

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (3) :345 - 351; 4 March 2014

ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.012

## 产高活性抗凝溶栓双活性蛋白的短小芽孢杆菌的筛选及鉴定

刘冰花, 罗亚雄, 陶雪梅, 谢小英, 马旭攀, 张林

成都大学医护学院, 四川 成都 610106

**摘要:**【目的】筛选可产生抗血栓活性物质的细菌。【方法】利用 VY/4 平板、酪蛋白平板从水样、土样、兔粪、羊粪、朽木等 20 多个样品中筛选目的菌株; 利用纤维蛋白平板和纤维蛋白试管检测抗血栓活性; 利用形态学特征、理化性质、16S rRNA 序列同源性鉴定目的菌株。【结果】得到 5 株可产生抗血栓活性物质的细菌, 重点研究了菌株 LDS33, 发现其分泌的胞外蛋白在纤维蛋白平板上和纤维蛋白试管中均显示出强烈的溶栓活性, 通过试管法发现此蛋白质同时具有较强的抗凝活性。结合形态学、理化性质、16S rDNA 序列及进化树分析, 发现该菌株属于硬壁菌门芽孢杆菌目芽孢杆菌科芽孢杆菌属的短小芽孢杆菌, 将其命名为 *Bacillus pumilus* LDS. 33。【结论】短小芽孢杆菌 LDS33 可产生高活性的抗凝溶栓双活性蛋白。

**关键词:**短小芽孢杆菌, 抗凝, 溶栓, 筛选, 鉴定

**中图分类号:**Q 939.124 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2014) 03-0345-07

血栓栓塞性疾病涉及到心血管科、肾脏科、神经内科等多个领域, 是致死或致残、加速人体衰老过程的直接原因和罪魁祸首。全身哪里有血管, 哪里就可能发生血栓。因此, 防治血栓已经成为世界各国最关心的问题之一。

溶栓抗凝疗法治疗血栓性疾病是效果最好的治疗手段之一, 所以抗血栓药物的发展对控制血栓病人的死亡率和致残率起到了十分重要的作用<sup>[1]</sup>。目前, 临床上治疗血栓病的抗凝药物大部分作用单一, 要么只有溶栓作用, 要么只有抗凝作用, 抗凝、溶栓药物需要分别给药, 临床应用过程中有许多不便之处, 所以寻找溶栓活性高、副作用小、具有溶栓和抗凝双活性的药物已逐渐成为全世界医药行业的研究热点。

短小芽孢杆菌属于芽孢杆菌属, 产生活性物质的概率很高, 不但可以产生多种酶, 如耐热木聚糖

酶<sup>[2]</sup>、耐热丝氨酸碱性蛋白酶<sup>[3]</sup>、谷氨酰内肽酶<sup>[4]</sup>、胆红素氧化酶<sup>[5]</sup>、胶原蛋白酶<sup>[6]</sup>、碱性纤维素酶<sup>[7]</sup>、脂肪酶<sup>[8-9]</sup>、耐热角蛋白酶<sup>[10]</sup>、降解毒死蜱的酶<sup>[11]</sup>、降解石油的酶<sup>[12]</sup>、降解血红蛋白的酶<sup>[13]</sup>等, 而且还可以产生多种抗生素, 特别是抗真菌的抗生素<sup>[14-15]</sup>。所以为了寻找新的抗血栓药物, 同时发掘短小芽孢杆菌的新用途, 本课题组从成都市周边的水样、土样、朽木等样品中筛选具有抗凝溶栓双活性物质的短小芽孢杆菌菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品:**采自成都市区、洛带古镇、龙泉驿区、双流县、黄龙溪古镇等地的兔粪、羊粪、泥土、水、朽

基金项目:四川省教育厅重点项目(12ZA207)

作者简介:刘冰花(1970-), 女, 陕西周至人, 硕士, 副教授, 主要从事微生物生物制药及微生物资源方面的研究。Tel: 13558745351; E-mail: liubinghua2006.com@163.com

收稿日期:2013-07-13; 修回日期:2013-11-24

木等共 20 个样品。样品采回后风干,马上使用(水样不用风干,采回后直接使用)。

**1.1.2 培养基:** VY/4 固体培养基<sup>[16]</sup>,种子培养基和 VY/4 固体培养基的成分相同,但不加琼脂粉;发酵培养基和酪蛋白培养基<sup>[17]</sup>,等。其它培养基按照参考文献 [18,19] 的配方配制。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**安琪酵母(湖北安琪酵母股份有限公司),维生素 B<sub>12</sub> (BR) (成都市科龙化工试剂厂),N-苯甲酰基甘氨酸钠(BR) (上海迈坤化工有限公司),明胶(BR) (天津市北辰方阵试剂厂),尿激酶(采用注射用尿激酶,100000U/支,丽珠集团丽珠制药厂),凝血酶(采用注射用凝血酶,500U/支,湖南一格制药有限公司),纤维蛋白原 1g/瓶(sigma 公司),UNI-Q-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工),UNI-Q-10 柱式胶回收试剂盒(上海生工);SW-CJ-4D 洁净工作台(江苏苏洁净化设备厂),DH-400 型电热恒温培养箱(北京中兴伟业仪器有限公司);全温振荡培养箱(琅玕),奥林巴斯生物显微镜 CX21BIM-SET6,PCR 反应扩增仪(加拿大 BBI 公司),3730 测序仪(美国 ABI 公司),YXJ-2 离心机(湘仪离心机仪器有限公司),H6-1 微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂),凝胶成像系统(Gene Genius 公司),U-3010 紫外-可见分光光度计(Hitachi 公司),移液器(加拿大 BBI 公司)。

## 1.2 目的菌株的筛选

**1.2.1 样品的预处理:**取样品适量,用抗真菌药 30 mg/L 的多菌灵溶液浸泡(水样没有用多菌灵处理)<sup>[17]</sup>。

**1.2.2 VY/4 平板法:**将用多菌灵处理过的兔粪、羊粪、泥土、树皮、朽木及没有用多菌灵处理过的水样放入加有 30 mg/L 多菌灵 VY/4 平板上,置 30℃ 恒温保湿培养,并及时挑取疑似短小芽孢杆菌的菌落,转接于 VY/4 平板上,继续置 30℃ 恒温保湿培养,并反复转接于 VY/4 平板上培养,直到目测没有杂菌为止。

**1.2.3 酪蛋白平板法:**将疑似菌株接种在酪蛋白平板上,30℃ 恒温保湿培养。观察是否有透明圈并测量透明圈直径大小,有透明圈者则证明该菌株可能产生纤溶酶,透明圈直径(D)与菌落直径(d)之比(D/d)越大,其酶活性越高。

## 1.3 目的菌株分泌的胞外蛋白质溶液抗血栓活性的检测

**1.3.1 目的菌株分泌的胞外蛋白质溶液的制备:**保

存菌株活化后,稀释涂平板(30℃、4 d),挑取单菌落于 100 mL 种子培养基中,置旋转式摇床 30℃、150 r/min 培养 2 d,以 5% 的接种量转接入 100 mL 发酵培养基中,置旋转式摇床 30℃、150 r/min 培养 7 d,然后将发酵液离心(2862 × g, 30 min),使上清液和菌体沉淀分离,弃沉淀。50℃ 旋转蒸发上清液至体积为 2 mL,此为胞外浓缩液。然后在胞外浓缩液中缓慢加入固体硫酸铵使其中的蛋白质全部沉淀,离心,分离上清液和沉淀,沉淀用 2 mL 0.1 mol/L pH7.4 的磷酸缓冲液溶解,此为菌体分泌的胞外蛋白质溶液。

**1.3.2 目的菌株分泌的胞外蛋白质溶液溶栓活性的检测:**用纤维蛋白平板法检测胞外蛋白质溶液的溶栓活性。按照 Astrup 的方法制作纤维蛋白平板<sup>[20]</sup>,待平板凝固后,打孔。向纤维蛋白平板的孔中分别滴加 30 μL 10 U/mL、100 U/mL、500 U/mL、1000 U/mL、2500 U/mL、5000 U/mL 的尿激酶标准品和 30 μL 目的菌株的胞外浓缩液,平皿加盖,35℃ 温育 6 h,观察目的菌株的胞外浓缩液是否像尿激酶一样会出现透明圈,如果出现透明圈就说明有溶栓活性,并计算出目的菌株胞外浓缩液纤溶酶的酶活力单位。在另一纤维蛋白平板的孔中分别滴加 30 μL 5000 U/mL 尿激酶标准品、30 μL 目的菌株的胞外蛋白质溶液和 30 μL 胞外浓缩液经硫酸铵沉淀后的上清液,平皿加盖,35℃ 温育 6 h,观察是否出现透明圈及透明圈大小。

用纤维蛋白试管法进一步检测胞外蛋白质溶液的溶栓活性:取 2 支短试管,分别向其中加入 2.5 mg/mL 的纤维蛋白原溶液 2 mL,置 37℃ 水浴中 3 min,然后向每支试管中一滴一滴加入 20 U/mL 的凝血酶溶液,边加边摇,直到试管中的液体全部凝固为止,这时向两支试管中分别加入 100 μL 目的菌株的胞外蛋白质溶液和 100 μL 目的菌株的胞外浓缩液经硫酸铵沉淀后的上清液,然后将两支试管均置入 37℃ 水浴中,10 min 后观察每支试管中的栓状物是否溶解。

**1.3.3 目的菌株胞外蛋白质溶液抗凝活性的检测:**在 3 支短试管中各加入 1mg/mL 的纤维蛋白原溶液 2 mL,置 37℃ 水浴中 3 min,然后向第一支试管中一滴一滴加入 20 U/mL 的凝血酶溶液,直至试管中的液体全部凝固,并记录所加的凝血酶溶液的体积;在另外 2 支试管中先分别加入 30 μL 目的菌株的胞外

蛋白质溶液和 80  $\mu\text{L}$  目的菌株的胞外浓缩液经硫酸铵沉淀后的上清液, 然后再加入和第一管相同体积的 20 U/mL 的凝血酶溶液, 置 37 $^{\circ}\text{C}$  水浴中, 观察后边 2 支试管中是否出现栓状物。

#### 1.4 目的菌株的种属鉴定

**1.4.1 菌株的形态学观察:** 将目的菌株在 VY/4 固体培养基上进行稀释涂布, 在 30 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中恒温培养 4-5 d, 观察菌落形态, 同时对菌株进行革兰氏染色<sup>[18]</sup>。

**1.4.2 菌落的理化性质检验:** 分别对目的菌株进行接触酶试验、葡萄糖氧化发酵实验、V-P 测定、淀粉水解试验、明胶水解试验、马尿酸盐水解试验、硝酸盐还原试验、厌氧洋菜中是否生长等实验<sup>[19,21]</sup>。

**1.4.3 16S rDNA 的鉴定:** 将目的菌株在 VY/4 平板上培养 4 d 后, 用上海生工 SK1201-UNIQ-40 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒抽提其基因组 DNA。以原核生物 16S rDNA 保守序列的通用引物: 7f (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 1540r (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 为引物, 以目的菌株的基因组 DNA 为模板, 对该菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 采用 25  $\mu\text{L}$  反应体系, 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$  5 min; 循环 94 $^{\circ}\text{C}$  30 S, 55 $^{\circ}\text{C}$  35 S, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环, 延伸 8 min。扩增结束后, 用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测, 切割所需 DNA 目的条带, 由上海生工测序, 然后将该菌株的 16S rDNA 序列在 NCBI GenBank 中进行 BLAST 检索, 采用 MEGA 5.2.1 软件进行多序列匹配排列, 采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树, 采用 Bootstrap (重复抽样 1000 次) 分析评估树的稳定性。

## 2 结果

### 2.1 目的菌株胞外蛋白质溶液的抗凝溶栓活性

从 20 个样品中分离出 5 株可降解酪蛋白的菌株, 发现成都市洛带镇某鱼池水样中的菌株 LDS33 在酪蛋白平板上的透明圈最大, 如图 1 所示。在溶栓实验中, 发现菌株 LDS33 的胞外浓缩液具有非常强的溶栓活性, 如图 2 所示。以透明圈两个垂直直径乘积的常用对数为横坐标, 以尿激酶标准品酶活力单位的常用对数为纵坐标, 作图得出溶栓酶活性的标准曲线, 如图 3 所示, 根据标准曲线和 LDS33 的胞外浓缩液在纤维蛋白平板上的透明圈直径乘积的大小, 计算出其酶活力单位高达

18055 U/mL。同时, 发现溶栓活性由菌株 LDS33 的胞外蛋白质溶液产生, 其不但在纤维蛋白平板上可产生明显的透明圈, 而且也可以迅速的使试管里纤维蛋白原和凝血酶形成的固体物质全部溶解。在抗凝实验中, 加有菌株 LDS33 胞外蛋白质溶液的试管经过 24 h 都没有出现栓状物 (试管中的混合物流动性很好, 没有絮状物出现), 而没有滴加菌株 LDS33 胞外蛋白质溶液的试管里的液体马上全部凝固 (全部形成栓状物)。这些说明菌株 LDS33 分泌的胞外蛋白既具有明显的溶栓活性, 又具有明显的抗凝活性。

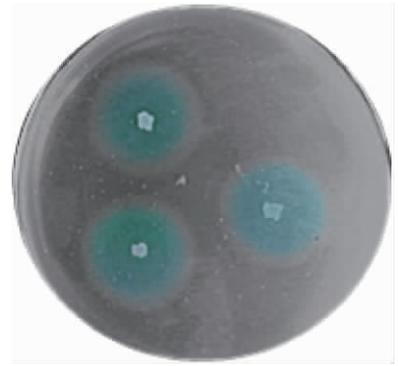


图 1. 菌株 LDS 33 在酪蛋白平板上形成的透明圈

Figure 1. The transparent circle is formed by the Strain LDS 33 in casein plate. Incubating for 122 h in 30  $^{\circ}\text{C}$ ,  $d = 0.4\text{cm}$ ,  $D = 2.5\text{cm}$ .

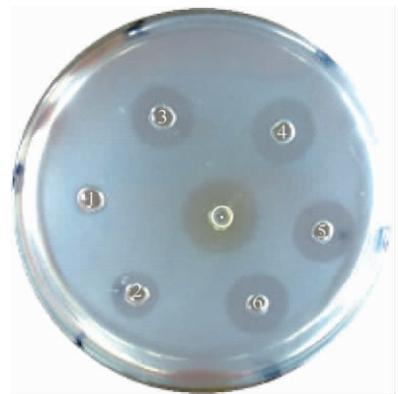


图 2. 抗凝溶栓双活性物质在纤维蛋白平板上形成的透明圈

Figure 2. The transparent circle is formed by the double active substance with anticoagulation and thrombolysis in the fibrin plate.

① 30 $\mu\text{L}$  10U/mL urokinase; ② 30 $\mu\text{L}$  100U/mL urokinase; ③ 30 $\mu\text{L}$  500U/mL urokinase; ④ 30 $\mu\text{L}$  1000U/mL urokinase; ⑤ 30 $\mu\text{L}$  2500U/mL urokinase; ⑥ 30 $\mu\text{L}$  5000U/mL urokinase; ⑦ 30 $\mu\text{L}$  extracellular concentration liquid of the strain LDS 33. Incubating for 4 h in 35  $^{\circ}\text{C}$ .

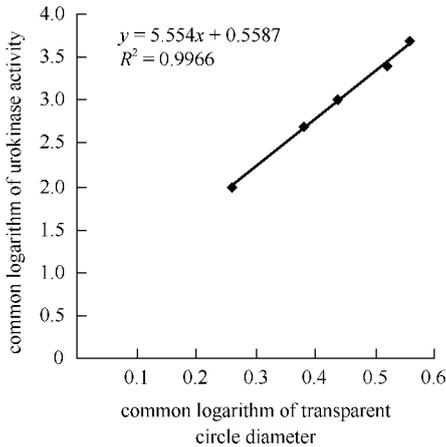


图 3. 尿激酶溶栓活性标准曲线

Figure 3. Standard curve of urokinase.

## 2.2 目的菌株的形态特征

菌株 LDS33 在 VY/4 平板上的菌落为浅黄色、较薄、表面黏湿,边缘不整齐,有很多树叶边缘状的突起。该菌株在 VY/4 平板上生长缓慢,可滑动。光镜下菌株杆状,两端钝圆。

## 2.3 目的菌株的理化性质

菌株 LDS33 的理化性质如表 1 所示。

## 2.4 16S rDNA 序列分析及系统发育学分析

对菌株 LDS33 的 16S rDNA PCR 产物测序后发现其 16S rDNA 共有 1440 bp,将其 16S rDNA 序列输入 NCBI GenBank 中 blast,发现其和菌株 *Bacillus*

表 1. 菌株 LDS33 的理化性质

Table 1. The physical and chemical properties of the strains LDS33

characteristic	LDS33
glucose fermentation acid production	+
aerogenesis	-
gram staining	+
catalase test	+
determination of V - P	+
amylolysis	-
hippurate hydrolysis	+
nitrate reduction	-
gelatin hydrolysis	+
the growth of Anaerobic Agar	-

*pumilus* SAFR-032 的相似度为 99%,和菌株 *Bacillus atrophaeus* 1942 的相似度为 98%,和菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的相似度为 97%,用 MEGA 5.2.1 软件构建系统发育树,发现菌株 LDS 33 与菌株 *Bacillus pumilus* SAFR-032 (AY167879.1) 聚到了同一个分支,亲缘关系最近。结合菌株的菌体及菌落形态、生理生化特性与 16S rRNA 基因序列的比对结果,确定细菌 LDS 33 属于硬壁菌门芽孢杆菌目芽孢杆菌科芽孢杆菌属的短小芽孢杆菌,命名为 *Bacillus pumilus* LDS.33 (图 4)。

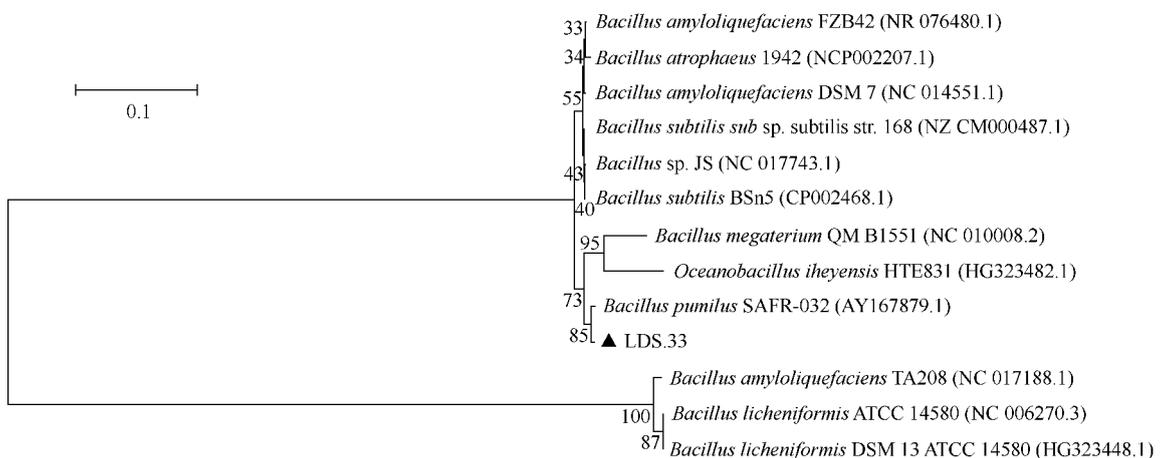


图 4. 菌株 LDS 33 的基因同源性的系统发育树

Figure 4. The phylogenetic position of strain LDS 33. The sequences used in the analysis were obtained from the GenBank Database (accession numbers are given parentheses). The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on Neighbor-joining analysis of 1000 resample data sets. The scale bar corresponds to 0.1 substitutions per nucleotide position.

### 3 讨论

人的全身器官及各组织均需通过动、静脉血管、毛细血管供血维持其正常功能, 如果出现血栓就会引起这些组织或器官供血不足或不供血, 造成该器官的功能紊乱而导致疾病, 严重时可危及生命。治疗血栓病的关键是溶栓和抗凝, 本研究从成都市洛带镇的鱼池水样中分离到的短小芽孢杆菌菌株 LDS33 可产生活性比较强的溶栓抗凝活性物质。该菌株现保存在中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC M 2013179, GenBank 登录号为 KF515275。

短小芽孢杆菌虽然产生活性物质的几率很高, 但之前还没有其产生抗血栓物质的报道。菌株 LDS33 产生的活性物质既有较强的溶栓活性, 也有较强的抗凝活性, 同时通过实验证明该活性物质的稳定性和溶解性都比较好, 因为在从胞外液浓缩该物质时, 我们采取的是真空旋转蒸发的方法, 发现在 60℃ 条件下旋蒸和 50℃ 条件下旋蒸后样品的活性差别不大, 同时将该活性物质在常温下放置 1 个月, 发现其仍然有较高活性; 用乙酸乙酯抽提该物质时, 发现该活性物质既能溶于水, 也能溶于乙酸乙酯。同时, 该菌株属于好氧菌, 耐 9% 的盐浓度和 45℃ 的高温环境, 在 VY/4 固体和液体培养基中的生长都比较好, 比较容易培养, 并且培养成本较低。所以菌株 LDS 33 既填补了短小芽孢杆菌在抗血栓方面的空白, 也拓宽了微生物产抗血栓药物的菌种范围, 而且最重要的是天然来源的抗凝溶栓双活性物质给血栓病的治疗提供了新的选择, 为菌种资源的开发和新型抗血栓药物的开发提供了重要的依据, 有进一步研究开发的價值。

### 参考文献

- [1] Kowalski M, Brown G, Bieniasz M, Oszejca K, Chabielska E, Pietras T, Szemraj Z, Makandjou-Ola E, Bartkowiak J, Szemraj J. Cloning and expression of a new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent — a staphylokinase variant. *Acta Biochimica Polonica*, 2009, 56(1): 41-53.
- [2] Garg G, Dhiman SS, Gautam R, Mahajan R, Patra AK, Sharma J. Bioscouring of jute fabric by cellulase-

- free alkalo-thermostable xylanase from *Bacillus pumilus* ASH. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 85-86: 43-48.
- [3] Jayakumar R, Jayashree S, Annapurma B, Seshadri S. Characterization of thermostable serine alkaline protease from an alkaliphilic strain *Bacillus pumilus* MCAS8 and Its applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 168(7): 1849-1866.
- [4] Balaban NP, Danilova YV, Shamsutdinov TR, Mardanov AM, Cheremin AM, Rudenskaya GN, Sharipova MR. Properties of the *Bacillus pumilus* glutamyl endopeptidase at different growth stages of its recombinant strain. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2013, 39(1): 40-47.
- [5] Edembe L, Gounel S, Cadet M, Durand F, Mano N. A highly efficient O<sub>2</sub> cathode based on bilirubin oxidase from *Bacillus pumilus* operating in serum. *Electrochemistry Communications*, 2012, 23: 80-82.
- [6] Wu Q, Li J, Li C, Chen H, Liu S. Isolation and identification of a *Bacillus pumilus* with collagenase activity. *China Leather*, 2007, 36(17): 16-19. (in Chinese)  
吴琦, 李军, 李陈, 陈惠, 刘书亮. 一株产胶原蛋白酶短小芽孢杆菌的分离与鉴定. 中国皮革, 2007, 36(17): 16-19.
- [7] Huang Y, Wu H, Xu X. Optimization of fermentation on process of *Bacillus pumilus* producing alkaline cellulase. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2012, 40(5): 172-175. (in Chinese)  
黄彦彦, 吴华珠, 许旭萍. 短小芽孢杆菌产碱性纤维素酶的发酵工艺优化. 贵州农业科学, 2012, 40(5): 172-175.
- [8] Li J, Li H, Duan X, Men J, Su F. Screening of organic solvent tolerant lipase-producing bacteria and enzymatic properties of crude lipase. *Food Science*, 2012, 33(03): 116-120. (in Chinese)  
李俊峰, 李红芳, 段效辉, 门晋名, 宿烽. 耐有机溶剂脂肪酶产生菌的筛选及其粗酶学性质. 食品科学, 2012, 33(03): 116-120.
- [9] Akbuluta N, Ozturka MT, Pijningb T, Ozturka SL, Gumusel F. Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(1): 123-129.

- [10] Rajput R, Gupta R. Thermostable keratinase from *Bacillus pumilus* KS12: production, chitin crosslinking and degradation of Sup35NM aggregates. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 118-126.
- [11] Ahmad F, Iqbal S, Anwar S, Afzal M, Islam E, Mustafa T, Khan QM. Enhanced remediation of chlorpyrifos from soil using ryegrass (*Lolium multiflorum*) and chlorpyrifos-degrading bacterium *Bacillus pumilus* C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 237-238:110-115.
- [12] Shen Y, Wang W, Li C. Screening of oil degrading strains in *Trifolium repens* Linn rhizosphere and its biodegrading characteristics. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2012, 6 (12): 4676-4680. (in Chinese)  
申圆圆, 王文科, 李春荣. 红三叶草根际区石油降解菌的筛选及降解性能. 环境工程学报, 2012, 6 (12): 4676-4680.
- [13] Li H, Ma M, Chen W. Study on the isolation, purification and zymetology properties of porcine hemoglobin enzyme degraded by *Bacillus pumilus* CN8. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31 (5): 171-174, 177. (in Chinese)  
李浩丽, 马美湖, 陈文成. *Bacillus pumilus* CN8 菌株降解猪血 Hb 酶的分离纯化及酶学性质研究. 食品工业科技, 2010, 31 (5): 171-174, 177.
- [14] Chen D, Sun S, Xie L. Isolation and identification of a strain of antagonistic bacteria inhibiting pathogenic fungi. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28 (23): 80-84. (in Chinese)  
陈东兴, 孙淑静, 谢连水. 一株病原真菌拮抗菌的分离与鉴定研究. 中国农学通报, 2012, 28 (23): 80-84.
- [15] Pang X, Xu H, Liao M, Huang H. Identification of antifungal bacteria strain BP08 and optimization of its fermentation conditions. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2011, 39 (8): 102-108, 113. (in Chinese)  
逢昔莎, 徐汉虹, 廖美德, 黄海翔. 抗真菌活性菌株 BP08 的鉴定及培养条件和培养基的优化. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39 (8): 102-108, 113.
- [16] Liu B, He L. Isolation and distribution of species resource of *Myxobacteria* in Chengdu Region. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2011, 34 (2): 146-151. (in Chinese)  
刘冰花, 何柳兴. 成都地区黏细菌物种资源的分离和区域分布. 新疆农业大学学报, 2011, 34 (2): 146-151.
- [17] Liu B, Luo Y, Zeng Y, Xie X, Rao T, Chen J, Zhang Y. Preliminary study of enzymic activity of ten *Myxobacteria* strains from Chengdu. *Journal of ChengDu University (Natural Science Edition)*, 2012, 31 (1): 25-28. (in Chinese)  
刘冰花, 罗亚雄, 曾玉桂, 谢小英, 饶停, 陈娟, 张艳萍. 对成都地区 10 株黏细菌菌株酶活性的初步研究. 成都大学学报(自然科学版), 2012, 31 (1): 25-28.
- [18] 杨革. 微生物学试验教程. 北京: 科学出版社, 2005: 143-152.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 371-373, 377, 382-383.
- [20] Astup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, 40: 346-351.
- [21] Holt JG, Krieg NR, Sneath PH. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9<sup>th</sup> eds. Baltimore: Williams &Wilkins, 2004: 729-731.

# Screening and identification of *Bacillus pumilus* producing double active protein of anticoagulation and thrombolysis

Binghua Liu<sup>\*</sup>, Yaxiong Luo, Xuemei Tao, Xiaoying Xie, Xupan Ma, Lin Zhang

School of Medicine and Nurse, Chengdu University, Chengdu 610106, Sichuan Province, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to screen bacteria that can produce antithrombotic. [Methods] We screened the target bacteria on VY/4 plate and casein plate from more than 20 samples such as water, soil, rabbit manure, sheep manure and deadwood. We detected the antithrombotic activity by fibrin plate and fibrin tube. We identified the target bacteria by morphological characteristics, physical and chemical properties and 16S DNA sequence homology. [Results] We obtained 5 strains that can produce antithrombotic. We found that the extracellular protein of strain LDS33 shows both stronger fibrinolytic activity and stronger anticoagulation activity. According to the morphology, physiochemical properties, 16S DNA sequencing and phylogenetic tree, strain LDS33 is identified as *Bacillus pumilus*. [Conclusion] *Bacillus pumilus* LDS33 can produce highly active anticoagulation and thrombolysis double active protein.

**Keywords:** *Bacillus pumilus*, anticoagulation, thrombolysis, screening, identification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major Project of Scientific Reserch Fund of Sichuan Provincial Education Department (12ZA207)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel: +86-13558745351; E-mail: liubinghua2006.com@163.com

Received: 13 July 2013/Revised: 24 November 2013

## 系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour - Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作 [参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应标明“树”上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为“Time New Roman”,字号为“8p”。可以选用两种方式——(A)文件格式为“\*.Tif”,分辨率为 600 线;(B)文件格式为“word”,画出树,输入文字。