

狗枣猕猴桃钙调节蛋白基因生物信息学分析

李然红^{1,2}, 董世鹏², 陈鑫², 安文和²

[1. 植物生物学黑龙江省高校重点实验室(哈尔滨师范大学), 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157012]

摘要: 通过NCBI查找到狗枣猕猴桃钙调节蛋白基因序列, 利用生物信息学方法对该基因编码蛋白的理化性质、二维结构、三维结构、糖基化位点、所属蛋白家族、代谢途径、进化地位等信息进行了预测。结果表明, 该蛋白富含天冬氨酸和谷氨酸, 不含N-糖基化位点和O-糖基化位点, 属于EF-hand蛋白家族, 在钙信号、cAMP信号转导及植物与病原菌的相互作用、细胞减数分裂等过程中均有重要作用。

关键词: 狗枣猕猴桃; 钙调节蛋白; 生物信息学; 蛋白家族; 代谢途径

中图分类号: S663.4; Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)02-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2015.02.001

Bioinformatics Analysis of Calmodulin gene in *Actinidia kolomikta*

LI Ran-hong^{1,2}, DONG Shi-peng², CHEN Xin², AN Wen-he²

(1. Key Laboratory of Plant Biology, College of Heilongjiang Province, Harbin Normal University, Harbin Heilongjiang 150025, China; 2. College of Life Sciences and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang Heilongjiang 157012, China)

Abstract: The Calmodulin gene of *Actinidia kolomikta* was found through Genebank of NCBI. And the physical and chemical properties, two-dimensional structure, three-dimensional structure, glycosylation sites, protein family, metabolic pathways and other informations of the Calmodulin in *Actinidia kolomikta* were predicted by bioinformatics methods. The results showed that the protein is rich in glutamic acid and aspartic acid, does not contain N-glycosylation sites and O-glycosylation sites, belongs to the EF-hand protein family, which plays an important role in the calcium signal and cAMP signal transduction, meiosis and pathogen interaction.

Key words: *Actinidia kolomikta*; Calmodulin; Bioinformatics; Protein family; Metabolic pathways

狗枣猕猴桃 (*Actinidia kolomikta*), 别名狗枣子, 属猕猴桃科猕猴桃属藤本植物, 是最为耐寒的猕猴桃种类之一^[1], 其果实酸甜可口、柔软多汁, 富含多种氨基酸、维生素和矿物质^[2-3], 具有强壮、解热及收敛、调节人体血液中 pH、使血液保持鲜红, 增加其输送氧气、营养物质等多种医疗保健功能^[4-5], 以及降血脂、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等医药功能^[6-8]。狗枣猕猴桃雄株叶片上半部分常变成白色或者粉色, 直至紫红色, 也是非常好的观叶树种。钙调节蛋白是一种能与钙离子结合从而调节细胞代谢途径的蛋白质, 在真核生物细胞中起到至关重要的作用^[9]。该研究通过生物信息学的方法, 对狗枣猕猴桃钙调蛋白基因及蛋白进行了理化性质、三维结构、糖基化位

点、所属蛋白家族、代谢途径等信息进行了预测, 以期为其生物学特性的研究及应用奠定理论基础。

1 材料与方法

通过 NCBI 在线搜索, 查找到狗枣猕猴桃钙调节蛋白基因及其编码序列(GenBank: EF441489.1), 用 BlastP 进行同源性搜索, 理化性质用 ProtParam 进行分析, 三维结构用 Geno3D 进行预测, 用 Net-NGlyc 对 N-糖基化位点进行预测, NetOGlyc 对 O-糖基化位点进行预测, Pfam 进行蛋白家族预测, KEGG 进行代谢途径预测。

2 结果与分析

2.1 理化性质预测

通过 ProtParam 对狗枣猕猴桃钙调蛋白理化性质进行预测, 结果表明, 该蛋白由 148 个氨基酸

收稿日期: 2015-01-15

基金项目: 哈尔滨师范大学“植物生物学重点实验室”开放项目(ZK201208); 植物生物学黑龙江省高校重点实验室(哈尔滨师范大学)开放基金

作者简介: 李然红(1981—), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士, 讲师, 主要从事遗传学、基因工程研究。联系电话: (0)13904830428。E-mail: swxlrh@126.com

构成, 分子量 16699.4 D, 等电点为 4.10, 富含天冬氨酸和谷氨酸。该蛋白共有 4 个钙离子结合位点, 1 个钙离子需要 4 个氨基酸来结合, 如封三图 1 所示。

2.2 多序列比对

通过 BlastP 对狗枣猕猴桃钙调节蛋白进行同源性搜索, 结果表明, 该蛋白与葛枣猕猴桃、美丽猕猴桃、拟南芥、胡萝卜、玉米、甜橙等多种植物的蛋白序列有相似性。选取其中部分序列进行比对发现, 钙调节蛋白在不同生物细胞内结构保守性很强, 有人推测若该蛋白结构发生突变很可能被致死, 因而在整个进化过程中都始终保持结构的保守性^[10]。

选取的序列如下: 狗枣猕猴桃钙调节蛋白 (ABR21730.1), 海枣钙调节蛋白 (XP_008810798.1), 谷子钙调节蛋白 (XP_004961666.1), 拟南芥 z-box 结合因子 (CAM12360.1), 葛枣猕猴桃钙调节蛋白 (ABR21756.1, ABR21757.1), 美丽猕猴桃钙调节蛋白 (ABR21718.1), 绿豆钙调节蛋白 (ABG82015.1), 甜菊钙调节蛋白 (AAL79908.1), 野生大豆钙调节蛋白 (KHN34595.1), 甘薯钙调节蛋白 (ACG63497.1), 玉米钙调节蛋白 (NP_001105490.1, NP_001167662.1), 菠菜钙调节蛋白 (P04353.2), 胡萝卜钙调节蛋白 (AAQ63461.1, AAT73619.1), 北美云杉钙调节蛋白 (ABK22713.1), 甜橙钙调节蛋白 (XP_006470430.1)。其中, 狗枣猕猴桃钙调节蛋白与海枣钙调节蛋白 (XP_008810798.1) 的同源性

最高(封三图2)。

将选取的序列进行进化树分析, 结果表明, 狗枣猕猴桃钙调节蛋白 (ABR21730.1) 与海枣钙调节蛋白 (XP_008810798.1) 的亲缘关系最近, 而与甜橙钙调节蛋白 (XP_006470430.1) 的亲缘关系最远(图3)。

2.3 二级结构预测

用 ExPASy 的 SOPMA 软件在线对狗枣猕猴桃钙调节蛋白的二级结构进行预测, 结果如封三图 4 所示。组成狗枣猕猴桃钙调节蛋白的 148 个氨基酸中, 其中 90 个氨基酸可能会形成 α 螺旋, 38 个可能形成无规则卷曲, 13 个可能形成 β -转角, 7 个可能形成延伸连。

2.4 三维结构预测

用 Geno3D 对狗枣猕猴桃钙调节蛋白进行预测, 结果如封三图 5 所示。该蛋白含有 2 个 EF-hand 结构域, 每个结构域由 2 个 α 螺旋及其中间的一个短的非螺旋结构连接, 为钙离子的结合位点。

2.5 糖基化位点预测

通过 NetNGlyc1.0 server 对狗枣猕猴桃钙调节蛋白 N-糖基化位点进行预测, 结果表明, 该蛋白内有 2 个潜在的 N-糖基化位点, 但是由于该蛋白在细胞质内发挥作用, 不含有信号肽序列, 因此很有可能不含 N-糖基化位点。采用 NetOGlyc4.0 server 对 O-糖基化位点进行预测, 预测分数均小于 0.5, 故推测该蛋白内不含 O-糖基化位点。

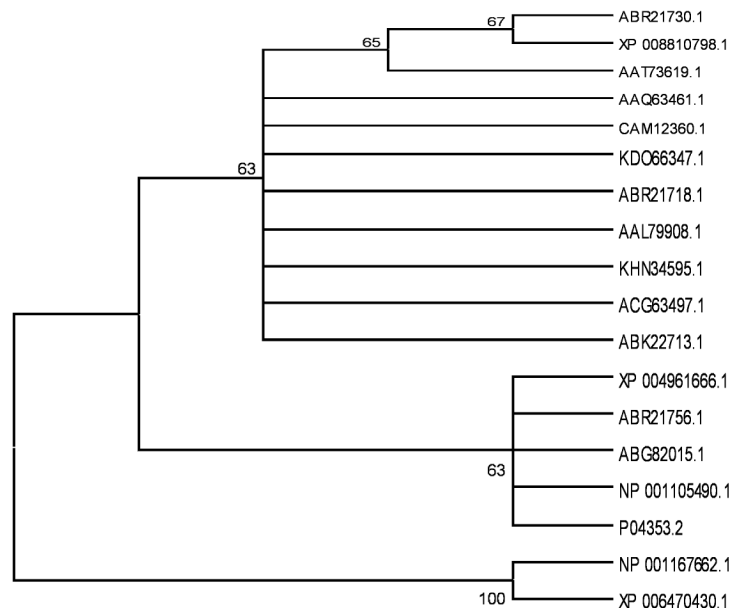


图3 狗枣猕猴桃钙调节蛋白相似性序列进化树

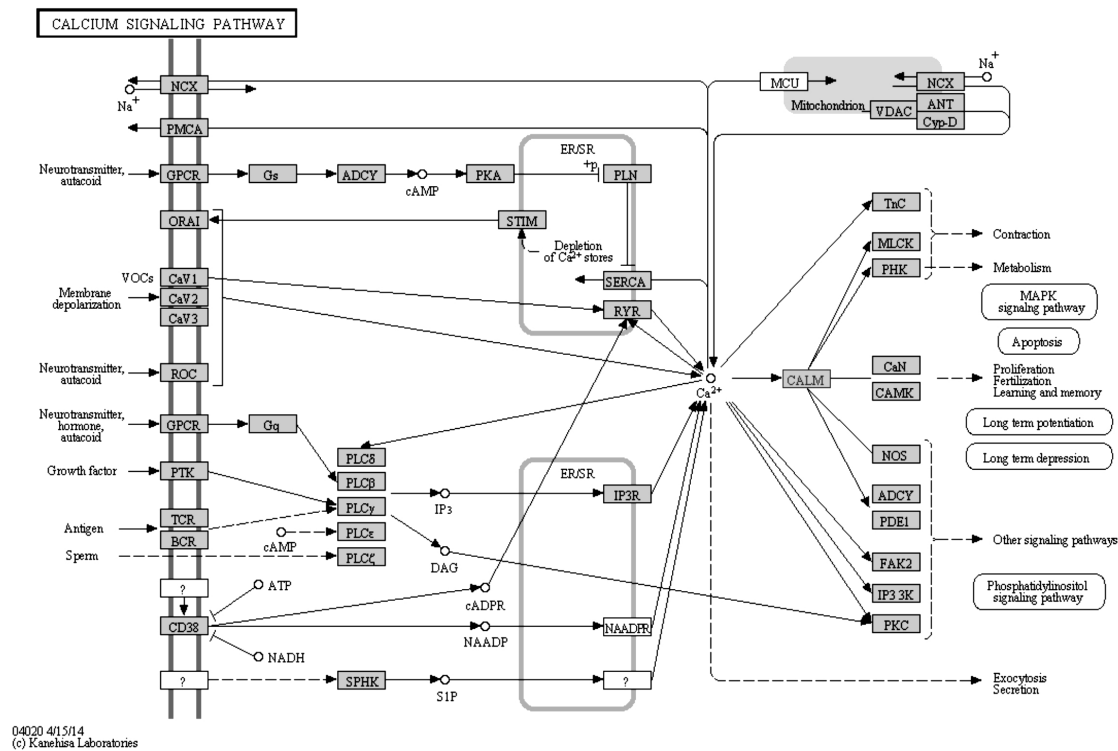


图 7 狗枣猕猴桃钙调节蛋白参与钙信号转导途径

2.6 所属蛋白家族预测

通过 Pfam 对狗枣猕猴桃钙调节蛋白所属蛋白家族进行预测，结果表明，该蛋白含有 EF-hand 结构域，属于 EF-hand 7 蛋白亚家族。EF-hand 具有 helix-loop-helix 结构域，是钙结合蛋白这个大家族中的一员，EF-hand 结构域包含一个 helix-loop-helix 的拓扑结构，就像人手的大拇指和食指，在这个结构当中，Ca²⁺ 由配体协调连接在环中。EF-hand 包含 2 个 α 螺旋，2 个 α 螺旋由一个较短的环连接，这个环通常由 12 个氨基酸组成，通常是连接钙离子的位点(封三图6)。

2.7 代谢途径分析

用 KEGG 对狗枣猕猴桃钙调节蛋白代谢途径进行分析，结果表明，该蛋白参与 Rap1、钙信号、cGMP-PKG、cAMP、磷脂酰肌醇等信号途径(图 7)。最重要的是其通过直接或间接调节胞内各种代谢调节剂如激素、第二信使(钙离子和 cAMP)代谢，进而对至少 15 种重要代谢相关的酶起调节作用，间接参与细胞的代谢活动。

3 结论

狗枣猕猴桃钙调节蛋白属于 EF-hand 7 蛋白家族，由 148 个氨基酸构成，分子量 16 699.4 D，

富含天冬氨酸和谷氨酸，这 2 种氨基酸属于酸性氨基酸，因而使该蛋白等电点呈偏酸性，为 4.10。其序列具有高度保守性，多序列比对结果表明其与海枣钙调节蛋白同源性最高。狗枣猕猴桃钙调节蛋白不含 N-糖基化位点和 O-糖基化位点，这可能与其不是分泌型蛋白有关；狗枣猕猴桃钙调节蛋白是钙离子信号应答的关键蛋白，并且参与 Rap1、钙信号、cGMP-PKG、cAMP、磷脂酰肌醇等信号途径。

参考文献:

- [1] 赵瑞艳, 付钧钧, 张海军. 狗枣猕猴桃的开发利用[J]. 中国林业, 2007(24): 42.
- [2] 苏玉彤, 张增江, 刘长武. 狗枣猕猴桃利用价值及开发前景[J]. 特种经济动植物, 2014(6): 46-47.
- [3] 陈显锋, 王玉红, 卜庆军. 浅谈狗枣猕猴桃的开发利用[J]. 中国林副特产, 2013(3): 105-106.
- [4] 李平亚, 卢爱平, 马冰如, 等. 狗枣猕猴桃根化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 1992, 17 (7): 420-421; 446.
- [5] 贾明月, 陈嘉峰, 杨东娜, 等. 狗枣猕猴桃叶提取物黄酮对大鼠急性脑缺血后 caspase-3、VEGF 表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010(6): 514-517.
- [6] 黄瑾, 郑玉建, 王维山, 等. 狗枣猕猴桃根对小鼠抗氧化作用[J]. 中国公共卫生, 2008(1): 75-76.

两个双孢蘑菇菌株在高海拔地区夏季栽培中的表现

刘明军, 张桂香, 任爱民, 杨建杰, 耿新军

(甘肃省农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 通过品比和中试试验, 观察了双孢蘑菇菌株 W2000、W192 在甘肃省高海拔地区夏季栽培中的表现。结果表明, 双孢蘑菇菌株 W2000、W192 在甘肃省高海拔地区夏季采用一次性发酵料平面栽培, 菇体洁白, 圆整, 肉厚, 菌柄短小。在品比试验中产量分别为 11.05、10.9 kg/m², 较当地主栽品种 As2796 分别增产 28.8%、27.0%; 在中试中产量分别为 10.07、9.91 kg/m², 较当地主栽品种 As2796 分别增产 19.2%、17.3%。两个菌株均表现耐高温, 死菇少, 病虫害发生轻, 适宜在高海拔地区夏季栽培。

关键词: 双孢蘑菇; 菌株; W2000; W192; 高海拔地区; 夏季栽培

中图分类号: S646 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2015)02-0004-03

doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2015.02.002

双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 别称白蘑菇、蘑菇、洋蘑菇、西洋松茸^[1-3], 是世界上人工栽培最广、产量最高、消费量最大的食用菌, 具有重要的经济价值^[4-5]。我国是世界双孢蘑菇科研、生产、加工与出口大国^[6-7]。甘肃省高海拔沿祁连山冷凉区夏季双孢蘑菇产业近几年发展迅速, 年生产规模在 150 万 m² 以上。自 2004 年以来, 双孢蘑菇栽培一直沿用当家菌株 As2796, 但因使用时间较长, 其菌株当初显现的优良品质和抗逆性正逐年降低, 在生产上表现产量不稳定等退化现象, 造成单产低下, 经济效益下降。2011 年我们引进 W192、W2000 菌株, 经品比和中试试验, 综合表现优良, 现将试验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株 W192、W2000、As2796(CK) 一级种均由福建省农业科学院提供, 经扩接成二级、三级麦粒菌种备用。供试培养料配方为每 100 m² 用大麦草 1 500 kg、牛(羊)粪 1 500 kg、尿素 15 kg、普

通过磷酸钙 30 kg、石膏粉 30 kg、石灰 15 kg、油渣 120 kg。

1.2 试验方法

试验于 2011、2012 年 4—10 月设在甘肃省永昌县焦家庄乡南沿沟村(海拔 2 100 m)。2011 年进行品种比较试验, 单因素随机区组设计, 小区面积 18 m², 3 次重复, 采用一次性发酵料平面栽培。2012 年进行中试试验, 每品种栽培面积 90 m², 3 次重复, 随机排列, 一次性发酵料平面栽培。2 a 试验期间均观察记载菌丝长势及浓密程度, 测定栽培种菌丝 5 d 的平均长速、出菇期、平均单菇重, 记载菇棚出菇期温度及对环境的适应性等, 统计各菌株前 4 潮菇的产量, 并对商品性进行评价, 对产量进行方差分析。以产量和商品性指标为主评价其性状优劣。

2 结果与分析

2.1 菌丝在麦粒菌种培养瓶中生长表现

2011 年试验观察结果(表 1)表明, 在麦粒原种培养基上, W2000、W192 和 As2796(CK) 均表现菌

收稿日期: 2014-10-14

基金项目: 国家现代农业产业技术体系兰州综合试验站 (CARS-24)

作者简介: 刘明军 (1977—), 男, 甘肃白银人, 助理研究员, 主要从事食用菌栽培工作。联系电话: (0931)7614702。

E-mail: gs_lmj@163.com

[7] 左丽丽. 狗枣猕猴桃多酚的抗氧化与抗肿瘤效应研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013: 9.

[8] GUAN D, ZHANG Z, YANG Y, *et al.* Antioxidant and antitumor activities of water extracts from the root of *Actinidia kolomikta* [J]. *Exp. Ther. Med.*, 2011, 2(1): 33-39.

[9] SONG Z, CHEN Q, DING Q, *et al.* Function of Ca

(2+)-calmodulin-dependent protein kinase IV in Ca (2+)-stimulated neuronal signaling and behavior [J]. *Sci. China Life Sci.*, 2015, 58(1): 6-13.

[10] 梁秋芬, 刘宽灿, 徐碧玉, 等. 钙调蛋白在植物发育中的功能 [J]. *生命科学研究*, 2005(S2): 1-5.