

西北旱区枣疯病植原体核糖体蛋白基因 的生物信息学分析

吴宽¹, 颜永杰², 王海妮³, 张珏³

(1. 西北大学信息科学与技术学院, 陕西 西安 710069; 2. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069;
3. 西北农林科技大学植物保护学院与陕西省农业分子生物重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 枣疯病是枣树上的一种具有毁灭性的植原体病害, 几乎分布于国内所有的枣树栽培区, 造成了巨大的经济损失。对我国陕西、宁夏、甘肃3省枣疯病样品植原体核糖体蛋白基因进行克隆和测序, 获得枣疯病植原体的核糖体基因片段为1196bp, 包含部分 *rps19*, *rpl22* 和 *rps3* 三个基因, 其中 *rpl22* 和 *rps3* 大小分别354bp和753bp, 分别编码118和251个氨基酸, 且这两个基因为非重叠基因。序列同源性比较结果表明: 我国陕西、宁夏、甘肃的枣疯病植原体的核糖体蛋白 *rp* 基因大小一致, 归属于植原体16S rV-B组; 该植原体核糖体蛋白基因特性与樱桃致死黄化(CLY5)和桃树黄化印度分离株系(PY-In)植原体相似。首次报道了我国枣疯病核糖体蛋白基因 *rp* 基因的序列, 把枣疯病植原体归到16S rV-B组, 为枣疯病植原体提供了新的分类依据。

关键词: 枣疯病, 植原体; 核糖体蛋白基因; 序列分析; 生物信息学

中图分类号: S665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2010)03-0265-04

枣树(*Ziziphus jujuba* Mill.)起源于我国, 是我国的特色和优势果树, 种植普遍, 已有7000余年的栽培历史, 目前世界上98%以上的枣树资源集中在我国。由于其适应性强, 抗旱, 耐盐碱, 耐瘠薄, 枣果营养丰富, 富含糖类、维生素C和铁等, 经济效益和生态效益显著等独特优势, 已经成为我国西北干旱地区果树发展中的热点之一^[1]。枣疯病(Jujube witches' broom, JWB)是由植原体(Phytoplasma)引起的一种毁灭性检疫病害, 现有枣主栽品种普遍对其敏感, 在中国和韩国均危害严重, 一旦发生产量将下降30%~80%, 给枣农带来严重的经济损失, 严重制约了枣树产业的可持续发展^[2]。

国内外从20世纪50年代就开始对枣疯病进行研究, 且在病原鉴定、田间传播、病害流行及病害防治等方面取得了很大进展^[3], 王海妮等^[4]已经用16SrDNA基因保守序列从组水平上确定了我国陕西武功、宁夏中宁、甘肃省临泽县的枣疯病植原体组的分类地位, 属于16SrV组, 但对亚组没有研究。Lee等人^[5]发现, 用16SrDNA基因片段、核糖体蛋白(ribosomal protein, *rp*)基因分析能够确定16Sr各组中亚组之间的系统发育关系^[6]。本研究首次对我国枣疯病病株进行植原体 *rp* 基因进行序列测定和分析, 取得了新的研究进展, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

枣疯病材料采自陕西武功、宁夏中宁、甘肃省临泽县, 每个地区10份样品。pMD18-T simple vector、HQ&Q凝胶回收试剂盒为优晶生物工程有限公司产品, E coli JM109菌株为本室保存。

1.2 植株总DNA提取与PCR扩增

总DNA提取方法参照Ahrens和Seemlluer^[7]的方法进行, 于-20℃冰箱中保存备用。参照榆树黄化组核糖体蛋白基因序列设计合成3条特异性引物。rpF1: 5' - TCGCGTCATGCAAAAGCGC - 3', rpF2: 5' - TTGCTCGTTTATTTCCGAGAG - 3', rpR1: 5' - ACGATATTTAGTCTTTTTGG - 3', 由上海基康公司合成。核糖体蛋白基因序列采用半巢式扩增, 第一次扩增以植物总DNA为模板, 以rpF1/rpR1为引物; 第二次扩增以第一次扩增产物为模板, 以rpF2/rpR1引物。PCR产物于1%琼脂糖凝胶中电泳观察。PCR反应以健康枣树样品为阴性对照, 以樱桃致死黄化病样品为阳性对照。Marker为DL-2000, Marker 3(大连TaKaRa公司)。

1.3 核苷酸序列测定及分析

PCR产物的纯化、连接、转化、筛选、酶切鉴定参

收稿日期: 2010-01-05

基金项目: 国家大学生创新性实验计划项目(091069702)

作者简介: 吴宽(1988—), 男, 陕西乾县人, 本科, 主要从事软件工程专业。E-mail: wukuan1988@163.com。

考岳红妮等人的方法^[8],把含有目标外源片段的重组克隆送上海捷瑞生物技术有限公司进行序列测定。用 BLAST 软件进行检索。

1.4 基因序列同源性分析和结构预测

通过 DNAMAN6.0.3 软件,将 *rp* 基因序列及其编码的氨基酸序列与已知的 16S r 各组代表植原体的 *rp* 基因序列及其相关氨基酸序列进行同源性比较,并得出同源进化树状图。利用瑞士生物信息学研究所 <http://au.expasy.org> 提供的 Prot - Scale 软件分别对 WBD 的 *rpl22* 和 *rps3* 基因进行蛋白质亲/疏水性的在线分析。利用分析软件 ANTHEPROTS.0 对蛋白进行理化特征及潜在信号肽切割位点进行分析,并预测二级结构。利用网站 <http://www.predict-protein.com> 对 WBD 核糖体蛋白 *rpl22* 和 *rps3* 基因跨膜区也进行了分析预测^[9]。

2 结果与分析

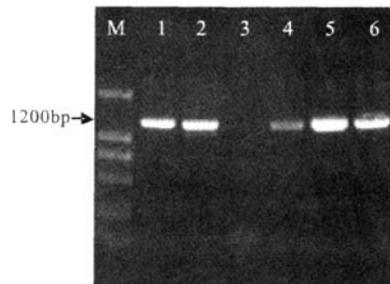
2.1 核糖体蛋白基因的序列分析

对陕西武功、宁夏中宁、甘肃省临泽县 3 个枣区的枣疯病样品总 DNA 进行了半巢式 PCR 扩增,结果表明来自 3 个枣区的枣疯样品的 PCR 产物均为 1.2 kb 左右,而健康植株未扩增出特异性条带(图 1)。序列测定结果表明枣疯病植原体核糖体蛋白基因片段长 1 196bp(EU651838),DNAMAN5.2.2 软件分析表明,该序列包括部分 *rps19* 基因片段和 *rpl22* 和 *rps3* 基因,其中 *rpl22* 和 *rps3* 基因均使用柔膜菌纲原核生物标准的 AUG 作为起始密码子,分别编码 129 和 252 个氨基酸。在所含的 3 个基因中均以 UAA 作为终止密码子,这些特性均与其它植原体核糖体蛋白基因序列相似。序列比较表明该核酸序列与 16Sr V 组中的植原体 *rp* 序列同源率均达到 96.0%以上,其中与 16Sr V - B 亚组的樱桃致死黄化(CLY5)和桃树黄化印度分离株系(PY - In)的亲缘关系最近,分别达到 99.2%和 99.4%,而与 16Sr 其它组的植原体同源率低于 86%。分别比较 *rpl22* 和 *rps3* 基因编码的氨基酸序列,JWB 株系与 CLY5 和 PY - In 的同源性分别达到 99.8%和 99.6%。枣疯病植原体最接近于 16Sr V - B 亚组植原体。

2.2 *rpl22* 基因编码蛋白的理化特性曲线

利用 ProtScale 软件的 Kyte and Doolittle 算法对各蛋白进行亲/疏性分析。该软件分析结果正值越大表示蛋白疏水性越强,负值越大表示蛋白亲水性越强,介于 +0.5 ~ -0.5 之间的主要为两性氨基酸。分析结果显示 *rpl22* 和 *rps3* 的大部分位于正值区域,为疏水性蛋白(图 3)。利用蛋白分析软件 AN-

THEPROTS.0 对 JWB 核糖体蛋白 *rpl22* 和 *rps3* 基因编码的氨基酸等电点进行分析。结果表明,其等电点分别为 11.135 和 10.505。理化特征曲线包括:抗原性曲线 - Antigenicity profile,亲水曲线 - Hydrophobicity profile,疏水曲线 - Hydrophilicity profile,跨膜区域曲线 - Transmembranous regions profile 和易溶性曲线 - Solvent accessibility profile 等。分析结果显示 *rpl22* 和 *rps3* 基因编码的蛋白疏水,易溶,具有良好的抗原性(图 4)。



M: DL-2000 DNA marker. 1: 樱桃致死黄化; 2: 含 *rp* 基因质粒; 3: 健康枣树; 4: 陕西 JWB; 5: 宁夏 JWB; 6: 甘肃 JWB
M: DL-2000 DNA marker. Lane 1: Cherry lethal yellows; Lane 2: Constructed plasmid of *rp* gene; Lane 3: Healthy jujube; Lane 4, Lane 5 and Lane 6: JWB *rp* gene of samples from Shaanxi, Ningxia, Gansu respectively.

图 1 枣疯病植原体 *rp* 基因的扩增
Fig.1 PCR amplification of JWB *rp* gene

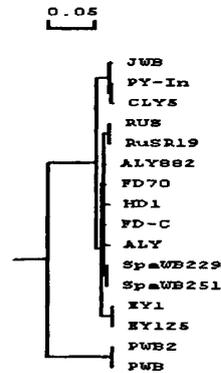


图 2 基于榆树黄化组(16SrV)植原体各株系的 *rp* 基因的同源进化树状图

Fig.2 Homology tree constructed by parsimony analysis of *rp* gene nucleotide sequence from every strain of Siberian elm yellows group(16SrV)

2.3 *rpl22* 蛋白的二级结构分析

通过软件 ANTHEPROTS.0(Gibrat 算法)对 *rpl22* 蛋白的二级结构进行了预测,获得蛋白质的二级结构。结果表明该蛋白的二级结构中主要是螺旋,其次为折叠和无规则卷曲,没有转角。*rpl22* 二级结构中

螺旋占 85%, 折叠和无规则卷曲分别为 2% 和 13% (图 5)。

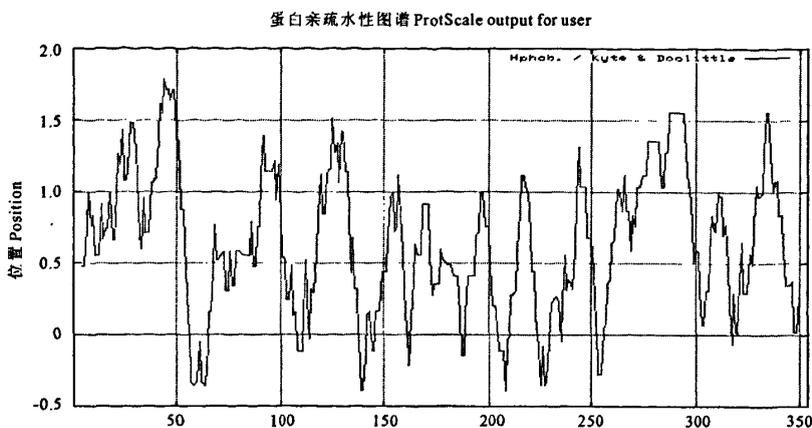


图 3 rpl22 蛋白的亲疏水性分析

Fig.3 Hydrophilic/Hydrophobic Profile of rpl22 protein

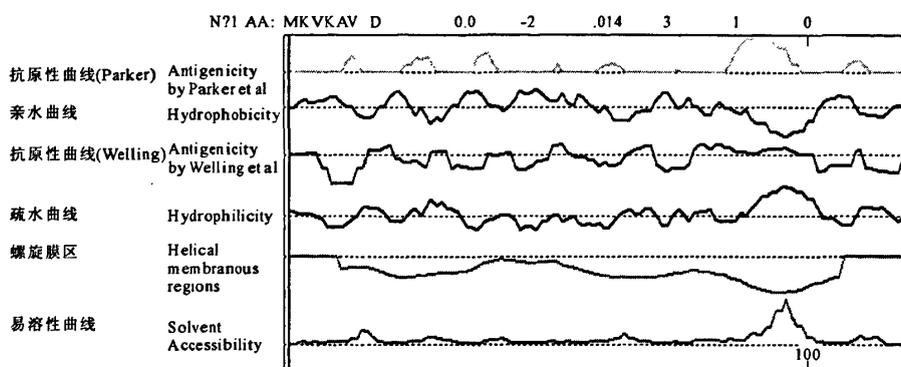


图 4 rpl22 蛋白物理化学特性分析

Fig.4 The physical and chemical properties analysis of rpl22 protein

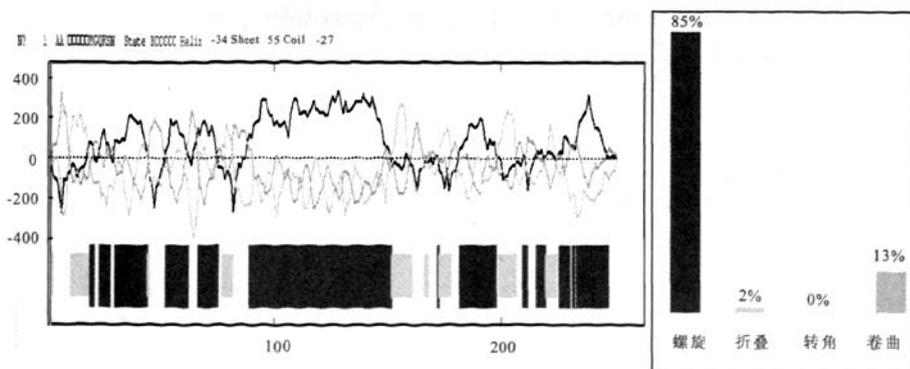


图 5 Antheprot 5.0 对 rpl22 蛋白二级结构预测

Fig.5 The secondary structure forecast analysis of rpl22 protein by Antheprot 5.0

2.4 rpl22 蛋白跨膜区和潜在信号肽切割位预测
用软件 ANTHEPROTS5.0 对潜在信号肽切割位

点计算表明, rpl22 在肽链中部有很强的切割位点 (图 6)。

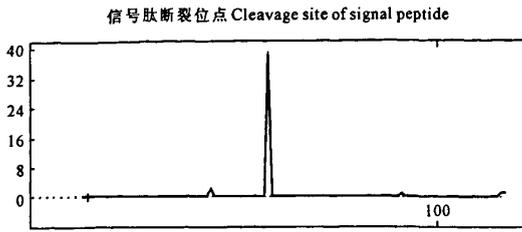


图 6 Anthrept 5.0 对 rpl22 蛋白潜在信号肽断裂位点预测
Fig. 6 The potential cleavage site of signal peptide
forecast of rpl22 protein by Anthrept 5.0

3 讨论

本研究通过对枣疯病植原体核糖体蛋白基因的序列测定及同源性比较,发现我国枣疯病植原体与榆树黄化组樱桃致死黄化(CLY5)和桃树黄化印度分离株系(PY-In)的亲缘关系最近,与 Jung H Y 等^[10]报道的日本、韩国的枣疯病植原体分离株系基本一致。这个结果进一步支持中国枣疯病植原体应属于 16SrV-B 组,这是首次从亚组的水平上确定了我国枣疯病植原体的分类地位。结果表明,枣疯病植原体 *rp* 基因也能作为对植原体分类系统中的辅助分析,是对国内外用 16S rDNA 基因和核糖体蛋白基因进行分类方法的一个补充,也是一种可靠而又简便的方法。

通过对枣疯病植原体核糖体蛋白基因所编码的蛋白理化性质分析,确定了枣疯病植原体核糖体蛋白的亲/疏性、等电点、易溶性和抗原性。结构分析表明了该蛋白的二级结构组成和潜在的切割位点。

这些结果为研究枣疯病植原体蛋白跨膜运输的分子机理提供了可靠数据,为进一步探索枣疯病的防治途径提供了一种新方法^[10]。

参考文献:

- [1] 温秀军,孙朝晖,田国忠,等.抗枣疯病枣树品系选育及抗病机理初探[J].林业科技开发,2006,20(5):12-18.
- [2] 赵锦,刘孟军,代丽,等.枣疯病病树中内源激素的变化研究[J].中国农业科学,2006,39(11):2255-2260.
- [3] Jae-Choon Yi, Tae Heon Lim, Byeongjin Cha. Change in phytoplasma densities in witches' broom-infected jujube trees over seasons[J]. The Plant Pathology Journal, 2001, 17: 295-299.
- [4] 王海妮,吴云锋,安凤秋,等.枣疯病和酸枣丛枝病植原体 16SrDNA 和 *tuf* 基因的序列同源性分析[J].中国农业科学,2007,40(10):2200-2205.
- [5] Lee I M, Gundersen D E, Davis R E, et al. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48: 1153-1169.
- [6] 蔡红,杨根华,孔宝华,等.应用分子生物学方法检测植原体研究进展[J].云南农业大学学报,2002,17(2):188-191.
- [7] Ahrens U, Seemuller E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16SrRNA gene[J]. Phytopathology, 1992, 82: 8281-8321.
- [8] 李水,田国忠,朴春根,等.我国几种植物植原体的快速分子鉴别与鉴定的研究[J].植物病理学报,2005,35(4):293-299.
- [9] 岳红妮,吴宽.泡桐丛枝植原体 Sec 分泌蛋白转运系统 3 个亚基基因的克隆及蛋白特性分析[J].植物保护,2009,35(2): 25-31.
- [10] Jung H Y, Sawayanagi T, Kakizawa S, et al. Candidatus phytoplasma ziziphi, a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches' broom disease[J]. Int J Syst Evol Micr, 2003, 53: 1037-1041.

Bioinformatics analysis of ribosomal protein gene of JWB phytoplasma in the northwestern arid regions

WU Kuan¹, YAN Yong-jie², WANG Hai-ni³, ZHANG Jue³

(1. College of Information Science and Technology, Xi'an, Shaanxi 710069, China;

2. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China; 3. College of Plant

Protection/ Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Jujube witches' broom (JWB) is a destructive disease caused by phytoplasma, that happened almost in every cultural regions at home and abroad, bringing large economic loss. The ribosomal protein (*rp*) gene is cloned by polymerase chain reaction from the samples of JWB which were collected from Shaanxi, Ningxia and Gansu. After sequenced, it is found that *rp* gene is 1199 bp, which included partial *rps19*, *rpl22* and *rps3*. *rpl22* and *rps3* coded 129 and 252 amino acids respectively, and these two genes are not overlapped. The homologic analysis shows that pathogens from Shaanxi, Ningxia and Gansu are same; and it is similar in character among JWB, cherry lethal yellows and peach yellows isolate PY-In phytoplasmas. This study reports *rp* sequences of JWB phytoplasmas for the first time and identifies that JWB phytoplasma belongs to 16S rV-B, which can provide theory basis for research of the functional sec system of JWB phytoplasma.

Keywords: jujube witches' broom; phytoplasma; ribosomal protein gene; sequence; bioinformatics