

## 红色毛癣菌分泌性蛋白酶的分析

冷文川 王玲玲 卫灿东 杨 剑 金 奇\*

(中国疾病预防控制中心 病毒基因工程国家重点实验室 北京 100176)

**摘 要:** 分泌性蛋白酶是红色毛癣菌致病的潜在毒力因子。在构建红色毛癣菌 6 个不同时间段 cDNA 文库的基础上,共获得了 9683 条 uniqueESTs,通过生物信息学分析从中得到了 18 个可能的分泌性蛋白酶的 EST 序列,包括 4 个分泌性肽酶、1 个分泌性金属蛋白酶、2 个细胞外丝氨酸蛋白酶、1 个分泌性天冬氨酸蛋白酶、9 个分泌性枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶、1 个空泡丝氨酸蛋白酶。这些分泌性蛋白酶在红色毛癣菌感染过程中可能分别与其获得营养、扩大侵袭范围及激起宿主免疫应答有关,这些结果为进一步研究红色毛癣菌感染和发病机制提供了重要的分子基础和线索。

**关键词:** 红色毛癣菌,分泌性蛋白酶,表达序列标签

中图分类号:R75 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)04-0601-05

浅部真菌病的发生率极高,其中 60% 以上为红色毛癣菌感染所致。红色毛癣菌可以侵犯人的皮肤、毛发、指(趾)甲,寄生或腐生于表皮角质、毛发和甲板的角蛋白组织中,引起各种癣病。其感染的主要过程是:关节分生孢子与皮肤角质层接触粘附,孢子出芽形成菌丝,菌丝纵向生长穿透至角质层深层,横向生长使皮损外延扩展,在此过程中红色毛癣菌分泌的多种蛋白水解酶可以分解角蛋白、胶原蛋白、弹力蛋白及其它蛋白,为其生长代谢提供所需养分,同时也有利于菌体向周围组织扩散及深层组织侵入,因此被认为是其主要的毒力因子<sup>[1-4]</sup>。早期研究显示红色毛癣菌可分泌能降解胶原、弹力蛋白、角蛋白的蛋白水解酶<sup>[5]</sup>。还有人报道在红色毛癣菌培养上清中纯化到多种丝氨酸蛋白酶<sup>[3]</sup>。但这些研究并未得到这些蛋白酶的基因和氨基酸序列。获得这些分泌性蛋白酶的基因和氨基酸序列是进一步研究红色毛癣菌感染和发病机制的重要基础。最近, Jousson 等<sup>[6,7]</sup>利用犬小孢子菌分泌性金属蛋白酶(MEP)和枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶基因(SUB)的保守区作为杂交探针从红色毛癣菌的基因组中得到了 5 个分泌性金属蛋白酶和 7 个分泌性枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶基因。

表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)来自 cDNA,能从基因水平真实反应基因的表达,准确地提供基因结构与功能信息。目前 EST 技术被广泛

应用于基因识别、绘制基因表达图谱、寻找新基因等研究领域。实践证明 EST 技术可大大加速新基因的发现与研究,是真核生物功能基因组研究中必不可少的手段<sup>[8,44]</sup>。本研究在已建立的包括 9683 条 uniqueESTs 的红色毛癣菌 EST 库中通过生物信息学分析得到了 18 个可能的分泌性蛋白酶的 ESTs,其中包括 4 个分泌性肽酶、1 个分泌性金属蛋白酶、2 个细胞外丝氨酸蛋白酶、1 个分泌性天冬氨酸蛋白酶、9 个分泌性枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶、1 个空泡丝氨酸蛋白酶,这为系统研究红色毛癣菌的毒力因子和致病机制奠定了坚实的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 本研究所用红色毛癣菌菌株(*Trichophyton rubrum*)为北京大学真菌和真菌病研究中心保藏的临床分离株 BMU01672,经形态学鉴定及其核糖体 DNA 18S 和转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)的 PCR 扩增、测序鉴定为红色毛癣菌。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH10B 为质粒载体 pCMV·SPORT 6 的扩增菌株。

**1.1.2 培养基和试剂:** 马铃薯葡萄糖琼脂、沙堡氏固体培养基(4% D-Glucose, 1% Peptone, 2% Agar), YPD 培养基(2% Peptone, 1% Yeast Extract, 2% D-Glucose)购于 Difco 公司。总 RNA 提取试剂盒

基金项目: 国家 863 计划(2001AA223021); 国家重大科技攻关计划(2002BA711A14)

\* 通讯作者。Tel 86-10-67877732; Fax 86-10-67877736; E-mail: zdsys@sina.com

作者简介: 冷文川(1973-),男,吉林省辽源市人,博士研究生,主要从事红色毛癣菌分泌性蛋白酶的研究。E-mail: lengwenchuan@hotmail.com。王玲玲为同等贡献作者。

收稿日期: 2004-12-20, 修回日期: 2005-04-20

RNeasy<sup>®</sup> Plant Mini Kit 及 mRNA 分离纯化试剂盒 Oligotex mRNA Mini Kit 购于 Qiagen 公司。cDNA 文库构建试剂盒 SuperScript<sup>™</sup> Plasmid System with Gateway<sup>™</sup> Technology for cDNA Synthesis and Cloning Kit 购于 Invitrogen 公司。质粒提取液购于 Vitagen 公司, 质粒纯化板购于 Millipore 公司。

## 1.2 菌体培养

接少许菌落于 PDA 斜面, 27.5℃ 培养 2~3 周, 由斜面中挑取少许菌落接种于 YPD 培养基, 27.5℃ 水浴摇床培养 7、10、14、16、20、22、26、28、34、36d。合并 16、20、22d 的菌体, 合并 26、28d 的菌体, 合并 34、36d 的菌体, 得到 7、10、14、(16, 20, 22)、(26, 28)、(34, 36)d 6 个不同时间段的菌体。

## 1.3 DNA 操作

总 RNA 提取和 mRNA 分离、纯化以及 cDNA 文库构建、质粒提取和测序的具体操作参见文献 [14]。

## 1.4 生物信息学分析

**1.4.1 测序数据预处理:** 用 phred 软件对 DNA 测序结果进行预处理, 具体操作参见文献 [14]。

**1.4.2 ESTs 聚类 and 组装:** 对于上一步处理得到的所有长度大于 200bp 的 ESTs 序列, 使用 BLASTN 进行相互比较, 然后以参考文献 [14] 的标准和方法进行组装, 得到较完整的一致性 ESTs 序列。

**1.4.3 ESTs 的功能预测和分类:** 对于得到的非冗余

ESTs 序列, 使用 BLASTx 将其和 GenBank 所提供的非冗余蛋白数据库 (Non-redundant protein database, 简称 NR) 进行同源性比较, 从而获得部分 ESTs 功能提示, 然后再按照 NCBI 提供的蛋白质直系同源簇数据库 (Clusters of Orthologous Groups of proteins, 简称 COG) 的标准对它们进行分类。使用 RPS-BLAST 将分类后 ESTs 的推测氨基酸序列和 GenBank 所提供的保守性结构域数据库 (Conserved Domain Database, 简称 CDD) 进行比较获得部分 ESTs 的保守性结构域及其功能提示。

## 2 结果和分析

### 2.1 对 ESTs 的功能预测

构建的红色毛癣菌 6 个不同时间段的 ESTs 库, 通过聚类分析获得 9683 条 unique 的 ESTs。其中 Clusters 3199 个, Singlets 6484 个。Clusters 平均长度为 720bp, Singlets 平均长度为 443bp。

通过与 NR 数据库中的序列进行同源性比较, 发现其中有 18 个可能的分泌性蛋白酶, 它们的核苷酸序列的平均长度为 597bp, 推测氨基酸序列的平均长度为 186aa。其中包括 4 个分泌性肽酶、1 个分泌性金属蛋白酶、2 个细胞外丝氨酸蛋白酶、1 个分泌性天冬氨酸蛋白酶、9 个分泌性枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶、1 个空泡丝氨酸蛋白酶 (表 1)。

表 1 ESTs 序列的功能预测及分类

Table 1 Functional prediction and classification of ESTs

Query name	E-value	Identity	Subject discription
C0979-Contig1	4.00E-26	60/122 (49%)	Putative secreted D-alanyl-D-alanine dipeptidase
Fungi-9-117B-20	3.00E-08	42/142 (29%)	Putative secreted dipeptidyl peptidase
Fungi-7-029B-77	9.00E-60	106/106 (100%)	Tri r 4 allergen, secreted dipeptidylpeptidase V
Fungi-9-103B-37	2.00E-16	48/124 (38%)	Related to vacuolar aminopeptidase yscI precursor
Fungi-7-07b-04	3.00E-39	79/80 (98%)	Putative secreted metalloprotease 1 [ <i>Trichophyton rubrum</i> ]
C2663-Contig1	8.00E-26	75/222 (33%)	Extracellular serine protease [ <i>Brucella melitensis</i> ]
Fungi-9-106B-05	8.00E-11	42/138 (30%)	Extracellular serine protease [ <i>Brucella melitensis</i> ]
C2785-Contig1	6.00E-59	121/276 (43%)	Secreted aspartic proteinase precursor
C1380-Contig1	1.00E-59	206/206 (100%)	Putative secreted alkaline protease SUB6 [ <i>Trichophyton rubrum</i> ]
Fungi-4-016-36b	8.00E-77	142/142 (100%)	Putative secreted alkaline protease SUB6 [ <i>Trichophyton rubrum</i> ]
C1902-Contig1	5.00E-71	215/215 (100%)	Putative secreted subtilisin-like protease SUB1 [ <i>Trichophyton rubrum</i> ]
Fungi-S003R-66-B09-077	1.00E-31	164/164 (100%)	Putative secreted subtilisin-like protease SUB1 [ <i>Trichophyton rubrum</i> ]
C1307-Contig1	1.00E-97	328/328 (100%)	Putative secreted subtilisin-like protease SUB5 [ <i>Trichophyton rubrum</i> ]
C0971-Contig1	5.00E-99	177/256 (69%)	Subtilisin-like serine protease PEPC precursor
C0726-Contig1	3.00E-06	47/167 (28%)	COG1404 : Subtilisin-like serine proteases
C1412-Contig1	8.00E-23	42/85 (49%)	COG1404 : Subtilisin-like serine proteases
Fungi-9-033b-25	1.00E-10	31/61 (50%)	COG1404 : Subtilisin-like serine proteases
C2808-Contig1	1.00E-71	137/210 (65%)	Allergen Pen n 18 [ <i>Penicillium chrysogenum</i> ]

目前已知红色毛癣菌分泌性枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶家族共有 7 个成员 (SUB1-SUB7)。其中 SUB1

基因全长 1628bp, 包括 3 个外显子和 2 个内含子。在我们 ESTs 库中 fungi-S003R-66-B09-077 的核酸序

列长度为 594bp, 推测氨基酸序列长度为 198aa。其中氨基酸序列的 35 ~ 198aa 与 SUB1 的 1 ~ 116aa 同源, 同源率为 100%。核酸序列的 103 ~ 411bp 与 SUB1 外显子 1 (1 ~ 309bp) 100% 同源, 412 ~ 594bp 与 SUB1 外显子 2 的前半部分 (372 ~ 554bp) 100% 同源。C1902-Contig1 的核酸序列长度为 884bp, 推测氨基酸序列长度为 294aa。其中氨基酸序列的 1 ~ 294aa 与 SUB1 的 180 ~ 473aa 100% 同源; 核酸序列的 1 ~ 421bp 与 SUB1 外显子 2 的后半部分 (600 ~ 1020bp) 100% 同源, 422 ~ 884bp 与 SUB1 基因外显子 3 的前半部分 (1072 ~ 1534bp) 100% 同源。这些结果表明这两个 ESTs 可能是 SUB1 基因不同部分的 cDNA 片段。

SUB6 基因全长 1955bp, 包括 4 个外显子和 3 个内含子。ESTs 库中 C1380-Contig1 的核酸序列长度为 729bp, 推测氨基酸序列长度为 224aa。其中氨基酸序列的 13 ~ 224aa 与 SUB6 的 1 ~ 212aa 有 100% 同源; 核酸序列的 92 ~ 415bp 与 SUB6 外显子 1 (310 ~ 633bp) 100% 同源, 416 ~ 729bp 与 SUB6 外显子 2 的前半部分 (712 ~ 1025bp) 100% 同源。fungi-4-016-36b 的核酸序列长度为 528bp, 推测氨基酸序列的长度为 155aa。其中氨基酸序列的 1 ~ 155aa 与 SUB6 的 258 ~ 412aa 同源率为 100%。核酸序列的 1 ~ 121bp 与 SUB6 外显子 2 的后半部分 (1158 ~ 1278bp) 100% 同源, 122 ~ 227bp 与 SUB6 外显子 3 (1334 ~ 1439bp) 有 100% 同源性, 228 ~ 469bp 与 SUB6 外显子 4 (1501 ~ 1742bp) 100% 同源。表明这两个 ESTs 可能是红色毛癣菌 SUB6 基因不同部分的 cDNA 片段。

SUB5 基因全长为 1384bp, 包括 4 个外显子 3 个内含子。我们 ESTs 库中 C1307-Contig1 的核酸序列长度为 995bp, 推测氨基酸序列长度为 331aa。其中氨基酸序列的 4 ~ 331aa 与 SUB5 的 1 ~ 328aa 同源率为 100%。核酸序列的 11 ~ 319bp 与 SUB5 外显子 1 (1 ~ 309bp) 100% 同源, 320 ~ 853bp 与 SUB5 外显子 2 (380 ~ 913bp) 100% 同源, 854 ~ 959bp 与 SUB5 外显子 3 (977 ~ 1082bp) 100% 同源, 960 ~ 995bp 与 SUB5 外显子 4 的前半部分 (1143 ~ 1384bp) 100% 同源。这表明 C1307-Contig1 是红色毛癣菌 SUB5 基因的 cDNA 片段。

除上述的 SUB1、SUB5 及 SUB6 外, C0971-Contig1、C0726-Contig1、C1412-Contig1 及 FUNGI-9-033b-25 分别与黑曲霉的分泌性枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶及紫丁香假单胞菌的分泌性枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶具有不同程度的同源性。

在 4 个分泌性蛋白酶中, FUNGI-7-029B-77 的推测氨基酸序列 (106aa) 与红色毛癣菌分泌性二肽基肽酶 V (即红色毛癣菌的变态反应原 Tri r 4) 的 621 ~ 726aa 100% 同源。在核酸水平上 FUNGI-7-029B-77 的 1 ~ 391bp 与 Tri r 4 mRNA 的 1935-2325bp 的同源率为 100%。这说明 FUNGI-7-029B-77 可能就是 Tri r 4 的 cDNA 片段。

FUNGI-7-07b-04 的推测氨基酸序列与红色毛癣菌分泌性金属蛋白酶家族中的 MEP1、MEP5 及 MEP2 分别具有 98%、58% 及 41% 的同源性。

## 2.2 保守性结构域的分析

在这些 ESTs 中, 除 FUNGI-7-07b-04、C2663-Contig1、FUNGI-9-106B-05、C0726-Contig1、C1412-Contig1 及 FUNGI-9-033b-25 外, 在其他序列中均发现了保守性结构域 (Conserved domain) 的存在 (表 2)。

在枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶中发现的保守性结构域有 pfam05922 枯草杆菌蛋白酶 N 末端区; pfam00082 Peptidase-S8, Subtilase family) 见于丝氨酸蛋白酶家族的成员中; COG1404, AprE, Subtilisin-like serine proteases。在 4 种肽酶中也发现了相应的保守性结构域。

## 3 讨论

在本研究中, 我们在已建立的包括 9683 条 uniqueESTs 的红色毛癣菌 EST 库中通过生物信息学分析得到了 18 个可能的分泌性蛋白酶的 ESTs, 包括分泌性蛋白酶、分泌性金属蛋白酶、细胞外丝氨酸蛋白酶、分泌性天冬氨酸蛋白酶、分泌性枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶及空泡丝氨酸蛋白酶。

在 9 个分泌性枯草杆菌蛋白酶样丝氨酸蛋白酶的 ESTs 中, 有 5 个分别与已知的红色毛癣菌分泌性枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶家族中的 SUB1、SUB5 和 SUB6 基因 100% 同源, 未发现与该基因家族中的 SUB2、SUB3、SUB4 及 SUB7 同源的序列, 说明在我们建库的条件下这些基因并未表达或丰度极低。其它 4 个 ESTs 分别与黑曲霉的分泌性枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶及紫丁香假单胞菌的分泌性枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶具有不同程度的同源性 (表 1), 说明在红色毛癣菌分泌性枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶家族中除了目前已知的 7 个成员外, 尚可能存在其它成员。

SUB6 即红色毛癣菌变态反应原 Tri r 2 能够诱导皮肤产生即发型和迟发型超敏反应。有研究表明人体对毛癣菌抗原的免疫应答特性与皮肤癣菌病的严重程度相关。即发型超敏反应与以轻度炎症病变

表 2 ESTs 序列中存在的保守性结构域

Table 2 Conserved domains in ESTs

Query name	Aligned	Conserved domain
C0979-Contig1	62.1% 49.3%	pfam01427, Peptidase-M15, D-ala-D-ala dipeptidase COG2173, DdpX, D-alanyl-D-alanine dipeptidase
Fungi-9-117B-20	21.5%	COG1506, DAP2, Dipeptidyl aminopeptidases
Fungi-7-029B-77	10.3%	COG1506, DAP2, Dipeptidyl aminopeptidases
Fungi-9-103B-37	15.2% 16.9%	pfam02127, Peptidase-M18, Aminopeptidase I zinc metalloprotease COG1362, LAP4, Aspartyl aminopeptidase
Fungi-7-07b-04	NF	NF
C2663-Contig1	NF	NF
Fungi-9-106B-05	NF	NF
C2785-Contig1	74.1%	pfam00026, Asp, Eukaryotic aspartyl protease
C1380-Contig1	100% 23.9% 11.4%	pfam05922, Subtilisin-N, Subtilisin N-terminal Region pfam00082, Peptidase-S8, Subtilase family COG1404, AprE, Subtilisin-like serine proteases
Fungi-4-016-36b	38.2% 21.5%	pfam00082, Peptidase-S8, Subtilase family COG1404, AprE, Subtilisin-like serine proteases
Fungi-S003R-66-B09-077	100%	pfam05922, Subtilisin-N, Subtilisin N-terminal Region
C0726-Contig1	NF	NF
C0971-Contig1	98.8% 23.9% 23.4%	pfam05922, Subtilisin-N, Subtilisin N-terminal Region pfam00082, Peptidase-S8, Subtilase family COG1404, AprE, Subtilisin-like serine proteases
C1307-Contig1	97.6% 73.1% 40.4%	pfam05922, Subtilisin-N, Subtilisin N-terminal Region pfam00082, Peptidase-S8, Subtilase family COG1404, AprE, Subtilisin-like serine proteases
C1412-Contig1	NF	NF
C1902-Contig1	51.5%	pfam00082, Peptidase-S8, Subtilase family
Fungi-9-033b-25	NF	NF
C2808-Contig1	50.5% 27.2%	pfam00082, Peptidase-S8, Subtilase family COG1404, AprE, Subtilisin-like serine proteases

NF: No found conserved domain.

和 IgE 抗体出现为特征的慢性持续性感染有关,而迟发型超敏反应与严重的炎症反应及对再次感染有一定耐受能力有关,说明细胞免疫对于清除皮肤癣菌感染和建立保护机制可能更为有效<sup>[9]</sup>。SUB1 基因比该基因家族中的其它 6 个基因在 C 末端多出约 104 个氨基酸,其中富含脯氨酸。因此, SUB1 基因象 SUB6 基因一样可能在皮肤癣菌感染过程中与宿主的免疫调节有关。Jousson 等<sup>[7]</sup>在以大豆蛋白为唯一氮源的红色毛癣菌培养上清中检测到 SUB3 和 SUB4 基因产物,发现它们对角蛋白、胶原、弹力蛋白、白蛋白及酪蛋白具有蛋白水解活性。说明 SUB3 和 SUB4 基因产物在红色毛癣菌感染过程中可能与其获得营养和扩大侵袭范围有关。目前尚未见报道在红色毛癣菌的培养上清中检测到该基因家族中的 SUB2、SUB5 及 SUB7 基因产物及其蛋白水解酶活性的研究,关于它们在红色毛癣菌感染过程中的作用仍有待阐明。

目前,已知的红色毛癣菌分泌性金属蛋白酶家族中共有 5 个成员 MEP1 ~ MEP5。其中, MEP3 和

MEP4 已从以大豆蛋白为唯一氮源的红色毛癣菌培养上清中得到鉴定,它们对角蛋白和弹力蛋白有明显的水解活性。我们 EST 库中的 FUNGI-7-07b-04 很有可能是该家族的另外一名成员。尽管尚未有人报道红色毛癣菌分泌性金属蛋白酶在其感染过程中的具体作用,但以犬小孢子菌感染豚鼠上皮的研究显示在接种感染后 14 和 21 天可以检测到 MEP2 和 MEP3,而此时正是感染病灶的扩散期,提示分泌性金属蛋白酶在感染过程中可能与病灶的扩散有关<sup>[10]</sup>。

尚无研究证明分泌性天冬氨酸蛋白酶在红色毛癣菌感染过程中具有某种作用,但分泌性天冬氨酸蛋白酶(SAP)是致病性白色念珠菌的主要毒力因子,并在其感染过程中具有重要作用却是不争事实。它们是酸性蛋白酶,于酸性条件下对细胞间质中的各种蛋白具有水解活性,在白色念珠菌感染的粘附、扩散及激起宿主免疫应答等方面具有重要作用<sup>[11-13]</sup>。对于红色毛癣菌,分泌性天冬氨酸蛋白酶可能是其一种储备,仅在某些特定条件下才发挥作

用,如在酸性条件下,金属蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶样蛋白酶及细胞外丝氨酸蛋白酶等中性和碱性蛋白酶的活性受抑制。

在4个分泌性肽酶的ESTs中,FUNGI-7-029B-77与红色毛癣菌分泌性二肽基肽酶V(即红色毛癣菌的变态反应原Tri r 4)100%同源。Tri r 4与须癣菌的变态反应原Tri t 4有较高的同源性,Tri t 4可以引起皮肤产生即发型和迟发型超敏反应,但用毕赤酵母产生的重组Tri r 4并不能引起皮肤的即发型和迟发型超敏反应,仅对角蛋白有较弱的水解活性<sup>[9]</sup>。这4个分泌性肽酶的EST序列中均发现了各种肽酶的保守性结构域,并提示与氨基酸的转运和代谢有关,这些结果都进一步支持我们对这些ESTs功能预测的准确性。在红色毛癣菌感染人体的过程中,通过各种分泌性蛋白酶水解角蛋白、弹力蛋白及胶原等底物产生多肽片段,但仍无法直接吸收和利用,需各种分泌性肽酶对这些多肽片段进一步分解产生较小的二肽和氨基酸才能转运入细胞内加以利用<sup>[3]</sup>。

红色毛癣菌具有多种分泌性蛋白酶,它们可能在其引发的不同疾病及疾病的不同阶段协同发挥作用。获得这些分泌性蛋白酶和肽酶的基因对于进一步研究红色毛癣菌感染发病机制至关重要,而本研究通过构建红色毛癣菌EST库的方法共获得了18个分泌性蛋白酶的ESTs,正为此奠定了良好基础。

### 参 考 文 献

[1] Samdani A J, Dykes P J, Marks R. The proteolytic activity of strains of *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* isolated from tinea

pedis and tinea unguium infections. *J Med Vet Mycol*, 1995, **33**(3): 167-170.

- [2] Apodaca G, McKerrow J H. Expression of proteolytic activity by cultures of *Trichophyton rubrum*. *J Med Vet Mycol*, 1990, **28**: 159-171.
- [3] Apodaca G, McKerrow J H. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect Immun*, 1989, **57**(10): 3081-3090.
- [4] Asahi M, Lindquist R, Fukuyama K, et al. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochem J*, 1985, **233**(1): 139-144.
- [5] Meevooitson V, Niederpruem D J. Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, 1979, **17**(2): 91-106.
- [6] Jousson O, Lechenne B, Bontems O, et al. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalsin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporium*. *Microbiology*, 2004, **150**(Pt 2): 301-310.
- [7] Jousson O, Lechenne B, Bontems O, et al. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene*, 2004, **15**(339): 79-88.
- [8] Fannon M R. Gene expression in normal and disease states—identification of therapeutic targets. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**(8): 294-298.
- [9] Judith A, Lisa M, Rohan V, et al. *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. *J Biol Chem*, 1998, **273**(45): 29489-29496.
- [10] Brouta F, Descamps F, Monod M, et al. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporium canis*. *Infect Immun*, 2002, **70**(10): 5676-5683.
- [11] Naglik J, Albrecht A, Bader O, et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol*, 2004, **6**(10): 915-926.
- [12] Naglik J R, Challacombe S J, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, **67**(3): 400-428.
- [13] Schaller M, Bein M, Korting H C, et al. The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an *in vitro* model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun*, 2003, **71**(6): 3227-3234.
- [14] 马 骊, 王玲玲, 冷文川, 等. 红色毛癣菌部分表达序列标签的分析. *中国科学*, 2004, **34**(2): 150-155.

## Analysis of secreted proteases of *Trichophyton rubrum*

LENG Wen-chuan WANG Ling-ling WEI Can-dong YANG Jian JIN Qi\*

(State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100176, China)

**Abstract**: Secreted proteases are thought as potential virulent factors of *Trichophyton rubrum*. Based on cDNA libraries of 6 physiological phases of *Trichophyton rubrum*, 9683 unique ESTs were obtained by DNA sequencing. By bioinformatic analysis, 18 ESTs of putative secreted proteases were obtained from the established ESTs library, including 4 secreted peptidases, 1 secreted metalloprotease, 2 extracellular serine proteases, 1 secreted aspartic proteinase, 9 secreted subtilisin-like proteases and 1 vacuolar serine protease. These secreted proteases are related to nutrient uptake, lesion extension and host immune responses elicitation in the process of *T. rubrum* infection. These results provide a clue to further research on the infection and pathogenicity of *T. rubrum*.

**Key words**: *T. rubrum*, Secreted proteases, Expressed sequence tag

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2001AA223021); Chinese National Key Technologies Research and Development Program(2002BA711A14)

\* Corresponding author. Tel 86-10-67877732; Fax 86-10-67877736; E-mail: zdsys@sina.com

Received date: 12-20-2004