

一株产蛇孢假单壳素真菌 F02Z2172 的形态 和分子鉴定

李业英 石英 路新华* 崔晓兰 马瑛 赵颖 刘静 张华

(华北制药集团新药研究开发有限责任公司 微生物药物国家工程研究中心 河北省工业微生物代谢工程技术研究中心 河北 石家庄 050015)

摘要: 从厦门武夷山自然保护区土壤样品中分离得到一株可产生蛇孢假单壳素(Ophiobolins)的丝状真菌, 编号为 F02Z2172。通过对其宏观特征、显微特征进行观察并对其 ITS、Calmodulin 和 β -tubulin 序列进行分子系统学分析, 鉴定为伪弯头曲霉, 并对伪弯头曲霉与焦色组内其他菌种的关系进行了讨论。由伪弯头曲霉产生蛇孢假单壳素还是首次报道。

关键词: 蛇孢假单壳素, 伪弯头曲霉, 转录间隔区, 钙调素基因, β -微管蛋白基因, 焦色组

Morphological and Molecular Identification of Ophiobolins Producing Strain F02Z2172

LI Ye-Ying SHI Ying LU Xin-Hua* CUI Xiao-Lan MA Ying ZHAO Ying
LIU Jing ZHANG Hua

(NCPC New Drug Research and Development Co., Ltd., National Engineering Research Center of Microbial, Medicine Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology Research Center, Shijiazhuang, Hebei 050015, China)

Abstract: A filamentous fungus F02Z2172 which is able to produce ophiobolins was isolated from Wuyishan Nature Reserve in Fujian province. The strain was identified as *Aspergillus pseudodeflectus* by cultural and morphological characteristics and phylogenetic analysis based on ITS rDNA, Calmodulin and β -tubulin sequences. The relation between *A. pseudodeflectus* and other species of *Aspergillus* Section *Usti* was also discussed. This was the first report of ophiobolins produced by *A. pseudodeflectus*.

Keywords: Ophiobolins, *A. pseudodeflectus*, ITS, Calmodulin, β -tubulin, *Aspergillus* Section *Usti*

药用微生物主要属于细菌、放线菌、真菌等类群。细菌和放线菌作为传统的药物微生物已经得到广泛研究, 而真菌近年来成为各类生理活性物质的主要来源之一^[1]。

Xa 因子(Factor X activated, Factor Xa)是一种丝

氨酸蛋白酶, 位于血液凝集级联的上游, 处在连接内源性和外源性激活途径共同通路的中心位置。Xa 因子抑制剂既能阻断内源性凝血亦能抑制外源性凝血的发生, 成为近年来抗凝血药物研究的热点之一。本实验室从大量土壤真菌代谢产物中筛选到

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30873107); 国家 973 计划项目子课题(No. 2009CB526513)

* 通讯作者: Tel: 86-311-85992995; ✉ luxinhua@ncpcrd.com.cn
收稿日期: 2010-02-02; 接受日期: 2010-05-26

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Xa 因子抑制剂, 经结构鉴定为蛇孢假单壳素 (Ophiobolins)^[2]。

蛇孢假单壳素是一族具有三环或四环结构的二倍半萜类化合物, 具有杀线虫、抗真菌、抗细菌和细胞毒等多种生物活性^[3]。最近研究表明蛇孢假单壳素体外不仅对肿瘤细胞增殖有活性而且可能对肿瘤浸润和转移有抑制作用^[4]。本实验室从厦门武夷山自然保护区土壤样品中分离到一株产蛇孢假单壳素的丝状真菌 F02Z2172, 并从形态学及分子系统学角度对其进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: F02Z2172 分离自武夷山自然保护区土壤样品。*Escherichia coli* DH5 α 由本实验室保存。

1.1.2 培养基: 鉴定培养基^[5-6]。

1.1.3 主要分子生物学试剂: 酵母基因组 DNA 提取试剂盒 DP307-2 (离心柱型) 购自天根生化科技(服务)有限公司。pGEM-T easy vector, T4 DNA ligase 购于 Promega 公司; *Taq* DNA 聚合酶, DNA Marker DL 2000 及胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.1.4 主要仪器设备: 光学显微镜 (OLYMPUS CX31)、恒温式电热水浴锅 (Pharmacia Biotech)、电泳仪 (Bio-Rad PAC300)、高速离心机 (Eppendorf centrifuge 5415D)、梯度 PCR 仪 (Eppendorf)、扫描电子显微镜 (JSM-5600LV)。

1.2 方法

1.2.1 菌株形态特征观察: 依据齐祖同^[5]和 Klith^[6]的研究方法对 F02Z2172 进行培养, 并进行菌落大小、质地、渗透液等特征观察; 用光学显微镜和电子显微镜对其分生孢子梗、顶囊、分生孢子等显微特征进行观察。

1.2.2 ITS、Calmodulin、 β -tubulin 序列的扩增及测定: ① 基因组 DNA 的提取: 液氮研磨法破壁后取 100 mg 研磨物转至 1.5 mL 离心管中, 用酵母基因组提取试剂盒进行菌株基因组 DNA 提取。② PCR 扩增: ITS 序列使用 ITS1 和 ITS4 引物进行扩增^[7]; Calmodulin 序列使用 cmd5 和 cmd6 引物进行扩增^[8]; β -tubulin 序列使用 Bt2a 和 Bt2b 引物进行扩增^[9]。PCR 采用 50 μ L 反应体系: 模板 DNA 3 μ L, 引物 (10 mmol/L) 各 1 μ L, dNTPs (每种成分均为 2.5 mmol/L) 4 μ L, *Taq* 酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 \times PCR

Buffer 5 μ L, 加 ddH₂O 至 50 μ L; 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。③ PCR 扩增产物的回收及序列测定: 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 使用 PCR 胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段。用 T4 DNA 连接酶将目的 DNA 片段与 pGEM-T easy 载体连接后转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 用含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板 (预先涂 X-gal 和 IPTG) 进行筛选。挑取白色菌落, 过夜培养后用碱裂解法^[10]提取质粒并进行酶切鉴定, 将阳性克隆送上海生工进行序列测定。

1.2.3 分子系统发育分析: 将测得的 ITS、Calmodulin 和 β -tubulin 序列在 NCBI 数据库中使用 BLASTn 程序进行比对并申请 GenBank 登录号。下载曲霉属焦色组模式菌株的 ITS、Calmodulin 和 β -tubulin 序列, 以 *Aspergillus egyptiacus* NRRL 5920 作为外群, 使用 MEGA 4.1 软件 ClustalW 方法进行聚类分析, 以 Neighbour-joining 法构建分子系统发育树, 在分枝上标记 1000 次重复获得的自展检验 Bootstrap 值, 以评估系统发育树的置信度, 从而确定各菌株的亲缘关系及分类地位。

2 结果

2.1 菌株的形态学特征

菌株的宏观特征见图 1(A-E): 菌落在查氏琼脂 (CA) 上 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后直径为 34 mm–36 mm; 质地呈毡状, 致密、厚; 表面具有较深的放射状沟纹; 菌落整体颜色呈灰褐色, 边缘呈白色; 表面有大量棕黄色渗出液, 呈环状分布; 菌落背面呈黄色。菌落在查氏酵母膏琼脂 (CYA) 上 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后直径为 32 mm–36 mm; 质地毡状, 致密、较厚; 表面具有浅的放射状沟纹; 中央部位颜色较深, 呈灰褐色至脏褐色, 由中央到边缘颜色逐渐变浅, 边缘呈白色; 中央部位均匀分布有大量小滴状淡棕黄色渗出液; 菌落背面呈黄色。菌落在 20% 蔗糖查氏酵母膏琼脂 (CY20S) 上 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后直径为 28 mm–30 mm; 质地致密, 绒状至毡状; 有稀疏、浅的放射状沟纹; 菌落整体呈淡灰色, 泛绿, 边缘为白色; 无渗出液; 菌落背面呈亮黄色。菌落在麦芽提取物琼脂 (MEA) 上 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后直径为 43 mm–45 mm; 质地呈绒状至棉絮状, 分布不均匀; 菌落整体呈浅灰白色。菌落在查氏酵母膏琼脂 (CYA) 上 37 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后直径为

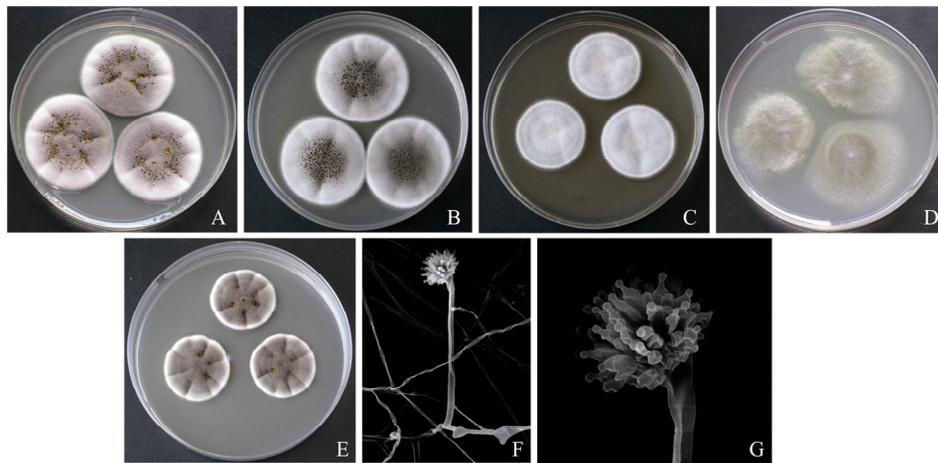


图 1 F02Z2172 的宏观及显微特征

Fig. 1 Macro and micro characteristics of F02Z2172

注: A-D: 25°C 培养 7 d 的菌落, A: CA; B: CYA; C: CY20S; D: MEA; E: CYA 37°C 培养 7 d 的菌落; F-G: 分生孢子梗, F: SEM 1000 ×; G: SEM 2500 ×.

Note: A-D: Colonies at 25°C after 7 d, A: CA; B: CYA; C: CY20S; D: MEA; E: Colonies on CYA at 37°C after 7 d; F-G: Conidiophores, F: SEM 1000 ×; G: SEM 2500 ×.

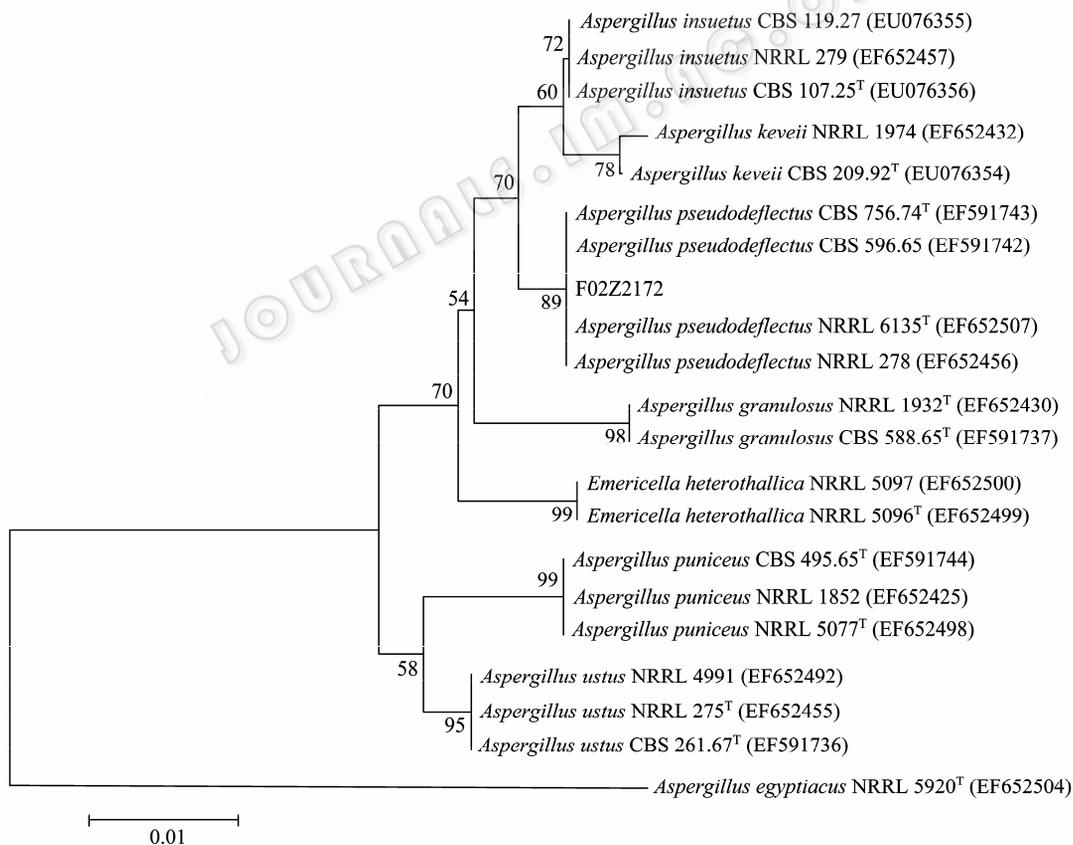


图 2 F02Z2172 与曲霉属焦色组菌株构建的 ITS 序列系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree inferred from neighbour-joining analysis of ITS rDNA sequences of F02Z2172 and *Aspergillus* Section *Usti*

注: 上标 T 表示模式株; 数字代表自展值; 图例为遗传距离。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Type isolates designated by a superscript T. Bar, 0.01% nucleotide substitutions per site.

24 mm–26 mm; 质地毡状, 致密、较薄; 表面有深的放射状沟纹; 菌落整体呈均匀的棕褐色, 边缘白色; 表面有少量大滴棕黄色渗出液; 菌落背面浅黄色。

菌株的显微特征见图 1(F-G): 分生孢子梗细长, 孢子梗直径约 6 μm , 分生孢子梗表面具有疣状突起; 有足细胞; 顶囊近球形, 直径约 18 μm ; 顶囊倾斜着生于分生孢子梗茎上, 类似烟斗状; 分生孢子头具有双层产孢结构, 呈半球形, 分生孢子表面有疣状突起, 分生孢子直径约 3 μm 。

根据产孢结构为双层, 分生孢子头不呈真正绿色, 而呈脏褐色至灰褐色的特征, 将其鉴定为曲霉属、巢状亚属、焦色组(*Aspergillus* section *Usti*)^[5-6]。

2.2 ITS、Calmodulin 和 β -tubulin 的序列登录号及系统发育分析

ITS 序列测得 538 个碱基, GenBank 登录号为 GU437198; Calmodulin 测得 575 个碱基, GenBank 登录号为 HM060541; β -tubulin 测得 478 个碱基, GenBank 登录号为 HM060542。

参照 Houbraken^[11]和 Peterson^[12]对曲霉属焦色组系统发育的研究方法, 构建 F02Z2172 与曲霉属焦色组模式菌株的 ITS、Calmodulin 和 β -tubulin 序列的系统发育树。

由 ITS、Calmodulin 和 β -tubulin 序列的系统发育树可以看出, F02Z2172 与模式株 *Aspergillus pseudodeflectus* NRRL 6135 的系统发育关系最近。因此根据系统发育分析并结合形态学特征, 将 F02Z2172 鉴定为曲霉属焦色组的伪弯头曲霉(*A. pseudodeflectus*)。

3 讨论

齐祖同^[5]记录并描述的关于曲霉属焦色组的种有 *Aspergillus deflectus*, *A. ustus* 和 *A. puniceus*。F02Z2172 在 37°C 生长良好的特点与 *A. ustus* 和 *A. puniceus* 在 37°C 不能生长的描述不符; 虽然 *A. deflectus* 在 37°C 生长良好且顶囊也是倾斜(近乎直

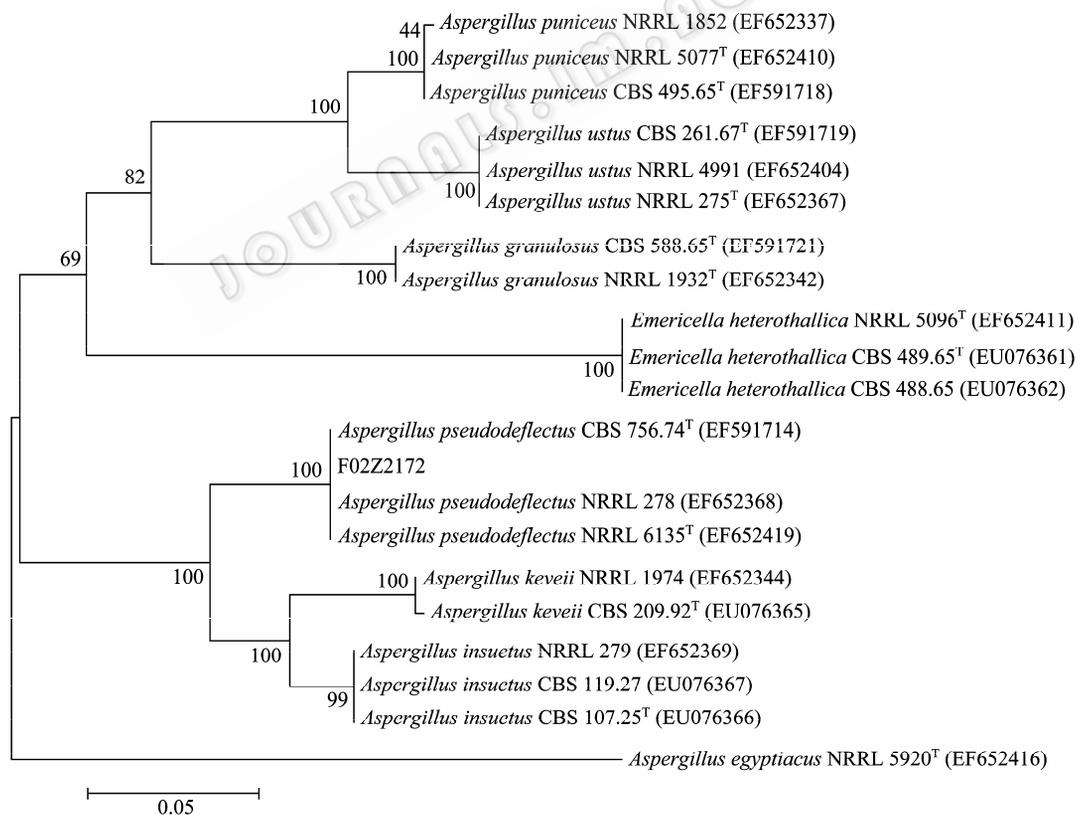


图 3 F02Z2172 与曲霉属焦色组菌株构建的 calmodulin 序列系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree inferred from neighbour-joining analysis of partial calmodulin gene sequences of F02Z2172 and *Aspergillus* Section *Usti*

注: 上标 T 表示模式株; 数字代表自展值; 图例为遗传距离。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Type isolates designated by a superscript T. Bar, 0.05% nucleotide substitutions per site.

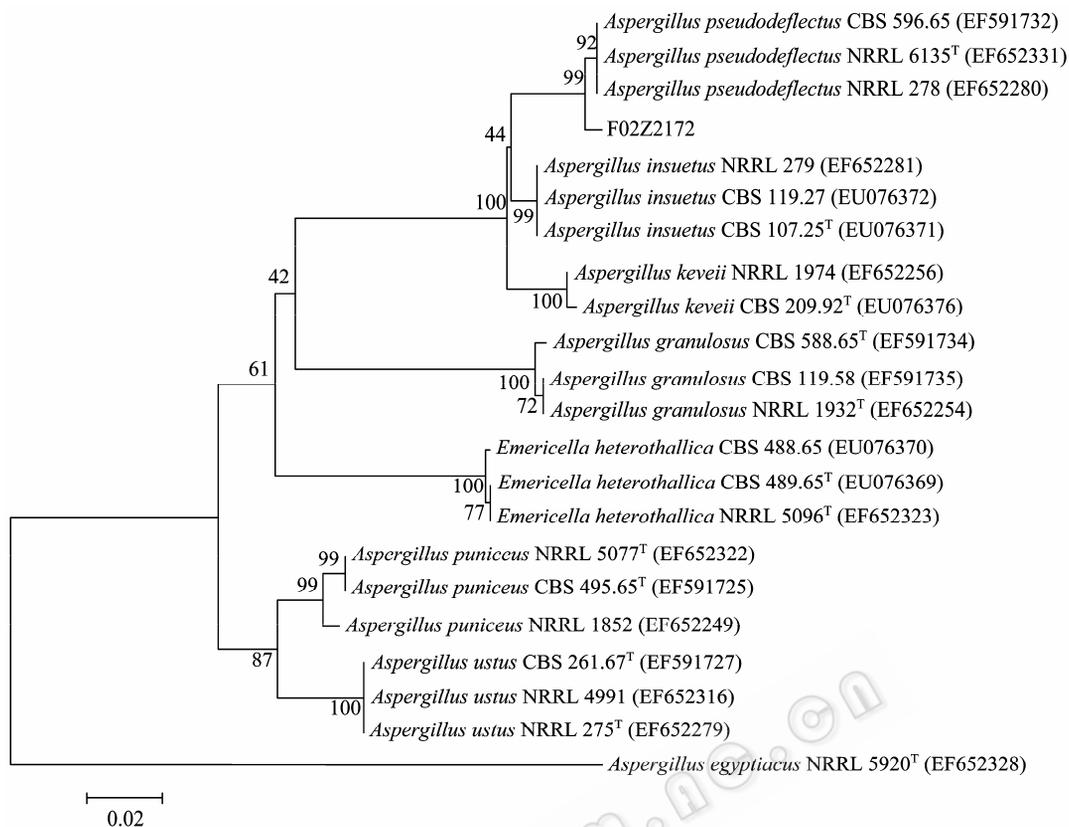


图 4 F02Z2172 与曲霉属焦色组菌株构建的 β -tubulin 基因序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree inferred from neighbour-joining analysis of partial β -tubulin gene sequences of F02Z2172 and *Aspergillus* Section *Usti*

注: 上标 T 表示模式株; 数字代表自展值; 图例为遗传距离。

Note: Numbers above branches are bootstrap values. Type isolates designated by a superscript T. Bar, 0.02% nucleotide substitutions per site.

角)着生于分生孢子梗上, 但 F02Z2172 在查氏琼脂 (CA)和查氏酵母膏琼脂(CYA)上的菌落特征与之相差很大。因此需要从其他角度对 F02Z2172 进行鉴定。以 DNA 分析为基础, 研究真菌系统发育的分子生物学方法的出现, 成为传统分类学的有效补充^[9]。其中 ITS、Calmodulin、 β -tubulin 序列分析已经广泛应用于曲霉属的分类研究中^[8-9,11-12]。通过对 F02Z2172 这 3 种序列的系统发育分析, 最终将其鉴定为曲霉属焦色组的伪弯头曲霉(*A. pseudodeflectus*)。

关于曲霉属焦色组的构成目前观点不是很一致^[11-12]。Houbraken 通过对曲霉属焦色组的多项分类研究认为其主要包括 8 个种: *Aspergillus ustus*、*A. puniceus*、*A. granulosis*、*A. pseudodeflectus*、*A. calidouustus*、*A. insuetus*、*A. keveii* 和 *Emericella heterothallica*。根据代谢物谱焦色组又可以分为 3 个化学分类组, 其中 *A. pseudodeflectus*、*A. cali-*

doustus、*A. insuetus*、*A. keveii* 同属于一个化学分类组。在焦色组的 3 个化学分类组中只有该组的菌株能够产生蛇孢假单壳素, 但由 *A. pseudodeflectus* 产生蛇孢假单壳素尚未见报道^[11]。本文的研究结果显示 *A. pseudodeflectus* 同样可以产生蛇孢假单壳素, 在一定程度上支持了根据代谢物谱分类的结论。

参 考 文 献

- [1] 刘梅, 董悦生, 李业英, 等. 化合物 wortmannilactone 产生菌 F01-195 的鉴定及发酵条件研究. 中国抗生素杂志, 2006, 31(5): 271-305.
- [2] 路新华, 郑智慧, 马瑛, 等. 微生物来源的 Xa 因子抑制剂 F02Z2172 的研究. 中国抗生素杂志, 2007, 32(5): 277-279.
- [3] Au TK, Chick WS, Leung PC. The biology of ophiobolins. *Life Sci*, 2000, 67(7): 733-742.
- [4] 朱京童, 范玉玲, 路新华, 等. 微生物来源的蛇孢菌素

- 抗肿瘤活性的体外实验研究. 癌变畸变突变, 2007, **19**(5): 388–391.
- [5] 齐祖同. 曲霉属及其相关有性型-中国真菌志. 第 5 卷. 北京: 科学出版社, 1997: 55–60.
- [6] Klith MA, Pitt JI. A Laboratory Guide to the Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorphs. North Ryde, N. S. W.: CSIRO, Division of Food Processing, 1988: 10–14.
- [7] White TJ, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, *et al.*, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press, 1990: 315–322.
- [8] Hong SB, Go SJ, Shin HD, *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 2005, **97**(6): 1316–1329.
- [9] Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(4): 1323–1330.
- [10] Sambrook J, David WR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1–1950.
- [11] Houbraken J, Due M, Varga J, *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. *Studies in Mycology*, 2007(59): 107–128.
- [12] Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four *loci*. *Mycologia*, 2008, **100**(2): 205–226.

2010 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-2)

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网 址	E-mail
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn	tongbao@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwxxyj.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	240	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
营养学报	6-22	双月刊	108	http://yyxx.chinajournal.net.cn	yyxx@chinajournal.net.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	www.zwyczy.cn	Zwyczyxb2003@sina.com Zwyczyxb2003@163.com
中国农业科学 (中文版)	2-138	半月刊	1188	www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国农业科学 (英文版)	2-851	月刊	432	www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishscichina.com	zgsekx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	90	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	www.chinacrops.org/zwxp	xbzw@chinajournal.net.cn