

药用真菌猪苓细胞凋亡抑制因子基因 BI-1 的克隆和表达分析

刘蒙蒙, 宋超, 邢咏梅, 郭顺星

中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要:目的 克隆药用真菌猪苓 *Polyporus umbellatus* 凋亡抑制因子基因 BI-1 并进行生物信息学和表达模式分析。方法 利用 5'-RACE PCR 方法获取基因 cDNA 全长; 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域和跨膜结构等分子特性; 采用 Bioeditor 以及 MEGA 6.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 实时荧光定量 PCR 分析基因表达模式。结果 猪苓细胞凋亡抑制因子 BI-1 (Genebank 登录号 JQ693683) 的 cDNA 全长为 1 091 bp, 其中编码区占 1 005 bp, 编码 334 个氨基酸, 推测相对分子质量为 36 170, 理论等电点为 10.51, 定名为 PuBI-1。整个多肽链具 5 个疏水区, 表现为疏水性, 是疏水性蛋白。系统进化树结果显示 PuBI-1 所在分支隶属于担子菌群, 与裂褶菌形成一单系。PuBI-1 基因转录本在初始期和生长期表达量在菌核组织中显著高于未形成菌核的菌丝组织, 分别为原基期菌核 (SI) 为 3.8 倍、发育期菌核 (SD) 为 7.497 倍, 成熟期菌核和菌丝中的 PuBI-1 基因的表达量几乎无差异。结论 猪苓凋亡抑制因子基因 BI-1 的分子特征及表达模式为进一步研究其在猪苓菌丝形成菌核过程中的作用奠定理论基础。

关键词: 猪苓; 药用真菌; 细胞凋亡抑制因子; 基因克隆; 表达分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)22-3396-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.019

Cloning and expression analysis of Bax inhibitor-1 gene from medicinal fungus *Polyporus umbellatus*

LIU Meng-meng, SONG Chao, XING Yong-mei, GUO Shun-xing

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To clone the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene from *Polyporus umbellatus* and perform the bioinformatics and expression mode analysis. **Methods** To clone the full-length cDNA of BI-1 using RACE technology. The characteristics of physiochemical properties, conserved domains, and transmembrane domain of the predicted BI-1 protein were determined using bioinformatic tools. **Results** The full-length cDNA of BI-1 gene was 1 091 bp in length and encoded a 334-aa protein with a molecular weight of 36 170 and an isoelectric point (pI) of 10.51. The polypeptide chain was a hydrophobin with five hydrophobic regions. The PuBI-1 belonged to basidiomycete group according to the phylogenetic analysis. Real time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis revealed that the transcription level of PuBI-1 gene was significantly higher in the beginning and developing stages of sclerotial formation with 3.8 and 7.497 fold over those in the mycelium, but the transcripts decreased sharply with the sclerotial development. **Conclusion** Molecular characterization and expression patten of PuBI-1 gene will be useful for the further functional determination of the gene during the development of *P. umbellatus* sclerotium.

Key words: *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries; medicinal fungus; Bax inhibitor-1 gene; gene cloning; expression analysis; quantitative real-time PCR

当细胞受到氧化压力胁迫时, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 会诱导内质网膜脂质过氧化反应, 破坏膜结构, 使内质网中的钙离子大量游离到细胞质中, 导致细胞中钙离子浓度失衡而诱导细胞凋亡^[1]。细胞凋亡抑制因子 (Bax inhibitor-1, BI-1) 是

低 ROS 对细胞膜结构的损害, 同时降低 ROS 的合成^[2]。

菌核是菌丝遭遇环境胁迫, 纠结而成的休眠结构, 研究发现菌核分化与氧化应激相关连, 氧化应激启动了 *Sclerotinia rolfii* 的菌丝进行分化产生菌核^[3], 但是菌核形成过程中 BI-1 对菌核细胞的保护作用鲜有研究。

收稿日期: 2015-05-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201666); 设施食用菌高效碳循环研究与示范 (FT2014-03)

作者简介: 刘蒙蒙, 男, 在读博士, 主要从事药用真菌分子生物学研究。E-mail: liuermengmeng@hotmail.com

猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 菌核是我国重要的中药资源,随着现代医学的发展,已经证实其具有抗癌、抗菌、抗炎等活性^[4]。随着猪苓菌核药用范围不断的扩大以及缺乏有效的保护措施,野生资源已濒临灭绝。然而,长期以来,人工培养猪苓菌丝形成菌核并未取得重大突破,这阻碍了猪苓的大规模生产。本研究利用 RACE 技术从猪苓菌体中克隆得到一个 BI-1 的 cDNA 全长基因,命名为 PuBI-1。并进行生物信息学、系统进化及猪苓菌丝形成菌核过程中表达模式分析,为进一步揭示其在猪苓菌核生长发育过程中的生物学功能提供理论依据,以期用分子育种手段突破人工培养猪苓菌丝形成菌核的瓶颈。

1 材料

猪苓菌丝纯培养物由中国医学科学院药用植物研究所真菌室提供。经笔者鉴定为猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 菌丝。

2 方法

2.1 猪苓菌丝培养及总 RNA 提取

根据实验室前期的研究方法对猪苓菌丝进行培养^[5]。分别取接菌后原基期(20~30 d)、生长期(30~40 d)、成熟期(50~60 d)生长的菌核和在同一培养皿中的菌丝组织为样品,液氮速冻后置-80℃保存备用。利用 CTAB 法进行 RNA 提取,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

2.2 5' RACE PCR 和 RT-PCR 验证

根据原始的 EST 序列(Genebank 登录号 JK752367)设计 1 条 5' RACE 引物:BI-1-R 5'-TGCCCAAGGGAAGTGCCATAGGTGC-3'。按照 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本)操作手册进行 5' RACE 实验。PCR 反应体系为 25 μL,包括 10×Advantage[®] 2 PCR 缓冲液 2.5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, BI-1-R (10 μmol/L) 0.5 μL, 10×UPM 2.5 μL, 5' RACE ready cDNA 1.0 μL, 50×Advantage[®] 2 Polymerase Mix (5 U/L) 0.5 μL, ddH₂O 17.5 μL。PCR 反应程序为:94℃、30 s, 72℃、3 min, 5 个循环;94℃、30 s, 70℃、30 s, 72℃、3 min, 5 个循环;94℃、30 s, 68℃、30 s, 72℃、3 min, 35 个循环。PCR 产物经 1.8%琼脂糖凝胶电泳分离后得到目的条带,利用 Biotech 胶回收试剂盒(Biotech, 中国)回收目的基因片段,连接到 pMD18-T 载体上(TaKaRa, 中国),转化至大肠杆菌感受态细胞 *Escherichia coli*

JM109 (TaKaRa, 中国),阳性克隆由金唯智公司进行测序。所获 cDNA 序列与原 EST 拼接,以开放阅读框(open reading frame, ORF)设计引物 BI-F: 5'-ATGCTCGGTAACATGTTGCG-3', BI-R: 5'-TTA-CTTCCTGTTTGACTGGCG-3', 进行全长基因 RT-PCR 验证。

2.3 序列分析

使用以下网络在线生物信息学分析工具对 BI-1 基因核酸及编码蛋白进行生物信息学分析。利用 NCBI 的 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>); InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan/>)和 PROSITE SCAN (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html)分析蛋白质的结构域和基元;分析 cDNA 序列;采用 ProtScale 预测氨基酸序列的疏水性;采用 Bioeditor 7.5 进行氨基酸序列比对分析;利用 MEGA 6.0 构建系统进化树。

2.4 RT-PCR 分析

分别取原基期菌核(SI)、原基期菌丝(HI)、生长期菌核(SD)、生长期菌丝(HD)、成熟期菌核(SM)及成熟期菌丝(HM)总 RNA 各 2 μg,使用 MMLV Reverse Transcriptase (Promega, 美国)试剂盒对样本进行反转录。采用 RT-PCR 方法检测不同样本中猪苓 BI-1 基因的表达量变化,以猪苓 18 S rRNA 基因作为内参基因。根据已知序列设计猪苓 BI-1 实时荧光定量 PCR 引物:BI-1-F: 5'-TTGCACGAGGCATTCCAGT-3' 和 BI-1-R: 5'-TCCCGATAGAGCCAACCAGA-3'。反应体系 25 μL 包括 2×SYBR[®] Premix Ex TaqTM Master Mix (TaKaRa, 中国)12.5 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)0.5 μL, ROX 0.5 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 9 μL。每个反应重复 3 次,PCR 程序为预变性 95℃、30 s; 95℃、5 s, 60℃、34 s, 共 40 个循环,同时绘制熔解曲线。ABI PRISM 7500 软件生成 C_t (cycle threshold) 值,用 2^{-ΔΔC_t} 法计算相对表达量^[6]。

3 结果与分析

3.1 猪苓 BI-1 基因的克隆和全长验证

经过 5' RACE 反应,扩增产生长度约为 550 bp 的目标条带,克隆、测序获得 509 bp 的序列,拼接分析获得了一条 1 091 bp 的 cDNA。BLASTx 分析表明其与灰盖鬼伞 C 端氨基酸残基同源性为 78%,因此定名为 PuBI-1, GenBank 中已注册为

JQ693683。根据 PuBI-1 全长 cDNA 推定其氨基酸序列,猪苓 BI-1 基因的 ORF 区共 1 005 bp,编码 334 个氨基酸,推测相对分子质量为 36 170,理论等电点为 10.51。使用 BI-1-F/R 引物,RT-PCR 扩增产生单一条带(图 1),克隆、测序获 1 005 bp 的完整 ORF 序列,与拼接序列中的 ORF 区一致,进而验证已成功获得 PuBI-1 基因全长。

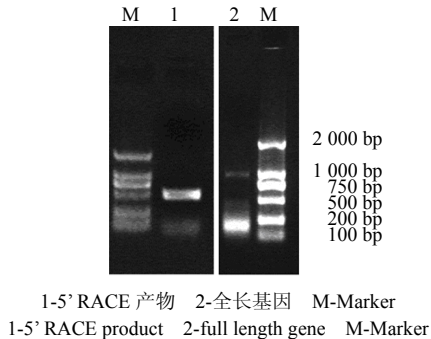


图 1 猪苓 PuBI-1 基因全长 cDNA 克隆

Fig. 1 Clone of full length cDNA of PuBI-1 gene in *P. umbellatus*

3.2 BI-1 基因编码蛋白的多序列比对分析

BI-1 在生物体内高度保守。BI-1 定位在内质网膜上,具有 6 个跨膜结构域。InterproScan 分析 PuBI-1 的全长 cDNA 推导的氨基酸序列。如图 2 所示,猪苓蛋白 PuBI-1 的结构具有 BI-1 的保守结构域,而且具有跨膜结构。

跨膜结构域是膜中蛋白与膜脂相结合的主要部位,一般由 20 个左右的疏水氨基酸残基组成,它固着于细胞膜上,起锚定作用。SOSUI 分析序列的跨膜结构,如图 3 所示,PuBI-1 具有 6 个跨膜结构域(81~103、150~172、178~200、203~224、235~257、266~288),N 端和 C 端均在内质网内侧。采用 ProtScale 预测 PuBI-1 氨基酸序列的疏水性,结果表明,PuBI-1 多肽链第 242、243 位的 Ala 和 Val 疏水性最强(2.8),第 300 位的 Thr 亲水性最强(-2.256),疏水性氨基酸分布于整个蛋白质中,且多于亲水性氨基酸。因此整个多肽链表现为疏水性,有 5 个疏水区,认为猪苓 PuBI-1 是疏水性蛋白。

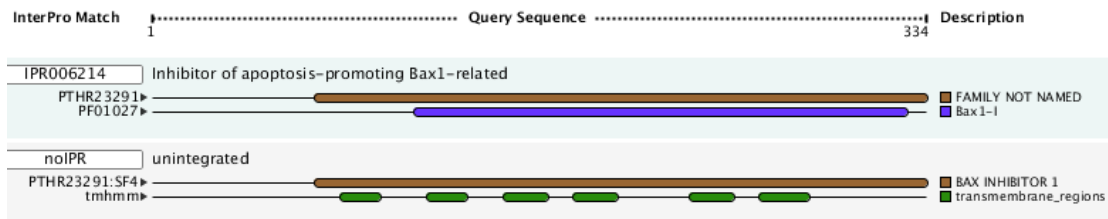


图 2 InterproScan 分析猪苓 PuBI-1 序列的结构域

Fig. 2 Analyses of conserved domains of PuBI-1 by InterproScan software

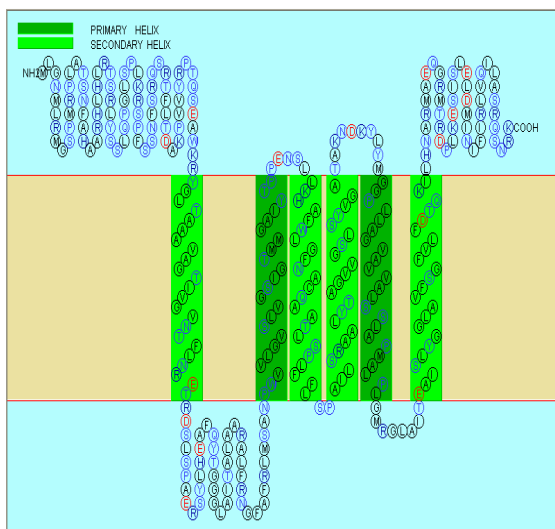


图 3 SOSUI 分析猪苓 PuBI-1 蛋白序列的跨膜结构

Fig. 3 Analyses on transmembrane domain of PuBI-1 protein sequence in *P. umbellatus* by SOSUI

3.3 PuBI-1 的聚类比对分析

运用 Bioeditor 程序对猪苓 PuBI-1 进行多序列比对,结果表明猪苓 PuBI-1 与其他 BI-1 具有一定同源性。猪苓 PuBI-1 与灰盖鬼伞同源性最高为 82%,与裂褶菌同源性为 67%,与 *Puccinia graminis* Pers.同源性为 55%,与 *Aspergillus kawachii* 同源性为 57%,与 *Glomerella graminicola* 同源性为 52%。拟南芥和人的 BI-1 同源性为 42%,二者与猪苓 PuBI-1 的同源性均为 19%。猪苓 PuBI-1 与酵母 BI-1 同源性仅为 9%,酵母 BI-1 与拟南芥的同源性为 23%。

3.4 PuBI-1 基因编码蛋白的系统进化树分析

为分析 PuBI-1 基因编码蛋白的进化关系,从 GenBank 数据库中选取来自真菌、植物、动物和细菌中具有代表性的 25 条 BI-1 的蛋白序列,利用 MEGA 6.0 构建 PuBI-1 蛋白的系统进化树。图 4 结

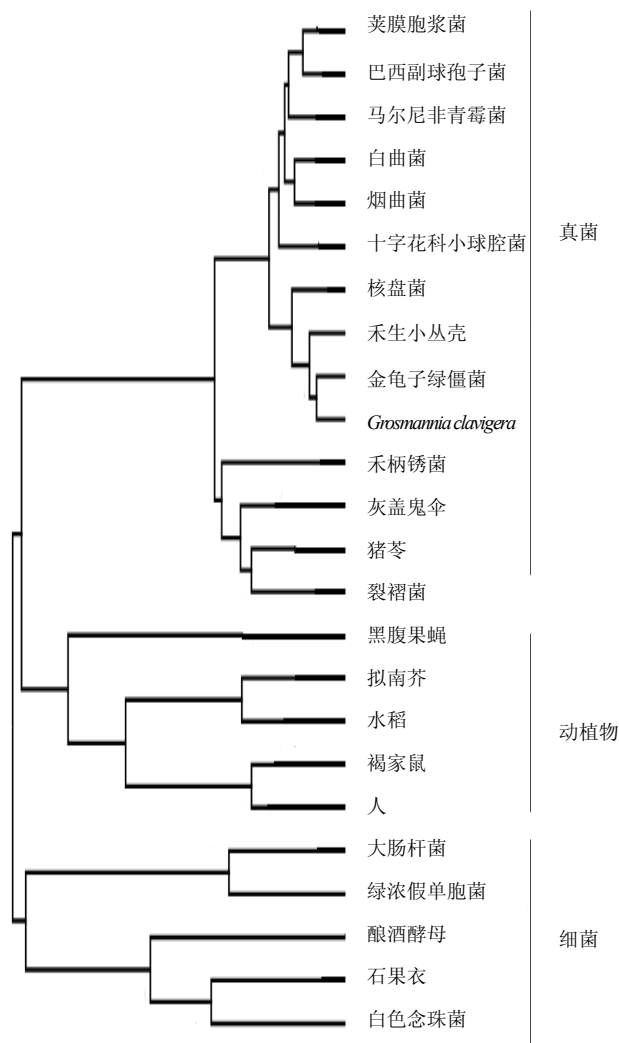


图 4 BI-1 的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of BI-1

果表明, 进化树分为 4 大群系: 真菌、动物、植物群系和细菌群系。真菌、动物、植物构成一单系群, 该单系群包括真菌、动物和植物 2 个姊妹群系。酵母 BI-1 在细菌群系, 而非真菌群系。PuBI-1 所在分支隶属于担子菌群, 与裂褶菌形成一单系。

3.5 菌核形成过程中 BI-1 的差异表达分析

为验证 PuBI-1 基因在菌核生长过程的表达模式, 分别取 SI、SD 和 SM 时期的菌核和菌丝体, 利用荧光定量 PCR 方法测定 mRNA 的表达量。分别以不同培养时间的菌丝体样本 HI、HD、HM 为对照组, 检测了 PuBI-1 基因在相同培养条件和时间下菌核和菌丝体中的差异表达, 结果表明在初始期和生长期 PuBI-1 基因的表达量在菌核组织中显著高于未形成菌核的菌丝组织, 分别为 SI 为 3.8 倍、SD 为 7.497 倍 (图 5-A、B); 成熟期菌核和菌丝中的 PuBI-1 的表达量几乎无差异, 为 1.143 倍 (图 5-C)。

4 讨论

细胞凋亡 (apoptosis) 是指为维持内环境稳定, 由多种基因控制的、细胞自主的、有序的死亡过程, 所以也常被称为细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)。细胞凋亡是细胞对环境条件的变化或缓和性损伤而产生的应答有序变化的死亡过程。目前, 对细胞凋亡遗传控制的研究主要集中在特定蛋白质上。p53 蛋白促进细胞程序性死亡, Bcl-2 蛋白、DAD1 蛋白等抑制细胞程序性死亡。BI-1 基因是一个对细胞凋亡有广泛抑制作用的因子, 可以抑制由 Bax 介导或非 Bax 介导的细胞凋亡过程^[7]。本

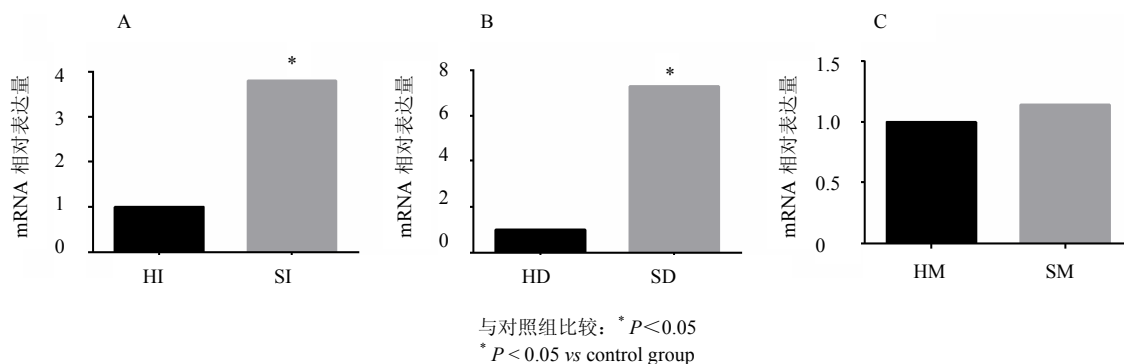


图 5 PuBI-1 在菌核生长过程 SI (A)、SD (B) 和 SM (C) 的表达分析

Fig. 5 Differential expression analysis of PuBI-1 gene during sclerotial growth SI(A), SD(B), and SM(C)

实验利用 5' RACE PCR 方法首次从猪苓中克隆得到 BI-1 全长 cDNA, InterProScan 分析其氨基酸序列具有 BI-1 结构域和功能位点, 分析其具有 6 个跨膜区域, 系统发育树结果显示 PuBI-1 属于担子菌类

群。这些结果均表明克隆得到的全长 cDNA 是新的 BI-1 全长基因。定量检测 PuBI-1 在菌核形成过程的转录水平, PuBI-1 在菌核中的表达量显著高于菌丝, 在初期和生长期分别为菌丝的 3.8 倍和 7.479

倍,之后随菌核的成熟其表达量下降。之前研究已经表明在猪苓菌核形成初期和生长期伴随着氧化压力的升高^[8],而这种氧化压力诱发猪苓菌核内细胞发生细胞凋亡,为了维持细胞的生长细胞凋亡抑制因子表达量升高。BI-1 保护细胞的机制之一就是降低细胞内 ROS 的生成^[9-10],所以高表达的猪苓 BI-1 能降低细胞内的氧化压力。同时,猪苓细胞自身具有多种抗氧化机制,参与这些机制的基因已被证明会在菌核中高表达^[11]。所以在猪苓菌核形成的中后期,菌核细胞内的氧化压力降低,而此时 PuBI-1 的表达量也下降。本研究后续将利用 RNAi 或过量表达技术研究 PuBI-1 基因在猪苓菌丝形成菌核过程中的生物学功能,为揭示其生长发育过程的分子机制奠定理论基础。

参考文献

- [1] Madeo F, Fr Hlich E, Ligr M, *et al.* Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast [J]. *J Cell Biol*, 1999, 145(4): 757-767.
- [2] Sharon A, Finkelstein A, Shlezinger N, *et al.* Fungal apoptosis: function, genes and gene function [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 33(5): 833-854.
- [3] Kim H J, Chen C, Kabbage M, *et al.* Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(21): 7721-7729.
- [4] Zhao Y Y, Xie R M, Chao X, *et al.* Bioactivity-directed isolation, identification of diuretic compounds from *Polyporus umbellatus* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 126(1): 184-187.
- [5] Liu Y Y, Guo S X. Nutritional factors determining sclerotial formation of *Polyporus umbellatus* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009, 49(2): 283-288.
- [6] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucl Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [7] Watanabe N, Lam E. Bax inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants [J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(7): 3149-3167.
- [8] Georgiou C D, Patsoukis N, Papapostolou I, *et al.* Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress [J]. *Integr Compare Biol*, 2006, 46(6): 691-712.
- [9] Lee G H, Kim H K, Chae S W, *et al.* Bax inhibitor-1 regulates endoplasmic reticulum stress-associated reactive oxygen species and heme oxygenase-1 expression [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(30): 21618-21628.
- [10] Kim H R, Lee G H, Cho E Y, *et al.* Bax inhibitor 1 regulates ER-stress-induced ROS accumulation through the regulation of cytochrome P450 2E1 [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(8): 1126-1133.
- [11] Xing Y M, Chen J, Song C, *et al.* Nox gene expression and cytochemical localization of hydrogen peroxide in *Polyporus umbellatus* sclerotial formation [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(11): 22967-22981.