

玫烟色棒束孢几丁质酶(*Ifuchit2*) 结构基因 及上游序列的克隆与分析

孟祥云¹, 谢翎², 黄勃^{1*}

(1. 安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 合肥 230036; 2. 安庆师范学院生命科学学院, 安庆 246011)

摘要: 玫烟色棒束孢作为一类可致昆虫死亡的虫生真菌, 是生物防治中极具开发应用潜力的种类。运用 PCR 技术与 DNA 步移技术, 从玫烟色棒束孢中克隆得到几丁质酶的结构基因及其上游序列。结构基因总长 1 425 bp, 扩出的结构基因 DNA 与其 cDNA 比较含有 3 个内含子, 分别位于距离起始密码子的 121 碱基至 176 碱基处, 277 碱基至 331 碱基处和 380 碱基至 431 碱基处, 大小分别为 54 bp、53 bp 和 51 bp。在玫烟色棒束孢几丁质酶 *Ifuchit2* 结构基因的基础上, 克隆得到了其上游序列。该基因上游序列大小为 1 794 bp, 其中有 209 bp 与该基因 cDNA 序列相互重叠。序列分析表明, 玫烟色棒束孢几丁质酶 *Ifuchit2* 上游序列中, 含有真核生物基因典型的 TATA-盒, 以及多个高度保守的潜在转录因子结合位点, 如 Oct1、GATA-1、GATA-2 和 CdxA 等。另外, 该上游序列还存在一些特异的应答元件, 如热激应答元件 (HSE)、胁迫应答元件 (STRE) 等。

关键词: 基因步移; 上游调控序列; 应答元件; 结构基因

中图分类号: S476.12

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)04-0582-05

Cloning and sequence analysis of structural gene and upstream sequence of chitinases (*Ifuchit2*) from *Isaria fumosorosea*

MENG Xiang-yun¹, XIE Ling², HUANG Bo¹

(1. Anhui Provincial Key Laboratory for Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Life Sciences, Anqing Teachers' College, Anqing 246011)

Abstract: *Isaria fumosorosea* is a kind of entomogenous fungi causing insect death with great potentials of exploitation and application for biological control. The structural gene of chitinases, with 1 425 bp, was cloned from *Isaria fumosorosea*, and the amplified structural gene have three introns compared with its cDNA. In the current study, the upstream sequence of chitinases (*Ifuchit2*) from *Isaria fumosorosea* was cloned by genome walking based on its structural gene. The obtained upstream sequence was 1 794 bp, and 209 bp was overlapped with its cDNA sequences. The sequence analysis indicated that the upstream sequence has a typical eukaryotic gene TATA-box of several hidden highly conserved transcription factor binding sites, such as Oct1, GATA-1, GATA-2, CdxA and contains some specific response elements, such as the heat responsive element (HSE), stress response elements (STRE).

Key words: genome walking; upstream regulation sequence; response element; structural gene

昆虫病原真菌是昆虫病原微生物中最大的一个类群, 寄主极为广泛。在害虫自然种群的控制和害虫的微生物防治中起着举足轻重的作用^[1]。昆虫病原真菌主要通过穿透昆虫体壁而侵入寄主。在昆虫的表皮中, 几丁质镶嵌于蛋白质基质中, 是这类真

菌的最初侵染和侵入的位点。昆虫病原真菌依靠酶解作用, 产生一系列的胞外酶(如蛋白酶、几丁质酶、脂酶等)降解昆虫体壁, 以便菌丝的进入^[2]。几丁质酶作为一类诱导酶, 既能在穿透寄主体壁时表达, 也能在以昆虫体壁为唯一碳氮源的培养基中

收稿日期: 2011-03-10

基金项目: 国家“863”项目(2006AA10A212)和安徽省级自然科学基金重点项目(TD200708)共同资助。

作者简介: 孟祥云, 女, 硕士研究生。

* 通讯作者: 黄勃, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: bhuang@ahau.edu.cn

表达, 是虫生真菌在侵染昆虫过程中产生的重要水解酶类^[3]。近年来对昆虫病原真菌毒力基因的研究发现, 通常同一菌株往往产生几种几丁质酶, 分别由不同的基因编码产生, 或由相同基因编码的前体酶蛋白通过不同方式的剪切产生^[4]。例如: 从球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌株中就克隆到 2 个几丁质酶基因 *Bbchit1* (AY145440) 和 *Bbchit2* (AY147011)^[5], 同样从蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* 菌株 (DAOM 175104) 也获得了预测分子量分别为 40.93 kDa 和 45.95 kDa 的两个几丁质酶^[6]。在金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 菌株 (ARSEF324) 中也克隆得到 *Chi2*(AJ293217) 和 *Chi3*(AJ293218) 2 个几丁质酶基因。通过 Blast 对保守区进行预测, 发现 *Ifuchit2* 几丁质酶基因也含有几丁质的活性位点 (DGIDIDWE) 和结合区域 (SIGG), 属于糖基水解酶 18 家族。

玫烟色棒束孢(*Isaria fumosorosea*)作为一种常见的昆虫病原真菌, 被广泛用于生物防治^[7]。本试验在对玫烟色棒束孢中几丁质酶 cDNA 基因研究的基础上, 利用 PCR 技术与基因步移法对几丁质酶 (*Ifuchit2*) 结构基因和上游序列进行了克隆, 并对结构基因中内含子及上游序列中的启动子顺式调控元件以及一些重要的转录因子结合位点进行了分析。现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源及试剂

供试的玫烟色棒束孢 RCEF3304 菌株由安徽农业大学微生物防治省重点实验室分离、保存, 其寄主为双翅目蛹, 采自江西庐山。

TaqDNA 聚合酶、pMD18- T 载体、DNA 胶回收试剂盒及 DNA 步移试剂盒均购自大连宝生物公司, 引物合成和测序分别由上海生工和北京六合生物技术有限公司完成。其他常规试剂均为国产。

1.2 玫烟色棒束孢菌丝的培养获得

取玫烟色棒束孢新鲜孢子悬浮液 0.5 mL, 涂布于铺有灭菌玻璃纸的 SDAY 平板上, 用涂棒涂抹均匀, 放入 25℃ 培养箱内培养 4 d。

1.3 玫烟色棒束孢基因组 DNA 的提取

取 0.2 g 菌丝分别采用 CTAB 法^[8]和氯化苄法^[9]提取玫烟色棒束孢基因组 DNA, 比较 2 种方法的提取效果, 确定最佳方法。

1.4 玫烟色棒束孢几丁质酶结构基因的克隆

根据已知的玫烟色棒束孢几丁质酶 (*Ifuchit2*) cDNA 序列, 在 5' 与 3' 端设计特异引物 Chitin-up 和

Chitin-down。

Chitin-up: 5'ATGCTGGGTTTCCTCAGGAAATCAATCGCTACGGTCG 3'

Chitin-down: 5'ACTATTCCTGATATTGTCGA ACTTC 3'

反应体系(25 μL)为: ddH₂O 18.5 μL, 模板 1 μL, dNTP (10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL, Chitin-up 和 Chitin-down (10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, Dream 酶 0.5 μL, 10×PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μL。

PCR 反应参数: 95℃ 预变性 5 min, 然后经过 35 个循环 (95℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 90 s), 72℃ 延伸 10 min 结束反应。

1.5 DNA 步移法扩增玫烟色棒束孢几丁质酶基因上游序列

根据获得的玫烟色棒束孢几丁质酶基因 *Ifuchit2* (GenBank 登录号:HQ267382) 的结构基因序列, 在其 5' 端设计 3 条下游引物 c-SP1、c-SP2、c-SP3, 以扩增其上游序列。

c-SP1: GCATCCAAAAACGTTATTACCGGGT

c-SP2: TTATAGCCACCATCACGCTTTGG

c-SP3: TGCTCGCAGCGCCACGACCGTA

参照 DNA 步移试剂盒操作说明, 进行 3 次热不对称 PCR。第 1 次扩增反应用试剂盒自带引物 AP1 与 c-SP1 进行扩增, PCR 反应体系 (25 μL) 为: 16.2 μL ddH₂O, 1 μL 基因组 DNA (60 ng·μL⁻¹), 2.5 uL 10×PCR Buffer (Mg²⁺ plus), 0.5 uL AP1 (100 μmol·L⁻¹), 0.5 μL SP1 (10 μmol·L⁻¹), 4 μL dNTP (2.5 mmol·L⁻¹), 0.3 μL LA TaqDNA 聚合酶 (5 U·μL⁻¹)。扩增循环条件参照说明书。扩增结束后, 用 1% 琼脂糖电泳检测。

以第 1 次扩增产物稀释 50 倍后作为模板, 以引物 AP1 与 c-SP2 进行第 2 次扩增并电泳检测。将第 2 次扩增产物稀释 50 倍后作为模板, 以引物 AP1 与 c-SP3 进行第 3 次扩增并电泳检测。第 2 和第 3 次扩增反应条件相同。将第 3 次 PCR 扩增的特异性产物纯化测序。

1.6 DNA 回收及克隆、测序

在紫外灯下切下含目的片段的凝胶块, 用 Takara 的胶回收试剂盒回收 DNA。回收片段按试剂盒说明书连接到 pMD18-T 载体上。大肠杆菌感受态细胞制备及克隆转化具体方法参考《分子克隆实验指南》。测序由北京六合生物技术有限公司完成。

1.7 序列及进化分析

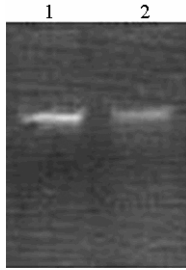
序列分析用 DNAMAN 软件、BioXM2.6 和 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上的

BLAST 程序来完成。利用真核生物启动子在线分析软件 (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) 分析克隆得到的上游序列。

2 结果与分析

2.1 玫烟色棒束孢基因组 DNA 的提取

用两种方法所提取的玫烟色棒束孢基因组 DNA 均无 RNA 污染 (图 1), CTAB 法 OD 值在 1.8~1.9, 氯化苄法其 OD 值在 1.9~2.0。



1. CTAB 法提取的基因组 DNA;
2. 氯化苄法提取的基因组 DNA

1. Genomic DNA extraction by method of CTAB;
2. Genomic DNA extraction by method of Benzyl chloride

图 1 玫烟色棒束孢的基因组 DNA

Figure 1 Genomic DNA of *Isaria fumosorosea*

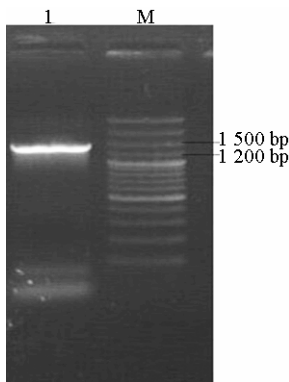


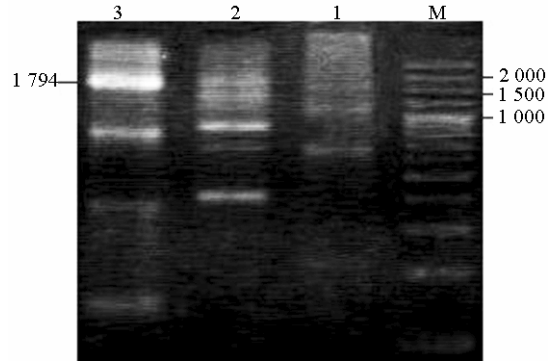
图 2 玫烟色棒束孢几丁质酶结构基因

Figure 2 The structural gene of chitinase from *Isaria fumosorosea*

2.2 玫烟色棒束孢几丁质酶 *Ifuchit2* 结构基因的克隆与分析

以 DNA 为模板用引物 Chitin-up 和 Chitin-down 进行 PCR 扩增, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 得到一条特异性很好的条带 (图 2), 经测序分析玫烟色棒束孢几丁质酶 (*Ifuchit2*) 的结构基因长为 1 425 bp, 其结构基因与 cDNA 比较含有 3 个内含子, 分别位于距离起始密码子 121 碱基至 176 碱基处, 277 碱基至 331 碱基处和 380 碱基至 431 碱基处, 大小分别为 54 bp、53 bp 和 51 bp。符合真核生物内含子

剪接位点 5'-GT...AG-3' 规则。这是普遍存在于真核基因中 mRNA 剪接的识别信号。



M. DNA marker; 1. 第 1 轮 PCR 产物; 2. 第 2 轮 PCR 产物;
3. 第 3 轮 PCR 产物

M. DNA Marker; 1. 1st PCR product; 2. 2nd PCR product;
3. 3rd PCR product

图 3 DNA 步移扩增玫烟色棒束孢几丁质酶基因上游序列产物

Figure 3 The upstream sequence of chitinase gene from *Isaria fumosorosea* was amplified using gene walking

2.3 玫烟色棒束孢几丁质酶基因上游序列的克隆与分析

利用 DNA 步移, 获得了 1 794 bp 的上游序列 (图 3), 命名为 *Ifuchit2U* (GenBank 登录号: JF323024)。 *Ifuchit2U* 与 *Ifuchit2* 有 209 bp 的序列完全重叠。因此可以确定 *Ifuchit2U* 就是玫烟色棒束孢几丁质酶 (*Ifuchit2*) 的上游启动子序列。利用真核生物启动子在线分析软件 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测出该基因转录起始位点位于 1 569 bp A 处。通过在线分析软件 (http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html) 对上游序列分析发现, *Ifuchit2U* 具有真核生物的基本启动子序列 TATA-盒, 该启动子能够选择正确的起始位点, 从而保证精确起始。 *Ifuchit2U* 同时含有 CdxA、Oct-1、HSF (热激转录因子) 等重要的转录因子结合位点, 以及 GATA 等启动子顺式调控元件。

3 讨论

结构基因 5' 端上游调控序列不仅包含启动子的核心结构序列, 能够指导全酶同模板正确结合, 活化 RNA 聚合酶, 启动基因转录^[10]。同时也有一些特异的反应元件和转录因子结合位点, 这些元件是起始转录和调控转录所必需的。

GATA-1
 1 TTATAGC**CACCATCACG**CCTTGGCATCCAAAACGTTATTACCGGGTTGACGATCAGCAACGGGGCTAAAATGCA
 CdxA
 76 TCGACAAGGGTAAATTTCATACGCTGGACATTTGATCTGAATTATAACGGGTGCTGGCGTTCTAACACAGTAG
 151 ATGTAGCGTGGGGAAAGAACTTTTTTTTTTTTCAAGGTGAAGCAGCCACATGGCGGGTAGACCTCTAACTAC
 226 CTATGTATGTATGTATGTACAGTACATAGGTAGCAACTAACAGCCAAAGAGGATGATGATTGGTGGCGCAAGCA
 301 TTGACAGTGAATGCTCGAGACATTCGGGCACGTCAAATACAAGGAGACAATTTTTGAGATAACTGCTAACCC
 HSF
 376 TTAAGAAAATTATGTATTTAATTCAATTGGCATGCCAATTACGTCGATTTGTGGTAGAATCGATTGCGTTGAAGT
 HSF
 451 GCTCTGCTGCGCTGGCTACCCTGCCTGCCACTTGGTTGTAGAGAAATTTGGGGAGCGGCTCTCACTTCTCTAC
 526 CAGTACACAATACTAACTACTAACGACCAGACGGCGAACTTTGTCCATTCTGTCCTCTACCAGACTGCATC
 GATA-2
 601 GGCTGGCCTGTGAAGCCAGAG**GCGGATATGT**ACAAGTATGACCAAAAGCCTATTGCAAGGCAAGTACTCACAGC
 STRE
 676 CAGTCTCCGGCCAACCCCTGGTTACCCTCGCACTACAAC**TCCCCTT**CAGTGGCCAAACACGAACTGCATGC
 GATA-1
 751 TTCGCGCTCAAATTTCTTTCGGCTCAGGTGCGTCCGGA**TGCTATCA**GCGAGGGTGGACTGACAGGTGGGAT
 826 ACATCGCACATGCCCGCTGTATGCCCGAGCTATTCATCGCGTCCACGTTGCAAGTCTTTTTCTAGCCAGCGCCT
 901 GTACAACTCAACCCATAACAACAAACGTACCATTACCCAGAACGCTGCCATTTGTGTCACACGAACCGCCCG
 976 GGTCGATGCATCACGCCTCTGGAGCTTCTGGAAAGGGCAGCGCTACCGTTTTGGCCCGCAGTATGTTGGTGCAGA
 NIT2
 1051 TGCCGTGCATGGGCAGTCTCGCT**TATCGA**GACTGCCAGAAGACGACTGCTGCCACTCAGGAAACGCCTTGCAT
 Oct-1
 1126 TCCTAATTTGTTGCCCCGCAAATGTCCCCCAAGTTTCAACCGTTGCGCGCATGCCATTTTGTAAAGACTGGAGGC
 1201 ATTCTGATGAGAGCAGTCACACGGATTGCCAGCTGATTGCATACTGCCATGGCCGGAGCAATTTACCCAGGT
 GATA-1
 1276 GGCTCGTTGGACAGACTGAGCAACGCTGCTCGAGTTGACCGCCAATTCTT**TTCCATCGCGAG**CTTCCGTACTTT
 1351 CCTTGGCTTGGGTAACCGCGAGCCACAACCTTCAATCACTCAGCCTTCGTGAGGGGAATGCCGTCGCTC
 1426 CAGACAACGTTGGCGAGACGCCGCTCTACTGTTTCGTTACCTAGTCTCATTGGAGCTGCCGGAACATCGTCAA
 TATA Transcriptional start site
 1501 AGACGCAACGCAATGCACACATGTAT**GTGTAATTGTATATATATCAAGG**CGTTGCTCCACCTACCAATGCTC
 1576 **ATACCCCTCAGCAACAAATCTAAAGCCAAATCTGAATCTACTTTTTCTATTTAACCCAACTTTACTCTTC**
 Start site of translation
 1651 CTTTCTTCTCTTCTCTCTCCGCTACA**ATGCTGGGTTTCTCAGGAAATCAATCGCTACGGTCGTGGCGCTGCG**
 1726 *AGCAGTCGCCACTTTCGCCACCAATTTCCAGTGAAGTTGGTTCCAAAGCGTGATGGTGGCTATAA*

左则数字为核酸位置, TATA-box、GATA-1、GATA-2 用方框标出, STRE、CdxA、NIT2、HSF、和 Oct-1 用下划线标出, 灰色阴影部分为预测的可能存在的启动子区域, 大写黑体字母为起始密码子和预测的转录起始位点, 斜体为与 cDNA 重叠部分

Numbers to the left are the nucleotide position. The TATA-box, GATA-1 and GATA-2 are boxed. STRES, CdxA, NIT2, HSF and Oct-1 are underlined. The putative basal promoter is shaded. The start codon ATG and the potential initial points of transcription are bold capital letters. The overlapped section with the cDNA is bold and italics

图 4 玫烟色棒束孢几丁质酶基因上游序列

Figure 4 The upstream sequence of chitinase gene from *Isaria fumosorosea*

本研究中, 通过 PCR 技术获得的 *Ifuchit2* 结构基因与其 cDNA 比较含有 3 个内含子, 分别位于距离起始密码子 121 碱基至 176 碱基处, 277 碱基至 331 碱基处和 380 碱基至 431 碱基处, 大小分别为 54 bp、53 bp 和 51 bp。由 DNA 步移法得到的玫烟色棒束孢 *Ifuchit2* 几丁质酶上游 *Ifuchit2U* 序列, 经测序与其 cDNA 编码序列(*Ifuchit2*)有 209 bp 重合, 因此可以确定 *Ifuchit2U* 是 *Ifuchit2* 基因的 5' 上游序

列。该序列中含有的 TATA 框具有选择正确的起始位点, 保证精确起始的功能, 同时, 还能影响转录速率。如兔的珠蛋白基因中 TATA 框的保守序列 ATAAAA 人工突变为 ATGTAA 时, 其转录效率会下降 80%^[11]。另外, 本研究克隆的 *Ifuchit2U* 序列, 还包含其他一些如 GATA-1、GATA-2、CdxA、Oct-1, 具有特异性调节基因转录功能的转录因子结合位点。在真菌中氮阻遏主要是通过氮阻遏子来完成,

目前已克隆了多个氮阻遏蛋白, 如构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 的 AREA, 粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 的 NIT2^[12] 和金龟子绿僵菌的 *nrr1*^[13]。它们的共同特征是都含有 C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C 型的锌指结构, 在 DNA 上的结合位点是相隔很近的序列——GATA, 因此又被称为 GATA 蛋白。经分析发现在 *Ifuchit2U* 中含有多个 GATA 元件。

在玫烟色棒束孢几丁质酶基因上游序列分析中, 还发现该序列含有压力反应元件 STRE。STRE 该元件在酵母中, 主要调控一些与抗逆有关的基因^[14], 当酵母菌处于高温、高渗透压、低 pH 以及营养饥饿等胁迫条件时, STRE 元件就会介导酵母相关抗逆基因的转录激活^[15]。因此, 我们推测该元件在玫烟色棒束孢几丁质酶基因上游序列中, 也具有类似的调控功能。

参考文献:

- [1] Hajek A, St. Leger R. Interactions between fungal pathogens and insect hosts[J]. Annual Review of Entomology, 1994, 39 (1): 293-322.
- [2] Leger R. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects[J]. Canada Journal of Botany, 1995, 73 (S1): 1119-1125.
- [3] St. Leger R, Joshi L, Bidochka M, et al. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62 (3): 907-912.
- [4] Feng J, Zhu X. Molecular biology of microbial chitinase[J]. Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci), 2004, 30 (1): 102-108.
- [5] Fang W, Leng B, Xiao Y, et al. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71 (1): 363.
- [6] Lu Z, Laroche A, Huang H. Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2005, 51 (12): 1045-1055.
- [7] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科技出版社, 1996.
- [8] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72-73.
- [9] 朱衡, 瞿峰. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
- [10] 张小辉, 祁艳霞. 真核生物启动子 TATA-box, GC-box 和 CAAT-box 的分析[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1380-1381.
- [11] 刘玉瑛, 张江丽. 真核生物启动子预测相关数据库资源概述[J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (24): 7418-7419.
- [12] Marzluf G. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61 (1): 17.
- [13] Screen S, Bailey A, Charnley K, et al. Isolation of a nitrogen response regulator gene (*nrr1*) from *Metarhizium anisopliae*[J]. Gene, 1998, 221 (1): 17-24.
- [14] 方卫国, 张永军, 马金成, 等. 用 YADE 法克隆球孢白僵菌类枯草杆菌蛋白酶基因 CDEP-I 的启动子及启动子序列分析[J]. 菌物系统, 2003, 22(2): 252-258.
- [15] Siderius M, Mager W H. General stress response: in search of a common denominator[M]//Hohmann S, Mager W. Yeast stress responses. New York: Springer Press, 1997: 213-230.