

刘 博,孔婷婷,刘 限,等. 玉米纹枯病病菌  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶基因克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):39-41.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.011

# 玉米纹枯病病菌 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶基因克隆与表达分析

刘 博,孔婷婷,刘 限,高增贵,姚 远,唐 琳,何世道

(沈阳农业大学植物免疫研究所,辽宁沈阳 110866)

**摘要:**前期利用 In-Fusion SMARTer™ cDNA Library Construction Kit 已完成玉米纹枯病病菌 WF-9 菌株的全长 cDNA 文库,并进行 EST 分析。笔者在此基础上,将 EST 片段进行聚类拼接,得到一个长 944 bp 的序列,根据所得序列开放阅读框设计引物,克隆得到玉米纹枯病病菌  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶基因(*GGT*) cDNA 序列,以生物信息学方法对其序列进行预测分析,并利用 real-time PCR 分析 *GGT* 在立枯丝核菌侵染玉米叶片不同时期的表达特性。结果表明,克隆所得 617 bp 序列与 EST 序列完全相同,在 GenBank 进行 Blastx 同源比对,与  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase(*Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP)有 85% 的同源性。实时荧光定量 PCR 表明,*GGT* 在立枯丝核菌侵染玉米叶片各个时期均有表达,并存在明显差异,其中在病菌侵染玉米叶片 24 h 时表达量最高。

**关键词:**立枯丝核菌;*GGT*;基因克隆;表达分析

**中图分类号:** S435.131.4\*9

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2015)05-0039-03

玉米纹枯病是世界玉米产区广泛发生、危害严重的世界性病害之一。近年来,随着玉米栽培密度的提高,氮肥用量增加,形成有利于玉米纹枯病发生的小气候条件,该病在某些地区危害日益严重,有逐年加重的趋势<sup>[1-2]</sup>。玉米纹枯病现已成为制约我国玉米持续增产的主要病害。

目前,关于真菌病害相关基因研究较多,杜欣可克隆了玉米纹枯病病菌内切多聚半乳糖醛酸酶的基因,用该基因构建了酵母工程菌株,接种玉米叶片出现水浸状病斑<sup>[3]</sup>。崔福浩成功克隆了  $\beta$ -1,4-内切纤维素酶基因,用该基因构建了酵母工程菌株,接种试验表明,该基因可以杀死植物细胞<sup>[4]</sup>。还有一些与代谢有关的基因已被克隆,Bowyer 等发现引起禾谷类全蚀病的禾顶囊壳菌(*Gaeuman-nomyces graminis*)产生燕麦素酶分解燕麦根表皮细胞内的皂角苷燕麦素,编码该酶的基因突变后禾顶囊壳菌也就失去了对燕麦的致病力<sup>[5]</sup>。关于玉米纹枯病病菌  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶基因( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, *GGT*)未见报道, $\gamma$ -谷氨酰转肽酶是一种催化肽基转移作用的酶,在 *H. pylori* 诱导的线粒体介导的程序性细胞死亡中,主要是通过诱导线粒体释放细胞色素 C 进入细胞质和激活 Caspase 家族成员起作用,*H. pylori*  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, *GGT*) 在分泌和成熟后通过离子键与细胞膜结合,将细菌和宿主细胞直接连接起来<sup>[6]</sup>。 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶广泛存在于原核和真核细胞中<sup>[7]</sup>,在动物体内主要存在于肾、肝、胰等脏器,在谷胱甘肽的新陈

代谢中起到了重要作用<sup>[8]</sup>。

笔者所在实验室构建了立枯丝核菌 cDNA 文库,获得了 329 个高质量 ESTs 序列<sup>[9]</sup>。为了明确 *GGT* 在病菌侵染过程中的表达情况,通过对 EST 数据进行分析,根据所得序列设计引物,克隆了立枯丝核菌 *GGT*,验证了前期 EST 序列测序结果。在此基础上,通过测定该基因在病原菌侵染过程中的表达量,探明该病原菌与寄主互作过程中的基因表达规律,为下一步研究侵染机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

玉米立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* AG-11A)菌株 WF-9,沈阳农业大学植物免疫研究所保存。立枯丝核菌在 PDA 培养基培养 3 d,刮取菌丝 50~100 mg,用于 RNA 提取、克隆。用离体叶片接种法,将培养 3 d 的立枯丝核菌菌饼,放在玉米 3 叶 1 心期苗的叶片上进行接菌,分别取 0、12、18、24、30、42、54、72 h 互作玉米叶片(水渍状发病处)100 mg,用于各个侵染时期基因表达量分析。所有样品经液氮速冻,保存于 -80℃ 备用。

### 1.2 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

提取菌株 WF-9 生长第 3 天样品和 0、12、18、24、30、42、54、72h 互作玉米叶片总 RNA,参照 TaKaRa RNA 提取试剂盒说明提取,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量,使用 Thermo 公司 Nano Drop ND 1000 超微量分光光度计测定浓度,使用 TaKaRa 公司反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。

### 1.3 立枯丝核菌 *GGT* 的克隆

笔者所在实验室已经构建了玉米立枯丝核菌 AG-1-1A 的全长 cDNA 文库,并进行了全长 cDNA 的随机测序。在随机测序中,分离出 *GGT* EST 片段,通过软件拼接,得到长 944 bp 的基因,包含完整开放阅读框。本试验根据所得序列开放阅读框,利用软件 primer premier 5.0 设计特异性引物 c06-f;5'-CACGCATACTCCCGACTACT-3'和 c06-r;5'-

收稿日期:2015-01-10

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD04B03、2013BAD07B03);辽宁省农业科技创新团队项目(编号:2014201003)。

作者简介:刘 博(1990—),男,陕西延安人,硕士研究生,主要从事玉米病害分子生物学研究。E-mail:liubo4552@126.com。

通信作者:高增贵,博士,研究员,主要从事玉米及蔬菜病害研究。E-mail:gaozengui@sina.com。

GCAACACCATCTCTCTCTGA - 3'。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,程序为 95 ℃ 4 min;95 ℃ 45 s,54 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min, 35 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 永久保存。PCR 产物用天根切胶回收试剂盒回收,并与 pMD19 - T 载体 (TaKaRa, 日本) 连接,转化大肠杆菌感受态细胞,挑取阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.4 GGT 序列及系统发育分析

利用软件包 DNASTAR 识别可读框、推测氨基酸序列、预测等电点和分子量。同源搜索 Blast 分析在 NCBI 的网页 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 上完成,用 Mega 4.0 软件构建 GGT 氨基酸系统进化树。

1.5 GGT 表达分析

根据获得的 GGT 核酸序列设计荧光定量 PCR 引物 C06ofr - F:5' - CTATCGCTCAGGCCATTGTT - 3', C06ofr - R: 5' - ATGCGTCGATCTCCTTGTG - 3';以立枯丝核菌 GAPDH (基因登录号 AF339928) 为内参基因,设计内参引物 GAPDH - F:5' - GGTGGCAAAGTCATACCAT - 3', GAPDH - R:5' - TCTGCGTCTCTTGGAGATA - 3'。反应在 BIO - RAD CFX96 荧光定量 PCR 仪 (BIO - RAD, 美国) 上进行,反应体系为 cDNA 模板 (50 mg/μL) 2.0 μL、上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、SYBR® Premix Ex Taq™ II 12.5 μL 和 dH<sub>2</sub>O 8.5 μL,每个样品 3 个重复。反应程序为 95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s (single),共 40 个循环;95 ℃ 1 s,65 ℃ 15 s,95 ℃ (continuous),溶解曲线测定;40 ℃ 30 s。

```
GGGGAAAGAGGGTGGTTTATGGTGGCATAGGGTCACAGAGGCGTTGAAATTCGGTAGTGCTGCAC
GCACGCGCCTCGGCGATCCGGCGTTTGGTAATAACCATAAGCTCATGGCTAAAATACCCACCAAGGAG
M A K I P T K E
TTCGGAATAACGTTTCTCTCGCATTACTGATGATACCACGCACTACCCGACTACTATAACCCAGTTACGAT
F G N N V S S R I T D D T T H T P D Y Y N P V Y D
GTCCAAATCGACCATGGAACAACCATACGTCGCGCAGATGCGGACGGCTTTGCGATTGCATTACTAGT
V Q I D H G T T H T S A A D A D G F A I A L T S
TCGGTCAACCTAATCTGGGGTTCGCGTGTGATGGACCCTGCAACTGGCGTGATCTTTAATGACGTAATGGAT
S V N L I W G S R V M D P A T G V I F N D V M D
GACTTTTCAACTCCTGGACTCCCCAATGCTTTCGGACTGTGGCCTAGCCCTGGAACACCCCGAGGCTGGA
D F S T P G L P N A F G L W P S P W N Y P E A G
AAACGCCAAGTGCTTCTATGGTCCCAATTATGGAGTATCCCTCTGGAGACTTTACCTGACACTGGGTG
K R Q V S S M A P T I M E Y P S G D F Y L T L G G
GATCAGGTGGCTCGCGGATTTTCGGGGCTATCGCTCAGGCCATTGTTAACCTCGATCGCGGAATGAATATTTT
S G G S R I F G A I A Q A I V N L D R G M N I S
TGGAGTGGTTGAAGCTCCTCGAGTCCACGACCAAGCTTTCCCAACTCTGGTGAGCATTGAGAGTGGGTTTG
G V V E A P R V H D Q L F P T L V S I E S G F G
GGCACAAGGAGATCGACGATTGAAGCAAAGAGGTCACAATACGTCGTGTGTTTGATATCAACCTCGGTGTA
H K E I D A L K Q R G H N T S V F D I N L G V
GCCGAAATACAAGCTGTACACAAGACATGGATGGACAATTTTCGCTGCGAGCGATTCAAGGAAGAATGG
A E I Q A D G Q F F A A S D S R K N G
TGTTGCAGCTGGGTGCTAAAGGGGATACCACGGGTTTTCATATAAGCATATCTGATTGTTTAAATATCTTCTT
V A A G W *
GGACTGTTTGTATTATGATTCGGATTGTTGTCTTCTCTCTAAATAAATGGCAAATGGTTTAATCAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAA
```

图2 玉米立枯丝核菌 GGT 的氨基酸序列

2.2 同源性分析

根据 GGT 氨基酸序列,采用 BLASTX 在 NCBI 上进行比对,下载了 17 条 GGT 同源序列,运用 Mega 4.0 软件构建系统进化树,结果显示克隆 GGT 与立枯丝核菌 AG - 3 融合群同源性最近 (图 3)。

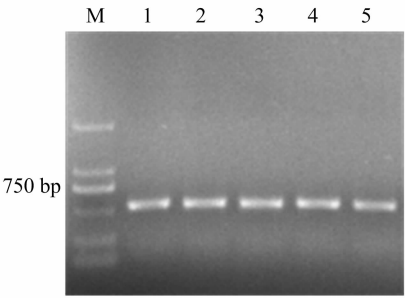
2.3 GGT 在侵染各个时期表达差异分析

利用实时荧光定量 PCR (real - time PCR) 技术,以立枯丝

2 结果与分析

2.1 GGT 的 cDNA 克隆

根据 cDNA 文库所获得序列开放阅读框设计特异性引物,以总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增到 600 bp 左右 GGT 的 cDNA (图 1)。经测序验证与 EST 片段序列一致,说明 EST 拼接序列结果正确。EST 拼接测序得到一个长 944 bp 的序列,在 NCBI 进行 BLASTx 对测序结果进行同源性分析,与 gamma - glutamyltranspeptidase (*Rhizoctonia solani* AG - 3 Rhs1AP) 有 85% 的同源性。利用 NCBI 站点的 ORF finder 进行 6 种可能的框架分析,发现该 cDNA 片段有一个完整的开放阅读框,最长的阅读框为 110 - 802,长度为 693 bp,编码 230 个氨基酸 (图 2)。



M—2.0 kb的marker; 1、2、3、4、5—GGT cDNA片段  
图1 GGT cDNA 琼脂糖凝胶电泳

核菌 GAPDH 为内参,分析了 GGT 在立枯丝核菌不同侵染时间点 (0、12、18、24、30、42、54、72 h) 的表达情况。结果表明,GGT 在立枯丝核菌侵染的各个时间点均有表达,但表达量存在明显差异,在侵染 12、18 h 时可能由于玉米自身防卫反应,GGT 表达量明显下调;而在 24 h,GGT 的表达量达到最高,可能是立枯丝核菌在寄主组织内迅速扩展,导致玉米叶片细胞开始程序性死亡,GGT 的表达量达到最大;侵染 54、72 h 表达

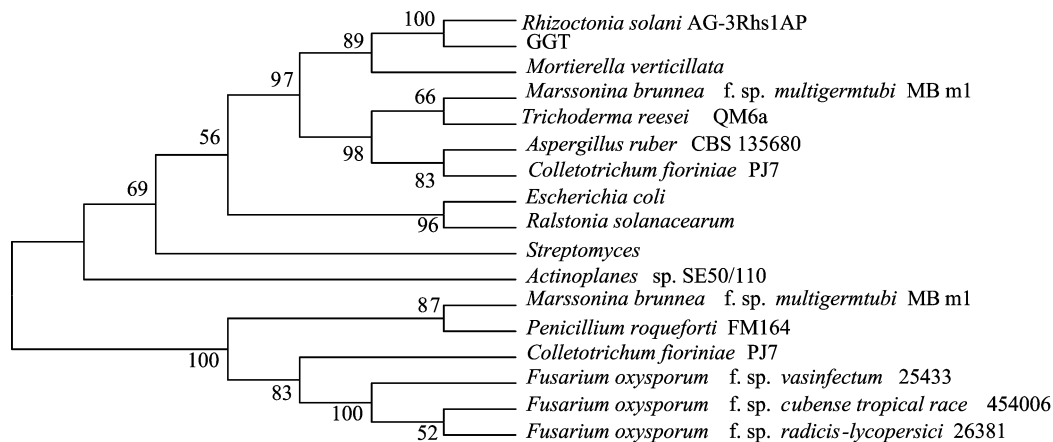


图3 *R. solani* GGT 与其他菌 GGT 氨基酸序列的系统进化树

量下降到相对平稳状态,可能是由于寄主大面积凋亡,病原与寄主互作概率减少造成的(图4)。

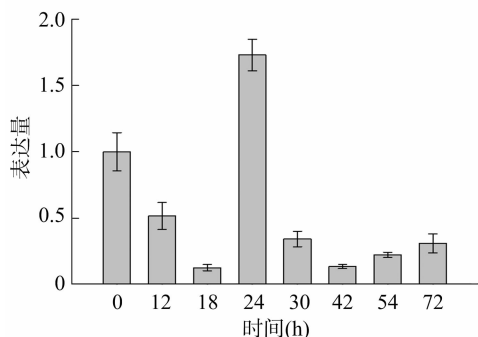


图4 侵染各个时期的差异表达

### 3 讨论

GGT 是谷氨酰循环中的关键酶,可特异性催化  $\gamma$ -谷氨酰基的转移反应。GGT 具有诱导细胞凋亡的活性,目前被广泛接受的观点是线粒体在凋亡的调节中起到了关键的作用<sup>[10]</sup>。GGT 对细胞的基本功能是线粒体结构的维护,对膜的完整性及细胞分化和发育具有影响。GGT 在真菌、植物细胞中代谢作用一直被忽略。在哺乳动物系统中,该酶已被反复使用,涉及谷胱甘肽重要的抗氧化响应功能,并与半胱氨酸输送到组织中<sup>[11]</sup>。敲除 GGT 活性基因的小鼠有异常发育和早期死亡<sup>[12]</sup>。为了进一步弄清 *Rhizoctonia solani* GGT 在细胞凋亡中的作用及探索 *Rhizoctonia solani* 的侵染机制。本试验采用 RT-PCR、基因克隆和核酸测序技术首次获得 *R. solani* AG-11A 的 GGT 核酸序列,验证了前期 EST 序列测序的结果,EST 拼接测序得到一个长 944 bp 的序列,开放阅读框为 110~802,长度为 693 bp,编码 230 个氨基酸。相对分子量 24.7 ku,理论等电点 4.68。为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的试验材料。

经序列比对结果显示,本研究克隆得到的 GGT 与 *Rhizoctonia solani* AG-3 Rhs1AP 的 GGT 氨基酸同源性最高,达到 85%;系统发育树构建结果显示与立枯丝核菌 AG-3 融合群同源性最近。后期利用 real-time PCR 分析 GGT 在立枯丝核菌侵染玉米叶片各个时间点的表达特性,表明 GGT 在立枯丝核菌侵染的各个时间点均有表达,但表达量存在明显差异,其

中在病菌侵染玉米叶片 24 h 时表达量最高。本研究只对玉米纹枯病菌  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶基因 (GGT) 进行了克隆,对病菌侵染玉米叶片不同时期的表达量进行了分析。GGT 是否参与致病,还需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 陈厚德,梁继农,朱 华. 江苏玉米纹枯病的菌丝融合群及致病力[J]. 植物病理学报,1996,26(2):138.
- [2] 高立起,王占廷,梁秋华,等. 玉米纹枯病对种子产量及质量性状的影响[J]. 作物杂志,2004(4):17-19.
- [3] 杜欣可. 玉米纹枯病菌内切多聚半乳糖醛酸酶的基因克隆、表达及致病性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009.
- [4] 崔福浩. 玉米纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani* AG-1-1A)  $\beta$ -1,4-内切纤维素酶的分离纯化、基因的克隆与表达及功能研究[D]. 泰安:山东农业大学,2009.
- [5] Bowyer P, Clarke B R, Lunness P, et al. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme[J]. Science, 1995, 267(5196): 371-374.
- [6] Shibayama K, Doi Y, Shibata N, et al. Apoptotic signaling pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(5): 3181-3189.
- [7] Bames H A, Bagnall M C, Browning D D, et al.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase has a role in the persistent colonization of the avian gut by campylobacter jejuni [J]. Microbial Pathogenesis, 2007, 43: 198-207.
- [8] Zhang H Q, Forman H J, Choi J.  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in glutathione biosynthesis [J]. Methods in Enzymology, 2005, 401: 468-483.
- [9] 孔婷婷,高增贵,张 硕,等. 玉米纹枯病菌全长 cDNA 文库的构建与鉴定[J]. 植物病理学报,2014,44(6):603-608.
- [10] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. Toxicology Letters, 2004, 149(1/2/3): 19-23.
- [11] Meister A, Tate S S, Griffith O W.  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase[J]. Methods in Enzymology, 1981, 77: 237-253.
- [12] Will Y, Fischer K A, Horton R A, et al. Gamma-glutamyltranspeptidase-deficient knockout mice as a model to study the relationship between glutathione status, mitochondrial function, and cellular function[J]. Hepatology, 2000, 32(4): 740-749.