

李明,丁丽娜,王政,等.甘蓝型油菜脂肪酶基因 *BnGLIP1* 的克隆与分析[J].江苏农业科学,2020,48(4):59-65.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.009

甘蓝型油菜脂肪酶基因 *BnGLIP1* 的克隆与分析

李明¹,丁丽娜¹,王政¹,曹维¹,王玉康¹,张洁夫²,谭小力¹

(1.江苏大学生命科学研究院,江苏镇江 212013; 2.江苏省农业科学院经济作物研究所,江苏南京 210014)

摘要:植物 GDSL 脂肪酶是一个重要的脂肪酶家族,具有水解酶活性,在植物体内参与众多的生理活动。从甘蓝型油菜中克隆到 1 个 GDSL 类型脂肪酶基因,将其命名为 *BnGLIP1*。该脂肪酶基因编码的蛋白有 360 个氨基酸,含有 20 种氨基酸,分子质量为 39 545.35 u,理论等电点为 4.95。生物信息学分析表明,该蛋白属于稳定性蛋白,可能为亲水性蛋白;编码蛋白的 N 端具有信号肽序列,推测可能为外分泌蛋白;蛋白质二级和三级结构显示 α 螺旋和无规则卷曲所占比例较高。组织特异性表达分析表明,*BnGLIP1* 在甘蓝型油菜的根、茎、茎尖、叶、花、角果、种子等中均有表达,其中角果中的表达量最高,茎中最低。干旱、高盐等胁迫处理均能诱导 *BnGLIP1* 的表达,表明 *BnGLIP1* 脂肪酶基因在植物的胁迫响应中发挥作用。

关键词:甘蓝型油菜;*BnGLIP1*;生物信息学;表达模式分析;胁迫响应

中图分类号:S634.301;Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)04-0059-06

油菜是继水稻、小麦、玉米和大豆之后的第五大农作物,主要分布在长江流域,属于十字花科,主要分为三大类型,即白菜型油菜、芥菜型油菜和甘蓝型油菜。其中甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是我国重要的油料作物,油菜籽中除含有丰富的油脂外,还含有丰富的蛋白质,是一种潜在的植物蛋白资源^[1]。此外,油菜又是生物柴油的理想原料,是一种优质能源,油菜生产对保障我国食用油安全供给有重要意义,同时对发展生物能源也有潜在价值^[2]。

GDSL 脂肪酶是具有多功能性质的水解酶,在多种植物体中均有发现^[3-6]。近年来许多研究发现,GDSL 在植物生长发育、器官形态发生、逆境胁迫和脂代谢等方面发挥着重要作用^[7-10]。譬如,*BnLIP2* 在油菜的种子萌发、形态建成及开花过程中起着重要作用^[11]。Takahashi 等鉴定到了 1 个拟南芥 *CDEF1* (cuticle destructing factor 1) 基因,该基因表达的蛋白属于 GDSL 脂肪酶/酯酶家族,参与花粉管穿透柱头并且可促进侧根的形成^[12]。此外,Kim 等研究发现,拟南芥 *glip1-1* 突变体在接种坏死病

原菌后表现出诱导抗性缺陷,而在过表达 *GLIP1* 基因植株中则表现出对多种病原菌的抗性^[13]。与野生型植株相比,*AtGDSL1* 和 *BnGDSL1* 过表达株系的种子发芽率和成苗率均有提高,与此同时,*AtGDSL1* 和 *BnGDSL1* 的组成性过表达促进了脂肪分解代谢,降低了种子油含量^[14]。另外,Chen 等研究表明,GDSL 脂酶家族成员可以通过降解脂肪酸而影响种子脂肪酸的含量^[15]。在油菜中过表达棉花基因 *GhGLIP* 后,显著提高了油菜种子中的油脂含量^[16]。

与微生物、动物 GDSL 脂肪酶研究相比,植物中该类脂肪酶的研究较少,尤其是关于油料作物脂肪酶基因,有很多问题亟待发现和研究。本研究从甘蓝型油菜中分离得到了 1 个 GDSL 脂肪酶基因(*BnGLIP1*),进一步对其进行生物信息学分析及表达分析,预测其结构与功能,为深入研究其生化功能打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

1.1.1 植物材料 甘蓝型油菜中双 11 号种子购于武汉中油种业科技有限公司,培养室生长条件如下:温度为(20±2)℃,湿度为 60%~90%,每天光周期为光照 8 h/黑暗 16 h,光照度为 150 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。生长 15 d 后分别取幼苗的根、叶、茎和茎尖,另外在开花 7 d 后取新鲜的花,待开花 30 d 后取幼嫩的角果和种子,将所取材料置于 -70℃ 冰箱备用。

收稿日期:2019-03-05

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0100305)。

作者简介:李明(1993—),女,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向为模式生物功能基因组学和蛋白质组学。E-mail:LMING0309@126.com。

通信作者:谭小力,博士,研究员,研究方向为油菜功能基因组学。E-mail:xltan@ujs.edu.cn。

1.1.2 试剂 TRIzol™ Reagent, 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; DH5α 化学感受态细胞、HiScript® Q RT SuperMix for qPCR(+ gDNA wiper) 反转录试剂盒、AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix, 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒 E. Z. N. A.® Gel Extraction Kit, 购自 Omega Bio - Tek 公司; KOD - Plus - Neo 高保真酶, 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; pMD™ 18 - T Vector 克隆试剂盒, 购自宝日医生物技术(北京)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 油菜总 RNA 提取以及 cDNA 合成 采用 Trizol 试剂快速提取法提取油菜总 RNA。首先取少量组织用液氮速冻, 研磨至粉末状, 之后加入 1 mL 预冷的 Trizol, 充分混合后冰上静置 10 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。待完成后, 取约 800 μL 上清加入 300 μL 三氯甲烷并剧烈振荡, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min。随后取上清加入等体积异丙醇轻摇, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min; 弃上清加入 75% 乙醇充分洗涤, 4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min。最后弃上清, 干燥沉淀, 加入 DEPC 水溶解, -70 ℃ 保存备用。

cDNA 合成是以总 RNA 为模板, 采用反转录试剂盒说明书进行反转录合成第 1 链。

1.2.2 序列克隆 根据 BnaC07g35650D 序列设计引物进行克隆, 扩增 *BnGLIP1* 的引物序列如下: OL - F: 5' - GGATAAGGTTTTTCCAGAGAG - 3' 和 OL - R: 5' - TCTTTGTCTGTGTGGAGGAA - 3'。以甘蓝型油菜中双 11 号的 cDNA 为模板, 使用高保真聚合酶 KOD - Plus - Neo 进行目的片段扩增, 采用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收扩增产物, 并将产物连接到 pMD18 - T 载体从而构建成为 *BnGLIP1* - pMD18 - T 载体, 之后转化进大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 并将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.3 蛋白生物信息学分析 利用 Primer 5 软件预测目的基因 *BnGLIP1* 编码的氨基酸序列; 蛋白的理化性质利用在线工具 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 进行分析; 利用 NCBI 中的 CDD 数据库^[17] 对蛋白保守结构域进行预测; 使用 MEGA 5.1 软件进行多种氨基酸序列比对; 利用 ProtScale 分析蛋白的亲疏水性; 运用 SignalP 4.1 Server 对蛋白序列的信号肽进行预测; 运用 TargetP

1.1 Server 预测真核细胞蛋白的亚细胞定位^[18]; 利用 SOPMA 和 SWISS - MODEL 分别对蛋白的二级结构和三级结构进行预测。

1.2.4 环境胁迫处理 选用生长至 4 叶 1 心期的油菜幼苗进行不同环境胁迫模拟处理。干旱胁迫处理: 用聚乙二醇 (PEG) 溶液模拟干旱, 将浓度为 20% (W/V) 的 PEG 溶液喷施于油菜叶片上, 黑暗培养 24 h。盐胁迫处理: 将浓度为 25 mmol/L 的 NaCl 溶液喷施于油菜叶片上, 黑暗培养 24 h。低温、高温胁迫处理: 分别将油菜置于 4 ℃ 冰箱和 37 ℃ 培养箱, 黑暗培养 24 h。以室温下正常生长的幼苗作为对照。上述每种处理均设置 3 个生物学重复。

1.2.5 表达分析 根据 *BnGLIP1* 基因序列的非保守区设计实时荧光定量 PCR 引物, 引物序列如下: qPCR - F: 5' - AGATTCCTTTGCCAACGACC - 3' 和 qPCR - R: 5' - ACCCTAAACCCATAGCGAGA - 3', 选取甘蓝型油菜 *Actin* 基因 (GenBank: AF111812.1) 作为内参基因, 内参引物序列如下: *Actin* - RTF: 5' - TGTTCCTATCCAGGCTGTTCTTTC - 3' 和 *Actin* - RTR: 5' - GATAGCGTGAGGAAGAGCATAACC - 3'。以反转录第 1 条链 cDNA 为模板, 具体操作方法根据 AceQ® qPCR SYBR® Green Master Mix 试剂盒说明书进行, 试验数据采用 GraphPad Prism 7 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜 *BnGLIP1* 基因的全长 cDNA 克隆

本研究从甘蓝型油菜中双 11 中分离得到了 BnaC07g35650D 的全长 cDNA, 核苷酸序列和预测的氨基酸序列如图 1 所示, 该序列的开放阅读框长 1 083 bp, 编码 360 个氨基酸, 将克隆到的基因命名为 *BnGLIP1* (*B. napus* GDSL LIPASE - LIKE1)。

2.2 蛋白性质的生物信息学分析

2.2.1 蛋白理化性质分析 利用 ProtParam 进行蛋白的理化性质预测, 分析结果显示 *BnGLIP1* 蛋白由 360 个氨基酸组成, 分子式为 $C_{1741}H_{2663}N_{483}O_{536}S_{19}$, 分子质量为 39 545.35 u, 理论等电点为 4.95, 此蛋白由 20 种氨基酸组成, 其中所占比例最高的 3 个氨基酸为 Ala(8.9%)、Asn(8.9%) 和 Gly(9.2%), 带负电荷的残基总数 (Asp + Glu) 为 34 个, 带正电荷的残基总数 (Arg + Lys) 为 25 个。

2.2.2 蛋白保守结构域分析 与其他脂酶 (lipase) 相似, GDSL 类脂酶同样以丝氨酸作为水解催化位

```

      10      20      30      40      50      60      70
1  GGATAAGGTTTTTTCCAGAGAGATGGCTAGAGTTTGTGTAATGATTATGATGATGGTAGCTATGATCTTGAACGT
1  M A R V C V M I M M M V A M I L N V

      85      95      105      115      125      135      145
76 AGCTAGAGGTGAACCAATGGCACCGTGTACTTCATATTGGTGATTCTTTGGTTGACAGTGGAACAACAATCA
19 A R G E P M A P C Y F I F G D S L V D S G N N N Q

      160      170      180      190      200      210      220
151 GCTTCAATCCTTAGCAAGAGCTGACTACTTCCCTTACGGTATCGACTTCCAGTTTGGTCCAACCGGCAGATTCTG
44 L Q S L A R A D Y F P Y G I D F Q F G P T G R F C

      235      245      255      265      275      285      295
226 TAATGGAAAAACAACCGTCGATGTCATCACTGAGCTTCTTGGTTTCGATGACTACATTACACCATATTCTCAAGC
69 N G K T T V D V I T E L L G F D D Y I T P Y S Q A

      310      320      330      340      350      360      370
301 AAGCGGAGAGACATCTTAGGAGGAGTAACTACGCTTCTGCGAGCTGCGGAGTTCGAGAAGAAACCGCCGTCA
94 S G E D I L G G V N Y A S A A A G V R E E T G R Q

      385      395      405      415      425      435      445
376 GCTGGGAGCTAGAATAACGTTTGCAGGGCAAGTAGCTAATCACGTGAACACTGTGTCGCAAGTGGTGGACATTCT
119 L G A R I T F A G Q V A N H V N T V S Q V V D I L

      460      470      480      490      500      510      520
451 CGGAGACGAGAACCAAGCTGCTAATTACCTAAGTAAATGCATCTACTCGATTGGTTTGGGAAGTAACGACTATCT
144 G D E N Q A A N Y L S K C I Y S I G L G S N D Y L

      535      545      555      565      575      585      595
526 CAATAACTACTTTATGCTCTCTATTACTCCACGGGAACCACTCTCCAGATTCTTTGCCAACGACCTTAT
169 N N Y F M P L Y Y S T G N Q Y S P D S F A N D L I

      610      620      630      640      650      660      670
601 CAACCGCTACACTGAGCAACTCAGGATATTGTATAACAATGGAGCGAGGAAGTTTGCGCTAATTGGTATCGCGC
194 N R Y T E Q L R I L Y N N G A R K F A L I G I G A

      685      695      705      715      725      735      745
676 AATAGGATGTAGCCCTAACGAGCTGGCGAGACAGACAGGAGGACTGTGACGAAAGGATCAACTCAGC
219 I G C S P N E L A Q N S R D G T T C D E R I N S A

      760      770      780      790      800      810      820
751 AAACAGGATCTTTAACAGCAAGCTGGTGTCTCTGGTGGACATTCAACCAAAACACTCCAGATGCTAAGTTCAC
244 N R I F N S K L V S L V D H F N Q N T P D A K F T

      835      845      855      865      875      885      895
826 TTACATCAATGCTTATGGTATCTTCCAAGACATGGTAGCTAATCCTTCTCGCTATGGGTTTAGGGTGACAAACGC
269 Y I N A Y G I F Q D M V A N P S R Y G F R V T N A

      910      920      930      940      950      960      970
901 GGGTTGTTGTGGAGTTGGGAGGAACAATGGACAGATAACTGTCTTCCAGGTCAAGTCCATGTCTGAACAGGGA
294 G C C G V G R N N G Q I T C L P G Q A P C L N R D

      985      995      1005      1015      1025      1035      1045
976 TGAGTTTGTGTTCTGGGATGCGTTTCATCCGGGAGAAGCAGCGAATATCGTGATCGGTAGTCGATCTTTAGGAG
319 E F V F W D A F H P G E A A N I V I G S R S F R R

      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
1051 AGAATCTCCATCTGATGCTCACCTTATGATATCCAGCAGCTTGCTTTGCTCTAGCTCATGAAATTTCTCCACA
344 E S P S D A H P Y D I Q Q L A L L AGCTCATGAAATTTCTCCACA

1125 CAGACAAAGA

```

黑色框标出的是引物序列 OL-F 和 OL-R 的位置,下划线指出的分别是起始密码子和终止密码子的位置

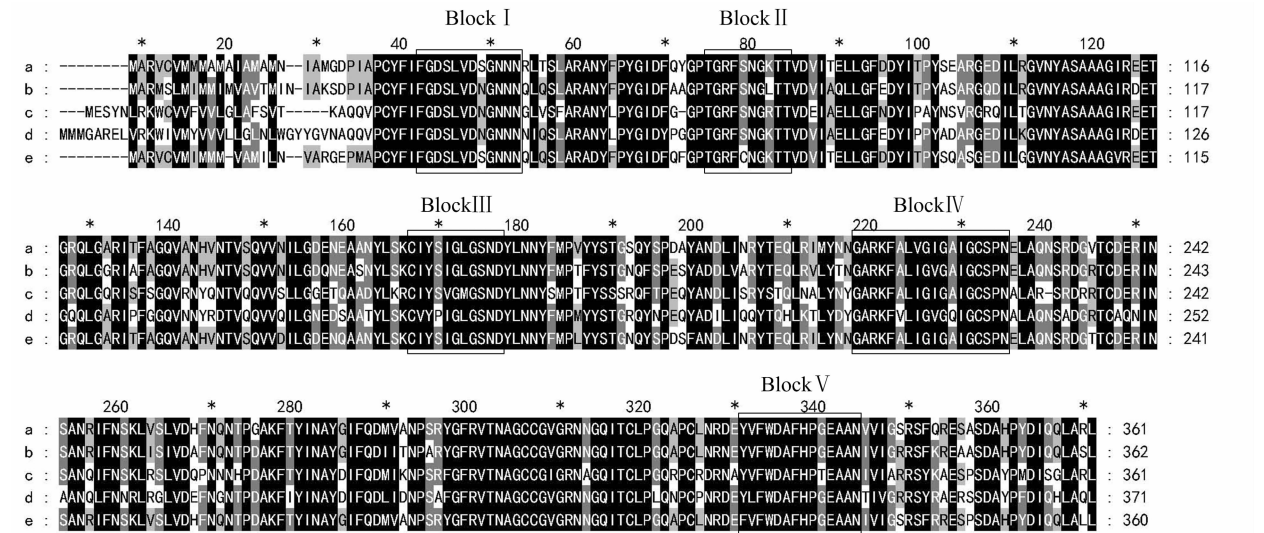
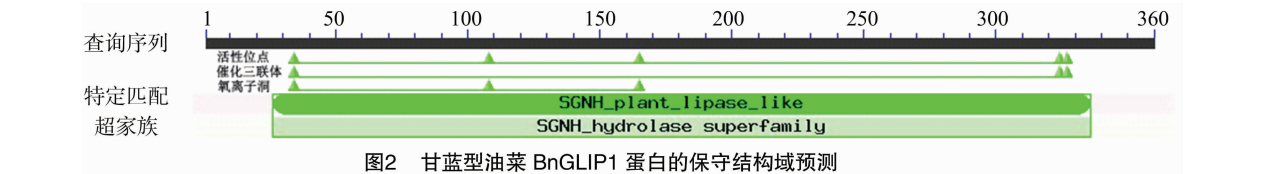
图1 甘蓝型油菜 *BnGLIP1* 基因的 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

点,但不同的是丝氨酸位于蛋白 N 端。此外,GDSL 脂酶还具有至少 4 个保守的结构区域(block)^[6]。利用 NCBI 的 CDD 数据库预测 *BnGLIP1* 蛋白的保守结构域特征,结果显示此蛋白属于植物 SGNH 脂肪酶家族(图 2)。使用 MEGA 5.1 软件对来自不同物种的氨基酸进行序列比对,发现甘蓝型油菜 *BnGLIP1* 蛋白具有很高的保守性,其中它与拟南芥中的同源蛋白(AAL24090.1) 同源性最高,为 90.83%,其次为另一种拟南芥同源蛋白(NP_199379.1),同源性为 81.94%。如图 3 所示,*BnGLIP1* 具备 GDSL 脂肪酶的序列特征,一级结构主要包括 5 个保守区域(I ~ V)。

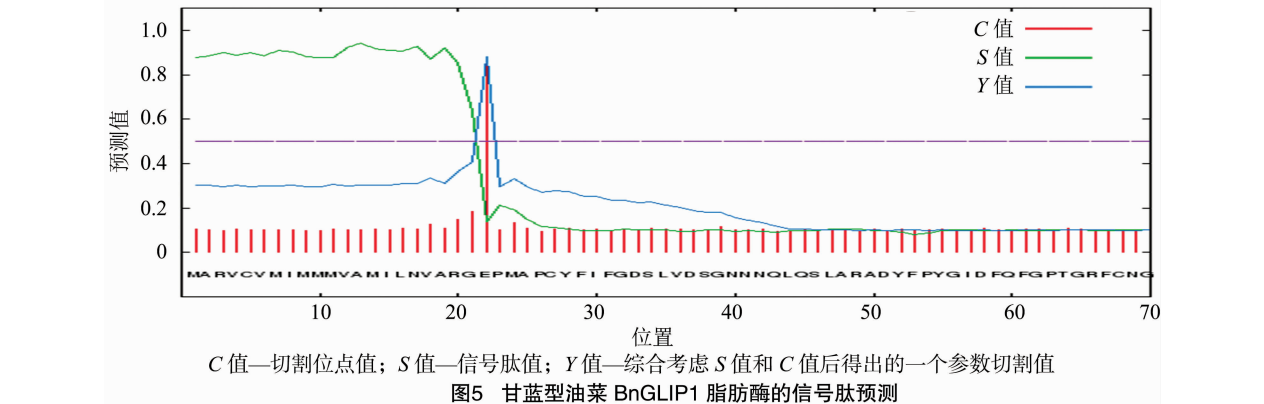
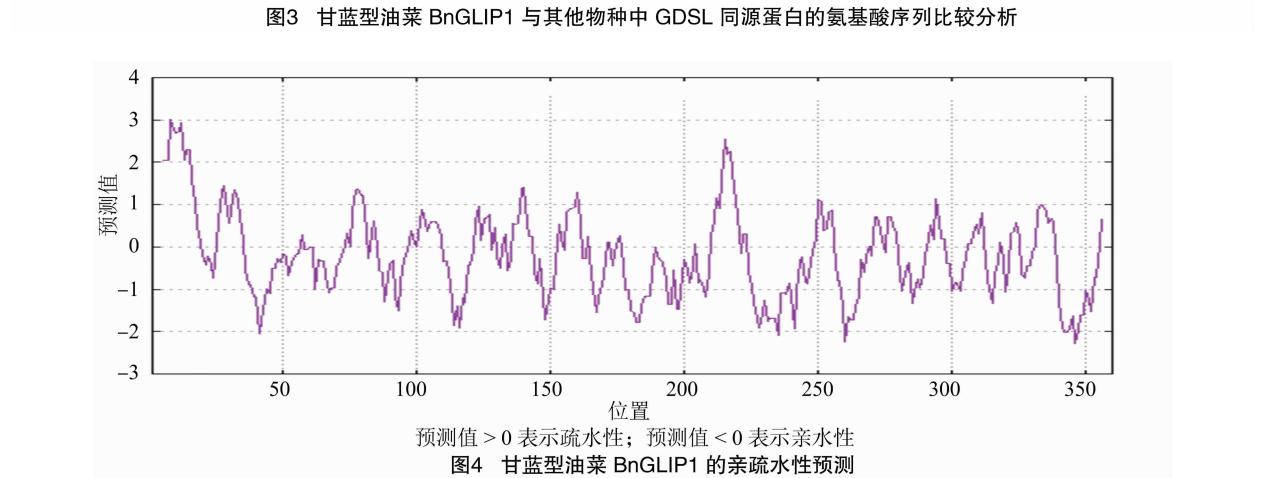
2.2.3 蛋白的亲疏水性预测 甘蓝型油菜

BnGLIP1 蛋白由 360 个氨基酸组成,为进一步了解编码蛋白的亲疏水性,利用 ProtScale 对其进行详细分析发现,虽然某些氨基酸表现出较强的疏水性,但亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,因此可以预测此蛋白为亲水性蛋白(图 4)。

2.2.4 信号肽分析以及亚细胞定位预测 如图 5 所示,运用 SignalP 4.1 Server 对蛋白序列的信号肽进行预测,发现前 21 个氨基酸的信号肽(S)值处于最高,在 0.637~0.943 之间浮动,并且在第 22 个氨基酸处骤降至 0.137,之后处于一个平稳水平;在第 22 个氨基酸处出现剪切位点(C)最高值 0.877;Y 值也在第 22 个氨基酸处出现最高值。由此可知,此 *BnGLIP1* 蛋白有信号肽序列,推测其可能为外分泌



图中a、b、c、d分别代表4种GDSL同源蛋白，GeneBank登录号和物种依次表示如下：a为AAL24090.1(拟南芥)，b为NP_199379.1(拟南芥)，c为AGJ83937.1(甘蓝型油菜)，d为AAX20033.1(辣椒)；e表示基因 *BnGLIP1* 的蛋白序列。黑色区域显示的为相同的氨基酸，灰色区域显示的为类似的氨基酸，黑色框表示的是 GDSL 保守结构域



蛋白。另外,利用 TargetP 1.1 Server 对其进行亚细胞定位预测,定位依据的是任何一个 N-末端存在序列,如叶绿体转运肽、线粒体靶向肽或分泌途径信号肽等。分析结果显示,分泌途径中的信号肽

(SP)数值为 0.976,并且可靠指数 RC 为 1,表明其为一个分泌蛋白(表 1),定位在细胞外。根据以上预测结果分析,推测 BnGLIP1 很可能是一个分泌蛋白。

表 1 甘蓝型油菜 BnGLIP1 蛋白的亚细胞定位预测结果

名称	预测结果						
	Len	cTP	mTP	SP	Other	Loc	RC
BnGLIP1	360	0.011	0.031	0.976	0.064	S	1
cutoff	0.000	0.000	0.000	0.000			

注:Len 表示序列长度,cTP 表示叶绿体转运肽,mTP 表示线粒体靶向肽,SP 表示分泌途径中的某个信号肽,RC 表示可靠性等级。

2.2.5 二级、三级结构预测 氨基酸序列决定了蛋白质的二级、三级结构,蛋白质结构决定了其功能。为了探讨 BnGLIP1 蛋白质结构,利用 SOPMA 在线分析软件对其二级结构进行预测。如图 6 所示, α

螺旋(蓝色)占 38.06%,延伸链条(红色)占 16.11%, β 转角(绿色)占 3.61%,紫色代表无规则卷曲,占 42.22%(图 6)。该结果与 SWISS-MODEL 软件进行的三级结构的预测结果相吻合(图 7)。

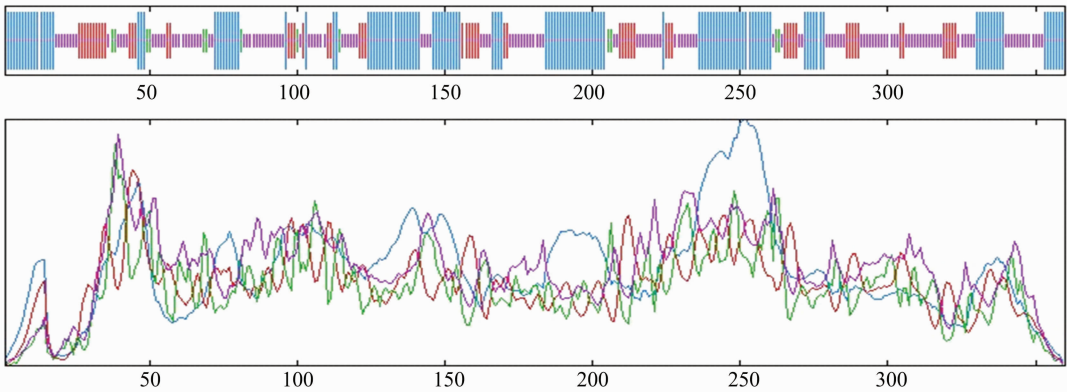


图6 甘蓝型油菜 BnGLIP1 的二级结构预测

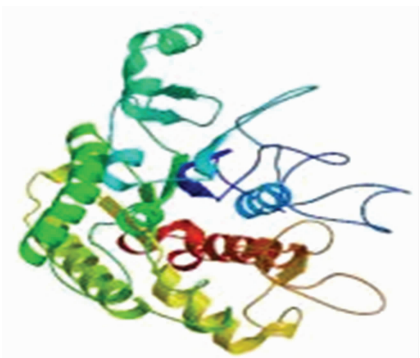


图7 甘蓝型油菜 BnGLIP1 的三级结构预测

2.3 BnGLIP1 基因表达模式分析

2.3.1 组织特异性表达分析 采用 qRT-PCR 技术检测 BnGLIP1 在甘蓝型油菜不同组织包括根、茎、叶、花、茎尖、角果、种子中的表达模式,结果发现此基因在各个组织中均有表达,但在各个组织中的表达量存在显著差异。其中以根作为对照,基因在角果中的表达量最高,约是根中表达量的 8.95 倍,在叶和茎中表达量相对较低(图 8)。

2.3.2 各种环境因子对 BnGLIP1 表达的影响 qRT-PCR 分析显示,在 PEG 溶液处理 24 h 时,与对照(CK)相比,BnGLIP1 的相对表达量显著提高。25 mmol/L NaCl 处理也可以诱导 BnGLIP1 的表达。另外,在 4℃低温、37℃高温处理条件下,BnGLIP1 的相对表达量下降(图 9)。这些结果表明,BnGLIP1 可能参与植物对环境胁迫的应答反应。

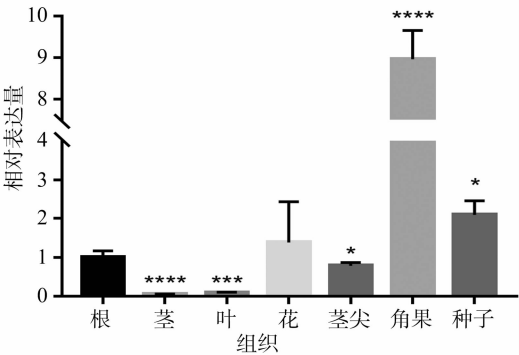


图8 甘蓝型油菜 BnGLIP1 基因组织特异性表达分析

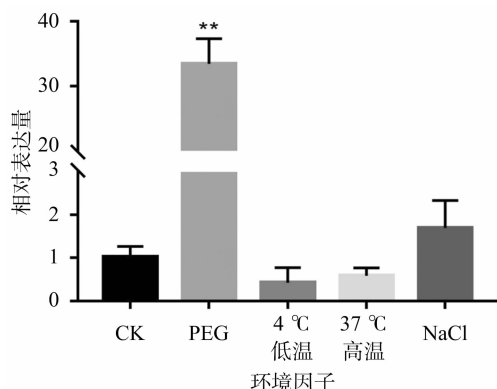


图9 各种环境因子对甘蓝型油菜 *BnGLIP1* 基因表达量的影响

3 讨论与结论

甘蓝型油菜是我国及世界上最重要的油料作物之一。植物脂肪酶具有广泛的生理功能,能催化水解反应,还可能催化酯化、醇解、酸解等多种反应,在油脂分解反应及油脂改造中具有潜在应用价值。

本研究以我国长江中下游油菜主产区具有优良抗逆特点的甘蓝型油菜品种中双 11 号为材料,克隆了 1 个重要的 GDSL 脂肪酶基因 *BnGLIP1*,并通过生物信息学方法分析了其基本理化性质以及结构特点等。利用 NCBI 的 CDD 数据库分析发现,*BnGLIP1* 蛋白属于植物 SGNH 脂肪酶家族。对来自不同植物物种的 GDSL 同源蛋白进行序列比对分析发现,*BnGLIP1* 在不同的物种中具有很高的保守性,特别是与双子叶植物油菜、拟南芥、山茱萸的 GDSL 脂肪酶在氨基酸水平上有很高的同源性。

植物基因在各组织器官的表达情况对其功能具有很大的影响,如 Kondou 等研究了拟南芥的 *RGE1* 基因,该基因在种子萌发阶段的胚乳中特异表达,在心形阶段控制胚胎的发育中起着重要的作用^[19]。笔者利用 qRT-PCR 比较了该基因在不同组织中的表达,结果发现该基因在不同组织中的表达差异较大,其中在角果中表达量最高,推测此基因可能在角果期发挥功能。与笔者研究结果一致,目前所报道的脂肪酶基因在不同组织器官中的表达特征呈现出多样性, Lee 等发现拟南芥 *GLIP2* 在根和茎以及早期幼苗阶段(1 周龄)中高表达,而 *GLIP1* 在 1 周龄幼苗、花、叶、茎、根等阶段均有表达^[20]。此外,它的表达还受到干旱、高盐等各种环境胁迫的诱导,受到低温、高温等环境条件的抑制,表明 *BnGLIP1* 基因除了参与脂肪酸代谢外,也参与了对环境胁迫的响应。

生物信息学分析还发现,*BnGLIP1* 蛋白含有 1 段跨膜结构域,都属于亲水性蛋白,在 N 端有 1 段含有 25 个氨基酸序列的信号肽,可能分泌到细胞外。TargetP 1.1 Server 分析发现,SP 数值为 0.976,更进一步说明了它是一个分泌蛋白。在拟南芥中,其同源蛋白 GDSL 脂肪酶 *GLIP1* 也是一个分泌蛋白,它通过信号传导调节激活植物局部和系统的抗性,在植物免疫反应中发挥了重要作用^[21]。所以笔者推测甘蓝型油菜 *BnGLIP1* 很可能也是一个植物防卫反应相关的蛋白,通过对其进行转基因及酶活分析将有助于进一步了解 *BnGLIP1* 的生物学功能。

参考文献:

- [1] 解蕊. 一种潜在的植物蛋白资源——菜籽蛋白的开发[J]. 农产品加工, 2003(1): 26-27.
- [2] 王汉中. 发展油菜生物柴油的潜力、问题与对策[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(2): 74-76.
- [3] Lai C P, Huang L M, Chen L O, et al. Genome-wide analysis of GDSL-type esterases/lipases in *Arabidopsis* [J]. Plant Molecular Biology, 2017, 95(1/2): 181-197.
- [4] Chepyshko H, Lai C P, Huang L M, et al. Multifunctionality and diversity of GDSL esterase/lipase gene family in rice (*Oryza sativa* L. *japonica*) genome: new insights from bioinformatics analysis [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 309.
- [5] Volokita M, Rosilio-Brami T, Rivkin N, et al. Combining comparative sequence and genomic data to ascertain phylogenetic relationships and explore the evolution of the large GDSL-lipase family in land plants [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(1): 551-565.
- [6] 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.
- [7] Ji R, Wang H, Xin X, et al. *BrEXL6*, a GDSL lipase gene of *Brassica rapa*, functions in pollen development [J]. Biologia Plantarum, 2017, 61(4): 685-692.
- [8] Ma R, Yuan H, An J, et al. A *Gossypium hirsutum* GDSL lipase/hydrolase gene (*GhGLIP*) appears to be involved in promoting seed growth in *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195556.
- [9] Kwon S J, Jin H C, Lee S, et al. GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. The Plant Journal, 2009, 58(2): 235-245.
- [10] Zhang Y J, Bai B, Lee M, et al. Cloning and characterization of *EgGDSL*, a gene associated with oil content in oil palm [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 11406.
- [11] Ling H, Zuo K, Zhao J, et al. Isolation and characterization of a homologous to lipase gene from *Brassica napus* [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2006, 53(3): 366-372.
- [12] 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 & Cell Physiology, 2010, 51(1): 123-131.

富玉竹,李 欣,李 晔,等. 16 种微生物蛋白酶的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):65-72.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.010

16 种微生物蛋白酶的生物信息学分析

富玉竹,李 欣,李 晔,王斯德,金丽华,于 然

(北京电子科技职业学院生物工程学院,北京 100176)

摘要:蛋白酶(protease)是以降解蛋白质为主的糖苷酶,具有丰富的多样性,在生物有机体中发挥着重要而又广泛的作用,具有广泛的研究和应用价值。本研究采用 ProtParam、ProtScale、SignalP 4.1 server 和 NPSA serve 等生物信息学软件,对天蓝色链霉菌、普通拟杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草杆菌等 16 种微生物蛋白酶的理化性质、蛋白结构、系统发生树和功能域等进行了分析。结果表明:通过分析 16 种微生物蛋白酶的稳定性发现,金黄色葡萄球菌、唾液链球菌、短小芽孢杆菌、绿脓杆菌为不稳定蛋白;二级结构由 α 螺旋、 β 转角、无规则卷曲和延伸链等结构元件组成;除了节杆菌属、无乳链霉菌、普通拟杆菌、肠杆菌属具有信号肽,其余蛋白酶氨基酸序列不具有信号肽的特点。可以推测出蛋白酶为非分泌性蛋白;只有绿脓杆菌和猪链球菌有跨膜结构,剩下其余几种微生物均没有跨膜结构。具有 2 个蛋白功能域,分别为 Peptidase S8 family1、Fn3_5like domain。

关键词:微生物;蛋白酶;序列分析;生物信息学;理化性质;蛋白结构;信号肽

中图分类号: S188⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)04-0065-08

蛋白酶是催化水解蛋白质肽键的一类酶的总

称^[1],在生物有机体中发挥着重要而又广泛的作用,具有广泛的研究和应用价值。按其水解多肽的方式,可以将其分为内肽酶和外肽酶 2 类。内肽酶将蛋白质分子内部切断,形成分子质量较小的肽。外肽酶从蛋白质分子的游离氨基或羧基的末端逐个将肽键水解而游离出氨基酸,前者为氨肽酶,后者为羧肽酶^[2-4]。蛋白酶在食品产业中运用十分广泛,如在白酒发酵中可添加适量蛋白酶对白酒香气进行改良^[5-7],或在对肉类进行加工中添加,改进肉的嫩度,提升口感^[8-10],或使用蛋白酶对小麦提取有益物质^[11-13],或对对虾进行改良^[14-15],等等。市

收稿日期:2018-12-14

基金项目:北京市自然科学基金(编号:2182019);北京市教育委员会项目(编号:1-PXM2018-014306-000057/7);国家自然科学基金青年科学基金(编号:51708005);北京电子科技职业学院重点课题(编号:2019-KXZ);北京市优秀人才资助(拔尖自然科学)(编号:2020Z002-002-KWT)。

作者简介:富玉竹(2000—),女,北京人,研究方向为酶与基因重组, E-mail:1002967685@qq.com;共同第一作者:李欣(1998—),女,北京人,研究方向为生物技术, E-mail:1217436404@qq.com。

通信作者:李 晔,博士,副教授,研究方向为蛋白重组表达和分子诊断。 E-mail:liyeyashi@163.com。

[13] Kim H G, Kwon S J, Jang Y J, et al. GDSL lipase 1 regulates ethylene signaling and ethylene-associated systemic immunity in *Arabidopsis* [J]. FEBS Letters, 2014, 588(9):1652-1658.

[14] Ding L N, Guo X J, Li M, et al. Improving seed germination and oil contents by regulating the GDSL transcriptional level in *Brassica napus* [J]. Plant Cell Reports, 2019, 38(2):243-253.

[15] Chen M X, Du X, Zhu Y, et al. Seed Fatty Acid Reducer acts downstream of gibberellin signalling pathway to lower seed fatty acid storage in *Arabidopsis* [J]. Plant, Cell & Environment, 2012, 35(12):2155-2169.

[16] 郝晓云,蔡永智,袁哈利,等. 过量表达棉花 GDSL 脂肪酶提高甘蓝型油菜油脂含量的研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(6):63-68, 73.

[17] Marchler-Bauer A, Derbyshire M K, Gonzales N R, et al. CDD: NCBI's conserved domain database [J]. Nucleic Acids Research,

2015, 43:D222-D226.

[18] Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. Nature Protocols, 2007, 2(4):953-971.

[19] 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.

[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] Oh I S, Park A R, Bae M S, et al. Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola* [J]. The Plant Cell, 2005, 17(10):2832-2847.