

# 枝状枝孢霉 MD2 的候选基因 A00981 的 克隆及转基因菌株的构建

张鹏,刘盼,周兰,裴婷,甘喆,李浩东,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** 目的:为揭示真菌紫杉醇合成分子机制.方法:克隆了产紫杉醇内生真菌枝状枝孢霉 MD2 的候选基因 A00981,该基因 DNA 和 cDNA 序列分别为 969 bp 和 894 bp;其编码蛋白含有 298 个氨基酸,无跨膜结构和信号肽,与酰基辅酶 A 脱氢酶(ACAD)具有 73% 的一致性.进一步构建该基因的超表达载体 pTFC-A00981,并转化枝状枝孢霉 MD2,共获得 9 株转基因菌株.结果:Southern blot 分析证明其中 5 株转基因菌株的外源基因是以单拷贝方式插入.结论:该结果为深入分析超表达候选基因 A00981 对枝状枝孢霉 MD2 紫杉烷类合成的影响奠定了基础.

**关键词** 枝状枝孢霉 MD2;紫杉醇;基因克隆;转基因菌株

中图分类号 Q36 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2019)01-0045-05

DOI 10.12130/znmzdk.20190108

引用格式 张鹏,刘盼,周兰,等.枝状枝孢霉 MD2 的候选基因 A00981 的克隆及转基因菌株的构建[J].中南民族大学学报(自然科学版) 2019,38(1):45-49.

ZHANG Peng, LIU Pan, ZHOU Lan, et al. Cloning of one candidate gene A00981 of *Cladosporium cladosporioides* MD2 and construction of A00981-transgenic strains [J]. Journal of South-Central University for Nationalities (Natural Science Edition), 2019, 38(1): 45-49.

## Cloning of the candidate gene A00981 of *Cladosporium cladosporioides* MD2 and construction of A00981-transgenic strains

ZHANG Peng, LIU Pan, ZHOU Lan, PEI Ting, GAN Zhe, LI Haodong, 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** Objective: To uncover the molecular mechanism of taxol biosynthesis in fungi. Methods: The candidate gene A00981 of taxol-producing endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* MD2 was cloned, and the DNA and cDNA sequences of the gene were 969 bp and 894 bp, respectively. The encoded protein contained 298 amino acids, had no transmembrane structure and signal peptide, and had 73% consistency with acyl-CoA dehydrogenase (ACAD). The super-expression vector pTFC-A00981 was further constructed and transformed into *C. cladosporioides* MD2, and nine transgenic strains were obtained. Results: Southern blot analysis showed that one copy of the exogenous gene was inserted into the genome among the 5 transgenic strains. Conclusion: The results of this study lay a foundation for further analysis of the effect of overexpression candidate gene A00981 in *C. cladosporioides* MD2 for taxanes synthesis.

**Keywords** *Cladosporium cladosporioides* MD2; taxol; gene clone; transgenic strain

内生真菌是抗癌药物紫杉醇的重要药源途径之一<sup>[1]</sup>.自 1993 年首次报道发现产紫杉醇内生真菌 *Taxomyces andreanae*<sup>[2]</sup>后,已有几百株产紫杉醇内生

真菌被报道<sup>[3]</sup>.Somjai peng S 等<sup>[4]</sup>从温带红豆杉中分离筛选出两株内生真菌 *Paraconiothyrium variabile* 和黑附球菌(*Epicoccum nigrum*),紫杉醇产量分别为

收稿日期 2018-10-15 \* 通信作者 宋发军,研究方向:应用生物化学,E-mail: songfajun@scuec.edu.com

作者简介 张鹏(1977-)男,副教授,博士,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(31370118,31770134)

1.75, 1.32  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Sah B 等<sup>[5]</sup>从胡椒中分离出一株产紫杉醇内生真菌龙眼焦腐病菌 (*Lasiodiplodia theobromae*), 紫杉醇产量为 247  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . El-Sayed 等<sup>[6]</sup>分别从罗汉松的纤毛木和枝条中分离到 3 株产紫杉醇内生真菌, 土曲霉 EFB108, EFB59, EFB14, 其中 EFB108 紫杉醇产量较高为 265  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . 但目前关于内生真菌的紫杉醇合成途径尚不清楚, 其紫杉醇合成相关基因的报道极少<sup>[7]</sup>, 严重限制了内生真菌紫杉醇合成的分子机理研究及高产工程菌株的创建.

枝状枝孢霉 (*Cladosporium cladosporioides*, 简称枝霉) MD2 是本课题组前期分离的产紫杉醇内生真菌, 在完成其转录组分析<sup>[8]</sup>的基础上, 本文克隆了枝霉 MD2 的紫杉醇合成相关候选基因 *A00981*, 采用生物信息学技术预测其结构和功能, 构建了该基因的超表达载体并转化枝霉 MD2, 通过抗性筛选和分子鉴定, 共获得 9 株转基因菌株, 其中 5 株转基因菌株的外源基因是以单拷贝方式插入, 为深入研究候选基因 *A00981* 的功能奠定了基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

枝霉 MD2 和根癌农杆菌 AGL-1 为本实验室保存. T4 DNA 连接酶、*Spe* I、*Hind* III 限制性内切酶 (TAKARA); RNA 提取试剂盒 (TIANGEN); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (TOYOBO); DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit (Roche); 引物合成及测序 (武汉擎科生物科技).

高速冷冻离心机 (FRESCO 21, Thermo); PCR 仪 (C1000 Touch, Bio-Rad); 生化培养箱 (SPX 智能型, 宁波江南仪器厂); 分子杂交仪 (QF-1, 上海乔枫实业).

### 1.2 候选基因 *A00981* 的克隆与生物信息学分析

参考课题前期报道 [9] 提取枝霉 MD2 的基因组 DNA 和总 RNA, 并将 RNA 反转录成第一链 cDNA. 采用引物 *A00981*-F: 5'-ATGGCCGGAATGGCAATC-3' 和 *A00981*-R: 5'-CTACAATCTCGCCTTGGG-3' 分别扩增候选基因的 DNA 和 cDNA 序列. 扩增条件为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 15 s, 55 °C 复性 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min. 扩增产物经测序验证后, 参照前期报道<sup>[10]</sup>, 采用 Vector NTI 比对 *A00981* 的 DNA 序列与 cDNA 序列, 分析其是否有内含子. 采用 Blastp, ProtParam, ProtScale, TMHMM, SignalP 4.1, NCBI 中 CDD, SMART, SWISS-MODEL 等软件进行候选基因的生物信息学分析.

### 1.3 过表达载体 pTFC-*A00981* 的构建与转化

先采用 Overlapping 方法将 *P*trpC 启动子、候选基因 *A00981* 和 *T*trpC 终止子依次连接构建其表达框, 再将其表达框于 *Spe* I 位点插入 pTFC 质粒构建候选基因的过表达载体 pTFC-*A00981*. 采用热激法将 pTFC-*A00981* 转入根癌农杆菌 AGL-1, 并参照本实验室前期建立的转化体系转化枝霉 MD2<sup>[11]</sup>. 最后通过潮霉素 (30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 抗性筛选及连续 2 次继代培养, 获得转基因菌株.

表 1 *A00981* 基因表达框构建所需引物

Tab.1 Primer sequences for construction of *A00981* gene expression cassette

引物名称	引物序列
P <sub>trpC</sub> -F	5'-AA <u>AACTAGT</u> TCGACAGAAGATGATATTG-3' ( <i>Spe</i> I)
P <sub>trpC</sub> -R	5'-AAGCTTATCGATGCTTGGGTAGAATA-3' ( <i>Hind</i> III)
T <sub>trpC</sub> -F	5'-AAGCTTAGTAGATGCCGACCGGGATC-3' ( <i>Hind</i> III)
T <sub>trpC</sub> -R	5'-AA <u>AACTAGT</u> AACCCAGGGGCTGGTGACGG-3' ( <i>Spe</i> I)
<i>A00981</i> -F	5'-ACCAAGCATCGAT <u>AAGCTT</u> ATGGCCGGAATGGCAATTC-3' ( <i>Hind</i> III)
<i>A00981</i> -R	5'-GGTCGGCATCTACTA <u>AAGCTT</u> CTACAATCTCGCCTTGGGCA-3' ( <i>Hind</i> III)

注: 下划线为限制性酶切位点

### 1.4 转基因菌株的检测

分别提取转基因菌株和对照 (未转基因) 菌株的基因组 DNA 为模板, 采用引物 *hpt II*-F: 5'-ATGAAAAAGCCTGAACCTCAC-3' 和 *hpt II*-R: 5'-CTATTCCTTTGCCCTCGGAC-3' 检测潮霉素基因

(hygromycin resistance gene, *hpt II*) 的转化情况; 并用 *Hind* III 完全酶切各个转基因菌株和对照菌株 (阴性对照) 的基因组 DNA, 并以 pTFC-*A00981* 质粒作阳性对照, 采用 Southern blot 分析转基因菌株的外源基因的转化情况.

## 2 结果与分析

### 2.1 候选基因 *A00981* 的克隆与分析

候选基因 *A00981* 的 cDNA 序列为 894 bp, DNA 序列为 969 bp, 含有 1 个 75 bp 的内含子. Blast P 比对结果表明, 候选基因 *A00981* 的编码蛋白与柑橘澳洲痂囊腔菌 (*Elsinoe australis*) 的酰基辅酶 A 脱氢酶

( acyl-CoA dehydrogenase, ACAD, GenBank No. PSK41880.1) 有 73% 的一致性; 与 *Sphaceloma murrayae* 的 ACAD ( GenBank No. PNS15105.1) 和 *Exophiala dermatitidis* NIH/UT8656 的 ACAD ( XP\_009152775.1) 有 72% 的一致性; 与 *Aureobasidium namibiae* CBS 147.97 的 ACAD ( XP\_013430645.1) 有 71% 的一致性( 见图 1 ).

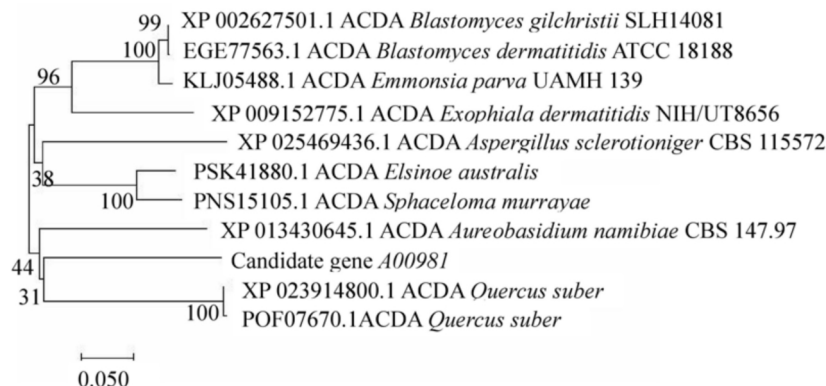
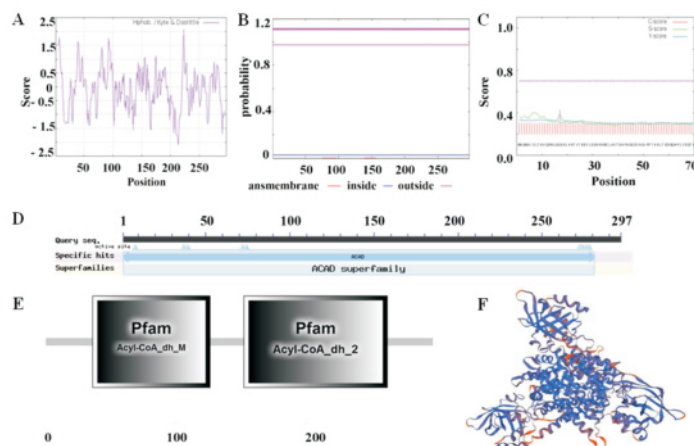


图 1 候选基因 *A00981* 的系统进化分析

Fig.1 phylogenetic analysis of candidate gene *A00981*

ProtParam 预测结果表明该基因编码蛋白包含 298 个氨基酸, 相对分子量为 32823.12 Da, 等电点 ( pI ) 为 9.14, 分子式为  $C_{1458}H_{2331}N_{401}O_{421}S_{19}$ . ProtScale, TMHMM 和 SignalP 4.1 预测结果表明, 该基因编码蛋白为亲水蛋白( 图 2A)、无跨膜结构域( 图 2B) 和信号肽( 图 2C). 经 NCBI 中 CDD,

SMART, SWISS-MODEL 预测结果表明: *A00981* 编码蛋白保守结构域被注释为酰基辅酶 A 脱氢酶( 图 2D) 在 C 端和 N 端各有 1 个 ACDA 催化结构域( 图 2E), 三级结构与嗜碱土芽孢杆菌 (*Geobacillus kaustophilus*) ACDA 晶体结构同源率为 28.04%, 并利用同源建模法预测了该蛋白的三级结构( 图 2F).



A) 亲疏水性; B) 跨膜结构域; C) 信号肽; D) 保守结构域; E) 二级结构域; F) 三级结构

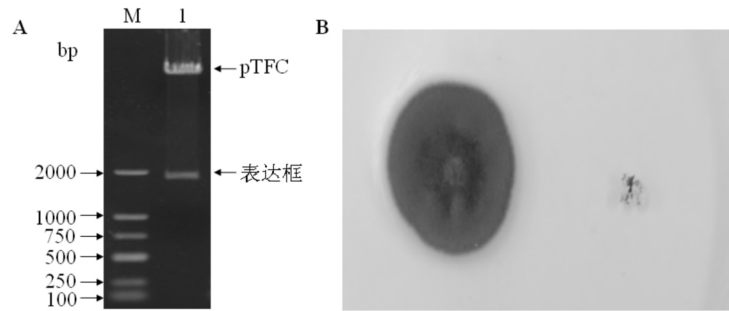
图 2 候选基因 *A00981* 的生物信息学预测

Fig.2 Bioinformatics analysis of candidate gene *A00981*

### 2.2 pTFC-*A00981* 载体的构建与转化

采用 overlapping 方法构建约 1865 bp 的表达框 ( P<sub>trpC</sub>-*A00981*-T<sub>trpC</sub>) 并插入 pTFC 质粒的多克隆位点构建候选基因的过表达载体 pTFC-*A00981*. 经 *Spe* I 酶切验证正确( 图 3A) 后, 转化枝霉 MD2. 将转

基因菌株通过抗性筛选及连续两次继代( 5 d/代) 后, 与未转基因( 对照) 菌株分别接种于含有潮霉素的抗性平板培养 5 d, 结果表明, 对照菌株不能正常生长, 而转基因菌株在抗性平板上长势良好( 图 3B). 本研究共获得 9 株转基因菌株.



M) DL2000; 1) 质粒酶切; A) pTFC-A00981 的酶切分析; B) 转基因菌株(左)和对照菌株(右)的抗性验证

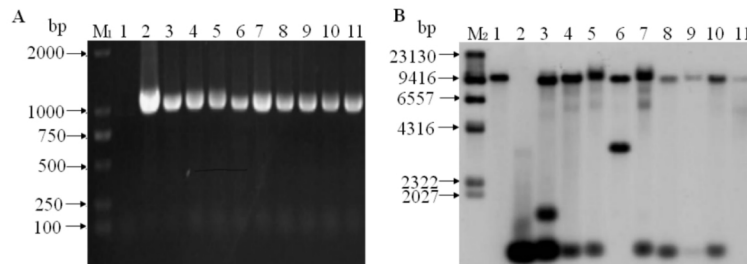
图 3 pTFC-A00981 载体的构建及转基因菌株的抗性验证

Fig.3 Construction of pTFC-A00981 and resistance verification of A00981-transgenic strains

### 2.3 转基因菌株的检测

抗性基因 *hpt II* 的扩增结果(图 4A)表明,9 株 A00981-转基因菌株均可扩增到 *hpt II* 基因,而对照菌株无扩增产物,初步说明含有抗性基因 *hpt II* 的 T-DNA 片段与宿主染色体整合。Southern blot 检测结

果进一步表明,9 株转基因菌株的外源基因均成功与宿主染色体整合;其中 5 株转基因菌株的外源基因是以单拷贝方式整合,对照菌株含有 1 个拷贝的候选基因 A00981(图 4B)。



M<sub>1</sub>) DL2000; M<sub>2</sub>) DL λ-DNA/Hind III; 1) 对照菌株; 2) pTFC-A00981; 3~11) A00981/MD2 转基因菌株

A) *hpt II* 基因的扩增; B) 转基因菌株的 Southern blot 分析

图 4 A00981/MD2 转基因菌株的分子验证

Fig.4 Molecular identification of A00981/MD2 transgenic strains

## 3 讨论

酰基辅酶 A 脱氢酶(ACAD)是一类催化细胞线粒体中脂肪酸 β 氧化循环起始步骤的酶。脂肪酸 β 氧化过程中将长链脂肪酸分解生成大量乙酰辅酶 A。紫杉醇合成的甲羟戊酸途径(MVA)起始于乙酰辅酶 A,经过 6 步酶促反应生成异戊烯焦磷酸(IPP),IPP 是所有萜类物质生物合成的共同前体物<sup>[12]</sup>。ACAD 在动物、植物、真菌和细菌中均被发现,如 Minenosuke 等<sup>[13]</sup>通过对 *S. murrayae* 全基因组测序结果分析 ACAD 基因的 DNA 全长序列(GenBank No. PNS15105.1); Gostin ċ ar 等<sup>[14]</sup>通过对 *A. namibiae* 全基因组测序结果预测 ACAD 基因的 DNA 全长序列(GenBank No. XP\_013430645.1); López 等<sup>[15]</sup>通过基因组测序分析出 *E. australis* 中 ACAD 基因的 DNA 全长序列(GenBank No. PSK41880.1);

周玉岩<sup>[16]</sup>克隆了北里链霉菌(*Streptomyces kitasatonesis*) 1-9F 中 ACAD 基因,编码蛋白包含 375 个氨基酸。目前,并未有产紫杉醇内生真菌中关于 ACAD 基因的克隆和功能研究的报道。

本研究首次从产紫杉醇内生真菌枝霉 MD2 中克隆了候选基因 A00981,生物信息学预测结果表明该基因编码蛋白在 C 端和 N 端均具有 ACAD 催化结构域,与柑橘澳洲痂囊腔菌(*E. australis*)的 ACAD 具有 73% 的一致性,因此,候选基因 A00981 的功能可能是通过编码 ACAD 酶,调节脂肪酸 β 氧化,为宿主紫杉醇合成的 MVA 途径提供乙酰辅酶 A,调节真菌枝霉 MD2 紫杉醇合成。在此基础上,本研究构建了候选基因 A00981 的过表达载体并转化枝霉 MD2,共获得 9 株转基因菌株,其中 5 株转基因菌株的外源基因是以单拷贝方式插入。这些转基因菌株的获得为后期深入分析候选基因 A00981 对宿主紫杉烷类合成的作用奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] MAJIDI M A. Review on taxol production through biotechnological approaches [J]. *J Med Plants*, 2018, 4 (68): 1-14.
- [2] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214.
- [3] MARTINEZKLIMOVA E, RODRÍGUEZPEÑA K, SÁNCHEZ S. Endophytes as sources of antibiotics [J]. *Biochem Pharmacol* 2016, 134: 1-17.
- [4] SOMJAIPENG S, MEDINA A, KWAS'NA H et al. Isolation, identification and ecology of growth and taxol production by an endophytic strain of *Paraconiothyrium variabile* from English yew trees (*Taxus baccata*) [J]. *Fungal Biol-UK*, 2015, 119(11): 1022-1031.
- [5] SAH B, SUBBAN K, CHELLIAH J. Cloning and sequence analysis of 10-deacetyl baccatin III-10-O-acetyl transferase gene and WRKY1 transcription factor from taxol producing endophytic fungus *Lasiodiplodia theobromae* [J]. *Fems Microbiol Lett* 2017, 364(24): 253-260.
- [6] EL-SAYED A S A, SAFAN S, MOHAMED N Z, et al. Induction of taxol biosynthesis by *Aspergillus terreus*, endophyte of *Podocarpus gracilior* Pilger, upon intimate interaction with the plant endogenous microbes [J]. *Process Biochem* 2018, 71: 31-40.
- [7] GARYALI S, KUMAR A, REDDY M S. Diversity and antimutic activity of taxol-producing endophytic fungi isolated from Himalayan yew [J]. *Ann Microbiol* 2014, 64(3): 1413-1422.
- [8] MIAOL Y, MO X C, XI X Y et al. Transcriptome analysis of a taxol-producing endophytic fungus *Cladosporium cladosporioides* MD2 [J]. *Amb Express* 2018, 8(1): 41.
- [9] 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.
- [10] 张鹏, 周兰, 席晓圆 等. 枝状枝孢霉 MD2 的 Unigene A03231 的克隆及原核表达分析 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)* 2018, 37(1): 35-40.
- [11] ZHANG P, LIU T T, ZHOU P P, LI S T et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of a taxol-producing endophytic fungus, *Cladosporium cladosporioides* MD2 [J]. *Curr Microbiol* 2011, 62(4): 1315-1320.
- [12] HEFNER J, KETCHUM R E, CROTEAU R. Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Taxus canadensis* and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production [J]. *Arch Biochem and Biophys*, 1998, 360(1): 62-74.
- [13] MINENOSUKE M, YASUO S, KATSUMI I, et al. Draft Genome Sequence of a thermophilic member of the *Bacillaceae*, *Anoxybacillus flavithermus* Strain Kn10, isolated from the Kan-nawa Hot Spring in Japan [J]. *Genome Announc* 2013, 1(3): 311-313.
- [14] GOSTIN ČAR C, OHM R A, KOGEJ T, et al. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species [J]. *BMC Genomics* 2014, 15(1): 1-29.
- [15] LÓPEZ G, DIAZCÁRDENAS C, SHAPIRO N, et al. Draft genome sequence of *Pseudomonas extremaustralis* strain USBA-GBX 515 isolated from superparamo soil samples in Colombian Andes [J]. *Stand Genomic Sci*, 2017, 12(1): 78.
- [16] 周玉岩. 吉他霉素生物合成基因簇克隆与基因工程菌株构建 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.

(责任编辑 刘 钊)