

基于 NRPS 基因筛选与鉴定葡萄附生真菌

吕曼, 杨柯, 王傲, 史雅凝, 辛志宏*

(南京农业大学食品科技学院, 江苏南京 210095)

摘要:以非核糖体多肽合成酶(nonribosomal peptide synthetase, NRPS)基因为筛选靶点,从葡萄中筛选出含有 NRPS 基因的附生真菌,以期发现具有抗菌作用的环肽类化合物。采用平板划线技术、斜面分离纯化技术分离葡萄附生真菌,从中筛选出一株含有 NRPS 基因的附生真菌(编号 PTLM-1)。在此基础上,构建系统发育进化树,结合形态学方法,将该菌株鉴定为腐皮镰刀菌 *Fusarium solani*。经过 NRPS 系统发育进化树分析,发现该菌株有产生抗菌环肽类化合物——环孢菌素的潜力。通过对该菌的发酵产物进行电喷雾质谱分析,进一步证实了该预测结果。该研究为定向筛选产生环肽类化合物的菌株提供了新的研究方法 with 理论依据。

关键词:葡萄,附生真菌,18S rDNA,ITS rDNA,分离鉴定,非核糖体多肽合成酶

Screening and identification of an epiphytic fungi from grapes based on NRPS gene

LV Man, YANG Ke, WANG Ao, SHI Ya-ning, XIN Zhi-hong*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Targeting a nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene, an epiphytic fungi containing NRPS gene was screened from grapes so as to discover cyclic peptide compounds with antimicrobial activities. An epiphytic fungi with NRPS gene, which named as PTLM-1, was isolated from grapes by streak plate and slant culture methods. The strain was identified as *Fusarium solani* by phylogenetic tree analysis and morphological observation. It was found that the strain had the potential to produce a cyclic peptide cyclosporine based on NRPS phylogenetic analysis, which was further confirmed by the electrospray ionization mass spectrum (ESI-MS) analysis. This study provides a new research method and theoretical basis for target-screening strains producing cyclic peptides.

Key words: grapes; an epiphytic fungi; 18S rDNA; ITS rDNA; screening and identification; NRPS

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)18-0229-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.18.035

食药两用植物能够产生许多具有重要生理活性的物质,在医药、食品和农业生产等领域具有重要的应用价值。然而,有些植物生长周期长且种类稀少,难以提供足够的生产原料,而且大量采伐会破坏生态环境。幸运的是,近几十年的微生物与生态学研究表明,几乎每一种植物都共附生有一种或多种微生物,这些微生物不仅能产生结构新颖的活性化合物,而且有些微生物还能产生与其宿主相同或相似的物质,尤其是食药两用植物^[1],如葡萄,作为一种广泛种植、以食用为主、食药两用的作物,蕴藏着丰富的共附生微生物资源,可通过发酵技术大批量培养,经过分离纯化获得目标产物,这种策略既可保护生态环境,又能为可持续开发天然生物活性物质提供一条新途径,但目前对其附生真菌的研究主要集中在

在种类鉴定与葡萄病害防治上。所以,开展葡萄共附生真菌的筛选及其次级代谢产物的研究具有重要意义。

在筛选有价值的共附生微生物过程中,有效的筛选方法是决定能否发现新型活性化合物的关键^[2]。通常采用的筛选方法是基于活性筛选和化学筛选或者二者的组合^[3],这些方法在微生物次级代谢产物研究的过程中,筛选到许多盛产活性物质的菌株,但是随着研究的深入,这些筛选方法的固有缺陷逐渐显现出,一些已知菌株和已知化合物被不断重复发现,大大降低了发现新化合物的概率,造成了巨大的时间和资源浪费,已经成为植物真菌研究过程中最主要的制约因素^[4-5]。

随着现代测序技术的发展,基因组测序、功能基

收稿日期: 2016-02-22

作者简介: 吕曼(1991-),女,硕士研究生,研究方向:食品营养与化学, E-mail: 2014108057@njau.edu.cn。

* 通讯作者: 辛志宏(1974-),男,博士,教授,研究方向:食品营养与化学, E-mail: xzhfood@njau.edu.cn。

基金项目:农业部农产品质量安全风险评估项目(GJFP201601106)。

因定位及其功能研究等相关技术逐渐成熟,一些微生物合成天然产物的生物合成途径得到解密,为通过功能基因筛选来预测化合物的结构类型提供了理论基础^[6]。基于非核糖体多肽合成酶(NRPS)功能基因定向筛选,目标直接指向合成多肽类化合物的目标基因,成为一种发现新型天然次级代谢产物的重要策略。许多新发现的抗菌、抗肿瘤和抗癌化合物都是由NRPS途径合成的^[7-8]。目前,通过依据NRPS基因筛选目标菌株,大多数集中在细菌方面,而有关真菌NRPS基因的筛选罕见报道^[9-10]。

由于微生物分离鉴定工作相对复杂且周期长,因此本文结合生产实际选择含水量较高、易腐败且种植范围广的巨峰葡萄为筛选对象,以NRPS功能基因为靶点,采用平板划线分离、斜面分离纯化技术筛选葡萄附生真菌,在此基础上,提取真菌DNA,PCR扩增18S rDNA、ITS rDNA、LSU rDNA和EF-1 α 目标序列,在NCBI数据库中进行BLAST搜索,下载与目的菌株有较高同源性的序列,构建系统发育进化树,并结合传统的形态学方法,确定目的菌株的种属地位,以期定向筛选到具有NRPS功能基因的附生真菌。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

巨峰葡萄 购自江苏省南京市苏果超市;Omega真菌基因组试剂盒(Fungal DNA Kit 50)及引物 上海捷瑞生物工程有限公司;DR001AM PCR试剂、Ver.3.0 D823A琼脂糖凝胶DNA提取试剂盒 日本TaKaRa公司;pMD19-T载体、solution I、2 $\times$ Taq Master Mix、大肠杆菌DH5 α 感受态细胞 南京诺唯赞生物科技有限公司;其他分析纯试剂 南京寿德实验器材有限公司;PDA固体培养基 土豆200 g/L、葡萄糖20 g/L、琼脂20 g/L、食盐30 g/L、自来水配制;LB液体培养基 胰蛋白胨10 g/L、酵母粉5 g/L、NaCl 10 g/L,pH7.2;LB固体培养基 胰蛋白胨10 g/L、酵母粉5 g/L、NaCl 10 g/L、琼脂5 g/L,pH7.2;真菌发酵液体培养基 土豆200 g/L、麦芽糖20 g/L、甘露醇20 g/L、葡萄糖10 g/L、味精5 g/L、蛋白胨5 g/L、酵母膏3 g/L,pH6.0。

DYCP-31DN电泳仪 北京市六一仪器厂;JS-380C全自动数码凝胶成像分析仪 上海市培清科技有限公司;TP600型梯度PCR仪 日本TaKaRa公司;Microfuge 22R台式微量冷冻离心机 美国Beckman公司;Mariner API-TOF型质谱仪 美国应用生物系统公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的分离培养 将巨峰葡萄于无菌操作台中破碎,梯度稀释后接种于PDA平板培养基上,于28 $^{\circ}\text{C}$ 培养2~3 d。待培养基中长出菌丝后,挑取新鲜菌丝到另一PDA平板培养基上进行划线分离,得到单菌落,并在PDA斜面试管中划线接种,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 菌株的形态学观察

1.2.2.1 菌落形态特征 从斜面培养基中挑取新鲜菌丝接种至另一PDA平板培养基上,于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培

养4~5 d,观察菌落的大小、颜色、质地等形态特征并记录。

1.2.2.2 显微形态特征 挑取菌落边缘菌丝,制作水浸片,然后在倒置显微镜下观察其菌丝体、分生孢子、孢子梗等。

1.2.3 基因组DNA的提取 从斜面中挑取新鲜菌丝接种到PDA平板培养基上,于28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养3~4 d。真菌基因组DNA的提取采用Omega真菌基因组试剂盒(Fungal DNA Kit 50)进行。将1%琼脂糖煮沸至澄清透明,加几滴EB并搅拌均匀进行染色,待30 min冷却成型后即可,将所提取的真菌基因组DNA在1%琼脂糖凝胶中电泳检测(120 V, 30 min)。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用,或于-20 $^{\circ}\text{C}$ 中长期保存。

1.2.4 NRPS功能基因片段的扩增与基因克隆 分别选用AUG003/AUG007、AUG003/AUG006、AUG005/AUG007 3对简并引物对其NRPS基因序列进行扩增,PCR反应条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸3 min,共35个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min^[11]。PCR扩增反应采用25 μL 的反应体系,包括ddH₂O 9.5 μL 、2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μL 、Primer-F(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、Primer-R(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、DNA 1 μL 。将1%琼脂糖煮沸至澄清透明,加几滴EB并搅拌均匀进行染色,待30 min冷却成型后将上述PCR扩增产物,在1%琼脂糖凝胶中电泳检测(120 V, 30 min),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.5 18S rDNA基因片段的PCR扩增 选用真核生物18S rDNA的通用扩增引物:NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGCTCTC-3')/NS8(5'-TCCGCAGGTTCACTACGGA-3')对18S rDNA片段进行扩增,PCR反应条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min 45 s,共35个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min^[12]。PCR扩增反应采用25 μL 的反应体系,包括ddH₂O 9.5 μL 、2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μL 、Primer-F(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、Primer-R(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、DNA 1 μL 。将1%琼脂糖煮沸至澄清透明,加几滴EB并搅拌均匀进行染色,待30 min冷却成型后将上述PCR扩增产物在1%琼脂糖凝胶中电泳检测(120 V, 30 min),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.6 ITS rDNA基因片段的PCR扩增 选用真核生物ITS rDNA的通用扩增引物:ITS1(5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对ITS rDNA片段进行扩增,PCR反应条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min 30 s,共35个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min^[13]。PCR扩增反应采用25 μL 的反应体系,包括ddH₂O 9.5 μL 、2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μL 、Primer-F(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、Primer-R(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 、DNA 1 μL 。将1%琼脂糖煮沸至澄清透明,加几滴EB并搅拌均匀进行染色,待30 min冷却成型后将上述PCR扩增产物在1%琼脂糖凝胶中电泳检测(120 V, 30 min),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.7 LSU rDNA基因片段的PCR扩增 选用真核生物LSU rDNA的通用扩增引物:NL1(5'-

GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')/LR3 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGAC-3')对 LSU rDNA 片段进行扩增,PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 1 min,53 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 7 min^[14]。PCR 扩增反应采用 25 μL 的反应体系,包括 ddH₂O 9.5 μL、2 × Taq Master Mix 12.5 μL、Primer-F (10 μmol/L) 1 μL、Primer-R (10 μmol/L) 1 μL、DNA 1 μL。将 1% 琼脂糖煮沸至澄清透明,加几滴 EB 并搅拌均匀进行染色,待 30 min 冷却成型后将上述 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测(120 V,30 min),4 ℃ 保存。

1.2.8 EF-1α 片段的 PCR 扩增 选用真核生物 EF-1α 的扩增引物:EF2T(5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3')/EF3(5'-GTAAGGAGGASAAGACTCACC-3')对 EF-1α rDNA 片段进行扩增,PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,53 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min^[15]。PCR 扩增反应采用 25 μL 的反应体系,包括 ddH₂O 9.5 μL、2 × Taq Master Mix 12.5 μL、Primer-F (10 μmol/L) 1 μL、Primer-R (10 μmol/L) 1 μL、DNA 1 μL。将 1% 琼脂糖煮沸至澄清透明,加几滴 EB 并搅拌均匀进行染色,待 30 min 冷却成型后将上述 PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测(120 V,30 min),4 ℃ 保存。

1.2.9 PCR 产物的回收及克隆 采用琼脂糖凝胶 DNA 提取试剂盒回收上述 PCR 产物,将新鲜制备的或-70 ℃ 保存的 100 μL 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞先置于冰上 5 min 后轻甩使细胞悬浮。再将纯化的 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接,然后转化至感受态细胞中,冰中放置 30 min,取出后 42 ℃ 热激 90 s,冰中放置 5~10 min 后加入 890 μL LB 液体培养基,37 ℃、90 r/min 振荡培养 1 h。将菌液均匀涂布于含 AMP(100 μg/mL)的 LB 培养基平板上,正放 15 min 后倒置过夜培养,挑取白色单菌落接到含有 AMP 的 LB 液体培养基中(1 mL LB 加 1 μL AMP),37 ℃、120 r/min 振荡培养 10~12 h。吸取 1 μL 培养过的菌液进行 PCR,所用引物为 M13-RV 和 M13-47,电泳检测是否含有目的片段。

PCR 采用 25 μL 的反应体系,包括 ddH₂O 9.5 μL、2 × Taq Master Mix 12.5 μL、Primer-F (10 μmol/L) 1 μL、Primer-R (10 μmol/L) 1 μL、DNA 1 μL。将得到的 PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,4 ℃ 保存。PCR 反应条件为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.10 目的 DNA 序列的测序和系统发育学分析 将 NRPS、18S rDNA、ITS rDNA、LSU rDNA 和 EF-1α 的单克隆 PCR 产物交由上海美吉生物有限公司进行测序。获得拼接序列后,将其转化为蛋白序列后进行同源性搜索,下载同源较高的蛋白序列;将 18S rDNA、ITS rDNA、LSU rDNA 和 EF-1α 序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对,从中下载与该序列相似性较高的核酸序列。使用 MEGA 6.0 软件,进行多重序列匹配排列和聚类分析,采用邻接法(neighbor

joining method)构建系统发育进化树,并通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测,自举数据集为 1000 次。

1.2.11 菌株 PTLM-1 的发酵与质谱分析 将分离纯化得到的菌株接种在真菌发酵液体培养基中,发酵培养 7 d,用丙酮提取发酵产物,过滤后直接进行进样分析。质谱条件:离子源 ESI 负离子模式,毛细管电压 4000 V,雾化器压力 25 psig,干燥气 9 L/min,干燥气温度 300 ℃,扫描范围 50~1100 m/z。

2 结果与分析

2.1 菌株形态学鉴定

2.1.1 菌落形态特征 由图 1 可知,菌株 PTLM-1 在 PDA 培养基上 28 ℃ 培养 4~5 d 后,观察可见其气生菌丝为白色至浅灰色,形如羊绒。

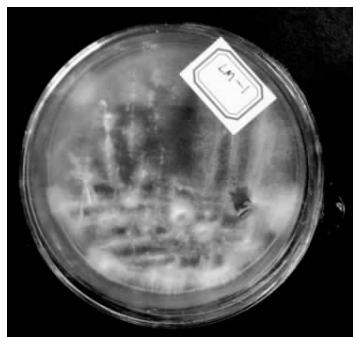


图1 菌株 PTLM-1 的菌落形态图

Fig.1 The morphological characters of PTLM-1

2.1.2 显微形态特征 由图 2 可知,菌株 PTLM-1 的显微形态:分生孢子以孢尖或孢体附于菌丝上,形态各异。其中大型分生孢子分布较稀疏;小型分生孢子则呈串排列。大型分生孢子两端较尖,呈镰刀形或纺锤形,孢体稍弯曲;小分生孢子呈卵形、肾形、梨形或纺锤形等,常平铺聚集与菌丝连接在一起。

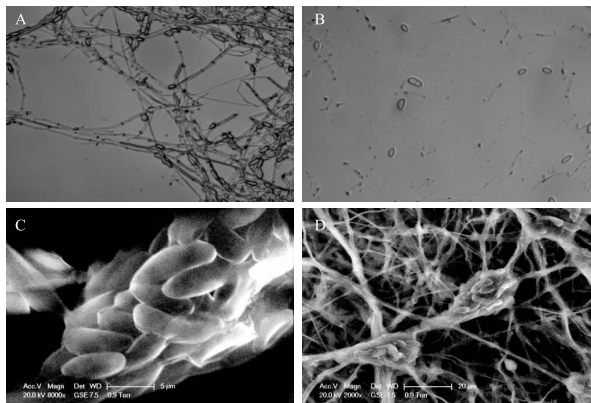


图2 菌株 PTLM-1 的显微形态图

Fig.2 The microscopic morphological characters of PTLM-1

注:A、B 为菌株 PTLM-1 的倒置显微镜图,放大倍数为 100 ×;C、D 为菌株 PTLM-1 的扫描电镜图,其中 C 图放大倍数为 8000 ×,D 图放大倍数为 2000 ×。

2.2 NRPS 片段扩增与系统发育学分析

经 PCR 扩增后发现仅引物 AUG003/AUG006 获得菌株 PTLM-1 的 NRPS 750 bp 的目的条带,如图 3 所示。测序后将核酸序列在 NCBI 上转化为蛋白序

列并进行同源性搜索,从中下载同源性较高的蛋白序列,将 PTLM-1 对应的蛋白序列与下载的蛋白序列经 MEGA 6.0 软件进行比对后,以邻接法(Neighbor-Joining)构建基于 NRPS 功能基因的系统发育进化树,如图 4 所示。不同种的绿僵菌菌株(*Metarhizium* sp.)聚为一枝,都能产生腐败菌素(destruxin);而不同属的炭疽菌(*Colletotrichum* sp.)和青霉菌(*Penicillium* sp.)都能产生金担子素 A1(aureobasidin A1)。这说明同属真菌的不同种菌株或不同属真菌都能够产生相同类型的化合物。如菌株 PTLM-1(登录号为 KX147648)与 *Tolypocladium inflatum* (CAA82227)聚为一枝,自展值为 100,表现出很近的亲缘关系。说明菌株 PTLM-1 可能产生抗菌环肽类化合物——环孢菌素(cyclosporine)。

2.3 18S rDNA 和 ITS rDNA 扩增与系统发育学分析

经 PCR 扩增分别获得菌株 PTLM-1 的 18S

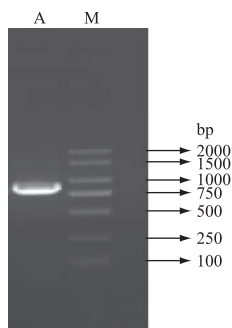


图 3 LM-1 NRPS 基因片段扩增图谱

Fig.3 PCR amplified products of 18S rDNA and ITS

注:A:NRPS 基因 PCR 扩增结果;M:DNA 分子质量标准。

rDNA 和 ITS1-5.8S-ITS4 rDNA 区域的序列,其中 PTLM-1 的 18S rDNA 序列全长为 1700 bp,PTLM-1 的 rDNAITS1-5.8S-ITS4 序列全长为 500 bp 左右。

将菌株 PTLM-18S 序列在 NCBI 中进行 BLAST

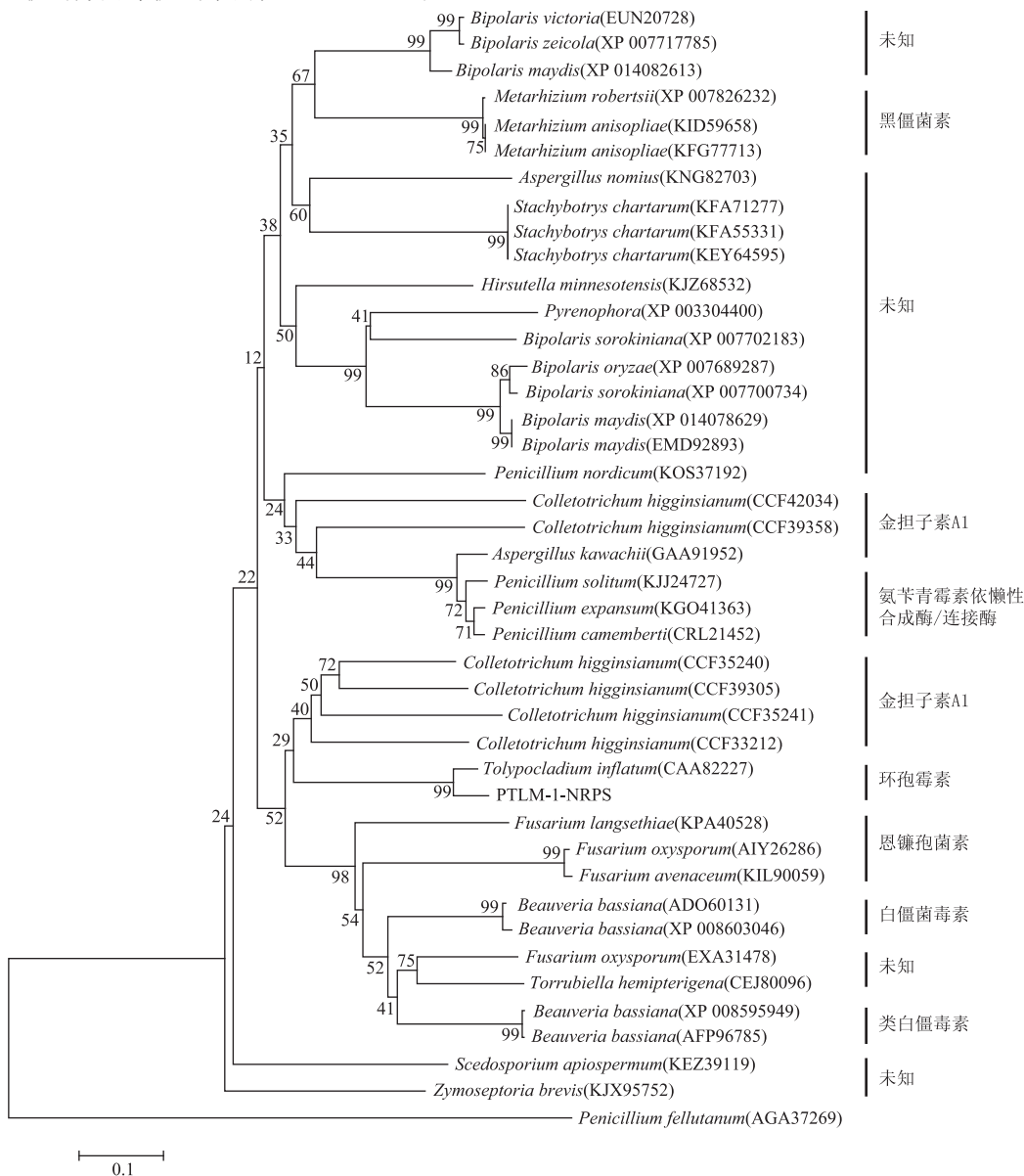


图 4 基于 PTLM-1 NRPS 基因 AUG 系列引物构建的系统发育进化树

Fig.4 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial NRPS rDNA sequences

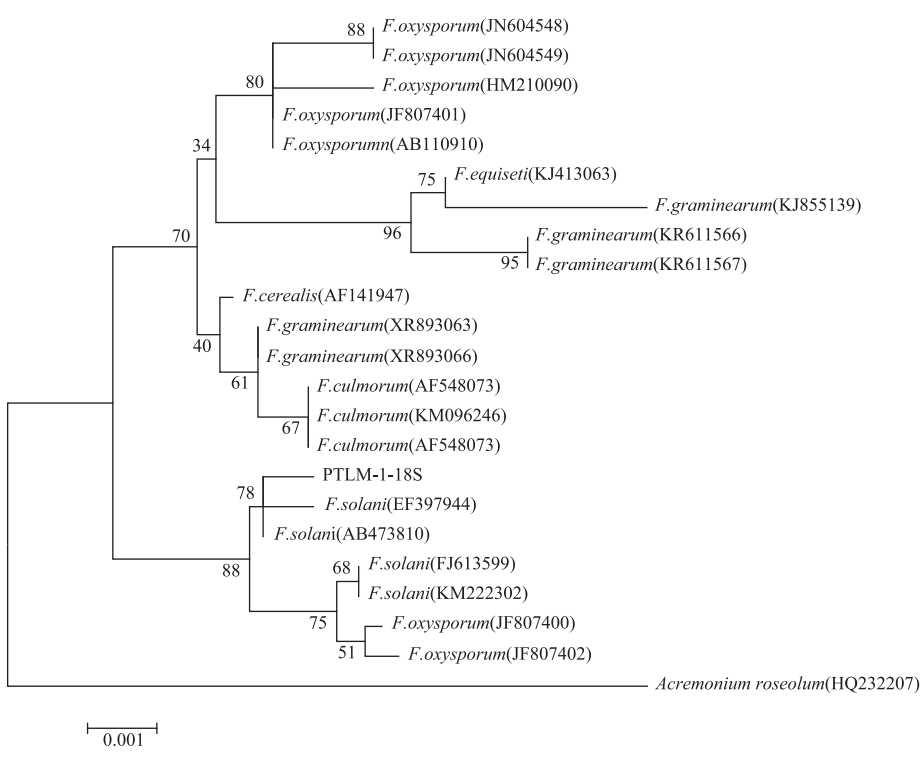


图5 基于菌株PTLM-1 18S rDNA序列构建的系统发育

Fig.5 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial 18S rDNA sequence

比对 (GenBank 登录号 KX147646), 发现该序列与 *Fusarium* sp. 的 18S rDNA 序列同源性最高, 相似性达 100%。选取同源性较高菌株的 18S rDNA 基因序列, 使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育进化树 (图 5)。从系统发育进化树中可以看出, 菌株 PTLM-1 与 *F.solani* (EF397944) 和 *F.solani* (AB473810) 聚为一枝, 表现出相当近的亲缘关系, 因此可将其初步鉴

定为 *Fusarium* sp.。再将该菌株 rDNA ITS1-5.8S-ITS4 序列与 GenBank 数据库中收录的真菌 rDNA 的 ITS1-5.8S-ITS4 序列进行 BLAST 比对 (GenBank 登录号 KX147647)。经过比对发现菌株 PTLM-1 的 ITS1-5.8S-ITS4 rDNA 序列与 *F.solani* 的 ITS 基因序列同源性最高, 相似性可达 99%。从系统发育进化树 (图 6) 中可以看出, 菌株 PTLM-1 与 *F.solani*

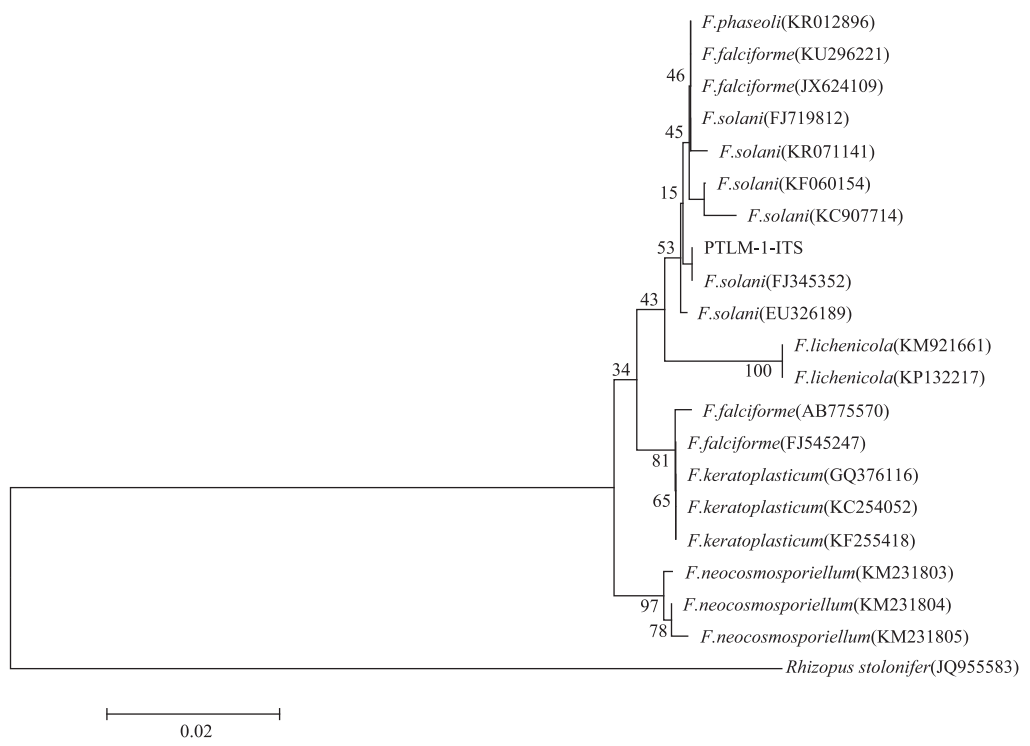


图6 基于菌株PTLM-1 ITS rDNA序列构建的系统发育进化树

Fig.6 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial ITS rDNA sequences

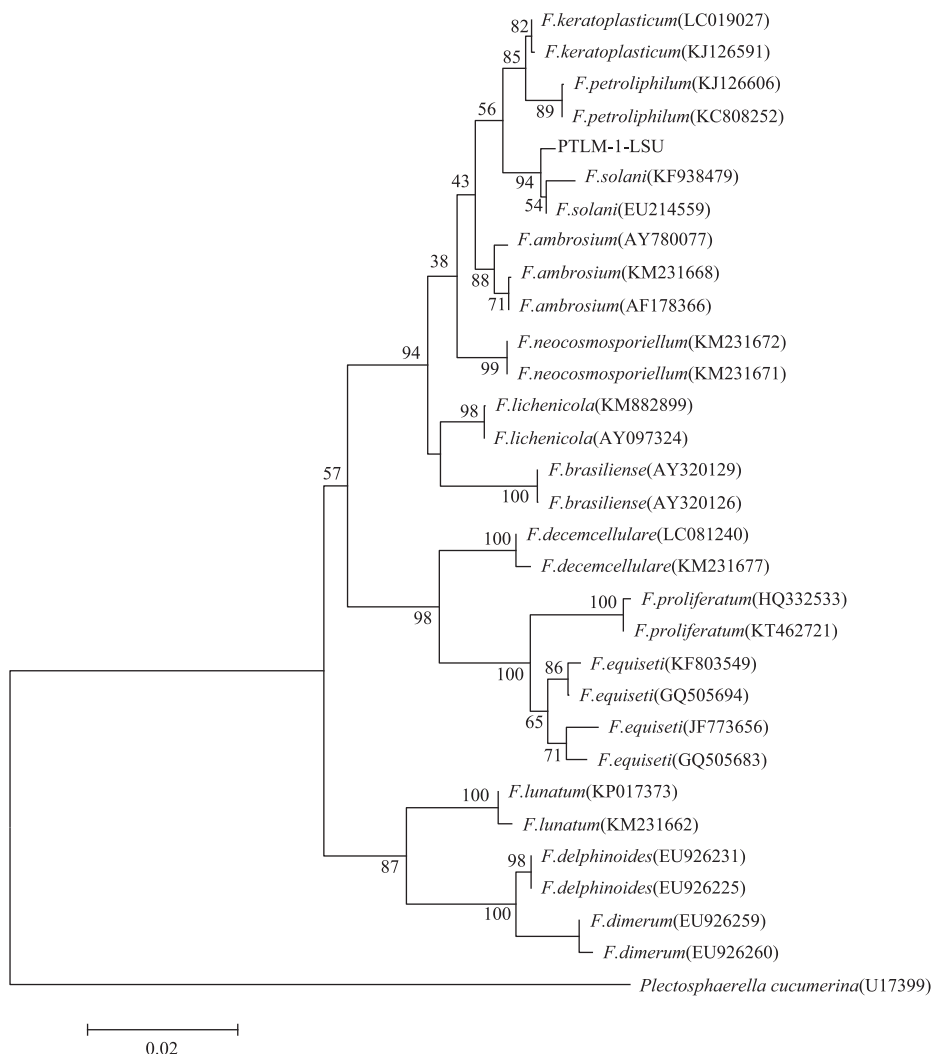


图7 基于菌株 PTLM-1 LSU rDNA 序列构建的系统发育进化树

Fig.7 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial LSU rDNA sequences

(FJ345352)聚为一枝,自展值为70,表现出较近的亲缘关系。

2.4 LSU rDNA 和 EF-1 α 的系统发育学分析

将该菌株 LSU rDNA 序列与 GenBank 数据库中收录的真菌 LSU rDNA 序列进行 BLAST 比对 (GenBank 登录号 KX147649)。经过比对发现菌株 PTLM-1 的 LSU rDNA 序列与 *F. solani* 的 LSU rDNA 序列同源性最高,相似性达 99%。从系统发育树 (图 7) 中可以看出,菌株 PTLM-1 与 *F. solani* (KF938479) 和 *F. solani* (EU214559) 聚为一枝,自展值为 94,表现出相当近的亲缘关系。再将该菌株 EF-1 α 序列与 GenBank 数据库中收录的真菌 EF-1 α 序列进行 BLAST 比对 (GenBank 登录号 KX147650)。经过比对发现菌株 PTLM-1 的 EF-1 α 序列与 *F. solani* 的 EF-1 α rDNA 序列相似性可达 99%。

综合菌落显微形态特征、NRPS、18S rDNA、rDNA ITS1-5.8S-ITS4、LSU rDNA 及 EF-1 α 序列分析结果,且与真菌鉴定手册标准菌株对照后,将该菌株 PTLM-1 鉴定为半知菌类 (Fungi Imperfecti)、丛梗孢目 (Melanconiales)、瘤座孢科 (Tuberculariaceae)、镰刀菌属 (*Fusarium* sp.)、腐皮镰刀菌 (*F. solani*)^[16]。

2.5 菌株 PTLM-1 的质谱分析

将菌株 PTLM-1 发酵 7 d 后,用丙酮提取发酵产物浓缩蒸干,加适量水溶解后直接进行进样分析。结果如图 8 所示,菌株 PTLM-1 的粗提物在 m/z 1020.8、1034.8、1035.8、1042.8 处产生碎片离子峰,为环孢菌素类化合物的特征分子离子质量,因此发酵产物中确实可能存在环孢菌素类化合物。另外,张梅等^[17]从腐皮镰刀菌固体发酵培养物中也分离得到 1 个次级代谢产物,通过核磁共振、质谱等波谱技术分析得知此化合物为酚类化合物,并且具有抑制酪氨酸酶活性,阻止黑色素的形成,为化妆品行业的发展奠定了理论基础^[18]。

3 结论与讨论

传统的真菌分类学鉴定主要依据形态学鉴定和生理生化鉴定,然而真菌种类的多样性及环境的不稳定性等不可避免的因素大大限制了这些方法的发展。随着分子生物学的快速发展,通过提取真菌基因组 DNA,并对其 18S、ITS、LSU 及 EF-1 α rDNA 片段进行 PCR 扩增,进而同源性分析并构建系统发育进化树来确定菌株的种属地位,已成现代真菌鉴定最为有效的方法。

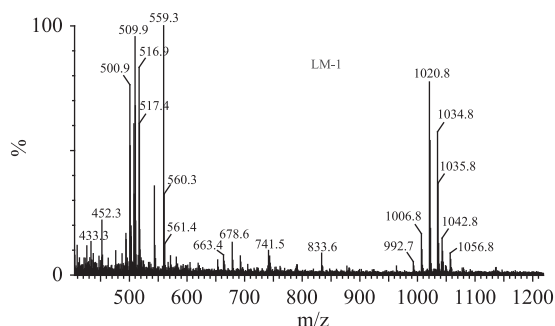


图8 菌株 PTLM-1 发酵产物质谱图

Fig.8 Mass spectrum diagram for PTLM-1

共附生微生物能否产生结构新颖的生物活性物质,基于其是否含有编码相应次级代谢产物合成的基因簇。2005年, Miao 课题组通过研究 *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 的 NRPS 合成途径,首次从中克隆出达托霉素合成基因簇,这为从基因到新化合物的预测奠定了理论基础,并且也成为现代天然产物研究与开发的有效手段^[19]。本研究基于 NRPS 基因筛选真菌菌株,目标直接指向新化合物的合成途径,减小已知化合物的发现概率,大大提高了工作效率。

本研究以 NRPS 功能基因为靶点,从含水量高且种植范围广的巨峰葡萄中分离得到菌株 PTLM-1。结合系统发育学分析与传统的形态学观察,将该菌鉴定为腐皮镰刀菌 *F.solani*。根据 NRPS 系统发育学分析,猜测菌株 PTLM-1 可能产生环孢菌素类化合物,经发酵后通过质谱分析验证,发现腐皮镰刀菌 PTLM-1 确实能产生环孢菌素。环孢菌素作为一种微生物次级代谢产物,除了具有抗菌、抗肿瘤等生物活性外,临床上还可将其应用于抑制器官移植时的排斥反应。除此之外,腐皮镰刀菌还能产生其他结构新颖、生理活性独特的化合物,如酚类化合物、大黄素、脑苷脂等。大黄素除了具有抗菌抗炎、抗肿瘤等药理作用外,还可抗氧化清除氧自由基^[20];而脑苷脂除了具有抑菌活性、保肝活性及抗溃疡等生物活性外,还对作用于细胞壁的抗生素有增效作用。可见,腐皮镰刀菌的次级代谢产物不仅结构多样,而且生物活性极其显著,具有明显研究价值。

多孔木霉 (*T.inflatum*) 产生的环孢菌素 H 和其它二十多个同系物,是目前为止国内外关于环孢菌素产生菌少有的报道^[21]。福建省微生物研究所从筛选到的腐皮镰刀菌中也已分离出十余种环孢菌素,并证明它们与多孔木霉产生的环孢菌素组分相同,而且外源氨基酸对多孔木霉和腐皮镰刀菌生物合成环孢菌素的影响不同,这为进一步阐明环孢菌素的生物合成途径,比较不同真菌来源环孢菌素合成酶的特性,指导环孢菌素的工业化生产有重要的意义,但国内外如今对产环孢菌素真菌腐皮镰刀菌遗传特性研究较少,并且在发酵过程中环孢菌素可能会受到菌种种类、发酵条件等多方面影响以至于产量并不稳定,倘若对腐皮镰刀菌进行基因改造,环孢菌素的产量将会大大提高。因此,研究腐皮镰刀菌的 NRPS 基因片段,为进一步选育高产环孢菌素菌

株奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 王伟,朱平,程克棣.药用植物基因组及 EST 研究[J].中国生物工程杂志,2004,5(1):1-5.
- [2] 许静,徐俊.海洋共附生微生物天然产物生物合成基因研究进展[J].微生物学报,2008,219(7):975-979.
- [3] 朱鹏.珍珠膜海绵共附生微生物 PKS 与 NRPS 的筛选与模块结构研究[D].杭州:浙江大学,2008.
- [4] Moore B S. Biosynthesis of marine natural products: microorganisms (Part A) [J]. Nat Prod Rep, 2005, 22(5): 580-593.
- [5] 文艳苹.基于 PKS、NRPS 基因的抗生素 paenimacrolidin 和嗜铁素 paenibactin 研究[D].杭州:浙江大学,2011.
- [6] 朱孟沼,崔晓龙,李铭刚,等.发现微生物药物的新途径:从基因到新化合物[J].天然产物研究与开发,2006,12(5): 854-857.
- [7] 张薇.海绵共附生活性菌 PKS 和 NRPS 基因的筛选及多样性研究[D].上海:上海交通大学,2008.
- [8] 符浩.基于放线菌基因组 I 型聚酮合酶和非核糖体肽合成酶保守序列筛选天然活性化合物的研究[D].上海:华东理工大学,2012.
- [9] Chang Z, Flatt P, Gerwick W H, et al. The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS) - non - ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit[J]. Gene, 2002, 296(1-2): 235-247.
- [10] 肖吉,张光涛,朱义广,等.海洋微生物次级代谢产物生物合成的研究进展[J].中国抗生素杂志,2012,34(4): 241-253.
- [11] Marahiel M A, Stachelhaus T, Mootz H D. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis[J]. Chem Rev, 1997, 97(7): 2651-2674.
- [12] Liang X H, Cai Y J, Liao X R, et al. Isolation and identification of a new hypocrellin A-producing strain *Shiraia* sp. SUPER-H168[J]. Microbiol Res, 2009, 164(1): 9-17.
- [13] 燕勇,李卫平,高雯洁,等.rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J].中国卫生检验杂志,2008,56(10):1958-1961.
- [14] Kurtzman C P, Robnett C J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1998, 73(4): 331-371.
- [15] O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous [J]. Mol Phylogenet Evol, 1997, 7(1): 103-116.
- [16] 魏景超.真菌分类鉴定手册[M].上海:上海科技出版社, 1979:487-533.
- [17] 张梅,徐良雄,薛璟花,等.一株茄病镰刀菌的代谢产物研究[J].热带亚热带植物学报,2012,36(6):585-590.
- [18] Fukai S, Tanimoto S, Maeda A, et al. Pharmacological activity of compounds extracted from persimmon peel (*Diospyros kaki* THUNB.) [J]. J Oleo Sci, 2009, 58(4): 213-219.

(下转第 240 页)

明了三级螺旋结构的存在^[16],由此证明超声波辅助提取同无超声波辅助的酶法提取一样,不会破坏胶原蛋白的三级螺旋结构。

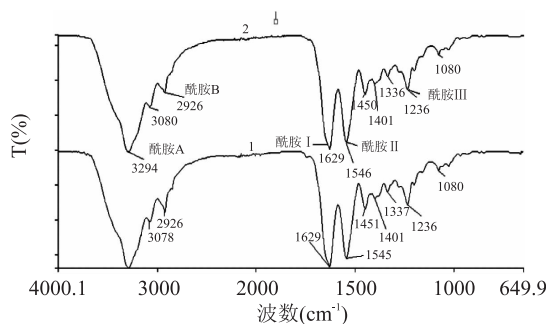


图8 PSC 傅里叶红外吸收光谱

Fig.8 FTIR spectra of PSC from grass carp skin

注:1-未经过超声波处理所得PSC红外光谱;

2-经超声波处理所得PSC红外光谱。

3 结论

本实验研究分析了超声波辅助法提取胶原蛋白具体条件,通过响应面设计实验并分析获得最佳工艺参数:超声波功率 310 W,超声波时间 10 min,酶解时间 29 h,此条件下胶原蛋白提取率为 68.67%。实验还通过对比较超声波处理和未经超声波处理下酶法提取得到的胶原蛋白的理化性质,分别由凝胶电泳图谱和傅里叶红外光谱确定超声波处理不会对胶原蛋白的结构造成影响。总之,响应面法设计实验获得了超声波辅助法下提取草鱼皮胶原蛋白提取率达到 68.67%,大大提高了胶原蛋白提取率,优于传统的酶提法,超声波处理下的胶原蛋白仍然具有完整的三级螺旋结构,这为超声波在胶原蛋白的提取工艺中的应用提供了有力的理论支持,为胶原蛋白的工业化生产提供了理论依据,以及更好地利用资源做出贡献。

参考文献

- [1]农业部渔业局编制.中国渔业统计年鉴[M].中国农业出版社,2015.
- [2]熊善柏.湖北省淡水鱼加工业现状、问题与发展方向[J].科学养鱼,2014(9):14-16.
- [3]王艳.草鱼皮胶原蛋白的提取、性质研究及膜性能表征

(上接第 228 页)

- [17]李雪,余晨,李秀娟,等.红薯米发糕生产工艺优化[J].食品科学,2010,31(20):518-521.
- [18]陈德文,沈伊亮,吴鹏,等.米发糕的比容与其质构的相关性研究[J].中国粮油学报,2009,24(12):7-9.

(上接第 235 页)

- [19]刘怡君,潘沐,王明洋,等.海芦笋内生真菌基于 PKS I 型功能基因的分离与鉴定[J].食品科学,2014,35(11):115-119.
- [20]于志伟,杨欣,曾宪军,等.腐皮镰刀菌 R13 发酵产大黄素的初步研究[J].四川大学学报(自然科学版),2015,52(5):1135-1140.
- [21]方金瑞,唐信东,任林英,等.氨基酸对环孢菌素 A 生物合成的影响[J].中国抗生素杂志,1990,12(2):140-141.

[D].天津:天津科技大学,2013:26-28.

- [4]王希,钟耀广,市川寿.响应面优化超声波快速提取鳕鱼皮中胶原蛋白的工艺研究[J].东北农业大学学报,2014,45(7):117-123.
- [5]李莉,顾赛麒,王锡昌,等.响应面法优化酶法提取大鲵皮胶原蛋白工艺[J].中国水产科学,2013,20(4):876-883.
- [6]王林,梁秋芳,王振斌,等.深海红鱼胶原蛋白的超声波辅助提取及其理化特性[J].食品研究与开发,2014,35(9):18-22.
- [7]张玲,芮汉明.超声波介入鲜猪皮的脱脂工艺研究[J].现代食品科技,2006,22(3):99-101.
- [8]杨萌萌,郭兆斌,余群力,等.超声波辅助法提取胶原蛋白工艺研究[J].甘肃农业大学学报,2013,48(3):121-126.
- [9]Woessner JF.The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this iminoacid[J].Archives of Biochemistry and Biophysics,1961,93:440.
- [10]MatmarohK, BenjakulS, ProdpranT, et al.Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (Parupeneusheptacanthus) [J]. Food Chemistry,2011,129:1179-1186.
- [11]Nagai, Takeshi, Araki, et al.Collagen of the skin of ocellatepuffer fish(Takifugurubripes) [J].Food Chemistry,2002, 78:137-177.
- [12]Kimura S, OhnoY, MiyauchiY, et al.Fish skin type I collagen;wide distribution of an α_3 subunit in teleosts [J]. Comparative Biochemistry and Physiology,1987,88(1):27-34.
- [13]AOAC. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists [M]. 15th ed. Arlington, Washington DC, USA: Association of Official Analytical Chemists,1990.
- [14]LI H, LIU B L, GAO L Z, et al.Studies on bullfrog skin collagen[J].Food Chemistry,2004,84(1):65-69.
- [15]ZHU B, DONG X, ZHOU D, et al.Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from seacucumberStichopusjaponicus [J]. Food Hydrocolloids, 2012,28(1):182-188.
- [16]GuzziPlepis AMD, Goissis G, Das-Gupta DK.Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and nativecollagen [J]. Polymer Engineering and Science,1996,36(24):2932-2938.
- [19]杨韵,吴卫国,李敏,等.米发糕发酵工艺条件的研究[J].农产品加工(学刊),2014(2):42-45.
- [20]郭蕾,刘小翠,沈硕,等.米发糕生产工艺的研究[J].粮食与饲料工业,2010(7):26-28.
- [22]方剑英.环孢菌素 A 衍生物的合成及其生物学活性研究[D].福州:福建医科大学,2008.
- [23]温耀明.环孢菌素 H 衍生物的合成及其生物学活性研究[D].福州:福建医科大学,2007.
- [24]陈振伟.茄病镰刀菌产生的环孢菌素 L 及其未知组分的研究[D].福州:福建医科大学,2007.
- [25]陈秀明.茄病镰刀菌产生的环孢菌素小组分的研究[D].福州:福建医科大学,2008.