

一株产纤溶酶菌株的分离鉴定及其纤溶组分分析

袁慎亮¹ 邢德明^{1,2} 窦少华¹ 王晓辉^{1*} 张庆芳¹ 迟乃玉^{1*}

(1. 大连大学 生命科学与技术学院 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622)

(2. 沈阳农业大学 食品学院 辽宁 沈阳 110866)

摘要:【目的】筛选性能良好的产纤溶酶菌株,对菌株进行多项分类鉴定,分析其纤溶酶系的组成特征及纤溶能力。【方法】通过酪蛋白培养基初筛,琼脂-纤维蛋白双层平板复筛,从海泥、土壤等环境中筛选纤维蛋白降解菌,以尿激酶为标准测定纤溶酶活性。通过形态学、生理生化特征研究,结合 16S rDNA 基因序列分析菌株种类及系统分类地位。通过 SDS-PAGE 和纤维蛋白酶谱法分析胞外纤溶酶系的组成特征。【结果】筛选到一株能降解纤维蛋白的细菌 CNY16,鉴定其为沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)。该酶为胞外酶,SDS-PAGE 和纤维蛋白酶谱结果表明该纤溶酶系有至少两种分子量大小不同的纤溶酶,分别约 33 kD 和 23 kD。能有效溶解血块中纤维蛋白,并且对红细胞无降解作用。【结论】细菌 CNY16 是一株新的纤溶酶产生菌,纤溶酶活性及稳定性较好,具有潜在开发价值。为获取新型纤溶酶提供了一种新的菌源。

关键词: 纤溶酶,沙福芽孢杆菌,鉴定,纤维蛋白酶谱

Isolation and identification of a fibrinolytic enzyme producing bacterium and its analysis of the fibrinolytic components

YUAN Shen-Liang¹ XING De-Ming^{1,2} DOU Shao-Hua¹
WANG Xiao-Hui^{1*} ZHANG Qing-Fang¹ CHI Nai-Yu^{1*}

(1. Liaoning Marine Microbial Engineering and Technology Center, College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

(2. College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

Abstract: [Objective] To isolate and identify a fibrinolytic enzyme producing bacterium, and to analyze the component and characteristic of fibrinolytic enzyme. [Methods] Plasmin-producing bacterium was isolated by casein medium and AGAR-fibrin double-layer tablets from sea mud, soil, etc. Then its enzyme activity was measured by urokinase standard curve. The morphological, biochemical and physiological characteristics and 16S rDNA gene were analyzed to identify the taxonomic position of strain CNY16. The composition of the extracellular plasmin system was analyzed by SDS-PAGE and fiber protease zymogram. [Results] A strain named CNY16 with

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA021306)

*通讯作者: Tel: 86-411-87402624

✉: 王晓辉: wangxiaohui@dlu.edu.cn; 迟乃玉: cny7566@126.com

收稿日期: 2013-11-27; 接受日期: 2013-12-04; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-11

fibrinolytic activity was isolated and identified as *Bacillus safensis*. The results of SDS-PAGE and fiber protease zymogram showed that the extracellular fibrinolytic enzyme system contained at least two fibrinolytic enzymes with molecular masses of approximately 33 kD and 23 kD, respectively. The plasmin effectively dissolved fibrin clots, but did not hydrolyze blood cells. **[Conclusion]** CNY16 was a novel plasmin-producing bacterium, the fibrinolytic enzyme produced by strain CNY16 hold the valuable property in high activity and good stability. The strain might provide a new source for novel fibrinolytic enzymes.

Keywords: Fibrinolytic enzyme, *Bacillus safensis*, Identification, Fiber protease zymogra

血栓性疾病是血栓形成和血栓栓塞两种病理过程所引起的疾病,可分为动脉性血栓、静脉性血栓及毛细血管性血栓,其发病率高居各种疾病之首,严重威胁人类的生命健康,且近年来还有增长之势^[1-2]。溶栓疗法是治疗血栓栓塞性疾病最为有效并且可靠的手段。目前,国内外已使用的传统溶栓药物有链激酶(SK)、尿激酶(UK)、组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)等^[3-6]。传统药物主要从动植物组织中提取获得,大都因为缺乏对纤维蛋白的特异性和稳定性而造成易出血等毒副作用,价格昂贵,还需大量给药,并且均不能口服。因此寻找新型高效、来源丰富的溶栓药物很有必要。微生物物种丰富、生长速度快、条件易控制、易于基因工程改造,因此是寻找潜在溶栓药物的重要来源^[7]。目前,细菌、真菌和放线菌中都有发现纤溶酶,尤以细菌中发现产纤溶酶种类最多,如芽孢杆菌^[8]、链霉菌^[9]、海洋假单胞菌^[10]、菊芋小孢根霉^[11]、米曲霉菌^[12]、放线菌^[13]、白色假丝酵母菌^[14]等。

本实验从大连海域附近土壤中筛选到了一株产纤溶酶活性良好的菌株 CNY16,经形态学特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析等多项分类研究,鉴定为 *Bacillus safensis* (GenBank 登录号 KF802857)。对其所产纤溶酶系进行纤溶组分及部分纤溶性质进行研究,该菌株所产的纤溶酶系含有至少两种纤溶酶成分,能有效溶解血块且对红细胞不产生降解作用。为治疗心血管疾病的药物开发、功能性保健食品的开发以及为后续纤溶酶的分子生物学性质研究提供了材料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: CNY16 筛选自大黑山土壤,从几十

株大连附近海水海泥及大黑山等环境中经过初筛复筛等步骤筛选出来最优良菌株。现由大连大学辽宁省海洋微生物工程技术研究中心保藏。

1.1.2 主要试剂和仪器: 核酸 Marker, Fermentas 公司,加拿大;牛血清白蛋白,北京索莱宝科技有限公司;纤维蛋白原(牛血)、凝血酶(牛血),尿激酶, Sigma-Aldrich 公司,美国;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基: 初筛培养基(g/L): 干酪素 5.0, 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 10.0, 酪氨酸 0.1, NaCl 5.0, CaCl₂ 0.1, 琼脂 20, 蒸馏水 1 L, pH 7.0-7.2。

琼脂-纤维蛋白双层平板配制方法: 称取 0.2 g 琼脂加热溶于 10 mL 巴比妥钠缓冲液中,倒入培养皿中,待冷却凝固形成第一层。称取 0.1 g 琼脂糖加热溶于 10 mL 巴比妥钠缓冲液中,然后放入 55 °C 水浴锅中。称取 0.02 g 纤维蛋白原溶于 5 mL 巴比妥钠缓冲液中,待溶解后与琼脂糖溶液混匀,并加入 200 μL 100 IU 凝血酶。充分混匀后倒入已凝固的琼脂平板上。待冷却形成双层纤维蛋白平板后,放入冰箱中备用。由于纤维蛋白原易失活,故纤维蛋白平板最好现用现配,确保每一平板厚度相同,以减少实验误差。然后用 3 mm 胶头滴管打孔,放在 4 °C 备用。

1.2 酶活测定方法

纤溶酶活性测定参照 Astrup 等^[15]的方法并稍作修改。

1.3 菌种的分离

将取得的样品经梯度稀释后在酪蛋白培养基涂布,把有透明圈的菌株挑出进行纯化培养,然后经过摇瓶培养,离心得上清液点样 10 μL 在琼脂-

纤维蛋白双层平板上复筛,能形成透明圈的说明该菌能分泌具有纤溶活性的产物。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 细菌形态观察: LB 琼脂平板上,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。

1.4.2 菌株生理生化特征鉴定: 根据《常见细菌系统鉴定手册》^[16]设计生理生化实验。主要包括蔗糖、甘露糖、Tween 80,淀粉、明胶、纤维素等发酵实验,以及氧化酶、接触酶、过氧化氢酶、V-P、反硝化、脲酶、甲基红反应、亚硝酸还原、硝酸盐还原、吲哚产生等生理生化鉴定,将结果与参考菌株^[17]对照。

1.4.3 16S rRNA 基因的扩增与分析: 采用酚氯仿抽提法提取菌株 DNA。使用细菌 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增,引物设计如下: Forward primer P1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 Reverse primer P2 (5'-GGTTACCTGTTCGACTT-3')。扩增反应体系 Ex Taq (5 U/ μ L) 0.25 μ L, Buffer 5.0 μ L, dNTPs mixture 5.0 μ L, P1 primer 1.0 μ L, P2 primer 1.0 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。扩增反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 8 min。PCR 得到的扩增产物送交上海生工生物有限公司测序。将测序结果在 NCBI 中 BLAST 比对后递交 GenBank 数据库与已有的序列进行比较分析,确定该菌株的分类地位,并将序列提交 GenBank 获得登录号。采用 MEGA 5.05 软件进行多序列匹配比对,计算相近序列之间的进化距离,采用邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树。

1.5 纤溶酶系组分分析及性质研究

1.5.1 粗酶液的制备: 将菌株 CNY16 接种到装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中,置于 30 °C,转速 166 r/min 条件下培养 52 h,发酵液经 4 °C、6 000 r/min 离心 25 min,去除菌体,得到粗酶液。

1.5.2 纤维蛋白酶谱法检测纤溶组分: 纤维蛋白酶谱是 SDS-PAGE 电泳与纤维蛋白自显影方法的融合,在 12% 分离胶中加入适量纤维蛋白原和凝血酶反应生成纤维蛋白,其他不变^[18-20]。经过 SDS-PAGE 电泳后,用蒸馏水冲洗干净凝胶,转入 2.5% (体积比) Triton X-100 溶液中,轻摇 2 h,期间更换 2 次溶液。然后将分离胶用蒸馏水冲洗后放在反应液中孵育 16 h,最后用常规考马斯亮蓝法染色,经脱色后在分离胶的蓝色背景下观察是否有裂解带。

1.5.3 溶解纤维蛋白作用方式测定: 购买的血纤维蛋白原中一般存在纤溶酶原,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^[21]。阳性平板置 85 °C 保温 30 min,冷却至室温制成阴性平板。结合 1.1.3 所述方法,制得 2 个纤维蛋白平板。用直径为 3 mm 的打孔器在平板上打孔,将 10 μ L 粗酶液分别加入 2 个平板中,30 °C 培养 16 h 后测量溶圈直径。阳性平板反映了直接溶解纤维蛋白及激活纤溶酶原间接溶解纤维蛋白的双重作用,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。以此判断纤溶酶溶解纤维蛋白的作用方式。

1.5.4 体外溶栓及红细胞溶血检测: 由辽宁省糖酯代谢综合实验室提供新鲜实验小鼠血液,待其自然凝固形成凝块,用滤纸吸附表面液体称取 1 g 血块。加入 1 mL CNY16 粗酶液(含 0.9% NaCl)放于 30 °C 培养箱内保存 8 h 后,称量溶栓后血块质量,即可计算出溶掉的血块质量,同时以血栓在含 0.9% NaCl 的巴比妥钠缓冲液中的溶解情况进行对照,并镜检每组各阶段红细胞形态变化^[22],以上实验做 3 组重复以减少误差。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及形态特征

自大连湾附近海泥海水样品中分离到 10 余株具有纤溶活性的菌株。其中编号为 CNY16 的菌株在酪蛋白培养基及琼脂-纤维蛋白双层平板上都能

形成较大透明圈。在 LB 培养基上菌落特征如图 1 所示,菌落呈乳黄色,不透明,为圆形或者近圆形,边缘不整齐,菌落表面无光泽,中央有突起。显微镜下观察菌株呈单个菌体,直杆状,两端钝圆,革兰氏染色阳性(图 2),有芽孢,无荚膜。

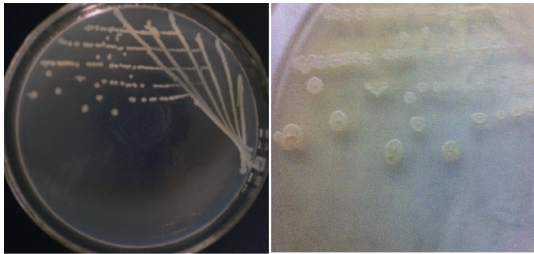


图 1 菌株 CNY16 菌落形态(LB 平板)
Figure 1 Colonial morphology of strain CNY16 (LB plate)

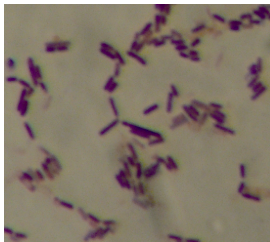


图 2 菌株 CNY16 革兰氏染色结果(1 000×)
Figure 2 Strain CNY16 gram staining results observed by microscope with magnification of 1 000×

2.2 生理生化特征

菌株 CNY16 能够分解蔗糖、甘露糖、Tween80,不能分解淀粉、明胶、纤维素。氧化酶、接触酶、过氧化氢酶、V-P、反硝化、脲酶试验结果为阳性,甲基红反应、亚硝酸还原、硝酸盐还原、吲哚产生等试验结果为阴性。参考菌株为一株沙福芽孢杆菌^[18],生理生化特征对照结果见表 1。

2.3 16S rRNA 基因的扩增与分析

将菌株 CNY16 提取的 DNA 经 PCR 扩增后对其产物进行序列测定,得到长度为 1 423 bp 的序列,提交到 GenBank,获得 GenBank 登录号为 KF802857,利用 BLAST 软件与 GenBank 中的相关序列进行同源性比较,结果显示菌株 CNY16 的目的 DNA 序列与芽孢杆菌属的沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)同源性高达 100%。利用 MEGA 5.05 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树构建,结果见图 3,遗传距离显示菌株 CNY16 与 *Bacillus safensis* 遗传距离最近。

2.4 纤溶酶系组分分析及性质研究

2.4.1 溶解纤维蛋白的作用方式:实验结果显示,没有加热的纤维蛋白平板中有明显的溶解圈,而加热后纤维蛋白平板也有较明显的溶解圈,且阳性平板溶解圈比阴性平板大,推断该纤溶酶可直接降解纤维蛋白作用,还可能同时具有直接降解和激活纤溶酶原间接降解纤维蛋白的双重作用。

表 1 菌株 CNY16 的生理生化特征
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain CNY16

鉴定特征 Identification of features	菌株 CNY16 Strain CNY16	参考菌株 Reference strain	鉴定特征 Identification of features	菌株 CNY16 Strain CNY16	参考菌株 Reference strain
Oxidase test	+	+	Cellulose decomposing	-	-
Catalase test	+	ND	V-P	+	+
Contact enzyme test	+	+	Nitrite reduction	-	-
Starch fermentation	-	-	Denitrification	+	+
Sucrose fermentation	+	+	Nitrate reduction	-	-
Mannito fermentation	+	+	Urease	+	-
Tween 80	+	ND	Indole	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	Methyl red	-	-

注:+: 阳性反应;-: 阴性反应;ND: 无数据。

Note: +: Positive; -: Negative; ND: No data.

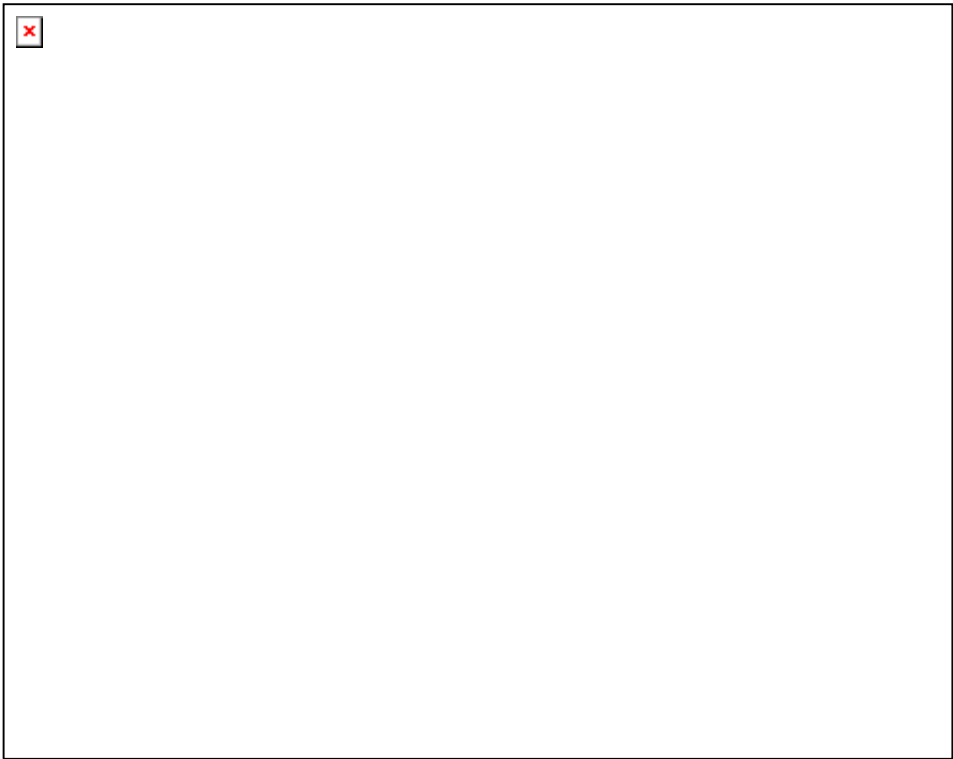


图 3 菌株 CNY16 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain CNY16 based on 16S rRNA gene sequence

注：发育树节点的数字表示 Bootstrap 值(自举 1 000 次)，括号内的数字是在 GenBank 上的序列登录号，线段 0.005 代表 1/200 进化距离单位。

Note: Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 1 000 samplings), the numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Scale bar: 0.005 nucleotide substitution per 200 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

2.4.2 纤维蛋白酶谱法检测纤溶组分：菌株 CNY16 产纤溶酶 SDS-PAGE 电泳和纤维蛋白酶谱结果如图 4 所示，纤维蛋白酶谱图可以看出每个泳道前段的纤维蛋白有被分解迹象，说明该纤溶酶具有显著的纤溶活性，且每个泳道都存在两条亮带 a 和 b，可判断该纤溶酶系中存在纤溶活性成分至少有两种；SDS-PAGE 电泳图主要也有两条带 A 和 B，初步判断该纤溶酶系主要存在两种蛋白；将两个结果进行对比分析，由于纤维蛋白酶谱实验中，分离胶在其他条件不变的基础上加入了纤维蛋白原和凝血酶，可能导致不同蛋白在分离胶内运动距离与 SDS-PAGE 不能完全一致，我们初步判断 a 带与泳道中 A 带对应，分子量约为 33 kD，b 带与泳道中 B 带对应，分子量约为 23 kD。

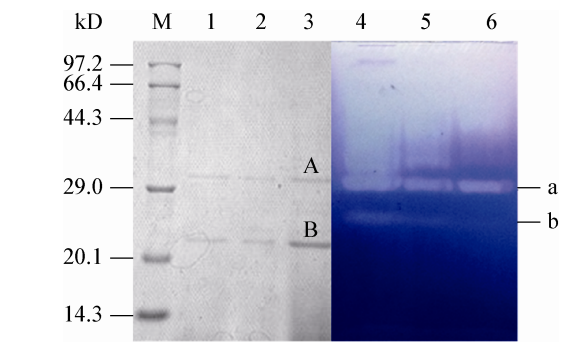


图 4 SDS-PAGE 和纤维蛋白酶谱

Figure 4 SDS-PAGE and fibrous protein zymogram

注：M：蛋白质分子量 Marker；1：粗酶液；2：盐析；3：超滤；4：超滤酶谱；5：盐析酶谱；6：粗酶液酶谱。

Note: M: Protein marker; 1: Crude enzyme; 2: Salting out; 3: Hyperfiltration; 4: Hyperfiltration zymogram; 5: Salting out zymogram; 6: Crude enzyme zymogram.

2.4.3 CNY16 纤溶酶体外溶栓及其对红细胞的作用: CNY16 粗酶液对实验小鼠血块的溶解情况如表 2 所示,凝血块在菌株 CNY16 粗酶液中作用 8 h 之后大部分被溶解,而血栓在缓冲液中作用 8 h 后只有很少量被溶出。在显微镜下观察红细胞形态发现几乎不变,表明该菌株粗酶液对红细胞无溶血作用。

3 讨论

血栓栓塞性疾病是一类严重危害人类健康的心血管疾病。目前治疗血栓栓塞性疾病的最为有效并且可靠的手段是采用纤维蛋白溶解酶或其激活剂进行的溶栓疗法。传统药物存在缺乏对纤维蛋白的特异性而造成易出血的副作用,价格昂贵且需大量给药。因此是寻找潜在溶栓药物的重要来源。

本实验从大连附近海泥、土壤等环境筛选到一株性能优良的纤溶酶产生菌 CNY16,该菌为革兰氏阳性菌,经 16S rDNA 序列分析鉴定发现该菌株与 NR_041794 序列相似性为 100%,并且生理生化实验与形态学观察均显示该菌株与参考菌株一系列特征相似度很高。可初步鉴定为沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*)

通过纤溶酶在普通纤维蛋白平板与加热后的纤维蛋白平板溶解圈结果显示,该纤溶酶能直接降

解纤维蛋白酶,还可能间接激活酶原降解纤维蛋白酶。通过 SDS-PAGE 图谱和纤维蛋白酶谱对比分析,可初步判断菌株 CNY16 可以分泌至少两种纤溶酶,分子量大小分别为 23 kD 和 33 kD,这在发现的产纤溶酶菌株中很少见,如日本学者报道的纳豆激酶,分子量 27.7 kD,以激活方式降解纤维蛋白^[23];韩国学者报道的纤溶酶 CK,分子量 28.2 kD^[24];Shiokara 中的纤溶酶分子量 35 kD^[25]。在国内,顾昌玲等报道的 B-60 纤溶酶分子量 34 kD^[8];牛术敏等报道的 BS-26 纤溶酶分子量 32 kD,作用方式是直接溶解,不能通过激活纤溶酶原降解纤维蛋白^[26];王骏等报道的 Y405 纤溶酶分子量 32 kD,只能直接降解^[27]。

另外,体外溶栓实验表明菌株 CNY16 产纤溶酶能有效溶解血块中纤维蛋白,并且对红细胞不产生降解作用,这些为开发出一种新型、安全、实用的食品级功能性添加剂和药用溶栓剂提供必要的科学依据。这对开发出新型、安全溶栓药物和溶栓保健食品具有重要意义。我们将进一步对该菌株所产纤溶酶进行分离纯化,溶栓机制,酶的核苷酸序列、氨基酸组成以及体内溶栓实验进行研究,为其开发利用提供更多科学理论依据。

参 考 文 献

- [1] 翁郁华,杨晓彤,杨明俊,等. 微生物纤溶酶的多样性与应用前景[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(8): 1562-1564.
- [2] 熊强,梁剑光,熊晓辉. 微生物——几种溶栓药物的重要来源[J]. 微生物学通报, 2003, 30(5): 116-118.
- [3] 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.
- [4] Hua Y, Jiang B, Mine Y, et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(4): 1451-1457.
- [5] Kim JS, Sapkota K, Park SE, et al. A fibrinolytic enzyme from the medical mushroom *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Microbiology, 2006, 44(6): 622-631.
- [6] 武临专,陈昉,王以光,等. 一种产生纤溶酶的链霉菌 C-3662 的鉴定及发酵研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(5): 600-605.
- [7] 刘晓婷,蔺新英. 豆豉纤溶酶的研究进展[J]. 预防医学

表 2 CNY16 粗酶液对实验小鼠血块的溶解实验
Table 2 CNY16 crude enzyme solution for clot dissolution experiments in mice

质量 Weight (g)	类别 Sort	
	粗酶液 Crude enzyme	缓冲液 Buffer solution
血块初始质量 The initial weight of blood clots	1.000±0.023	1.000±0.026
血块最终质量 The eventually weight of blood clots	0.130±0.046	0.910±0.041
溶解的血块质量 Weight of the blood clot dissolved	0.870±0.069	0.090±0.067

注:表中数据为平均数±标准差。

Note: Data in the table are $\bar{x} \pm s$.

- 论坛, 2006, 12(4): 459-461.
- [8] 顾昌玲, 郭晓军, 李佳, 等. 一株产纤溶酶芽孢杆菌的鉴定及纤溶酶的分离纯化与性质分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(4): 492-497.
- [9] 武临专, 陈昉, 王以光, 等. 一种产生纤溶酶的链霉菌 C-3662 的鉴定及发酵研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(5): 600-605.
- [10] 刘晨光, 魏香, 刘万顺. 海洋假单胞菌纤溶酶的酶学性质研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(5): 730-734.
- [11] 曹兴南, 王海宽, 孙岩, 等. 一株来源于酒曲的纤溶酶产生菌的鉴定及其酶学性质[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(5): 13-18.
- [12] 高占争. 微生物产纤溶酶的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2006.
- [13] 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.
- [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] Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952, 40: 346-351.
- [16] 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: 43-65.
- [17] 王志丽, 管越强, 王颖, 等. 养殖中华鳖肠道中芽孢杆菌的分离鉴定及其噬菌体的分离和性质分析[J]. 水产科学, 2012, 31(7): 419-424.
- [18] 武金霞, 赵晓瑜. 纤维蛋白酶谱检测蛆蛆纤溶酶组分[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(21): 1656-1659.
- [19] 黄明星, 叶韵, 韩雅莉. 纤溶活性蛋白检测方法研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(10): 113-120.
- [20] 刘士辉, 朱恒奇, 徐秀英. SDS-PAGE 纤维蛋白自显影法检测不同分子量的纤溶酶原激活剂[J]. 生物技术通讯, 1994, 5(3): 141-142.
- [21] 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.
- [22] 刘美艳, 张健, 孙楠, 等. 枯草芽孢杆菌纤溶酶的纯化及性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(7): 42-45.
- [23] Fujita M, Nomura K, Hong K. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197(3): 1340-1347.
- [24] 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: 2482-2488.
- [25] Sumi H, Nakajima N, Yatagai C. A unique strong fibrinolytic enzyme (Katsuwokinase) in skipjack "shiokara" a Japanese traditional fermented food[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1995, 112(3): 543-547.
- [26] 牛术敏, 郭晓军, 李术娜, 等. 枯草芽孢杆菌 BS-26 菌株纤溶酶的性质分析及活性组分的分离纯化[J]. 微生物学报, 2008, 48(10): 1387-1392.
- [27] 王骏, 王敏, 王以光, 等. 链霉菌产生的新型纤溶酶的纯化和性质的研究[J]. 生物工程学报, 1999, 15(2): 147-152.