

灰葡萄孢菌 *Rac1* 基因的生物信息学分析

兰 俊¹, 董德成², 张 雷¹, 李安达¹, 张传博^{2*}

(1. 贵阳市白云区农业水利局, 贵州 贵阳 550014; 2. 贵州师范大学 生命科学院, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 利用多种不同序列分析软件, 基于生物基因组学数据库, 对灰葡萄孢菌 *Rac1* 基因进行生物信息学分析, 以预测 *BCRac1* 基因编码产物的理化性质、结构与功能, 同时构建 *Rac1* 基因同源系统进化树。结果表明: *BCRac1* 基因编码产物由 150 个氨基酸构成, 为亲水性蛋白, 没有信号肽, 二级结构以 α -螺旋与无规则卷曲为主, 推测其主要在细胞核中发挥生物学作用。结构功能域分析表明, *BCRac1* 基因编码产物可能主要具有生长因子的功能, 对灰葡萄孢菌的激素调节有影响。构建的 *Rac1* 基因编码产物系统进化树显示, *BCRac1* 基因与核盘菌、稻瘟病菌、炭疽菌等物种 *Rac1* 基因遗传距离较近, 具有高度同源性。

关键词: 灰葡萄孢菌; *Rac1* 基因; 生物信息学

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)06-0098-05

Bioinformatics Analysis of *Botrytis cinerea* *Rac1* Gene

LAN Jun¹, DONG De-cheng², ZHANG Lei¹, LI An-da¹, ZHANG Chuan-bo^{2*}

(1. Agriculture and Water Conservancy Bureau of Baiyun District, Guiyang City, Guiyang 550014, China;

2. College of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: This study aimed to analyze the bioinformatics of *BCRac1* gene in *Botrytis cinerea* with genomics database. The physicochemical characteristics, structures and functions of the coding product of *Botrytis cinerea* *BCRac1* gene were predicted and analyzed. Meanwhile, the phylogenetic tree of *Rac1* and related genes was constructed. The results showed that *BCRac1* gene encoded a hydrophilic protein of 150 aa, which had no signal peptide. The secondary structure was primarily composed of alpha helix and random coil, and the biological functions of *BCRac1* speculatively performed in the nucleus. Sequence analysis indicated that the coding product of *BCRac1* might mainly act as growth factor, and play an important role in the hormonal regulation of *Botrytis cinerea*. The phylogenetic tree demonstrated that the *BCRac1* had a close genetic distance and high homology with *Sclerotinia sclerotiorum*, *Magnaporthe grisea* and *Colletotrichum gloeosporioides*.

Key words: *Botrytis cinerea*; *Rac1* gene; bioinformatics

灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)是引起植物灰霉病的真菌, 属于半知菌亚门(Deuteromycotina)丝孢纲(Hyphomycetes)丝孢目(Moniliales)淡色孢科(Moniliaceae)葡萄孢属(*Botrytis*)。因在寄主植物表面形成白色絮状菌丝体, 菌丝体在分生孢子形

成过程中转变为灰色而得名。该菌侵染范围极广, 能侵染 400 多种植物^[1]。

Rac1 基因编码的蛋白是小 G 蛋白超家族中 Rho 家族的重要成员, 具有鸟苷三磷酸酶活性, 是一种分子开关蛋白; 小 G 蛋白还有与下游效应物

收稿日期: 2013-11-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000881); 贵州省星火计划项目[黔科合农字(2012)5056 号]

作者简介: 兰 俊(1981-), 男, 贵州贵阳人, 助理农艺师, 本科, 主要从事植物病虫害防治研究。E-mail: 19714857@qq.com

* 通讯作者: 张传博(1978-), 男, 山东梁山人, 教授, 博士, 主要从事植物病虫害生物防治研究。

E-mail: zhangchuanbo2004@163.com

相互结合的区域,可以调控多种细胞骨架蛋白重结构和基因表达,与细胞粘附有关,且参与调控细胞的增殖与凋亡。^[2]

生物信息学是进行生物基因组学研究的基础,是基因、基因结构、基因产物功能分析必不可少的技术手段^[3]。通过生物信息学对基因的结构功能和理化性质等进行预测可为进一步研究基因功能提供理论依据。本研究拟对灰葡萄孢菌 *Rac1* 基因(*BCRac1*)的序列特征及其编码产物的理化性质、蛋白结构、生物学功能进行分析,比较不同生物 *Rac1* 的差异和进化关系,为从分子水平上理解 *BCRac1* 基因的结构和生物学功能提供理论依据,从而为进一步研究 *BCRac1* 在灰葡萄孢菌中的作用提供参考。

1 材料和方法

1.1 序列来源

BCRac1 基因序列来源于 GenBank 数据库,登录号为 AL112749.1。利用 *BCRac1* 基因序列编码产物进行 BLAST 分析,得到与其同源的 11 个物种 *Rac1* 基因编码产物的氨基酸序列,登录号见表 1。

表 1 不同物种 *Rac1* 基因编码产物序列来源

物种	序列号
乳牛肝菌 <i>Suillus bovinus</i>	AAF37890
黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	XP_002384152
阴道毛滴虫 <i>Trichomonas vaginalis</i>	XP_001309838
炭疽菌 <i>Colletotrichum trifolii</i>	AAP89013
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	XP_003721025
绵羊 <i>Ovis aries</i>	ACR46641
褐家鼠 <i>Rattus norvegicus</i>	NP_599193
核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	XP_001586090
里氏木霉 <i>Trichoderma reesei</i>	EGR50036
玉米黑粉菌 <i>Ustilago maydis</i>	AAM74083
烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i>	XP_754976

1.2 试验方法

采用 NCBI 的 ORFfinder 程序分析 *BCRac1* 基因的开放阅读框;采用 DNASTar 及 Bioedit 分析软件预测编码产物的理化性质;采用 ProtScale 预测疏水性/亲水性;采用 SignalP 预测蛋白信号肽^[4];采用 PSORT II 预测亚细胞定位^[5];采用 ProtFun 预测结构功能域及其功能类别^[6-7]。采用 TMHMM 程序预测跨膜区域;采用 PBIL 分析预测二级结构^[8-9];使用 Swiss-Model 分析预测三级结构;采用

DNAMAN 及 MEGA 5.1 软件进行多序列比对及同源性分析。

2 结果与分析

2.1 *BCRac1* 基因开放阅读框分析

DNA 序列可以按 6 种框架阅读和翻译。开放阅读框(ORF)识别把提交的序列分成 6 个亚区,并对这 6 个阅读框分别进行默认,然后分析每个亚区并决定哪个包含以启动子和终止子为界限的 DNA 序列而其内部不包含启动子或终止子,符合这些条件的序列有可能对应一个真正的单一基因产物^[10-11]。ORF 识别是证明一条新的 DNA 序列为特定的蛋白质编码基因的部分或全部的先决条件,参照 Kozak 法则^[12],从 *BCRac1* 基因序列中找到一个长 453 bp 的 ORF(图 1),编码 150 个氨基酸残基,起始密码子位于 139 bp 处,终止密码子位于 591 bp 处。

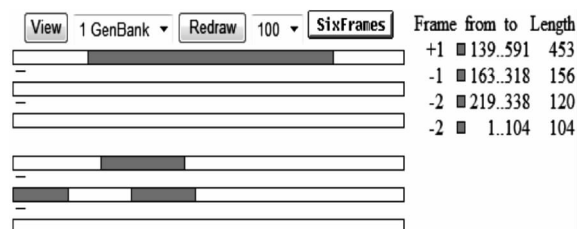


图 1 *BCRac1* 基因序列的 ORF 分析

2.2 *BCRac1* 基因编码产物的理化性质分析

蛋白质的理化性质是蛋白质序列分析内容之一,一般包括氨基酸组成、分子质量、稳定性、理论等电点等,目前对蛋白质理化性质的分析是研究已知及未知蛋白质的一个重要手段^[13]。由 *BCRac1* 基因编码产物的氨基酸组成(图 2)可知,*BCRac1* 基因编码 150 个氨基酸,组成中最多的氨基酸是亮氨酸(Leu),所占比例为 9.33%;在 pH 值 7.0 环境下其电荷量为 3.328;理论分子量约为 16.96 kD,理论等电点为 8.588。

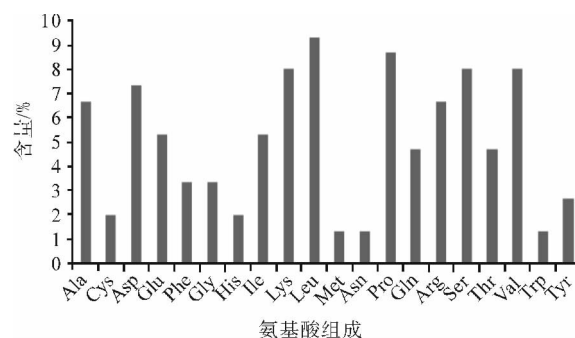


图 2 *BCRac1* 基因编码产物的氨基酸组成

2.3 *BCRac1* 基因编码产物疏水性/亲水性预测和分析

疏水性/亲水性是蛋白质折叠形成结构域的主要驱动力,在 ProtScale 软件中采用 K-D 法进行分析,以各氨基酸的疏水性减去甘氨酸的疏水性之值来表示。由氨基酸残基得分(图 3)可知,多肽链第 37 位的半胱氨酸(Cys)具有最高的得分(3.167),疏水性最强;第 80 位的脯氨酸(Pro)具有最低的得分(-2.833),亲水性最强;整条多肽链表现为亲水性,因此,推断 *BCRac1* 基因编码产物是一种水溶性蛋白。

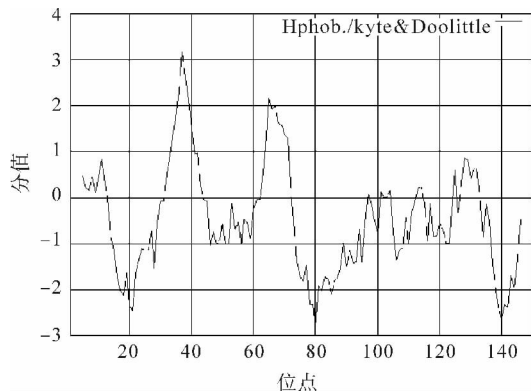


图 3 *BCRac1* 基因编码产物的亲水性分析

2.4 *BCRac1* 基因编码产物信号肽分析

信号肽是引导新生肽链在细胞中进行穿梭运送到作用部位的一些肽段,通常位于肽链 N 端,由 15~35 个氨基酸组成。采用 SignalP 软件中的神经网络模型对 *BCRac1* 基因编码产物进行信号肽分析,得到 C、Y、S 值计算结果(图 4)。对于一个典型的信号肽,C 值和 Y 值趋向于 +1,S 值在剪切位点之前高,而在剪切位点之后变低^[14]。由图 4 可知,*BCRac1* 基因编码产物的分值曲线 C 值为 0.176,Y 值为 0.140,S 值为 0.145,基本可以判定 *BCRac1* 基因编码产物不存在信号肽,属于非分泌蛋白。

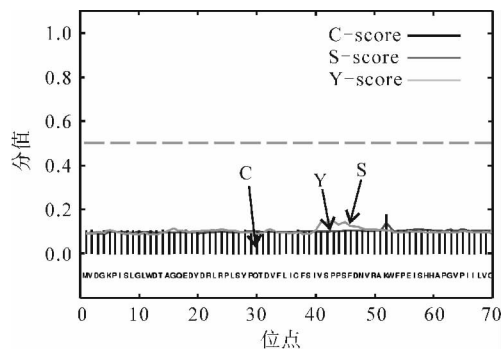


图 4 *BCRac1* 基因编码产物信号肽的分值曲线

2.5 *BCRac1* 基因编码产物亚细胞定位分析

亚细胞定位是指某种蛋白质或表达产物在细胞

内的具体存在部位,通过工具 PSORT II 预测,*BCRac1* 基因编码产物分布在细胞核的可能性为 43.5%,分布在质膜的可能性为 21.7%,在囊泡的可能性为 8.7%。因此推断,*BCRac1* 基因编码产物主要在细胞核中发挥生物学作用。

2.6 *BCRac1* 基因编码产物功能的预测与分析

通过 ProtFun 软件分析(表 2)可知,*BCRac1* 基因编码产物主要具有生长因子的功能,可能性为 3.709。由此推断,*BCRac1* 基因可能在灰葡萄孢菌生长过程中发挥重要作用,对灰葡萄孢菌的激素调节起关键作用,从而影响孢子产生与分裂以及其侵染致病。

表 2 *BCRac1* 基因编码产物的功能分析

功能类别	几率
信号转导	0.207
受体	0.068
荷尔蒙	0.206
结构蛋白	0.242
运载体	0.229
离子通道	0.172
电压门控离子通道	0.166
阳离子通道	0.215
转录	0.384
转录调控	0.658
胁迫应答	0.130
免疫应答	0.247
生长因子	3.709
金属离子转移	0.038

2.7 *BCRac1* 基因编码产物跨膜区域的预测与分析

跨膜结构域是膜内在蛋白与膜脂相结合的主要部位,一般由 20 个左右的疏水氨基酸残基组成,形成螺旋,固着于胞膜上起锚定作用^[15]。通过 TM-HMM 预测(图 5)可知,*BCRac1* 基因编码产物全部位于膜外,无跨膜结构,属于非跨膜蛋白。

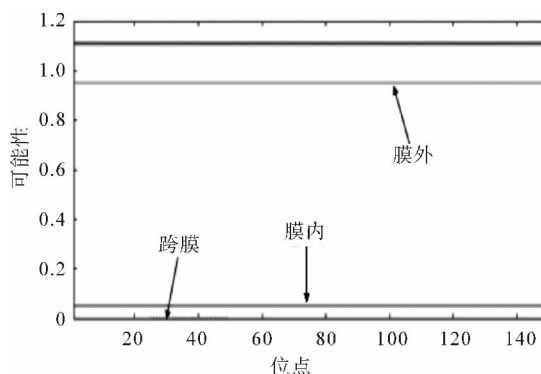


图 5 *BCRac1* 基因编码产物的跨膜区域分析

2.8 *BCRac1* 基因编码产物的二级与三级结构预测

蛋白质二级结构不仅是联系其一级结构和三级空间结构的桥梁和纽带,而且也是从一级结构预测其三级空间结构的关键步骤^[16],对其进行预测与分析有助于认识蛋白质的空间结构。采用 PBIL 软件分析可知,*BCRac1* 基因编码产物是由 41.33% 无规则卷曲、36.67% α -螺旋、16.67% 链延伸、5.33% β -转角组

成,二级结构分布如图 6 所示。由此可推测,无规则卷曲和 α -螺旋是其主要的蛋白质二级结构元件,延伸链散布于整个蛋白质中。蛋白质三级结构是指一条多肽链在二级结构或者超二级结构甚至结构域的基础上,进一步盘绕、折叠,依靠共价键维系固定所形成的特定空间结构。采用 Swiss-Model 程序预测 *BCRac1* 基因编码产物的三维结构,如图 7 所示。

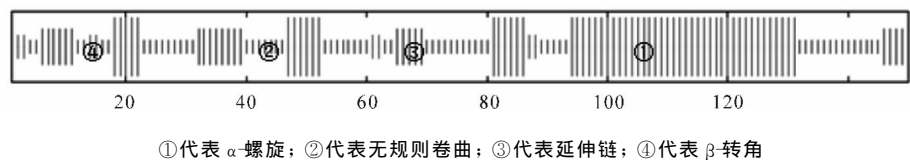


图 6 *BCRac1* 基因编码产物二级结构预测结果



图 7 *BCRac1* 基因编码产物三级结构预测结果

2.9 *BCRac1* 基因编码产物序列同源性分析

由图 8 可以看出,*BCRac1* 基因编码产物序列与核盘菌、稻瘟病菌、黄曲霉、烟曲霉、炭疽菌等物种的蛋白同源性较高,均在 85% 以上,说明它们在进化过程中具有亲缘关系。从 *Rac1* 基因系统发育树(图 9)可以看出,*BCRac1* 基因与核盘菌、稻瘟病菌、炭疽菌等物种 *Rac1* 基因距离较近,说明它们具有高度同源性。

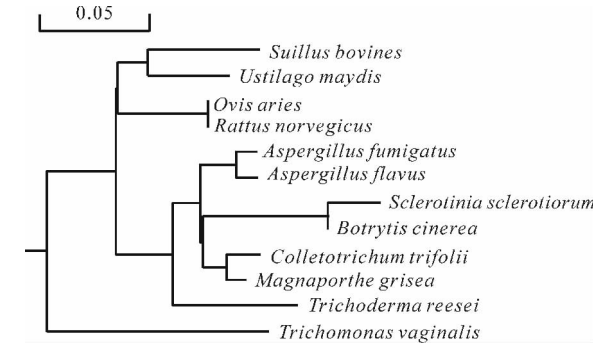


图 9 12 个物种 *Rac1* 基因编码产物的系统发育树

3 结论与讨论

Rho GTP 酶作为细胞信号传导途径重要的开关分子,调控病原真菌的形态建成、细胞骨架重组、环境适应性和生长发育,与其侵染致病过程密切相关。*Rac1* GTP 酶属于 Rho GTP 酶家族成员之一。研究证明,马尔尼菲青霉(*Penicillium marneffei*)中 *Rac* 同源基因 *cflB* 在无性生殖阶段的细胞极性生长及分裂中起关键作用。*cflB* 缺失导致营养菌丝、分生孢子梗的细胞分裂和生长缺陷,细胞去极化,隔膜异常以及肌动蛋白骨架严重破坏^[17]。植物病原真菌刺盘孢(*Colletotrichum trifolii*)中的 *Rac1* 能够调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的活性和胞内活性氧(ROS)的产生,恢复 *Ras* 基因显性激活突变引起的菌丝表型变化^[18]。在新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中,*Rac1* 在 *Ras* 下游起作用,并与 *Ste20* 共同调控高温状态下的细胞生长及细胞分化^[19]。真菌中的 Rho GTP 酶表现出功能的多样性,参与的信号传导途径极其复杂,因而具有重要的研究价值。灰霉病菌作为植物病原菌的模式

同源性/%													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1		68.4	68.5	74.5	73.6	81.4	74.1	77.7	77.7	68.9	58.0	72.0	1
2	41.0		99.3	84.1	83.6	71.2	87.6	73.4	73.4	75.7	53.1	84.2	2
3	40.8	0.7		95.1	85.2	71.8	88.6	73.8	73.8	75.2	50.3	85.2	3
4	31.2	17.9	16.6		88.9	76.6	95.0	77.6	77.6	80.4	58.9	87.4	4
5	32.6	18.5	16.5	12.1		73.6	89.4	77.2	77.2	79.4	59.1	95.5	5
6	21.4	36.3	35.3	28.2	32.6		75.6	80.3	80.3	69.4	61.1	74.6	6
7	31.8	13.6	12.4	5.2	11.4	29.5		78.2	78.2	80.5	58.0	87.9	7
8	26.5	32.8	32.2	26.7	27.2	22.9	25.8		100.0	72.0	63.2	76.7	8
9	26.5	32.8	32.2	26.7	27.2	22.9	25.8	0.0		72.0	63.2	76.7	9
10	40.1	29.4	30.2	22.8	24.1	39.2	22.6	35.0	35.0		56.0	80.4	10
11	60.7	71.9	79.0	58.9	58.5	54.3	60.7	50.2	50.2	65.2		58.0	11
12	35.0	17.8	16.5	13.9	4.6	31.0	13.2	28.0	28.0	22.8	60.7		12

1. 乳牛肝菌; 2. 核盘菌; 3. 灰葡萄孢菌; 4. 炭疽菌; 5. 烟曲霉;
6. 玉米黑粉菌; 7. 稻瘟病菌; 8. 绵羊; 9. 褐家鼠; 10. 里氏木霉;
11. 阴道毛滴虫; 12. 黄曲霉

图 8 12 个物种 *Rac1* 基因编码产物序列的同源性与分歧度

种,在生长发育和侵染致病以及抗药性过程中伴随着形态的动态变化,是细胞极性建立和骨架重组的结果,而 Rac1 GTP 酶与细胞极性、细胞分裂、信号传递等有关,由此推测 Rac1 可能在灰霉病菌侵染致病方面具有重要作用,因此,研究 BCRac1 基因的生物信息学对今后研究灰霉病致病机制有一定的指导意义。

本研究通过分析 BCRac1 基因编码产物,推测 BCRac1 蛋白由 150 个氨基酸组成,整条多肽链表现为亲水性,说明该蛋白质的亲水性较好,为水溶性蛋白。BCRac1 基因编码产物的二级结构以无规则卷曲与 α -螺旋为主,其不易接近脂类分子,主要在细胞核中发挥生物学作用。跨膜区域预测结果表明,该编码产物无跨膜结构,与三级结构分析的结果相符。BCRac1 基因编码产物与核盘菌、稻瘟病菌、炭疽菌等物种具有高度同源性,进化距离较近,亲缘关系密切,这与微生物学分类结果一致^[20]。同源性分析表明,Rac1 蛋白具有较强的保守性,说明不同物种 Rac1 蛋白结构的稳定性对生物体功能的发挥具有重要意义。本研究还发现,BCRac1 基因可能在灰葡萄孢菌生长过程中发挥重要作用,对灰葡萄孢菌的激素调节起关键作用,从而影响孢子产生与分裂以及其侵染致病。这与已知 Rac1 在稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)分生孢子形成、附着胞分化以及侵染性生长过程中起重要作用^[21]相吻合。

本研究采用多种不同软件对灰葡萄孢菌 Rac1 基因进行了生物信息学分析,结果具有较高的可信度,为深入研究 BCRac1 蛋白的分子结构及功能奠定了基础,同时为今后进一步研究 BCRac1 基因对灰葡萄孢菌的激素调节以及其在侵染致病中的作用提供了参考资料。

参考文献:

- [1] 张中义,何永宏,王学英,等.我国灰葡萄孢的新寄主植物[J].云南农业大学学报,2002,17(4):148-420.
- [2] Subauste M C, Herrath M, Benars V, et al. Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and Fas[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 9725-9733.
- [3] 郑国清,高亮之.农业生物信息学[J].计算机与农业,2002(9):36-38.
- [4] 李玩生,刘磊,冯海燕,等.猪 T 细胞受体 β 链基因的克隆及生物信息学分析[J].甘肃农业大学学报,2010,45(3):1-6.
- [5] Nakai K, Horton P. PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization[J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24: 34-36.
- [6] Jensen L J, Gupta R, Blom N, et al. Prediction of human protein function from post-translational modifications and localization features[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 319: 1257-1265.
- [7] Jensen I J, Strfeldt H H, Borunak S. Prediction of human protein function according to gene ontology categories[J]. Bioinformatics, 2003, 19(5): 635-642.
- [8] 韦敏. GnrHa 主动免疫绵羊对 GnrHR 表达与分布的作用研究[D].兰州:西北民族大学,2010.
- [9] 徐飞.藏绵羊 DRB1 基因第 3 外显子多态性及生物信息学分析[D].兰州:甘肃农业大学,2011.
- [10] 王明亮,陈鹏,郝明超,等.黄牛 FSHR 基因的生物信息学分析[J].甘肃农业大学学报,2012,47(4):7-13.
- [11] 王明亮.牦牛 FSHR 基因部分序列多态性与繁殖性状关联分析及 FSHR 基因生物信息学分析[D].兰州:甘肃农业大学,2012.
- [12] 罗轶.鸡 FATP1 基因 cDNA 的克隆、组织表达及其生物信息学分析[D].雅安:四川农业大学,2008.
- [13] 吴祖建,高芳奎,沈建国.生物信息学分析实践[M].北京:科学出版社,2010:105-132.
- [14] 程亮,王维民,李发弟.绵羊 Ghrelin 基因的克隆和生物信息学分析[J].甘肃农业大学学报,2012,47(6):13-19.
- [15] 翟中和,王喜忠,丁明孝.细胞生物学[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [16] Garnier J, Gibrat J F, Robson B. GOR secondary structure prediction method version IV [J]. Methods in Enzymology, 1996, 266: 540-553.
- [17] Boyce K J, Hynes M J, Andrianopoulos A. Control of morphogenesis and actin localization by the *Penicillium marneffei* Rac homolog [J]. J Cell Sci, 2003, 116: 1249-1260.
- [18] Chen C, Dickman M B. Dominant active Rac and dominant negative Rac revert the dominant active Rac phenotype in *Colletotrichum trifolii* by distinct signalling pathways[J]. Mol Microbiol, 2004, 51: 1493-1507.
- [19] Vallim M A, Nichols C B, Fernandes L, et al. A Rac homolog functions downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* [J]. Eukaryot Cell, 2005, 4(6): 1066-1078.
- [20] 张忠义.中国真菌志[M].北京:科学出版社,2006:26.
- [21] Chen J S, Zheng W, Zheng S Q, et al. Rac1 is required for pathogenicity and chml-dependent conidiogenesis in rice fungal pathogen *Magnaporthe grisea* [J]. PLoS Pathog, 2008, 4(11): e1000202.