

一株来自蚯蚓的产纤溶酶蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 的筛选及鉴定

张雪琴^{3,4} 康冀川^{1,2,3*} 文庭池^{1,2} 何劲^{3,4} 雷帮星^{1,2}

(1. 贵州大学 西南药用生物资源教育部工程研究中心 贵州 贵阳 550025)

(2. 贵州省生化工程中心 贵州 贵阳 550025)

(3. 贵州大学 贵州省农业生物工程重点实验室 贵州 贵阳 550025)

(4. 贵州大学 生命科学学院 贵州 贵阳 550025)

摘要: 对来自 4 个不同省份的 5 条蚯蚓的肠道及体表细菌进行分离, 共获得 122 株细菌。通过脱脂奶粉平板法初筛, 纤维蛋白平板法复筛, 以透明圈为筛选标记, 共筛选出产纤溶酶菌株 12 株, 其中菌株 SC-3-W-3 的纤溶酶活力较高, 达到了 538.64 U/mL (相当于尿激酶的活力单位)。通过对其形态、培养、生理生化特征进行研究, 发现其与蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* Frankland 的特征很相符。进一步对 SC-3-W-3 的 16S rDNA 序列及系统发育分析表明, 该菌株与蜡状芽孢杆菌的同源性高达 100%。综合生理生化及 16S rDNA 序列比对结果, 将 SC-3-W-3 菌株鉴定为蜡状芽孢杆菌。

关键词: 蚯蚓, 纤溶酶, 蜡状芽孢杆菌, 筛选, 鉴定

Screening and identification of a *Bacillus cereus* strain producing fibrinolytic enzyme from earthworm

ZHANG Xue-Qin^{3,4} KANG Ji-Chuan^{1,2,3*} WEN Ting-Chi^{1,2} HE Jin^{3,4}
LEI Bang-Xing^{1,2}

(1. Engineering Research Center of Pharmaceutical Bio-resources of Southwest China, Ministry of Education, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

(2. Guizhou Biochem-engineering Research Center, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

(3. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

(4. College of Life Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: One hundred and twenty-two bacteria strains were isolated from the intestinal tracts and body surface of five earthworms collected from four different provinces. Twelve fibrinolytic enzyme pro-

ducing strains were screened based on the size of halo zone by using powdered skim milk and fibrous protein as the first and second round screening substrates, respectively. SC-3-W-3 strain with high fibrinolytic enzyme activity was identified as *Bacillus cereus* based on physiological and biochemical characteristics, as well as 16S rDNA. The fibrinolytic enzyme activity of SC-3-W-3 strain was up to 538.64 U/mL.

Keywords: Earthworm, Fibrinolytic enzyme, *Bacillus cereus*, Screening, Identification

心脑血管栓塞性疾病已成为人类死亡的主要原因之一,其病因是纤维蛋白聚集于动脉管壁所导致^[1]。纤溶酶(纤维蛋白降解酶)是一类蛋白酶,对血栓中的纤维蛋白具有一定的降解特异性,因此其具有溶解血栓、疏通栓血管的作用,临床上可用于治疗血栓性疾病。目前,在动物^[2-4]、植物^[5]、微生物中均发现了天然的纤溶酶。其中微生物是纤溶酶的一个重要来源,有报道从枯草芽孢杆菌^[6]、短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*^[7]、根霉 *Rhizopus chinensis*^[8]、密环菌 *Armillaria mellea*^[9]、蛹虫草 *Cordyceps militaris*^[10]、链霉菌^[11]等微生物中发现了产纤溶酶菌株。这些产纤溶酶菌株主要是来源于豆豉、酱等传统发酵食品和土壤、海泥等自然环境,而关于从蚯蚓肠道及体表分离筛选产纤溶酶菌株的研究鲜见报道,虽国外已有关于蚯蚓肠道微生物的研究^[12],但仅限于分离蚯蚓肠道的微生物,并未进行产纤溶酶活性的研究。本研究首次从不同地区的蚯蚓肠道及体表分离筛选出了一株高产纤溶酶菌株,这将为下一步进行诱变、优化使其产酶能力提高、微生物纤溶酶高效表达基因工程菌的构建及微生物纤溶酶的产业化开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离材料: 供分离的 5 个蚯蚓样品分别采自贵州(HXS)、河南(HN-1, HN-2)、四川(SC-1, SC-3)、海南(LG) 4 个不同地区。经过鉴定, HXS 为夏威夷环毛蚓 *Pheretima hawayana* Rose, HN-1 为直隶环毛蚓 *Pheretima tschiliensis* Michaelsen, HN-2 为白颈环毛蚓 *Pheretima californica* Kinberg, SC-1 和 SC-3 为威廉环毛蚓 *Pheretima guillemi* Michaelsen, LG 为参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* E. Perrier^[13]。

1.1.2 对照菌株: 产纤溶酶对照菌株: 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* B1[®]由贵州大学微生物教研室分离并保存; 生理生化对照菌株: 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和大肠杆菌 *Escherichia coli* 由贵州大学微生物教研室保存。

1.1.3 主要试剂: 尿激酶 1 280 U/支购于中国药品生物制品检定所, 凝血酶 200 U/支购于美国 Sigma 公司, 纤维蛋白原 1 g/瓶购于美国 Sigma 公司, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于北京天泽基因公司, 其他试剂均为国产分析纯或进口分装。

1.1.4 主要仪器: SHZ-82A 气浴恒温振荡器, 常州奥华仪器有限公司; 2-16 K 高速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; PCR 仪、凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司; CX41RF 型 OLMPUS 显微镜; JA2003 电子天平, 上海天平仪器厂; YX400 高压蒸汽灭菌锅, 上海三申医疗器械有限公司。

1.1.5 主要培养基: (1) 细菌分离和保存培养基(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5, 琼脂 20, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

(2) 产纤溶酶初筛培养基(g/L): 脱脂奶粉 10, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; 琼脂 15, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 然后冷却至 50 °C 左右混匀。

(3) 细菌种子培养基(g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 10, Na_2HPO_4 2, NaH_2PO_4 1, CaCl_2 0.2, MgSO_4 0.5, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

(4) 细菌发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, Na_2HPO_4 2, NaH_2PO_4 1, CaCl_2 0.2, MgSO_4 0.5, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离: (1) 蚯蚓体表菌株的分离: 在无菌条件下, 将蚯蚓放入装有玻璃珠和 100 mL 无菌水的三角瓶中, 摇床上振荡 30 min 使玻璃珠撞击蚯蚓

体表, 获得菌悬液并稀释适当倍数后涂布营养琼脂平板, 30 °C 倒置培养 2 d, 挑取单菌落进行划线纯化结合显微镜观察, 获得纯菌株接种于营养琼脂斜面, 4 °C 保存。

(2) 蚯蚓肠道菌株的分离: 先将蚯蚓进行 10% 酒精麻醉后, 用 75% 的酒精对体表消毒 5 次, 然后用无菌水冲洗 3 次, 无菌条件下解剖, 取其肠道内容物捣烂, 移入盛有玻璃珠和 100 mL 无菌水的三角瓶中, 摇床上振荡 30 min 使其彻底分散, 稀释适当倍数后涂布营养琼脂平板。30 °C 倒置培养 2 d, 挑取单菌落进行划线纯化结合显微镜观察, 获得纯菌株接种于营养琼脂斜面, 4 °C 保存。

1.2.2 产纤溶酶菌株的初筛: 将分离得到的细菌点种于产纤溶酶初筛培养基中, 以点接产纤溶酶菌株 B₁⑥作为阳性对照, 点接不能产生纤溶酶的大肠杆菌 *E. coli* 作为阴性对照, 35 °C 倒置培养 48 h, 分别测量菌落直径(*d*)与透明圈直径(*D*) 3 次, 计算平均值, *D/d* 比值表示菌株产蛋白酶能力的大小, *D/d* 比值 ≥ 1.5 的菌株作为复筛菌株。

1.2.3 产纤溶酶菌株的复筛: 将初筛得到的产纤溶酶菌株挑取一环, 转接于装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、150 r/min 摇床培养 24 h, 按 4% 接种量转接于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、150 r/min 摇床培养 72 h 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 μ L 点样于纤维蛋白平板中, 同时在纤维蛋白平板中点样产纤溶酶菌株 B₁⑥的发酵液作为阳性对照, 点样无菌生理盐水作为阴性对照。室温平稳放置 10 min, 再置于 37 °C 恒温培养 18 h, 测其溶解圈垂直直径, 各测 3 次计算平均值, 垂直直径的乘积为溶解圈的面积。溶解圈面积最大的菌株作为发酵生产纤溶酶的目的菌株。

1.2.4 纤溶酶活性的测定: (1) 双层纤维蛋白平板的制作。根据文献稍作修改^[14-15], 配制成双层纤维蛋白平板。取 10 mL 2% 的琼脂溶液倒入 9 cm 平板中, 凝固后形成第一层。将 5 mL pH 7.8、0.04 mol/L 巴比妥缓冲液(含 10 mg 纤维蛋白原)与 5 mL 1% 的

琼脂糖溶液于 50 °C 充分混合, 迅速加入 100 μ L 100 IU/mL 的凝血酶溶液, 迅速混匀后倒入第一层平板中, 形成双层纤维蛋白平板。该配制方法能够确保每个平板的厚度均一, 从而减少实验误差。

(2) 尿激酶标准曲线的制作。配制浓度分别为 220、180、140、100、40、5 U/mL 的尿激酶标准溶液, 取各浓度酶液 5 μ L 点样于纤维蛋白平板的小孔内(直径 3 mm), 在 37 °C 温育 18 h, 测定溶解圈的垂直直径。根据报道^[16], 溶解圈的两垂直直径之积(*A*)与浓度(*C*)有以下关系, $A = K \times C^a$, 因此以测定的不同浓度的溶解圈垂直直径乘积的对数与不同浓度标准品的对数作一元线性回归方程。以尿激酶浓度的对数值为横坐标, 溶解圈面积的对数值为纵坐标, 绘制尿激酶标准曲线。

(3) 样品纤溶酶活性的测定。将 5 μ L 样品加入纤维蛋白平板的小孔(直径 3 mm)内, 于 37 °C 温育 18 h, 测定纤溶圈垂直直径, 得到其乘积。根据尿激酶标准曲线计算出样品的纤溶活性, 得到的纤溶酶活相当于尿激酶的活力单位。同时, 在纤维蛋白平板中点样产纤溶酶菌株 B₁⑥的发酵液作为阳性对照, 点样无菌生理盐水作为阴性对照。

1.2.5 产纤溶酶目的菌株的鉴定: (1) 传统分类学鉴定参照文献[17-18]的方法进行, 其中生理生化试验分别以枯草芽孢杆菌、大肠杆菌作为阳性、阴性对照, 以未接种的培养基作为空白对照。

(2) 目的菌株的 16S rDNA 的 PCR 扩增与序列测定。将目的菌株接种在肉汤培养基中, 30 °C 振荡培养至对数生长期后期, 12 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体, 提取基因组 DNA。用于 16S rDNA 的 PCR 扩增反应的引物为一对通用引物^[19], 其序列为: 正向序列 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系: 2×Mix 10 μ L、27f (0.1 g/L) 0.4 μ L、1492r (0.1 g/L) 0.4 μ L、模板 DNA 1 μ L, 补水至 20 μ L。PCR 条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物由南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

2 结果

2.1 菌株的分离、筛选结果

采用分离培养基,从5条蚯蚓肠道及体表分离到菌株122株(表1)。其中体内66株,体表56

株。经过脱脂奶粉平板(图1)初筛,纤维蛋白平板法(图2)复筛,共获得了12株产纤溶酶的细菌(表2)。其中SC-3-W-3纤溶酶活性最大,纤溶圈面积达到了355.21 mm²,因此将该菌株作为鉴定的目的菌株。

表1 蚯蚓肠道和体表细菌分离情况
Table 1 Bacteria from intestinal tract and body surface of earthworm

| 序号 Number | 蚯蚓 Earthworm | 蚯蚓种类 Species | 肠道菌株数(株) Strains from intestinal tract | 体表菌株数(株) Strains from body surface |
|--------------|-----------------|--|---|---------------------------------------|
| 1 | HXS | 夏威夷环毛蚓 <i>Pheretima hawayana</i> Rose | 15 | 13 |
| 2 | SC-1 | 威廉环毛蚓 <i>Pheretima guillemi</i> Michaelsen | 4 | 4 |
| 3 | SC-3 | 威廉环毛蚓 <i>Pheretima guillemi</i> Michaelsen | 7 | 8 |
| 4 | HN-1 | 直隶环毛蚓 <i>Pheretima tschiliensis</i> Michaelsen | 3 | 2 |
| 5 | HN-2 | 白颈环毛蚓 <i>Pheretima californica</i> Kinberg | 10 | 0 |
| 6 | LG | 参环毛蚓 <i>Pheretima aspergillum</i> E. Perrier | 27 | 29 |
| 合计 Total | | | 66 | 56 |

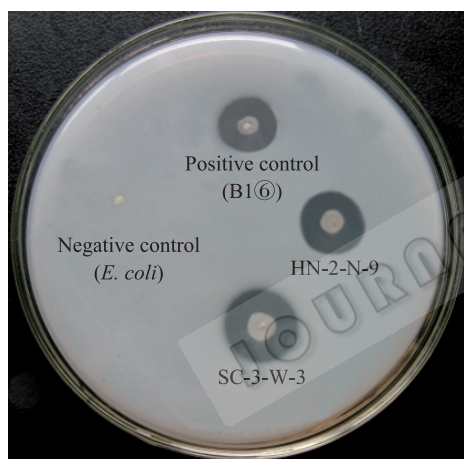


图1 SC-3-W-3在奶粉平板上形成的透明圈
Fig. 1 The transparent circle in the skimmed milk powder plate

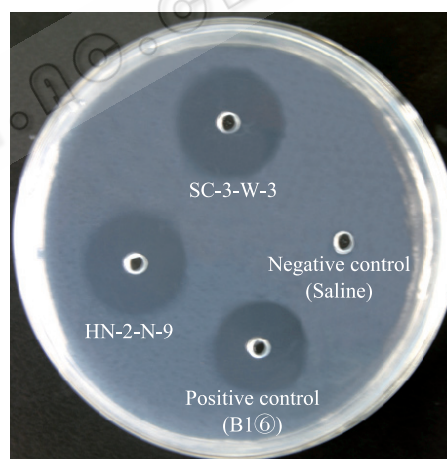


图2 SC-3-W-3在纤维蛋白平板上的纤溶圈
Fig. 2 The transparent circle of strain SC-3-W-3 in fibrin plate

表2 产纤溶酶菌株的筛选结果
Table 2 The screening result of strains with producing fibrinolytic enzyme

| 序号 Number | 菌株 Strains | D/d | 纤溶圈面积 Dissolution area (mm ²) | 序号 Number | 菌株 Strains | D/d | 纤溶圈面积 Dissolution area (mm ²) |
|--------------|------------------|-----------|--|--------------|---------------|-----------|--|
| 0 | B ₁ ⊕ | 2.61±0.03 | 285.54±0.49 | 7 | LG-W-27 | 2.26±0.04 | 203.06±0.63 |
| 1 | SC-3-W-3 | 3.31±0.02 | 355.21±0.54 | 8 | HXS-N-6 | 2.21±0.05 | 200.22±0.56 |
| 2 | HN-2-N-9 | 2.67±0.02 | 291.73±0.53 | 9 | HXS-N-11 | 2.13±0.03 | 200.02±0.72 |
| 3 | HXS-N-1 | 2.54±0.04 | 240.25±0.68 | 10 | SC-3-W-6 | 2.06±0.02 | 183.60±0.47 |
| 4 | HXS-N-5 | 2.39±0.05 | 217.50±0.78 | 11 | SC-1-W-1 | 1.95±0.05 | 170.31±0.62 |
| 5 | HN-2-N-7 | 2.35±0.03 | 210.25±0.43 | 12 | SC-1-W-3 | 1.72±0.04 | 25.50±0.51 |
| 6 | HXS-N-2 | 2.30±0.02 | 203.10±0.34 | | | | |

2.2 纤溶酶活性的测定

根据尿激酶标准曲线(图 3), 计算得到菌株 SC-3-W-3 产纤溶酶的活力为 538.64 U/mL。

2.3 目的菌株的鉴定

2.3.1 菌落及菌株形态观察: 菌株 SC-3-W-3 用普通琼脂营养平板 35 °C 培养 48 h, 单菌落为圆形或近圆形, 边缘呈锯齿状, 菌落中央稍有凸起, 不透明, 质地软, 有一定湿度、光泽的灰白色菌落(图 4)。革兰氏染色呈阳性、菌体为杆状、两端钝圆、长为 3.1 μm–3.8 μm, 宽为 1.0 μm–1.1 μm, 可见单个散生或形成 3–5 链状排列, 芽孢中生(图 5)。SC-3-W-3 在肉汤中培养呈均匀浑浊生长, 静置后菌体形成白色沉淀。

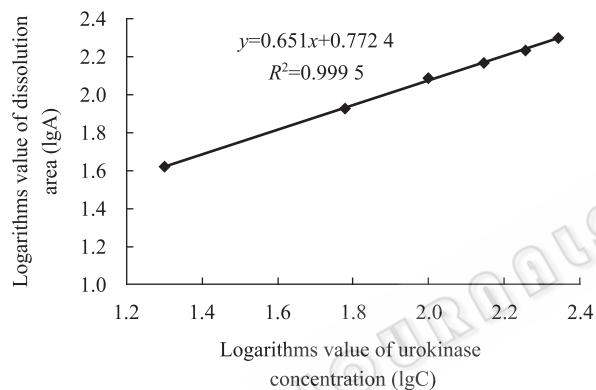


图 3 尿激酶标准曲线

Fig. 3 The standard curve of urokinase activity

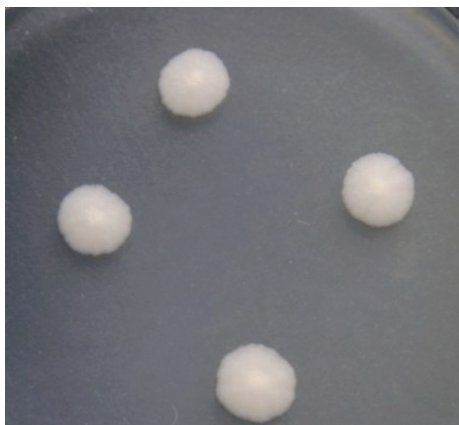


图 4 菌株 SC-3-W-3 菌落形态

Fig. 4 The colonial morphology of strain SC-3-W-3



图 5 菌株 SC-3-W-3 的显微形态(×1 000)

Fig. 5 Micrograph of strain SC-3-W-3 (×1 000)

2.3.2 生理生化测定: 从表 3 可看出, 菌株 SC-3-W-3 发酵甘露醇、乳糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖不能产酸产气, 无运动性, 在 5 °C、45 °C 时不能正常生长, 在 10% NaCl 中不能生长。其他反应均为阳性。接种枯草芽孢杆菌、大肠杆菌作为阳性、阴性对照, 以未接种的培养基为空白对照。

根据菌株 SC-3-W-3 的个体形态特征、菌落形态特征及上述各项生理生化试验结果, 参照《伯杰细菌鉴定手册》^[18]和《常见细菌系统鉴定手册》^[17], 菌株 SC-3-W-3 初步鉴定为蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*。

2.3.3 16S rDNA 全序列测定与系统发育分析: 将扩增产物用 1% 琼脂糖进行电泳检测, 结果显示菌株 SC-3-W-3 的 16S rDNA 扩增产物大小为 1 500 bp 左右。将目的菌株的 16S rDNA 序列(GenBank 登录号为 HQ992816)通过 BLAST 与 GenBank 中核酸数据进行同源性搜索比对, 结果表明, 该菌株序列与蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 的相似度达到了 100%。根据 16S rDNA 序列同源性比对结果, 与来自核酸数据库的 11 株相似度在 99% 以上的部分同种及近源属、种的 16S rDNA 序列进行发育分析, 以邻接法构建系统树, 在分支上的数据为 1 000 次重复获得的自展检验 Bootstrap 值, 以评估系统发育树的置信度。从图 6 可知, 菌株 SC-3-W-3 与来自核酸数据库的 3 株蜡状芽孢杆菌以 85% 的自展支持率聚在一起。综合考虑菌株 SC-3-W-3 的培养、生理生化特征以及 16S rDNA 序列比对结果, 将 SC-3-W-3 菌株鉴定为蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*。

表3 菌株 SC-3-W-3 生理生化鉴定结果
Table 3 Physiological and biochemical characters of strain SC-3-W-3

| 生理生化实验 Physiological and biochemical test | 鉴定结果 Result | 生理生化实验 Physiological and biochemical test | 鉴定结果 Result |
|--|----------------|--|----------------|
| 接触酶 Catalase | + | 分解酪氨酸 Hydrolyse of tyrosine | + |
| V-P 试验 V-P test | + | 硝酸盐还原 Nitrate reduction | + |
| 淀粉水解 Hydrolyse of starch | + | 抗溶菌酶 Anti-lysozyme | + |
| 运动性 Mobility | - | pH 5.7 营养肉汤生长 pH 5.7 nutrient broth | + |
| 酪素水解 Hydrolyse of Casein | + | 生长温度 Growth at | |
| 柠檬酸盐利用 Citrate utilization | + | 5 °C | - |
| 糖发酵产酸 Acid production of fermentation | | 10 °C | + |
| 蔗糖 Sucrose | + | 20 °C | + |
| 麦芽糖 Maltobiose | + | 30 °C | + |
| 甘露醇 Mannitol | - | 40 °C | + |
| 乳糖 Lactose | - | 45 °C | - |
| 半乳糖 Galactose | - | 耐盐性 Salt tolerance | |
| 木糖 Xylose | - | 2% | + |
| 阿拉伯糖 Arabinose | - | 5% | + |
| D-葡萄糖 D-Glucose | + | 7% | + |
| | | 10% | - |

注: +: 阳性 -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

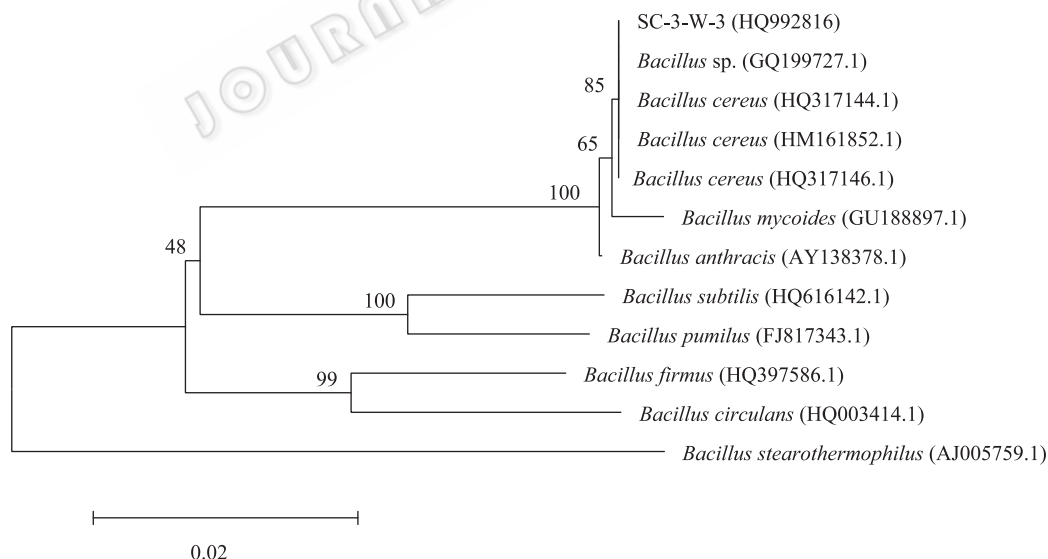


图6 菌株 SC-3-W-3 的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of strain SC-3-W-3 and related strains based on 16S rDNA

注: 在树节上的数字代表 1 000 取样的百分比; 括号中为菌株的 GenBank 登录号; 比例尺代表 2% 的序列差异.

Note: The numbers at the nodes indicate the percentages of occurrence in 1 000 bootstrapped trees. The GenBank accession number of each strain is indicated in parentheses and the scale bar represents 2% sequence difference.

3 讨论

血栓栓塞性疾病严重危害人类的身体健康, 全世界共有血栓病人 1 500 万, 所需溶栓剂潜在市场约 20 亿美元^[20]。目前临床注射的抗血栓药物普遍存在药效短、副作用大、价格高等缺点, 因此世界各国都在寻找新型的安全性高、疗效好、价格低廉的溶栓药物。微生物是溶栓药物的重要来源, 到目前为止, 在细菌、真菌、放线菌中均发现有产纤溶酶的种类。产纤溶酶细菌的大多数种类为芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌^[6]、蜡状芽孢杆菌^[21]、解淀粉芽孢杆菌^[22]、短小芽孢杆菌^[7], 还有少数的 β -溶血链球菌^[23]、金黄色葡萄球菌^[24]、微球菌属的藤黄微球菌^[25]。用这些野生型细菌菌株进行液体发酵时的纤溶酶活力一般可达 200–300 U/mL, 菌株诱变和工艺优化后可达 600–3 000 U/mL, 最高纤溶酶活力可达 5 989 U/mL^[26]。本研究从蚯蚓中分离的菌株 SC-3-W-3 的初始发酵酶活为 538.64 U/mL, 相比文献来看, 产酶能力达到了中等水平。但这仅是野生菌株的产酶活力, 可以通过进一步诱变、发酵工艺优化、基因工程改造等手段进一步提高其产酶能力。通过形态、生理生化及 16S rDNA 鉴定, 把菌株 SC-3-W-3 鉴定为蜡状芽孢杆菌, 与 Kim HJ 等^[12]报道的从蚯蚓中分离的微生物相似。本研究还发现蚯蚓肠道及体表细菌中产纤溶酶菌株较多, 因此, 认为从蚯蚓微生物中筛选新型纤溶酶潜力巨大。可进一步对 SC-3-W-3 菌株的安全性、产酶稳定性进行检测, 通过诱变, 优化提高其产酶能力, 为微生物纤溶酶的大规模生产及临床应用提供菌种资源。

致谢: 感谢上海交大农业与生物技术学院邱江平教授在蚯蚓鉴定中给予的极大帮助!

参 考 文 献

- [1] 罗明典. 微生物制药研究新进展[J]. 微生物学通报, 1998, 25(1): 61–62.
- [2] Nakajima N, Ishihara K, Sugimoto M, et al. Chemical modification of earthworm fibrinolytic enzyme with human serum albumin fragment and characterization of the protease as atherapeutic enzyme[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(2): 293–300.
- [3] Siigur J, Samel M, Tönismägi K, et al. Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* snake venom[J]. Thrombosis Research, 1998, 90(1): 39–49.
- [4] 景然. 墨科学家发现蝙蝠的唾液能治血栓[J]. 畜牧兽医科技信息, 2003, 19(2): 58.
- [5] 裴光源, 王中枢. 蒲黄纤溶酶的分离纯化及部分性质的研究[J]. 生物化学与生物物理学报: 英文版, 1991, 23(1): 14–19.
- [6] 林芬, 谢和, 姚玉萍, 等. 高产纤溶酶菌株的筛选及鉴定[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(6): 101–103.
- [7] 李占强, 胡江春, 潘华奇, 等. 产纤溶酶海洋微生物 B5815 菌株的筛选及鉴定[J]. 微生物学杂志, 2009, 29(6): 41–44.
- [8] 李树文, 刘晓兰. 根霉产纤溶酶液体发酵培养基的优化[J]. 中国酿造, 2009(7): 58–60.
- [9] 徐德钦, 陈海燕, 章海锋, 等. 黄绿蜜环菌产纤溶酶的发酶条件优化研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(6): 96–103.
- [10] 崔莉, 董明盛, 陈晓红, 等. 一株纤溶酶产生菌—蛹虫草的形态和分子鉴定[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(3): 667–669.
- [11] 龚勇, 王以光. 一种来源于链霉菌的纤溶酶的纯化及其基因的克隆[J]. 微生物学报, 2001, 41(2): 186–190.
- [12] Kim HJ, Shin KH, Cha CJ, et al. Analysis of aerobic and culturable bacterial community structures in earthworm (*Eisenia fetida*) intestine[J]. Agric Chem Biotechnol, 2004, 47(3): 137–142.
- [13] 陈义. 中国动物图谱-环节动物(附: 多足类)[M]. 北京: 科学出版社, 1959: 7–11.
- [14] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Arch Biochem Biophys, 1952, 40(2): 346–351.
- [15] 范晓丹. 新型纤溶酶得产生菌选育、发酵优化及酶学性质研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2006.
- [16] Edward N. Methods for improving the sensitivity and specificity of the fibrin plate[J]. J clin Pathol, 1972, 25(4): 335–337.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [18] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.

- [19] Moreno C, Romero J, Romilio T, et al. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. *Microbiology*, 2002, 148(4): 1233-1239.
- [20] Fukutake M, Tadahashi M, Ishida K, et al. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1996, 34(5): 457-461.
- [21] 张自强, 张云开, 陈桂光, 等. 豆豉纤溶酶高产菌株的筛选研究[J]. *工业微生物*, 2007, 37(1): 67-70.
- [22] 彭勇, 张义正. 豆豉溶栓酶产生菌的筛选及其酶学性质的初步研究[J]. *高技术通讯*, 2004, 12(2): 30-34.
- [23] Jackson KW, Esmon N, Tang J. Streptokinase and staphylokinase[J]. *Methods Enzymol*, 1981, 80: 387-394.
- [24] Sako T, Tsuchida N. Nucleotide sequence of the staphylokinase gene from *Staphylococcus aureus*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11(22): 7679-7693.
- [25] 肖璐, 张仁怀, 张义正. 纤溶酶产生菌—藤黄微球菌的筛选、鉴定及纤溶酶基因的克隆[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(9): 1443-1449.
- [26] 豆孝伟, 陈桂光, 张云开, 等. 豆豉溶栓酶产生菌株的诱变育种[J]. *现代食品科技*, 2006, 23(3): 33-38.

征订启事

欢迎订阅 2011 年《基因组学与应用生物学》

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办,公开发行的双月刊科学期刊。广西大学聘请中国农业大学李宁院士任主编,北京大学教授朱玉贤博士和海南省热带农业资源研究所所长方宣钧博士任执行主编,国内众多的著名学者出任编委。

《基因组学与应用生物学》主要刊登现代生物技术的前沿学科和基础学科如基因组学、分子细胞遗传学、生化与分子生物学、应用生物学等相关的原始研究成果。刊登植物、动物及微生物领域的生物在组织、器官、细胞、染色体、蛋白质、基因、酶、发酵工程等不同水平上的现代生物技术等基础与应用基础研究的成果。本刊按国际标准编排,题目摘要、图表、引用文献等均实行中英文对照,实现网上领先发表模式。

《基因组学与应用生物学》,前身是原《广西农业大学学报》,创刊于 1982 年。广西农业大学合并入广西大学以后更名为《广西农业生物科学》。《广西农业生物科学》已入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版(即第五版)之综合性农业科学类的核心期刊,是中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊,也是中国科技核心期刊即中国科技论文统计源期刊。2001 年入选国家新闻出版总署“中国期刊方阵”,先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘:自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。

承载着《广西农业生物科学》的历史与荣誉,《基因组学与应用生物学》将在新的高度开拓奋进,为现代生命科学和应用生物学的研究与发展提供学术交流的平台,使之成为中国科学家走向世界的桥梁。

《基因组学与应用生物学》《Genomics and Applied Biology》,ISSN1674-568X, CN45-1369/Q, 双月刊, 双月 28 日出版,国内定价:人民币 ¥40.00/期,人民币 ¥240.00/年;国际定价:美元 \$40.00/期,美元 \$240.00/年。

邮局汇款

地址:广西南宁市大学东路 100 号广西大学西校园榕江路《基因组学与应用生物学》编辑部

收款单位:《基因组学与应用生物学》编辑部

邮编:530004

联系电话:0771-3239102, 0771-3232621

传真:0771-3232621

E-mail: gab@hibio.org; gab@genoapplbiol.org

网址: www.genoapplbiol.org