

哈茨木霉 β 微管蛋白基因的克隆与序列分析

李 敏 杨 谦*

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

摘要 根据哈茨木霉 T88 菌丝体 cDNA 文库中的 β 微管蛋白基因 EST 序列,采用反向 PCR 方法以哈茨木霉 T88 的基因组 DNA 为模板,扩增得到了 1.74kb 的 β 微管蛋白基因编码区、1.5kb 的 5'非编码区和 1.0kb 的 3'非编码区。哈茨木霉 β 微管蛋白基因编码 446 个氨基酸,与其它真菌 β 微管蛋白基因具有较高的序列同源性。对哈茨木霉 β 微管蛋白的三维结构进行了同源建模,建模的结果为研究哈茨木霉 β 微管蛋白自身特性及其与抗微管类杀菌剂的作用机制提供了分子基础。

关键词 哈茨木霉,反向 PCR, β 微管蛋白,同源建模

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1150-04

Isolation and Characterization of a β -tubulin Gene from *Trichoderma Harzianum*

LI Min YANG Qian*

(Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001)

Abstract Based on a β -tubulin gene EST sequence from *Trichoderma harzianum* mycelium cDNA library, a 1.74kb β -tubulin gene coding region, together with a 1.5kb 5'-flanking region and a 1.0kb 3'-flanking region was cloned from *T. harzianum* by IPCR methods. The gene encodes a 446 amino acid polypeptide, which shows a high degree of homology with other fungal β -tubulins. A three-dimensional model of the *T. harzianum* β -tubulin was built based on the crystal structure of bovine tubulin using homology modeling method. Tertiary protein structure of the β -tubulin should provide a basis for understanding a significant body of research on tubulin's properties and interactions with antimicrotubule agents.

Key words *Trichoderma harzianum*, Inverse PCR, β -tubulin, Homology modeling

微管是真核生物细胞骨架的重要组成成分,在细胞分裂、物质运输、鞭毛或纤毛运动、维持细胞形态等众多生理活动中发挥着重要的作用^[1]。微管的主要成分为微管蛋白,由 α 微管蛋白和 β 微管蛋白聚合形成的二聚体为主要成分组成。 α 微管蛋白和 β 微管蛋白具有较高的序列同源性。已有研究指出,真菌 β 微管蛋白是苯并咪唑类杀菌剂的主要作用位点, β 微管蛋白基因的某个或某几个碱基发生突变均可引起真菌对杀菌剂产生抗性。Jung 等报道,构巢曲霉室内诱导抗性突变体的微管蛋白粗提物与苯并咪唑类杀菌剂结合力明显下降^[2]。由于苯并咪唑类杀菌剂在田间长期、大量施用,导致很多植物病原菌产生了抗药性,因此对植物病原菌 β 微管蛋白的研究主要集中在与苯并咪唑类杀菌剂的相互作用上^[3~5]。研究指出不同的病原菌突变位点不

同,所引起的抗性水平不同,甚至同一突变位点被不同的碱基所取代,也可引起个体间抗性水平的差异。另外,Byrd 等报道,黑麦草内生真菌抗性菌株 β 微管蛋白基因 5'非编码区发生重排,可能导致了其苯菌灵抗性的产生^[6]。

随着可持续农业的发展,人们对 β 微管蛋白的研究逐渐由植物病原菌转向了生物防治真菌。通过对生物防治真菌 β 微管蛋白的研究,开发具有杀菌剂抗性的优秀菌株,与化学杀菌剂相结合来防治植物病原菌,既可以减少化学杀菌剂的使用量,又可以达到有效防治植物病原菌的目的。Goldman 等和 McMahan 等分别对绿色木霉(*Trichoderma virid*)和禾谷镰刀菌(*Fusarium lateritium*)苯并咪唑类杀菌剂抗性菌株 β 微管蛋白基因进行了研究,探讨了生物防治真菌与杀菌剂间的相互作用^[7,8]。哈茨木霉(*T.*

* 通讯作者 Tel: 0451-86412952, E-mail: yangq@hit.edu.cn

收稿日期:2007-03-22, 修回日期:2007-07-24

harzianum)是一种资源丰富的拮抗微生物,在植物病害生物防治中具有重要的、不可忽视的作用^[9,10]。为了实现哈茨木霉与苯并咪唑类杀菌剂在病虫害防治中的综合应用,本研究克隆并分析了哈茨木霉 β 微管蛋白基因及其5'非编码区,模拟构建了三维结构模型,为研究哈茨木霉与苯并咪唑类杀菌剂之间的相互作用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)T88、大肠杆菌 JM109 均为本实验室保存。pMD18-T 载体购自 TaKaRa(大连)公司。

1.1.2 酶及主要试剂:限制性内切酶 *Bgl*II、*Hind*III、*Spe*I、*Xba*I 购自 MBI 公司;T4DNA 连接酶、Ex-TaqDNA 聚合酶、X-gal 和 IPTG 均购自 TaKaRa(大连)公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司。引物由 Invitrogen(北京)公司合成。其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的粗提:参照文献[11]方法进行。

1.2.2 基因组 DNA 的纯化:用 0.8% 的琼脂糖凝胶分离基因组 DNA 的粗提物,用胶回收试剂盒回收目的片段,即获得高质量的 DNA。

1.2.3 目的基因片段的扩增:我们对本实验室建立的哈茨木霉 T88 菌丝体 cDNA 文库进行搜索,得到一条 β 微管蛋白基因 EST 序列(Accession Nos. CK906836)根据这一部分核苷酸序列设计一对引物,p1:5'-TTGGTAACTCCACCTCCATCCA-3',p2:5'-TGCAAACACTTGCCATCTGACC-3',对基因组 DNA 进行扩增。PCR 反应体系(50 μ L)包括 50ng DNA、0.2mmol/L 引物、200 μ mol/L dNTP、1 \times buffer、2.5U Ex-TaqDNA 聚合酶。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s 61 $^{\circ}$ C 40s 72 $^{\circ}$ C 30s 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 7min。回收扩增片段,与 pMD-18T 载体连接转化大肠杆菌 JM109 筛选阳性克隆测序。

1.2.4 反向 PCR 扩增目的基因片段 5' 及 3' 编码区及侧翼序列:用限制性内切酶 *Bgl*II、*Hind*III、*Spe*I 及 *Xba*I 分别消化基因组 DNA,各反应体系中 DNA 量不得少于 1.5 μ g。消化产物加入 5 μ L NaAc(pH5.2)和 125 μ L 无水乙醇于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 2h,12 000r/min 离心

15min,用 70% 乙醇清洗沉淀,室温干燥并溶于 10 μ L 双蒸水中。取上述消化并醇沉后的产物 5 μ L,用 T4 DNA 连接酶进行片段自连,连接产物醇沉,沉淀溶于 10 μ L 双蒸水中(如上),-20 $^{\circ}$ C 保存。反向 PCR 包括两个反应,即巢式 PCR。根据 1.4.1 所得的扩增片段测序结果设计两对巢式引物,第一对引物 p3 5'-GTTGCACTGTTCCCGTGTACCC-3', p4 5'-GGACTCGGCCCTCGGTGAACT-3'; 第二对引物: p5 5'-GGTCAGATGGCAAGTGTTCGA-3', p6 5'-TGGATGGAGTGGAGTTACCAA-3'。

取制备的模板 3 μ L,以引物 p3 和 p4 进行第一轮 PCR 扩增,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s 63 $^{\circ}$ C 40s 72 $^{\circ}$ C 5min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 7min。第一轮反应结束后,取反应产物 1 μ L,以引物 p5 和 p6 进行第二轮 PCR 扩增,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s 61 $^{\circ}$ C 退火 30s 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min,35 个循环后于 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7min。PCR 产物回收、克隆和测序。为了验证得到的目的片段,设计新的引物:

p7 5'-AAGCTTCTCATCAGCAAGCTCGAAG-3'和 p8 5'-AAGCTTCCAGAACATTTGAGGAGA-3'来扩增整个序列。PCR 方法同上。

1.2.5 序列分析和结构预测:用 DNAMAN 软件进行序列分析;用 Blast 软件做同源性比较分析;用 MatInspector 软件进行转录因子分析;使用 Swiss-Model 程序预测 β 微管蛋白的三维结构,结构预测的结果用 Spdbv 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 目的基因及其非编码区的扩增

2.1.1 目的基因片段的扩增:以纯化的哈茨木霉 T88 基因组 DNA 为模板,以 p1、p2 为引物扩增 β 微管蛋白基因。扩增产物测序结果表明所得片段长 436bp(图 1A),片段序列与已登记的哈茨木霉 cDNA 文库中的 β 微管蛋白基因 EST 序列完全一致。

2.1.2 目的基因片段 5' 及 3' 末端编码区及非编码区的扩增:用各限制性内切酶分别消化基因组 DNA,将消化片段自身连接,制成反向 PCR 反应的模板。以 p3 和 p4 为引物,对各处理模板进行扩增,扩增产物经电泳检测发现,产物条带均呈弥散状,无特异性条带产生。以扩增产物为模板,以 p5 和 p6 为引物,进行巢式 PCR 扩增发现,以 *Hind*III 处理过

的基因组 DNA 为模板,扩增出一条大小约 3.9kb 的片段(图 1B),其余处理无特异性条带产生。

2.1.3 目的基因及其非编码区的全长扩增:将以上获得的两条基因进行序列拼接,得到一条长 4.3kb 的序列。为验证这条序列的正确性,设计新引物 p7

和 p8,对基因组 DNA 进行扩增。电泳检测结果表明,扩增片段长度与预期大小一致(图 1C)。测序结果进一步证实了扩增产物的正确性,扩增所得 4.3kb 的序列由 436bp 和 3.9kb 的序列组成。

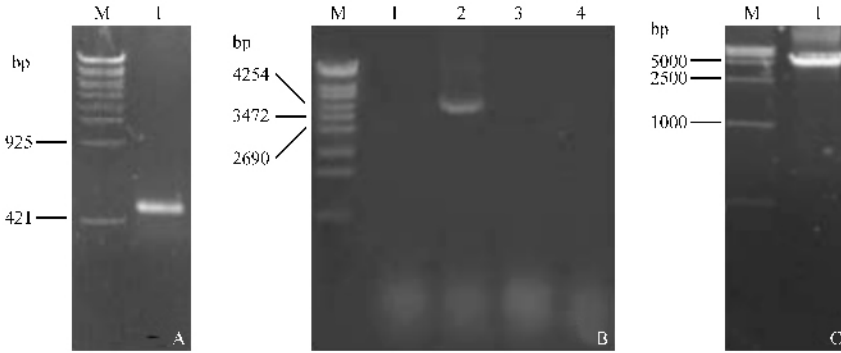


图 1 PCR 扩增产物琼脂糖电泳

M: DNA marker; A1: 目的基因片段的扩增产物; B1-B4: 反向 PCR 扩增产物; C1: 目的基因的全长扩增产物

2.2 序列分析

扩增所得 4.3kb 的序列包括 1.74kb 的 β 微管蛋白基因开放读码框(ORF) 1.5kb 的 5'非编码区及 1.0kb 的 3'非编码区。 β 微管蛋白基因 ORF 全长 1740bp 编码 446 个氨基酸,包含 5 个外显子,外显子和内含子交界处碱基排列均符合 GT-AG 原则,具有相似的 5'端(GTRMGT)和 3'端(YAG)序列。该基因氨基酸序列具有高度保守性,与其他真菌的 β 微管蛋白氨基酸序列同源性很高,与绿色木霉及玉蜀黍赤霉菌的同源性分别为 99% 和 94%。推测的 β 微管蛋白的分子量为 49930D,等电点为 4.79。非编码区的分析结果显示,该基因在起始密码子上游非翻译区内,距转录起始位点 - 432, - 470 和 - 586 处,存在三个可能的 CCAAT 盒,未发现 TATA 盒及

polyA 加尾信号特征序列。

作为一种三磷酸鸟苷(GTP)结合蛋白,哈茨木霉 β 微管蛋白具有 1 个 GTP 结合位点 GGGTGSG (140~146),此位点在 α 微管蛋白与 β 微管蛋白的聚合中起重要的作用^[12]。该蛋白 N 端具有 MREI 保守结构域,该结构域已经被证明参与基因转录后的独立自主调控作用^[13]。分析还发现,哈茨木霉 β 微管蛋白存在一个镁离子结合位点(200~225)和一个核糖体结合位点(240~244)。

2.3 三维结构同源建模

以牛 β 微管蛋白晶体结构(1JFF)为模板,对哈茨木霉 β 微管蛋白的三维结构进行了同源建模。对 Ramachandran 图的分析显示,主链 90.3% 的 Ψ 、 Φ 角落在核心区 and 允许区,说明模建的结构合理。由三

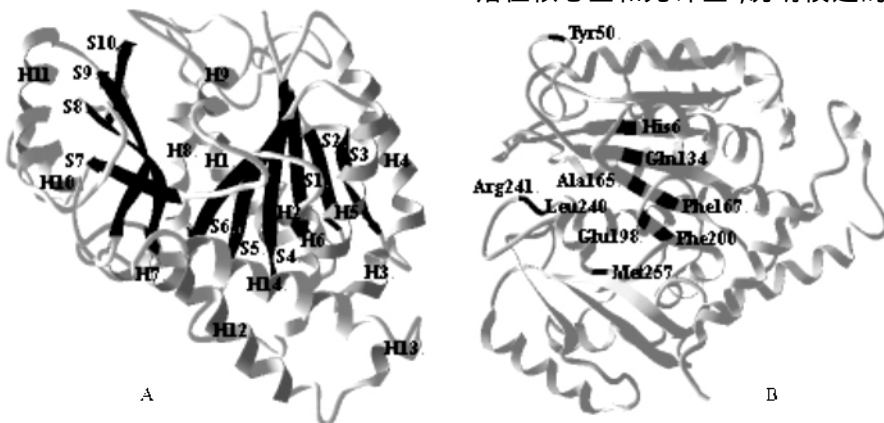


图 2 哈茨木霉 β 微管蛋白三维结构的带状图

维结构的带状图(图 2A)可知,哈茨木霉 β 微管蛋白以由 6 条 β 折叠和 4 条 β 折叠组成的两个 β 片层结构为中心,周围围绕着 14 个 α 螺旋。N 端存在一个 $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ 交替的典型 Rossmann 折叠超二级结构域^[14],此结构域为核苷酸结合蛋白的典型结构域。 β 微管蛋白 C 端结构域由三个 α 螺旋(H12、H13 和 H14)组成,这部分区域存在于微管的外表面,推测这一结构域为可能的微管结合蛋白和马达蛋白结合域^[15]。

3 讨论

对本实验室已建立的哈茨木霉 T88 菌丝体 cDNA 文库进行搜索,得到一条 β 微管蛋白基因 EST 序列。根据这条已知序列,采用反向 PCR 方法对 β 微管蛋白基因进行了全长扩增。由于反向 PCR 技术成功的关键取决于制备的模板的质量,因此为了保证反应的扩增效率,我们对模板的制备过程做了适当的改进。首先,由于哈茨木霉基因组 DNA 粗提物含有一些未被除净的蛋白质和 RNA 等杂质,使粗提物呈乳白色,我们用胶回收试剂盒对粗提物进行了浓缩和纯化,保证了基因组 DNA 的高纯度和高浓度。其次,在对基因组 DNA 进行酶切和对酶切产物进行环化的环节中,我们对酶切产物和环化产物分别进行了醇沉处理,将 50 μ L 反应液经醇沉后溶于 10 μ L 双蒸水中,即提高了模板的浓度,又去除了反应液中不必要的酶及缓冲液成分。由于第一次反向 PCR 产物条带弥散,无特异性条带产生,因此为了提高产物的特异性,我们设计了一对巢式引物,以第一次反向 PCR 的反应液为模板,成功的实现了 β 微管蛋白基因的全长扩增。

以牛 β 微管蛋白晶体结构为模板,对哈茨木霉 β 微管蛋白的三维结构进行了同源建模,建模的结果将为研究 β 微管蛋白自身特性、 β 微管蛋白与微管蛋白家族其它成员的相互作用、 β 微管蛋白与微管相关蛋白的相互作用奠定基础。由于真菌 β 微管蛋白是苯并咪唑类化学杀菌剂的主要作用位点,因此哈茨木霉 β 微管蛋白三维结构的建立也将为研究哈茨木霉与杀菌剂的作用机制提供分子基础,并有助于实现杀菌剂和抗性生物防治真菌在可持续农业中的综合施用。鉴于对 16 种真菌的已有研究表明, β 微管蛋白的第 6、50、134、165、167、198、200、240、

241 和 257 位氨基酸发生突变,可引起真菌对苯并咪唑类杀菌剂产生抗性,我们对哈茨木霉 β 微管蛋白相应位点的氨基酸做了标记(图 2B)。由这些氨基酸的分布趋势来看,杀菌剂对 β 微管蛋白的作用位点存在于微管的内表面,尽管微管与其他相关蛋白的作用位点大多位于微管外表面。已有研究表明,不同真菌 β 微管蛋白基因与杀菌剂的作用位点不同,产生的抗性水平也不同。即使是相同的作用位点,同一碱基产生不同的突变,也会导致菌株间抗性水平的差异^[16]。因此,判别这些位点是否为苯并咪唑类杀菌剂对哈茨木霉 β 微管蛋白的有效作用位点,最终还需要通过实验来验证。

参考文献

- [1] Stephens R, Edds K. *Physiol Rev*, 1976, **56**(4): 709 ~ 777.
- [2] Jung M K, Wilder I B, Oakley B R. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1992, **22**(2): 170 ~ 174.
- [3] Ma Z H, Yoshimura M A, Michailides T J. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(12): 7145 ~ 7152.
- [4] Sholberg P L, Harlton C, Haag P, et al. *Postharvest Biol Tec*, 2005, **36**(1): 41 ~ 49.
- [5] Maymon M, Zveibil A, Pivonia S, et al. *Popul Ecol*, 2006, **96**(5): 542 ~ 548.
- [6] Byrd A D, Schardl C L, Songlin P J, et al. *Curr Genet*, 1990, **18**(4): 347 ~ 354.
- [7] Goldman G H, Temmerman W, Jacobs D, et al. *Mol Gen Genet*, 1993, **240**(1): 73 ~ 80.
- [8] McMahan G, Yeh W, Marshall M N, et al. *J Ind Microbiol Biot*, 2001, **26**(3): 151 ~ 155.
- [9] 李梅云, 谭丽华, 方敦煌, 等. *微生物学通报*, 2006, **33**(6): 79 ~ 83.
- [10] Gao K X, Liu X G, Liu Y H, et al. *J Phytopathol*, 2002, **150**(5): 271 ~ 276.
- [11] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002, pp. 96 ~ 102.
- [12] Nogales E, Downing K H, Amos L A, et al. *Nat Struct Biol*, 1998, **5**(6): 451 ~ 458.
- [13] Bachurski C J, Theodorakis N G, Coulson R M R, et al. *Mol Cell Biol*, 1994, **14**(6): 4076 ~ 4086.
- [14] Rossmann M, Moras D, Olsen K. *Nature*, 1974, **250**(19): 194 ~ 199.
- [15] Cross D, Dominguez J, Maccioni R, et al. *Biochemistry*, 1991, **30**(17): 4362 ~ 4366.
- [16] Ma Z H, Michailides T J. *Crop Prot*, 2005, **24**(10): 853 ~ 863.