

张 杰,阮先乐,侯小歌,等. 绿僵菌 HC 毒素合成酶基因的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):71-74.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.019

绿僵菌 HC 毒素合成酶基因的生物信息学分析

张 杰,阮先乐,侯小歌,王俊英,胡炳义

(周口师范学院生命科学与农学院,河南周口 466001)

摘要:通过生物信息学的方法对绿僵菌 HC 毒素合成酶基因进行了分析。生物信息学分析表明,它在一级结构、二级结构、三级结构上接近于植物病原真菌,但是其一级结构上并不保守。

关键词:NCBI;蛋白;核酸;生物信息学

中图分类号:Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0071-03

绿僵菌是农业害虫防治的主要病原真菌之一,其致病性主要依赖毒素麻痹宿主的防御。绿僵菌 HC 毒素是三轮状结构的环状四肽(D-Pro-L-Ala-D-Ala-L-Aeo),Aeo 表示 2 氨基 9,10 氟环唑 8 3-羧基癸酸乙酯^[1]。在玉米黑粉病中,HC 毒素是黑粉病菌侵染玉米过程中的特异性和毒力的决定性因素^[2]。HC 毒素是微生物为数不多的第二代谢产物之一。在植物、昆虫和哺乳动物中 HC 毒素是组蛋白脱乙酰基酶(HDACs)的抑制因子^[3],然而,昆虫病原真菌侵染宿主时抑制宿主 HDACs 致病和生物合成的机制尚不清楚^[4-6]。利用生物信息学技术分析 HC 毒素合成酶的进化、二级结构、三级结构、跨膜结构域及物理化学性质,可以为生物学功能的进一步研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中的绿僵菌数据库为材料。

1.2 方法

1.2.1 序列的查找 通过 NCBI 数据库搜索 HC 毒素合成酶的蛋白序列,再通过绿僵菌数据库 NCBI/BLAST/tblastn 搜索绿僵菌的核酸序列,进而获得 HC 毒素合成酶基因的全长序列。

1.2.2 序列的生物信息学分析 用 DNAMAN 软件对 HC 毒素合成酶蛋白序列运行 clustalW、亲水性、疏水性和跨膜结构分析;应用 MEGA 5.0 构建系统发育树;用 The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench 和 COILS 在线分析二级结构,SMART 在线分析二级结构及结构域;用 swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>)数据库在线建模和三级结构

分析^[7-10];用 SignalP 4.1 Server 预测蛋白序列的信号剪切位点;蛋白质结构域的预测用在线 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>);利用 KEGG 数据库分析其所在的信号通路;利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>)数据库在线预测其物理和化学性质。

2 结果与分析

2.1 HC 毒素合成酶一级结构和信号肽预测

基于一级结构上的同源性对蛋白序列运行 clustalW 和系统发育树的构建。由图 1-A 可知绿僵菌 HC 毒素合成酶总共有 290 个氨基酸,在一级结构上保守型极低,在不同的病原菌中只有一个共同的甘氨酸位点(黑色、蓝色和红色区域分别表示相同性高于 90%、75% 和 50%)。由图 1-B 可知绿僵菌的 HC 毒素合成酶与半知菌类的虫生真菌白僵菌具有较高同源性(88%),其次是动物病原菌(53%)。用 SignalP 4.1 Server 对其一级结构上的信号肽进行预测。由图 1-C 表明该蛋白序列在第 19 个氨基酸位置具有信号肽位点,其预测分值为 0.8,信号肽序列为 MLLSSAAVVLGALQPALG,与 swiss-model 和 SMART 在线预测结果相一致,可能是分泌性蛋白。

2.2 HC 毒素合成酶二、三级结构预测

在一级结构的基础上用 COILS 在线分析了 HC 毒素合成酶的二级结构。从图 2 可以看出,HC 毒素合成酶有 3 个 α -螺旋结构,在蛋白中的含量为 3.45%;13 个 β -折叠,其含量为 16.55%;无规则卷曲最多,其含量为 80%。而在线 SMART 预测到其内部有 2 个重复序列及前端的信号肽序列,没有预测到特征性结构域。

2.3 HC 毒素合成酶亲水性、疏水性、跨膜结构和分子结构的预测

从图 3-A 可知,HC 毒素合成酶最高亲水性分值为 1.94,而最低分值为 -1.91,总体亲水性为 -0.471;从图 3-B 可知,HC 毒素合成酶疏水性不显著,其疏水性最高分值为 3.03,最低值为 -3.28,推测其可能是水溶性蛋白;从图 3-C 可知,HC 毒素合成酶没有跨膜结构。图 3-D 是预测到的 HC 毒素合成酶的分子结构,分子式为 $C_{1357}H_{2136}N_{390}O_{417}S_{24}$,分子量为 31 355.6。

2.4 HC 毒素合成酶三维建模

从图 4-A 和 4-B 可知,在 SWISS-MODEL 数据库中搜

收稿日期:2014-08-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:31171897);河南省教育厅自然科学基金计划(编号:2010B180031);周口师范学院科研成果孵化专项(编号:2011-zknuhf)。

作者简介:张 杰(1975—),男,河南太康人,博士研究生,讲师,研究方向为分子生物学与生物工程。E-mail:zhangjiekz@qq.com。

通信作者:胡炳义,教授,研究方向为生物技术。E-mail:bingyihu@126.com

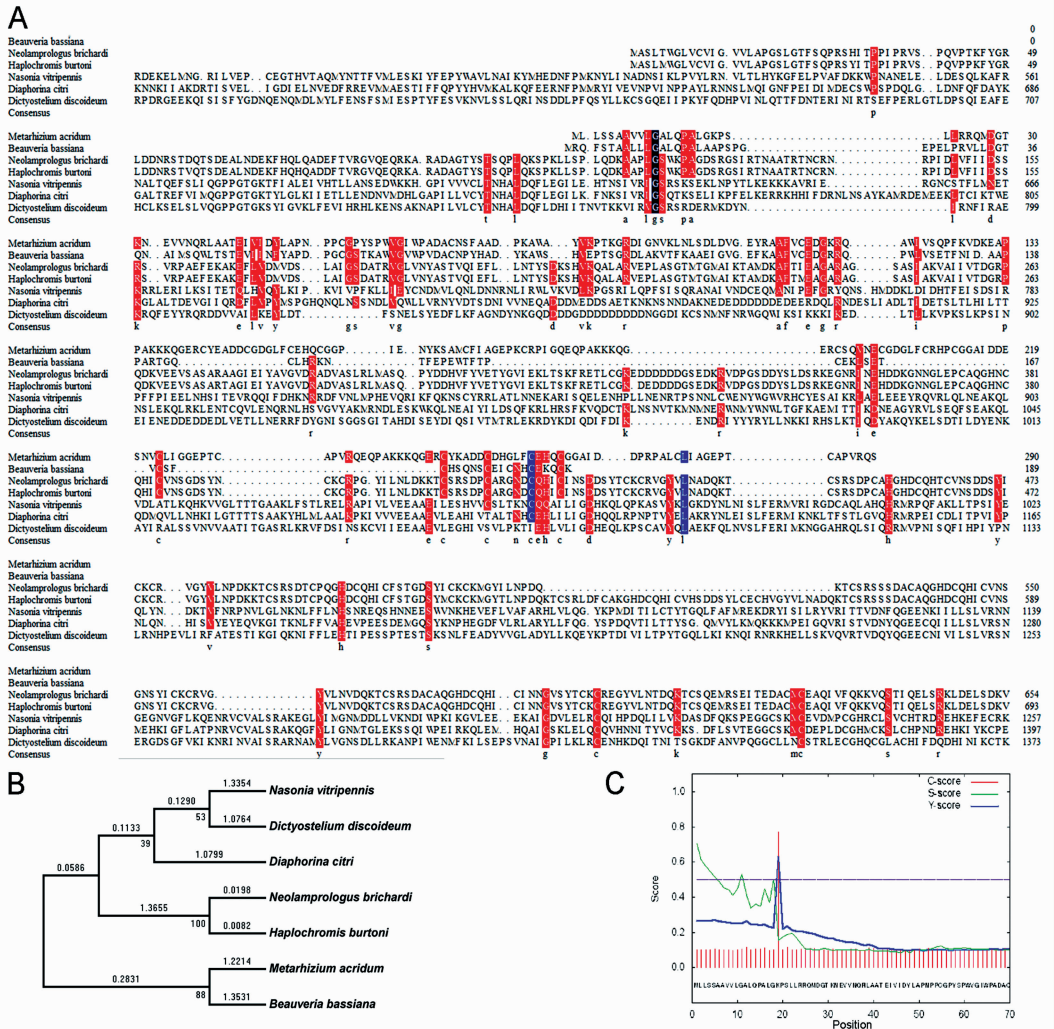


图1 HC毒素合成酶多序列比对(A)、系统进化树的构建(B)及绿僵菌HC毒素合成酶信号肽预测(C)

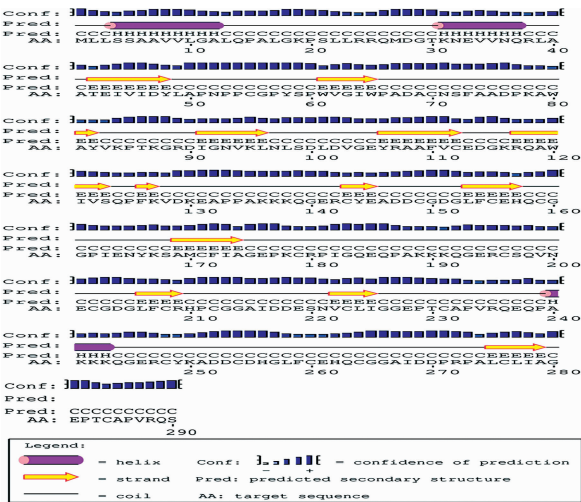


图2 HC毒素合成酶二级结构预测

2.5 HC毒素合成酶抗原性片段、物理和化学性质分析

用DNAMAN软件预测到该氨基酸含有17个抗原肽段,其分值和长度(红色字母表示最大分值位点)分别如下:

- [1] 分值 = 1.181, 长度 = 21, 4 - SSAAVVLGALQPALGKPSLLR - 24; [2] 分值 = 1.179, 长度 = 16, 272 - RPALCLIAGEPTCAPV - 287; [3] 分值 = 1.172, 长度 = 12, 204 - DGLFCRHPGCGGA - 215; [4] 分值 = 1.162, 长度 = 22, 246 - ERCYKADDCDHGLFCEHQCGGA - 267; [5] 分值 = 1.162, 长度 = 13, 150 - GDGLFCEHQCGGP - 162; [6] 分值 = 1.150, 长度 = 7, 108 - AAFVCE - 114; [7] 分值 = 1.147, 长度 = 26, 40 - AATEIVIDYLAPNPPCGPSYSPWGIW - 65; [8] 分值 = 1.125, 长度 = 13, 119 - AWIVSQPFKVDKE - 131; [9] 分值 = 1.123, 长度 = 8, 195 - RCSQVNEC - 202; [10] 分值 = 1.123, 长度 = 7, 220 - SNVCLIG - 226; [11] 分值 = 1.110, 长度 = 10, 228 - EPTCAPVRQE - 237; [12] 分值 = 1.106, 长度 = 7, 32 - NEVVNQR - 38; [13] 分值 = 1.090, 长度 = 7, 141 - ERCYEAD - 147; [14] 分值 = 1.089, 长度 = 15, 168 - SAMCFIAGEPKCRPI - 182; [15] 分值 = 1.080, 长度 = 7, 79 - AWAYVKP - 85; [16] 分值 = 1.074, 长度 = 7, 67 - ADACNSF - 73; [17] 分值 = 1.072, 长度 = 14, 93 - NVKLNLSLDLVGEY - 106。

索到了HC毒素合成酶的模板,它与靶蛋白的相似性评估得分为37.93%(图4-C),正常的QMEAN4分值为-3.52,靶蛋白与模型氨基酸的对应序列如图4-E所示。建模结果表明该蛋白的三维结构与上述预测结果相一致。

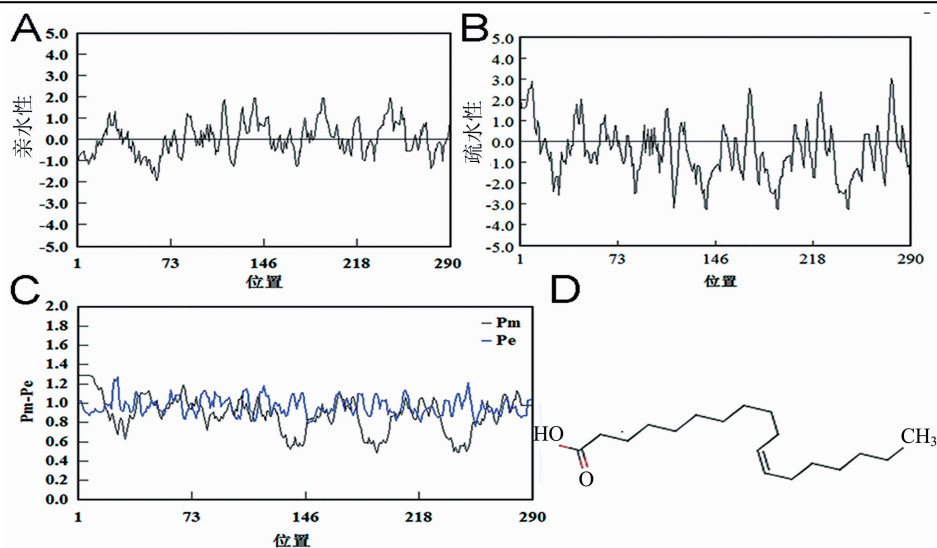


图3 HC 毒素合成酶亲水性分析(A)、疏水性分析(B)、跨膜结构分析(C)及分子结构预测(D)

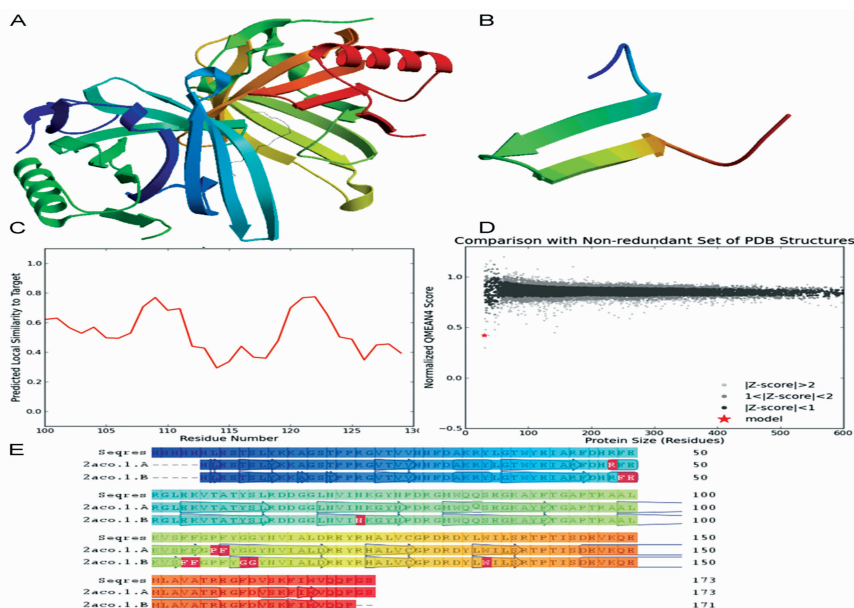


图4 HC毒素合成酶三维结构模板(A)、三维建模(B)、三维建模评价(C)、三维建模评分(D)、三维建模比对(E)

其物理化学性质用 ProtParam 在线预测,结果表明该蛋白的等电点为 5.70,总共有 4 324 个原子组成,假定所有的半胱氨酸形成二硫键,它们在水中 280 nm 的消光系数为 33 680 L/(mol · cm);假定所有的半胱氨酸是还原态,它们在水中 280 nm 的消光系数为 32 430 L/(mol · cm)。其氮端起始氨基酸为 Met,预测到该蛋白在哺乳动物网状细胞中,离体状态下的半衰期为 30 h;在酵母活体中的半衰期为大于 20 h;在细菌活体中的半衰期大于 10 h。其不稳定性指数为 41.72,属于不稳定性蛋白。其脂肪族指数为 66.69。

3 讨论

利用生物信息学的方法对研究的基因进行正确预测是现代分子生物学研究的有效手段之一^[11-12]。随着生物信息学算法和蛋白质结构预测研究的深入,生物信息学在生物科学领域

的研究非常重要^[13]。HC 毒素合成酶的同源序列比对及系统进化树的分析结果与 Gao 等的研究结论^[14]一致,说明生物信息学预测是正确的。同软件与在线对信号肽段预测结果相一致,与 Nadine 等的报道结果^[15]一致。HC 毒素合成酶的二级结构和三级结构的预测与 Jones 等报道的玉米圆斑病菌相似^[16]。HC 毒素合成酶的物理化学性质及抗原片段尚未有报道。总体来说,绿僵菌 HC 毒素合成酶结构及功能接近禾本科病原菌,它与植物病原菌的异同尚需试验证明,其物理化学性质也需进一步的验证。表明生物信息学是现代生物学中重要的技术手段,与其他生物学技术相结合是生物学研究的必要途径。

参考文献:

- [1] Walton J D. HC - toxin [J]. Phytochemistry, 2006, 67 (14): 1406 - 1413.

黄 静,张超腾,郑 燕. 应用正交测验法优选巨菌草诱导培养基[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):74-76.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.020

应用正交测验法优选巨菌草诱导培养基

黄 静,张超腾,郑 燕

(国家菌草工程技术研究中心/福建农林大学生命科学学院,福建福州 350002)

摘要:以巨菌草幼茎作为试验材料,研究不同浓度的防褐化物质对巨菌草组织培养褐化的影响,应用正交测验法研究生长激素 2,4-D、KT、IAA 不同的浓度对巨菌草愈伤组织诱导的影响。结果表明:最佳防褐化物质是 1.0 mg/L PVP;2,4-D 对巨菌草幼茎愈伤组织诱导的影响最小,KT 居于二者之间,没有达到显著水平,而 IAA 影响最大,达到了显著水平($P < 0.05$);巨菌草诱导愈伤组织的最佳培养基配方是 MS + 2,4-D 1.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L + KT 1.0 mg/L。

关键词:巨菌草;防褐化;正交测验法;愈伤组织;培养基;激素

中图分类号:S646.904 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0074-03

巨菌草(*Pennisetum* sp.)属于单子叶植物禾本科狼尾草属,是一种适宜在热带、亚热带和温带生长的高产优质菌草。其抗逆性强,根系发达,为直立丛生的多年生植物,植株高大,一般为 3~5 m,有的也可达到 6~8 m^[1-2]。巨菌草是典型的 C₄ 植物,光合效率很高,是其他阔叶树的 4~7.46 倍,年产鲜草达 200~400 t/hm²^[3]。巨菌草原产于南非,1983 年引入我

国,由于其巨大的经济价值得到了广泛推广。

巨菌草是一种高产优质的菌草,抗逆性极强,一般不会有病虫害发生,管理简单,利用期长,生长速度快,粗蛋白含量很高,营养价值丰富^[3],可作为生产饲料和保持水土、绿化环境的优良草种^[4],也被用作香菇、灵芝、平菇、猴头菇等的栽培培养料^[5]。此外,巨菌草还是能源草的典型草种,可用于生产乙醇等生物燃料。巨菌草种植简单,既可以进行有性繁殖,也可以进行无性繁殖。无性繁殖一般用腋芽进行,有性繁殖用种子,但是发芽率一般都很低^[4]。目前,巨菌草在我国南方的种植范围越来越广,由于不耐寒,在北方寒冷的冬季无法自然越冬,使得在北方的推广受到严重限制^[6]。

长期以来,巨菌草品种选育方面基本是依靠常规育种的方法,因而无法快速解决巨菌草耐寒性、品质及产量改良等问题。植物基因工程技术是解决品种改良的一种高效手段,而

收稿日期:2014-09-06

基金项目:国家菌草工程技术研究中心开放基金(编号:JCJJ13003)。
作者简介:黄 静(1988—),女,山东泗水人,硕士研究生,研究方向为草业育种学。Tel:(0591)83789338;E-mail:hj880866@126.com。

通信作者:郑 燕,博士,副教授,从事草业育种学研究。Tel:(0591)83789338;E-mail:swallow1318@126.com。

- [2] Liesch J M, Sweeley C C, Staffeld G D, et al. Structure of hc-toxin, a cyclic tetrapeptide from helminthosporium-carbonum [J]. Tetrahedron, 1982, 38(1): 45-48.
- [3] Horbach R, Navarro-Quesada A R, Knogge W, et al. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi [J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(1): 51-62.
- [4] Yamane H, Konno K, Sabelis M, et al. Chemical defence and toxins of plants [J]. Chemical Ecology, 2010, 4: 339-385.
- [5] Stachelhaus T, Hüser A, Marahiel M A. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases [J]. Chemistry & Biology, 1996, 3(11): 913-921.
- [6] Turgeon B G, Oide S, Bushley K. Creating and screening *Cochliobolus heterostrophus* non-ribosomal peptide synthetase mutants [J]. Mycological Research, 2008, 112(2): 200-206.
- [7] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb viewer: an environment for comparative protein modeling [J]. Electrophoresis, 1997, 18(15): 2714-2723.
- [8] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(13): 3381-3385.

- [9] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling [J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [10] Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models [J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 343-350.
- [11] 张广辉,李翠婷,王建军,等. 灯盏花黄酮合成酶II基因克隆及其生物信息学分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2231-2236.
- [12] Gao J, Cheng A C, Wang M. Bioinformatics analysis of the complete nucleotide sequence of the duck enteritis virus (DEV) US2 gene [J]. Management and Control, 2012(2): 484-487.
- [13] 周建红,艾观华,方慧生,等. 蛋白质结构从头预测方法研究进展[J]. 生物信息学, 2011, 9(1): 1-5.
- [14] Gao Q, Jin K, Ying S H, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum* [J]. Plos Genetics, 2011, 7(1): 1-18.
- [15] Nadine M, Christian H. Fungal phytotoxins as mediators of virulence [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(4): 390-398.
- [16] Jones M J, Dunkle L D. Factors regulating the synthesis of a cyclic peptide pathotoxin produced by *Cochliobolus carbonum* [J]. Mycological Research, 1998, 102(11): 1381-1386.