

高南,李俊林,郝东利,等. 基因的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):25-27.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.006

OsAKT2/3 基因的生物信息学分析

高南¹,李俊林^{1,2},郝东利¹,苏彦华¹

(1. 中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室,江苏南京 210008;

2. 南京林业大学森林资源与环境学院,江苏南京 210037)

摘要:Shaker 类型 K⁺ 通道在植物钾的吸收、转运及其他生理过程中发挥着重要作用。AKT2/3 是 Shaker 类型 K⁺ 通道中唯一既主导 K⁺ 内流,又允许去极化情况下 K⁺ 渗漏性外流的通道。水稻 OsAKT2/3 蛋白的生物信息学分析表明,OsAKT2/3 蛋白含有 K⁺ 通道的标志性序列 TxxTxGYGD;该基因分子式为 C₄₂₁₉H₆₆₉₃N₁₁₇₉O₁₂₃₃S₃₅,理论等电点为 6.64,氨基酸残基组成中亮氨酸残基含量最高;有一定的亲水性,为跨膜蛋白;可能存在 31 个翻译后修饰位点、5 种结构域、52 个磷酸化位点,不含信号肽;序列主要构件为 α-螺旋和折叠延伸;该蛋白与其他植物的 AKT2/3 家族成员具有较高的同源性。试验结果为 OsAKT2/3 基因生理功能的深入研究提供一定依据。

关键词:水稻;二级结构;磷酸化位点;三级结构;系统进化

中图分类号:Q785;Q945.12 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)09-0025-03

钾是植物必需的大量元素,对提高作物产量、改善产品品质起着重要作用。水稻(*Oryza sativa* L.)对钾素的需求量大,不同基因型的水稻对土壤中钾素的吸收利用存在很大差异^[1]。缺钾可影响细胞渗透压平衡,进而引起器官机能的破坏,影响植物的正常生长;并通过植物激素调节破坏植物体内的代谢和转运过程,导致作物的产量和品质大幅下降^[2]。我国大部分耕地土壤供钾不足,其中严重缺钾土壤(速效钾 < 50 mg/kg)约 2 000 万 hm²,占耕地面积的 20% 以上,且主要分布于我国的水稻产区;因此,需施用钾素化肥以保证水稻的丰产和品质,而我国钾矿资源十分匮乏,95% 以上的钾肥供应依赖进口^[3]。K⁺ 通道在植物体内的表达能改良植物的钾素营养性状^[4-5];因此,挖掘植物中钾吸收利用的基因并研究其生理功能,对水稻钾营养性状的改良及现有钾素资源的利用具有重要意义。Shaker 类型 K⁺ 通道在植物钾的吸收、转运及其他生理过程中发挥着重要作用^[2,6-7]。AKT2/3 是 Shaker 类型 K⁺ 通道中唯一既主导 K⁺ 内流,又允许去极化情况下 K⁺ 渗漏性外流的通道,其电生理特征表现为弱内向整流、能

够感应 K⁺ 水平、受 Ca²⁺ 和 H⁺ 调控^[8-9]。其独有的渗漏型电流,在过量 K⁺ 迅速吸收进入细胞而导致的膜电位去极化情况下,通过胞内 K⁺ 的渗漏从而实现膜电位的精确微调作用^[10]。目前,水稻的基因组测序已经完成,但关于水稻 K⁺ 通道的研究尚较少^[11-13]。本研究利用生物信息学的方法对水稻 OsAKT2/3 蛋白的理化性质、核苷酸序列组成、跨膜结构、亲水性、疏水性、亚细胞定位进行分析,并对其结构域、磷酸化位点、二级结构、三级结构进行预测,最后进行系统进化分析,以全面了解 OsAKT2/3 基因,为该基因生理功能的深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

NCBI 中 GenBank 数据库已注册水稻 OsAKT2/3 基因(JN989970.1)、拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.]的 AKT2/3(NP_567651.1)、大麦(*Hordeum vulgare* L.)的 HvAKT2(ABE99811.1)、雨树[*Samanea saman* (Jacq.) Merr.]的 SPICK1(AAD16278.1)和 SPICK2(AAD39492.1)、欧美杨(*Populus tremula* L. × *Populus tremuloides* Michx.)的 PTK2(CAC05489.1)、玉米(*Zea mays* L.)的 ZMK2(NP_001105120.1)。

收稿日期:2013-12-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:31000930)。

作者简介:高南(1981—),女,辽宁黑山人,博士,助理研究员,主要从事分子植物营养和植物逆境生理的研究。E-mail: springgn@

163.com。

[20] Fukuda A, Nakamura A, Tagiri A, et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2004, 45(2): 146-159.

[21] Zhao F, Wang Z, Zhang Q, et al. Analysis of the physiological mechanism of salt-tolerant transgenic rice carrying a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Suaeda salsa* [J]. *Journal of Plant Research*, 2006, 119(2): 95-104.

[22] 李金耀,张富春,马纪,等. 植物分子水平的耐盐机制[J]. 植物生理学通讯,2003,39(6):715-719.

[23] 吕慧颖,李银心,孔凡江,等. 植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白研究进展[J]. 植物学通报,2003,20(3):363-369.

[24] 吕慧颖,李银心,陈华,等. 番杏 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的克隆及特性分析[J]. 高技术通讯,2004,14(11):26-31.

[25] 郭会敏,顾春笋,刘兆磊,等. 荷花液泡膜型 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *NnNHX1* 的克隆与特性分析[J]. 植物生理学通讯,2010,46(10):1025-1032.

[26] 严一诺,孙淑斌,徐国华,等. 菊芋 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因的克隆与表达分析[J]. 西北植物学报,2007,27(7):1291-1298.

1.2 方法

OsAKT2/3 蛋白的理化性质使用 ProtParam 软件在线分析;蛋白跨膜结构使用 TMHMM 软件在线分析;亲水性及疏水性使用 ProtScale 软件在线分析;蛋白亚细胞定位使用 TargetP 软件、WoLF PSORT 软件在线分析;蛋白序列上潜在的结构域和功能位点使用 MotifScan 软件、CCD 软件预测;蛋白磷酸化位点使用 NetPhos 软件在线分析;蛋白信号序列使用 SignalP4.1 软件在线分析;蛋白二级结构使用 SOPMA 软件在线分析;蛋白三级结构使用 Phyre2 软件在线分析;利用 MEGA 6.05 软件,采用 Neighbor - Joining 法构建系统进化树。上述各分析软件的网址见表 1。

表 1 分析软件的名称和网址

软件名称	软件网址
CCD	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index
MotifScan	http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan
NetPhos	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
ProtScale	http://web.expasy.org/protscale/
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
WoLF PSORT	http://wolfsort.org/

2 结果与分析

2.1 OsAKT2/3 蛋白的理化性质分析

由序列分析结果可知,OsAKT2/3 蛋白含有 K⁺ 通道的标志性序列 TxxTxGYGD。用 ProtParam 软件分析得知,OsAKT2/3 蛋白共有 13 359 个原子,分子量为 94 783.8,蛋白的分子式为 C₄₂₁₉H₆₆₉₃N₁₁₇₉O₁₂₃₃S₃₅,理论等电点为 6.64。在 855 个氨基酸残基组成中,OsAKT2/3 蛋白的 N 端为蛋氨酸,含量较高的氨基酸残基包括亮氨酸残基(10.2%)、缬氨酸残基(8.5%)、甘氨酸残基(7.3%)、精氨酸残基(7.1%)、丝氨酸残基(7.1%);含量较低的氨基酸残基包括色氨酸残基(1.1%)、半胱氨酸残基(1.4%)等。带负电荷的氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)残基为 99 个;带正电荷的氨基酸(精氨酸、

赖氨酸)残基为 95 个。OsAKT2/3 蛋白在哺乳动物、酵母、大肠杆菌中的半衰期分别为 30 h(体外)、>20 h(体内)、>10 h(体内),不稳定指数为 39.03,该蛋白为稳定蛋白。

2.2 OsAKT2/3 蛋白的亲水性、疏水性、亚细胞定位

使用 ProtScale 软件预测 OsAKT2/3 蛋白的亲水性及疏水性可知,氨基酸的最低分值为 -2.967,最高分值为 3.133(图 1)。整体来看,亲水性氨基酸残基分布于整条肽链,且多于疏水性氨基酸残基。使用 TMHMM 软件进行预测,将参数设置为默认值,可知 OsAKT2/3 蛋白为跨膜蛋白。Wolfpsort 软件预测该蛋白可能在细胞质膜上,TargetP 软件预测该蛋白在叶绿体膜上的可能性为 79.6%。

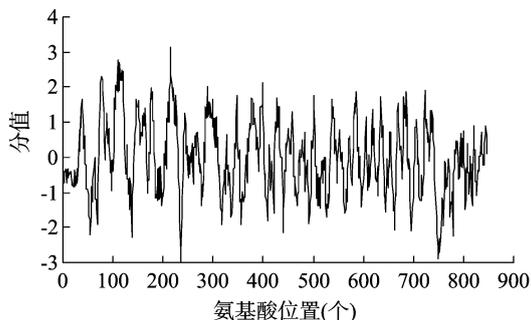


图 1 OsAKT2/3 蛋白的亲水性及疏水性分析

2.3 OsAKT2/3 蛋白结构域、功能位点的预测

OsAKT2/3 蛋白序列上潜在的结构域、功能位点使用 MotifScan 软件、CCD 软件进行预测。结果表明,该蛋白可能存在的翻译后修饰位点包括 1 个酰胺化位点、4 个 N - 糖基化位点、1 个 cAMP 磷酸化位点、11 个酪蛋白激酶 II 位点、7 个酰化位点、7 个蛋白激酶磷酸化位点;发现 5 种结构域,分别为锚蛋白重复(ANK, cd00204)、环核苷酸结合结构域(CAP_ED, cd00038)、未知功能的 DUF3354 超级家族结构域(DUF3354, pfam11834)、离子转运结构域(Ion_trans_2, pfam07885)、电压依赖的钾离子通道结构域(PLN03192, PLN03192)(图 2)。该蛋白具有 Shaker 基因家族的典型特征,即蛋白的 N 末端包括 6 个跨膜区(S₁ ~ S₆),有电压感受区和高度保守的通道孔区。使用磷酸化位点预测程序 NetPhos 2.0 发现 OsAKT2/3 蛋白有 37 个潜在的丝氨酸磷酸化位点、7 个潜在的苏氨酸磷酸化位点、8 个潜在的酪氨酸磷酸化位点。使用 SignalP 4.1 Server 软件在线分析 OsAKT2/3 蛋白的信号肽情况,结果显示该蛋白不含信号肽序列。

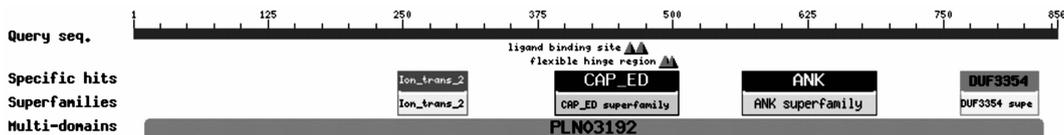


图 2 OsAKT2/3 蛋白的结构域预测

2.4 OsAKT2/3 蛋白二级结构、三级结构的分析

使用 SOPMA 软件预测 OsAKT2/3 蛋白的二级结构,结果显示 OsAKT2/3 蛋白由 43.16% 的 α - 螺旋、17.19% 的折叠延伸、8.30% 的 β - 转角、31.35% 的无规则卷曲构成,其中折叠延伸和 β - 转角不均匀分布于整个蛋白质的多肽链上。依据模板 c2ptmA,采用折叠识别法,使用 Phyer2 软件在线预测 OsAKT2/3 蛋白序列主链原子位置,生成预测蛋白三级结构

模型(图 3),并依据能量最小化原理使侧链集团处于能量最小的位置。该蛋白主要由 α - 螺旋和无规则卷曲构成,与蛋白质二级结构分析结果相似。

2.5 OsAKT2/3 编码基因的系统进化分析

在 NCBI 上共选取 6 种植物的 7 个 AKT2/3 基因序列,以拟南芥 KAT1 基因作为外群,构建系统进化树。结果显示,水稻 OsAKT2/3 在进化上与单子叶植物玉米的 ZMK2、单子叶植

物大麦的 HvAKT2 的亲缘关系较近,与双子叶植物拟南芥的 AKT2/3 等有较高的相似度(图4)。

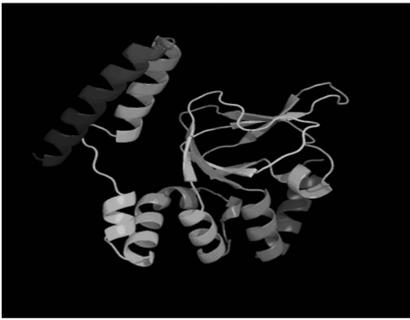


图3 预测的 OsAKT2/3 蛋白三级结构

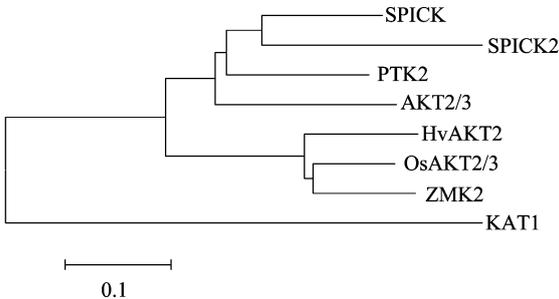


图4 OsAKT2/3 编码基因的系统进化树

3 结论与讨论

蛋白质的功能不仅取决于其一二级结构,在很大程度上也取决于其高级结构。生物信息学综合运用数学、计算机技术、生物学的各种工具,较好地阐明和理解大量数据所包含的生物学意义。基因序列及其特性分析、蛋白质空间结构模拟等是生物信息学的重要组成部分。利用生物信息学的原理,通过计算机模拟相关的辅助信息,可在较短时间内,用较低成本获得大量可靠的蛋白质结构和功能信息^[14-15]。本研究通过网络资源,在前期获得水稻 *OsAKT2/3* 的基础上,应用 ProtParam、TMHMM 等分析软件,对 *OsAKT2/3* 蛋白的亚细胞定位、结构域、磷酸化位点、二级结构等蛋白特性进行预测,并对其三级结构进行初步分析模拟,以期尽可能多地获得该蛋白质结构及功能的信息,为 *OsAKT2/3* 基因功能的研究提供更多、更可靠的理论依据。

Shaker 类型 K^+ 通道在植物钾的吸收、转运及其他生理过程中发挥着重要作用^[2,6,11]。*OsAKT2/3* 蛋白含有 K^+ 通道的标志性序列 TxxTxGYGD;该基因分子式为 $C_{4219}H_{6693}N_{1179}O_{1233}S_{35}$,理论等电点为 6.64,氨基酸残基组成中亮氨酸残基含量最高;有一定的亲水性,为跨膜蛋白;可能存在 31 个翻译后修饰位点、5 种结构域、52 个磷酸化位点,不含信号肽;序列主要构件为 α -螺旋和折叠延伸;该蛋白与其他植物的 AKT2/3 家族成员具有较高的同源性。本试验结果为 *OsAKT2/3* 基因生理功能的深入研究提供一定依据。然而,同源性仅是基因序列和蛋白结构上的类似,虽然某些典型功能相近,但来源不同的同源通道表现出独特之处。在氨基酸序列、关键结构元件上,玉米的 ZmK2.1 K^+ 通道与拟南芥的 KAT1 通道均高度同源,但其功能特征却存在显著差异^[16]。与其他 AKT2/3 型 K^+ 通道相比,*OsAKT2/3* 的功能特征是否存在独特之处仍

需进一步研究。

参考文献:

- [1] 王为木,杨肖娥,魏幼璋,等. 水稻不同基因型吸收利用土壤钾素的差异[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2005,31(1): 52-58.
- [2] Wang Y, Wu W H. Potassium transport and signaling in higher plants [J]. Annual Review of Plant Biology,2013,64:451-476.
- [3] 李庆远,朱兆良,于天仁. 中国农业持续发展中的肥料问题[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1998.
- [4] 施卫明,王校常,严蔚东,等. 外源钾通道基因在水稻中的表达及其钾吸收特征研究[J]. 作物学报,2002,28(3):374-378.
- [5] Lebaudy A, Vavasasseur A, Hosity E, et al. Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2008, 105(13):5271-5276.
- [6] Véry A A, Sentenac H. Molecular mechanisms and regulation of K^+ transport in higher plants[J]. Annual Review of Plant Biology,2003, 54:575-603.
- [7] 马小娟,戚金亮,印莉萍,等. 植物钾离子转运相关蛋白及基因研究进展[J]. 首都师范大学学报:自然科学版,2004,25(2): 41-45.
- [8] Marten I, Hoth S, Deeken R, et al. AKT3, a phloem-localized K^+ channel, is blocked by protons [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,1999,96(13): 7581-7586.
- [9] Lacombe B, Pilot G, Michard E, et al. A shaker-like K^+ channel with weak rectification is expressed in both source and sink phloem tissues of *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell,2000,12(6):837-851.
- [10] Gajdanowicz P, Michard E, Sandmann M, et al. Potassium (K^+) gradients serve as a mobile energy source in plant vascular tissues [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2011,108(2):864-869.
- [11] Fuchs I, Stölzle S, Ivashikina N, et al. Rice K^+ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress[J]. Planta,2005,221(2):212-221.
- [12] Gupta M, Qiu X, Wang L, et al. Kt/HAK/KUP potassium transporters gene family and their whole-life cycle expression profile in rice (*Oryza sativa*) [J]. Molecular Genetics and Genomics,2008,280(5):437-452.
- [13] Obata T, Kitamoto H K, Nakamura A, et al. Rice shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells[J]. Plant Physiology,2007,144(4):1978-1985.
- [14] Elmasri R, Ji F, Fu J, et al. Modelling concepts and database implementation techniques for complex biological data [J]. International Journal of Bioinformatics Research and Applications, 2007,3(3):366-388.
- [15] Kelley L A, Sternberg M J. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server[J]. Nature Protocols,2009,4(3):363-371.
- [16] Su Y H, North H, Grignon C, et al. Regulation by external K^+ in a maize inward shaker channel targets transport activity in the high concentration range [J]. The Plant Cell,2005,17(5):1532-1548.