

# 落叶松-杨栅锈菌 MlpMCM4 蛋白和 MlpHOG1 蛋白 互作关系初探

杨 冰,陈凯玥,李子晔,周显臻,于 丹\*

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**由落叶松-杨栅锈菌侵染引起的杨树叶锈病严重威胁杨树的正常生长。通过家族鉴定和系统发育分析确定落叶松-杨栅锈菌标准菌株 ID 48743 为 *MCM4* 直系同源基因,命名为 *MlpMCM4*。以夏孢子 cDNA 为模板,运用 RT-PCR 技术,同源克隆获得中国菌株 *MlpMCM4* 基因 CDS 片段,称之为 *MlpMCM4* (wh03),长度为 2 460 bp,编码 819 个氨基酸。结果表明,比对分析显示目的蛋白具有保守结构域,包括 Walker A、Walker B 和 R-finger 基序,以及 MCM4 类型锌指结构。亚细胞定位预测显示其定位在细胞核区域。利用基于分离泛素系统的酵母双杂交技术和萤火虫荧光素酶互补试验,没有检测到落叶松-杨栅锈菌中国菌株 MlpMCM4 蛋白和 MlpHOG1 蛋白能够相互作用,推断二者相互作用可能需要外源渗透压刺激。

**关键词:**落叶松-杨栅锈菌; *MCM4* 基因; 同源克隆; 序列分析; 蛋白互作

中图分类号: S763.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2024)01-0100-08

## A Preliminary Study on the Interaction Between MlpMCM4 and MlpHOG1 in *Melampsora larici-populina*

YANG Bing, CHEN Kai-yue, LI Zi-ye, ZHOU Xian-zhen, YU Dan\*

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** The poplar leaf rust caused by *Melampsora larici-populina* is a serious threat to the poplar growth. By family identification and the phylogenetic tree, it was found that ID 48743 from the *Mlp* reference strain 98AG31 was the ortholog gene of *MCM4* from *Saccharomyces cerevisiae*, so naming as *MlpMCM4*. The gene *MlpMCM4* (wh03) was cloned and sequenced from *Mlp* Chinese strain, using urediospore cDNA as template and the homology-based RT-PCR method. The coding sequence was 2 460 bp, encoding 819 amino acids. The deduced MlpMCM4 (wh03) protein contained the conserved domains, including Walker A, Walker B and R-finger motifs, and Zn finger domain based on alignment analysis. By means of the online bioinformatics tools, it was predicted that this protein was located at the nucleus region. No interaction between MlpMCM4(wh03) and MlpHOG1(wh03) was detected in both the split-ubiquitin yeast two hybrid system and the firefly luciferase complementary assay. It is inferred that the interaction may need the exogenous osmotic pressure stimulation.

**Key words:** *Melampsora larici-populina*; *MCM4* gene; homology cloning; sequence analysis; protein interaction

微小染色体维持蛋白(minichromosome maintenance protein, MCM)是 AAA ATPase 大基因家

族中一类独特的亚群<sup>[1]</sup>。MCM 蛋白在真核生物中高度保守,典型的 MCM 基因家族包括 6 个成员,即

收稿日期:2023-01-14 修回日期:2023-06-07

基金项目:国家自然科学基金(31870630)。

第一作者:杨 冰。研究方向:林木病害病原菌致病机理。E-mail: yangbing1337@163.com

\* 通信作者:于 丹,博士,副教授。研究方向:林木病害病原菌致病机理。E-mail: yudan@nwsuaf.edu.cn

MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6 和 MCM7, 它们通常形成异源六聚体复合物<sup>[2]</sup>。MCM 蛋白具有 ATPase 结构域, 也称作 MCM box, 其中含有所有 MCM 蛋白具有的 3 个保守基序。第 1 个 Walker A, 对应 MCM 特异的序列 GDPXX(S/A)KS; 第 2 个 Walker B, 序列为 IDEFDKM; 第 3 个 R-finger, 序列较短, SRFD<sup>[1,3]</sup>。所有真核 MCM 蛋白具有锌结合基序, 具体序列因蛋白类型有一定差异<sup>[1]</sup>。在酿酒酵母中, MCM 基因家族在 DNA 复制起始过程发挥重要作用, 并且以 0.4 M NaCl 处理细胞 10 min 作为外源渗透压胁迫, 使用免疫共沉淀技术检测 HOG1 蛋白是否与各种复制复合体组分相互作用, 最终发现 HOG1 能够与 MCM4、CDC45、PSF2、DPB2 及 CDC7 互作<sup>[4-5]</sup>。

在真菌中, MCM4 基因的研究主要集中在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 两大系统, 也被分别称为 CDC54 和 CDC21<sup>[1]</sup>。付静等<sup>[3]</sup>在全基因组水平上鉴定了植物病原真菌葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) MCM 基因家族成员, 并分析了其对硫化物胁迫的响应特征, 为阐明韭菜及其主要成分对苹果轮纹病的防控机理提供了理论依据。专性寄生真菌落叶松-杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina*) 能够侵染杨树引起杨树叶锈病, 该病害广泛分布于世界各杨树栽培区, 在我国对杨树用材林和保护林的安全生产造成严重影响<sup>[6]</sup>。落叶松-杨栅锈菌 MCM 基因家族的研究目前尚未见报道。前期研究推断 MlpHOG1 基因参与落叶松-杨栅锈菌侵染菌丝生长扩展和响应环境胁迫等生命活动<sup>[7-8]</sup>。本研究通过鉴定落叶松-杨栅锈菌标准菌株 MCM 基因家族成员和系统发育分析, 从而确定 MCM4 候选基因, 进而同源克隆获得中国菌株 MlpMCM4 基因的 CDS 片段, 并对目的蛋白的基本特征进行预测分析, 最后借助 2 种技术分析目的蛋白与 MlpHOG1 蛋白的相互作用情况, 为后续明确目的蛋白与 MlpHOG1 蛋白的互作关系提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和试剂

1.1.1 试验材料 落叶松-杨栅锈菌中国菌株 wh03 为单孢菌系<sup>[9]</sup>, 使用太白杨 (*Populus purdomii*) 在温室进行人工扩繁, 根据曹支敏等<sup>[10]</sup>的方法进行菌株的活化及保存。酵母双杂交载体 pDHB1、pPR3-N、pDHB1-largeT 和 pDSL-ΔP53 以及荧光素酶试验载体 pCAMBIA1300-CLuc、pCAMBIA1300-NLuc 分别由西北农林科技大学植

物保护学院刘慧泉教授和康振生教授实验室惠赠。大肠杆菌感受态细胞 DH5α 购自北京擎科生物科技有限公司。酵母感受态细胞 NMY51 和农杆菌感受态细胞 GV3101 购自上海唯地生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 总 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司; 反转录试剂盒、Phusion Plus DNA 聚合酶和 Taq 酶购自 Thermo Scientific 公司; 高保真聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 公司和 Clon Express II One Step Cloning Kit 购自 Vazyme; pMD19-T 载体购自 TAKARA 公司; SC/-Leu/-Trp Broth、SC/-Ade/-His/-Leu/-Trp Broth 和 X-gal 购自北京酷来搏科技有限公司; D-荧光素钾盐购自上海笛医生物科技有限公司。引物序列合成和大肠杆菌转化子测序在北京奥科鼎盛生物科技有限公司(杨陵分部)完成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 候选基因分析 从 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org/>) 下载 MCM 基因家族模型数据 (PF00493), 通过 hmmer 软件在供试真菌(表 1)全体蛋白序列中搜索鉴定, 提取鉴定到的序列并在 NCBI CDD 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) 中比对, 从而去除不存在 MCM (PF00493) 保守结构域的序列。将通过筛选的蛋白序列用软件 MEGA7.0 对齐, 用 gbblocks 提取保守序列。最后, 用 iqtree 构建最大似然法 (Maximum likelihood) 树, 设置“-m”参数调用 ModelFinder 获得氨基酸序列的最佳替代模型, 设置“-b 1 000”采用 1 000 次重复计算的常规自展检验法 (Bootstrap) 对分支可靠性进行评估。生成的树文件使用 MEGA7.0 软件查看。

1.2.2 目的基因克隆 用 Rneasy Plant Mini Kit 试剂盒提取落叶松-杨栅锈菌夏孢子总 RNA, 消解基因组 DNA 后用 Thermo Scientific Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒合成第一链 cDNA。根据落叶松-杨栅锈菌标准菌株 98AG31 (v1.0)<sup>[11]</sup> 中 Protein ID 48743 的基因序列, 利用软件 Primer Premier 5 设计特异性扩增引物 48743-uF1 和 48743-uR2(表 2)。PCR 反应总体积 50 μL, 其中 cDNA 模板 1.5 μL, 10 μM 上下游引物各 2.5 μL, 2 × Phusion Plus PCR Master Mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.5 μL。扩增程序: 98 °C 预变性 30 s; 98 °C 变性 7 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 1 min 25 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 16 °C 保存。扩增完成后, 在 PCR 产物中加入 0.5 μL Taq DNA 聚合酶和 0.5 μL dNTP, 72 °C 延伸 30 min, 16 °C 保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 然后

用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化目的片段,再感受态细胞,PCR 检测筛选后将阳性转化子送公司连接至 pMD19-T 载体骨架,转化大肠杆菌 DH5α 测序。

表 1 参与 MCM 基因家族鉴定的物种

Table 1 Species used in the phylogenetic analysis of the MCM family

物种	数据来源	备注
落叶松-杨栅锈菌 ( <i>Melampsora larici-populina</i> )	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mellp1/Mellp1.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Mellp1/Mellp1.home.html</a>	担子菌门,柄锈菌亚门,锈菌目,栅锈菌科
松栎柱锈菌 ( <i>Cronartium quercuum</i> f. sp. <i>fusiforme</i> )	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Croqu1/Croqu1.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Croqu1/Croqu1.home.html</a>	担子菌门,柄锈菌亚门,锈菌目,柱锈菌科
小麦秆锈菌 ( <i>Puccinia graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> )	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Pucgr2/Pucgr2.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Pucgr2/Pucgr2.home.html</a>	担子菌门,柄锈菌亚门,锈菌目,柄锈菌科
玉米黑粉菌 ( <i>Ustilago maydis</i> )	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Ustma2_2/Ustma2_2.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Ustma2_2/Ustma2_2.home.html</a>	担子菌门,黑粉菌亚门
稻瘟菌 ( <i>Magnaporthe oryzae</i> )	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Magor1/Magor1.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Magor1/Magor1.home.html</a>	子囊菌门,盘菌亚门
禾谷镰孢菌 ( <i>Fusarium graminearum</i> )	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Fusgr1/Fusgr1.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Fusgr1/Fusgr1.home.html</a>	子囊菌门,盘菌亚门
裂殖酵母	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Schpo1/Schpo1.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Schpo1/Schpo1.home.html</a>	子囊菌,外囊菌亚门
白色念珠菌 ( <i>Candida albicans</i> )	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Canalb1/Canalb1.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Canalb1/Canalb1.home.html</a>	子囊菌门,酵母亚门
酿酒酵母	<a href="https://yeastgenome.org/">https://yeastgenome.org/</a>	子囊菌门,酵母亚门
拟南芥霜霉菌 ( <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> )	<a href="https://phycocosm.jgi.doe.gov/Hyaar1/Hyaar1.home.html">https://phycocosm.jgi.doe.gov/Hyaar1/Hyaar1.home.html</a>	卵菌,区别于担子菌和子囊菌,作为系统进化分析的外群

表 2 试验所用的扩增引物

Table 2 Amplified primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
48743-uF1	CGAACGCCATATCTTTGTCTAG
48743-uR2	AGCAGAATAAAATGTGTTGTGATAG
pDHB1-48743 seqF	AAGAACGCGGCCATTACGGCCATG-CAACCACCATCTGCCGA
pDHB1-48743 seqR	CGACATGGCCGAGGCGGCCAACAT-GGTGTGCATTATCATGCGC
MlpHOG1-NU-F	GATGTTCCAGATTACGCTGGATC-CATGGCCGATTTGCCAAACTG
MlpHOG1-NU-R	ATCGATAAGCTTGATATCGAAT-TCTCAAGCAGCAGGGGCAGCAA
Luc-C-48743 seq F	GCGTCCC GGGCGGTACCATG-CAACCACCATCTGCCGA
Luc-C-48743 seq R	AAAGCTCTGCAGGTTCGACTTACAT-GGTGTGCATTATCATGCGC
LCU-N-H1-F	GGGGACGAGCTCGGTACCATGGC-CGATTTTGCCAAACTG
LCU-N-H1-R	GTACGAGATCTGGTCGACAGCAG-CAGGGGCAGCAAGAC

1.2.3 目的基因编码蛋白生物信息学分析 利用在线软件 ProtParam 预测和分析目的基因编码蛋白的基本理化性质。使用软件 Clustalx1.83 对供试蛋白序列进行多序列比对,然后使用 GeneDoc 软件进行查看。使用 SOPMA 在线工具预测目的基因编码蛋白的二级结构。借助 3 种在线软件 EuK-mPLoc 2.0、WOLFPSORT 和 PROTCOMP 预测分析目的蛋白的亚细胞定位区域。

1.2.4 酵母双杂交 使用高保真聚合酶扩增目的片段,扩增引物见表 2。*Nco* I 单酶切 pDHB1 载体,*Bam* H I 和 *Eco* R I 双酶切 pPR3-N 载体。用重组克隆试剂盒,将 *MlpMCM4* (wh03) 基因片段和 *MlpHOG1* (wh03) 基因片段分别连接至 pDHB1 载体质粒和 pPR3-N 载体质粒,测序确认后获得 bait 载体 pDHB1-*MlpMCM4* 和 prey 载体 pPR3-N-*MlpHOG1*。将获得的重组载体质粒共转化至酵母感受态细胞 NMY51,观察 30 ℃ 条件下整合外源片段的酵母转化子在缺陷培养基 SD-Trp-Leu 和 SD-Trp-Leu-His-Ade 上培养 3 d 的生长情况,并检测以 X-gal 为反应底物时能否发生蓝色反应。其中 pDHB1-largeT 与 pDSL-ΔP53 共转化转化子为阳性对照,pDHB1-largeT 与 pPR3-N 共转化转化子为阴性对照,pDHB1-*MlpMCM4* 与 pPR3-N 共转化转化子为自激活组。

1.2.5 萤火虫荧光素酶互补试验 使用高保真聚合酶扩增目的片段,扩增引物见表 2。*Kpn* I 和 *Sal* I 酶切空载体 pCAMBIA1300-CLuc 和 pCAMBIA1300-NLuc。用重组克隆试剂盒将目的基因片段分别连接至载体骨架,测序确认后获得重组载体 pCAMBIA1300-CLuc-*MlpMCM4* 和 pCAMBIA 1300-NLuc-*MlpHOG1*。选取生长 3~4 周、长势良好的本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 作为烟草瞬时表达系统的材料。将获得的重组载体质粒分别转化至农杆菌感受态细胞 GV3101,参考 Chen 等<sup>[12]</sup> 的方

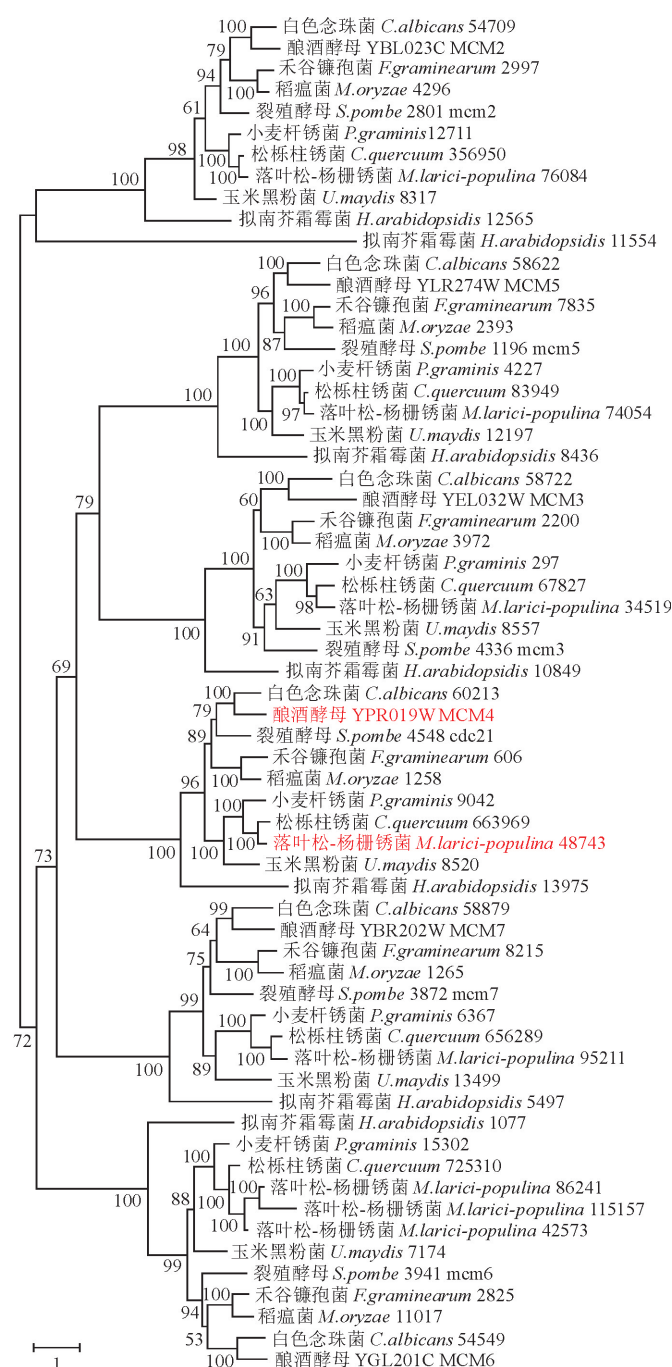
法进行菌液处理,在烟草叶片上分别注射不同的菌液组合。2 d 后在每个接种点均匀涂抹 D-荧光素钾盐溶液,室温黑暗静置 5 min。在多光谱动态荧光显微成像系统(PlantView 100)中观察其注射烟草叶片区域是否有荧光出现。

## 2 结果与分析

### 2.1 候选基因的确定

借助 hmmer 软件将下载获得的 MCM 基因家

族模型数据在 10 个供试物种的蛋白序列中进行搜索鉴定,共获得 65 条序列。其中 2 个基因序列太短,不具有保守结构域,进而使用 63 条序列构建最大似然法系统进化树,结果表明,进化树具有 6 个分支,分别代表 MCM 基因家族的 MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM6 和 MCM7(图 1)。ID 48743 (v1.0)为酿酒酵母 MCM4 基因在落叶松-杨栅锈菌标准菌株 98AG31 中的直系同源基因,命名 MlpMCM4。



1) 物种后的数字代表在相应物种数据库中的蛋白序号(Protein ID); 2) 自展支持率标注于节点。

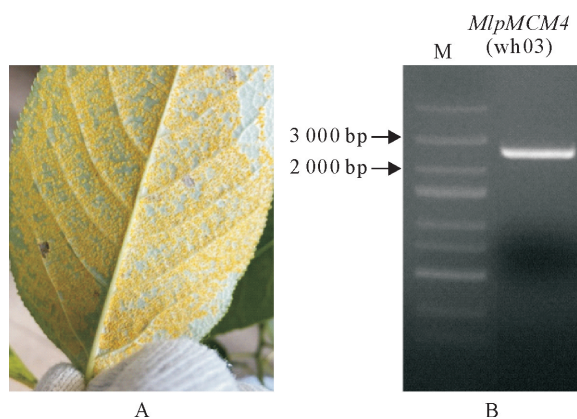
图 1 MCM 基因家族系统进化树

Fig. 1 The Phylogenetic analysis of MCM family



## 2.2 目的基因的克隆

以落叶松-杨栅锈菌中国毒性菌株 wh03(图 2A)夏孢子 cDNA 为扩增模板,根据 ID 48743(v1.0)序列设计特异引物进行同源克隆,扩增结果呈现一个较为特异且浓度较高的约 2.5 kb 的条带(图 2B)。通过 TA 克隆及测序分析结果表明,成功获得 wh03 菌株 ID 48743 基因的 CDS 片段,长度为 2 460 bp,将该基因命名为 *MlpMCM4* (wh03)(GenBank OR751401)。



A. 落叶松-杨栅锈菌中国毒性菌株 wh03 接种杨树叶片后的寄主表现; B. 从 wh03 菌株夏孢子 cDNA 中扩增 *MlpMCM4* 基因片段

图 2 目的基因 *MlpMCM4* 的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification of the *MlpMCM4* fragment

## 2.3 目的基因编码蛋白特征

使用在线软件 ProtParam 分析蛋白理化性质,结果显示 *MlpMCM4* (wh03) 基因编码 819 个氨基酸,相对分子量 90.31 ku。负电荷氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 110 个,正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 97 个,带负电荷的数目略多于正电荷。*MlpMCM4* (wh03) 基因编码蛋白理论等电点(pI)为 5.78,即偏酸性。预测的不稳定指数为 44.56,超过 40,推测属于不稳定蛋白。

将 *MlpMCM4* (wh03) 基因编码蛋白序列和酿酒酵母 MCM4 蛋白序列进行比对分析,发现目的蛋白具有 MCM 蛋白共有的 3 个重要基序,即 Walker A(GDPXX(S/A)KS)、Walker B(IDEFDKM)和 R-finger(SRFD),还具有 MCM4 类型锌结合基序(CX<sub>2</sub>CX<sub>18</sub>CX<sub>2-4</sub>C)(图 3)。

运用 SOPMA 在线预测目的蛋白二级结构,显示 *MlpMCM4* (wh03) 蛋白二级结构主要由 4 种形式组成(图 4),分别为 41.64% 的  $\alpha$ -螺旋(Alpha helix)、6.23% 的  $\beta$ -转角( $\beta$ -turn)、15.26% 的延伸链(Extended strand)和 36.87% 的无规则卷曲(Random coil),其中  $\alpha$ -螺旋和无规则卷曲为主要二级结构。

ScMCM4	289	--LDYDLDEIEETKFKYKVRPYNVG-----SCKG---MRRLNPNDIKLINLKG
MlpMCM4(wh03)	132	IAGDDQIAMLELMTFKVRPFGLVNQSAQSSHISTGKSMQGGANMRDLNPGDIDKVVSVKG
ScMCM4	331	LVLRSSTPVIDPMKVAFFKCNVCDHTMAVEIDRGVIOEPARCERIDCNENPNSMSLIHNRC
MlpMCM4(wh03)	192	LVIRATPVIDPMKKAFFRCLSCGHATTVEIDRGKIAEPAQCPRDVCGQPGGMSLVHNRC
ScMCM4	391	FADKQVIRKQETPDPFVDPGQTPHSISLCVYDELVDSCRAGDRIEVTGTFRSIPTRANSRQ
MlpMCM4(wh03)	252	FADROVVRKQETPDEVPDGPQTPHTVSLCVYDELVDISKPGDRVEVTGIFRSVPVRVNP
ScMCM4	451	RVLKSLYKTYVDVHVKKVSDKRLDVTST-----IEQELMONKVDHNEV
MlpMCM4(wh03)	312	RVIKTLFKTYLDVLHIKRSDSRRLGVLDLSTRDGDGSGVGRGGIGVGGEDDDDGGNAADALNV
ScMCM4	496	EE--VR-----QITDQDLAKIREVAAREDLISLARSILAPSIYELEDVKKGILLQLFGGT
MlpMCM4(wh03)	372	QQRVRGNTSNHQTAEEMEERMVELSSREDIYDVLARSILAPSVWEMDDIKKGILLQLFGGT
ScMCM4	549	NKTFTKGG-----RYRGDINILLCGDPSTSKSQILQYVHKITPRGVYTSKGSSAVGLTA
MlpMCM4(wh03)	432	NKTIGRGGGAGGFRRYRGDINVLVGDGPGVSKSQILQYVHKIAPRGVYTSKGSSAVGLTA
		Walker A
ScMCM4	604	YITRDVDTKQLVLES GALVLS DGGVCCIDEFDKMSDSTRSVLHEVMEQQTISI AKAGIIT
MlpMCM4(wh03)	492	YVTRDPDSRQLVLES GALVLS DGGVCCIDEFDKMSDSTRSVLHEVMEQQTISI AKAGIIT
		Walker B
ScMCM4	664	TLNARSSILASANPIGSRYPNLPVTENIDLPPPLSRFDLVYLVLDKVDKNDRELAKH
MlpMCM4(wh03)	552	TLNARTSILAAANPVGSKYNLAWPITKNIDLPPPLSRFDLVYLVLDKIDEISDRRLAKH
		R-finger
ScMCM4	724	LTNLYLEDKPEHISQDDVLPVEFLTIMYISYAKEHIHETITEAAKTELVRAYVGRMKMGDD
MlpMCM4(wh03)	612	LVGLYLEDRE-PTGGDDILPVQTLTSYISFARNRIHEVLTEDACSSLVRAYISMKGAGED

1) 深绿色横线区域隶属酿酒酵母 MCM4 的 MCM box 结构域,其中浅蓝色横线表示 Walker A、Walker B 和 R-finger 基序;2) \* 表示锌结合基序。

图 3 *MlpMCM4* (wh03) 蛋白保守结构域

Fig. 3 Conserved domains in the *MlpMCM4* (wh03) protein

使用 EuK-mPLOC、WOLFP SORT 和 PROTCOMP 这 3 种在线软件对 *MlpMCM4* (wh03) 蛋白进行亚细胞定位预测分析。EuK-mPLOC 预测目的

蛋白定位在细胞核(Nucleus)区域。WOLFP SORT 和 PROTCOMP 均预测显示细胞核(Nuclear)区域数值明显高于其他区域(26/27 和 8.84)。综合 3 种

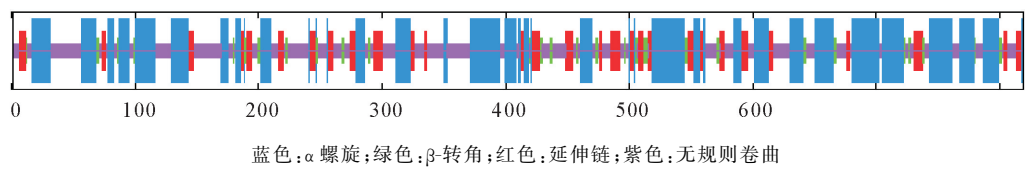


图 4 MlpMCM4 (wh03)蛋白二级结构组成

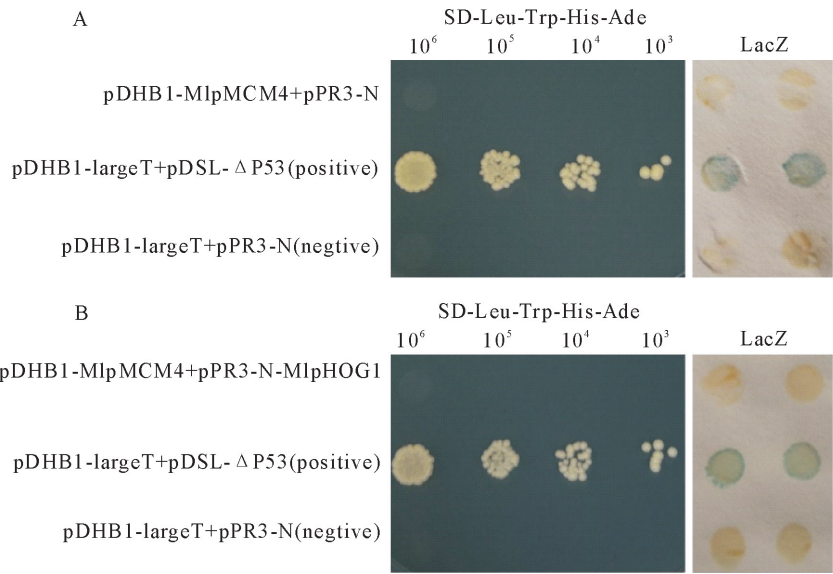
Fig. 4 Prediction of secondary structure of the MlpMCM4 (wh03) protein

软件预测结果,推断 MlpMCM4 (wh03)蛋白定位在细胞核区域。

2.4 MlpMCM4 蛋白和 MlpHOG1 蛋白的互作关系

借助酵母双杂交技术分析落叶松-杨栅锈菌 MlpMCM4 蛋白和 MlpHOG1 蛋白是否相互作用。在 SD-Leu-Trp 培养基上,阳性对照 (pDHB1-largeT + pDSL-ΔP53)、阴性对照 (pDHB1-largeT + pPR3-N)及自激活组 (pDHB1-MlpMCM4 + pPR3-N)均能正常生长。在 SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基上,阳性对照正常生长,阴性对照不能生长,自激活组也不能生长;X-gal 染色显示阳性对照变蓝,阴性

对照没有变蓝,自激活组也没有变蓝(图 5A)。因此,MlpMCM4 (wh03)基因编码蛋白不具有自激活能力。阳性对照、阴性对照及试验组 (pDHB1-MlpMCM4 + pPR3-N-MlpHOG1) 在 SD-Leu-Trp 培养基上均能正常生长。在 SD-Leu-Trp-His-Ade 培养基上,阳性对照正常生长,阴性对照不能生长,试验组也不能生长;X-gal 染色显示阳性对照变蓝,阴性对照没有变蓝,试验组也没有变蓝(图 5B)。因此,利用本研究中分离泛素酵母双杂交系统发现 MlpMCM4 (wh03) 基因编码蛋白和 MlpHOG1 (wh03)基因编码蛋白二者不存在相互作用关系。



A. 自激活检测结果;B. 试验组检测结果

图 5 酵母双杂交分析 MlpMCM4 蛋白和 MlpHOG1 蛋白的互作关系

Fig. 5 The interaction between MlpMCM4 and MlpHOG1 detected by the yeast two-hybrid assay

同时,借助萤火虫荧光素酶互补试验进行分析。在植物活体荧光成像系统中观察不同组合烟草叶片注射区域,阳性对照 pCambia1300-CLuc-X 与 pCambia1300-NLuc-Y 共表达的叶片区域呈现荧光(结果未报道),3 组阴性对照 pCambia1300-CLuc + pCambia1300-NLuc、pCambia1300-CLuc-MlpMCM4 + pCambia1300-NLuc、pCambia1300-CLuc + pCambia1300-NLuc-MlpHOG1,以及试验组 pCambia1300-CLuc-MlpMCM4 + pCambia1300-NLuc-MlpHOG1 共表达的叶片区域都没有检测到荧光信号(图 6)。表明该系统中

MlpMCM4 (wh03) 基因编码蛋白和 MlpHOG1 (wh03)基因编码蛋白也不存在相互作用。

3 结论与讨论

MCM4 基因是 MCM 家族成员之一,一对一对涉及的序列相似度较高,因此根据家族模型在全基因组水平鉴定落叶松-杨栅锈菌 MCM 基因家族成员,进而通过构建系统进化树来确定成员直系同源基因。本研究发现 ID 48743 是酿酒酵母MCM4 基因的直系同源基因,因此命名为MlpMCM4。同时,也鉴定出其他成员,ID76084 是酿酒酵母MCM2

基因的直系同源基因, ID34519 是酿酒酵母 *MCM3* 基因的直系同源基因, ID74054 是酿酒酵母 *MCM5* 基因的直系同源基因, ID86241、115157 和 42573 是酿酒酵母 *MCM6* 基因的直系同源基因, ID95211 是酿酒酵母 *MCM7* 基因的直系同源基因。这为后续研究该锈菌 MCM 基因家族的功能奠定基础。本研究使用 MCM 模型在供试担子菌和子囊菌中均鉴定到 *MCM2-7*, 没有其他成员如 *MCM8* 和 *MCM9*, 这与 *MCM8* 和 *MCM9* 仅存在于高等生物体内的报道是一致的<sup>[13]</sup>。

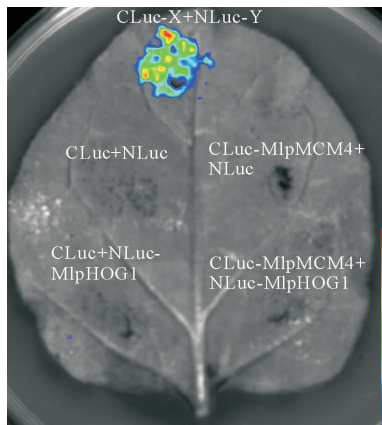


图6 萤火虫荧光素酶互补试验分析 MlpMCM4 蛋白和 MlpHOG1 蛋白的互作关系

Fig. 6 The interaction between MlpMCM4 and MlpHOG1 detected by the firefly luciferase complementary assay

比对分析显示 MlpMCM4 (wh03) 蛋白具有 3 个保守的亚结构域, 即 Walker A、Walker B 和 R-finger, 它们与 MCM 蛋白利用 ATP 的能力密切相关<sup>[13]</sup>。同时, 目的蛋白还具有 MCM4 类型特有的锌指结构 (CX<sub>2</sub>CX<sub>18</sub>CX<sub>2-4</sub>C), 研究显示在许多 MCM 蛋白中该结构与酵母菌株的存活密切相关<sup>[14-15]</sup>。因此, 比对预测分析显示目的蛋白较为保守。大多数 MCM4 蛋白还具有一个保守的 CDK 激酶作用位点 (S/T)PX(K/R)<sup>[1]</sup>。但没有在目的蛋白中预测出该位点, 推断可能 CDK 激酶通过新的途径或者作用复合体其他基因来发挥作用。酿酒酵母 6 个 MCM 蛋白成员在 G1 期主要集中在细胞核区域, 在 S 期逐渐从核内输出, 到了 G2/M 期则完全从核内排出<sup>[16]</sup>。本研究亚细胞定位预测显示目的蛋白定位于细胞核, 这与报道具有吻合度, 有待于后续开展相关试验进行分析。

落叶松-杨栅锈菌是专性寄生真菌, 目前还没有稳定遗传操作体系, 导致致病分子机理研究明显落后于模式植物病原真菌。基于前期研究进展, 期望能够理清落叶松-杨栅锈菌 HOG 途径在该病原菌侵染致病和响应胁迫方面的作用机制。酿酒酵母中

在外源渗透压处理下 HOG1 和 MCM4 蛋白具有特异的互作关系<sup>[5]</sup>。本研究酵母双杂交系统和萤火虫荧光素酶互补试验中, 落叶松-杨栅锈菌中国菌株 HOG1 蛋白和 MCM4 蛋白没有表现相互作用, 推断可能因为没有外源渗透压刺激。后续考虑增加外源渗透压胁迫条件及借助多种互作检测方法, 来继续分析 2 个蛋白的互作关系。

#### 参考文献:

- [1] FORSBURG S L. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2004, 68(1): 109-131.
- [2] YOU Z, KOMAMURA Y, ISHIMI Y. Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-Mcm7 DNA helicase activity [J]. Molecular and Cellular Biology, 1999, 19(12): 8003-8015.
- [3] 付静, 孙梦, 刘俊萍, 等. 葡萄座腔菌 *Mcm* 基因家族全基因组鉴定及其对硫化物的响应特性 [J]. 菌物学报, 2021, 40(8): 2043-2055.  
FU J, SUN M, LIU J P, et al. Genome-wide identification and the responses to sulfides of the *Mcm* gene family in *Botryosphaeria dothidea* [J]. Mycosystema, 2021, 40(8): 2043-2055. (in Chinese)
- [4] KEARSEY S E, LABIB K. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication [J]. Biochim et Biophys Acta, 1998, 1398(2): 113-136.
- [5] YAAKOV G, DUCH A, GARCÍA-RUBIO M, et al. The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmotic stress [J]. Molecular Biology of the Cell, 2009, 20(15): 3572-3582.
- [6] 徐梅卿. 我国青杨叶锈病的研究概况和防治策略 [J]. 温带林业研究, 2020, 3(3): 1-5, 20.  
XU M Q. Thereseearch overview and control strategies of *Melampsoralaricis-populina* in China [J]. Journal of Temperate Forestry Research, 2020, 3(3): 1-5, 20. (in Chinese)
- [7] YU D, LI R X, YU Z D, et al. Molecular characterization of a Hog1-type MAPK, *MlpHog1*, from *Melampsoralarici-populina* [J]. Phytoparasitica, 2016, 44(2): 251-259.
- [8] YU D, YANG B, CHEN K Y, et al. Functional characterization of *Melampsora larici-populina* Hog1-type MAPK in response to osmotic stress [J]. Forest Pathology, 2022, 52: 12758.
- [9] 刘亦菲, 杨冰, 周显臻, 等. 落叶松-杨栅锈菌 *MlpNHA1*-like 基因的克隆及序列分析 [J]. 西北林学院学报, 2022, 37(5): 129-134.  
LIU Y F, YANG B, ZHOU X Z, et al. Cloning and sequence analysis of *NHA1*-like gene from *Melampsora larici-populina* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2022, 37(5): 129-134. (in Chinese)
- [10] 曹支敏, 李振岐, 胡景江. 落叶松-杨栅锈菌生理分化研究 [J]. 西北林学院学报, 1998, 13(1): 53-57.  
CAO Z M, LI Z Q, HU J J. Physiological specialization in *Melampsora larici-populina* Kleb. in the Qinling Mountains [J]. Journal of Northwest Forestry University, 1998, 13(1): 53-57. (in Chinese)



- [11] DUPLESSIS S, CUOMO C A, LIN Y C, *et al.* Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(22): 9166-9171.
- [12] CHEN H, ZOU Y, SHANG Y, *et al.* Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants [J]. Plant Physiology, 2008, 146(2): 368-376.
- [13] 付凌玲, 赵啸宇, 徐进. Mcm10 在真核细胞复制起始中的作用 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(5): 788-794.
- FU L L, ZHAO X Y, XU J. The role of Mcm10 in eukaryote replication origin [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2018, 40(5): 788-794. (in Chinese)
- [14] FORSBURG S L, SHERMAN D A, OTTILIE S, *et al.* Mutational analysis of Cdc19p, a *Schizosaccharomyces pombe* MCM protein [J]. Genetics, 1997, 147(3): 1025-1041.
- [15] YAN H, MERCHANT A M, TYE B K. Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast [J]. Genes & Development, 1993, 7(11): 2149-2160.
- [16] NGUYEN V Q, CO C, IRIE K, *et al.* Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7 [J]. Current Biology, 2000, 10(4): 195-205.

(上接第 87 页)

- [16] 王春霞. 近自然经营对旺业甸森林灌草植物多样性影响的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017: 1-44.
- [17] 惠刚盈, 赵中华, 胡艳波. 结构化森林经营技术指南 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2010.
- [18] 朱俐娜, 彭祚登. 基于 Voronoi 图的北京公园常见林分空间结构分析 [J]. 西北林学院学报, 2015, 30(5): 176-180.
- ZHU L N, PENG Z D. Common stand spatial structure in Beijing parks based on voronoi diagram method [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(5): 176-180. (in Chinese)
- [19] 胡艳波, 惠刚盈. 基于相邻木关系的林木密集程度表达方式研究 [J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(9): 1-8.
- HU Y B, HUI G Y. How to describe the crowding degree of trees based on the relationship of neighboring trees [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(9): 1-8. (in Chinese)
- [20] 董莉莉, 刘红民, 汪成成, 等. 采伐对蒙古栎次生林林分生长和林分结构的影响 [J]. 林业资源管理, 2021(2): 83-91.
- DONG L L, LIU H M, WANG C C, *et al.* Effects of the cutting intensity on stand growth and structure for *Quercus mongolica* secondary forests [J]. Forest Resources Management, 2021(2): 83-91. (in Chinese)
- [21] 陆元昌. 近自然森林经营的理论与实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [22] 王绪芳, 井赵斌, 程积民, 等. 华北落叶松人工林生长的合理经营密度探讨 [J]. 贵州农业科学, 2013, 41(10): 168-171.
- WANG X F, JING Z B, CHENG J M, *et al.* Study on reasonable management density of *Larix principis-rupprechtii* artificial forest [J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2013, 41(10): 168-171. (in Chinese)
- [23] 许晓东, 刘丽婷, 邓海燕, 等. 桉树人工林抚育间伐调控技术研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(4): 52-58.
- XU X D, LIU L T, DENG H Y, *et al.* Study on control technology for thinning of *Eucalyptus* plantation [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2019, 39(4): 52-58. (in Chinese)
- [24] 张岗岗, 刘瑞红, 惠刚盈, 等. 林分空间结构参数 N 元分布及其诠释——以小陇山锐齿栎天然混交林为例 [J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(4): 21-31.
- ZHANG G G, LIU R H, HUI G Y, *et al.* N-variate distribution and its annotation on forest spatial structural parameters: a case study of *Quercus aliena* var. *acuteserrata* natural mixed forest in Xiaolong Mountains, Gansu Province of northwestern China [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2019, 41(4): 21-31. (in Chinese)
- [25] 林富成, 王维芳, 门秀莉, 等. 兴安落叶松人工林空间结构优化 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(4): 68-76.
- LING F C, WANG W F, MEN X L, *et al.* Spatial structure optimal of *Larix gmelinii* plantation [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(4): 68-76. (in Chinese)
- [26] 陈昌雄, 刘健, 余坤勇, 等. 基于空间结构优化的马尾松阔叶树混交林模拟采伐 [J]. 西南林学院学报, 2010, 30(6): 29-32, 37.
- CHENG C X, LIU J, YU K Y, *et al.* Simulated cutting for the mixed forest of *Pinus massoniana* and broad-leaved tree species based on optimized spatial structure [J]. Journal of Southwest Forestry, 2010, 30(6): 29-32, 37. (in Chinese)