

# 球孢白僵菌羧基转运蛋白基因 *BbJEN1* 及其上游序列的克隆与分析

张永军 方卫国 肖月华 金 凯 裴 炎\*

(农业部生物技术与作物品质改良重点实验室 西南农业大学生物技术研究中心 重庆 400716)

**摘 要** :在分析一株球孢白僵菌 T-DNA 插入突变体 T12 的 Tagging 序列的基础上,根据与其具有高度同源性的一条金龟子绿僵菌 EST 序列(编号为 AJ273226)设计简并引物,用 YADE 法从球孢白僵菌中扩增出该 EST 的同源序列及其延伸序列。序列分析表明,该片段与粗糙脉孢霉的羧基转运蛋白 JEN1 具有高度同源性,由此确定该序列为球孢白僵菌羧基转运蛋白 JEN1 基因的部分序列。然后利用 YADE 法延伸扩增该序列的上、下游序列,获得球孢白僵菌羧基转运蛋白 JEN1 的全长 DNA 序列,命名为 *GBbJEN1*。利用 3'-RACE 扩增出球孢白僵菌羧基转运蛋白 JEN1 的 cDNA 序列,命名为 *BbJEN1*。*BbJEN1* 全长 1656bp,编码 514 个氨基酸的蛋白。推测蛋白分子量为 55975.37Da,等电点 9.32。氨基酸序列与金龟子绿僵菌、粗糙脉孢霉和酿酒酵母羧基转运蛋白 JEN1 的同源性分别为 77%、66% 和 30%。序列分析表明,*GBbJEN1* 含有 2 个内含子。Southern 杂交表明,*GBbJEN1* 基因在球孢白僵菌基因组中为单拷贝。利用 RT-PCR 法对 *BbJEN1* 的表达特性进行了分析,结果发现 *BbJEN1* 基因的转录受蟑螂壳、蝉蜕等昆虫体壁的诱导,受葡萄糖的抑制。进一步利用 YADE 法获得了长为 977bp 的 *GBbJEN1* 上游序列,其中含有可能的葡萄糖抑制调控序列和压力反应元件。

**关键词** 球孢白僵菌,羧基转运蛋白

中图分类号 :Q785 文献标识码 :A 文章编号 0001-6209(2004)02-0198-04

利用遗传转化随机插入 DNA 获得突变体,是研究病原真菌侵染致病机理的重要手段之一<sup>[1]</sup>。我们曾通过遗传转化从昆虫病原真菌球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中获得了一株表型变化明显的 T-DNA 插入突变体 T12,该突变体菌落生长速度与野生菌株没有明显差别,但产孢早,且产孢量增加(待发表)。由于突变体的上述特征是昆虫病原真菌优良性状的一项重要指标<sup>[2]</sup>。因此,阐明 T12 的突变机理,对了解昆虫病原真菌产孢机制具有重要意义。我们利用 T-DNA Tagging 从该突变体得到了一段与 T-DNA 相连的基因组序列。序列分析发现,该片段与金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)诱导 EST 文库(<http://tegr.umd.edu>)中的一条 EST(AJ273226)相似性很高,同时该 EST 与粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*)羧基转运蛋白 JEN1 具有较高的同源性<sup>[3]</sup>。那么,T12 突变体的表型变化是否与羧基转运蛋白基因 *JEN1* 有关,很值得继续研究。本研究从 T12 突变体的野生菌株球孢白僵菌 Bb0062-

15 中克隆编码羧基转运蛋白 JEN1 基因及其上游序列并进行分析,为进一步研究 JEN1 在球孢白僵菌中的功能及其与 T12 表型变化的关系奠定基础。

YADE(Y-shaped Adaptor Dependant Extension)法是一种依靠“Y”形接头延伸未知序列的新方法,该方法假阳性率低、效率高,但通常所用的引物(线性扩增和指数扩增引物)都是特异性引物<sup>[4]</sup>。由于我们在前期获得的 T-DNA tagging 片段较短,无法直接利用 YADE 法延伸其两端序列,因此,本文首先根据与其具有较高相似性的金龟子绿僵菌 EST(AJ273226)序列设计简并引物,尝试利用 YADE 法在球孢白僵菌中扩增该 EST 的同源序列及其延伸序列,然后根据扩增序列依次延伸获得完整的基因。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*) Bb0062-15,分离自感染的菜青虫(*Pieris rapae*),保存于本室。

基金项目 国家 863 计划(2002AA245021),国家自然科学基金资助项目(30300235)

\* 通讯作者。Tel 86-23-68251883;Fax 86-23-68250515;E-mail:peiyuan@swau.edu.cn

作者简介 张永军(1970-),男,甘肃金昌人,副研究员,在职博士,主要从事杀虫微生物学研究。E-mail:yjzhang@swau.cq.cn

其他作者:冯金成,罗志兵

收稿日期 2003-05-26,修回日期 2003-11-24

## 1.2 主要试剂

3'-Full RACE Core Set 试剂盒和 RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;GFP<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit 回收试剂盒和 Ready-To-Go<sup>TM</sup> DNA Labelling Beads(-dCTP)标记试剂盒购自 Amersham Biosciences 公司;Hybond N<sup>+</sup> 尼龙膜购自 Pharmacia 公司;克隆载体 pGEM Easy-T 载体购自 Promega 公司。

## 1.3 RNA 和 DNA 的提取

按方卫国等<sup>[5]</sup>的方法进行。

## 1.4 YADE 法从球孢白僵菌中扩增绿僵菌 EST 的同源序列和与已知序列相连的未知序列

根据金龟子绿僵菌登录号为 AJ273226 的 EST 序列设计简并引物,用 YADE 法在球孢白僵菌中扩增金龟子绿僵菌 EST(AJ273226)的同源序列。所用 5'端的线性扩增引物和指数扩增引物分别为:BJ5-x: 5'-AGCGTCAATGTG(A)ATG(A,T,C)GCG(A,T,C)GT-3'和 BJ5-z: 5'-GCGTGGAAG(A)TCG(A)AAT(A,C,G)GC(A)TC-3',扩增 EST 同源序列 3'端的线性扩增引物和指数扩增引物分别为:BJ3-x: 5'-ACGAGTACGGAGAG(A)ACT(C,A,G)CGT(C,G,A)-3'和 BJ3-z: 5'-TGGCTCTTCTT(A)CT(A)CT(C,G)GG-3'。然后根据扩增的片段设计引物,利用 YADE 法依次延伸扩增与已知片段相连的未知序列。球孢白僵菌基因组采用 *Sma* I、*Sca* I、*Dra* I 和 *Eco*RV 4 种限制性内切酶酶切。连接体系和扩增程序参照肖月华等<sup>[4]</sup>的方法。

## 1.5 3'RACE

从蟑螂壳诱导的球孢白僵菌中提取 RNA,根据基因组序列设计上游引物 BJen1-RT1: 5'-AGGTAGAGTATCCTCCACAC-3',按 3'-Full RACE Core Set 试剂盒说明书进行 3'RACE。

## 1.6 RT-PCR

以不同条件诱导培养 48h 的球孢白僵菌提取 RNA,根据 cDNA 序列设计引物 BJen1-RT1 和 BJen1-RT2 利用 RNA PCR Kit(AMV)试剂盒进行 RT-PCR。BJen1-RT1 序列见 1.5,BJen1-RT2 的序列为 5'-TCGTTGAGGTGGATGGAAT-3'。

所用的 RNA 从下述 4 种培养基诱导的球孢白僵菌中提取:(1)蟑螂壳诱导培养基(每升含 0.3g NaCl,0.3g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.3g MgSO<sub>4</sub>,2g 蟑螂壳粉末);(2)含 2% 葡萄糖的蟑螂壳诱导培养基;(3)蝉蜕诱导培养基(每升含 0.3g NaCl,0.3g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.3g MgSO<sub>4</sub>,2g 蝉蜕粉末);(4)含 2% 葡萄糖的蝉蜕诱导

培养基。上述培养基接种相同浓度(10<sup>6</sup> 孢子/mL)的分生孢子,26℃、180r/min,诱导培养 48h。

## 1.7 DNA 回收、克隆和测序

在紫外灯下切下目的片段,用 GFP<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit 试剂盒回收 DNA。回收片段克隆到 pGEM Easy-T 载体上。测序由上海申友生物技术有限责任公司完成。

## 1.8 Southern 杂交

用 *Dra* I 和 *Eco*R I / *Pst* I 两组内切酶完全酶切 25μg 球孢白僵菌基因组 DNA 后电泳过夜(1.0% 琼脂糖),电泳产物用高盐法<sup>[6]</sup>转到 Hybond N<sup>+</sup> 尼龙膜上进行杂交分析。用 <sup>32</sup>P dCTP 标记探针,操作按 Ready-To-Go<sup>TM</sup> DNA Labelling Beads(-dCTP)试剂盒说明书进行。标记探针的 DNA 片段用引物 BJen1-RT1 和 BJen1-RT2 扩增基因组 DNA 获得。杂交温度为 65℃。洗膜条件为:先分别用 2×SSC、0.1% SDS 和 0.5×SSC、0.1% SDS 于室温下各洗膜 15min,然后用 0.1×SSC、0.1% SDS 于 65℃洗膜 15min。X 光片放射自显影按《分子克隆实验指南》进行。

## 2 结果和分析

### 2.1 球孢白僵菌羧基转运蛋白 JEN1 基因的克隆和分析

根据金龟子绿僵菌登录号 AJ273226 的 EST 设计简并引物,用 YADE 法从球孢白僵菌扩增出金龟子绿僵菌 AJ273226 EST 的同源序列及延伸序列 641bp,序列分析表明,该片段与粗糙脉孢霉的羧基转运蛋白 JEN1 具有高度同源性,由此确定该序列为球孢白僵菌羧基转运蛋白 JEN1 基因的部分序列。进而利用 YADE 法扩增该序列的上、下游序列。拼接扩增的 YADE 片段,获得球孢白僵菌羧基转运蛋白 JEN1 完整的基因组序列,命名为 *GBbjEN1*,GenBank 登录号为 AY187631。

利用 3'-RACE 扩增出球孢白僵菌羧基转运蛋白 JEN1 的全长 cDNA 序列。cDNA 序列全长 1656bp(命名为 *BbjEN1*,GenBank 登录号为 AY187630),编码 514 个氨基酸的蛋白。推测蛋白分子量为 55975.37Da,等电点 9.32。推测的氨基酸序列与金龟子绿僵菌、粗糙脉孢霉和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)羧基转运蛋白 JEN1 的同源性分别为 77%、66%和 30%。表明羧基转运蛋白在丝状真菌中具有较高的保守性,与酵母的同源性较低。比较球孢白僵菌羧基转运蛋白 JEN1 基因组序列和 cDNA 序列发现,*GBbjEN1* 含有两个内含子,有典型的

GT...AG 边界,并有真菌典型的分支序列 CTGAC。

2.2 GbbJEN1 上游序列的获得和分析

根据获得的 *GbbJEN1* 序列设计引物,利用 YADE 法扩增出 *GbbJEN1* 基因的上游序列 977bp (GenBank 登录号 AY187631)。该片段含 TATA 和 CAAT 等典型的启动子元件。同金龟子绿僵菌羧基转运蛋白 *GmaJEN1* 的上游序列相同,该上游序列还含多个富集嘧啶和富集嘌呤相连的序列,可能是葡萄糖抑制元件 Mig1 和 Mig2 的结合位点。Mig1 和 Mig2 受到葡萄糖的直接或间接激活,从而抑制 *Jen1* 的表达<sup>[7]</sup>; *GbbJEN1* 上游序列还含有可能的压力反应元件 STREs( CCCCT)。在酿酒酵母中,该元件在压力胁迫如加热、高渗透压、低 pH 以及营养饥饿等条件下,介导相关基因的转录激活<sup>[8]</sup>。

2.3 Southern 杂交

用 *Dra* I 和 *Eco* R I / *Pst* I 2 种限制性内切酶组合酶切球孢白僵菌的基因组 DNA,转膜后与 <sup>32</sup>P dCTP 标记的 *GbbJEN1* 片段杂交。杂交结果如图 1 所示,两组酶切 DNA 均显示一条特异杂交带。结合 *GbbJEN1* 酶切位点分析表明, *GbbJEN1* 在球孢白僵菌基因组中为单拷贝形式存在。

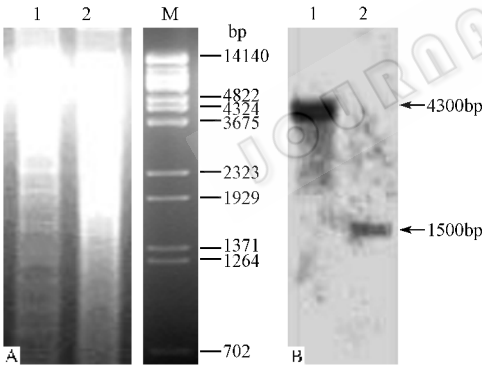


图 1 GbbJEN1 的 Southern 杂交分析

Fig.1 Southern blot analysis of *Beauveria bassiana* genomic DNA hybridized with <sup>32</sup>P labeled *GbbJEN1*

A. Agarose gel electrophoresis of *B. bassiana* genomic total DNA digested with *Dra* I and *Eco* R I / *Pst* I ; B. Genomic Southern blot hybridization with *GbbJEN1* fragment as probe ; M. Marker XV ( MBI ). 1. *Dra* I ; 2. *Eco* R I / *Pst* I .

2.4 BbJEN1 的表达分析

利用 RT-PCR 法对 *BbJEN1* 的表达特性进行了分析。结果表明, *BbJEN1* 在蟑螂壳或蝉蛻诱导培养基中均转录,但在上述诱导培养基中添加葡萄糖,抑制 *BbJEN1* 的转录(图 2),这与 *BbJEN1* 的启动子中有葡萄糖信号接受序列一致。由此表明, *BbJEN1* 转录受昆虫体壁的诱导,受葡萄糖的抑制。

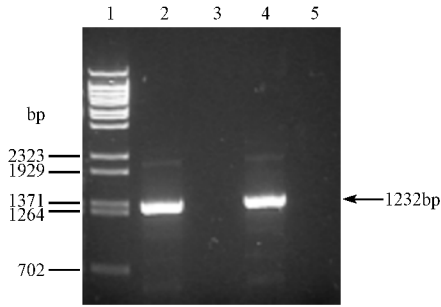


图 2 RT-PCR 分析 *BbJEN1* 的表达特性

Fig.2 Analysis of *BbJEN1* expression by RT-PCR

1. Marker XV ( MBI ); 2 ~ 5. RT-PCR using RNA which was extracted from the cultures containing cicada cuticle ( lane 2 ), cicada cuticle and glucose ( 2% ) ( lane 3 ), cockroach cuticle ( lane 4 ), and cockroach cuticle and glucose ( 2% ) ( lane 5 ), respectively.

3 讨论

研究表明, *JEN1* 与酵母在自然生物环境中的能量代谢密切相关。在有氧条件下,酿酒酵母可以吸收不同的短链羧酸。在自然环境下,尤其是在混合酸性的生物环境中,酿酒酵母主要是通过羧基转运蛋白 *JEN1* 将乳酸、丙酮酸等多种单羧酸能量物质转运到细胞内,供细胞利用。表达调控发现, *JEN1* 基因在酿酒酵母中的表达受到碳源的调控,即 *JEN1* 基因的表达受到葡萄糖的抑制,受到非发酵性碳源如乳酸、乙醇等的诱导<sup>[9,10]</sup>。尽管球孢白僵菌羧基转运蛋白 *JEN1* 与酿酒酵母的氨基酸序列同源性较低 ( 30% ),但本研究表明球孢白僵菌 *JEN1* 与酿酒酵母 *JEN1* 的转录具有相似性,受葡萄糖的抑制。 *GbbJEN1* 的上游序列与酿酒酵母 *JEN1* 基因的上游序列相似,含有可能的葡萄糖抑制调控序列。推测球孢白僵菌 *JEN1* 与酿酒酵母 *JEN1* 可能具有类似的功能,与球孢白僵菌能量物质的代谢相关。

另外, *GbbJEN1* 上游序列还含有可能的压力反应元件 STRE( CCCCT ),该元件也存在于酵母一些与抗逆有关的基因的调控序列中。在压力胁迫如加热、高渗透压、低 pH 以及营养饥饿等条件下,介导酵母相关基因的转录激活<sup>[11]</sup>,推测该元件在球孢白僵菌中也可能具有类似功能。另外,昆虫病原真菌球孢白僵菌等具有腐生和寄生两种生活方式,而涉及寄生生活的基因转录或表达受到昆虫营养的诱导<sup>[11]</sup>。本研究表明,球孢白僵菌 *JEN1* 的转录也受到昆虫体壁的诱导。而且,前期研究分析表明,与该基因同源的金龟子绿僵菌的 EST( AJ273226 )序列也来源于昆虫体壁诱导。由此推断, *JEN1* 可能与昆虫病原真菌的毒力相关。而 *JEN1* 与昆虫病原真菌能

量代谢以及毒力的关系到底如何,需要进一步研究。

本试验也表明 YADE 法不仅能够有效的从已知片段延伸与该片段相连的未知序列,而且 利用氨基酸同源性分析设计简并引物,也是从不同物种克隆同源基因的一种有效方法。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Millins E D , Kang S. Transformation : a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* , 2001 **58** : 2043 – 2052.
- [ 2 ] 王成树,王四宝,李增智. 球孢白僵菌高毒菌株筛选模型的研究. 农业生物技术学报, 1998 **6** ( 3 ) 245 – 249.
- [ 3 ] 方卫国,张永军,肖月华,等. 金龟子绿僵菌羧基转运蛋白基因 *MaJEN1* 及其启动子的克隆与分析. 遗传学报, 2003 **30** ( 3 ) 283 – 288.
- [ 4 ] 肖月华,罗 明,方卫国,等. 利用 YADE 法进行棉花基因组 PCR 步行. 遗传学报, 2002 **29** ( 1 ) 62 – 66.
- [ 5 ] 方卫国,杨星勇,张永军,等. 真菌核酸的一种快速提取方法.

应用与环境生物学报, 2002 **8** ( 3 ) : 305 – 307.

- [ 6 ] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998 620 – 624.
- [ 7 ] Makuc J , Paiva S , Schauen M , *et al.* The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast* , 2001 **18** : 1131 – 1143.
- [ 8 ] Siderius M , Mager W H. General stress response : in search of a common denominator. In : Hohmann S , Mager W H , ( eds ). *Yeast Stress Responses*. Austin R G Landes , 1997 213 – 230.
- [ 9 ] Casal M , Paiva S , Andrade R P , *et al.* The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1*. *Journal of Bacteriology* , 1999 **181** 2620 – 2623.
- [ 10 ] Lodi T , Fontanesi F , Guiard B. Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast : the role of lactate permease gene *JEN1*. *Mol Genet Genomics* , 2002 **266** 838 – 847.
- [ 11 ] Clarkson J M , Chamley A K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* , 1996 **4** ( 5 ) : 197 – 203.

## Cloning and Characterization of a Carboxylic Transport Protein *JEN1* and Its Upstream Sequence from *Beauveria bassiana*

ZHANG Yong-Jun FANG Wei-Guo XIAO Yue-Hua JIN Kai PEI Yan\*

( Key Laboratory of Biotechnology and Crop Quality Improvement of Agriculture Ministry ; Biotechnology Research Center of Southwest Agricultural University , Chongqing 400716 , China )

**Abstract** : The degenerate primers were designed based on an EST( AJ273226 ) of *Metarhizium anisopliae* , which was highly homologous with a DNA tagging from a T-DNA insert mutant of *Beauveria bassiana* . And homologous DNA fragment of the EST and it 's extending sequence were amplified from *B. bassiana* using YADE method. The sequence analysis showed that the amplified DNA fragment was a partial fragment of gene encoding carboxylic transport protein *JEN1* , because the putative amino acid sequence was similar to carboxylic transport protein *JEN1* from *Neurospora crassa* . Thereafter , the whole DNA sequence of *GBbJEN1* encoding *JEN1* from *B. bassiana* was obtained by extending upstream and downstream sequence of the amplified fragment using YADE method. The cDNA of *JEN1* , designated *BbJEN1* , was cloned from *B. bassiana* by 3'RACE according to the sequence of *GBbJEN1* , which is 1656bp long and encoded a protein of 514 amino acid with Mr = 55975.37 Da and PI = 9.32. The amino acid sequence of the gene showed 77% , 66% and 30% similarity to *MaJEN1* of *M. anisopliae* , *JEN1* of *Neurospora crassa* and *JEN1* of *Saccharomyces cerevisiae* , respectively. Sequence analysis indicated that *GBbJEN1* contained two introns. Southern analysis indicated that *GBbJEN1* was present as a single copy in *B. bassiana* . The result of RT-PCR showed that transcription of *BbJEN1* was induced by the cuticle of cockroach or cicada , and repressed by glucose. A 977bp upstream sequence of *GBbJEN1* was amplified using YADE method , which contain several putative binding domains of glucose repressor and one stress response element ( STREs ).

**Key words** : *Beauveria bassiana* , Carboxylic transport protein