·信息研究·

申克孢子丝菌 SPDS 基因的生物信息学分析及分子克隆

袁立燕[1]，黄怀球[1*]，张 静[2]，冯佩英[1]，高文超[3]，李玉哲[1]，张晓辉[4]，黄丽林[1]
（1. 中山大学附属第三医院 皮肤性病科，广东 广州 510630；2. 中山大学孙逸仙纪念医院 皮肤性病科，广东 广州 510120；
3. 中山大学中山医学院，广东 广州 510089；4.广东省皮肤病医院，广东 广州 510000）

摘 要：【目的】分析预测申克孢子丝菌 cDNA 中编号为 Locus_168_Contig_1 序列编码的基因及蛋白质结构、功能特征，并进行分子克隆。【方法】利用 NCBI 及 Expasy 网站提供的 BLASTx、SignalIP、InterPro Scan 等生物信息学软件分析其序列，判断其是否为全长编码序列、同源序列名称，并分析其结构、定位及功能等；将其中的全长编码区利用 PCR 方法进行扩增后克隆到 pET-30a(+)载体，测序验证。【结果】该序列是亚精胺合成酶(SPDS)的同源基因，全长序列为 1062 bp，包含完整的编码区 190 ~ 1 062 bp，编码 291 个氨基酸，在 GenBank 中，其与粗糙脉孢菌的 SPDS 基因同源性最高，达 88%。理化性质预测其编码蛋白疏水性高；无质体、线粒体等定位序列，不存在跨膜螺旋结构，为非分泌型蛋白。进化树分析结果显示与粗糙脉孢菌同源性最高；PCR 扩增及测序结果证实目的基因成功克隆进入 pET-30a(+)质粒。【结论】获得申克孢子丝菌 SPDS 的基因及蛋白结构、功能特点，构建了其重组表达质粒，将为进一步明确其在孢子丝菌病中的致病作用奠定理论基础。

关键词：申克孢子丝菌；亚精胺合成酶；生物信息学；分子克隆
中图分类号：R75 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2013)06-0948-06

Bioinformatics Analysis and Molecular Cloning of Spermidine Synthase Gene from *Sporothrix schenckii*

YUAN Li-yan[1], HUANG Huai-qiu[1*], ZHANG Jing[2], FENG Pei-ying[1], GAO Wen-chao[3], LI Yu-zhe[1], ZHANG Xiao-hui[4], HUANG Li-lin[1]
(1. Department of Dermatology and STD, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;
2. Department of Dermatology and STD, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;
3. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China;
4.Guangdong Provincial Dermatology Hospital, Guangzhou 510000, China)

Abstract: 【Objective】 To identify the characteristics of the sequence Locus_168_Contig_1 from full cDNA sequence of *Sporothrix schenckii* by bioinformatics analysis and obtain its recombinant plasmid.【Methods】The characterizations of gene structure and its deduced amino acid sequence encoding by the insert sequence of EST clone (Locus_168_Contig_1) from the *S.schenckii* full-length cDNA sequence was analyzed by using bioinformatics software packages such as BLASTx, SignalIP, InterProScan provided by websites of NCBI or Expasy. 【Results】 A complete open reading frame of 873bp was included in the full cDNA sequence encoding SPDS. The sequence had high homology with the amino acids sequence from other species in GenBank. It has an 88% homology with SPDS from Neurospora crassa. The SPDS homolog from *Sporothrix schenckii* was predicted to be an aliphatic, highly hydrophobic protein without plastid or mitochondrial localization sequence. It was predicted as a non-secreted protein. Phylogenetic tree showed that it has the highest homology with *Neurospora crassa*. The recombinant plasmid pET-30a(+)-SPDS was confirmed by PCR amplification and sequencing. 【Conclusion】 The characterizations of structure and function of SPDS from *S. schenckii* were obtained and the recombinant plasmid pET-30a (+)-SPDS was constructed successfully. Our study established a cornerstone for the research on the role of SPDS in the pathogenicity of *S. schenckii*.

Key words: *Sporothrix schenckii*; spermidine synthase; bioinformatics analysis; molecular cloning
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(6):948-953]

收稿日期：2013-06-20
基金项目：广东省自然科学基金(S2012020011056,8151008901000187)；广东省科技计划项目(2011B031800277)
作者简介：袁立燕，硕士生，研究方向为真菌性皮肤病；*通信作者：黄怀球，副主任医师，E-mail：hhuaiqiu@medmail.com.cn

孢子丝菌病(Sporotrichosis)是由申克孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*, *S. schenckii*)引起的皮肤、皮下组织及周围淋巴系统的亚急性、慢性感染,偶尔播散全身,引起系统损害。孢子丝菌分布很广,地理上以温热带地区多见,定植于植物、土壤中[1],当机体免疫屏障受损时, 易通过破损的皮肤黏膜入侵引起感染。孢子丝菌病临床可分为皮肤固定型、皮肤淋巴管型、皮肤播散型和系统性孢子丝菌病 4 种类型[2]。研究表明,在高渗胁迫条件下真菌细胞生长受到抑制,细胞周期停滞,造成生长缺陷从而造成细胞死亡; 而同时由于代谢停滞,药物外排泵运输时间延长,细胞内药物代谢明显减慢,胞内药物浓度上升,明显延长药物作用时间,可能成为对抗真菌耐药的重要作用靶点[3]。亚精胺(spermidine, SPD)作为多胺中的主要一员,可有效提高抗逆性和抗渗透胁迫[4],亚精胺合成酶(spermidine synthase, SPDS) 作为催化腐胺合成 SPD 的关键酶, 在抗渗透胁迫中可能具有重要意义。申克孢子丝菌的 SPDS 的研究目前国内外未见报道,本课题组通过 de novo 测序获得申克孢子丝菌的 cDNA 全长序列,通过生物信息学分析,从中筛选出申克孢子丝菌的 SPDS 基因(SsSPDS),对其编码基因和蛋白的结构和功能进行分析, 了解其与其他物种 SPDS 基因的同源性, 并进行分子克隆, 为深入研究其生物学特征和致病性提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材　料

申克孢子丝菌全长 cDNA 序列由广州爱健生物公司测序所得。pET-30a(+)质粒、质粒扩增菌株 DH 5α 均由实验室常规保存,酵母提取物、胰蛋白胨是英国 OXOID 公司产品; 琼脂糖、Ex Taq 酶、DNA marker DL 2000 及 DL15000、Tris 等均为 TaKaRa公司产品;RNA 提取试剂盒及 cDNA 逆转录试剂盒等均为 OMEGA 公司产品;*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ DNA 快速内切酶、T4 DNA Ligase 为 Fermantas 公司产品;质粒提取、回收试剂盒购自广州东盛生物技术有限公司; 卡那霉素购自晶美生物工程有限公司;引物合成,测序由上海英骏生物技术有限公司完成; 用于生物信息学分析软件为美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库及其他数据资源。

1.2　SsSPDS 基因的生物信息学分析

通过 NCBI 的 BLASTx 程序,将目的基因序列与 GenBank 中的所有序列进行比对, 判断该基因是否为全长基因, 确定其完整开放编码框氨基酸序列; 通过蛋白分析专家系统 Expasy (http://ca.expasy.org/) 提供的序列分析和蛋白组学工具作如下分析:①蛋白质的理化性质,包括分子质量、等电点、摩尔消光系数、氨基酸组成、半衰期、溶液中稳定性等;②一级结构中模序和修饰位点,包括糖基化、硫酸化、磷酸化、脂酰化、GPI 锚着位点等;③亚细胞定位信息, 包括分泌信号肽(SignalP)、线粒体(MITOPROT)、过氧化物酶体(PTS1)、质体(ChloroP)定位序列分析等;④序列跨膜区和拓扑结构以及分子的亲水性、溶液中的分子形态等;利用 SWISS-MODEL 比对和折叠二级结构, 模拟并建立蛋白质的空间构象; 利用 DNAStar 中抗原决定簇分析方法分析蛋白质一级结构, 绘制氨基酸亲水性分布图,确定强亲水性的线性表位;⑤利用 Vector NTI 软件包对 SsSPDS 与其他物种的同源蛋白序列比对分析,构建分子进化树。

1.3　SsSPDS 基因的分子克隆

使用试剂盒提取 *S.schenckii* 的总 RNA 并使用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA,以逆转录产物为模板进行 PCR,反应体系 20 μL,SsSPDS 基因上游引物序列:5'- CCGGAATTCATGTCCGACATTGTCCACGAGAC-3', 下游引物序列:5'-ATTCTCGAGGTGCAGAGCCTTGGCGGCAAAG-3',PCR 反应条件为:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,72 ℃终末延伸 10 min。1%浓度琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物后, 使用 PCR 产物回收试剂盒回收, 提取 pET-30a (+)质粒, 两者同时使用 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ DNA 快速内切酶进行双酶切,后按比例 1:4 混合进行连接,转化至感受态细菌 DH-5α,扩增后接种至含卡那霉素的 LB 固体琼脂平板中进行重组筛选,扩增后使用质粒提取试剂盒提取质粒, 对其进行 PCR、*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ DNA 快速内切酶双酶切鉴定,进一步由生物公司进行测序确认。

2　结　果

2.1　Locus_168_Contig_1 序列的 BLASTx 分析

BLASTx 的分析结果显示, Locus_168_Contig_1

表 1 编号为 Locus_168_Contig_1 序列在 GenBank 中的同源基因搜索

Table 1 Blastx of sequence labeled as Locus_168_Contig_1 in Genbank

Genbank Access No.	Source of Species	Identity (%)	Positivity (%)	Name of homologuous gene/protein
XP_960907.1	*Neurospora crassa*	88	95	Spermidine Synthase
EFX01250.1	*Grosmannia clavigera*	87	96	Spermidine Synthase
EJT77548.1	*Gaeumannomyces graminis var. tritici*	88	93	Spermidine Synthase
EFQ29044.1	*Glomerella graminicola*	87	93	Spermidine Synthase
XP_003712083.1	*Magnaporthe oryzae*	87	94	Spermidine Synthase
EFY98465.1	*Metarhizium anisopliae*	86	92	Spermidine Synthase

序列在 GenBank 中与多个物种的亚精胺合成酶基因同源,其中与粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)亚精胺合成酶基因(XP_960907.1)同源性最高,一致性达 88%,相似性达 95%(表 1)。

该基因全长 1062 bp,编码区为 190~1062 bp,在 5' 端有非翻译区,该基因是 SsSPDS 的全长编码序列(图 1)。

```
      M  S  D  I  V  H  E  T  I  K  D  G  W  F  R  E  I  S  D  M  W  P  G  Q
1     ATGTCCGAC ATTGTCCAC GAGACCATT AAGGATGGC TGGTTCCGC GAGATCTCC GATATGTGG CCCGGCCAG
      A  M  T  L  R  V  K  K  V  L  H  H  E  K  S  K  Y  Q  D  V  L  I  F  E
73    GCCATGACG CTCCGCGTC AAGAAGGTC CTCCACCAC GAGAAGAGC AAGTACCAA GATGTGCTG ATCTTCGAG
      S  T  D  Y  G  T  V  L  V  L  D  N  V  I  Q  C  T  E  R  D  E  F  S  Y
145   TCCACCGAC TACGGCACC GTCCTGGTC CTCGACAAT GTCATCCAG TGCACGGAG CGCGACGAG TTTTCGTAC
      Q  E  M  I  T  H  L  A  L  N  S  H  P  N  P  K  K  V  L  V  I  G  G
217   CAGGAAATG ATCACCCAC CTGGCCTTG AACTCGCAC CCCAACCCC AAGAAGGTC CTCGTCATC GGCGGCGGC
      D  G  G  V  L  R  E  V  V  K  H  D  C  V  E  E  A  I  L  C
289   GACGGCGGT GTTCTGCGC GAGGTCGTC AAGCACGAC TGCGTCGAG GAGGCCATT CTCTGCGA
```

图 1 SsSPDS 基因全长 cDNA 序列及其 ORF 编码的氨基酸序列

Fig.1 Full length cDNA sequence and its ORF coding sequence of amino acids Translated from the 190th base

2.2 SsSPDS 蛋白质的理化性质

SsSPDS 蛋白理论分子质量与等电点分别为 32 910.6 u、5.57,存在人体 20 个必需氨基酸,含有 42 个负电荷氨基酸残基及 32 个正电荷氨基酸残基。在 280 nm 处的摩尔消光系数为 38765 $mol^{-1}\cdot cm^{-1}$,0.1%浓度(1 g/L)的 Abs 为 1.178。成熟肽 N 端的氨基酸为甲硫氨酸时,哺乳动物网状红细胞体外表达的半衰期为 30 h,酵母和大肠埃希菌体内表达的半衰期分别大于 20 h 和 10 h。在溶液中的不稳定指数为 32.88,低于阈值 40,提示其在溶液中性质较稳定。脂肪族指数为 87.73,总亲水性-0.271,蛋白质总体疏水性较高。

模序(Motif)分析结果显示,SsSPDS 含有 4 个可能的 SPDS 位点 (aa90~103,aa10~291,aa12~291,aa12~254),1 个可能的 S-腺苷甲硫氨酸位点(aa83~201),其中 aa90~103 处氨基酸残基为 VLVIGGGDGGVLRE,此为 SPDS 标志性序列。

TMHMM 结果显示该蛋白不含跨膜螺旋区域,SingalP 结果显示 N 端没有非信号肽,推测该蛋白为一种非分泌型蛋白,此蛋白位于胞外(图 2)。未发现线粒体、细胞核、过氧化酶体等亚细胞定位序列。

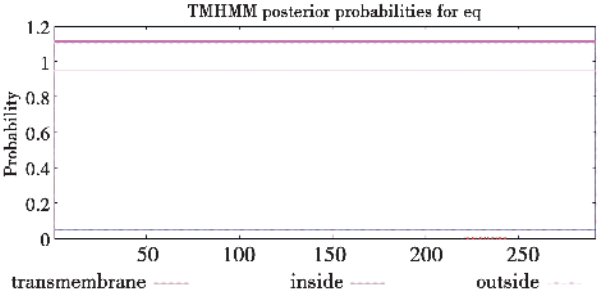


图 2 SsSPDS 蛋白 TMHMM 结果分析

Fig.2 TMHMM analysis of SsSPDS

Inter Pro Scan 结果表明该蛋白一级结构中含亚精胺合成酶家族同类物功能域特征序列,在 HAMAP,PANTHER,PFAM 等中都有相似的结构域(图 3)。

DNA Star 分析申克孢子丝菌 SPDS 基因的亲水性如图 3 所示,由图中我们可以看出,亲水性正值的绝对值较亲水性负值的绝对值大,因而提示该蛋白为疏水性蛋白。

2.3 SsSPDS 蛋白的三维结构分析

SWISS-MODEL 构建 SsSPDS 蛋白的三维结构图,在 vector NTI suite 软件包 3D molecule viewer 显示蛋白质(图 5),显示该蛋白空间结构较紧密,图中标黄部分为 SPDS 特征序列(VLVIGGGDGGVLRE)。

2.4 SsSPDS 蛋白的进化树分析

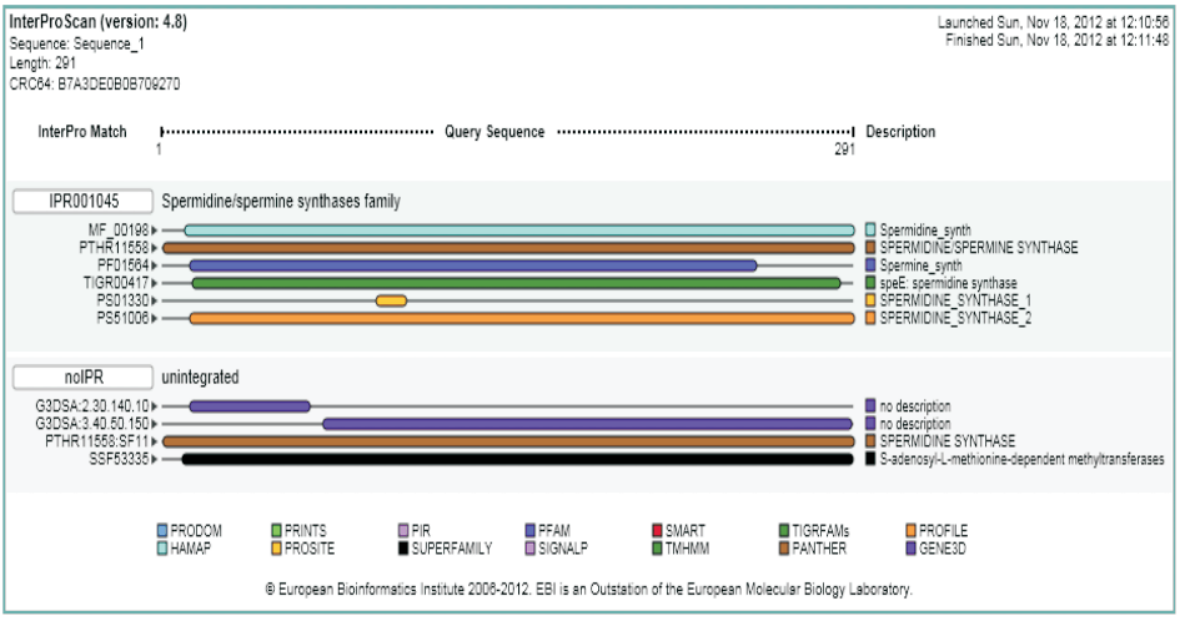


图 3　SsSPDS 蛋白 Inter Pro Scan 扫描结果

Fig.3　Inter Pro Scan of SsSPDS

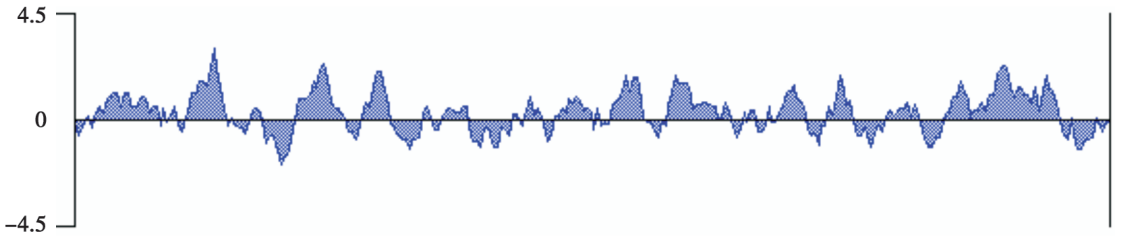


图 4　SsSPDS 蛋白亲水性分析

Fig.4　Hydrophilicity profile of SsSPDS

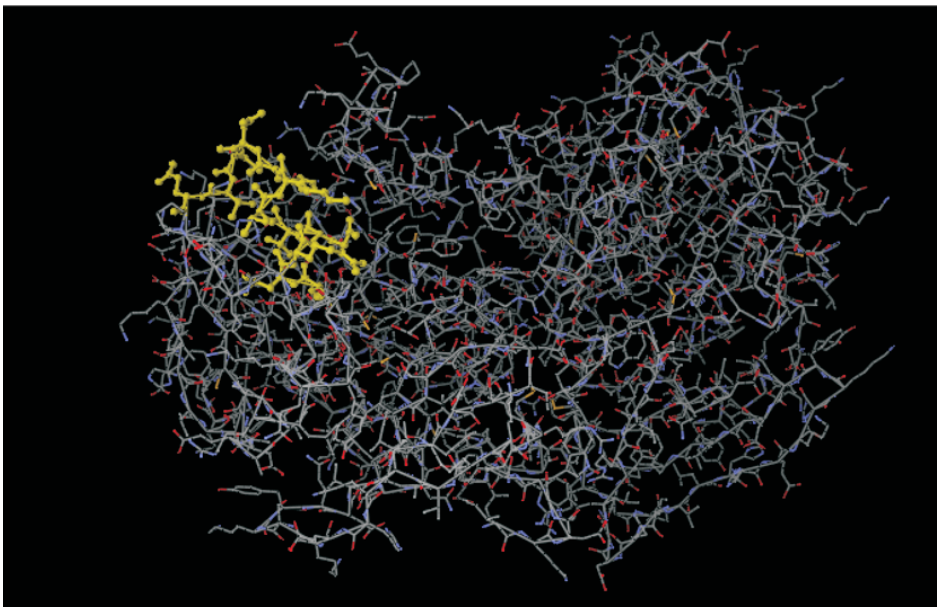


图 5　SsSPDS 蛋白的三维结构图及其特征序列

Fig.5　3Dstructureand of SsSPDS and its signature sequence

菌和粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的 SPDS 遗传距离最近,这与 BLASTx 的结果较为一致(图 6)。

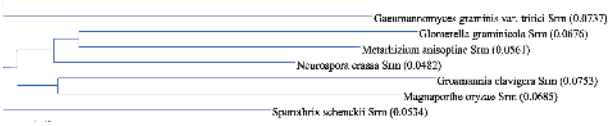


图 6 多物种 SPDS 同源基因的进化树

Fig.6 Phylogenetic analysis of SsSPDS from other species

2.5 SsSPDS 蛋白的分子克隆

利用上述引物对 SsSPDS cDNA 进行扩增,琼脂糖凝胶电泳结果显示在约 1 000 bp 处有单一条带(图 7)。将其克隆到 pET-30 a(+)载体,扩增后 PCR 筛选阳性克隆获得重组质粒,命名为 pET-30-SPDS,EcoR I、Xho I DNA 快速内切酶进行双酶切鉴定,并以重组质粒为模板用上述引物进行相同反应条件 PCR,获得基因片段大小在 750~1 000 bp (图 8),重组质粒测序结果表明插入序列与 SsSPDS 基因序列的 ORF 完全一致。

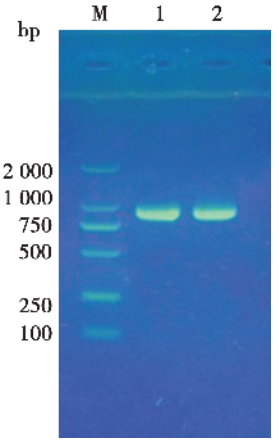


图 7 SsSPDS PCR 结果提示在 750 ~ 1 000 bp 处扩增出目的基因

Fig.7 PCR of SsSPDS, target gene could be amplified between 750 and 1 000 bp

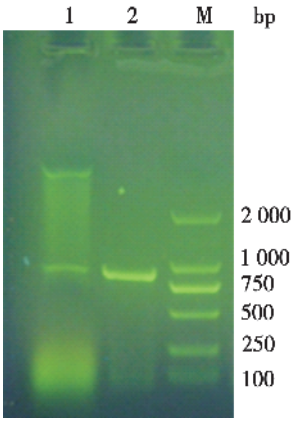


图 8 重组质粒 pET-30-SPDS 的 PCR 及酶切鉴定图

Fig.8 The recombinant plasmid pET-30a(+)-SPDS was confirmed by PCR amplification and double digestion

3 讨 论

SPDS 属于腐胺氨丙基转移酶(putrescine minopropyl transferase,PAPT)家族,是包括腐胺、亚精胺和精胺在内的多胺家族合成过程中的重要调节酶,主要催化腐胺合成亚精胺,而作为多胺家族重要成员的亚精胺是合成精胺的前体[5]。既往研究表明,多胺广泛存在机体组织中,在逆境胁迫下发挥着重要的作用,包括稳定生物膜、清除自由基、参与细胞信号转导及影响跨膜化学梯度等。多胺生成不会抑制细胞生长,而增加多胺的表达则与肿瘤发生及进展相关[6]。在高盐、高渗或高金属等逆境胁迫条件下,植物体内多胺合成酶活性迅速发生改变,多胺浓度迅速发生变化,从而适应逆境胁迫过程[7-8]。在杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)的研究中发现,SPDS 是其原虫在体内存活必不可少的蛋白酶之一,与该原虫的毒力密切相关[9]。在恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的研究中发现,使用 SPDS 抑制剂环己胺处理恶性疟原虫后,该原虫可完全被抑制在滋养体阶段[10]。

目前国内外对真菌 SPDS 的研究较少。本课题组首先获取了 *S.schenckii* 的 cDNA 全长序列,并从中筛选出 SPDS 编码基因序列,发现该基因在 GenBank 中具有大量同源序列,且该基因与粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的 SPDS 基因同源性最高,具有 SPDS 的特征性氨基酸序列及保守功能域,为 SsSPDS 的全长编码基因。通过分析,我们发现 SsSPDS 为疏水性蛋白,无跨膜区域,且没有质体、线粒体、溶酶体等定位序列,其位于细胞外,为非分泌性蛋白。对其编码的蛋白质的理化性质预测有助于制定基因的克隆表达策略,提高表达的效果并获得有活性的重组蛋白[11]。通过与其他物种比对及构建进化树,可了解进化过程中选择表达的情况,通过选取与人类 SPDS 基因的差异片段进行研究,有助于发现新的药物作用靶点(本文中

并未对其与人类的 SPDS 基因进行比较)。在上述分析的基础上，获得其重组质粒有利于进一步深入研究其功能。

课题组既往研究表明，温度和培养基在 *S. schenckii* 酵母相转化中起着重要作用[12],鉴于在高温、高渗、高盐等逆境胁迫条件下,SPDS 对多胺浓度变化产生影响从而在生物体适应逆境胁迫过程中发挥了一定作用,了解 SsSPDS 的基本结构及功能、获得其重组表达质粒,将可有效指导研究 *S. schenckii* 在不同时相中 SPDS 的表达差异,从而验证其是否参与 *S. schenckii* 的双相转化过程,为进一步研究 SsSPDS 在孢子丝菌病发病中的作用提供理论基础。

致谢：感谢荷兰真菌多样性研究中心（CBS-KNAW,Fungal Biodiversity Centre)Sybren de Hoog 教授馈赠申克孢子丝菌株(CBS359.36),感谢广州爱健生物技术有限公司刘海量老师的指导，感谢广东省公共卫生研究院孙九峰副研究员的支持。

参考文献：

[1] Barros MB, de Almeida PR, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis [J]. Clin Microbiol Rev, 2011, 24(4): 633-654.

[2] Romeo O, Scordino F, Criseo G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of Sporothrix schenckii species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates [J]. Mycopathologia, 2011, 172(3): 179-186.

[3] Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, et al. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene [J]. EMBO J, 1994, 13(18): 4382-4389.

[4] Legocka J, Kluk A. Effect of salt and osmotic stress on changes in polyamine content and arginine decarboxylase activity in *Lupinus luteus* seedlings[J]. J Plant Physiol, 2005, 162(6): 662-668.

[5] Seckute J, Mccloskey D E, Thomas H J, et al. Binding and inhibition of human spermidine synthase by decarboxylated S-adenosylhomocysteine [J]. Protein Sci, 2011, 20(11): 1836-1844.

[6] Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications[J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(2): 244-258.

[7] Wen XP, Pang XM, Matsuda N, et al. Over-expression of the apple spermidine synthase gene in pear confers multiple abiotic stress tolerance by altering polyamine titers[J]. Transgenic Res, 2008, 17(2): 251-263.

[8] Lee MJ, Yang YT, Lin V, et al. Site-directed mutations of the gatekeeping loop region affect the activity of *Escherichia coli* spermidine synthase [J]. Mol Biotechnol, 2013, 54(2): 572-580.

[9] Grover A, Katiyar SP, Singh SK, et al. A leishmaniasis study: structure-based screening and molecular dynamics mechanistic analysis for discovering potent inhibitors of spermidine synthase [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1824(12): 1476-1483.

[10] Becker JV, Mtwisha L, Crampton BG, et al. Plasmodium falciparum spermidine synthase inhibition results in unique perturbation-specific effects observed on transcript, protein and metabolite levels [J]. BMC Genomics,2010,11:235.

[11] 黄艳,黄江,胡旭初,等. 亚洲带绦虫烯醇酶基因及其蛋白质的结构与功能[J]. 中山大学学报:医学科学版,2008,29(05):575-580.
Huang Y, Huang J, Hu X C, et al. Structure and characteristics of gene and protein of enolase from taenia asiatica[J]. J Sun Yat-sen Univ: Med Sci, 2008, 29(05): 575-580.

[12] 张静,黄怀球,薛汝增,等. 温度和培养基在申克孢子丝菌酵母相转化中的作用研究[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2010, 31(04): 491-495.
Zhang J, Huang HQ, Xue RZ, et al. Effect of temperature and media on mycelium-to-yeast transformation of *Sporothrix schenckii*[J]. J Sun Yat-sen Univ: Med Sci, 2010, 31(04): 491-495.

（编辑　刘清海）