

玉米大斑病菌钙调磷酸酶 B 亚基基因的克隆与生物信息学分析

刘艳梅, 韩建民*, 董金皋*

(河北农业大学真菌毒素实验室, 保定 071001)

摘要: 【目的】克隆玉米大斑病菌 *CnB* 基因, 并进行初步的生物信息学分析。【方法】采用 cDNA 末端快速扩增 (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE) 技术, 扩增玉米大斑病菌 *CnB* 基因全长 cDNA 序列和 DNA 序列。运用相关生物信息学软件对该基因序列进行分析和预测其编码蛋白的结构功能。

【结果】*CnB* 基因含 4 个外显子和 3 个内含子, 最大开放阅读框为 525 bp (GenBank 登录号 EF 469732), 编码 174 个氨基酸; 预测蛋白含约 59.77% 的 α 螺旋, 8.62% 的 β 转角, 6.32% 的延伸串, 25.29% 的不规则卷曲; 含有高度保守的 4 个“EF-hand” Ca^{2+} 结合区域, 属于 Ca^{2+} 结合蛋白家族成员, 与小麦叶枯病菌 (*Phaeosphaeria nodorum*)、灰葡萄孢 (*B.cinerea*)、粗糙麦孢霉 (*Neurospora crassa*) 等病原真菌中 *CnB* 基因有 90% 以上的氨基酸同源性。【结论】首次在玉米大斑病菌中克隆得到 *CnB* 基因, 为进一步研究该基因功能奠定基础。

关键词: 玉米大斑病菌; 钙调磷酸酶; 基因克隆; RACE 技术; 生物信息学

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1175-06

玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 是玉米生产上的一种重要植物病原真菌, 病害流行年份常造成重大经济损失。玉米大斑病菌的致病过程是病菌与寄主相互识别, 相互作用的过程: 分生孢子萌发形成附着孢, 附着孢四周沉积黑色素靠强大的机械压力穿透玉米表皮细胞, 进入叶肉组织完成定殖过程。随后菌丝会在叶肉内不断扩展, 并释放致病毒素, 造成玉米叶肉细胞死亡, 形成病斑^[1]。

上述过程的完成涉及病菌中一系列信号传递及致病相关基因的表达。研究表明, cAMP 信号途径和 MAPK 信号途径参与了玉米大斑病菌菌丝生长、分生孢子形成、分生孢子萌发、附着孢形成、黑色素产生等过程^[2, 3]。最新研究发现, 蛋白磷酸酶也参与了这种调控作用。其中最重要的一种去磷酸化调节的蛋白磷酸酶就是钙调磷酸酶 (Calcineurin, CaN)^[3], 它是迄今发现的唯一受 Ca^{2+} /钙调素 (CaM) 调节的丝/苏氨

酸蛋白磷酸酶^[4], 含有一个催化亚基 (CnA) 和一个调节亚基 (CnB)。CnB 在结构上与 CaM 相似, 有 4 个 Ca^{2+} 结合位点。当 Ca^{2+} 存在时, CnB 和 CaM 结合在 CnA 上不同的位点, 启动 CaN 催化活性^[5]。

在植物致病真菌中, 通过特异性抑制剂、亲环素 A 基因沉默或者反义抑制表达来研究 CaN 参与致病性的作用。例如, 从灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 中就已经克隆获得编码亲环素 A 的基因 (亲环素 A 是生物体内免疫抑制剂环孢菌素 A 的受体, 两种蛋白结合后能抑制钙调磷酸酶基因的表达), 将该基因失活后发现其突变体仍能形成侵染结构, 但是接菌番茄和豆类叶片时, 病害症状发生改变。用免疫抑制剂环孢菌素 A (CsA) 抑制灰葡萄孢 CaN 后, 其菌丝形态发生改变, 不能形成侵入结构^[6]。稻瘟病菌中亲环素 A 基因的突变体 *Cyp1* 对寄主的毒性降低, 观察发现附着孢萌发和侵入钉产生受到影响。研究还发现 CsA 能够抑制稻

基金项目: 国家自然科学基金 (30471126)

*通讯作者。Tel: +86-312-7528246; Fax: +86-312-7528266; E-mail: shmdjg@hebau.edu.cn, hanjianmin64@tom.com

作者简介: 刘艳梅 (1982-), 女, 河北邯郸人, 硕士研究生, 研究方向为植物分子病理学。E-mail: lym0807@tom.com

收稿日期: 2008-02-27; 修回日期: 2008-04-29

瘟病菌附着孢的形成和菌丝的生长^[7]。Hare 用反义抑制研究发现 CaN 参与核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 菌核的形成和致病性的调控^[3]。目前, 已经在小麦叶枯病菌 (*Phaeosphaeria nodorum*)、灰葡萄孢 (*B. cinerea*)、粗糙麦孢霉 (*Neurospora crassa*) 等植物病原真菌中克隆出了钙调磷酸酶基因, 而玉米大斑病菌中的 *CaN* 基因还未见报道。本研究旨在克隆玉米大斑病菌 *CnB* 基因, 并利用生物信息学分析基因及预测蛋白结构特点, 为进一步研究该基因在玉米大斑病菌生长发育及致病过程中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 玉米大斑病菌菌株 01-23, 由河北农业大学真菌毒素实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (上海生物工程有限公司); Reverse Transcriptase M-MLV, 3'-Full RACE Core Set (TaKaRa 公司); SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司)。

1.2 玉米大斑病菌 *CnB* 基因的克隆

1.2.1 大斑病菌基因组 DNA 和总 RNA 的提取: 采用 CTAB 法提取玉米大斑病菌的基因组 DNA^[8]。根据 UNIQ 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒使用说明书, 提取玉米大斑病菌总 RNA, 再由总 RNA 反转录合成第一链 cDNA。

1.2.2 大斑病菌 *CnB* 基因 cDNA 同源片段的获得: 利用 DNAMAN 软件, 根据小麦叶枯病菌、灰葡萄孢、粗糙麦孢霉等 6 种病原真菌 *CnB* 基因氨基酸序列的保守区域 FVSGLSA 和 DIDRDGY 设计一对寡核苷酸简并引物。上游引物 STcNB-L: 5'-ATGATTGCCATCTTCGACG-3'; 下游引物 STcNB-R: 5'-GAACTCC-TCAAAGCTGATC-3'。以反应得到的第一链 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。反应条件: 94 10 min; 94 30 s, 45~55 30 s, 72 30 s, 35 个循环; 72 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。转化大肠杆菌后选取阳性克隆测序。

1.2.3 RACE 技术获得 *CnB* 基因 cDNA 全序列: 根据所获 *CnB* 基因同源片段的 cDNA 序列, 应用 primer3 设计 RACE 特异性引物。STcNB-1: 5'-AGTTTGTCTCTGGCCTCTCGGCCTCC-3' 用于 3'RACE 扩增; STcNB-2: 5'-ATGTAGCCGTCGCGATCAATGTCGT-

A-3 用于 5'RACE 扩增。参照 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒和 SMARTTMRACE cDNA Amplification 试剂盒操作方法分别获得玉米大斑病菌 3'末端和 5'末端 cDNA。参照试剂盒说明书扩增病菌 *CnB* 基因 3'末端和 5'末端 cDNA 序列。利用 DNAMAN 软件将 3'末端和 5'末端 cDNA 序列进行拼接, 得到了 cDNA 全长序列。

1.2.4 *CnB* 基因全长 DNA 序列的获得: 根据 cDNA 全长序列运用 primer5 设计基因特异性引物: STcNB-QC-1: 5'-ATGGGTAACCAACAGTCAGGG-3'; STcNB-QC-2: 5'-TTAGAACTGATCCAGGGTCA-TG-3'。以玉米大斑病菌基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。将所获得的 DNA 序列与 cDNA 进行比较, 进而明确基因的结构。同时利用 Genome Walking 技术扩增 5'端起始密码子 (ATG) 上游 DNA 序列, 寻找可能的启动子活性区域。

1.3 *CnB* 基因结构及预测蛋白的生物信息学分析

根据 <http://ncbi.nlm.nih.gov/http://cn.Expasy.org> 及 <http://softberry.com/> 等网站提供的生物信息学软件进行在线分析。用 ProtParam tool 软件作蛋白质等电点和分子量计算; 蛋白质二级结构分析用 SOPMA 完成; 蛋白的特定功能位点用 ScanProsite 和 Smart 软件分析; 核苷酸和氨基酸序列同源比对用 Blast 在线工具 DNAMAN 5.0 软件完成。

2 结果和分析

2.1 玉米大斑病菌 *CnB* 基因 cDNA 和 DNA 全长序列的克隆

利用简并引物 STcNB-L 和 STcNB-R 对玉米大斑病菌 cDNA 进行 PCR 扩增, 获得一条 288 bp 的条带。以合成的大斑病菌 3'末端和 5'末端 cDNA 为模板, 进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增。经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测获得的条带与预期大小一致, 分别为 483 bp 和 435 bp (图 1-A)。将所获得的 3'末端和 5'末端 cDNA 序列进行拼接, 应用 NCBI 的 ORF finder 软件对该 cDNA 序列进行开放阅读框 (ORF) 分析, 发现有 1 个全长 525 bp、编码 174 个氨基酸的 ORF。以大斑病菌 cDNA 为模板, 用引物 STcNB-QC-1 和 STcNB-QC-2 扩增获得 525 bp 的一条带 (图 1-B), 将该片段回收、克隆和测序后, 与 RACE 扩增产物序列拼接后预测的 *CnB* cDNA 基因序列完全相同。用引物 STcNB-QC-1 和 STcNB-QC-2 扩增病菌基因组 DNA, 得到大小为 705 bp 的条带 (图 1-B)。利用 DNAMAN

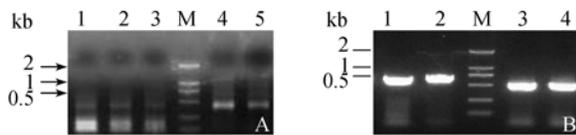


图 1 玉米大斑病菌 *CnB* 基因的扩增

Fig. 1 PCR amplification of *S. turcica CnB* gene; M. DL2000 DNA marker. A: Lane1~3. amplification of 3 RACE; Lane4~5. amplification of 5 RACE. B: Lane1~2.amplification of DNA; Lane3~4.amplification of cDNA.

软件将 *CnB* 基因的 cDNA 序列与 DNA 序列进行比对, 结果发现 DNA 序列中含有 4 个外显子和 3 个分别为 64 bp、56 bp 和 60 bp 的内含子。

2.2 *CnB* 基因结构分析

CnB 基因 cDNA 全长 741bp, 起始密码子 ATG

位于 62 bp 处, ATG 起始密码子附近符合 Kozak 规则^[9] (AXXATGG), 终止密码子位于 586 bp 处, 编码 174 个氨基酸, 3 端有 poly A 尾(图 2)。分子式为: C₈₅₉H₁₃₅₉N₂₃₃O₂₈₂S₉, 相对分子量为 19725.5 u, 等电点(PI) 为 4.28, 为酸性蛋白。

2.3 *CnB* 基因转录启动子序列分析

用已获得的玉米大斑病菌 *CnB* 基因 5 端开放读框前 2 kb 基因组 DNA 序列在 softberry 启动子网站中分析, 发现存在 8 个期望值在 0.04 以下的启动子元件(表 1), 但没有发现类似 TATA 盒的元件。存在病原菌诱发子反应元件 GT-1 等转录因子识别和相结合的相关位点。而且在开放读框前存在 TAA 或 TGA 等多个终止子。

```

1          acg c g g g g a c c t c c c t a c t c a c g a c c a c a c a c c g c a t c c c g c o g c c c a c c a c t c g c c a a a
62  atg g g t a a c c a a c a g t c a g g g c t g c t c g a c a a c a t a g c c t c g g g c t c g a a t t c g a c c g c g a g g a g g t t
    M G N Q Q S G L L D N I A S G S N F D R E E V
131 g a c c g c c t c a g g a a g c g a t t c a t g a a g c t t g a c a a a g a c a a c t c g g g a a c c a t t g a g c g c g a c g a a t t c
    D R L R K R F M K L D K D N S G T I E R D E F
200 c t g g c c c t c c c c c a g a t c t c c t c g a a c c c c t c g c a a c g c g c a t g a t t g c c a t c t t c g a c g a g g a t g g c
    L A L P Q I S S N P L A T R M I A I F D E D G
269 g g c g g t g a c g t c g a c t t c c a g g a g t t t g t c t c t g g c c t c t c g g c c t t c a g c a g c a a g g g c a a c a a g g a g
    G G D V D F Q E F V S G L S A F S S K G N K E
338 g a g a a g c t g c g c t t c g c a t t c c g c g t g t a c g a c a t t g a t c g c g a c g g c t a c a t c a g c a a c g g c g a g c t c
    E K L R F A F R V Y D I D R D G Y I S N G E L
407 t t c a t a g t a c t g a a a a t g a t g g t t g g a a g c a a c c t g a a g g a c c a g c a g c t a c a g c a g a t t g t c g a c a a g
    F I V L K M M V G S N L K D Q Q L Q Q I V D K
476 a c c a t c a t g g a g g c c g a c c t g g a c c g c g a c g g c a a g a t c a g c t t c g a g g a g t t t a c c a a g a t g g t c g a g
    T I M E A D L D R D G K I S F E E F T K M V E
545 a a c a c g g a t g t c t c t a t g a g c a t g a c c c t g g a t c a g t t c t a a g c g c t g t t t c t c t c a c a a a t g c a a c a
    N T D V S M S M T L D Q F *
614 a c a t t c c t g a t a c g a g g a t t t c t t g g c g a g g c g t t c a c g g t t c t g c a g g c a c a c t t g g g a a c a g g c t t
683 g a a a g t a t t t g a t a t t c a t c a a t c c a g g g c t t t g a c c c t g a a c a t g a g a a a a a a a a a a a a a a a a a a a a a
    
```

图 2 玉米大斑病菌 *CnB* 基因 cDNA 序列和氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequenc and deduced amino acid Sequence. atg start codon; *stop codon

表 1 Softberry 预测的玉米大斑病菌 *CnB* 基因可能的启动子
Table 1 Probable promoter sequences of *CnB* gene predicted by Softberry

No.	Start	End	Exp.Num	Promoter sequence	Regulatory element
1	1024	1019	0.01436	TATCTA	NIT2 ZN-finger protein
2	336	350	0.01819	AATcTTACaCATAtA	GT-1
3	259	266	0.02454	CAAAACGC	DET1; CDA-1
4	287	278	0.00173	ATCACGTGAT	G-box binding bZIP proteins
5	447	456	0.03977	cCCACGTCTT	ACE-binding factor
6	945	952	0.02138	ATTTCAA	Dof factors
7	761	752	0.02912	GATGACATGC	Opaque-2
8	1840	1854	0.02789	GTGTaGTgAAgATGG	GBF

Search PARAMETERS: (1) Expected Number: 0.0500000; (2) Statistical Siginicance Level: 0.9500000

2.4 预测蛋白功能分析

根据 ScanProsite 软件分析特定功能位点,发现 *CnB* 基因预测蛋白含有 4 个“EF-hand” Ca^{2+} 结合位点。将已在 GenBank 登录的不同真菌中 *CnB* 氨基酸序列运用 ScanProsite 软件分析,发现均有 4 个“EF-hand”

的 Ca^{2+} 结合区,说明钙调磷酸 B 亚基 Ca^{2+} 结合区存在高度保守性(表 2)。在 PSORT 服务器对 *CnB* 蛋白进行亚细胞定位分析,初步定位在细胞质中,该蛋白在细胞质中可激活下游转录因子,使之进入细胞核中发挥作用。

表 2 玉米大斑病菌 *CnB* 基因预测蛋白的保守结构域分析

Table 2 conserved binding domain analysis of *CnB* gene on predicted protein in *Setosphaeria turcica*

Fungi	“EF-hand” Ca^{2+} binding regions			
<i>Setosphaeria turcica</i>	DK DNSGTIErdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DL DRDGKISfeEF
<i>Phaeosphaeria nodorum</i>	DK DNSGTIErdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DQ DRDGKISfeEF
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	DK DNSGTIErdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DL DRDGKISfeEF
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	DK DNSGTIErdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DL DRDGKISfeEF
<i>Neurospora crassa</i>	DK DNSGTIErdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DL DRDGKISfeEF
<i>Gibberella zeae</i>	DK DNSGTIErdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DL DKDGKISfeEF
<i>Chaetomium globosum</i>	DK DNSGTIErdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DL DGDGKISfeEF
<i>Aspergillus clavatus</i>	DK DSSGTIDrdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DK DRDGKISfeEF
<i>Aspergillus fumigatus</i>	DK DSSGTIDrdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DK DRDGKISfeEF
<i>Aspergillus niger</i>	DK DSSGTIDrdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DK DGDGKISfeEF
<i>Aspergillus oryzae</i>	DK DSSGTIDrdEF	DE DGGGDVdfqEF	DI DRDGYISngEL	DK DQDGKISfeEF

Note: Residues marked with bold typeface indicate Ca^{2+} -binding pole amino acids.

运用 SOPMA 软件 (<http://pbil.ibcp.fr/>) 预测大斑病菌 *CnB* 蛋白的二级结构(图 3),表明该蛋白含约 59.77%的 α 螺旋,8.62%的 β 转角,6.32%的延伸串,25.29%的不规则卷曲。在 SWISS-MODEL 数据库中进行蛋白质三维结构分析,得到该蛋白的三维结构图(图 4)

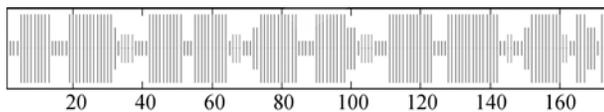


图 3 玉米大斑病菌 *CnB* 蛋白二级结构的预测

Fig. 3 Predicted secondary structure for *CnB* protein from *Setosphaeria turcica*. Alpha helix: Blue; Extended strand: Red; Beta turn: Green; Random coil: Purple.

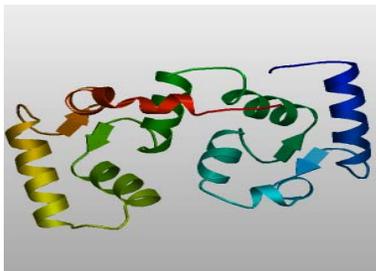


图 4 玉米大斑病菌 *CnB* 蛋白三级结构同源建模

Fig. 4 The *CnB* 3D structure predicted by Swiss-model. modelled residue range: 16 to 172; based on template 1auib (2.10 Å); Sequence Identity [%]: 64; Evaluate: 2.85e-48.

2.5 *CnB* 基因蛋白同源性分析

利用 NCBI 网站的 PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)软件,对 *CnB* 基因预测蛋白进行同源性序列比对,结果发现,该蛋白与许多病原真菌的 *CnB* 都有 80%以上的同源性,其中与 *Phaeosphaeria nodorum*, *Neurospora crassa*, *Botryotinia fuckeliana* 和 *Gibberella zeae* 的同源性为 90%以上,采用 DNAMAN 软件进行多序列匹配排列,构建系统进化树(图 5)。

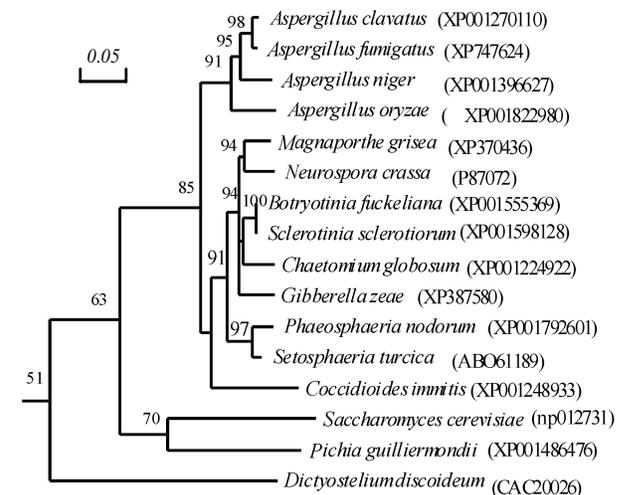


图 5 钙调磷酸酶 B 亚基的系统进化树

Fig. 5 phylogenetic tree of B subunit. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

3 讨论

利用保守结构域设计简并引物并通过 RACE 技术获得基因全长是目前克隆未知基因应用最广泛、最快速、最有效的方法之一。与筛选基因文库再进行亚克隆的方法相比, RACE 技术具有简单、快速、经济的优点,目前已经广泛用于克隆动物、植物和微生物中的未知基因^[10-12]。

本研究克隆的玉米大斑病菌 *CnB* 基因与已报道的其他病原真菌的同一基因相比,编码区数目基本一致。玉米大斑病菌 *CnB* 基因所有内含子都符合丝状真菌内含子 GT-AG 法则^[13]。在大多数真菌基因中, cDNA 的第一个起始密码子为 ATG,而且在起始密码子上游的第三位点往往是 A,本研究的基因符合上述两个特点^[9]。选择了 16 种真菌 *CnB* 氨基酸序列进行比较,从 *CnB* 基因的系统进化树与传统分类系统的对比来看,两者基本吻合(图 5)。玉米大斑病菌与小麦叶枯病菌亲缘关系较近,同样稻瘟病菌与非致病菌粗糙脉孢菌亲缘较近,因而它们列在一个分枝上,玉米赤霉病菌、灰葡萄孢、核盘菌、玉米大斑病菌和稻瘟病菌等,这几种真菌分类地位同属于子囊菌门盘菌纲,因而它们列在一起。而酵母菌亚门的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和季氏毕赤酵母(*Pichia guilliermondii*)与它们亲缘关系较远,故聚在不同分枝上。盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)是一种原生生物,属于黏菌门。故他们的亲缘关系最远,同源性也较低。

玉米大斑病菌 *CnB* 启动子区中没有发现真核生物启动子中所具有的典型的 TATA-box。发现光应答转录因子 G-box 以及与细胞分化相关的转录因子 DET1, CDA-1 等。推测这些调控转录原件主要在细胞形态建成及信号传导通路中起作用。随着玉米大斑病菌外源转化系统的成熟,将可以通过 5'端缺失分析的方法来进行进一步分析这些调控元件以及一些潜在的调控位点在 *CnB* 基因转录调控中作用。

通过 SOPMA 软件预测可知,大斑病菌 *CnB* 基因编码的蛋白主要由 α 螺旋和不规则卷曲构成,而 β -转角和延伸链则散布于整个蛋白质中。一般认为 α 螺旋和 β 折叠结构规则,主要起稳定蛋白质分子结构的作用,伸展结构和无规则卷曲往往突出于蛋白表面,构成蛋白质的功能区域。通过 Swiss-Model 模建的三维结构发现蛋白空间结构由 8 个螺旋和 4 个折叠片组

成,形成 4 个螺旋-环-螺旋区域,这与 *CnB* 蛋白 4 个“EF-hand”保守结构功能域相吻合。通常基因编码蛋白质含有的 4 个“EF-hand”结构功能域,含 E、F 两段螺旋,并形成螺旋-环-螺旋结构。不同真菌中 *CnB* 蛋白的 4 个“EF-hand”氨基酸序列具有很高的同源性(表 2),说明其 Ca^{2+} 结合区域是高度保守的。*CnB* 蛋白的 4 个钙结合位点与 Ca^{2+} 有很高的亲和力,揭示其主要通过与 Ca^{2+} 连接诱导钙结合区域构象变化,导致下游靶蛋白激活与失活。

目前,对 *CnB* 基因在植物致病真菌中的作用在国内尚无研究报道。因此,玉米大斑病菌 *CnB* 基因的成功克隆对研究该基因在病菌生长发育及致病过程中的作用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 董金皋. 农业植物病理学. 第一版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] 范永山. 玉米大斑病菌 MAPK 基因的克隆和功能分析. 河北农业大学博士学位论文, 2004.
- [3] Harel A, Bercovich S, Yarden O. Calcineurin is required for Sclerotial development and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* in an oxalic acid-independent manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(6): 682-693.
- [4] 符民桂, 唐朝枢. 钙调神经磷酸酶的研究进展. 生物化学与生物物理进展(*Progress In Biochemistry and Biophysics*), 2000, 27(2): 157-161.
- [5] Guerini D. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 235(2): 271-275.
- [6] Viaud M, Brunet-Simon A, Brygoo Y, et al. Cyclophilin A and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin A inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology*, 2003, 50: 1451-1465.
- [7] Viaud MC, Balhadere PV, Talbot NJ. *Magnaporthe grisea* cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection. *The Plant Cell*, 2002, 14: 917-930.
- [8] 安鑫龙, 董金皋, 韩建民. 应用 CTAB 法提取玉米大斑病菌 DNA. 河北农业大学学报(*Journal of Agricultural University of Hebei*), 2001, 24 (1): 38-41.
- [9] Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 19867-19870.
- [10] Chenchik A, Zhu Y, Diatchenko L, et al. Generation and use of high quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. *Biotechniques Books*, 1998, 305-319.
- [11] Matz M, Lukyanov S, Bogdanova E, et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(6): 1558-1560.
- [12] Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: A SMARTTM approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques*, 2001, 30: 892-897.

[13] Praveen RJ, Manabu A, Harushi N, *et al.* Cloning and sequence analysis of CNA gene encoding the catalytic subunit of cal-

cineurin from *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiology Letter*, 2001, 204: 169–174.

Cloning and bioinformatic analysis of calcineurin B gene in *Setosphaeria turcica*

Yanmei Liu, Jianmin Han*, Jingao Dong*

(Mycotoxin Laboratory of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: [Objective] To clone and identify *CnB* gene from *Setosphaeria turcica* and to perform the primary bioinformatic analysis. [Methods] Using RACE method, we isolated the completed cDNA sequence and DNA sequence of *CnB* gene from *S. turcica*. Corresponding structure and functions were predicted by the bioinformatic software. [Results] The results showed that *CnB* gene had 4 exons and 3 introns and the largest open reading frame was 525 bp which encoded a protein of 174 amino acid residues. The predicted secondary structure composition for the protein contained about 59.77% alpha helixes, 8.62% beta turn, 6.32% extended strand and 25.29% random coil. The *CnB* gene of *S. turcica* had 4 “EF-hand” calcium-binding regions, and showed 90% homology with *CnB* gene of *P. nodorum*, *B. cinerea* and *Neurospora crassa*. [Conclusion] The *CnB* gene was successfully cloned from *S. turcica* for the first time, providing a good foundation for further research on its function.

Keywords: *Setosphaeria turcica*; calcineurin; gene clone; RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends); bioinformatic

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30471126)

*Corresponding author. Tel: +86-312-7528246; Fax: +86-312-7528266; E-mail: shmdjg@hebau.edu.cn, hanjianmin64@tom.com

Received: 27 February 2008/ Revised: 29 April 2008

《微生物学报》答作者问——关于投稿

问：在学术会议上发表过的论文能否在《微生物学报》上发表？

答：这要分两种情况。

- (1) 如果论文集属于正式出版物，有正式书号或刊号，则不能再在本刊发表；
- (2) 如果不是正式出版物，属于交流材料，则论文可以投稿本刊。

问：投稿时都需要哪些手续？是否还需要纸稿？

答：从 2006 年起，本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供：

- (1) 论文研究内容所属单位的介绍信(请注意：在此强调的是研究内容所属单位，通常是第一单位)，介绍信主要应证明论文的作者署名无误，未一稿两投及不涉及保密问题。介绍信模板可从本刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。
- (2) 在接到经过编辑部内审后 E-mail 发出的“稿件受理通知”后，需要及时补寄纸样的 1 份稿件和介绍信，并缴纳 100 元稿件受理费。

问：审稿费需邮局汇款还是转帐？

答：邮局汇款！中科院微生物所共有 4 个期刊编辑部，因此提醒您在办理汇款时一定要注意以下几点，否则在登记汇款、办理发票时会造成混乱！编辑部在收到汇款之后，将以挂号信形式及时寄回发票。

- (1) 切忌在邮寄来的纸样材料中加入 100 元现金！
- (2) 在收款人一栏填写“微生物学报编辑部”；
- (3) 在备注栏中注明“稿件编号”+“第一作者姓名”；
- (4) 通过邮局汇 100 元审稿费，汇款后请登陆本刊网站，填写“汇款时间”、“发票单位”和收“发票地址”等信息。编辑部会在收到后及时登记“收款时间”和“寄发票时间”，作者可随时查询不必打电话来询问。