

研究报告

湛江沿海潮间带产胞外纤溶活性酶类海洋真菌的 生物多样性分析

崔丽娇¹ 王洁² 吕应年³ 薛珊珊¹ 刘颖文¹ 江黎明^{1*}

(1. 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所 广东 湛江 524023)

(2. 漯河医学高等专科学校 医学检验技术教研室 河南 漯河 462002)

(3. 广东医科大学 广东省天然药物重点实验室 广东 湛江 524023)

摘要:【目的】研究湛江沿海硇洲岛和徐闻珊瑚礁自然保护区潮间带产胞外纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物海洋真菌的生物多样性, 为发掘新型溶栓药物奠定基础。【方法】采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)和酵母膏蛋白胨葡萄糖(YPD)培养基分离培养海洋真菌, 采用真菌 rDNA 转录间隔区 1-5.8S rDNA-转录间隔区 2 (ITS1-5.8S-ITS2)片段的序列分析及其系统进化树构建的方法鉴定分离培养的海洋真菌, 采用脱脂牛奶马铃薯葡萄糖琼脂(SM-PDA)培养基培养法筛选产胞外蛋白酶的海洋真菌, 采用海水纤维蛋白马铃薯葡萄糖琼脂(FN-PDA)培养基培养法筛选产胞外纤溶酶样酶和/或纤溶酶原激活物的海洋真菌。【结果】从湛江沿海的硇洲岛和徐闻珊瑚礁自然保护区潮间带分离、培养和鉴定了海洋真菌 446 株, 含真菌的 98 个种, 分布于真菌域子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)的 6 个纲、18 个目、46 个科、65 个属; 其中产胞外蛋白酶的海洋真菌有 265 株, 61 个种, 分布于 41 个属; 产胞外纤溶酶样酶的海洋真菌有 67 株, 22 个种, 分布于 14 个属; 产胞外纤溶酶原激活物的海洋真菌有 84 株, 23 种, 分布于 13 个属; 优势属为曲霉属(*Aspergillus*), 其次为青霉属(*Penicillium*)。【结论】湛江沿海潮间带可分离培养的产胞外纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物的海洋真菌物种丰富多样, 是发掘新型溶栓药的丰富资源。

关键词: 硇洲岛, 徐闻珊瑚礁自然保护区, 海洋真菌, 纤溶酶样酶, 纤溶酶原激活物, 生物多样性

Foundation item: Zhanjiang Key Laboratory for R&D of the Microbial Resource Products from Beibu Gulf Coast (No. 2012E02)

***Corresponding author:** Tel: 86-759-2388523; E-mail: lmjiang@gdmc.edu.cn

Received: March 29, 2016; **Accepted:** May 17, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 17, 2016

基金项目: 湛江市环北部湾海岸特色微藻生物资源产品研发重点实验室(No. 2012E02)

***通讯作者:** Tel: 86-759-2388523; E-mail: lmjiang@gdmc.edu.cn

收稿日期: 2016-03-29; **接受日期:** 2016-05-17; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-05-17

Biodiversity analysis of marine fungi producing extracellular fibrinolytic activity enzymes from the intertidal zone along Zhanjiang coast

CUI Li-Jiao¹ WANG Jie² LÜ Ying-Nian³ XUE Shan-Shan¹
LIU Ying-Wen¹ JIANG Li-Ming^{1*}

(1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

(2. Department of Medical Laboratory, Luohe Medical College, Luohe, Henan 462002, China)

(3. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

Abstract: [Objective] To investigate the biodiversity of marine fungi producing extracellular plasmin-like enzymes and plasminogen activators from the intertidal zone of Naozhou island and Xuwen coral reef nature reserve along Zhanjiang coast, and lay the foundation for discovery of new thrombolytics of plasmin-like enzymes and plasminogen activators. [Methods] Marine fungi were isolated and cultured by the method using potato dextrose agar (PDA) culture plates and yeast extract peptone dextrose (YPD) media, and identified by sequence analysis and phylogenetic tree construction of fungal rDNA internal transcribed spacer 1-5.8S rDNA-internal transcribed spacer 2 (ITS1-5.8S-ITS2) fragments. The marine fungi producing extracellular proteases were screening by the method using skim milk PDA (SM-PDA) plates, and the marine fungi producing extracellular plasmin-like enzymes and plasminogen activators were screening by the method using sea water fibrin PDA (FN-PDA) plates. [Results] A total of 446 strains of marine fungi were isolated, cultured and identified from the intertidal zone of Naozhou island and Xuwen coral reef nature reserve along Zhanjiang coast, which contained 98 species distributed in 65 genera, 46 families, 18 orders, 6 classes, belonged to Ascomycota and Basidiomycota of fungus. Amongst, there were 265 strains of marine fungi producing extracellular proteases represented 61 species distributed in 41 genera, 67 strains of fungi producing extracellular plasmin-like enzymes represented 22 species distributed in 14 genera, and 84 strains of fungi producing extracellular plasminogen activators represented 23 species distributed in 13 genera. The dominant genus was *Aspergillus*, and then *Penicillium*. [Conclusion] There were species biodiversity of the culturable marine fungi producing extracellular plasmin-like enzymes and plasminogen activators in the intertidal zone along Zhanjiang coast, which would be the rich resources for discovery of new thrombolytic agents.

Keywords: Naozhou island, Xuwen coral reef nature reserve, Marine fungus, Plasmin-like enzyme, Plasminogen activator, Biodiversity

国际卫生组织(WHO)报告, 2012 年因心血管疾病死亡的人数为 1 750 万, 占当年全球因非传染性疾病死亡人数的 46.2%, 是全球头号死亡原因^[1]; WHO 预计到 2030 年, 全世界因心血管疾病, 尤其是因血管内血栓形成所致的急性心肌梗塞、急性缺血性脑卒中和肺动脉栓塞而死亡的年死亡人数将会增加到 2 330 万^[2]。目前常用于血栓性疾病临床治疗和实验研究的溶栓药, 可根据其作用机制不同

而分为直接酶解血栓中纤维蛋白的纤溶酶样酶 (Plasmin-like enzyme) 和通过激活纤溶酶原而间接溶解纤维蛋白的纤溶酶原激活物 (Plasminogen activator) 两大类^[3]。前者包括人源纤溶酶及其衍生物、蚓激酶、蛇毒纤溶酶和纳豆激酶^[4], 后者主要包括人源性的组织纤溶酶原激活物和尿激酶^[5]及细菌来源的链激酶和葡激酶^[6]。大多数现有的纤溶酶样酶, 尤其是纤溶酶经系统给药后会迅速被血浆中

的 α 2-抗纤溶酶和 α 2-巨球蛋白中和,因此,只有微纤维蛋白溶酶(Microplasmin)和蛇毒纤溶酶被作为溶栓药进行过临床实验,但结果均不理想^[4]。迄今被批准用于临床治疗的溶栓药都是纤溶酶原激活物类,包括组织纤溶酶原激活物及其衍生物、尿激酶和链激酶^[7]。但这些现有的纤溶酶原激活物对纤维蛋白的特异性较低,在溶解血管中阻塞性血栓的同时,也可使系统中大量的纤维蛋白原和血管损伤部位的止血栓子降解,引起出血的副作用。因此,寻找疗效更好、副作用更小的新型溶栓药仍是目前溶栓药研究中的热门领域之一^[8]。

因具有巨大的生物多样性及丰富的代谢产物和酶类,并已发现其中许多物种能产生纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物,微生物正逐渐成为溶栓新药研发的重要资源^[9]。其中,种类繁多、数量庞大的海洋微生物因长期生活在高盐、高压、低营养、温差大及 pH 范围广的海洋环境中^[10],可产生许多结构和功能与陆栖微生物不同的次级代谢产物和酶类,是至今仍未得到很好挖掘的重要微生物资源^[11]。海洋真菌是海洋微生物的重要组成部分,据估计可能有 10 000 多个种或种系型,包括已被鉴定的 500 多种专性海洋真菌、300 多种兼性海洋真菌和 1 500 多种海洋酵母等^[12]。近年来,海洋微生物中,关于芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[13]和希瓦氏菌属(*Shewanella*)^[14]海洋细菌,以及松藻属(*Codium*)^[15]海洋绿藻的纤溶活性酶类的研究已有零星报道,但至今仍未见关于产纤溶活性酶类海洋真菌的研究报道。本研究拟分析研究湛江沿海硇洲岛和徐闻珊瑚礁自然保护区潮间带产胞外纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物的海洋真菌的生物多样性,为发掘可用于新型溶栓药物研发的海洋真菌资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器、海洋真菌及其培养基

1.1.1 主要试剂和仪器:溶细胞酶、酪蛋白、凝血酶和用于配制马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、酵母膏蛋白胨葡萄糖(YPD)、脱脂牛奶马铃薯葡萄糖琼脂

(SM-PDA)及纤维蛋白马铃薯葡萄糖琼脂(FN-PDA)等培养基的化学试剂, Sigma-Aldrich 公司;真菌基因组 DNA 提取试剂盒, Bioflux 公司;PCR 试剂盒, Vazyme 公司;真菌 rDNA 转录间隔区 1-5.8S rDNA-转录间隔区 2 (ITS1-5.8S-ITS2)片段 PCR 通用引物由上海生工生物工程公司合成;人纤维蛋白原由广东双林生物药业有限公司馈赠;超净工作台,上海蓝季科技;5417R 台式冷冻离心机和 PCR 扩增仪, Eppendorf 公司。

1.1.2 海洋真菌:用于产胞外纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物海洋真菌生物多样性分析的海洋真菌共 446 株,其中 178 株是研究组之前从硇洲岛(20°52'–20°56'N, 110°33'–110°38'E)潮间带分离鉴定的^[16],其余 268 株由本研究组从徐闻珊瑚礁自然保护区(20°10'–20°27'N, 109°50'–109°24'E)潮间带采样、分离和鉴定。

1.1.3 分离与发酵培养基:海水 PDA 固体培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 16 g, 50%自然海水 1 L, pH 自然,倒平板前加入终浓度为 100 U/mL 的青链霉素混合液)、海水 YPD 培养基(胰蛋白胨 20 g, 酵母提取物 10 g, 葡萄糖 20 g, 50%自然海水 1 L, pH 自然,葡萄糖与其他分别灭菌后再混匀)和用于蛋白酶活性筛选的 SM-PDA 固体培养基(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 16 g, 脱脂速溶奶粉 10 g, 50%自然海水 1 L, pH 自然),按文献^[16]的方法配制。

用于纤溶酶及其激活物筛选的海水 FN-PDA 固体培养基的配制参照 Astrup 等的方法^[17],并针对海洋真菌的生长特性做出相应的调整。即马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 16 g, 50%自然海水 1 L, 1×10^5 Pa 高压灭菌 20 min,冷却至 55–60 °C,加入预热的纤维蛋白原缓冲液(0.5 g 纤维蛋白原溶于 250 mL pH 7.4 的磷酸缓冲液),加入 3 mL 的 200 U/mL 凝血酶缓冲液(1 000 U 凝血酶溶于 5 mL pH 7.4 的磷酸缓冲液)混匀倒平板。海水纤溶酶活性筛选固体培养基采用 Lassen 的方法^[18],将上述配制的海水 FN-PDA

固体培养基 70 °C 加热 60 min 而成。

1.2 菌株的分离纯化及保存

沉积物样品取 2 g 悬浮于 20 mL 灭菌天然海水, 其上清液与海水样品经细胞计数后分别适当稀释, 取稀释液 50 μ L 涂布在 PDA 固体培养基上, 置 28 °C 培养箱培养, 一旦发现有菌丝长出后, 立即将其转移到另一相同培养基中, 经 2-3 次平板划线纯化后, 以海水 PDA 试管斜面培养基保存于 4 °C。

1.3 DNA 的提取及 PCR 扩增

斜面培养基保存的海洋真菌接种到海水 PDA 培养基, 于 28 °C 培养 14 d。加入灭菌的 0.1% Tween 80 收集分生孢子, 计数后将孢子悬液稀释至约 2×10^8 cells/mL。将孢子悬液接种到 3 mL 海水 YPD 培养液中, 28 °C 培养 48 h。发酵液 1 000 \times g 离心 3 min, 将菌丝体转移到 1 mL 的 Eppendorf 管中, 加入 500 μ L PBS (pH 7.0) 和 100 U 溶细胞酶, 混匀后 37 °C 培养 1 h^[16]。采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒, 按说明书上的方法提取真菌基因组 DNA。最后加入 100 μ L TE 缓冲液将 DNA 溶解, 置 -20 °C 保存。

采用真菌 ITS1-5.8S-ITS2 片段特异性通用 PCR 引物对 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[16,19], 以提取的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增各真菌的 ITS1-5.8S-ITS2 片段。PCR 体系为: DNA 模板 2 μ L, 2 \times Taq Master Mix 25 μ L, 10 μ mol/L Primers 各 2 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L。反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 7 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后送上海生工生物工程股份有限公司测序。

1.4 系统进化分析

ITS1-5.8S-ITS2 片段测序结果提交 GenBank, 并在 GenBank 网站采用 BLAST 进行相似性分析, 采用 ClustalW 2 两两比对, 排除相同序列, 用 ClustalX 进行排列比较, 用 Phylip 软件按照邻接法聚类(选择 Bootstrap 检验值 $\geq 50\%$, 1 000 次重复)进行系统树的构建, 从而对分离出的微生物进行分类

鉴定。

1.5 蛋白酶及纤溶活性菌株的筛选

产生蛋白酶的菌株采用之前报道^[16]的 SM-PDA 培养基的方法进行筛选。纤溶活性菌株的筛选采用纤维蛋白培养基方法^[17-18]进行, 并针对海洋真菌的培养条件做出调整。将分离纯化的单个菌落分别接种于 SM-PDA 培养基、不经 70 °C 加热 60 min 处理的海水 FN-PDA 培养基和经 70 °C 加热 60 min 处理的海水 FN-PDA 培养基, 28 °C 恒温培养 3-7 d。能在 SM-PDA 培养基上形成透明圈的菌株为能产生胞外蛋白酶的海洋真菌菌株; 能在经过 70 °C 加热 60 min 处理和不处理的海水 FN-PDA 培养基上都形成透明圈的菌株为能产生胞外纤溶酶样酶的真菌菌株; 仅能在未经 70 °C 加热 60 min 处理的海水 FN-PDA 培养基上形成透明圈的菌株为能产生胞外纤溶酶原激活物的菌株。测量不同阳性菌株的透明圈直径和菌落直径, 以透明圈直径与菌落直径的差值(D)表示酶活大小, D 值越大, 表明活性越强。

2 结果与分析

2.1 海洋真菌生物多样性

之前研究组已从硇洲岛潮间带分离鉴定了 178 株海洋真菌(ITS1-5.8S-ITS2 序列 GenBank 登录号为 KM277955-KM278132^[16]), 本研究从徐闻珊瑚礁自然保护区采集的样品中分离出了 268 株真菌(ITS1-5.8S-ITS2 片段的 GenBank 序列登录号为 KX098015-KX098282), 共 446 株海洋真菌(表 1)。序列比对分析结果表明, 这 446 株海洋真菌包含了真菌的 98 个种, 归属为真菌域 2 个门的 6 个纲、18 个目、46 个科、65 个属(表 1)。其中, 散囊菌纲(Eurotiomycetes)真菌 290 株, 占分离培养真菌的 65.0%; 座囊菌纲(Dothideomycetes)真菌 66 株, 约占 14.8%; 粪壳菌纲(Sordariomycetes)真菌 64 株, 约占 14.3%; 伞菌纲(Agaricomycetes)真菌 19 株, 约占 4.2%, 子囊菌纲(Ascomycete)真菌 8 株, 约占 1.8%。在 446 株海洋真菌归类的 65 个属中, 优势

表 1 湛江沿海硇洲岛和徐闻珊瑚礁自然保护区海洋真菌及产胞外蛋白酶、纤溶酶样酶及纤溶酶原激活物海洋真菌菌株的类群分布
Table 1 The marine fungi producing extracellular proteases, plasmin-like enzymes and plasminogen activators from Naozhou island and Xuwen coral reef nature reserve along Zhanjiang coast

类群分布				菌株数			产酶菌株数			
Distribution groups				Number of strains			Strains producing enzymes			
门	纲	目	科	属	硇洲岛	徐闻	合计	蛋白酶	纤溶酶样酶	纤溶酶原激活物
Phylum	Class	Order	Family	Genus	NZI	XW	Total	Protease	PLE	PA
Ascomycota	Ascomycete	?	?	?	2	6	8	6	1	2
	Dothideomycetes	Botryosphaeriales	Botryosphaeriaceae	<i>Lastodiplodia</i>	8	0	8	0	0	2
Capnodiales				<i>Neofusicoccum</i>	1	0	1	0	0	0
				<i>Cladosporium</i>	7	18	25	23	1	2
				<i>Toxicocladosporium</i>	0	1	1	0	0	0
				<i>Pallidocercospora</i>	0	1	1	1	0	0
Dothideales				<i>Devriesia</i>	0	1	1	1	1	0
				<i>Eupeniidiella</i>	0	1	1	0	0	0
				<i>Aureobasidium</i>	0	1	1	0	0	0
				<i>Biatriospora</i>	0	1	1	1	0	0
Pleosporales				<i>Corynespora</i>	1	0	1	0	0	0
				<i>Pyrenochaetopsis</i>	1	0	1	0	0	0
				<i>Leptosphaerulina</i>	0	1	1	1	0	1
				<i>Stagonosporopsis</i>	0	1	1	1	0	0
				<i>Paraconiothyrium</i>	0	3	3	3	0	3
				<i>Westerdykella</i>	1	0	1	1	1	0
				<i>Paraphaeosphaeria</i>	7	0	7	6	5	0
				<i>Paraconiothyrium</i>	2	0	2	2	2	0
				<i>Paraphoma</i>	1	0	1	1	0	0
				<i>Phaeosphaeriopsis</i>	2	0	2	2	0	0
				<i>Setophoma</i>	1	0	1	0	0	0
				<i>Setophaeosphaeria</i>	0	1	1	1	1	0
				<i>Curvularia</i>	3	0	3	1	0	0

(待续)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

(续表)											
Basidiomycota	Agaricomycetes	Agaricales	Xylariaceae	<i>Daldinia</i>	2	0	2	0	0	0	1
				<i>Hypoxylon</i>	1	0	1	1	0	0	
				<i>Myrmecridium</i>	2	0	2	2	0	0	
				<i>Microsphaeropsis</i>	5	0	5	4	4	1	
	Agaricales	Amanitaceae	<i>Amanita</i>	0	1	1	0	0	0		
			<i>Phanerochaete</i>	2	0	2	0	0	0		
			<i>Subulicystidium</i>	2	0	2	2	0	0		
			<i>Leiotrametes</i>	0	1	1	0	0	0		
	Polyporales	Coriolaceae	<i>Rigidoporus</i>	1	2	3	2	2	0		
			<i>Trametes</i>	2	3	5	0	0	0		
			<i>Lentinus</i>	1	0	1	1	0	0		
			<i>Flavodon</i>	2	0	2	1	0	0		
	Russulales	Phanerochaetaceae	<i>Pseudolagarobasidium</i>	1	0	1	0	0	0		
			<i>Peniophora</i>	1	0	1	1	0	0		
	合计				178	268	446	265	67	84	
	Total										

注: 分离菌株的 ITS1-5.8S-ITS2 序列在 GenBank 中相似性最高的物种没有相应纲, 或目, 或科, 或属以?表示。
Note: Naozhou island was represented as NZI, Xuwen coral reef nature reserve was represented as XW, plasmin-like enzyme was represented as PLE, plasminogen activator was represented as PA. The closest identified ITS1-5.8S-ITS2 in GenBank has no corresponding class or order or family or genus are represented in ?.

属为曲霉属(*Aspergillus*), 含 189 株, 占被分离真菌的 42.4%; 其次为青霉属(*Penicillium*), 含 93 株, 占被分离真菌的 20.8%。

2.2 产胞外蛋白酶海洋真菌的生物多样性

采用 SM-PDA 培养基培养的方法, 对获得的海洋真菌进行胞外蛋白酶活性分析的结果显示, 446 株海洋真菌中有 265 株真菌可产生胞外蛋白酶(表 1), 占分离培养真菌的 59.4%。其中优势菌群为曲霉属(*Aspergillus*), 含海洋真菌 134 株, 占可产生胞外蛋白酶真菌的 50.6%; 其次为青霉属(*Penicillium*), 含海洋真菌 44 株, 占可产生胞外蛋白酶真菌的 16.6%。265 株可产生胞外蛋白酶的真菌含 61 个种, 分布于真菌域的 41 个属、32 个科、13 个目、6 个纲的 2 个门。

2.3 产胞外纤溶活性酶类海洋真菌的生物多样性

采用经 70 °C 加热 60 min 处理和不处理的两种海水 FN-PDA 培养基培养的方法, 对获得的海洋真菌的胞外纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物进行分析的结果(图 1)显示: 在 446 株分离培养的海洋真菌中, 能在经 70 °C 加热 60 min 处理和不处理的海水 FN-PDA 培养基上形成透明圈的, 即产生胞外纤溶酶样酶活性的菌株有 67 株; 仅能在未经 70 °C 加热 60 min 处理的海水 FN-PDA 培养基上形成透明圈的, 即产生胞外纤溶酶原激活物的菌株有 84 株(表 1)。

这些具有胞外纤溶活性菌株的类群分布(表 1)及 ITS1-5.8S-ITS2 序列系统进化树(图 2-5)显示: 67 株产胞外纤溶酶样酶真菌菌株含 22 个种, 分布在 14 个属、13 个科、8 个目、5 个纲的 2 个门, 即

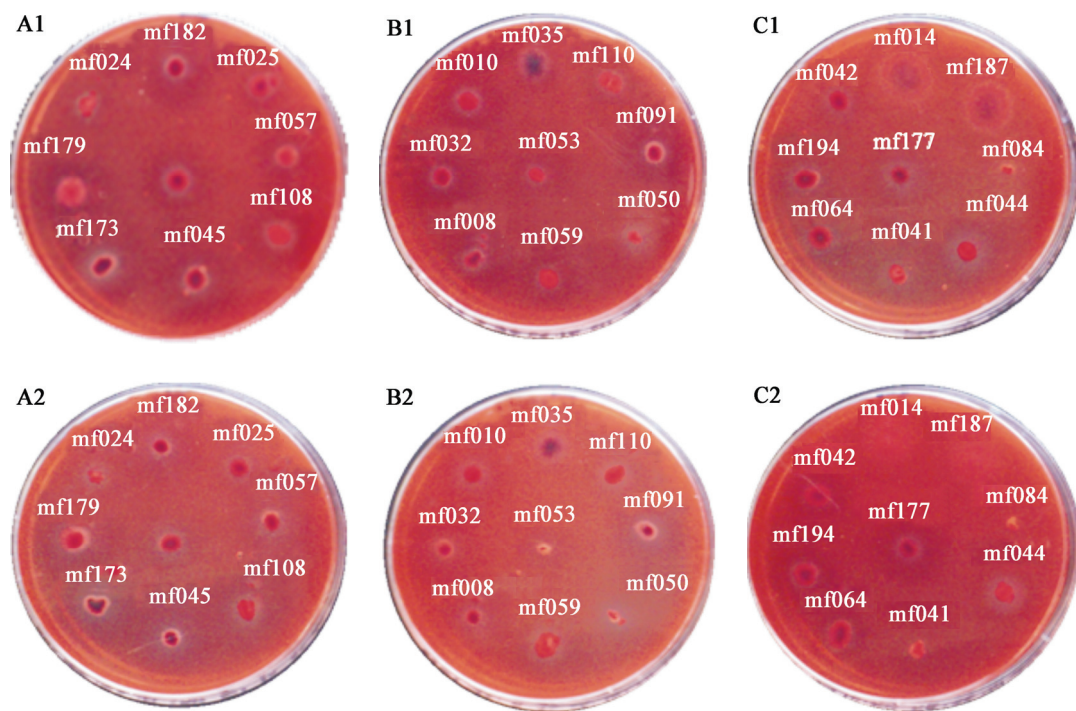


图 1 采用海水纤维蛋白 PDA 培养基筛选产胞外纤溶酶样酶及纤溶酶原激活物海洋真菌
Figure 1 Screening for the marine fungi producing plasmin-like enzymes and plasminogen activators with sea water FN-PDA culture plates

注: A1、B1 和 C1 是接种了不同菌株的未经加热处理的海水 FN-PDA 培养基; A2、B2 和 C2 是接种了不同菌株的经加热处理的海水 FN-PDA 培养基。

Note: A1, B1 and C1 were the unheated sea water FN-PDA plates inoculated with different strains; A2, B2 and C2 were the unheated sea water FN-PDA plates inoculated with different strains.

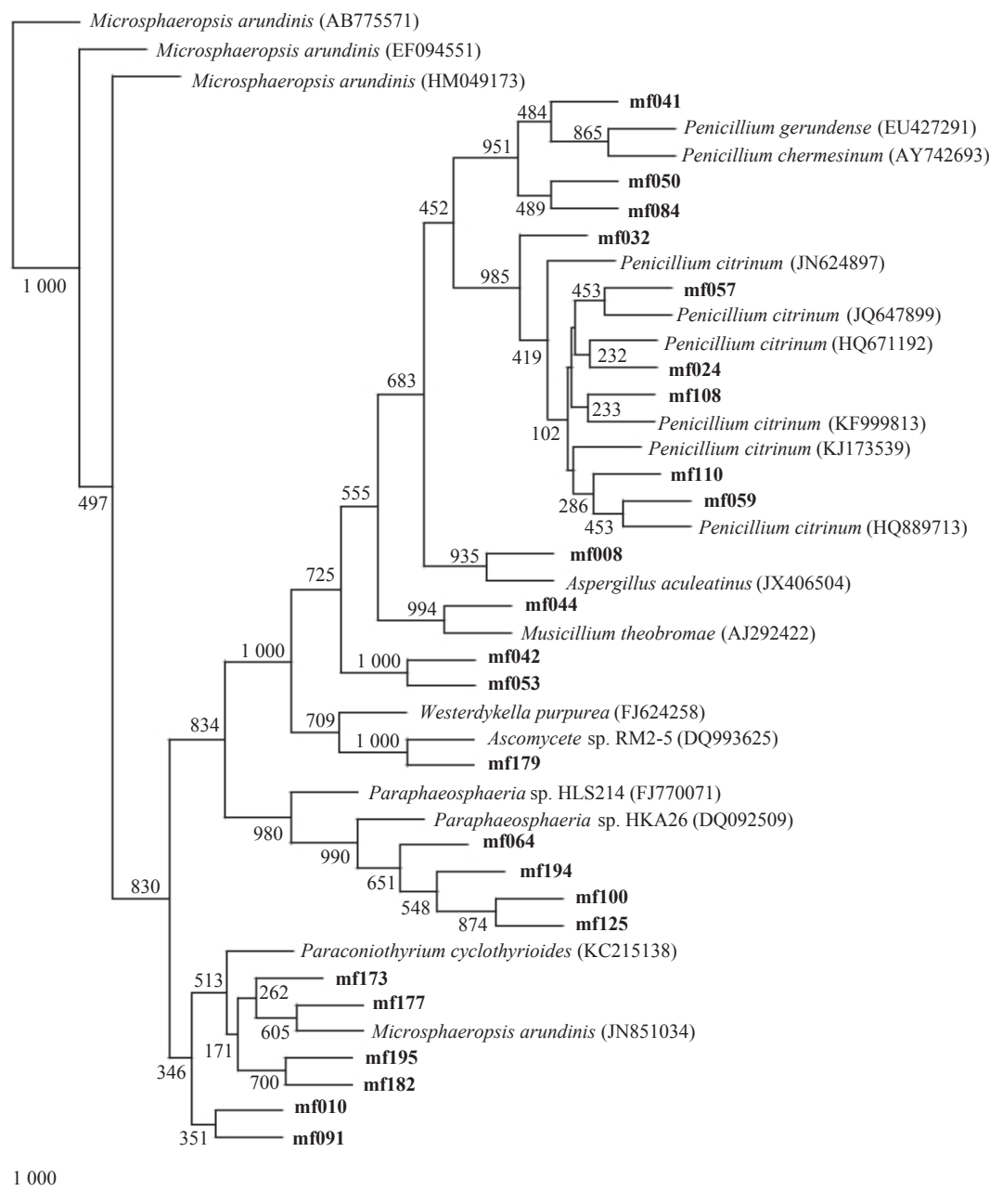


图2 产纤溶酶样酶菌株(硃洲岛)与 GenBank 数据库中相应真菌菌种的 ITS1-5.8S-ITS2 序列系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of ITS1-5.8S-ITS2 sequence of the isolated fungal strains (Naozhou island) with plasmin-like enzymes and appropriate fungal species in GenBank database

注: 分离的真真菌菌株号用粗线表示; 括号里的数字为 GenBank 登录号; 节点上的数字为 Bootstrap 值(1 000 次重复抽样的百分比); 比例尺代表每 1 000 个核苷酸中有 0.5 个核苷酸发生替代。

Note: The number of fungal strains isolated in this study are indicated in bold; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are given at nodes; The scale bar represents 0.5 substitutions per 1 000 nucleotide positions.

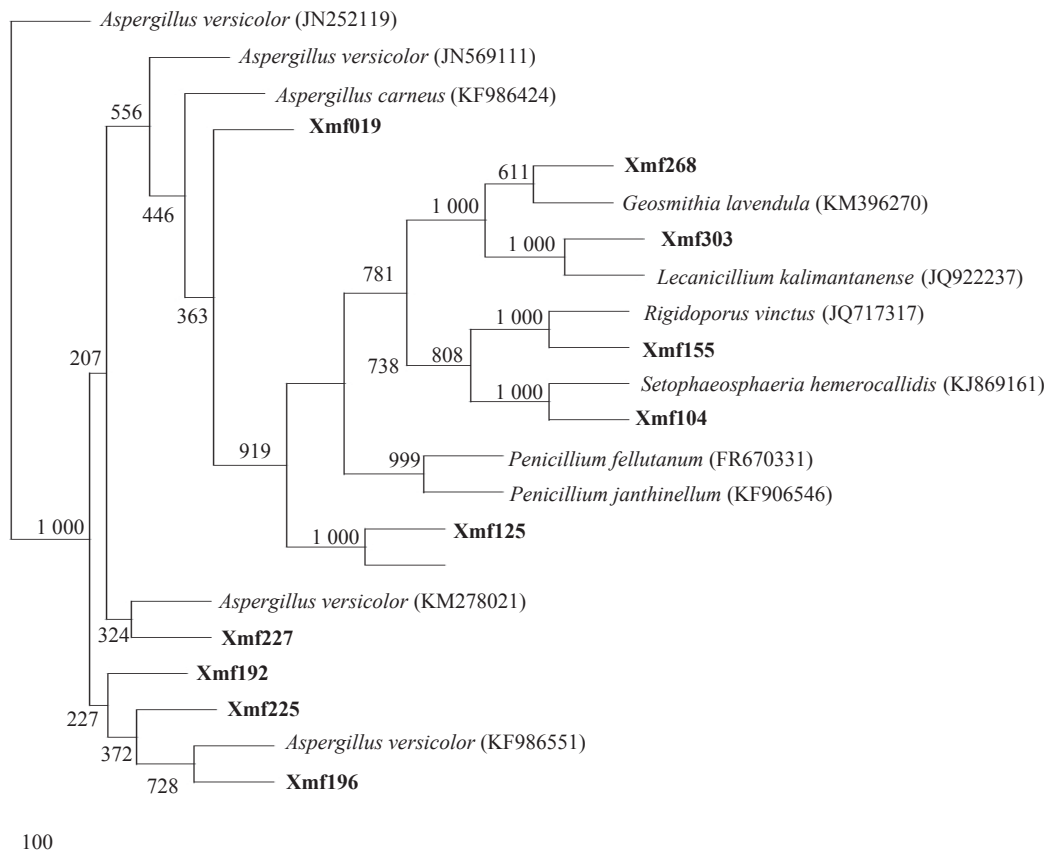


图3 产纤溶酶样酶菌株(徐闻珊瑚礁自然保护区)及 GenBank 数据库中相应真菌菌种的 ITS1-5.8S-ITS2 序列系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of ITS1-5.8S-ITS2 sequence of the isolated fungal strains (Xuwen coral reef nature reserve) with plasmin-like enzymes and appropriate fungal species in GenBank database

注: 分离的真菌株号用粗线表示; 括号里的数字为 GenBank 登录号; 节点上的数字为 Bootstrap 值(1 000 次重复抽样的百分比); 比例尺代表每 100 个核苷酸中有 0.5 个核苷酸发生替代。

Note: The number of fungal strains isolated in this study are indicated in bold; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are given at nodes; The scale bar represents 0.5 substitutions per 100 nucleotide positions.

子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota); 优势属为曲霉属(*Aspergillus*), 含海洋真菌 34 株, 占产胞外纤溶酶样酶活性真菌的 50.7%; 其次为青霉属(*Penicillium*), 含海洋真菌 11 株, 占产胞外纤溶酶样酶活性真菌的 16.4%。84 株产胞外纤溶酶原激活物的真菌菌株含 23 个种, 分布于 13 个属、11 个科、8 个目、4 个纲的 1 个门, 即子囊菌门(Ascomycota); 优势属也是曲霉属(*Aspergillus*), 含海洋真菌 56 株, 占产胞外纤溶酶原激活物活性真菌的 66.7%; 其次为青霉属(*Penicillium*), 含海洋真

菌 11 株, 占产胞外纤溶酶原激活物活性真菌的 13.1%。

3 讨论

硃洲岛和徐闻珊瑚礁自然保护区是湛江沿海目前环境保护较好的海岛和珊瑚礁自然保护区。本研究组先后分别从硃洲岛和徐闻珊瑚礁自然保护区潮间带的海水和沉积物中分离、鉴定了海洋真菌 178 株^[16]和 268 株, 合计共 446 株, 98 个种, 基本都是兼性海洋真菌。其中优势属为 *Aspergillus*, 共 189 株, 占分离培养菌株的 42.4%; 其次为

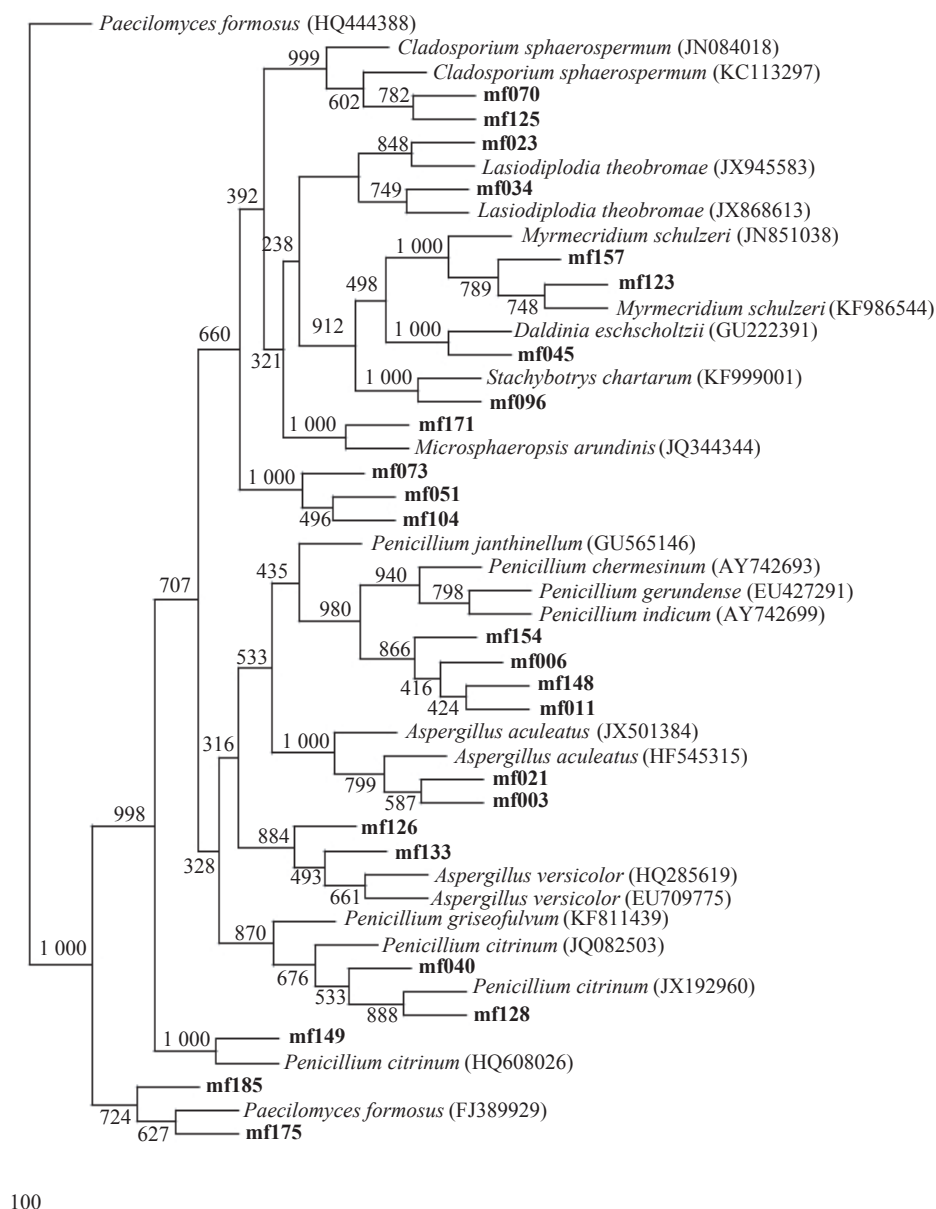


图4 产纤溶酶原激活物菌株(硃洲岛)与 GenBank 数据库中相应真菌菌种的 ITS1-5.8S-ITS2 序列系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of ITS1-5.8S-ITS2 sequence of the isolated fungal strains (Naozhou island) with plasminogen activators and appropriate fungal species in GenBank database

注：分离的真菌菌株号用粗线表示；括号里的数字为 GenBank 登录号；节点上的数字为 Bootstrap 值(1 000 次重复抽样的百分比)；比例尺代表每 100 个核苷酸中有 0.5 个核苷酸发生替代。

Note: The number of fungal strains isolated in this study are indicated in bold; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are given at nodes; The scale bar represents 0.5 substitutions per 100 nucleotide positions.

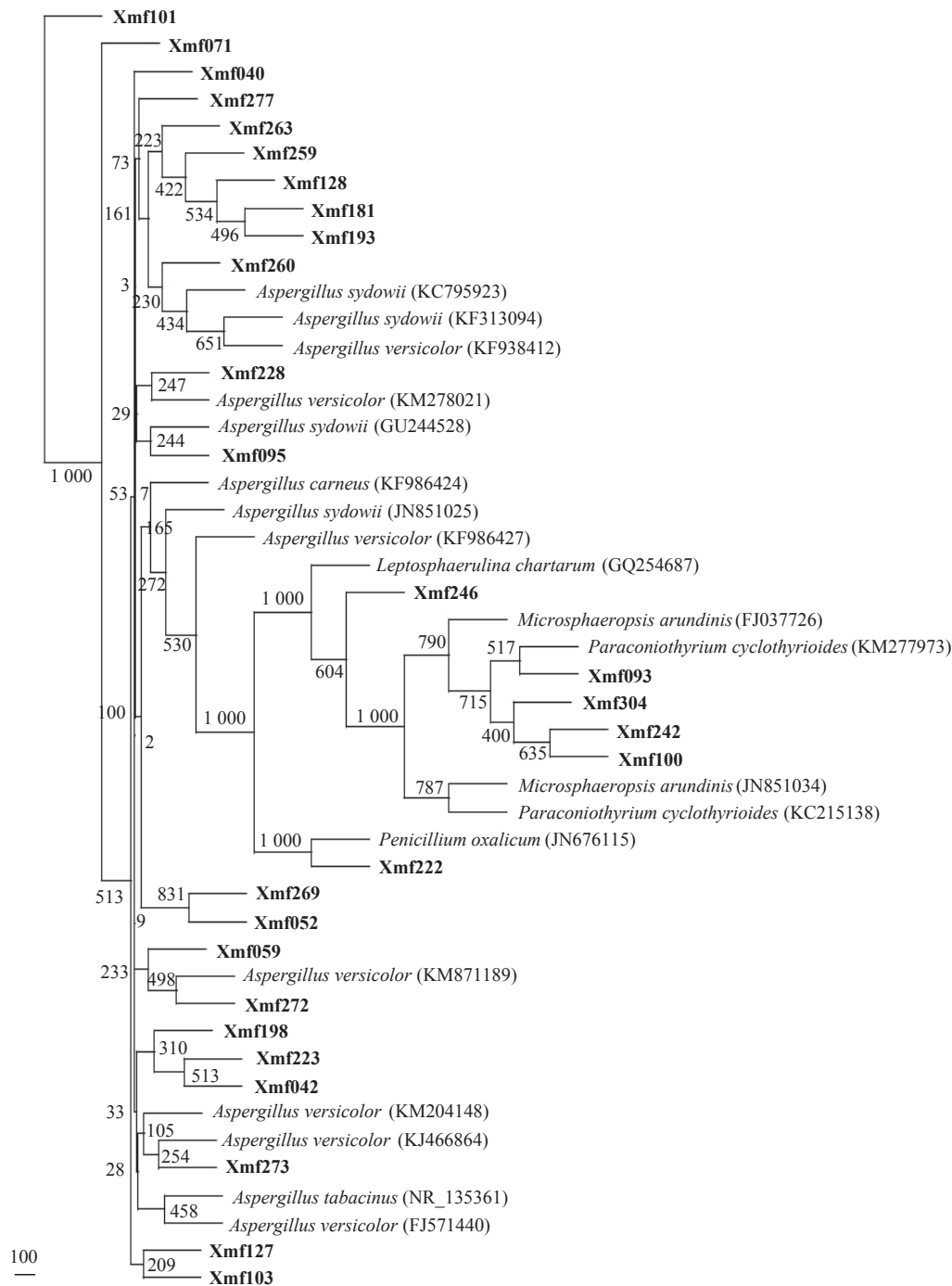


图 5 产纤溶酶原激活物菌株(徐闻珊瑚礁自然保护区)与 GenBank 数据库中相应真菌菌种的

ITS1-5.8S-ITS2 序列系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of ITS1-5.8S-ITS2 sequence of the isolated fungal strains (Xuwen coral reef nature reserve) with plasminogen activators and appropriate fungal species in GenBank database

注: 分离的真菌菌株号用粗线表示; 括号里的数字为 GenBank 登录号; 节点上的数字为 Bootstrap 值(1 000 次重复抽样的百分比); 比例尺代表每 100 个核苷酸中有 0.5 个核苷酸发生替代。

Note: The number of fungal strains isolated in this study are indicated in bold; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are given at nodes; The scale bar represents 0.5 substitutions per 100 nucleotide positions.

Penicillium, 共 93 株, 占分离培养菌株的 20.8% (表 1), 与研究组之前的报道^[16]一致。

除蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶和脂肪酶等重要的工业用酶^[20]外, 微生物也是产纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物的重要资源^[11]。已发现可产生和释放纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物的陆栖微生物包括细菌^[9]、放线菌^[21]和真菌^[8]。细菌来源的纤溶活性酶类有最早从溶血性链球菌(*Streptococcus hemolyticus*)发现、目前常用于血栓性疾病临床治疗的链激酶, 以及从金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)获得的葡激酶^[9]和从纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto*)获得的纳豆激酶^[22]; 已发现可产生具有显著纤溶活性蛋白酶的放线菌主要是链霉菌属(*Streptomyces*)的放线菌^[21]; 可产生具有显著纤溶活性蛋白酶的真菌有赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*) KSK-3、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*) H9、多孢木霉(*Tolypocladium inflatum*) k1、镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)和中华根霉(*Rhizopus chinesis*) 12 等^[8-9,23]。海洋微生物中, 已发现可产生纤溶活性酶类的有细菌和绿藻^[13-15], 但至今仍未见关于产纤溶活性酶类海洋真菌的研究报道。

本研究从硇洲岛和徐闻珊瑚礁自然保护区潮间带的海水和沉积物中分离到了 67 株产胞外纤溶酶样酶的海洋真菌, 含 22 个种, 分布于 *Aspergillus* (曲霉属)、*Penicillium* (青霉属)、*Cladosporium* (芽枝霉属)、*Cordyceps* (虫草属)、*Rigidoporus* (硬孔菌属)、*Devriesia*、*Geosmithia*、*Microsphaeropsis*、*Mucicillium*、*Paraphaeosphaeria*、*Paraconiothyrium*、*Setophaeosphaeria*、*Westerdykella* 等 14 个属, 优势属为曲霉属(*Aspergillus*), 其次为青霉属(*Penicillium*) (表 1, 图 2、3); 分离到了 84 株产胞外纤溶酶原激活物的海洋真菌, 含 23 个种, 分布于 *Acremonium* (枝顶孢属)、*Cladosporium* (芽枝霉属)、*Daldinia* (轮层炭菌属)、*Lasiodiplodia* (二孢属)、*Leptosphaerulina* (小光壳属)、*Paecilomyces* (拟青霉属)、*Stachybotrys* (葡萄穗霉属)、*Paraconiothyrium*、*Microsphaeropsis*

等 13 个属的海洋真菌, 优势属也是曲霉属(*Aspergillus*), 其次为青霉属(*Penicillium*) (表 1, 图 4、5)。本研究还分离到了 8 株镰孢菌属(*Fusarium*)的海洋真菌, 其中 4 株有蛋白酶活性, 但都没有纤溶酶样酶和纤溶酶原激活物的活性。

纤溶酶和大多数纤溶酶原激活物都是蛋白酶。本研究首先采用 SM-PDA 培养基培养的方法^[16], 筛选可产生胞外蛋白酶的海洋真菌, 然后用 Permin 于 1947 首次建立并用于纤溶酶原激活物检测, 后经 Astrup 等和 Lassen 改进后用于血浆纤溶酶和纤溶酶原激活物检测的纤维蛋白培养基培养法^[17-18]来筛选产胞外纤溶酶和纤溶酶原激活物的海洋真菌。该方法中用来形成底物的纤维蛋白原, 在其分离纯化的过程中至今仍无法将其中少量的纤溶酶原去除掉, 所以制备的 FN-PDA 培养基中均有少量的纤溶酶原, 因此不论是纤溶酶还是纤溶酶原激活物都能在 FN-PDA 培养基上形成纤维蛋白溶解圈; 纤溶酶可直接酶解培养基中纤维蛋白形成纤维蛋白溶解圈, 纤溶酶原激活物则可将培养基中纤溶酶原激活为纤溶酶进而间接使培养基中的纤维蛋白酶解, 形成纤维蛋白溶解圈。Lassen 发现^[18], 可采用 70 °C 加热 60 min 的方法使 FN-PDA 培养基中纤溶酶原变性失活而用于纤溶酶活性的特异性检测; 同时, 采用未经 70 °C 加热 60 min 处理和经 70 °C 加热 60 min 处理的两种 FN-PDA 培养基分别检测纤溶活性的样品则可区分纤溶酶和纤溶酶原激活物的活性, 前者可分别在两种不同的 FN-PDA 培养基上形成纤维蛋白溶解圈, 后者只能在未经 70 °C 加热 60 min 处理的 FN-PDA 培养基上形成纤维蛋白溶解圈。针对海洋真菌的生长特征, 本研究改用 50% 自然海水来配制 FN-PDA 等培养基, 以利于海洋真菌的生长。

参 考 文 献

- [1] WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014[R]. Geneva: World Health Organization, 2014
- [2] WHO. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control[R]. Geneva: World Health Organization, 2011

- [3] Urano T, Suzuki Y. Accelerated fibrinolysis and its propagation on vascular endothelial cells by secreted and retained tPA[J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 2012: 208108
- [4] Marder VJ, Novokhatny V. Direct fibrinolytic agents: biochemical attributes, preclinical foundation and clinical potential[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2009, 8(3): 433-444
- [5] Kunamneni A, Ravuri BD, Ellaiah P, et al. Urokinase - A strong plasminogen activator[J]. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 2008, 3: 58-70
- [6] Aisina RB, Mukhametova LI, Gulina DA, et al. Streptokinase and staphylokinase: differences in the kinetics and mechanism of their interaction with plasminogen, inhibitors, and fibrin[J]. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2015, 41(5): 506-517
- [7] Thelwell C. Biological standards for potency assignment to fibrinolytic agents used in thrombolytic therapy[J]. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2014, 40(2): 205-213
- [8] Sharkova TS, Kurakov AV, Osmolovskiy AA, et al. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes[J]. *Microbiology*, 2015, 84(3): 359-364
- [9] Raju EVN, Divakar G. An overview on microbial fibrinolytic proteases[J]. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2014, 5(3): 643-656
- [10] Mondol MA, Shin HJ, Islam MT. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity[J]. *Marine Drugs*, 2013, 11(8): 2846-2872
- [11] Mahajan PM, Nayak S, Lele SS. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: media optimization, purification and characterization[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(3): 307-314
- [12] Jones EBG. Are there more marine fungi to be described?[J]. *Botanica Marina*, 2011, 54(4): 343-354
- [13] Huang SH, Pan SH, Chen GG, et al. Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 62: 124-130
- [14] Vijayaraghavan P, Prakash Vincent SG. A low cost fermentation medium for potential fibrinolytic enzyme production by a newly isolated marine bacterium, *Shewanella* sp. IND20[J]. *Biotechnology Reports*, 2015, 7: 135-142
- [15] Matsubara K, Hori K, Matsuura Y, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 125(1): 137-143
- [16] Wang J, Cui LJ, Lan LB, et al. Diversity of culturable extracellular proteases producing marine fungi isolated from the intertidal zone of Naozhou island in South China Sea[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 238-253
- [17] Astrup T, Müllertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1952, 40(2): 346-351
- [18] Lassen M. Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1952, 27(4): 371-376
- [19] White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//PCR Protocol—a Guide to Methods and Applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322
- [20] Gurung N, Ray S, Bose S, et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond[J]. *Biomed Research International*, 2013, 2013: 329121
- [21] Sasirekha C, Ramya S, Balagurunathan AR. Fibrinolytic enzymes from actinomycetes[J]. *Journal of Pharmacy Research*, 2012, 5(12): 5457-5463
- [22] Jia Y, Cao XH, Deng Y, et al. Four residues of propeptide are essential for precursor folding of nattokinase[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2014, 46(11): 957-964
- [23] Shirasaka N, Naitou M, Okamura K, et al. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3[J]. *Mycoscience*, 2012, 53(5): 354-364