

冯宝珍,李培谦,成娟丽,等. 辣椒疫霉 NPP 效应子基因家族生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):28-32.

辣椒疫霉 NPP 效应子基因家族生物信息学分析

冯宝珍,李培谦,成娟丽,刘 缙

(运城学院,山西运城 044000)

摘要: NPP(necrosis-inducing *Phytophthora* protein) 是一类效应子,在卵菌疫霉属病原菌中普遍存在,该类蛋白能够激发植物的防御反应,如引起植物细胞死亡、促使寄主防御基因表达及产生乙烯。利用生物信息学方法对辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)基因组内的 NPP 基因家族存在状况进行分析,并对其氨基酸序列组成、基本理化性质、蛋白质三级结构等进行预测分析,旨在了解其结构特征,进而发掘辣椒疫霉的致病相关基因。结果表明:NPP 基因家族有 25 个成员,其中大部分成员存在多个拷贝。对 25 个 NPP 氨基酸序列进行分析发现,其分子量在 12.45~88.9 ku 之间;对其中 15 个 NPP 蛋白进行三级结构预测发现,它们的三维结构类似,主要的结构元件为 α -螺旋和 β -片层;构建了 25 个 NPP 蛋白的进化树,进行了分子进化分析。

关键词: 辣椒疫霉;NPP 基因家族;效应子;生物信息学

中图分类号: S436.418.1⁺9

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)07-0028-04

效应子(effector)是病原物产生的各种能够压制或平衡寄主防御系统的分子。在侵染过程中,病原物以效应子为关键武器突破寄主的防御系统,一方面能减弱寄主抵抗力以成功侵入,另一方面还能利用寄主的养分以利于自身增殖^[1-2]。许多病原物都能分泌效应子,在细菌、真菌、卵菌及线虫中都发现了效应子^[3]。病原物中存在的效应子有许多种,包括 NPP^[4]、无毒基因(Avr)^[5]、CRN^[6]、PcF^[7]、ScR^[8]、糖类水解酶、果胶酶、几丁质酶以及酯酶^[7]等,其中 NPP(necrosis-inducing *Phytophthora* protein)也被称为 NLP(NEP1-like protein),此类基因在卵菌、真菌、细菌中普遍存在^[8],但在细菌、真菌基因组内的数量较少,一般为 1~4 个,而在卵菌基因组中的数量较多,且多数以基因家族形式存在,如在大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)中约有 29 个,在橡胶疫霉(*Phytophthora ramorum*)中约有 40 个^[9]。多数植物被 NPP 蛋白处理后表现为产生乙烯、MAP 激酶活化、植保素合成、PR 基因诱导表达、胞质 Ca²⁺ 释放以及多种双子叶植物的叶片坏死反应等现象。最早报道的 NPP 蛋白 NEP1 来自镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),能够引起双子叶植物叶片坏死^[10]。后来在腐霉(*Pythium aphanidermatum*)中分离了该类基因 PaNIE,发现其原核表达产物能使胡萝卜、拟南芥及烟草等细胞死亡^[11]。Fellbrich 等研究了 *Phytophthora parasitica* 的 NPP1 基因,发现其原核表达产物能够诱导欧芹及拟南芥体内产生 pathogenesis-related (PR)蛋白、活性氧(ROS)和乙烯,并引起过敏性坏死反应^[12]。Keates 等用 NEP1 处理斑点矢车菊、蒲公英、拟南芥,电镜结果显示,这些植物细胞壁结构发生了明显变化,可引起角质层变薄、叶绿体降解等现象^[13]。Bailey 等分别用 NEP1 和 *Phytophthora megakarya* 游动孢子处理不同生长时期的可可叶片,发现不同生长时期可可叶片的各类抗逆基因表达水平

不同,2 种处理叶片中的抗逆基因表达模式相似,因此推测 NEP1 可能是一种感病因子^[14]。棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*) VdNEP 基因的表达产物能使棉花、烟草、拟南芥叶片萎蔫,因此认为 VdNEP 是棉花与病原物互作过程中的重要诱导因子^[15]。敲除细菌 *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* 和 *E. carotovora* ssp. *atroseptica* 的 NPP 基因后再分别接种马铃薯块茎,发现其毒性明显下降^[16]。研究发现,大豆疫霉(*P. sojae*)的 *PsojNIP* 基因表达是在活体营养向死体营养转换的过渡时期,并且只能引起双子叶植物细胞死亡,因此认为该基因在大豆疫霉半活体营养生活过程中起到辅助病原在寄主植物中定殖的作用^[17]。目前有人研究了这类蛋白对植物的过敏反应,但是这类蛋白的功能及在植物中的作用模式还是未知的,更没有足够的证据证实 NPP 蛋白对疫霉毒性起重要作用。

辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)属于卵菌纲,是一类区别于真菌的真核生物,除了能够引起辣椒疫病,还能够引起多种茄科及葫芦科植物疫病。辣椒疫病是一种土传植物病害,广泛分布于世界各地,且发病快、流行广,易造成作物严重损失。大量使用传统的化学药剂不仅使病原物产生了药物抗性,而且造成的农药残留更会严重威胁人类的生存环境。随着基因工程及蛋白质组学的迅速发展,从基因和蛋白水平解释植物病原的致病机理、挖掘致病相关基因、开展抗病育种及研究抗病基因过程势在必行。随着辣椒疫霉全基因组测序的完成^[9],有关致病重要基因家族及靶基因预测分析等逐渐成为研究热点。分析植物病原真菌关键致病基因编码的蛋白质结构及其关键功能结构基团的修饰特性,对于探索植物病原真菌致病性变异的机理具有重要的意义。本试验在前人研究的基础上,开展与辣椒疫霉致病性变异相关的基因簇大小、组成、亚组划分及其关键基因的研究。

1 材料与方法

1.1 数据库

辣椒疫霉基因组序列信息从 DOE Joint Genome Institute (<http://genome.jgi.doe.gov/>)下载。

收稿日期:2013-10-02

基金项目:山西省高校科技项目(编号:20121025);山西省青年科技研究基金(编号:2013021024-6)

作者简介:冯宝珍(1981—),女,山东临沂人,博士,讲师,主要从事分子植物病理学研究。E-mail: fengbaozhen@126.com。

1.2 基因组信息分析

从 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 下载已报道的 2 个大豆疫霉的 *NPP* 基因,其基因登入号分别为 AF320326、AAM48172^[17]。以下载的这 2 个序列为诱饵,利用 TBLASTN 软件对辣椒疫霉基因组内的 *NPP* 基因序列进行筛查分析,参数设置为 E - value cut - off < 10⁻¹⁵,共检测到 25 个 *NPP* 基因。

1.3 序列分析

利用 DNASTar 软件中的 EditSeq 程序分析氨基酸序列的组成及理化性质。利用在线软件 SignalP v3.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)^[18]分析获得的 25 个 *NPP* 基因的氨基酸序列的信号肽。同时利用 NCBI 的 CDD 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)^[19]和 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)^[20]对蛋白功能域进行分析。

1.4 系统进化分析

所有 *NPP* 基因的蛋白序列用 culstaln 2.0 进行多重序列比对,参数设置为其默认值。序列的系统进化分析使用 PAUP×4.0,采用邻近结合法(neighbor - joining, NJ)构建距离树,进行 1 000 次 bootstrap 自举法检验。批处理命令如下:

```
Begin paup;  
Execute phnpp.nex;  
Cstatus;  
Set criterion = distance;  
Showdist;
```

```
Nj brlens = yes treefile = phnpp.tre;  
Savetrees file = phnpp.tre root = yes brlens = yes savebootp  
= brlens from = 1 to = 4;  
Savetrees file = phnpp.best.tre root = yes brlens = yes save-  
bootp = brlens from = 1 to = 1;  
Bootstrap nreps = 1000 brlens = yes treefile = boot.phnpp.tre  
search = nj;
```

1.5 *NPP* 蛋白质二级、三级结构预测

蛋白质二级结构的特性分析利用 ExPaSy 提供的在线 SOPMA 程序(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsaautomat.pl?page=npsa_sopma.html),预测分析 α -螺旋 β -折叠和无规则卷曲。蛋白质三级结构的空间模型分析利用 ExPaSy 提供的 Swiss - Model(<http://swissmodel.expasy.org>)进行同源建模。

2 结果与分析

2.1 辣椒疫霉基因组 *NPP* 基因家族分析

利用大豆疫霉 *NPP* 基因编码蛋白检索辣椒疫霉 *NPP* 家族蛋白,去除冗余序列后,共获得 25 条辣椒疫霉 *NPP* 氨基酸序列,它们均具有保守的氨基酸序列“GHRHDWE”。

2.2 辣椒疫霉的 *NPP* 基因分析

对 25 条氨基酸序列在基因组中的分布情况进行分析,发现大部分基因存在多拷贝。25 个基因及其拷贝情况见表 1。可以看出,大部分基因存在 1~2 个拷贝,个别基因的拷贝数达到 16 个(jgi|PhyCaF7|43883)。

表 1 辣椒疫霉基因组中的 *NPP* 基因分布

单拷贝基因	多拷贝基因	
基因号	基因号	基因组中拷贝
jgi PhyCaF7 86540	jgi PhyCaF7 23459	jgi PhyCaF7 70850
jgi PhyCaF7 20844	jgi PhyCaF7 70852	jgi PhyCaF7 122619
jgi PhyCaF7 21204	jgi PhyCaF7 76138	jgi PhyCaF7 113086
jgi PhyCaF7 24573	jgi PhyCaF7 82430	jgi PhyCaF7 116399
jgi PhyCaF7 68295	jgi PhyCaF7 114323	jgi PhyCaF7 114326
jgi PhyCaF7 68503	jgi PhyCaF7 7756	jgi PhyCaF7 23286;jgi PhyCaF7 70849
jgi PhyCaF7 69004	jgi PhyCaF7 23292	jgi PhyCaF7 7613;jgi PhyCaF7 37194
jgi PhyCaF7 70605	jgi PhyCaF7 71103	jgi PhyCaF7 23660;jgi PhyCaF7 7723
jgi PhyCaF7 72101	jgi PhyCaF7 74207	jgi PhyCaF7 27731;jgi PhyCaF7 27732;jgi PhyCaF7 74207
jgi PhyCaF7 73591	jgi PhyCaF7 8760	jgi PhyCaF7 86961;jgi PhyCaF7 39481;jgi PhyCaF7 118625;jgi PhyCaF7 124767
jgi PhyCaF7 75230	jgi PhyCaF7 43883	jgi PhyCaF7 43884;jgi PhyCaF7 43885;jgi PhyCaF7 43886;jgi PhyCaF7 43887;jgi Phy-
jgi PhyCaF7 78535		CaF7 66543;jgi PhyCaF7 91548;jgi PhyCaF7 91549;jgi PhyCaF7 91460;jgi PhyCaF7
jgi PhyCaF7 78817		91461;jgi PhyCaF7 91462;jgi PhyCaF7 119696;jgi PhyCaF7 41934;jgi PhyCaF7 41935;jgi
jgi PhyCaF7 82067		PhyCaF7 41936;jgi PhyCaF7 41937;jgi PhyCaF7 65858

辣椒疫霉的 *NPP* 氨基酸数目在 113~807 个之间,大部分基因的氨基酸数目为 200~300 个(图 1)。

对 25 个 *NPP* 基因进行信号肽分析发现,部分基因(48%)有信号肽,长度为 17~20 个氨基酸。利用 DNASTar 软件中的 EditSeq 程序分析氨基酸序列的组成及理化性质,结果表明 *NPP* 蛋白质氨基酸的分子量在 12.45~88.9 ku 之间,大部分氨基酸的等电点为 5.5~6.5(表 2)。

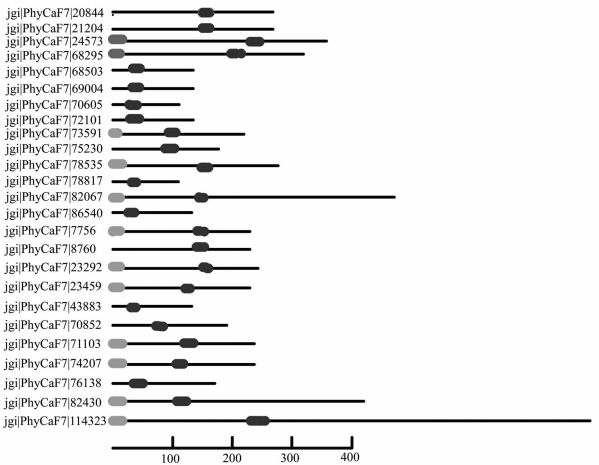
2.3 系统进化分析

为了进一步对辣椒疫霉的 *NPP* 蛋白特征进行分析,本研究利用 PAUP 4.0 软件对预测的 25 条 *NPP* 氨基酸序列进行进化关联评估。图 2 为 25 条 *NPP* 蛋白序列的系统发生树,

可见它们分为 a、b、c 3 个亚族,各亚族的基因成员数目未见显著差异,分别为 6、10、8 个。a 亚族分支较长,说明该亚族基因的进化较早,基因信息变化较大;而 b、c 亚族的基因分支都较近,说明这些基因发生基因变化的时间较短,进化较快。

2.4 *NPP* 蛋白的三级结构预测

蛋白质的三级结构是在二级结构的基础上进一步盘绕折叠形成的。三级结构的预测和分析对于理解蛋白质结构和功能之间的关系有重要作用。根据 *NPP* 基因家族系统进化分析的结果,选取 15 条最具代表性的氨基酸序列进行同源三级结构建模。本研究利用 Swiss - Model 对辣椒疫霉 *NPP* 蛋白的 15 条氨基酸序列进行三维结构同源建模,图 3 结果显示,



浅色部分代表信号肽；深色部分代表保守序列“GHRHDWE”

图1 辣椒疫霉NPP蛋白序列结构

表 2 辣椒疫霉 NPP 基因家族的氨基酸特性分析

基因号	氨基酸数目 (个)	分子量 (ku)	等电点	信号肽
jgi PhyCaF7 20844	279	30.50	7.28	
jgi PhyCaF7 21204	277	29.67	6.30	
jgi PhyCaF7 24573	359	39.31	5.59	19
jgi PhyCaF7 68295	319	30.50	6.59	19
jgi PhyCaF7 68503	132	15.05	6.63	
jgi PhyCaF7 69004	136	15.06	6.00	
jgi PhyCaF7 70605	113	12.60	6.35	
jgi PhyCaF7 72101	132	15.17	6.80	
jgi PhyCaF7 73591	223	24.44	6.72	18
jgi PhyCaF7 75230	187	20.92	6.41	
jgi PhyCaF7 78535	274	30.24	6.59	17
jgi PhyCaF7 78817	109	12.45	6.67	
jgi PhyCaF7 82067	476	51.75	5.64	18
jgi PhyCaF7 86540	132	14.84	5.98	
jgi PhyCaF7 23459	234	25.39	6.96	17
jgi PhyCaF7 70852	193	21.12	6.06	
jgi PhyCaF7 76138	168	19.33	6.52	
jgi PhyCaF7 82430	421	45.49	4.22	20
jgi PhyCaF7 114323	807	88.90	9.09	20
jgi PhyCaF7 7756	233	25.47	4.21	18
jgi PhyCaF7 23292	246	26.94	6.01	19
jgi PhyCaF7 71103	236	25.45	6.50	19
jgi PhyCaF7 74207	234	25.57	4.65	18
jgi PhyCaF7 8760	232	25.31	4.65	
jgi PhyCaF7 43883	132	15.19	7.14	

15 条氨基酸序列大部分都具有相似的三级结构,这些蛋白为单结构域,α-螺旋和β-片层是其主要的结构元件。根据α-螺旋和β-片层的个数差异又可以分为两大类结构域,第一类结构域由3个α-螺旋围绕β-片层组成,共有10个序列(jgi|PhyCaF7|7756、jgi|PhyCaF7|8760、jgi|PhyCaF7|20844、jgi|PhyCaF7|23459、jgi|PhyCaF7|24573、jgi|PhyCaF7|68295、jgi|PhyCaF7|70605、jgi|PhyCaF7|70852、jgi|PhyCaF7|71103、jgi|PhyCaF7|73591);第二类三级结构主要由2个α-螺旋和β-片层形成,共有6个序列(jgi|PhyCaF7|43883、jgi|PhyCaF7|69004、jgi|PhyCaF7|70605、jgi|PhyCaF7|75230、jgi|PhyCaF7|78817、jgi|PhyCaF7|86540),是一些单结构域的小肽。

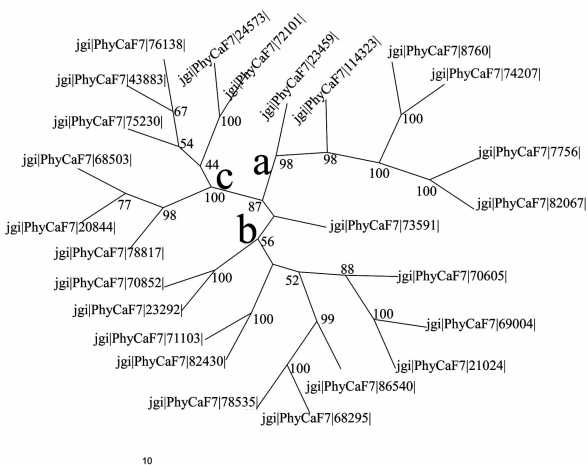


图2 辣椒疫霉NPP蛋白系统进化树

虽然有些蛋白质的基本元件个数相同,但它们的α-螺旋、β-片层以及无规则卷曲的长度都存在一定差异,这些相似或者差异可能导致它们家族成员之间功能的多样性。

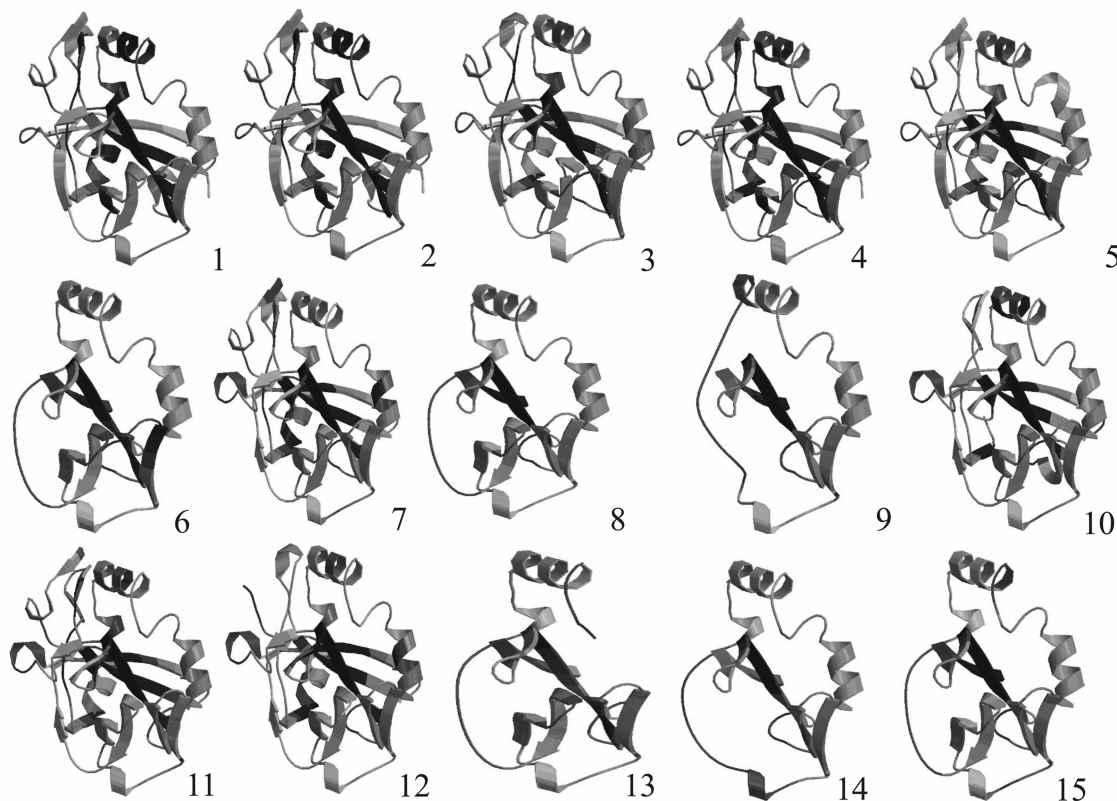
3 结论与讨论

NPP 效应子的研究是当前卵菌功能基因组学领域的热点。NPP 效应子基因家族在微生物中广泛存在,目前已知的微生物有卵菌腐霉属(*P. aphanidermatum*)^[4]、疫霉属(*Phytophthora* spp.)、真菌镰刀菌(*F. oxysporum*)、链孢霉属(*Neurospora crassa*)^[21],以及革兰氏阳性菌芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)、链霉菌属(*Streptomyces coelicolor*),革兰氏阴性菌欧文氏菌属(*Erwinia*)^[4]和弧菌属(*Vibrio pommerensis* sp.)^[22],这些微生物中部分是植物病原菌,部分是动物病原物,其侵染方式各异,表明 NPP 蛋白功能的多样性。目前的研究集中于对部分植物病原 NPP 基因功能的分析,大部分 NPP 蛋白的功能都是未知的。据报道,NPP 蛋白可参与寄主防御反应,引起寄主的过敏反应。也有研究表明,有些病原物中的 NPP 蛋白与病原物致病性有关。本研究对辣椒疫霉 NPP 基因家族生物信息学进行了分析,为深入开展 NPP 基因在辣椒疫霉中的克隆、表达分析及生物学功能鉴定等方面的研究提供了重要基础。

本研究以大豆疫霉 NPP 基因编码蛋白为探针,对辣椒疫霉基因组数据库进行检索得到了 25 个 NPP 蛋白序列,利用相关数据库和软件对这些序列进行基因鉴定和蛋白质三级结构预测分析,并构建系统进化树对该家族不同成员之间的相互关系和演化历程进行了探讨。对发掘辣椒疫霉致病基因、解析其关键基因对于探索植物病原真菌致病性变异的机理及开展抗病基因工程研究具有重要的意义。

参考文献:

[1] Chisholm S T, Coaker G, Day B, et al. Host - microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response[J]. Cell, 2006, 124(4): 803 - 814.
[2] Hogenhout S A, Van der Hoorn R A, Terauchi R, et al. Emerging concepts in effector biology of plant - associated organisms [J]. Molecular Plant - Microbe Interactions, 2009, 22(2): 115 - 122.



1—jgi|PhyCaF7|7756 (亚族a); 2—jgi|PhyCaF7|8760 (亚族a); 3—jgi|PhyCaF7|20844 (亚族c); 4—jgi|PhyCaF7|23459 (亚族a); 5—jgi|PhyCaF7|24573 (亚族c); 6—jgi|PhyCaF7|43883 (亚族c); 7—jgi|PhyCaF7|68295 (亚族b); 8—jgi|PhyCaF7|69004 (亚族b); 9—jgi|PhyCaF7|70605 (亚族b); 10—jgi|PhyCaF7|70852 (亚族b); 11—jgi|PhyCaF7|71103 (亚族b); 12—jgi|PhyCaF7|73591 (亚族b); 13—jgi|PhyCaF7|75230 (亚族c); 14—jgi|PhyCaF7|78817 (亚族c); 15—jgi|PhyCaF7|86540 (亚族b)

图3 辣椒疫霉NPP蛋白三级结构预测图

- [3] Kamoun S. Groovy times; filamentous pathogen effectors revealed[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(4): 358 – 365.
- [4] Pemberton C L, Salmond G P. The Nep1 – like proteins – a growing family of microbial elicitors of plant necrosis[J]. Molecular Plant Pathology, 2004, 5(4): 353 – 359.
- [5] Whisson S C, Boevink P C, Moleleki L, et al. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells[J]. Nature, 2007, 450(7166): 115 – 118.
- [6] Stam R, Jupe J, Howden A J, et al. Identification and characterisation CRN effectors in *Phytophthora capsici* shows modularity and functional diversity[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59517.
- [7] Orsomando G, Lorenzi M, Raffaelli N, et al. Phytotoxic protein PcF, purification, characterization, and cDNA sequencing of a novel hydroxyproline – containing factor secreted by the strawberry pathogen *Phytophthora cactorum* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(24): 21578 – 21584.
- [8] Bos J I B, Armstrong M, Whisson S C, et al. Intraspecific comparative genomics to identify avirulence genes from *Phytophthora* [J]. New Phytologist, 2003, 159(1): 63 – 72.
- [9] Tyler B M, Tripathy S, Zhang Xuemin, et al. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis [J]. Science, 2006, 313(5791): 1261 – 1266.
- [10] Jennings J C, Apel – Birkhold P C, Mock N M, et al. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum* [J]. Plant Science, 2001, 161(5): 891 – 899.
- [11] Veit S, Wörle J M, Nürnberger T, et al. A novel protein elicitor (PaNep) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco [J]. Plant Physiology, 2001, 127(3): 832 – 841.
- [12] Fellbrich G, Romanski A, Varet A, et al. NPPI, a *Phytophthora* – associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis* [J]. Plant Journal, 2002, 32(3): 375 – 390.
- [13] Keates S E, Kostman T A, Anderson J D, et al. Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis [J]. Plant Physiology, 2003, 132(3): 1610 – 1622.
- [14] Bailey B A, Bae H, Strem M D, et al. Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya* [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43(6): 611 – 622.
- [15] Wang J Y, Cai Y, Gou J Y, et al. VdNep, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4989 – 4995.
- [16] Mattinen L, Tshukina M, Mäe A, et al. Identification and characterization of Nip, necrosis – inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* [J]. Molecular Plant – Microbe Interactions, 2004, 17(12): 1366 – 1375.
- [17] Qutob D, Kamoun S, Gijzen M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis – inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy [J]. Plant Journal, 2002, 32(3): 361 – 373.

张永改,李祥龙,周荣艳,等. 不同物种 *CDK5* 基因编码区生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2014,42(7):32-34.

不同物种 *CDK5* 基因编码区生物信息学分析

张永改, 李祥龙, 周荣艳, 李兰会
(河北农业大学动物科技学院,河北保定 071001)

摘要:采用生物信息学方法比较分析了东非狒狒、黑猩猩、裸鼯鼠、牛、欧洲雪貂、人、灰鼠猴、大猩猩、长臂猿、猪 *CDK5* 基因编码区(CDS)的遗传多样性。结果表明,来自 10 个物种的 47 条基因序列中检测到个 532 多态位点,共生成 30 种单倍型,物种间及物种内 *CDK5* 基因序列编码区存在较丰富的遗传多样性;理论等电点均大于 6,N 端无信号肽,无跨膜结构域,肽链表现为亲水性;蛋白质二级结构主要结构元件是 α -螺旋、无规则卷曲。
关键词:*CDK5* 基因;物种;生物信息学
中图分类号: Q813 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)07-0032-03

CDK5 主要参与神经元正常功能的维持,但在非神经元的组织或细胞中也广泛表达并发挥作用^[1]。研究表明,*CDK5* 可能通过调节黑色素细胞核中 *MITF*mRNA、*TYR* 的表达,从而参与调控羊驼毛色的形成^[2]。在羊驼皮肤组织中,*Agouti* 基因、*MC1R* 基因、酪氨酸酶基因家族、*KIT* 基因、*CDK5* 基因都参与了羊驼毛色的形成与调控^[3]。本研究利用比较基因组学、生物信息学方法研究了该基因编码区种间、种内变异,以期探明该基因在不同种间及种内的遗传分化,进而为相关

黑色素基因的遗传学分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 序列来源

从 NCBI 网站 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 的 GenBank 中下载东非狒狒、黑猩猩、裸鼯鼠、牛、欧洲雪貂、人、灰鼠猴、大猩猩、长臂猿、猪等 10 个物种的 47 条 *CDK5* 基因的 CDS 序列(表 1)。

表 1 不同物种的 *CDK5* 基因序列来源

物种	序列数(条)	序列号
东非狒狒	2	XM-003896873.1,XR-161539.1
黑猩猩	2	XR-169918.1,XM-519523.2
裸鼯鼠	2	XM-004860387.21,XM-004877372.1
牛	3	NM-174017.2,L04798.1,BC120083.1
欧洲雪貂	11	XM-004765943.1,XM-00 4765944.1,XM-004810654.1,XM-004765942.1,XM-004810655.1,XM-004810653.1,XM-004765941.1,XM-004810652.1,XM-004810651.1,XM-004765940.1,XM-004765939.1
人	16	CR-457041.1,NM-004935.3,BT006680.1,BC005115.1,AY049778.1,AY889545.1,X66364.1,AB463550.1,BT020139.1,BT008036.1,AY892008.1,AY892007.1,AY891155.1,AY588641.1,AY893831.1,NG-022432.1
灰鼠猴	2	XM-003929869.1,XR-166425.1
大猩猩	2	XR-175359.1,XM-004046495.1
长臂猿	2	XM-003270919.2,XR-179558.1
猪	5	NM-001044621.2,AK391758.1,AK389504.1,AK349617.1,AY610190.1

收稿日期:2013-10-17
作者简介:张永改(1987—),女,河北定州人,硕士研究生,从事动物遗传学研究。E-mail:zhangyonggai1022@126.com。
通信作者:李祥龙,博士,教授,从事动物遗传学研究。E-mail:lix-ianglongen@aliyun.com。

1.2 方法

用 BioEdit 软件对 47 个不同序列的 *CDK5* 基因编码区进行比对分析,编辑并选取共有的编码区序列(长度为 879 bp)进行比较,利用 DanSP 4.20 软件对其进行遗传多态性分析,生成单倍型,并计算种间核苷酸歧异度(D_{xy})、遗传分化指数

[18] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3. 0 [J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 340(4): 783-795.

[19] Marchler - Bauer A, Anderson J B, Chitsaz F, et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: D205-D210.

[20] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource [J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40: D302-D305.

[21] Galagan J E, Calvo S E, Borkovich K A, et al. The genome sequence of the filamentous *Neurospora crassa* [J]. Nature, 2003, 422(6934): 859-868.

[22] Jores J L A, Appel B, Lewin A. Cloning and molecular Characterization of a Unique Hemolysin Gene of *Vibrio pommerensis* sp. nov. development of a DNA probe for the detection of the hemolysin gene and its use in identification of related *Vibrio* spp. from the Baltic Sea [J]. FEMS Micro Lett, 2003, 229(2): 223-229.