

研究报告

Research Report

谢瓦氏曲霉间型变种 *YchF* 基因 cDNA 全长克隆及序列分析

李孝霞^{1,2} 谭玉梅^{2,3} 刘永翔^{2,3} 刘作易^{2,4*}

1 贵州大学, 贵阳, 550025; 2 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵阳, 550006; 3 贵州省生物技术研究, 贵阳, 550006; 4 贵州省农业科学院, 贵阳, 550006

* 通讯作者, liuzuoyi@yahoo.com.cn

摘要 从谢瓦氏曲霉间型变种抑制性差减杂交(SSH)文库中,筛选到一个子囊孢子时期差异表达的序列标签 A0128.860,以其序列为模板设计特异性引物,利用 RT-PCR 及 RACE 技术克隆获得了该基因的全长 cDNA,命名为 *eYchF*。生物信息学分析显示,该基因包含一个 1 182 bp 的完整开放阅读框(ORF),编码 393 个氨基酸,相对分子质量为 43.466 9 kD,预测的理论等电点为 6.99,包括一个保守的 G domain (guanine nucleotide-binding domain)和一个 TGS (ThrRS, GTPase, SpoT) domain,为疏水蛋白。序列同源性分析表明:该基因与棒曲霉(*Aspergillus clavatus* NRRL 1)的 GTP 结合蛋白 YchF 相似度为 84%,谢瓦氏曲霉间型变种 *YchF* 基因的克隆及生物信息学分析为 *YchF* 的进一步研究奠定了基础。

关键词 谢瓦氏曲霉间型变种, *YchF* 基因, RACE

Cloning and Sequence Analysis of the Full Length *YchF* cDNA in *Aspergillus chevalieri* var. *intermedius*

Li Xiaoxia^{1,2} Tan Yumei^{2,3} Liu Yongxiang^{2,3} Liu Zuoyi^{2,4*}

1 Guizhou University, Guiyang, 550025; 2 Guizhou Key Laboratory for Agricultural Biotechnology, Guiyang, 550006; 3 Guizhou Institute of Biotechnology, Guiyang, 550006; 4 Guizhou Academy of Agricultural Science, Guiyang, 550006

* Corresponding author, liuzuoyi@yahoo.com.cn

DOI: 10.3969/gab.032.000185

Abstract TAn expression sequence tag (EST), A0128.860, which is differentially expressed in the period of ascospore, was selected from the Suppression Subtractive Hybridization (SSH) library. The complete cDNA of *eYchF* gene was cloned by RT-PCR and RACE with primers designed based on the sequence of A0128.860. Analysis of bioinformatics showed that the gene contains a uninterrupted open reading frame of 1 182 bp and encoded a hydrophobic protein of 393 amino acid residues containing a G domain and a TGS domain. The estimated molecular weight and isoelectric point of the putative protein were 43.466 9 kD and 6.99, respectively. Analysis of the nucleotide sequence indicated that it should have the similarity of 84% with *Aspergillus clavatus* NRRL 1 GTP-binding protein YchF. Molecular cloning and bioinformatic analysis of *YchF* in *Aspergillus chevalieri* var. *intermedius* will be helpful for the further analysis of *YchF*.

Keywords *Aspergillus chevalieri* var. *intermedius*, *YchF* gene, RACE

丝状真菌中产孢机制的研究主要集中在两种模式真菌构巢曲霉和粗糙链孢菌上,并且对其无性产孢的机理研究得比较清楚,而对有性产孢的报道则比较少。由于构巢曲霉等大部分丝状真菌在自然及诱导条件下都很难得到纯的有性发育阶段,而与谢瓦氏曲霉间型变种(*Aspergillus chevalieri* var. *intermedius*)相比,

其它真菌具有一些独特的优势,该菌在不同的渗透压条件下产生两种截然不同的孢子,在低渗透压下只产生子囊孢子,随着渗透压增大,子囊孢子产生量逐渐减少,最终只产生分生孢子(刘作易等, 1991, 西南农业学报, 4(1): 73-76),因此是研究产孢机制的良好材料。

基金项目 本研究由黔农科院专项([2011] 037 号)资助

YchF 是一个高度保守的 GTPase, 属于 Obg 蛋白家族。该家族的蛋白参与了压力应答、DNA 复制、孢子形成以及形态发育等(Michel, 2005)。在原核生物中 *YchF* 功能相当于依赖 GTP 的翻译因子, 作为核蛋白复合体的一部分参与翻译过程(Caldon and March, 2003)。在酵母中与 *YchF* 同源的 YBR025c 被 H_2O_2 诱导表达(Godon et al., 1998), 在细胞应对氧压应激反应时, 通过与 26S 蛋白酶体相互作用参与受损蛋白质的降解(Verstraeten et al., 2011)。同源的水稻 *YchF1* (Cheung et al., 2008) 和人类 OLA 1 (张佳炜, 2009) 的功能分别是作为压力应答和细胞抗氧化反应制的一个负调控因子。而本研究所采用的材料谢瓦氏曲霉间型变种的产孢也是通过渗透压为主导、温度和光照等外界环境压力所调控的, 所以推测此类蛋白有可能在产孢调控中发挥一定作用, 且目前 *YchF* 在丝状真菌中的功能方面的信息几乎是空白, 因此该基因的研究具有十分重要的意义。

谢瓦氏曲霉间型变种是茯砖茶加工“发花”过程中的优势菌种, 其数量和质量常被用来判断茯砖茶品质的优劣。目前国内对于该菌的研究仅限于生理、生化特性, 为了达到改善茯砖茶品质, 提高其经济价值的目的, 就必须深入理解谢瓦氏曲霉间型变种产孢的分子机制, 以便人工有效控制茯砖茶的品质。为深入了解谢瓦氏曲霉间型变种产孢的机制, 分离该菌差异表达的基因就成为一种有效的手段。本研究从已构建的谢瓦氏曲霉间型变种抑制性差减杂交 (SSH) 文库中, 筛选出一个子囊孢子时期差异表达的基因 *YchF* 的 cDNA 片段, 利用 RT-PCR、RACE 及生物信息学方法得到该基因 cDNA 的全长序列并对其进行了初步分析。该实验成果为深入研究该基因在谢瓦氏曲霉间型变种中与有性发育的关系奠定基础。

1 结果与分析

1.1 *YchF* 基因的 cDNA 全长扩增

所提 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 28S 及 18S RNA 条带清晰, 表明所提 RNA 完整, 符合后续实验要求。利用 RACE 技术扩增 *YchF* 基因的 3' 和 5' 末端, 并将扩增得到的特异性条带进行回收(图 1; 图 2)。

1.2 *YchF* 基因 cDNA 的测序及拼接

根据 *YchF* 基因 5' 和 3' 末端片段测序结果, 利用 Bioedit 软件对这两个片段以及库中 EST 片段进行拼接得到 *YchF* 基因的全长 cDNA 序列。该 cDNA

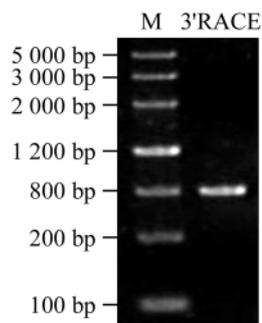


图 1 *YchF* 基因 3' RACE 结果

Figure 1 3' RACE result of *YchF* gene

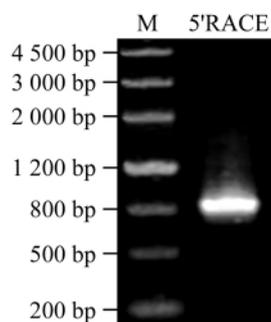


图 2 *YchF* 基因 5' RACE 结果

Figure 2 5' RACE result of *YchF* gene

全长 1367 bp, 并用 Bioedit 软件对该基因 cDNA 的开放阅读框(open reading frame, ORF)进行预测, 结果显示该基因的 ORF 有 1182 bp, 含 24 个 polyA, 5' 非编码区有 57 bp, 3' 非翻译区有 128 bp, 开放阅读框的起始位点在 58 bp 处, 终止位点在 1237 bp 处, 编码 393 个氨基酸残基。

1.3 谢瓦氏曲霉间型变种 *eYchF* 基因及其编码蛋白质的生物信息学分析

Blast 核苷酸序列同源性分析表明 *eYchF* 与棒曲霉(*Aspergillus clavatus* NRRL 1) 的 GTP 结合蛋白 *YchF* 相似度为 84%。该基因含有一个长为 1182 bp 的完整的 ORF, 利用 softberry 对该基因 ORF 编码的氨基酸序列进行推导结果表明, 该基因的人 ORF 编码一个由 393 个氨基酸组成的蛋白(图 3), 该蛋白分子量为 43.4669 kD, 理论等电点为 6.99, 负电荷氨基酸(Asp+Glu)总数为 54, 正电荷氨基酸(Arg+Lys)总数为 54, 不稳定参数为 33.01, 属于稳定蛋白。推测该蛋白位于细胞质中。保守结构域分析发现 *eYchF* 基因编码的 *YchF* 蛋白含有一个 G domain 和一个 TGS domain (图 4), 与曲霉属其它种的 *YchF* 的结构域相符合, 所以将谢瓦氏曲霉间型变种 *YchF* 基因命名为 *eYchF*。

```

1 : atgcccccaagaagggccccctgcaagaaaaggctcctgctgggcccacctggtaacaacctgaagagtggatcgtt
M P P K K A P V Q E K V L L G R P G N N L K S G I V
79 : ggtctcgccaacgctggcaagtcacgctcttccaggccattaccaagtcgctcgctgggtaacccccgcaacttcccc
G L A N V G K S T L F Q A I T K S S L G N P A N F P
157 : tatgccaccatcaacccccgaagaagcccgtgctgctgctcccgatgagcgttcgactggctctgctcccactacaag
Y A T I N P E E A R V V V P D E R F D W L C S H Y K
235 : cccaagtcgaggtccccgccaacttgactgtgtatgatatcgccggtctgacccgtggtgccctcgactggtgccggt
P K S E V P A N L T V Y D I A G L T R G A S T G A G
313 : ctgggtaactcttctgtgctgcacatccgtgcccgcgatgccatcttccaggctgctcggtgcttcgatgatgctgag
L G N S F L S H I R A V D A I F Q V V R C F D D A E
391 : attattcacgctgaggggtgacgtcgacctgttcgggatttgactatcatcaacgaggagctgcggtcaaggatatt
I I H V E G D V D P V R D L T I I N E E L R I K D I
469 : gagtttgcgagaagggcgttgagaactgaagaagcagaccgctgctgggtgagactttggagatgaagaagctc
E F V E K A L E N L K K Q T R R G G Q T L E M K K L
547 : agagaggaggaggccaccgtggcccagtgcttgagtggtgacaggagggtcacgatgtccgcaagggtgactggggc
R E E E A T V A R V L E W L Q E G H D V R K G D W G
625 : ccgaaagaggtcgaggtcatcaaccctcttctctcactgccaagcccgtgctctacctcgtaaccttagcgag
P K E V E V I N P L F L L T A K P V V Y L V N L S E
703 : aaggactacattcgccaagaagaacaagtaccttcccaagggttgcgaatggatcaaggagaactctccggctcctcg
K D Y I R Q K N K Y L P K V F E W I K E N S P G P L
781 : atccccatctctgcttcttggaggagcgtctggctctcatgtctgatgacgcccggctgaggaggagtgcaagaag
I P I S A S F E E R L A L M S D D A A A E E E C K K
859 : cttaacaccaagctggtcttcccaaggctcatcaccactatgcgctcaggtttgaaacctgtccagtttcttccact
L N T K S G L P K V I T T M R Q A L N L S S F F T T
937 : ggtgcggtgaagtccgccaagtgactatccgaaagggtatcaaggcaccagctgccgcccgtgctcattcacactgac
G A D E V R Q W V V Y N Y T T L R E Y G D E G A V K
1015 : ttgaaagactttcatccaggctgttgtctacaactacaccactctgcgagtagcggtagcgaaggtgcccgtcaag
A A G K I M T K T I R K G I K A P A A A G V I H T D
1093 : gccgcccgaagatcatgaccaagggcaaggattacgccgtagaggacggtgatcttctgctcatcaaggcccgtgct
F E K T F I Q A G K D Y A V E D G D I L L I K A G A
1171 : gccaaagggttaa
A K G *
    
```

图3 *YchF* 基因序列及推导的氨基酸序列
Figure 3 Gene sequence and deduced amino acid sequence of *YchF*

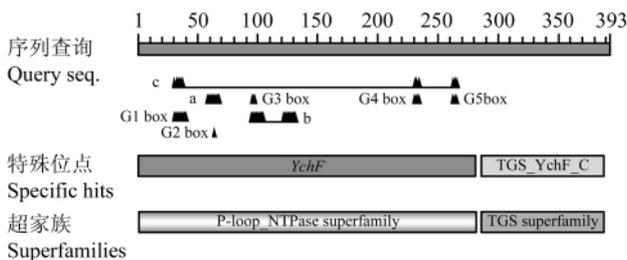


图4 *YchF* 保守结构域分析
注: a: 开关 区域; b: 开关 区域; c: 三磷酸鸟苷/Mg²⁺ 结合位点
Figure 4 Analysis of conserved domain of *YchF*
Note: a: Switch region; b: Switch region; c: Guanosine triphosphate/Mg²⁺ binding sites

G domain 由 G1、G2、G3、G4 和 G5 这 5 个不同的序列构成,而另一个 TGS domain 的功能目前尚不明确。

用 ProtScale 进行的疏水性 / 亲水性分析: 脂肪族氨基酸指数(aliphatic index)为 92.32, *YchF* 蛋白的平均亲水系数(GRAVY)为 -0.282, 因此, 该蛋白为亲水蛋白(图 5)。

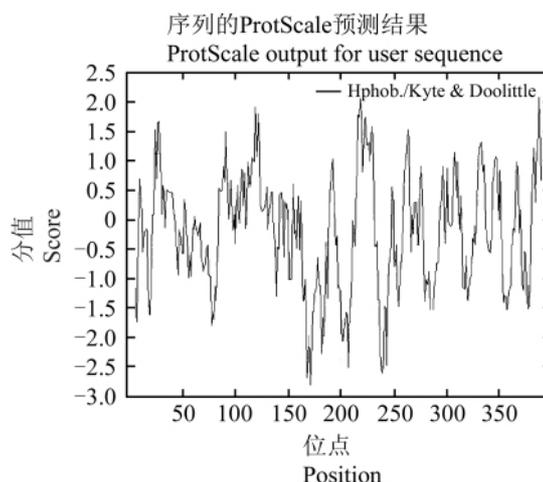


图5 *YchF* 蛋白的亲水性 / 疏水性分析
注: 横坐标为编码蛋白的氨基酸顺序; 纵坐标为亲疏水值; 0 值以上的部分表示疏水区域; 0 值以下的部分表示亲水区域
Figure 5 Hydrophilicity/hydrophobicity profile of *YchF* protein
Note: Amino acid position is plotted on the x-axis beginning with the N-terminus; Hydrophilicity score on the y-axis; Regions above a hydrophobicity score of zero are hydrophobic; Regions below a hydrophobicity score of zero are hydrophilic

2 讨论

通过对 *YchF* 序列的生物信息学分析,发现其作为一个 GTPase,从保守结构域上看,含有一个定位在 N 端的 G domain 和一个定位于 C 端的 TGS domain。G domain 含有从 G1 到 G5 五个特征序列,参与核苷酸的结合及水解(Sprang et al., 1997)。这五个序列在所有的 GTPase 中都相对比较保守。G1 序列 (GLANVGKS)也被称为 P-loop (Saraste et al., 1990), G2 也被称为 switch,其特征是一个保守的苏氨酸 T, G3 (DIAG)序列被称为 switch, switch 和 switch,发挥着分子开关的作用,与 GTP 结合时,蛋白被激活,进而发挥功能;与 GDP 结合时,蛋白就失活(Vetter and Wittinghofer, 2001)。G4 序列为 NLSE, G5 序列为 ISA。这些保守结构特征证实扩增序列正确,为今后对 *YchF* 的进一步研究奠定了基础。

近年来,由于假阳性率低、特异性较高、背景低等优点(Wan et al., 2002; Rebrikov et al., 2004)抑制性差减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)被广泛应用于研究基因的差异表达(Huang et al., 2007)。而本研究是从谢瓦氏曲霉间型变种抑制性差减杂交(SSH)文库中筛选出一个基因编号为 A0128.860 的 EST 序列,该基因为子囊孢子时期差异表达,推测该基因可能在谢瓦氏曲霉间型变种的有性发育过程中发挥一定的作用,因此利用同源重组敲出谢瓦氏曲霉间型变种的 *YchF* 基因,看 $\Delta YchF$ 突变体对谢瓦氏曲霉间型变种产孢过程究竟产生什么影响,成为我们下一步研究的目的。

3 材料与方法

3.1 菌株、培养基及试剂

谢瓦氏曲霉间型变种(菌株 GZAAS20.1004)由贵州省农业生物技术重点实验室保存, *E. coli* 感受态菌株 DH5 α 购于美国 Invitrogen 公司。

固体培养基: Malt Extract 20 g、Yeast Extract 5 g、蔗糖 30 g、NaCl 50 g、琼脂 12 g、蒸馏水 1 000 mL。液体培养基: Malt Extract 20 g、Yeast Extract 5 g、蔗糖 30 g、NaCl 50 g、蒸馏水 1 000 mL。

Trizol RNA 提取试剂盒、pMD19-T 载体及 PCR 试剂购于大连宝生物公司; 3' RACE 和 5' RACE 试剂盒购自 Clontech 公司; 离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根公司; 引物合成由上海捷瑞生物公司完成。

3.2 菌丝培养及诱导产孢

接种子囊孢子悬液于液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C, 220 r/min 摇床培养 6 d 左右。收集菌丝,再转接于固体培养基培养 18 h 诱导产孢,收集产孢初期的菌丝体备用。

3.3 RNA 提取

按照 TaKaRa 公司 RNAliso Plus 试剂盒说明书进行谢瓦氏曲霉间型变种总 RNA 的提取。

3.4 *YchF* 基因 cDNA 全长的克隆

3.4.1 反转录及 3' RACE 和 5' RACE cDNA 的扩增

反转录以谢瓦氏曲霉间型变种产子囊孢子初期的总 RNA 为模板,按照 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行合成。

从本实验室已构建的谢瓦氏曲霉间型变种抑制性差减杂交(SSH)文库中,筛选一个表达序列标签 A0128.860,以其序列为模板,利用软件 Primer Premier 5.0 设计基因特异性引物(gene specific primer, GSP)及其巢式引物(Nested GSP, NGSP)序列,分别用于 3' RACE 和 5' RACE 的扩增。引物信息如下:

GSP1 :5'-CCGTCGTGGTGGTCAGACTTTGGA G-3'; NGSP1 :5'-AGGAGGGTACGATGTCCGCA AG-3'; GSP2 :5'-CTCGCTAAGGTTGACGAGGTA ACG-3'; NGSP2 :5'-CCAGTCACCCTTGCGGACAT CGT-3'。

通用引物 10 \times Universal Primer A Mix (UPM)由试剂盒提供,基因扩增操作均按 Clontech 公司的 SMARTer RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。反应体系(50 μ L) 3'/5'-RACE-Ready cDNA 3 μ L, 2 \times Taq PCR MasterMix 25 μ L, 10 \times UPM 5 μ L, ddH₂O 15 μ L, GSP 引物 2 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环。

3.4.2 PCR产物克隆测序

扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后,胶回收,然后克隆到 pMD-19T 载体,并转到 *E. coli* DH5 α 感受态中,筛选重组子,菌落 PCR 验证后送北京诺赛基因公司测序。

3.4.3 *YchF* 基因全长拼接及生物信息学分析

根据 *YchF* 基因 5' RACE 和 3' RACE 测序结果,利用 Bioedit 软件对这两个片段以及库中 EST 片段进行拼接,将拼接得到的 *YchF* 基因的 cDNA 的全长

序列用 Bioedit 软件和 ORF finder 进行 ORF 的预测。并用在线数据库(<http://cn.expasy.org/tools/>)分析谢瓦氏曲霉间型变种 *YchF* 基因的 cDNA 的全长序列的性质,推导该种的 *YchF* 的氨基酸序列。

作者贡献

李孝霞是本研究的实验设计和实验研究的执行人;李孝霞及谭玉梅完成数据分析和论文初稿的写作,刘永翔参与实验设计和试验结果分析,刘作易是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析及论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究得到了黔农科院专项([2011] 037 号)的资助。作者感谢贵州省农业生物技术重点实验室的所有工作人员以及研究生同学在日常的工作和学习中给予的帮助和关心。

参考文献

- Caldon C.E., and March P.E., 2003, Function of the universally conserved bacterial GTPases, *Curr. Opin. Microbiol.*, 6(2): 135-139
- Cheung M.Y., Zeng N.Y., Tong S.W., Li W.Y., Xue Y., Zhao K. J., Wang C., Zhang Q., Fu Y., Sun Z., Sun S.S., and Lam H. M., 2008, Constitutive expression of a rice GTPase-activating protein induces defense responses, *New Phytol.*, 179 (2): 530-545
- Godon C., Lagniel G., Lee J., Buhler J.M., Kieffer S., Perrot M., Boucherie H., Toledano M.B., and Labarre J., 1998, The H₂O₂

- stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, 273 (35): 22480-22489
- Huang X., Li Y., Niu Q., and Zhang K., 2007, Suppression subtractive hybridization (SSH) and its modifications in microbiological research, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76 (4): 753-760
- Michel B., 2005, obg/CtgA, a signaling protein that controls replication, translation, and morphological development, *Dev. Cell*, 8(3): 300-301
- Rebrikov D.V., Desai S.M., Siebert P.D., and Lukyanov S.A., 2004, Suppression subtractive hybridization, *Methods Mol. Biol.*, 258: 107-134
- Saraste M., Sibbald E.R., and Wittinghofer A., 1990, The P-loop—a common motif in ATP-and GTP-binding proteins, *Trends Biochem. Sci.*, 15(11): 430-434
- Sprang S.R., 1997, G protein mechanisms: Insights from structural analysis, *Annu. Rev. Biochem.*, 66: 639-678
- Verstraeten N., Fauvart M., Versées W., and Michiels J., 2011, The universally conserved prokaryotic GTPases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 75(3): 507-542
- Vetter I.R., and Wittinghofer A., 2001, The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions, *Science*, 294(5545): 1299-1304
- Wan J., Wright M.B., Li C., Flament A., and Lindpaintner K., 2002, Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes, *BMC Genomics*, 3(1): 12
- Zhang J.W., 2009, Functional characterizations of the gene product-*OLAI*, Dissertation for Ph.D., College of Medicine, Zhejiang University, Supervisors: Zheng S., and Shi Z.Z., pp. 67-72 (张佳炜, 2009, 基因 *OLAI* (obg like ATPase 1)的蛋白功能研究, 博士学位论文, 浙江大学医学院, 导师: 郑树, 施正政, pp.67-72)