

少孢节丛孢菌胞外丝氨酸蛋白酶 *P186* 基因的克隆、序列分析及表达

赵海龙¹, 孟庆玲¹, 乔 军¹, 陈双庆¹, 王国超¹, 谢 堃¹, 胡政香¹, 才学鹏²

(1. 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003; 2. 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046)

摘要:根据 GenBank 中少孢节丛孢菌丝氨酸蛋白酶 *P186* 基因序列设计特异性引物, 运用 RT-PCR 扩增获得目的基因片段, 构建重组表达质粒 pET32a-*P186*, 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3), 以 IPTG 进行了诱导表达。结果表明, *P186* 基因 cDNA 全长为 1 224 bp, 编码 407 个氨基酸, 其中第 1~21 位为信号肽序列, 氨基酸序列的第 156~167 位、192~202 位、343~353 位分别是天冬氨酸 (Asp₁₆₀)、组氨酸 (His₁₉₂)、丝氨酸 (Ser₃₄₅) 活性位点所在区域, 属于 Subtilase 家族, 包括 2 个潜在的 N-联糖基化位点 (Asn₂₄₉、Asn₃₄₂) 及与底物结合的 S1 区 (SBP) Ser₂₅₁Ile₂₅₂Gly₂₅₃ 和 Ala₂₇₇Ala₂₇₈Gly₂₇₉。SDS-PAGE 分析结果显示, 表达产物的分子质量约为 62 kDa。Western Blot 分析结果表明, *P186* 重组蛋白可以与抗蛋白粗提液多克隆抗体发生反应。为了揭示少孢节丛孢菌捕食线虫的分子机制, 首次克隆并表达了少孢节丛孢菌丝氨酸蛋白酶 *P186* 基因, 为进一步研究丝氨酸蛋白酶 *P186* 的生物学功能奠定了基础。

关键词:少孢节丛孢菌; 丝氨酸蛋白酶 *P186*; 克隆; 表达

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)04-0093-05

Cloning and Prokaryotic Expression of Serine Protease *P186* Gene of *Arthrobotrys oligospora*

ZHAO Hai-long¹, MENG Qing-ling¹, QIAO Jun¹, CHEN Shuang-qing¹, WANG Guo-chao¹,
XIE Kun¹, HU Zheng-xiang¹, CAI Xue-peng²

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

2. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: A pair of specific primers derived from *Arthrobotrys oligospora* Serine Protease *P186* gene in GenBank was designed and used to amplify *P186* gene by RT-PCR from total RNA extracted from *Arthrobotrys oligospora*. The RT-PCR product was cloned into the expression vector pET32a to generate recombinant pET32a-*P186*, and pET32a-*P186* plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced by IPTG. Sequence analysis demonstrated that *P186* cDNA contained an insert of 1 224 bp encoding 407 amino acids. Among them 1-21 for the signal peptide sequence, amino acid sequence of 156-167, 192-202, 343-353 were aspartic acid (Asp₁₆₀), histidine (His₁₉₂) and serine (Ser₃₄₅) active site area, respectively, which are belonging to the family of Subtilase. The amino acid also contained two potential N-terminal glycosylation sites (Asn₂₄₉, Asn₃₄₂) and a substrate binding region of S1 (SBP) Ser₂₅₁Ile₂₅₂Gly₂₅₃ and Ala₂₇₇Ala₂₇₈Gly₂₇₉. SDS-PAGE analysis showed that the product had a molecular weight of about 62 kDa. Western Blot analysis indicated that the recombinant protein could specifically react with polyclonal antibody against protein crude extracts. In order to reveal the molecular mechanism of *Arthrobotrys oligospora* predatory nematodes, in this study, the serine protease *P186* gene of *Arthrobotrys oligospora* was firstly cloned and expressed, which laid a foundation of further study on biological function of *P186*.

Key words: *Arthrobotrys oligospora*; Serine protease *P186*; Cloning; Expression

收稿日期: 2014-05-10

基金项目: 国家农业公益行业专项课题 (201303037-5); 国家自然科学基金项目 (31260601); 兵团博士资金项目 (2010JC09)

作者简介: 赵海龙 (1989-), 男, 甘肃灵台人, 在读硕士, 主要从事动物寄生虫学研究。

通讯作者: 孟庆玲 (1969-), 女, 江苏徐州人, 教授, 博士, 主要从事动物寄生虫学研究。

利用寄生性线虫的自然天敌对家畜寄生性线虫进行生物防治是一种非常具有潜力的寄生虫控制模式,对发展无污染的绿色畜牧产品具有重要意义,已成为国内外学者研究的热点^[1-2]。少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)作为捕食线虫性真菌最具代表的一种模式真菌,被广泛地用于研究捕食线虫性真菌与宿主线虫的相互作用^[3]。少孢节丛孢菌在侵染过程中产生特定的捕食性结构捕食线虫,同时还分泌胞外蛋白酶固定线虫并降解其体壁,从而发挥杀线虫效应,丝氨酸蛋白酶便是其中之一,而其作用机制可能是在菌丝侵入宿主的过程中破坏角质层的蛋白组分^[4]。

迄今为止,国内外许多学者从少孢节丛孢菌中分离到了不同的胞外丝氨酸蛋白酶,Tunlid 等^[5]从少孢节丛孢菌液体培养物中分离出可以分解线虫体壁的胞外丝氨酸蛋白酶 P II。Liang 等^[4]研究发现,在少孢节丛孢菌的细胞壁上检测到了 16 种蛋白酶,包括丝氨酸蛋白酶家族 S8、S10、S41 和金属蛋白酶家族 M20、M28、M43 以及降解角质层的分泌型丝氨酸蛋白酶 P II 和 P186,同时发现,P186 在捕食线虫过程中表达上调超过 40 倍,而 P II 则表达下调,这提示在真菌侵入线虫过程中 P186 是主要的侵染性蛋白酶,因此,P186 在侵入线虫中可能发挥了重要作用^[6]。为了揭示少孢节丛孢菌捕食线虫的分子机制,本研究克隆了少孢节丛孢菌丝氨酸蛋白酶 P186 基因,构建了 P186 基因的原核表达质粒,并在大肠杆菌中表达了重组蛋白 P186,为进一步研究 P186 蛋白的生物学功能和开发高效的生防制剂奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

捕食线虫性真菌-少孢节丛孢菌新疆分离株(*Arthrobotrys oligospora* XJ-A1)由石河子大学动物科技学院寄生虫实验室提供;小鼠抗少孢节丛孢菌胞外分泌性蛋白多克隆抗体由本研究室制备。*E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、表达载体 pET32a 均由为本实验室保存;真菌 RNA 提取试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、RT 试剂盒、pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;HRP 标记的兔抗鼠 IgG 购自康为世纪生物有限公司。

1.2 P186 基因特异性引物设计

根据 GenBank 中登录的 P186 基因序列,用 Primer 5 软件设计合成 1 对引物,上、下游引物分别引入 *Sac* I、*Hind* III 限制性内切酶位点,上游:5'-CGAGCTCATGCACTTTATACCTCTTGCCTCTC-3' (下

划线部分为 *Sac* I 酶切位点),下游:5'-CCC AAG CTT CTAATATGGGTAGGGTTGGTATTCCG-3' (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点),引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.3 P186 基因的克隆、序列测定及生物信息学分析

将少孢节丛孢菌分离株 XJ-A1 接种到 LMZ 发酵产酶培养基中,21 ℃ 于摇床(150 r/min)培养 6 d,然后低温离心收集菌丝,立即用液氮冷冻。然后用真菌 RNA 提取试剂盒进行 RNA 提取和纯化,然后用 RT 试剂盒反转录成 cDNA,并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件为:95 ℃ 5 min;94 ℃ 50 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 80 s,共 35 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收后与 pMD19-T 载体 4 ℃ 过夜连接,转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,通过 PCR 和 *Sac* I、*Hind* III 双酶切筛选重组质粒。将重组质粒送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。利用生物在线分析软件(<http://www.expasy.org/tools/>)对丝氨酸蛋白酶 P186 进行生物信息学分析。

1.4 原核表达质粒 pET32a-P186 的构建

用 *Sac* I 和 *Hind* III 分别对 pMD19-T-P186 和 pET32a 质粒进行双酶切,回收双酶切的 pET32a 载体片段和 P186 目的片段,然后在 T4 DNA 连接酶作用下 4 ℃ 连接过夜。连接产物转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,在氨苄抗性平板 37 ℃ 过夜培养,通过 PCR 和酶切方法筛选鉴定阳性克隆(命名为 pET32a-P186)。

1.5 目的蛋白的诱导表达

将构建的重组质粒 pET32a-P186 转化入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,经氨苄抗性筛选,挑取阳性克隆,接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 ℃ 培养至 OD_{600nm} 值达 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 ℃ 诱导 P186 的表达。

1.6 重组蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blot 分析鉴定

分别诱导 4、6 h 后收集菌体,然后进行重组菌的表达产物 SDS-PAGE 分析,并转移至硝酸纤维素膜上,以小鼠抗少孢节丛孢菌胞外分泌性蛋白多克隆抗体为一抗,HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 为二抗,进行 Western Blot 鉴定。

2 结果与分析

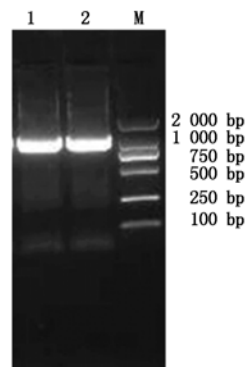
2.1 P186 基因的克隆

以少孢节丛孢菌提取的总 RNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明,PCR 扩增结果产物大小约为 1 200 bp,与 GenBank 中提

供的 *P186* 基因片段大小一致(图 1)。

2.2 测序结果及生物信息学分析

经测序, *P186* 基因全长 1 224 bp (此序列已提交 GenBank, 登录号为 KF830699), 编码 407 个氨基酸, 信号肽位于序列的第 1 ~ 21 位; 氨基酸序列的第 156 ~ 167 位、192 ~ 202 位、343 ~ 353 位分别是天冬氨酸(Asp₁₆₀)、组氨酸(His₁₉₂)、丝氨酸(Ser₃₄₅)活性位点所在区域, 属于 Subtilase 家族; 包括 2 个潜在的 N-联糖基化位点(Asn₂₄₉、Asn₃₄₂)及与底物结合的 S1 区(SBP) Ser₂₅₁ Ile₂₅₂ Gly₂₅₃ 和 Ala₂₇₇ Ala₂₇₈ Gly₂₇₉。与 GenBank 中少孢节丛孢菌 *P186* 基因的同源性为 96.5%, 但氨基酸的同源性为 100% (图 2)。



M. DNA 分子质量标准; 1, 2. RT-PCR 扩增产物。
M. DL2000 DNA Marker; 1, 2. RT-PCR amplified product.

图 1 *P186* 基因的 RT-PCR 扩增产物

Fig. 1 *P186* gene amplified by RT-PCR

| | |
|------|--|
| 1 | ATGCACCTTTATACCTCTTGCCTCTCTTCTCCCTTGCCTGCTCATCTCCAGTCGCGCTGACTTAACGTCTCGTGGCGGATCC |
| 1 | <u>M H F I P L A S L L P L A G L L L Q V A A</u> D L T V L G A G S |
| 91 | AAAGATAAAATCCAAACAGCTATATGTT GTACTTAAACCTCAACAAATCAGGCTCAGGTCGAGAACATACCCAGCGAATCAGCAAT |
| 31 | K D K I P N S Y I V V L K P S T N Q A Q V R E H T Q R I S N |
| 181 | TATCATACCGTCGAGCGCTACAGGAGCGTGGTGTGACCACTGGTATTCGTGGACAGTTTGATATCCAGAGCGTTAAGGGTTACACTGT |
| 61 | Y H T R R S L Q E R G V T T G I R G Q F D I Q S V K G Y T V |
| 271 | GAGTGTGACCATGGGACATTGAGTCAATCCTTAGCTCCCGAGAAGTCCAATATGTTGAGCAAGAGGCAAGACAAGGTACAGGTAACA |
| 91 | E C D H G T L S Q I L S S P E V Q Y V E Q E G K T K V Q V T |
| 361 | CAAAAACCTTCGACATGGGCGCTCTCTCGCATTTTCATGGAAAACCTGCCCAAGGCACCTTATTCGTATCGCTACCAGAATACATGGGCT |
| 121 | Q K P S T W G L S R I S W K T L P K A P Y S Y R Y Q N T W G |
| 451 | GGAAGAGGGACTACCATTTACATTGTGATAGCGGTGTCGAGTCTCACACAAAGGAATCGAAGCAAGAGCTACTTGGGGCTATAACGCC |
| 151 | G R G T T I Y I V D S G V R V S H K E F E A R A T W G Y N A |
| 541 | GTCCCGGCGAGCCCTAATACGGATAACACGCGCATGGTACTCATGTGCGCGTACTGCCGCGGAAAAACATATGGAGTTGGGAAATAT |
| 181 | V P G S P N T D N H G H G T H V A G T A A G K T Y G V A K Y |
| 631 | GCTCGAATCGTCCCGTAAAGGTCAATGGGATGATGGAAACCGGTCAGACTCATATACGCTTGCTGGGTGAATTACATCTCGAGGTC |
| 211 | A R I V A V K V I G D D G T G Q D S Y T L A G L N Y I S R V |
| 721 | GCTAAACCTGGCAAGAGCGTCTCAACATGTCATTGGTGGACGAAATCGGAAGCGTCAATGCTGCCGTAGAAAGCTCTCTACAAAAA |
| 241 | A K P G K S V V <u>N M S I G</u> G P K S E A V N A A V E A L Y K K |
| 811 | GGAATCGTCTGTGGCAGCGCTGGTAACGAAACGAAATGCGCGCTCTCTTCCCGAGCATCAGCACGTAGCGCCATCAACGTTGGA |
| 271 | G I V V V A A A G N E N E N A G L S S P A S A R S A I T V G |
| 901 | GCGACCGACGAACCGATACCGAGCAAGTTTCTCAACTTTGGCAGCATAGTCGATATCTTTGCTCCTGGGGTTAATATTCTAGTGG |
| 301 | A T D E T D T G A S F S N F G S I V D I F A P G V N I L S A |
| 991 | GATATTACTTCGGACACCGCAACAGATGGACAATGGAACTCGATGGCCTCGCCCATGTCGCAAGGCTTGGGCTTACTTTATCAGC |
| 331 | D I T S D T A T R L D <u>N G T S</u> M A S P H V A G L A A Y F I S |
| 1081 | AGCAGGACTACTTCCAGAGCCACTCAATATTCACAGCTTATTGATTACTTACTCTCAGAAGGGCTTGGTCAAAATCCCTGGACGTC |
| 361 | S R T T S Q S P L N I H S L F I T Y S Q K G L V K S P G P S |
| 1171 | CCAAACAGACTAGCTTACAATGGATGGGAAGCAATACCAACCTACCCATATTAG |
| 391 | P N R L A Y N G W D E Y Q P Y P Y * |

P186 含有的信号肽位于序列的第 1 ~ 21 位(波浪线标定字体); 天冬氨酸(Asp₁₆₀)、组氨酸(His₁₉₂)、丝氨酸(Ser₃₄₅)活性位点(加粗斜体); 蛋白酶催化功能区(阴影区域); 2 个潜在的 N 末端糖基化位点(双线标定字体); 底物结合的 S1 区(SBP)位置(边框标定字体)。

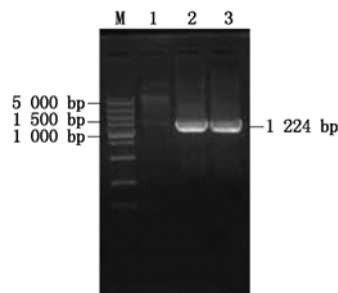
P186 contains the signal peptide sequence is located 1 to 21 (the wavy line marked font); The active sites(Asp₁₆₀, His₁₉₂ and Ser₃₄₅) are marked on the bold italics; Protease catalytic domains (shadow area); Two potential N-terminal glycosylation sites (double lines marked font); Substrate-binding S1 pockets are marked on frame.

图 2 少孢节丛孢菌丝氨酸蛋白酶 *P186* 基因序列和氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and amino acids sequence of serine protease of *Arthrobotrys oligospora*

2.3 重组原核表达载体 pET32a-*P186* 的双酶切鉴定

目的基因与 pET32a 表达载体连接后构建了 pET32a-*P186* 重组表达质粒,经 PCR 和双酶切鉴定,得到大小约为 1.2 kb 的插入片段,与预期一致(图 3)。测序结果表明,插入片段为 1 224 bp,是所需的基因片段,而且开放阅读框正确,可以表达重组蛋白。



M. DNA 分子质量标准;1. pET32a-*P186* 重组质粒的双酶切产物;2, 3. pET32a-*P186* 重组质粒的 PCR 产物。

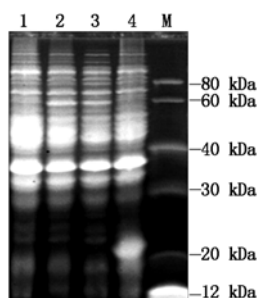
M. DL5000 DNA Marker;1. Product from recombinant pET32a-*P186* digested with *Sac* I and *Hind* III;
2, 3. PCR amplified product from pET32a-*P186*.

图 3 重组质粒 pET32a-*P186* 的酶切和 PCR 鉴定

Fig.3 Restriction enzyme analysis and PCR identification of the recombinant plasmid pET32a-*P186*

2.4 重组目的蛋白 P186 的诱导表达

将重组质粒 pET32a-*P186* 阳性菌落,接种于含氨苄的 LB 培养基中,加入 IPTG 诱导 4,6 h 后分别提取蛋白,经 SDS-PAGE 电泳分析表明,在 62 kDa 处出现融合蛋白带,分子量与预期值相同(图 4)。



M. 蛋白分子质量标准;1. 未加 IPTG 诱导的重组菌;2. 重组载体 pET32a-*P186* 诱导 4 h;3. 重组载体 pET32a-*P186* 诱导 6 h;4. pET32a 空载体。

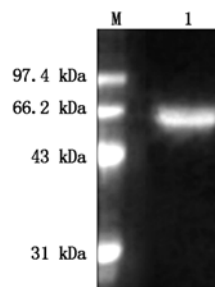
M. The standards of protein molecular weight; 1. The recombinant bacteria does not add IPTG induction; 2. pET32a-*P186* of recombinant vector induced by 4 hours; 3. pET32a-*P186* of recombinant vector induced by 6 hours; 4. Empty vector of pET32a.

图 4 重组目的蛋白 P186 SDS-PAGE 分析结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis results of recombinant protein P186

2.5 重组蛋白 Western Blot 鉴定

重组工程菌的表达产物经 SDS-PAGE 分析,发现在相对分子质量约 62 kDa 处可见一条蛋白带,表达量占菌体总蛋白的 18%。Western Blot 鉴定结果显示,表达的融合蛋白能与小鼠抗少孢节丛孢菌胞外分泌性蛋白多克隆抗体发生免疫学反应(图 5)。



M. 蛋白质分子质量标准;1. 用 IPTG 诱导表达的 pET32a-*P186* 蛋白。

M. Protein molecular weight Marker; 1. Protein of pET32a-*P186* expression was induced with IPTG.

图 5 重组蛋白 P186 的 Western Blot 分析

Fig.5 Western Blot analysis of recombinant protein P186

3 讨论

寄生性线虫对畜牧业的生产发展可以产生巨大的影响^[7]。在过去的 50 年里,化学杀虫剂被广泛应用于动物线虫的控制,但由于耐药虫株的不断产生、药物残留和环境问题日益凸显,使它们的使用越来越受限制。食线虫性真菌是线虫的自然天敌,它们能捕食活的线虫和寄生在虫卵里,把它们当作自己的营养来源,因此,这种生物防控方法日益受到各国学者的广泛关注^[8-9]。然而,由于目前对食线虫性真菌捕食和侵入线虫的分子机制尚不清楚,在很大程度上制约了食线虫真菌生物防控制剂的研发。

捕食线虫性真菌侵染线虫时必须先穿透线虫的体壁屏障才能寄生,在此过程中需要其分泌的胞外蛋白酶的参与,其中具有降解线虫角质层的丝氨酸蛋白酶在真菌侵染线虫过程中发挥了重要作用^[9]。Zhao 等^[10]从少孢节丛孢菌云南分离株分离纯化了一种丝氨酸蛋白酶 Aoz1,与 P II 具有较高的同源性(97%),该中性蛋白酶在加有明胶的培养基中表达量明显增加,能固定线虫和降解线虫表皮。在此之后,又分离了几种食线虫真菌的胞外丝氨酸蛋白酶: Acl、Dsl、Dvl、Mlx、Mcl、PrC、Ver112 等,这些丝氨酸蛋白酶均参与真菌侵染线虫的几个阶段:激活其他酶系,分解胶原质含量丰富的线虫体壁,降解线虫体内的蛋白质;而且能够被线虫角质膜碎片、其他可溶或不溶的蛋白质诱导产生^[11-12]。Yang 等^[12-13]发现 *A. oligospora* 经线虫萃取物诱导 10 h 时,其分泌的丝氨酸蛋白酶 P12 和 P186 转录水平分别增加了 5.9、23.4 倍;用同源重组方法从 *P186* 基因中缺失 107 bp 后,与野毒株相比构建的缺失株的表型没有呈现出差异,但是它的杀线虫活性明显降低,基因缺失株与线虫作用 24 h 后,线虫杀灭率削弱 24% ~ 32%,表明 P186 在 *A. oligospora* 侵染线虫过程中起着比较主要的作用;而缺失 *P11* 基因比缺失 *P186* 基

因对 *A. oligospora* 致病力的影响要相对有限。

本研究首次对 P186 基因进行了克隆及序列测定,并构建了 P186 基因的原核载体 pET32a-P186,对该基因进行了诱导表达鉴定。诱导后能够表达分子量 62 kDa 的 P186 重组蛋白,与预期大小相符。Western Blot 显示该蛋白能与小鼠抗 P186 多克隆抗体发生免疫学反应。为今后进一步研究丝氨酸蛋白酶 P186 的生物学功能奠定了前期基础。

参考文献:

- [1] Paraud C, Chartier C. Biological control of infective larvae of a gastro-intestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces [J]. Parasitology Research, 2003, 89(2): 102 – 106.
- [2] Terrill T H, Larsen M, Samples O, et al. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies [J]. Veterinary Parasitology, 2004, 120(4): 285 – 296.
- [3] Niu X M, Zhang K Q. *Arthrobotrys oligospora*: a model organism for understanding the interaction between fungi and nematodes [J]. Mycology, 2011, 2(2): 59 – 78.
- [4] Liang L M, Wu H, Liu Z H, et al. Proteomic and transcriptional analyses of *Arthrobotrys oligospora* cell wall related proteins reveal complexity of fungal virulence against nematodes [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(19): 8683 – 8692.
- [5] Tunlid A, Rosen S, Ek B O, et al. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* [J]. Microbiology, 1994, 140(7): 1687 – 1695.
- [6] Andersson K M, Meerupati T, Levander F, et al. Proteome of the nematode-trapping cells of the fungus *Monacrosporium haptotylum* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(16): 4993 – 5004.
- [7] 孟庆玲, 王为升, 王俊伟, 等. 少孢节丛孢菌的分离鉴定及捕食线虫活性研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(3): 189 – 193.
- [8] Dijksterhuis J, Veenhuis M, Harder W, et al. Nematophagous fungi: physiological aspects and structure-function relationships [J]. Advances in Microbial Physiology, 1994, 36: 111 – 144.
- [9] Yang J, Huang X, Tian B, et al. Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity [J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(15): 1123 – 1128.
- [10] Minglian Z, Minghe M, Keqin Z. Characterization of a neutral serine protease and its full-length cDNA from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* [J]. Mycologia, 2004, 96(1): 16 – 22.
- [11] Yang J K, Tian B Y, Liang L M, et al. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 75(1): 21 – 31.
- [12] Huang X W, Zhao N H, Zhang K Q. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host [J]. Research in Microbiology, 2004, 155(10): 811 – 816.
- [13] Yang J K, Wang L, Ji X L, et al. Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into Nematode-Trap formation [J]. PLOS Pathogens, 2011, 7(9): e1002179.