

角毛壳菌丝切蛋白基因的克隆和特性分析

李黎, 张海燕

(河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475004)

摘要:在构建的角毛壳菌(*Chaetomium cupreum*)菌丝体 cDNA 文库中获得丝切蛋白(Cofilin)的 ESTs 序列片段,为研究角毛壳菌的生物特性,提高其生物防治效果,以角毛壳菌总 RNA 反转录产物为模板进行 PCR 扩增,成功获得了 Cofilin 基因 cDNA 序列.生物信息学分析结果表明,该基因全长 468 bp,编码 155 个氨基酸,编码蛋白理论分子量 17 kD,等电点是 4.99, α -螺旋和无规则卷曲是其主要的二级结构,为亲水性蛋白质.该蛋白有 6 个位点发生 Ser 磷酸化,4 个位点发生 Tyr 磷酸化,有 4 个保守区,ClustalX 分析说明该蛋白与柄孢霉(*Podospora anserina*)和球毛壳菌(*C. g lobosum*)亲缘关系较近.

关键词:角毛壳菌;丝切蛋白;基因克隆;生物信息学分析

中图分类号:Q785

文献标志码:A

角毛壳菌(*C. cupreum*)属于子囊菌门盘菌亚门毛壳菌属真菌,是一种生物防治真菌,主要通过产生毒素类物质或者生长优势等方式抑制植物病原真菌的生长,对一些常见的植物病原真菌有较好的防治效果,如:苹果炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、番茄叶霉菌(*Cladosporium fulvum*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等^[1-2].其生物防治机理主要是产生抗真菌活性的次级代谢产物,分泌细胞壁降解酶类等^[3,4].如何海清从角毛壳菌(*C. cupreum*)CH-1 中通过紫外光谱、红外光谱、质谱、核磁共振谱等方法分离鉴定出卵孢菌素^[5],其对人体和动物毒害较低,而对鸡冠花猝倒病菌(*Phyitium ultimum*)等植物真菌具有特异性抗菌活性^[6,7];Panthama 等从角毛壳菌(*C. cupreum*)RY202 的菌丝体中分离得到两种结构新颖抗菌化合物 Iso-chromophilanol 和 Ochrephilanol^[8].杨谦等为研究角毛壳菌(*C. cupreum*)的分子生物防治机制,提高其生物防治效果,构建了角毛壳菌菌丝体(*C. cupreum*)文库,共获得 3069 条 ESTs 序列,并对部分基因进行了克隆研究^[9].

在角毛壳菌 cDNA 文库中得到了一条 Cofilin 的 cDNA 基因序列,Cofilin 是普遍存在于真核细胞的一种肌动蛋白结合蛋白^[10],是丝切蛋白家族的一个成员.Cofilin 的基本功能是在细胞内结合和解聚 F 肌动蛋白(F-actin),其活性可通过磷酸化、去磷酸化、pH 改变等进行调节^[11].本文采用 PCR 方法克隆了 *Cofilin* 基因的全长 cDNA,并借助生物信息学的手段对从角毛菌中克隆得到的 *Cofilin* 基因的核酸序列和氨基酸序列的理化性质等进行了预测和分析,为进一步研究 Cofilin 蛋白在真菌微生物中的的结构功能和在生物防治中的作用奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

角毛壳菌菌丝体 cDNA 文库由哈尔滨工业大学微生物实验室提供;反转录酶 Superscript 量总 RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司;DNase I, RNase 抑制剂购自宝生物公司(大连);测序

收稿日期:2017-02-10;修回日期:2017-04-10.

基金项目:国家自然科学基金(31400108);河南大学科研项目(xxjc20140009).

作者简介:李黎(1965-),女,河南开封人,河南大学实验师,主从事环境微生物学研究,E-mail:ll2002769@henu.edu.cn.

通信作者:张海燕(1977-),女,黑龙江双城市人,河南大学副教授,博士,主要从事生物技术及遗传学研究,E-mail:zhanghy150@sina.com.

由上海博亚生物工程有限公司完成. SDS RNA 提取液(2% SDS, 硼砂 0.025 mol/L, pH = 8.5, DEPC 处理);其他生化试剂为国产分析纯.

1.2 引物合成

以 cDNA 文库筛选获得的 ESTs 序列为模板,设计引物,引入 *Bam* H I, *Xho* I 酶切位点,交由金唯智生物技术有限公司合成引物. 引物序列如下:

Cof1 5' - actgggatcc ATGTCTCAATCCGGAGCG - 3';

Cof2 5' - agtactcga GTACCGCCGCGTA - 3'.

1.3 方法

1.3.1 Cofilin 基因的克隆

1.3.1.1 角毛壳菌菌丝体总 RNA 提取

参考植物小量总 RNA 提取试剂盒说明书.

1.3.2.2 RT-PCR 反应与测序

以 2 μ g 总 RNA 为模板,反转录合成单链 cDNA,再以 Cof1, Cof2 为引物进行 PCR 扩增目的基因. PCR 反应体系为 25 μ L,其中含 2.5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液,100 μ mol/L dNTP,上下游引物各 0.25 μ mol/L,1.5U Taq DNA 聚合酶,0.5 μ L RT 产物为模板. 反应条件为 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 54.5 $^{\circ}$ C, 45 s; 72 $^{\circ}$ C, 40 s, 25 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min.

1.3.2 序列的生物信息学分析

利用 NCBI (National Center for Biotechnology Information, 美国国立生物信息学中心) 网站中的 ORF Finder 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 中进行 Blast 和开放阅读框的分析^[12]; 通过 BlastP 预测保守区,用 Pfam17.0 预测蛋白质家族.

利用 ExPASy 网站在线分析工具 ComputerPI/Mw tool (http://expasy.org/tools/pi_tool.html) 和 ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) 对丝蛋白基因编码的氨基酸序列进行氨基酸序列等电点、相对分子质量和疏水性等物理化学性质分析^[12]; 用在线程序 ProtScale^[13] <http://expasy.org/tools/protscale.html>, 选择 Hphob. / Kyte & Doolittle, 对该氨基酸序列进行疏水性分析预测; 利用在线分析工具 PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) 对蛋白质的二级结构进行预测; 使用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质的三维结构; 采用 NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 对氨基酸序列进行磷酸化位点分析.

从美国 NCBI 数据库 (GenBank) 中选择相似性较高的 10 种不同真菌的 Cofilin 蛋白氨基酸序列, 下载后采用 FASTA 格式保存, 按照默认参数采用 ClustalX (1.83) 软件 (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) 构建进化树, 进行序列比对. 所选真菌如下: 球毛壳菌 (*C. globosum* CBS 148.51)、玉米赤霉菌 (*Gibberella zeae* PH-1)、禾生小丛壳 (*Glomerella graminicola* M1.001)、蓝菌属真菌 (*Grosmannia clavigera* kw1407)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae* 70-15)、蝗绿僵菌 CQMa 102 (*Metarhizium acridum*)、血红丛赤壳 (*Nectria haematococca* mpVI 77-13-4)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa* OR74A)、柄孢霉 (*Podospora anserina* Smat+) 和小麦褐斑病菌 (*Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP).

2 结果与分析

2.1 Cofilin 基因的克隆

通过 PCR 扩增获得了角毛壳菌 *Cofilin* 基因的全长 cDNA 序列 (图 1), 该序列的长度是 629bp, 序列在 Genbank 上的登录号为 DV546486.

2.2 Cofilin 基因核酸序列的分析

该核酸 cDNA 序列的长度是 468bp, 编码 155 个氨基酸, 起始密码子是 ATG, 终止密码子是 TAA, 结果如图 2. 5' 端非翻译区为 124bp, 该蛋白质的分子量是 16 994.03D, 理论等电点 PI 是 4.99, 说明该蛋白质为酸性蛋白质. ProtParam 预测表明该蛋白质的带正电荷的氨基酸残基 (Arg + Lys) 的数目是 19, 负电荷的氨

基酸残基(Asp + Glu)数目是 23,说明该氨基酸总体是带负电的.

2.3 Cofilin 蛋白疏水性分析

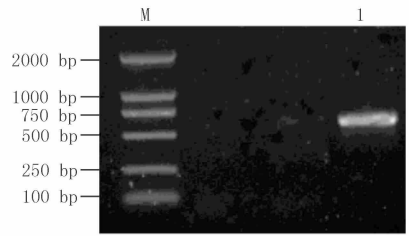
疏水性分析结果如下:该蛋白质疏水性最大值是 1.356,最小值是一2.500(图 3),其 C、N 端均表现为疏水性,总体上呈亲水性强.

2.4 Cofilin 蛋白的二级结构和三级结构预测

蛋白质的二级结构预测结果表明该蛋白质存在 4 个 α -螺旋,5 个延伸带(Extended strand)和 10 个无规则卷曲.根据 SWISS-MODEL 的预测结果显示,丝切蛋白的三级结构主要以 α -螺旋为主,存在 4 个 α -螺旋,其余主要以无规则卷曲和延伸带为主,这和二级结构的预测相同(图 4).

2.5 Cofilin 氨基酸序列磷酸化位点分析

经过 NetPhos 2.0 Server 的分析,结果显示,该氨基酸序列发生 6 个 Ser 磷酸化,分别是第 43,45,87,101,115,116 氨基酸位点.第 63 氨基酸位点发生 1 个 Thr 磷酸化,4 个位点发生 Tyr 磷酸化,分别是第 27,51,76 和 83 氨基酸位点. Ser³ 是所有 cofilin 蛋白家族中最保守的氨基酸. Ser³ 位点的磷酸化使 cofilin 蛋白失活,使其不能与肌动蛋白丝结合,从而提高了 F 肌动蛋白的稳定性.因此,cofilin 的磷酸化与否是肌动蛋白解聚的开关^[10].



1道为Cofilin基因;M:2kb Marker

图1 角毛壳菌Cofilin基因PCR电泳

```

125 atgtctcaatccggagcgaacctcaacgcccagtgatcataacagcc
M S Q S G A T V N A E C I T A
170 tacaatgagctgaagctcaacaagaagtaactacatcatctac
Y N E L K L N K K Y S Y I I Y
215 aagctgtccgacgacaacaaggagattgtgctcgacagcaccagc
K L S D D N K E I V L D S T S
260 gaggacggccccgagtaagagaacttccgagagaagctcatcaac
E D G P E Y E N F R E K L I N
305 gctaccaccaagaccaagtttgggtggcgagggcaagggtccccgc
A T T K T K F G G E G K G P R
350 tatgcagtctacgagtgccagtaacgagctcgcgctccggcgagggc
Y A V Y D V Q Y E L A S G E G
395 acccggacaagaatcaagttcatcgctgctgctgatgatgctg
T R N K I T F I A W S P D D A
440 ggtatcatggccaagatggtgtaagcctcgtccaaggagggcctg
G I M A K M V Y A S S K E A L
485 aagcgcgcccctgaacggcctcgcgcttgagggtgcagggccaacgac
K R A L N G L A V E V Q A N D
530 gccgacgacatcgagtgggcctcgcgctggtcaagaagctcagcaag
A D D I E W A S L V K N V S K
575 ggtaccgcccgcgtataa 592
G T A A V *
    
```

图2 Cofilin基因cDNA及氨基酸序列

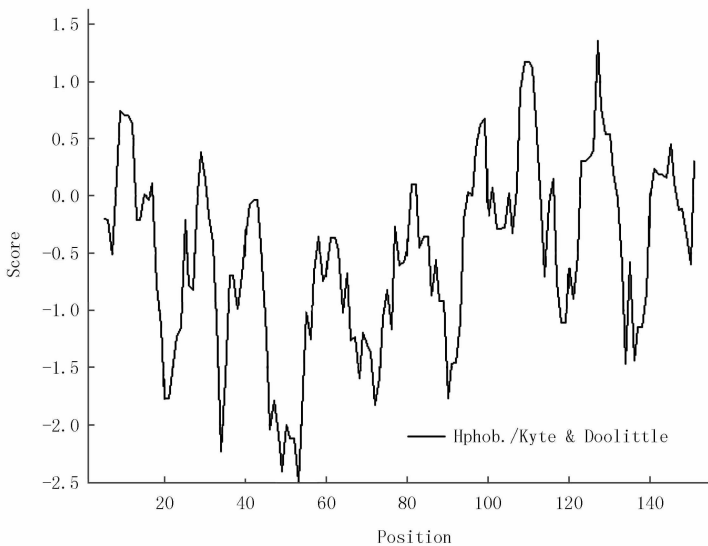


图3 Cofilin蛋白疏水性分析

2.6 Cofilin 保守区及蛋白质家族预测

利用 Blast P 程序进行保守区预测,结果表明 Cofilin 蛋白质有 4 个保守区,分别是肌动蛋白结合位点、核定位序列、特殊的肌动蛋白纤维结合位点和磷酸化位点,属于 ADF 蛋白家族.用 Pfam17.0 预测蛋白质家

族,结果表明,该蛋白质属于 cofilin-ADF 蛋白家族,结果与 BlastP 预测结果一致(图 5)。

2.7 系统进化树分析

将 11 种真菌的 Cofilin 蛋白的氨基酸序列进行进化树分析(图 6),结果表明,角毛壳菌与柄孢霉(*P. anserina*)亲缘关系最近,他们在进化上同属于真菌门,子囊菌门,其次是和球毛壳菌(*C. globosum*)亲缘关系较近,列在同一个分支,而与粗糙脉孢霉(*N. crassa*),稻瘟病菌(*M. oryzae*)的 Cofilin 蛋白亲缘关系远。

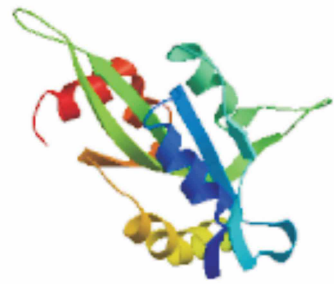


图4 Cofilin蛋白的三级结构预测

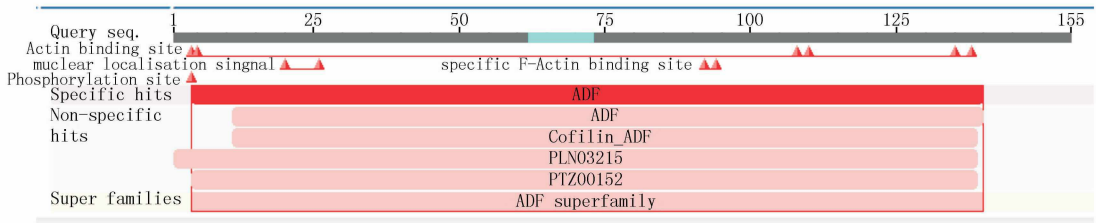


图5 Cofilin蛋白保守区及蛋白家族预测

3 讨论

Cofilin 又可称为肌动蛋白解聚因子,通过促进细胞运动前沿的微丝解聚来调节板状伪足延伸和细胞迁移,从而在细胞定向性运动中发挥关键作用.其既可与肌动蛋白单体结合,又可与微丝结合,促使微丝负性端解聚,解聚下来的单体参与新一轮微丝聚合.目前国内外针对 Cofilin 主要集中在医学方面的研究,如在乳腺癌细胞中丝切蛋白均有过度表达,并可增强乳腺癌细胞的侵袭性^[10,14];杜纳等的研究表明,抑制丝切蛋白-1 表达可降低皮肤鳞状细胞癌细胞的活性与迁移能力,可作为皮肤肿瘤防治的靶点^[15].本研究克隆了真菌角毛壳菌的 *Cofilin* 基因,并利用生物信息学手段,对 *Cofilin* 基因的结构和功能进行预测分析,结果显示该基因编码一条多肽链共 155 个氨基酸.二级结构和高级结构分析显示该蛋白存在 4 个 α -螺旋,10 个无规则卷曲和 5 个延伸带. Cofilin 家族的成员蛋白家族是一类微丝结合蛋白,能和肌动蛋白单体结合,其精细的蛋白结构还不是很清楚.但在细胞进化过程中,cofilin 家族无论是全序列还是功能区域,都是高度保守的,有 1 个由 5 个 β 折叠(其中 4 个是反平行的)、5 个 α 螺旋及 C 末端的一个短 β 链构成的折叠结构.其中,第 133 位的组氨酸和第 98 位的天冬氨酸搭成一个盐桥,以稳定分子及为其提供适宜的 pH 环境.本研究获得了角毛壳菌 *Cofilin* 基因全长 cDNA 序列,并进行了生物信息学分析,为进一步研究 *Cofilin* 基因在真核微生物中的作用和功能奠定基础。

100% 90% 80% 70% 60%

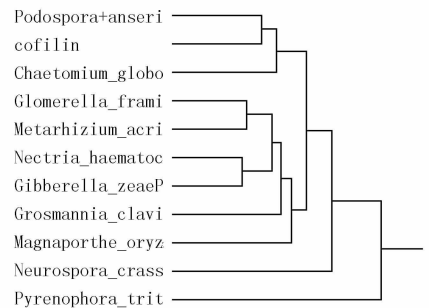


图6 11种真菌的Cofilin蛋白ClustalX分析

参 考 文 献

- [1] 付雯,张晓勇.毛壳菌生物防治机制研究进展[J].中国农学通报,2012,28(07):100-103.
- [2] 谭悠久,钟娟,周金燕,等.毛壳菌产抗真菌活性物质菌株的筛选与鉴定[J].西南农业学报,2010,23(4):1128-1131.
- [3] Zhang Haiyan, Li Min. Transcriptional Profiling of ESTs from the Biocontrol Fungus *Chaetomium cupreum*[J]. The Scientific World Journal Volume 2012, doi:10.1100/2012/340565.
- [4] 张海燕,贺洁,尚富德.角毛壳菌泛素结合酶基因的克隆和特性分析[J].河南大学学报(自然科学版),2014,44(1):74-78.
- [5] 何海清,钟娟,周金燕,等.角毛壳菌 CH1 产生的抗真菌活性化合物的纯化和鉴定[J].中国生物防治学报,31(4):592-597.

- [6] Nagaokaa T, Nakatab K, Kounoa K, et al. Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*[J]. *Zeitschrift für Naturforschung-C-A Journal of Biosciences*, 2004, 59(3/4): 302-304.
- [7] Mao B Z, Huang C, Yang G M, et al. Separation and determination of the bioactivity of oosporein from *Chaetomium cupreum*[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9(36): 5955-5961.
- [8] Panthama N, Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, et al. Chemical constituents from the fungus *Chaetomium cupreum* RY202[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2015, 38(5): 585-590.
- [9] Zhang H, Yang Q, Wang G, Shang F. Analysis of expressed sequence tags from *Chaetomium cupreum* grown under conditions associated with mycoparasitism[J]. *Letters in Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02487.x
- [10] LIN M C, Galletta, Brian J. Overlapping and distinct functions for cofilin, coronin and Aip1 in actin dynamics in vivo[J]. *Journal of Cell Science*, 2010, 8(123): 1329-1342.
- [11] 赵微, 苏玉虹, 巴彩凤, 等. Cofilin 蛋白功能及活性调节[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 9: 706-710.
- [12] WEI Q C, CHANG L P, XUE X F, et al. Electronic cloning and bioinformatical analysis of IPI gene from *Glycinemax* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010, 11: 96-100.
- [13] QIANG C K, DU Y Z, FENG W J, et al. Bioinformatics analysis of partial sequences of ubiquitin gene among different insects [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010, 10: 188-192.
- [14] 陆玉成, 闫红霞, 王莉莉, 等. 自分泌运动因子对 EC9706、Eca109 及 EC-1 细胞丝切蛋白磷酸化的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2010, 45(4): 537-540.
- [15] WANG L H, XIANG J, YAN M, et al. The mitotic kinase Aurora-A induces mammary cell migration and breast cancer metastasis by activating the Cofilin-F-actin pathway[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9118-9128.

Cloning and Character Analysis of Cofilin from *Chaetomium cupreum*

Li Li, Zhang Haiyan

(College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: *Cofilin* gene was obtained from mycelia cDNA library of *Chaetomium cupreum*. Full length of *Cofilin* gene was acquired by PCR amplification with reverse RNA template in order to study the biological character and enhance the biocontrol effect. The bioinformatics results showed that the full-length of *Cofilin* gene was 468 bp length and encoded 155 amino acids. The protein molecular weight was 17 kD and its theoretical isoelectric point was 4.99. Cofilin was hydrophilic and its main secondary structure elements of cofilin were alpha helix and random coil. Cofilin protein included 4 conservative regions and 6 Ser and 4 Tyr phosphorylation site. ClustalX analysis revealed that the amino acid sequence shared high similarity with *P. anserina* and *C. g lobosum*.

Keywords: *C. cupreum*; *Cofilin*; gene cloning; bioinformatics analysis

[责任编辑 王凤产]