

菌寄生真菌纤细齿梗孢 FUS3/KSS1 类 MAPK 基因的克隆和序列分析

赵培宝^{1,2} 任爱芝² 李多川^{1*}

(1. 山东农业大学植物保护学院 山东 泰安 271018)

(2. 聊城大学植物保护系 山东 聊城 252000)

摘要: 采用 RACE 技术和 TAIL-PCR 相接合, 克隆得到菌寄生真菌纤细齿梗孢的一个丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶基因, 命名为 *omk1* (GenBank accession No. EU479712), 其 cDNA 编码区 1068 bp, 编码 355 个氨基酸的多肽; *omk1* 基因编码区包含 2 个内含子, 分别长 57 bp 和 73 bp, 内含子边界符合 GT-AG 规则。序列比对和分析显示该基因属于 FUS3/KSS1 类 MAPK 基因; RT-PCR 显示该基因在孢子萌发和菌丝生长阶段均表达。该基因的克隆将为进一步研究该菌识别寄主信号的分子机理奠定基础。

关键词: 纤细齿梗孢, 蛋白激酶, 基因克隆

Cloning and Characterization of the Gene *omk1* in Mycoparasite Fungus *Olpitrichum tenellum*, Homologous to FUS3/KSS1-type MAPK in Yeast

ZHAO Pei-Bao^{1,2} REN Ai-Zhi² LI Duo-Chuan^{1*}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China)

(2. Department of Plant Protection, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252000, China)

Abstract: As an important signaling molecule, protein kinases participate in signal transduction by phosphorylating target substrates, and play important roles in the processes of perceiving environmental stimuli, cell differentiation and fungal growth. By using 3'RACE and TAIL-PCR, a protein kinase gene named *omk1* (GenBank accession number: EU479712) was cloned and characterized from mycoparasite fungus *Olpitrichum tenellum*. The *omk1* gene encodes 355 aa and contains two introns (57 bp and 73 bp, respectively). Phylogenetic analysis indicated that OMK1 is most similar to other fungal FUS3/KSS1-type MAP kinase and has signature sequences characteristic of serine-threonine kinases. RT-PCR analysis showed that the gene *omk1* transcribed in the phases of both spore germination and hyphal growth.

Keywords: *Olpitrichum tenellum*, MAP kinase, Gene cloning

蛋白激酶是生物中普遍存在的一类信号分子,由蛋白激酶和磷酸酶催化的蛋白质可逆磷酸化是细胞信号转导的基本和重要方式^[1]。蛋白激酶包括多种类型,其中丝氨酸-苏氨酸类蛋白激酶是最重要的一类,又可分为蛋白激酶A(PKA)、蛋白激酶C(PKC)及有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)等几种类型,该类蛋白激酶组成了丝状真菌的信号转导网络,在真菌感受外界刺激、生长发育与形态建成、孢子产生与萌发等生命过程中具有重要作用^[2]。近些年MAPK 信号转导途径受到了广泛关注,该信号通路在真核生物中是相当保守的,通常组成 MAPKKK-MAPKK-MAPK 级联放大通路。研究发现在啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中至少有 5 条 MAPK 信号途径,根据 MAPK 基因的不同将其分为 FUS3、KSS1、Slt2、Hog1 和 Smk1 信号途径,其中 FUS3 和 KSS1 在功能上冗余,有人将这两条途径归为一类^[3]。

菌寄生是指发生在真菌之间的一种寄生现象,是自然界普遍存在的真菌间的相互作用形式,菌寄生真菌依据寄生方式可分为活体菌寄生真菌和死体菌寄生真菌^[4]。深入研究菌寄生真菌和寄主真菌之间的识别和识别信号的传导对于了解微生物间的相互作用具有重要理论意义。纤细齿梗孢(*Olpitrichum tenellum*)是一种接触型活体菌寄生真菌,其寄主包括轮枝镰孢(*Fusarium verticillioide*)、链格孢(*Alternaria alternata*)等十几种真菌,本实验室研究发现其分生孢子萌发需要来自寄主细胞壁多糖的刺激,并分离得到一种来自轮枝镰孢的凝集素能促进其孢子萌发^[5-6]。推测凝集素可能作为一种信号配体与孢子表面受体结合,引起信号传导,启动下游萌发相关基因表达,产生寄生行为。笔者拟通过对菌寄生真菌纤细齿梗孢中与信号传导有关的蛋白激酶基因的克隆和功能分析来对此进行深入探讨。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

纤细齿梗孢 OL1 菌株由本实验室采用单胞分离并保存;在添加轮枝镰孢细胞壁提取物作为营养因子的 PDA 和 PDB 培养基上培养。

1.2 酶和生化试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒、*Taq* 酶、限制性内切酶及其他工具酶、DEPC、Tris、

IPTG、X-gal、氨苄青霉素、DNA Marker DL2000 等试剂购自宝生物(TaKaRa)公司, DNA Marker Plus2000 购自全式金公司,胶回收试剂盒购自上海生工公司,质粒提取试剂盒购自 Omega 公司,其他化学试剂均为国产分析纯。

1.3 基因组 DNA 和总 RNA 的提取

过滤收集 PDB 中培养 3-4 d 菌丝,分别采用 CTAB 法和 Trizol 法提取该菌的基因组 DNA 和总 RNA。

1.4 *omk1* 基因的克隆

1.4.1 *omk1* 基因 3'端序列的扩增:通过 GenBank 下载几种丝状真菌 FUS3/KSS1 类 MAPK 基因,根据该类基因的保守区氨基酸序列,设计 2 条兼并引物(MK1: gctcygcsathcayaagcc; MK2: ccyttcgaycaytccatgt)。Trizol 法提取其总 RNA,采用宝生物(TaKaRa) RT-PCR 试剂盒进行巢式 3'RACE。首先以 MK1-M13M4 为引物进行第 1 次 PCR,条件为: 94°C 4 min; 94°C 1 min, 47°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。然后以第 1 轮 PCR 产物为模板,以引物 MK2-M13M4 进行第 2 轮 PCR,反应条件为: 94°C 4 min; 94°C 1 min, 47°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。回收所得产物进行测序。

1.4.2 *omk1* 基因 5'端序列的扩增:根据获得的 3'端序列设计嵌套引物,并参照资料合成随机引物 AD₁-AD₅^[7],以该菌基因组 DNA 为模板,分别以 AD₁-AD₅ 混合物作为上游引物,以嵌套特异引物为下游引物,运用 TAIL-PCR 来克隆基因的 5'端序列。TAIL-PCR 第 1 轮循环: 95°C 3 min; 95°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 1.5 min, 5 个循环; 95°C 1 min, 30°C 1 min, 72°C 1.5 min; 95°C 1 min, 44°C 1 min, 72°C 1.5 min, 3 个循环; 95°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 1.5 min, 95°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 1.5 min, 95°C 1 min, 44°C 1 min, 72°C 1.5 min, 12 个循环; 72°C 6 min。第 2、3 轮循环: 95°C 1 min, 61°C (59°C) 1 min, 72°C 1 min; 95°C 1 min, 61°C (59°C) 1 min, 72°C 1 min; 95°C 1 min, 44°C 1 min, 72°C 1 min, 12 个循环; 72°C 6 min。回收所得的特异条带产物进行测序。

1.4.3 *omk1* 全长 DNA 和 cDNA 序列的扩增:以所得序列来设计基因特异引物,分别以基因组 DNA 和 cDNA 为模板来扩增该基因的 DNA 和 cDNA 完整片

段, 验证拼接所得基因的正确性。PCR 扩增条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。

1.5 *omk1* 同源性比对与预测蛋白的结构及功能分析

采用 DNAMAN 软件对基因及其编码蛋白进行同源性比对和系统进化树分析; 采用 NCBI 的 BLAST 软件预测蛋白的保守结构域; 采用 DNAMAN 预测蛋白的二级结构。

1.6 基因表达分析

分别分离萌发的孢子和生长的菌丝, 提取其 RNA, 通过两步法 RT-PCR, 分析其表达情况, 以不

加 RNA 的作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 *omk1* 基因的克隆

2.1.1 3'cDNA 序列的扩增: Trizol 法提取该菌总 RNA, 采用宝生物 RT-PCR 试剂盒反转录得到其 cDNA, 经巢式 PCR 扩增得到一特异的条带, 见图 1A, 经回收、测序后进行分析, 找到了上、下游引物、PolyAAA 结构和终止密码子 TAG, 比对发现与 MAPK 基因具有较高的同源性, 证明我们得到了一蛋白激酶基因的 3'端 cDNA 序列。

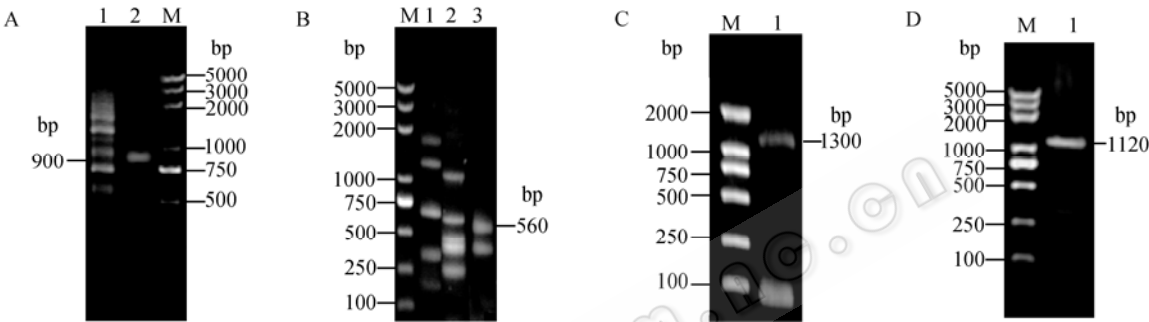


图 1 基因 *omk1* PCR 产物的琼脂糖电泳

Fig. 1 Agarosegel electrophoresis of PCR products

注: A: 3'RACE 产物的琼脂糖凝胶电泳(1: 3'RACE 第 1 轮 PCR 产物; 2: 3'RACE 第 2 轮 PCR 产物); B: TAIL-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳(1: 第 1 轮 PCR 产物; 2: 第 2 轮 PCR 产物; 3: 第 3 轮 PCR 产物); C: DNA 克隆的琼脂糖凝胶电泳; D: cDNA 克隆的琼脂糖凝胶电泳 (M: Marker DL2000 or marker DLplus 2000)。

Note: A: Agarosegel electrophoresis of the 3'RACE product (1: Product of the 1st cycle PCR; 2: Product of the 2nd cycle PCR); B: Agarosegel electrophoresis of the TAIL-PCR product (1: The primary PCR product; 2: The secondary PCR product; 3: The tertiary PCR product); C,D: Agarosegel electrophoresis of the DNA or cDNA clone (M: Marker DL2000 or marker DLplus 2000)。

2.1.2 蛋白激酶基因 *omk1* 5'端序列的克隆: 根据所得 3'端序列设计 5'TAIL-PCR 嵌套引物 OMT1、OMT2 和 OMT3(表 1), 并合成随机引物 AD1-AD5。经过 3 轮 TAIL-PCR 反应, 得到一特异性条带, 见图 1B, 切胶回收后测序, 经比对后找到了重叠区和蛋白激酶同源序列, 证明得到了该蛋白激酶基因的 5'端序列。

2.1.3 基因 *omk1* 的 DNA 和 cDNA 序列的获得: 为

了证实所得上下游片段来自同一基因, 依据所得序列设计引物 OMKS 和 OMKX (表 1), 分别以该菌的基因组 DNA 和 cDNA 为模板来扩增基因 *omk1*。经扩增均得到的预期长度的条带(图 1C、1D)。分别切胶回收两特异条带进行测序, 经比对证明得到了基因 *omk1* 自 ATG 到 TAG 的 DNA 和 cDNA 序列, 全长 ORF 为 1068 bp, 编码 355 个氨基酸残基的多肽; 自 ATG 到 TAG 的 DNA 全长 1198 bp, 包含 2 个内含子, 第 1 个内含子自 114 bp 到 170 bp, 长度为 57 bp, 第 2 个内含子自 747 bp 到 819 bp, 长度 73 bp, 内含子边界符合 GT-AG 规则。

2.2 同源性比对与预测蛋白的结构及功能分析

将所得基因 *omk1* 的核苷酸及其预测的氨基酸序列在 GenBank 上进行 BLAST, 发现它们与酵母及真菌中 MAPK 基因高度同源。图 2A 为利用

| 表 1 PCR 引物 Table 1 PCR specific primers | |
|--------------------------------------------|--------------------------|
| Name | Sequence (5'→3') |
| OMT1 | GCGCAAGACCGAAGTCGCAAACCT |
| OMT2 | GCAGTTTCATCTCGCGCAGTGTAC |
| OMT3 | CGCAAACAAAACATGGAGTGGTCG |
| OMKS | GCACCATTTGAGACCATC |
| OMKX | CCGAATACAAGACAGGGAT |

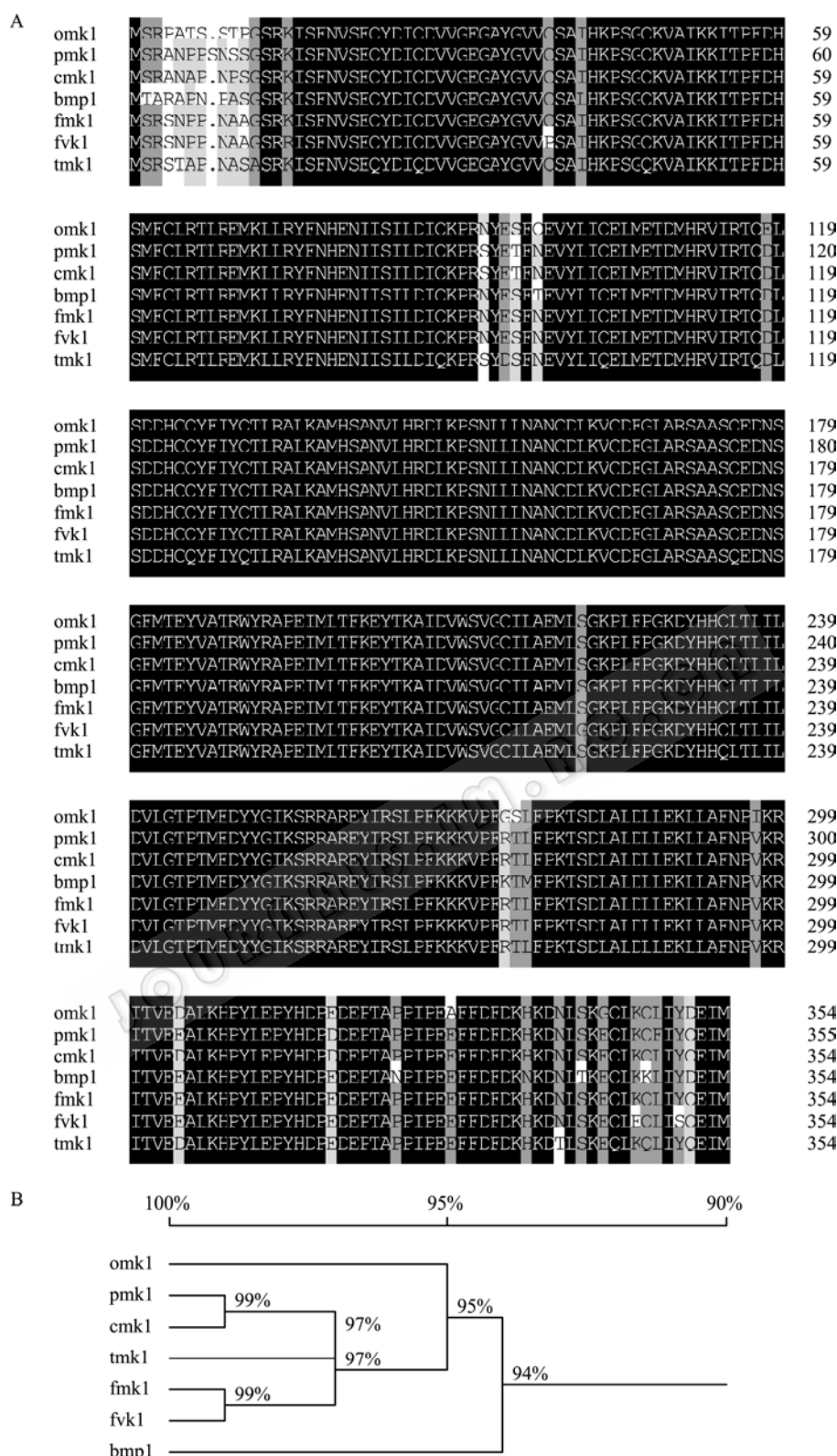


图2 OMK1与真菌 Fus3/Kss1 类蛋白激酶同源性比对及系统进化树分析

Fig. 2 Amino acids sequence alignment and phylogenetic analysis of OMK1 and the other fungal protein kinases

注: A: 同源性比对; B: 系统进化分析(fvk1: EU417814, 轮枝镰孢 *Fusarium verticillioides*; fmk1: AAG01162, 尖镰孢菌 *Fusarium oxysporum*; pmk1: XP-364720, 稻瘟菌 *Magnaporthe grisea*; bmp1: AF205375, 灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*; cmk1: AF174649, 瓜类炭疽菌 *Colletotrichum lagenarium*; tmk1: AAM69918, 深绿木霉 *Trichoderma atroviride*).

Note: A: Amino acids sequence alignment; B: Phylogenetic analysis (fvk1: EU417814, *Fusarium verticillioides*; fmk1: AAG01162, *Fusarium oxysporum*; pmk1: XP-364720, *Magnaporthe grisea*; bmp1: AF205375, *Botrytis cinerea*; cmk1: AF174649, *Colletotrichum lagenarium*; tmk1: AAM69918, *Trichoderma atrovirides*).

DNAMAN 上 Multiple sequence alignment 程序与几种丝状真菌的 FUS3/KSS1 类 MAPK 比对结果。并进行了 OMK1 与几种丝状真菌蛋白激酶的同源系统树分析(图 2B)。

由同源性比对及同源系统树分析可看到, 所得到的蛋白激酶基因 *omk1* 的氨基酸序列与丝状真菌中 FUS3/KSS1 类基因序列高度同源, 同源性均在 90% 以上, 同时发现该类蛋白激酶在生物进化过程中高度保守, 可能对生物完成生长发育等生命过程具有重要作用。

2.3 两基因预测蛋白的结构和功能分析

2.3.1 保守结构域分析: 利用 NCBI 的 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>)

进行了 *omk1* 预测蛋白的结构域分析, 结果如图 3 所示, 发现该蛋白中含 Ser/Thr 蛋白激酶的保守结构域, 说明该蛋白属于 Ser/Thr 类蛋白激酶。

2.3.2 二级结构预测: 采用 DNAMAN 相关程序和网站在线预测该蛋白激酶基因的二级结构 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl) 预测, 结果如图 4 所示。

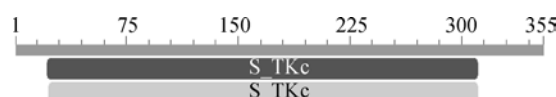


图 3 *omk1* 预测蛋白的保守结构域

Fig. 3 Conserved domains on predicted protein of *omk1* gene

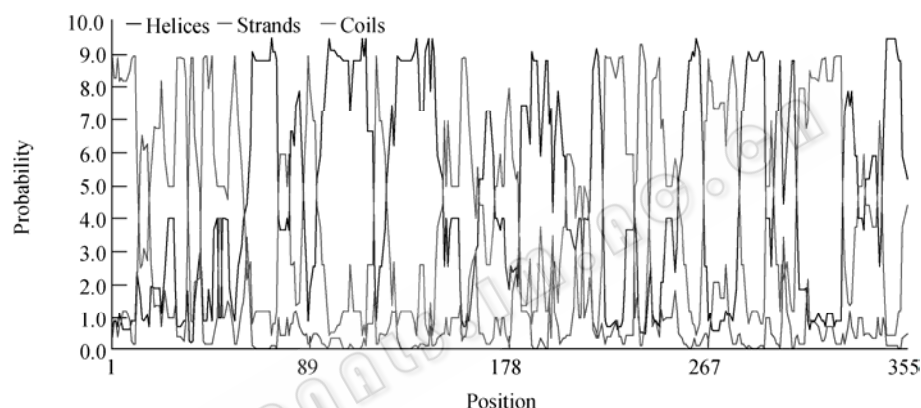


图 4 *omk1* 预测蛋白的二级结构

Fig. 4 Secondary structure prediction protein of *omk1* gene

由图 4 可得知 OMK1 基因预测蛋白以 α 螺旋为主, 占 50.70%, β 折叠(E: extended sheet)仅占 3.10%, 无规卷曲占 46.20%。

2.4 基因转录情况分析

分别对萌发的孢子和生长的菌丝进行该基因的 RT-PCR, 结果发现该基因在萌发的孢子和生长的菌丝中均表达(图 5), 而不添加 RNA 的对照则没有相应条带, 表明该基因对菌丝生长和孢子萌发可能都是必要的, 进一步的功能分析将通过基因的缺失突变来研究。

3 讨论

生物细胞在整个生长发育过程中, 要受到多种内在因素和外在因素, 如激素、光、温度、水分及生物因子的影响, 细胞必须能够正确地辨别和接受各种信息并做出反应, 以便确保其正常的生长和发

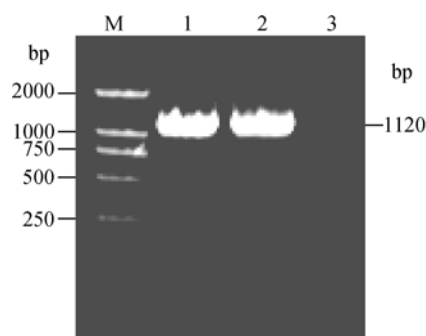


图 5 基因 *omk1* 的转录分析

Fig. 5 RT-PCR of *omk1*

注: 1: 萌发的孢子; 2: 菌丝; 3: 阴性对照; M: Marker DL2000.

Note: 1: DNA from germinating spore; 2: DNA from mycelium; 3: Control; M: Marker DL2000.

育^[8]。蛋白激酶是生物体内一类重要的信号分子, 通过对底物蛋白的磷酸化来参与信号传导, 其中丝氨酸-苏氨酸类蛋白激酶是最主要的一类, 它们组成了丝状真菌信号转导网络, 可能对真菌感受光温刺激

和识别寄主信号等具有重要作用。作者试图从蛋白激酶基因切入,来了解菌寄生真菌纤细齿梗孢识别寄主信号、实现寄生的分子机理。截止到目前,作者已克隆得到该菌的2个蛋白激酶基因 *opk1* (GenBank accession No. EU417815)和 *omk1*, 分别属于 PKA 类和 FUS3/KSS1 类 MAPK。本文对 *omk1* 进行了克隆研究,初步分析表明该基因在孢子萌发和菌丝生长阶段均能表达,可能对孢子萌发和菌丝生长均具有重要作用,与前人研究的植物病原真菌中该类激酶与识别寄主信号产生附着胞等有关结果相符合。下一步我们将通过构建基因缺失突变体来探讨其在该菌识别寄主和完成寄生过程中的作用。

参 考 文 献

- [1] Martin BD, Oded Y. Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet and Biol*, 1999, **26**(3): 99–117.
- [2] Lee N, D'Souza CA, Kronstad JW. Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. *Annu Rv Phytopathol*, 2003, **41**(4): 399–427.
- [3] Takano Y, Kikucki T, Kubo Y, et al. The *colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact*, 2000, **13**(2): 374–383.
- [4] Jeffries P. Mycoparasitism within the zygomycetes. *J Linn Soc Bot*, 1985, **91**(3): 135–150.
- [5] Li DC, Shi CK, Wang HH, et al. Cell wall polysaccharide from *Fusarium moniliforme* activates spore germination of the mycoparasite *Olpitrichum tenellum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2004, **23**(3): 34–36.
- [6] Zhang CS, Li DC, Kong FY. Purification and characterization of a lectin from the fungus *Alternaria alternata* mycelia cell walls. *Acta Phytopathologica Sinica* (in Chinese), 2004, **23**(2): 132–138.
- [7] 罗丽娟, 施季森. 一种 DNA 侧翼序列分离技术—TAIL-PCR. 南京农业大学学报, 2003, **27**(4): 87–90.
- [8] Klaus BL, Robert CD, Cletus DS, et al. Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. *Annu Rv Phytopathol*, 2003, **41**(5): 399–427.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。