



细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶基因的克隆与表达分析

杜林娜^{1,2}, 李秀兰¹, 魏东旭¹, 陈鸿兵¹, 姚宇¹, 杨晶^{1,2}

(1. 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118)

摘要:腺苷酸琥珀酸合酶(ADSS)为细脚拟青霉(*Paecilomyces tenuipes*)有效成分腺苷合成代谢途径的关键酶,而细脚拟青霉中腺苷酸琥珀酸合酶基因 *Ptadss* 的克隆与序列分析鲜见相关报道。本文在细脚拟青霉转录组测序结果的基础上,利用 PCR 技术克隆得到该菌 *Ptadss* 基因的 cDNA 序列,对 *Ptadss* 基因及其编码的蛋白进行生物信息学分析(相关理化性质、结构域、亲水性-疏水性、亚细胞定位、信号肽和高级结构等),并构建 PtADSS 与相关微生物 ADSS 的系统进化树。同时,采用实时荧光定量 PCR 技术,分析 *Ptadss* 基因在不同发酵阶段的细脚拟青霉菌丝体中的表达量,以初步明确该基因的表达量对于细脚拟青霉腺苷含量的影响。结果表明:克隆得到的 *Ptadss* 基因的 ORF 序列为 1 670 bp。该基因编码的蛋白的基本性质为:423 个氨基酸残基、相对分子量为 46.7 663 kDa、等电点(pI)为 5.59,含 58 个磷酸化位点,且该蛋白为定位于细胞质中的非分泌性和非跨膜的疏水性蛋白。结构预测结果表明该蛋白是由 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规则卷曲组成的复杂结构。序列分析结果提示,细脚拟青霉 *Ptadss* 基因与 *Cordyceps confragosa* 腺苷酸琥珀酸合酶基因同源性最高,可达 91%。结合其他微生物的 ADSS 氨基酸序列构建系统树,结果表明细脚拟青霉与 *Cordyceps confragosa* 亲缘关系较近。另经对不同发酵阶段的细脚拟青霉中 *Ptadss* 的表达量及腺苷含量分析结果表明:*Ptadss* 基因的表达水平与菌丝体中腺苷含量存在正相关性。

关键词:细脚拟青霉;腺苷酸琥珀酸合酶;基因克隆;序列分析;表达分析

细脚拟青霉(*Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson)是筛选新型生物活性物质的一种重要药用真菌。文献报道提示,细脚拟青霉具有多种药理活性,比如抗抑郁、降血糖、免疫调节和抗肿瘤等。在亚洲国家,该菌已经作为保健食品原料和传统药物而广泛应用,尤其是在过敏性疾病、哮喘、癌症及结核病的治疗中发挥了极为重要的作用^[1-5]。细脚拟青霉中富含腺苷、多糖及多种次级代谢产物^[6]。其中,腺苷是该菌非常重要的一种活性成分,可用于肿瘤、冠状血管障碍、狭心症及高血压症等疾病的治疗^[7-8]。然而,细脚拟青霉中腺苷含量不高,限制了该菌的药用开发进度。因而,利用现代的基因克隆技术,从分子水平上深入挖掘细脚拟青霉中腺苷合成途径的关键酶基因资

源,是采用分子育种手段提高该菌腺苷含量迫切需要解决的问题。

腺苷酸琥珀酸合酶 ADSS 可催化肌苷酸转化为腺苷酸,从而进入腺苷合成途径,是腺苷生物合成途径的最重要的关键酶之一^[9-11],而有关细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶基因研究还鲜见相关报道。

本研究以细脚拟青霉 RCEF4339 为研究对象,利用 PCR 技术从该菌菌丝体中扩增得到 *Ptadss* 基因的 cDNA 全序列。在此基础上,利用多种在线分析工具预测该基因及其编码蛋白的理化性质、结构域等特征。利用 Bioeditor 和 MEGA 5.0 分析 *Ptadss* 基因编码氨基酸的进化关系。同时,利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *Ptadss* 基因在不同发酵时期细脚拟青霉菌丝体中的表达量,以明确该基因在细脚拟青霉腺苷生物合成过程中的作用,为深入研究 *Ptadss* 基因在细脚拟青霉腺苷生物合成中的功能提供了数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 细脚拟青霉 RCEF4339 购买于安

收稿日期:2018-03-06

基金项目:吉林农业大学科研启动基金资助项目(2015014);吉林省教育厅“十三五”科学技术研究资助项目吉教科合字[2016]第 180 号;2016 大学生创新计划资助项目(2016 10193042);吉林省科技厅优秀青年人才基金资助项目(2017 0520035JH)。

第一作者简介:杜林娜(1985-),女,博士,从事微生物与生化药学研究。E-mail:dulinna0918@163.com。

通讯作者:杨晶(1981),女,博士,副研究员,从事药用植物研究。E-mail:2690338278@qq.com。

徽农业大学。大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。

1.1.2 试剂与仪器 NANODROP2000(美国 ThermoScientific 公司),TP50 电子天平(美国双杰兄弟有限公司),MDF-492 超低温电冰箱(日本三洋公司),可调式微量移液器(德国 Eppendorf 公司),MiniSpin 高速离心机(德国 Eppendorf 公司),ABIPCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.1.3 培养基 种子和发酵培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$):葡萄糖 40,蛋白胨 10,酵母浸粉 10。

1.2 方法

1.2.1 细脚拟青霉 RCEF4339 培养方法 采用 250 mL 摇瓶培养细脚拟青霉 RCEF4339。培养条件分别为:装液量 100 mL,接种量 5%,转速 $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,培养时间 4 d。离心($4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)收集发酵后的细脚拟青霉菌丝体,并用去离子水清洗 3 次后备用。

1.2.2 RNA 的提取及 cDNA 的合成 将置于液氮中的细脚拟青霉菌丝体充分研碎,并提取其总 RNA(依照 Trizol 试剂说明书)。分别采用琼脂糖凝胶电泳和 NANODROP2000 检测所得 RNA 的完整性和浓度,置于一 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。合成的 cDNA 的第一条链置于一 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存(Biotek 公司反转录试剂盒)。

1.2.3 细脚拟青霉 *Ptadss* 基因 ORF 片段的克隆 根据细脚拟青霉转录组测序结果,利用 ORF Finder 对功能注释为腺苷酸琥珀酸合酶的 UniGene 2475 开放阅读框进行分析。软件 Primer 5.0 设计并由华大基因公司合成目的基因的 ORF 序列引物(*Ptadss*-F 和 *Ptadss*-R)。将细脚拟青霉 cDNA 做为模板进行 PCR 扩增。

Ptadss-F:ATGACTATCAACGTGATTCTTG ;

Ptadss-R:TCACGCGCGCCGAATCATG。

PCR 反应体系($50\text{ }\mu\text{L}$): $20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ *Ptadss*-F $1\text{ }\mu\text{L}$, $20\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ *Ptadss*-R $1\text{ }\mu\text{L}$, $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs $4\text{ }\mu\text{L}$, $2.5\text{ U}\mu\text{L}$ $10\times$ EasyPfu Buffer $5\text{ }\mu\text{L}$,模板 $1\text{ }\mu\text{L}$,ddH $_2\text{O}$ $38\text{ }\mu\text{L}$ 。

反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 8 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

采用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增所得产物。PCR 回收产物(Takara 胶回收试剂盒)与 pEASY-T1 载体连接后,转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。筛选重组子,提取质粒(碱裂解法),PCR、双酶切(*EcoR* V 和 *Hind* III)鉴定重组子。

由生工生物工程(上海)股份有限公司完成阳性重组菌液的测序。

1.2.4 细脚拟青霉 *Ptadss* 基因序列的分析 BLAST 分析 *Ptadss* 基因的 ORF 序列,并通过 DNAMAN 软件翻译成氨基酸序列,并对来源于各种微生物的 *Ptadss* 的相关氨基酸序列进行同源比对。相对分子质量与理论等电点(pI)预测采用 ExPASy 在线服务器的 Compute Pi/Mw 工具,二级和三级结构预测分别使用 Dublin 大学的 Porter 服务器和 Swiss-Model 服务器分析,结构功能域分析采用 ExPASy 在线服务器 Prosite Scanprosite。另外,采用多种在线工具分析细脚拟青霉 *Ptadss* 基因编码蛋白的信号肽(SignalP4.1Server)、跨膜区预测(TMhmm Server v. 2.0)、亲水性/疏水性(ProScale)和亚细胞定位(WOLF PSORT 和 Cell-Ploc2.0)。利用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树(Neighbor-Joining)。

1.2.5 细脚拟青霉 *Ptadss* 基因的表达分析 以 *tef* 基因为内参基因,采用 Takara 公司的 SYBR Premix EX TaqTM(Tli RNaseH Plus)试剂盒进行 qRT-PCR 检测并分析培养 24、48、72、96、120 h 的细脚拟青霉菌丝体菌丝体中 *Ptadss* 基因的表达量。

tef-F:CCTCCAACGTCACCACTGAAGT;

tef-R:CGGAGACGTTCTTCACGTTGA。

反应体系($15\text{ }\mu\text{L}$):SYBR Premix Ex TaqTM($2\times$) $7.5\text{ }\mu\text{L}$,ROX Reference Dye $0.3\text{ }\mu\text{L}$,*tef*-F $0.3\text{ }\mu\text{L}$; *tef*-R $0.3\text{ }\mu\text{L}$;DEPC 水 $5.1\text{ }\mu\text{L}$,cDNA $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 。

反应条件:预变性 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$,30 s;PCR 反应 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$,5 s; $62\text{ }^{\circ}\text{C}$,20 s;40 个循环。

1.2.6 腺苷含量检测 参照文献方法提取并检测细脚拟青霉菌丝体重腺苷含量^[12-13]。

2 结果与分析

2.1 细脚拟青霉总 RNA 的提取及检测

琼脂糖凝胶电泳检测结果提示:按照上述方法提取细脚拟青霉 RCEF4339 总 RNA,其 28S rRNA 和 18S rRNA 两条带均较清晰(图 1),提示提取的 RNA 完整性较好;经核酸蛋白检测仪测得 $A_{260}/A_{280}=1.94$, $A_{260}/A_{230}=1.96$,表明 RNA 纯度较高,可用于 PCR 扩增。

2.2 细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶基因 ORF 片段的克隆

采用 PCR 技术扩增到一条长度为 1 670 bp

的条带(图 2A)。克隆产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后进行切胶回收及纯化,然后与 pEASY-T1 载体连接,通过质粒的 *EcoRV* 和 *Hind* III 双酶切验证(图 2B)测序结果正确。

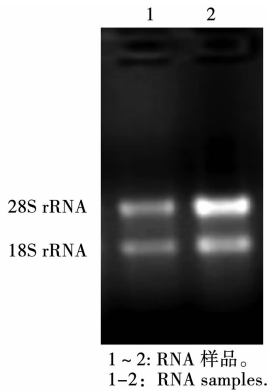
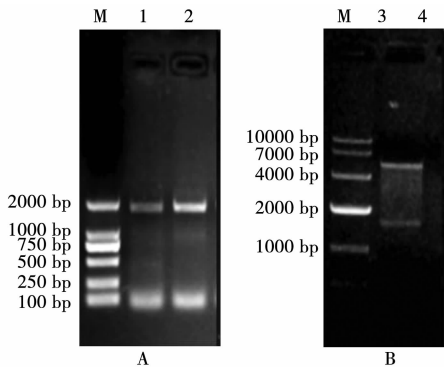


图 1 细脚拟青霉菌丝体总 RNA 检测结果
Fig. 1 Electropherograms of total RNA of *P. tenuipes*



M: Marker; 1~2: 基因PCR产物; 3~4: *Ptadss*基因酶切验证。
M: Marker; 1~2: Gene PCR product; 3~4: *Ptadss* gene e

图 2 细脚拟青霉菌丝体 *Ptadss* 基因 DNA 片段电泳检测
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of DNA fragment of *Ptadss* gene from *P. tenuipes*

2.3 细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶基因编码蛋白序列的生物信息学分析

2.3.1 编码蛋白的理化性质分析 细脚拟青霉 RCEF4339 腺苷酸琥珀酸合酶基因编码 423 个氨基酸。利用 ExPaSy-ProtParam 在线工具对推导出的细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶进行基本理化特性分析,结果显示该蛋白共含原子数为 6 599, 化学分子式为 $C_{2083}H_{3309}N_{559}O_{634}S_{14}$, 理论分子量和等电点分别为 46.7 663 kDa 和 5.59。该推测蛋白内含 22 种氨基酸,其中甘氨酸(10.2%)、异亮氨酸(9.0%)和谷氨酸(8.5%)所占比例较大。带负电荷、正电荷残基总数分别为 58 和 50 个。脂脂肪酸指数(90.33)和亲水性平均系数(-0.226)检测结果提示,该蛋白为疏水性蛋白。该蛋白较为稳定(不稳定指数为 30.23)。采用 BLASTp 比较

分析推测的氨基酸序列,发现 *Ptadss* 属于 NTP 酶蛋白亚家族(P-loop-NTPase superfamily)。

2.3.2 编码蛋白信号肽及其跨膜分析 利用 SignalP4.1 在线工具对推导出的细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶的氨基酸序列的信号肽进行分析,发现 *Ptadss* 编码蛋白为非分泌蛋白,且不存在信号肽序列(图 3)。TMHMM Server v. 2.0 软件分析结果表明 *Ptadss* 编码蛋白是一个非跨膜蛋白。

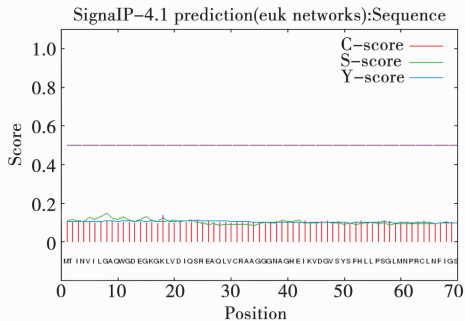


图 3 细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶蛋白信号肽预测结果
Fig. 3 SignalP analysis of *PtADSS* from *P. tenuipes*

2.3.3 蛋白修饰位点分析 利用两种在线工具对推导蛋白的糖基化位点(DictyOGlyc 1.1)和磷酸化位点(NetPhos 3.1)进行预测。*Ptadss* 蛋白不存在糖基化位点(图 4A),但存在 58 个磷酸化位点(图 4B),这些修饰可能与该蛋白的生物学功能有关。

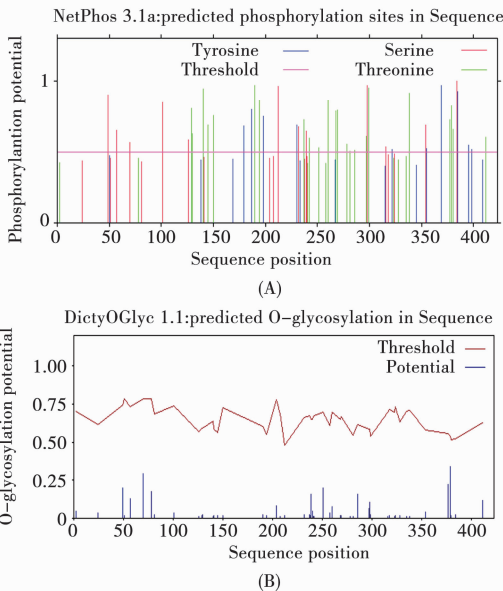


图 4 细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶蛋白磷酸化位点(A)和糖基化位点(B)预测结果
Fig. 4 Phosphorylation (A) and NetNGlyc (B) analysis of *PtADSS* from *P. tenuipes*

2.3.4 蛋白氨基酸序列的结构预测 *Ptadss* 基因编码蛋白二级结构分析 (SWISS-MODEL-SOPMA)结果表明该蛋白主要由 α -螺旋 (Alpha helix, 39.01%)、延伸链 (Extended strand, 21.99%)、无规卷曲 (Random coil, 27.90%)、转角 (Beta turn, 11.11%) 组成。

利用 SWISS-MODEL 对 *Ptadss* 编码蛋白进行三维结构建模 (图 5),结果显示 *Ptadss* 编码蛋白是由 α -螺旋、延伸链和 β -转角缠绕形成的无规则卷曲的复杂结构,这与二级结构分析结果相一致。

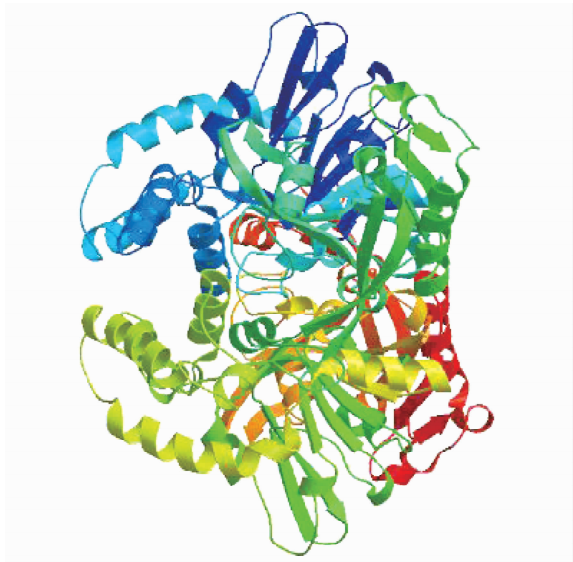


图 5 细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶蛋白三级结构预测图
Fig. 5 Predicted tertiary structures of PtADSS from *P. tenuipes*

2.3.5 蛋白亚细胞定位及亲水性/疏水性分析 经 WOLF PSORT 分析 *Ptadss* 编码蛋白的亚细胞定位,结果表明,该蛋白可能定位于细胞质内 (细

胞质>细胞核)。为验证结果的准确性,本研究还采用 Cell-Ploc2.0 软件进一步分析,预测结果与上述结果一致。

利用 *ProScale* 对预测蛋白进行亲水性/疏水性分析 (图 6),发现 *Ptadss* 编码的氨基酸序列均为疏水性氨基酸,因此该蛋白为疏水性蛋白。

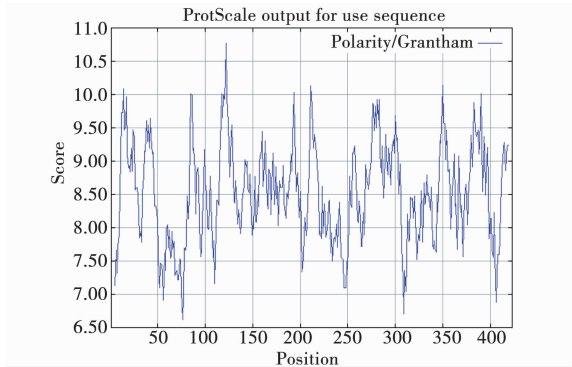


图 6 细脚拟青霉 *PtADSS* 亲水性/疏水性分析
Fig. 6 Distributing curve of hydropathy of the PtADSS from *P. tenuipes*

2.3.6 同源性分析和系统进化树分析 比对细脚拟青霉 *Ptadss* 基因推导出的氨基酸序列与其它微生物的腺苷酸琥珀酸合酶,结果显示 AdSS 的一些保守的氨基酸在细脚拟青霉和其它微生物中都存在。利用 DNAMAN 软件对细脚拟青霉 *Ptadss* 进行同源性分析显示,与其它物种比较 AdSS 蛋白与 *Cordyceps confragosa* 一致性最高,可达 91%。为了进一步了解 AdSS 蛋白与其他物种 AdSS 蛋白间的进化关系,采用 MEGA 5.0 软件的 NJ 法构建系统进化树 (图 7)。通过与 13 种微生物的 AdSS 氨基酸聚类分析发现,细脚拟青霉与 *Cordyceps confragosa* 聚为一类,亲缘关系相对较近。

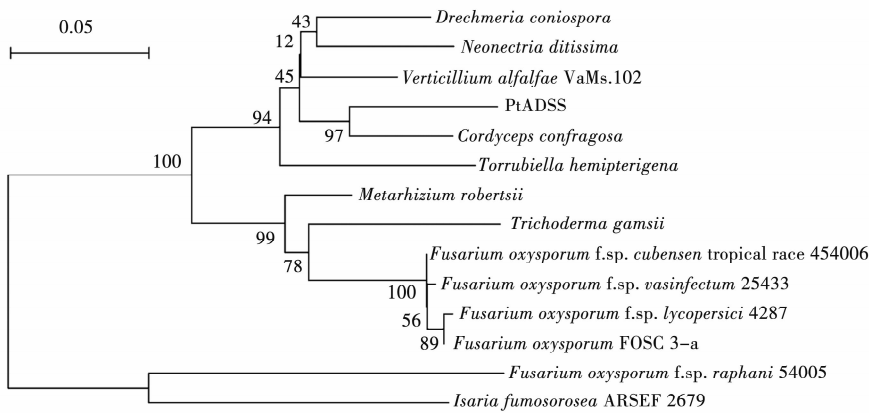


图 7 细脚拟青霉 PtADSS 与其它微生物 ADSS 氨基酸序列的系统进化分析
Fig. 7 Phylogenetic relationship of amino acid sequences between PtADSS and ADSS from other microorganism

2.4 *Ptadss* 基因表达量与细脚拟青霉腺苷含量间的关系研究

分别取培养 24、48、72、96、120 h 的细脚拟青霉菌丝体,采用 qRT-PCR 分析其菌丝体中 *Ptadss* 基因的表达量,与此同时采用 HPLC 方法检测这 5 个样本中腺苷含量,结果如图 8 所示,可见,*Ptadss* 基因表达量随着发酵时间的延长逐渐提高,而后有所降低,且与腺苷含量存在正相关性。

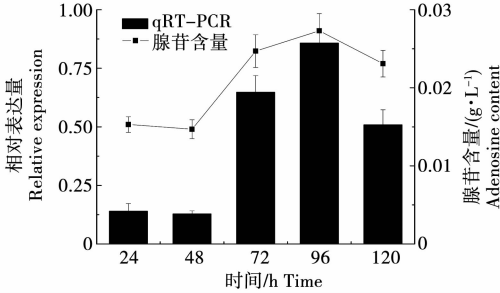


图 8 *Ptadss* 基因表达量与细脚拟青霉腺苷含量间的关系的结果

Fig. 8 Correlation analysis of expression levels of *Ptadss* gene and adenosine production in *P. tenuipes*

3 结论与讨论

细脚拟青霉因其具有多种生物活性物质和多种药理活性而受到广泛关注,是我国一种重要的药用真菌。腺苷是该菌非常重要的一种核苷类生物活性成分^[14-15],参与多种生理学及病理生理学调控中^[16-17]。其含量对于改善细脚拟青霉品质尤为重要。腺苷酸琥珀酸合酶是腺苷生物合成关键酶之一。近年来,腺苷酸琥珀酸合酶基因已经在包括枯草芽孢杆菌、小鼠、氧化铁硫杆菌等很多物种中克隆出来,但在细脚拟青霉中鲜见报道^[18-20]。

本研究基于细脚拟青霉高通量转录组测序结果,利用 PCR 方法从细脚拟青霉 RCEF4339 中克隆出 *Ptadss* 基因的 cDNA 序列。序列分析结果显示:该基因编码蛋白属于 NTP 酶蛋白亚家族,为定位于细胞质中的非跨膜的疏水性且不具有信号肽的蛋白。蛋白质修饰位点分析结果表明该预测蛋白存在 58 个磷酸化位点。结构预测该蛋白是由多个 α -螺旋和 β -转角构成的复杂结构。该在此基础上,将推导的氨基酸序列与其他已报道微生物 ADSS 氨基酸序列进行多重比对和系统进化树分析,结果表明,细脚拟青霉腺苷酸琥珀酸合酶氨基酸序列与其它微生物 ADSS 氨基酸序列差

异较大,在系统进化树分散在遗传距离较远的分支上。*Ptadss* 基因表达量分析结果表明,不同发酵时期的细脚拟青霉菌丝体中 *Ptadss* 基因的表达量有明显差异,且其表达量与腺苷含量呈正相关性。本研究结果不仅可为细脚拟青霉腺苷生物合成代谢的分子调控机制奠定基础,为采用分子育种手段改良细脚拟青霉菌种提供理论依据。

参考文献:

- [1] Che J H, Yun J W, Cho E Y, et al. Toxicologic assessment of *Paecilomyces tenuipes* in rats: Renal toxicity and mutagenic potential[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2014, 70: 527-534.
- [2] Chen X M, Lu J X, Zhang Y D, et al. Studies of macrophage immuno-modulating activity of polysaccharides isolated from *Paecilomyces tenuipes* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43: 252-256.
- [3] Kan H W, Ming L, Li C R, et al. Antidepressant effect of bioactive compounds from *Paecilomyces tenuipes* in mice and rats[J]. Neural Regeneration Research, 2010(5): 1568-1572.
- [4] Hoe C K, Bong-Suk C, Kumar S, et al. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes* [J]. Process Biochemistry, 2011, 46: 1545-1553.
- [5] Du L N, Liu C G, Teng M Y, et al. Anti-diabetic activities of *Paecilomyces tenuipes* N45 extract in alloxan-induced diabetic mice [J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 13: 1701-1708.
- [6] Mi YA, Yi S J, Sang D J, et al. Anti-hypertensive effect of the Dongchunghacho, *Isaria sinclairii*, in the spontaneously hypertensive rats [J]. Archives of Pharmacal Research, 2007, 30: 493-501.
- [7] Zhao J, Xie J, Wang L Y, et al. Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps* [J]. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 87(18): 271-289.
- [8] Ayako T, Takeshi K, Tomoyuki N. Adenosine exerts potent anticancer effects through diverse signaling pathways[J]. Personalized Medicine Universe, 2014, 3: 35-37.
- [9] Isaac K O C, Satoru K, Hiroyuki T, et al. Adenylosuccinate synthetase genes: Molecular cloning and phylogenetic analysis of a highly conserved archaeal gene[J]. Systematic and Applied Microbiology, 1998, 21: 478-486.
- [10] Wang X Y, Wang G L, Li X L, et al. Directed evolution of adenylosuccinate synthetase from *Bacillus subtilis* and its application in metabolic engineering [J]. Journal of Biotechnology, 2016, 231: 115-121.
- [11] Li X Y, Zhu Z M, Mo D L, et al. Comparative molecular characterization of ADSS1 and ADSS2 genes in pig (*Sus scrofa*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B), 2007, 147: 271-277.
- [12] Du L N, Song J, Meng L J, et al. Application of two model-

- ing methods in optimization for adenosine extraction from mycelium of *Cordyceps militaris* [J]. Advanced Materials Research, 2012, 343-344: 826-831.
- [13] 国家药典委员会. 中国药典, I 部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 75.
- [14] Du L N, Liu Y, Liu C G, et al. Acute and subchronic toxicity studies on safety assessment of *Paecilomyces tenuipes* N45 extracts [J]. Combinatorial Chemical and High Throughput Screening, 2015, 18(8): 809-818.
- [15] Hong I P, Nam S H, Sung G B, et al. Chemical components of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson [J]. Mycobiology, 2007, 35(4): 215-218.
- [16] Zhang Z, Tudi T, Liu Y F, et al. Preparative isolation of cordycepin, N⁶-(2-hydroxyethyl)-adenosine and adenosine from *Cordyceps militaris* by macroporous resin and purification by recycling high-speed counter-current chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1033-1034: 218-225.
- [17] Opeyemi J O, Yan F, Oyenike O O, et al. Neuroprotective effects of adenosine isolated from *Cordyceps cicadae* against oxidative and ER stress damages induced by glutamate in PC12 cells [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 44: 53-61.
- [18] Oivin M G, Bruce F C, Frederick B R, et al. Amplification of an adenylosuccinate synthetase gene in alanosine-resistant murine T-lymphoma cells [J]. Journal of Biological Chemistry, 1994, 269(6): 4488-4496.
- [19] Peeke Mäntsälä, Howard Z. Cloning and sequence of *Bacillus subtilis* *purA* and *guaA*, involved in the conversion of IMP to AMP and GMP [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(6): 1883-1890.
- [20] Kusano T, Takeshima T, Inoue C, et al. Identification of the *purA* gene encoding adenylosuccinate synthetase in *Thiobacillus ferrooxidans* [J]. Current Microbiology, 1993, 26(4): 197-204.

Cloning and Expression Analysis of *Ptdss* Gene from *Paecilomyces tenuipes*

DU Lin-na^{1,2}, LI Xiu-lan¹, WEI Dong-xu¹, CHEN Hong-bing¹, YAO Yu¹, YANG Jing^{1,2}

(1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Engineering Research Center of the Chinese Ministry of Education for Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Adenosine is one of most important active ingredients of *Paecilomyces tenuipes*. Adenylosuccinate synthetase is a key enzyme of adenosine biosynthesis. The cloning and sequene analysis of adenylosuccinate synthetase in *P. tenuipes* has not been reported. In this study, cloning and sequence analysis of adenylosuccinate synthetase gene was performed. Previously, based on the results of RNA-seq of *P. tenuipes*, *Ptdss* gene were identified. In this project, a pair of primers was designed and the full-length cDNA fragments of *Ptdss* gene is to be amplified using gene cloning technology. Furthermore, characters of *Ptdss* gene and encoded amino acid residue sequence were analyzed using bioinformatics method, including the physical and chemical properties, hydrophobic/hydrophilic, localizion sites in cells, signal peptide, secondary structure and teritiary structure. Then, the phylogeny evolution tree was constructed with other microorganism. Additionally, The expression level of *Ptdss* gene in *P. tenuipes* cultured different time and the relation between the expression level and the yield of adenosine were also investigated. The cloned *Ptdss* gene of *P. tenuipes* had an ORF of 1,670 bp which was predicted to encode a protein of 423 amino acids residues, including 58 phosphorylation sites. There was no signal peptide in *Ptdss*. The relative molecular weight and theoretical pI of protein are 46.7663 kDa and 5.59, respectively. In addition, subcelluar localization indicated that the prediction of protein was located in cytoplasm. Tertiary structure prediction showed that the predicated protein is mainly composed of alpha helix, β -turns, extended strand and random coil. Sequence alignment showed that predicted *Ptdss* had high consistency with adenylosuccinate synthetase gene of *Cordyceps confragosa*. Phylogenetic tree analyses showed that *P. tenuipes* is closely related to *Cordyceps confragosa*. Real-time PCR results showed that the expression of *Ptdss* gene was positively related with adenosine production. The results of this study will provide a foundation for exploring the molecular function of *Ptdss* involved in adenosine biosynthesis in *P. teuiipes*.

Keywords: *Paecilomyces tenuipes*; adenylosuccinate synthetase; cloning; sequence analysis