

马铃薯腐烂茎线虫类毒液过敏原蛋白基因 cDNA 全长的克隆与序列分析

王秉宇^{1,2} 彭德良² 黄文坤² 彭 煊² 王高峰²

1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118;

2. 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

摘要 以马铃薯腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor*)为材料,用RACE方法,获得了类毒液过敏原蛋白新基因 *Dd-vap-2* 的 cDNA 全长(GenBank 登录号为 GU370352)。该 cDNA 全长序列为 1 150 bp,包括 1 个 912 bp 的完整 ORF,编码 1 个含 303 个氨基酸的蛋白,其理论分子质量为 31.8 ku,等电点 pI 为 6.76。序列比对分析表明, *De-vap-2* 基因含有保守性结构域,属于富含半胱氨酸分泌蛋白(cysteine-rich secretory protein, CRISP)家族成员,N 端具有 21 个氨基酸残基组成的信号肽。系统进化树分析表明,该基因与马铃薯金线虫(*Globodera rostochiensis*) 和大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines*) 分泌的类毒液过敏原蛋白属于同一支,亲缘关系较近。

关键词 马铃薯腐烂茎线虫; 类毒液过敏原蛋白基因; 富含半胱氨酸分泌蛋白家族

中图分类号 S 432.4⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)02-0182-05

植物寄生线虫是引起植物病害的重要病原。马铃薯腐烂茎线虫引起的甘薯茎线虫病(*Ditylenchus destructor* Thorne)是我国甘薯产区的重要病害之一^[1]。类毒液过敏原蛋白是富含半胱氨酸分泌蛋白(cysteine-rich secretory protein, CRISP)家族的一员^[2],该家族蛋白在植物和动物中分布广泛。类毒液过敏原蛋白基因是一种在植物线虫侵染过程中起重要作用的基因,在动物线虫方面研究较多^[3]。该基因最早在线虫中的相关报道来自动物寄生线虫犬钩口线虫(*Ancylostoma caninum*)^[4],该类蛋白被认为对 *A. caninum* 从自由生活阶段向寄生阶段转变具有重要作用;旋盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)^[5] 及自由生活线虫秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)^[6] 中也有发现和报道。该类基因目前在根结线虫(*Meloidogyne* spp.) 和大豆孢囊线虫(*Heterodera glycines*)^[7-9] 上已被分离鉴定。

Ding 等^[7] 从南方根结线虫中克隆了第 1 个类毒液过敏原蛋白基因 *Mi-msp-1*, Northern 杂交分析显示该基因在侵染前 2 龄幼虫和侵染期 2 龄幼虫均有信号,但在成熟雌虫中未检测到信号。Wang 等^[2] 从南方根结线虫中获得第 2 个类毒液过敏原蛋白基因 *Mi-vap-2*, 原位杂交试验显示该基因定位

在线虫的亚腹食道腺, RT-PCR 证实该基因与果胶酸裂解酶基因和分支酸变位酶基因类似,在侵染前 2 龄幼虫和侵染早期阶段的 2 龄幼虫中表达较高。在根结线虫和孢囊线虫中,这类蛋白包含分泌信号肽,表达场所在亚腹食道腺,在植物寄生线虫与寄主互作的功能还不明确。而编码在植物食道腺细胞表达的分泌蛋白的基因,对于线虫寄生植物起关键的作用^[6]。虽然目前对毒液过敏原蛋白的确切生物功能研究还不很清楚,但研究表明类毒液过敏原蛋白基因可能在植物线虫寄生寄主的早期阶段发挥重要作用^[7]。

克隆在食道腺细胞的编码分泌蛋白的寄生基因对理解线虫对植物的寄生起关键作用^[8]。目前国内外没有马铃薯腐烂茎线虫类毒液过敏原蛋白基因的报道,笔者首次从危害甘薯的马铃薯腐烂茎线虫中克隆到类毒液过敏原蛋白基因(*Dd-vap-2*)。

1 材料与方法

1.1 供试材料

利用中国农业科学院植物保护研究所线虫实验室已有的马铃薯腐烂线虫纯培养体系,从河北省昌黎县田间采集病薯,分离马铃薯腐烂线虫后,手工挑

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871627)和国家重大基础研究发展计划(973)项目(2009CB119200)

王秉宇, 硕士研究生, 研究方向: 植物线虫生物学及防治技术, E-mail: wangbingwoogimhong@163.com

通讯作者: 彭德良, 博士, 研究员, 研究方向: 线虫分子生物学及生物安全, E-mail: dlpeng@ippcaas.cn

取单条雌虫和单条雄虫在半裸镰刀菌(*Fusarium semitectum*)进行纯培养^[10]。待马铃薯腐烂线虫在菌落上生长 30 d 后收集线虫备用。

TRIzol 试剂, SuperScript™ II First-Strand Synthesis System-Version 2.0 (Invitrogen, Madison, USA); EX Taq DNA 聚合酶, 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 扩增试剂盒(TaKaRa 公司, 大连); 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技有限公司, 北京), 大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 DH5 α ; pGEM-T easy 系统试剂盒(Promega, Madison, USA)。

1.2 cDNA 的合成

采用 TRIZOL 试剂提取总 RNA。cDNA 第 1 链合成采用 Invitrogen SuperScript™ II First-Strand Synthesis System 试剂盒, 具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.3 3'端第 1 链 cDNA 的合成

采用 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 扩增试剂盒, 3'RACE cDNA 合成的反应体系为 10 μ L, 含有 1 μ L 3'RACE Adaptor (5 μ mol/ μ L) 引物, 2 μ L 的 5 \times 缓冲液, 0.25 μ L RNase Inhibitor (40 U/ μ L), 1 μ L dNTP 混合物(10 mmol/L), 0.25 μ L M-MLV (200 U/ μ L), 反转录酶 1 μ L 总 RNA (1 μ g/ μ L) 和 4.5 μ L 的 DEPC 处理水。将反应体系在 42 $^{\circ}$ C 保温 60 min 以完成 cDNA 第 1 链的合成。

1.4 EST 序列验证

根据笔者所在实验室构建的甘薯茎线虫的全长 cDNA 文库的 EST 片段序列信息, 采用 Primer5.0 软件设计特异性引物 TF: 5'-AAGCTCT CAGACGAAGGAATGG-3' 和 TR: 5'-GGTTC CACTCAGTCTGGGTCAA-3' 进行 EST 片段验证。以 *D. destructor* 总 cDNA 为模板, 用正向引物 TF 和反向引物 TR 进行 PCR 反应, PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。

1.5 3'RACE

根据笔者所在实验室构建的甘薯茎线虫全长 cDNA 文库的 EST 片段序列信息, 通过生物信息学分析发现该 EST 序列含有完整的 5'端, 因此只采用 Primer5.0 软件设计 3'端特异性引物 3RVAPB-99: 5'-CTCAGACGAAGGAATGGAATCT-3' 和 3RVAPB-539: 5'-GCCATTGGTCTCAGCAAG

CATG-3'。以 *D. destructor* 总 cDNA 为模板, 通过巢式 PCR 获得了 *vap3'* 完整序列。用 3RVAPB-99 和 3' RACE Outer Primer (5' - TACCGTCGTTC CACTAGTGATTT-3') 为正反向引物, 进行第 1 次 PCR 反应。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。将第 1 次 PCR 产物稀释 200 倍为模板, 用 3RVAPB-539 和 Inner Primer (5' - CGCGGATC CTCCACTAGTG ATTTCACTATAGG-3') 为引物, 进行第 2 次 PCR 反应, 30 个循环。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。第 2 次扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 回收目的片段, 再进行连接、转化、克隆和 PCR 检测后, 利用 ABI 377 型测序仪测序(北京华大基因研究中心)。

1.6 类毒液过敏原蛋白基因 cDNA 全长扩增

将 EST 序列和 3'端序列拼接后, 利用 Primer 5.0 软件设计全长 cDNA 特异引物对序列进行确认。F1: 5'-TGACAGCCGCCTCTAAT-3'; R1: 5'-GTTGGTCGTGTCCGTGTT-3'。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 回收目的片段, 再进行连接、转化、克隆和菌液 PCR 检测后测序。

1.7 类毒液过敏原蛋白基因 cDNA 序列分析

分别使用 DNASTar 和 DNAMAN 进行核苷酸序列的翻译和氨基酸序列的比对分析。使用在线工具 http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html 进行蛋白质分子质量的预测。使用 Signal P 3.0 Server 在线工具 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> 预测蛋白质前体信号肽。使用在线工具 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> 对蛋白质序列中可能存在的 N 糖基化位点进行预测。使用 MEGA 4.0 的邻位法(neighbor joining, NJ) 法进行分子系统树的构建。

2 结果与分析

2.1 EST 片段验证及 cDNA 的克隆和序列分析

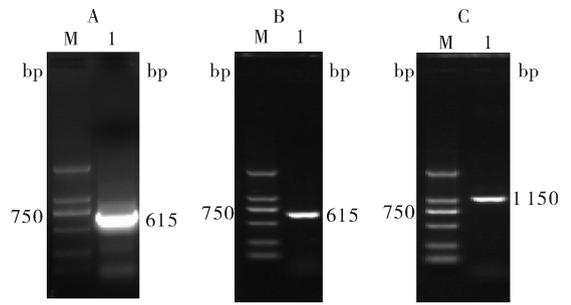
使用特异引物 TF 和 TR 为正反向引物进行 PCR 扩增, 电泳检测发现 PCR 产物只有 1 个条带(图 1-A), 对其进行回收, 测序表明其长度为 615 bp。经 BLAST 查询, 证实此片段与其他植物寄生线虫的 *vap*EST 部分序列具有高度同源性。通过

生物信息学分析发现该 EST 序列含有完整的 5' 端。

使用特异引物 3RVAPB-99 和 3RVAPB-539 进行巢式 PCR 扩增,电泳检测发现 RACE-PCR 产物只有 1 个片段(图 1-B),对其进行回收,测序表明其长度为 615 bp,经 BLASTX 比对,证实此片段与其他植物寄生线虫的 vap 部分序列具有高度同源性。

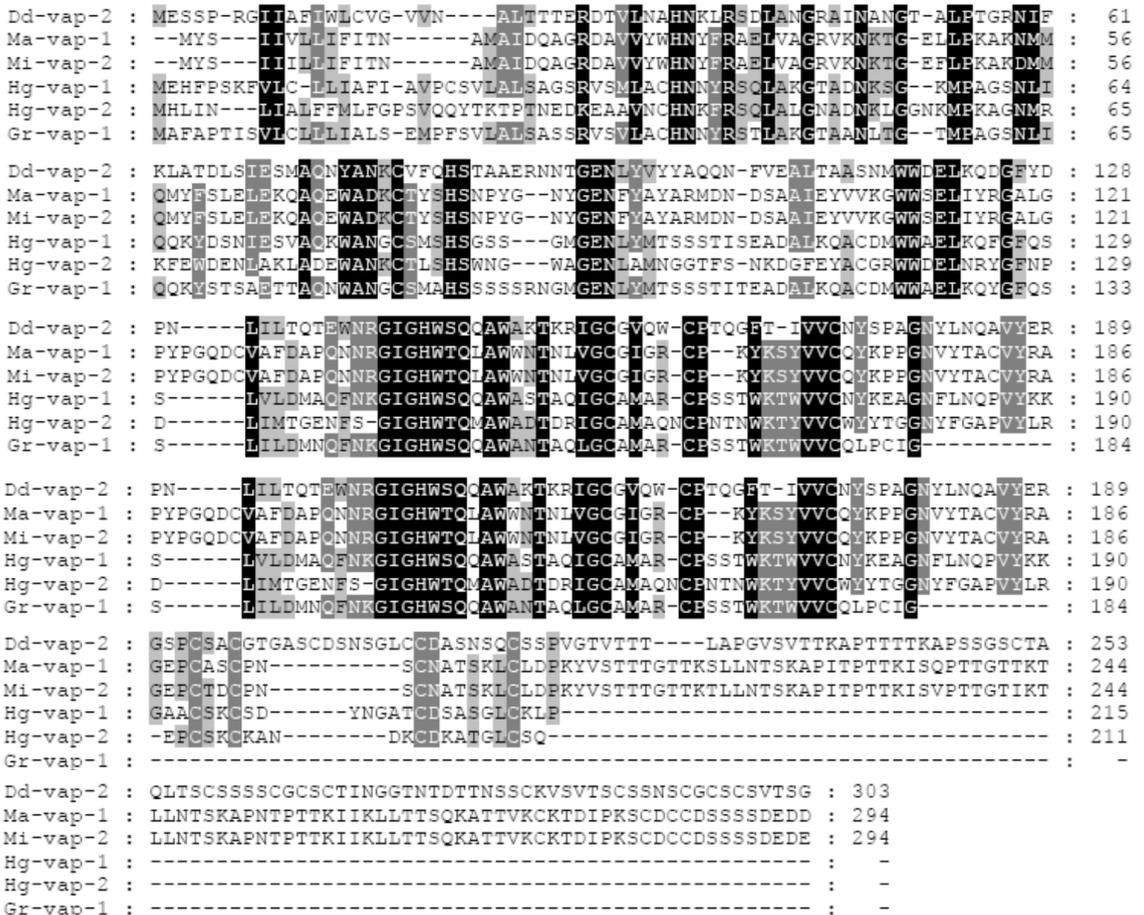
利用 DNAMAN 软件将相互重叠的 EST 序列和测得的 3' 端序列进行拼接,得到 1 150 bp 的全长 cDNA 序列(图 1-C)。再对拼接所得全长 cDNA 序列设计特异引物 F1 和 R1 进行验证,进一步确认全长 cDNA 序列,将此基因命名为 *Dd-vap-2* (GenBank 登录号为 GU370352)。NCBI (www. ncbi. nlm. nih. gov) 上分析其 ORF 长度为 912 bp。5' 端

非编码区的长度为 111 bp,3' 端非编码区长度为 128 bp。



A. EST 片段 EST fragment; B. 3' RACE 片段 Fragment of 3' RACE; C. cDNA 全长 Fragment of cDNA.

图 1 1% 琼脂糖电泳检测 vap 基因 PCR 扩增结果
Fig.1 Electrophoresis detection of the PCR production of vap gene on 1% agarose



Dd:马铃薯腐烂茎线虫 *Ditylenchus destructor*; Ma:花生根结线虫 *Meloidogyne arenaria*; Mi:南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*; Hg:大豆孢囊线虫 *Heterodera glycines*; Gr:马铃薯金线虫 *Globodera rostochiensis*.

图 2 马铃薯腐烂茎线虫与其他 5 种线虫类毒液过敏原蛋白的氨基酸序列比对

Fig.2 Venom allergen-like protein alignment of *D. destructor* and 5 other nematodes

2.2 Dd-vap-2 氨基酸的序列分析

经预测,马铃薯腐烂茎线虫 *De-vap-2* 基因编码 1 个由 303 个氨基酸组成的蛋白。应用 Signal P 3.0 Server 等在线工具预测蛋白质前体信号肽,显示 N 端具有 21 个氨基酸的信号肽,其剪切位点位于第 21 位的 Ala 丙氨酸和第 22 位的 Leu 亮氨酸之间。剪切位点的可能性为 91.8%,信号肽的可能性为 95.8%。跨膜区分析显示:在预测蛋白的前 23 个氨基酸具有较强的跨膜信号,其结果与信号肽分析一致,说明该蛋白能被分泌到胞外。根据在线工具预测,该氨基酸序列存在 4 个潜在的 N-糖基化位点,它们分别是位于第 85~89 位的 NGTA、第 126~130 位的 NNTG、第 209~213 位的 NYSP 和第 314~318 位的 NSSC。该基因的推测氨基酸序列包含 1 个开始于第 27 个氨基酸结束于第 176 个氨基酸保守性结构域,属于富含半胱氨酸分泌蛋白 CRISP 家族。该蛋白的分子质量(Mw)为 31.8 ku,等电点(pI)为 6.76。

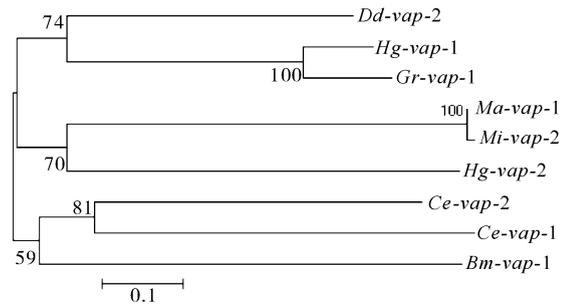
将 *Dd-vap-2* 序列与线虫纲已报道的类毒液过敏原蛋白进行多序列比较(图 2),再利用 MEGA 4.0 软件邻位法(neighbor joining)构建系统进化树(图 3)。

多序列比对发现 *Dd-vap-2* 与 *Gr-vap-1* 的相似性为 46%,与 *Hg-vap-1* 的相似性为 45%,与 *Ce-vap-1* 的相似性为 43%,与 *Bm-vap-1*、*Ce-vap-2*、*Hg-vap-2*、*Ma-vap-1* 和 *Mi-vap-2* 相似性分别为 40%、38%、37%、34% 和 32%。在 CRISP 家族内,*Dd-vap-2* 与 *Gr-vap-1* 和 *Hg-vap-1* 聚为一支,说明它们亲缘关系较近。植物寄生线虫聚为一支,而自由生活线虫和动物线虫聚为一支。

3 讨论

类毒液过敏原蛋白在植物和动物当中分布广泛。目前这类基因在植物寄生线虫中的研究较少,对毒液过敏原蛋白的确切生物功能研究还不很清楚。Wang 等^[2]的研究表明,类毒液过敏原蛋白基因可能是在植物线虫寄生寄主的早期阶段发挥重要作用。

本试验首次成功分离克隆出马铃薯腐烂茎线虫类毒液过敏原蛋白 *Dd-vap-2* 基因,该基因属于富含半胱氨酸分泌蛋白家族成员,其氨基酸序列包括 1 个 21 个氨基酸的信号肽和 1 个开始于第 27 个氨基酸、结束于第 176 个氨基酸的保守结构域,与植



Hg:大豆孢囊线虫 *Heterodera glycines* (*Hg-vap-1* AF374388.1, *Hg-vap-2* AY028639.1); Ce:秀丽小杆线虫 *Caenorhabditis elegans* (*Ce-vap-1* NM001029382.1), (*Ce-vap-2* F2M212909.1); Ma:花生根结线虫 *Meloidogyne arenaria* (*Ma-vap-1* EF122788.1); Bm:马来布鲁线虫 *Brugia malayi* (*Bm-vap-1* XM001894237.1); Mi:南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* (*Mi-vap-2* EF370395.1); Gr:马铃薯金线虫 *Globodera rostochiensis* (*Gr-vap-1* AJ536826.1)。

图 3 基于 NJ 法构建的 9 种类毒素过敏原蛋白的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic trees of VAPS based on the VAP amino acid sequence using NJ method

物寄生线虫的类毒液过敏原蛋白基因具有较高的相似性,与马铃薯金线虫(*Globodera rostochiensis*)的 *Gr-vap-1* 的同源性达 46%,与大豆孢囊线虫 *vap-1* 的同源性达 45%^[7-9]。分析软件 Signal P 预测显示,*Dd-vap-2* 推测编码的氨基酸序列的 5' 端含 1 个前体信号肽,编码蛋白信号肽的存在,有利于线虫将类毒液过敏原蛋白泌到细胞外。由于膜相关蛋白也有信号肽,所以作为一个胞外蛋白质的功能,一个预测信号肽的单独存在并不是结论性的证据,对类毒液过敏原蛋白基因的结构分析表明其呈现一种典型的真核基因结构(多聚腺嘌呤信号)。笔者的研究也证实了 *Dd-vap-2* 具有真核基因结构。

在 cDNA 全长克隆的基础上,进行马铃薯腐烂茎线虫类毒液过敏原蛋白基因家族的研究,能促进人们对马铃薯腐烂茎线虫致病基因功能的了解。本试验中笔者只对 *Dd-vap-2* 序列分析和编码蛋白的结构和功能进行预测,在后续的试验中,将对该基因表达时间、表达部位及酶活性等进行分析,从而进一步明确该基因在线虫与寄主植物互作中的作用,为有效防治马铃薯腐烂茎线虫提供新的策略。

参 考 文 献

[1] 陈品三. 我国大豆主要病虫害发生及其防治研究进展[J]. 大

- 豆通报,1995(1):11-15.
- [2] WANG X, LI H M, HU Y J, et al. Molecular cloning and analysis of a new venom allergen-like protein gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. *Experimental Parasitology*, 2007, 117: 133-140.
- [3] SCHALLIG H D F H, VAN-LEEUEWEN M A W, VERSTREPEN B E, et al. Molecular characterization and expression of two putative protective excretory secretory proteins of *Haemonchus contortus* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1997, 88: 203-213.
- [4] HAWDON J M, NARADSIMHAN, HOTEZ P J. *Ancylostoma* secreted protein 2: cloning and characterization of a second member of a family of nematode secreted proteins from *Ancylostoma caninum* [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1999, 99: 149-166.
- [5] TAWE W, PEARLMAN, UNNASCH T R, et al. Angiogenic activity of *Onchocerca volvulus* recombinant proteins similar to vespid venom antigen 5 [J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2000, 109: 91-99.
- [6] GAO B, ALLEN R, MAIER T, et al. Molecular characterization and expression of two venom allergen-like protein genes in *Heterodera glycines* [J]. *International Journal for Parasitology*, 2001, 31: 1617-1625.
- [7] DING X, SHIEIDS, ALLEN R, et al. Molecular cloning and characterization of a venom allergen AG5-like cDNA from *Meloidogyne incognita* [J]. *International Journal for Parasitology*, 2000, 30: 77-81.
- [8] 廖金铃, 卓侃, 崔汝强. 根结线虫食道腺细胞表达的基因及其应用潜力 [J]. *植物保护*, 2009, 35(1): 1-7.
- [9] DAVIS E L, HUSSEY R S, BAUM T J, et al. Nematode parasitism genes [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2000, 38: 365-396.
- [10] 宛菲, 彭德良, 杨玉文, 等. 马铃薯腐烂茎线虫特异性分子检测技术研究 [J]. *植物病理学报*, 2008, 38(3): 263-270.

Cloning and sequence analysis of a venom allergen-like proteins gene from *Ditylenchus destructor* on potato in China

WANG Bing-yu^{1,2} PENG De-liang² HUANG Wen-kun² PENG Huan² WANG Gao-feng²

1. *College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;*
 2. *State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China*

Abstract A new venom allergen-like proteins, named *Dd-vap-2*, was isolated from *Ditylenchus destructor* by RT-PCR and RACE. The full length cDNA of *Dd-vap-2* consists of 1 150 bp, with a 912 bp ORF encoding a 303 amino acid protein (GenBank accession No. GU370352). The putative protein with the theoretical molecular weight was 31.8 ku in weigh and its pI was 6.76. The sequence analysis indicated that this gene was classified as a member of cysteine-rich secretory protein, CRISP and has a 21 amino acids long signal sequence at N terminal. Phylogenic analysis suggested that *Dd-vap-2* had a close homology to *Globodera rostochiensis* and *Heterodera glycines*.

Key words *Ditylenchus destructor*; venom allergen-like proteins gene; cysteine-rich secretory protein

(责任编辑:陈红叶)