

烟草 β -1,3-葡聚糖酶的生物学分析

马世明¹, 罗家佐², 王德勋³, 卢艳霞³, 范志勇³, 苏家恩^{3*} (1. 大理州烟草公司南涧县分公司, 云南大理 675700; 2. 大理州烟草公司巍山县分公司, 云南大理 672400; 3. 云南省烟草公司大理州公司, 云南大理 671000)

摘要 [目的]以烟草 β -1,3-葡聚糖酶的氨基酸序列为材料, 对其特性进行深度挖掘。[方法]采用 NCBI-PROTEIN 筛选蛋白序列, 依次运用 ProtParam、SignalP 4.1 和 TMHMM 2.0 工具进行预测并分析烟草葡聚糖酶的理化特性、信号肽和跨膜结构的组成成分。[结果] NtBGL-2 的分子量最大(40 390.76 Dk), NtBGL-3 的分子量最小(37 722.64 Dk); NtBGL-1 和 NtBGL-2 的等电点小于 7.0, 而 NtBGL-3 的等电点大于 7.0; NtBGL-1 和 NtBGL-2 属于不稳定蛋白, NtBGL-3 属于稳定性蛋白, 且耐热性大于 NtBGL-1 和 NtBGL-2; NtBGL-1 和 NtBGL-2 的优势氨基酸为甘氨酸和丝氨酸, NtBGL-3 的为天冬酰胺和丙氨酸; NtBGL 均含有信号肽, 属于分泌蛋白; NtBGL-1 无跨膜区, 而 NtBGL-2(13~35)和 NtBGL-3(7~29)含有跨膜结构区域, 属于跨膜蛋白。[结论]该研究为深入研究烟草葡聚糖酶奠定基础。

关键词 烟草; β -1,3-葡聚糖酶; 生物学
中图分类号 S-3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)17-0096-02

Biological Analysis of β -1,3- Glucanase in Tobacco
MA Shi-ming¹, LUO Jia-zuo², WANG De-xun³ et al (1. Nanjian County Branch of Dali Tobacco Company, Dali, Yunnan 675700; 2. Weishan Branch of Dali Tobacco Company, Dali, Yunnan 672400; 3. Dali Prefecture Tobacco Company, Yunnan Province Tobacco Company, Dali, Yunnan 671000)

Abstract [Objective] The amino acid sequence of tobacco β -1,3-glucanase was used as a material to deeply explore its characteristics. [Method] NCBI-PROTEIN was used to screen protein sequences, and ProtParam, SignalP 4.1 and TMHMM 2.0 tools were used to predict physico-chemical properties, signal peptide and transmembrane structure of tobacco glucan enzyme. [Result] The molecular weight of NtBGL-2 was the maximum (40 390.76 Dk), and that of NtBGL-3 was the minimum (37 722.64 Dk); the isoelectric point of NtBGL-1 and NtBGL-2 was less than 7.0, but NtBGL-3 was more than 7.0; NtBGL-1 and NtBGL-2 were unstable proteins, NtBGL-3 was a stable protein, and the heat resistance was greater than that of NtBGL-1 and NtBGL-2; the dominant amino acids of NtBGL-1 and NtBGL-2 were glycine and serine, NtBGL-3 for asparagine and alanine; NtBGL contained signal peptide, belonged to secreted proteins; NtBGL-1 had no transmembrane domain, while NtBGL-2 (13~35) and NtBGL-3 (7~29) contained transmembrane structure, and belonged to transmembrane proteins. [Conclusion] This study lays the foundation for in-depth study of tobacco glucanase.

Key words Tobacco; β -1,3- Glucan; Biology

β -1,3-葡聚糖酶具有水解 β 型的 1,3 糖苷键的葡聚糖聚合体的作用^[1-2], 由于葡聚糖是植物细胞壁的重要组成部分, 因此葡聚糖酶具有促进植物体软化的作用^[3]。此外, 葡聚糖酶具有抵抗部分细菌和真菌的入侵^[4-6]。正常情况下, 葡聚糖酶较少在植物体内积累, 且活性较低, 当受到病原微生物入侵时, 葡聚糖酶的表达量增加, 在体内大量合成, 同时产生部分同工酶, 进而发挥抵抗病原菌入侵的作用^[7-9], 如水稻被稻瘟菌感染, 诱导葡聚糖酶的活性增加 3~5 倍^[10]; 烟草的坏疽病感染黄瓜叶, 促使葡聚糖酶的活性增加 6 倍^[11]。

目前, 关于烟草葡聚糖酶的研究主要集中在其抵抗病原微生物, 主要包括花叶病^[12]、疫霉病^[13]、立枯丝核菌^[14]、坏疽病^[11]等。为更深层次地认识烟草 β -1,3-葡聚糖酶的生物学特性, 笔者利用生物信息学的方法进行研究, 进而为深入研究烟草葡聚糖酶奠定基础。

1 材料与方法

1.1 筛选烟草 β -1,3-葡聚糖酶家族成员 采用 NCBI-PROTEIN^[15] 数据库在线检索, 筛选烟草葡聚糖酶相关的蛋白序列, 获取的登录号分别是 AAA63541.1、ACF93731.1 和 AAA63542.1, 依据优势氨基酸和氨基酸数进行命名, 分别为 NtBGL-1、NtBGL-2 和 NtBGL-3^[16]。

1.2 方法 以 ProtParam 的工具^[17] 测定序列的理化特性, 如烟草葡聚糖酶的氨基酸数、分子量、理论等电点、不稳定指数、脂肪族指数和优势氨基酸; 使用 SignalP 4.1 的在线服务^[18], 其 D-cut-off 值以 Matthews 的相关系数进行测定; 采用 TMHMM 2.0 工具^[19], 根据疏水性氨基酸, 对烟草葡聚糖酶的跨膜结构进行分析。

2 结果与分析

2.1 烟草 β -1,3-葡聚糖酶理化特性的分析 通过在线工具 (PROTPARAM) 预测 NtBGL 的相关理化特性, 结果显示 (表 1), NtBGL-2 的氨基酸数最多 (370), 其次是 NtBGL-1, 为 359 个, NtBGL-3 的最小, 含有 343 个氨基酸; 对于烟草葡聚糖酶, 以 NtBGL-2 的分子量最大, 其分子量为 40 390.76 Da, 而 NtBGL-3 的分子量最小 (37 722.64 Da); 通过测定烟草葡聚糖酶的等电点, NtBGL-1 和 NtBGL-3 的等电点分别为 6.60 和 5.12, 均属于酸性蛋白, 而 NtBGL-2 的等电点值最大 (7.10), 属于碱性蛋白; NtBGL-1 和 NtBGL-2 的不稳定指数均大于 40, 其值分别为 42.49 和 44.28, 因此 NtBGL-1 和 NtBGL-2 属于不稳定性蛋白, 而 NtBGL-3 的不稳定指数为 37.47, 即 NtBGL-3 属于稳定性蛋白; NtBGL-3 的脂肪族指数最大 (90.20), 说明 NtBGL-3 的耐热性大于 NtBGL-1 和 NtBGL-2; NtBGL-1 和 NtBGL-2 的优势氨基酸相同, 均为甘氨酸 (含量分别为 9.2%、8.9%) 和丝氨酸 (含量分别为 9.2%、9.5%), NtBGL-3 的优势氨基酸为天冬酰胺 (9.6%) 和丙氨酸 (10.2%)。

基金项目 中国烟草总公司云南省公司项目 (2015YN20, 2016YN10)。
作者简介 马世明 (1972—), 男, 云南南涧人, 助理农艺师, 从事烟叶生产技术指导工作。* 通讯作者, 高级农艺师, 硕士, 从事烟叶烘烤技术及烤房研究和推广工作。
收稿日期 2018-03-13

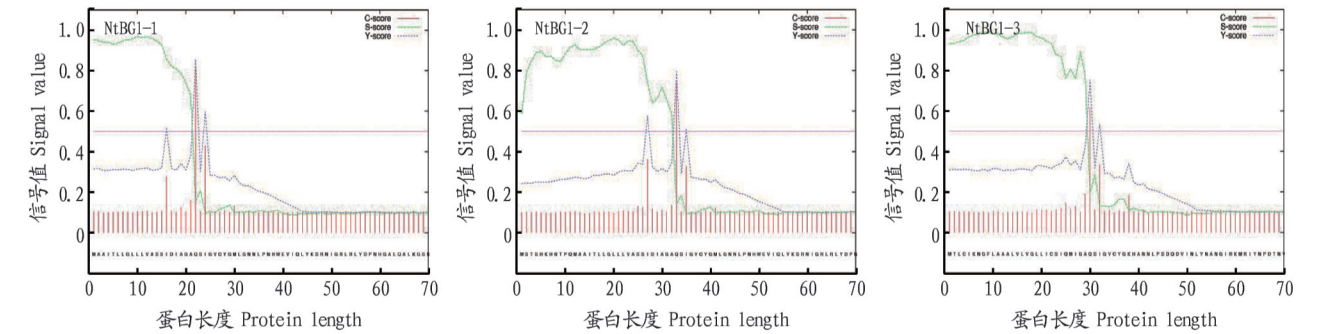
表 1 NtBGI 的相关理化特性

Table 1 The related physicochemical properties of NtBGI

蛋白名称 Protein name	氨基酸数 Amino acid number	分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical isoelectric point	不稳定指数 Unstable index	脂脂肪族指数 Aliphatic index	优势氨基酸 Advantageous amino acids
NtBGI-1	359	39 145.45	6.60	42.49	88.83	Gly Ser
NtBGI-2	370	40 390.76	7.10	44.28	85.92	Gly Ser
NtBGI-3	343	37 722.64	5.12	37.47	90.20	Asn Ala

2.2 烟草 β -1,3-葡聚糖酶的信号肽分析 从信号肽、原始的剪切位点和综合的剪切位点 3 个方面分析烟草葡聚糖酶的信号肽发现(图 1),NtBGI-1 第 10 位亮氨酸的信号肽值(S)达到最大(0.970),而原始的剪切位点(C)和综合的剪切位点(Y)的最大分值均处于第 22 位谷氨酰胺,其值分别为 0.810 和 0.856,因此 NtBGI-1 具有信号肽,剪切位点处于第 21 与 22 位氨基酸之间,信号肽处于第 1~21 位的氨基酸,该信号肽的均值为 0.902;NtBGI-2 的信号肽值于第 20 位亮氨酸处达到最大(0.957),原始的剪切位点和综合的剪切位点

的最大分值均处于第 33 位谷氨酰胺,其值分别为 0.742 和 0.795,即 NtBGI-2 具有信号肽,剪切位点处于第 32~33 位氨基酸,信号肽处于第 1~32 位的氨基酸,该信号肽的均值为 0.846;NtBGI-3 的信号肽值于第 9 位苯丙氨酸处达到最大(0.986),原始的剪切位点和综合的剪切位点的最大分值均处于第 30 位谷氨酰胺,其值分别为 0.615 和 0.753,表明 NtBGI-3 具有信号肽,剪切位点处于第 29 与 30 位氨基酸之间,且信号肽处于第 1~29 位的氨基酸,该信号肽的均值为 0.929。综上所述,烟草葡聚糖酶均具有信号肽,即属于分泌蛋白。



注:S-score 表示信号肽具有的分值,Y-score 表示原始的剪切位点具有的分值,C-score 表示综合的剪切位点具有的分值

Note:S-score represents the score of the signal peptide. Y-score represents the score of the original shear site, and C-score represents the score of the synthesized shear site

图 1 NtBGI 的信号肽分布

Fig.1 Signal peptide distribution of NtBGI

2.3 烟草 β -1,3-葡聚糖酶的跨膜结构分析 蛋白酶可通过跨膜结构锚定于质膜上,进而在亚细胞结构的特定区域参与信号传递或代谢活动,因此对 NtBGI 的跨膜结构进行分析,结果显示(图 2),NtBGI-1 序列位于膜内的氨基酸数为 3.50,小于 20.00,即 NtBGI-1 不具有跨膜结构;NtBGI-2 和

NtBGI-3 位于膜内序列的氨基酸数分别为 20.97 和 22.74,均大于 20.00,表明 NtBGI-2 和 NtBGI-3 含有跨膜结构,其概率分别为 0.947 和 0.993;NtBGI-2 的第 1~12 位氨基酸位于膜内,第 13~35 位氨基酸为跨膜区,第 36~370 位的氨基酸处于膜外;NtBGI-3 的第 1~6 位氨基酸位于膜内,第 7~29 位

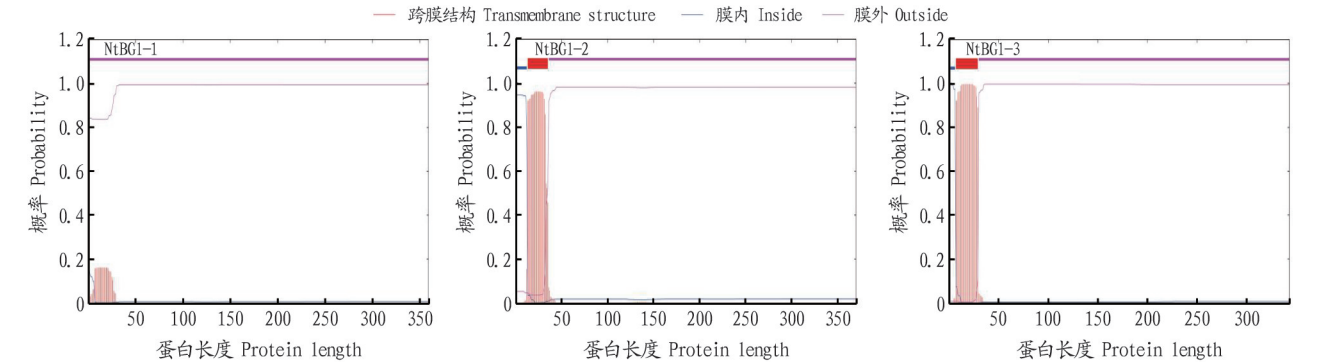


图 2 NtBGI 的跨膜结构

Fig.2 Transmembrane structure of NtBGI

树混交的一种较好树种,也是一种在漳州具有较好发展前途的珍贵树种。

表 3 林下杂灌木情况
Table 3 The situation of the mixed vegetation in the forest

调查时间 Survey time	上径 3-11 小班 Shangjing 3-11 Xiaoban (米老排纯林)			百岁楼 7-1 小班 Baisuilou 7-1 Xiaoban (米老排巨尾松混交林 5:5)			上径 5-12 小班 Shangjing 5-12 Xiaoban (卷荚相思巨尾松混交林 5:5)		
	杂灌木主要种类 Main species of miscellaneous shrubs	杂草主要种类 Main species of weed	覆盖度 Coverage %	杂灌木主要种类 Main species of miscellaneous shrubs	杂草主要种类 Main species of weed	覆盖度 Coverage %	杂灌木主要种类 Main species of miscellaneous shrubs	杂草主要种类 Main species of weed	覆盖度 Coverage %
2013-06	赤南	芒萁骨	95	桃金娘	芒萁骨	95	桃金娘	芒萁骨	95
2016-06	无	五节芒	15	无	五节芒	15	其他杂灌木	芒萁骨、五节芒	80
2017-06	无	五节芒	10	无	五节芒	10	其他杂灌木	芒萁骨、五节芒	90

(2)随着国家经济发展,生态文明建设被提高到一个新的层次,森林是生态文明建设的一个重要载体,增加森林覆盖率和蓄积量是发展趋势。科学多树种经营发展能维持漳州沿海地区森林生态平衡,特别是生态保护区内林木的更新改造,米老排树种是一个很好的选择,因为米老排生长快、覆盖率高、保水保肥能力强,合理的引进种植,既可以增加森林覆盖率和蓄积量,又能增加水分涵养、减少劈草和施肥量,是该地区多树种平衡发展的良好思路。

参考文献

[1] 李良昌,廖翠兰,黄德林,等. 米老排在乐昌林场的引种及生长表现

[J]. 广东林业科技,2003,19(4):66-68.
[2] 宋绍敦,张祝平,蔡旭舜. 米老排造林试验报告[J]. 广东林业科技,1986(3):12-15.
[3] 蔡清平,熊扬,李干荣,等. 米老排萌芽更新研究[J]. 农业与技术,2015,35(6):48.
[4] 何伟民,刘蕾. 米老排区域化推广试验研究[J]. 山东林业科技,2010(6):38-40.
[5] 胡雪雁,林朝楷,李小红,等. 米老排引种栽培技术[J]. 林业实用技术,2010(12):25-26.
[6] 徐良. 南方优良速生树种——米老排[J]. 热带林业科技,1984(2):53-60.
[7] 吴庄,李志军,刘光良,等. 速生材制化学机械浆(CMP)系列研究 I:米老排材制化学机械浆的研究[J]. 林产化工通讯,1992(4):2-5.
[8] 陈志云. 杉木—米老排混交林生态系统生产力及养分特征研究[D]. 福州:福建农林大学,2010.

(上接第 97 页)

氨基酸为跨膜区,第 30~343 位的氨基酸处于膜外。综上所述,除 NtBGL-1 外,NtBGL 含有跨膜结构。

3 结论与讨论

通过理化特性分析,NtBGL-2 等电点大于 7.0,因此,NtBGL-2 可能定位于液泡,且具有降解病原菌菌丝的功能^[20],但 NtBGL-2 属于不稳定性蛋白,因此 NtBGL-2 可能诱导同工酶、几丁质、核糖体等共同作用,进行抵抗病原微生物^[7-8];NtBGL 均属于分泌蛋白,具有信号肽,从而指引烟草葡聚糖酶运输于特定区域,参与相应的抗性反应^[21];NtBGL-2(第 13~35 位氨基酸)和 NtBGL-3(7~29)均含有跨膜结构,因此,NtBGL-2 和 NtBGL-3 可能参与信号的传递^[22]。

参考文献

[1] 蒋选利,李振岐,康振生. β -1,3-葡聚糖酶与植物的抗病性[J]. 西北农业学报,2005,14(4):135-139.
[2] DOXEY A C,YAISH M W F,MOFFATT B A,et al. Functional divergence in the *Arabidopsis* β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states[J]. Molecular biology & evolution,2007,24(4):1045-1055.
[3] CHOURASIA A,SANE V A,SINGH R K,et al. Isolation and characterization of the *MiCel1* gene from mango:Ripening related expression and enhanced endoglucanase activity during softening[J]. Plant growth regulation,2008,56(2):117-127.
[4] 欧阳波,李汉霞,叶志彪. 植物 β -1,3-葡聚糖酶及其基因[J]. 中国生物工程杂志,2002,22(6):18-23.
[5] 刘爱新,董汉松,梁元存,等. 烟草几丁酶 β -1,3-葡聚糖酶的抑菌作用[J]. 微生物学通报,1999,26(1):15-17.
[6] COLLINGE D B,SLUSARENKO A J. Plant gene expression in response to pathogens[J]. Plant molecular biology,1987,9(4):389-410.
[7] 左豫虎,康振生,杨传平,等. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性与大豆对疫霉根腐病抗性的关系[J]. 植物病理学报,2009,39(6):600-607.
[8] LAWRENCE C B,JOOSTEN M H A J,TUZUN S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the asso-

ciation of a basic chitinase isozyme with resistance[J]. Physiological & molecular plant pathology,1996,48(6):361-377.
[9] LAWRENCE C B,SINGH N P,QIU J S,et al. Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism[J]. Physiological & molecular plant pathology,2000,57(5):211-220.
[10] 杜良成,王钧. 稻瘟菌诱导的水稻几丁酶- β -1,3-葡聚糖酶活性及分布[J]. 植物生理与分子生物学学报,1992,18(1):29-36.
[11] REPKA V,TAMÁS L,FISCHEROVÁ I,et al. Identification and partial characterization of beta-1,3-glucanase from virus-infected cucumber cotyledons[J]. Acta virologica,1997,41(1):35-39.
[12] KANG M K,PARK K S,CHOI D. Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco[J]. Molecules & cells,1998,8(4):388-392.
[13] PAZ LAGO D,GUTIERREZ A,LUZARDO L. Biological relevance of the enzyme beta 1,3 glucanase on the activation of systemic resistance of tobacco induced by the fungal cell wall[J]. Cultivos tropicales,1998,19(3):25-27.
[14] 迟彦. 大豆 β -1,3-葡聚糖酶基因转化烟草及抗病性的研究[J]. 大连大学学报,2001,22(6):37-41.
[15] SAYERS E. NCBI protein resources;The NCBI handbook[M]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information,2013.
[16] 陈二龙,苏家恩,范志勇,等. Bright Yellow 2 烤烟热激蛋白 90 生物信息学分析[J]. 南方农业学报,2017,48(10):1734-1740.
[17] SEZUTSU H,KAJIWARA H,KOJIMA K,et al. Identification of four major hornet silk genes with a complex of alanine-rich and serine-rich sequences in *Vespa simillima xanthoptera* Cameron[J]. Bioscience biotechnology & biochemistry,2007,71(11):2725-2734.
[18] BENDTSEN J D,NIELSEN H,WIDDICK D,et al. Prediction of twin-arginine signal peptides[J]. BMC Bioinformatics,2005,6(1):167.
[19] KROGH A,LARSSON B,VON HEIJNE G,et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model:Application to complete genomes[J]. Journal of molecular biology,2001,305(3):567-580.
[20] ANFOKA G,BUCHENAUER H. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus[J]. Physiological & molecular plant pathology,1997,50(2):85-101.
[21] 何江峰,韩冰,赵宏鑫. 植物 β -1,3-葡聚糖酶的研究进展[J]. 内蒙古农业科技,2006(5):21-25.
[22] 方静平,苏亚春,游倩,等. 甘蔗 β -1,3-葡聚糖酶基因的电子克隆与分析[J]. 生物信息学,2012,10(3):199-207.