

金龟子绿僵菌中性海藻糖酶基因的克隆及其表达特性分析

胡宗利^{1,2} 王中康^{1,2,3} 彭国雄^{1,2,3} 殷幼平^{1,2,3} 夏玉先^{1,2,3*}

(重庆大学 ¹ 基因工程研究中心 ² 生物工程学院生物力学与组织工程教育部重点实验室 重庆 400030)

(³ 重庆市杀虫真菌工程技术中心 重庆 400030)

摘 要 根据中性海藻糖酶 NTL 基因的同源序列设计引物,PCR 扩增出杀蝗专一菌株——金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因片段,利用 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增出 NTL cDNA 的 5'和 3'端序列,经拼接得到 CQMa102 NTL 基因 cDNA 全长。根据其全长 cDNA 序列,设计引物 PCR 扩增出 CQMa102 NTL 的完整基因。为了解该基因的上游调控信息,采用 Panhandle Polymerase Chain Reaction Amplification 方法扩增其上游序列。序列分析表明,CQMa102 NTL 全长 DNA 3484bp,cDNA 全长 2385bp,编码 737 个氨基酸的蛋白,推测蛋白分子量为 83.1kD,含有 3 个内含子,包含一个依赖于 cAMP 的磷酸化作用位点(RRGS)和一个钙附着位点(DTDGNMQITIED);上游序列含有一个压力反应元件(CCCCT);与金龟子绿僵菌广谱性菌株 ME1 NTL 的核苷酸序列和氨基酸序列分别具有 93%和 99%同源性,由此确定该序列为金龟子绿僵菌中性海藻糖酶基因序列。Southern 杂交表明,NTL 基因在 CQMa102 基因组中为单拷贝。Northern 杂交表明,NTL 基因转录出约 2.5kb 的 mRNA 单带,在液体培养条件下,对数生长期表达水平最高,对数生长后期降到最低,进入稳定生长期后表达水平又有所提高。金龟子绿僵菌 CQMa102 中性海藻糖酶基因 DNA 全长和 cDNA 全长登录 GenBank,登录号分别为:AY557613,AY557612。

关键词 金龟子绿僵菌 中性海藻糖酶 蝗虫 昆虫病原真菌

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)06-0890-05

金龟子绿僵菌是一类应用广泛的昆虫病原真菌,在昆虫防治中起着重要作用。过去十多年来,国外在虫生真菌的致病机制、高毒力菌株选育和应用技术等方面都取得了不少进展,已先后有 40 多种产品登记注册,但这些产品常常不稳定,其主要原因是孢子的储藏期较短、抗逆境能力较差。本实验室从我国微生物资源中自行分离、选育出一株高毒力、高产孢、强专化性的杀蝗新菌株金龟子绿僵菌 CQMa102,该绿僵菌孢子粉及其油悬浮剂已在国内登记注册,实现了商品化,却也同样存在进一步延长储藏期、提高稳定性等问题。有研究报道,细胞内海藻糖积累与 *Trichoderma harzianum*^[1] 和 *Aspergillus japonicus*^[2] 等丝状真菌孢子的储藏期延长密切相关。采用基因敲除技术破坏 *Aspergillus nidulans* 中性海藻糖酶基因后,*A. nidulans* 萌发孢子耐热激的能力提高 5~10 倍,表明海藻糖对孢子的抗逆境能力有重要作用,可能是真菌孢子存活率的一个重要决定因子^[3]。海藻糖是一种非还原性二糖,海藻糖酶(EC3.2.28)水解一个分子的海藻糖为 2 个分子的葡

萄糖。真菌海藻糖酶根据其最适 pH 和调节特性分为酸性(或非调节性)和中性(或调节性)海藻糖酶^[4,5]。在完整酵母细胞内,海藻糖是由中性海藻糖酶分解而非酸性海藻糖酶^[6,7]。

为了提高金龟子绿僵菌 CQMa102 孢子的耐贮性和抗逆境能力,我们拟采用分子生物学技术将中性海藻糖酶基因敲除,提高孢子的海藻糖含量,增强其耐储藏能力和抗逆能力。本试验分离克隆金龟子绿僵菌 CQMa102 的中性海藻糖酶 NTL 基因,并进行全序列测定,为构建金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因高效表达载体和敲除载体、研究绿僵菌体内海藻糖代谢和调控、培育耐贮杀虫真菌提供基础材料和科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:金龟子绿僵菌菌株(*Metarhizium anisopliae*) CQMa102 为本实验室从我国微生物资源中自行分离、选育出的高毒力、高产孢、

基金项目:国家自然科学基金(30170630);重庆市自然科学基金重点项目(8564)

* 通讯作者。Tel 86-23-65120486 Fax 86-23-65120490 E-mail: yuxianxia@cqu.edu.cn

作者简介:胡宗利(1971-),女,重庆江津人,博士研究生,助理研究员,主要从事分子生物学及生物技术研究。E-mail: huzongli71@yahoo.com.cn

其他作者:蔡绍哲²

收稿日期:2005-03-11,修回日期:2005-07-20

强专化性的杀蝗新菌株;大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 为本实验室保存;质粒 pGEM[®]-T Easy Vector 购自 Promega 公司;质粒 pUC118 购自大连 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂:Pyrobest[™] DNA Polymerase、5'-Full RACE Core Set、3'-Full RACE Core Set 为大连 TaKaRa 公司产品;限制性内切酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、T4 多核苷酸激酶(T4 PNK)、总 RNA 和 mRNA 提取试剂盒、Prime-a-Gene[®] Labeling System 标记试剂盒为 Promega 公司产品;Hybond N 尼龙膜购自 Pharmacia 公司;High Pure Plasmid Isolation Kit 为 Roche 公司产品;凝胶回收试剂盒为博亚生物技术有限公司产品;同位素 α -P³²dCTP 购自北京福瑞生物工程公司;其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 引物设计

根据 NCBI 的 GenBank 中丝状真菌中性海藻糖酶基因的同源性比较,设计一对简并引物扩增金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因片段。上游引物 A1: 5'-GTNCCNGGNGGNAGRTTYAAYGA-3';下游引物 A2 5'-CCANCCRTANGGRTARTCCCAITG-3'。

为获得 NTL 基因 cDNA 的 5'端序列,采用了 5'-RACE 法,设计一条反转录引物 RT 和两对反向 PCR 引物 B1、B2 和 C1、C2:引物 RT 5'-GGCAAGGTCGGC ACAAT-3';引物 B1: 5'-ACGAGCGGGTAGCA TTGAGTAT-3';引物 B2 5'-CGATCACAGCCTCCATTG-3';引物 C1 5'-CTTTGCCAAGTCAACCCTGTGCG-3';引物 C2 5'-TGAACCAGACGCCAAGGA-3'。为获得 NTL 基因 cDNA 的 3'端序列,采用了 3'-RACE 法,设计一条上游特异引物 D:5'-CTGATCTAGAGGTACCGGAT CCGTTGGCTGGCACTGAGAA-3'。

根据获得的全长 cDNA 序列设计一对特异引物 PCR 扩增 NTL 完整基因。上游引物 E1: 5'-GC GCAGATCTACCTCCACGTTTCGTCACT-3';下游引物 E2 5'-ATATGGATCCTGAGAGGGCAATTAATCGGTA-3'。

为获得 NTL 基因上游调控序列,采用了 Panhandle PCR 法,根据 NTL 基因 5'端已知序列设计 4 条引物和一条寡核苷酸链:引物 1(+ 54 → + 30): 5'-AAACACATTGTAGTCATCCGAGCC-3';引物 2(+ 64 → + 39): 5'-GCGTCGTCAAACACATTGTAGTCA -3';引物 3(+ 153 → + 131): 5'-CGCAAACAAG TGGAACAATACCT-3';引物 4(+ 253 → + 234): 5'-TCACCGTGGCTGCCTCTTCT-3';寡核苷酸链 56(+ 72 → + 95): 5'-CTAGTATGCTTCTGAAGAGCGACATCA-3'。Panhandle PCR 验证引物 Q539.4P (- 607 →

- 590) 5'-TTGTCCTCCCATCTCTTC-3'。

1.3 金龟子绿僵菌 CQMa102 总 DNA、总 RNA 和 mRNA 的提取

将金龟子绿僵菌孢子 10⁶ 接种于 20mL 1/4 SDA (1/4-Strength Sabourauds Dextrose Agar) 培养液, 180r/min 26 ~ 28℃ 培养 60h, 10000r/min 离心 5 min 沉淀菌丝, 无菌水冲洗两次, 按单志萍等^[8]的方法提取金龟子绿僵菌 CQMa102 总 DNA。分别收集 1/4 SDA 液培 12h、24h、48h、72h 的培养菌丝, 按照总 RNA 和 mRNA 提取试剂盒的操作说明进行金龟子绿僵菌 CQMa102 总 RNA 和 mRNA 的提取。

1.4 金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因同源片段的 PCR 扩增、克隆和序列测定

NTL 基因同源片段 F 的 PCR 反应体系为:金龟子绿僵菌 CQMa102 总 DNA 50ng, 引物 A1、A2 各 60pmol, MgCl₂ 终浓度为 2.0mmol/L, dNTP mixture 终浓度为 0.25mmol/L, Pyrobest[™] DNA Polymerase 2U, 反应总体积 50μL。PCR 反应条件:94℃ 5min; 94℃ 30s, 60℃ 60s, 72℃ 2.5min, 35 个循环; 72℃ 10min。利用凝胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段, 然后连接到 pGEM[®]-T Easy Vector 上。按文献 9 采用氯化钙法制备大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 进行连接、转化、阳性克隆菌株的筛选及电泳鉴定。克隆菌株由上海 Sangon 公司进行 DNA 序列测定, 并对测序结果进行分析。

1.5 利用 5'RACE 和 3'RACE 克隆 NTL 基因 5'端和 3'端 cDNA 序列

根据金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 同源片段 F 的测序结果, 设计一条反转录引物 RT 和两对嵌套式反向 PCR 引物 B1、B2 和 C1、C2, 以金龟子绿僵菌 CQMa102 mRNA 500ng 为模板, 按照 5'-Full RACE Core Set 描述的操作程序进行 NTL 基因 5'端 cDNA 序列的 RT-PCR 扩增, 然后将扩增产物连接到 pGEM[®]-T Easy Vector 上。同样, 根据获得的 NTL 同源片段设计一条上游特异引物 D, 以金龟子绿僵菌 CQMa102 mRNA 500ng 为模板, 首先利用 3'-Full RACE Core Set 提供的 Oligo dT-3sites Adapter primer 为反转录引物合成第一链 cDNA, 然后以其为模板, 利用该试剂盒提供的 3sites Adapter primer 和上游特异引物 D, PCR 扩增出 NTL 基因 3'端 cDNA 序列, 然后经 Kpn I 酶切、连接到同样经 Kpn I 酶切的质粒 pUC118 上。

将以上获得的 NTL 基因同源序列和 5'、3'端 cDNA 序列拼接得到金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 全

长 cDNA。根据该全长 cDNA 序列设计一对引物 E1、E2,以金龟子绿僵菌 CQMa102 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增出 NTL 完整基因片段,并经克隆、测序获得 NTL 基因全长 DNA 序列。

1.6 NTL 基因上游序列的 Panhandle PCR 扩增

首先用限制性内切酶 *Xba* I 消化金龟子绿僵菌 CQMa102 基因组 DNA,经去磷酸化后,在消化片段 3'端连接一段与 NTL 基因 5'端已知序列互补的寡核苷酸链 56,经聚合酶延伸形成一锅柄状,加入引物 2 和引物 4 各 1.25 μ l(均为 12.5pmol),进行起始扩增:94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 4min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 7min,然后取出 1 μ l 未纯化的起始 PCR 产物,置于含有嵌套式引物(引物 1 和引物 3)并预热至 80 $^{\circ}$ C 的 PCR 管中,嵌套式扩增和起始扩增反应应用同样的酶、试剂和引物浓度,嵌套式扩增作 35 个 PCR 热循环,循环参数与起始扩增完全相同。

Panhandle PCR 产物的克隆和测序同以上 NTL 基因 PCR 产物的克隆及序列测定。根据此测序结果,设计一个新引物 Q539.4P,用该引物和引物 4,以金龟子绿僵菌 CQMa102 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增出 DNA 片段 P,克隆并测序该片段。以该片段 P 为模板,利用同位素 α -P³² dCTP 制备探针,以此探针与经限制性内切酶 *Xho* I, *Bam* H I, *Apa* L I 完全酶切的金龟子绿僵菌 CQMa102 总 DNA 做 Southern 杂交,其操作过程按文献[9]描述进行。

1.7 Northern 杂交

以金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因同源片段 F 为模板,用同位素 α -P³² dCTP 制备探针,将此探针与经甲醛变性胶电泳后 12h、24h、48h、72h 培养菌总 RNA 20 μ g 杂交,其操作过程参照文献[9]进行。

2 结果和分析

2.1 金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因同源片段的克隆和分析

根据中性海藻糖酶 NTL 基因的同源序列设计引物,PCR 扩增出金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因同源片段 F,该片段经克隆、测序后确定为 1020bp,序列分析表明该 DNA 片段无内含子,将其推导的氨基酸序列与其他丝状真菌中性海藻糖酶氨基酸序列进行同源性比较。结果表明,与已报道的金龟子绿僵菌广谱性菌株 ME1 有 99%(339/340)的同源性^[10],与稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 有 81%(278/340)同源^[11],与粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 有 80%(275/340)同源^[3],与构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 有

71%(244/340)同源性^[3]。由此推断获得的 PCR 片段可能为中性海藻糖酶基因片段。

2.2 金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因的克隆和分析

根据金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 同源片段的测序结果,采用 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增出 NTL cDNA 的 5'和 3'端序列,经拼接得到金龟子绿僵菌中性海藻糖酶 NTL cDNA 全长。根据其全长 cDNA 序列,设计引物 E1、E2,PCR 扩增、克隆金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 完整基因。然后,利用 Panhandle PCR 法扩增、克隆 NTL 基因的部分上游调控序列。

金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因 DNA 全长 3484bp,登录 NCBI 的 GenBank,登录号为 AY557613;其 cDNA 全长 2385bp,GenBank 登录号为 AY557612,编码 737 个氨基酸的蛋白,推测蛋白分子量为 83.1kD,具有中性海藻糖酶基因的共有特征,即包含一个依赖于 cAMP 的磷酸化作用位点(RRGS)^[12]和一个钙附着位点(DTDGNMQITIED)^[13]。比较金龟子绿僵菌中性海藻糖酶 NTL 基因 DNA 序列和 cDNA 序列发现,NTL 基因含有 3 个内含子,有典型的 GT...AG 边界。CQMa102 NTL 基因 DNA 序列和推导的氨基酸序列与已报道的金龟子绿僵菌广谱性菌株 ME1 中性海藻糖酶基因 DNA 序列和推导氨基酸序列(GenBank 登录号分别为:AJ298019, AJ298020)进行比较,在结构基因的长度、所编码氨基酸的长度、内含子位置等均相同,在 DNA 序列上有 145 个碱基不相同,同源性达 93%(2238/2383),两者氨基酸残基数及其位置均完全相同,仅有 6 个氨基酸残基不同(第 8 位氨基酸 Q \rightarrow R;第 10 位氨基酸 H \rightarrow R;第 60 位氨基酸 H \rightarrow Y;第 269 位氨基酸 R \rightarrow Q;第 490 位氨基酸 D \rightarrow N;第 727 位氨基酸 L \rightarrow Q),同源性达到 99%(731/737)。由此推定克隆的基因为中性海藻糖酶基因。

2.3 金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因上游调控序列的获得和分析

根据已经获得的金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因 5'端序列,设计引物,采用 Panhandle PCR 法扩增出 NTL 基因上游序列 982bp(GenBank 登录号 AY557613),该序列含 5 个 CAAT 启动子元件,还含有一个压力反应元件 STRE(Stress responsive element CCCCT),它可能具有调控 NTL 基因在各种胁迫条件下转录活性的作用^[14]。

2.4 Southern 杂交

为验证 Panhandle PCR 扩增出的 DNA 片段的确

是 NTL 基因上游序列,设计引物 Q539.4P,以此引物和引物 4 为引物对,PCR 扩增出 DNA 片段 P,并克隆、测序。其测序结果表明,该 DNA 片段含有 NTL 5'端序列和部分上游调控序列,并且不含 *Xho* I、*Bam*H I、*Apa*L I 等限制性内切酶位点。再用该片段 P 制备探针,与经限制性内切酶 *Xho* I、*Bam*H I、*Apa*L I 完全酶切、电泳、转膜后的金龟子绿僵菌 CQMa102 总 DNA 做 Southern 杂交,3 个酶切 DNA 均显示一条特异杂交带(图 1),由此可见,我们利用 Panhandle PCR 法成功地获得了金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因的上游序列,并且 NTL 基因在金龟子绿僵菌基因组中为单拷贝形式存在。

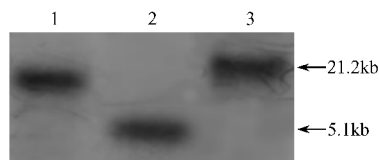


图 1 金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因 Southern 杂交分析
Fig.1 Southern blot analysis of the neutral trehalase gene of *M. anisopliae* CQMa102

Genomic DNA digested with *Xho* I, *Bam*H I and *Apa*L I restriction enzymes was hybridized with the radiolabelled P product amplified from *M. anisopliae* DNA with primers Q539.4P and 4. 1. *Xho* I 2. *Bam*H I ; 3. *Apa*L I .

2.5 表达特性分析

利用 Northern 杂交分析金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因在不同生长时期的表达特性(图 2),NTL 基因转录出约 2.5kb 的 mRNA 单带,在液体培养条件下,该基因表达水平在对数生长前期最高,对数生长后期降到最低,进入稳定生长期后表达水平又有所提高。该表达特性与已报道的丝状真菌构巢曲霉和粗糙脉孢菌中性海藻糖酶基因的表达特性不同^[3],这两种丝状真菌中性海藻糖酶基因在对数生长期大量表达,进入稳定生长期后表达水平降低。中性海藻糖酶基因在这 3 种丝状真菌中表达水平的差异,可能是由物种特性或培养条件的差异引起。

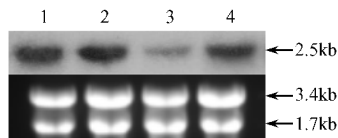


图 2 Northern 杂交分析金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因在不同生长时期的表达特性

Fig.2 Northern analysis of the expression of the neutral trehalase gene of *M. anisopliae* during the exponential growth (12h, 24h, 48h) and the stationary phase of growth (72h)

Gel RNA loadings are represented below the autoradiograph by inclusion of a UV image of the ethidium bromide-stained rRNAs in each sample lane.

1.12h 2.24h 3.48h 4.72h.

以上获得的金龟子绿僵菌 CQMa102 NTL 基因 DNA 序列和氨基酸序列同源性比较结果表明,金龟子绿僵菌 NTL 基因具有高度同源性,且该菌株是本实验室分离的高毒力杀蝗菌株,可作为 NTL 基因超表达载体和敲除载体的受体材料,为进一步阐明该基因在孢子耐储藏、抗逆境中的作用提供基础材料和科学依据。现这两种载体已经构建成功,并转化了金龟子绿僵菌 CQMa102,获得目的转化子,详细内容将另文报道。

3 讨论

App 等^[15]已经从酵母中分离出中性海藻糖酶, Kopp 等^[7]克隆并鉴定了酿酒酵母中性海藻糖酶基因。这些研究发现,中性海藻糖酶在 pH 7.0 显示最大活力,其活性受转录调控和翻译后调控机制蛋白质磷酸化的影响,定位于胞质。本试验克隆的中性海藻糖酶基因包含一个依赖于 cAMP 的磷酸化作用位点和一个钙附着位点,推测该基因可能受到翻译后磷酸化作用的调控。另外,NTL 基因上游序列包含一个压力反应元件,该元件也存在于酵母一些与抗逆有关基因的调控序列中。在压力胁迫如热击、高渗透压、有毒以及营养饥饿等条件下,介导酵母相关基因的转录激活^[16],推测该元件在金龟子绿僵菌中也可能具有类似功能。

对 mRNA 结构进行分析时,一般通过 RT-PCR 反应扩增目的区域,然后再将扩增后的目的 DNA 片段进行克隆、测序来进行。但一般的 RT-PCR 反应很难扩增某一基因的全长 cDNA 片段。RACE 法能有效地解决这一问题,通过已知的 cDNA 序列情况,进一步扩增此 cDNA 的 5'末端或 3'末端。我们采用此方法高度特异地扩增出金龟子绿僵菌中性海藻糖酶基因 cDNA 的两端序列,表明 5'-RACE 和 3'-RACE 法是一种较好的获得 cDNA 全长的方法。

Panhandle PCR 法是一种扩增已知序列旁侧未知序列的染色体步移法,可以高度特异地扩增与已知位点相邻的大于 3.0kb 的人基因组 DNA,可以应用于染色体步移、利用 cDNA 信息进行的启动子及基因结构域的定位、病毒及转座子整合位点的测定、不能克隆的 DNA 的定位和测序等^[17]。我们利用 Panhandle PCR 方法扩增金龟子绿僵菌中性海藻糖酶 NTL 基因上游序列,本试验表明 Panhandle PCR 法操作简单,步骤少,容易形成锅柄状,便于 PCR 扩增。同时,由于采用了嵌套式扩增,其特异性较高,是一种较好的克隆已知序列旁侧未知序列的方法。

参 考 文 献

- [1] Harman G E, Jin X, Stasz T E, *et al.* Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological control. *Biological Control*, 1991, **1** : 23 – 28.
- [2] Gornova I B, Feofilova E P, Tereshina V M, *et al.* Effect of carbohydrate content of *Aspergillus japonicus* spores on their survival in storage and subsequent germination. *Mikrobiologiya*, 1992, **61** : 549 – 554.
- [3] d'Enfert C, Bonini B M, Zapella P D, *et al.* Neutral trehalases catalyse intracellular trehalose breakdown in the filamentous fungi *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol*, 1999, **32** (3) : 471 – 483.
- [4] Thevelein J M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiol Rev*, 1984, **48** : 42 – 59.
- [5] Thevelein J M. Regulation of trehalase activity by phosphorylation-dephosphorylation during developmental transitions in fungi. *Exp Mycol*, 1988, **12** : 1 – 12.
- [6] Mittenbuhler K, Holzer H. Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. *J Biol Chem*, 1988, **263** : 8537 – 8543.
- [7] Kopp M, Muller H, Holzer H. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 1993, **268** : 4766 – 4774.
- [8] 单志萍, 孟 好, 姜文侯. 丝状真菌三孢布拉酶 DNA 的提取研究. *生物技术* 2001, **11** (3) : 5 – 6.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 1999.
- [10] Xia Y, Gao M, Clarkson J M, *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression of a neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 2002, **80** : 127 – 137.
- [11] Foster A J, Jenkinson J M, Talbot N J. *Magnaporthe grisea* neutral trehalase (NTH1) gene: Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *EMBO J*, 2003, **22** (2) : 225 – 235.
- [12] Kemp B E, Pearson R B. Protein kinase recognition sequence motifs. *TIBS*, 1990, **15** : 342 – 346.
- [13] Geiser J R, Van T D, Brockerho S E, *et al.* Can calmodulin function without binding calcium? *Cell*, 1991, **65** : 949 – 959.
- [14] Zahringer H, Thevelein J M, Nwaka S. Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Mol Microbiol*, 2000, **35** (2) : 397 – 406.
- [15] App H, Holzer H. Purification and characterization of neutral trehalase from the ABYS1 mutant. *J Biol Chem*, 1989, **264** : 17583 – 17588.
- [16] Clarkson J M, Chamley A K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 1996, **4** (5) : 197 – 203.
- [17] Jones D H, Winistorfer S C. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. *Nucleic Acids Research*, 1992, **20** (3) : 595 – 600.

Cloning and characterization of the neutral trehalase gene in *Metarhizium anisopliae* CQMa102

HU Zong-Li^{1,2} WANG Zhong-Kang^{1,2,3} PENG Guo-Xiong^{1,2,3} YIN You-Ping^{1,2,3} XIA Yu-Xian^{1,2,3*}

(¹ Genetic Engineering Research Center, ² Bioengineering College, Key Laboratory of Biomechanics & Tissue Engineering Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

(³ Chongqing Engineering Research Center of Fungal Insecticides, Chongqing 400030, China)

Abstract: The partial fragment of the neutral trehalase (NTL) in *Metarhizium anisopliae* CQMa102 was amplified by the polymerase chain reaction (PCR) with primers designed according to the sequences of the NTL in GenBank. The amplified fragment was cloned and sequenced. Based on the known sequence of NTL gene, the 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) were used to amplify the 5' and 3' regions of the NTL cDNA, then the whole cDNA sequence of NTL gene in *M. anisopliae* CQMa102 was obtained by combining the above sequences and its whole genomic DNA was amplified by PCR. In order to obtain more regulatory information of the NTL, panhandle polymerase chain reaction strategy was used to amplify the 5' flanking sequences adjacent to the known sequence of the neutral trehalase gene. The sequence analysis shows that the DNA sequence is 3484bp in size, includes three introns, and the cDNA sequence is 2385bp in size, encodes a protein of 737 amino acid residues with a calculated Mr of 83.1kD, in which there is a cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate-dependent phosphorylation consensus site and a putative calcium binding site, which is consistent with a regulatory enzyme. Comparison of this sequence with the NTL of *M. anisopliae* ME1 in GenBank (GenBank Accession : AJ298019, AJ298020) shows that the nucleotide homology is as high as 93%, and the amino acid homology comes up to 99%. Southern analysis indicated that NTL gene was present as a single copy in this *M. anisopliae* strain. A single transcript of approximately 2.5kb was detected by Northern blot analysis. The NTL mRNA was present throughout spore germination in rich medium, but accumulated to its highest level at the early stage of exponential growth. Thereafter, the mRNA level declined at the late stage of exponential growth, but began to show an increase during the stationary phase of growth. A 982bp upstream sequence of NTL was amplified using panhandle PCR method, which contains one stress response element (STRE). The NTL nucleotide sequence and its amino acid sequence have been accessed by GenBank (Accession : AY557613, AY557612).

Key words: *Metarhizium anisopliae*, Neutral trehalase, Locust, Insect pathogenic fungus

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30170630); Natural Science Key Foundation of Chongqing City (8564)

* Corresponding author. Tel 86-23-65120486; Fax 86-23-65120490; E-mail yuxianxia@cqu.edu.cn

Other author: CAI Shao-xi²

Received date 03-11-2005