

孙晓梅, 黄金光. 禾谷镰刀菌甾醇 14 α 脱甲基酶基因 cDNA 克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(3): 31–36.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.008

禾谷镰刀菌甾醇 14 α 脱甲基酶基因 cDNA 克隆及生物信息学分析

孙晓梅¹, 黄金光²

(1. 青岛农业大学动漫与传媒学院, 山东青岛 266109;

2. 山东省植物病虫害综合防控重点实验室/青岛农业大学农学与植物保护学院, 山东青岛 266109)

摘要:克隆获得禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*) 2 个甾醇 14 α 脱甲基酶 CYP51 蛋白(CYP51A、CYP51B) 基因 cDNA 序列, 明确其氨基酸序列典型特征, 为研究蛋白质结构及其抗药性机制奠定基础。采用 RT-PCR 技术, 克隆 2 个 CYP51 蛋白基因 cDNA 序列, 利用相关生物信息软件对其序列进行生物信息学分析。结果克隆到 2 条 cDNA 序列, 长度分别为 1 524、1 581 bp, 分别编码 507、526 个氨基酸; 2 个蛋白分子量分别为 57.5、59.3 ku, 等电点分别为 6.93、7.08, 不稳定系数分别为 49.43、39.05; 2 个蛋白均含有细胞色素 P450 家族成员典型的保守结构域; 不具有信号肽的属于非分泌性蛋白, 具有跨膜结构域, 是亲水性蛋白; 蛋白质二级结构最主要的结构元件是 α 螺旋, 无规则卷曲, 并散布于整个蛋白中; 亚细胞定位预测显示, CYP51A 蛋白主要位于内质网及高尔基体等细胞器中, 而 CYP51B 主要位于细胞质中。研究结果将为进一步研究 CYP51 蛋白生物学功能及其蛋白结构生物学提供参考。

关键词:禾谷镰刀菌; 甾醇 14 α 脱甲基酶; 基因克隆; 抗药性; 生物信息学分析; cDNA

中图分类号: S182; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)03-0031-05

小麦赤霉病(fusarium head blight, FHB)是我国小麦生产中最主要的病害之一, 由镰刀菌属(*Fusarium* spp.) 多种真菌引起^[1]。在全世界范围内, 禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*) 是小麦赤霉病主要的病原菌, 在 2012 年 Molecular Plant Pathology 上发表的十大病原真菌中, 由于其发生的普遍性和重要性, 居于第 4 位^[2]。使用杀菌剂是控制赤霉病发生和危害的主要手段, 通常用于防治小麦赤霉病的杀菌剂为苯并咪唑类杀菌剂多菌灵^[3]。但是长期、单一、大量使用, 使其产生了严重的抗药性, 造成防效显著下降。因此, 明确禾谷镰刀菌对唑类杀菌剂产生抗性机制具有重要的理论、生产实践价值。杀菌剂作用于甾醇生物合成中的 14 α 脱甲基酶(CYP51), CYP51 属于细胞色素 P450(Cytochrome P450, 简称 CYP) 家族第 5 类中唯一的一个家族, 与 P450 其他家族相比, CYP51 功能非常保守, 作用于移除甾醇前体 14 α 位的甲基, 又称为甾醇 14 α 脱甲基酶, 催化酵母、真菌羊毛甾醇或齿孔醇, 植物钝叶醇和哺乳动物二氢羊毛甾醇的 14 α 位脱甲基反应, 具有较强的底物特异性^[4-6]。病原真菌中含有多个 CYP51 基因, 对唑类药剂产生抗性的病原菌中, CYP51 基因点突变是病原菌对

唑类杀菌剂产生抗性的主要机制^[7-9]。由于唑类杀菌剂中均含有 1 个含氮杂环, 杂环上的氮原子可以与 CYP51 蛋白血红素-铁活性中心以配位键结合, 竞争底物的结合位点, 使酶的活性受到抑制。当唑类杀菌剂结合区域的氨基酸位点发生突变, 使药剂与 CYP51 蛋白的结合能力下降, 引起病原菌的抗药性。在人类病原菌白色念珠菌(*Candida albicans*) 点突变研究中已经证实了上述假设, 如 F145L^[10]、Y132H、R467K^[11] 等突变。迄今为止, CYP51 突变引起抗药性报道最多的真菌是 *C. albicans*, 其引起抗性的突变位点多达 50 个。对已报道的突变位点的位置进行分析, 大部分突变位点集中在 2 个区域, 分别为 CYP51 蛋白的 N 端、C 端, 这可能与蛋白折叠的二级结构、三级结构中底物和药剂的结合位点有关^[12]。CYP51 蛋白 N 端包括 α 螺旋 B、B'、C 及其中间的 Loop 连接部分, 在这个区域的点突变中, 尤其以位于 α 螺旋 B' 和 C 之间的 1 个酪氨酸突变引起的抗性报道最多, 包括 *C. albicans* 中 CYP51 的 Y132F 位点突变^[13], 以及其他真菌斐济球腔菌(*Mycosphaerella fijiensis*)、白粉病菌(*Blumeria graminis* f. sp.) 中的 Y136F^[14-15]、禾生球腔菌(*Mycosphaerella graminicola*) 中的 Y137F^[16], 以及叶锈菌(*Puccinia triticina*) 中的 Y134F 位点突变等^[17]。*M. graminicola* 中的 Y137F 突变使三唑醇不能够再与酶结合, 引起抗性的发生^[18]。第 2 个突变区域为 CaCYP51 蛋白氨基酸序列的 428~459 位或 MgCYP51 蛋白氨基酸序列的 438~463 位^[19]。MgCYP51 中保守位点 Y459、G460 及 Y461 的突变或/和缺失都能够引起唑类杀菌剂敏感性下降^[20]。可见, CYP51 蛋白氨基酸突变使病原菌对药剂产生抗药性。CYP51 功能非常保守, 但是不同生物中 CYP51 氨基酸序列的同源性不高, 生物界之间其氨基酸的相似性只有 22%~30%; 而同一生物界中, 其氨基酸序列的同源性较高,

收稿日期: 2015-03-11

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31471735); 国家科技基础条件平台子项目(编号: 2005DKA21207-17); 山东省“泰山学者”建设工程专项经费(编号: TSSD201316); 青岛农业大学高层次人才科研基金(编号: 631217)。

作者简介: 孙晓梅(1975—), 女, 山东莱州人, 硕士, 副教授, 主要从事生物信息学研究。E-mail: xmsun@qau.edu.cn。

通信作者: 黄金光, 博士, 教授, 主要从事蛋白质结构生物学、分子植物病理学研究。E-mail: jghuang@qau.edu.cn。

在动物、植物、真菌中 CYP51 的相似性分别为 64%、41%、42%^[21]。禾谷镰刀菌含有 3 个 CYP51 基因 *FGCYP51A*、*FGCYP51B*、*FGCYP51C*，这 3 个基因虽然序列同源性较高，却发挥着不同的功能。Fan 等对这 3 个基因的功能进行了遗传学研究，发现 *FGCYP51A* 与 *FGCYP51B* 编码甾醇 14 α 脱甲基酶，与病原菌对唑类杀菌剂的敏感性密切相关^[22]。

目前，病原真菌中 CYP51 蛋白三维结构未见报道，且有关 CYP51 抗药性机制研究集中在基因遗传突变研究。因此，有必要从 CYP51 的蛋白结构入手研究其抗药性机制。解析蛋白质结构首先要对蛋白质进行分析，构建包含主要功能域的表达载体，进而体外纯化出高质量的目标蛋白，为 续生物学功能及生化功能试验奠定基础。本研究采用 RT-PCR 技术，克隆 2 个 CYP51 蛋白基因 cDNA 序列，利用生物信息学方法，对禾谷镰刀菌 *FGCYP51A*、*FGCYP51B* 基因编码的蛋白质进行分析，包括氨基酸组成、预测保守结构域、信号肽及跨膜结构域及亚细胞定位等，以期为进一步研究 CYP51 蛋白晶体结构及其生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种 本试验菌种为禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*) PH-1^[23]。

1.1.2 主要试剂 总 RNA 提取试剂 (Trizol Reagent)、总反转录酶 (M-MLV)、DNase，购自 Promega 公司；PCR 克隆试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit、SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit、质粒提取试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit)、Taq 酶、pMD18-T，购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 提取和 RT-PCR 收集禾谷镰刀菌菌丝体，抽干 置于液氮中速冻并转移，于 -80℃ 备用。从液氮中取出冷冻抽干的菌丝约 100 mg，置于预冷的研钵中，磨成粉末，并迅加入 1 mL Trizol。总 RNA 抽提步骤按 Trizol Reagent 说明书进行，所提取的总 RNA 用 2% 的琼脂糖电泳检验其分子的完整情况，并用分光光度法检测其浓度。以 Oligo (dT)₁₈ 为引物、1 μ g 总 RNA 为模板，按照反转录试剂盒 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 操作说明书合成第 1 链 cDNA。通过国际禾谷镰刀菌网站 (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_graminearum/MultiHome.html) 查找 CYP51 蛋白 2 个基因，分别为 *FGCYP51A*、*FGCYP51B*，根据此序列设计引物 (表 1)，并通过 PCR 克隆 2 个基因的 cDNA 片段 (图 1)。引物序列由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 扩增条件均为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 30 s，55℃ 40 s，72℃ 90 s，共 35 个循环；72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳检测，回收目的片段，纯化 克隆至载体 pMD18-T，转化感受态细胞 *E. coli* JM109。所筛选的阳性克

表 1 禾谷镰刀菌 CYP51 基因的 PCR 引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
FGCYP51AF	ATGTTCCATCTACTCATCTATCCCTTAT
FGCYP51AR	CTATATCTTCTTCCTACGCTCCCATCGA
FGCYP51BF	ATGGGTCTCCTTCAAGAACTGGCG
FGCYP51BR	TTACTGGCGTCGCTCCCACTGAAT

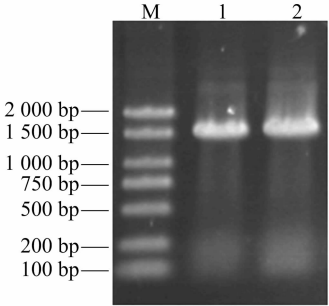


图 1 *FGCYP51A*(1)、*FGCYP51B*(2) 基因 cDNA PCR 电泳结果
隆经检测 由上海英骏生物技术有限公司进行测序。

1.2.2 分析方法 利用在线软件 protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析 CYP51 蛋白氨基酸序列^[24]；用 NCBI 网站在线软件 Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测保守结构域^[25]；用在线软件 NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 分析磷酸化位点；用 protscale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析氨基酸序列的疏水性/亲水性；利用 PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) 进行亚细胞定位的预测；利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽；利用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测跨膜结构域；利用在线软件 sopma (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 预测二维结构。

2 结果与分析

2.1 cDNA 的克隆及序列分析

采用 RT-PCR 方法获得 *FGCYP51A*、*FGCYP51B* 2 个基因，其 cDNA 序列全长分别为 1 524、1 581 bp (图 1)。推测其蛋白质分别有 507、526 个氨基酸残基，通过在线软件 protparam 对禾谷镰刀菌 CYP51 蛋白理化性质进行分析，CYP51A 蛋白的分子式为 C₂₆₀₆H₄₀₅₃N₆₉₇O₇₃₆S₁₉，总计由 8 111 个原子组成，分子量约为 57 533.2 u，等电点为 6.93，不稳定系数为 49.43 (40 以下为稳定蛋白)，推测其为不稳定蛋白。该蛋白中亮氨酸、丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、缬氨酸、脯氨酸、丝氨酸等含量相对较多，而半胱氨酸、色氨酸含量相对较少 (图 2-A)。CYP51B 蛋白的分子式为 C₂₆₈₀H₄₁₄₄N₇₂₀O₇₅₄S₂₃，总计由 8 321 个原子组成，分子量约为 59 252.1 u，等电点为 7.08，不稳定系数为 39.05 (40 以下为稳定蛋白)，推测其为稳定蛋白。该蛋白中丙氨酸、谷氨酸、甘氨酸、亮氨酸、赖氨酸、脯氨酸、缬氨酸、丝氨酸等含量相对较多，而半胱氨酸、色氨酸含量相对较少 (图 2-B)。

2.2 CYP51 蛋白保守结构域分析

利用 Conserved Domains 程序对 CYP51 蛋白进行结构域分析，从图 3 可以看出，CYP51A 蛋白第 36~499 位氨基酸和 CYP51B 蛋白第 72~525 位氨基酸分别组成了细胞色素 P450 家族成员典型的保守结构域。

2.3 CYP51 蛋白氨基酸序列翻译后的磷酸化修饰

预测细胞内蛋白质磷酸化在信号转导中发挥着重要的作用，研究报道共有 3 种主要的磷酸化部位——丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸结合位点。大多数蛋白质是在丝氨酸、苏氨酸残基

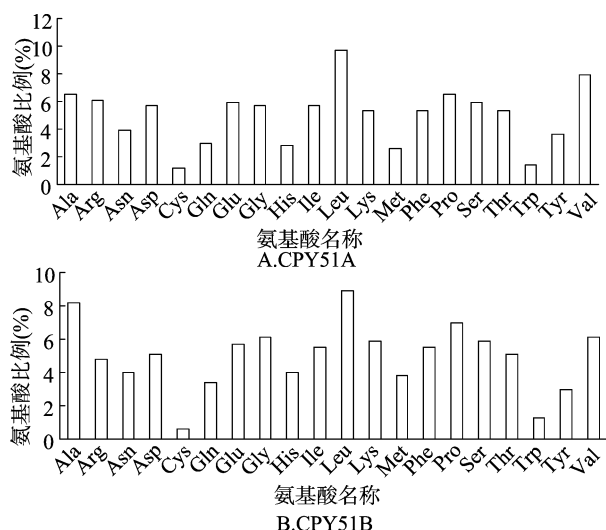


图2 CYP51 蛋白的氨基酸含量分布

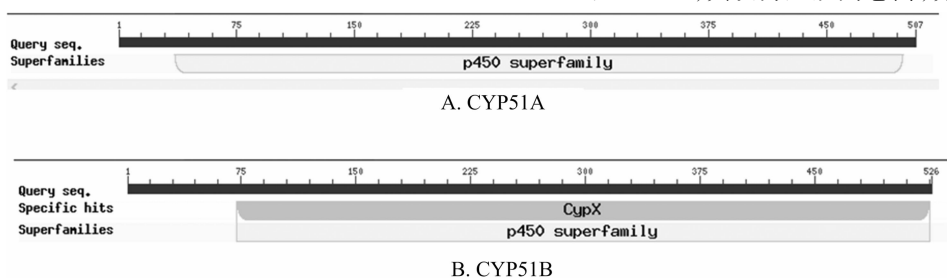


图3 CYP51 蛋白保守结构域分析

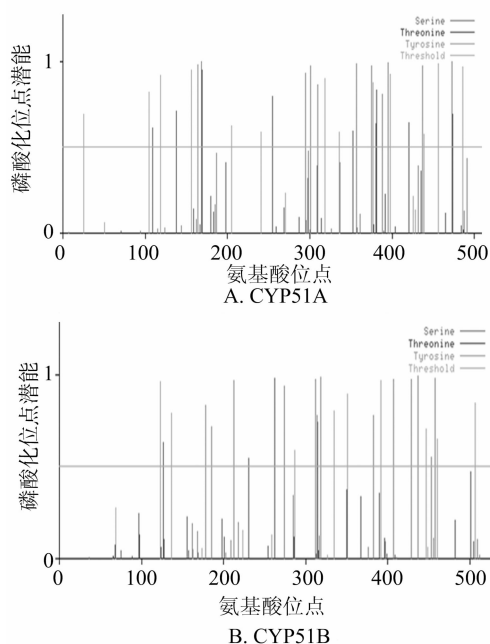


图4 CYP51 蛋白氨基酸序列翻译后的磷酸化修饰预测

36.50%, β 折叠片层结构分别占 19.13%、15.40%, 最少的是 β 转角, 分别占 7.69%、6.84%。可见 α 螺旋、无规卷曲是 CYP51A、CYP51B 的最主要二级结构, 分布于整条肽链中。

2.5 CYP51 蛋白的信号肽和跨膜结构域分析

利用相关软件对 CYP51 蛋白的信号肽和跨膜域进行预测, 由图 6-A 可知, CYP51A 的 C 值最大切割点在第 22 个氨

上磷酸化, 而许多与信号转导有关的蛋白质还在酪氨酸位置上被磷酸化。利用在线软件 NetPhos 分析可看出, 在 CYP51A 中含有 11 个丝氨酸磷酸化位点, 9 个苏氨酸磷酸化位点, 13 个酪氨酸磷酸化位点 (图 4-A); 在 CYP51B 中含有 14 个丝氨酸磷酸化位点, 3 个苏氨酸磷酸化位点, 9 个酪氨酸磷酸化位点 (图 4-B)。CYP51 蛋白磷酸化, 改变蛋白质的活性, 这种改变可能为激活, 也可能是抑制作用。

2.4 CYP51 蛋白二级结构预测

多肽链借助氢键排列成沿一维方向而呈现有规则的重复构象的二级结构, 是氨基酸顺序与三维构象之间的桥梁。二级结构借助范德华力、氢键、静电和疏水等相互作用形成蛋白质的三级结构, 从而发挥正常的生物学功能。利用 SOPMA 软件对 CYP51 蛋白的氨基酸序列的二维结构进行预测, 由图 5 可知, CYP51A、CYP51B 均含有 α 螺旋、无规则卷曲、 β 折叠延伸链、 β 转角结构, 其中 α 螺旋结构部分较多, 分别占 37.08%、41.25%, 其次为无规则卷曲, 分别占 36.09%、

36.50%, β 折叠片层结构分别占 19.13%、15.40%, 最少的是 β 转角, 分别占 7.69%、6.84%。可见 α 螺旋、无规卷曲是 CYP51A、CYP51B 的最主要二级结构, 分布于整条肽链中。

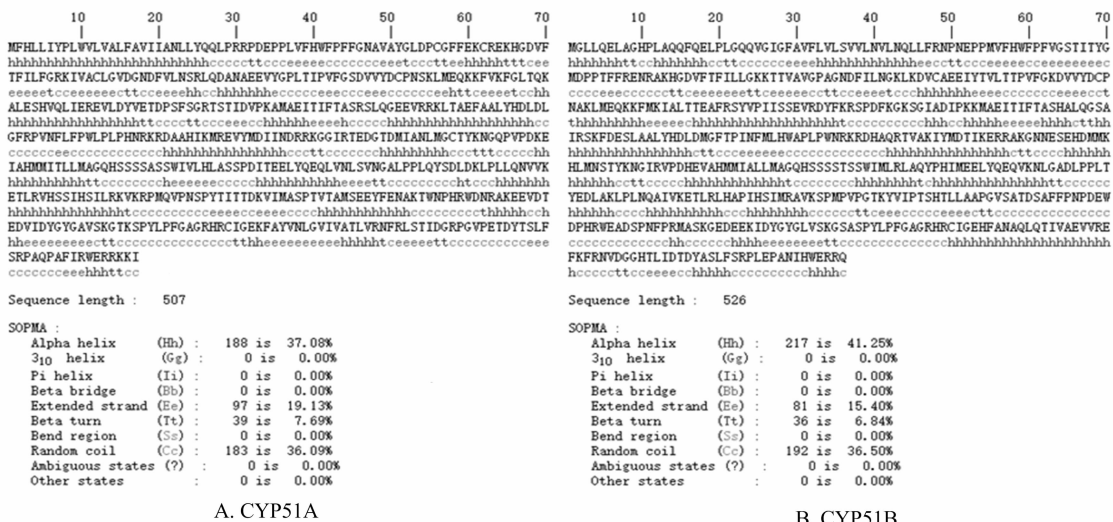
基酸位置, 分值为 0.392, 综合剪切点分值 (Y 值) 最高也在第 22 个氨基酸位置, 为 0.412, 信号肽最大分值 (S 值) 在第 2 个氨基酸位置, 为 0.666, 因此判断 CYP51A 没有信号肽, 属于非分泌性蛋白。CYP51B 的 C 值最大切割点在第 16 个氨基酸位置, 分值为 0.111, 综合剪切点分值 (Y 值) 最高在第 25 个氨基酸位置, 为 0.131, 信号肽最大分值 (S 值) 在第 19 个氨基酸位置, 为 0.202, 因此判断 CYP51B 没有信号肽 (图 6-B), 属于非分泌性蛋白。由图 6-C 可知, CYP51A 蛋白 30~507 位氨基酸在膜外, 1~6 位氨基酸在膜内, 7~29 位氨基酸 (YPLWVLVALFAVIIANLLYQQLP) 组成跨膜结构域。CYP51B 蛋白有 2 个跨膜结构域, 分别为 20~42 位氨基酸 (PLGQQVGIGFAVFLVLSVVLNVL)、55~77 位氨基酸 (MVFHWFPFVGSTITYGMDPPTFF), 1~19、78~526 位氨基酸在膜外, 43~54 位氨基酸在膜内 (图 6-D)。

2.6 CYP51 蛋白氨基酸序列疏水性/亲水性分析

蛋白质结构的特征是疏水/亲水间的平衡, 了解氨基酸序列疏水性/亲水性对蛋白质的结构和功能预测有一定的作用。用 protscale 分析 CYP51 蛋白氨基酸序列的疏水性/亲水性, 根据氨基酸分值越高疏水性越强、得分越低亲水性越强的规律, 从图 7-A 可以看出 CYP51A 在 30、60、230、250、410 位氨基酸附近分别包含 1 个亲水头部, 亲水性区域超过疏水性区域, 属于亲水性蛋白。可以看出 CYP51B 在 80、170、250、270、420、440 位氨基酸附近分别包含 1 个亲水头部, 亲水性区域超过疏水性区域, 也属于亲水性蛋白 (图 7-B)。

2.7 CYP51 蛋白的亚细胞定位预测

了解蛋白的亚细胞定位可为蛋白功能预测提供基础。利



Hh— α 螺旋; Ec— β 折叠延伸链; Tt— β 转角; Cc—无规则卷曲

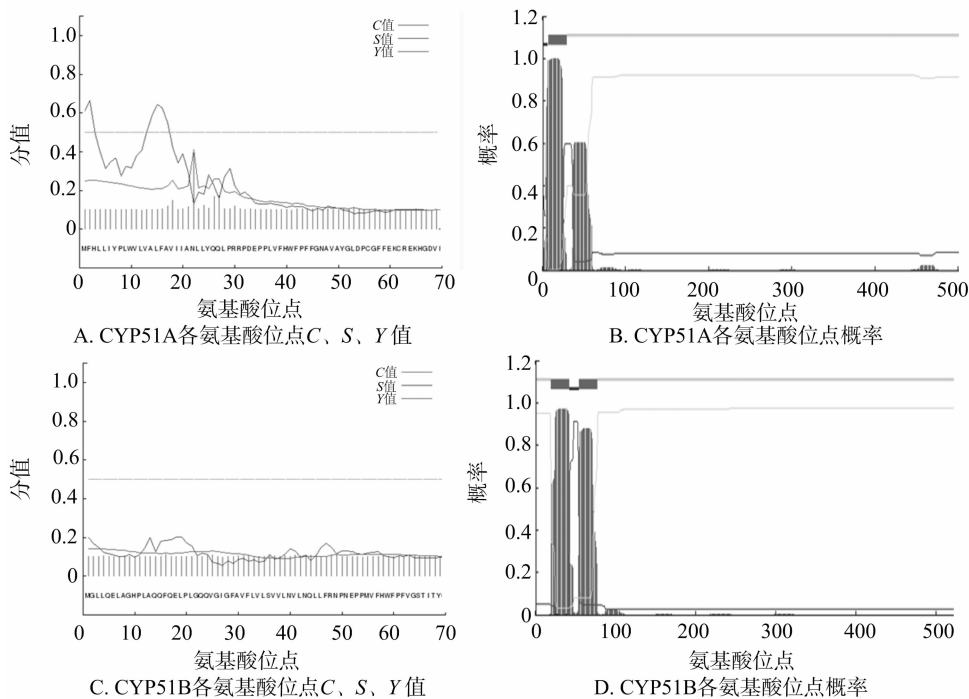


图6 CYP51 蛋白的信号肽和跨膜结构域预测

用在线软件 PSORT II 对 CYP51 蛋白的亚细胞定位进行预测,结果表明,CYP51A 蛋白分布在内质网概率为 55.6%,高尔基体为 33.3%,细胞质膜为 11.1%。CYP51B 蛋白分布在细胞质中概率为 39.1%,细胞核及线粒体均为 17.4%,内质网为 13.0%,囊泡分泌系统、高尔基体及过氧化物酶体均占 4.3%。

3 讨论与结论

CYP51 被认为是细胞色素 P450 超级家族中最古老的家族,存在于几乎所有的生物中,包括动物、植物、酵母、真菌等真核生物以及原生动物和细菌等原核生物,因此推测其在主要的真核生物族群分化之前就已经形成^[26-27]。虽然 CYP51 的功能非常保守,但是不同生物中 CYP51 氨基酸序列的同源

性并不相同。Lepesheva 等对 180 多个已知的 CYP51 氨基酸序列,包括原核、真核生物中的 CYP51 进行比对,结果发现在所有生物中都保守的氨基酸有 15 个,所有真核生物中都保守的氨基酸有 24 个^[6]。此外,真菌 CYP51 中还含有 1 个真菌特异性 C 端结构域,其中包括 1 段只在真菌中保守的序列 DF/YGF/YG^[19]。因此,以病原真菌的 CYP51 为靶标而开发的杀真菌剂,对真菌具有特异性。

Becher 等对 38 个子囊菌中的 *CYP51* 基因进行分析,其中 18 个种的真菌中含有 1 个 *CYP51* 基因,15 种真菌中包括 2 个 *CYP51* 基因,其他 5 种真菌中含有 3 个 *CYP51* 基因,其中含有 2 个及以上 *CYP51* 基因的真菌数量在总数的 50% 以上^[28]。真菌 *CYP51* 蛋白序列系统进化树分析表明,*CYP51* 分为 3 支,分别为 *CYP51A*、*CYP51B*、*CYP51C*。在所有比对序

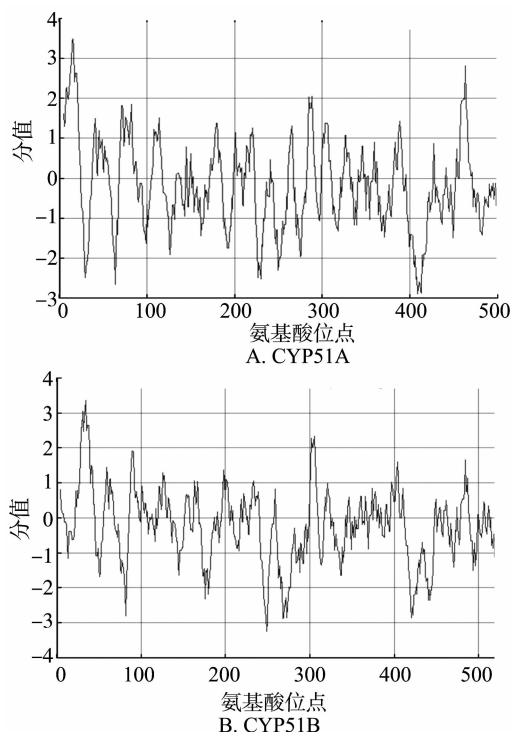


图7 CYP51 蛋白氨基酸序列疏水性/亲水性预测结果

列中,单一 *CYP51* 基因都聚类为 CYP51B;而除镰刀菌属之外,含有 2 个以上 *CYP51* 基因的真菌,其 *CYP51* 基因聚类为 CYP51A 或者 CYP51B。禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)含有 3 个 *CYP51* 基因 *FGCYP51A*、*FGCYP51B*、*FGCYP51C*,它们分别编码 507、526、517 个氨基酸,蛋白序列间的一致性为 61.65%。其中 *FGCYP51A*、*FGCYP51B* 基因编码甾醇 14 α 脱甲基酶,与禾谷镰刀菌抗药性产生有关。本研究对这 2 个蛋白进行了生物信息学分析,CYP51 蛋白没有信号肽,具有跨膜结构域,属于亲水性蛋白;二者具有细胞色素 P450 家族成员典型的保守结构域;具有多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化修饰位点,可能与其表达的生物学功能相适应;二级结构预测表明,CYP51 蛋白以无规卷曲和 α 螺旋为主,推测与其活性位点形成有关。

本研究克隆了 *FGCYP51A*、*FGCYP51B* 基因的 cDNA,为进一步构建蛋白表达载体进行蛋白表达纯化,进而开展蛋白结构生物学研究。利用生物信息学方法预测了 CYP51 蛋白的理化性质、结构域和亚细胞定位等基本信息,这些结果也为构建不同长度及功能域的表达载体提供了线索,为蛋白纯化提供了依据。

参考文献:

- [1] 张洪滨,柳金伟,刘秉江,等. 山东省小麦赤霉病菌种群组成及其致病力分化[J]. 植物保护学报,2013,40(1):27-32.
- [2] Dean R, van Kan J A, Pretorius Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012,13(4):414-430.
- [3] 龚双军,杨立军,向礼波,等. 2013 年湖北省小麦赤霉病菌对多菌灵和戊唑醇的敏感性[J]. 农药学报,2014,16(5):610-613.
- [4] Alcazar - Fuoli L, Mellado E, Garcia - Efron G, et al. Ergosterol bio-

synthesis pathway in *Aspergillus fumigatus* [J]. Steroids, 2008, 73 (3):339-347.

- [5] Bean T P, Cools H J, Lucas J A, et al. Sterol content analysis suggests altered eburicol 14 α - demethylase (CYP51) activity in isolates of *Mycosphaerella graminicola* adapted to azole fungicides[J]. FEMS Microbiol Lett, 2009, 296(2):266-273.
- [6] Lepesheva G I, Waterman M R. Sterol 14 α - demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1770(3):467-477.
- [7] Ghosop J M, Schmidt L S, Margosan D A, et al. Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the PdCYP51 promoter region of *Penicillium digitatum* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 44(1):9-18.
- [8] Mellado E, Garcia - Efron G, Alcázar - Fuoli L, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross - resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(6):1897-1904.
- [9] Snelders E, van der Lee H A L, Kuijpers J, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism[J]. PLoS Medicine, 2008, 5(11):e219.
- [10] Kudo M, Ohi M, Aoyama Y, et al. Effects of Y132H and F145L substitutions on the activity, azole resistance and spectral properties of *Candida albicans* sterol 14 - demethylase P450 (CYP51): a live example showing the selection of altered P450 through interaction with environmental compounds [J]. Journal of Biochemistry, 2005, 137(5):625-632.
- [11] Park H G, Lee I S, Chun Y J, et al. Heterologous expression and characterization of the sterol 14 α - demethylase CYP51F1 from *Candida albicans* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011, 509(1):9-15.
- [12] Becher R, Wirsal S G. Fungal cytochrome P450 sterol 14 α - demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(4):825-840.
- [13] Morio F, Loge C, Besse B, et al. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole - susceptible and azole - resistant clinical isolates; new substitutions and a review of the literature [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2010, 66(4):373-384.
- [14] Cañas - Gutiérrez G P, Angarita - Velásquez M J, Restrepo - Flórez J M, et al. Analysis of the *CYP51* gene and encoded protein in propiconazole - resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis* [J]. Pest Management Science, 2009, 65(8):892-899.
- [15] Wyand R A, Brown J K. Sequence variation in the *CYP51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(8):726-735.
- [16] Leroux P, Walker A S. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α - demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola* [J]. Pest Management Science, 2011, 67(1):44-59.
- [17] Stammler G, Cordero J, Koch A, et al. Role of the Y134F mutation in cyp51 and overexpression of cyp51 in the sensitivity response of *Puccinia triticina* to epoxiconazole [J]. Crop Protection, 2009, 28(10):891-897.

张俊波,印双红,李 默,等. PI3K/Akt 信号通路在胞内布鲁氏菌存活中的作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):36-39.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.009

PI3K/Akt 信号通路在胞内布鲁氏菌存活中的作用

张俊波¹, 印双红¹, 李 默², 冉 辉¹, 罗 静¹, 李建新¹, 陆安法³, 郭 飞², 陈创夫²

(1. 铜仁学院, 贵州铜仁 554300; 2. 石河子大学, 新疆石河子 832000; 3. 贵州省铜仁市动物疫病控制中心, 贵州铜仁 554300)

摘要:为了检测对 PI3K/Akt 信号通路在巨噬细胞内布鲁氏菌存活的影响,将布鲁氏菌粗糙型菌株 RB51 和光滑型菌株 S2308 分别侵染细胞,应用 Western blot 技术检测 RB51 和 S2308 和对巨噬细胞内 $p-Akt$ (S473) 和 $p-Akt$ (T308) 表达的影响;用 MTT 法检测抑制剂 LY294002 (LY) 对细胞活性的影响;通过菌落计算法,检测抑制剂 LY 对胞内菌 RB51 和 S2308 存活的影响。结果表明,粗糙型菌株 RB51 和光滑型菌株 S2308 都可激活 PI3K/Akt 信号通路,但粗糙型菌株 RB51 的激活程度显著弱于光滑型菌株 S2308 ($P < 0.01$);抑制剂 LY 在小于或等于 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时不影响细胞活性;抑制剂 LY (20 $\mu\text{mol/L}$) 可显著抑制光滑型菌株 S2308 的存活,但不影响粗糙型菌株 RB51 的存活。本研究表明,PI3K/Akt 信号通路在光滑型菌株存活中发挥重要作用。

关键词:PI3K/Akt 信号通路;布鲁氏菌 RB51 和 S2308;胞内存活

中图分类号:S855.99 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0036-04

布鲁氏菌病是一种严重危害人类和家畜健康的人兽共患传染病^[1-2]。布鲁氏菌为革兰氏阴性的兼性胞内寄生菌,其急性期的临床特点主要为恶寒、发热、关节和肌肉痛等;人感染布鲁氏菌 造成骨关节、神经系统、生殖系统和免疫系统等

损害,慢性期主要症状为骨关节病及包括神经系统在内的多系统多器官的损害,患者一般会表现出神经-精神症状,病程较长,容易复发并再感染,从而导致劳动力的丧失。动物布鲁氏菌病的特点是生殖器官、胎膜及其他多种器官组织发炎、坏死和肉芽肿的形成,引起流产、睾丸炎及关节炎等症状。布鲁氏菌病给人类健康和畜牧业和谐发展带来严重危害^[3]。因此,研究布鲁氏菌及其对宿主细胞的致病机制,为布鲁氏菌疫苗研发和防控提供理论依据,对于国民经济的发展和社会的安全具有重大的意义。

PI3K/Akt 信号转导通路是重要的细胞生存通路之一,Akt 作为 PI3K/Akt 信号转导通路的关键分子,在促进细胞生存、生长、增殖,促进细胞运动、侵袭和转移,抑制细胞凋亡方面起核心作用^[4]。PI3K/Akt 信号通路与肿瘤的发生发展密切相关,在多种肿瘤组织有 Akt 的过度表达和活化。PI3K/Akt 信号通路还与一些病毒的生存繁殖密切相关,然

收稿日期:2015-03-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31502067);博士科研启动基金(编号:trxyDH1504);“野生动植物保护与利用”——省级重点学科[编号:黔学位办(2013)18号];梵净山特色动植物资源保护与利用创新人才团队[编号:黔教合人才团队字(2012)08号];梵净山特色动植物资源重点实验室[编号:黔教合 KY 字(2011)005号];高层次人才启动资金(编号:RCZX201228)。

作者简介:张俊波(1984—),男,河南周口人,博士研究生,副教授,主要从事免疫遗传与抗病机理。E-mail:zhangjunbo666@126.com。
通信作者:印双红,硕士研究生,讲师,主要从事感染免疫学方面研究。E-mail:ysh_hong2006@163.com。

- [18] Mullins J G L, Parker J E, Cools H J, et al. Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* [J]. PLoS One, 2011, 6(6): e20973.
- [19] Podust L M, Stojan JPoulos T L, Waterman M R. Substrate recognition sites in 14 α -sterol demethylase from comparative analysis of amino acid sequences and X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP51 [J]. J Inorg Biochem, 2001, 87(4): 227-235.
- [20] Cools H J, Fraaije B A. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control [J]. Pest Management Science, 2013, 69(2): 150-155.
- [21] Lepesheva G I, Waterman M R. Structural basis for conservation in the CYP51 family [J]. Biochimica et Biophysica acta, 2011, 1814(1): 88-93.
- [22] Fan J, Urban M, Parker J E, et al. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function [J]. The New Phytologist, 2013, 198(3): 821-835.

- [23] Cuomo C A, Güldener U, Xu J R, et al. The fusarium graminearum genome reveals a Link between localized polymorphism and pathogen specialization [J]. Science, 2007, 317(5843): 1400-1402.
- [24] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. The proteomics protocols handbook [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005: 571-607.
- [25] Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson J B, et al. CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39: D225-D229.
- [26] Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O, et al. Sterol 14-demethylase P450 (P45014DM*) is one of the most ancient and conserved P450 species [J]. Journal of Biochemistry, 1996, 119(5): 926-933.
- [27] Werck-Reichhart D, Feyereisen R. Cytochromes P450: a success story [J]. Genome Biology, 2000, 1(6): 1-9.
- [28] Becher R, Weihmann F, Deising H B, et al. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses [J]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 52.