이, 언제나 웃음이 넘치고 같이 있으면 즐거운 슬아까지... 이렇게 논문을 마무리 하며 대학원 졸업을 앞두고 해주셔서 고맙습니다.

마지막으로 언제나 뒤에서 지켜봐 주시며 기도로 후원해 주시는 우리 엄마, 아빠, 너무나 사랑합니다. 그동안 말 안 듣고 속 많이 썩혔지만, 이제 행복 가득한 우리 집을 위해 노력 할게요. 이제 걱정 내려 놓고 웃을 날만 만들어 봐요. 그리고 세상에 하나밖에 없는 우리 오빠, 내가 많이 걱정 하고 아끼는거 알지?

마지막으로 글로 남기기엔 부족하지만, 이 자리에 있기까지 많은 도움 주신 분들께 감사 인사 드립니다.

2013년 12월 02일 늦은 어느 날 밤에...

6. 참고문헌

1. Marion M. Bradford A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry*, Volume 72, Issues 1-2, 7 May 1976, Pages 248-254
2. Tage Astrup, Sten Müllertz The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 40, Issue 2, October 1952, Pages 346-351
3. Patton, L. M., Pretzer, D., Schulteis, B. S., Saggart, K. D., Tennant, K. D. and Ahmed, N. K. Activity assays for characterizing the thrombolytic protein fibrolase. *J. Biochem. Biophys. Met.*, 27(1); 11-23, 1993.
4. U. K. Laemmli Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, Volume 227, Issue 5259, August 1970, Pages 680-685
5. Kim Seung-Ho, Choi Nack-Shick and Lee Woo-Yiel. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzyme on gels. *Anal. Biochem.*, 263; 115-116, 1998.
6. Leber, T. M. and Balkwill, F. R. Zymography: a single-step staining

method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal. Biochem.*, 249;24–28,

1997.

7. 이은주. 토끼털 송편버섯 균사체로부터 혈전 분해효소의 정제 및 특성분석. 석사학위논문. 2006.

8. M. Hagimori, S. Kamiya, Y. Yamaguchi, M. Arakawa, Improving frequency of thrombosis by altering blood flow in the carrageenan-induced rat tail thrombosis model. *Pharmacol. Res.* 60 (2009) 320–323.

9. M. Brozovic, J.V. Dacie, S.M. Lewis, *Practical Haematology*, eleventh ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, England, 1991. pp. 279–292.

10. E.L. Tucker, N.G. Verbout. P.Y. Leung. S. Hurst, O.J. McCarty. D. Gailani A. Gruber, Inhibition of factor XI activation attenuates inflammation and coagulopathy while improving the survival of mouse polymicrobial sepsis. *Blood* 119 (2012) 4762–4768.

11. Fox I, Dawson A, Loynds P, Eisner J, Findlen K, Levin E, Hanson D, Mant T, Wagner J, Maragaonre J. 1993. Anticoagulant activity of

Hirulog™, a direct thrombin inhibitor, in humans. *Thromb Haemost* 69: 157–163.

12. Momi S, Emerson M, Paul W, Leone M, Mezzasoma AM, Del Soldato P, Page CP, Gresele P. Prevention of pulmonary thromboembolism by NCX 4016, a nitric oxide–releasing aspirin. *Eur J Pharmacol* 2000 May 26;397(1):177–85

13. A.M. Carter. C.M. Cymbalista, T.D. Spector. P. J. Grant. Heritability of clot formation, morphology. And lysis: the EuroCLOT study. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 27 (2007). pp. 2783–2789

14. Wang X, Cheng Q, Xu L, Feuerstein GZ, Hsu MY, Smith PL, et al. Effect of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride–induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost* 2005;3:695–702

15. Gresele, P., Corona, C., Alberti, P., Nenci, G.G., 1990. Picotamide protects mice from death in a pulmonary embolism model by a mechanism independent from thromboxane suppression. *Thromb. Haemostasis* 64, 80–86.