

## 稻瘟菌 *MgORP1* 基因敲除突变株的构建及其表型分析

林春花<sup>1,2</sup>, 郑服从<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>海南大学环境与植物保护学院, 儋州 571737)

(<sup>2</sup>中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 儋州 571737)

**摘要:**【目的】了解稻瘟病菌中氧固醇结合蛋白(oxysterol-binding proteins related proteins 缩写为 ORPs)家族成员组成情况, 构建 *MgORP1* 基因缺失突变株和互补株, 对 *MgORP1* 基因功能进行初步研究。

【方法】以 ORPs 家族的典型结构域“ORD”为靶标, 对稻瘟病菌基因组数据库进行 BlastP 搜索。通过同源重组的策略, 构建 *MgORP1* 基因缺失突变体, 再通过重新导入该基因全长片段获得互补株。然后对野生型、突变体和互补株进行菌落、分生孢子和附着胞形态或形成情况、以及致病力进行比较分析。【结果】稻瘟病菌基因组中含有 6 个可能的 ORPs 族蛋白, 其中 *MgORP1* 基因的破坏降低了稻瘟菌在完全培养基上的菌落生长速率和产孢量。但对菌丝、分生孢子和附着胞的形态, 以及在水稻上的致病力没有明显影响。【结论】*MgORP1* 基因可能与稻瘟病菌的菌落生长和产孢量相关。

关键词: 稻瘟菌; 固醇; 氧固醇结合蛋白; 基因敲除

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1160-08

麦角固醇是一种类似胆固醇, 存在于真菌细胞膜中特有的脂质, 是细胞膜重要的结构组分。麦角固醇在确保膜结构的完整性、膜结合酶的活性、膜的流动性、细胞活力及物质运输等方面起着重要作用<sup>[1]</sup>。氧化固醇(oxysterol)是胆固醇(cholesterol)的氧化衍生物, 能对固醇的生物合成起到反馈调节作用, 是维持固醇动态平衡的第二信使, 如细胞内 25-羟基胆固醇(25-hydroxycholesterol)上调 1000 倍时能有效地下调胆固醇的合成<sup>[2]</sup>。氧化固醇能通过抑制固醇合成相关基因的转录和翻译, 激活内质网上的酶活性, 从而调节脂类物质的代谢。氧化固醇还对细胞凋亡、细胞衰老、血小板凝集、鞘脂类物质代谢等有一定作用<sup>[3]</sup>。目前已知能结合氧化固醇起作用的有两类蛋白家族, 一类是固醇激素核受体(steroid hormone nuclear receptors); 另一类就是氧固醇结合相关蛋白 ORPs (oxysterol-binding protein-related proteins)<sup>[4]</sup>。

OSBP(Oxysterol binding protein)及其相关的蛋白

ORPs (Oxysterol-binding proteins-related proteins) 家族是真核生物中一个保守的大家族, 它广泛存在于真菌、植物以及动物中。OSBP 于 1980 年作为一种细胞质内氧化固醇的受体而被发现<sup>[5]</sup>, 是唯一能特异性结合氧化固醇而调节固醇物质的合成的一类蛋白<sup>[6]</sup>。这类蛋白序列结构上有两大明显的特征, 一是蛋白序列的 C 端都含有一个保守的、约 400 个氨基酸的 ORD 结构域 (OSBP-related ligand-binding domain), 并且在这个结构域中有一个极其保守的“OSBP 指纹序列 (EQVSHHPP)<sup>[7]</sup>。ORD 结构域能与氧化固醇结合<sup>[8]</sup>。另一个特征是部分成员在 C 端含有 PH (pleckstrin homology domain) 的功能性结构域, 约由 100~120 个氨基酸残基组成。PH 结构域广泛分布于多种膜结合蛋白上, 对蛋白质具有细胞和亚细胞水平的膜定位作用, 并参与调节宿主蛋白的活性, 从而介导信号传导过程中的蛋白质-脂类、蛋白质-蛋白质之间的相互作用。

根据现有对酵母 OSH(OSBP homologues)家族中

基金项目: 国家自然科学基金(30260046)

\*通讯作者。Tel: +86-898-23300371; E-mail: zhengfucong@126.com

作者简介: 林春花(1980-), 女, 福建屏南县人, 博士研究生, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: lin3286320@126.com

收稿日期: 2008-02-25; 修回日期: 2008-04-01

的 7 个成员以及人类中 12 个成员结构特征及遗传功能研究, ORP 家族蛋白主要通过结合、转运氧化固醇, 参与脂类物质的代谢合成、转运以及细胞内囊泡的运输<sup>[7, 9]</sup>。Beh 等把酵母 OSH 的 7 个基因全部敲除, 细胞致死<sup>[4]</sup>。但只要 ORP 家族的任一 OSH 基因表达, 其他基因是否存在对酵母的生存就不重要。这说明了 ORPs 家族成员在细胞内有一个共同的, 且对酵母细胞存活起着重要作用的功能。Beh 等还通过电子显微镜观察发现突变体细胞内富含脂筏 (lipid raft), 其麦角固醇含量比野生型增加 3.5 倍<sup>[4]</sup>, 并通过实验证明了突变体细胞内吞作用 (endocytosis) 缺失<sup>[1]</sup>。所以推测 ORPs 家族基因直接或者间接参与细胞内固醇脂质的合成或转运, 从而影响细胞膜脂相关的生命过程。

ORP 除了参与脂质的代谢和运输外, 该家族蛋白还参与其他功能。如昆虫不能自身合成类固醇, 而是通过进食获取, 所以在果蝇 (*Drosophila*) 中 OSBP-Dm (果蝇 ORP 家族一成员) 不可能像在酵母或者动物中一样, 起着反馈调节固醇的合成作用, 该蛋白可能作为细胞周期进程的负调控因子<sup>[10]</sup>; BIP 是线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的一个 ORP 成员, 它参与转化生长因子 $\beta$ 信号途径调节线虫体长<sup>[11]</sup>; OSBPa 对盘基网柄菌 (*Dictyostelium*) 从蛞蝓体 (slug) 到子实体 (fruiting) 的转换起着重要作用<sup>[12]</sup>。

至今, 关于 ORP 家族蛋白的研究工作仍主要局限在酵母、人类及其他少数动物上。在丝状真菌上相关报道极少。稻瘟菌 (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, 无性世代为 *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) 是重要的丝状真菌, 是水稻严重病害-稻瘟病的病原真菌<sup>[13]</sup>, 水稻-稻瘟菌是研究植物-病原菌互作的重要模式对象。通过研究丝状真菌稻瘟菌的 ORP 基因的功能, 有利于更全面的了解 ORP 家族基因的功能。本文通过同源重组法敲除稻瘟菌 ORP 家族的一个结构典型的基因 *MgORP1*, 观察表型, 并进一步利用表型互补等方法初步鉴定该基因在稻瘟菌的功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 稻瘟菌野生型菌株 Y34, 来自我国云南省。质粒 pCX62 由福建农林大学王宗华研究员惠赠<sup>[14]</sup>。pSULF-gfp 以 pCAMBIA1300 为骨架, 含有 *ILV1* 基因 (有氯嘧啶隆抗性)<sup>[15]</sup>, 由英国诺维奇 John Innes 中心 Sainsbury 实验室 Anne E. Oshourn 惠赠。

**1.1.2 培养基:** 稻瘟菌用燕麦培养基平板培养<sup>[16]</sup>, 菌丝用 CM 液体培养基 (酵母粉 6 g/L, 水解酪蛋白 6 g/L, 蔗糖 10 g/L), 25、150 r/min 振荡培养获得。制备原生质体所用的培养基有 TB3 (酵母粉 30 g/L, 酸水解酪蛋白 30 g/L, 蔗糖 200 g/L, 固体培养基另加琼脂粉 10 g), STC (蔗糖 200 g/L, Tris-CL 50 mmol/L (pH:8.0), CaCl<sub>2</sub> 50 mmol/L), 过滤除菌。DCM 培养基 (不含氨基酸的酵母粉 1.7 g/L, 天冬碱 2 g/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g/L, glucose 10 g/L, 用 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 调节 PH 值到 6.0, 琼脂粉 18 g/L)

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 限制性内切酶、Taq 酶购于 TaKaRa 公司; 连接酶购自 NEB 公司; 各种抗生素、溶壁酶购于 Sigma 公司; 引物合成和 DNA 测序委托三博公司完成。Miracloth 滤纸购于 Merck-Calbiochem 公司; 同位素标记试剂盒 Primer-a-gene Labeling System, pGEM-T Easy Vector Systems 购自 Promega 公司。

### 1.2 蛋白序列同源性搜索

运用 BLASTP 同源搜索, 以 ORP 家族 ORD 结构域上同源性高达 90% 以上的氨基酸序列为靶序列<sup>[4]</sup>, 在稻瘟菌基因组数据库 ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/magnaporthe\\_grisea/Blast.html](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/magnaporthe_grisea/Blast.html)) 中搜索。获得的序列运用 ClustalX 软件进行比对, E 值为 1e-1。

### 1.3 敲除载体的构建

**1.3.1 PCR 扩增:** 根据稻瘟菌基因组 DNA 序列, 在假定基因 MGG\_03047.5 启动子前 1kb 左右和终止密码子后 400 bp 左右处, 设计引物: ORP1-F: 5'-AAG-CTTCTTTAATCCGCCGCCCATTC-3' 和 ORP1-R: 5'-AAGCTTCGACCAACCAGAGCAGCAAC-3'。从野生型菌株 Y34 的基因组总 DNA 中扩增到含有 *MgORP1* 基因的启动子和阅读框架的目的片段。PCR 反应采用 50  $\mu$ L 体系, 反应条件为: 94 4 min; 94 1 min, 60 1 min, 72 6 min, 循环 30 次; 72 10 min。

**1.3.2 构建敲除载体:** 与 pGEM-T easy 载体相连构建成 pT-MgORP1, 经测序确定序列正确。再用 *Bam*H /*Eco*RV 从 pCX62 中将含潮霉素基因切大小约 1.4 kb 的片段下, 用其替换 pT-MgORP1 的 *Bam*H /*Eco*RV 片段 (约 3581 bp), 获得敲除载体 pKO-MgORP1。

### 1.4 稻瘟菌原生质体的制备和转化

**1.4.1 原生质体的制备:** 参考 Sweigard 等方法<sup>[17]</sup>, 挑取 2 块稻瘟菌块于 CM 液体培养基上, 用 25、150 r/min 摇菌培养 2 d 后, 取 10 mL 培养液至 100 mL 的 YEG 培养基内扩大培养 1~1.5 d 后获得幼嫩菌丝

体。菌丝体经 Miracloth 过滤后放入 10 mg/mL 的溶壁酶 (Lysing enzymes, 用 1 mol/L sorbitol 配制) 液体内消解细胞壁 2.5 h (60 r/min, 30 °C)。消化后的细胞悬浮液经过 Miracloth 过滤, 滤去未被消化的菌丝体。收集的溶液用 2700 × g 离心 5 min 后收集原生质体, 再用 STC 洗涤 2 次, 即得可用于转化的原生质体, 用 STC 调节原生质体浓度为  $1 \times 10^8 \sim 10^9$  个/mL, 分装 (每管 200  $\mu$ L), 保存于 -80 °C。

**1.4.2 转化:** 取一管原生质体加入 10  $\mu$ L 被转质粒, 静置 20 min 后, 加入 1.25 mL 的 40% PTC (用 STC 配制 40% 的 PEG3350, 过滤除菌), 轻轻混匀, 静置 20 min, 加入 5 mL 液体 TB3, 室温振荡培养 12 h。与 TB3 固体培养基 (47 ~ 55 °C, 含 200 ~ 300  $\mu$ L/mL 潮霉素, 100  $\mu$ L/mL 安苄青霉素) 混匀, 倒平板。培养 12 h 后, 再用 TB3 固体培养基 (所含抗生素同上) 覆盖一层。5 ~ 7 d 后, 挑取转化子。

### 1.5 转化子的筛选和分子验证

**1.5.1 PCR 法检测:** 挑取转化子, 放在含有潮霉素抗性的燕麦培养基中再次筛选培养。将生长出的转化子转入液体 CM 中培养振荡 2 d (28 °C, 150 r/min), 收集菌丝, 参照 Talbot 等方法<sup>[18]</sup>, 提取总基因组 DNA。根据潮霉素磷酸转移酶基因上的引物 HPH853 (5'-ACAGACGTCGCGGTGAGTT-3') 和 *MgORP1* 基因后端引物 ORP-DR (5'-ATGCATGTTTTGGCACCGG-C-3'), 进行 PCR 扩增验证。PCR 反应采用 20  $\mu$ L 体系, 反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 循环 35 次; 72 °C 5 min。

**1.5.2 Southern 杂交方法验证:** 采用同位素标记法, 以 Primer-a-gene Labeling System (Promega 公司) 标记试剂盒中的  $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP 来标记探针。探针 1 为稻瘟菌基因 *MgORP1* 上一段大小为 1065 bp 的 PCR 片段 (引物 P1-F: 5'-AAGCTTCTGGCGATTTTCATGTC-3' 和 P1-R: 5'-TTTCTTCCACACTTCCAATG-3'), 探针 2 为大小 819bp 潮霉素基因片段 (引物 H1: 5'-TCCCAAGCTGCATCAT-3' 和 H2: 5'-TGAACCTACCCG-CGTCTGT-3') (具体见图 2 标示), 操作方法见试剂盒说明书。

### 1.6 突变体表型鉴定

**1.6.1 菌落形态观察及生长速率测定:** 用打孔器取 0.5 mm 大小的菌块或取 2  $\mu$ L 的孢子悬浮液 ( $1 \times 10^5$  个/ $\mu$ L) 接种于各种培养基上培养, 测量菌落大小及其观察菌落形态。重复 3 次。

**1.6.2 菌丝长度测定:** 各菌株在 CM 培养基上 28 °C 培养 5-7 d, 挑取菌丝于载玻片上, 用细胞核染料 DAPI (100 ng/mL) 染色, 在显微镜下观察, 随机抽取 50 个菌丝细胞, 用软件 ACT-2U (Nikon 公司) 量取相邻两个细胞核间的距离, 并进行方差分析。

**1.6.3 分生孢子产量、孢子萌发以及附着胞形态观察:** 菌株在 OMA 培养基上培养 7 d 后, 刮去表面菌丝, 于 25 °C 连续光照 3 ~ 4 d, 用 5 mL 无菌水洗脱分生孢子, 用 Miracloth 过滤获得分生孢子悬浮液。在显微镜下观察孢子形态, 用血球计数板计算孢子浓度, 用软件 ACT-2U 随机测定 50 个分生孢子的长度和宽度。然后调整孢子浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL, 取 20  $\mu$ L 于 Parafilm (Pwchinery Plastic Packaging Inc. 产品) 上, 置于 25 °C 条件下保湿培养, 3 ~ 4 h 后观察芽管的产生, 6 ~ 8 h 后观察附着胞形态情况。

**1.6.4 致病力情况调查:** 分生孢子悬浮液的获得方法同上, 孢子浓度配制成  $1 \times 10^6$  个/mL, 接种方法见参考文献[19]。

### 1.7 突变体的遗传互补

将 1.3 部分所述的 pT-MgORP1 (含 *MgORP1* 的阅读框架、前端启动子区约 1.4 kb 以及终止密码子后端约 400 bp 的序列) 用内切酶 *Hind*III 连入含有氯喹磺隆筛选标记的载体 pSULF-gfp<sup>[15]</sup>。利用农杆菌介导 T-DNA 转化法将其转入敲除菌株, 方法参考文献[20]。挑取转化子于 DCM 培养基上 (含氯喹磺隆 100  $\mu$ g/mL), 以野生型和突变体为对照, 观察表型是否互补。

## 2 结果和分析

### 2.1 稻瘟菌基因组中 ORP 家族蛋白序列分析

ORP 家族蛋白序列有一个共同的特点, 它们在蛋白序列的 C 端都有一个大小约 150 ~ 200 个氨基酸序列相似性很高的结构域——ORD 结构域。参考 Beh 等方法<sup>[4]</sup>, 用来自拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*)、线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、人类 (*Homo sapiens*)、红色面包霉 (*Neurospora crassa*)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、小白鼠 (*Mus musculus*)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等 39 个 ORP 蛋白的同源序列比对, 取其同源性在 90% 以上的氨基酸组成一个 ORP 家族的保守序列——the consensus sequence。本文也使用 ORP 家族这一保守序列对稻瘟菌基因组数据库进行搜索比对分析。E 值为  $1e-1$ 。获得 7 个同源蛋白, 通过进一步分析保守结构

域 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 和 <http://smart.embl-heidelberg.de/>), 获得 6 个可能的 ORP 族蛋白。它们分别是 MGG\_03047.5、MGG\_11490.5、MGG\_05718.5、MGG\_09949.5、MGG\_13935.5、MGG\_00853.5。它们都有 ORP 家族中典型的保守 ORD 结构域。这六个蛋白序列中的“ORD”结构域序列与 ORP 蛋白家族的共同序列进行比对 (用 ClustX 软件)。结果显示 (图 1-A), 图中黑色下划线标出的为 3 个亚结构域 (subdomains), 它们被大小不定且同源性低的序列分开。在这些保守序列中, 有些氨基酸是在所有被比对 OSBP 同源序列中保守不变的, 图中以“\*”标出。其中第 3 个亚结构域中的高度保守序列: EQVSHPPP, 通常被称为“指纹”序列 (fingerprint sequence)。它在所有的 ORP 蛋白序列

中保守性都极高<sup>[7]</sup>。

ORP 族蛋白除了含有一个保守的 ORD 结构域外, 还有一些共同特点, 如大部分的成员蛋白带有 PH 结构域、Ankyrin 重复区、以及含有 coiled-coil 区<sup>[7]</sup>。在稻瘟菌 ORP 家族这 6 个蛋白成员中也有这个特点。如 MGG\_03047.5 和 MGG\_11490.5, 它们在 N 端都含有一个 PH 结构域。在酵母的 7 个 OSH 蛋白中有 3 个含有 PH 结构域 (Osh1p、Osh2p 和 Osh3p)。有研究表明 PH 结构域起着将蛋白定位到膜上的功能<sup>[21]</sup>。除了 PH 结构域, Ankyrin 重复区在 ORP 家族中也 very 常见。如酵母的 Osh1p 和 Osh2p 都含有 Ankyrin 重复区。

本论文选择具有典型 ORD 结构域的基因 MGG\_03047.5 为进一步功能研究的研究对象, 它在 N 端有一个 PH 结构域和 3 个 Ankyrin 重复区, 其结构与

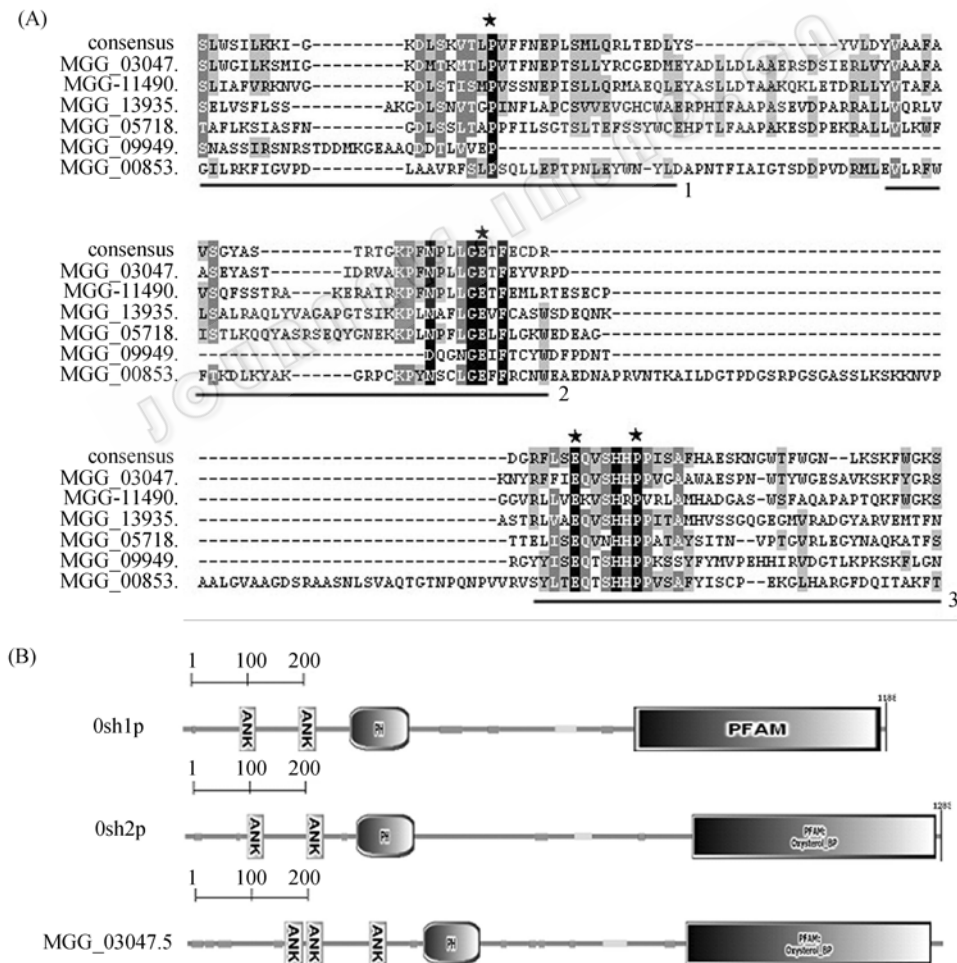


图 1 稻瘟菌 6 个 OSBP 同源序列与其他 OSBP 相关序列的比对

Fig. 1 Sequence alignments of the 6 *Magnaporthe grisea* OSBP homologues compared to other related proteins. (A) Alignment of amino acid sequences from all *Magnaporthe grisea* ORP homologues with the consensus sequence. The consensus sequence compiled from 39 independent OSBP homologues<sup>[4]</sup>. Residues identified by an asterisk (\*) signified invariant amino acids found in all 39 OSBP homologues. The bars (1-3) indicated OSBP subdomains within which the greatest sequence identity between OSBP homologues was located. (B) The architecture analysis of Osh1, Osh2 from yeast and MGG\_03047.5 by simple modular architecture research tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

酵母中的 Osh1p 和 Osh2p 很相似 (图 1-B)。该基因的 ORD 结构域与上述的保守序列——the consensus sequence 比对, E 值最低, 为  $8e-31$ 。

## 2.2 稻瘟菌 *MgORP1* 基因的敲除和验证

**2.2.1 PCR 法检测:** 本研究共挑取到抗潮霉素的转化子 111 个, 分别提取基因组总 DNA, 用引物对 HPH853/ORP-DR 进行 PCR 扩增检测, 能扩增到约 2 kb 大小目的条带的转化子共有 5 个, 它们分别为: MgORP1-1、MgORP1-2、MgORP1-3、MgORP1-66、MgORP1-103。

**2.2.1 Southern 杂交法检测:** 首先以潮霉素基因为探针 (probe2, 见图 2-A), 验证经 PCR 检测正确的 5 个转化子 (泳道 2~6) 基因组中潮霉素基因的拷贝数。基因组总 DNA 经过内切酶 *EcoR* I 进行完全酶切后进行杂交。结果显示 (图 2-B), 泳道 1 为野生型 Y34, 没有信号带。泳道 2、4 和 6 只有一条信号带, 潮霉素基因为

单拷贝, 但泳道 2 的信号带大小和理论不符。泳道 3 和 5 有多条信号带, 潮霉素基因有多个拷贝。其中泳道 4 和 6 分别为转化子  $\Delta$ MgORP1-3 和  $\Delta$ MgORP1-103, 它们极有可能是 *MgORP1* 基因的敲除转化子。

为了进一步验证潮霉素是与 *MgORP1* 基因上 DNA 片段发生正确的置换, 利用 *MgORP1* 基因上 1065 bp 的 PCR 产物为探针 (probe1 见图 2-A), 再次对野生型 Y34, 两突变株  $\Delta$ MgORP1-3 和  $\Delta$ MgORP1-103 进行 Southern 杂交。并采用三种内切酶 *Bam*H I, *Eco*R V 和 *Xho* I 分别对基因组总 DNA 进行完全酶切, 相互验证 (酶切图见 2-A)。结果显示 (图 2-C), 在 *Bam*H I 酶切组中, 野生型 Y34 有 2649 bp、124 bp 和 12096 bp 的 3 条信号带, 124 bp 条带小已跑出胶外, 所以图中能见到两条信号带。在突变株中, 12096 bp 带中信号部分被置换, 所以只见 2649 bp 的一条带; 在 *Eco*R V 组中, 野生型有一 6580 bp 大小的信号带, 在突变株内

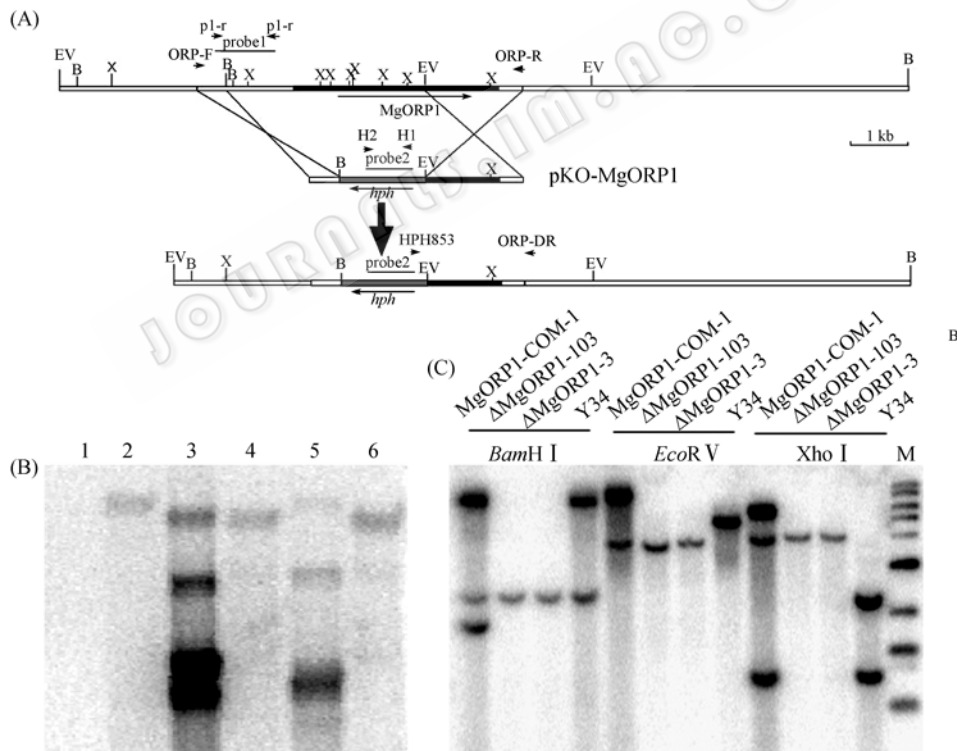


图 2 *MgORP1* 基因敲除突变株的构建以及分子鉴定

Fig. 2 The *MgORP1* knockout construct and molecular confirmation. (A) Restriction map of the *MgORP1* genomic region and knockout construct. Thick arrows indicate orientations of the *MgORP1* and phosphotransferase (*HPH*) gene. Arrowheads indicate the primers used in this assay. Restriction enzymes are in abbreviation as B (*Bam*H I), X (*Xho* I), EV (*Eco*R V). The *MgORP1* knockout construct pKO-ORP1 was constructed by replacing the *Bam*H I / *Eco*R V 3581 bp fragment of the *MgORP1* gene with the *hph* (about 1.4kp) gene. (B) Southern blot analysis of total genomic DNA samples isolated from Y34 and transformants were digested with *Eco*R V. The probe is a 819 bp PCR fragment amplified from *hph* gene open reading frame (the probe 2). Lane 1 is Y34 genomic DNA, lane 2-6 are transformants. lane 4 and lane 6 are  $\Delta$ MgORP1-3 and  $\Delta$ MgORP1-103. (C) Southern blot analysis of total genomic DNA samples isolated from Y34 (WT),  $\Delta$ MgORP1-3,  $\Delta$ MgORP1-103 (two deletion mutants) and MgORP1-COM-1 (complementation strain) were digested with *Bam*H I, *Eco*R V and *Xho* I. The probe is a 1065 bp PCR fragment amplified from Y34 genomic DNA using primers p1-f and p1-r (the probe 1).

由于用 1.4 kb 大小的潮霉素基因替代了 3581 bp 的片段,所以能杂出的条带比野生型的 6580 bp 小约 2.1 kb (3581 bp 减去 1400 bp); 在 *Xho* 中,野生型有两条大小分别为 2428 bp 和 1295 bp 的信号带,突变体中由于 *MgORP1* 基因内 *Xho* 酶切位点被置换,所以只有一条大小约 4670 bp 的条带。以上 3 组酶切杂交出的信号结果,均与理论相符。因此,可以确定在这两个突变株中确实进行了正确的同源重组——即基因 *MgORP1* 确已被敲除。

根据以上结果,充分证实突变株  $\Delta$ *MgORP1*-3 和  $\Delta$ *MgORP1*-103 确实是 *MgORP1* 基因被敲除的突变株。本研究共挑取到抗潮霉素的转化子 111 个,经验证获得两株敲除突变体。同源重组比率约为 1.8%。

### 2.3 突变体表型鉴定及其遗传互补实验

**2.3.1 突变体表型分析:** 在不同培养基上观察突变体株、野生型以及互补菌株的菌落形态,结果发现:突变体  $\Delta$ *MgORP1*-3 和  $\Delta$ *MgORP1*-103 比野生型 Y34 菌落生长小(图 3-A 和 3-B)。在 CM 培养基上培养 10 d, Y34 的菌落大小约 6.6 cm,两突变体约 5.2 cm,突变体约为野生型菌落大小的 80%。经过多种不同培养基多次实验,突变体菌落大小在野生型的 80~85% 左右。为了清楚突变体菌落变小是由于菌丝细胞变短还是菌丝生长缓慢引起,在荧光显微镜下大量观察测量突变体、野生型的菌丝两细胞核间距离,以此表示细胞菌丝长度,结果显示突变体与野生型菌丝细胞长度跨度大,从 16.96  $\mu$ m 到 99.05  $\mu$ m。通过 Duncan 新复极差测验结果显示野生型互补株两细胞核间距离没有明显差异(表 1)。所以 *MgORP1* 基因的敲除可能是通过影响菌丝生长速率,从而导致菌落变小。

分生孢子产量、孢子长宽比值测定结果显示(表 1),突变体的分生孢子产量比野生型略低。野生型约为  $7.32 \times 10^5$  个/mL,突变株约为  $4.42 \times 10^5$  个/mL,占野生型的 60% 左右。

本研究还对各菌株的孢子萌发、附着胞形成以及在水稻上的致病力等情况进行调查。突变体与野生型未见明显差别(结果略)。

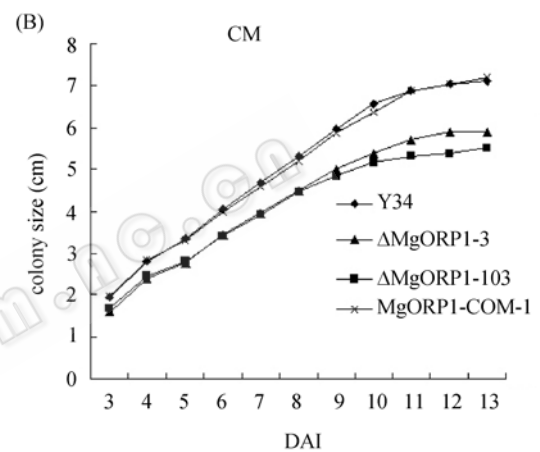
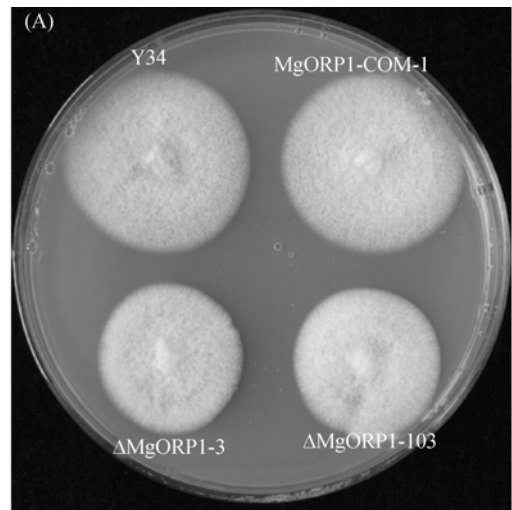


图 3 野生型菌株 Y34、突变株  $\Delta$ *MgORP1*-3 和  $\Delta$ *MgORP1*-103 及其互补株 *MgORP1*-COM-1 菌落形态及其菌落生长曲线图  
Fig. 3 Colony morphology of wild-type strain Y34,  $\Delta$ *MgORP1*-3,  $\Delta$ *MgORP1*-103, and the complementation strain *MgORP1*-COM-1 were grown on complete medium (CM) for 6 days (A). Growth curve of deleted mutants and complemented transformant (*MgORP1*-COM-1) on CM for 13 days (B).

**2.3.2 互补菌株的获得:** 为了确定突变体的表型确实是由于 *MgORP1* 基因的缺失所致,对该突变体进行了遗传互补实验。本研究使用农杆菌共培养转化法,将互补载体分别转化突变体  $\Delta$ *MgORP1*-3 和  $\Delta$ *MgORP1*-103, 分别挑取到 30 株和 12 株转化子。这些转化子通过 PCR 法(数据略)和 Southern 检测,结果见图 2-C 的泳道 *MgORP1*-COM-1, 除了具有同

表 1 稻瘟菌 *MgORP1* 突变体的表型分析

Table 1 Phenotypic analysis of *MgORP1* mutants of *M. grisea*<sup>a</sup>

Strain	Colony diameter/(cm) <sup>b</sup>	Conidiation /( $\times 10^5$ /mL) <sup>c</sup>	Length/width ratio of conidia <sup>d</sup>	Distance between two nucleus/ $\mu$ m <sup>e</sup>
Y34	5.8 $\pm$ 0.07	7.32 $\pm$ 0.78	3.74 $\pm$ 0.46	57.73 $\pm$ 21.00
$\Delta$ <i>MgORP1</i> -3	4.92 $\pm$ 0.13	4.42 $\pm$ 0.38	3.61 $\pm$ 0.67	50.56 $\pm$ 14.97
<i>MgORP1</i> -COM-1	5.66 $\pm$ 0.11	6.23 $\pm$ 0.49	3.63 $\pm$ 0.58	52.43 $\pm$ 17.54

<sup>a</sup> Data provided in all columns were averages with standard deviations. <sup>b</sup> Diameter of colony at day 9 after incubation on complete medium agar plates under 28 °C. <sup>c</sup> Average numbers of conidia harvested from a 9-cm oatmeal agar plate at day 10 after incubation under 28 °C. <sup>d</sup> Conidial length/width ratio; average of 50 measurements. <sup>e</sup> Average distance between nucleus of mycelia in 50 measurements; stained by DAPI.

基因敲除突变体的信号带外, 还出现一条 (*EcoRV* 酶切泳道) 和两条 (*BamHI* 和 *XhoI* 酶切泳道) 杂交条带, 这是导入的互补载体信号带 (不同酶切出现的条带数不一样)。这充分说明了 *MgORP1* 基因全长序列重新整合到了突变株基因组上。再与野生型、突变体一起观察表型。经过菌落大小测定, 其中分别有 19 株 (63%) 和 6 株 (50%) 在菌落大小得到恢复, 获得遗传互补。见图 3 和表 1, 互补株 *MgORP1*-COM-1 的菌落大小接近野生型, 产孢量恢复到  $6.23 \times 10^5$  个/mL, 突变体约占互补株的 71% 比, 互补株的产孢量有所恢复。本实验从遗传上证实了 *MgORP1* 基因的敲除导致菌落变小和产孢量降低。

### 3 讨论

近几年来对 ORPs 家族的研究主要集中于它们在酵母以及动物 (主要为人类) 细胞内的功能、定位等方面, 在其他生物上报道很少。根据现有对该家族蛋白的了解, 敲除该家族所有基因导致酵母细胞不能存活, 但是敲除单个成员基因对酵母的生存没有影响<sup>[4]</sup>。所以推测稻瘟菌 ORP 家族基因成员间也具有功能冗余, *MgORP1* 基因的缺失对稻瘟菌生存影响并不明显。

本研究首次利用 ORP 家族的保守结构域 ORD, 对稻瘟菌数据库进行搜索, 获得 6 条可能的蛋白成员, 并选择其中比对相似程度最高, 具有典型结构特征的 *MgORP1* 基因做进一步功能研究。对该基因敲除突变体进行初步的表型观察, 突变体在分生孢子形态, 分生孢子萌发, 附着胞的产生, 以及在水稻叶片的致病力情况下, 从表面上并未观察到突变体与野生型有明显的差异, 但突变体菌落大小是野生型的 80% 左右, 且产孢量降低。根据分生孢子产孢量的计算方法, 即从 9cm 的培养皿中洗下分生孢子, 然后定容计算孢子浓度。由于突变体菌落面积比野生型降低了 15%~20%, 所以产孢量降低, 在一定程度上可能是由于菌落面积变小所致。

在对酵母 *OSH* 基因的研究中, 发现该类家族与菌丝生长有关, 如在研究致病酵母 (*C.albicans*) 和酿酒酵母 (*S.cerevisiae*) *OSH3* 基因结果表明, 该基因与酵母的假菌丝生长有关<sup>[22, 23]</sup>。Rho GTP 酶在真菌细胞中参与调控细胞极性生长, *OSH* 基因能与 Rho 家族的 CDC42p 和 Rho1p 互作, 并影响它们的亚细胞定位, 过表达 *Osh4* 基因还能恢复 Rho 家族成员 CDC42 缺失突变体的温度敏感生长缺陷<sup>[24]</sup>。但它们是如何影响菌丝生长的机制并不清楚。

丝状真菌最基本的单位是菌丝, 但至今对真菌菌丝

生长机制的理解还很有限。综合锐顶镰刀菌 (*Fusarium acuminatum*), 酿酒酵母 (*S.cerevisiae*), 棉阿舒囊霉 (*Ashbya gossypii*), 构巢曲霉 (*A.nidulans*), 白假丝酵母菌 (*C.albicans*) 以及玉蜀黍黑粉菌 (*U.maydis*) 等的研究结果, 菌丝顶端伸长的理解主要有 3 个模型, 其中最令人信服的模型是 Bartnicki-Gatcia 提出的囊泡供给中心模型 (the vesicle supply center model)<sup>[25, 26]</sup>。在光学显微镜下, 观察菌丝顶端有一黑色物体, 这个黑色物体被称为 Spitzenkörper<sup>[25]</sup>。它对真菌菌丝的伸长和菌丝生长方向起着很重要作用, 它所处的位点就是菌丝伸长的方向。Spitzenkörper 内聚集有许多囊泡 (vesicles), 囊泡起着运送菌丝顶端生长所需要物质的作用, 并能通过控制细胞的内吞等来决定菌丝生长。在菌丝生长顶端还有富集脂筏 (sterol-rich lipid raft) 的膜结构, 这可能有利于细胞内吞的进行。根据该模型, 脂质物质在菌丝顶端的聚集以及菌丝顶端囊泡正常工作对菌丝的正常生长起着重要的作用<sup>[26]</sup>。对 *Candida albicans* 和 *Aspergillus nidulans* 的研究表明, 细胞内 Myriocin 能通过抑制鞘磷脂的合成, 影响菌丝顶端生长。根据现有对 ORP 家族基因的研究, 该家族基因参与细胞内脂质的代谢和转运, 所以有可能 ORP 家族蛋白能通过反馈作用影响脂质的合成, 从而影响菌丝生长。

细胞质膜的麦角固醇对细胞内吞作用起着重要作用。麦角固醇合成途径中重要的酶 ERG2 缺失时导致固醇组分的改变, 影响细胞内吞<sup>[27]</sup>。ORPs 家族蛋白具有与脂类物质高度亲和能力, 能影响细胞膜的固醇和鞘磷脂的组成<sup>[4, 28, 29]</sup>。在 Beh 对酵母的 *OSH* 基因的研究发现 *OSH* 基因缺失的细胞内吞严重削弱, *OSH* 基因能通过影响细胞内固醇分布、细胞质膜脂质组成从而影响细胞内吞作用<sup>[1, 7]</sup>。

本研究 *MgORP1* 基因敲除突变体菌落生长速率变小, 可能是由于该基因的缺失, 一定程度上影响到菌丝顶端细胞膜的脂类物质分布和运输, 直接或间接影响到囊泡的内吞作用, 影响菌丝生长所需原料的提供速度, 从而影响到菌丝生长速率, 或者是通过影响 Rho 家族蛋白的正常工作而导致的。究竟如何还需要进一步的研究。

致谢 本研究工作是在中国科学院微生物研究所何朝族老师实验室完成, 期间得到了何老师及其实验室成员的悉心指导和帮助; 在构建稻瘟菌敲除突变体时, 使用的 PEG 介导原生质体转化法及其突变体的筛选技术, 曾得到福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室王宗华研究员和鲁国东教授的指导, 在此一并表示衷心的感谢!

## 参 考 文 献

- [1] Beh CT, Rine J. A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 14): 2983–2996.
- [2] Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, 1990, 343(6257): 425–430.
- [3] Bjorkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *J Clin Invest*, 2002, 110(6): 725–730.
- [4] Beh CT, Cool L, Phillips J, et al. Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues. *Genetics*, 2001, 157: 1117–1140.
- [5] Taylor FR, Saucier SE, Shown EP, et al. Correlation between oxysterol binding to a cytosolic binding protein and potency in the repression of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem*, 1984, 259(20): 12382–12387.
- [6] Dawson PA, Ridgway ND, Slaughter CA, et al. cDNA cloning and expression of oxysterol-binding protein, an oligomer with a potential leucine zipper. *J Biol Chem*, 1989, 264(28): 16798–18803.
- [7] Lehto M, Olkkonen VM. The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signalling. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1631: 1–11.
- [8] Ridgway ND, Dawson PA, Ho YK, et al. Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J Cell Biol*, 1992, 116(2): 307–319.
- [9] Lessmann E, Ngo M, Leitges M, et al. Oxysterol-binding protein-related protein (ORP) 9 is a PDK-2 substrate and regulates Akt phosphorylation. *Cell Signal*, 2007, 19: 384–392.
- [10] Alphey L, Jimenez J, Glover D. A *Drosophila* homologue of oxysterol binding protein (OSBP)—implications for the role of OSBP. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1395: 159–164.
- [11] Sugawara K, Morita K, Ueno N, et al. BIP, a BRAM-interacting protein involved in TGF-beta signalling, regulates body length in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*, 2001, 6: 599–606.
- [12] Fukuzawa M, Williams JG. OSBP<sub>a</sub>, a predicted oxysterol binding protein of Dictyostelium, is required for regulated entry into culmination. *FEBS Lett*, 2000, 527: 37–42.
- [13] Valent B. Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology*, 1990, 80(1): 33–36.
- [14] Zhao XC, Kim Y, Xu JR. A ligation-pcr approach for generating gene replacement constructs in *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics Newsletter*, 2004, 51: 17–18.
- [15] Sesma A, Osbourn AE. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature*, 2004, 431: 582–586.
- [16] 林春花, 贺春萍, 王葵娣, 等. 稻瘟菌突变体 T-DNA 插入位点的精细定位和插入模式的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(4): 588–592.
- [17] Sweigard JA, Carroll AM, Kang S, et al. Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell*, 1995, 7(8): 1221–1233.
- [18] Talbot NJ, Salch YP, Ma M, et al. Karyotypic Variation within Clonal Lineages of the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea*. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(2): 585–593.
- [19] 贺春萍, 林春花, 廖奇亨, 等. 稻瘟病菌 T-DNA 插入突变体库构建及致病相关突变体筛选. *热带作物学报(Chinese Journal of Tropical crops)*, 2007, 28(1): 80–84.
- [20] Rho HS, Kang S, Lee YH. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol Cells*, 2001, 12(3): 407–411.
- [21] Levine TP, Munro S. Dual targeting of Osh1p, a yeast homologue of oxysterol-binding protein, to both the Golgi and the nucleus-vacuole junction. *Mol Biol Cell*, 2001, 12: 1633–1644.
- [22] Hur HS, Ryu JH, Kim KH, et al. Characterization of Osh3, an oxysterol-binding protein, in filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *J Microbiol*, 2006, 44(5): 523–529.
- [23] Park YU, Hwang O, Kim J. Two-hybrid cloning and characterization of OSH3, a yeast oxysterol-binding protein homolog. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293: 733–740.
- [24] Kozminski KG, Alfaro G, Dighe S, et al. Homologues of oxysterol-binding proteins affect Cdc42p- and Rho1p-mediated cell polarization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*, 2006, 7: 1224–1242.
- [25] S. Bartnicki-Garcia FH, G. Gierz. Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*, 1989, 153: 46–57.
- [26] Steinberg G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot Cell*, 2007, 6(3): 351–360.
- [27] Munn AL, Heese-Peck A, Stevenson BJ, et al. Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Mol Biol Cell*, 1999, 10(11): 3943–3957.
- [28] Dawson PA, Van der Westhuyzen DR, Goldstein JL, et al. Purification of oxysterol binding protein from hamster liver cytosol. *J Biol Chem*, 1989, 264(15): 9046–9052.
- [29] Jiang B, Brown JL, Sheraton J, et al. A new family of yeast genes implicated in ergosterol synthesis is related to the human oxysterol binding protein. *Yeast*, 1994, 10(3): 341–353.

## Characterization of oxysterol binding protein homolog *MgORP1* in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*

Chunhua Lin<sup>1,2</sup>, Fucong Zheng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Environment and Plant Protection College, Hainan University, Danzhou 571737, China)

<sup>2</sup>Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

**Abstract:** [Objective] To study the component of ORPs (Oxysterol-binding proteins-related proteins) family in the rice fungus (*Magnaporthe grisea*), and the functions of *MgORP1* gene with growing development of *M. grisea*, we constructed two *MgORP1* deletion mutants and a complementation mutant. [Methods] All proteins of ORPs have a conserved OSBP-related ligand-binding domain (ORD), which was compared by BLASTP with the sequences of *M. grisea* genomic DNA published in *M. grisea* database. One of *ORP* gene, designated as *MgORP1*, was deleted by gene replacement and then the phenotypes of  $\Delta$ *MgORP1* were characterized. [Results] Six putative ORP family proteins have been found in *M. grisea*, and the growth rate of hyphal colony in complete medium and conidiation of  $\Delta$ *MgORP1* were lower, whereas the ability of conidia germination, appressoria formation and pathogenicity were normal. [Conclusion] *MgORP1* gene of *M. grisea* was probably involved in colony growth and conidiation.

**Keywords:** *Magnaporthe grisea*; sterol; oxysterol binding proteins; gene knockout

Supported by the Chinese National Natural Sciences Foundation (30260046)

\*Corresponding author. Tel: +86-898-23300371; Email: zhengfucong@126.com

Received: 25 February 2008/ Revised: 1 April 2008