

草菇 *MAPKKK* 同源基因的克隆及序列分析

汪虹 鲍大鹏* 陈明杰 陈辉 冯爱萍

(国家食用菌工程技术研究中心 农业部应用真菌资源与利用重点开放实验室 上海市农业遗传育种重点开放实验室
上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201106)

摘要: 根据担子菌丝裂原活化蛋白质激酶激酶激酶(MAPKKK)蛋白的保守序列设计两对简并引物, 通过巢式简并 PCR 方法获得草菇 *VV-MAPKKK* 基因中的保守片段, 然后通过和草菇基因组信息比对, 获得了 *VV-MAPKKK* 基因全长序列。 *VV-MAPKKK* 基因长度为 4434 bp, 包含 4 个内含子, 编码 1405 个氨基酸残基, 推定的氨基酸序列与新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、巴西芽生菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)和异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)的 MAPKKK 同源蛋白相似性分别为 58%、57%和 56%。对 *VV-MAPKKK* 蛋白的系统发生学分析的结果表明, *VV-MAPKKK* 与担子菌中的 Hog 信号传导途径的 MAPKKK 同源蛋白聚在同一进化支上, 这些数据都支持所获得的 *VV-MAPKKK* 为 Hog-MAPKKK 蛋白在草菇中的同源物的推定。

关键词: 草菇, 丝裂原活化蛋白质激酶激酶激酶(MAPKKK), 克隆, 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Homolog from *Volvariella volvacea* (VV-MAPKKK)

WANG Hong BAO Da-Peng* CHEN Ming-Jie CHEN Hui FENG Ai-Ping

(National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Applied Mycological Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, People's Republic of China, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: Two pairs of degenerate primers were designed according to the conserved amino acid sequences of several mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKK) from basidiomycetes. Based on the conserved DNA sequence, which was obtained by nested degenerate PCR, a whole DNA sequence of *MAPKKK* of *Volvariella volvacea* (*VV-MAPKKK*) was obtained by blasting with *Volvariella volvacea* genome. *VV-MAPKKK* gene, containing 4 introns and coding for a 1405 aa protein (*VV-MAPKKK*), is 4434 bp in length. The similarity of *VV-MAPKKK* compared with Hog-MAPKKK protein from *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Cochliobolus heterostrophus* is 58%, 57% and 56%, respectively. Phylogenetic analysis showed that *VV-MAPKKK* and Hog-MAPKKK protein homolog belong to the same clade. These data supported that *VV-MAPKKK*

基金项目: 上海农科院 2008 年度院发基金[No. 上海农科院农科发 2008(16)]; 上海科技兴农重点攻关项目(No. 沪农科攻字 2007 第 6-2 号); 农业部公益性行业科研专项项目(No. nyhyzx07-008); 上海市浦江人才计划项目(No. 08PJ14087)

* 通讯作者: Tel: 86-21-62201090; 信箱: baodp@hotmail.com

收稿日期: 2010-05-10; 接受日期: 2010-08-25

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

protein is a Hog-MAPKKK protein homolog from *Volvarella volvacea*.

Keywords: *Volvarella volvacea*, Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK), Clone, Sequence analysis

丝裂原活化蛋白质激酶信号传导途径广泛存在于真核生物中, 由丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)、丝裂原活化蛋白质激酶激酶(Mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK)和丝裂原活化蛋白质激酶激酶激酶(Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK)三级激酶级联组成。研究发现啤酒酵母中至少有 5 条 MAPK 信号途径, 根据 MAPK 蛋白的不同, 将其分为 Fus3、Kss1、Hog1、Slt2 和 Smk1 信号途径, 分别接受不同的胞外刺激, 调节酿酒酵母的交配反应、丝状生长、高渗环境的胁迫反应、细胞完整性以及孢子的形成等^[1]。

在外界高渗透压环境中, 酵母 Hog1 信号途径被特异性激活, 信号通过一系列磷酸化反应进行传递, 最终传入核内, 调控相关基因的表达, 从而增强细胞对外界不利环境的适应能力。近年来, 该信号途径的多个组分被从多种丝状真菌中分离获得, 但是在食用真菌中, 这方面的研究还比较少。本文通过简并巢式 PCR 方法从草菇中获得了 Hog1 信号途径 *MAPKKK* 同源基因 *VV-MAPKKK* 部分保守序列, 然后通过和草菇基因组信息比对, 获得了 *VV-MAPKKK* 基因全长。这将有助于研究草菇 Hog1 信号途径的功能, 为进一步探讨草菇低温胁迫的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

草菇 V23 菌株由上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心保藏。

1.2 草菇菌丝培养及基因组 DNA 的提取

草菇菌丝培养方法参见文献[2], 草菇基因组 DNA 提取采用改进的 CTAB 法^[3]。

1.3 草菇 *VV-MAPKKK* 的克隆

比对已知的几种担子菌 Hog1 途径的 *MAPKKK* 同源基因编码的氨基酸序列, 找出其中的保守片段 EVHRDKV、WSNLDNE、VHRDIKP 和 GTPMYM, 根据保守序列设计出 2 对简并引物 VV-MAPKKK-F1 和 VV-MAPKKK-R1、VV-MAPKKK-F2

和 VV-MAPKKK-R2 (表 1), 以草菇基因组 DNA 为模板扩增 *VV-MAPKK* 基因的保守片段, 然后把该序列和获得的草菇基因组信息进行比对获得了 *VV-MAPKKK* 基因全长序列。在其序列两端设计引物 VV-MAPKKK-F 和 VV-MAPKKK-R (表 1), 以草菇基因组 DNA 为模板扩增 *VV-MAPKKK* 基因进行验证。

1.4 PCR 产物的回收、克隆和测序

PCR 反应产物经 1.5% 的琼脂糖电泳(TAE 缓冲液)分离后, 用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences 公司, 美国)纯化目的条带, 纯化产物连接于 pGEM-T 载体(Promega 公司, 美国), 操作按该公司说明书进行。连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞 Top10 [天根生化科技(上海)有限公司], 阳性菌落经菌液 PCR 验证后, 委托上海英骏生物技术有限公司对载体插入片段进行测序。

表 1 实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	碱基数 Base number	序列 Sequence (5'→3')
VV-MAPKKK-F1	20	GARGTNCAYMGNGAYAARGT
VV-MAPKKK-R1	18	CCAYTCRTRTCNARRTT
VV-MAPKKK-F2	20	GTNCAYMGNGAYATHAARCC
VV-MAPKKK-R2	18	CATRACATNGNGNTCC
VV-MAPKKK-F	23	GAAC*AGAACAA*CGTC*CGCCT*TAA
VV-MAPKKK-R	23	GG*T*ACAGG*CGGTGATTGGGCAT*T

注: *: 酶切位点。

Note: *: Restriction enzyme cutting site.

1.5 序列与系统进化分析

获得的 DNA 序列使用 NCBI 网站中的 BLASTx 程序搜索找出其编码的同源氨基酸序列。多序列的比对由 Clustal W 程序完成, 输出格式选用 PHY 格式, 然后依次应用 PHYLIP 软件中的 SEQBOOT、DNADIST、NEIGHBOR 和 CONSENSE 程序构建进化树, 进化树可以用 Treeview 软件打开并导出。

2 结果

2.1 草菇 *VV-MAPKKK* 基因的克隆与序列分析

利用巢氏简并 PCR 从草菇基因组 DNA 中扩增

出一条 268 bp 的片段(图 1), 序列分析表明该片段编码的产物与白色念珠菌(*Candida albicans*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)的 MAPKKK 同源蛋白的相似性分别为 63%、57%和 55%, 推测该序列为草菇 *VV-MAPKKK* 基因中的保守部分。把该序列和获得的草菇基因组信息进行比对获得了 *VV-MAPKKK* 基因全长序列, 特异引物扩增结果见图 2, 并运用生物信息学的方法对该序列进行了同源性分析。依据 BLAST 搜索结果中显示相似性和相同性序列, 以及根据内含子两端剪接点的序列(GT-AG 规则), 推定草菇 *VV-MAPKKK* 基因的全长为 4434 bp, 含有 4 个内含子, 长度分别为 52、58、53 和 53 bp, 为编码 1405 个氨基酸残基的多肽(GenBank accession number: HM366445)。

2.2 *VVMAPKK* 编码氨基酸的特征分析

利用 NCBI 网站的 BLAST 软件分析表明, *VV-MAPKKK* 推定的氨基酸序列与新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、巴西芽生菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)和异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)的 MAPKKK 同源蛋白相似性分别为 58%、57%和 56%, 相同性分别为 38%、38%和 37%, *E* 值(*E* values)均为 0。对 *VV-MAPKKK* 的系统发生学分析的结果表明 *VV-MAPKKK* 与 Hog1-MAPKKK 同源蛋白聚在同一进化支上(图 3)。这些数据都支持 *VV-MAPKKK* 为 Hog1-MAPKKK 同源蛋白的推定。

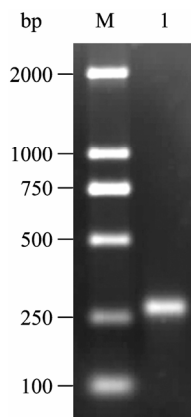


图 1 简并 PCR 扩增草菇 *MAPKKK* 基因保守片段
Fig. 1 Conserved fragment of *Volvariella volvacea* *MAPKKK* gene amplified by PCR using degenerate primers
Note: M: Marker; 1: Conserved fragment of *Volvariella volvacea* *MAPKKK* gene.

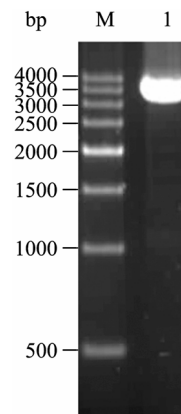


图 2 特异引物扩增草菇 *MAPKKK* 基因
Fig. 2 *Volvariella volvacea* *MAPKKK* gene amplified by PCR using specific primers
Note: M: Marker; 1: *Volvariella volvacea* *MAPKKK* gene.

3 讨论

在缺乏基因组信息的情况下, 根据其他物种已知的同源蛋白的保守序列设计简并引物, 通过巢式简并 PCR 方法获得未知基因的保守序列, 并以此为模板设计引物, 进行上下游基因组步行获得基因全长, 这是利用基因的保守性实现从不同物种中克隆同源基因的常用且有效的方法。但由于有些基因序列特殊性以及单引物扩增等方面的问题, 有时很难通过此方法获得基因全长, 基因组信息的获得使同源基因序列的获得变得简单快捷。

丝裂原活化蛋白质激酶信号传导途径在从酵母直到人类之间的生物物种中都存在着很大的保守性, 其功能也不仅仅限于高渗环境中信号转导。Lawrence 等人发现在柠檬酸胁迫条件下, 酵母 Hog1 途径也会被激活, 以适应不良环境^[4]。Panadero 等人发现, 酵母细胞在受到冷胁迫刺激时, Hog1 途径被激活, 进而影响特定胁迫应答基因的转录水平, 并通过增加甘油的浓度而增强细胞对冷胁迫的抵抗能力^[5]。张永军等人研究表明, 球孢白僵菌 Hog1 同源基因可能与其在高渗、亚高温和营养胁迫条件下适应性调节密切相关^[6]。

草菇是高温型食用菌, 在低温下会软化、液化以致腐烂, 影响了其生产和保鲜工作的开展。研究发现草菇在低温处理过程中会有相关基因表达, 蛋白质组成也会发生变化, 最后表现为自溶^[7-8], 但具体机理尚不清楚。本文从草菇中克隆了 *VV-MAPKKK* 基因, 其推测的氨基酸序列和酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Hog1 途径 MAPKKK 蛋白相似性达到

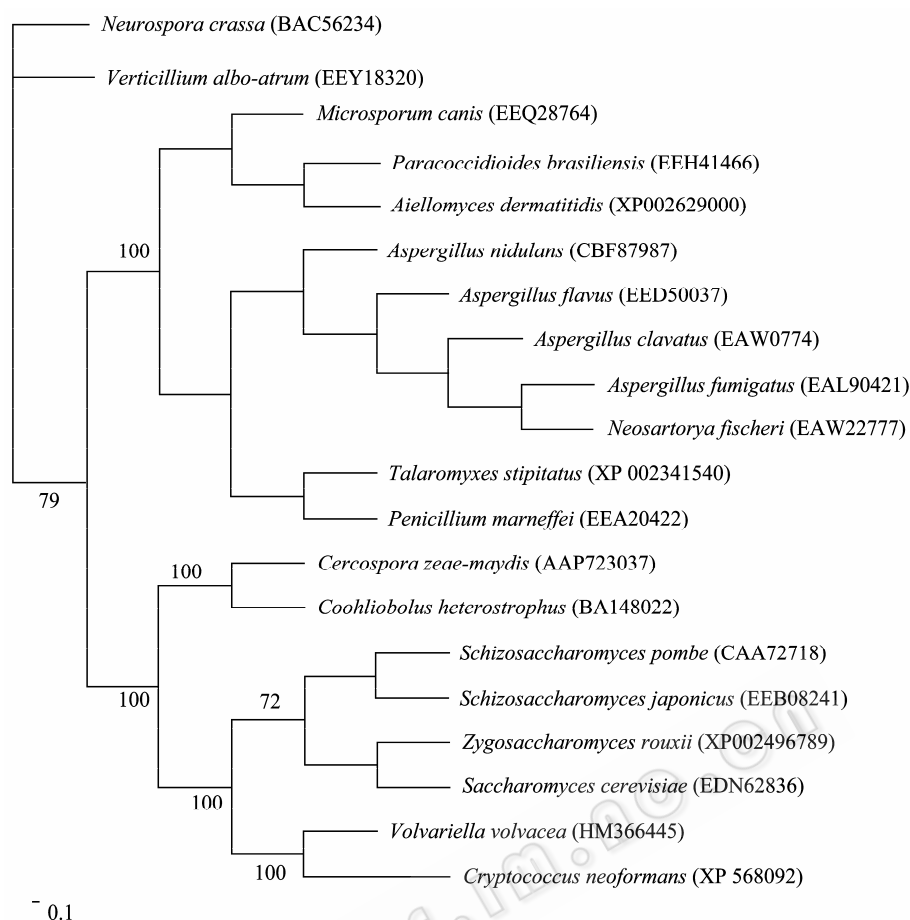


图 3 草菇 *MAPKKK* 基因推定蛋白与几种典型真菌 *MAPKKK* 同源蛋白构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *Volvariella volvacea* *MAPKKK* protein and other fungal *MAPKKK* homologs

Note: Data in parentheses are the GenBank accession numbers. The numbers at the branches indicate the bootstrap values based on Neighbor-joining analysis of 100 resampled datasets.

59%，这从生物信息学的角度证明 VV-MAPKKK 可能具有与 Hog1-MAPKKK 同源蛋白相同或者相似的功能。本人已通过基因组步行的方法从草菇中获得 Hog1 途径另外 2 个关键组分(未发表)，说明草菇中具有 Hog1 信号途径，但该途径是否参与草菇低温条件下的信号转导以及该途径的具体功能还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Gustin MC, Jacobus A, Alexander M, *et al.* MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, **62**(4): 1264-1300.
- [2] 汪虹, 陈明杰. 草菇冷诱导 Cor3 基因实时荧光定量 PCR 标准品质粒和标准曲线的构建. *食用菌学报*, 2007, **14**(3): 16-23.
- [3] 张红, 秦莲花, 谭琦, 等. 用改进的 CTAB 法提取香菇基因组 DNA. *上海大学学报: 自然科学版*, 2006, **12**(5): 547-550.
- [4] Lawrence CL, Botting CH, Antrobus R, *et al.* Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(8): 3307-3323.
- [5] Joaquin Panadero, Claudia Pallotti, Sonia Rodriguez-Vargas, *et al.* A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 2006, **281**(8): 4638-4645.
- [6] 张永军, 赵建华, 蒋小东, 等. 球孢白僵菌 *Hog1* MAPK 同源基因 *BbHog1* 的克隆及特征分析. *菌物学报*, 2007, **26**(1): 76-83.
- [7] 陈明杰, 谭琦, 曹晖, 等. mRNA 差别显示技术分离草菇低温诱导基因. *菌物学报*, 2001, **20**(3): 342-346.
- [8] 张蒙, 贾新成, 陈明杰. 草菇低温诱导蛋白研究初探. *菌物学报*, 2000, **19**(4): 580-582.