

一株青藏高原冻土溶栓菌的筛选及鉴定

王高学, 黄海洪, 张明

(西北农林科技大学动物科技学院, 杨凌 712100)

摘要:【目的】心脑血管疾病是一种世界性疾病, 严重危害人类健康, 溶栓酶是治疗该病的有效药物之一。而极端环境中的溶栓微生物因其特殊的生存方式, 可能分泌高效、安全的新型溶栓酶。因此, 为了获得这种具有特殊功能的溶栓酶, 我们从青藏高原高海拔冻土中进行了溶栓菌的筛选。【方法】首先, 本文通过血粉-琼脂平板初步筛选具有血粉水解功能的菌株, 然后对其进行体外溶栓试验以检验其人工血栓溶解功能, 并用纤维蛋白平板法测定其纤溶活性, 最后通过生理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析方法对该菌进行分类鉴定。【结果】本文从青海省玉树藏族自治州海拔 4300 m 的冻土样品中筛选获得了菌株 DR-536, 不仅具有水解血粉的功能, 还具有体外溶栓功能, 且能够水解纤维蛋白, 纤溶活性为 51.80 IU/mL (以尿激酶为标准)。最后, 分类鉴定结果显示菌株 DR-536 是一株金黄色杆菌 (*Arthrobacter aurescens*)。【结论】本文首次从青藏高原高海拔土壤中进行了溶栓菌的筛选, 并获得了一株新型溶栓菌, 为进一步研究和开发高效、安全的新型溶栓酶提供了菌源。

关键词: 溶栓菌; 筛选; 青藏高原; 冻土; 16S rRNA 基因

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0148-07

心脑血管疾病是一种世界性疾病, 每年导致大量病人死亡, 严重危害人类健康, 血栓形成是引起该病的一个重要原因。血栓形成后, 堵塞血管, 阻碍血液流动, 从而引起血管阻塞和脑梗塞等血栓性疾病。血栓是由于血液中的纤维蛋白原 (fibrinogen) 在凝血酶 (thrombin) 的作用下转变成网状的纤维蛋白 (fibrin) 后俘获血液中的有形成分 (如红细胞) 而形成的。溶栓疗法是治疗血栓症的有效手段之一, 通过注射或口服溶栓类药物 (如溶栓酶), 可使作为血栓骨架的纤维蛋白降解, 从而引起血栓崩解, 使血管重新畅通, 达到治疗效果^[1]。但是目前的一些溶栓药物, 如组织型纤维蛋白溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA)、尿激酶 (Urokinase, UK) 等, 也可能会引起出血、过敏等副作用^[2], 给病人带来危害。因此, 寻找无毒副作用的溶栓酶成为

目前溶栓药物研究的热点之一。

溶栓微生物是溶栓酶的重要来源^[2], 如 β -溶血链球菌 (*Streptococcus homolyticus*) 分泌的链激酶 (Streptokinase, SK)^[3] 和纳豆芽孢杆菌 (*Bacillus natto*) 分泌的纳豆激酶 (Nattokinase, NK)^[4] 等都是目前血栓症临床应用的重要药物。自然环境中也蕴藏着丰富的溶栓微生物资源, 如镰孢菌 (*Fusarium pallidoroeseum*)^[5] 和链霉菌 Y405 (*Streptomyces* sp. Y405)^[6] 是分别从埃及和我国云南省的土壤中分离获得的溶栓菌, 链霉菌 SD5 (*Streptomyces megasporus* strain SD5) 是从印度高温温泉中分离得到的^[7]。本实验室也报道过一株从青海省海拔 3300m 的冻土中分离得到的溶栓菌, 嗜麦芽寡单胞菌 DR-929 (*Stenotrophomonas maltophilia* DR-929)^[8], 并对其分泌的溶栓酶进行了初步的研究^[9]。

基金项目: 陕西省科技攻关项目 (2006K02-G14-03)

作者简介: 王高学 (1965 -), 男, 陕西富平人, 副教授, 博士, 主要从事生物工程制药的研究。Tel: +86-29-87092102; Fax: +86-29-87092164; E-mail: wanggaoxue@126.com

收稿日期: 2009-07-22; **修回日期:** 2009-09-26

另外,近年来对极端微生物的研究也为我们寻找无毒副作用的溶栓酶提供了一个方向。据报道,微生物能够在极端环境(如低温、高温、高盐等)中存活下来,在很大程度上与它们分泌的酶有关,这些酶在极端环境中经过长期的进化,往往具有特殊的生物学活性^[10],如来自于高温温泉的链霉菌 SD5 (*Streptomyces megasporus* strain SD5) 就能够分泌一种耐高温的溶栓酶^[7]。所以,本文继续从青藏高原低温、高海拔并且受强紫外线辐射的表层冻土中筛选溶栓菌,并对其进行分类鉴定,为研究和开发高效、安全的新型溶栓酶提供新的菌源和基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样:我们从青海省玉树州花石峡河谷冻土、海北州门源高寒草甸、湟源高山冻土、青海湖泥土、巴颜喀拉山等地共采集了 12 个土壤样品,其中草丛根部土样 5 个,样品采集地点海拔 3300 m - 3500 m;灌木丛根部土样 2 个,海拔为 3300 m - 3500 m;山体表层土样 5 个,海拔为 2300 m - 4800 m。样品采集时,收集表层土壤,装入灭菌玻璃瓶中,编号,密封。

1.1.2 实验动物:绵羊为西北农林科技大学动物科技学院实验用羊。

1.1.3 主要试剂和仪器:凝血酶(牛血)、纤维蛋白溶酶原(牛血)和纤维蛋白原(牛血)均购自 Sigma-Aldrich Company (St. Louis, MO, USA), 尿激酶标准品购于中国药品生物制品检定所, DP301 型细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司(北京), CH-3-1-2 型凝胶回收试剂盒购自优晶生物工程有限公司(安徽), *Taq* 酶购自富酶泰斯(Fermentas)生物技术(深圳)有限公司。Mastercycle 型 PCR 仪(Eppendorf AG, Hamburg, Germany), DYY-BC 型电泳仪(北京六一仪器厂), GenGenius 凝胶电泳成像仪(美国 Syngene 公司), 1-15K 型高速冷冻离心机(Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA), JME-1230 型透射电镜(日本电子株式会社)。

1.2 培养基的制备

1.2.1 LB 培养基:按照文献[11]制备。

1.2.2 血粉-琼脂平板:从屠宰场采集新鲜牛血,自然凝固后,捣碎,沥干,晒干,粉碎,过 80 目筛,以 1.0% (wt./vol) 的比例添加到配好的 LB 液体培养基中,最后再加入 1.0% (wt./vol) 的琼脂,煮沸,

0.1 MPa, 30 min 灭菌,制备平板。

1.2.3 纤维蛋白平板:参照文献[12]制备,稍作改进。取 4 mL 2.0% (wt./vol) 琼脂糖溶液, 100 °C 加热 30 min, 冷却至 45 °C 左右, 加入 16 μL 牛凝血酶溶液(1000 IU/mL)、80 μL 纤维蛋白溶酶原溶液(10 IU/mL)以及 4 mL 0.2% (wt./vol) 纤维蛋白原溶液, 混匀, 制备纤维蛋白平板(75 mm)。上述 4 种溶液均用巴比妥钠-盐酸缓冲液(pH 7.8, 0.04 mol/L)配制。

1.3 溶栓菌的初筛

1.3.1 细菌的分离纯化:参照文献[11]所述方法, 制备稀释度为 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 的土壤悬液, 分别涂布于 LB 平板上, 25 °C 培养 48 h, 挑选形态不同的菌落, 反复传代培养, 直至获得纯培养菌株, 接种于 LB 斜面, 4 °C 冰箱保存。

1.3.2 溶栓菌的初筛:将上述纯培养的菌株接种于血粉-琼脂平板上, 25 °C 培养 48 h, 观察菌株是否在平板上产生水解圈。挑选产生水解圈的菌株, 重新接种于血粉-琼脂平板, 反复进行 3 次传代培养, 观察其是否仍然能够产生水解圈, 最后优选出血粉水解功能稳定和活性高的菌株。

1.4 体外溶栓试验

对上述初筛获得的菌株进行体外溶栓试验以检验其血栓溶解功能。

1.4.1 人工血栓制备:参照文献[13]制备, 稍作改进。颈静脉采血法无菌采集绵羊血, 置于大小合适的无菌烧杯中, 使血液高度达到 1 cm 左右。静置, 血液凝固后用 0.9% 无菌生理盐水漂洗 3 次, 之后用直径 5 mm 的打孔器制备长约 1 cm 的条状血栓, 再用 0.9% 无菌生理盐水漂洗 3 次, 备用。

1.4.2 溶栓菌发酵液制备:用接种环取一环斜面保存的初筛菌株, 接种于 20 mL LB 液体培养基中, 25 °C、150 r/min 振荡发酵 72 h。之后 6000 × g 离心 15 min, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 得到含溶栓酶的发酵液。

1.4.3 体外溶栓试验:将一条长约 1 cm 的人工血栓置于 3 mL 发酵液中, 25 °C 孵育 24 h, 观察血栓溶解情况并记录血栓完全溶解的时间。以血栓在 LB 液体培养基中的自溶情况为对照。

1.5 纤维蛋白溶解活性(纤溶活性)测定

取 5 μL 上述发酵液, 滴加到纤维蛋白平板上, 25 °C 孵育 24 h, 测水解圈直径, 计算水解圈面积, 以尿激酶标准品为对照计算发酵液中溶栓酶的含量。尿激酶标准曲线的绘制方法如下: 取 80 IU/mL,

60 IU/mL, 40 IU/mL, 20 IU/mL 和 10 IU/mL 的尿激酶各 5 μ L, 滴加到纤维蛋白平板上, 25 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 测量各个水解圈直径, 并计算出其面积, 然后对水解圈面积和尿激酶活性进行回归分析, 得到回归方程, 绘制标准曲线。

1.6 细菌形态和生理生化试验

将上述纯培养菌株接种于 LB 液体培养基中, 25 $^{\circ}$ C 培养 24 h 和 96 h, 分别对其培养物进行磷钨酸染色, 电镜观察其形态特征。细菌的其它形态特征、培养特性及生理生化试验均按照文献[14]进行。

1.7 细菌 16S rRNA 基因序列分析

引物 63 f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC) 和 1387 r (5'-GGGCGWGTGTACAAG-GC)^[15] 由上海基康生物技术有限公司合成。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1.5 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物送上海基康生物技术有限公司进行克隆、测序。序列提交到 GenBank 数据库, 并进行 BLAST 分析, 之后用 Mega 4.0 构建系统发育树。

2 结果

2.1 溶栓菌的筛选

2.1.1 菌株 DR-536 的血粉水解和体外溶栓功能: 我们从青海省玉树州海拔 4300 m 的山体表层冻土中分离得到一株细菌 DR-536 (图 1-a), 该菌能够在血粉-琼脂平板上降解血粉产生水解圈 (图 1-b)。图 1-c 显示的是从海北州海拔 3500 m 的草丛根部土壤样品中分离获得的菌株 DR-421, 该菌不能产生水解圈。体外溶栓试验结果显示, 菌株 DR-536 的

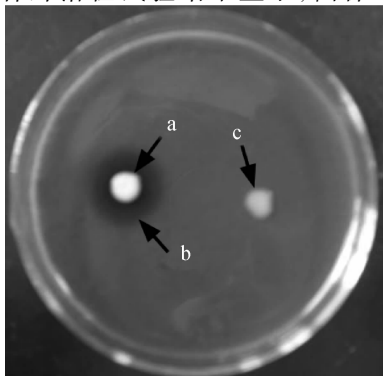


图 1 菌株 DR-536 及其产生的水解圈 (血粉-琼脂平板, 25 $^{\circ}$ C, 24 h)

Fig.1 Strain DR-536 and its hydrolytic zone (blood powder-agar plate, 25 $^{\circ}$ C, 24 h). Arrow a and b indicate strain DR-536 and the hydrolytic zone, respectively. Arrow c indicates strain DR-421, from soil at 3500 m altitude in Haibei Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province.

3 mL 发酵液 (LB 液体培养基, 25 $^{\circ}$ C, 72 h, 150 r/min) 在 12 h 之内将长约 1 cm 的人工血栓完全溶解, 而血栓在 LB 液体培养基中孵育 24 h 后仍保持原来的形态, 仅有少许红细胞溶出。

2.1.2 菌株 DR-536 发酵液的纤溶活性: 为了绘制尿激酶标准曲线, 我们首先测定了 80 IU/mL、60 IU/mL、40 IU/mL、20 IU/mL 和 10 IU/mL 的尿激酶 (各 5 μ L) 在纤维蛋白平板上产生的水解圈 (图 2-a, b, c, d, e) 的面积, 然后对水解圈面积与尿激酶活性进行了回归分析, 获得了回归方程: $Y = 0.3399X - 0.0078$ (Y 表示纤溶活性, X 表示水解圈面积, $r = 0.9929$), 并绘制了标准曲线 (图 3)。

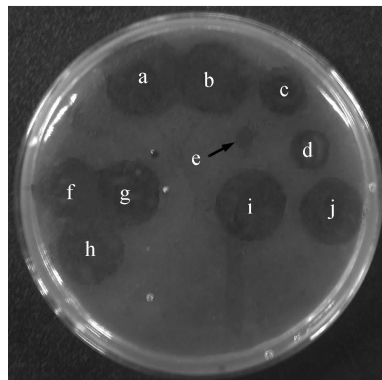


图 2 尿激酶和菌株 DR-536 发酵液 (LB 液体培养基, 25 $^{\circ}$ C, 72 h, 150 r/min) 的纤溶活性

Fig.2 Fibrinolytic activity of Urokinase and fermentation broth (LB broth, 25 $^{\circ}$ C, 72 h, 150 revolutions per minute) of strain DR-536. Zone a, b, c, d and e are fibrinolytic zones hydrolyzed by 5 μ L of 80 IU/mL, 60 IU/mL, 40 IU/mL, 20 IU/mL and 10 IU/mL Urokinase, respectively. Zone f, g, h, i and j are 5 replicates of fibrinolytic zones produced by fermentation broth (5 μ L) of DR-536.

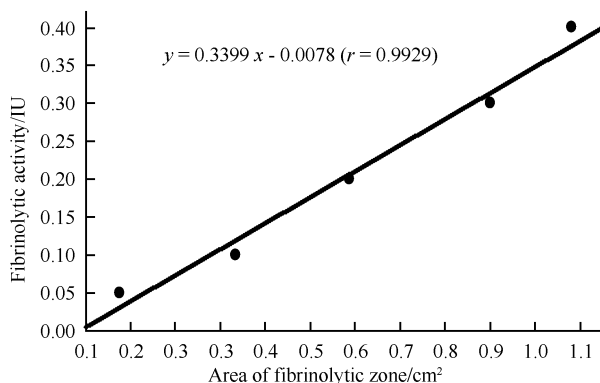


图 3 尿激酶标准曲线

Fig.3 Standard regression curve of Urokinase. In the formula, X and Y represent area of fibrinolytic zone and fibrinolytic activity, respectively, and r is the regression coefficient.

纤维蛋白平板法测定结果显示, 菌株 DR-536

的 5 μL 发酵液 (LB 液体培养基, 25 $^{\circ}\text{C}$, 72 h, 150 r/min) 产生的纤维蛋白水解圈直径约为 1 cm (图 2-f, g, h, i, j), 以尿激酶标准品为对照, 其纤溶活性约为 0.2590 IU, 由此我们计算出菌株 DR-536 发酵液 (LB 液体培养基, 25 $^{\circ}\text{C}$, 72 h, 150 r/min) 中溶栓酶的活性为 51.80 IU/mL。

2.2 菌株 DR-536 的分类鉴定

2.2.1 培养、形态和生理生化特征: 菌株 DR-536

菌落呈圆形, 直径 2 mm - 3 mm (LB 平板, 25 $^{\circ}\text{C}$, 24 h), 黄色, 表面光滑, 边缘整齐, 隆起, 奶油状, 不透明。生长温度范围为 7 $^{\circ}\text{C}$ - 35 $^{\circ}\text{C}$, 适温为 25 $^{\circ}\text{C}$ - 30 $^{\circ}\text{C}$; pH 范围为 3.0 - 12.0, 最适 6.0 - 9.0; 盐度范围为 0% - 7%, 最适 1% - 3%。菌株 DR-536 好氧, 无芽孢, 无鞭毛, 不运动, G^{+} , 有球-杆变化周期, 其 24 h 培养物 (LB 液体培养基, 25 $^{\circ}\text{C}$) 的细胞呈杆状 (图 4-A), 96 h 培养物 (LB 液体培养基, 25 $^{\circ}\text{C}$) 的部分细胞变为球状 (图 4 B-c), 其杆状细胞大小为 0.44 μm - 0.62 μm \times 0.93 μm - 3.34 μm , 球状细胞大小为 0.54 μm - 0.64 μm 。菌株 DR-536 的主要生理生化特征见表 1。表 2 为菌株 DR-536 对糖类的分解和利用情况。

从上述培养、形态和生理生化特征可以看出, 菌株 DR-536 是一株节杆菌, 具有节杆菌属 (*Actinobacter* sp.) 的典型特征, 如革兰氏染色阳性、好氧、杆-球变化周期、接触酶阳性等^[14]。

2.2.2 16S rRNA 基因序列分析: 本文应用 PCR 方法扩增了菌株 DR-536 的 16S rRNA 基因, 得到了长 1327 bp 的序列, 其 GeneBank 登录号为 EF198138, BLAST 比对结果显示, 该序列主要与节杆菌属菌株的 16S rRNA 基因序列相似。我们从中选取了 21 株与菌株 DR-536 16S rRNA 基因序列相似度高的菌

株, 包括 11 株金黄节杆菌 (*Arthrobacter aurescens*)、9 株噬尼古丁节杆菌 (*Arthrobacter nicotinovorans*) 以及 1 株节杆菌属未定种 *Arthrobacter* sp. KP17, 同时以球形节杆菌 (*Arthrobacter globiformis*) 作为外群, 进行系统发育分析。

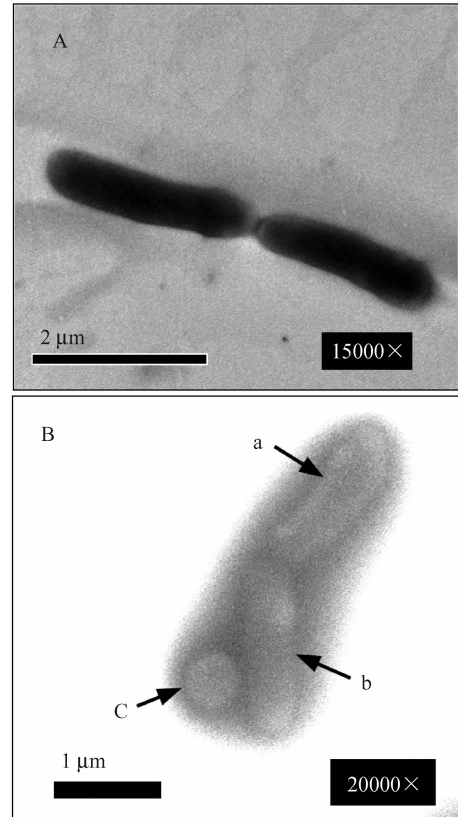


图 4 菌株 DR-536 的细胞形态电镜图 (磷钨酸染色)

Fig. 4 Electron micrographs of cell shapes of strain DR-536 (phosphotungstic acid staining). Graph A indicates rod cells of strain DR-536 incubated for 24 h at 25 $^{\circ}\text{C}$ in LB broth (15000 \times). Graph B shows cell shapes of strain DR-536 incubated for 96 h at 25 $^{\circ}\text{C}$ in LB broth (20000 \times). Arrow a and b indicate rod cells of strain DR-536, and arrow c indicates a coccus cell.

表 1 菌株 DR-536 的生理生化特征

Table 1 physiological and biochemical characteristics of strain DR-536

Test	Result	Test	Result	Test	Result
M. R reaction	-	Nitrates reduced to Nitrites	+	Lipase (Tween 80)	-
V - P reaction	+	Starch hydrolysis	-	Lecithinase	-
Indole production	+	Lys - decarboxylase	+	Glucosamine ^a	+
Carbohydrate metabolism	Oxidative	Orn - decarboxylase	+	Acetate ^a	+
Milk peptonization	+	Arg - decarboxylase	+	Dulcitol ^b	-
Catalase	+	Milk Peptonization	+	Inositol ^b	+
Gelatin liquefaction	+	Urease production	-	Mannitol ^b	+
Oxidase	-	ONPG reaction	-	Sorbitol ^b	+
Cytochrome oxidase	-	H ₂ S production	-	Citrate salt ^b	-
Phe - aminotransferase	-	Hemolysis test	-	Rochelle salt ^b	-

^a, reagent as sole nitrogen source. ^b, reagent as sole carbon source. +, positive. -, negative.

表 2 菌株 DR-536 糖类分解和利用试验

Table 2 properties of carbohydrate utilization and cleavage of strain DR-536

Carbohydrates	As sole carbon source	Cleavage of carbohydrate	
		Acid formation	Gas formation
Glucose	+	-	-
Sucrose	+	-	-
Lactose	+	-	-
Maltose	+	±	-
Mannose	+	-	-
Fructose	+	-	-
Sorbose	-	-	-
Arabinose	+	-	-
Rhamnose	+	-	-
Cellobiose	+	-	-
Raffinose	+	-	-
Trehalose	+	-	-

+, positive. -, negative. ±, weak positive.

分析结果显示,系统发育树分成两个大的类群,9 株噬尼古丁节杆菌 (*Arthrobacter nicotinovorans*) 聚成一个类群。而菌株 DR-536 以及 *Arthrobacter sp.*

KP17 则与 11 株金黄节杆菌 (*Arthrobacter aurescens*) 相近,共同聚成了另一个类群(图 5),在这个类群中,菌株 DR-536 与金黄节杆菌 (*Arthrobacter aurescens*) 各菌株的序列相似性为 95% - 97%,这表明菌株 DR-536 是一株金黄节杆菌 (*Arthrobacter aurescens*)。

3 讨论

本文首次从青藏高原高海拔土壤中进行了溶栓菌的筛选,并从青海省玉树州海拔 4300 m 的山体表层冻土中筛选获得了一株溶栓菌 DR-536,分类鉴定结果表明该菌是一株金黄节杆菌 (*Arthrobacter aurescens*),而有关节杆菌溶栓功能的研究我们还尚未见过报道,所以菌株 DR-536 可能是一株新型溶栓菌。

为了获得溶栓微生物,El-Aassar 等^[5]采用纤维蛋白-琼脂平板筛选溶栓微生物,彭勇等^[16]通过在液体培养基中添加血粉来进行溶栓微生物的富集培养,因为血粉中也富含纤维蛋白。因此本文用血粉

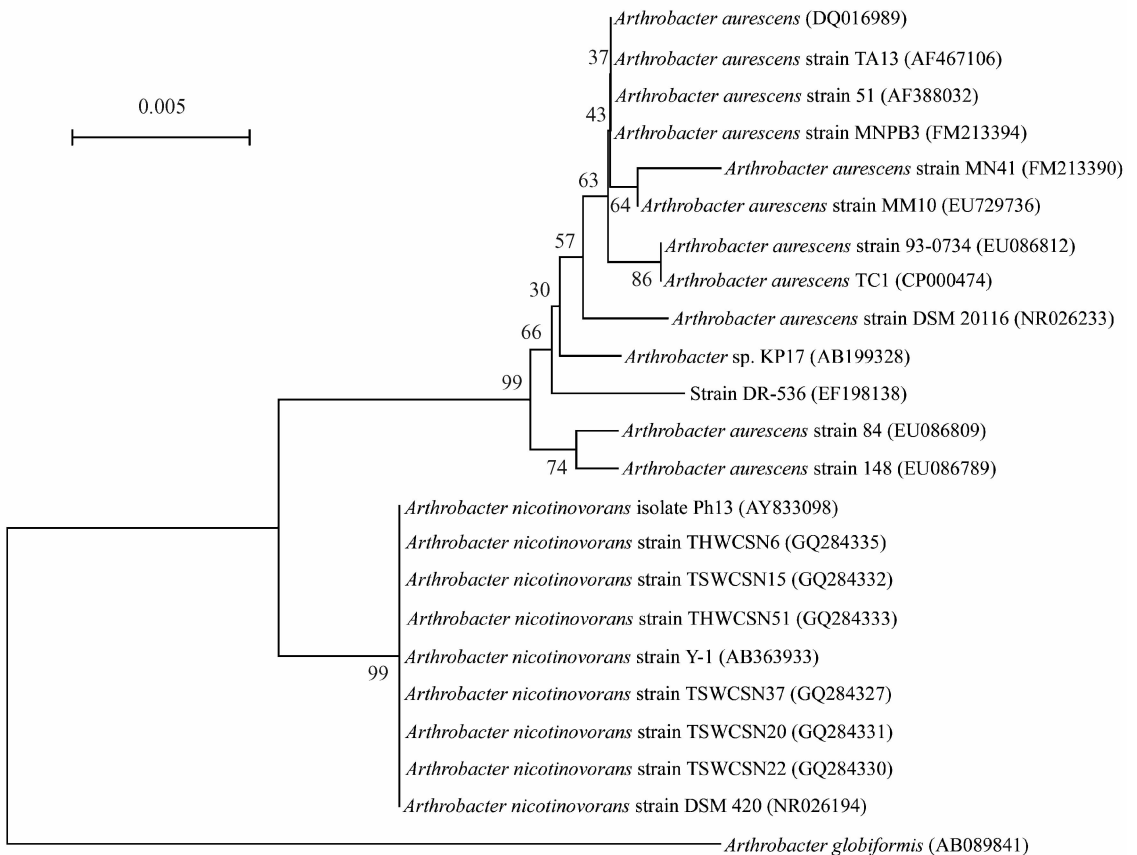


图 5 基于菌株 DR-536 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain DR-536 constructed with Neighbour-Joining method. Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1000 replicates. The GenBank accession number is showed in parentheses. Bar: 0.005 substitutions per nucleotide.

代替纤维蛋白,制备血粉-琼脂平板来筛选溶栓菌,并获得了具有血粉水解功能的菌株 DR-536(图 1)。但是血粉除了富含纤维蛋白之外,还含有多种其它蛋白质,所以细菌在血粉-琼脂平板上产生的水解圈也可能是因水解其它蛋白而形成的。为此,我们又对菌株 DR-536 进行了体外溶栓试验,结果表明其 3 mL 发酵液(LB 液体培养基, 25 °C, 72 h, 150 r/min)在 12 h 之内将长约 1 cm 的条状人工血栓完全溶解。最后,纤维蛋白平板法显示菌株 DR-536 也具有纤维蛋白水解功能,其发酵液中溶栓酶的纤溶活性为 51.80 IU/mL(以尿激酶为对照)。

本文还对菌株 DR-536 进行了分类鉴定,结果表明菌株 DR-536 是一株金黄杆菌(*Arthrobacter aureescens*)。从生理生化试验结果可以看出,菌株 DR-536 具有节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)的典型特征,16S rRNA 基因序列进化分析结果则进一步显示,菌株 DR-536 与金黄杆菌(*Arthrobacter aureescens*)相近,并聚成一群(图 5)。因为在 BLAST 比对结果的 105 株菌中,绝大多数菌株为节杆菌未定种(*Arthrobacter* sp.)或非培养细菌(Uncultured bacterium clone),而与菌株 DR-536 相似性较高且分类地位明确的却只有 20 株。因此,此次鉴定仍然是一个初步的研究结果。

生理生化试验结果还表明菌株 DR-536 溶血试验阴性(表 1),说明其不分泌溶血素。刘光琇等从青藏高原多年冻土中分离获得的 13 株菌,均非临床常见致病菌,并认为这可能是由于青藏高原高寒地带微生物生态环境的特殊性造成的^[17]。因此菌株 DR-536 可能不是一株致病菌,其分泌的溶栓酶可能能够克服目前的一些溶栓药物(如 t-PA、尿激酶等)引起的出血、过敏等副作用^[2]。此外,我们另一研究表明溶栓菌 DR-536 分泌的溶栓酶具有良好的体内溶栓效果,在小鼠抗凝血模型、大鼠静脉血栓形成模型以及兔颈动脉血栓模型试验中,该菌分泌的溶栓酶分别经口服、肠道和静脉注射给药后,均能明显延长实验动物的凝血时间(CT)、凝血酶原时间(PT)、活化部分的凝血活酶时间(APTT)以及凝血酶时间(TT),并能显著降低实验动物的优球蛋白溶解时间(ELT)和纤维蛋白原(FIB)含量^[18]。因此,菌株 DR-536 分泌的溶栓酶有望开发成一种新的溶栓药物。

致谢 感谢中国科学院西北高原生物研究所的王启兰副研究员为本文提供了部分土样。

参考文献

- [1] Mine Y, Wong AHK, Jiang B. Fibrinolytic enzyme in Asian traditional fermented foods. *Food Research International*, 2005, 38: 243-250.
- [2] Peng Y, Yang XJ, Zhang YZ. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties and thrombolytic activity in vivo. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69 (2): 126-132.
- [3] 梁剑光,熊晓辉,熊强. 微生物代谢产物在溶栓药物制备中的应用研究进展. 氨基酸和生物资源(*Amino Acids & Biotic Resources*), 2003, 25 (2): 73-76.
- [4] Fujita M, Nomura K, Hong K, et al. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1993, 197: 1340-1347.
- [5] EI-Aassar SA. Production and properties of fibrinolytic enzyme in solid state cultures of *Fusarium pallidoroseum*. *Biotechnology Letters*, 1995, 17: 943-948.
- [6] 王骏,王敏,王以光. 链霉菌产生的新型纤溶酶的纯化和性质的研究. 生物工程学报(*Chinese Journal of Biotechnology*), 1999, 15 (2): 147-153.
- [7] Chitte RR, Dey S. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31: 405-410.
- [8] 王高等,黄海洪,梁朝军,等. 一株溶纤维蛋白细菌的筛选、鉴定及体外溶栓的研究. 安徽农业科学(*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2007, 35 (4): 964-965.
- [9] 王高等,梁朝军,黄海洪,等. 嗜麦芽寡单胞菌(DR-929)纤溶酶的发醇条件优化及其分离纯化. 中国生物工程杂志(*China Biotechnology*), 2007, 27(9): 47-52.
- [10] Herbert, RA. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends in Biotechnology*, 1992, 10: 395-401.
- [11] 沈萍,范秀容,李广斌. 微生物学实验. 第三版. 北京:高等教育出版社,2001.
- [12] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, 40: 346-351.
- [13] 庞宝森,王辰,伍燕兵,等. 急性多发性微小血栓所致犬肺栓塞时对细胞因子的影响. 中华医学杂志(*Chinese Journal of Clinical Assemble*), 2002, 82(15): 1067-1069.
- [14] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京:科学出版社,2001.

- [15] Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, et al. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (2): 795-799.
- [16] 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. 高技术通讯 (*High Technology Letters*), 2002, 2: 30-34.
- [17] 刘光琇, 胡昌勤, 张靖溥, 等. 青藏高原多年冻土微生物的分离分析及其意义. 冰川冻土 (*Journal of Glaciology and Geocryology*), 2001, 23(4): 419-422.
- [18] 王高学, 梁朝军, 姚嘉赞, 等. 新型纤溶酶 FA-I 抗血栓形成和溶栓作用研究. 四川大学学报(医学版) (*Journal of Sichuan University Medical Science Edition*), 2009, 40(2): 288-291.

Isolation and identification of a fibrinolytic bacterium strain from frozen soil in the Tibetan Plateau

Gaoxue Wang^{*}, Haihong Huang, Ming Zhang

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: [**Objective**] Cardiovascular disease, harmful to human health, is a worldwide disease, for which fibrinolytic enzyme is usually used as an effective remedy. Fibrinolytic microbes under extreme environmental conditions may excrete some high efficient and safe fibrinolytic enzymes. So, for obtaining this fibrinolytic enzyme, we isolated fibrinolytic strains from frozen soil in the Tibetan Plateau. [**Methods**] We screened microbes hydrolyzing blood powder by blood powder (bovine)-agar plate, followed by detection of thrombolysis effect through thrombolytic test *in vitro*. After that, we detected and measured the fibrinolytic activity of those microbes screened above with fibrin plates. Finally, we classified and identified the fibrinolytic microbes by combining physiological and biochemical test and 16S rRNA gene sequence analysis. [**Results**] We isolated a strain DR-536 from frozen soil at 4300 m altitude in Yushu Tibetan Autonomous Prefecture, Qinghai Province. We found that the strain DR-536 not only hydrolyzed blood powder in the blood-agar plate, but also completely dissolved thrombus *in vitro*. We also found that strain DR-536 could hydrolyze fibrin, and the fibrinolytic activity was 51.80 IU/ml (with Urokinase as a standard). At last, results of classification and identification indicated that DR-536 is a new strain of *Arthrobacter aurescens* with fibrinolytic function. [**Conclusion**] We provided a strain for research and exploitation of novel fibrinolytic enzymes.

Keywords: fibrinolytic bacterium; isolation; Tibetan Plateau; frozen soil; 16S rRNA gene

(本文责编:王晋芳)