

粟弯孢霉叶斑病菌 G 蛋白 β 亚基基因克隆及表达

司贺龙¹, 佟亚萌¹, 郝志敏¹, 李志勇², 王楠³, 董志平², 董金皋¹

(1. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省农林科学院 谷子研究所, 河北 石家庄 050035; 3. 河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050024)

摘要:旨在获得粟弯孢霉叶斑病菌 G 蛋白 β 亚基基因, 明确其表达模式, 为阐明该基因对粟弯孢霉叶斑病菌致病性的调控机制奠定基础。运用 SMART RACE RT-PCR 技术, 克隆粟弯孢霉叶斑病菌 G 蛋白 β 亚基基因 *ClgB* 全长 cDNA 序列, 以 qRT-PCR 技术, 对该基因在粟弯孢霉叶斑病菌不同生长时间的表达特征进行分析。结果表明, *ClgB* 基因 cDNA 编码区为 1 056 bp, DNA 包含 4 个内含子和 5 个外显子, 编码 351 个氨基酸。该基因的 cDNA 序列在 GenBank 中注册的登录号为 JQ768316。qRT-PCR 结果表明, *G β* 基因在菌株生长过程中表现出前期表达量较低而后期表达量明显升高的趋势。构建了 pET28(a)-*ClgB* 原核表达载体, 经 IPTG 诱导, 目的蛋白在宿主菌 *E. coli* BL21 中获得表达, 表达产物分子量与 *ClgB* 蛋白计算分子量一致。

关键词: 粟弯孢病菌, G 蛋白 β 亚基, qRT-PCR, 原核表达

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)04-0007-06

Molecular Cloning and Expression of G Protein β Subunit Gene of *Curvularia lunata*

SI He-long¹, TONG Ya-meng¹, HAO Zhi-min¹, LI Zhi-yong²,
WANG Nan³, DONG Zhi-ping², DONG Jin-gao¹

(1. College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Millet Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050035, China; 3. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

Abstract: In order to make a foundation for illustrating the pathogenic mechanism of G protein beta-subunit in *Curvularia lunata*, this research focuses on acquiring the gene encoding *G β* subunit in *C. lunata* and exploring its expression pattern. The full-length cDNA of G-protein beta-subunit was cloned using SMART RACE RT-PCR, and the expression pattern of *ClgB* gene was analyzed under different growth time using Real-time PCR. The full-length cDNA of *ClgB* was 1 056 bp and encoded 351 amino acids, while its DNA contained 4 introns and 5 exons. The cDNA sequence of *ClgB* had been deposited in GenBank with accession number JQ768316. The results of Real-time PCR indicated that the gene expression level of G-protein beta-subunit is lower at early stage and higher at later stage. We constructed the prokaryotic expression vector pET28(a)-*ClgB*, and *E. coli* BL21 was transformed by this recombinant construct and induced by IPTG. The molecular weight of the expression product was identical with the calculated molecular weight of *ClgB*.

Key words: *Curvularia lunata*; G protein beta-subunit; Real-time quantitative PCR; Prokaryotic expression

植物病原真菌识别寄主、侵入寄主和在寄主中扩展与繁殖需要识别寄主和环境的信号, 而异源三聚体鸟苷酸结合蛋白(G 蛋白)在这一过程中起重

要作用^[1-2]。G 蛋白是由 $G\alpha$ 亚基、 $G\beta$ 亚基和 $G\gamma$ 亚基组成, 病菌 G 蛋白偶联受体(GPCR)接收到寄主及环境信号后激活 G 蛋白, G 蛋白解聚为 $G\alpha$ 亚

收稿日期: 2014-05-12

基金项目: 谷子产业技术体系项目(CARS-07-12.5-A8); 国家自然科学基金项目(31271787; 31301616)

作者简介: 司贺龙(1975-), 男, 河北蔚县人, 在读博士, 主要从事分子植物病理学研究。司贺龙、佟亚萌为同等贡献作者。

通讯作者: 李志勇(1976-), 男, 河北邯郸人, 副研究员, 博士, 主要从事分子植物病理学研究。

董金皋(1963-), 男, 河北平乡人, 教授, 博士, 主要从事分子植物病理学研究。

基和 $G\beta$ 、 $G\gamma$ 亚基构成的二聚体,进而激活下游一系列信号传导调控基因^[3-4]。由于 $G\beta$ 亚基蛋白在植物病原真菌进化中相对保守,所以可以利用基因同源性的 PCR 扩增技术克隆 $G\beta$ 亚基基因,进而通过反向遗传学研究其功能^[5]。目前,已克隆得到了很多植物病原真菌 $G\beta$ 基因,并研究了其基因功能,如在玉米小斑病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 中 $G\beta$ 基因调控病菌致病性、有性生殖及菌形态建成,而大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) $G\beta$ 基因不仅调控病菌致病性、菌核形成及孢子产生,还负责调控病菌乙烯的产生^[6-7]。小麦颖枯病菌 (*Stagonospora nodorum*) $G\beta$ 亚基缺失突变体在小麦上致病力减弱,在正常生长条件下不能形成子座和孢子^[8]。小麦赤霉 (*Gibberella zeae*) $G\beta$ 亚基缺失突变体致病力减弱,在培养基上生长变缓,而毒素 DON 和 ZEA 产生量大幅增加,但在大丽轮枝菌 (*Fusarium verticillioides*) 中 $G\beta$ 亚基缺失突变体产 Fumonisin B 毒素量急剧下降^[9-11]。粟弯孢霉叶斑病为谷子生长后期的一种重要叶部病害,引起该病害的病菌为新月弯孢 (*Curvularia lunata*)。病害发生严重时病斑愈合而引起叶片枯死,在空气湿度较大时还可以引起谷穗霉变,对谷子产量及品质有较大的影响。近年来随着夏谷区谷子密植的推广,该病害在局部区域有加重的趋势。目前生产上尚未发现抗病品种,因此,亟需针对该病原对寄主的致病机制开展研究,以利于寻找有效的病害防治策略。本研究拟克隆粟弯孢霉叶斑病菌 $G\beta$ 基因,研究其结构及表达规律,并在大肠杆菌中异源表达,为深入研究该基因的功能、寻找其下游效应蛋白,进而加深对粟弯孢霉叶斑病菌致病机理的理解、有效防控粟弯孢霉叶斑病奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与试剂

粟弯孢霉叶斑病菌 Cl-10 由河北省农林科学院谷子所植保室保存。pMD19-T 载体、AMV 反转录酶、荧光定量 PCR 反应混合液 (SYBR Premix Ex Taq II) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa), TRIzol 试剂 (Invitrogen)、SMART RACE cDNA Amplification 试剂盒 (Clontech), 引物合成和 DNA 测序委托上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 $CIG\beta$ 基因的克隆与生物信息学分析

1.2.1 真菌 RNA 和 DNA 的提取 接种粟弯孢霉叶斑病菌 Cl-10 在液体 PD 培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗静置培养 6 d 后收集培养基上面菌盘,用灭菌滤纸压干后保存在 -80°C 冰箱待用。根据 TRIzol 总 RNA

提取说明书提取粟弯孢霉叶斑病菌的总 RNA。利用微量分光光度计及电泳检测提取 RNA 质量,符合质量的 RNA 反转录合成第一链 cDNA。根据常规 CTAB 法提取粟弯孢霉叶斑病菌的基因组 DNA。

1.2.2 粟弯孢霉叶斑病菌 $CIG\beta$ 基因 cDNA 全长序列的克隆 根据玉米小斑病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*)、玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 和小麦颖枯壳病菌 (*Phaeosphaeria nodorum*) $G\beta$ 基因编码的氨基酸保守位点,设计 1 对简并引物 $G\beta$ -F1 5'-GTYATGACGTGYGCVTACTC-3'、 $G\beta$ -F2 5'-CRTCGTCKGABCCMGTVCCA-3' 用于扩增 $G\beta$ 基因同源片段。根据克隆的 $G\beta$ 基因片段部分序列,设计基因特异引物 $G\beta$ -5R 5'-CGAGATCCCACAGCACGCACG TCA-3' 和 $G\beta$ -3R 5'-GCAGACTTTTGCCGCCACG ACT C-3',以 RACE 试剂盒合成的第一链 cDNA 为模板,利用引物 UPM/ $G\beta$ -5R 和 UPM/ $G\beta$ -3R 分别进行 5' 和 3' 两端 PCR 扩增。PCR 反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,经过 35 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。以粟弯孢霉叶斑病菌提取的基因组为模板,设计 1 对基因特异引物 $G\beta$ -F 5'-ATGGCCGACATGAACCAAGA-3' 和 $G\beta$ -R 5'-TTAGGCCAGATGCGCAG-3',利用引物 $G\beta$ -F/ $G\beta$ -R 扩增粟弯孢霉叶斑病菌 $G\beta$ 基因全长。PCR 反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,经过 35 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

PCR 产物切胶回收后与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞,挑选阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序,获得其 DNA 序列。利用 DNAMAN 5.0 软件分析拼接粟弯孢霉叶斑病菌 $G\beta$ 基因,把拼接好的 $G\beta$ 基因序列在 GenBank 上注册,并获得基因登录号。在 <http://ncbi.nlm.nih.gov> 分析粟弯孢霉叶斑病菌 $G\beta$ 基因与其他植物病原真菌 $G\beta$ 基因相似性,并利用 Swisspro 和 ExPasy 在线软件分析其保守结构域。

1.3 $CIG\beta$ 基因表达分析及原核表达

配制孢子浓度为 1×10^6 个/mL 粟弯孢霉叶斑病菌孢子悬浮液,取 400 μL 孢子悬浮液滴加到铺有玻璃纸的 PDA 培养基上,用灭菌玻璃涂棒涂布均匀,28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养,分别收集培养 2,3,4,5,6 d 的菌丝,利用 TRIzol 试剂提取各时间点样品的总 RNA,纯化去除基因组污染后,利用微量分光光度计测量各样品 RNA 浓度,调节浓度一致后反转录合成第一链 cDNA。

利用 Premier 5.0 设计 $CIG\beta$ 基因特异引物 q $G\beta$ -F 5'-CGGTAGCCTTTTCCGTTTCC-3' 和 q $G\beta$ -R 5'-

GCACTCAAAGTCGTCGTAACCA-3'。同时选取粟弯孢霉叶斑病菌三磷酸甘油醛脱氢酶基因作为内参基因,引物序列为 *GAPDH*-F 5'-AGACCGTCCGCTTC-CACAT-3' 和 *GAPDH*-R 5'-GTCCGCAGAAGGAG-CAGAGA-3'。反应在 STEPONE(AB) 实时荧光定量 PCR 仪上进行。20 μ L PCR 扩增体系含:10 μ L 2 \times SYBR Premix Ex *Taq*, ROX 和上下游引物终浓度为 0.2 μ mol/L,模板 cDNA 2 μ L,加水至 20 μ L,每个样品重复 3 次。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s;经过 40 个循环(95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 30 s)。采用比较 Ct 值法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)分析粟弯孢霉叶斑病菌 *G β* 基因在不同发育时间表达规律。

利用 Premier 5.0 设计 *Clg β* 基因原核表达的特异引物 *Clg β* -Ep-F: 5'-GAATTCATGGCC GACAT-GAACCAAGA-3' 和 *Clg β* -Ep-R: 5'-GCGGCCGCATT-AGGCCAGATGCGCAG-3',扩增粟弯孢霉 *Clg β* 基因开放阅读框,扩增产物回收后与 pMD19-T 载体连接过夜,通过热激法转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,菌落 PCR 法筛选阳性克隆。用碱裂解法提取阳性克隆质粒,利用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切带有 *Clg β* 基因开放阅读框的阳性质粒和 pET28a(+) 载体,回收酶切产物后连接,转化表达宿主菌 *E. coli* BL21 菌株。通过菌落 PCR 及 *EcoR* I、*Not* I 双酶切鉴定阳性克隆。

把带有 pET28-*Clg β* 重组质粒的 *E. coli* BL21 菌株在 LB 培养基中扩繁过夜,吸取 5 mL 扩繁菌液接种到 250 mL LB 液体培养基中。37 $^{\circ}$ C 220 r/min 振荡培养到对数生长期后加入 IPTG,使其终浓度达到 1 mmol/L,诱导培养 8 h 和 12 h 后取样,利用常规 SDS-PAGE 电泳检测 *Clg β* 蛋白表达。

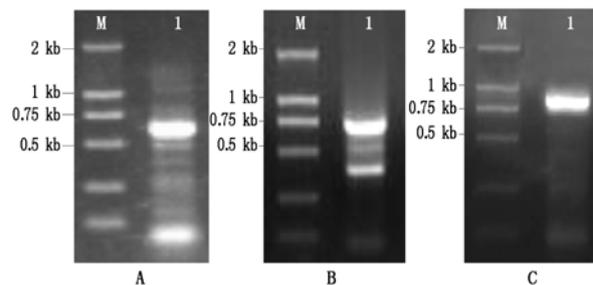
2 结果与分析

2.1 *Clg β* 基因的克隆和生物信息学分析

利用简并引物 *G β* -F1 和 *G β* -F2,以粟弯孢霉叶斑病菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,测序得到一条长 540 bp 的序列(图 1-A)。将该片段与 GenBank 中的序列进行 Blast 比对,发现它与其他丝状真菌的 G 蛋白 β 亚基基因同源性很高。初步证实扩增产物为粟弯孢霉叶斑病菌 G 蛋白 β 亚基基因片段。

根据得到的粟弯孢霉叶斑病菌 *G β* 基因同源片段设计特异引物 *G β* -5R 和 *G β* -3R,采用 5'-RACE 和 3'-RACE 技术分别扩增粟弯孢霉叶斑病菌 *G β* 基因的 5'端和 3'端,所得扩增产物经测序长度分别为 0.71 kb(图 1-B)和 0.82 kb(图 1-C)。利用 DNA-

MAN 5.0 软件拼接粟弯孢霉叶斑病菌 *G β* 基因,得到 1 056 bp 的全长 cDNA 序列。经过 Blast 比对,发现其核苷酸序列与大斑病菌(*Setosphaeria turcica*, GenBank 登录号: JN019784)、异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*, GenBank 登录号: AY211190)、偃麦草核腔菌(*Pyrenophora tritici-repentis*, GenBank 登录号: XM_001936292)、十字花科陈小球腔菌(*Leptosphaeria maculans*, GenBank 登录号: XM_003840094) G 蛋白 β 亚基基因的同源性分别为 93%,92%,91%,87%。把该 *G β* 基因序列命名为 *Clg β* 并在 GenBank 上注册,获得基因登录号为 JQ768316。



A. 基因同源片段克隆;B. 5'-RACE 扩增片段;C. 3'-RACE 扩增片段;M. DL2000 Marker。
A. Cloning of gene homologous fragment;B. Amplified fragment of 5'-RACE;C. Amplified fragment of 3'-RACE;M. DL2000 DNA Marker.

图 1 粟弯孢霉叶斑病菌 *G β* 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification of G-protein beta-subunit gene in *Curvularia lunata*

通过 *Clg β* 基因全长 DNA 序列和 cDNA 序列对比,发现 *Clg β* 含有 5 个外显子和 4 个内含子,内含子长度分别为 60,64,51,52 bp,其中第一条位于编码区的上游,其余 3 条均位于编码区的下游区域,每个内含子 5'和 3'两端总为 GT 和 AG,但是内含子 5'端前 3 个核苷酸都是 GTA,而不是 GTG。*Clg β* 基因编码区共编码 351 个氨基酸,编码产物预测分子量为 39.11 kDa,预测等电点为 6.37。将氨基酸序列在 GenBank 上进行 Blast,结果表明,该氨基酸序列与其他物种已知 G 蛋白 β 亚基的相似性很高,其中与异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*, AAO25585)、十字花科小球腔菌(*Leptosphaeria maculans*, XP_003840142)、菜豆壳球孢(*Macrophomina phaseolina*, EKG16879) G 蛋白 β 亚基基因的相似性分别为 99%,99%,95%。利用 Swissplot 和 ExPasy 在线软件分析其保守结构域和二级结构,发现粟弯孢霉叶斑病菌 *G β* 基因编码的蛋白含有 2 个腺苷酸环化酶结合区域 TTNKVHAIPLRSSWVMTCA Y(氨基酸残基 96 ~ 115)和 ACGGLDNICSIYNLSAREGPT(氨基酸残基 123 ~ 143),第 1 个区域与其他真菌的腺苷酸环化酶结合区域完全一致,而第 2 个结合区

域仅有 4 个氨基酸不同(图 2)。二级结构分析表明, Clgβ N-端第 4 ~ 40 个氨基酸构成卷曲螺旋 (Coiled-coil), 还发现 7 个典型的 G 蛋白 β 亚基

WD-40 重复结构。该序列编码产物含有 RPEL、CP12、SCP、HALZ、ELK 和 GPS 6 个功能结构域。

```

GGTCGACGGCCCGGGCTGGTGGGCGCTCTGTAACTCGCCATCTCCAAAGCCCTCGCGTCCCTTCC
CATCCTCACGACCCACGACCGTCTGCTCTCTGCCAGCCGCCGAACCTCCGCGCCAGCAATTGAC
TTGCTCTGCGCGCTCTCTCTTTCTGCTGTCGCTGCTGACGCTTGTCCATCACTTTCTCAGGTGCCG
CCTCACCCGCCGGCTCCACGTGCTTCTTCGCACGCCCTGGATCCGCCGCTTCGCCCTTTCGCGCC
TCCAGCCATCTGCATCTGTCCACCACCACCACCCTGCCCATGGCCGACATGAACCAAGAGACCATA
M A D M N Q E T I
CAGCAGAAAGATCCAGCTCGCCCGTCCGACGCCGAGGCGCTCAAGGACCGGATAAAGCGCAAGAAG
Q Q K I Q L A R R D A E A L K D R I K R K K
GACGAGCTTGTGATACCACCCgtactgccccctcaaacacagtcctctgcatgtccaactgtaacaccccgctccagTTCGC GATG
D E L A D T T L R D
TCGCCGCGACCCGCTTGAGGCCCTGCCGCGCTCACCATGGAGACGAAGCGCACCCCAAGGGCCA
V A R D R V E A L P R L T M E T K R T L K G H
TCTCGCAAGATCTACGCGATGATTTGGTCCGACGGACCCGCCATCTCGTCTCGGCCTCGCGAGCG
L A K I Y A M H W S T D R R H L V S A S Q D
GCAAGTCTATCTGGGACGCTACACGACAAACAAGTCCACGCCATCCCTTCGCGTCTCCTGTGG
G K L I I W D A Y T T N K V H A I P L R S S W
GTCATGACGTGCGCTACTCGCCCTCGGGCAACTACGTCGCTGCGGTGGTCTCGACAACATCTGCTC
V M T C A Y S P S G N Y V A C G G L D N I C S
CATCTACAACCTGTCCGACGGGAAGGCCACACGCGTCCGCCGCGAGCTGTCTGGCCACTCGGGC
I Y N L S A R E G P T R V A R E L S G H S G
TACCTCAGTGTGCGCTTATCAGCGACAAGCGCATCCTACATCGTCCGGCGACATGACGTGCGT
Y L S C C R F I S D K R I L T S S G D M T C V
GCTGTGGGATCTGAGACGGGCTCCAAGGTCCACGAGTTCGCCGACCATCTCGGAGACGTCATGAGC
L W D L E T G S K V H E F A D H L G D V M S
CTGAGCATCAACCGCTCGACCACAACAGTTGTGTCTGGCGCGTGCATGCCCTTGCCAAGCTGTG
L S I N P L D H N Q F V S G A C D A F A K L W
GGACATCCGGCAGCAGAAGTGCAGACTTTGCCGCCACGACTCGGACATCAACGCCATCCAG
D I R Q Q K C V Q T F A A H D S D I N A I Q
TTCTTCCC AACGGCAATGCATTCGGCACCGCTCCGACGATGCCCTGTGCCGCTGTTCGACATCCGT
F F P N G N A F G T G S D D A S C R L F D I R
GCCGACCGGAGCTGGCTCC TACCAGgtatg cgcctggaacgcgtgtaaacgcctttgtgtacttgattactaatgtgactcgtgtagAT
A D R E L A S Y Q I
TCCGAGCCCGTCTGCGGCATCACGTCCGTAGCCTTTCCGTTCCGCCGCTGCTGCTTTTGTGGTTA
P E P V C G I T S V A F S V S G R L L F A G Y
CGAGACTTTGATGCAA GtaaggaccatgtggcatgtctccagagacgcgtgtaacgatactgagGTC TGGGATGTGTTGC
D D F E C K V W D V L
GCGGTGACGCTGTTGGCACACTGCAAGGTCACGACAA CCGAGTCGGCTGTCTGGGTGTCAGTAACGA
R G E R L V G T L Q G H D N R V G C L G V S N D
TGCGCTCAGTCTTGCATGTTTATGGGATTCATGtaagtgtctgtacattgtg gccgtg gacaag gactaacggtgtacag
A L S L C T G S W D S M
CTGCGCATCTGGGCTAAGCGCACCCCGACGACCGAATACCGACGACGCCATGTAACGAAGCCAA
L R I W A *
AGCGAAGTGTGCGCTACTCTTAATATTGGCAAAGTACCATCGACGACTGCAAACTTCCCAAGCCC
TGGCATACCATAACCCCTTTTTTGCATCTTACTTTCCAGGAGTCTTTTGCAGAGCTACTACCC TACTTA
CAAGAATATAATACACCAACCCCTTGAA AAAAAAAAAAACCTATAGTG
    
```

Gray as adenylate cyclase combined area.

图 2 Clgβ 基因结构分析

Fig. 2 The analysis of Clgβ gene structure

2.2 不同培养时间 Clgβ 基因表达分析

运用实时荧光定量 PCR 技术,以粟弯孢霉叶斑病菌 cDNA 为模板,定量检测其 G 蛋白 β 亚基基因在不同时期的表达量。结果表明(图 3),菌株 G 蛋白 β 亚基在 2~4 d 内表达量逐渐上升但表达量都较低,第 5 天猛烈上升表达量达到最大值,为第 2 天表达量的 8.4 倍左右,第 6 天略有下降,总体表现出前期基因表达量较低而后后期基因表达量较高的趋势。

2.3 Clgβ 基因的原核表达分析

将 pET28(a)-Clgβ 表达载体转化宿主菌 E. coli BL21 所得阳性转化子进行 IPTG 诱导表达后,SDS-PAGE 电泳检测其菌体裂解物,结果发现转化子菌体总蛋白中包含一个分子量约为 40 kDa 的蛋白组分,而对照菌株菌体总蛋白中不存在这一组分(图

4)。其分子量与 Clgβ 的编码产物计算分子量相近,且随诱导时间的延长,该蛋白的表达量明显增加,初步推测该差异条带为目的产物,Clgβ 成功在 pET 原核表达体系中表达。

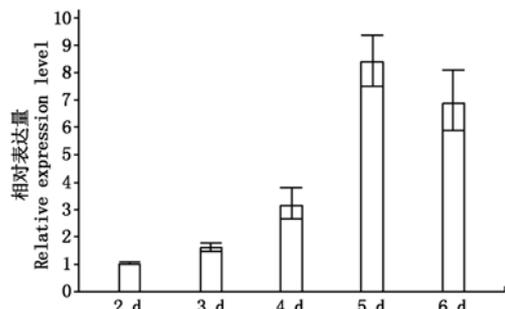


图 3 粟弯孢霉病菌 Gβ 亚基基因在不同时间表达量

Fig. 3 Expression of foxtail millet G protein β subunit gene in different period

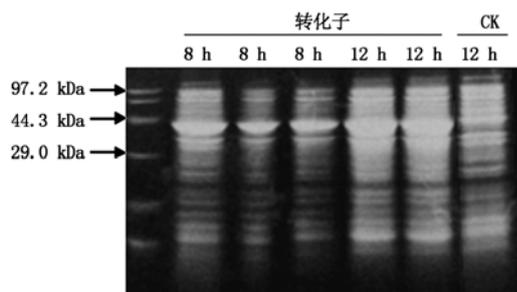


图4 CIG β 重组蛋白在 *E. coli* BL21 中诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the induced recombinant protein of CIG β in *E. coli* BL21

3 讨论与结论

粟弯孢霉叶斑病为近年来新出现的病害,目前生产上主栽品种均对该病菌表现高感。随着谷子密植、矮秆品种推广及水肥条件的改良,粟弯孢霉叶斑病在局部区域有加重的趋势。在植物病原真菌中,G 蛋白介导的信号传导直接调控病原菌的致病性与发育。粟弯孢霉叶斑病 G β 亚基的克隆和表达分析研究,对了解病菌致病机理及植物病害的防治有很大的意义。

在动物中已克隆得到 5 种不同类型的 G β 亚基,但在植物病原真菌中目前只发现 1 个 G β 亚基,并且相对 G 蛋白另 2 个亚基更加保守,本研究根据植物病原真菌 G β 基因保守结构域设计兼并引物,通过 PCR 同源克隆法获得谷子新月弯孢 G β 基因片段,进一步利用 RACE 技术获得了 G β 亚基全长 cDNA。获得基因全长的方法主要有利用探针筛选文库、染色体步移和 TAIL-PCR 等方法。但 RACE 与上述方法相比,不需要进行繁琐的酶切和连接反应,减少了 RNA 样本的损失,总 RNA 起始量可低至 10 ng,另外,1 次 PCR 反应就可以获得 5' 和 3' 两端全长 cDNA 序列。与已报道的其他植物病原真菌的 G β 基因比较分析,粟弯孢霉叶斑病菌 G β 基因有 4 个内含子和 5 个外显子,每个内含子 5' 和 3' 两端均为 GT 和 AG,与其他已知真菌一致,但是内含子 5' 端前 3 个核苷酸均为 GTA,而不是 GTG,表明 G β 亚基内含子剪切方式不是很保守。CIG β 基因编码区数目基本一致,编码 351 个氨基酸的多肽,多肽链中含有 2 个腺苷酸环化酶结合区域,第一个区域与其他真菌的腺苷酸环化酶结合区域完全一致,而第 2 个结合区域仅有 4 个氨基酸不同。

肖勇等^[12]用半定量 RT-PCR 方法研究水稻立枯丝核菌 G β 基因表达规律,发现前 2 d 检测不出,3 d 后表达逐步增大,推测菌丝生长势与该基因表达

有密切关系。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术可以检测出初始菌丝中 G β 基因的表达,表明其灵敏度要高于普通 RT-PCR。Maria^[13]通过 Northern 杂交研究发现,在致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 中 G β 基因表达受培养基营养元素缺乏诱导,并且在形成孢子囊时表达量最高。粟弯孢霉叶斑病菌 G β 基因同样是在营养生长后期表达量大,可能与培养基中营养元素缺乏而诱导其表达有关,另外,营养生长后期,产孢分化逐渐开始,故在此时期表达量升高的 G β 基因可能与分生孢子的分化形成有关。

G β 基因在真菌中功能变异较大,如在尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 中敲除 G β 基因后,缺失突变体致病力几乎丧失,而在串珠赤霉菌 (*Gibberella moniliformis*) 中,G β 基因缺失突变体致病力不受影响。在小麦赤霉中 G β 基因负调控毒素产生,而在大丽轮枝菌中正调控毒素产生,G β 基因在粟弯孢霉叶斑病具体功能还不很清楚,下一步需通过粟弯孢霉叶斑病菌原生质体遗传转化,获得 G β 基因缺失突变体,进而更加清楚地理解粟弯孢霉叶斑病菌中 G β 基因的功能。

粟弯孢霉叶斑病菌 G 蛋白 β 亚基基因全长 1 056 bp,包含 4 个内含子和 5 个外显子,编码 351 个氨基酸。CIG β 在菌株生长过程中表现出前期基因表达量较低而后期基因表达量较高的趋势。CIG β 已在 pET 原核表达体系中成功异源表达。

参考文献:

- [1] Mccudden C R, Hains M D, Kimple R J, *et al.* G-protein signaling: back to the future [J]. *Cellular and Molecular Life Science*, 2005, 62(5): 551 - 577.
- [2] Rahim M, Sarrah B M, Theo A J, *et al.* G α and G β proteins regulate the cyclic AMP Pathway that is required for development and pathogenicity of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2009, 8(7): 1001 - 1013.
- [3] Oldham W M, Hamm H E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(1): 60 - 71.
- [4] Schumacher J, Viaud M, Simon A, *et al.* The G α subunit BCG1, the phospholipase C and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea* [J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 67(5): 1027 - 1050.
- [5] Muller P, Leibbrandt A, Teunissen H, *et al.* The G β -subunit-encoding gene *bpp1* controls cyclic-AMP signaling in *Ustilago maydis* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(3): 806 - 814.

- [6] Ganem S, Lu S W, Lee B N, *et al.* G-protein β subunit of *Cochliobolus heterostrophus* involved in virulence, asexual and sexual reproductive ability, and morphogenesis [J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(6): 1653 – 1663.
- [7] Tzima A K, Paplomatas E J, Tsitsigiannis D I, *et al.* The G protein β subunit controls virulence and multiple growth and development-related traits in *Verticillium dahliae* [J]. *Fungal Genet Biology: FG & B*, 2012, 49(4): 271 – 283.
- [8] Gummer J P, Trengove R D, Oliver R P, *et al.* A comparative analysis of the heterotrimeric G-protein $G\alpha$, $G\beta$ and $G\gamma$ subunits in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* [J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 131.
- [9] Sagaram U S, Butchko R A, Shim W B, *et al.* The putative monomeric G-protein GBP1 is negatively associated with fumonisin B production in *Fusarium verticillioides* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7, 381 – 389.
- [10] Sagaram U S, Shim W B. *Fusarium verticillioides* GBB1, a gene encoding heterotrimeric G protein beta subunit, is associated with fumonisin B biosynthesis and hyphal development but not with fungal virulence [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(4): 375 – 384.
- [11] Mukherjee M, Kim J E, Park Y S, *et al.* Regulators of G-protein signalling in *Fusarium verticillioides* mediate differential host-pathogen responses on nonviable versus viable maize kernels [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12: 479 – 491.
- [12] 肖 勇, 李双成, 初明光, 等. 水稻立枯丝核菌 G 蛋白 β 亚基基因的克隆、表达及序列分析 [J]. *中国水稻科学*, 2008, 22(5): 541 – 544.
- [13] Maria L A, Latijnhouwers M, Van Hulst M, *et al.* Differential expression of G Protein alpha and beta subunit genes during development. *Phytophthora infestans* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 36: 137 – 146.

《华北农学报》征订启事

《华北农学报》1986 年创刊,由河北、北京、天津、河南、山西、内蒙古六省市农科院、农学会联合主办,为全国首家跨省、市、区多单位联办的农业学术刊物。本刊立足华北,面向全国和全世界。主要刊载农业基础学科学术论文、研究报告及科研简报,报道农业学术动态。主要服务于农业高等院校师生和农业科研机构的研究人员。

《华北农学报》为中国科学引文数据库核心期刊(CSCD 核心库)、中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊(A+)和中国农业核心期刊。在 2011 年版《中文核心期刊要目总览》综合性农业科学类核心期刊中排名第 2 位,为我国有影响力的农业学术刊物。《华北农学报》多次荣获国家级及省级奖励:全国优秀科技期刊评比三等奖、全国优秀农业期刊学术类一等奖、首届华北优秀期刊、首届北方十佳期刊、中国北方优秀期刊、河北省优秀期刊、河北省十佳期刊及河北省荣誉期刊等奖项;2011 年被评选为“中国精品科技期刊”。

《华北农学报》国内外公开发行,国内统一刊号:CN13-1101/S,国际刊号 ISSN 1000-7091。双月刊,双月 28 日出版,国际标准大 16 开本,240 页,每期定价 12 元,全年 72.00 元。邮发代号:18-10,国外发行代号:5918。全国各地邮局均可订阅。可随时汇款到编辑部订阅,请注明刊名、份数、姓名、地址、邮编及电话。

欢迎订阅、欢迎投稿。

通信地址:石家庄市和平西路 598 号《华北农学报》编辑部

邮 编:050051

电 话:0311-87652166

E-mail:hbxb@163.com

网 址: <http://www.hbxb.net/>