

刘玉洁,郭丹妮,张 渝,等.沙田柚 GDSL 酯酶/脂肪酶基因的鉴定及序列分析[J].江苏农业科学,2017,45(11):45-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.012

沙田柚 GDSL 酯酶/脂肪酶基因的鉴定及序列分析

刘玉洁,郭丹妮,张 渝,覃信梅,李惠敏,秦新民

(广西师范大学生命科学学院/珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室,广西桂林 541004)

摘要:利用高通量测序技术对沙田柚自交和异交花柱进行转录组测序。通过差异分析得到 GDSL 酯酶/脂肪酶的基因序列,该基因全长 1 306 bp(GenBank 登录号:KU159279),开放阅读框(简称 ORF)全长 1 104 bp,共编码 367 个氨基酸,编码的蛋白质分子量为 40.09 ku,理论等电点为 6.44,含有 1 个与 SGNH 蛋白相同的保守结构域(conserved active sites,简称 CAS);GDSL 基因在沙田柚自交 1 d 花柱中的表达量(简称 RPKM)为 4.68,2 d 为 2.41,3 d 则迅速下降到 0.27;在异交 1 d 花柱中该基因的表达量为 4.48,2 d 迅速升高至 7.43,3 d 仍维持较高水平为 4.37;系统进化树显示,沙田柚 GDSL 酯酶/脂肪酶基因与甜橙(*Citrus sinensis*)亲缘关系很近,属于同一进化分支。

关键词:沙田柚;GDSL 酯酶/脂肪酶基因;序列分析;鉴定

中图分类号:S666.301 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)11-0045-04

植物自交不亲和是指具有完全花且能够产生雌雄配子,雌蕊的柱头或花柱能特异性识别与自体基因型相同的花粉,导致花粉不萌发或花粉管停止生长的一种现象^[1]。在高等植物中,据估计有超过一半的显花植物表现出自交不亲和性,这种现象在被子植物中尤其明显^[2]。自交不亲和对植物保持遗传多样性以及杂种优势有着极其重要的作用。

目前,植物自交不亲和性的研究取得了较大进展。在茄科、车前草科、罂粟科,自交不亲和物种利用胞外核糖核酸酶(简称 S-RNase)阻止花粉管的生长^[3]。在蔷薇科、玄参科中,自交不亲和现象受 S 位点相关的 F-box 基因 *SLF* 的调控,这些基因能在花粉中特异性表达^[4]。此外,一些基因也参与了植物自交不亲和反应,如参与防御的蛋白质可能在花粉萌发以及花粉管延伸到生长停止、破裂等一系列过程中发挥作用^[5]。Distefano 等发现与花粉特异性识别以及花粉管定向生长有关的蛋白表现出多样化特性^[6]。钙离子在调节花粉管的生长方面也有重要作用^[7-8]。

沙田柚属于配子体高度自交不亲和的果树。目前,沙田柚自交不亲和的研究在蛋白质化学、细胞学、形态学方面取得了一定的进展。薛妙男等发现,沙田柚自交花粉管停止生长的位置在花柱的 1/2 处^[9]。杨继华等对沙田柚自交花柱特异蛋白的分子量、等电点、N-末端氨基酸序列进行了测定^[10-11]。秦新民等对沙田柚花粉管特异蛋白进行了分离和鉴定^[12]。同时,花柱通道细胞中特异蛋白以及花粉管中特异蛋白的产生部位及分布也得到确定^[13-15]。

GDSL 酯酶/脂肪酶因具有保守结构域(GDS)(L)保守区

而得名,其中,G、D、S 分别代表甘氨酸、天冬氨酸、丝氨酸。目前,尚未见 GDSL 酯酶/脂肪酶基因与植物授粉和自交不亲和性相关的研究报道。笔者对沙田柚自交和异交花柱进行转录组测序,通过对所测的 Unigenes 功能进行注释,获得了沙田柚 GDSL 酯酶/脂肪酶基因,对该基因编码蛋白质的理化特征、在沙田柚自交与异交花柱中的表达进行了分析,旨在为深入研究 GDSL 酯酶/脂肪酶基因的生理功能以及沙田柚自交不亲和的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

沙田柚试验材料取自广西壮族自治区桂林市灵川县潮田乡大山口村果园 10 年生结果树。取盛花期人工自交授粉(沙田柚×沙田柚)和异交授粉(酸柚×沙田柚)后 1~3 d 的花柱及当天开花的未授粉的花柱为试材,立即于液氮中速冻,并保存在-80℃超低温冰箱中。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA 的提取、建库及测序 RNA 的提取按改良的 Trizol 法^[16]进行,RNA 检测合格后交由深圳华大基因科技服务有限公司建库测序,每个样品产生 8 Gb 数据(资料另文发表)。首先用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA,然后将 mRNA 随机打断成片段,以这些 RNA 片段为模板,用随机引物合成第 1 条 cDNA 链,然后加入缓冲液、dNTPs、核糖核酸酶 H(简称 RNase H)、DNA 聚合酶 I(简称 DNA polymerase I)合成第 2 条 cDNA 链。cDNA 链经试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱之后做末端修复、加 poly(A)并连接测序接头,然后用琼脂糖凝胶电泳检测文库插入片段大小,最后进行 PCR 扩增,制备好的文库用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序。

1.2.2 序列分析和系统树构建 使用 DNAMAN、SWISS-MODEL、NetPhos 2.0、TMPRED、Finder 等软件对测序所得序列进行序列及蛋白质理化性质分析。基于氨基酸序列 GDSL 酯酶/脂肪酶基因的系统进化树用 DNAMAN 软件进行构建。

收稿日期:2016-01-13

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360477);广西教育厅项目(编号:2013YB036)。

作者简介:刘玉洁(1990—),女,河南郑州人,硕士研究生,主要从事植物生殖生理方面的研究。E-mail:2510965486@qq.com。

通信作者:秦新民,博士,教授,主要从事植物分子生物学方面的研究。E-mail:xmqin@mailbox.gxnu.edu.cn。

2 结果与分析

2.1 基因的生物信息学分析

沙田柚 GDLSL 酯酶/脂肪酶基因 (*UnigeneI7983_All*) 全长

序列为 1 306 bp (GenBank 登录号: KU159279), 使用 NCBI 网站的 NCBI ORF Finder 和生物信息学软件 DNAMAN 进行分析, 该序列包含 1 个 1 184 bp 的开放阅读框 (简称 ORF), 编码 367 个氨基酸 (图 1)。

CAATCTTTTAAATTTTCCAATTTCTTTTCTTTTATTGAAAAAATCCAATTTATTCT
TCTTTTGCTATCAATGCCGATGGGGCTTAAAGTATGTCATTTAGTGCTATCATTGATTTT
M G L K V C H L V S L I L
GATGGACTTGTCAAAATGGGTAAATGGAGCAGAGCAGGTGCCATGTTACTTCATTTTGG
M D L S K W V N G A E Q V P C Y F I F G
TGATTCATTATGGGATAATGGCAATAACAATGCTCTTTTCAACGAAGGCTAAAGCCAATTA
D S L W D N G N N N A L S T K A K A N Y
CCCTCCTTATGGGATTGATTTTCTGGAAGGCGCAACTGGAAGATTACAAATGGTCGAAA
P P Y G I D F P E G A T G R F T N G R N
CATGGGAGATATTTTAGCTCAACTTCTAGGGTTTGAGAAATTCATTCCGTCTTTTGGCGCA
M G D I L A Q L L G F E N F I P S F A H
TGCTAGTAATGCAAAAGATCAGGAATTTCTCAGAGGTGTAAATTATGCATCTGGAGGAGC
A S N A K D Q E I L R G V N Y A S G G A
TGGAATTGCAATGAAACTGCTCGAAACAACCTAGGACCCGTAATTAGCATGGACATGCA
G I R N E T A R N N L G P V I S M D M Q
GCTACAAAATCACCAAAATACAGCCTCTCGCATTGCAAAAATATTAGGAAATAGTAAAAA
L Q N H Q N T A S R I A K I L G N S K K
ATCAGCTGCAAAACACCTAAGCAAATGCATATACTCAGTTGGAATTGGCAACAACGATTA
S A A K H L S K C I Y S V G I G N N D Y
CATTAACAATTACCTATTGCCTCAGTTTTACCCAACGAATAGTTCTTATACGCCTGATCA
I N N Y L L P Q F Y P T N S S Y T P D Q
ATATGCCACCGTTCTAATTCAGCAATATTCTCGTCAATTAAAGACTTTGTACAACCTTTGG
Y A T T V L I Q Q Y S R Q L K T L Y N F G
AGCAAGGAAGGTAGCTCTATTGGATTAGGTCTTATCGGTTGTACACCCGGCAGTATTGC
A R K V A L F G L G L I G C T P G S I A
CATGTATGGCAACGGTACTTCATGCGTAGAGTACATAACAATGAAGTCCAATTTGTTAA
M Y G N G T S C V E Y I N N E V Q M F N
CACCATGCTCGTATCACTAGTCGATGAACCTGAACAACAATTTCCAGGATACCAAATTCAT
T M L V S L V D E L N N N F Q D T F I
CTATGTGAACACTTCCAGCGTATCATCTAGTATTCCAGCAACTGTGATCAACGCCTCTCC
Y V N T S S V S S I P A T V I N A S P
CTGCTGTGAAGTAGGGAATTTAACAGCGAATAACGGCGTTTAAACGTGCATTCCATCGGG
C C E V G N L T A N N G V L T C I P S G
GACTGCATGCCCTAACAGAGCTGAGCATATCATGTGGGATGCAGCACATCCGACTGAGGC
T A C P N R A E H I M W D A A H P T E A
TGCCTATGTAATGATGGCTGAAAGATCATAAAGGCTCAACTTCCTTCTGATACTTACCC
A Y V M M A E R S Y K A Q L P S D T Y P
GATTGATATTACACCTCGCTCAGCTTAATTTAACTAACTAATTAATATAAAAAATAATT
I D I H L A Q L N L T N *
AATTAATCATAGTTAAATAGAGAATCTCTATCAAAATGTACCATTTCCTTTAATTTGTTA
ATTTGTTGTACTCAAAATTGCTTTGTTGTAATGCAACTTCAGCGGAG

图1 GDLSL 酯酶/脂肪酶基因序列和推测的氨基酸序列

2.2 编码蛋白质的分析和疏水性预测

在线软件 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析表明, 该基因编码的蛋白质分子量 (简称 MW) 为 40.09 ku, 等电点 (简称 pI) 为 6.44。该蛋白质带负电荷的氨基酸 (Asp + Glu) 总数为 26, 带正电荷的氨基酸 (Arg + Lys) 总数为 24; 分子式为 $C_{1771}H_{2749}N_{483}O_{540}S_{20}$; 不稳定系数为 38.54, 属于稳定性的蛋白质。

蛋白质序列的疏水性用 DNAMAN 软件分析, 结果见图 2。此基因所编码肽链的疏水性平均值为 -0.144, 为亲水性蛋白。

2.3 功能结构域分析

用 NCBI 的安全域架构检索工具 (Conserved Domain Architecture Retrieval Tool) 分析编码的氨基酸序列, 发现该蛋白质具有 1 个与 SGNH 蛋白相同的 CAS 保守结构域 (图 3)。

2.4 跨膜预测

运用跨膜蛋白数据库 (简称 TMbase) (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 预测该蛋白的跨膜区域。由图 4 可知, 此蛋白共有 9 个跨膜区, 其中 1~21 位、78~98 位、218~236 位、273~296 位氨基酸的跨膜方向为由内向外, 分值分别为 12、88、227、283。而 2~21 位、78~96、

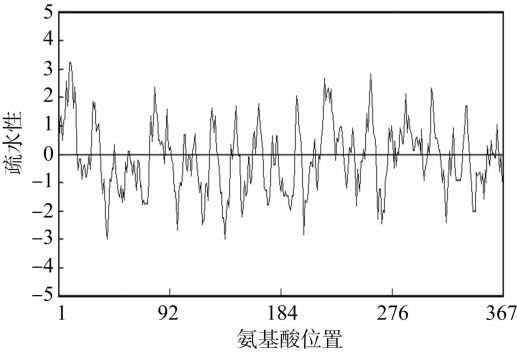


图2 沙田柚 GDLSL 酯酶/脂肪酶疏水性分析

218~236、275~295、292~321 位氨基酸的跨膜方向为由外到内, 分值分别为 10、88、227、285、308。

2.5 蛋白质磷酸化预测

通过在线蛋白磷酸化位点预测分析软件 (简称 NetPhos 2.0 Server), 对 GDLSL 酯酶/脂肪酶基因所编译的蛋白质进行预测, 该多肽链分值在 0.5 以上可能的磷酸化位点共有 19 个 (图 5)。其中丝氨酸 (Ser) 可能的磷酸化位点共有 9 个, 分别位于肽链的 36、47、152、155、279、283、284、293、343 位; 苏氨酸 (Thr) 可能的磷酸化位点有 4 个, 分别位于 66、120、240、

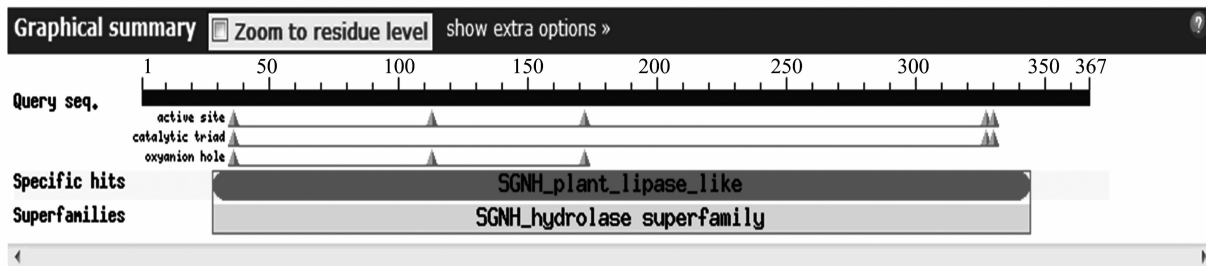


图3 GDSL 酯酶/脂肪酶保守结构域

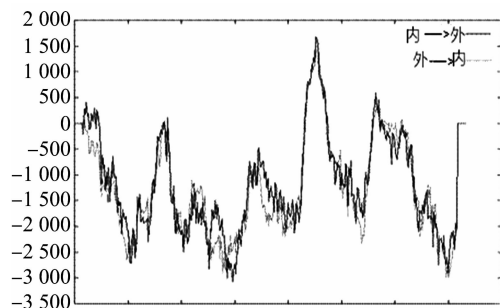


图4 沙田柚 GDSL 酯酶/脂肪酶的跨膜区预测

278 位;酪氨酸的磷酸化位点有 6 个,分别位于 109、174、195、245、275、336 位。

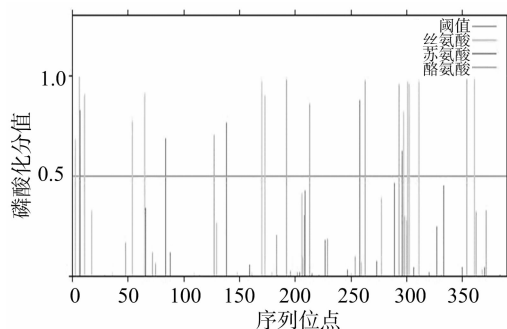


图5 GDSL 酯酶/脂肪酶氨基酸序列磷酸化修饰预测

2.6 蛋白质二级结构及三级结构预测

通过在线分析软件 Predict Protein (<http://www.predict-protein.org/>) 对 GDSL 酯酶/脂肪酶二级结构进行预测, α -螺旋所占比例为 32.7%, β -折叠所占比例为 5.72%,无规则卷曲所占比例为 61.58%。

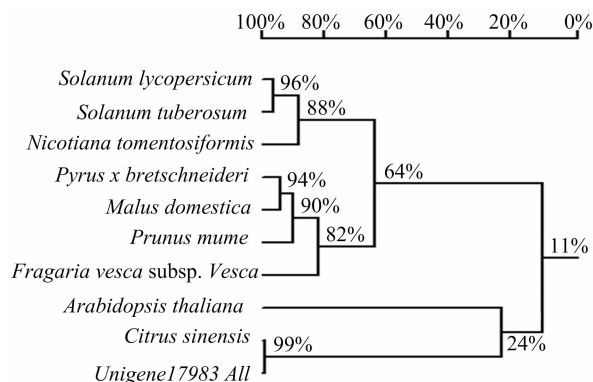
利用 SWISS-MODEL 工具对该蛋白三级结构进行在线预测,预测结果如图 6 所示。结果表明,该蛋白的三级结构含有 5 个 α -螺旋、5 个 β -折叠,其间由无规则卷曲连接。

2.7 同源性分析

从 GenBank 数据库中下载其他植物的 GDSL 酯酶/脂肪酶 At1g29660 类基因编码的氨基酸进行同源性分析,沙田柚 GDSL 酯酶/脂肪酶 At1g29660 类基因编码的氨基酸序列与甜橙 (*Citrus sinensis*, XM_006465091.1) 的同源性为 99%。在此基础上,笔者下载了 9 种植物的 GDSL 酯酶/脂肪酶序列构建系统树,结果表明沙田柚 GDSL 酯酶/脂肪酶基因编码的蛋白与芸香科甜橙的亲缘关系很近,属于同一进化分支(图 7)。



图6 沙田柚 GDSL 酯酶/脂肪酶的三级结构



Solanum lycopersicum(番茄, XP_004245509.1); *Solanum tuberosum*(马铃薯, XP_006343842.1); *Nicotiana tomentosiformis*(拟葎花烟草, XP_009592720.1); *Pyrus x bretschneideri*(梨, XP_009358619.1); *Malus domestica*(苹果, XP_008341675.4); *Prunus mume*(青梅, XP_008239138.1); *Fragaria vesca* subsp. *Vesca*(草莓, XP_011463996.1); *Arabidopsis thaliana*(拟南芥, AEC07592.1)

图7 基于氨基酸序列的 GDSL 酯酶/脂肪酶系统发育树

3 结论与讨论

氨基酸同源性分析可知,本研究所克隆的沙田柚 *Unigene17983_All* (GenBank 登录号: KU159279) 基因与甜橙的 GDSL 酯酶/脂肪酶 At1g29660 同源性为 99%,分析该基因编码蛋白质的功能结构域发现,该蛋白质具有 1 个与 SGNH 蛋白质相同的保守 CAS 结构域。GDSL 酯酶/脂肪酶是脂肪水解酶超家族的一个亚家族,具有广泛的底物特异性和专一性,能够水解多种酯类物质^[17]。其中 G、D、S 分别代表甘氨酸、天冬氨酸、丝氨酸的残基活性位点在 N 末端^[18-21]。其活性位点非常灵活,因其活性位点与底物结合导致构象改变而使其有更加广泛的底物结合性,因此它的底物特异性较为广泛且具有

多重功能^[22-24]。

GDSL 酯酶/脂肪酶是一个多基因家族,广泛参与植物的生长发育、器官形态建成、次生代谢和逆境胁迫等生理活动^[17]。其中 GDSL 酯酶/脂肪酶与植物授粉和胚胎发育密切相关。Kondou 等发现拟南芥 *RGE1* 基因可能在胚乳中表达并且调节胚胎的发育^[25]。EXL4 是 GDSL 脂肪酶家族的一员,编码的花粉壁蛋白是胞外脂肪酶,能够促进柱头水化作用的开始^[26],而其中 1 个拟南芥角质水解酶(cuticle destructing factor 1,简称 CDEF1)能够水解柱头表面的角质层,进而促进花粉管穿透柱头^[27]。而本研究中所克隆的 GDSL 酯酶/脂肪酶为 GDSL 酯酶/脂肪酶 At1g29660,*GDSL* 基因在沙田柚自交 1 d 花柱中表达量(简称 RPKM)为 4.68,2 d 为 2.41,3 d 则迅速下降到 0.27。而在异交 1 d 花柱中该基因的表达量为 4.48,2 d 迅速升高至 7.43,3 d 仍维持较高水平(4.37)。薛妙男等发现,沙田柚自交和异交条件下花粉的萌发和穿过柱头的过程没有差异,但花粉管在花柱中的生长情况与自交和异交显著相关,在自花授粉后 2~3 d 花粉管在花柱的 1/2 处生长受阻,同时花粉管壁增厚,出现胼胝质的积累;而异交花粉管生长正常,最终进入胚囊受精^[9]。观察沙田柚花柱通道细胞的亚细胞结构特征发现,自花授粉后 2~3 d,花柱通道细胞处于衰退状态,表现在内质网、高尔基体逐渐解体并液泡化^[13]。*GDSL* 基因在沙田柚自交 1 d 与异交 1 d 花柱中的表达基本相同,而在 2~3 d 自交花柱中的表达量快速下降,与自花授粉后 2~3 d 花柱通道细胞处于衰退状态在时间上吻合,推测 *GDSL* 基因表达量的快速下降造成了细胞内酯类物质代谢受阻。至于 *GDSL* 基因在沙田柚自交不亲和性反应中的功能有待进一步证实。

参考文献:

- [1] de Nettancourt D. Incompatibility in angiosperms[J]. Sexual Plant Reproduction,1997,10(4):185-199.
- [2] Lewis D. Sexual incompatibility in plants[M]. Studies in Biology,1979.
- [3] Kubo K,Entani T,Takara A,et al. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility[J]. Science,2010,330(6005):796-799.
- [4] Ushijima K,Sassa H,Dandekar A M,et al. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond:identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism[J]. The Plant Cell,2003,15(3):771-781.
- [5] 何兴波,雷莉莉,杨绍彬,等. 自交不亲和杏李品种‘风味玫瑰’授粉早期花柱蛋白质差异分析[J]. 林业科学研究,2014,27(5):590-597.
- [6] Distefano G,Caruso M,La M S,et al. Histological and molecular analysis of pollen-pistil interaction in *Clementine*[J]. Plant Cell Reports,2009,28(9):1439-1451.
- [7] Taylor L P,Hepler P K. Pollen germination and tube growth[J]. Annual Review of Plant Biology,1997,48(1):461-491.
- [8] Rudd J J, Franklin-Tong V E. Calcium signaling in plants[J]. Cellular and Molecular Life Sciences,1999,55(2):214-232.
- [9] 薛妙男,陈腾士,杨继华. 沙田柚自交和异交亲和性观察[J]. 园艺学报,1995,22(2):127-132.
- [10] 杨继华,李红艳,薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白分离及鉴定[J]. 广西师范大学学报,2000,18(4):66-70.
- [11] 杨继华,尧桂荣,薛妙男. 沙田柚花柱 S-糖蛋白的纯化和 N-端序列测定[J]. 广西师范大学学报,2001,19(1):72-79.
- [12] 秦新民,李惠敏,薛妙男,等. 沙田柚自交、异交花粉管蛋白的双向电泳分析[J]. 广西植物,2004,24(6):566-569.
- [13] 薛妙男,李义平,张杏辉,等. 沙田柚自交花柱中识别蛋白的免疫金定位[J]. 园艺学报,2001,28(1):59-61.
- [14] 秦新民,莫花浓,万 珊,等. 沙田柚花粉管特异蛋白的免疫细胞化学研究[J]. 广西师范大学学报,2008,26(4):113-115.
- [15] 秦新民,莫花浓,石膏萍,等. 沙田柚花粉管 S1-RNase 免疫胶体金定位研究[J]. 广西农业科学,2009,40(5):483-485.
- [16] Simms D, Cizdziel P E, Chomczynski P. Trizol: a new reagent for optimal single-step isolation of RNA[J]. Focus,1993,15(4):532-535.
- [17] Akoh C C, Lee G C, Liaw Y C, et al. GDSL family of serine esterases/lipases[J]. Progress in Lipid Research,2004,43(6):534-552.
- [18] Brick D J, Brumlik M J, Buckley J T, et al. A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize[J]. FEBS Letters,1995,377(3):475-480.
- [19] Upton C, Buckley J T. A new family of lipolytic enzymes? [J]. Trends in Biochemical Sciences,1995,20(5):178-179.
- [20] Lee D S, Kim B K, Kwon S J, et al. *Arabidopsis* GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,2009,379(4):1038-1042.
- [21] Updegraff E P, Zhao F, Preuss D. The extracellular lipase EXL4 is required for efficient hydration of *Arabidopsis* pollen[J]. Sexual Plant Reproduction,2009,22(3):197-204.
- [22] Huang Y T, Liaw Y C, Gorbatyuk V Y, et al. Backbone dynamics of *Escherichia coli* thioesterase/protease I: evidence of a flexible active-site environment for a serine protease[J]. Journal of Molecular Biology,2001,307(4):1075-1090.
- [23] Hammes G G. Multiple conformational changes in enzyme catalysis[J]. Biochemistry,2002,41(26):8221-8228.
- [24] Tyukhtenko S I, Litvinchuk A V, Chang C F, et al. NMR studies of the hydrogen bonds involving the catalytic triad of *Escherichia coli* thioesterase/protease I[J]. FEBS Letters,2002,528(1):203-206.
- [25] Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, et al. RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth[J]. Plant Physiology,2008,147(4):1924-1935.
- [26] 李志兰, 华水金, 蒋立希. 植物 GDSL 脂酶家族基因的研究进展[J]. 农业生物技术学报,2014,22(7):916-924.
- [27] Takahashi K, Shimada T, Kondo M, et al. Ectopic expression of an esterase, which is a candidate for the unidentified plant cutinase, causes cuticular defects in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Cell Physiology,2010,51(1):123-131.