

# 辣椒疫霉菌效应因子 RxLR23 克隆与基因敲除体系建立

姜海滨,李京,许海青,陈茹雪,张修国\*

山东农业大学 植物保护学院, 山东省蔬菜病虫生物学省级重点实验室, 山东 泰安 271018

**摘要:** 在辣椒疫霉菌感染寄主的过程中,病原菌能够分泌大量的 L 效应因子,协助病原菌干扰寄主植物的抗病反应。长期以来,由于缺乏有效的定向诱变和基因置换的技术严重阻碍了关于疫霉菌的致病性的遗传研究。为了深入开展辣椒疫霉菌 L 效应因子的功能研究,本研究以辣椒疫霉菌株 D33 总 DNA 为模板,设计引物,克隆出基因 L 23 的序列。以 L 23 基因序列为模版设计 A 构建 F2.3G- - A 重组载体以及设计构建同源修复供体载体 B II K + 重组载体。利用 C I / 9 系统敲除基因 L 23,经 G418 抗性筛选和 C 扩增验证,成功获得了基因 L 23 的 4 个敲除突变体。

**关键词:** 辣椒疫霉; 效应因子; C I / 9; 基因敲除

**中图分类号:** 436.418.1+2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2017)04-0491-06

## Cloning of RxLR23 and Establishment of Gene Knockout System of *Phytophthora Capsici*

JIA GH - , LI J , H - , CHE - , HA G - \*

College of Plant Protection, Key Laboratory of Vegetable Pest and Biology of Shandong Province/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

**Abstract:** *Phytophthora capsici*, L . F , *Phytophthora* . I L *Phytophthora capsici*, D33D A , L 23, A F2.3G- - A B II K + C I /C 9 L 23, G418 C , 4 L 23

**Keywords:** *Phytophthora capsici*; ; C I / 9;

辣椒疫霉菌是一种在世界范围内广泛引起辣椒、茄子、西红柿、黄瓜等在内的蔬菜病害。其分布广泛,主要寄主是包括辣椒、茄子、西红柿、黄瓜等在内的蔬菜作物,它还能够侵染模式植物本氏烟和拟南芥,是卵菌遗传学,植物病理学,植物生理学和模型研究中的重要模式材料<sup>2,3</sup>。长期以来,由于缺乏有效的定点突变和基因置换技术,疫霉菌致病性研究在分子水平上进展缓慢。随着分子生物学技术的发展,近年来相关工作相继完成和 C I /C 9 系统应用于卵菌基因结构和功能研究,植物体内的获得性免疫机制的研究系统是近几年发展的一门新技术。其中 II 型 C I /C 9 系统是自动化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)改造而来,其依赖于一段短的 A 序列指导核酸酶 C 9 靶标到靶 D A 序列进行 D A 的识别和切割,从而实现了对特定生物的靶基因进行定点突变<sup>4,5</sup>。目前, C I /C 9 系统已成功应用于酵母、果蝇、鼠、人等生物以及烟草、拟南芥、水稻、小麦等多种植物中<sup>6-10</sup>。但是,在卵菌中,该技术还处于起步阶段,2016 年 F<sup>11</sup>将该技术应用于大豆疫霉小种 6497 并成功敲除 A 4/6,在辣椒疫霉中尚未有报道将该系统应用于基因敲除。

在辣椒疫霉菌感染寄主的过程中,病原菌能够分泌大量的 L 效应分子<sup>12</sup>。当寄主植物不含有相应的抗病蛋白时,效应分子通过干扰或者破坏植物的防卫反应从而促进病原菌的侵染;当寄主植物含有效应分子对应的抗病蛋白,寄主植物识别相应的效应分子引发效应分子触发的免疫反应

收稿日期: 2017-01-07

修回日期: 2017-04-09

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系(CA 12-25-03B)

作者简介: 姜海滨(1991-),男,在读硕士研究生.研究方向:植物病原真菌学和真菌资源利用.

\*通讯作者: A .E- : @ . .

(E - , E D)。鉴于目前在辣椒疫霉菌中对效应分子的功能与机制报道较少,本研究克隆了辣椒疫霉菌中的 1 个 L 效应分子,通过对其基因序列的分析设计和构建了 2 个 A 序列,使用 C I / C 9 系统和 EG 介导的原生质体转化技术<sup>13-15</sup>成功实现了对效应因子的基因替换,为开展辣椒疫霉效应分子的功能研究奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试菌株及培养条件

辣椒疫霉菌株 D33 由本实验室分离鉴定,在 10% 8 培养基上,25 黑暗培养。

### 1.2 供试试剂

- (1) 0.8 M : 称取 145.76 ( M-1902) 定容至 1 L, 高压灭菌。
- (2) 酶解水: 将超纯水高压灭菌, 备用。
- (3) 0.5 M C C<sub>2</sub>: 称取 7.35 ( C3306) 定容至 100 L, 过滤除菌。
- (4) 0.5 M ME -K H: 4 ( 2933) 加 40 L, 用 K H 调 H 至 5.7, 过滤除菌。
- (5) 0.5 M KC: 3.7 ( 9541) 定容至 100 L, 高压灭菌。
- (6) EG: 分别 L 0.8 M , 3 L H<sub>2</sub>O, 3 L 0.5 M C C<sub>2</sub>, 过滤除菌, 现配现用, 冰上放置。
- (7) 酶: , 8 L H , C C<sub>2</sub>, 800 L 0.5 M KC, 800 L 0.5 M ME。
- (8) : 称取 0.1488 KC ( C C<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub> ( C<sub>2</sub> 6), 3.6 , 12.48 葡萄糖 ( G8270) 。
- (9) MM : 18.22 M C 6H<sub>2</sub> ( ), 2 L ( H=5.7) 加水定容至 250 L, 高压灭菌。
- (10) G418 (50 : 418 粉末溶于 20 L 的细菌过滤器过滤除菌。

### 1.3 辣椒疫霉

用 D AMA 设计一对特异扩增效应因子 L 23 ACCAGAC C GAGG; L 23- : CACAAAC CC C GG 株总 D A 为模版进行 L 23 基因克隆。

反应体系: 10 E B 5 L, 4 L, E 无菌水补足至 50 L。反应程序: 95 3 , 72 30 , 共 环; 72 10 。

### 1.4 辣椒疫霉效应因子 RxLR23 敲

利用 C I / 9 系统, 系统同时将 C 9、 F2.3G- 中 HD 供体质粒采用 -B II K +载体, L - 福建省农科院植保所提供。

#### 1.4.1 构建质粒 A

1.4.1.1 A 的设计 将基因 列导) , 然后根据 果来选择合适的 A。自 进行初筛, 然后将初筛得到的 位点 ( GG) 构成的 2 行再次筛选, 其原则为: 匹 基因以外, 存在匹 时位于 GG 前的 12 的 A 应当舍弃不

1.4.1.2 A 的合成 (1) 按 报道的方法设计 酸, 并送至合成; (2) 将 使用 A B D A ( 碧云天) 进行退火, 退火体系(100 L): -F 40 L, A B D A ( 5 ) 20 L,



进行初步验证; (16) 游动孢子, 涂布于... / L, G418 的... 浓度为 12.5 / ... 黑暗培养待其... 菌落重复... 次; (17) ... 提取疑似敲除转化子, D33 ... 转入 ...

F2- L - C 9、 F2.3G- ) 的总 D N A, 分别... 23 的引物及引物... 进行 C 验证。其中引物 F1: C AACCAAAGCAAC ... 1: AGGC ... GGAG GG; F2: A GGCC CC CCGAGGACG ; 2: CAGC ... CA GAC ...

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒疫霉效应分子 RxLR23 的基因结构与基因序列分析

以辣椒疫霉菌株 D33 总 D N A 为模板, 利用特异性引物 L 23-F1 / L 23- 对效应分子 L 23 进行 C 扩增, 得到长度为 1155 左右的 D N A 片段 (见图 1),

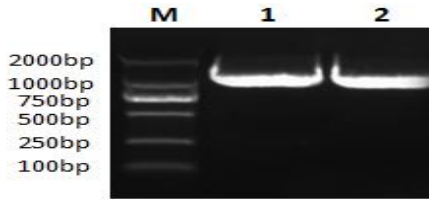


图 1 基因 RxLR23 PCR 扩增结果

Fig.1 The results of RxLR23 PCR gene amplification

M: M ; 1-2: 基因 L 23。M: M ; 1-2: L 23

辣椒疫霉效应分子 L 23 基因序列全长为 1155 , 完整的开放阅读框 F 为 1152 , 编码一个 384 个氨基酸的蛋白质, 预测的编码产物大小为 43.271 D , 等电点为 10.03 (见图 2)。经生物信息学在线预测网站 , 预测出 L 23 前 18 个氨基酸为其信号肽序列。

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
1	ATGGCTCTTCATTATATCGTTGTCGTCGGCTTCATTCGCCACGAAACGGGAATGAAGTCTCAGCTGGCAAGTCCCGTGTCCGCATA								
91	100	110	120	130	140	150	160	170	180
91	ACTACTACTGGTGCACCTTACACCCCCCAACCCAGACTCTTGAGGACCCAGTACACGGACCAAGAGGGCGCTTCGGCTTCAATCTTTC								
31	T T T G A L D T P T T R L L R T Q Y T D E E R A F G L N L L								
191	190	200	210	220	230	240	250	260	270
91	CCTGGAGCAGAAAATCTCAAGTATCATAAACAAGAAAGTGTCCAGTATCTCAAGAGCAACCAAGAAATTCGACGACGTTTCATC								
271	270	280	290	300	310	320	330	340	350
91	AAACTCAAGCTCGACAAGCCGGAGACAAGTTGTTGAGAACCAGAAATTCCTCCCTGGGCTCAATACGTTGGACGATTCAATCAGAAA								
361	360	370	380	390	400	410	420	430	440
121	CACCGAGCCAGAACTGGATGCTCCCCAGCTTGGCCAGCTTTGGCAAGTATCTGATTCGATTCGAAAAAGTCCCAAGCAGGCA								
541	540	550	560	570	580	590	600	610	620
191	ATCTACAATTAGATGATGGGGCTACGAATCTGCTGGAAAATTTGGATGAGGTACCGACAGCACTTTTCCCTGGCA								
631	630	640	650	660	670	680	690	700	710
211	GACTCCACACTTCTCTCAAGAAAGCTGCAAAAGACATTCCTCCCTGGGCTCAATACGTTGGACGATTCAATCAGAAA								
721	720	730	740	750	760	770	780	790	800
241	ACGGAGAAAGTTGGCTGGACTTGCAGAAAGTATCTGATTCGATTCGAAAAAGTCCCAAGCAGGCA								
811	810	820	830	840	850	860	870	880	890
271	TCACTCAACAGGGGGGGGACGATGCTGGATGAGGTACCGACAGCACTTTTCCCTGGCA								
901	900	910	920	930	940	950	960	970	980
301	TACGCTCACAGGGCGACGCTTCCTCCCTGGGCTCAATACGTTGGACGATTCAATCAGAAA								
991	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
331	GCCTACGGCAGCACTTCCTCCCTGGGCTCAATACGTTGGACGATTCAATCAGAAA								
1081	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160
361	AACCTGGGCTTCCTCCCTGGGCTCAATACGTTGGACGATTCAATCAGAAA								

23 核苷酸序列和氨基酸序列  
nucleotide sequence and amino acid

### 2.2 辣椒疫霉

2.2.1 ... 设计引物... 2016 年报道... 设计... A, 选取两条... A 序列, A-482: AGGGCGAACAGA GAAAC C, A-891: GCAGAA CCG ACGC CACA, 并根据序列按 F 所报道的方法设计寡核苷酸序列送至公司合成, 其合成序列分别为: (1)482-F: C AGC CGCCC C GA GAG CCG GAGGACGAAACGAG AAGC CG CAGGGCGAACAGA GAAAC C, 482 : AAACGAG CA C G CGCCC GACGAGC AC CG CG CC CACGGAC CA CA GAGGGCGG; (2)891-F: C AGC C GCC GA GAG CCG GAGGACGAAACGAG AAGC CG CGCAGAA CCG ACGC CACA, 891- : AAAC G GAGCG ACGGA C GCGACGAGC AC CG CG CC CACGGAC CA CAGGCAGAAG.

2.2.2 D33 菌株中 L 23 上游 1 碱基序列及下游 1 碱基序列测序结果 根据 L 基因在 F DB 上查找出该基因的上下游各 1000 (见图 3、图 4)。

```

1      GTCGTTCTCG TTGGTCCTGA CCCTAGTCTT TGCAGCGCTA CTCTTTTGGC GATTAGGTGT
61     TGACTACCTG TTTTCTGCAA TTTGATTAGG GACTTTAGGA AGTTCCTTTT TCATTTCTCA
121    ACTACTGTTT CTCTGGATCA GTCAAGCCAC TCTATCGCTA CAGCCATACT GTACGTCAGT
181    AGGTTGAGGA CTCTAACACG AGCCTTATTA ATATTTGGTT CCCCATTAAA ATATTATGTA
241    AACTTTCATC TTCGCCACGA ATGGTTACTT TTTTGGCCAGC ACACATACAT GTATATATAC
301    AGTGTAACGT AGTGCACATC ACTACCGAAG CATCTTCGTA CATGTAGACT GCGAATCGCA
361    GGAAGAAGTT CGGCAAGAAA TGATCTCCA CTGGAGGCTC CAGATGTCIT CGTTTTGTTA
421    CCAGGCACCA TAATACATGT ACGTAATCTT GTACCTGGAT TAATACTTTC TGACTTTACG
481    GTGTTTGAC CTGGGAAACT TGCAATTGTC AAGTATGTTT CAGCATAGGA TTTTAATGGG
541    GAACCAAATA AAATCTATTA AAAGTAAAAG CTAAGTATGT ACGTGTCTT TTTACTTGCC
601    AAGTATTACG TACAGTGTAC ATGTACAAAC TTCGTA AACG CCAACAAATA CAGCAAGTTT
661    TCGTACAATT TTGTGTTTTG CTCAGTAAGT GAAGCATTTA CAAATGCTTA GTAATTGCAA
721    CCAAGAGGCT AAATACTGACT TTACTTGGCG GTATCATTCA CAAGTGGTCA CCGGATCCA
781    AGGAAGACCT TTTCAAGCCC TTTTAACCCG TGATAGAACT TTGGAGCTTT GCGAAATGTA
841    TGGAGCGTCT TGATTTGAGA CTTGAAGGCG CCTTCATACC GGTACAGTAT AACTTCTGCA
901    AAGCTCAAAG TTCTTTCTCG ATTTGTGATC CCCTGAGGCT CCATTCCGAA CTTTTTTCAT
961    TTCGAAACTA ACTCTGGATC AGTCAAGCCA CGCTTTTGGT+

```

图 3 RxLR23 上游 1 kb 碱基序列

Fig.3 Upstream 1 kb base sequence of RxLR23

```

1      TTTCCGGTTTA GGATTAATTA CCTCTATTAA TCITTTGGTC ATACAGTACA TGTAACCCAC
61     CATTACCATG TCATACCACC AGGAAC TGGC TAATTTGCTT GGCTACATGT TACCGGTGTT
121    GTTGATCTTT AACCGTGAGC TCACCGTTGT ACTTCC TGGC AACGCTCAAT CCAACAATTC
181    AGCAGTGCTT CGACCAACAT GTCAAGGATT GGAGACGATA GAACATTGCT TTTTGTGCC
241    TCACTTGCAA CCACTCTGGC GTTAAATATG GACATTCTGG TCACGTTTCT TTCCAGTAGA
301    TTTGACGTGG AGATGTAGAC CCGACACGAC AAGAAGCTGT CTGAGTACCT TAAGAAATCG
361    ACGACGTGTT CATCAAAC TG AAGCTCCACA AGGCCGGAGA CAAGTTGTCT GAGAACCCTAA
421    ACTTCCTACG CTTGGGCTCA ATACGTGGAC GATTTCAACC AGAAAACCCA GACCACGAAAC
481    TCGATGCTCC CTACATGGT ACGACAGTTT GGAGGATGA TCTGTGAT ATGTTGCAAG
541    AAGAGGAGAA AAACCTCTC ACTAGCATCG AAAC TGCAGG GCGAACAGAT GAGTCTTTGG
601    AAACCGGAAAG GTCCACTACT GACCAACTCA ATTCAAATC TACAAACTGG ACGAAGGAAC
661    CATGAACCTG CTGGATAACC CAGGCATTAA GATCTGGACG AGGTACGCGG ACGAATTCAC
721    AGGGGCTTGG TACAGTAAAG CTTATGCCAA CCTGAACCAA ACGCTCACAA GGTGACGCTA
781    TTCGATAGGC TCCTGGAGAA TTACGACATT GCCACCATAG TCAAAAATGCT CAACTCGAGG
841    CTGAATTCAG ATTCGTCTA GGCTGTCTAC GTGCAACG TG ATCTCGTAGG TTGTGACGCG
901    GCATTACAAT ACGTTCAAAG ACGGCCGTA GTTTTGGTTT TAGGATTAAT CCGTGTGTTA
961    TGTGTTTCCC ATCAGTTAAT CAAAAG AATCC AAAACTCCCC+

```

图 4 RxLR23 下游 1 kb 碱基序列

Fig.4 Downstream 1 kb base sequence of RxLR23

2.2.3 L 23 辣椒疫霉菌敲除转化子验证结果 利用基因 L 23 的引物验证, 以辣椒疫霉菌株 D33 及空载转化子为对照, 验证筛选到的 4 个独立的 L 23 敲除转化子 (见图 5)。

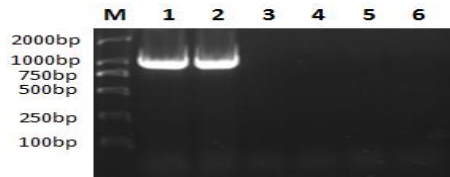


图 5 敲除转化子 PCR 验证结果

Fig.5 Result of PCR knockout transformants verification

M: M ; 1: D33; 2: 空载转化子; 3-6: 4 个独立的 L 23 敲除转化子。

M: M ; 1: D33; 2: E ; 3-6: 4 L 23

利用设计的两对引物 F1/ 1、F2/ 2, 验证敲除转化子, 以辣椒疫霉菌株 D33 及空载转化子为对照。结果显示 D33 及空载转化子无条带, 敲除转化子有条带, 大小与所设计片段大小一致, 表明 F 4 成功替换效应因子 L 23, L 23 敲除成功 (见图 6、图 7)。根据 F1/ 1, F2/ 2 引物设计位置示意图及条带测序结果, 结果表明位于基因组中的 L 23 被 F 4 标签完全置换(图 8)。

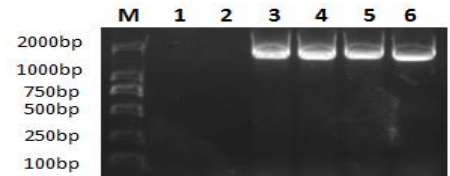


图 6 引物 F1/R1 PCR 验证结果

Fig.6 Primer F1 / R1 PCR verification results

M: M ; 1: D33; 2: 空载转化子; 3-6: 4 个独立的 L 23 敲除转化子。

M: M ; 1: D33; 2: E ; 3-6: L 23

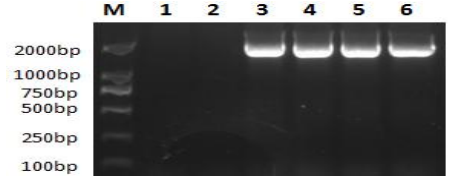


图 7 引物 F2/R2 PCR 验证敲除转化子结果

Fig.7 Primer F2/R2 PCR validation of knockout transformants results

M: M ; 1: D33; 2: 空载转化子; 3-6: 4 个独立的 L 23 敲除转化子。

M: M ; 1: D33; 2: E ; 3-6: 4 L 23

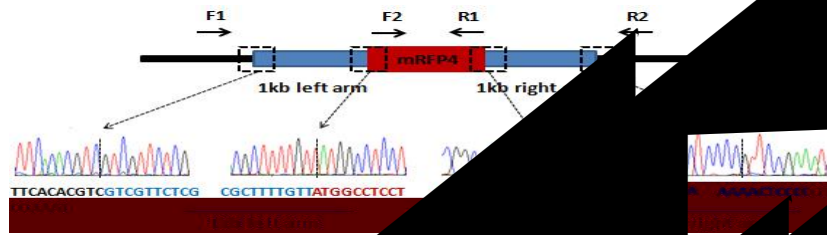


图 8 测序结果表明 PDB 质粒构建成功

Fig.8 The sequencing results showed PDB plasmid construction was successful

### 3 结论与讨论

本研究以辣椒疫霉菌株 D-1 的果胶裂解酶基因 *PhyP* 为模板，根据上游 1 kb 碱基序列及下游 1 kb 碱基序列，利用 Gateway 系统构建 pENTR1-*PhyP* 质粒。将 pENTR1-*PhyP* 质粒与 pDONR221 质粒进行同源重组，得到 pDONR221-*PhyP* 质粒。将 pDONR221-*PhyP* 质粒与 pF2.3G-*PhyP* 质粒进行同源重组，得到 pF2.3G-*PhyP* 质粒。将 pF2.3G-*PhyP* 质粒与 G418 抗性菌株进行同源重组，得到 pF2.3G-*PhyP*-G418 菌株。其中 G418 的加入量为 8 mg/L，并根据同源修复的原理以 pF2.3G-*PhyP* 质粒为模板，设计引物，合成化分子加以验证，从而获得 pF2.3G-*PhyP*-G418 菌株。尽管 Gateway 系统对于质粒构建较为简便，但实验过程中需要注意 A 的脱靶效应在设计引物的过程中尽量选择得分高的引物，放在 F 2 DB 上进行特异性比对，尽量选择特异性高的引物；(2) G418 的含量中不同辣椒疫霉的菌株加入 G418 的量是不同的，必须要根据所用的菌株的种类对 G418 的加入量进行优化，否则，菌丝很难在 G418 含量很高的培养基上生长。

### 参考文献

- 1 付丽.辣椒疫霉(*Phytophthora capsica*)果胶裂解酶基因克隆及功能研究 D.山东:山东农业大学,2012:1-2
- 2 L KH, J J, et al. *Phytophthora capsica* J. M ,2012,13(4):329-337
- 3 B K, M JE, et al. A A : *Phytophthora capsici* , J. C E ,2013,36(6):1192-1203
- 4 C L, FA, C D, et al. M C I /C J. ,2013,339(6121):197-217
- 5 M , L, E KM, et al. A- C 9 J. ,2013,339(6121):823-826
- 6 J , B D, C D, et al. A- C I -C J. B ,2013,31(3):233-239
- 7 F , B, D , et al. E C I /C J. C ,2013,23(10):1229-1232
- 8 B L, F . C I /C 9 J. B A ,2015,33(1):41-52
- 9 M L, , , et al. A C I /C 9 , - J. M ,2015,8(8):1274-1284
- 10 F, L H, , et al. G C I /C 9 J/ L. ,2015-07-19. :// . / / 11491
- 11 F , BM. E C I /C 9 J. M ,2016,17(1):127-139
- 12 B , , B MJ, et al. , , J. C B ,2012,15(4):483-492
- 13 J H , BM, M . , *Phytophthora infestans* J. M M I ,1991,4(6):602-607
- 14 C C, J H . , *Phytophthora infestans*, J. C G ,2003,42(4):228-235
- 15 M A, F BA, A , et al. I J. J E M ,2008,55(2):103-109