

枝状枝孢霉 MD2 的 *Unigene A03231* 的 克隆及原核表达分析

张 鹏,周 兰,席晓圆,德 格,柯友胜,刘 盼,宋发军*

(中南民族大学 生命科学学院 生物技术国家民委重点实验室/
武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室,武汉 430074)

摘 要 为研究真菌紫杉醇合成相关基因的功能,从产紫杉醇真菌枝状枝孢霉 MD2 中克隆了 *Unigene A03231* 的 DNA 和 cDNA 全长序列(918 bp)。结果表明:该基因不含内含子,其编码产物含 305 个氨基酸,与短链脱氢酶/还原酶一致性为 64%,预测蛋白分子量为 33071.5 Da,不存在信号肽,含有 2 个跨膜结构。*Unigene A03231* 以单拷贝形式存在于基因组,在 0~30 h 内其表达水平随茉莉酸甲酯诱导表现为先升高后降低。构建了该基因的原核表达菌株,初步优化了其在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达条件为:诱导温度 28℃,IPTG 浓度 0.6 mmol/L,诱导时间 8 h。为深入分析该基因的催化功能奠定了基础。

关键词 枝状枝孢霉;紫杉醇;基因;克隆;原核表达

中图分类号 Q36 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)01-0035-06

Cloning and Prokaryotic Expression Analysis of *Unigene A03231* from *Cladosporium cladosporioides* MD2

Zhang Peng, Zhou Lan, Xi Xiaoyuan, De Ge, Ke Yousheng, Liu Pan, Song Fajun

(Key Laboratory for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission/Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract To study the function of fungal paclitaxel-related genes, the DNA sequence and cDNA sequence (918 bp) of *Unigene A03231* were cloned from one paclitaxel-producing fungus of *Cladosporium cladosporioides* MD2. The results indicated that *Unigene A03231* sequence had no introns, whose encoded protein contained 305 amino acids, with a percentage of exact agreement of 64% with short chain dehydrogenase/reductase. The gene was predicted to be of a molecular weight of 33071.5 Da, have no signal peptide, but have two transmembrane structures. *Unigene A03231* existed in the host genome with a single copy. The expression levels of *Unigene A03231* responding to methyl jasmonate induction firstly increased and then decreased within 30 h. Additionally, the prokaryotic expression strains of *Unigene A03231* was constructed, and its expression conditions in *E. coli* BL21 were optimized as following: induced at 28 °C for 8 h with 0.6 mmol/L IPTG. These results would provide a basis for further analysis of the catalytic function of *Unigene A03231*.

Keywords *Cladosporium cladosporioides*; taxol; gene; clone; prokaryotic expression

紫杉醇是分离自红豆杉的具有促进微管蛋白聚合及抑制细胞有丝分裂的独特抗癌药物^[1],但由于

植物的药用成分含量受其品种、生长环境和采集季节等因素的影响较大^[2],且红豆杉野生资源匮乏,

收稿日期 2017-06-13 * 通讯作者 宋发军,研究方向:应用生物化学,E-mail:songfajun@mail.scuec.edu.com

作者简介 张 鹏(1977-),男,副教授,博士后,研究方向:药用植物内生菌研究,E-mail:zhangpenghust@126.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31370118);湖北省本科高校“生物技术专业综合改革”试点资助项目(GJZ15006);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(CZW15019);校企合作资助项目(HZY14024);中南民族大学大学生创新创业资助项目(SCX1725,GCX1725,SKYCX17020)

因此,仅依靠从红豆杉中提取紫杉醇无法满足市场需求.植物内生菌是一类生活在健康植物组织和器官内的微生物类群^[3],许多植物内生菌可生产与宿主植物相同的生物活性物质.1993年首次发现红豆杉内生真菌 *Taxomyces andreanae*^[4]可以产紫杉醇,目前已分离了20多个属的上百株可产紫杉醇的内生真菌^[5,6].但紫杉醇产量较低和不稳定等因素制约了产紫杉醇真菌的产业化应用^[7].提高真菌紫杉醇产量的方法包括发酵条件优化^[7]、诱变育种^[8,9]及基因工程育种^[10]等,其中通过基因工程手段构建紫杉醇稳定高产菌株是实现其产业化应用的主要途径之一^[11,12].目前关于真菌紫杉醇的合成相关酶类基因的报道极少^[13],因此,开发真菌的紫杉醇合成相关基因资源并明晰其功能成为解决真菌紫杉醇产量低及不稳定等问题的关键.

枝状枝孢霉(简称枝霉,MD2)是本实验室从曼地亚红豆杉分离的产紫杉醇内生真菌^[14].本研究在完成枝霉 MD2 基因组和转录组测序的基础上,分析各基因响应茉莉酸甲酯(MeJA)诱导的表达特征,选择 *Unigene A03231*(简称 *A03231*)为研究对象,克隆其 DNA 及 cDNA 全长序列,分别采用 Southern blot 和 qRT-PCR 技术分析其在基因组中的拷贝数以及响应 MeJA 诱导的表达特征,并采用生物信息学方法对其进行功能预测,构建该基因的原核表达菌株,初步优化其诱导表达条件.

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

枝霉 MD2、*E. coli* BL21 (DE3) 和载体 pET-32a (+) 由本实验室保存. T4 DNA 连接酶、限制性内切酶等 (Takara), Trizol reagent RNA 提取液 (Invitrogen), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo), Realtime PCR Master Mix (TOYOBO), DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit (Roche), 其他分析纯试剂购自国药集团化学试剂有限公司. 扩增产物由武汉擎科伟业生物科技有限公司进行序列测定.

冷冻离心机 (Centrifuge 5424R, Eppendorf), PCR 仪 (C1000 Touch, Bio-Rad), 7500 Fast Real-Time PCR System (Quantstudio 5, Applied Biosystems).

1.2 枝霉 MD2 基因组 DNA 和 RNA 的提取

将枝霉 MD2 接种于 YES 培养基中, 28 °C 培养

5 d 后, 采用 SDS-CTAB 法^[15]提取其基因组 DNA. 添加终浓度为 100 μmol/L 的 MeJA, 并分别于 0, 6, 12, 18, 24, 30 h 收集菌体, 用 Trizol 试剂分别提取其总 RNA, 并用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 合成其第一链 cDNA^[16].

1.3 *A03231* DNA 和 cDNA 全长序列的克隆

分别以枝霉 MD2 的基因组 DNA 和总 RNA 做模板, 采用引物 *A03231*-F1: 5'-ATGGCTTCAACAACATTA GC-3' 和 *A03231*-R1: 5'-TCAAAACGCCATCCTCAACT-3' 扩增 *A03231* 的全长序列.

1.4 *A03231* 的拷贝数及响应 MeJA 诱导表达特征的分析

用 *A03231* 全长序列中不含有的 *Sma* I 和 *Eco* R I 完全消化枝霉 MD2 的基因组 DNA, 电泳分离后, 根据 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 说明书, 以 *A03231* 的 DNA 全长序列为探针进行 Southern blot 分析该基因的拷贝数.

用于 qRT-PCR 分析的 *A03231* 引物为 *A03231*-F2: 5'-GCTTATGAAAATGGCATCGG-3' 和 *A03231*-R2: 5'-CGAGGTGATGTCTACTGTGC-3', 内参基因 18S rDNA 引物为 18S F: 5'-AGCAACTATACGGTGAACTG-3' 和 18S R: 5'-TCTAATAAATACACCCCTTCC-3'. 按照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus 说明书进行 qRT-PCR 分析, 重复 3 次.

1.5 *A03231* 的生物信息学分析

采用 Vector NTI 比对 *A03231* 的 DNA 序列与 cDNA 序列, 分析其是否有内含子. 采用 Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) 分别预测 *A03231* 编码蛋白的同源性、亲疏水性、跨膜结构域、信号肽、二级结构和三级结构等.

1.6 *A03231* 原核表达载体的构建

用含有酶切位点的引物 *A03231*-F3 (5'-AAAGAAATTCGCTTCAACAACATTAGCCCA-3', 引入 *Eco* R I 位点) 和 *A03231*-R3 (5'-AAAGCGGCCGCTC AAAACGCCATCCTCAACT-3', 引入 *Not* I 位点) 扩增 *A03231* 序列, 经相应内切酶消化后回收目标片段, 与相同内切酶消化的 pET-32a (+) 连接获得原核表达质粒 pET-32a-*A03231*, 并转化 *E. coli* BL21 获得原

核表达菌株 pET-32a-A03231/*E. coli* BL21.

1.7 诱导表达条件的初步优化

分别将含有 pET-32a(对照)和 pET-32a-A03231 的菌株接种到含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min 下培养至 $\text{OD}_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 后,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4 h,12000 r/min 离心 3 min 收集菌体,用 PBS 缓冲液重悬沉淀,加入 5 \times 蛋白 Loading buffer 混匀,煮沸 5~10 min,离心取上清液于 SDS-PAGE 电泳,经考马斯亮蓝 R-250 染色并脱色后检测目标基因的表达.在此基础上,依次优化 IPTG 的诱导温度、诱导剂量、诱

导时间,初步获得该基因较适的原核表达条件.

2 结果与分析

2.1 *A03231* 的克隆

分别用 SDS-CTAB 法和 Trizol 试剂盒提取枝孢霉 MD2 的基因组 DNA(图 1A)和总 RNA(图 1B)后,分别以其基因组 DNA 和 cDNA 为模板扩增 *A03231*(图 1C)并测序,结果表明 *A03231* 长度为 918 bp,无内含子.

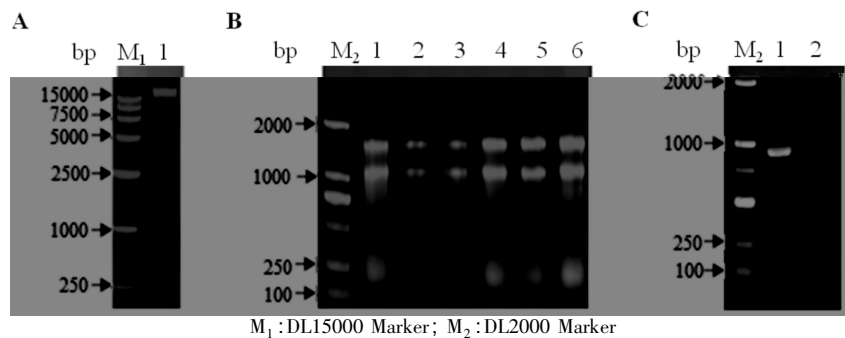


图 1 枝孢霉 MD2 的基因组 DNA(A),总 RNA(B)和 *A03231* 的克隆(C)

Fig.1 Genomic DNA (A), total RNA (B) of *C. cladosporioides* MD2 and cloning of *A03231* (C)

2.2 *A03231* 的拷贝数分析和响应 MeJA 诱导的表达特征分析

以 *A03231* 基因全长序列做探针进行 Southern blot 分析,结果表明 *A03231* 在染色体上以单拷贝形式存在(图 2A).以不经 MeJA 诱导的枝孢霉 MD2 为对照,qRT-PCR 分析诱导不同时间点的 *A03231* 表达水平(图 2B)结果表明:在 30 h 诱导处理范围内,*A03231* 的表达量随 MeJA 诱导表现为先升高后降低;但在 30 h,其表达水平仍然高于 0 h,说明 MeJA 诱导处理提高了 *A03231* 的表达量.

2.3 *A03231* 的生物信息学分析

用 Blastp 软件在线分析 *A03231*,并与一致性较高的蛋白序列进行进化分析,结果见图 3.图 3 显示 *A03231* 编码蛋白与 *Solanum lycopersicum* 的 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (GenBank:NP 001296810.1) 一致性为 68%;与 *Colletotrichum orbiculare* MAFF 240422 的 short chain dehydrogenase/reductase (GenBank:ENH82870.1) 一致性为 64%;与 *Penicillium griseofulvum* 的 Short-

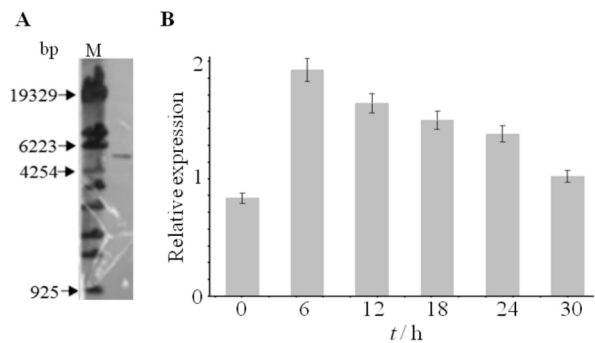


图 2 *A03231* 的拷贝数分析(A)和响应 MeJA 诱导的表达特征分析(B)

Fig.2 Copy numbers analysis of *A03231* (A) and its expression characteristics in response to MeJA (B)

chain dehydrogenase/reductase SDR (GenBank:KXG49772.1) 一致性为 63%;与 *Aspergillus fischeri* NRRL 18 的 NADP (+)-dependent dehydrogenase (GenBank:XP 001258531.1) 一致性为 62%;与 *Aspergillus calidoustus* 的 short chain dehydrogenase/

reductase (GenBank:CEL06036.1) 一致性为 61%;与 *Colletotrichum chlorophyti* 的 3-oxoacyl-[acyl-carrier-

protein] reductase (GenBank:OLN97504.1) 一致性为 60%.

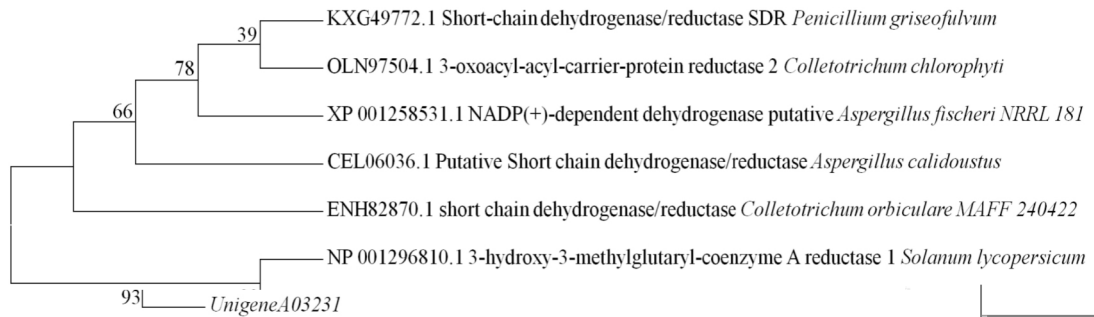
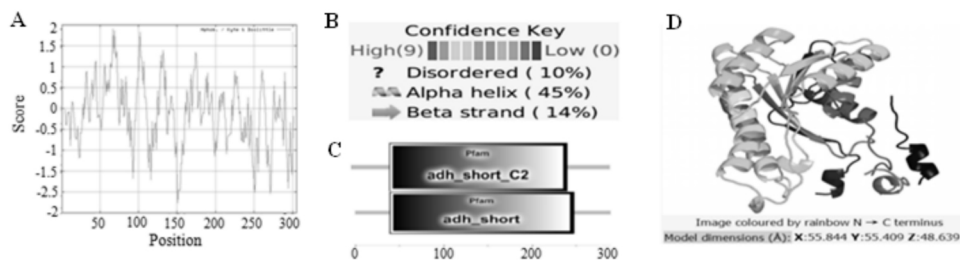


图 3 A03231 的进化分析

Fig.3 Evolutionary analysis of A03231

经 ProtParam 预测 A03231 编码产物的相对分子量为 33071.5 Da, 等电点 (pI) 为 5.69, 不稳定指数为 38.17, 脂肪指数为 87.77, 分子式为 C1457H2314N406O448S12. 经 ProtScale 预测 A03231 编码蛋白为亲水性蛋白 (图 4A). 经 TMHMM 和 SignalP 4.1 预测 A03231 编码蛋白不存在信号肽, 但是存在 2 个跨膜结构. 经 PHYRE 2 预测 A03231 编码蛋白存在 8 个

螺旋结构、8 个延伸链 (图 4B). 经 SMART 预测 A03231 编码蛋白在 N 端含有 ADH (Alcohol dehydrogenases) short C2 和 ADH short 结构域 (图 4C). 经 PHYRE 2 预测 A03231 编码蛋白的三级结构含有与 NAD(P) 结合的 Rossmann 折叠结构域 (图 4D, 详见链接: http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/phyre2_output/5a57abf9549d41f0/summary.html)



A) 亲疏水性分析; B) 二级结构分析; C) 二级结构域分析; D) 三级结构预测

图 4 A03231 的生物信息学分析

Fig.4 Bioinformatics analysis of A03231

2.4 A03231 原核表达菌株的构建及诱导表达条件的初步优化

将表达载体 pET-32a-A03231 用 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切验证后 (图 5A), 转化 *E. coli* BL21 获得重组菌株 pET-32a-A03231/*E. coli* BL21. 重组菌株和对照菌株 (pET-32a/*E. coli* BL21) 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳检测 (图 5B), 结果表明: 与对照相比, pET-32a-A03231/*E. coli* BL21 表达出符合预期大小的目标蛋白, 即 His-A03231 融合蛋白, 约 45 KD (12 KD+33.07KD), 表明 A03231 在 *E. coli* BL21 中成功表达。

之后, 依次优化了诱导温度 (图 5B)、IPTG 剂量 (图 5C) 和诱导时间 (图 5D) 对 A03231 在 *E. coli* BL21 中表达的影响, 初步获得了 A03231 的较适诱导表达条件为: 诱导温度为 28 °C, IPTG 浓度为 0.6 mmol/L, 诱导时间为 8 h.

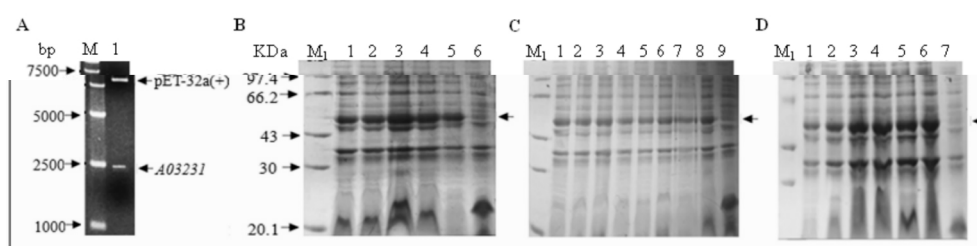
3 讨论

短链脱氢酶/还原酶 (SDRs) 是一大类利用 NAD(P)H 作为氢供体将羰基化合物还原为相应醇化化合物的蛋白质超家族, 其蛋白质成员由 250~300

个氨基酸组成,且序列相似度仅为 15%~30%^[17]。虽然超家族成员的序列有很大的差异性,但它们都含有保守的 Rossmann-fold 折叠结构域^[18]。短链脱氢酶能将甾体、前列腺素、脂肪酮、芳香酮等底物催化还原为重要医学中间体醇,具有重要的医学与工业价值^[19]。

紫杉醇是二萜类化合物,合成途径涉及多个脱氢酶/还原酶,其中属于甲羟戊酸途径的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)活性和表达量的增加有助于提高紫杉醇以及倍半萜类的合成。枝孢霉 MD2 是一株产紫杉醇内生真菌,MeJA^[20-22]诱导可以提高其紫杉醇产量,*Unigene A03231* 是响应 MeJA 诱导而表达水平提高的一个候选基因,三级结

构预测表明 *Unigene A03231* 编码蛋白含有典型的 Rossmann-fold 结构域,属于短链脱氢酶家族。*Unigene A03231* 与紫杉醇合成相关的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)有 68% 的一致性,*Unigene A03231* 可能具有与 HMGR 相似的功能,参与了枝孢霉 MD2 的紫杉醇的合成和调控。因此,深入研究 *A03231* 的功能有助于揭示枝孢霉 MD2 紫杉醇合成的分子机理。关键酶基因的原核表达条件优化是大量分离和纯化目标蛋白及研究酶蛋白生物催化功能的前提^[23]。而本研究对 *Unigene A03231* 的克隆、序列分析以及诱导表达条件的分析,可为后期深入研究该基因的催化功能奠定基础。



M:DL15000 Marker; M_1 低分子量蛋白 Marker 20.1~ 97. 4 KDa

A) 1 为 pET-32a-A03231 的酶切分析;B) 1~5 分别为 pET-32a-A03231/*E. coli* BL21 在 20, 25, 28, 32, 37 °C 诱导温度下的表达情况(1 mmol/L IPTG, 诱导 4 h), 6 为对照;C) 1~8 分别为 pET-32a-A03231/*E. coli* BL21 经 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 mmol/L IPTG 诱导的表达情况(28 °C, 诱导 4 h) 9 为对照;D) 1~6 分别为 pET-32a-A03231/*E. coli* BL21 经 IPTG 诱导 4, 6, 8, 10, 12, 14 h 的表达情况(28 °C, 1 mmol/L IPTG) 7 为对照

图 5 pET-32a-A03231 质粒的酶切分析及其在 *E. coli* BL21 表达条件的优化

Fig.5 Restriction digestion of pET-32a-A03231 and optimization of its expression conditions in *E. coli* BL21

参 考 文 献

- [1] Schiff P B, Fant J, Horwitz S B. Promotion of microtubule assembly *in vitro* by Taxol [J]. *Nature*, 1979, 277 (5698): 665-667.
- [2] 宋发军, 黄 珍, 罗 忠, 等. 代谢组学及其在药用植物研究中的应用 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2016, 35(2): 36-41.
- [3] 宋发军, 于鹏飞, 刘 佳, 等. 促进种子萌发的重楼内生菌的筛选 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2015, 34(3): 29-32.
- [4] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreae*, an endophytic fungus of Pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
- [5] Zhou X W, Zhu H F, Liu L, et al. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(6): 1707-1717.
- [6] Ji Y, Bi J N, Yan B, et al. Taxol-producing fungi: a new approach to industrial production of taxol [J]. *Chin J Biotech*, 2006, 22(1): 1-6.
- [7] 苗莉云, 张 鹏, 刘 博, 等. 产紫杉醇内生真菌 Z58 的分离和鉴定 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(12): 1141-1146.
- [8] Heinig U, Scholz S, Jennewein S. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi [J]. *Fungal Divers*, 2013, 60(1): 161-170.
- [9] 赵 凯, 周东坡, 平文祥, 等. 紫杉醇产生菌 *Nodulisporium sylviforme* 原生质体诱变研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24(9): 63-68.
- [10] Kan Z, Yuan Y, Ping W, et al. Improved taxol production in *Nodulisporium sylviforme* derived from inactivated protoplast fusion [J]. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10(20): 4175-4182.

- [11] 张昕欣,吴翰桂,奚立民,等. 微生物发酵法生产紫杉醇的研究进展[J]. 化工进展, 2012, 31(2): 392-396.
- [12] Long D M, Smidansky E D, Archer A J, et al. *In vivo* addition of telomeric repeats to foreign DNA generates extrachromosomal DNAs in the taxol-producing fungus *Pestalotiopsis microspora* [J]. Fungal Genet Biol, 1998, 24(3): 335-344.
- [13] 席晓圆,张 鹏,宋发军,等. 枝状枝孢霉 MD2 的 *Unigene A09801* 克隆与原核表达分析[J]. 生物学杂志, 2016, 33(4): 1-4.
- [14] Zhang P, Zhou P P, Yu L J. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2 [J]. Curr Microbiol, 2009, 59(3): 227-232.
- [15] 苗莉云,张 鹏. 盐湖土壤微生物总 DNA 提取方法的比较[J]. 浙江农业学报, 2012, 24(6): 1086-1090.
- [16] 张新茹,赵 炜,王冬雪,等. 红景天苷改善+鼠原代肝细胞糖脂代谢紊乱机制[J]. 医药导报, 2017, 36(11): 1260-1263.
- [17] Persson B, Kallberg Y, Bray J E, et al. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative [J]. Chem Biol Interact, 2009, 178(1/3): 94-98.
- [18] Joernvall H, Persson B, Krook M, et al. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) [J]. Biochemistry, 1995, 34(18): 6003-6013.
- [19] Kavanagh K L, Joernvall H, Persson B, et al. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(24): 3895-3906.
- [20] 陈大华,叶和春. 植物类异戊二烯代谢途径的分子生物学研究进展[J]. 植物学报, 2000, 42(6): 551-558.
- [21] 贾 宁,仇 燕. 紫杉醇生物合成相关酶类的研究进展[J]. 生物学杂志, 2002, 18(6): 9-12.
- [22] 刘 智,余龙江,赵春芳. 基于定量 PCR 技术探讨紫杉醇生物合成的限速步骤[J]. 西北植物学报, 2005, 25(11): 2213-2218.
- [23] 吴云华,肖 虔. 重组拟南芥细胞色素 P450 707A3 在大肠杆菌中的原核表达[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2017, 36(1): 28-31.

(责任编辑 刘 钊)