

陈凯丽, 孙延鸣, 沈文, 等. 湖羊 *SPLUNC1* 基因序列的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(2): 48–51.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.012

湖羊 *SPLUNC1* 基因序列的生物信息学分析

陈凯丽¹, 孙延鸣², 沈文², 陈冬梅², 郭海英²

(1. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832003; 2. 石河子大学动物科技学院, 新疆石河子 832003)

摘要:以湖羊 *SPLUNC1* 基因为研究对象, 利用生物信息学方法对其编码的蛋白进行理化性质、信号肽、跨膜区域、亚细胞定位、二级结构、三级结构、保守区域分析, 并构建系统发育树。结果表明, 湖羊 *SPLUNC1* 蛋白的分子量为 26.53 ku, 理论等电点为 5.07。SPLUNC1 蛋白 N 端存在信号肽, 亚细胞定位在细胞外。SPLUNC1 蛋白质的二级结构主要为 α 螺旋和无规则卷曲。该蛋白由 4 股反平行的肽段形成的 β 折叠片和 2 个 α 螺旋组成的桶形结构域组成。系统发育树分析表明, 湖羊的 *SPLUNC1* 蛋白在山羊、牛、猪、人、小鼠中, 与山羊首先聚为一类, 后与牛聚为一类, 这与动物学分类结果一致。

关键词:湖羊; 短的上腭、肺及鼻咽上皮克隆 1 (*SPLUNC1*); 生物信息学分析

中图分类号: Q781 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0048-03

短的上腭、肺及鼻咽上皮克隆 1 (short palate, lung and nasal epithelium clone 1, *SPLUNC1*) 因其特异表达于上腭、肺及鼻咽上皮而被命名。Weston 等首次克隆了小鼠的 *SPLUNC1* 基因^[1]。*SPLUNC1* 具有分泌物的生化特性^[2], 分布于细胞胞浆中^[3]。人、小鼠、牛、猪 *SPLUNC1* 分别定位于 20 号染色体、2 号染色体、13 号染色体、17 号染色体。研究表明哺乳类动物物种拥有共同的 *SPLUNC1* 表达模式, 即在口咽部、上呼吸道、唾液腺和气管表达, 且在革兰阴性细菌引起的呼吸道感染中能起到抗菌及抗炎双重作用^[4]。Liu 等证明了 *SPLUNC1* 是吸道病原菌感染肺部黏膜固有免疫防御相关决定性成分^[5]。Chu 等证实 *SPLUNC1* 是一种新的宿主防御肺炎支原体蛋白, 体内过表达的 *SPLUNC1* 能显著地抑制肺部肺炎支原体的载荷量^[6]。此外, *SPLUNC1* 在维持上呼吸道稳态方面也起了重要的作用^[7]。目前, 有关人和小鼠的 *SPLUNC1* 基因功能已有相关报道, 但未见有关羊的 *SPLUNC1* 相关功能及其生物信息学分析的报道。在此前的研究中, 笔者采用 RACE 技术, 从湖羊的肺组织中克隆得到 *SPLUNC1* cDNA 序列, 并在 GenBank 上登录 (登录号: KJ749828.1)。本研究利用生物信息学方法对湖羊 *SPLUNC1* 基因序列进行分析, 为进一步研究湖羊 *SPLUNC1* 蛋白的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 生物信息学数据库和软件

NCBI (美国生物技术研究中心): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/EXPASY>; <http://www.us.expasy.ch> (蛋白质数据库); MEGA 5.05 软件; RasMol 软件。

收稿日期: 2015-01-27

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31460686)

作者简介: 陈凯丽 (1988—), 女, 河南南阳人, 硕士, 主要从事动物学研究。E-mail: kellyhenan@163.com。

通信作者: 孙延鸣, 博士, 教授, 主要从事临床兽医学研究。E-mail: sym@shzu.edu.cn。

1.2 湖羊 *SPLUNC1* 基因 cDNA 全长的获得

从湖羊肺组织中提取 RNA, 利用 RACE 技术分别扩增出 *SPLUNC1* 的 3' 末端和 5' 末端序列并送基因公司测序, 用 DNAMAN 软件将测序结果进行拼接, 获得湖羊 *SPLUNC1* cDNA 的全长序列。湖羊 *SPLUNC1* cDNA 的全长序列的具体克隆步骤参照文献 [8]。

1.3 生物信息分析方法

利用在线分析工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对湖羊 *SPLUNC1* 基因编码的蛋白质进行氨基酸理化分析。利用在线分析工具 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 对湖羊 *SPLUNC1* 基因编码的蛋白质进行糖基化位点分析。利用在线分析工具 WoLF PSORT (<http://wolfsort.org>)、TargetP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 SignalP-3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>) 对湖羊 *SPLUNC1* 蛋白在真核细胞的亚细胞位置和信号肽进行分析。利用在线分析工具 TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 对湖羊 *SPLUNC1* 蛋白进行跨膜区分分析。利用在线分析工具 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测湖羊 *SPLUNC1* 蛋白二级结构进行分析。利用 NCBI 的在线分析工具 Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) 对湖羊 *SPLUNC1* 蛋白的保守结构域进行预测。利用在线分析工具 3D-PSM (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 和 RasMol 软件对湖羊 *SPLUNC1* 蛋白的三级结构进行分析。利用 NCBI 的在线分析工具 Blast 对湖羊的 *SPLUNC1* 进行氨基酸序列比对。利用 MEGA 5.05 构建湖羊 *SPLUNC1* 蛋白的分子进化树。

2 结果与分析

2.1 湖羊 *SPLUNC1* 基因基本信息与理化性质分析

研究利用 ExPaSy 蛋白数据库中的 ProtParam 在线工具对

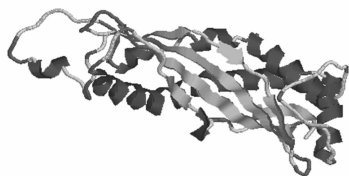


图5 SPLUNC1 蛋白序列三级结构预测

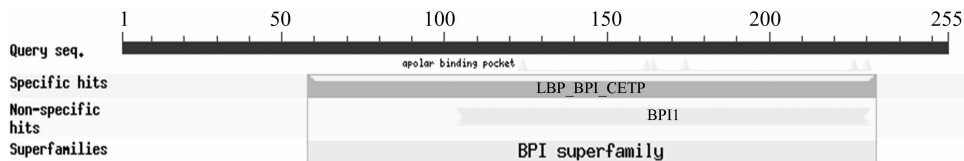


图6 湖羊 SPLUNC1 蛋白保守区域预测

用 MEGA 5.05 的邻近法 (Neighbor - Joining, NJ) 基于该基因氨基酸序列的比对结果构建 6 个物种的系统发育树,进而反映不同物种的系统进化及亲缘关系(由图 7 可见,分支节点处数字为 1 000 次 Bootstrap 检验的支持百分比)。结果表明,湖羊和山羊的 *SPLUNC1* 基因同属一个分支,亲缘关系比较密切,聚为一类,随后这 2 者与牛聚为一类,而后与猪聚为一类,而人和小鼠的 *SPLUNC1* 基因单独为 1 支。

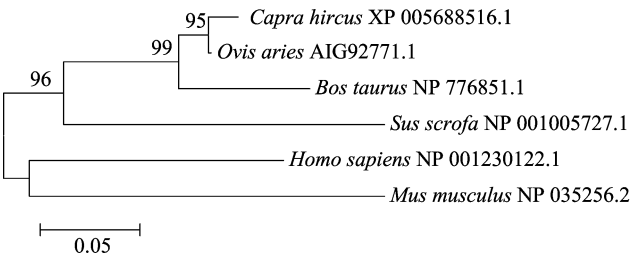


图7 湖羊 SPLUNC1 蛋白的系统发育树

3 结论与讨论

本研究通过 DNAMAN、NCBI 等在线工具和软件,对湖羊 *SPLUNC1* 基因的蛋白结构和功能进行了分析。由分析结果可知,克隆的湖羊 *SPLUNC1* 基因 cDNA 全长 (GenBank 登录号: KJ749828.1) 为 1 091 bp, 含 1 个完整的开放阅读框 (ORF) 768 bp, 共编码 255 个氨基酸。将湖羊 *SPLUNC1* 基因翻译的氨基酸序列与已发表文章小鼠和猪^[1,11] *SPLUNC1* 的信息进行比较,发现湖羊的 *SPLUNC1* 与小鼠在 N 端都有亮氨酸拉链,且排列的位置相同。小鼠的为 MFLVGSILVLCGLLAHSTAQLAGLPLPL, 湖羊的为 MFQIGSLIVLCGLLAQT-TALLEALPVPL, 猪的 N 端未发现,表明亮氨酸拉链在物种进化上存在差异。另外小鼠的糖基化序列是 NPTD、NITA 和 NLTG, 湖羊是 NITA 和 NLTG, 猪只有 1 个糖基化序列 NITV。同时,在小鼠的 *SPLUNC1* 序列上发现的 PLPL 结构域以及保守结构域蛋白激酶 C (SLK) 和酪蛋白激酶 II (SFVD 和 SGLD) 在湖羊 *SPLUNC1* 上没有被发现,而猪的 *SPLUNC1* 序列上却发现蛋白激酶 C (SLK) 序列。

最早先采用的是信号肽预测软件 SignalP 4.0 分析湖羊 *SPLUNC1* 蛋白,发现信号肽切割位点在 23 ~ 24, 而报道的小鼠和猪的信号肽切割位点在 19 ~ 20 之间,人的 *SPLUNC1* 蛋白的 N 端的信号肽长度为 19 个氨基酸^[12], 但是结合了亚细胞定位后,支持了信号肽切割位点为 19 ~ 20。在亚细胞定位

结构域与 BPII 结构域相似。

2.6 湖羊 SPLUNC1 蛋白的系统发育树分析

使用 NCBI 的 Blast 在线工具对湖羊 *SPLUNC1* 的氨基酸进行序列比对,结果表明,湖羊与山羊、家牛、猪、人、小鼠物种相似性为 98%、92%、78%、79%、67%。利用 Clustal X 1.81 软件对 6 个物种 *SPLUNC1* 基因氨基酸序列进行比对,然后使

时参考了孙伟等和杜慕云等的亚细胞定位方法^[13-14], 对序列进行分析发现,用 Signal 3.0 分析有 2 个结果,neural networks (NN) 的分析结果为信号肽切割位点为 19 ~ 20, hidden Markov models (HMM) 的分析结果为信号肽切割位点为 23 ~ 24。综合比较后,判断湖羊 *SPLUNC1* 的信号肽切割位点应为 19 ~ 20 之间,但是仍需试验数据支持。

从近些年的研究报道中,可以看出大部分的 *SPLUNC1* 生物学研究功能主要在人和鼠上,鲜见羊 *SPLUNC1* 生物学功能的相关报道。此次研究运用生物信息学的方法对湖羊 *SPLUNC1* 蛋白的基本理化性质、信号肽、跨膜区域、二级结构等进行分析,初步预测了湖羊 *SPLUNC1* 蛋白所拥有的部分特性,以期为进一步探讨其生物学功能提供理论依据。

参考文献:

- [1] Weston W M, Leclair E E, Trzyna W, et al. Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274 (19): 13698 - 13703.
- [2] Campos M A, Abreu A R, Nlend M C, et al. Purification and characterization of PLUNC from human tracheobronchial secretions [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2004, 30 (2): 184 - 192.
- [3] 肖丁良, 钟礼立, 梁沫, 等. 肺炎支原体脂质膜蛋白诱导人支气管上皮细胞 *SPLUNC1* 的表达 [J]. 医学临床研究, 2013, 30 (6): 1041 - 1045.
- [4] Di Y P, Harper R, Zhao Y, et al. Molecular cloning and characterization of spurt, a human novel gene that is retinoic acid - inducible and encodes a secretory protein specific in upper respiratory tracts [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (2): 1165 - 1173.
- [5] Liu Y, Bartlett J A, Di M E, et al. SPLUNC1/BPIFA1 contributes to pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* respiratory infection [J]. The American Journal of Pathology, 2013, 182 (5): 1519 - 1531.
- [6] Chu H W, Thaikootathil J, Rino J G, et al. Function and regulation of SPLUNC1 protein in *Mycoplasma* infection and allergic inflammation [J]. Journal of Immunology, 2007, 179 (6): 3995 - 4002.
- [7] McGillivray G, Bakaletz L O. The multifunctional host defense peptide SPLUNC1 is critical for homeostasis of the mammalian upper airway [J]. PLoS One, 2010, 5 (10): e13224.
- [8] 陈凯丽, 孙延鸣, 沈文, 等. RACE 法克隆湖羊 *SPLUNC1* 基因及序列分析 [J]. 西北农业学报, 2015, 24 (3): 8 - 13.

陈晓洁,郑伶俐,李方方,等. 抗轮纹病苹果砧木 1-1-10-8 茎尖培养快繁体系建立[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):51-53.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.013

抗轮纹病苹果砧木 1-1-10-8 茎尖培养快繁体系建立

陈晓洁,郑伶俐,李方方,李忠勇,张学英,徐继忠

(河北农业大学园艺学院,河北保定 071001)

摘要:以抗轮纹病苹果砧木 1-1-10-8 的茎尖为外植体,通过研究培养基中不同植物生长调节剂配比对芽苗诱导、增殖和生根的影响,筛选出适合苹果砧木 1-1-10-8 茎尖组培快繁的培养基配方。结果表明:1-1-10-8 砧木外植体材料经 0.1% HgCl_2 浸泡处理 10 min 的消毒效果最好,外植体成活率较高,为 65%;以 MS 为基本培养基,添加蔗糖 35 g/L、琼脂 6.2 g/L,适宜启动培养的植物生长调节剂配比为 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.05 mg/L;适宜增殖培养的植物生长调节剂配比为 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.075 mg/L,增殖系数可达到每 4 周 12.71 倍;以 1/2MS 为基本培养基,附加蔗糖 15 g/L、琼脂 6 g/L,适宜组培苗生根的植物生长调节剂配比为 IAA 1.0 mg/L + IBA 0.6 mg/L,生根率达 98.06%,每株苗平均生根 7.89 条,移栽成活率达 92.38%。

关键词:苹果砧木;茎尖培养;组培快繁;植物生长调节剂

中图分类号: S436.611.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0051-03

苹果轮纹病,是由轮纹病病原菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 引起的真菌性病害,已成为威胁苹果产业的重大病害之一^[1-2]。苹果轮纹病不仅危害苹果果实,造成烂果,降低果实品质,而且危害枝干,削弱树势,影响结果年限,严重时造成枝干枯死^[3]。近年来,果实套袋技术的推广使苹果果实轮纹病的发生受到抑制,但枝干轮纹病却日趋严重,成为苹果生产中的瓶颈问题。苹果枝干轮纹病在高温多雨地区发病严重,杨军玉等统计分析发现全国除了甘肃和黑龙江较轻外,苹果枝干轮纹病在各地均发生严重^[4]。目前,生产上对苹果枝干轮纹病的防治主要是采取重刮皮结合施用化学农药的措施^[5],但是这些措施很难根除苹果枝干轮纹病的发生,且刮树皮、施药等需要耗费较多的人力、物力^[6],长期大量使用化学农药不仅会增加果实的农药残留,严重影响着苹果果实的质量与安全,而且容易使轮纹病菌对化学药剂产生抗性^[7-9]。所以寻求一条能够安全有效解决苹果枝干轮纹病的正确途径成为苹果产业亟待解决的关键问题。

选用轮纹病抗性砧木是防治苹果枝干轮纹病安全有效的方法之一。研究表明,采用抗轮纹病的砧木能够增强树体对苹果轮纹病的抗性,有效降低苹果轮纹病的发病率^[6,10-12]。姜忠武等从鸡冠自然杂交实生苗中选育出的“烟砧 1 号”砧木对苹果轮纹病菌具有抗性,以其作中间砧的富士枝干轮纹病的发病率比未嫁接中间砧的富士降低 59.3%^[10]。因此,选育优良抗轮纹病苹果砧木成为果树育种工作人员的迫切任务之一。

应用抗轮纹病砧木防治苹果枝干轮纹病的首要任务是生产培育健壮的抗轮纹病自根砧苗木。自根砧的繁殖方式主要有种子繁殖、扦插、压条与组织培养等^[13],其中组织培养技术是快速稳定高效繁殖苗木的最佳方式^[14]。1-1-10-8 砧木是由河北农业大学园艺学院苹果课题组经田间自然发病调查和接菌试验鉴定的抗轮纹病苹果砧木,对防治苹果枝干轮纹病具有重要利用价值,迄今对 1-1-10-8 砧木组培快繁的研究尚未见报道。本试验以抗轮纹病苹果砧木 1-1-10-8 为试材,采用茎尖培养的方法,通过调节培养基的激素配比,筛选出适宜于苹果砧木 1-1-10-8 诱导成活、增殖与生根的最佳培养基配方,建立其快速繁殖体系,为进一步研究轮纹病的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2014 年 3 月下旬,自河北省保定顺平县滕家庄村苹果试验园 Biophysica Acta,2005,1727(3):220-226。

[12] 郭小芳,陈攀,李夏雨,等. 新的天然免疫保护分子 SPLUNC1 的结构与功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2012,39(10):945-951。

[13] 孙伟,李达,苏锐,等. 绵羊 YAP1 基因全长 cDNA 克隆及生物信息学分析[J]. 中国农业科学,2013,46(8):1725-1735。

[14] 杜慕云,杨仁德,李剑,等. 草菇 α -淀粉酶基因的生物信息学分析[J]. 食用菌学报,2014,21(3):6-12。

收稿日期:2015-01-26

基金项目:河北省科技项目(编号:14226307D-5);公益性行业(农业)科研专项(编号:201203075-05)。

作者简介:陈晓洁(1989—),女,河北张家口,硕士研究生,主要从事果树栽培生理研究。E-mail:15933593516@163.com。

通信作者:徐继忠,博士,教授,博士生导师,主要从事果树生物技术、果树栽培生理与生态研究。E-mail:xjzhxw@126.com。

[9] Emanuelsson O, Brunak S, Von Heijne G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 953-971。

[10] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35 (Web Server issue): W585-W587。

[11] Larsen K, Madsen L B, Bendixen C. Porcine SPLUNC1: molecular cloning, characterization and expression analysis [J]. Biochimica et