

付强,邹颖,余婧,等.烟草蛋白酶体 $\alpha 2$ 型亚单位的克隆和序列分析[J].江苏农业科学,2016,44(9):39-41.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.011

# 烟草蛋白酶体 $\alpha 2$ 型亚单位的克隆和序列分析

付强,邹颖,余婧,赵杰宏,任学良

(贵州省烟草科学研究院/烟草行业烟草分子遗传重点实验室,贵州贵阳 550081)

**摘要:**为研究烟草识别病毒并将其降解为蛋白酶体基因,以拟南芥的蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号:AF043520.1) 为信息探针,用电子克隆的方法从烟草栽培品种中克隆到 1 个蛋白酶体基因 *NtPAB1*, 并对其序列分析。结果表明,*NtPAB1* 包含完整的开放读码框,编码 219 个氨基酸,含有 1 个保守域 proteasome\_alpha\_type\_2;通过同源比对和进化分析发现,*NtPAB1* 氨基酸序列与葡萄 PAB1 的序列一致性达到 98%。以上结果表明,*NtPAB1* 是栽培烟草中未报道的编码蛋白酶体基因。

**关键词:**栽培烟草;蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位;蛋白降解;克隆;序列分析

**中图分类号:** S188;S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0039-03

马铃薯 Y 病毒属的蚜传辅助因子 (HC-Pro) 是释放感染所需病毒蛋白的三大蛋白酶之一<sup>[1]</sup>,HC-Pro 抑制植物体内起抗病毒作用的 RNA 干涉,但其具体分子机制尚无报道<sup>[2-3]</sup>。近期研究发现,莠苣花叶病毒的 HC-Pro 能干涉泛素/26S 蛋白酶体系统中核心元件 20S 蛋白酶体的活性,而泛素/26S 蛋白酶体系统参与抗病毒反应<sup>[4]</sup>。Ballut 等研究发现,烟草花叶病毒、莠苣花叶病毒的 RNA 能够被蛋白酶体识别水解,这暗示 20S 蛋白酶体的核酸内切酶活性可能参与植物体内的抗病毒过程<sup>[5]</sup>。

泛素/26S 蛋白酶体在植物发育的方方面面起着重要作用,影响着一系列生理过程,包括胚胎发育和衰老<sup>[6]</sup>。泛素/26S 蛋白酶体的核心元件是受到紧密调控并高度特异的 26S 蛋白酶体,由二级结构为圆柱形的 20S 核心蛋白酶结合 1 个 19S 调控因子构成<sup>[7]</sup>。筒形的 20S 蛋白酶体由 4 个环形结构构成,包括在 2 个外侧的环形结构中的 7 个  $\alpha$  亚基,而内侧的 2 个环形结构上具有 7 个  $\beta$  亚基,其大体的构型为  $\alpha 1-\alpha 7/\beta 1-\beta 7//\beta 1-\beta 7/\alpha 1-\alpha 7/\alpha 1-\alpha 7$ <sup>[7]</sup>。尽管已经从烟草、土豆、绿豆、豌豆等植物中纯化得到 20S 蛋白酶体<sup>[8-10]</sup>,但是目

前尚无关于栽培烟草中蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位基因序列的报道。

随着近年来多个物种全基因组测序的完成和表达序列标签 (expressed sequence tags, ESTs) 计划的发展,电子克隆技术应运而生,其技术核心是利用生物信息学技术组装延伸 ESTs 序列,获得基因的部分乃至全长 cDNA 序列。本研究采用电子克隆的方法获得 1 个蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位基因 *NtPAB1*, 并对其生物信息学分析,为进一步研究烟草中外源蛋白、异常蛋白的降解奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 烟草 *PAB1* 基因的电子克隆

以拟南芥的蛋白酶体  $\alpha 2$  型亚单位基因全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号:AF043520.1) 为信息探针<sup>[11]</sup>,对 GenBank 中 EST\_others 数据库指定物种烟草 (*Nicotiana tabacum*) 进行 Blast 比对,并利用菲莫公司林烟草和绒毛状烟草的全基因组测序数据<sup>[12]</sup>,将比对到的烟草栽培品种美国普通烟草的全部 EST 序列使用 Codon Code Aligner 软件进行拼接,形成重叠群 (contig)。利用拼接获得的重叠群作为探针,再次进行同源检索、拼接,重复以上过程直至没有更多 EST 被检出,获得普通烟草的 *PAB1* cDNA 序列。最后,再以此片段在 NCBI 数据中进行 BLAST 比对,对比其他物种同源基因的相似性和一致性,判断拼接所得 cDNA 片段的正确性以及读码框 (open reading frame, ORF) 序列的完整性。

### 1.2 烟草 *PAB1* 基因的生物信息学分析

序列比对、ORF 查找和翻译在“http://www.ebi.ac.uk/”提供的相应模块上完成。采用 ExPASy 网站上 Prot-Param、

收稿日期:2015-07-30

基金项目:贵州省科技厅科学技术基金(编号:黔科合 J 字[2014]2118 号)。

作者简介:付强(1984—),男,贵州赤水人,博士,副研究员,主要从事烟草遗传育种与蛋白质组学研究。E-mail: nestal1984fu@sina.com。

通信作者:任学良,博士,研究员,主要从事烟草基因组学研究。E-mail: renxuel@126.com。

[13]何重. *Pi-ta* 和 *Pi-b* 基因在水稻穗颈瘟抗性育种中的利用[D].南京:南京农业大学,2013.

[14]Zhuang J Y, Ma W B, Wu J L, et al. Mapping of leaf and neck blast resistance genes with resistance gene analog, RAPD and RFLP in rice[J]. Euphytica, 2002, 128(3): 363-370.

[15]董巍,李信,晏斌.利用分子标记辅助选择改良矮培 64S 的稻瘟病抗性[J].分子植物育种,2010,8(5):853-860.

[16]徐未末,王兴,黄永相.水稻抗稻瘟病基因的分子标记与标记辅助育种研究进展[J].江苏农业学报,2013,29(4):898-906.

[17]Qu S H, Liu G F, Zhou B, et al. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice[J]. Genetics, 2006, 172(3): 1901-1914.

基因。另外 *NtPAB1* 与杨树、百脉根、可可的相关基因的相似性达到 85% 以上。从 GenBank 上获得的多个植物 *PAB* 同源基因编码蛋白的氨基酸序列, 经过 ClustalX 2.0 比对后生成 aln 比对文件, 然后利用进化分析软件 MEGA4.0 打开比对文件, 采用邻接 (Neighbor - Joint, N - J) 算法构建系统进化

树<sup>[15-16]</sup>。分析结果表明,*NtPAB1* 与葡萄 *PAB* 基因编码蛋白 进化关系更近(图 4)。

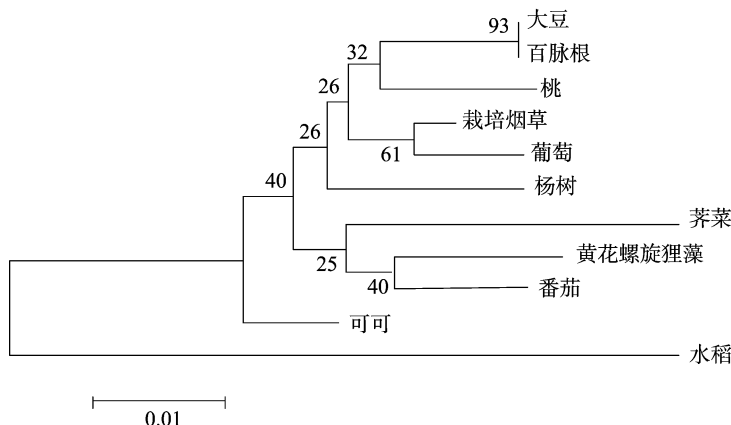


图4 烟草与其他物种蛋白酶体蛋白序列的系统进化分析结果

### 3 结论与讨论

马铃薯 Y 病毒属 (potato virus Y, PVY) 是包含范围广、增殖过程复杂但基因组简单的一类重要病毒,对农业生产造成重大的经济损失<sup>[17]</sup>。特别是在烟草行业,烟草马铃薯 Y 病毒分布于世界各烟区。在中国,近年来马铃薯 Y 病毒也有逐年加重的趋势,在马铃薯、烟草及蔬菜混种或间种的地区发病尤为严重,已经成为导致烟草减产和品质下降的主要病毒之一。国外研究调查显示,烟草感染 PVY 后,其单位面积产值减少 11% ~ 18%,烟叶等级指数也降低 36% ~ 62%。

近年来,随着生物技术的发展,发现了许多 PVY 侵染循环中的作用因子,加深了对 PVY 侵染过程中各项机制的研究。HC-Pro 对于 PVY 的传播至关重要,但是其具体分子机制尚未研究清楚。Ballut 等研究表明,莴苣花叶病毒的 HC-Pro 能够结合 20S 蛋白酶体<sup>[4]</sup>。因此可知,20S 蛋白酶体对于植物抵御病毒的危害具有重要作用。

本研究通过电子克隆方法从烟草栽培品种中克隆到 1 个 20S 蛋白酶体基因 *NtPAB1*,为利用该基因培育抗 PVY 病毒栽培烟草品系奠定了理论基础。下一步工作是通过改变烟草 20S 蛋白酶体的序列,使得 PVY 病毒的 HC-Pro 无法识别靶标序列,从而达到抗 PVY 的目的。

#### 参考文献:

- [1] Plisson C, Drucker M, Blanc S, et al. Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(26): 23753-23761.
- [2] Anandalakshmi R, Pruss G J, Ge X, et al. A viral suppressor of gene silencing in plants [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(22): 13079-13084.
- [3] Brigneti G, Voinnet O, Li W X, et al. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana* [J]. The EMBO Journal, 1998, 17(22): 6739-6746.
- [4] Ballut L, Drucker M, Pugnère M, et al. HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and af-

- fects its enzymic activities [J]. The Journal of General Virology, 2005, 86(9): 2595-2603.
- [5] Ballut L, Petit F, Mouzeyar S, et al. Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower [J]. Biochimica et Biophysica acta, 2003, 1645(1): 30-39.
- [6] Hellmann H, Estelle M. Plant development: Regulation by protein degradation [J]. Science, 2002, 297(5582): 793-797.
- [7] Vierstra R D. Proteolysis in plants: mechanisms and functions [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 32(1/2): 275-302.
- [8] Schliephacke M, Kremp A, Schmid H P, et al. Prosomes (proteasomes) of higher plants [J]. European Journal of Cell Biology, 1991, 55(1): 114-121.
- [9] Kremp A, Schliephacke M, Kull U, et al. Prosomes exist in plant cells too [J]. Experimental Cell Research, 1986, 166(2): 553-557.
- [10] Skoda B, Malek L. Dry pea seed proteasome: purification and enzymic activities [J]. Plant Physiology, 1992, 99(4): 1515-1519.
- [11] Fu H, Doelling J H, Arendt C S, et al. Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. Genetics, 1998, 149(2): 677-692.
- [12] Sierro N, Battey J N, Ouali S, et al. Reference genomes and transcriptomes of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tomentosiformis* [J]. Genome Biology, 2013, 14(6): R60.
- [13] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786.
- [14] 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.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [17] 李萌萌, 陈士华, 吴兴泉. 马铃薯块茎坏死环斑病研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 143-146.