

球孢白僵菌DNA甲基转移酶基因*Dim-2*的克隆及其表达分析

汪超¹, 谢翎², 黄勃^{1*}

(1. 安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 合肥 230036; 2. 安庆师范学院生命科学系, 安庆 246011)

摘要: 本研究运用 RACE 技术, 从球孢白僵菌中克隆出完整的 DNA 甲基转移酶基因 *Dim-2* 的编码区序列。该基因 cDNA 全长 4021 bp, 5'端非翻译区 283 bp, 3'端非翻译区 303 bp, 开放阅读框 (ORF) 3429 bp, 编码 1142 个氨基酸。蛋白理论分子量为 128 kD, 理论等电点为 6.13。结构域分析显示, 该基因编码蛋白含有 1 个 BAH 结构域和合成 5-甲基胞嘧啶的活性区域。Real-time PCR 与 HPLC 检测表明, 球孢白僵菌 DNA 甲基化程度会随着其生长发育的变化而不断改变。结果显示, 球孢白僵菌 *Dim-2* 基因的转录表达量与基因组 DNA 的 5-甲基胞嘧啶百分含量在菌体培养初始产孢阶段 (即培养第 7 d), 均出现了 1 个低谷。这可能意味着球孢白僵菌 *Dim-2* 基因所引起的 DNA 甲基化与其生长发育之间具有内在的联系。本研究将为进一步探索 DNA 甲基化在虫生真菌生长发育中具体功能机制奠定基础。

关键词: 球孢白僵菌; DNA 甲基转移酶; *Dim-2* 基因; DNA 甲基化; 表观遗传学

中图分类号: S476.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261(2014)06-0736-07

Cloning and Expression Analysis of DNA Methyltransferases Encoding Gene *Dim-2* from *Beauveria bassiana*

WANG Chao¹, XIE Ling², HUANG Bo^{1*}

(1. Anhui Provincial Key Laboratory for Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Department of Life Sciences, Anqing Teachers College, Anqing 246011, China)

Abstract: The full-length cDNA of *Dim-2* gene was cloned from *Beauveria bassiana* using a RACE technique. The cDNA of *Dim-2* had a length of 4021 bp, including an open reading frame (ORF) with 3429 bp encoding 1142 amino acids. The protein had a molecular mass of 128 kD with a calculated pI of 6.13. The Realtime-PCR and HPLC analysis indicated that the degree of DNA methylation varied along with fungal growth development. The results showed that both the expression level of *Dim-2* gene and the degree of DNA methylation reached the minimum levels at initial stage of sporulation (the 7th day). It was inferred that there was an internal relationship between DNA methylation caused by *Dim-2* gene and growth development in *B. bassiana*. The study will benefit future functional studies of DNA methylation in developmental control of entomopathogenic fungi.

Key words: *Beauveria bassiana*; DNA methyltransferases; *Dim-2* gene; DNA methylation; epigenetics

表观遗传学 (epigenetics) 主要研究生物体在不发生核苷酸序列变化的情况下, 如何通过 DNA 甲基化 (DNA methylation)、染色质重塑、基因沉默等方式调控基因表达, 从而影响物种的生物学性状^[1]。目前, DNA 甲基化是研究最为透彻的表观遗传机制^[2], 由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase) 催化, S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 的甲基被转移到 DNA 的胞嘧啶残基上, 进而形成 5-甲基胞嘧啶 (5-mC) 及微量 7-甲基鸟嘌呤 (7-mG)^[3]。

DNA 甲基化广泛存在于动物、植物以及微生物中^[4-6]。在哺乳动物中, DNA 甲基化参与了基因的时空

收稿日期: 2014-02-10

基金项目: 公益性行业 (林业) 科研专项 (201204506); 国家自然科学基金 (31272096)

作者简介: 汪超, 硕士研究生, E-mail: chaoren_w@qq.com; *通信作者, 教授, E-mail: bhuang@ahau.edu.cn。

特异性表达、衰老及癌症的发生等多个过程^[7,8]。植物中, DNA 甲基化则在调控基因表达和控制生长发育过程中起着重要作用^[9]。而在微生物, 特别是真菌中, DNA 甲基化主要发生在转座子和其他重复序列^[10]。

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 作为应用最广、研究最多和最具有开发潜力的一类生防真菌^[11], 其有关 DNA 甲基化的研究目前尚无报道。基于球孢白僵菌已经完成的基因组测序数据^[12], 本研究通过 RACE 技术克隆获得了球孢白僵菌 DNA 甲基转移酶编码基因 *Dim-2* 的全长 cDNA 序列, 并对其进行了生物信息学分析。同时, 本研究还通过 Real-time PCR 技术和 HPLC 技术对球孢白僵菌生长发育过程中 *Dim-2* 基因的转录表达, 以及基因组 DNA 中 5-甲基胞嘧啶的含量进行了检测, 分析了球孢白僵菌生长发育过程中 DNA 甲基化变化情况。以期为今后进一步研究球孢白僵菌表观遗传学, 以及 DNA 甲基化在菌体生长发育机制中的具体功能提供基础材料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及主要试剂

供试的球孢白僵菌 Bb2005 由本实验室保存, 寄主为鳞翅目蛹, 采自安徽宣城。大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 由本实验室保存。

TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司。反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶、PMD18-T 载体、及 DNA 胶回收试剂盒均购自大连宝生物公司。3'/5'-RACE 试剂盒为 CLONTECH 公司生产的 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit。1-己烷磺酸钠、5-甲基胞嘧啶、胞嘧啶、三乙醇胺及甲醇等试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。Real-time PCR 反应八连管及管盖均购自 Axygen 公司。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 球孢白僵菌 Bb2005 单孢株的获得与培养

按徐金柱等^[13]的方法分离得到球孢白僵菌 Bb2005 单孢株并保存。将球孢白僵菌 Bb2005 单孢株点接于 SDAY 培养基(4%葡萄糖、1%蛋白胨、1%酵母粉及 2%琼脂)中, 25 °C 下进行连续培养。

1.3 球孢白僵菌 *Dim-2* 基因的克隆

参照谢翎等^[14]的方法提取总 RNA, 并检测纯度与完整性。根据 GenBank 中预测的球孢白僵菌 DNA 甲基转移酶编码基因 *Dim-2* 的已知序列(GenBank 登录号为 EJP66406), 分别设计 2 条 5'端下游嵌套引物(GSP1、NGSP1)和 2 条 3'端上游嵌套引物(GSP2、NGSP2)(表 1)。按 RACE 试剂盒说明书进行白僵菌 *Dim-2* 基因的 3'/5'RACE 扩增并回收测序。

表 1 试验引物列表

Table 1 Primers for experiment

引物名称 Primer name	引物描述 Description of primer	引物类型 Primer type	引物序列 Primer sequence 5'-3'	扩增子长度 Amplification length (bp)
GSP1	5'-RACE, outer	Reverse primer	TTCCTCGGGTCTGAACCTGGTATCGC	-
NGSP1	5'-RACE, inner	Reverse primer	AATGGCGTATAGCAGGATCGTGGGC	-
GSP2	3'-RACE, outer	Forward primer	AGACAGCCGCCAAACCAGCCAATG	-
NGSP2	3'-RACE, inner	Forward primer	GCCGTAGACAGCGAGGACGAGGTGA	-
RTDIM01	<i>Dim-2</i> , Real-time PCR	Forward primer	GAAGAAGTGGACAGGCAATG	132
RTDIM02		Reverse primer	CCTCCTCCGCAGAATAGA	
ACTIN01	<i>Actin</i> , Real-time PCR	Forward primer	TGGTGCGAAACTTCAGCGTCTAGTC	322
ACTIN02		Reverse primer	TCCAGCAAATGTGGATCTCCAAGCAG	

1.4 生物信息学分析

使用 NCBI 提供的蛋白保守区数据库(CDD)平台(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/docs/cdd_search.html)进行球孢白僵菌 *Dim-2* 基因编码蛋白的保守结构域预测; 编码蛋白理论分子量、等电点及三级结构预测由 ExPASy 工具完成; 利用 Clustal X 进行多序列比对, 并使用 Mega 4.0^[15]构建进化树。

1.5 球孢白僵菌 *Dim-2* 基因的转录表达分析

取 200 mL 球孢白僵菌 Bb2005 孢子悬浮液 (2×10^7 孢子/mL), 涂布于铺有玻璃纸的 SDAY 平板上, 分别培养至第 3、5、7、10 d 时, 挑取培养物分别提取总 RNA。反转录后, 进行 Real-time PCR 检测。根据本研究获得的球孢白僵菌 *Dim-2* 基因 cDNA 序列, 设计 Real-time PCR 靶基因引物 RTDIM01、RTDIM02。根据 Cho 等^[16]的报道选择内参基因 *Actin*, 合成内标引物 ACTIN01、ACTIN02。Real-time PCR 扩增选用美国 ABI 公司 7500 Real-time PCR System。

1.6 5-甲基胞嘧啶百分含量的测定

利用氯化苯法^[17]分别提取 SDAY 平板中培养了 3、5、7、10 d 的球孢白僵菌 Bb2005 的基因组 DNA。取已提取的 DNA 样品 20 μ L, 加入 0.2 mmol/L 的 HCl, 在 80 $^{\circ}$ C 水浴锅内水解 2 h, 再加入 10 μ L 的 0.4 mmol/L NaOH 中和水解液, 离心取上清液。采用葛才林等^[18]方法利用高效液相色谱法测定 5-甲基胞嘧啶百分含量, 色谱柱为 C₁₈ 键合柱 (250 mm \times 16 mm), 流动相由 5% 甲醇、4.75 mmol/L 己烷基磺酸钠及 0.2% 三乙醇胺组成, 并用磷酸将 pH 值调为 5.5。流速为 0.7 mL/min, 检测波长为 273 nm, 进样量为 20 μ L。采用外标准和内标准法确定胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶的峰位。采用外标准法通过比较样品和标样 (胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶购自上海生工生物工程股份有限公司) 的峰面积确定胞嘧啶和 5-甲基胞嘧啶的含量, 5-甲基胞嘧啶百分含量 (%) = 5-甲基胞嘧啶总量 / (5-甲基胞嘧啶总量 + 胞嘧啶总量) \times 100。

2 结果与分析

2.1 球孢白僵菌 *Dim-2* 基因全长 cDNA 克隆

将 RACE 克隆得到的球孢白僵菌 *Dim-2* 基因 3'端和 5'端序列, 与 GenBank 中已知的该基因部分序列进行拼接, 最终获得了全长 4021 bp 的 cDNA 序列。分析表明, 球孢白僵菌 *Dim-2* 基因开放阅读框由 3429 个核苷酸组成, 编码了 1142 个氨基酸。5'非翻译区 (5'-UTR) 与 3'非翻译区 (3'-UTR) 分别为 283 个核苷酸和 303 个核苷酸。白僵菌 *Dim-2* 编码蛋白的分子量 128 kD, 理论等电点 6.13。

2.2 *Dim-2* 基因及编码蛋白的生物信息学分析

DIM-2 蛋白的结构域分析显示 (图 1), 该蛋白含有 1 个 BAH 结构域和合成 5-甲基胞嘧啶的活性区域。BAH 结构域可能参与了 DNA 甲基化和组蛋白修饰识别等功能, 5-甲基胞嘧啶的活性区域则可能参与了将 DNA 的胞嘧啶合成 5-甲基胞嘧啶的过程^[12]。另外, 分析表明 DIM-2 蛋白还包含多个翻译后修饰位点, 包括 4 个潜在的 N 端糖基化位点, 10 个潜在的 N 端酰基化位点, 16 个潜在的 PKC 磷酸化位点, 22 个潜在的 CK II 磷酸化位点, 2 个潜在的酪氨酸硫酸盐化位点, 以及 1 个依赖 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点等基元。

采用 Neighbor-Joining 法完成球孢白僵菌 *Dim-2* 基因编码蛋白与 GenBank 中已登录注释的蛹虫草 *Cordyceps militaris*、轮枝菌 *Verticillium alboatrum*、粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa*、巴西芽生菌 *Paracoccidioides brasiliensis* 等 11 种真菌的同源蛋白进化关系分析。如图 2 所示, 包括白僵菌 *Dim-2* 编码蛋白在内的 12 种真菌 DNA 甲基转移酶蛋白氨基酸序列共聚成 2 个群。太田节皮菌 *Arthroderma otae*、皮炎组织胞浆菌 *Ajellomyces dermatitidis* 和巴西芽生菌的 DIM-2 蛋白形成 Group 2; 而其余 9 个真菌的 DIM-2 蛋白形成了 Group 1。值得注意的是, Group 2 的 3 种真菌均为哺乳动物病原真菌, 而 Group 1 成员则主要为植物或昆虫病原真菌。其中与球孢白僵菌 *Dim-2* 基因编码蛋白关系最近的蛹虫草 DIM-2 蛋白, 其来源恰好也为昆虫病原真菌, 二者一致性达到了 63%。

2.3 *Dim-2* 基因在球孢白僵菌不同生长阶段的转录表达分析

培养发现, 菌株 Bb2005 的菌丝大量生长主要发生在 3~5 d 时; 第 7 d 时菌株 Bb2005 开始产孢; 第 10 d 左右菌落主要以孢子为主。因此, 分别选择 3、5、7、10 d 的时间点测定 *Dim-2* 转录表达水平。试验得到的结果用 Duncan 法进行多重分析, $F=30.032 > F(0.01)$, 存在极显著差异。不同时期的转录表达差异如图 3 所示。对不同生长阶段球孢白僵菌 *Dim-2* 基因的 Real-time PCR 检测表明, 该基因的转录表达在白僵菌生长过程中会不断变化。如图 3 所示, *Dim-2* 基因在白僵菌菌丝生长期 (如第 3 d、第 5 d) 时表达量相对较高, 约为初始产孢期的 2 倍左右。白僵菌培养至第 7 d (即初始产孢期) 时, *Dim-2* 基因相对表达

```

1  acat ggg cac tca aca gaa gat ggt gaa ctg cat caa atc aat aca ccg ttc tta ttt tct aca agt tct tac tca ttt gag taa ggg gcc
92  ttt tat cta att cca tat gaa agc gcg tag gaa ggc cgg cag acg tgc aaa cgc gac ggc tgg ccc gcg ttt gac ctt gac ctt gcc aca
182  cac agg gct tct ctt cct aaa cac tgc gaa cta tgc tgc ttc cag gaa cac cga cat tat ctt ctg ctc gca ctg ctg att att tta ttg
272  ctt aat gag gcc atg aag ctc act gcg gat ctt gac ctg cat ctt gac ctg aat ctt gac ctg gat ctt gat ctt gat ctt gat att
    M K L T A D L D L D L N L D L D L D L D L A I
362  agc tcc gaa cac gat aca cga att ctc gcc acc aca tgt ctt cct gga gta ctt tct ggc atc gat tac gat gga tgg tat agc tct
27  S S E Q H D T R I L A T A C L P G V L S G I D Y D G S Y S S
452  cat ggg tgg aag gat gat gac ctc gaa gaa gac ggc cct aca ggt tca tat cca atc tgg gta cac atc cct gaa tgt atg ctc atc agc
57  H G S K D D D L E E D G C P T G S Y P I S V H I P E C M L I S
542  cca cga tcc tgc tat acg cca ttc gac ccg ccg tgt ccg gtc ccg tgg gag cgt gat gct tta aga att cta cta cca caa cga tac gcc
87  P R S C Y T P F D P P C P V A S E R D A L R I L L P Q R Y A
632  aag aat ggt ttt ctc gag ctg aag ctt gac gat ttt gcc gtc tac tgc gat acc aag ttc aga ccc gag aag atg cgc tca ctc agt cag
117  K N G F L E L K L D D F F A V Y C D T K F R P E E M R S L S Q
722  ctt ggc acc gag cct cac tcc aca ccc ttg ttc ttc gac ggg atg ctc gat gga acc cag agc ctc tac gtc cgt cga gtt cgt ata
147  L G T E P H S T A P L F F D G M L S H G T Q S L Y V R R V R I
812  cac gca cta cct att gga aac tat ggc caa gag tca cga cat cag acg aga gac aac ata tgg atc caa tcc gag gaa aat gcc acg agc
177  H A L P I G N Y G Q E S R H Q T R D N I W I Q S E E N A T S
902  gat gta ttt tat aag ttg gga tca cca gca cca gaa tac aag aga ttt ttt gag ctc ttt gtt ggg gtt gct gat cta ggc aag tat ttt
207  D V F Y K L L G S P A P E Y K R F F E L F V W V A D L A K Y F
992  gtc gac ttt ctg act gtc atg cgt gcc ata gag ccg ccc gtt aca att cat cac ttc cga cga gac ttt ggc gcc tgg ctt ctt gct ctt
237  V D F L T V M R A I E R P V T I H H F R R D F A A W L L A L
1082  tat gca aag tct gac aaa att gag ccg gtc aaa acc tgg atg tgt aaa cct cgt caa gac tat cga tcc ggc gtc aat gca aat gtt
267  Y A K S D K I E A V K T W M C K H P R Q D Y R S A V N A N V
1172  gat ttt ttg cac aag gaa tct gtt ggt gta cta ggc gag cga aga gcc tac ttt cac gat ttg tgg aac gag vtg ttt ttc ttt caa acg
297  D F T L H K E S V G V L G E R A A Y F H D L W N E G V F F Q T
1262  tac act ccc tac atc gca cat aac gaa gac aaa tgt acc att gtt acc aaa tac att tac gac tgc ttt cac cca tta cca ttt ggt aaa
327  Y T P Y I A H N E D K C T I V T K Y I Y D C F H C L P F G K
1352  aga ctc aag gtt gtt gat ctc agt gct cac aca aag cga ctc cga ttg gaa gta atc gcg caa cga ccg atg cta cct ata aat gcc act
357  R L K V V D L S A H T K R L R L E V I A Q R P M L P I N G T
1442  caa gtt acc ccg cgt ggc cac ggc aag atc ggc cct ggg gac acc ata tct acc gca cgc gac act gtc gat tct ggc act cag tgg gaa
387  Q V T P A G G H G K I G P G D T I S T A R D T V D S G T D W E
1532  aag gaa ggc acc aag ggc gat gag tac agc gat cta gtt ttt gcc ctt gtt caa agc gttg tcc gtt aac agc gat ggc gtt cga gta ttc
417  K E E A K G D E Y S D L W F A L V Q S V S V N S D G G V R V H
1622  gag gtc att tgg tac tat cga ccc gtc gat acc cta tgc ggc ctc atg cag tat cct tgg tct gat gag tta ttc ctg tcc gac cac tgt
447  E V I W Y R P V D T L C G L M Q Y P W S D E L F L S D H Q
1712  tgc tgt gag gaa ggc acc aag atc cga gaa gat gaa gtt cgc agc gtt cat gag gtc gac ttt ggc ggt acg cca gaa acc aca aaa gaa
477  S C E E G T K I R E D E V R S V H E V D F G G T K E
1802  ttc ttc tgc cga caa tgc tac tta tca gac gat aag atc tgg gtt acc cta acc caa tgc cat ttg acg tgt cgt cat aac aat gat gca
507  F F C R Q S Y L S D D K I W V T L T Q S H L T C R H N N D A
1892  cct ata cct gac agt gca gaa gaa tac tgt gga gac agc gtt gta aaa tgc aga aat tgc cat gtt tgc cat ccc tgc gag
537  P I P D S A E E Y C L G D T V L V K S G R N S N V C H P C E
1982  atc atc gag act aag cag gaa aat gga aga cta cgc ttc gtc ttt cgg aaa tta cct ata cgc cac gca gtt gat ttg acc gca aga aac
567  I I E T K Q E N G R L R F V F R K L P I R H A V D L T A R N
2072  gcg ccg ccg aat gag gtc gtt tac aca gac gaa att gtc aaa tct ggt cca tca agt atc gtt agc cga tgt cat gtt cgc ttt ccc
597  A P P N E V V Y T D E I V K S G P S S I V S R C H V F R W F P
2162  cag act agc cca gta ccg act cca tat gac cgt gac ggc ctg gga gca ttc ttc ttc ttg act cat cag aag aag tgg aca ggc aat ggc
627  Q T R P P V P T P Y D R D G V G A F F F L T H Q K K W T G N G
2252  tac atc aca tct cct ttg gaa gaa gcc ccg cca tcc tta aac cag ggc cac gat cca cag cag gac tgg aac cca aag ctt cgc ggt ctt
657  Y I T S P L E E A P P S L N Q G G H D P Q Q D S K P K L R G L
2342  gat cta ttc tgc gga gga gcc aac ttt ggt ccg gtc ctc gag gaa ggc atg aag tgg ggc agt aag tgg ggc aac gat gtc aac tgc aaa
687  D L F C G G G G N F G R G L E E G G S V T M K W A N D V N S K
2432  gcg tta cat aca tac atg gct aat aca gaa ccc ggg cag ata tat cca ttc cta ggt tct att gac gac ttc cag ccg ctt gca ttt caa
717  A L H T Y M A N T E P G Q I Y P F L G S I D D F Q R L G A F Q
2522  ggt aga ttt gca gac aac atc ccg caa gtt gga gag gtc gat ttc atc tca ggc ggc agc ccg tgc cct gga ttc tgc sag ttg acc aac
747  G R F N A D N I P Q V G E V D F I S G G S P C P G S Q T L N
2612  gac aag gag acg gac gca cag aga aag aat caa tct tta gta gca ccg ttt gca tcc tgt gtc gac ttg tac agg ccc aag tac ggg ata
777  D K E T D A Q R K N Q S L L V A A F A S C V D L Y R P K Y G I
2702  cta gag aat gtc gcc agc atc cag aag cac caa aat aga agc cat gat ttt acc cag ctc atg tgt gca ttt gta gtc atg ggt
807  L E N V A G I I Q K H Q N R G H D V F S Q L M C A L V G M G
2792  tat gac gct ccg ctt gtc ttg ttg gat gcc ctt tct tgc ggc tct gct cag gtc cgc tcc cgc gtc ttt atc atc ttt gcc ccg cct gga
837  Y Q A R L V L L D A L S C G S A Q V R S R V F I I F A A P G
2882  tgg act ctg ccc gag ccg ccc att cag acc cac tca hat cag ccc aat gtc aag aat ttt aag ctt ggc agg cta ccg acc ggt gag ccc
867  W T L P E A P I Q T H S H Q P N V K N F K L G R L P T G E P
2972  atg ccg aga aga gag gtc ggc agc tgt acc cca ttt tca tat aag agt ccg tca cag ccg gct gcc ggg ctg ccg agc tta tac gat gcc
897  M A R R E V A S C T P F A S Q A A A S Q A A A G L P S L Y D A
3062  act ccg gat atc tgc atc gca ttc ccg gat cac cga gtt gtt tgc cac aca aat aca aat acc atg aga aat aga att ccg ctg att ccg
927  T P D I C I A F P D H R V V V S H T N T N T M R N R I R L I P
3152  aag gct ccc tat ggt atg aat ttt tca caa gcc tgg tat vgg cgt tta ggc act aga ccc cgc gtc gct gga ccg ggc gtt ttg acc agg
957  K A P Y G M N F S Q A W Y G R L G T R P R V A G R G V L L T R
3242  tgg gag cgc aac atg ttt tca ctc cga ggt gag gca acc atg tgc acc tgc atc cag tcc agg gcc tac gga aga cag ccg cca aac cag
987  S E R N M F S L R G E A T M S T S I Q S R A Y G R Q P P N Q
3332  cca atg gcc acc att gtc aca aga gcc agt ccc agg gat gcc aag cag ggc ccg acc atc cac tgg agc gag cag ccg tgc ctg agc gtc
1017  P M A T I V T R A S P R D A K Q G R T I H W S E D R C L S V
3422  atg gaa ccg aag ccg ggg cag ggc ttc cta gac gag gag cta cta ttg ggg tcc gcc gac gtc cag tac agg atc atc gcc aac agc ggt
1047  M E A K R G Q G G F L D E L L L G S A D V Q Y R I I G A N S V
3512  gcg aga gaa gta tca ctg ccg ttg ggc gtt gtt ttc gca gaa ccg gtc atg ccg agc tac ggc cag ggt gtc gag ctc gcc gta gac
1077  A R E V S L A L G V V F A E A V M R S Y G Q G V E D L A V D
3602  agc gag gac gag gtc acg ata aag aca gag atg agc gtc ccg acc aca ccg gga ccg acc agg cag gaa aac aac gcc agg aat1
1107  S E D E V T I K T E M S V P T T P G A T R Q Q G E N N G R N
3692  aag cga cga ccg gtc gga taa gag agg aaa tgc agg ccg atg ctg ggc acc tgg gcc cgt agc gag gca agg cgt gga cag aaa tgg cga
1137  K R R R V G *
3782  acg ttc tgc cca cac tgc att gca gcc gaa aaa aga ctc tct ttt ata atg tcc agc gat ttg cta gat gtt caa ggt gaa gag ttg tga
3872  gta tgc gca cca cat ggg att ggt ggg ttt gtt ggt ttg ggt ggt ttt agg cag cga ccg ccg tgt gaa aaa acc ccg ggt gta tct
3962  gca aaa gtc tgt gtt att tta gcc att gca aag aaa aaa aaa aaa aaa aaa

```

注：左则数字为核酸和氨基酸位置；方框部分为 BAH 结构域；划线部分为甲基转移酶活性位点
 Note: Numbers on the left were the nucleotide and amino acid positions. The BAH domain was boxed. The active site of DNA methylation was underlined.

图 1 球孢白僵菌 *Dim-2* 基因的 cDNA 和推导氨基酸序列

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequence of gene *Dim-2* from *B. bassiana*

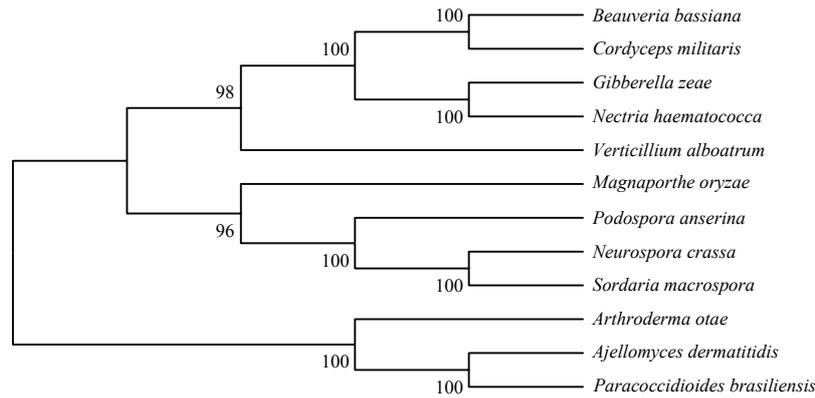


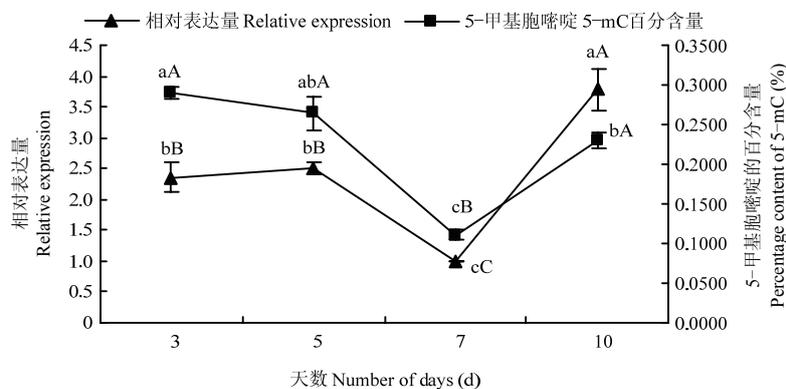
图2 不同来源真菌 DNA 甲基转移酶 DIM-2 蛋白序列进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of protein sequences of DIM-2 from different fungi

量明显降低。而白僵菌培养至第 10 d, 其分生孢子大量形成后, *Dim-2* 基因的表达量又显著升高, 接近初始产孢期的 4 倍。该检测显示球孢白僵菌中 *Dim-2* 基因的表达, 在其生长发育过程中呈两边高中间低的趋势。*Dim-2* 基因在白僵菌产孢后的表达量最高, 在菌丝生长期的表达量次之, 而在产孢初始期其表达量是最低的。说明球孢白僵菌在不同的生长发育时期具有不同的 *Dim-2* 基因的表达水平。

2.4 球孢白僵菌不同生长阶段 5-甲基胞嘧啶百分含量检测

试验得到的结果 Duncan 法进行多重分析, $F=30.807 > F(0.01)$, 存在极显著差异。对不同生长阶段球孢白僵菌基因组 DNA 的 HPLC 检测表明, 白僵菌在生长过程中其 5-甲基胞嘧啶含量 (即 DNA 甲基化程度) 也会不断变化。5-甲基胞嘧啶含量在白僵菌培养至第 3 d 与第 5 d 时表达量较高。第 7 d 时, 5-甲基胞嘧啶含量显著降低。而白僵菌培养至第 10 d, 5-甲基胞嘧啶含量又明显升高。该检测显示, 球孢白僵菌基因组 DNA 中 5-甲基胞嘧啶含量在其生长发育过程中同样呈两边高中间低的趋势。5-甲基胞嘧啶含量在白僵菌菌丝生长期最高, 在产孢后含量次之, 而产孢初始期, 白僵菌 5-甲基胞嘧啶含量最低, 球孢白僵菌 5-甲基胞嘧啶百分含量变化趋势与 *Dim-2* 基因的表达趋势基本一致 (图 3)。



注: 图中大小写字母分别表示在 1% 和 5% 水平上差异显著。

Note: Data followed by capital and lowercase letters indicated the significant difference at 0.01 and 0.05 levels.

图3 球孢白僵菌 *Dim-2* 基因在不同生长时期的转录表达和 5-甲基胞嘧啶百分含量

Fig. 3 Detection of *Dim-2* gene expression and the percentage content of 5-mC of *B. bassiana* in different growth stages

3 讨论

作为原核与真核生物体基因组中常见的表观遗传修饰, DNA 甲基化参与了生物体很多重要的生理生化过程^[9]。真核生物中, 特别是 CpG 二核苷酸中胞嘧啶的甲基化会影响很多基因的表达^[19]。尽管生物体的 DNA 甲基化能够进行遗传, 但并不代表 DNA 甲基化模式一成不变。例如环境条件的变化就可能会引起生

物细胞内 DNA 甲基化的模式发生变化, 进而对生物体的遗传性状、生产发育产生影响^[20,21]。DNA 甲基转移酶在这个过程中就扮演着非常重要的角色。

Kouzmanova 和 Selker^[22]对粗糙脉孢菌 *Dim-2* 基因编码的 DNA 甲基转移酶进行研究, 发现该酶对粗糙脉孢菌所有胞嘧啶甲基化都起到了维持作用。蛋白同源性比对表明本研究克隆的球孢白僵菌 *Dim-2* 基因编码蛋白与粗糙脉孢菌 *Dim-2* 基因编码蛋白同源性较高。蛋白结构域分析显示, 球孢白僵菌 *Dim-2* 基因编码蛋白含有一个可以催化生成 5-甲基胞嘧啶的活性位点和一个能参与 DNA 甲基化的 BAH 结构域。该编码蛋白结构域组成与粗糙脉孢菌 *Dim-2* 基因编码的 DNA 甲基转移酶也高度一致。这可能意味着 *Dim-2* 基因在白僵菌体内同样起着催化生成 5-甲基胞嘧啶, 并维持所有胞嘧啶甲基化的重要作用。

Real-time PCR 与 HPLC 检测显示, 球孢白僵菌在不同生长阶段, 其 *Dim-2* 的转录表达量以及基因组 DNA 中的 5-甲基胞嘧啶含量具有差异。数据表明球孢白僵菌 DNA 甲基化程度会随着其生长发育的变化而不断改变, 并且 DNA 甲基化与球孢白僵菌 *Dim-2* 的表达具有一定的相关性。

近年来, 对于粗糙脉孢菌的研究还发现, *Dim-2* 基因与异染色质区域的 DNA 甲基化也有关系^[23]。异染色质可以通过表观遗传的调控使染色体其他区域的基因的转录沉默, 从而使细胞表现出不同的生理和结构性状^[24]。我们在研究中发现, 球孢白僵菌 Bb2005 菌株在培养至第 7 d 时逐渐产孢, 该阶段 *Dim-2* 基因正处于低转录时期, 菌体 DNA 甲基化程度也处于低谷。这可能是由于球孢白僵菌在非产孢阶段, 其菌丝和孢子中异染色质高水平的 DNA 甲基化抑制了很多相关基因的表达。而进入产孢期, 白僵菌通过控制 *Dim-2* 基因的低水平转录, 来降低异染色质 DNA 甲基化的形成, 从而使大量基因表达并参与产孢过程。

目前, 人们对以球孢白僵菌为代表的昆虫病原真菌 DNA 甲基化调节的具体过程, 及其在生长发育与菌种退化过程中的详细作用机制还不十分清楚, 后续研究还需要进一步通过试验验证。

参 考 文 献

- [1] Wu C T, Morris J R. Genes, genetics, and epigenetics: A correspondence[J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1103-1105.
- [2] Chan S W L, Zilberman D, Xie Z X, *et al.* RNA silencing genes control de novo DNA methylation[J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1336-1336.
- [3] Cheng X D, Blumenthal R M. Mammalian DNA methyltransferases: A structural perspective[J]. *Structure*, 2008, 16(3): 341-350.
- [4] Moggs J, Teo S S, Mueller A, *et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation profiles in a preclinical animal model of non-genotoxic carcinogenesis[J]. *Toxicology Letters*, 2009, 189(S): 135.
- [5] Gehring M, Henikoff S. DNA methylation dynamics in plant genomes[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression*, 2007, 1769(5-6): 276-286.
- [6] Zhang G Q, Wang W Z, Deng A H, *et al.* A mimicking-of-DNA-methylation-patterns pipeline for overcoming the restriction barrier of bacteria[J]. *PloS Genetics*, 2012, 8(9): e1002987.
- [7] Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy[J]. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 21-32.
- [8] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes and Development*, 2002, 16(1): 6-21.
- [9] Chan S W L, Henderson I R, Jacobsen S E. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2005, 6(5): 351-360.
- [10] 邱立友, 余翠, 戚元成, 等. 真菌表观遗传学研究进展[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(2): 212-216.
- [11] 徐延平, 仇飞, 黄勃, 等. 一株小菜蛾高致病性球孢白僵菌菌株的筛选及其可湿性粉剂的田间药效试验[J]. *中国生物防治学报*, 2013, 29(3): 376-383.
- [12] Xiao G, Ying S H, Zheng P, *et al.* Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*[J]. *Scientific Reports*, 2012, 2: 483.
- [13] 徐金柱, 黄勃, 李增智. 球孢白僵菌单孢子分离株在继代培养过程中菌落局变的遗传分析[J]. *菌物学报*, 2010, 29(2): 279-284.
- [14] 谢翎, 陈红梅, 蒲顺昌, 等. 球孢白僵菌热休克蛋白基因 *hsp70* 的 cDNA 及上游序列克隆与分析[J]. *菌物学报*, 2009, 28(2): 283-288.
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*,

- 2007, 24(8): 1596-1599.
- [16] Cho E M, Kirkland B H, Holder D J, *et al.* Phage display cDNA cloning and expression analysis of hydrophobins from the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*[J]. *Microbiology-SGM*, 2007, 153: 3438-3447.
- [17] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苳提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. *真菌学报*, 1994, 13(1): 34-40.
- [18] 葛才林, 杨小勇, 刘向农, 等. 重金属对水稻和小麦 DNA 甲基化水平的影响[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 28(5): 363-368.
- [19] Martienssen R A, Colot V. DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi[J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1070-1074.
- [20] 王志刚, 吴建新. DNA 甲基转移酶分类、功能及其研究进展[J]. *遗传*, 2009, 31(9): 903-912.
- [21] Olszewska M, Kurpisz M. Methylation of DNA is an epigenetic modification critical for gametic imprinting[J]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej*, 2010, 64: 642-649.
- [22] Kouzminova E, Selker E U. *Dim-2* encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*[J]. *EMBO Journal*, 2001, 20(15): 4309-4323.
- [23] Rountree M R, Selker E U. DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*[J]. *Heredity*, 2010, 105(1): 38-44.
- [24] Jenuwein T, Allis C D. Translating the histone code[J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1074-1080.