

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53 (9) :1001 - 1008; 4 September 2013
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

真菌 *Mucor amphibiorum* RCS1 中一个类 *S*-腺苷-*L*-高半胱氨酸水解酶基因的蓝光诱导表达

高雅[#], 王舒[#], 付鸣佳^{*}, 钟果林

江西师范大学生命科学院, 南昌 330022

摘要: 【目的】确定真菌 *Mucor amphibiorum* RCS1 中一个类 *S*-腺苷-*L*-高半胱氨酸水解酶基因 (*S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase-like, *sahhl*) 受蓝光诱导表达。【方法】以真菌 *M. amphibiorum* RCS1 为研究对象, 在随机 PCR 过程中从中获得了一段 555 bp 长度的 DNA 序列。以地高辛对这段已知序列进行标记制备探针, 通过 Northern 杂交检测 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝体培养过程中, 由黑暗到蓝光再到黑暗这一光照条件改变的情况下, *sahhl* 基因的转录情况。同时结合应用 real-time PCR 方法进行分析检测。【结果】经过比对确定这段 555bp 序列与已经发表的人 (*Homo sapiens*)、家鼠 (*Mus musculus*) 和部分真菌的 *S*-腺苷-*L*-高半胱氨酸水解酶基因 *sahh* 有较高的同源性。因此, 初步确认这段 mRNA 序列来自 *M. amphibiorum* RCS1 的一个类 *S*-腺苷-*L*-高半胱氨酸水解酶基因。 *sahhl* 基因在黑暗预培养 24 h 的情况下, 蓝光诱导 24 h 时通过 Northern 杂交和 real-time PCR 均可从菌丝体中检测到 *sahhl* 基因的大量转录。但 *sahhl* 基因在黑暗预培养 48 h 的情况下, 通过 real-time PCR 没有检测到 *sahhl* 基因的大量表达。【结论】上述结果说明, 蓝光可以诱导 *M. amphibiorum* RCS1 中生长旺盛的菌丝体中 *sahhl* 基因的表达。

关键词: *S*-腺苷-*L*-高半胱氨酸水解酶, 蓝光, *Mucor amphibiorum* RCS1, northern 杂交, real-time PCR

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 09-1001-08

S-腺苷-*L*-高半胱氨酸水解酶 (*S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase, SAHH 或 AdoHcyase) (*E. C.* 3.3.1.1), 英文名称还可以是 Adenosylhomocysteinase、*S*-Adenosylhomocysteinase、*S*-Adenosylhomocysteine hydrolase 等, 该酶在真核生物中催化 *S*-腺苷高半胱氨酸 (*S*-adenosylhomocysteine, AdoHcy) 可逆水解生成腺苷 (adenosine, Ado) 和高半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) ^[1-2]。因此, 也可简称为 AdoHcy 水解酶。现

有的研究表明不同来源的 SAHH 大都为一同源四聚体结构, 每个亚基含有 1 分子紧密结合的辅酶 (NAD^+)。单体亚基由 3 个结构域组成: N 端底物结合域或催化域 (substrate-binding domain 或 catalytic domain)、NAD 结合域 (NAD-binding domain) 和 C 端域 (C-terminal domain) ^[2-3]。SAHH 的活性与人体许多疾病有关, 这主要是因为该酶控制组织 AdoHcy 水平和调节各种转甲基酶活性方面

基金项目: 国家自然科学基金 (31060004, 31260010); 江西省自然科学基金 (2010GZN0115)

* 通信作者。Tel: +86-791-88120391; E-mail: mingjiafu@yahoo.com.cn

作者简介: 对本文有同等贡献。高雅 (1990 -), 女, 江西彭泽人, 硕士研究生, 从事真菌生化与分子生物学研究, E-mail: gaoyaoya1104@163.com; 王舒 (1987 -), 女, 江西高安人, 硕士, 从事真菌生化与分子生物学研究, E-mail: guiya.touws@yahoo.com.cn

收稿日期: 2013-01-31; 修回日期: 2013-05-08

发挥着关键作用。例如,哺乳动物中,Hey 只由 AdoHey 的水解产生,而 Hey 是冠心病、痴呆和阿尔茨海默病发病的高危险因素^[4-5]。再如,大多数动植物病毒在复制过程中其 mRNA 5'末端均需要一个甲基化的“帽子”结构,通过抑制 SAHH,就可以反馈性抑制与形成“帽子”结构有关的病毒编码的转甲基酶,从而抑制病毒的复制^[6],这也为设计抗病毒药物提供了靶标。关于 SAHH 与某些疾病治疗的研究已见诸相关综述文章^[7-8]。而 SAHH 在真菌中的正式研究报道比较少,孙晓红等对草菇 SAHH 的基因进行了克隆和分析^[9];汪虹等研究了 SAHH 的同源基因 *Cor3* 基因可能参与了低温胁迫调节^[10]。表明在真菌中也存在 SAHH 基因或同源基因。

蓝光是重要的环境刺激因素,对真菌的形态发生和生理生化有重要的影响,目前已经在多种真菌中发现有蓝光受体基因^[11-16]。研究表明,真菌中的蓝光受体接受蓝光信号以后可以导致真菌细胞中的多种蛋白质和酶的活性水平的变化,从而改变真菌的趋光性、形态发生、生理节律和生理生化等方面^[17-21]。

在前期的研究工作,一个毛霉属的真菌从稻草中分离了出来,鉴定和定名为 *Mucor amphibiorum* RCS1,并以该种真菌进行相关的蓝光调控基因的克隆和蓝光调控研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验用菌种: *M. amphibiorum* RCS1 为本实验室分离,并保存在 4℃ 冰箱中。使用前于马铃薯培养基(PDA)上 28℃ 倒置培养,活化 2 次。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 在加入 20% 的甘油的情况下于 -80℃ 保存,使用前接种在 LB 培养基上,37℃ 活化培养 2 次。

1.1.2 主要试剂和仪器: Trizol RNA Extractor、M-MuLV cDNA 第一链的合成试剂盒、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒、Amp、Yeast Extract 和琼脂糖购于上海生工生物工程公司。Recombinant DNase I 去除基因组试剂、pMD18-T 载体和 DNA Marker 购于宝生物工程(大连)有限公司。2 \times Taq PCR MasterMix 购于北京天根有限公司。地高辛(Dig)标记试剂盒 I 和地高辛

杂交检测试剂盒 I 购自于深圳莱伯克生物技术有限公司。Fast SYBR[®] Green Master Mix 为美国应用生物系统公司(Applied Biosystems, USA)产品。尼龙膜为美国珀金埃尔默有限公司(Perkin-Elmer, USA)产品。其他试剂均为国产分析纯。PTC-200 型 PCR 仪为美国 MJ-Research 公司产品,用于实时荧光定量 PCR 的 ABI StepOne Real-Time PCR System 为美国应用生物系统公司产品。

1.2 *M. amphibiorum* RCS1 蓝光诱导培养

M. amphibiorum RCS1 菌接入 PDA 培养基以后,首先将接种有 *M. amphibiorum* RCS1 的培养皿用锡铂纸包裹,28℃ 条件下进行黑暗预培养 24 h,而后再将锡铂纸去除置于蓝光下照射培养,其他条件均不改变。期间分别在黑暗 24 h 时第一次取样,而后分别在蓝光照射 1、4、8、12 和 24 h 时分别进行菌丝体取样,所取样品保存于 -40℃ 备用;再将受蓝光照射培养 24 h 以后的 *M. amphibiorum* RCS1 菌重新用锡铂纸包裹,并在重新进入黑暗后的 24 h 和 48 h 分别取样,所取样品也保存于 -40℃ 备用。进行 real-time PCR 检测的样品,分两批进行取样:第一批是在 28℃ 条件下进行黑暗预培养 24 h 第一次取样;黑暗预培养 24 h 后进入蓝光照射培养,并在蓝光照射的 4、8、12 和 24 h 分别取样;蓝光照射 24 h 后重新进行黑暗培养,并在黑暗后的 12h 和 24h 分别进行取样;所有时间点的取样有 3 个重复。第二批是在 28℃ 条件下进行黑暗预培养 48 h 第一次取样,其他取样方式同第一批。

1.3 *M. amphibiorum* RCS1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

前期已经收集的存于 -40℃ 的样品可用来进行总 RNA 的提取;首先取 0.05 - 0.1 g 的菌丝体置于研钵中,加入液氮后迅速进行研磨,研磨后的粉末放入 1.5 mL 的离心管中,加入 1 mL Trizol 试剂,而后再进行氯仿抽提,上清液的异丙醇沉淀,以及沉淀的 75% 乙醇洗涤,最终可获得 *M. amphibiorum* RCS1 的总 RNA。操作过程均按试剂盒生产厂家说明书操作,电泳检测所提取 RNA。

cDNA 第一链的合成采用第一链 cDNA 合成试剂盒,反转录酶为 M-MuLV,在 20 μ L 的反转录体系中加入 1 μ L 的酶和 2 μ L RNA 酶抑制剂,42℃ 孵育 60 min,而后 70℃ 10 min 以终止反应。操作过程均按试剂盒生产厂家说明书操作。

1.4 *M. amphibiorum* RCS1 中 *S-adenosyl-L-homocystine hydrolase-like (sahhl)* 基因部分序列的克隆

在前期进行蓝光调控研究中,设计了一系列的引物用于随机扩增受蓝光诱导后的 *M. amphibiorum* RCS1 菌中的相关基因,以期获得这一类基因。但在扩增产物中所设计的一对引物 Car3: 5'-ACGCATCGACCCTTTCAGC-3' 和 Car4: 5'-CTTGTCGAGGTTGAACCTT-3' 却扩增获得了 *sahhl* 基因。PCR 扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。胶回收纯化 PCR 产物, 连接到 pMD18-T 载体 (宝生物工程 (大连) 有限公司产品) 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆, PCR 检测后测序, 获得 *sahhl* 基因部分序列后利用生物信息学数据库和互联网上的软件进行分析。

1.5 探针 (Dig-DNA) 制备及检测

Northern 杂交用的探针以地高辛 (Dig) 标记试剂盒 I 进行标记, *sahhl* 基因部分序列仍用 Car3 和 Car4 做为引物, 底物为 *sahhl* 基因部分序列在 pMD18-T 载体上的阳性克隆子 (测序结果表明该质粒中带有 *sahhl* 基因部分序列)。在探针制备的 PCR 反应过程中, 试剂盒中带有 Dig-dUTP 用以合成带 Dig 标记的探针。探针合成的反应体系按试剂盒说明书配制。整个 PCR 扩增条件同步骤 1.3, 但退火温度为 60℃。

1.6 Northern 杂交

所提取的 *M. amphibiorum* RCS1 菌菌丝体总 RNA 在含有 1.2% 甲醛变性琼脂糖凝胶上电泳, 而后溴化乙锭 (EB) 染色来确定完整性, RNA 被转移到尼龙膜上, 而后按地高辛杂交检测试剂盒 I 说明书进行预杂交、杂交、洗膜。洗膜后用碱性磷酸酶显色法进行检测。

1.7 *M. amphibiorum* RCS1 中蓝光诱导 *sahhl* 基因表达的 real-time PCR 检测

按照 Real-time PCR 的引物要求设计了 *sahhl* 基因引物 SA1: 5'-ACATCACCGTAACCAGCGAC-3' 和 SA2: 5'-TCTGTCACCAAGTCCAAGTTCG-3'。内标基因采用的是 18S rRNA, 在 ncbi 上搜索到 GenBank: AF113426.1, 按照实时荧光定量 PCR 设计了相应的引物 S18S1: 5'-CTGCGAAACATTTGACCC-3' 和 S18S2: 5'-TTCAGCCTTGCGTCCCATAC-3'。扩增之

前, 18S rRNA 反转录 cDNA 第一链引物为 random primers。所有引物由 Invitrogen (英俊) 公司合成。在这里采用两步法 PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 20 s, 而后 95℃ 10 s 和 60℃ 30 s 进行, 40 个循环。Real-time PCR 在 ABI StepOne Real-Time PCR System 上完成, 整个过程按厂家说明书进行。每个时间点的样品, 根据取样结果均有 3 个重复。数据处理用 Δ CT 法处理数据:

$$\text{目标基因/管家基因} = 2^{-\Delta\text{CT}}$$

$$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{目标基因}} - \text{CT}_{\text{管家基因}}$$

2 结果

2.1 *Mucor amphibiorum* RCS1 总 RNA 的提取

经过黑暗和蓝光照射以后, RCS1 菌的菌丝体连同培养基一起迅速冰冻在 -40℃, 而后进行 RCS1 菌总 RNA 的提取。从蓝光照射培养和黑暗培养获得的 *M. amphibiorum* RCS1 菌的菌丝体中均可提取获得用于进行反转录的总 RNA (图 1)。从图 1 中可以看出所获得的总 RNA 有两条清晰的 28S 和 18S 条带, 其中图 1a 为蓝光照射 24h 的菌丝体中提取的 RNA, 图 1b 为黑暗培养的菌丝体中提取的 RNA, 表明蓝光照射培养和黑暗培养所获得的菌丝体中均可获得较好的总 RNA。

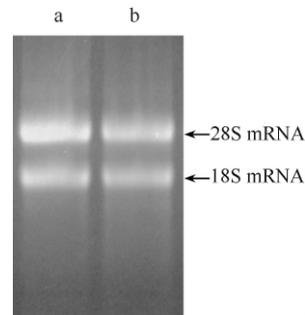


图 1. 从 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝体中提取的总 RNA

Figure 1. Total RNA was extracted from *M. amphibiorum* RCS1 mycelia. Lane a, Total RNA extracted from the mycelia of *M. amphibiorum* RCS1 in the condition of blue light 24h; lane b, Total RNA extracted from the mycelia of *M. amphibiorum* RCS1 in the condition of darkness.

2.2 *M. amphibiorum* RCS1 中 *sahhl* 基因部分序列的 RT-PCR 扩增

前期进行蓝光调控基因的研究中,设计了一系

列相关引物进行基因的随机扩增研究。在设计用于扩增八氢番茄红素脱氢酶基因的引物时,其中一对引物 car3 和 car4 以蓝光处理 24 h 的 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝体 RNA 进行 RT-PCR 扩增,获得了 PCR 产物;经进一步优化以后,以引物 car3 和 car4 对 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝体总 RNA 逆转录的 cDNA 第一链进行 PCR 扩增,可获得一个约 555 bp 的特异产物(图 2)。从图 2 中可以看出,在蓝光处理 24 h 以后所获得的 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝体,其中的 RNA 反转录后进行 RT-PCR,其扩增产物可获得明亮的 555 bp 大小电泳条带(图 2 中的泳道 1);而最初黑暗处理 24 h 的 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝体,其 RNA 反转录后进行 RT-PCR 扩增,其扩增产物有很淡的 555bp 大小电泳条带(图 2 中的泳道 2)。从这一结果来看,暗示蓝光的处理可能会促进 *sahhl* 基因的表达。

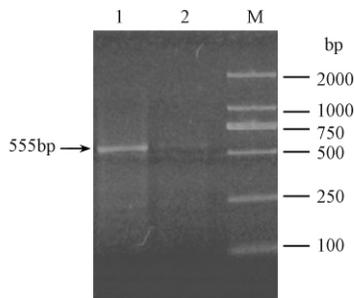


图 2. *sahhl* 基因部分序列的 RT-PCR 扩增

Figure 2. The partial *sahhl* gene DNA fragment was amplified by RT-PCR and identified to be 555bp. Lane 1, amplified DNA fragment from the RNA of mycelia in 12 h blue light culture; lane 2, amplified DNA fragment from the RNA of mycelia in darkness culture; M, DNA marker.

2.3 *M. amphibiorum* RCS1 的 *sahhl* 基因部分序列分析

将已经获得的 555 bp 长度的 DNA 克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序。所获得的序列经 ncbi 中的 BLAST 软件分析,发现该序列与人 (*Homo sapiens*) 的 *sahh* 基因同源性达到 72%,与家鼠 (*Mus musculus*) *sahh* 基因同源性也达到 72%。而与其他真菌的 *sahh* 基因或类似的 *sahh* 基因有较高的同源性,其中与一种植物病原真菌 *Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP 的 *sahh* 基因同源性有 79%,与脉胞菌 *Neurospora crassa* OR74A 的有 80% 同源性, *Penicillium marneffeii* ATCC 18224 为 78%, *Aspergillus clavatus* NRRL 1 为 79%, *Aspergillus niger* CBS

513.88 为 77%, *Leptosphaeria maculans* JN3 为 78%, 等等。通过比较以后,与其他物种的 *sahh* 基因同源性基本在 70% 以上。由此初步推测该序列为存在于 *M. amphibiorum* RCS1 中的 *sahh* 基因或类似 *sahh* 基因的部分序列,已经呈送 ncbi, GenBank 接受号 ACCSSION: KC461296。

2.4 Northern 杂交用探针的合成

以地高辛 (Dig) 标记试剂盒 I 进行探针的合成,使杂交中的探针能标记上 Dig。 *M. amphibiorum* RCS1 的 *sahh* 基因部分序列已经构建在质粒载体 pMD18-T,以该质粒为底物,以 Car3 和 Car4 做为 *M. amphibiorum* RCS1 菌 *sahh* 基因部分序列扩增的引物,进行特异性的 PCR 扩增,电泳检测到一条 555bp DNA 条带。这表明合成了可用于 Northern 杂交检测的探针,扩增过程中目标 DNA 条带已经标记上地高辛。

2.5 *M. amphibiorum* RCS1 中 *sahhl* 基因蓝光诱导表达的 Northern 杂交检测

研究中设计了对 *M. amphibiorum* RCS1 黑暗处理和蓝光照射处理的方案。将获得的 8 组菌丝体分别提取总 RNA,变性琼脂糖凝胶电泳检测表明已经获得了这 8 组的总 RNA (图 3)。将这 8 组的总 RNA 进行变性电泳后,转尼龙膜,再用地高辛标记的 *sahhl* 基因探针与 *M. amphibiorum* RCS1 的 8 组 RNA 进行杂交。检测表明,在黑暗的 24 h 时进行杂交检测并没有 *sahhl* 基因的表达(图 3-1);再将已经黑暗生长 24 h 后的菌丝体置于蓝光下照射,在蓝光照射的 1 h、4 h 和 8 h 均没有检测到 *sahhl* 基因表达的杂交带(图 3-2,图 3-3,图 3-4);只有蓝光照射

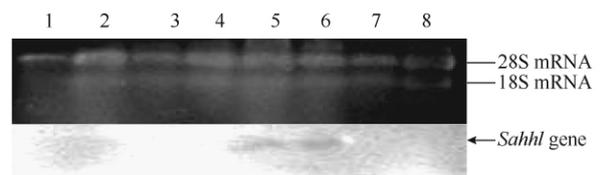


图 3. *M. amphibiorum* RCS1 中 *sahhl* 基因的 northern 杂交检测

Figure 3. Northern blotting analysis of *sahhl* gene from the total RNA of *M. amphibiorum* RCS1 mycelium. Transcription of *sahhl* gene in the mycelia can be detected in the condition of blue light 12 h and 24 h. Lane 1, darkness 24 h; lane 2, blue light 1 h; lane 3, blue light 4 h; lane 4, blue light 8 h; lane 5, blue light 12 h; lane 6, blue light 24 h; lane 7, blue light 24 h then darkness 24 h; lane 8, blue light 24 h then darkness 48 h.

12 h 和蓝光照射 24 h 的 RNA 中出现了 *sahhl* 基因表达的杂交带 (图 3-5, 图 3-6); 但在蓝光照射 24 h 后再进行黑暗培养 24 h 和 48 h 时, 分别取样, 这两个样品中未检测到 *sahhl* 基因表达的杂交带 (图 3-7, 图 3-8)。这表明在蓝光照射 24 h 内, 时间的延长有利于 *sahhl* 基因 mRNA 量的增加。而在去除蓝光照射 24 h 后, 促进 *sahhl* 基因表达的条件会消失。

2.6 *M. amphibiorum* RCS1 中 *sahhl* 基因蓝光诱导表达的 real-time PCR 分析

根据 Northern 杂交的结果设计了 real-time PCR 的检测方案。*M. amphibiorum* RCS1 菌丝体通过黑暗的预培养以后, 再进行蓝光照射培养, 并在不同的时间取样提取 RNA 进行 real-time PCR 检测, 以确定蓝光对 *sahhl* 基因表达的影响。研究中采用了 18S RNA 做为内标对照基因, 因此检测的 *sahhl* 基因表

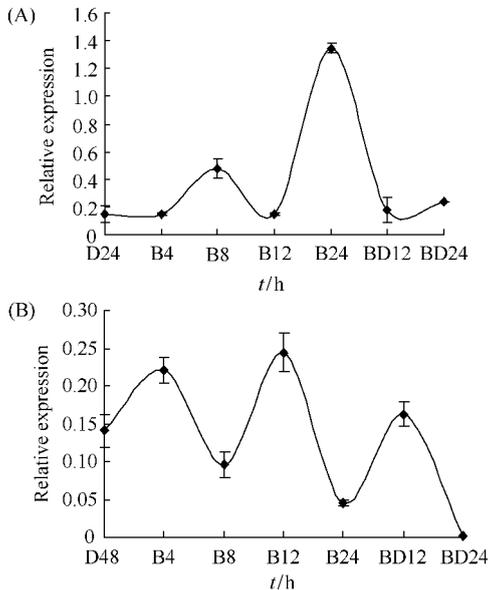


图 4. *M. amphibiorum* RCS1 中 *sahhl* 基因蓝光诱导表达的 real-time PCR 检测

Figure 4. Real-time PCR analysis of *sahhl* gene expression that was induced by blue light in *M. amphibiorum* RCS1 mycelia. (A) A large amounts of transcript of *sahhl* gene in the mycelia can be detected in the condition of blue light 24 h Under the dark pre-culture in 24 h through real-time PCR analysis; (B) A large amounts of transcript of *sahhl* gene wasn't found under the dark pre-culture in 48 h through real-time PCR analysis in *M. amphibiorum* RCS1 mycelia, although having a small change of *sahhl* gene expression under blue light irradiation (D24: darkness 24 h; D48: darkness 48 h; B4: blue light 4 h; B8: blue light 8 h; B12: blue light 12 h; B24: blue light 24 h; BD12: blue light 24 h then darkness 12 h; BD24: blue light 24 h then darkness 24 h).

达是相对表达量。通过检测表明: 第一批取样中获得的结果与 Northern 杂交的结果有较大的吻合 (图 4-A), 即黑暗预培养 24 h 和前期蓝光照射 (蓝光照射 12 h 前) 时 *sahhl* 基因表达仅在 8 h 时有个小高峰值 0.48 (图 4-A), 相对表达量并不高; 而在蓝光照射 24 h 时, 相对表达量达到一个最大值 1.34 (图 4-A), 这与 Northern 杂交的结果一致; 但在蓝光照射 12 h 时没有检测到象 Northern 杂交的结果, 即 *sahhl* 基因有较高的表达量, 推测这应该是这两个方法检测时取样误差所致; 而在蓝光照射培养以后再进入黑暗培养, *sahhl* 基因相对表达量又快速下降 (图 4-A), 这与 Northern 杂交的结果一致。第二批取样中, 黑暗预培养变为 48 h, 但结果变化很大, 尽管在蓝光照射 4 h 和 12 h 有两个小高峰, 但 *sahhl* 基因相对表达量值仅为 0.22 和 0.24 (图 4-B); 在由蓝光进入黑暗时, *sahhl* 基因相对表达量值有个微幅提升, 但最终在再进入黑暗 24 h 时相对表达量接近为 0 (图 4-B)。由此表明前期的黑暗预培养时间, 会影响到后期蓝光对 *sahhl* 基因表达的影响。

3 讨论

对 *M. amphibiorum* RCS1 中获得的一个类 S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因 (*sahhl*) 的部分序列进行了分析, 与其他物种有较高的同源性。初步表明这段来自 mRNA 反转录产物的 555bp 序列, 是来自 *M. amphibiorum* RCS1 中的一个类 S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因的产物。将这段序列进行可能的蛋白质序列翻译分析, 可以翻译获得一个 179aa 的多肽 (图 5-A)。将这一段多肽序列通过 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 网上在线分析表明, 这一段多肽序列正好有一个 AdoHcyase_NAD 结构域, 即结合 NAD⁺ 的结构域, 位置在这段多肽的 25 - 178aa 之间。已有研究表明, SAHH 要求有 NAD⁺ 来维持它的结构和催化活性^[22]。通过 <http://swissmodel.expasy.org> 网站, 在线分析了这段多肽的三维结构 (图 5-B), 从图中可以看出这段结合 NAD⁺ 的氨基酸序列形成一个较为稳定的对称结构。从这些分析来看, 研究中所获得的 *M. amphibiorum* RCS1 中的 *sahhl* 基因, 其可能的翻译产物在结构上带有较为明显的 SAHH 酶特性。

M. amphibiorum RCS1 在适宜温度的培养条件

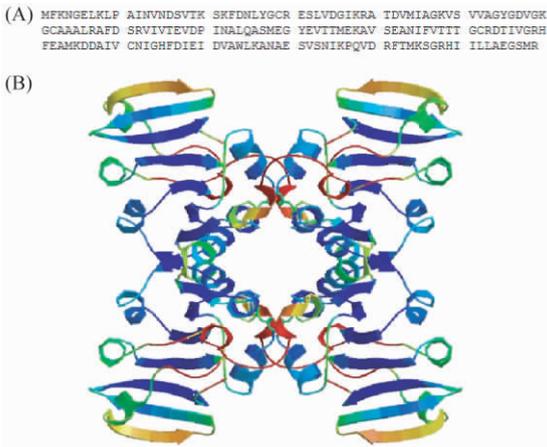


图 5. *sahhl* 基因部分序列推测的多肽翻译序列 (A) 及其三维结构模拟 (B)

Figure 5. Putative peptide sequence (A) by partial *sahhl* mRNA and its three-dimensional Structure modeling (B).

下生长很快,一般接种 2 d 后就可接近长满培养皿。在研究中,将菌丝没有完全长满的培养皿置于蓝光下,经过不同时间取样,再经过 Northern 杂交和 real-time PCR 检测,基本可以肯定,蓝光可以促进其中的 *sahhl* 基因的表达。研究表明在黑暗预培养 24 h 的情况下,*M. amphibiorum* RCS1 受蓝光照射后并非在很短的时间内有 *sahhl* 表达,需要一定蓝光照射时间的积累,其促进表达作用在蓝光照射 24 h 可以达到一个较大的表达量值(图 3 和图 4-A);而重新进入黑暗以后,蓝光促进表达的作用会逐渐消失。研究还发现,如果黑暗预培养时间改变为 48 h 时,蓝光对 *sahhl* 表达没有很大的影响(图 4-B),这时 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝体几乎长满整个培养皿,表明其菌丝细胞已经开始进入衰老阶段。因此,蓝光对 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝中 *sahhl* 基因表达的影响仅限于生长旺盛的菌丝细胞中。

在研究中,进行 *sahhl* 基因的 PCR 扩增时,黑暗中的样品也有极少量的扩增产物,但因为 Dig 标记的灵敏度不是特别高,杂交时可能检测不出来,而在 real-time PCR 检测时可检测到(图 4-A)。由此表明该基因的表达在没有蓝光照射时也会进行,而蓝光仅是促进了 *sahhl* 基因的表达量(图 3 和图 4-A)。

有研究表明,SAHH 在哺乳动物中是一种“看家酶”(housekeeping enzyme)^[23],而在 *M. amphibiorum* RCS1 中的表达却可以受到诱导。在这里可以推测出两个结果:(1) *sahhl* 基因表达受蓝光调控,这可以肯定在 *M. amphibiorum* RCS1 中存在一个蓝光受体

系统;(2)若 *sahhl* 基因表达的产物确实是 SAHH,那么蓝光对 *M. amphibiorum* RCS1 菌丝体中的腺苷和高半胱氨酸的含量起到一个间接的调控作用。关于 *M. amphibiorum* RCS1 中 *sahhl* 基因的全基因的测序研究将进一步进行,同时将对该基因的产物性质进行深入研究。

参考文献

- [1] Haba GD, Cantoni GL. The enzymatic synthesis of *S*-adenosyl-*L*-homocysteine from adenosine and homocysteine. *The Journal of Biological Chemistry*, 1959, 234: 603-608.
- [2] Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, Howell PL. Structure and function of *S*-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2000, 33 (2) : 101-125
- [3] Yang X, Hu Y, Yin DH, Turner MA, Wang M, Borchardt RT, Howell PL, Kuczera K, Schowen RL. Catalytic Strategy of *S*-Adenosyl-*L*-homocysteine Hydrolase: Transition-State Stabilization and the Avoidance of Abortive Reactions. *Biochemistry*, 2003, 42 (7) : 1900-1909.
- [4] Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *The New England Journal of Medicine*, 1997, 337 (4) : 230-236.
- [5] Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW, Wolf PA. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 2002, 346 (7) : 476-483.
- [6] Steere JA, Honek JF. Synthesis and biological activity of novel *S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, 11 (15) : 3229-3236.
- [7] Yuan CS, Saso Y, Lazarides E, Borchardt RT, Robins MJ. Recent advances in *S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase inhibitors and their potential clinical. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 1999, 9 (9) : 1197-1206.
- [8] Fu Y, Wu Q, Yang Y, Zuo J. Advances in research of novel drugs based on *S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase as a potential target. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2006, 20 (6) : 510-514. (in Chinese)

- 付云峰, 吴庆莉, 杨以阜, 左建平. 以 S-腺苷同型半胱氨酸水解酶为潜在靶点的新药研究进展. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 20 (6) : 510-514.
- [9] Sun X, Chen M, Wang H, Feng A, Pan Y. Cloning and sequence analysis of a *S-adenosyl-L-homocysteine* hydrolase gene from *Volvariella volvacea*. *Acta Edulis Fungi*, 2010, 17 (1) : 22-25. (in Chinese)
孙晓红, 陈明杰, 汪虹, 冯爱萍, 潘迎捷. 草菇 S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因的克隆和序列分析. 食用菌学报, 2010, 17 (1) : 22-25.
- [10] Wang H, Chen M, Feng A, Qiao N. Expression of a low temperature-induced *S-adenosyl-L-homocysteine* hydrolase gene (*Cor3*) in a low temperature sensitive strain and a cold tolerant mutant of *Volvariella volvacea*. *Acta Edulis Fungi*, 2010, 17 (1) : 14-16. (in Chinese)
汪虹, 陈明杰, 冯爱萍, 乔娜. 草菇 S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶同源基因 *Cor3* 低温条件下的表达变化. 食用菌学报, 2010, 17 (1) : 14-16.
- [11] Ballario P, Vittorioso P, Magrelli A, Talora C, Cabibbo A, Macino G. White Collar-1, a Central Regulator of Blue Light Responses in *Neurospora*, is a Zinc Finger Protein. *The EMBO Journal*, 1996, 15:1650-1657.
- [12] Sanz C, Rodríguez-Romero J, Idnurm A, Christie JM, Heitman J, Corrochano LM, Eslava AP. From the cover: phycomyces MADB interacts with MADA to form the primary photoreceptor complex for fungal phototropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106 (17) : 7095-7100.
- [13] Silva F, Torres-Martínez S, Garre V. Distinct white collar-1 genes control specific light responses in *Mucor circinelloides*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61 (4) : 1023-1037.
- [14] Purschwitz J, Müller S, Kastner C, Schöser M, Haas H, Espeso EA, Atoui A, Calvo AM, Fischer R. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Current Biology*, 2008, 18 (4) : 255-259.
- [15] Kihara J, Moriwaki A, Tanaka N, Ueno M, Arase S. Characterization of the *BLR1* gene encoding putative blue-light regulator in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 266 (1) : 110-118.
- [16] Schmoll M, Franchi L, Kubicek C P. Envoy, a PAS/LOV domain protein of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*), modulates cellulase gene transcription in response to light. *Eukaryotic Cell*, 2005, 4 (12) : 1998-2007.
- [17] Kertesz-Chaloupkova K, Walser PJ, Granada JD, Aebi M, Kues U. Blue light overrides repression of asexual sporulation by mating type genes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Fungal Genetics Biology*, 1998, 23 (1) : 95-109.
- [18] Lauter FR, Marchfelder U, Russo VEA, Yamashiro CT, Yatzkan E, Yarden O. Photoregulation of *cot-1*, a kinase-encoding gene involved in hyphal growth in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics Biology*, 1998, 23 (3) : 300-310.
- [19] Idnurm A, Rodríguez-Romero J, Corrochano LM, Sanz C, Iturriaga EA, Eslava AP, Heitman J. The *Phycomyces mada* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (12) : 4546-4551.
- [20] Velayos A, Blasco JL, Alvarez MI, Iturriaga EA, Eslava AP. Blue-light regulation of phytoene dehydrogenase (*carB*) gene expression in *Mucor circinelloides*. *Planta*, 2000, 210 (6) : 938-946.
- [21] Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC. White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science*, 2002, 297 (5582) : 815-819.
- [22] Palmer JL, Abeles RH. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254: 1217-1226.
- [23] Merta A, Aksamit RR, Kasir J, Cantoni GL. The gene and pseudogenes of rat *S-adenosyl-L-homocysteine* hydrolase. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 229: 575-582.

Blue-light induced expression of *S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase-like* gene in *Mucor amphibiorum* RCS1

Ya Gao[#], Shu Wang[#], Mingjia Fu^{*}, Guolin Zhong

College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, China

Abstract: [Objective] To determine blue-light induced expression of *S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase-like* (*sahhl*) gene in fungus *Mucor amphibiorum* RCS1. [Methods] In the random process of PCR, a sequence of 555 bp was obtained from *M. amphibiorum* RCS1. The 555 bp sequence was labeled with digoxin to prepare the probe for northern hybridization. By northern hybridization, the transcription of *sahhl* gene was analyzed in *M. amphibiorum* RCS1 mycelia culture process from darkness to blue light to darkness. Simultaneously real-time PCR method was used to the *sahhl* gene expression analysis. [Results] Compared with the sequence of *sahh* gene from *Homo sapiens*, *Mus musculus* and some fungi species, a high homology of the 555 bp sequence was confirmed. Therefore, the preliminary confirmation has supported that the 555 bp sequence should be *sahhl* gene from *M. amphibiorum* RCS1. Under the dark pre-culture in 24 h, a large amounts of transcript of *sahhl* gene in the mycelia can be detected by northern hybridization and real-time PCR in the condition of 24 h blue light. But a large amounts of transcript of *sahhl* gene were not found in other detection for the dark pre-culture of 48 h, even though *M. amphibiorum* RCS1 mycelia were induced by blue light. [Conclusion] Blue light can induce the expression of *sahhl* gene in the vigorous growth of *M. amphibiorum* RCS1 mycelia.

Keywords: *S-adenosyl-L-homocysteine* hydrolase, blue light, *Mucor amphibiorum* RCS1, northern hybridization, real-time PCR

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31060004, 31260010) and by the Jiangxi Province Natural Science Foundation (2010GZN0115)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-791-88120391; E-mail: mingjiafu@yahoo.com.cn

[#]These authors contributed equally to this work.

Received: 31 January 2013/Revised: 8 March 2013