

• 医药生物技术 •

# 桔黄赛多孢霉外泌弹性蛋白酶的生化特性

彭元怀<sup>1</sup>, 葛歆<sup>2</sup>, 叶剑芝<sup>3</sup>, 金蓓<sup>1</sup>, 韩志萍<sup>1\*</sup>

1 岭南师范学院食品科学与工程学院, 广东 湛江 524048

2 岭南师范学院网络与信息服务中心, 广东 湛江 524048

3 中国热带农业科学院农产品加工研究所, 广东 湛江 524001

彭元怀, 葛歆, 叶剑芝, 金蓓, 韩志萍. 桔黄赛多孢霉外泌弹性蛋白酶的生化特性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3800-3813.  
PENG Yuanhuai, GE Xin, YE Jianzhi, JIN Bei, HAN Zhiping. Biochemical properties of *Scedosporium aurantiacum* extracellular elastase-like protease[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3800-3813.

**摘要:** 外泌弹性蛋白酶是桔黄赛多孢霉(*Scedosporium aurantiacum*)主要毒性蛋白酶之一, 本文在前期研究的基础上, 对这种蛋白酶的序列、结构和酶学特性进行了研究。首先通过柱层析技术将 *S. aurantiacum* 培养上清液中的蛋白进行了分离, 然后通过酶谱电泳纯化得到了弹性蛋白酶条带。从凝胶中提取了弹性蛋白酶, 通过质谱技术对其序列进行了检测, 并对其反应特性、活力和反应动力学参数进行了研究。结果显示, *S. aurantiacum* 外泌弹性蛋白酶对弹性蛋白和牛跟腱胶原蛋白(bovine achilles tendon collagen, BATC)具有较好的水解性能, 对鱼皮胶原蛋白(fish skin collagen, FSC)的水解效率高于对鱼鳞明胶的水解效率, 对酪蛋白的水解性最差。作用于弹性蛋白时, 其催化效率小于猪胰腺弹性蛋白酶。 $Zn^{2+}$ 对酶活力有提升作用, 而  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Na^{+}$ 、(2S)-2-[(4S)-2-氨基-1,4,5,6-四羟基 4-嘧啶基]-N-[[[(1S)-1-羧基-3-甲基丁基]氨基]羧基]甘氨酸-N1-[(1S)-1-甲基-2-氧乙基]-L-谷氨酸甲酰胺(elastatinal)和苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)均对酶活有抑制作用。该蛋白酶和青霉(*Paecilomyces lilacinus*)外泌丝氨酸蛋白酶(PDB Entry: c3f7oB)的序列最相似, 且有多段保守序列的氨基酸个数多于7个, 可以作为PCR反应引物设计的模板。酶学特性实验表明, *S. aurantiacum* 外泌弹性蛋白酶对肺组织中的弹性蛋白具有降解作用, 其蛋白表达和毒性机制需要进一步的研究。

**关键词:** 桔黄赛多孢霉; 弹性蛋白酶; 蛋白结构; 酶学特性

资助项目: 湛江市科技计划项目(2020A01040); 岭南师范学院红树林研究院开放课题(YBXM12); 粤西特色生物医药工程技术研究中心开放课题(2022-K09); 岭南师范学院校级科研项目(ZL2012); 海南省自然科学基金(322MS121); 广东省普通高校重点领域专项(2020ZDZX1047)

This work was supported by the Science and Technology Planning Project of Zhanjiang (2020A01040), the Open Project of Mangrove Research Institute, Lingnan Normal University (YBXM12), the Open Project of Western Guangdong Provincial Research Center of Biomedical Engineering and Technology (2022-K09), the Lingnan Normal University Science and Technology Innovation Project (ZL2012), the Natural Science Foundation of Hainan Province (322MS121), and the Special Projects in Key Fields of Colleges and Universities in Guangdong, China (2020ZDZX1047).

\*Corresponding author. E-mail: zhipinghan@lingnan.edu.cn

Received: 2022-11-14; Accepted: 2023-01-09; Published online: 2023-02-02

# Biochemical properties of *Scedosporium aurantiacum* extracellular elastase-like protease

PENG Yuanhuai<sup>1</sup>, GE Xin<sup>2</sup>, YE Jianzhi<sup>3</sup>, JIN Bei<sup>1</sup>, HAN Zhiping<sup>1\*</sup>

1 College of Food Science and Technology, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, Guangdong, China

2 Network & Information Center of Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, Guangdong, China

3 Agricultural Products Processing Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524001, Guangdong, China

**Abstract:** Extracellular elastase-like protease is one of the key virulence proteases of *Scedosporium aurantiacum*. To date, little is known about this enzyme in terms of genetic information, structure, properties and virulence mechanism due to the difficulties in purification caused by its low secretion amount, high specific activity, uncompleted genome sequencing and annotation. This work investigated the gene, structure and enzymatic properties of this enzyme. The *S. aurantiacum* elastase-like protease from the fungal culture supernatant was analyzed through tandem mass spectrometry (MS/MS) approach, illustrating its primary structure. Bioinformatics tools were employed to predict the conserved domain and tertiary structure, the enzymatic properties were also studied. It turned out that *S. aurantiacum* extracellular elastase-like protease demonstrated well hydrolysis towards elastin and bovine achilles tendon collagen, with  $V_{max}$  of 18.14  $\mu\text{g/s}$  and 17.57  $\mu\text{g/s}$  respectively, better than fish scale gelatin, with the lowest hydrolysis effect on casein. Its activity towards elastin was lower than that of the elastase from porcine pancreas, with values of  $K_{cat}/K_m$  of 3.541 ( $\mu\text{g/s}$ ) and 4.091 ( $\mu\text{g/s}$ ), respectively. It was an alkaline protease, with optimal pH 8.2 and temperature 37 °C.  $\text{Zn}^{2+}$  promoted the enzymatic activity while  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , elastatinal and PMSF inhibited its activity. Its sequence was similar to *Paecilomyces lilacinus* secreted serine protease (PDB Entry: c3f7oB\_) with multiple conserved fractions each containing more than 7 amino acids, thus suitable for design of PCR primer. This study increased our knowledge on *S. aurantiacum* extracellular elastase-like protease in terms of structure and enzymatic properties, and may facilitate later studies on protein expression and virulence mechanism.

**Keywords:** *Scedosporium aurantiacum*; elastase-like protease; protein structure; enzymatic properties

赛多孢霉(*Scedosporium* spp.)是一类侵袭性和致病力较强的条件致病真菌,常引起致死性感染。在澳大利亚、法国、奥地利等地,它是继曲霉(*Aspergillus* spp.)之后第二大呼吸道真菌,平均感染率为33.3%<sup>[1-3]</sup>。但赛多孢霉比曲霉感染更能刺激宿主的免疫响应,使宿主产生更多的炎症因子IL-6和TNF $\alpha$ <sup>[4]</sup>。其受累器官和

组织主要为肺和软组织,也可以在中枢神经、骨头、关节、眼部等多个部位引起侵袭感染<sup>[1,5]</sup>。此外,赛多孢霉还可以定殖在肺囊性纤维化和其他肺部受损病人的呼吸道中,引发咳痰,粘痰呈白色含血丝,甚至咯血、呼吸困难、肺部湿啰音,全球每年15.1%的肺囊性纤维化病人死于这种真菌感染<sup>[1,3,6]</sup>。

随着分子诊断工具的大范围应用,人们对赛多孢霉的种属认识不断更新。2005年时,西班牙真菌学家 Gilgado 等<sup>[7]</sup>经内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)测序法鉴定了一种新的赛多孢霉,其在麦芽糖固体培养基上生长时,可产生桔黄色的色素沉淀,命名为桔黄赛多孢霉(*Scedosporium aurantiacum*, SA)。SA在水体和土壤中分布广泛,人类活动越密集的区域菌荷量越大<sup>[8-9]</sup>。在免疫低下的人群中,SA孢子或菌体经吸入进入宿主呼吸道,先在肺部形成感染,然后血行感染到全身,部分SA通过血脑屏障进入脑部,形成脑膜炎<sup>[1]</sup>。

到目前为止,SA的致病机理、致病因子的研究还很匮乏。人们对它的认识较多地集中在临床发现、菌落与细胞结构、细胞表型、致死率和耐药性测试方面<sup>[2,9-11]</sup>。与其他赛多孢霉(例如尖端赛多孢)相比,SA在很多方面更具有耐受性。它耐受45℃高温<sup>[7]</sup>、耐受5%的MgCl<sub>2</sub>和NaCl、对常用的抗真菌药剂更有耐受性(如两性霉素、伊曲康唑、伏立康唑、米卡芬净、卡泊芬净等)<sup>[12]</sup>,因而更难治愈,受其感染的小鼠存活时间短、致死率高,被认为是毒性最强的赛多孢霉<sup>[2,13]</sup>。Harun 等<sup>[2,14]</sup>基于基因型分析发现,SA有20多种菌株,不同菌株具有不同的毒力,其毒力大小与菌株的基因型有关,而与菌株的最初分离地无关,毒力最强的菌株WM 06.482造成实验小鼠100%的死亡率。

在之前的研究中,人们对SA在人工唾液培养基中分泌的蛋白酶进行了筛查,特别对比分析了毒性最强的菌株WM 06.482和毒性最弱的菌株WM 10.136的蛋白酶分泌情况<sup>[15-16]</sup>。结果发现,菌株WM 06.482比WM 10.136多分泌2种丝氨酸蛋白酶,分别是弹性蛋白酶(elastase, ELA)和胰蛋白酶(trypsin, TRY)<sup>[15]</sup>,这两种蛋白酶都是潜在的毒力因子,帮助SA破坏和侵入宿

主组织细胞中的蛋白质组分<sup>[17]</sup>。特别是在肺囊肿纤维化疾病中,真菌外泌ELA可引起肺组织损伤、呼吸功能恶化、支气管扩张和气道的其他炎症,是引起实验小鼠呼吸困难、甚至死亡的一个重要因子<sup>[18-19]</sup>。

笔者前期从SA的培养液中分离纯化了TRY<sup>[20]</sup>,但却分离不到ELA,并且在国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)、FungiDB真菌蛋白库(<http://fungidb.org>)中未能找到ELA的同源蛋白,然而其在弱碱性条件下对蛋白底物的水解效率却非常高,说明该蛋白酶分泌量很小,但比活力非常高<sup>[15-16]</sup>,细胞实验显示,该酶对肺上皮细胞活性具有显著的负面影响。若能获得该酶的蛋白结构,对后续的毒性研究非常重要。

本文将通过底物诱导表达的方法,提高SA的ELA分泌量,然后经膜浓缩和柱层析方法从培养液中分离纯化ELA,对其蛋白质序列进行检测,在此基础上研究其酶学特性,为后续对SA ELA侵染性的研究提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 SA培养基

使用人工唾液培养基,由各种矿物质、氨基酸和1%(质量体积比)葡萄糖按照文献<sup>[21]</sup>中的方法进行配制,在其中加入1%(质量体积比)牛跟腱弹性蛋白(购自Sigma-Aldrich)以模拟人体内液态环境,简称为SCFM。人工唾液使用0.22 μm膜过滤灭菌(Millipore),弹性蛋白高压灭菌,混合后将培养基pH值调节至5.7以支持真菌生长<sup>[22]</sup>。

### 1.2 SA菌株

桔黄赛多孢霉菌株WM 06.482和WM10.136,由澳大利亚悉尼Westmead医院分子生物研究中心赠送(Molecular Mycology Research Laboratory, Centre for Infectious

Diseases and Microbiology, Westmead Hospital, The University of Sydney, Sydney, Australia)。

### 1.3 SA 培养条件

固体培养在麦芽浸膏琼脂上进行,在 37 °C 条件下培养 7–10 d,使用 0.9% (质量体积比) 氯化钠和 0.01% (体积比) Tween 80 混合液水洗收集孢子。液体培养在摇瓶中进行,在 250 mL 的摇瓶中加入 50 mL SCFM,孢子接入量为  $2 \times 10^6$  个/mL,在温度为 37 °C、转速为 200 r/min 的条件下培养 7 d,每个设定的时间点设置 3 个平行培养。每 24 h 收集一次培养上清液。首先将摇瓶从培养箱中取出,在 4 500×g 条件下离心 30 min,取上清液,用 0.22 μm 膜(Millipore)在 4 °C 条件下过滤,以去掉孢子和小的菌丝。将过滤好的上清液分装至 50 mL 的 Eppendorf 试管中,在 -80 °C 环境中储存,直到进行下一步研究。

### 1.4 SA 培养液中 ELA 活力检测

首先通过平板水解圈法检测 ELA 的分泌情况,将 1.5% (质量体积比) 的琼脂高温灭菌,待冷却至约 50 °C 时,加入 ELA 的底物刚果红弹性蛋白(1%, 质量体积比),混合均匀后制成平板,在平板中央用注射器注入 5 μL 的 SA 培养液,37 °C 下孵化 12 h,观测培养基中水解圈的产生情况,阳性对照为产自猪胰腺的 I 型 ELA (P-ELA, Sigma, E7885),阴性对照为桔黄赛多孢霉环境菌株 WM10.136 培养液。

ELA 具体的酶活力值参照 Chen 等<sup>[23]</sup>的方法进行测定。用 0.1 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)配制浓度为 0.5 mmol/L 的底物溶液,在 96 孔板中加入酶液与底物溶液各 75 μL,在 37 °C 条件下反应 10 min,之后在反应体系中加入 0.2 mol/L 的盐酸溶液 100 μL,继续孵化 5 min,离心取上清,在 495 nm 下测其吸光度,空白组以高温灭活(99 °C, 5 min)的酶液代替普通酶液。每毫升酶溶液每分钟内水解 1 μg 的刚果红弹性蛋白定义为一个酶活力单位(U)。检测酶液抑制活性

时,将同体积的酶液与抑制剂溶液混合,在室温下孵化 30 min,然后再进行酶活力检测,与不加酶抑制剂的测试结果进行对比。

底物特异性检测中使用了 5 种底物,包括鱼鳞明胶(fish scale gelatin, FCG)、鱼皮胶原蛋白(fish skin collagen, FSC)、牛跟腱胶原蛋白(bovine achilles tendon collagen, BATC)、刚果红弹性蛋白(congo red elastin, CRE)和酪蛋白(casein),其中 FCG、FSC、BATC 和 CRE 购自上海源叶生物科技有限公司,casein 购自北京索莱宝科技有限公司。将各底物按照说明书中的方法溶解,分别稀释成不同浓度的底物溶液(2–10 μg/mL),在 37 °C 条件下测定酶活力,检测不同底物浓度对应的反应速度。每次反应结束后,离心取上清液 50 μL,加入等体积茚三酮显色液,充分混匀后,沸水浴中加热 15 min,自然冷却后,加入 150 μL 60%乙醇稀释,充分摇匀,在 440 nm 下测吸光度。以脯氨酸为标品,绘制标准曲线。利用 Lineweaver-Burk 作图法及相关软件进行非线性分析,计算酶动力学参数  $K_m$  和  $V_{max}$ 。根据酶分子量和酶浓度,最终得到  $K_{cat}$  值。

### 1.5 SA 培养液中 ELA 的分离纯化

通过盐析技术对真菌培养上清液中的蛋白质进行初步分离,4 °C 条件下在上清液中边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末,直到硫酸铵的饱和度达到 80%,静置 10 min 后,离心(6 000 r/min, 15 min)收集蛋白质沉淀,使用磷酸缓冲液(PBS, pH 7.2, 0.05 mol/L)复溶,用 Nanosep 离心管(Pall, 型号: OD003C33, 购于广州誉维生物科技仪器有限公司)将复溶后的蛋白质溶液浓缩并脱盐。

蛋白浓缩液经 DEAE-Sepharose Fast Flow 弱阴离子交换凝胶(16 mm×200 mm)进行纯化。上样量 2 mL,使用含氯化钠(NaCl)的 PBS 缓冲液进行梯度洗脱(0–1.0 mol/L NaCl),洗脱流速 1 mL/min,分别收集各峰组分,间隔时间为

0.1 min, 使用 ÄKTAPrime 蛋白纯化系统(GE Healthcare Life Sciences)在 280 nm 测定蛋白吸光度, 对蛋白含量高的组分, 测其弹性蛋白酶活力。DEAE-Sepharose Fast Flow 分离结束后, 选取弹性蛋白酶活力最好的组分冻存备用。

### 1.6 SA 酶谱电泳分析

参照 Peterson 等<sup>[24]</sup>的酶谱分析方法, 在 12.5% (质量体积比) Tris-glycine 电泳胶中加入 0.1% (质量体积比) 可溶性弹性蛋白(E6527, Sigma-Aldrich), 将 21  $\mu$ L 酶溶液与 7  $\mu$ L 4 $\times$  NuPAGE LDS 缓冲液混合, 上样到电泳胶上, 在 80 V、4  $^{\circ}$ C 下分离 16 h, 之后将胶在 2.5% (体积比) Triton-X 100 中清洗 2 次, 每次 30 min, 然后用纯净水清洗 3 次, 接着在 0.03 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(37  $^{\circ}$ C, pH 7.5)中孵化 24 h, 使用考马斯亮蓝 G-250 对胶片染色, 并用 1% (体积比)的醋酸脱色。使用弹性蛋白酶特异性寡肽底物 N-Sue-Ala-Ala-Ala-MCA (Peptide Institute Inc)对酶谱分析结果进行验证。

### 1.7 SA ELA 氨基酸序列分析

将电泳凝胶上 ELA 对应的条带剪切下来, 仔细切碎, 用含 50%乙腈(ACN)的 100 mmol/L 碳酸氢铵脱色, 用 10 mmol/L 的二硫苏糖醇还原, 用 55 mmol/L 碘乙酰胺碱化, 然后用

25 mmol/L 二硫苏糖醇清洗 2 次。碎胶粒用 CAN 脱水后在真空离心浓缩仪上干燥, 之后置于冰上 10 min, 冷却后的样品用胰蛋白酶 (sequencing grade modified, Promega)水解, 酶添加量为蛋白质质量的 1/30。多肽产物用含 1.65% (体积比)甲酸的 65% (体积比) ACN 提取, 经 ziptip 枪头除盐后, 低温真空干燥, 使用 1%的乙腈溶液复溶, 产物进行二级质谱分析(Q-exactive nano, LC-MS/MS)。使用 Global Proteome Machine 软件 X!Tandem algorithm 对质谱图所对应的肽段序列进行搜索分析, 根据酶切规律进行蛋白的组装。

### 1.8 SA ELA 结构及功能预测分析

在一级结构的基础上, 应用生物信息学工具 Phyre2<sup>[25]</sup>、I-TASSER<sup>[26]</sup>对其高级结构、同源性、活性中心、生物功能进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 SA 培养液中 ELA 的活力验证

SA 培养上清液中存在 ELA 酶, 其液滴在刚果红弹性蛋白平板上产生了明显的水解圈, 水解圈直径比阳性对照(产自猪胰腺的 I 型 ELA)稍小, 说明其对猪胰腺弹性蛋白的水解能力低于阳性对照(图 1)。



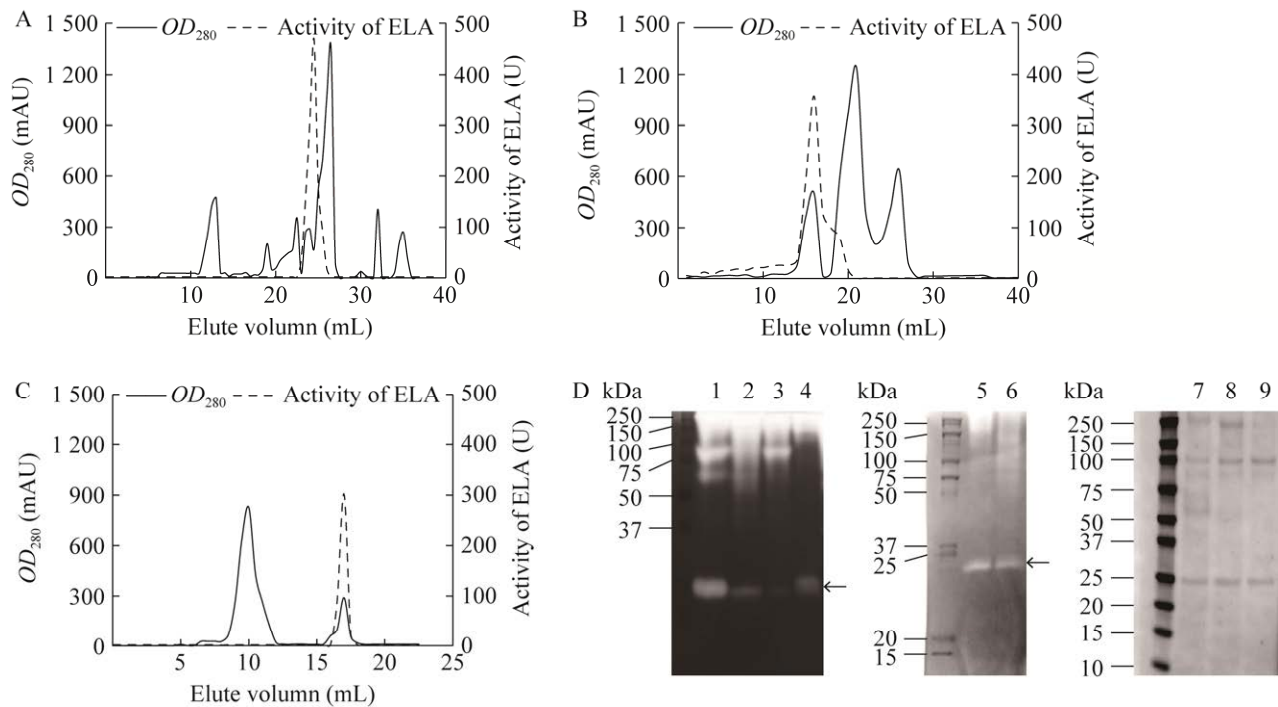
图 1 桔黄赛多孢霉培养液水解平板中弹性蛋白产生水解圈 阳性对照为产自猪胰腺的 I 型 ELA, 阴性对照为桔黄赛多孢霉环境菌株 WM10.136 培养液

Figure 1 Elastase activity presenting in *Scedosporium aurantiacum* culture supernatant on elastin agar. Elastase from porcine pancreas was used as a positive control and the *S. aurantiacum* environmental strain WM10.136 culture supernatant was used as a negative control.

## 2.2 SA ELA 的分离纯化

整个分离纯化过程在 4 °C 条件下进行。桔黄赛多孢霉培养上清液经超滤浓缩后, 得到浓度为 10 mg/mL 的蛋白溶液, 经 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换凝胶分离后, 得到 7 个主要的蛋白峰(图 2A)。将含有弹性蛋白酶的洗脱液

(23–25 号管)合并到一起, 用 Nanosep 离心管(Pall, 型号: OD003C33)脱盐浓缩, 产物再次使用离子交换分离, 通过调节洗脱液离子浓度来增强分离效果(图 2B)。二次离子交换后, ELA 主峰仍有拖尾, 收集含有弹性蛋白酶的洗脱液, 使用凝胶层析柱按照分子大小进行分离, 得到了较好的分离



**图 2** 桔黄赛多孢霉胞外弹性蛋白酶分离纯化 A: DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换图谱, 洗脱液中 NaCl 浓度为 0.2 mol/L. B: DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换图谱, 洗脱液中 NaCl 浓度为 1.0 mol/L. C: Sephadex G100 凝胶过滤层析图谱. D: 酶谱及 SDS-PAGE 检测. 泳道 1–6 为酶谱检测结果, 其中 1–4 所用底物为弹性蛋白, 泳道 1 代表真菌培养上清液, 泳道 2、3、4 分别对应图 A、B、C 中分离纯化得到的 ELA 组分; 泳道 5–6 所用底物为特异性寡肽, 泳道 5 代表真菌培养上清液, 泳道 6 代表图 C 中分离纯化得到的 ELA 组分. 泳道 7–9 为 SDS-PAGE 电泳结果, 泳道 7 代表真菌培养上清液中总蛋白, 泳道 8 和 9 分别对应图 A、B 中含 ELA 活性的组分

Figure 2 Isolation and purification of elastase-like protease secreted by *Scedosporium aurantiacum*. A: DEAE-sepharose fast flow ion exchange chromatography. Concentration of NaCl in the eluent was 0.2 mol/L. B: DEAE-sepharose fast flow ion exchange chromatography. Concentration of NaCl in the eluent was 1.0 mol/L. C: Sephadex G100 gel filtration chromatography. D: Zymography and SDS-PAGE analysis. Lanes 1–4 used elastin as a substrate, lane 1 represents the fungal culture supernatant, lanes 2, 3, 4 represent the ELA-contained samples obtained from chromatography. Lanes 5–6 used specific peptide as a substrate, lane 5 represents the fungal culture supernatant, lane 6 represents purified ELA from gel filtration. Lanes 7–9 shows results from SDS-PAGE analysis. Lane 7 represents the proteins present in the fungal culture supernatant. Lanes 8 and 9 represent ELA-contained samples obtained from chromatography A and B.

效果(图 2C)。将 SA 培养上清液和柱分离的产物都进行酶谱电泳分析,结果显示,纯化过程中底物水解条带逐渐减少,最后只产生一个条带,达到了分离目的(图 2D)。在凝胶顶部都出现了底物水解区,这是因为 80 V、4 °C 条件下蛋白在凝胶中下行缓慢,各酶对凝胶顶部的蛋白产生水解作用。凝胶中添加底物影响凝胶孔洞的大小,进而影响蛋白分离效果,标准蛋白在添加了弹性蛋白(泳道 1-4)和寡肽(泳道 5-6)的凝胶中分离效果有明显差异(图 2D)。SA 培养上清液在弹性蛋白底物中产生多个水解条带(泳道 1),而在寡肽底物中只产生一个条带(泳道 5),说明 SA 分泌了多种可以水解弹性蛋白的酶,其中分子量约 24 kDa 的酶为 ELA,其对特异性寡肽底物有水解作用。SA ELA 分子量大小与其他真菌如烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)天然弹性蛋白酶的大小一致<sup>[19,27]</sup>。

### 2.3 ELA 的结构及功能分析

生物信息学分析显示,SA ELA 的分子量为 24.5 kDa,与酶谱凝胶的检测结果一致(图 2D)。该蛋白与淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)外泌丝氨酸蛋白酶(PDB Entry: c3f7oB)的结构相似度最高<sup>[28]</sup>,其中 54%的序列完全一致(置信度 100%) (图 3A)。模拟结构分析显示,SA ELA 的  $\beta$  折叠片和  $\alpha$  螺旋之间形成了一个较深的内部口袋,呈喇叭形,结合位点和活性中心都在开口大的一侧。在催化反应过程中,结合配体特异性地识别底物蛋白,活性中心氨基酸残基 D17、H48、S196 残基组成的催化三联体锚定在内部口袋中。活性中心另一个氨基酸残基 N139 酶结构的稳定性有关,在催化反应过程中,S196 作为亲核体进攻肽段上羰基碳原子,并给出一个质子到 H48,荷负电的 N139 可以中和 H48 上的正电<sup>[29]</sup>。蛋白功能分析显示,

SA ELA 参与让 SA 逃避宿主免疫系统的破坏(GO:0042784)、破坏宿主弹性组织(GO:0060309)的生物过程。

### 2.4 SA ELA 的酶学特性

SA ELA 的最适反应条件如图 4A-4D 所示:温度为 37 °C, pH 8.2, 反应时间为 20 min,适当浓度的  $Zn^{2+}$  可以提升其酶解效率,而  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Na^{+}$  均会造成其酶活力的下降。该酶适宜在低温下贮藏(图 4E),在 4 °C 下贮藏 90 d,酶活力没有明显变化,在 25 °C 下贮藏 7 d 后,酶活力开始快速下降;当贮藏温度超过 37 °C 时,其活力迅速下降。

从表 1 可见,丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 和弹性蛋白酶抑制剂 elastatinal 对 SA ELA 的抑制效果,验证了这种酶是丝氨酸蛋白酶家族的弹性蛋白酶。EDTA 和 Boc-VF-NHO-Bz-Pcl 对 SA ELA 有一定的抑制效果,说明添加了这些抑制剂对酶或底物结构有影响,从而影响了酶解反应效率<sup>[15]</sup>。

从底物特异性检测结果(图 5A)可以看出,SA ELA 的最适底物为弹性蛋白,其次为胶原蛋白,对明胶的水解性能较差,但对弹性蛋白的水解效率低于猪胰腺弹性蛋白酶(P-ELA),与平板水解圈检测结果一致(图 1)。利用 Lineweaver-Burk 作图(图 5B),结果显示 SA ELA 与 P-ELA 的曲线较接近,而与其他底物的曲线则相差较明显,即初步判定这 2 种蛋白酶作用于弹性蛋白底物时,水解效率较接近。再根据酶浓度,最终计算得到  $K_{cat}$  值。

根据米氏方程的计算规则,结合图 5B 中各曲线拟合生成的方程式,计算  $V_{max}$ 、 $K_m$  和  $K_{cat}$  值(表 2)。各底物所对应的 SA ELA 最大反应速率与反应效率一致,CRE 所对应的反应速率  $V_{max}$  最大,平均每秒水解所产生的脯氨酸为 18.14  $\mu g$ ,其  $K_m$  值最小,说明其与底物的结合

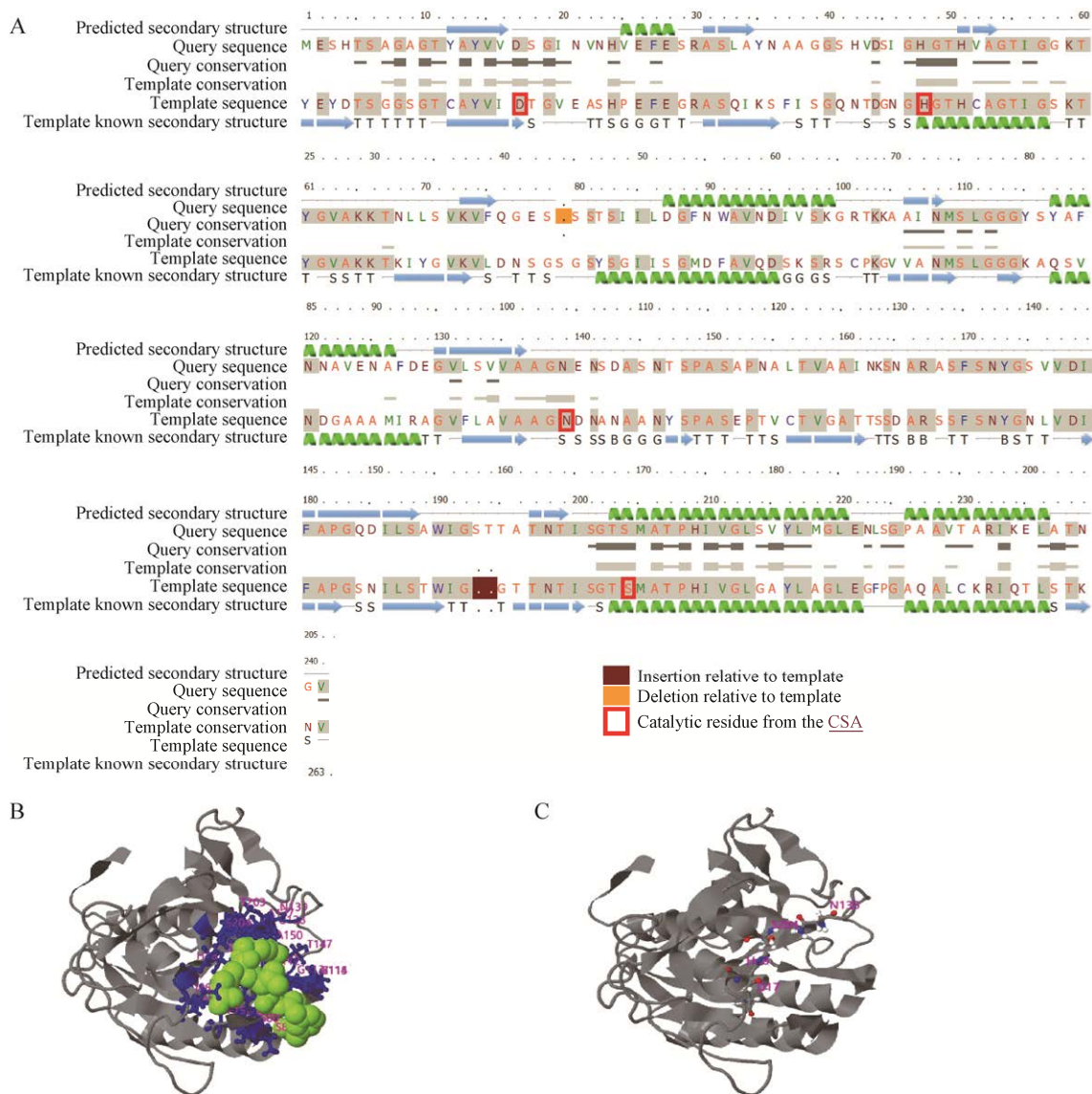


图3 桔黄囊多孢霉胞外弹性蛋白酶的二级结构(A)、结合部位(B)及酶活性位点(C) A中模板蛋白为其结构相似蛋白 c3f7oB<sub>1</sub>; 顶部数值代表序列所在位置; 绿色螺旋代表α螺旋, 蓝色箭头代表β折叠片, 灰色细线代表无规则卷曲. B和C中, 结合部位及活性中心的氨基酸残基由不同颜色代表, 且各自标注了其氨基酸单字符和序列位置(结合部位: S18, I46, H48, F75, S80, S81, I85, S110, L111, G112, G113, G114, Y115, A136, A137, G138, N139, T147, P149, A150, T203, S204; 活性中心: D17, H48, N139, S204), 黄绿色代表结合配体

Figure 3 The secondary structure (A), ligand binding sites (B) and active site (C) of extracellular elastase from *Scedosporium aurantiacum*. In figure A the digits on the top represent the position of amino acid in the sequence; Green helices represent α-helices, blue arrows indicate β-strands and faint lines indicate coil. Predicted amino acid residues at the ligand binding sites and active site demonstrated by colored ball & stick and labelled by amino acid codes and sites in the protein sequence (ligand binding site residues: S18, I46, H48, F75, S80, S81, I85, S110, L111, G112, G113, G114, Y115, A136, A137, G138, N139, T147, P149, A150, T203, S204; active site residues: D17, H48, N139, S204). Predicted binding ligand is shown in green yellow sphere.



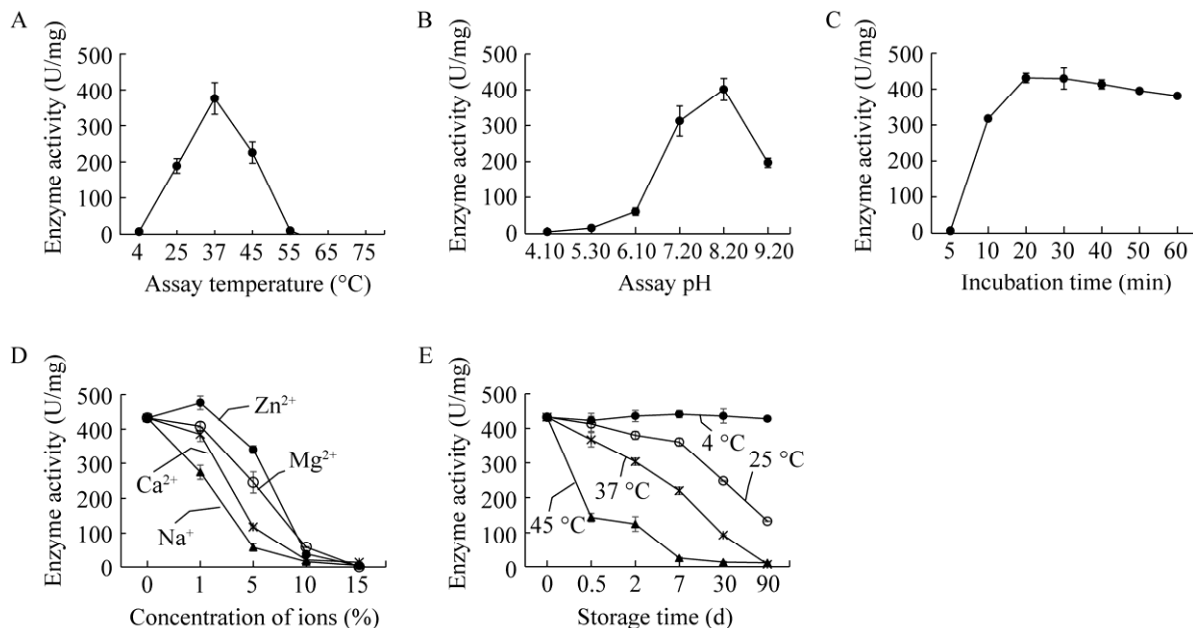


图 4 桔黄赛多孢子菌外泌弹性蛋白酶的酶学特性 A、B、C、D 分别为反应温度、pH、时间和离子强度对酶活力的影响；E 为贮藏温度和时间对酶活力的影响

Figure 4 Enzymatic properties of one elastase-like protease secreted by *Scedosporium aurantiacum*. A, B, C and D were effects of temperature, pH, reaction time, and ions on the enzyme activity; E were effects of storage temperature and time on the activity of enzyme.

表 1 不同抑制剂对 SA ELA 活力的抑制作用

Table 1 Effects of inhibitors on elastase from *Scedosporium aurantiacum*

Protease inhibitor and specificity	Final concentration	Residual activity (%)
EDTA (metalloprotease)	5.0 mmol/L	50
Pepstatin (aspartic protease)	0.15 mmol/L	100
E-64 (cysteine proteases)	10 $\mu$ mol/L	100
PMSF (serine proteases)	0.2 mmol/L	0
Elastatinal (elastase protease)	50 $\mu$ mol/L	0
Chymostatin (chymotrypsin protease)	5 mg/mL	100
Aprotinin (trypsin protease)	100 nmol/L	100
Boc-VF-NHO-Bz-Pcl (subtilisin protease)	100 $\mu$ mol/L	40

性最好，表明酶进行反应所需的底物浓度越低。反之，casein 的  $K_m$  值最大，说明它对酶的亲和力最弱，结果与底物的反应效率一致(图 5A)。 $K_{cat}/K_m$  值反映了不同酶或同一种酶催化底物的催化效率。P-ELA 对 CRE 的催化效率( $K_{cat}/K_m$ ) 高于 SA ELA，表明其对 CRE 的水解能力高于 SA ELA。

### 3 讨论

外泌弹性蛋白酶是烟曲霉 *A. fumigatus* 的毒性因子之一<sup>[30-31]</sup>，人们很早就对其进行了研究。相对而言，SA 的感染在西方国家比较多见，典型者见于囊性纤维化(cystic fibrosis)患者<sup>[1,3]</sup>。囊性纤维化是一种遗传性疾病，仍没有治疗方

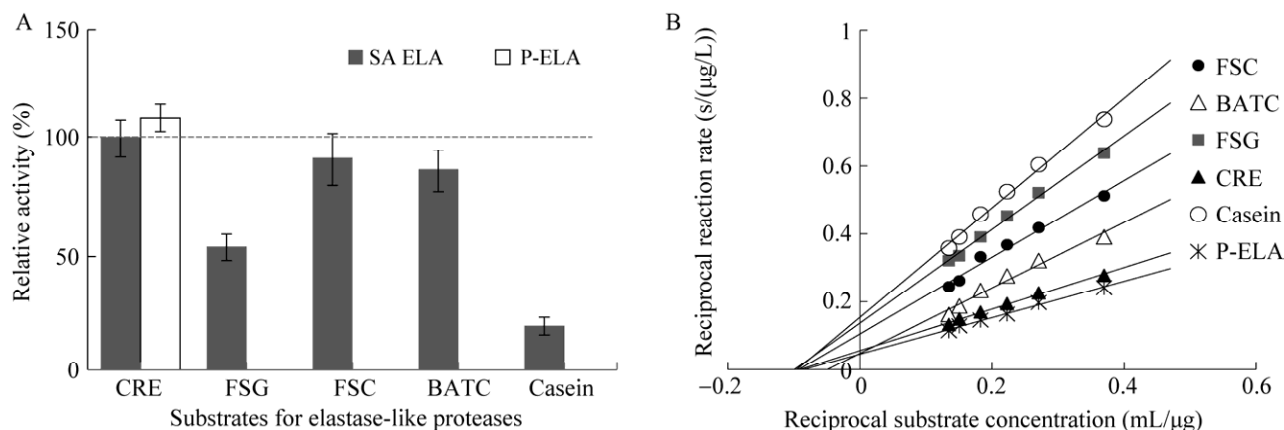


图 5 桔黄赛多孢霉外泌弹性蛋白酶的底物特异性及反应动力学 A: 底物特异性, 以酶与 CRE 反应所产生的活力为基准(图中虚线), 将酶与不同底物反应时的活力与之对比. B: 酶反应动力学, 以底物浓度倒数和反应速率的倒数作图. P-ELA 为产自猪胰腺的 I 型 ELA

Figure 5 Enzymatic properties of elastase-like protease secreted by *Scedosporium aurantiacum*. A: Substrate specificity. All assays were compared to the activity measurement against CRE, set as 100% (dotted line). B: Kinetic parameters of the catalytic reaction. The curve was plotted using reciprocal substrate concentration as x-axis and reciprocal reaction rate as y-axis. P-ELA referring to the elastase protease, type I, produced in porcine pancreas.

表 2 不同底物的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of catalysis against various substrates

Enzymes	Substrates	$V_{max}$ ( $\mu\text{g/s}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{g}$ )	$K_{cat}$ (1/s)	$K_{cat}/K_m$ ( $\mu\text{g/s}$ )
SA ELA	Casein	6.51 $\pm$ 0.41	11.81 $\pm$ 0.23	11.83 $\pm$ 0.71	1.00 $\pm$ 0.09
	FSG	7.32 $\pm$ 0.64	11.21 $\pm$ 0.85	13.31 $\pm$ 0.26	1.18 $\pm$ 0.14
	FSC	9.56 $\pm$ 0.47	10.81 $\pm$ 0.74	17.38 $\pm$ 0.22	1.60 $\pm$ 0.18
	BATC	17.57 $\pm$ 0.59	10.13 $\pm$ 0.46	31.95 $\pm$ 0.39	3.15 $\pm$ 0.29
	CRE	18.14 $\pm$ 0.88	9.31 $\pm$ 0.21	32.99 $\pm$ 0.78	3.54 $\pm$ 0.23
P-ELA	CRE	22.07 $\pm$ 0.50	9.79 $\pm$ 0.06	40.13 $\pm$ 0.64	4.09 $\pm$ 0.21

法, 好发于白种人<sup>[32]</sup>。正是因为受累人群有限, 导致 SA 得到的研究较少。在 *A. fumigatu* 感染小鼠肺组织时中, 参与孢子萌发、菌丝穿透组织、破坏肺呼吸功能和引起肺组织损伤等过程<sup>[30-31]</sup>。笔者在前期研究中也发现, SA ELA 可以引起肺上皮细胞 A549 的凋亡, 可能具有和 *A. fumigatu* 弹性蛋白酶相似的功能<sup>[33]</sup>。为了进一步研究 SA ELA, 通过二级质谱的方法对 SA 所有的外泌蛋白进行了检测分析, 但搜库检索时却未能找到可信的相似蛋白<sup>[16,34]</sup>, 这可能

是由于 ELA 分泌量太小(图 2), 其丰度没有达到二级质谱的检测限<sup>[35]</sup>, 这也与本研究结果一致, 且 SA 基因组测序工作未全面完成, 未能通过 PCR 法得到 SA ELA 的克隆。

蛋白酶的纯化是了解其功能的重要第一步。从纯蛋白酶开始, 可以对氨基酸进行精确测序, 可以绘制蛋白质结构图, 可以研究生化特性, 也可以评估蛋白酶在发病机制中的作用<sup>[36]</sup>。Markaryan 等<sup>[37]</sup>通过亲和层析和凝胶过滤方法从 *A. fumigatus* 培养上清液中纯化了一种蛋白

酶,然后检测分析了这种蛋白酶的分子和催化特性,例如分子量、底物和抑制剂特异性、温度和 pH 值的活性曲线以及 N 端氨基酸序列,并通过进化关系分析,确定了该蛋白酶是一种可以分解弹性蛋白的金属酶,最后,他们通过免疫金标记法检测了这种蛋白酶在 *A. fumigatus* 感染的小鼠肺中的分泌情况,发现该酶在 *A. fumigatus* 侵染过程中主要起到了降解肺组织中弹性蛋白的作用。弹性蛋白酶和酪氨酸蛋白酶不易用柱层析的方法分离,原因是弹性蛋白酶一般分泌量少,而酪氨酸蛋白酶存在自降解行为<sup>[37-38]</sup>。

SA ELA 是一种碱性蛋白酶,与其他真菌来源和动物来源的 ELA 相似<sup>[35,37]</sup>,其碱适应性与 *A. fumigatus* ELA 的最适 pH 接近(pH 8.5)<sup>[37]</sup>,但均低于猪胰腺的 I 型 ELA (最适 pH 9.4)。目前报道的真菌 ELA 的分子量范围为 12–34 kDa,且都源自曲霉属,包括黄曲霉 *A. flavus*、烟曲霉 *A. fumigatus*、黑曲霉 *A. niger* 和米曲霉 *A. oryzae*<sup>[37,39-41]</sup>。虽然,这些曲霉的基因组测序和注释工作已经很好地完成了,但它们与 SA ELA 的相似性较差(identity percentage < 50%)。保守结构域检索时发现 SA ELA 与青霉 *P. lilacinus* 外泌丝氨酸蛋白酶(PDB Entry: c3f7oB\_)的序列相似度最高。通过与 c3f7oB\_ 的对比,获得了几段潜在的 SA ELA 保守序列(图 3A),后续将根据这些序列,设计引物,通过 PCR 法获得其序列,对本研究结果进行验证。

弹性蛋白是肺部结构重要的组成成员之一,占肺部质量的 20%,保持肺部的弹性<sup>[19]</sup>。弹性蛋白的水解,不仅破坏肺组织的完整性,而且其水解多肽产物可诱导产生大量的抗体,进而引发细胞因子、趋化因子及其他相关蛋白的表达发生变化<sup>[42]</sup>。这也验证了 Silva 等<sup>[19]</sup>在小鼠实验中发现的赛多孢霉外泌蛋白酶参与真

菌组织侵染和诱导炎症反应的结论。

检测分析蛋白结构的方法有多种,但由于 SA ELA 与其他已知蛋白的同源性较差,前期未能通过 BLAST 方法有效获得其氨基酸序列。本研究通过蛋白纯化、质谱测序、计算机模拟的流程检测分析了 SA ELA 的蛋白结构,并对其酶学特性进行了检测,为后续的异源表达、生物功能和毒性机制研究奠定了基础。

## 致谢

澳大利亚悉尼 Westmead 医学研究所赞助了本研究所所需的菌种,在此表示感谢。

## REFERENCES

- [1] CORTEZ KJ, ROILIDES E, QUIROZ-TELLES F, MELETIADIS J, ANTACHOPOULOS C, KNUDSEN T, BUCHANAN W, MILANOVICH J, SUTTON DA, FOTHERGILL A, RINALDI MG, SHEA YR, ZAOUTIS T, KOTTILIL S, WALSH TJ. Infections caused by *Scedosporium* spp.[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2008, 21(1): 157-197.
- [2] HARUN A, SERENA C, GILGADO F, CHEN SCA, MEYER W. *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *S. prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model[J]. *Medical Mycology*, 2010, 48(sup1): S45-S51.
- [3] PIHET M, CARRERE J, CIMON B, CHABASSE D, DELHAES L, SYMOENS F, BOUCHARA JP. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review[J]. *Medical Mycology*, 2009, 47(4): 387-397.
- [4] WARRIS A, NETEA MG, VERWEIJ PE, GAUSTAD P, KULLBERG BJ, WEEMAES CMR, ABRAHAMSEN TG. Cytokine responses and regulation of interferon-gamma release by human mononuclear cells to *Aspergillus fumigatus* and other filamentous fungi[J]. *Medical Mycology*, 2005, 43(7): 613-621.
- [5] SLAVIN M, van HAL S, SORRELL TC, LEE A, MARRIOTT DJ, DAVESON K, KENNEDY K, HAJKOWICZ K, HALLIDAY C, ATHAN E, BAK N,

- CHEONG E, HEATH CH, ORLA MORRISSEY C, KIDD S, BERESFORD R, BLYTH C, KORMAN TM, OWEN ROBINSON J, MEYER W, et al. Invasive infections due to filamentous fungi other than *Aspergillus*: epidemiology and determinants of mortality[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2015, 21(5): 490.e1-490.e10.
- [6] 俞雯. 1 例尖端赛多孢子菌肺炎病人手术后的护理[J]. *全科护理*, 2016, 14(28): 3016-3017.
- YU W. Postoperative nursing care of a patient with pneumonia caused by *Sporozoospermum pointes*[J]. *Chinese General Practice Nursing*, 2016, 14(28): 3016-3017 (in Chinese).
- [7] GILGADO F, CANO J, GENÉ J, GUARRO J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(10): 4930-4942.
- [8] LACKNER M, FERNÁNDEZ-SILVA F, GUARRO J, LASS-FLÖRL C. Assessing micafungin/triazole combinations for the treatment of invasive scedosporiosis due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium boydii*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, 69(11): 3027-3032.
- [9] 韩燕峰, 郑欢, 张芝元, 陈万浩, 罗韵, 王玉荣, 梁宗琦. 广西和海南的赛多孢属 2 新种[J]. *菌物学报*, 2017, 36(2): 145-153.
- HAN YF, ZHENG H, ZHANG ZY, CHEN WH, LUO Y, WANG YR, LIANG ZQ. Two new *Scedosporium* species from Guangxi and Hainan[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(2): 145-153 (in Chinese).
- [10] LACKNER M, de HOOG GS, VERWEIJ PE, NAJAFZADEH MJ, CURFS-BREUKER I, KLAASSEN CH, MEIS JF. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(5): 2635-2642.
- [11] 王玉荣, 王垚, 罗韵, 梁建东, 陈万浩, 韩燕峰, 梁宗琦. 桔黄赛多孢, 一种潜在的致病有丝分裂产孢真菌[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(10): 2090-2093.
- WANG YR, WANG Y, LUO Y, LIANG JD, CHEN WH, HAN YF, LIANG ZQ. *Scedosporium aurantiacum*, a potential pathogenic mitosporic fungus[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(10): 2090-2093 (in Chinese).
- [12] ALASTRUEY-IZQUIERDO A, CUENCA-ESTRELLA M, MONZÓN A, RODRIGUEZ-TUDELA JL. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(2): 748-751.
- [13] HEATH CH, SLAVIN MA, SORRELL TC, HANDKE R, HARUN A, PHILLIPS M, NGUYEN Q, DELHAES L, ELLIS D, MEYER W, CHEN SCA, GROUP ASS. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection[J]. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, 15(7): 689-693.
- [14] DELHAES L, HARUN A, CHEN SCA, NGUYEN Q, SLAVIN M, HEATH CH, MASZEWSKA K, HALLIDAY C, ROBERT V, SORRELL TC, GROUP ASS, MEYER W. Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(2): 282-290.
- [15] HAN ZP, KAUTTO L, NEVALAINEN H. Secretion of proteases by an opportunistic fungal pathogen *Scedosporium aurantiacum*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169403.
- [16] HAN ZP, KAUTTO L, MEYER W, CHEN SCA, NEVALAINEN H. Growth and protease secretion of *Scedosporium aurantiacum* under conditions of hypoxia[J]. *Microbiological Research*, 2018, 216: 23-29.
- [17] 桑军军, 李颖芳, 潘炜华, 廖万清. 病原性真菌蛋白酶致病机制研究进展[J]. *微生物与感染*, 2017, 12(1): 8-13.
- SANG JJ, LI YF, PAN WH, LIAO WQ. The pathogenetic mechanism of proteases from pathogenic fungi[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2017, 12(1): 8-13 (in Chinese).
- [18] FUKUI Y, OKUMURA Y, UCHIYA K, KOMORI Y, OGAWA K, NIKAI T, HASEGAWA Y. Biochemical and cellular activity of chemically synthesized elastase inhibitor (S-AFUEI) from *Aspergillus fumigatus*[J]. *Journal De Mycologie Medicale*, 2019, 29(4): 345-351.

- [19] SILVA RLH, ROSA-MILANI E, BRUNALDI MO, MAFFEI CML. Murine model of invasive pulmonary *Aspergillosis*: follow-up of tissue injury, fungal burden and mortality with distinct elastase production strains[J]. *Journal De Mycologie Medicale*, 2019, 29(2): 112-119.
- [20] 韩志萍, 程慧莹, 王飞. 桔黄赛多孢菌胞外胰蛋白酶的酶学特性[J]. *菌物学报*, 2020, 39(8): 1520-1529. HAN ZP, CHENG HY, WANG F. Characterization of enzymatic properties of trypsin-like protease secreted by *Scedosporium aurantiacum*[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(8): 1520-1529 (in Chinese).
- [21] PALMER KL, AYE LM, WHITELEY M. Nutritional cues control *Pseudomonas aeruginosa* multicellular behavior in cystic fibrosis sputum[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 8079-8087.
- [22] DAVIS DA. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, 12(4): 365-370.
- [23] CHEN QH, HE GQ. Optimization of elastolysis conditions and elastolytic kinetic analysis with elastase from *Bacillus licheniformis* ZJUEL31410[J]. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 2006, 7(6): 482-490.
- [24] PETERSON R, GRINYER J, NEVALAINEN H. Secretome of the coprophilous fungus *Doratomyces stemonitis* C8, isolated from koala feces[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(11): 3793-3801.
- [25] KELLEY LA, MEZULIS S, YATES CM, WASS MN, STERNBERG MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(6): 845-858.
- [26] YANG JY, ZHANG Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(W1): W174-W181.
- [27] GALIAKBEROVA AA, BEDNENKO DM, KREYER VG, OSMOLOVSKIY AA, EGOROV NS. Formation and properties of the extracellular proteinase of *Aspergillus flavus* O-1 micromycete active against fibrillar proteins[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2021, 57(5): 586-593.
- [28] LIANG LM, MENG ZH, YE FP, YANG JK, LIU SQ, SUN YN, GUO Y, MI QL, HUANG XW, ZOU CG, RAO ZH, LOU ZY, ZHANG KQ. The crystal structures of two cuticle-degrading proteases from nematophagous fungi and their contribution to infection against nematodes[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2010, 24(5): 1391-1400.
- [29] CERA ED. Serine proteases[J]. *IUBMB Life*, 2009, 61(5): 510-515.
- [30] GARRATT LW, SUTANTO EN, LING KM, LOOI K, IOSIFIDIS T, MARTINOVICH KM, SHAW NC, KICIC-STARCEVICH E, KNIGHT DA, RANGANATHAN S, STICK SM, KICIC A. Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (AREST CF). Matrix metalloproteinase activation by free neutrophil elastase contributes to bronchiectasis progression in early cystic fibrosis[J]. *The European Respiratory Journal*, 2015, 46(2): 384-394.
- [31] YOO D, PANG L, RADA B. Neutrophil release of cystic fibrosis airway inflammatory markers, extracellular DNA, mpo and elastase, in response to *Pseudomonas aeruginosa*, equires nadph oxidase and Mek1/2-Erk1/2 signaling[J]. *Pediatric Pulmonology*, 2013, 48: 288-289.
- [32] LYCZAK JB, CANNON CL, PIER GB. Lung infections associated with cystic fibrosis[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, 15(2): 194-222.
- [33] HAN ZP, KAUTTO L, MEYER W, CHEN SCA, NEVALAINEN H. Effect of peptidases secreted by the opportunistic pathogen *Scedosporium aurantiacum* on human epithelial cells[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(11): 814-822.
- [34] HAN Z. Proteases of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic fungal pathogen[D]. Sydney: Macquarie University, 2017.
- [35] RAMIREZ-GARCIA A, PELLON A, BULDAIN I, ANTORAN A, ARBIZU-DELGADO A, GURUCEAGA X, REMENTERIA A, HERNANDO FL. Proteomics as a tool to identify new targets against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the context of cystic fibrosis[J]. *Mycopathologia*, 2018, 183(1): 273-289.
- [36] BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L. *Biochemistry* [M]. 5th ed. New York: W H Freeman, 2002: 20-32.
- [37] MARKARYAN A, MOROZOVA I, YU H, KOLATTUKUDY PE. Purification and characterization

- of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung[J]. *Infection and Immunity*, 1994, 62(6): 2149-2157.
- [38] FROSCO M, CHASE T Jr, MACMILLAN JD. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*[J]. *Infection and Immunity*, 1992, 60(3): 728-734.
- [39] REICHARD U, BUTTNER S, EIFFERT H, STAIB F, RUCHEL R. Purification and characterisation of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1990, 33(4): 243-251.
- [40] NAKANISHI I, KINOSHITA T, SATO A, TADA T. Structure of porcine pancreatic elastase complexed with FR901277, a novel macrocyclic inhibitor of elastases, at 1.6 Å resolution[J]. *Biopolymers*, 2000, 53(5): 434-445.
- [41] OKUMURA Y, OGAWA K, NIKAI T. Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2004, 53(Pt 5): 351-354.
- [42] ALP S, ARIKAN S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2008, 48(5): 331-337.

(本文责编 陈宏宇)