

柑橘 *Ptcor8* 基因相关功能的生物信息学分析

刘湘志^{1,2}, 龙桂友^{1,2*}, 邓子牛^{1,2}

(1. 湖南农业大学 园艺园林学院, 湖南 长沙 410128; 2. 国家柑橘改良中心 长沙分中心, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 应用生物信息方法, 对柑橘 *Ptcor8* 基因的理化性质、跨膜区域、疏水性/亲水性、二级结构、结构功能域、功能分类和同源性进行分析。结果表明: *Ptcor8* 隶属于植物 WCOR413 冷诱导蛋白家族, 具有 1 个 621 bp 的潜在编码区, 编码 206 个氨基酸残基; 功能预测结果显示, *Ptcor8* 编码蛋白质的相对分子质量为 2.28×10^6 , 等电点为 9.4, 具有 5 个疏水区, 5 个跨膜螺旋, 6 个丝氨酸磷酸化位点; 亚细胞定位和分子系统发育分析结果均表明, *Ptcor8* 为质膜型冷诱导蛋白, *Ptcor8* 可能为冷诱导基因, 在提高植物抗寒能力方面有重要的作用。

关 键 词: 柑橘; *Ptcor8* 基因; 生物信息学; 功能分析; 冷诱导

中图分类号: Q343.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0161-05

Related functional analysis of *Ptcor8* gene by bioinformatic

LIU Xiang-zhi^{1,2}, LONG Gui-you^{1,2*}, DENG Zi-niu^{1,2}

(1. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Changsha Sub-Center, National Center for Citrus Improvement, Changsha 410128, China)

Abstract: The physical and chemical properties, transmembrane region, hydrophobicity/hydrophilicity, secondary structure, functional domain, functional category and homology tree of *Ptcor8* were analyzed by using bioinformatics methods. Results showed that *Ptcor8* belongs to cold acclimation protein WCOR413 family and possesses a potential ORF of 621 bp sizes encoding 206 amino acid residues. Predicted by bioinformatic analysis tools such as ProParam, PSORT, MotifScan, CCD, TMHMM and NetPhos, the protein coded by *Ptcor8*, with molecular weight 2.28×10^6 and *pI* 9.4, possesses five hydrophobicity regions, five transmembrane helix, six serine phosphorylation sites and one WCOR413 domain. Both subcell identification and molecular evolutionary investigation demonstrate that *Ptcor8* protein belongs to PM type. *Ptcor8* is a cold-induced gene and play an important role in improving plant cold tolerance.

Key word: *Citrus*; *Ptcor8* gene; bioinformatics; functional analyse; cold-induced

世界范围内, 柑橘常因遭受低温伤害而造成损失^[1]。低温能够诱导植物许多基因的表达, 从而使植物具有抗寒性。近年来, 涉及低温胁迫信号转导与调节的新基因鉴定和功能分析一直是植物抗寒性研究的重点, 其长远目标是通过遗传工程来改良植物的抗逆性^[2]。有研究^[3]表明, 植物细胞感受低

温胁迫信号会启动相关的适应反应, 通过研究 mRNA 水平上基因的表达差异, 已鉴定了一些柑橘低温响应基因^[4-6]。如 Jia 等^[7]运用差异显示 RT-PCR 技术从柑橘叶片和枝中分离、鉴定了具有 2 个转录本的新的柑橘低温基因(*CLTa* 和 *CLTb*)。 *Ptcor8* 基因是从枳中克隆得到的 1 个 849 bp 的冷诱导基因,

收稿日期: 2010-12-01

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2008BAD92B05-2); 湖南农业大学人才科学基金(09WD48)

作者简介: 刘湘志(1984—), 男, 湖南宁乡人, 硕士研究生; *通信作者, longgy63@163.com

是国家柑橘改良中心长沙分中心运用抑制性差减杂交技术从枳叶片中克隆的 1 个 cDNA 全长^[8-9], NCBI 登录号为 EU077497。笔者应用生物信息学方法和工具对 *Ptcor8* 基因编码蛋白的理化性质、跨膜区域、疏水性和亲水性、二级结构、结构功能域、功能分类和同源性进行分析, 以期为该基因的深入研究提供参考。

1 材料与方 法

获取 *Ptcor8* 核苷酸序列信息后, 应用蛋白质分析专家系统提供的翻译工具, 将 *Ptcor8* 基因的核苷酸翻译成蛋白质氨基酸序; 运用 ORFfinder 预测开放阅读框, 使用 InterProScan 在 EBI 的 InterPro 数据库搜索 *Ptcor8* 基因编码蛋白质的家族, 在 Sanger 的 Pfam 数据库获取该蛋白质家族的相关信息; 应用 NCBI 的 Entrez 查询该家族的蛋白质成员, 用 DNAMAN6.0 比较这些蛋白质与 *Ptcor8* 基因编码蛋白质的同源性。用 MEGA 4 软件构建 WCOR413 蛋白质家族分子系统发育树, 用位于丹麦科技大学生物序列分析中心服务器上的 TMHMM 程序对 *Ptcor8* 进行跨膜结构预测。蛋白质的理化性质、亚细胞定位、二级结构、基序和结构域、磷酸化位点等分析的工具与网址见表 1。

表 1 柑橘 *Ptcor8* 基因相关功能的生物信息学分析软件及网站

Table 1 Softwares and websites of bioinformatics analysis of *Ptcor8* gene

软 件	网 址
ExPASy ProtParam	http://www.expasy.org/tools/protparam.html
ProtScale	http://www.expasy.org/tools/protscale.html
ExPASy MotifScan	http://www.expasy.org/tools/MotifScan.html
PSORT	http://psort.nibb.ac.jp
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM
JPred	http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred
CDD	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.html
NetPhos 2.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos
ProtFun 2.2 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun

2 结果与分析

2.1 序列翻译与 ORF 预测

使用 ExPASy translate tool 程序翻译 *Ptcor8* 基因 849 bp 的核苷酸序列, 发现 6 个翻译的阅读框中第 2 个阅读框连续翻译的氨基酸序列最长(图 1 深色区域)。通过 NCBI 上的 ORF finder 程序预测 *Ptcor8* 基因的开放阅读框, 结果表明, 该开放阅读框共有 621 个核苷酸(第 44~664 个), 编码 1 个长为 206 个氨基酸残基的蛋白质。

5'3' Frame 2

```
LFLESWVLIGRLKVMet Met GKKSYLEMet RAGGVTSDLISSD
Met KELVVAEAE Met LADHSVDAIKLRGLGFGTTFLEWVASFA
AIYLLILDRTNWR TNILGLLIPYIFFSLPSLIFNVFRGDVGK
WIAFIAVIVRLFFPRRFADWLEMet PAALILLIVVAPSLFASY
TRSSWIGVVILAIACYLLQEHIRASGGFRNSFSKAHGVSNS
VGIHLLVVPYPAWALVLYILStop APYLQLLDCLNFTK FIRIVS
KFADDMet YYP LLHHStop LIVLCKFLFIDFLWEN Met KENYV
WSVKR
```

图 1 用 ExPASy translate tool 翻译 *Ptcor8* 基因的氨基酸序列

Fig.1 Amino acid sequence translated from *Ptcor8* by ExPASy translate tool

2.2 与同源蛋白质家族的比较

应用 InterProScan 程序, 搜索位于 EBI 的 InterPro 数据库, 发现 *Ptcor8* 基因开放阅读框编码的 206 个氨基酸残基的蛋白质, 隶属于 1 个 Cold acclimation WCOR413 的蛋白质家族。该家族目前收录的 30 个蛋白质成员, 全部来源于真核生物的绿色植物。运用 NCBI 上的 ENTREZ 查询系统, 在蛋白质数据库查询 WCOR413, 获得了 63 个结果。收录该蛋白质家族的 Pfam 数据库有 26 个蛋白质拥有详细信息, 并与 *Ptcor8* 蛋白的同源性较高。含有冷诱导 WCOR413 结构域的蛋白质, 其编码基因的核苷酸序列长度为 594~1 508 bp, 变化幅度较大, 平均为 929 bp; 由其编码的蛋白质氨基酸残基数的变化幅度较小, 为 197~265 个, 平均为 206 个, 说明该蛋白质家族的 WCOR413 结构域十分保守。将 *Ptcor8* 的氨基酸序列与家族中同源性最高的 5 个蛋白质的氨基酸序列进行多序列对比, 其一致性(Identity)达 86.46%, 表明氨基酸保守程度很高(图 2)。

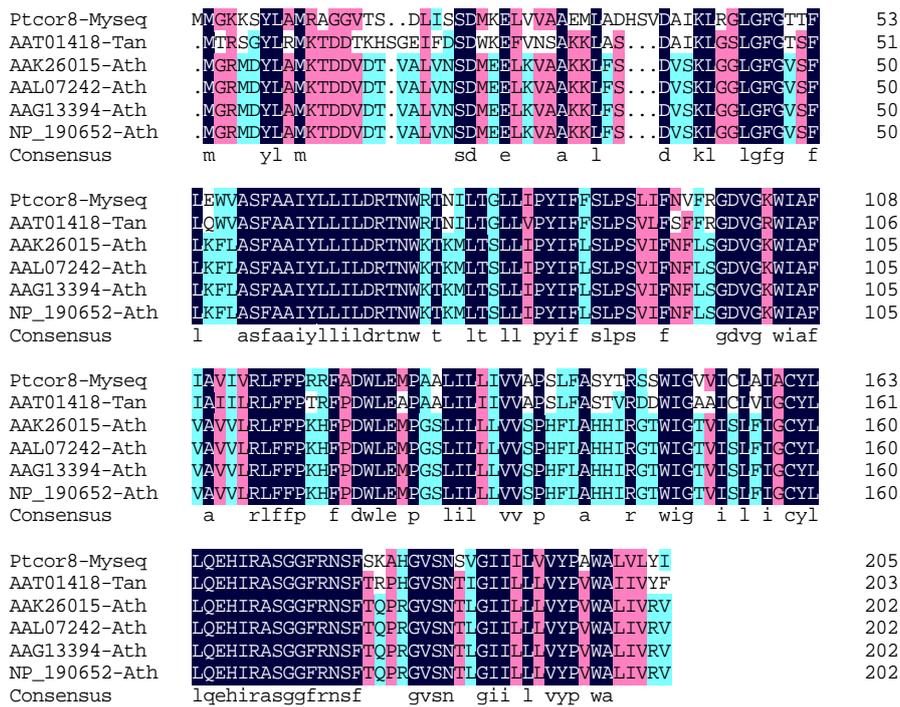


图 2 Ptcor8 蛋白质序列与同源家族中 5 个同源性最高的蛋白质序列的对比结果

Fig.2 Result of multiple alignment for target Ptcor8 sequence with 5 protein sequences sharing relative higher homology with the target sequence by DNAMAN

与 Ptcor8 残基进行对比分析的 23 个蛋白质全部是由全长 cDNA 编码的，编码的氨基酸残基平均数为 206 个，加之这个区域的氨基酸十分保守，可以判断 *Ptcor8* 基因是 1 个全长 cDNA，具有完整的编码区。

2.3 蛋白质理化性质及疏水性、亲水性的预测和分析

登录 ExPASy 服务系统，使用 ProtParam 工具对 Ptcor8 蛋白序列的基本理化性质进行预测分析，结果表明，Ptcor8 的相对分子质量为 2.28×10^6 ，等电点为 9.4，分子式为 $C_{1076}H_{1677}N_{263}O_{268}S_8$ 。

使用 ProtScale 工具对靶标蛋白序列进行疏水性分析，结果表明，分值越低，亲水性越强；分值越高，疏水性越强。就多肽链整体来看，疏水性氨基酸占多肽链的大部分，而且分值整体偏向正值，整个链表现为疏水性，没有明显的亲水区域。由此可知，*Ptcor8* 基因编码的蛋白是疏水性蛋白(图 3)。亲水性和疏水性分析也为跨膜结构提供了验证的

依据。

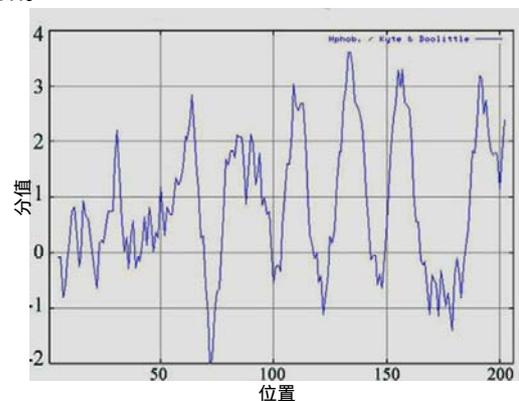


图 3 Ptcor8 蛋白疏水性分析结果

Fig.3 Hydropathicity of Ptcor8 protein predicted by ProtScale

用 TMHMM 程序对 Ptcor8 进行跨膜结构预测。结果表明，在长度为 206 个氨基酸的蛋白序列中共预测到 5 个跨膜螺旋(TMhelix)。

2.4 蛋白质二级结构、基序及结构域的预测

蛋白质结构包括一级序列、二级结构序列和空间结构，其中蛋白质的二级结构序列起着关键的作

用。二级结构是指 α 螺旋和 β 片层等蛋白质局部结构元件。应用 JPred 工具对 Ptcor8 蛋白进行二级结构预测,发现 Ptcor8 蛋白主要由螺旋(H)、折叠(E)和转角(-)组成,由某些二级结构聚在一起形成的小区域称为结构域(Domain),基序(Motif)是结构域的亚单位,通常由 2~3 个二级结构单位组成。它们是蛋白序列结构、功能和进化的基本单元,一般由 50~300 个氨基酸组成,具有一定的生物学功能。通过与结构数据库中已知结构和功能的蛋白序列对比,可以预测目标基因中包含的功能结构区域。应用 ExPASy、MotifScan、NCBI 和 CDD^[11]分析目标蛋白 Ptcor8 的基序和结构域,预测结果均指向 WCOR413,可知此目标蛋白序列的结构域只由 1 个基序亚单位组成。由 206 个氨基酸组成的蛋白序列中,第 8~194 个氨基酸残基属于保守结构域,目前对该结构域的功能尚不清楚,仅知道为冷诱导的 WCOR413 蛋白序列。在拟南芥、水稻、苜蓿、普通小麦、大麦、日本柳杉、玉米、毒麦、紫杆柳、小立碗藓、海岛棉、尖叶蕉等植物上均发现了与低温诱导相关的 WCOR413 蛋白(基因)。

2.5 蛋白质磷酸化位点分析

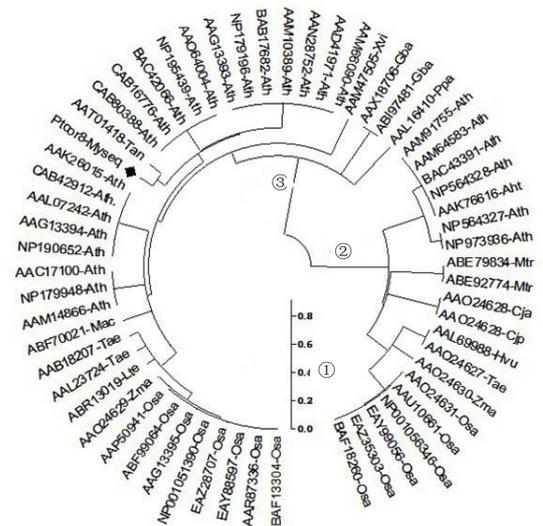
使用 NetPhos 2.0 Server^[10] 对 Ptcor8 进行磷酸化位点预测,结果表明,Ptcor8 蛋白序列在第 6、21、38、144、149 和 177 位氨基酸残基共存在 6 个丝氨酸磷酸化位点,其中 5 个磷酸化位点位于 WCOR413 结构域内,第 6 位氨基酸残基上的磷酸化位点在 WCOR413 结构域前端第 2 个氨基酸残基上,可能对于该结构域功能活化有作用。

2.6 分子系统发育分析

冷诱导的 WCOR413 蛋白目前只在植物中存在。为了研究冷诱导基因 *Ptcor8* 编码的蛋白质在植物冷诱导 WCOR413 蛋白家族中的进化地位,以“WCOR413”为检索词,从 GenBank 中搜索到 58 条由全长基因(genomic DNA)或全长 cDNA 编码的蛋白序列,其中来源于拟南芥植物的蛋白序列约占

50%,十字花科的拟南芥和禾本科的 5 种植物合计占 82.8%。

将来自于 9 个科 13 个物种的 58 条 WCOR413 家族蛋白序列与靶标蛋白序列 *Ptcor8* 一起用 MEGA4.0 软件进行分子系统发育分析,构建系统发育树(图 4)。从图中可以看出,WCOR413 家族分为 2 种类型,即质膜型(PM 型, plasma membrane)和类囊体膜型(TM 型, thylakoid membrane)。这与前人的研究结果^[12]一致。有菱形标记的为分析的靶标基因,被纳入 PM 型这一组,与亚细胞定位的预测结果相吻合,即位于细胞质膜上。



① 进化距离;② TM 型;③ PM 型。

图 4 冷诱导蛋白 WCOR413 家族系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of cold acclimation protein WCOR413 family

此外,PM 型冷诱导蛋白进化要比 TM 型冷诱导蛋白快,这与细胞质膜直接面对细胞外剧烈变化的环境和类囊体膜处于细胞内相对恒定的环境有极大的关系,2 种迥然不同的环境必然导致进化快慢不同。

3 结论与讨论

Ptcor8 基因为首次从柑橘上克隆到的 1 个属于冷诱导蛋白 WCOR413 家族成员的全新基因,在进行生物信息学分析之前,仅知道它是从低温诱导材料枳叶片中克隆得到的长度为 849 bp 的核苷酸序

列。通过生物信息学分析,对这个靶标基因又有了如下认识:长度 849 bp 的核苷酸序列中存在 1 个长为 621 bp 的潜在开放阅读框,编码 206 个氨基酸残基的蛋白质,该蛋白质的相对分子质量为 2.28×10^6 ,等电点为 9.4,具有 5 个疏水区,无 N 端信号序列,可能是 1 个 IIIa 型膜蛋白,位于细胞质膜上,有 5 个跨膜螺旋,6 个丝氨酸磷酸化位点,含有 1 个与冷诱导相关、但具体功能尚不清楚的 WCOR413 结构域,可能是质膜型冷诱导蛋白质。

虽然这些结果仅仅是预测分析,还未经试验验证,但为下一步的研究指明了方向。下一步可对其其他的诱导因子,如水杨酸、茉莉酸、赤霉素、脱落酸、盐、干旱、涝、高温、光周期等是否诱导 *Ptcor8* 基因表达进行较全面的分析,以明确其在柑橘抗逆反应中的具体作用。如果该基因确实与柑橘低温锻炼关系密切,那么可进行真核表达和 Western 杂交,在翻译水平验证其表达。应用 RNA 干扰、基因敲除、构建表达载体等技术,可将 *Ptcor8* 基因导入不耐寒的柑橘,如柠檬、橙类、柚类植物,以探明该基因与柑橘抗寒能力的关系。

进行生物信息学分析应持审慎的态度,如分析软件应该选择生物信息分析界普遍接受的软件,各类数据库中分子生物学数据和信息量非常浩大,使用时不一定越多越好,应经过精心筛选等。

参考文献:

- [1] 沈洪波,陈学森,张艳敏. 果树抗寒性的遗传与育种研究进展[J]. 果树学报, 2002, 19(5): 292-297.
- [2] 龙桂友. 柑橘低温诱导相关基因的克隆及表达分析[D]. 长沙:湖南农业大学园艺园林学院, 2007.
- [3] 钟克亚,叶妙水,胡新文,等. 转录因子 CBF 在植物抗寒中的重要作用[J]. 遗传, 2006, 28(2): 249-254.
- [4] Cushman J C, Bohnert H J. Genomics approaches to plant stress[J]. Curr Opin Plant Biol, 2000, 3(2): 117-124.
- [5] Cao Q, Kong W F, Wen P F. Plant freezing tolerance and genes express in cold acclimation[J]. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(4): 806-811.
- [6] Cai Q, Moore G A, Guy C L. An unusual group 2 LEA gene family in citrus responsive to low temperature [J]. Plant Mol Biol, 1995, 29(1): 11-23.
- [7] Jia Y, del Rio H S, Robbins A L, et al. Cloning and sequence analysis of a low temperature-induced gene from trifoliolate orange with unusual pre-mRNA processing [J]. Plant Cell Rep, 2004, 23(3): 159-166.
- [8] 龙桂友,刘杰,饶力群,等. 柑橘抗寒研究的现状与展望[J]. 生物技术通报, 2006(增刊): 58-62.
- [9] 罗坤,龙桂友,袁飞荣,等. *Ptcor8* 表达与积生理落叶及温度的关系[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2010, 36(4): 418-421.
- [10] Breton G. Expression profiling and bioinformatic analysis of a novel stress-regulated multispinning transmembrane protein family from cereals and *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2003, 132: 64-74.
- [11] Marchler-Bauer A. CDD: A conserved domain database for protein classification[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 33: 192-198.
- [12] Weiser G J. Cold resistance and injury in woody plants[J]. Science, 1970, 169: 1269.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 罗文翠