

一株产纤溶酶菌株的分离、鉴定及其 酶活特征的初步研究

和七一 赵瑛 段海龙 伍勇 文浩平 张有义 余晓东*

(教育部活性物质生物技术工程研究中心 重庆市生物活性物质工程研究中心
重庆市动物生物学重点实验室 重庆师范大学 生命科学学院 重庆 400047)

摘要: 【目的】分离筛选并鉴定产纤溶酶的菌株。【方法】采用血粉培养基富集, 琼脂糖-纤维蛋白平板筛选, 从自然界中分离筛选出一株产纤溶活性物质的菌株。通过形态学特征、生理生化特征研究, 并结合 16S rRNA 基因序列分析及分子系统发育树的构建结果, 确定菌株的种类。【结果】从自然界分离筛到一株产纤溶酶的菌株 EF608, 经鉴定该菌株为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)。SDS-PAGE 和纤维蛋白自显影表明该纤溶酶的分子量为 37 kD, 最适反应温度和 pH 分别为 35 °C 和 7.5, EDTA 能完全抑制其纤溶活性, 而 PMSF 对其活性无抑制作用。菌株 EF608 发酵液不仅可以直接水解纤维蛋白, 而且具有体外溶栓的作用, 对血红细胞没有溶解作用。【结论】筛选到一株具有纤溶活性的粪肠球菌——EF608, 为获取新型纤溶酶提供了一种新的菌源。

关键词: 纤溶酶, 粪肠球菌, 分离

Isolation and identification of a fibrinolytic bacterium

HE Qi-Yi ZHAO Ying DUAN Hai-Long WU Yong WEN Hao-Ping
ZHANG You-Yi YU Xiao-Dong*

(Engineering Research Center of Active Substance and Biotechnology, Ministry of Education, Chongqing
Engineering Research Center of Bioactive Substance, Chongqing Key Laboratory of Animal Biology,
School of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

基金项目: 重庆市教委基金项目(No. KJ120607)

*通讯作者: ✉: xdyuyu@gmail.com

收稿日期: 2012-10-12; 接受日期: 2012-12-25

Abstract: [Objective] We isolated and identified strains producing fibrinolytic enzyme. **[Methods]** A strain with fibrinolytic activity was isolated from the environment by using blood powder plates and agar-fibrin plates. We identified the strain by morphological, physiological and biochemical characterization, combined with 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree. **[Results]** A strain (named EF608) with fibrinolytic activity was obtained and identified as *Enterococcus faecalis*. Fermentation broth of strain EF608 had fibrinolytic activity. Its optimal reactive temperature and pH value were 35 °C and 7.5, respectively, and the molecular weight is 37 kD by SDS-PAGE and fibrin autography. EDTA completely inhibited the fibrinolytic activity, but PMSF exerted little effect on it. The fermentation broth dissolved thrombus *in vitro*, directly degrade the fibrin, and did not hydrolyze blood cells. **[Conclusion]** The strain might provide a new source for novel fibrinolytic enzymes.

Keywords: Fibrinolytic enzyme, *Enterococcus faecalis*, Isolation

血栓是血管系统内血液本身组成物形成的结块,由血栓造成管道闭塞所导致的许多病变都属于血栓栓塞性疾病,如心肌梗塞、脑血栓、肺血栓、静脉血栓等。随着人类寿命的延长和饮食结构的改变,血栓栓塞性病例也明显增多,血栓栓塞性疾病已成为当前危害人类健康,导致死亡率最高的疾病之一。

目前,治疗血栓栓塞性疾病最为可靠并且有效的手段之一是溶栓疗法^[1],即注射溶栓剂使血管再通。现行临床所用的溶栓剂主要有尿激酶、人组织性纤维蛋白溶解酶原激活剂(Tissue plasminogen activator, t-PA)、蝮蛇抗栓酶等,虽然具有溶栓功效,但会引起出血、过敏等副作用^[2]。因此,寻找高效、无毒副作用的新型溶栓药物需求迫切。

以微生物为来源生产溶栓制剂,具有来源丰富、生产成本低、周期短、且不受地域限制的特点,具有广阔的前景。目前,已发现多种微生物具有产生纤溶活性物质的能力,如 β -溶血链球菌^[3]、藤黄微球菌^[4]、芽孢杆菌^[5-6]、金黄节杆菌^[7]、放线菌^[8]、黄青霉菌^[9]、根霉^[10]、旋孢霉菌^[11]、米曲霉菌^[12]、蘑菇^[13]、白色假丝酵母菌^[14]、海洋假

单胞菌^[15]、镰孢菌^[16]、黄绿蜜环菌^[17]等。根据作用机理不同,微生物源溶栓药物可分成两类^[18]:一类是纤溶酶原激活剂,其作用原理是先将无活性的纤溶酶原激活为纤溶酶,而纤溶酶则能降解构成血栓骨架的纤维蛋白,从而引起溶栓作用,如尿激酶(UK)、链激酶(SK)、葡激酶(SaK);另一类是纤溶酶类物质,其作用是直接降解血块中的纤维蛋白溶解血栓,如来源于芽孢枯草杆菌的纳豆激酶(NK)。

本实验室从自然界中筛选出一株产纤溶酶菌株,通过采用形态学特征、生理生化特性和16S rRNA 基因序列分析相结合的方法,将其鉴定为粪肠球菌,并对其分泌的纤溶酶进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:菌株 EF608 为本实验室筛选分离得到。

1.1.2 实验动物:新西兰实验兔购自重庆滕鑫生物技术有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器:蛋白胨、酵母提取物,

Amresco 公司; 核酸 Marker, MBI 公司; 牛血清白蛋白, Solarbio 公司; 纤维蛋白原(牛血)、凝血酶(牛血), Sigma 公司; 尿激酶, 中国药品生物制品检定所; dNTPs、RNase、*Taq* 酶、PCR 产物纯化试剂盒, TaKaRa 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

SW-CJ-2FD 超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; THZ-82 恒温振荡器, 上海比朗仪器有限公司; 3-15K 高速冷冻离心机, 美国 Sigma; 普及型 PB-10 酸度计、BT25S 电子分析天平, 德国赛多利斯; Eppendorf 22331 PCR 仪, 德国 Eppendorf; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂。

1.2 培养基制备

1.2.1 LB 培养基: 蛋白胨 1%, 酵母提取物 0.5%, NaCl 1%。固体培养基中添加 2% 的琼脂。

1.2.2 富集培养基: 猪血粉 2%, 蛋白胨 1%, NaCl 5%, 琼脂 2%, pH 7.2。

1.2.3 纤维蛋白培养基: 称取纤维蛋白原 16.0 mg 溶解于 8 mL 双蒸水中, 配制成纤维蛋白原溶液, 于 37 °C 中水浴保温; 称取 0.16 g 琼脂粉加双蒸水定容至 8 mL 并煮化, 待冷却至 50 °C 左右加入 0.1 mL 100 IU/mL 的凝血酶, 摇匀后加入上面配置好的纤维蛋白原溶液, 迅速摇匀后倒入直径为 9 cm 的平皿中, 室温平放 30 min, 待平板凝固后置于 4 °C 冷藏备用。

1.3 菌种的分离

先用富集培养基在自然环境中富集, 然后在琼脂糖-纤维蛋白培养基平板上初筛, 挑选活性较高的菌落再经过摇瓶复筛, 取上清液用纤维蛋白平板测定纤溶活性。

1.4 纤溶酶活性测定

纤溶酶活性测定参照 Astrup 等^[19]的方法。

1.5 菌株鉴定

1.5.1 细菌形态观察: LB 琼脂平板上划线接种, 37 °C 恒温培养 18 h, 观察细菌生长情况及菌落

特征, 挑取平板上单菌落涂抹于洁净玻片上, 常规方法作革兰氏染色, 光学显微镜下观察细菌形态和染色特征。

1.5.2 细菌生理生化特征鉴定: 参考《伯杰氏细菌鉴定手册》^[20]进行鉴定。主要包括耐热试验, 分别做 10 °C、45 °C 和 60 °C 耐热试验; 生化鉴定, 将 EF608 培养液接种在甘露醇、山梨醇、阿拉伯糖、棉子糖、山梨糖、乳糖、精氨酸脱羧酶、丙酮酸盐、胆汁七叶苷、6.5% NaCl 肉汤、pH 9.6 葡萄糖肉汤等 11 种细菌微量生化鉴定管, 进行培养及判断结果; 动力试验, 采用半固体穿刺法进行测定; 色素生成试验, 检测非荧光色素生成情况。

1.5.3 菌株的 16S rRNA 基因序列测定及分子系统发育树的构建: 用 SDS-蛋白质裂解法提取菌株总 DNA 并以之为模板, 对 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增。引物序列: 27f (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3') 和 1495r (5'-CTACGGCT ACCTTGTTACGA-3'), 由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 采用 50 μL 反应体系, 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 60 s, 55 °C 60 s, 72 °C 120 s, 共 30 个循环; 72 °C 8 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果, 并通过 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。PCR 产物由上海生工生物技术有限公司进行测序, 序列(GenBank accession No. HQ449389)用 BLAST 进行相似性搜索和同源性比对, 采用 ClustalX 1.83 进行序列匹配比对, 通过 MEGA 4.0 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining method)构建发育树。

1.6 EF608 纤溶酶酶学性质的初步研究

将 EF608 发酵液进行 60% 硫酸铵盐析后, 于 25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 缓冲液中透析后即 EF608 纤溶酶粗酶样品, 用于酶学性质的研究。

1.6.1 溶解纤维蛋白作用方式测定: 按 1.2.3 所述方法, 制得两个琼脂糖-纤维蛋白平板, 取其中一个平板置于电热恒温培养箱中 85 °C 加热

30 min, 制得加热平板, 另一个则为纤维蛋白标准。用直径为 3 mm 的打孔器在平板上打孔, 将 10 μ L EF608 粗酶液分别加入两个平板中, 以等体积的尿激酶(1 000 IU/mL)为对照, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h 后用游标卡尺测量溶圈直径, 根据水解圈面积判断其溶解纤维蛋白作用方式。

1.6.2 纤溶酶分子量初步测定: 按 Laemmli 方法^[21]进行 SDS-PAGE 电泳, 12%分离胶。电泳结束后, 用蒸馏水冲洗干净凝胶, 转入 2.5% (V/V) Triton X-100 溶液中, 轻摇 1 h, 期间更换一次溶液。然后用蒸馏水冲洗, 平铺于纤维蛋白平板上, 37 $^{\circ}$ C 保温一段时间, 考马斯亮蓝染液染色, 观察水解带的出现。

1.6.3 EF608 粗酶液最适反应温度的测定: 将 EF608 纤溶酶粗酶样品添加到琼脂糖-纤维蛋白平板, 分别置于 25 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 检测纤溶活性, 每次做 3 组平行。

1.6.4 EF608 粗酶液最适 pH 值的测定: 调整 EF608 纤溶酶粗酶样品 pH 分别为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5, 利用琼脂糖-纤维蛋白平板检测溶纤活性, 每次做 3 组平行。

1.6.5 不同抑制剂对纤溶活性的抑制作用: EF608 粗酶液分别与不同的抑制剂(终浓度为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 的 EDTA, 终浓度为 0.1 mmol/L 和 1.0 mmol/L 的 PMSF 以及终浓度为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 的 β -巯基乙醇)混合, 在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 同时设未添加抑制剂的粗酶液作为对照组, 各组分别取等体积采用纤维蛋白平板法测定纤溶活性。

1.6.6 体外溶栓测定: 取新鲜兔血, 自然放置使其凝固, 切成 2–4 mm³ 的小血凝块, 用生理盐水漂洗去除凝块上的血细胞, 吸水纸吸取外表面水分, 加入 1 mL EF608 粗酶液(含 0.9% NaCl)放于 37 $^{\circ}$ C 温箱内, 定时观察溶栓效果。同时以血栓在 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5, 0.9% NaCl)缓冲液中

的自溶情况为对照。

1.6.7 红细胞溶血测定: 取新鲜兔血迅速加入带有玻璃珠的三角瓶内, 振荡 10 min 脱纤。2 500 \times g 离心 10 min, 弃去上清液, 红细胞沉淀物用生理盐水洗涤 3 次, 直至离心上清液不再显红色, 然后用 0.9% NaCl 配置 2%红细胞悬液。取 EF608 粗酶液(含 0.9% NaCl) 1 mL, 与等体积红细胞悬液混合, 放于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中, 定时观察各试管变化, 同时设 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5, 0.9% NaCl)缓冲液组作为对照。

2 结果与分析

2.1 形态学特征

经富集培养、分离筛选, 共获得 5 个菌株具有纤溶活性, 选取酶活最高的菌株作为研究对象, 命名为 EF608 菌株。该菌株在 LB 固体培养基上呈圆形透明菌落, 白色, 表面光滑, 有光泽, 边缘整齐(图 1)。菌体成对或短链状排列, 无运动型, 不生成芽孢, 革兰氏染色阳性(图 2)。

2.2 生理生化特征

以粪肠球菌 1927 (C55614)为对照, 菌株 EF608 能在高温、高 pH、高盐的极端条件下生长, 具有水解胆汁七叶苷的能力, 详细结果见表 1。根据《伯杰细菌鉴定手册》可初步判断该菌为粪肠球菌。



图 1 菌株 EF608 菌落形态(LB 平板)

Fig. 1 Colonial morphology of strain EF608 (LB plate)

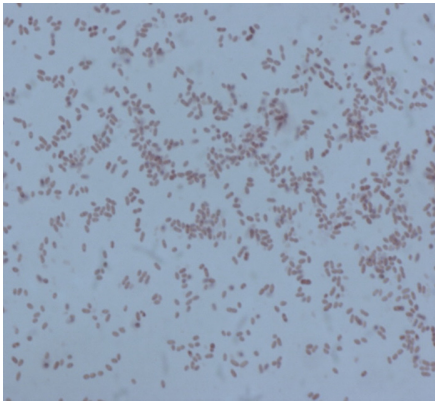


图 2 菌株 EF608 镜检结果(1 000×)
Fig. 2 Strain EF608 observed by microscope with magnification of 10×100

表 1 菌株 EF608 的生理生化特征 Table 1 Physiological and biochemical characters of strain EF608		
检测项目 Test	菌株 EF608 EF608	参考菌株 Reference strain ^[22]
Sodium pyruvate	+	+
Arg-decarboxylase	+	+
Arabinose	—	—
Raffinose	—	—
Sorbose	—	—
Lactose	+	+
Mannitol	+	+
Sorbitol	+	+
MOT	—	—
PIG	—	—
Bile esculin	+	+
10 °C	+	+
45 °C	+	+
60 °C 30 min	+	+
pH 9.7	+	+
Nutrient agar containing 6.5% NaCl	+	+

注：MOT：动力；PIG：色素；+：阳性反应；—：阴性反应；
Reference strain：粪肠球菌 1927 (C55614).
Note: MOT: Motive; PIG: Pigment; +: Positive; -: Negative;
Reference strain: *Enterococcus faecalis* 1927 (C55614).

2.3 16S rRNA 基因系统发育学分析

以菌株 EF608 总 DNA 为模板，经 PCR 扩增并对其产物进行序列测定，得到长度为 1 522 bp 的序列，其 GenBank 登录号为 HQ449389。BLAST 同源序列比对结果显示，该序列主要与粪肠球菌属菌株的 16S rRNA 基因序列相似。调集与该菌株同源性高的典型菌株序列，采用 ClustalX 1.83 进行序列匹配比对，通过 MEGA 4.0 软件进行系统进化树的构建(图 3)。分析结果显示，菌株 EF608 与粪肠球菌聚成一群，各菌株的序列相似性为 99%，结合其生理生化及形态特征，可推断菌株 EF608 为粪肠球菌的一个株系。

2.4 EF608 纤溶酶溶解纤维蛋白的作用方式

EF608 粗酶液在标准纤维蛋白平板和加热平板上的水解圈面积没有显著差异，而尿激酶在标准平板上具有水解活性，在加热平板上无纤溶活力。表明 EF608 纤溶酶与尿激酶作用方式不同，具有直接溶解纤维蛋白的作用，而不是通过激活纤溶酶原水解纤维蛋白。

2.5 EF608 纤溶酶的分子量

通过 SDS-PAGE 电泳后采用纤维蛋白自显影，可以看到一条清晰的水解带，与粗酶液电泳图谱比对，可以确定 EF608 纤溶酶的分子量。结果如图 4 所示，EF608 纤溶酶的分子量为 37 kD。

2.6 EF608 纤溶酶的最适反应温度和 pH

在不同温度下测定纤溶活性，结果如图 5 所示，EF608 纤溶酶最适反应温度为 35 °C。

采用不同 pH 条件测定纤溶活性，结果如图 6 所示，EF608 纤溶酶最适 pH 为 7.5。

2.7 抑制剂对 EF608 纤溶酶的抑制作用

与对照组相比(图 7)，5 mmol/L EDTA 可完全抑制 EF608 粗酶液纤溶活性，而 1 mmol/L PMSF 对其活性无影响，10 mmol/L β-巯基乙醇对其活性有微弱的抑制作用。推测该酶不是丝氨酸蛋白酶，可能为一种金属蛋白酶。

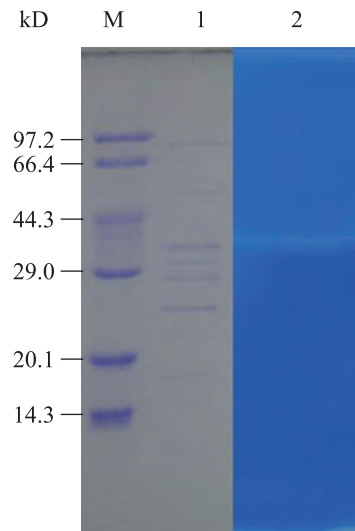


图 4 SDS-PAGE 和纤维蛋白自显影
Fig. 4 SDS-PAGE and fibrin autography
注: M: 蛋白质分子量 Marker; 1: 初酶液; 2: 纤维蛋白自显影。
Note: M: Protein marker; 1: Crude enzyme; 2: Fibrin autography.

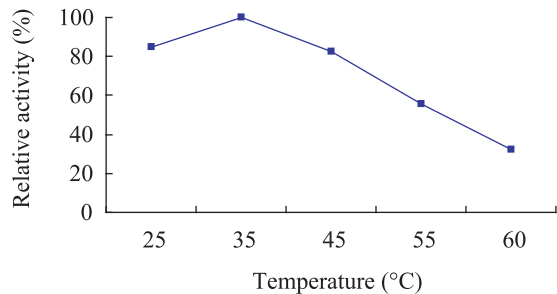


图 5 EF608 纤溶酶最适反应温度
Fig. 5 Effect of different temperature on strain EF608 fibrinolytic enzyme

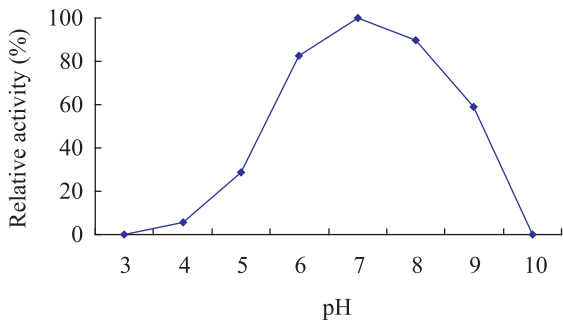


图 6 EF608 纤溶酶最适 pH
Fig. 6 Effect of different pH on strain EF608 fibrinolytic enzyme

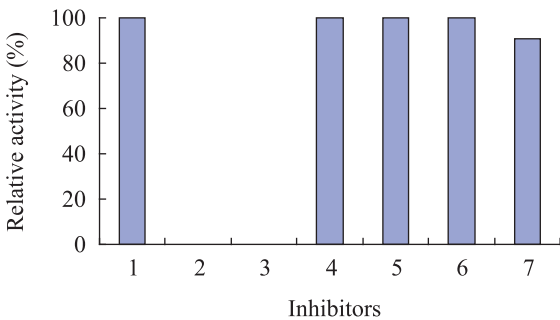


图 7 不同抑制剂对 EF608 纤溶酶活力的影响
Fig. 7 Effect of different inhibitors on strain EF608 fibrinolytic enzyme
注: 1: 对照; 2: 5 mmol/L EDTA; 3: 10 mmol/L EDTA; 4: 0.1 mmol/L PMSF; 5: 1 mmol/L PMSF; 6: 5 mmol/L β -巯基乙醇; 7: 10 mmol/L β -巯基乙醇。
Note: 1: Control; 2: 5 mmol/L EDTA; 3: 10 mmol/L EDTA; 4: 0.1 mmol/L PMSF; 5: 1 mmol/L PMSF; 6: 5 mmol/L β -mercaptoethanol; 7: 10 mmol/L β -mercaptoethanol.

因而很有必要寻找新型的安全性高、疗效好、价格低廉的溶栓药物。

微生物具有来源广泛,种类繁多,培养成本低等优点,已成为筛选溶栓药物的重要来源。我们通过血粉培养基富集,纤维蛋白平板筛选的方法,从自然环境中筛选获得了一株降纤酶产生菌 EF608。从形态学特征及生理生化试验结果可以看出,菌株 EF608 具有肠球菌属(*Enterococcus* sp.)的典型特征,菌体单个细胞为圆形,呈对或短链状排列, G^+ , 无鞭毛,无芽孢,能耐受高温、高 pH、高盐等极端条件,并能水解胆汁七叶苷,与粪肠球菌 1927 (C55614)的生理生化指标相同。16S rRNA 基因序列进化分析结果则进一步显示,菌株 EF608 与粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)相近,并聚成一群(图 3),推断 EF608 是粪肠球菌的一个株系。

溶栓疗法的本质是通过纤溶酶降解血栓的主要成分纤维蛋白,而这主要通过激活纤溶酶原途径和直接水解纤维蛋白途径来实现。本研究采用加热纤维蛋白平板的方式灭活纤维蛋白原试剂

中可能混杂的纤溶酶原, 试验结果证实, EF608 菌株粗酶液在加热纤维蛋白平板和标准纤维蛋白平板上均产生相同大小的水解圈, 表明其溶解纤维蛋白的作用方式是直接水解纤维蛋白, 而不是激活纤溶酶原形成纤溶酶水解纤维蛋白, 这与已报道的纳豆激酶^[18]、豆豉溶栓酶^[6]溶解纤维蛋白作用方式相似, 与尿激酶、链激酶、葡激酶水解纤维蛋白作用方式不同。

采用 SDS-PAGE 和纤维蛋白自显影的方法, 初步确定菌株 EF608 纤溶酶的分子量为 37 kD, 与已发现的细菌源纤溶酶分子量存在差异。粗酶液的最适反应温度和 pH 值分别为 35 °C 和 7.5, 与其他蛋白酶类性质相似。金属螯合剂 EDTA (5 mmol/L) 可以完全抑制粗酶液的溶解纤维蛋白活性, 而丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 在高浓度 (1 mmol/L) 条件下也未对其溶纤活性产生抑制作用, 提示该菌产生的降纤酶可能为一种金属蛋白酶。在体外, 菌株 EF608 粗酶液具有较强的溶栓功效, 且对红细胞不产生溶解作用, 提示菌株 EF608 产生的降纤酶具有开发成溶栓药物的可能。我们将进一步对该菌株所产降纤酶的核苷酸序列、氨基酸组成以及相关理化性质和溶栓机制进行研究, 为其开发利用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 卢立志, 刘振川. 溶栓疗法与抗凝剂在缺血性脑血管病中的应用现状[J]. 现代诊断与治疗, 2000, 11(2): 93-95.
- [2] Peng Y, ang XJ, Zhang YZ. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties and thrombolytic activity *in vivo*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69 (2): 126-132.
- [3] Jackson KW, Malke H, Gerlach D, et al. Active streptokinase from the cloned gene in *Streptococcus sanguis* is without the carboxyl-terminal 32 residues[J]. Biochemistry, 1986, 25(1): 108-114.
- [4] 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.
- [5] Kim W, Choi K, Kim Y, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from Chungkook-Jang[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(7): 2482-2488.
- [6] 彭勇, 张义正. 豆豉溶栓酶产生菌的筛选及酶学性质的初步研究[J]. 高技术通讯, 2002, 12(2): 30-40.
- [7] 王高学, 黄海洪, 张明. 一株青藏高原冻土溶栓菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学报, 2010, 50(2): 148-154.
- [8] Egorov NS, Kochetov GA, Khaïdarova NV. Isolation and properties of the fibrinolytic enzyme from the *Actinomyces thermovulgaris* cultural broth[J]. Mikrobiologiya, 1976, 45: 455-459.
- [9] el-Aassar SA, el-Badry HM, Abdel-Fattah AF. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 33(1): 26-30.
- [10] 杜连祥, 刘晓兰, 路福平, 等. 根霉 12[#] 发酵产生纤溶酶的酶学性质[J]. 生物工程学报, 2005, 21(2): 323-327.
- [11] Abdel-Fattah AF, Ismail AM. Purification and some properties of pure *Cochliobolus lunatus* fibrinolytic Enzyme[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1984, 26(5): 407-411.
- [12] 高占争, 赵允麟. 产纤溶酶的米曲霉筛选及测定方法的研究[J]. 中国酿造, 2006(1): 14-17.
- [13] Kim JH, Lee HY, Yoo KH, et al. The screening of fibrinolytic activities of extracts from mushrooms in Mt. Chiak[J]. Korean Journal of Medical Mycology, 1998, 26: 589-593.
- [14] Oshiaki N, Yoshiyuki O, Youichi H, et al. Isolation and characterization of fibrinogenase from candida albicans NH-1[J]. International Journal of Biochemistry, 1993, 25(12): 1815-1822.
- [15] 刘晨光, 王鹏, 刘成圣, 等. 海洋假单胞菌纤溶酶的体外溶栓实验研究[J]. 中国生化药物杂志,

- 2002, 23(1): 34–35.
- [16] El-Aassar SA. Production and properties enzyme in solid state cultures of *Fusarium allidoroseum*[J]. Biotechnology Letters, 1995, 17(9): 943–948.
- [17] Lee SY, Kim JS, Kim JE, et al. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 13(1): 10–17.
- [18] 辜转荣, 潘洁, 程远方, 等. 微生物代谢产物在溶栓药物中的应用[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2307–2308.
- [19] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40: 346–351.
- [20] 布坎南 RE, 吉本斯 NE, 等. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 中国科学院微生物研究所译. 北京: 科学出版社, 1984: 660–677.
- [21] Laemmli UK. Nature[J]. Analytical Chemistry, 1980, 52(9): 1098a–1098a.
- [22] 曾涛, 韩梅红. 2株鸭源肠球菌的鉴定和药敏试验[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(1): 181–182.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc(x)格式的电子稿,凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整,不用缩写,不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2013-00-00; 接受日期: 2013-00-00

(下转 p.1447)