

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :391 - 397; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.005

水稻纹枯病菌 *Rspg1* 基因的克隆、表达及其编码产物生物信息学分析

陈夕军^{1,2}, 王友德¹, 张家豪¹, 左示敏², 童蕴慧¹, 潘学彪², 徐敬友^{1*}

¹扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009

²扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室, 植物功能基因组学教育部重点实验室, 江苏 扬州 225009

摘要: 【目的】为克隆、表达水稻纹枯病菌 *Rspg1* 基因, 明确其编码产物的生物学特性, 为研究该基因在病菌致病过程及与寄主互作中的作用提供理论依据。【方法】据 GenBank 提供的相关序列设计特异引物扩增目的基因, 并对之进行原核表达和生物信息学分析。【结果】从水稻纹枯病菌基因组 DNA 中扩增出一 1395 bp 的目的片段。RT-PCR 分析表明, 该片段为 *Rspg1* 基因的完整开放阅读框, 含有 5 个内含子 (278-334, 57 bp; 545-601, 57 bp; 657-715, 59 bp; 1090-1155, 66 bp; 1244-1304, 61 bp), 编码区为 1 095 bp, 编码一含有 364 个氨基酸的蛋白。原核表达 *Rspg1* 基因, 表达产物大小约为 40 kDa, 具明显的多聚半乳糖醛酸酶 (Polygalacturonase, PG) 活性, 活性值为 277.78 U/mg。生物信息学分析表明, *Rspg1* 中含有所有生物 PG 特有的严格保守序列¹⁸⁰NTD、²⁰²DD、²²³GHG 和²⁵⁵RIK, 存在一 18 个氨基酸的信号肽分子; 二级结构以 α -螺旋、 β -折叠和随机卷曲为其基本结构单元, 6 个半胱氨酸残基形成 3 个二硫键, 跨膜结构预测以从胞内向胞外分泌为主; 三级结构为 10 个重复的 β -折叠环按右手螺旋规则排列形成的螺旋结构, 形成一个开放的有活性的裂隙结构。【结论】*Rspg1* 基因编码产物为一 40 kDa 蛋白, 具明显的 PG (Polygalacturonase, PG) 活性, 以胞外分泌为主, 且有一个开放的有活性的裂隙结构。

关键词: *Rspg1* 基因, 克隆和表达, 生物信息学分析, 水稻纹枯病菌

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2014) 04-0391-07

纹枯病 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 是水稻重要病害之一, 广泛分布于各产稻区。近年来, 随着复种指数的增加、多穗矮秆品种的种植和施肥水平的提高, 此病危害有逐渐加重的趋势, 在我国南方一些省 (区) 已将该病列为水稻生产的第一大病害^[1]。

传统观点认为, 由于单子叶植物细胞壁成分中,

果胶含量仅为双子叶植物的十分之一, 因此果胶酶并不是单子叶植物病原菌致病的主要因子^[2]。但近年来的研究表明, 在一些禾本科作物病原菌 (如: 麦角菌) 中, 缺失 *pg* 基因后, 病菌的致病力几乎完全丧失; 利用野生型菌株进行互补后, 菌株又可恢复致病性^[3]。张红等^[4] 研究亦表明, 胞壁降解酶是水稻

基金项目: 转基因重大专项 (2014ZX08001-003B); 江苏省自然科学基金 (BK2010305)

* 通信作者。E-mail: jyxu@yzu.edu.cn

作者简介: 陈夕军 (1973 -), 男, 江苏阜宁人, 副教授, 博士, 主要从事水稻病害研究。E-mail: xjchen@yzu.edu.cn

收稿日期: 2013-09-04; 修回日期: 2013-10-21

纹枯病菌重要的致病因子,其能破坏寄主细胞外被和亚显微结构,导致细胞解体。病菌产生胞壁降解酶的能力与其致病力呈极显著正相关,几种酶中尤以多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)活性最高,对叶鞘组织的浸解作用亦显著高于其它酶^[5]。

植物病原真菌 PG 编码基因是基因家族 28 的成员,不同真菌的 PG 或同种真菌的不同 PG 编码基因序列之间都有一定的一致性 or 相似性,而且还存在一些保守的序列区域或氨基酸残基,这种结构上的保守性和多基因家族的特征保证了功能上的互补性,也为人类更多地克隆和研究真菌 PG 提供了途径。许多新克隆的编码 PG 的基因都是利用同源基因的保守序列,通过 PCR 扩增或筛选基因组文库获得的,并且加入到这个基因家族中^[6-10]。Osker 等^[11]详细分析了基因家族 28 成员的序列特征、结构特异性及其演化,为更好地研究和利用 PG 提供了理论依据。本文根据 GenBank 中提供的序列设计特异引物,克隆了水稻纹枯病菌 *Rspgl* 基因,并对其编码产物进行了生物信息学分析,拟为进一步研究该基因在病菌致病过程中的作用及与寄主 *pgip* 基因的互作奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

水稻纹枯病菌 YN-7: 为本实验室从江苏水稻病株分离保存。大肠杆菌 DH 5 α 和 BL21: 由本实验室保存。

1.2 *Rspgl* 基因的克隆与表达

1.2.1 水稻纹枯病菌基因组 DNA 的提取与 PCR 扩增: 采用 CTAB 法^[12] 提取水稻纹枯病菌基因组 DNA。根据 GenBank 与相关文献中 *pg* 基因序列设计引物, P1: 5'-ATGCACTATCTTTCCTTTGCA-3'; P2: 5'-TCAGAACTACCTCCTTTGAC-3'。

20 μ L 反应体系: ddH₂O 12.5 μ L, 10 \times PCR Buffer (含 Mg²⁺) 2 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1 μ L, 引物 P1 (20 ng/ μ L) 1 μ L, 引物 P2 (20 ng/ μ L) 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (5U/ μ L) 0.5 μ L, 模板 DNA (50 ng/ μ L) 2 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 *Rspgl* 基因的克隆与测序: 采用 Chung 等^[13] 方法制备 *E. coli* DH 5 α 的感受态细胞。重组

质粒的构建按 pMD19-T 试剂盒说明书进行,质粒的转化按常规方法进行。挑取阳性克隆子移至 50 mL 含 10 mL LB/Amp (50 mg/L) 培养液的离心管中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5, 提取质粒, 酶切验证, 正确的阳性克隆子送上海生工生物工程技术服务公司测序。

1.2.3 *Rspgl* 基因的原核表达: 在引物 P1 和 P2 的 5'端分别加上 *Bam* H I 和 *Xho* I 的酶切位点, PCR 体系和条件同上。用 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切扩增产物与原核表达载体 pET-28a (+), 连接与转化按常规方法进行。挑取阳性克隆子至 150 mL 含 50 mL LB/Amp (50 mg/L) 培养液的锥形瓶中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min, 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6, 加入适量 IPTG (终浓度为 0.4 mmol/L), 同时将温度降到 28 $^{\circ}$ C 继续培养 6 h。取培养菌液 40 mL, 提取全细胞蛋白, 并进行 SDS-PAGE 电泳分析 (分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 3%, 标准蛋白为 Promega 公司产品) 和 PG 活性测定。

1.3 *Rspgl* 基因及其编码产物的生物信息学分析

1.3.1 *Rspgl* 基因序列分析: 从 GenBank 中搜索相关序列, 应用 Vector NTI Suite 8 软件进行同源性比较、开放阅读框和限制性酶切位点分析。

1.3.2 *RsPG1* 的生物信息学分析: 一级结构应用 Vector NTI Suite 8 软件进行氨基酸序列分析和系统进化树的构建。采用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/Signal/>^[14] 网站软件进行信号肽位点预测。二级结构预测由 PBIL 信息库 (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)^[16] 和 ISREC 服务器 (<http://www.ch.embnet.org>)^[17] 完成。三级结构以 ESyPred3D Web 服务器 (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>)^[18] 提供的软件进行预测, 由 SWISS-MODEL Workspace 服务器的 Tool 程序 (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_structureassessment1)^[19] 进行修改和评价, 并通过 Vector NTI Suite 8.0 和 PyMOL Viewer 软件完成相关分析。性质与功能通过 Vector NTI Suite 8.0 软件预测蛋白质分子量、等电点、氨基酸组成和紫外吸收量等。利用 <http://au.expasy.org/tools/protparam.html>^[20] 网站软件预测蛋白原子组成、极性氨基酸数、分子式、极性消光系数、半衰期、稳定系数、脂溶指数和疏水性等。据 <http://biotech.ou>

edu/ [21] 预测其在大肠杆菌中表达产物的溶解性。应用 <http://www.cbs.dtu.dk/> [15] 网站提供的 NetNGlyc 1.0、NetOGlyc 3.1 和 NetPhos 2.0 进行 N-糖基化位点、O-糖基化位点和磷酸化位点预测。

1.4 PG 活性测定 [22]

将 0.2 g 蛋白溶于 1 mL 水中, 取 0.5 mL 蛋白液, 加 0.5 mL pH 5.0 的 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的含 0.25% 多聚半乳糖醛酸溶液, 再加 1.0 mL 水。50℃ 酶解 60 min 后, 立即加入 DNS 试剂 2.5 mL, 并在沸水浴中保温 10 min, 取出流水冷却。再加 8.0 mL 的蒸馏水, 稀释冷却后在 540 nm 处测定其酶活性。对照除在酶解反应后才加入底物外, 其余操作同上。PG 的酶活性单位为 50℃ 下 1 h 催化底物释放 1 μg 还原糖所需的酶量。

2 结果和分析

2.1 *Rspg1* 基因的克隆与分析

利用 P1/P2 这一引物对, 可从水稻纹枯病菌基因组 DNA 中扩增出 *Rspg1* 基因的完整开放阅读框 1395 bp, 将该片段连接载体 pMD19-T 获得重组质粒 pMD-*Rspg1*。转化宿主菌 *E. coli* DH 5α 后 PCR 验证, 获得正确连接的阳性克隆子 *E. coli* DH 5α / pMD-*Rspg1* (图 1)。阳性克隆子经测序后在 GenBank 中进行 Blast, *Rspg1* 基因序列与 Du 等 (登陆号: FJ544456) 发布的玉米纹枯病菌 *pg1* 基因序列除第 75 位不同 (G→A) 外, 其它序列完全一致。RT-PCR 显示, *Rspg1* 基因转录形成的 mRNA 全长为 1095 bp, 该基因含有 5 个内含子 (278 - 334, 57 bp; 545 - 601, 57 bp; 657 - 715, 59 bp; 1090 - 1155, 66 bp; 1244 - 1304, 61 bp)。测序的编码区为一个完整的开放阅读框 (OFR), 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA。序列中存在 3 个限制酶切位点, 分别为 *Ava* I (259)、*Hind* III (470) 和 *Pst* I (493)。

2.2 *Rspg1* 基因的原核表达

在工程菌 *E. coli* BL21/pET-*Rspg1* 中加入 IPTG 诱导表达后, 提取其全细胞蛋白。SDS-PAGE 显示, 在约 40 kDa 处有一条明显加粗的特异蛋白带 (图 2)。活性测定表明, 全细胞蛋白的酶活为 277.78 U/mg (图 3)。

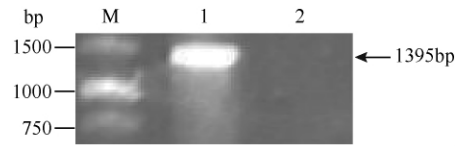


图 1. 重组质粒 pMD-*Rspg1* PCR 检测电泳图谱

Figure 1. Map of recombinant vector pMD-*Rspg1* by PCR. M, Marker; lane 1, PCR production of recombinant vector; lane 2, PCR production of control vector.

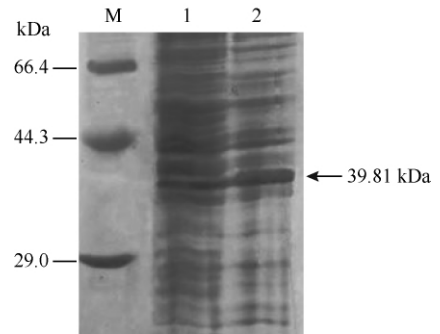


图 2. *Rspg1* 基因原核表达全细胞蛋白 SDS-PAGE 图谱

Figure 2. Map of the prokaryotic expression production of *Rspg1* gene determined by SDS-PAGE. M, Marker; lane 1, Prokaryotic expression production of control vector; lane 2, Prokaryotic expression production of recombinant vector.

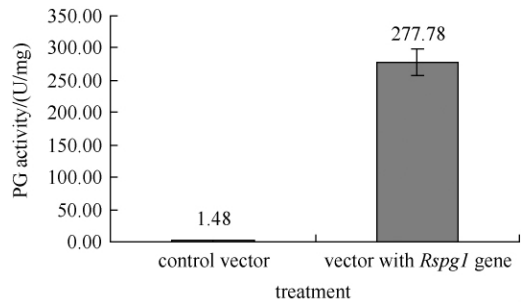


图 3. *Rspg1* 基因原核表达产物活性

Figure 3. PG activity of the prokaryotic expression production of *Rspg1* gene.

2.3 *RsPG1* 的生物信息学分析

2.3.1 *RsPG1* 的结构分析: 一级结构采用 Vector NTI Suite 8 软件分析表明, *RsPG1* 由 364 个氨基酸组成, 含有所有生物 PG 特有的严格保守的序列¹⁸⁰ NTD、²⁰² DD、²²³ GHG 和²⁵⁵ RIK (图 4)。利用两种模型进行信号肽预测表明, *RsPG1* 可能 (NN 法, 可能性 59.2%; HNN 法, 可能性 39.2%) 具有一信号肽分子, 切点在第 18 与 19 位氨基酸之间。

MHYLSFAALAFAPILAIATPVSRCVTGTIASLDDVAAAQKCTTVTIKGFVTPAGKTFELSLDNTVVNMEGDVVKFGVANW
 AGPLFSVSGKGITFNGNGHTFDGQGPSYWDGQGGNGGVTKPHPMMKIKISGTYSNVKVLNSPAHTYSISNPAKLVMSKL
 TIDNSAGDAPNNQSGGKAAGHNNTDGFDVSTTDLTIEDSTIRNDDCIAINKGSNIIFQRNSCTGGGHGISIGSISTGATVQNV
 QILNNQIHNDQALRIKTKADATSASVSGITFSGNTATGTTKFGVIVDQGYPTTLGAPNGVVKISGINFTGSTNNIAVTSSA
 QRVAVNCGTGCTGTWDWSKLTVTGGKASDSKYRYSGVKGGSF-

图 4. *RsPG1* 的一级结构

Figure 4. Putative protein primary structure of *RsPG1*. Sequences with underline were the strictly conserved sequence segments of all organisms' PG.

二级结构中 *RsPG1* 蛋白主要以为 α -螺旋、 β -折叠和卷曲为其基本结构单元,其中有 220 个氨基酸参与了卷曲的形成,占其氨基酸总数的 60.44%;延伸链部分仅占 29.67%,但这一部位却对其与果胶聚合物的特异性互作有重要作用。

用同源建模法得到与提供序列等同值为 45.6% 的 *RsPG1* 的三级结构图,与其它多数真菌 PG 一样,*RsPG1* 的三级结构主要是由 10 个重复的 β -折叠环按右手螺旋规则排列形成的螺旋结构,每个 β -折叠环由 22 - 39 个氨基酸组成。10 个 β -折叠环形成了一个开放的有活性的裂隙结构(图 5)。

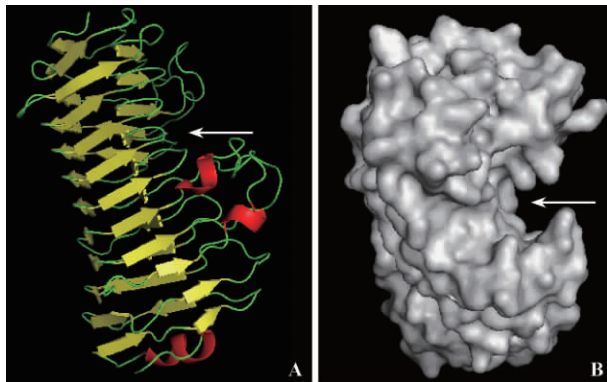


图 5. *RsPG1* 三级结构的卡通图与表面图

Figure 5. Putative protein tertiary structure of *RsPG1*. A: Cartoon; B: Surface; The arrow indicated the opening activity cleft.

2.3.2 *RsPG1* 的性质与功能分析:据推测,*RsPG1* 的理论分子量为 37.62 kDa,分子式为 $C_{1634}H_{2590}N_{460}O_{330}S_{11}$, pI 8.93。其不稳定系数为 20.93,脂溶指数为 74.51,说明该蛋白稳定且耐热。一级结构上以亲水性为主,平均亲水系数为 -0.132。亚细胞定位表明,*RsPG1* 主要位于细胞外,占 66.7%,其它细胞器如液泡、高尔基体和内质网分别占 11.1%、11.1% 和 11.1%。另外,跨膜结构预测显示,*RsPG1* 主要是以从胞内向胞外分泌为主。

在 *RsPG1* 上分散着 6 个半胱氨酸残基,可形成

3 个二硫键 ($Cys^{24}-Cys^{40}$, $Cys^{204}-Cys^{220}$, $Cys^{329}-Cys^{333}$)。磷酸化功能位点分析显示,*RsPG1* 分别有 14 个丝氨酸、4 个苏氨酸和 4 个酪氨酸共 22 个磷酸化位点。但在其序列上既不存在 N-糖基化位点也不存在 O-糖基化位点。

2.3.3 *RsPG1* 的系统进化分析:系统进化分析表明,来源于玉米和水稻的立枯丝核菌由于都属于 AG1 融合群,故其 PG 的序列相似性最高;来源于马铃薯的立枯丝核菌为 AG3 融合群,虽然其与水稻纹枯病菌有一定的差异,但相比其它真菌而言相似度仍颇高;而其它植物病原真菌的 PG 则相对差异较大。有趣的是,来自同属不同种真菌的 PG 在序列上有较大差异(如 *FmPG1* 和 *FoPG*),即使是来自同种真菌,其不同 PG 之间的差异亦较大(如 *BjPG1* 和 *BjPG3*);而一些亲缘关系很远的病原真菌其 PG 的相似度反而较高(如 *BjPG1* 和 *SsPGb*) (图 6)。这可能提示我们,PG 作为重要的致病因子之一,与物种进化的方向并无关系。

3 讨论

根据序列的相似性,植物病原真菌 PG 被归为糖苷水解酶 28 家族,这一家族共有三类 PG 酶,分别为 endo-PG、exo-PG 和 Peh (exo-poly- α -galacturonosidase)。Markovic^[23] 比较了该家族的 115 个 PG 序列,结果表明,有 4 个序列 (¹⁷⁸NTD、²⁰¹DD、²²²GHG 和 ²⁵⁶RIK,以黑曲霉 PG II 序列为准)在所有 PG 中是严格保守的,而这些序列在 *RsPG1* 中同样存在 (¹⁸⁰NTD、²⁰²DD、²²³GHG 和 ²⁵⁵RIK)。

尽管在各种不同植物病原真菌的 PG 中,半胱氨酸残基数量都非常有限,但这些残基多数是高度保守的。紫软韧革菌(苹果银叶病菌)的 endo-PG I 序列中含有 7 个半胱氨酸,可形成 3 个二硫键,分别为 Cys^3-Cys^{17} , $Cys^{175}-Cys^{191}$ 和 $Cys^{300}-Cys^{303}$, Cys^{167} 为

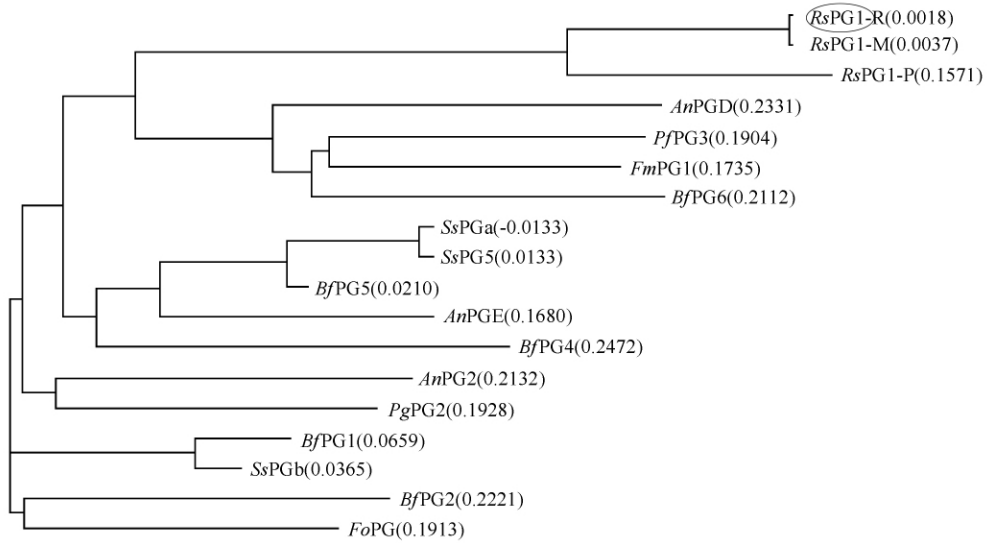


图 6. 不同植物病原真 PG 的系统进化树

Figure 6. Phylogenetic tree of *Rspg1*-R and other PGs. *Rspg1*-R, PG1 of *R. solani* (Isolated from rice); *Rspg1*-M: PG1 *R. solani* (Isolated from maize); *Rspg1*-P: PG1 of *R. solani* (Isolated from potato); *BfPG*: PG of *Botryotinia fuckeliana*; *FmPG*: PG of *Fusarium moniliforme*; *FoPG*: PG of *Fusarium oxysporum*; *AnPG*: PG of *Aspergillus niger*; *PgPG*: PG of *Penicillium griseoroseum*; *SsPG*: PG of *Sclerotinia sclerotiorum*.

自由的半胱氨酸残基^[24]。比较多个植物病原真菌 PG 序列发现, 尽管蛋白的氨基酸序列相似性很低 (40% - 43%), 但这 6 个形成二硫键的残基是保守的。且 Cys⁴⁵ (以黑曲霉 PG II 序列为准) 这一保守的半胱氨酸具有重要的分类学意义, 因为其仅出现在真菌群中。在 *Rspg1* 中, 这 6 个半胱氨酸残基和形成的二硫键同样存在, 分别为 Cys²⁴-Cys⁴⁰, Cys²⁰⁴-Cys²²⁰, Cys³²⁹-Cys³³³。

晶体结构图显示, 多数植物病原真菌 PG 含有 1 个由多个 β -折叠环按右手平行方向形成的 β -螺旋, 每一 β -折叠环由 22 - 39 个氨基酸形成的 2 - 4 个 β -折叠连接而成。这些 β -折叠环在空间结构上形成了一个较大的裂隙区, 这一裂隙区即为 PG 的活性位点区。在其 N-端, 有一很小的 α -螺旋, 主要是用来遮蔽 PG 的疏水核心^[25-26]。通过 3D 空间结构模型预测, 据序列构建的 *Rspg1* 模型与原序列具有 45.6% 的相似性, 完全可以用来代表其真实的空间结构。据预测模型可知, *Rspg1* 亦有 10 个平行的 β -折叠环, 这些 β -折叠环正常由 3 个 β -折叠和一些随机卷曲结构组成; 在其 N-端, 有一个由少数几个氨基酸形成的 α -螺旋, 可能与其疏水性有关。至于这些 β -折叠环形成的裂隙区中, 哪些氨基酸残基与 *Rspg1* 的活性 (即致病力) 直接相关, 还有待进一步研究。

经生物信息学分析表明, 水稻纹枯病菌 PG 为外泌蛋白, 本实验室以往研究亦是从小稻纹枯病菌培养滤液中提取粗酶进行酶活性测定^[5]。但在进行原核表达时却发现, 上清蛋白 PG 活性很低, 而全细胞蛋白的活性则相对较高。这是否是因为真菌与细菌本身细胞结构的不同导致, 还有待进一步以真核表达 (如酵母) 加以验证说明。

参考文献

- [1] Liao H, Xiao L, Wang H. Analysis of developing annals and evolving causation of rice sheath blight (in Chinese). *Guangxi Plant Protection*, 1997, 10 (3): 35-38. (in Chinese)
廖皓年, 肖陵生, 王华生. 水稻纹枯病发生历史及演变原因简析. 广西植保, 1997, 10 (3): 35-38.
- [2] Carpita NC, Gibeaut DM. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 1993, 3 (1): 1-30.
- [3] Birgitt O, Patrick MH, Ulrike M, Paul T, Klaus BT. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 36 (3): 176-186.
- [4] Zhang H, Chen X, Tong Y, Ji Z, Xu J. Damage of cell wall degrading enzymes produced by *Rhizoctonia solani* to rice tissue and cells. *Journal of Yangzhou University*

- (*Agricultural and Life Science Edition*), 2005, 26 (4): 83-86. (in Chinese)
- 张红,陈夕军,童蕴慧,纪兆林,徐敬友. 纹枯病菌胞壁降解酶对水稻组织和细胞的破坏作用. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2005,26(4):83-86.
- [5] Chen X, Zhang H, Xu J, Tong Y, Ji Z. Cell wall degradation enzymes produced by *Rhizoctonia solani* and their pathogenicity of rice plants. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* 2006, 22 (1): 24-28. (in Chinese)
- 陈夕军,张红,徐敬友,童蕴慧,纪兆林. 水稻纹枯病菌胞壁降解酶的产生及致病作用. 江苏农业学报,2006, 22(1):24-28.
- [6] Wubben JP, Mulder W, ten Have A, van Kan JAL, Visser J. Cloning and partial characterization of endopolygalacturonase genes from *Botrytis cinerea*. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, 65 (4): 1596-1602.
- [7] Williams HL, Tang Y, Hintz WE. Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. *Fungal Genetics and Biology*, 2002, 36(1): 71-83.
- [8] Li RG, Rimmer R, Buchwaldt L, Sharpe AG, Seguin-Swartz G, Hegedus DD. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genetics Biology*, 2004, 41(8): 754-765.
- [9] Gong Z, Arvid G, David AJ. Studies on cloning, sequencing and genetic transformation of *Pcpg* (*Phytophthora cinnamomi* polygalacturonase) 9 and *Pcpg* 10. *Journal of Northwest A&F University of (Natural Science Edition)*, 2004, 32(8): 1-6. (in Chinese)
- 巩振辉,Arvid G,David AJ. 樟疫霉多聚半乳糖醛酸酶基因9和10的克隆、测序及其遗传转化研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(8):1-6.
- [10] Gong Z, Lü Y, Wang X. Studies on cloning, sequencing and genetic transformation of *Pcpg* (*Phytophthora cinnamomi* polygalacturonase) 16 and *Pcpg* 17. *Journal of Northwest A&F University of (Natural Science Edition)*, 2005, 33(6): 1-6. (in Chinese)
- 巩振辉,吕元红,王晓敏. 樟疫霉多聚半乳糖醛酸酶16和17基因的克隆、测序及其真核表达研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(6):1-6.
- [11] Oskar M, Štefan J. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Engineering*, 2001, 14 (9): 615-631.
- [12] Chen F, Li B, Yang B, Zhang Y. An economical and rapid extraction method for genomic DNA from filamentous fungi. *Life Science Research*, 2010, 14 (2): 122-124. (in Chinese)
- 陈锋菊,李百元,杨冰,张叶纯. 一种经济快速提取丝状真菌基因组DNA的方法. 生命科学研究,2010,14 (2):122-124.
- [13] Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1989, 86 (8): 2172-2175.
- [14] Bendtsen JD, Nielsen H, Heijne GV, Brunak S. Improved prediction of signal peptides-SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340 (4): 783-795.
- [15] Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Bruank S. Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 2004, 15 (2): 153-164.
- [16] Primo ME, Sica MP, Risso VA, Poskus E, Ermacora M. Expression and physicochemical characterization of an extracellular segment of the receptor protein tyrosine phosphatase IA-2. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1764 (2): 174-181.
- [17] Fong JH, Keating AE, Singh M. Predicting specificity in bZIP coiled-coil protein interactions. *Genome Biology*, 2004, 5 (2): 2-10.
- [18] Lambert C, Leonard N, Bolle XD, Depiereux E. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics*, 2002, 18 (9): 1250-1256.
- [19] Benkert P, Schwede T, Tosatto SCE. QMEANclust: estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information. *BMC Structural Biology*, 2009, 9: 35-42.
- [20] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*//Walker JM. The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press Inc. Totowa New Jersey, 2005: 571-607
- [21] Harrison RG. Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein. *Novation*, 2000, 11: 4-7.
- [22] Zhang F, Yue T, Fei J, Yuan Y, Gao Z. Research on measuring method of PG activity. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2004, 13 (4): 134-137. (in Chinese)
- 张飞,岳田利,费坚,袁亚宏,高振鹏. 果胶酶活力的测定方法研究. 西北农业学报,2004,13(4):134-137.

- [23] Markovic O, Janecek S. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. *Protein Engineering Design & Selection*, 2001, 14 (9) : 615-631.
- [24] Shimizu T, Miyairi K, Okuno T. Determination of glycosylation sites disulfide bridges and the C-terminus of *Stereum purpureum* mature endopolygalacturonase I by electrospray ionization mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267 (8) : 2380-2389.
- [25] van Santen Y, Benen JAE, Schroter KH, Kalk KH, Armand S, Visser J, Dijkstra BW. 1.68 Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (43) : 30474-30480.
- [26] Cho SW, Lee S, Shin W. The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 311 (4) : 863-878.

Cloning, prokaryotic expression and bioinformatics of *Rspg1* gene of *Rhizoctonia solani*

Xijun Chen^{1, 2}, Youde Wang¹, Jiahao Zhang¹, Shimin Zuo², Yunhui Tong¹, Xuebiao Pan², Jingyou Xu^{1*}

¹Horticulture and Plant Protection College, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

²Key Laboratory of Plant Functional Genomics of Ministry of Education/Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The study was aimed at understanding the roles of polygalacturonases in the pathogenicity and the interaction between *Rhizoctonia solani* and rice. [Methods] According to the sequences of *Rspg1* of *R. solani* deposited in GenBank, a pair of specific primers was designed. The gene *Rspg1* was cloned and expressed using prokaryotic expression tool to elucidate its biological characteristics. The structures of the protein RsPG1 were predicted using bioinformatics tools. [Results] A 1395-bp fragment including an open reading frame (ORF) of *Rspg1* was amplified from the genomic DNA of the pathogen. Compared with RT-PCR results, it was found that this sequence fragment contains five introns (positions 278-334, 545-601, 657-715, 1090-1155 and 1244-1304) and one 1095 bp ORF. The ORF was predicted to encode 364 amino acids. Bioinformatics analysis showed that RsPG1 contains an 18-amino acid signal peptide and 4 conserved sequence segments (¹⁸⁰NTD, ²⁰²DD, ²²³GHG and ²⁵⁵RIK) characteristic of all the polygalacturonases. The main structural elements of the secondary structure are α -helix, β -sheet and random coil. Six cysteines form three disulfide bonds (Cys²⁴-Cys⁴⁰, Cys²⁰⁴-Cys²²⁰ and Cys³²⁹-Cys³³³). Transmembrane prediction analysis suggested that RsPG1 could be secreted outside the cell. Tertiary structure is a right-handed helix which consisted of ten repeated β -sheet, forming an opening activity cleft. [Conclusion] RsPG1 is tentatively a 40 kDa protein with polygalacturonase enzyme activity at 277.78 U/mg. It is probably a secreted protein and has characteristics of all the polygalacturonases. The results can help to further understand the roles that *R. solani* polygalacturonases play during the pathogenicity and how the pathogen interacts with the host.

Keywords: *Rspg1*, cloning and expression, bioinformatics analysis, *Rhizoctonia solani*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Transgenic Key Project (2014ZX08001-003B) and by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2010305)

* Corresponding authors. Tel: +86-514-87979313; E-mail: jyxu@yzu.edu.cn

Received: 4 September 2013 / Revised: 21 October 2013