

球毛壳菌 60S 核糖体蛋白 L10a 基因克隆与特性分析*

刘志华 杨 谦**

(哈尔滨工业大学生命科学与工程系 哈尔滨 150001)

摘要: 用粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) XP_322380 和赤霉菌 (*Gibberella zeae*) PH-1 (EAA76971) 的 60S 核糖体蛋白 L10a 基因 (60S ribosomal protein L10a, RPL10a) 蛋白序列对球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) ESTs 序列数据库进行 tBlastn 检索, 获得了球毛壳菌 RPL10a cDNA 序列。cDNA 序列长 765 bp, 开放阅读框 654 bp, 编码 217 个氨基酸组成的多肽, 蛋白分子量为 23.9 kD。BlastP 分析表明该基因氨基酸序列与粗糙脉孢菌相似最高为 89%; 与玉蜀黍黑粉菌 (*Ustilago maydis*) 相似性最低为 78%。cDNA 序列及推测的氨基酸序列在 GenBank 登录 (登录号分别为 AY669070, AAT74578)。

关键词: 球毛壳菌, 60S 核糖体蛋白 L10a, 基因克隆, 特性分析, 生物信息学

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0024-05

Cloning and Characterization Analysis of 60S Ribosomal Protein L10a Gene from *Chaetomium globosum**

LIU Zhi-Hua YANG Qian**

(Depa. of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001)

Abstract: The sequence of *Neurospora crassa* (XP_322380) and *Gibberella zeae* PH-1 (EAA76971) ribosomal protein gene were subjected to local tBlastn searching against the *Chaetomium globosum* ESTs database. The 765 bp full length cDNA encoding 60S ribosomal protein L10a gene was obtained. The open reading frame was 654 bp and encoded 217 amino acids. The protein molecular mass was 23.9 kD. The BlastP analysis revealed that amino acids sequence of ribosomal protein L10a gene from *C. globosum* shared 89% high similarity with *N. crassa* and 78% low similarity with *Ustilago maydis*. The cDNA and deduced amino acid sequence of 60S ribosomal protein L10a gene were accepted by GenBank (accession numbers: AY669070, AAT74578).

Key words: *Chaetomium globosum*, 60S ribosomal protein L10a, Gene cloning, Characterization analysis

所有生物中核糖体是催化 mRNA 为导向的蛋白质合成的场所。核糖体 RNA 大约占核糖体的 2/3, 核糖体蛋白大约占 1/3。核糖体蛋白命名与蛋白在核糖体的大小亚基一致, 小亚基核糖体蛋白为 S1 到 S31, 大亚基核糖体蛋白为 L1 到 L44。其中核糖体蛋白 L10a 是大亚基核糖体蛋白的一种。真核生物的核糖体蛋白 L10 与原核生物的核糖体蛋白 L1 相当。尽管目前认为这些核糖体蛋白主要在蛋白质合成中发挥作用, 但越来越多的核糖体蛋白被报道具有各种其它功能, 它们通过参与复制、转录、RNA 加工、DNA 修复等过程在细胞的增殖、凋亡、发育的多种调控和恶性转化等方面发挥作用^[1-3]。

球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*) 通过产生多种抗生素和麦角甾醇类物质来抑制病原菌的生长, 是一种重要的植物病害生物防治菌^[4,5]。本实验室构建了球毛壳菌菌丝

* 国家高新技术发展计划项目 (“863 项目”) (No. 2003AA241140)

** 通讯作者 Tel: 0451-86412952, E-mail: yangq@hit.edu.cn

收稿日期: 2005-03-22, 修回日期: 2005-06-01

cDNA文库,获得了1410条ESTs序列,本研究通过对这些EST数据进行分析,利用生物信息学的方法克隆了球毛壳菌60S核糖体蛋白L10a cDNA完整的编码区序列(CgL10a)。分析氨基酸序列的分子量,等电点等,并对13种真菌60S核糖体蛋白序列L10a进行了多序列比对分析。

1 材料与方法

1.1 全长cDNA序列的克隆与分析

使用BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>)软件构建1410 ESTs数据库(DDBJ Accn: BP383878-BP383850, BP113368-BP113050, BP100102-BP098896)^[6]。使用粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*, XP_327967)和赤霉菌(*Gibberella zeae* PH-1, P35143)60S核糖体蛋白L10a基因的氨基酸序列对球毛壳菌ESTs序列数据库进行tBlastn比对,Contig拼接获得全基因。

用ProtParam (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>)软件计算分子量,等电点,不稳定系数。

1.2 蛋白家族预测

用BlastP预测保守区;用Pfam 14.0 (<http://pfam.wustl.edu/hmmserach.shtml>)预测蛋白家族。

1.3 序列相似性分析

用BlastP寻找相似性序列,选择与其相似性高的12种不同真菌的60S核糖体蛋白L10a的氨基酸序列,利用ClustalW软件对13个氨基酸序列进行多序列比对。所选序列如下杜仲种腐病菌(*Ashbya gossypii*) AAS53258;烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) CAE47895;白色念珠菌(*Candida albicans*) CAB56219;光滑假丝酵母(*Candida glabrata*) CAG60122;汉逊氏德巴利酵母菌(*Debaryomyces hansenii*) CAG85905;玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae*) EAA76971;乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*) XP_451620;粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) XP_322380;酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) NP_015104;粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) NP_587891;玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*) EAK85891; *Yarrowia lipolytica* CAG80264。

1.4 进化树构建

用ClustalW软件构建上述13种真菌60S核糖体蛋白L10a的氨基酸序列N-J进化树。

2 结果与分析

2.1 cDNA与推断的氨基酸序列分析

tBlastn相似性搜索获得2条同源性高的球毛壳菌核糖体蛋白L10a基因ESTs序列(BP113174, BP099196)。通过对2条序列拼接获得60S核糖体蛋白L10a cDNA。60S核糖体蛋白L10a的cDNA序列已经提交GenBank注册,接受号为AY669070。cDNA长765 bp,编码217aa(图1)。编码区长度654 bp。3'UTR 33 bp, 5'UTR 76 bp。ProtParam预测表明该蛋白的分子量为23.9 kD,理论等电点为9.90。不稳定系数为31.43,这类蛋白是稳定的蛋白质。负电荷的氨基酸残基数(Asp + Glu)为19,正电荷的氨基酸残基数(Arg + Lys)为36。

```

1   T CGA ACT CCG CAA CTT TCT CGT CTA CGA CCG AAT AAA CCT GAC CTA TAG AAG AAA TTC 58
59  TAC TGG AAG ACG GCC ATC ATG TCT AAA ATT ACC GTC GCC GGT GTG CGT CAG AAC GTT GCT 118
      N S K I T V A G V R Q N V A
119 GAG CTC CTG GAG TAC AGC AAC GAG ACC AAG AAG CGT AAC TTT CTG GAG ACC GTC GAA CTC 178
      E L L E Y S N E T K K R N F L E T V E L
179 CAG ATC GGC CTC AAG AAC TAT GAC CCC CAG CGT GAC AAG CGT TTC TCC GGC ACT GTC AAG 238
      Q I G L K N Y D P Q R D K R F S G T V K
239 CTG CCG TCG GTC CCC GCG CCG AAC ATG GCC ATC TGC ATT CTC GGT GAC CAG CAC GAT ATT 298
      L P S V P R P N N A I C I L G D Q H D I
299 GAC ACG GCC AAG CAG GGC GGT GTC GAT GCC ATG AGC GCC GAC GAC TTG AAG AAG CTC AAC 358
      D R A K H G G V D A N S A D D L K K L N
359 AAG AAG AAG AAG CTC ATC AAG AAG CTG GCT CCG AAG TAG GAT GCC TTC GTC GCC TCC GAC 418
      K N K K L I K K L A R K Y D A F V A S D
419 ACC CTG ATC AAG CAG ATC CCC CGT CTG CTT GGC CCC GGT CTT TCC AAG GCT GGC AAG TTC 478
      T L I K Q I P R L L G P G L S K A G K F
479 CCT ACC CCC GTC TCG CAG GCC GAC GAC CTC AGC GCC AAG ATT ACC GAG GTC AAG TCG AGC 538
      P T P V S H A D D L S A K I T E V K S T
539 GTC AAG TTC CAG CTC AAG AAG GTC CTG TGC ATG GGT GTC GCT GTC GGC AAC GTC GGC ATG 598
      V K F Q L K K V L C N G V A V G N V G N
599 ACC TCG GAC CAG CTG ATC GCC AAC ATC ATG TTG GCC ATC AAC TAC CTG GTC TCG CTG CTC 658
      T S D Q L I A N I N L A I N Y L V S L L
659 AAG AAG GGC TGG CAG AAC GTT GGT AGC CTG ACC ATC AAG GCT ACC ATG TCG CCT CCC AAG 718
      K K G W Q N Y G S L T I K A T N S P P K
719 CGC ATC TAC TAA GCG CCG GGA TGC CGT GTG CAT CGA CCA TGG GGG 765
      R I Y *

```

图1 60S核糖体蛋白L10a cDNA及推断的氨基酸序列

2.2 蛋白家族预测

从图中可以看出与60S ribosomal protein匹配的保守区共有1个(图2)。与其相对应的蛋白质家族为pfam00687, Ribosomal_L1, Ribosomal protein L1p/L10e 家族。该家族包括原核生物的核糖体蛋白L1和真核生物核糖体蛋白L10。207个匹配的氨基酸残基中96.6%完全保守, 分数为133, 期望值为 $2e-32$ 。因此, 以序列相似性为基础, 认为核糖体蛋白L10a属于核糖体蛋白L1p/L10e家族。



图2 保守区预测

2.3 序列相似性

13种真菌60S核糖体基因同源性分析结果见图3。可以看出氨基酸个数从216~217个不等。各种真菌60S RPL10a氨基酸个数相差仅1个。完全保守的氨基酸数为231个, 占总氨基酸数的69%。球毛壳菌60S RPL10a基因与粗糙脉胞菌相似性最高为89%; 与玉米黑粉菌相似性最低为78%。这些说明真菌的60S RPL10a氨基酸进化上具有高度保守性, 适合进化关系研究。

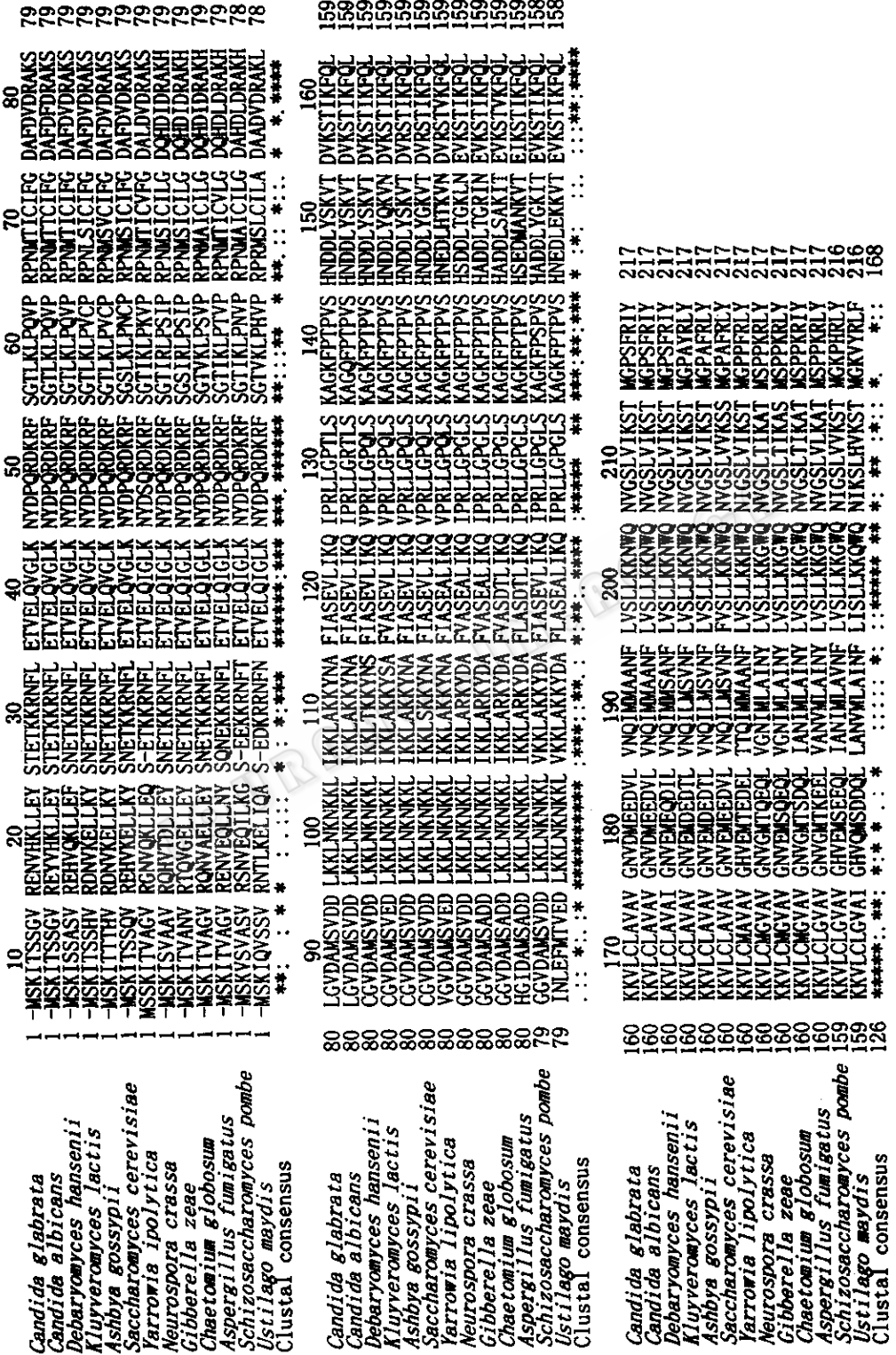


图3 多序列比对

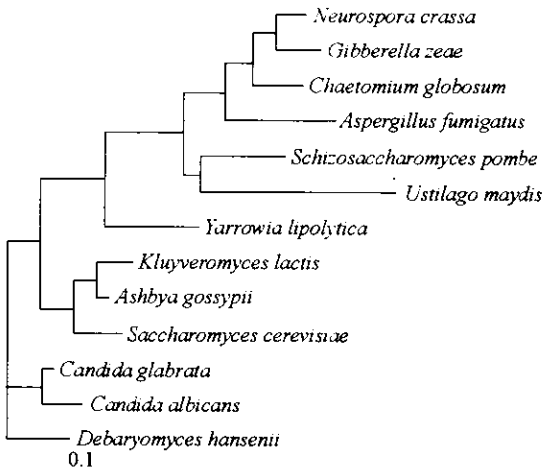


图4 核糖体蛋白 L10a 的 N-J 树

一个分支上。核糖体蛋白 L10a 分子分类基本符合 13 种真菌形态分类规律。

3 讨论

通过构建球毛壳菌 ESTs 数据库,并用其它真菌的 RPL10a 基因的氨基酸序列对该数据库进行 tBlastn 比对,成功地获得了球毛壳 RPL10a 基因的 ESTs 序列,通过序列拼接,获得了 CgL10a 基因全长 cDNA,该方法具有针对性强,快速、简捷的特点,减少了对 ESTs 全面分析的工作量。因此,是一种理想的生物信息学手段克隆基因的方法。

在基因表达的翻译调控中核糖体蛋白 L10a 起调控作用^[7]。大肠杆菌核糖体蛋白 L1、L10、S7、S8 和 S4 参与自体翻译调控,它们都可以与各自 mRNA 上的顺反子专一性地结合从而抑制其翻译^[1]。溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*) 核糖体蛋白 L10 有抑制细胞增殖的功能,与人的肿瘤抑制蛋白 (QM protein) 具有相似性^[8]。60S 核糖体蛋白 L10a (RPL10a) 重新恢复了酵母菌 (*S. cerevisiae*) yap1 缺陷株的抗氧化能力^[9]。因此 RPL10a 不仅是核糖体的重要组成部分,在生物体中还行使其他功能。

目前,对微生物核糖体蛋白基因的克隆已有报道^[10],但国内尚无核糖体蛋白 L10a 研究的报道。因此,60S 核糖体蛋白 L10a 基因的成功克隆对研究球毛壳菌的生命活动,及对球毛壳菌进行分子分类和建立与其它菌种之间的系统发育关系奠定基础。

参考文献

- [1] Wool I G. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 164 ~ 165.
- [2] Chen F W, Ioannou Y A. Int Rev Immunol, 1999, 18: 429 ~ 448.
- [3] Naora H. Immunol Cell Biol, 1999, 77: 197 ~ 205.
- [4] Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Phonkerd N, et al. Planta Med, 2002, 68 (9): 834 ~ 836.
- [5] Reissinger A, Winter S, Steckelbroeck S, et al. Mycol Res, 2003, 107 (Pt 9): 1094 ~ 1102.
- [6] 金红星, 杨 谦. 高技术通讯, 2004, 7: 34 ~ 37.
- [7] Karl T, Onder K, Kodzius R, et al. Curr Genet, 1999, 34 (6): 419 ~ 429.
- [8] Chavez-Rios R, Arias-Romero L E, Almaraz-Barrera Mde J, et al. Mol Biochem Parasitol. 2003, 127 (2): 151 ~ 160.
- [9] Mendez-Alvarez S, Rufenacht K, Eggen R I. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 267 (3): 953 ~ 959.
- [10] 蔡 红, 陈 惠, 李 凡, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (1): 34 ~ 37.

2.4 分子进化 N-J 树

选择了 13 种真菌 L10a 蛋白氨基酸序列进行比较,如图 4 发现球毛壳菌 L10a 蛋白与粗糙脉孢菌和米曲霉及烟曲霉最为接近,列在一个分枝上。这 4 种真菌分类地位同属于子囊菌门 (Ascomycota), 盘菌纲 (pezizomycotina) 说明了这条基因在进化上的地位。白色念珠菌与光滑假丝酵母属于酵母菌的两个不同种列在一个分支上。另外酿酒酵母、乳酸克鲁维酵母、杜仲种腐病菌形态分类上同属于 Ascomycota、Saccharomycotina、Saccharomycetes、Saccharomycetales、Saccharomycetaceae, 因此在一