

## 绿僵菌第五类 Ser/Thr 蛋白磷酸酶基因的克隆及表达特征分析

徐飞, 彭国雄, 夏玉先\*

重庆大学生物工程学院基因工程研究中心, 重庆市杀虫真菌农药工程研究中心, 重庆 400030

**摘要:**【目的】克隆绿僵菌第五类 Ser/Thr 蛋白磷酸酶(*PP5*)基因, 了解该基因及其编码产物的结构特征和两种产孢模式(微循环产孢和正常产孢)中的表达特征。【方法】通过绿僵菌中 *PP5* 基因 EST 序列与全基因组数据库比对, 获得 *PP5* 基因 DNA 序列; 通过同源蛋白比对预测 *PP5* 基因的 DNA 结构并设计引物, PCR 扩增获取 *PP5* 全长 cDNA 序列; 通过在线分析工具及生物软件进行蛋白结构分析。采用实时荧光定量 PCR 检测 *PP5* 基因在两种产孢模式中的表达特征。【结果】*PP5* 基因长 2100 bp, 含 7 个外显子和 6 个内含子; cDNA 开放阅读框长为 1428 bp (GenBank 登录号 HQ317137), 编码 475 个氨基酸; 一级、二级及三级结构分析均显示较保守的蛋白磷酸酶结构特征。实时荧光定量 PCR 分析表明, *PP5* 基因在绿僵菌微循环产孢的不同阶段表达水平具有显著性差异, 特别是在孢子接种 16、24、32 h 高表达, 而在正常产孢模式下表达量非常少。【结论】克隆了绿僵菌的 *PP5* 基因, 详细了解了该基因及其编码产物的结构特征, 发现了该基因在微循环产孢孢子形成后期高表达的重要特征, 为进一步研究该基因在微循环产孢中的功能奠定了基础。

**关键词:** 绿僵菌; 微循环产孢, Ser/Thr 蛋白磷酸酶, 实时荧光定量 PCR

**中图分类号:** Q936      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0360-08

绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 是一种世界范围内广泛存在的昆虫病原真菌, 它能侵染 50 多个纲 200 多种昆虫<sup>[1]</sup>, 关于其侵染及致病机制已经得到深入的研究<sup>[2]</sup>。孢子是其繁殖的独立单位, 因此绿僵菌的产孢能力在商业化生产及田间应用中起着非常重要的作用。目前, 在其他丝状真菌中 2 种主要的产孢模式已经被报道: 正常产孢和微循环产孢。正常产孢是指孢子萌发后首先形成菌丝, 然后在菌丝的顶端或侧段产生分生孢子<sup>[3]</sup>; 而微循环产孢则是没有或极少有菌丝的参与, 而直接由孢子产

生孢子的一种简化过程<sup>[4]</sup>。作为一种昆虫病原真菌, 绿僵菌在不同培养条件下也能产生这两种产孢方式<sup>[5-6]</sup>。但是, 与正常产孢相比, 微循环产孢显示了较快的产孢速度及较强的抗逆性<sup>[7]</sup>, 这极大地提高了绿僵菌在农业防治中的应用潜力。

在前期工作中, 本实验室成功构建了绿僵菌微循环产孢时期差减文库<sup>[6]</sup>。对该文库进行分析发现一个 *PP5* 基因, 该基因主要编码第五类 Ser/Thr 蛋白磷酸酶。Ser/Thr 蛋白磷酸酶是一类调控酶, 它主要选择性的对细胞内蛋白的 Tyr 或 Ser/Thr 残

基金项目: 生物源农药创制与技术集成及产业化开发(200903052); 211 工程(S-09104)

\* 通信作者。Tel: +86-23-65120486; Fax: +86-23-65120490; E-mail: yuxianxia@cqu.edu.cn

作者简介: 徐飞(1986-), 男, 安徽安庆人, 硕士研究生, 从事微生物分子机制研究。

收稿日期: 2010-09-29; 修回日期: 2010-12-06

基进行去磷酸化,从而与蛋白激酶共同作用调控细胞内蛋白的磷酸化水平和程度,在细胞内的信号转导、细胞循环、次生代谢产品及底物的转化等过程中起着非常重要的作用<sup>[8-11]</sup>。虽然 Ser/Thr 蛋白磷酸酶普遍存在于核、线粒体、叶绿体、膜等多个细胞器中,但是从结构上主要分为 3 个家族:PTP、PPP、PPM。PTP 主要是脱去蛋白的 Tyr 残基磷酸化,只有一个包含 *CDC25* 在内的一个亚族能够同时对 Tyr 和 Ser/Thr 残基进行去磷酸化<sup>[12]</sup>。PPP 和 PPM 家族特异的进行 Ser/Thr 去磷酸化。PPP 家族主要包括 *PP1*、*PP2A* 和 *PP2B*,同时 PPM 家族包括 *PP2C* 和丙酮酸脱氢酶磷酸化酶<sup>[8]</sup>。近年来,PPP 家族中其他很多成员也相继发现,如:*PP4*、*PP5*、*PP6* 等,它们的分解结构域非常相似,在结构域中都有包含 3-4 个 TPR (tetratricopeptide repeat) 的融合氨基酸末端结构域<sup>[13]</sup>。*PP5* 主要被报道通过 TRP 区域参与蛋白与蛋白之间相互作用,如与 *hsp90*<sup>[14]</sup>、*CDC16*<sup>[15]</sup>、*CDC27*<sup>[15]</sup> 的相互作用。同时,*PP5* 也被报道与多不饱和脂肪酸,如花生四烯酸相互作用,参与该酶活性的调控<sup>[16]</sup>。此外,在人体 A549 肺癌中通过反义核苷酸的技术抑制 *PP5* 的表达可导致明显的抗细胞增殖活性,表明人体内 *PP5* 的作用主要体现为参与细胞生长<sup>[17]</sup>。然而,在丝状真菌中,该基因的功能被报道尚少,而对于丝状真菌中微循环产孢特异相关的基因也非常少。目前,只有粗糙脉胞菌中的 *mcb*、*mcm*<sup>[18]</sup> 基因及绿僵菌中的 *ccg*<sup>[19]</sup> 基因已被报道。

本研究克隆了绿僵菌中的 *PP5* 基因,分析了该基因的基因结构及编码蛋白的一级、二级、三级结构,检测了该基因在微循环产孢过程中的表达特征,从而揭示该基因的表达特征,为研究其功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:**绿僵菌 CQMa102 蝗变种 (*Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) 菌株,由重庆大学基因工程中心从黄脊竹蝗 (*Ceracris kiansu* Tsai) 染病虫尸上分离得到,专用于防治蝗虫。该菌株由中国普通微生物保藏中心 (CGMCC) 保存,登记号为 1877。大肠杆菌 JM109 购自博大泰克

公司。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**Trizol (Invitrogen)、OligodT (TaKaRa)、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> Master mix (TaKaRa); DNase (TaKaRa)、SuperScript<sup>™</sup> II 反转录酶 (Invitrogen)、LA Taq 酶 (Promega); VersaDoc 凝胶成像系统 (Bio-Rad)、PCR 热循环仪 (Bio-Rad)、实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad); 各种引物和 DNA 测序均由南京金斯特生物有限公司完成。

**1.1.3 培养基:**LB 培养基 (1% 蛋白胨, 0.5% 酵母提取物, 0.5% NaCl, 需固体培养基时再加 1.5% 琼脂, pH 7.0); 1/4SDA 培养基<sup>[5]</sup>; SYA 培养基<sup>[6]</sup>。

### 1.2 绿僵菌 *PP5* 基因的克隆

**1.2.1 EST 序列选取及 Blast 比对:**根据所构建的绿僵菌微循环产孢时期的差减文库,挑选该时期特异的 EST 序列 (FC809202),经比对发现该基因序列与 *Neurospora crassa* 中的第五类 Ser/Thr 蛋白磷酸酶具有非常高的相似性 ( $E = 2 \times 10^{-46}$ )。

**1.2.2 绿僵菌总 RNA 的提取:**收集绿僵菌微循环产孢高峰期 (24 h) 的孢子,根据 Trizol 试剂提取说明,提取总 RNA,并反转录合成 cDNA 第一链。

**1.2.3 绿僵菌 *PP5* 基因 cDNA 全长序列的克隆:**本实验室已经将绿僵菌全基因组测序完成,根据已有的 EST 序列与绿僵菌全基因组序列比对,同时与其他物种中同源蛋白分析相结合,获取 *PP5* 基因的基因组 DNA 序列;*PP5* 基因组 DNA 序列与其他物种中同源蛋白进行比对,预测该基因的开放阅读框及其编码产物,设计全长 cDNA 引物:*PP5* (f): 5'-GGCTTCTGCCCTCTTCC-3' 和 *PP5* (r): 5'-TATTGCGCCATCTCCT-3',扩增该基因的 cDNA 并将扩增得到的目的片段切胶回收,TA 克隆后转化大肠杆菌,挑取阳性克隆送交测序,得到了 *PP5* 基因的全长 cDNA 序列,并再次与基因组 DNA 序列经行比对,明确该基因的结构。

**1.2.4 *PP5* 编码蛋白的结构分析:**一级结构中氨基酸序列同源比对用 NCBI 中的 Blast 在线工具完成;二级结构用 <http://cn.Expasy.org> 中的 SOPMA 分析;三级结构是蛋白质结构预测的重点,其同源建模用 <http://cn.Expasy.org> 中的 Swiss-Model 程序进行,它是运用结构仿真模拟 (ProMod II 程序) 和能量最小化分析 (GRO-MOS96 程序) 构建目标序列的结构,蛋白三维结构可信度利用在线工具 Procheck 进行检测。蛋白的分子量、等电点、信号肽、功能域

也均在 <http://cn.Expasy.org> 预测。

### 1.3 实时荧光定量 PCR 检测 *PP5* 基因在两种产孢模式中的表达特征

**1.3.1** 孢子的收集和总 RNA 的提取: 分别收集绿僵菌微循环产孢时期 0、8、16、24、32 h 的孢子和正常产孢时期 28 h 的菌丝, 提取总 RNA, 并反转录成 cDNA 第一链。

**1.3.2** 实时荧光定量 PCR 检测 *PP5* 基因在 2 种产孢模式中的相对表达量: 实时荧光定量分析采用相对定量的方法进行, 为了消除起始样本量不同对定量分析的影响, 以绿僵菌基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 基因作为内参基因, 引物序列为 GAPDH (F): 5'-GACTGCCCGCATTGAGAAG-3' 和 GAPDH (R): 5'-AGATGGAGGAGTTGGTGTG-3'。目标基因引物为 Q-*PP5*-F: 5'-CTCAGGAAGCCGTTGAT-3' 和 Q-*PP5*-R: 5'-CTCGTTAGTGAAGAAGGT-3'。

标准品采用测序时的 cDNA 片段, 连续稀释 10 倍进行荧光定量 PCR, 绘制标准曲线。实验品分别以微循环产孢 0、8、16、24、32 h 的 cDNA 和正常产孢 28 h 的 cDNA 为模板进行定量 PCR 扩增。荧光定量 PCR 采用 SYBR Green I 染料法, 反应在 iCycler™ Real Time PCR System (Bio-Rad, USA) 检测系统上进行。PCR 反应体系为 25 μL: 12.5 μL SYBR® Premix Ex Taq™ Master mix, 1 μL 引物 (10 μmol/L), 1 μL cDNA 模板。PCR 循环参数为: 95℃ 15 s, 58℃ 15 s, 72℃ 15 s, 循环 40 次; 随后进行熔解曲线分析, 温度以 0.5℃ /30 s 的速率从 55.0℃ 缓慢递增至 95.0℃。每次反应设置标准品、未知样品 (重复 3 次) 和一个阴性对照 (NTC)。

本实验中把微循环 24 h 的孢子作为对照样品, 其它为检测样品。由于目的基因和管家基因的扩增效率都接近 100%, 且相差小于 5%, 所以 *PP5* 转录本的表达差异通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算。根据实时荧光定量 PCR 得到的 Ct 值以及标准曲线, 利用 IQ5 软件和 Excel 计算 *PP5* 基因的相对表达量。

## 2 结果和分析

### 2.1 绿僵菌 *PP5* 基因 DNA 和 cDNA 全长序列的获取

通过绿僵菌中 *PP5* 基因 EST 序列与全基因组数据库比对, 获得了 *PP5* 基因 DNA 序列。利用引

物 *PP5* (f) 和 *PP5* (r) 对绿僵菌 cDNA 第一链进行扩增, 得到该基因的全长 cDNA 片段。经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测获得的条带与预期大小一致, 为 1624 bp。经测序后获得 cDNA 序列。利用扩增获得的全长 cDNA 与 *PP5* 基因组 DNA 进行比对, 确定 *PP5* 基因的结构, 已提交 NCBI (GenBank 登录号 HQ317137)。

### 2.2 *PP5* 基因结构分析

*PP5* 基因 DNA 长 2100 bp, 含有 7 个外显子和 6 个内含子, 起始密码子 ATG 位于 130 bp 处, ATG 密码子附近并不符合 Kozak 规则 (AXXATGG), 终止密码子位于 1937 bp 处。开放阅读框长 1428 bp, 编码区被 6 个内含子阻断, 分别位于 272 - 357 bp、440 - 498 bp、938 - 984 bp、1230 - 1289 bp、1654 - 1713 bp、1839 - 1894 bp。该基因 3' 端有 Poly A 尾, 并且有典型的 AATAA 加尾信号。

### 2.3 *PP5* 蛋白结构分析

**2.3.1** 一级结构分析: 绿僵菌 *PP5* 基因编码 475 个氨基酸, Blast 分析显示该序列与某些其他真菌中的第五类 Ser/Thr 蛋白磷酸酶具有较高的相似性, 与蛋白磷酸酶家族中某些其他成员, 如 *PP1*、*PP2C* 也具有一定的相似性。利用 PSI-BLAST 软件对 *PP5* 基因编码蛋白进行同源性比对, 结果发现该蛋白与真菌 *Neurospora crassa* (XP\_955993.1), *Ajellomyces dermatitidis* (XP\_002625655.1), *Coccidioides posadasii* (XP\_003069386.1), *Uncinocarpus reesii* (XP\_002544853.1) 和 *Ajellomyces capsulatus* (XP\_001536595.1) 的第五类 Ser/Thr 蛋白磷酸酶的氨基酸序列具有非常高的同源性, 分别为 82%、75%、74%、73%、73%。并且, 保守性的氨基酸主要集中在 C 端 (图 1)。

所有 PPP 亚家族成员均有 3 个不变的氨基酸序列: -GDHXG-、-GDXXVRG- 和 -GNH-, 这 3 个氨基酸序列决定了 Ser/Thr 蛋白磷酸酶家族中成员的分类<sup>[20]</sup>, 我们分析了绿僵菌 *PP5* 基因编码的蛋白中氨基酸序列, 均精确的找到了这 3 个氨基酸序, 分别位于 216、245、277 aa 处。另外, 我们也分析了 *PP5* 蛋白中的氨基酸组成, 在 N 端 10 - 110 aa 处发现了 3 个 TPR 序列, 并且在 C 端 217 - 428 aa 处有 Ser/Thr 蛋白磷酸酶催化区域, 通过同源比对发现, 这 2 个结构域与其他物种 *PP5* 具有极高的相似性 (图 2)。

<i>M.anisopliae</i>	. . . MSQEAVDLKNGKNSLFAASLDYPAALDHYSKAIELNDKQPTFTNRAQAYIKTEAYGYAIADAQKAEINPKLKAYMRRGLARITAILRNPKEAIDDF	96
<i>N.crassa</i>	. MTTPEQCAIAFKNEGCKAFAAFDVPAKALFHYDKAIELNDKQPTFTNRAQAHIKTEAYGYAIRDAIKAEINPQGFV KAYMRRATAYAAI LNPKEAVKDF	99
<i>A.dermatitidis</i>	MATTDKEAATALKLQCNKAFASLDVMIQALDFYSQALFQYDQDPSFVFCNRAQVHIREAYGYAVADAIKAEIDDPNYKAYMRRATANTAILNSRAALKDF	100
<i>C.posadasii</i>	MAQAEIEAATALKVACNKAFARLDVPEALGFYTKAEKYDRDPSFVFCNRAQANIKLEAYGYAIDAIKAEIDDPYSYKAYMRRATANTAILNSREALKDF	100
<i>U.ressii</i>	MANADI EAATALKVGCNKAFAKIDVPGALDFYTCALFQYDQDPSFVFCNRAQANIKLEAYGYAIDAIKAEIDDPYSYKAYMRRATANTAILNSYREALRDF	100
<i>A.capsulatus</i>	MATAGEKAATALKLQCNKAFASLDVMIQALDFYSKALFQYDQDPSFVFCNRAQVHIREAYGYAVADAIKAEIDDPDYKAYMRRATANTAILNSRAALKDF	100
<i>M.anisopliae</i>	KECVRLDFVANKDARLKLVECKIKVRLQAFFAALEVGDPELSAAEGLDLDMSVMEPEYDGVRLDEN.EVTQEHDDMERFKNGKLIHKYVYQIIVKNI V	195
<i>N.crassa</i>	KTCVKIAPDNKDALKLVCEKIKVRLQAFFAALEVGDPELSAAEGLDLYESMAVDASVYDGRLEEGNEATQEHDDMERFKRGLIHKYVYQIIVRNIV	199
<i>A.dermatitidis</i>	KTYVRKAPNDRDALKLAECCKLVRRIEFEKALFVADPPSAFEGLDIDGIMVEESYDGVRLG.E.SVTQEHDDMERFKTKGKLIHKYAFQIVRATKDI V	199
<i>C.posadasii</i>	KTYVRKAPNDRDALKLAECCKLVRRIEFEKALFVADPPSAFEGLDIEAIKVEESYDGVRLG.D.EVTQEHDDMERFKNGKLIHKYAYKIVKAVKDLV	199
<i>U.ressii</i>	KAVMKKAPNDRDALKLAECCKLVRRIEFEKALFVADPPSAFEGLDIDAIKVEEYDGVRLG.D.EVTQEHDDMERFKNGKLIHKYAYKIVKVKVDMV	199
<i>A.capsulatus</i>	KTYVRKAPNDRDALKLAECCKLVRRIEFEKALFVADPPSAFEGLDIVDGVVVEDSYDGVRLG.E.SVTQEHDDMERFKTKGKLIHKYAFQIVRATRNIV	199
<i>M.anisopliae</i>	YDEATVVEVDIPGDVELTICGDTHGQYHDLMLHRRNGTFRNKHWYLNHNGDFVDRGSWSTEIALLLYAKWLRFRNGHFLNRGNHETDDNRYVGHGECK	295
<i>N.crassa</i>	YNPTVVEVDIPEDVQLTIVCGDTHGQYHDLMLHRRNGTFRNKHWYLNHNGDFVDRGSWSTEIALLLYAKWLRFRNGHFLNRGNHETDDNRYVGHGECK	299
<i>A.dermatitidis</i>	YDEPTVVEVGVKEGTLTICGDTHGQYHDLMLHRRNGYPSDTHAYLNHNGDFVDRGSWSTEVALLLYAKWLRFRHFLNRGNHETDDNRYVGHGECK	299
<i>C.posadasii</i>	YDEPTVVEIVGVEEGTKLTVCGDTHGQYHDLLEIHRNGYPSDTHAYLNHNGDFVDRGSWSTEIALLLYAKWLRFRNHFLLNRGNHETDDNRYVGHGECK	299
<i>U.ressii</i>	YDEPTVVEVGVVEGTLTVCGDTHGQYHDLLEIHRNGYPSDTHAYLNHNGDFVDRGSWSTEIALLLYAKWLRFRNHFLLNRGNHETDDNRYVGHGECK	299
<i>A.capsulatus</i>	YDEPTVVEVIGKEGTLTVCGDTHGQYHDLLEIHRNGYPSDTHAYLNHNGDFVDRGSWSTEVALLLYAKWLRFRHFLNRGNHETDDNRYVGHGECK	299
<i>M.anisopliae</i>	AKYNERVLRKLSSEFSALPLATLIGKYLVLHGGLFSDDKVTLDDIRKLRNFRQFGQAGLVAEMLVDFQDFGRGFSKRGVGVQFGFDVTKRFCENN	395
<i>N.crassa</i>	HKYNERVLRKLSSEFSALPLATLIGKFLVLHGGLFSDDNVTLDDIRKLRDRHQFGQAGLVAEMLVDFQDFGRGFSKRGVGVQFGFDVTKRFCODKN	399
<i>A.dermatitidis</i>	AKYNERVLRKLSSEFSALPLATLIGKFLVLHGGLFSDDKVTLDDIRKLRNFRQFGQAGLVAEMLVDFQDFGRGFSKRGVGVQFGFDVTKRFCENN	399
<i>C.posadasii</i>	AKYNERVLRKLSSEFSALPLATLIGKYLVLHGGLFSDDKVTLDDIRKLRNFRQFGQAGLVAEMLVDFQDFGRGFSKRGVGVQFGFDVTKRFCODKN	399
<i>U.ressii</i>	AKYNERVLRKLSSEFSALPLATLIGKYLVLHGGLFSDDKVTLDDIRKLRNFRQFGQAGLVAEMLVDFQDFGRGFSKRGVGVQFGFDVTKRFCODKN	399
<i>A.capsulatus</i>	AKYNERVLRKLSSEFSALPLATLIGKFLVLHGGLFSDDKVTLDDIRKLRNFRQFGQAGLVAEMLVDFQDFGRGFSKRGVGVQFGFDVTKRFCENN	399
<i>M.anisopliae</i>	GLEAVIRSHHEVRMDGYEVEHDGRCITVFSAPRYCDSTENAGAYINIKSDYKIRYEQFDVPHPIIKPMAYAQSSVMSL	474
<i>N.crassa</i>	GLEAVIRSHHEVRMDGYEVEHDGRCITVFSAPRYCDMTENAGAYINIGDYKIKFSQFDVPHPIIKPMAYAQSSVMSL	478
<i>A.dermatitidis</i>	GLEAVIRSHHEVRMDGYEVEHDGRCITVFSAPRYCDSTENAGAYINIGELKLEFHKEFVAVPHPIIKPMAYAANSVMSL	478
<i>C.posadasii</i>	GLKAVIRSHHEVRMDGYEVEHDGRCITVFSAPRYCDNTENAGAYINVDPKLEVEFHKEFVAVPHPIIKPMAYAQNSVMSL	478
<i>U.ressii</i>	GLKAVIRSHHEVRMDGYEVEHDGRCITVFSAPRYCDNTENAGAYINVDPKLEVEFHKEFVAVPHPIIKPMAYAQNSVMSL	478
<i>A.capsulatus</i>	GLEAVIRSHHEVRMDGYEVEHDGRCITVFSAPRYCDNTENAGAYINIGELKLEVEFHKEFVAVPHPIIKPMAYATNSVMSL	478

图1 绿僵菌中 *PP5* 基因编码蛋白与其它真菌中第五类 Ser/Thr 蛋白磷酸酶的氨基酸同源性比对(一致的氨基酸以黑色显示,相似的氨基酸以灰色显示)

Fig. 1 Putative amino sequence alignment of *PP5* in *M. anisopliae* with homologs of Ser/Thr protein phosphates type 5 from other fungi. The identical amino acids are highlighted on a black background and similar amino acids are shown on a grey background.

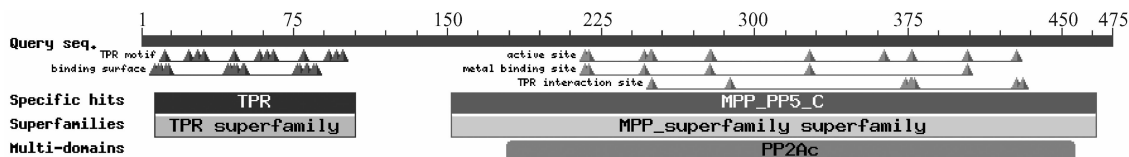


图2 绿僵菌 *PP5* 基因保守功能域比对结果

Fig. 2 The blast result of conserved domain in *PP5* against PP family.

2.3.2 蛋白质二级结构分析: 运用 SOPMA 软件 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma)).

pl) 预测绿僵菌 *PP5* 蛋白的二级结构, 显示该蛋白约含 46.32% 的  $\alpha$  螺旋, 7.16% 的  $\beta$  转角, 14.74%

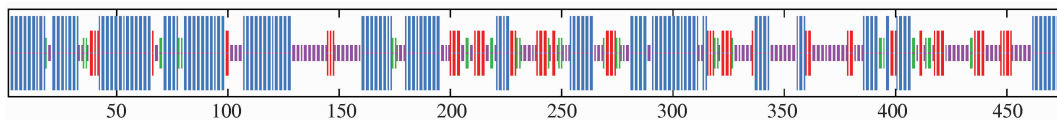


图3 绿僵菌 *PP5* 蛋白二级结构的预测

Fig. 3 Prediction to secondary structure of *PP5* protein from *M. anisopliae*. Alpha helix; Blue; Extended strand; Red; Beta turn; Green; Random coil; Purple.

的延伸串, 31.79% 的不规则卷曲(图 3)。

**2.3.3 三级结构的同源建模及分析:** 利用 SWISS-MODEL 提供的服务, 提交 *PP5* 的蛋白序列, 经 BLAST 及 SIM 计算, 在蛋白质结构数据库中搜寻模板, 最终得到 *PP5* 蛋白的 161 到 466 位氨基酸残基与 3icfA 的序列具有最高的相似性 (>25%), 具备同源建模的条件。根据模版的结构信息, 采用 SWISS-MODEL 的结构建模程序 ProModII 及能量最小化程序 GROMOS96 进行同源建模。三级结构建模结果如图 4 所示, 可以清楚地看到该酶的核心结构类型属于  $\alpha/\beta$  型。拥有一个集中由彼此平行的

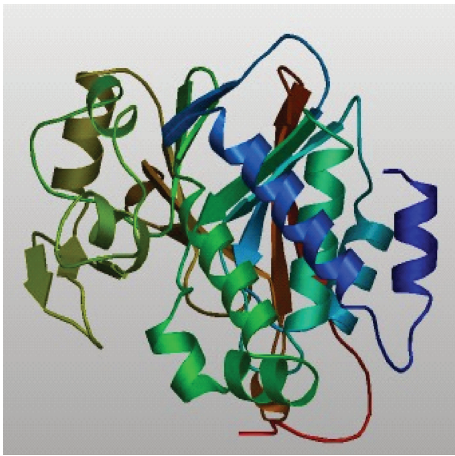


图 4 绿僵菌 *PP5* 蛋白三级结构同源建模

Fig. 4 The 3D structure of *PP5*-encoding protein predicted by Swiss-model.

$\beta$  折叠构成的区域,  $\alpha$  螺旋在外周分布, 这一结构特点与 Rossmann<sup>[21]</sup> 折叠立体结构很相似。进一步, 用在线评价工具 Procheck 对建模结果可信度进行检测, 计算得出 Ramachandran 图(图 5)。Ramachandran plots 是反映立体化学质量 (stereochemical quality) 的参数, 它通过分析  $\Phi$  角和  $\Psi$  角的分布方式大致评估模拟的结构是否与自然结构趋势相同。从图中可见, 模拟得到的 *PP5* 蛋白的三维结构的  $\Phi$  角和  $\Psi$  角有 92.5% (>90%) 位于 Ramachandran 图中合理区域, 从理论上表明模拟得到的 *PP5* 蛋白的三维结构是可信的。

## 2.4 其他生物信息学分析

**2.4.1 *PP5* 蛋白分子量及等电点预测:** [http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) 在线工具进行蛋白质分子量和等电点的预测。结果显示, 该基因产物相对分子量为 38.1 kDa, 等电点 (pI) 为 9.66, 为碱性蛋白。

**2.4.2 *PP5* 蛋白信号肽切割位点预测:** <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 对编码的氨基酸序列进行分析, 发现该基因编码的蛋白并无信号肽序列, 为非分泌型蛋白, 位于细胞液或是细胞核中。

**2.4.3 *PP5* 蛋白功能域预测:** <http://www.predictprotein.org> 预测其在 13 位 (NKSH) 氨基酸处存在 N-糖基化位点, 136 位 (SAAE)、200 位 (TMVE)、234 位 (TPND) 和 337 位 (TLDD) 均有一个酪蛋白激酶磷酸化位点, 80 位 (GLARTA)、251 位 (GSWSTE)、277 位 (GNHETD)、328 位 (GGLFSD)、436 位 (GAYZNI) 均有一个 N-肉豆蔻酰基化位点, 175 位 (NGKK) 和 319 位 (VGKK) 分别有一个酰胺化位点, 275 位 (NRGNHE) 有一个 ser/thr 特异的磷酸化酶标记, 338 位 (LDDIRKLNHRH NQRQP) 有一个 His 酸性磷酸酶标记。此外, 在 309-326 位有一个跨膜螺旋结构。

## 2.5 *PP5* 基因在两种产孢模式中的表达特征分析

以绿僵菌微循环产孢 0、8、16、24、32 h 的 cDNA 和正常产孢 28 h 的 cDNA 为模板, 实时荧光定量 PCR 检测 *PP5* 基因在各个时期的相对表达量。以微循环产孢 24 h 的表达量作为标准 (100%), 发现该基因在 0 h、8 h 时的表达量都非常低, 相对表达量分别为 4.48%、17.73%, 而此时微循环产孢培养基上的孢子分别处于极性萌发点的选择和孢子萌发形成芽管的阶段; 到 16 h、32 h 表达量明显增加,

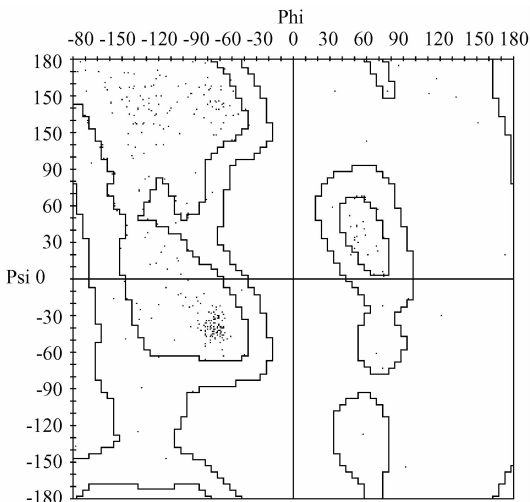


图 5 *PP5* 蛋白三级结构 Ramachandran 评价图

Fig. 5 The Ramachandran plot of the 3D structure of *PP5*-encoding protein.

相对表达量分别为 77.60%、91.22%，此阶段正处于子代孢子大量形成阶段。但在正常产孢的菌丝生长阶段(28 h \*, 1/4SDA 培养基上), 该基因的表达量仅为 9.08% (图 6)。

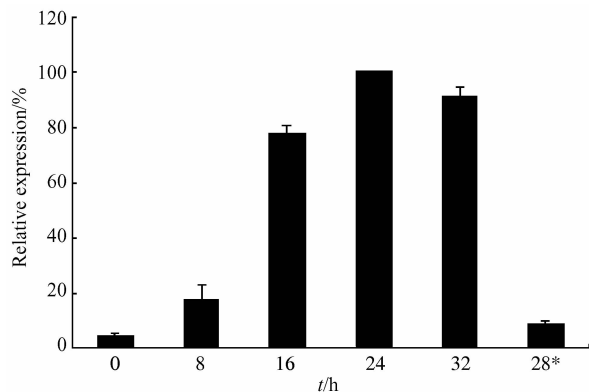


图 6 *PP5* 基因在微循环产孢及正常产孢两种模式下的表达特征

Fig. 6 Relative expression analysis of *PP5* in microcycle conidiation and normal conidiation. The expression level of 24 h in microcycle conidiation was calibrated as 100%. Error bars are standard errors of three trials. (0 h, 8 h, 16 h, 24 h and 32 h, the total RNA was obtained from different stages in microcycle conidiation; 28 h \*, the total RNA was obtained from hyphal stage in normal conidiation)

### 3 讨论

微循环产孢被认为是真菌在逆境下发生的一种罕见的产孢机制<sup>[4]</sup>, 在真菌农药的田间应用中起着重要的作用, 其快速的产孢方式及较强的抗逆境也成為了真菌农药商业化生产的一个突破点。研究表明, 在不同培养条件下真菌中的基因表达模式是不一样的。本文第一次克隆到了绿僵菌微循环产孢时期一个 Ser/Thr 蛋白磷酸酶基因(*PP5*), 并且对其在微循环产孢及正常产孢中的表达特征做了分析, 这对详细阐明该基因在微循环产孢中的功能具有非常重要的作用。

克隆其全长 cDNA 序列是基因功能研究必不可少的一个程序, 目前较为普遍的方法是 Race 或是 cDNA 文库杂交等技术。在本研究中, 我们采用了简单、快速且正确的全长 cDNA 克隆途径, 该方法是基于物种全基因组测序已经完成, 通过多次 Blast

比对、同源蛋白分析与 PCR 技术相结合的方法, 可快速的获取基因的 cDNA 全长。在得到 *PP5* 基因的全长 cDNA 后, 为了深入的了解该基因的功能, 在基因及蛋白结构上做了详细的分析, 该基因含有 6 个内含子, 充分显示了其在生物体内的复杂性, 在一级结构上该基因具有 PPP 家族中众多相同或是性质相似的氨基酸, 这些氨基酸构成了保守的结构域, 如 Ser/Thr 蛋白磷酸化酶家族所共有的 N 端 TRP 序列及 C 端酶活催化区域。

实时荧光定量 PCR 分析表明, *PP5* 基因在微循环产孢不同时期的表达量有明显差异。在 0 h 该基因几乎不表达, 而在微循环产孢 8 h 时表达量开始有所增加, 此时微循环孢子正处于孢子芽管萌发阶段。到了 16 h 和 24 h 时表达量显著性增高, 此时正是微循环产孢的高峰期, 24 h 后大部分孢子开始进入下一个循环, 所以 32 h 时 *PP5* 基因的表达量略有下降。然而, 该基因在正常产孢的菌丝生长阶段表达量非常低, 表明该基因并不参与正常产孢的模式决定。由此可见, 该基因是参与微循环产孢模式决定的一个非常重要的基因, 并且主要在子代孢子产生后期起重要作用。

微循环产孢是一种非常有规则的细胞无限循环过程, 并且在孢子快速产生的过程, 从孢子极性位点的选择到孢子的完全产生均涉及到多种信号的转导。在其他物种中 *PP5* 基因被报道参与了细胞循环蛋白调控及信号调控等, 这预示着 *PP5* 基因可能在绿僵菌微循环产孢过程中可能起着非常保守的功能。同时, 在绿僵菌微循环产孢时期差减文库的所有基因中 (NCBI 登录号: FC809186-FC809404 和 FC860292-FC860293), 除了微循环产孢文库中的 *PP5*, 并未发现其他 Ser/Thr 蛋白磷酸化酶家族成员, 这说明该基因除了含有家族中一些保守的功能外, 结构中必然含有该家族其他成员所不具有的特定功能域, 并且这些功能域在微循环产孢的模式决定中起着非常重要的作用。然而, *PP5* 基因及其同源基因的功能研究较少, 而在丝状真菌产孢中更是未见报道。因此, *PP5* 基因的成功克隆及表达特征分析对以后研究该基因在微循环产孢过程中的作用奠定了非常重要的基础。

## 参考文献

- [ 1 ] Roberts DW, Humber RA. Entomogenous fungi in biology of conidial fungi. New York: Academic Press, pp, 1981.
- [ 2 ] St Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93: 6349-6357.
- [ 3 ] Adams TH, Wieser JK, Yu JH. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62: 35-54.
- [ 4 ] Hanlin RT. Microcycle conidiation-a review. *Mycoscience*, 1994, 35: 113-123.
- [ 5 ] Peng GX, Xie L, Xia YX. Identification of genes that are preferentially expressed in conidiogenesis cell development of *Metarhizium anisopliae* by suppression subtractive hybridization. *Current Genetics*, 2009, 55: 263-271.
- [ 6 ] Zhang SZ, Xia YZ. Identification of genes preferentially expressed during Microcycle conidiation of *Metarhizium anisopliae* using suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 286: 71-77.
- [ 7 ] Zhang SZ, Xia YZ. Microcycle conidiation and the conidial properties in the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum* on agar medium. *Biocontrol Science and Technology*, 2010, 20: 809-819.
- [ 8 ] Cohen PT. Novel protein serine/threonine phosphatases; variety is the spice of life. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, 22: 245-251.
- [ 9 ] Jackson MD, Denu JM. Molecular reactions of protein phosphatases-insights from structure and chemistry. *Chemical Reviews*, 2001, 101: 2313-2340.
- [ 10 ] Tamura S, Toriumi S, Saito J, Awano K, Kullo TA, Kobayashi T. PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis. *Cancer Science*, 2006, 97: 563-567.
- [ 11 ] Tong Y, Quirion R, Shen SH. Cloning and characterization of a novel mammalian PP2C isozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 35282-35290.
- [ 12 ] Wang WQ, Sun JP, Zhang ZY. An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2003, 3: 739-748.
- [ 13 ] Barford D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21: 407-412.
- [ 14 ] Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, Owens-Grillo JK, Chinkers M, Pratt WB. Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 16224-16230.
- [ 15 ] Ollendorff V, Donoghue DJ. The serine/threonine phosphatase PP5 interacts with CDC16 and CDC27, two tetratricopeptide repeat containing subunits of the anaphase-promoting complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 32011-32018.
- [ 16 ] Sinclair C, Borchers C, Parker C, Tomer K, Charbonneau H, Rossie S. The tetratricopeptide repeat domain and a C-terminal region control the activity of ser/thr protein phosphatase 5. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 23666-23672.
- [ 17 ] Zuo Z, Dean NM, Honkanen RE. Serine/threonine protein phosphatase Type 5 acts upstream of p53 to regulate the induction of p21WAF1/CIP1 and mediate growth arrest. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 12250-12258.
- [ 18 ] Maheshwari R. Microcycle conidiation and its genetic basis in *Neurospora crassa*. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137: 2103-2115.
- [ 19 ] Liu J, Cao YQ, Xia YX. Mmc, a gene involved in microcycle conidiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 15: 132-138.
- [ 20 ] Minu C. Cloning and characterization of a novel serine/threonine protein phosphatase type 5 from *Trypanosoma brucei*. *Gene*, 2001, 266: 1-13.
- [ 21 ] Minor DL, Kim PS. Measurement of the  $\beta$ -sheet forming propensities of amino acids. *Nature*, 1994, 367: 660-663.

# Cloning and expression of Ser/Thr protein phosphatase type 5 during microcycle conidiation in *Metarhizium anisopliae*

Fei Xu, Guoxiong Peng, Yuxian Xia\*

(Genetic Engineering Research Center of Bioengineering College, Chongqing University, Chongqing Engineering Research Center for Fungal Insecticides, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To clone Ser/Thr protein phosphatase type 5 gene (*PP5*) from *Metarhizium anisopliae*, analyze the structure of *PP5* gene with its encoding protein and expression profile during two conidiation program (microcycle conidiation and normal conidiation). [ **Methods** ] The DNA sequence of *PP5* was isolated by blasting the expressed sequence tags (EST) of *PP5* in subtracted library with genomic data of *M. anisopliae*. Primers were designed based on the DNA sequence to clone the full length cDNA of *PP5* by PCR, and the characteristics of the encoded protein was analyzed by online tools and biological softwares. The *PP5* expression profile was quantified by real time PCR at different stages of microcycle conidiation and hyphal stage of normal conidiation in *M. anisopliae*. [ **Results** ] The genomic DNA, which was interrupted by six introns, was 2100 bp long. The cDNA, encoding 325 amino acid residues, is 1428 bp. Analysis to Ser/Thr protein phosphatase type 5 in *M. anisopliae* show a conserved structure features. Quantitative real time PCR analysis showed that *PP5* expression varied obviously in different stages of microcycle conidiation. Expression was sharply up-regulated after 16 h, with the highest transcript levels at 24 h in microcycle conidiation, but lowly expressed in normal conidiation. [ **Conclusion** ] This work presents the first report about the detailed sequence and structure of *PP5* from entomopathogenic fungi. Comparison of expression profile of microcycle conidiation and normal conidiation reveals that *PP5* is principally involved in microcycle conidiation in *M. anisopliae*, and it provides ideal candidate for further studies to *PP5* and its molecular regulation.

**Keywords:** *Metarhizium anisopliae*; microcycle conidiation; Ser/Thr protein phosphatase type 5; quantitative real time PCR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Creation, Technology Integration and Industrial Development of Bio-pesticides (200903052), and by the 211 Project (S-09104)

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

Received: 29 September 2010/Revised: 6 December 2010