

# 黄瓜 NBS 类抗病基因类似物的生物信息学分析

王昶童, 曹刚强, 梁丛敏, 谢冰心, 闫飞翔

(郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

**摘要:**利用生物基因组学数据库,对黄瓜 NBS 类抗病基因类似物(RGA 基因)进行生物信息学分析,以预测 RGA 基因编码产物的理化性质、结构与功能,为进一步研究黄瓜抗病调控机制提供一定的理论依据。结果表明:RGA 基因编码产物为一个长度达 84 个氨基酸的蛋白,其理论分子量为 10 964.32 Da,理论等电点为 PI 9.36,不存在跨膜区域,主要定位在细胞质中;进化比对表明,黄瓜的 NBS 类抗病基因在亲缘关系上与西瓜最近,其次是丝瓜;二级结构为  $\alpha$ - $\beta$  型,具有较为明显的 3 个螺旋和 2 个折叠;具有酰化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和蛋白激酶 C 磷酸化位点 3 个功能位点;预测 RGA 基因编码产物主要充当辅酶角色参与生化反应的调控,介导基因表达调控,在抗逆相关的信号通路以及种子胚的发育等过程中发挥重要的生理功能。

**关键词:**黄瓜;NBS;RGA;生物信息学

**中图分类号:**S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0101-04

抗病基因的成功分离对作物抗病机制的研究及抗病育种具有非常重要的意义<sup>[1]</sup>。目前已有 50 多个抗病基因从不同的植物中克隆出来<sup>[2]</sup>。在克隆的抗病基因中,NBS 类(Nucleotide binding site)是已分离抗病基因中最大的一类。NBS 保守结构域含有许多保守的基序,其结构域能够结合 ATP 或 GTP 进而参与抗病信号的传递,在植物抗病过程中起重要作用<sup>[3]</sup>。抗病基因同源序列(resistance gene analog,RGA)是一种存在于植物基因组中与一些植物抗病基因的某些保守序列有较高同源性的 DNA 片段<sup>[4]</sup>。有许多研究证明,一些 RGA 与抗病基因密切连锁,甚至就是抗病基因其中的一部分<sup>[5-7]</sup>。开展对 RGAs 的研究不仅有助于对植物抗病机制的分析与认识,而且也能加速挖掘植物抗病基因的进程<sup>[2]</sup>。目前已从小麦、水稻、甜瓜、南瓜等植物材料中分离得到了大量的 NBS 类 RGAs,并进一步展开了分子标记、定位、功能分析等多方面的研究<sup>[8-10]</sup>。该研究利用生物信息学资源对黄瓜 NBS 类 RGA 基因编码产物的结构和功能进行预测,以期为进一步阐释黄瓜的抗病机制提供理论参考依据,同时也为黄瓜各种抗病基因分子标记的筛选提供一定的线索。

**第一作者简介:**王昶童(1988-),男,硕士研究生,研究方向为抗冷黄瓜选育。E-mail:king\_pose@126.com.

**责任作者:**曹刚强(1972-),男,博士,副教授,硕士生导师,现主要从事作物遗传改良等研究工作。E-mail:caogangqiang126@126.com.

**基金项目:**河南省重大科技攻关资助项目(112102110066)。

**收稿日期:**2014-04-08

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

黄瓜 NBS 类抗病基因同源序列(登录号:AY555482)的数据资料通过 Gen Bank 数据库获得。

### 1.2 试验方法

氨基酸序列比对采用 NCBI/blastp(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp>);多序列比对和进化树分析采用 DNAMAN 程序;蛋白质二级结构预测采用 nnPredict(<http://www.cmpchem.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>);蛋白质理化性质分析采用 Antheptot 分析软件进行预测;蛋白质跨膜结构预测采用 SOSUI(<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuisubmit.html>)基因保守序列分析采用 NCBI/CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp>);亚细胞定位采用 CBS(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>);蛋白质三级结构预测及功能分析采用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>),raswin 2.7.2.1 分析软件、Antheptot-3D-viewer 1.0.162 分析软件和 Swiss-PdbViewer 3.7 分析软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 同源性分析

经对 RGA 的多物种氨基酸序列比对,挑选出与 NBS 类抗病蛋白氨基酸序列同源性较高的 7 个序列,相似性分别为西瓜(*Citrullus lanatus*)80%、丝瓜(*Luffa aegyptiaca*)63%、大豆(*Glycine max*)61%、胡桃(*Juglans regia*)60%、茄子(*Solanum bulbocastanum*)61%、豇豆(*Vigna unguiculata*)60%、草莓(*Fragaria x ananassa*)

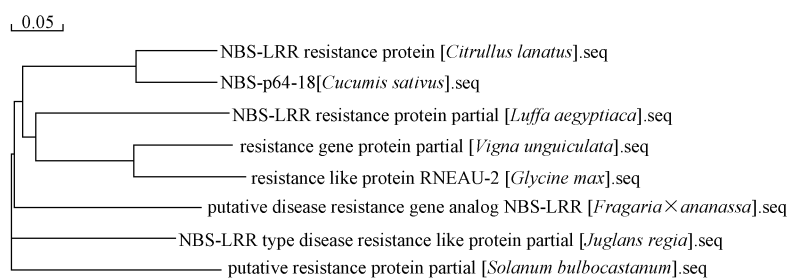


图1 黄瓜 RGA(NBS-p64-18)同源性分析进化树

Fig. 1 Homology analysis of the phylogenetic tree of RGA(NBS-p64-18)

60%。由图1 AY555482 多序列比对进化树结果可知, RGA 基因与西瓜的同源性最高,其次是丝瓜。

## 2.2 蛋白质理化性质分析

根据 Antheprot 软件预测, RGA 基因所编码蛋白由 84 个氨基酸残基组成, 其中酸性氨基酸 10 个, 碱性氨基酸 15 个, 组成中最多的 3 种氨基酸是 Leu(亮氨酸)、Lys(赖氨酸)和 Val(缬氨酸), 所占比例分别达到 14.3%、9.52% 和 9.52%。理论分子量为 10 964.32 Da; 理论等电点为 pI 9.36; 疏水性蛋白; 不存在跨膜区域。

## 2.3 二级结构预测

运用 nnPredict 和 Antheprot 软件分析 RGA 基因编码蛋白的二级结构, 结果显示, 此蛋白含 45% 的螺旋, 27% 的折叠, 21% 的无规则卷曲和 6% 的延伸主链。预测该氨基酸序列的二级结构呈现  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠交替的结构。Antheprot 软件程序包括 Garnier, Gibrat,

DMP, Levin, SOPMA, PHD 共 6 种算法, 这些算法预测的结果具有较明显的共性。运用 SOPMA 软件预测蛋白质的二级结构可分为 H、E、T 和 C 4 型, 分别代表螺旋、折叠、卷曲和线圈。当  $H > 45\%$ 、 $E < 5\%$  时为 all-alpha 型; 当  $H < 5\%$ 、 $E > 45\%$  时为 all-beta 型; 当  $H > 30\%$ 、 $E > 20\%$  时为 alpha-beta 型; 其它情况为 mixed 型。结果显示 RGA 蛋白  $H = 45\% > 30\%$ ,  $E = 27\% > 20\%$ , 说明该蛋白为 alpha-beta 型。

## 2.4 亚细胞定位

利用 expasytools 进行黄瓜 NBS 类抗病基因蛋白质的亚细胞定位预测。结果显示该基因产物可能在细胞中的各个部分中均有分布, 分布在细胞质可能性最大, 其次是细胞质膜, 再次是胞外周质。

## 2.5 蛋白质的三维结构及功能预测

### 2.5.1 蛋白质三维结构 蛋白质由氨基酸的线性序列

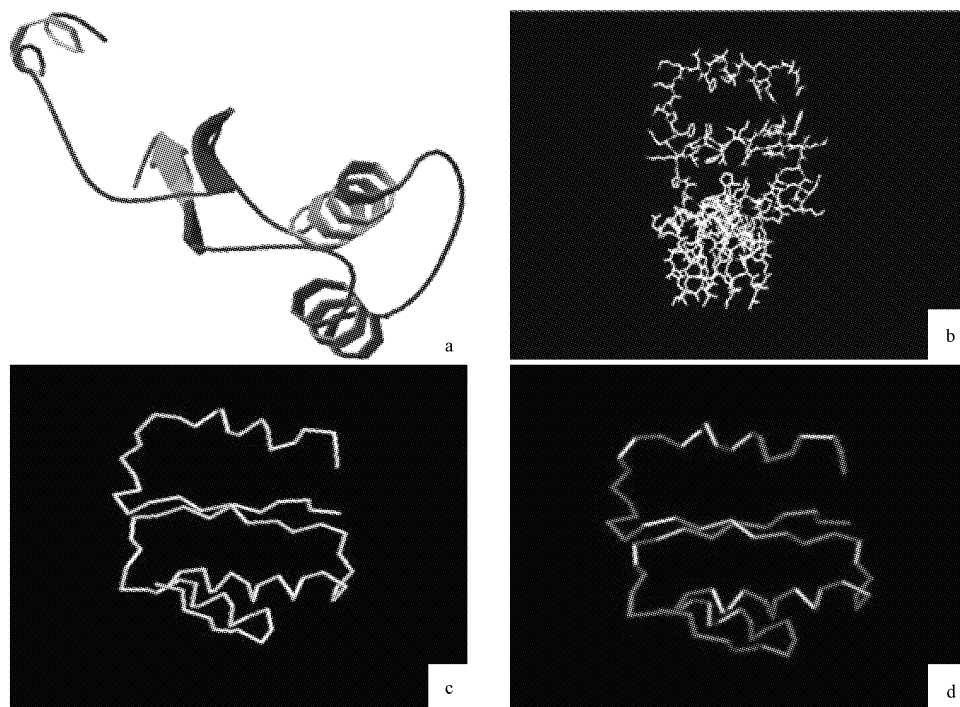


图2 RGA 蛋白质三维结构模式

Fig. 2 Three-dimensional protein structure of RGA gene

组成,但是它们只有折叠成特定的空间构象才能具有相应的活性和生物学功能。了解蛋白质的空间结构不仅有利于认识蛋白质的功能,也有利于认识蛋白质是如何执行其功能的。因此,预测蛋白质的空间结构对于生物学研究具有非常重要的意义。首先将黄瓜 NBS 类抗病基因 RGA 蛋白氨基酸序列提交到 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 得到一个蛋白质三维结构模式图,如图 2-a,同时采用 Swiss-PdbViewer 软件、Antheptrot-3D-viewer 软件和 Raswin 软件进行 RGA 蛋白三维成像预测,分别得到三维结构模式图 2-b、2-c 和 2-d。4 个软件预测的 RGA 蛋白三维结构模式图具有相似性和一致性,预测该蛋白具有 3 段较为明显的螺旋,2 个转角,2 个折叠,这与 2.3 中的 Garnier 算法得出的二级结构预测结果相吻合。

**2.5.2 功能预测** 将 RGA 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 网站上 blastp 后进入保守结构域网页,结果显示此氨基酸序列的保守结构域功能位点约位于第 2~42 氨基酸位点之间的 dNK [cd01673],属于核苷酸激酶超家族(NK superfamily)。采用 Antheptrot 软件对该蛋白质功能位点进行预测,共预测出了 3 个功能位点,分别是在氨基酸序列上位于 2~7 的酰化位点(N-myristoylation site),位于 18~21 的酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(Casein kinase II phosphorylation site),位于 73~75 的蛋白激酶 C 磷酸化位点(Protein kinase C phosphorylation site),其中酰化位点和酪蛋白激酶 II 磷酸化位点与 NCBI 得到的属于核苷酸激酶超家族 dNK [cd01673]具有一致性。预测 AY555482 编码产物主要充当辅酶角色参与生化反应的调控,介导基因表达调控,在抗逆相关的信号通路、以及种子胚的发育等过程中发挥重要的生理功能。

### 3 讨论

近年来已有许多与抗病有关的 RGA 被克隆出来<sup>[11-13]</sup>,这些 RGAs 序列同抗病基因均具有一定的同源性,说明用此方法进行抗病基因的克隆是可行的。但是对这些 RGAs 的利用还处于初级阶段,有关 RGA 基因表达调控和功能鉴定的报道还较少<sup>[14]</sup>。分离黄瓜的 RGA 不仅有助于筛选黄瓜各种抗病基因的分子标记,而且通过对黄瓜 RGA 的结构、表达和调控的研究,将有助于深入阐释黄瓜的抗病机制<sup>[13]</sup>。

该研究利用生物信息学数据库和软件工具,对黄瓜 NBS 类抗病基因-RGA 基因结构和蛋白质结构等进行了分析预测,从中得到该基因家族不同成员之间的相互关系和演化历程,理化性质与结构功能等。通过蛋白结构与功能位点预测,推测此蛋白属于植物蛋白激酶家族。蛋白激酶是一类磷酸转移酶,在细胞信号的转导过程中起到较重要作用,是自然界中生物普遍存在的一种调节

机制<sup>[15]</sup>。综合跨膜结构,亚细胞定位等信息可推测 RGA 基因编码产物可能是位于细胞质中的一种酪氨酸蛋白激酶,具有调控、受体、胁迫、应答、信号转导等功能,可能在免疫应答和胁迫应答过程中发挥重要作用,可能对黄瓜抗病性起关键作用。但是其生物学功能,还需要在黄瓜中进行克隆以及表达分析来进行验证。

为了提高预测的准确性,该研究对大多数类型的预测均采用多种不同软件。由于不同预测程序分析时所依据的原理和所运用的算法侧重点不同。它们预测的结果中一致性部分具有较高的可信度。

### 参考文献

- [1] Whitham S, Dinesh-Kumar S P, Choi D, et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N; Similarity to toll and the interleukin-1 receptor [J]. Cell, 1994, 78(6): 1101-1115.
- [2] 李峰, 张颖, 刘崇怀, 等. 植物 NBS-LRR 类抗病基因的研究进展[J]. 分子植物育种(网络版), 2011(9): 1784-1790.
- [3] 高丽华, 周以飞, 郑伟文, 等. 南瓜 NBS 类抗病基因同源序列的克隆与分析[J]. 长江蔬菜, 2007(8): 40-43.
- [4] Collins N C, Webb C A, Seah S. The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize[J]. Molecular Plant-microbe Interact, 1988 (11): 968-978.
- [5] 秦跟基, 李万隆, 陈佩度, 等. 植物抗病基因结构特征及其类似序列的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(3): 102-107.
- [6] Deng Z, Huang S, Ling P, et al. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101(5-6): 814-822.
- [7] Zhou T, Wang Y, Chen J Q, et al. Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes[J]. Mol Genet Genomics, 2004, 271: 402-415.
- [8] 薛勇彪, 唐定中, 张燕生, 等. 水稻基因组中 R 类抗病基因同源序列的分析[J]. 科学通报, 1998, 43(2): 277-281.
- [9] Meyers B C, Dickerman A W, Michelmore R W, et al. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily[J]. Plant, 1999, 20(3): 317-332.
- [10] Brotman Y, Silberstein L, Kovalski I, et al. Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(6-7): 1055-1063.
- [11] Gao Y, Guo W, Wang L, et al. Isolation and characterization of resistance and defense gene analogs in cotton (*Gossypium barbadense* L.) [J]. Science in China Series C, Life Sciences, 2006, 49(6): 530-542.
- [12] Huang X, Xu Z Q, Chen LY, et al. Cloning and identification of the Resistance gene analogs of wheat[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2006, 39(2): 91-96.
- [13] Sela H, Cheng J, Jun Y, et al. Divergent diversity patterns of NBS and LRR domains of resistance gene analogs in wild emmer wheat populations [J]. Genome, 2009, 52(6): 557-565.
- [14] Liu J J, Ekramoddoullah A K M. Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex. D. Don.) [J]. Mol Genet Genomics, 2003, 270 (5): 432-441.
- [15] 张春宝, 赵丽梅, 赵洪银, 等. 植物蛋白激酶研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(10): 17-23.

# 石斛种质资源遗传多样性的 PAGE 分析

张文龙<sup>1,2</sup>

(1. 贵阳中医学院 药学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省农业科学院 旱粮研究所, 贵州 贵阳 550006)

**摘要:**以 16 种石斛属植物为试材, 采用 PAGE 法, 利用筛选获得的 6 条理想 ISSR 多态性引物, 研究了小分子量片段的差异对石斛属植物分类的影响。结果表明: 试验结果与经典形态分类相似, 但也有一定差别; PAGE 法多态性比率高, 可进一步从分子水平揭示石斛属植物的遗传多样性与亲缘关系。

**关键词:**石斛; 遗传多样性; PAGE

**中图分类号:**R 931.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0104-03

石斛是我国久享盛誉的名贵常用中药, 以新鲜或干燥的茎入药。始载于《神农本草经》, 列为上品。因其益胃生津, 滋阴清热效果显著, 历版《中国药典》均予收载。我国药用石斛的原植物主要来源于兰科(Orchidaceae)石斛属(*Dendrobium*)植物, 主要分布于西南、华东及华南地区, 全国约有 76 种, 其中有近 40 种被作为药用<sup>[1]</sup>, 因

其基源复杂, 形态与化学成分相似, 利用常规的鉴定方法对其进行形态学特征比较、显微鉴定及理化鉴定等, 往往很难得出正确有效的结论, 石斛属植物目前已经成为业界公认的最难鉴定的品种之一。

ISSR 分子标记是目前使用最多、效果最好的分析基因遗传多样性的分子标记技术之一, 已广泛应用在生命科学的各个领域。它在引物设计上比 SSR 技术简单, 不需要知道基因组序列即可设计引物并进行扩增, 同时又可比 RFLP、RAPD、SSR 揭示更多的遗传多态性, 稳定性和重复性更好, 试验精度更高<sup>[2]</sup>。国内利用琼脂糖凝胶电泳检测石斛 ISSR 分子标记的研究已有诸多报

**作者简介:**张文龙(1976-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事药用植物栽培育种与分子生物学等研究工作。E-mail: wlzhsst@yeah.net.  
**基金项目:**贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 J 字[2013]2072 号); 贵阳中医学院博士资金资助项目[(2012)01 号]。  
**收稿日期:**2014-03-31

## Bioinformatics Analysis of the NBS Resistance Gene Analogs in Cucumber

WANG Chang-tong, CAO Gang-qiang, LIANG Cong-min, XIE Bing-xin, YAN Fei-xiang  
(Biological Engineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001)

**Abstract:** The bioinformatics of cucumber NBS resistance gene analogs (RGA gene) was analyzed using bioinformatics software (NCBI, DNAMAN, nnPredict, Antheprot, SOSUI, CBS, SWISS-MODEL). The physical and chemical properties, structure and function of the cucumber NBS resistance gene analogs (RGA gene) protein were predicted, in order to provide a theoretical basis for the further study on the regulation mechanism of disease resistance of cucumber. The results showed that the RGA gene encoded a length of 84 amino acid protein. Its molecular weight was 10 964. 32 Da. The theoretical isoelectric point was 9. 36. This gene had no transmembrane domain. It mainly was located in the cytoplasm. Evolutionary analysis indicated that the cucumber NBS resistance genes had the close genetic relationship with watermelon, also loofah. The secondary structure on this gene was  $\alpha$ - $\beta$  type, with the more obvious three helices and two fold. The protein had three functional sites: N-myristoylation site, Casein kinase II phosphorylation site and Protein kinase C phosphorylation site. And predicted that RGA protein could acts as a coenzyme role in the regulation of biochemical reactions, mediated regulation of gene expression in the stress resistant associated signaling pathways, as well as it could play an important physiological function during the development of seed embryos.

**Key words:** cucumber; NBS; RGA; bioinformatics