

粗糙脉孢菌 26 S 蛋白酶体三个亚基缺失菌株的构建及表型分析

徐航, 王颖*

(中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】通过构建 26 S 蛋白酶体的 3 个亚基 RPN4、RPN7、RPN10 的缺失突变菌株, 研究这些缺失突变体的表型, 进而探究这 3 个亚基在蛋白酶体中的作用。【方法】采用同源重组基因敲除技术、电转化、粗糙脉孢菌杂交、子囊孢子萌发及 PCR 鉴定等方法分别获得 3 个调节亚基的基因缺失突变体。利用 *racetube* 和平板生长法进行突变体表型检测。【结果】得到 *rpn4* 和 *rpn10* 的缺失突变纯合体及 *rpn7* 缺失突变核体菌株。【结论】与野生型相比, *rpn7*^{KO} (*ku70*^{RIP} 背景) 突变体的菌丝生长及产生分生孢子的能力显著减弱; *rpn4*^{KO} 突变体在生长初期的菌丝生长缓慢, 而后期的产孢能力与野生型无显著差异; *rpn10*^{KO} 突变菌株的表型介于上述两种突变体的表型之间。这些结果表明 26 S 蛋白酶体的这 3 个亚基对脉孢菌的生长和发育至关重要。

关键词: 粗糙脉孢菌; 泛素-蛋白酶体途径; 26 S 蛋白酶体; RPN 调节亚基

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 05-0593-08

蛋白质是执行生命功能的大分子, 其正常的合成和降解是保证细胞内各项生命活动有序进行的重要前提。在真核细胞内, 蛋白质主要通过溶酶体途径和泛素-蛋白酶体途径进行降解。其中, 泛素-蛋白酶体途径控制着 80% 以上蛋白质的降解。在这一过程中, 底物蛋白经过泛素激活酶 (E1)、泛素偶联酶 (E2) 和泛素连接酶 (E3) 的级联催化反应后被加上了泛素链标签。接着, 26 S 蛋白酶体的调节亚基识别泛素化的底物蛋白, 将其去折叠, 并送至催化亚基中水解为小肽^[1]。泛素单体被释放出来进行再循环。研究表明多种癌症及神经退行性疾病, 如帕金森综合症、阿尔兹海默症的发生都与泛素-蛋白酶体系统异常相关^[2-3]。

26 S 蛋白酶体是真核生物和古菌中普遍存在的蛋白酶体形式, 其分子量约为 2000 kDa, 整体结构由一个 20 S 核心催化单位和两个 19 S 调节单位

组成。20 S 核心催化单位为中空桶状结构, 两端分别反向连接着一个 19 S 调节单位。

20 S 核心蛋白酶催化单位由 4 个亚基环堆叠而成, 靠近调节亚基的 2 个是 α 环, 居中两个是 β 环, 每个环分别由 7 个结构相似的 α -或 β -亚基按 $\alpha 1-7$ 、 $\beta 1-7$ 的顺序连接组成。其中, 每个 β 环中的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 5$ 亚基为催化位点, 分别对应类半胱氨酸蛋白酶活性、类胰岛素活性和胰凝乳蛋白酶活性, 能切断酸性、碱性和疏水的氨基酸残基 C-末端一侧的肽键^[4]。

19 S 调节单位由 21 个不同分子量 (25-110 kDa) 的亚基组成。这些亚基在功能上可分为两类: 一类为 ATP 酶, 包括 Rpt1-Rpt6, 它们的结构及功能在进化上高度保守; 另一类为非 ATP 酶亚基, 包括 Rpn1-Rpn15^[5]。每个 19 S 调节单位均由 Base 和 Lid 两部分组成。Base 主要结合在 20 S 核心蛋白酶催化

基金项目: 国家自然科学基金 (JO 730639)

* 通信作者。Tel: +86-10-62731206; E-mail: wangying@cau.edu.cn

作者简介: 徐航 (1987-), 女, 湖北人, 本科生。E-mail: hangxu.0103@gmail.com

收稿日期: 2009-11-25; 修回日期: 2010-02-11

单位的 α 环上,由 6 个 Rpt1-Rpt6 ATP 酶和 2 个非 ATP 酶 Rpn1 及 Rpn2 组成。其中 6 个 ATP 酶聚集成装配成环状结构,为靶蛋白的降解提供能量。Base 的主要功能包括接受泛素化的蛋白底物,将靶蛋白去折叠,打开核心催化单位的通道,将解折叠的底物蛋白送入核心蛋白酶催化单位的环形通道。Lid 是由 13 个 (Rpn3-Rpn15) 非 ATP 酶亚基组成的复合体,其主要功能是负责识别多泛素化的靶蛋白,并将底物蛋白的多泛素链切除。

伴随着结构与分子生物学的不断发展,近年的研究揭示 26 S 蛋白酶体对于细胞周期、基因表达调控、氧化应激反应等生命过程均起到了重要的作用^[6]。由于 26 S 蛋白酶体与众多人类疾病的发生密切相关,因此,对其各亚基功能的研究就显得非常有意义,但是以前的研究主要集中在组成 20 S 核心催化单位的亚基(尤其是含有酶活性的亚基)上,针对组成 19 S 调节单位亚基的研究还很欠缺。通过蛋白纯化的方法 Saeki 等发现了 RPN10 与 Base 和 Lid 具有相互作用^[7],且其存在于两者的交界面上^[8]。RPN7 对于稳定 Lid 的结构及维持 26 S 蛋白酶体的完整性具有重要作用^[9]。而国内外关于 RPN4 的研究却很少。目前尚无敲除调节单位亚组分 RPN4、RPN7 及 RPN10 的报道。

我们对粗糙脉胞菌、粟酒裂殖酵母、酿酒酵母、秀丽线虫、果蝇、拟南芥、小鼠及人等八种模式生物的氨基酸序列进行比对,发现 RPN4 的序列不保守,而 RPN7 和 RPN10 的序列高度保守。本研究构建了 RPN4、RPN7 和 RPN10 三个调节单位亚组分的基因缺失突变体,并检测了其表型,发现与野生型相比, $rpn7^{KO}$ ($ku70^{RIP}$ 背景)突变体的菌丝生长及产生分生孢子的能力显著减弱; $rpn4^{KO}$ 突变体在生长初期的菌丝生长缓慢,而后期的产孢能力与野生型无显著差异; $rpn10^{KO}$ 突变菌株的表型介于上述 2 种突变体的表型之间。根据以上结果我们认为 26 S 蛋白酶体的这 3 个可能的调节亚基对脉胞菌的生长和发育至关重要,且这些工作也为进一步研究蛋白酶体对粗糙脉胞菌其他生命过程的影响提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:所用粗糙脉胞菌 (*Neurospora crassa*) 菌株如表 1 所示。

表 1 粗糙脉胞菌菌株

Strain	Phenotype	Genotype	Source
87-3	wild type	<i>bd, a</i>	He Lab
<i>ku70^{RIP}</i>	<i>ku70</i> null mutant	<i>bd, ku70^{RIP}, a</i>	He Lab
301-6	<i>his-3</i> null mutant	<i>bd, his-3⁻, A</i>	He Lab

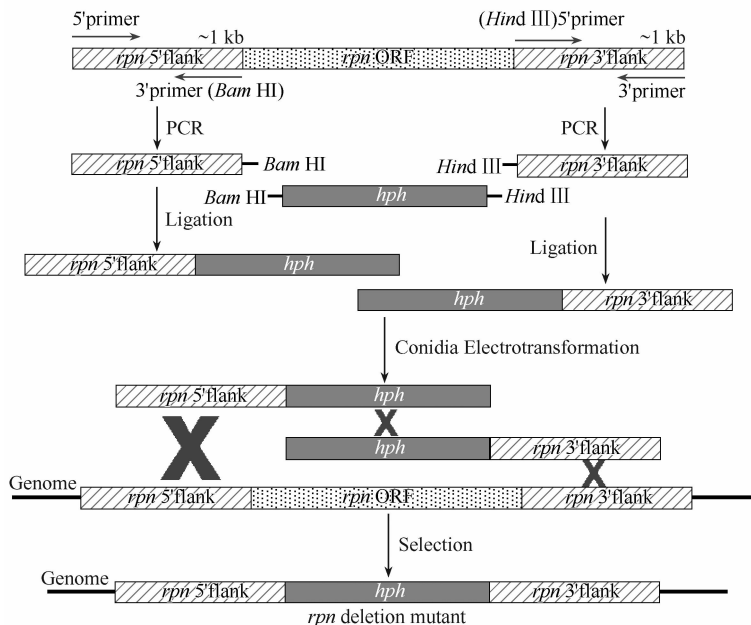
1.1.2 主要试剂和仪器:①质粒: pCSN44 (Amp^r)^[10],由本实验室保存。②引物:在粗糙脉胞菌数据库中查找基因 *rpn4* (NCU01640)、*rpn7* (NCU03972) 和 *rpn10* (NCU02982) 的 DNA 序列,分别设计这 3 个基因的 5'flank 和 3'flank 引物(如表 2 所示)。③培养基:常用的培养粗糙脉胞菌的底层培养基、上层培养基、基本培养基、杂交培养基、2% 葡萄糖培养液、Race Tube 培养基等配制方法如 Hildur^[11-12] 等所述。④酶类:限制性内切酶及 T4 连接酶均购自 NEB。

表 2 基因敲除引物

Prime	5'→3'
<i>rpn4</i> -1F	ATGCACAACGGTTGTACGACTC
<i>rpn4</i> -2R. <i>Bam</i> HI	CGGGATCCGAGTGGTAGGATAGTATTGTGG
<i>rpn4</i> -3F. <i>Hind</i> III	CCCAAGCTTTGTCGATCACATCGCTGAATTG
<i>rpn4</i> -4R	CTTTCATCTTTCCATCCTTCC
<i>rpn7</i> -1F	CCATCTGACGTTGACGAATCTG
<i>rpn7</i> -2R. <i>Bam</i> HI	CGGGATCCGAGGAGGATGCAAATGGAAGAC
<i>rpn7</i> -3F. <i>Hind</i> III	CCCAAGCTTAAGCGAGCTGTGCTATCGTTAG
<i>rpn7</i> -4R	GTACCTCTTCCCTACCATCAAC
<i>rpn10</i> -1F	GTTGGATGATGTTGATACTGACG
<i>rpn10</i> -2R. <i>Bam</i> HI	CGGGATCCAAGATGTTGTTGTTCTGATGG
<i>rpn10</i> -3F. <i>Sma</i> I	TCCCCGGGGTACAATAGACTCGCCATGG
<i>rpn10</i> -4R	TGCCCACTCATCTCAACCTGG
<i>hph</i> -1	GAAAAGCCTGAACCTACCCG
<i>hph</i> -2	CGTCGGTTCCACTATCGGC

1.2 3 个 *rpn* 基因的定向敲除菌株的构建

根据 Hildur^[11-12] 等的基本方法和胥慧^[13] 等的改进方法。从野生型菌株 87-3 基因组中分别扩增 *rpn4*、*rpn7* 或 *rpn10* 基因 ORF 上、下游约 1 kb 的 DNA 序列作为 5'flank 和 3'flank,如图 1 中左倾斜阴影所示。再从质粒 pCSN44 上酶切下潮霉素抗性基因 (*hph*) 的启动子和编码框序列(波浪纹阴影 DNA),分别与 5'flank 和 3'flank 连接,获得 5'flank + *hph* 或 3'flank + *hph*。以连接产物为模板通过 PCR 大量扩增两组片段。将这两组片段共同转化粗糙脉胞菌 *ku70^{RIP}* 菌株,利用细胞有丝分裂时发生的同源重组,以潮霉素抗性基因 (*hph*) 替换宿主菌基因组中的 *rpn* 基因(点状阴影片段),得到相应的基因缺失突变体,然后通过杂交或分生孢子过膜方法得到纯合缺失突变体。

图 1 *rpn* 缺失突变体的构建 (参考文献 12)Fig. 1 Method of *rpn*^{KO} mutant construction.

1.3 粗糙脉孢菌分生孢子电穿孔转化

以粗糙脉孢菌 *ku70*^{RIP} 菌株为受体菌,依据文献 [10] 中的方法,将 3 个 *rpn* 基因的 *hph* 替代片段分别电转到粗糙脉孢菌的分生孢子内,并将电转后的孢子悬液分别涂布到含潮霉素的基本培养基选择平板上,30℃ 培养 3 d 后,在每个基因的转化平板上各挑取潮霉素抗性菌落,转接到含潮霉素的基本培养基试管斜面上,连续传 3-5 代。

1.4 粗糙脉孢菌的杂交

将上述有抗性的菌株,进行液体培养,提取基因组 DNA,PCR 鉴定 *hph* 基因替代了染色体上需要敲除的基因的 ORF。挑取分生孢子制成孢子悬液,同样依据文献 [10] 中的方法,与 301-6 菌株进行杂交,于 25℃ 黑暗条件下培养 3 周后,将培养皿取出放到光下静置 1 周,待子囊孢子喷射到皿盖上。

1.5 子囊孢子的萌发

用 200 μL 无菌水从皿盖上洗下孢子收集到离心管中,60℃ 水浴热激 45 min,然后涂板。

1.6 缺失突变体昼夜节律的检测

挑取适量分生孢子,接在 Racetube 的一端。室温下光照培养 1 d 至长出菌丝,转入 25℃ 全黑暗 (DD) 培养箱,每 24 h 定时标记菌丝生长前沿,当野生型菌丝生长至 Racetube 另一端时取出。通过与野生型比较可以检测受试菌株的节律是否有变化。

1.7 缺失突变体在平板上表型的检测

挑取突变体的分生孢子制成孢子悬液,吸取

3 μL 孢子悬液点接到基本培养基平板中央,于 30℃ 温箱中倒置培养。观察菌丝生长情况后转移到光下,观察分生孢子长势及颜色变化。

2 结果和分析

2.1 基因 *rpn4*、*rpn7*、*rpn10* 的序列比对

利用生物信息学方法,将脉孢菌 *rpn4*、*rpn7* 或 *rpn10* 基因编码的蛋白序列与七种真核模式生物 (*Arabidopsis*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Human*, *M. musculus*, *Drosophila*, *C. elegans*) 的同源序列进行比对。结果显示 RPN4 蛋白是蛋白酶体中最不保守的亚基,而 RPN7 及 RPN10 蛋白的保守性很高。基于这些分析结果,我们选择这 3 个基因进行定向敲除,以期能帮助解析粗糙脉孢菌蛋白酶体的作用机制。

2.2 构建基因 *rpn4*、*rpn7*、*rpn10* 的缺失突变体

根据设计的基因敲除策略,分别扩增出 1 kb 左右的 *rpn4*、*rpn7* 或 *rpn10* 基因的 5' flank 和 3' flank 片段 (图 2-A),分别用相应限制性内切酶消化,然后与酶切获得的 *hph* 片段连接。分别以连接产物 5' flank + *hph* 或 3' flank + *hph* 为模板,经 PCR 大量扩增基因置换的重组片段。图 2-B 显示了全部 6 个 DNA 片段的 PCR 扩增结果。将获得的目的片段用乙醇沉淀浓缩并去除蛋白和杂质,用于随后的粗糙脉孢菌分生孢子的电穿孔转化。

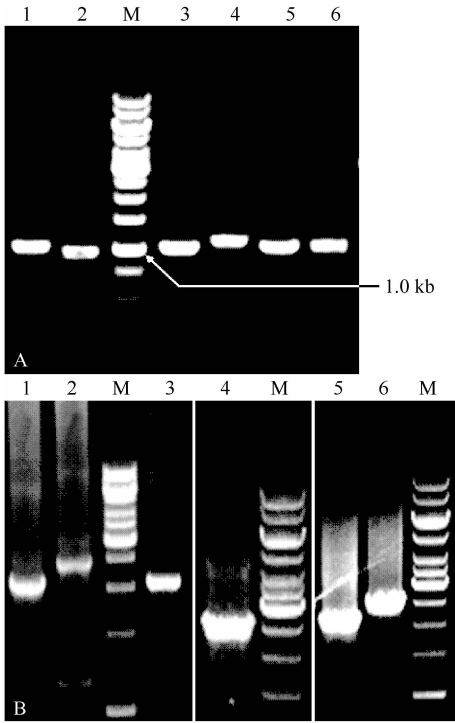


图2 PCR扩增的 *rpn* 基因的结果

Fig. 2 The results of PCR amplification of *rpn* genes. A: PCR amplification of the bilateral flank fragments of *rpn* genes; 1. *rpn4* 5'flank (1.02 kb); 2. *rpn4* 3'flank (0.97 kb); 3. *rpn10* 5'flank (1.04 kb); 4. *rpn10* 3'flank (1.13 kb); 5. *rpn7* 5'flank (1.05 kb); 6. *rpn7* 3'flank (1.07 kb); M. 1 kb DNA marker; B: PCR amplification of the ligation products of *rpn* genes' flank fragments and *hph* fragment. 1. *rpn7* 5'flank + *hph* (2.09 kb); 2. *rpn7* 3'flank + *hph* (2.45 kb); 3. *rpn10* 5'flank + *hph* (2.08 kb); 4. *rpn10* 3'flank + *hph* (2.53 kb); 5. *rpn4* 5'flank + *hph* (2.06 kb); 6. *rpn4* 3'flank + *hph* (2.35 kb); M. 1 kb DNA Marker.

2.3 粗糙脉孢菌的转化及鉴定

分别将 *rpn4*、*rpn7* 或 *rpn10* 基因的 5'flank + *hph* 及 3'flank + *hph* 成对片段电穿孔转化到 *ku70^{RIP}* 分生孢子中。电转后从每种 *rpn* 基因敲除的转化平板(含潮霉素)上各挑取 18 个抗性菌落。在含潮霉素的试管斜面连续传接 4 代后,提取基因组 DNA 进行 PCR 检测。我们从 7 株(#10-#16) *rpn4^{KO}* (*ku70^{RIP}*)

转化菌株中扩增出了 5'flank + *hph*, 从 5 株(#10, #12-#15)转化菌中扩增出了 3'flank + *hph* 片段,这些结果表明:有 5 株转化子中的 *rpn4* 基因被 *hph* 基因替代。相似地,在 4 株(#1、#2、#3 和 #9) *rpn10^{KO}* (*ku70^{RIP}*)转化菌株中的 *rpn10* 也被 *hph* 基因替代。这些结果说明我们已经获得了这两个 *rpn* 基因缺失菌株的杂合体(菌株仍然含有野生型细胞核和 *hph* 基因替代的细胞核)。

选取可以在含有潮霉素斜面上生长的 10 株转化子 *rpn7^{KO}*,提取基因组 DNA 作模板,用 *rpn7^{KO}* 1F 和 *rpn7^{KO}* 4R 作引物进行 PCR 检测。由于潮霉素抗性基因比 *rpn7* 基因小 300 bp,如果 *rpn7* 基因没被 *hph* 替换掉,则扩增出来的片段大小为 3879 bp; 而若 *hph* 替换掉了 *rpn7* 基因,则扩增出的片段大小应为 3552 bp。如图 3 所示,在 *rpn7^{KO}* (*ku70^{RIP}*)菌株中有 #1、#2、#8 三株扩增的片段大小为 3552 bp,说明在这 3 个转化子中 *hph* 基因已经替换了相应位置的 *rpn7* 基因。

2.4 通过杂交获得 *rpn* 基因的纯合缺失突变体

由于粗糙脉孢菌的菌丝体和大分生孢子都为异核体,为了获得纯合的基因敲除突变体,我们选择发生了基因替换的转化子与对应的交配型菌株进行杂交,得到子囊孢子。将子囊孢子热激后涂布到含潮霉素和组氨酸的平板上,挑取单克隆到含有潮霉素和组氨酸的斜面上。

为了检测菌株是否是组氨酸缺陷菌株,将菌株转接到基本培养基的斜面上,不能生长的菌株即为组氨酸缺陷型。为确定所获得的菌株是否为纯合体,提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。作为对照的野生型菌株 87-3,不能扩增出 5'flank + *hph* 和 3'flank + *hph* 片段,但能扩增出 *rpn* 基因;而能扩增出 5'flank + *hph* 和 3'flank + *hph* 片段,不能扩增出 *rpn* 基因的则为基因缺失纯合体。图 4-A 的结果显示了 *rpn4* #14 是 *rpn4* 基因缺失突变体纯合菌株,图 4-B

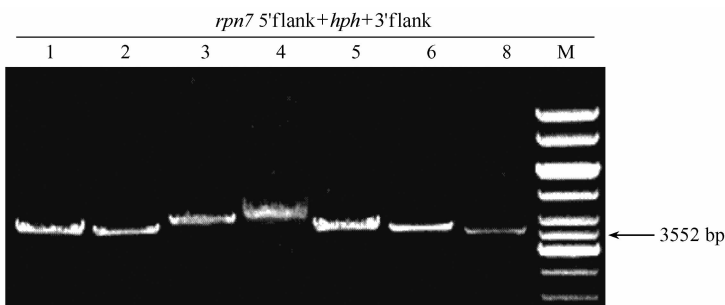


图3 *ku70^{RIP}* *rpn7^{KO}* 菌株的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of *rpn7^{KO}* mutant by PCR.

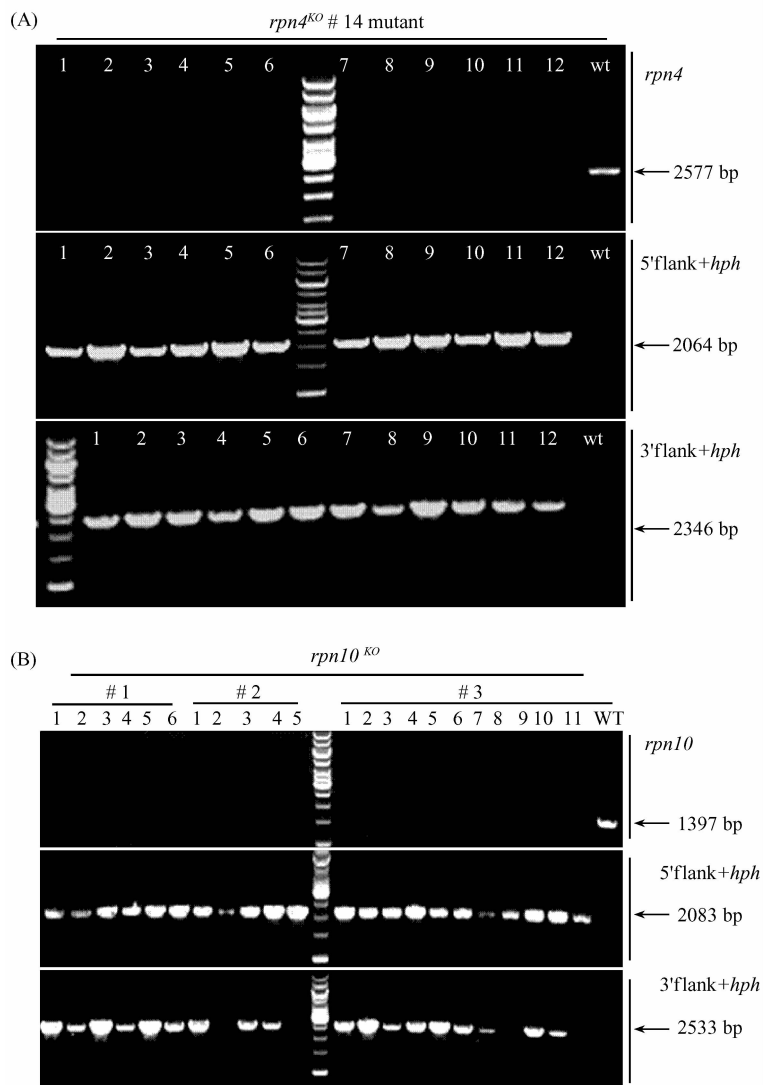
图 4 *rpn^{KO}* 突变体纯合体的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of *rpn* homokaryotic mutant by PCR. A: Identification of *rpn4* homokaryotic mutant by PCR; B: Identification of *rpn10* homokaryotic mutant by PCR.

显示了 *rpn10* #1、2、3 是 *rpn10* 基因缺失突变体纯合菌株。

rpn7^{KO} (*ku70^{RIP}*) 转化菌株与 301-6 *his⁻* 进行杂交试验时, 菌株虽然能够在杂交平板上长出菌丝体, 但是不能形成子囊, 因此, *rpn7* 基因的缺失可能影响

了粗糙脉孢菌的减数分裂过程。目前我们一直未能获得 *rpn7* 基因的缺失突变纯合体。这些结果暗示 *rpn7* 编码的蛋白是粗糙脉孢菌生存必需的。实验中所获得缺失突变体如表 3 所示。

表 3 *rpn* 缺失突变体Table 3 *rpn^{KO}* mutants

Mutant	Strains
<i>rpn4^{KO}</i>	#10-4, #10-9, #13-5, #13-9, #14-9, #14-11
<i>rpn4^{KO} his-3</i>	#10-3, #10-5, #13-2, #14-3, #14-5, #14-6
<i>rpn10^{KO}</i>	#1-2, #1-6, #2-2, #2-4, #3-6, #3-9
<i>rpn10^{KO} his-3</i>	#1-1, #1-4, #2-1, #2-5, #3-2, #3-4
<i>Ku70^{RIP} rpn7^{KO}</i> (Heterokaryon)	#1, #2, #8, #1-1, #1-1-5, #1-1-6, #1-1-11, #1-1-15, #1-1-21

2.5 *rpn* 缺失突变体的表型分析

2.5.1 *rpn* 缺失突变体昼夜节律表型分析: racetube

分析是用来研究突变体与野生型菌株在生长速度及昼夜节律上的差异的方法。近年的研究发现: 泛

素—蛋白酶体降解途径参与了脉孢菌昼夜节律的调控,因此,我们首先检测这三个基因缺失突变后会对分生孢子昼夜节律产生怎样的影响。如图 5 所示,与野生型相比,*rpn7* 缺失菌株生长速度明显受到影响,分生孢子昼夜节律完全消失。这可能是由于 *rpn7* 基因的缺失严重影响了蛋白酶体的功能,进而影响与昼夜节律相关蛋白如 FRQ 降解的缘故。

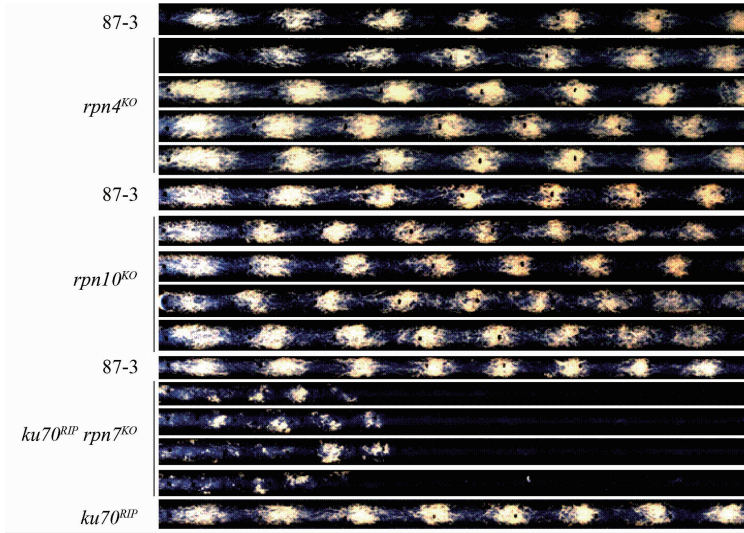


图 5 *rpn* 缺失对粗糙脉孢菌昼夜节律的影响

Fig. 5 The phenotypes of *rpn*^{KO} mutants growth on racetube.

2.5.2 *rpn* 缺失突变体生长和发育的表型观察: 为了进一步观察这 3 个基因缺失后对突变体生长和发育的影响,我们进行了平板培养观察。以粗糙脉孢菌野生型菌株 87-3 (如图 6-A1) 和 *ku70*^{RIP} (如图 6-A2) 作为对照,*rpn4*^{KO} 突变体在生长初期菌丝生长较慢,而转移到光下后其产孢能力则与野生型无显著

rpn10 基因的缺失导致菌丝生长比野生型稍慢,分生孢子带的产生随培养时间延长而逐渐变弱,但昼夜节律的周期不受基因缺失的影响。而基因 *rpn4* 缺失后突变体的生长和分生孢子产生的昼夜节律都没有受到影响,推测 *rpn4* 基因编码的蛋白在蛋白酶体中并未起到重要作用,这与 *rpn4* 是 3 个基因中最不保守的结果相一致。

差异 (如图 6-B)。杂合的 *ku70*^{RIP} *rpn7*^{KO} 菌株无论是菌丝的生长速度还是分生孢子的产生都比野生型弱很多 (如图 6-C),考虑到该检测中用的是杂合突变体而非纯合突变体,这些结果说明该基因对于粗糙脉孢菌的生长和发育有重要的调控作用。*rpn10*^{KO} 突变体的整体长势也较弱,其表型介于 *rpn4*^{KO} 与

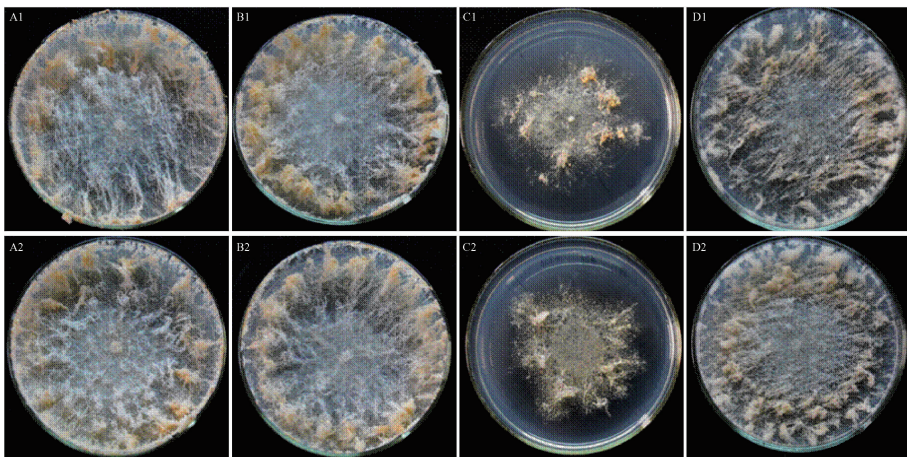


图 6 缺失突变体在平板上的表型

Fig. 6 The phenotypes of *rpn*^{KO} mutants growth on plate. A1: Strain 87-3; A2: Strain *ku70*^{RIP}; B1: *rpn4*^{KO} #13-5; B2: *rpn4*^{KO} #14-9; C1: *ku70*^{RIP} *rpn7*^{KO} #5; C2: *ku70*^{RIP} *rpn7*^{KO} #21; D1: *rpn10*^{KO} #1-6; D2: *rpn10*^{KO} #2-2.

*ku70^{RIP} rpn7^{KO}*中间(如图 6-D),说明该基因的产物也是蛋白酶体中较重要的成分。

3 讨论

通过遗传学的方法研究蛋白酶体的功能在很多物种中都有尝试。脉孢菌作为遗传分析和生物化学研究的经典材料也很适合这方面的研究。因此,基于生物信息学的分析,我们从脉孢菌基因组中选取 3 个编码蛋白酶体亚基的基因进行定向敲除,所构建的基因工程菌株为进一步研究蛋白质泛素化修饰和降解的调控打下基础。

应用潮霉素抗性基因替代 *rpn* 基因的基因定向敲除方法,我们获得了 *rpn10* 缺失突变和 *rpn4* 缺失突变的纯合菌株。该结果证明这两个亚基不是脉孢菌维持生命所必需的。由于 *rpn4* 的缺失突变并不影响菌株的生长、发育以及分生孢子的产生和昼夜节律,说明该基因对于蛋白酶体执行蛋白降解的影响有限,这些结果与该基因编码的蛋白的保守性很低相对应。*rpn10* 缺失突变直接影响了菌株的生长和发育,同时其编码的蛋白具有很高的保守性,这些结果暗示我们该基因的缺失可能直接影响了蛋白酶体降解泛素化蛋白的能力。因此,可以在该突变体中检测一些可能进行泛素化蛋白的稳定性。我们至今未能获得 *rpn7* 基因的纯合敲除菌株,显然该基因可能是脉孢菌生命活动所必需的基因。在杂交过程中无法产生有性结构——子囊,说明该基因的部分缺失已经对菌株的一些生理过程产生影响。由于不能通过有性过程来获得 *rpn7* 基因缺失突变的纯合体,我们只能选择通过过膜纯化单核小分生孢子的方法希望能在无性世代获得该基因敲除的纯合体。从遗传表型的分析来看,*rpn7* 基因缺失的杂合体已经严重影响了菌株的生长、发育和分生孢子的产生和节律,显然其基因产物在蛋白酶体中起重要作用。尽管未能获得纯合体,还是可以利用该菌株的潮霉素抗性,进行蛋白泛素化修饰和稳定性检测等方面的研究。

本文通过实验证实了脉孢菌的 3 个编码蛋白酶体的基因在蛋白酶体中可能起不同的作用,因此可以利用 *rpn10^{KO}*、*rpn4^{KO}* 和 *rpn7^{KO}* 突变体来研究蛋白质的泛素化修饰和蛋白降解的调控。

致谢 感谢杨思路在整个实验过程中给予的技术支持;感谢胡启文在文献查阅方面给予的指导,感谢周志鹏在图表修改方面给予的建议。

参考文献

- [1] Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M. Role of the Ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of cyclin dependent kinase inhibitor P27. 1995, *Science*, 269: 682-685.
- [2] Thompson SJ, Loftus LT, Ashley MD, Meller R. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate. 2007, *Current Opinion in Pharmacology*, 7: 1-6.
- [3] Oliver K, Rachael F, and Mark H. Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. 2006, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22: 159-180.
- [4] Hirano, S Murata, K Tanaka. Large- and Small-Scale Purification of Mammalian 26 S Proteasomes. 2005, *Methods in Enzymology*, 399: 227-240.
- [5] Tanaka K, Kumatori A, Ii K, Ichihara A. Direct evidence for nuclear and cytoplasmic colocalization of proteasomes (multiprotease complexes) in liver. 1989, *Journal of Cell Physiology*, 139: 34-41.
- [6] Schwartz AL and Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. 1999, *Annual Review of Medicine*, 50: 57-74.
- [7] Saeki Y, Toh-e A, and Yokosawa H. Rapid isolation and characterization of the yeast proteasome regulatory complex. 2000, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273: 509-515.
- [8] Fu H, Reis N, Lee Y, Glickman MH, Vierstra RD. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26 S proteasome and the COP9 signalosome. 2001, *The EMBO Journal*, 20: 7096-7107.
- [9] Isono E, Saeki Y, Yokosawa H, Toh-e A. Rpn7 Is Required for the Structural Integrity of the 26 S Proteasome of *Saccharomyces cerevisiae*. 2004, *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 27168-27176.

- [10] He Q, Cha J, He Q, Lee HC, Yang Y, Liu Y. CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the *Neurospora* circadian negative feedback loop. 2006, *Genes and Development*, 20: 2552-2565.
- [11] Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. 2006, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (27): 10352-10357.
- [12] He Q, Cheng P, He Q, Liu Y. The COP9 signalosome regulates the *Neurospora* circadian clock by controlling the stability of the SCFFWD-1 complex. 2005, *Genes and Development*, 19: 1518-1531.
- [13] 文莹, 李颖. 现代微生物研究技术. 北京: 中国农业大学出版社, 2008.

Construction of deletion mutants for three proteasome protein coding genes and characterization of their phenotypes in *Neurospora crassa*

Hang Xu, Ying Wang*

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, State Key Laboratory for Agrobiotechnology, Beijing 100193)

Abstract: [**Objective**] In this study, we generated strains with knockout *rpn4*, *rpn7* and *rpn10* genes respectively in *Neurospora crassa*, and studied their phenotypes to uncover their functions in the 26 S proteasome pathway. [**Methods**] We used gene-replacement strategy to make knockout mutants. After electrotransformation, the resulted transformants were examined by PCR. To get homokaryotic mutants, the heterokaryotic strains were crossed with the wild-type strain. The ascospores were germinated after heat shock, and the resulting strains were examined by PCR to confirm the homokaryotic strains. [**Results**] Homokaryotic *rpn4* and *rpn10* knockout strains, and heterokaryotic *rpn7^{KO}* strains were obtained. [**Conclusion**] Compared to the wild-type strain, *rpn7^{KO}* strains exhibited severe defects in hyphal growth and conidial formation; *rpn4^{KO}* strain had defect in hyphal growth too, but displayed normal conidiation; the growth and developmental phenotypes of *rpn10^{KO}* strain were slightly affected. Taken together, these data demonstrated that these three genes were important for the growth and developmental phenotypes of *Neurospora crassa*.

Keywords: *Neurospora crassa*; ubiquitin-proteasome pathway; 26 S proteasome; RPN subunits

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Nature Science Foundation of China (JO 730639)

* Corresponding author. Tel: +86-10-62731206; E-mail: wangying@cau.edu.cn.

Received: 25 November 2009/Revised: 11 February 2010