

球孢白僵菌蛋白酶成熟因子基因片段的克隆及其表达分析

张军¹, 谢翎², 孟慧敏¹, 汪章勋¹, 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: 通过 mRNA 差异显示技术, 从蝉蜕诱导培养的球孢白僵菌中分离获得了长度 295 bp 一种蛋白酶成熟因子的基因片段。该片段编码多肽序列与米曲霉的蛋白酶成熟因子编码氨基酸序列同源性较高, 达 94.44%。Realtime-PCR 检测结果表明, 蝉蜕诱导条件下该基因的表达量为对照的 8 倍左右。诱导下蛋白酶成熟因子的高效表达, 表明其在白僵菌毒力相关重组菌株构建研究中可能具有重要的应用价值。

关键词: 球孢白僵菌; 蛋白酶成熟因子; mRNA 差异显示; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q78; S476.12

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0783-05

Cloning and expression analysis of a protease maturation factor gene fragment from *Beauveria bassiana*

ZHANG Jun¹, XIE Ling², MENG Hui-ming¹, WANG Zhang-xun¹, 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: The fragment of a protease maturation factor gene from *Beauveria bassiana* was cloned using DDRT-PCR (differential display reverse transcription polymerase chain reaction). The length of the cloned specific fragment was 295 bp. Analysis of the amino acid sequences indicated that the protease maturation factor from *Beauveria bassiana* was highly homologous to *Aspergillus oryzae* (94.44%). The expression of the protease maturation factor gene from *Beauveria bassiana* under different induced conditions was detected using Realtime PCR. We found that the expression of protease maturation factor gene for cuticle of cicada induced was significantly higher than that in control (nearly 8 times of control). It can be inferred that the protease maturation factor gene in *Beauveria bassiana* may have important application value in construction of genetic engineering strain with high toxicity.

Key words: *Beauveria bassiana*; protease maturation factor; DDRT-PCR; Realtime PCR

随着社会经济的发展和人们环保意识的提高, 环境友好型生物源杀虫剂的应用受到越来越高的重视。其中真菌杀虫剂由于具有安全性好、效费比高、易于人工培养以及能够发挥持续控制效果等优点, 是生物农药发展的理想选择之一。但目前整个生物农药所占农药市场份额还十分有限, 仅为 10% 左右^[1]。同细菌、病毒杀虫剂相似, 真菌杀虫剂也存在着杀虫效果慢、受环境影响较大以及防治效果不稳定等缺点, 这在一定程度上限制了真菌杀虫剂的大规模应用。因此, 研究昆虫病原真菌侵染寄主过程

中的分子机制, 从而有目的地通过基因工程手段对生产菌株进行遗传改良, 获得高效工程菌, 以加速真菌杀虫剂的产业化步伐就显得尤为重要。

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)作为研究最多、应用最广和最具有开发潜力的虫生真菌^[2], 人们对其侵染昆虫致病机制的研究从未间断过。相关报道表明, 在球孢白僵菌侵染害虫的过程中, 存在着复杂的生物合成与调控, 如白僵菌细胞中的蛋白酶(proteinases)、几丁质酶(chitinase)、脂肪酶(lipase)、 β -N-乙酰葡萄糖苷酶(β -N-GlcNAcase)的产生水平

收稿日期: 2012-03-13

基金项目: 林业公益性行业科研专项(201204506)和农业部公益性行业专项(201003079)共同资助。

作者简介: 张军, 男, 硕士研究生。E-mail: zhj851207@126.com

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

与其菌株毒力之间就存在一定的相关性^[3-5]。当白僵菌入侵害虫时,各种酶类协调配合,疏水蛋白(hydrophobins)主要参与了白僵菌孢子对宿主的被动附着^[6],蛋白质降解酶、几丁质酶参与了寄主体壁蛋白质与几丁质多糖的降解^[7-8],而脂肪酶则参与对寄主体内脂肪类物质的分解^[7]。其中,胞外蛋白酶是决定球孢白僵菌菌株毒力的关键酶^[9]。近年来,国内外研究人员已成功克隆出了编码球孢白僵菌多种胞外蛋白酶的多个功能基因^[8],其相关转基因菌株的构建研究也取得了一定成果^[10-11]。

但是,目前人们对球孢白僵菌蛋白酶合成调控机制的了解还十分有限。特别是白僵菌胞内相关蛋白酶前体在核糖体中装配完成后及形成相应催化功能之前,如何进行相关功能域的后期加工及修饰的研究还有待深入。相关研究表明,真菌蛋白酶催化功能的完善与一些蛋白酶成熟因子具有密切的关系^[12]。Chen 研究表明蛋白酶在机体内缺氧等逆境环境下,其组装单位蛋白酶成熟因子有所增加,并促使体内进行多种氧化途径,如甲萘醌,过氧化氢,4-羟基产生能量,延长生命^[13],所以在机体内蛋白酶成熟因子与蛋白酶活力有很重要的互作关系,也是关乎机体生存和繁殖重要影响因素。

1992年,Liang和Padee建立了以PCR为基础的mRNA差异显示技术(differential display reverse transcription polymerase chain reaction, DDRT-PCR)。该技术以其灵敏、快速、操作简便、且具有能同时进行2组或2组以上的样品的分析比较等特点^[14],因此,一经问世便在诸多领域得以广泛的应用。mRNA差异显示(DDRT-PCR)技术,正为真核细胞检测未知的表达基因提供了一条有效途径^[15-16]。另外,由于其适用于微量起始(即低丰度)RNA样本,同时还具有可以检测某一表达基因的有无或表达的强弱等优点^[17]。

本研究在利用DDRT-PCR技术(mRNA差异显示)对普通无机盐和蝉蜕液体诱导培养下的球孢白僵菌进行基因表达差异检测时,发现了一段特异性条带。克隆测序及Blast分析表明,该特异条带为白僵菌蛋白酶成熟因子基因片段。利用Realtime PCR技术,还进一步对该白僵菌蛋白酶成熟因子在蝉蜕诱导及对照培养下的转录表达量进行了精确检测。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

球孢白僵菌 Bb13 菌株,保存编号 RCEF0013,

由安徽农业大学微生物防治重点实验室分离和保存。其寄主为马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*),采自安徽霍邱。

1.2 白僵菌的培养与诱导

取球孢白僵菌新鲜孢子接种于SDY液体培养基中,120 r·min⁻¹转速下于25℃培养6 d。液体培养结束后,对菌丝进行过滤,并利用无菌水冲洗3次。洗涤后菌丝,分别转接于1%蝉蜕诱导培养基与无机盐培养基内,25℃下诱导培养24 h。诱导后菌丝,立即提取RNA。以上每个样品处理均重复3次。

1.3 总RNA的提取与纯化

用Invitrogen公司的TRIzol试剂提取总RNA,具体操作参照产品说明书。提取的总RNA用DNaseI(Promage)处理,以去除总RNA中的混杂DNA。纯化后RNA经1%琼脂糖电泳检测其完整性,同时利用NanoDrop核酸测定仪检测其浓度。

1.4 反转录及DDRT-PCR反应

使用PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行反转录。取RNA 1 μg反转录后稀释10倍,取1 μL利用引物Oligo(dT)10G和d(TGGTA AAGGG)(购自上海生工)进行PCR扩增。PCR反应总体积为20 μL。PCR反应程序:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 40℃ 2 min, 72℃ 1 min, 40个循环; 72℃ 5 min。经8%尿素变性聚丙烯酰胺凝胶恒功率70 W电泳1.5 h,即参照染料二甲苯青FF至凝胶底部时停止电泳。银染显色后,比对查找差异条带。

1.5 差异cDNA的再扩增

利用浸泡法回收切下含差异条带的胶条,加入100 μL ddH₂O清洗,1 000 r·min⁻¹离心5 min后弃洗脱液。加入30 μL ddH₂O,并尽量将胶体捣碎,4℃静放30 min以上。等固体完全溶解后,吸取1 μL样品进行PCR二次扩增。所用引物及反应条件与第1次PCR扩增相同。PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳分离后切胶回收。

1.6 差异cDNA序列测定和同源性分析

回收片段按试剂盒说明书连接到TaKaRa公司的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》。测序由上海生工生物技术有限公司完成。序列分析采用DNAMAN软件和NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)BLAST在线程序。

1.7 荧光定量PCR验证及表达量对比

利用白僵菌常用持家基因Actin(肌动蛋白基因)^[18]设计内标引物Actin-1与Actin-2。另根据本研究克隆获得的白僵菌蛋白酶成熟因子序列,设计

目标引物 RT-1 与 RT-2。通过 SYBR Green1 荧光染料, 进行白僵菌特异蛋白酶成熟因子的 Realtime PCR 检测。Realtime PCR 反应体系与 PCR 扩增条件参照 TAKaRa 公司 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Per-

fect Real Time) 试剂盒说明书。Realtime PCR 扩增由美国应用生物系统公司 (ABI) 生产的 7500 Realtime PCR System 完成。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物
Table 1 Primers for Realtime PCR

引物 Primer	标注 Remark	序列 Sequence (5'-3')
Actin-1	内参基因 Internal reference	TTGGTGC GAAACTTCACGCTCTAGTC
Actin-2		TCCAGCAAATGTGGATCTCCAAGCAG
RT-1	目标基因 Goal of gene	TACAGGCGGGATGTGAACAAGAG
RT-2		GCCTGTGGCTTCTAACGGTG

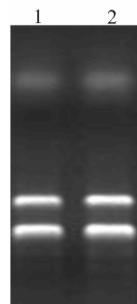
1.8 数据分析

Realtime PCR 检测结果由 ABI 7500 Software SDS v1.31 系统软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 球孢白僵菌总 RNA 的提取与鉴定

DDRT-PCR 技术要求十分精细, 高质量 RNA 的提取是实验成功的关键。通过 TRIzol 试剂提取总 RNA 后, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳电泳得到的 18 S 与 28 S rRNA 条带清晰 (图 1)。RNA 样品的 OD260/OD280 (Ratio, R) 介于 1.8~2.0 之间。说明该样品没有发生降解, 同时蛋白及酚类物质污染较少, 适用于后续的 mRNA 差显分析。



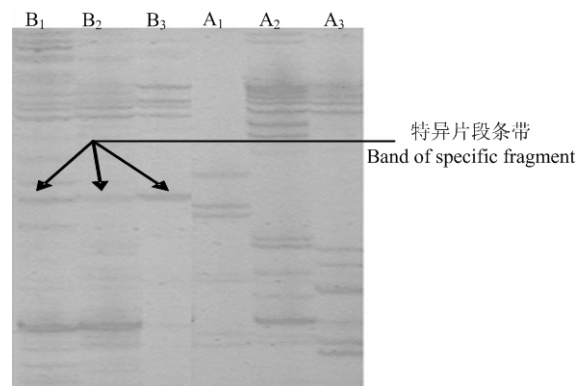
1: 蝉蜕诱导; 2: 液体培养 (对照)
1: Induced by cuticle of cicada; 2: Control

图 1 球孢白僵菌总 RNA 检测
Figure 1 Profile of RNA extracted from *B. bassiana*

2.2 mRNA 差异显示分析

在前期 78 个引物组合的差异显示 PCR 反应中, 以锚定引物 Oligo(dT)₁₀G 和 d(TGGTAAAGGG) 进行的扩增, 其 3 个平行诱导处理样品, 相对于对照, 其中 B₁、B₂ 和 B₃ 均出现了 1 条明显的特异条带 (图 2)。该特异条带在蝉蜕诱导条件下能被 DDRT-PCR 技术检测, 而在对照处理条件下则检测不到, 说明

该条带编码基因的表达与蝉蜕诱导具有直接关系。蝉蜕是白僵菌毒力相关酶系 (如胞外蛋白酶与几丁质酶) 合成分泌的重要诱导物。因此, 该特异条带的编码基因可能为白僵菌毒力相关基因或与其毒力相关酶系表达有关的基因。



dT₁₁G/B04, A1、A2 和 A3 是对照组的 3 个重复; B1、B2 和 B3 是诱导组的 3 个重复

A1, A2 and A3 are the three repeated control group from SDY cultivating; B1, B2 and B3 are the induced group of three repeated from cicada-induced

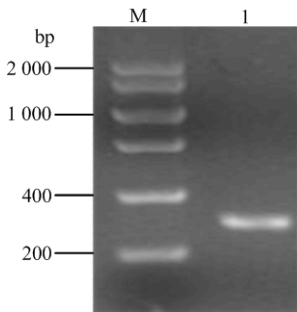
图 2 球孢白僵菌对照和蝉蜕诱导差异显示分析
Figure 2 Differential mRNA display of *Beauveria bassiana*.

2.3 特异条带编码基因分析

将聚丙烯酰胺凝胶中的特异条带割胶回收后, 利用同样引物和 PCR 条件再次扩增 (图 3)。特异产物纯化回收后, 克隆测序。该特异序列测序后长度为 295 bp。

DNAMAN 软件与 BLAST 在线程序分析表明, 该序列编码多肽与米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的相应蛋白酶成熟因子氨基酸序列具有高度的同源性 (图 4)。同源性分别为 94.44% 和 15.00%, 同时发现米曲霉和酿

酒酵母的相应蛋白酶成熟因子氨基酸序列同源性为15.00%。因此，确定本研究测序获得的特异序列为与米曲霉蛋白酶成熟因子相似度较高的球孢白僵菌相应蛋白酶成熟因子编码基因的部分序列。



M: DNA Marker; 1: 差异部分片段

M: DNA Marker; 1: Differential partial fragment

图3 差异部分片段的PAGE胶回收再扩增产物

Figure 3 Reamplified products of differential partial fragment from PAGE gel recovery

DNAMAN File: Multiple Alignment			
dnaman2b	.SRFETCGMTRCFEISPSHCLMGNYYMGLDIRVAVTNSVA	39	
dnaman5-3	ECTSIRINIEELCNHTAKTNLCTVSTNIVHCRITNEK	36	
Consensus	g p g i tn		
dnaman2b	ATRTGFSYAEECICECCTPFVRCCCSYVACTSP	72	
dnaman5-3	CCGNCNFGSYRLGPFENKRYTFTTEGRVCHFLCGRLEVY	76	
Consensus	g sy tp p		
DNAMAN File: Multiple Alignment			
dnaman5-3	ECTSIRINIEELCNHTAKTNLCTVSTNIVHCRITNEK	36	
dnaman1a	.FFLLCTGCMTRCFEISPSHCLMGNYYMGLDIRVAVTNSVA	39	
Consensus	g p g i tn		
dnaman5-3	CCGNCNFGSYRLGPFENKRYTFTTEGRVCHFLCGRLEVY	76	
dnaman1a	ATRTGFSYAEECICECCTPFVRCCCSYVACTSP	72	
Consensus	g sy tp p		
DNAMAN File: Multiple Alignment			
dnaman1a	FFLLCTGCMTRCFEISPSHCLMGNYYMGLDIRVAVTNSVA	40	
dnaman2b	SDFLCTGCMTRCFEISPSHCLMGNYYMGLDIRVAVTNSVA	40	
Consensus	dt ggirt r gfei spshdl ngnyynqi d r vavt nswa		
dnaman1a	TFTGFSYAEECICECCTPFVRCCCSYVACTSP	72	
dnaman2b	TFTGFSYAEECICECCTPFVRCCCSYVACTSP	72	
Consensus	t r t g r s y a e e q i g e c c t p f v r c c c s y v a c t s p		

dnaman2b 为该序列编码多肽；dnaman1a 为米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的；dnaman5-3 为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的。Polypeptide from targeted sequence, dnaman2b; *Aspergillus oryzae*, dnaman1a; *Saccharomyces cerevisiae*, dnaman5-3

图4 相应蛋白酶成熟因子氨基酸序列比对结果

Figure 4 Comparison of the sequence encoding the polypeptide with protease mature factors from others speices

2.4 诱导条件下白僵菌特异蛋白酶成熟因子的转录表达分析

Realtime PCR 检测及 2- $\Delta\Delta$ CT 法分析表明，本研究获得的蛋白酶成熟因子编码基因在蝉蛻诱导条件下和对照组相比，其转录表达量差异明显。诱导条件下，特异蛋白酶成熟因子高效表达，其转录

表达量约为对照组的 8 倍 (图 5)。

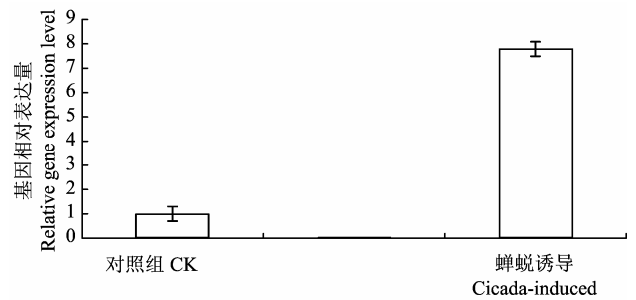


图5 不同处理条件下球孢白僵菌蛋白酶成熟因子的转录表达检测

Figure 5 Detection of proteasome maturation factor gene expression in *Beauveria bassiana* under different treatment conditions

3 讨论

自 20 世纪 90 年代以来，白僵菌在分子生物学各方面的研究都有了飞快地发展。为了克服白僵菌在毒力性状上的一些缺陷，国内外研究人员通过对白僵菌的毒力相关编码基因进行克隆与改良，取得了一定的成绩^[19]。同时，人们也一直希望于通过高效、低成本的方法，从为数众多的白僵菌功能基因中找出控制毒力的主效基因，以便更好地应用于转基因菌株的构建。

本研究首次将 DDRT-PCR 技术引入球孢白僵菌毒力相关基因的筛选表达研究中。通过对人工模拟条件下的白僵菌浸染过程 (即蝉蛻诱导) 中各表达基因的转录分析，筛选诱导条件下特异性表达条带。本研究率先发现了与球孢白僵菌毒力关键酶—蛋白酶相作用的蛋白酶成熟因子编码基因序列片段，并通过 Realtime PCR 技术，进一步验证了该蛋白酶成熟因子在蝉蛻诱导条件下的转录表达量远高于对照处理，约为后者的 8 倍左右。这与蝉蛻诱导条件下白僵菌胞外蛋白酶活性的大幅提高可能具有内在的联系^[10]。研究表明，在酿酒酵母中蛋白酶成熟因子主要作用于蛋白酶前体的相应功能域，以激活后者对相应蛋白质底物的酶催化作用^[11]。相关实验证明，蛋白酶在机体内缺氧等逆境环境下，其组装单位蛋白酶成熟因子有所增加，并促使体内进行多种氧化路径，如甲萘醌，过氧化氢，4-羟基产生能量，延长生命^[13]。酿酒酵母的相应蛋白酶成熟因子经 RNAi 干扰后，其蛋白酶的活性也受到了极大抑制^[20]。因此，本研究克隆的蛋白酶成熟因子其编码基因和蛋白产物在白僵菌中也可能存在类似的作用机制。

参考文献:

- [1] 吕丁丁, 李增智, 王成树. 虫生真菌分子致病机理及基因工程改造研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 443-449.
- [2] 谢翎, 陈红梅, 樊美珍, 等. 利用大米固态发酵生产球孢白僵菌的工艺优化[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(17): 85-88.
- [3] 金洁, 张作法, 时连根. 昆虫病原白僵菌的分子生物学研究进展[J]. 科技通报, 2007, 23(6): 842-847.
- [4] 王刚, 董建臻, 冯书亮. 球孢白僵菌胞外蛋白酶及几丁质酶的研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(13): 175-178.
- [5] 林海萍, 魏锦瑜, 马良进. 球孢白僵菌蛋白酶、几丁质酶、脂肪酶活性与其毒力相关性[J]. 中国生物防治, 2008, 24(3): 290-292.
- [6] St Leger R J, Staples R C, Roberts D W. Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hydrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*[J]. Gene, 1992, 120(1): 119-124.
- [7] St Leger R J, Joshi L, Bidochka M J, 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]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(3): 907-912.
- [8] St Leger R J, Frank D C, Roberts D W, et al. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*[J]. Eur J Biochem, 1992, 204(3): 991-1001.
- [9] 姚剑, 李增智, 樊美珍. 虫生真菌入侵过程中酶的研究[J]. 安徽农业大学学报, 1996, 23(3): 303-308.
- [10] Fan Y, Fang W, Guo S, et al. Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase[J]. Appl Environ Microb, 2007, 73(1): 295-302.
- [11] Lu D, Pava-Ripoll M, Li Z, et al. Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease[J]. Appl Microbiol Biot, 2008, 81(3): 515-522.
- [12] 方卫国, 张永军, 杨星勇, 等. 球孢白僵菌降解昆虫表皮蛋白酶基因 CDEP-1 克隆与序列分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(2): 278-282.
- [13] Chen Q, Thorpe J, Dohmen J R, et al. Ump1 extends yeast lifespan and enhances viability during oxidative stress: central role for the proteasome[J]. Free Radical Bio Med, 2006, 40(1): 120-126.
- [14] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257(5072): 967-971.
- [15] 季哲, 李玉祥, 赵明文, 等. 运用 mRNA 差异显示技术研究黄伞发育相关基因[J]. 菌物学报, 2007, 26(2): 243-248.
- [16] 蔡为明, 李南羿, 谢鸣, 等. 利用 mRNA 差异显示技术研究香菇发育相关基因[J]. 菌物学报, 2009, 28(2): 289-294.
- [17] Liang P, Averboukh L, Pardee A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21(14): 3269-3275.
- [18] Zhang Y J, Zhao J H, Fang W G, et al. Mitogen-activated protein kinase *hog1* in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects[J]. Appl Environ Microb, 2009, 75(11): 3787-3795.
- [19] 李增智, 黄勃, 陈名君, 等. 分子时代的白僵菌研究[J]. 菌物学报, 2011, 30(6): 823-835.
- [20] Chen Q, Ding Q, Thorpe J, et al. RNA interference toward UMP1 induces proteasome inhibition in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for protein oxidation and autophagic cell death[J]. Free Radical Bio Med, 2005, 38(2): 226-234.