

# 球毛壳菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因克隆及特性分析

刘志华 杨 谦\*

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

**摘 要** :用粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa* XP-327967)和菜豆炭疽病菌(*Colletotrichum lindemuthianu*, P35143)的甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)氨基酸序列对球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)菌丝 ESTs 序列本地数据库进行 tBlastn 检索,获得了球毛壳菌 GAPDH 全长 cDNA 序列。该序列长 1240bp,开放阅读框 1014bp,编码 337 个氨基酸组成的多肽,蛋白分子量为 36.1kD。用 PCR 方法克隆了该基因的 DNA 序列,序列长为 1556bp,由 2 个内含子和 3 个外显子组成。BlastP 同源性分析表明该基因与鹅掌柄孢壳(*Podospora anserine*)同源性最高为 95%;与米曲霉(*Aspergillus oryzae*)同源性最低为 87%。GAPDH 酵母转化子生物功能分析表明转化子对 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 和高温有高的耐受性,证明 GAPDH 为抗胁迫基因。该基因的 cDNA 序列、DNA 序列及推测的氨基酸序列在 GenBank 登录(登录号分别为 AY522719, AY593253, AAS01412)。

**关键词** 球毛壳菌,甘油醛-3-磷酸脱氢酶,基因克隆,转基因酵母

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)06-0885-05

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是生物体内糖酵解和糖异生过程中的关键酶,其生理功能是在 NAD<sup>+</sup> 和无机磷酸存在的条件下催化甘油醛-3-磷酸氧化磷酸化,生成 1,3-二磷酸甘油酸,是维持生命活动最基本的酶之一。由于 GAPDH 基因具有高度的保守性,人们通过比较不同物种 GAPDH 基因核苷酸或氨基酸序列的异同,对物种进行分类和建立各物种之间的系统发育关系<sup>[1,2]</sup>。同时, GAPDH 基因还具有抵抗逆境胁迫的功能。当活细胞处在各种环境压力的条件下,例如热激高盐、低温等胁迫,其基因表达模式将发生改变。真菌凤尾菇(*Pleurotus sajor-caju*) 在 4mol/L NaCl 条件下胁迫 4h,在 4℃低温条件下处理 4h,在 45℃高温条件下处理 4h,以及在真空干燥 10min 干旱胁迫条件下 GAPDH 基因的表达量均有提高,其中干旱胁迫提高 8 倍,盐胁迫与冷胁迫表达量提高 4 倍和 2 倍,将该基因转化酵母,提高了酵母转化子在盐、高温、低温及干旱胁迫的存活率<sup>[3]</sup>。Redkar 等<sup>[4]</sup>研究表明盐胁迫下构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的 GAPDH 基因表达的转录水平明显提高。盐压力条件下兼性盐生植物 *Mesembryaemum crystallinum* 的 Gap1 基因转录正调控<sup>[5,6]</sup>。

球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)是一种重要的

植物病害生物防治菌。本实验室构建了球毛壳菌 cDNA 文库,获得了 1410 个 ESTs 序列,本研究通过对这些 EST 数据进行分析,用生物信息学技术克隆到了球毛壳菌 GAPDH 全长 cDNA。用 PCR 方法克隆了该基因的 DNA 序列。GAPDH 是用来分类的重要基因,本研究对 24 种真菌 GAPDH 氨基酸序列进行了多序列比对分析,为球毛壳菌进行分子分类和建立与其它菌种之间的系统发育关系提供了理论依据,同时,该基因对于球毛壳菌间的亲缘关系的鉴定,从而选择生物防治能力强的菌株也将具有重要意义。应用酵母表达技术研究 GAPDH 功能,证明该基因具有抗盐、碱和高温胁迫功能,是一种重要的抗逆境胁迫基因。球毛壳菌对生物防治过程中产生的生物胁迫具有明显的适应能力。研究表明 GAPDH 基因对生物胁迫起应答作用,对胁迫反应代谢过程起调节作用<sup>[7]</sup>。因此,该基因为研究球毛壳菌对生物胁迫适应能力和生物防治机理具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 球毛壳菌(*C. globosum*)为本实验室保存的菌株。孢子接入 PD 液体培养基<sup>[8]</sup>中,在 25℃和 220r/min 条件下培养 36h。4000r/min 离心

基金项目:国家“863 计划”(2003AA241140)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-451-86412952 E-mail: yangq@hit.edu.cn

作者简介:刘志华(1976-),女,吉林德惠人,博士研究生,主要研究方向为基因工程与生物信息学。E-mail: liuzhuhua1029@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-03-21,修回日期:2005-07-28

10min 收集菌丝,液氮冷冻后 -70℃ 冰箱中保存备用。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)INVSc1、表达载体 pYES2、大肠杆菌(*Escherichia coli*)TOP10F'(Catalog no. V825-20)购于 Invitrogen 公司。

**1.1.2 试剂:**反转录酶 Superscript II 购于 Invitrogen 公司;YPD、SC-U 培养基购于 BD Biosciences 公司。DNase I、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Kpn* I 和 *Bam* H I 购于 Promega 公司。半乳糖、醋酸锂购于 Sigma 公司。引物由上海 Sangon 公司合成。酵母总 RNA 提取试剂盒为上海华舜生物工程公司生产。

## 1.2 全长 cDNA 序列获得及分析

利用 BioEdit(下载地址: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)软件构建球毛壳菌菌丝 1410 条 ESTs 序列<sup>[9]</sup>(DDBJ 接受号 BP383878-BP383850, BP113368-BP113050, BP100102-BP098896)的数据库。用粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*, XP-327967)和菜豆炭疽病菌(*Colletotrichum lindemuthianum*, P35143)的 GAPDH 基因氨基酸序列对该数据库进行 tBlastn 比对,Contig 拼接获得全基因。

利用 bl2seq 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>)比对 cDNA 及 DNA 序列寻找内含子。用 ProtParam(<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)计算蛋白的分子量、等电点;BlastP 进行序列相似性搜索;Pfam 14.0(<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>)进行蛋白家族预测。

## 1.3 DNA 序列的克隆

根据 GAPDH 基因 cDNA 编码区两侧序列设计 DNA 克隆引物, GAPDH1: 5'-CACGTAAGACCC TCTAGTCAACAC-3'; GAPDH2: 5'-TCCGGCTGACTCA TTGATTACCAG-3'。球毛壳菌菌丝 DNA 提取参见文献<sup>[10]</sup>。20 $\mu$ L 反应体系含 10 $\times$  PCR Buffer 2 $\mu$ L; dNTP 200 $\mu$ mol/L;引物 GAPDH1、GAPDH2 各 0.5 $\mu$ mol/L;模板 DNA 0.6 $\mu$ g; *Taq* DNA 聚合酶 1.2U。反应条件: 94℃ 120s; 94℃ 20s; 64℃ 30s; 72℃ 90s, 共 30 个循环, 72℃ 10min。

## 1.4 24 种真菌 GAPDH 基因同源性分析

利用 BlastP 进行同源性搜索,选择了 23 种与球毛壳菌 GAPDH 基因同源性高的真菌 GAPDH 基因氨基酸序列。用 ClustalW 软件对 24 种真菌的 GAPDH 基因的氨基酸序列进行了同源性分析。所选的真菌有黑曲霉(*A. niger*, Q12552)、构巢曲霉(*A. nidulans*, P20445)、米曲霉(*A. oryzae*, AAK08065)、稻米发酵酵母(*Monascus purpureus*, P53430)、荚膜组织

胞浆菌(*Ajellomyces capsulatus*, AAG33368)、巴西酿酒菌(*Paracoccidioides brasiliensis*, Q8X1X3)、灰酷球孢子菌(*Coccidioides immitis*, Q8J1H3)、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*, 521, AAK08065)、颖枯壳真孢(*Phaeosphaeria nodorum*, Q9P8C0)、球腔菌属真菌(*P. avenaria*, AAQ62906)、旋孢腔菌属病原菌(*Cochliobolus lunatus*, P28844)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*, Q96US8)、木霉(*Hypocrea ceramica*, P17730)、康宁肉座菌(*H. koningii*, S29814)、林克肉座菌(*H. lixii*, P87197)、菜豆炭疽病(*Colletotrichum lindemuthianum*, P35143)、玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae* PH-1, XP-386433)、大孢粪壳(*Sordaria macrospora*, Q8WZN0)、粗糙脉孢霉(*N. crassa*, XP-327967)、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*, P19089)、稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*, EAA49426)、鹅掌柄孢壳(*Podospora anserine*, P32637)、麦角菌(*Claviceps purpurea*, Q00584)。

## 1.5 酵母表达载体 pYES2-GAPDH 构建

根据球毛壳菌 GAPDH 基因 cDNA 序列 (AY522719),在编码区上游和下游设计合成一对引物。gapdhL: 5'-TACTGGGTACCATGGCTATCAAGGTC GGCATCAACGGCT-3'(下划线为 *Kpn* I 酶切位点)和 gapdhR: 5'-TACTGGGATCCCTATTTGCTAGCATCGA CCTTGGCGACG-3'(下划线为 *Bam* H I 酶切位点)。

用 CTAB 法提取球毛壳菌菌丝总 RNA<sup>[10]</sup>,将 RNA 用 DNase I 处理,消化可能存在的 DNA,进行反转录,反转录模板为 2 $\mu$ g,反转录酶为 Superscript II,引物 Oligo d(T)<sub>18</sub>,反应体系参照说明书,42℃ 保温 1h,反应完成后稀释成 200 $\mu$ L,用作 PCR 模板。PCR 反应体系含 10 $\times$  PCR Buffer 2 $\mu$ L; dNTP 200 $\mu$ mol/L;引物 gapdhL、gapdhR 各 0.5 $\mu$ mol/L;模板 cDNA 2 $\mu$ L; *Taq* DNA 聚合酶 1.2U;加双蒸水至 20 $\mu$ L。PCR 反应条件同 1.3。

上述 PCR 反应产物及 pYES2 载体同时进行 *Kpn* I 和 *Bam* H I 酶切。将经过柱纯化的 PCR 反应产物与 pYES2 载体双酶切产物连接,随后转化大肠杆菌 TOP10F'感受态细胞,在 LB 平板(含氨苄青霉素 100mg/L)上进行筛选,挑取白色菌落用碱裂解法提取质粒 DNA,进行 PCR、双酶切及测序鉴定。

## 1.6 诱导表达及酵母转化子胁迫实验

用醋酸锂沉淀法将重组质粒及对照 pYES2 质粒转化酿酒酵母(*S. cerevisiae*),按 Invitrogen 公司提供的操作手册进行,INVSc1 株为尿嘧啶缺陷,质粒 pYES2 中带有尿嘧啶合成基因,转化成功的 INVSc1

可以在缺少尿嘧啶的培养基上(SC-U)生长。培养48h后,挑取2~3mm大小的菌落进行菌落PCR,方法为挑取酵母转化子于ddH<sub>2</sub>O中,沸水浴10min,取出后立即置于冰上裂解酵母,然后进行PCR反应;反应体系及反应条件见1.5。利用0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。

用RT-PCR检测GAPDH转化子基因表达情况。将转GAPDH基因的酵母用半乳糖诱导20h和40h,分别提取总RNA,并用含非重组质粒转化酵母的总RNA作对照,按照酵母总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA。反转录体系,PCR反应体系和反应条件同1.5,但PCR循环数变为26,取2 $\mu$ L进行电泳。

挑取INVSc1-pYES2-gapdh,INVSc1-pYES2酵母菌株接种于YPD培养基中过夜培养20h,接种于SC-U(2%半乳糖为碳源及诱导底物)诱导培养基中诱导表达20h,测OD<sub>600</sub>值,收集200 $\mu$ L的菌体离心弃上清,菌体重悬于200 $\mu$ L 6%、8%和10%的Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>中,30℃胁迫5h。直接取200 $\mu$ L的菌体在53℃条件下热胁迫3h。离心弃上清,用无菌水重悬菌体,涂布于SC-U培养基中(2%葡萄糖为碳源),30℃培养48h,照相记录结果。

## 2 结果和分析

### 2.1 全长cDNA的获得

tBlastn搜索,共获得6条同源性高的球毛壳菌(*C. globosum*)GAPDH基因ESTs序列(BP113197, BP099221, BP099016, BP113090, BP113050, BP098905)。通过对6条序列拼接获得GAPDH全长cDNA。该cDNA序列已经提交GenBank注册,登录号为AY522719。这一cDNA序列全长1240bp,编码区G+C含量为61.34%,A+T含量为38.66%。为典型的真核生物的碱基含量特征。

### 2.2 GAPDH基因及其推断的氨基酸序列分析

ORF六框翻译找到了GAPDH基因的开放阅读框,该基因cDNA编码区序列自100位的ATG起,止于1113位的TGA,全长1014bp。3'UTR 97bp,5'UTR 99bp。1211~1240位为Poly(A)尾巴。开放阅读框编码由337个氨基酸残基组成的多肽。

ProtParam分析表明该蛋白的分子量为36.1kD,理论等电点为5.98。Pfam14.0蛋白家族预测表明该蛋白为糖酵解和糖异生的关键酶,N端是RossmannNAD连接折叠。C端为一个固定的 $\alpha/\beta$ 反向平行的折叠。

### 2.3 GAPDH基因DNA序列的获得及分析

GAPDH基因DNA序列长度1556bp(图1),该序列已提交GenBank,注册号为AY593253。将其与全长cDNA序列比较,发现该基因由3个外显子及2个内含子组成。3个外显子长度分别为127bp、684bp、203bp,两个内含子分别为77bp、58bp。编码区长1014bp。内含子以GT开始以AG结束,外显子与内含子连接位点具有典型的GT/AG型剪接位点特征。

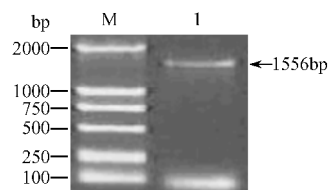


图1 球毛壳菌GAPDH基因DNA图谱

Fig.1 The DNA electrophoretic pattern of GAPDH gene from *C. globosum*. M, DNA Marker DL2000; 1, DNA fragment of GAPDH gene.

### 2.4 同源性分析

从24种真菌GAPDH基因同源性分析结果可以看出氨基酸个数从336~338个不等。各种真菌GAPDH基因氨基酸个数相差仅1~2个。除N端7个氨基酸和C端11个氨基酸保守性差外。完全保守的氨基酸数为231个,占总氨基酸数的69%。最保守的区域是173~247位共75个氨基酸非常保守。球毛壳菌GAPDH基因与鹅掌柄孢壳(*P. anserine*)同源性最高为95%;与米曲霉同源性最低为87%。这些说明真菌的GAPDH基因氨基酸进化上非常保守,适合进化关系研究<sup>[11]</sup>。

### 2.5 酵母表达载体构建

利用引物gapdhL/gapdhR成功扩增出GAPDH基因片段,经酶切、连接和转化大肠杆菌,获得重组质粒。重组质粒经酶切鉴定获得1014bp和5.9kb两产物,与预期相符。测序表明GAPDH基因已按正确方向克隆入酵母表达载体pYES2中,pYES2-gapdh质粒构建成功。

菌落PCR结果表明,已经成功地获得了转球毛壳菌(*C. globosum*)GAPDH基因的酵母(GAPDH<sup>+</sup>)和转对照质粒(不含GAPDH基因)的酵母(GAPDH<sup>-</sup>)。经RT-PCR检测表明,在半乳糖诱导20h和40h后,GAPDH基因在GAPDH<sup>+</sup>酵母中出现明显的表达,而GAPDH<sup>-</sup>酵母则检测不到该基因的表达。说明,GAPDH<sup>+</sup>酵母在半乳糖诱导下成功地实现了基因的表达(图2)。

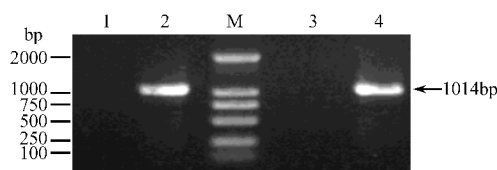


图 2 RT-PCR 检测

Fig. 2 RT-PCR result

M. DNA Marker DL2000 ; 1. INVSc1-pYES2( induced 20h ); 2. INVSc1-pYES2-gapdh ( induced 20h ); 3. INVSc1-pYES2 ( induced 40h ); 4. INVSc1-pYES2-gapdh( induced 40h ).

## 2.6 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 及高温胁迫实验

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫条件下含有 pYES2-gapdh 的酵母存活率明显高于含有 pYES2 的酵母。非胁迫下,含 GAPDH 基因酵母( $\text{GAPDH}^+$ )与无 GAPDH 基因的酵母( $\text{GAPDH}^-$ )生长量相同(CON),在 6% 的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫下  $\text{GAPDH}^+$  与  $\text{GAPDH}^-$  生长出现明显差异,随着  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  浓度的升高, $\text{GAPDH}^-$  存活率明显下降, $\text{GAPDH}^+$  存活率远远高于对照, $\text{GAPDH}$  的表达提高了酵母在  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  胁迫下的存活率。在  $53^\circ\text{C}$  高温下 3h, $\text{GAPDH}^+$  存活率非常高,菌落连成片,而  $\text{GAPDH}^-$  仅有几个菌落。 $\text{GAPDH}$  提高了酵母的耐高温能力。

## 3 讨论

本研究通过构建球毛壳菌(*C. globosum*)菌丝 ESTs 本地数据库,并用其它真菌的 GAPDH 基因的氨基酸序列对该数据库进行 tBlastn 比对,成功地获得了球毛壳菌(*C. globosum*)GAPDH 基因的 ESTs 序列,通过序列拼接,获得了 GAPDH 基因全长 cDNA,说明这种基因克隆方法可行,同时,该方法具有针对性强、快速、简捷的特点,减少了对 ESTs 全面分析的工作量。因此,是一种理想的生物信息学手段克隆基因的方法。

GAPDH 酵母转化子胁迫实验选择  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  处理,其兼有盐和碱的双重性质,是一种强的胁迫物质。通过胁迫实验说明转 GAPDH 基因的酵母,明显增强了对  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的抗性。同时,也提高了对高温的耐受性,说明该基因能够赋予寄主较强的抗逆性质,是一种重要的抗胁迫基因。因此,该基因对于研究球毛壳菌对于各种胁迫的抗性和其生命活动具有重要意义。通过对球毛壳菌(*C. globosum*)与 23 种真

菌的 GAPDH 基因同源性进行分析表明,GAPDH 基因家族基因在氨基酸序列上保守性较高,说明该基因可以用来进行分类研究及亲缘关系鉴定。球毛壳菌(*C. globosum*)为一种重要生物防治菌类。因此,研究其分类对该菌亲缘关系的鉴定和有效进行生物防治具有重要意义。

球毛壳菌(*C. globosum*)GAPDH 基因的成功克隆为 GAPDH 基因家族增加了新成员,并对球毛壳菌(*C. globosum*)的分子分类及有效利用其生物防治功能提供了基础数据,同时,该基因由于具有强的抗逆能力,也为抗逆基因工程提供了理想目的基因。

## 参 考 文 献

- [1] 肖川,刘晓斐,詹树萱,等.水稻甘油醛-3-磷酸脱氢酶 cDNA 结构分析和分子进化.自然科学进展,1998,8(4):411-419.
- [2] 宋时英,郭剑,李军,等.甘油醛-3-磷酸脱氢酶结构的保守性.生物物理学报,1998,14(3):401-406.
- [3] Redkar R J, Herzog R W, Singh N K. Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans* gpdA promoter by osmotic signals. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 2229-2231.
- [4] Jeong M J, Park S C, Kwon H B, et al. Isolation and characterization of the gene encoding glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 278: 192-196.
- [5] Schaeffer H J, Forsthoefel N R, Cushman J C. Identification of enhancer and silencer regions involved in salt responsive expression of Crassulacean acid metabolism (CAM) genes in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 205-218.
- [6] Vernon D M, Ostrem J A, Bohnert H J. Stress perception and response in a facultative halophyte: The regulation of salinity-induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Cell Environ*, 1993, 16: 437-444.
- [7] Laxalt A M, Cassia R O, Sanllorenti P M, et al. Accumulation of cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase RNA under biological stresses conditions and elicitor treatments in potato. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 961-972.
- [8] 彭琛,郑忠辉,杜希萍,等.培养基对海藻真菌 PT2 菌株的生长及活性代谢产物合成的影响.台湾海峡,2005,24(1):90-96.
- [9] 金红星,杨谦.球毛壳菌部分表达序列标签的生物信息学分析.高技术通讯,2004,14(7):34-37.
- [10] 王玉成,薄海侠,杨传平,胡杨,程柳总. RNA 提取方法的建立.东北林业大学学报,2003,31(5):99-100.
- [11] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南.黄培堂,等译.第三版.北京:科学出版社,2002.

## Cloning and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene from *Chaetomium globosum*

LIU Zhi-hua YANG Qian\*

( Department of Life Science and Engineering , Harbin Institute of Technology , Harbin 150001 ,China )

**Abstract :** The amino acid sequence of Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ( GAPDH ) gene from *Neurospora crassa* ( XP-327967 ) and *Colletotrichum lindemuthianu* ( P35143 ) were subjected to local tBlastn searching against the ESTs local database of *Chaetomium globosum* . The full length cDNA sequence of 1240bp encoding GAPDH gene with an open reading frame of 1014bp and encoding 337 amino acids was obtained. The protein molecular weight was 36.1kD. The DNA sequence of GAPDH gene was obtained through PCR amplification with specific primers of cDNA 5' and 3' untranslated region. The analysis of DNA sequence indicated that GAPDH gene have 3 exons and 2 introns. The BlastP analysis revealed that amino acids sequence of GAPDH gene from *C. globosum* shared 95% high similarity with *Podospira anserin* and 87% low similarity with *Aspergillus oryzae* . A transgenic yeast harboring *C. globosum* GAPDH was generated under the control of a constitutively expressed GAL promoter. The results from biofunctional analyses of GAPDH yeast transformants showed that GAPDH yeast transformants had significantly higher resistance to  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and heat stresses. The cDNA ,DNA and deduced amino acid sequence of GAPDH gene were accepted by GenBank ( accession numbers : AY522719 ,AY593253 ,AAS01412 ).

**Key words :** *Chaetomium globosum* , Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase , Gene cloning , Transgenic yeast

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2003AA241140 )

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-451-86412952 ;E-mail : yangq@hit.edu.cn

Received date 03-21-2005

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>