

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2020)02-0072-06

马铃薯V型ATP酶E亚基基因的生物信息学分析

庞鹏湘, 郜 刚*

(山西师范大学生命科学学院, 山西 临汾 041000)

摘 要: V-ATP酶广泛分布于真核细胞和原核细胞中, 负责质膜上的质子转运和胞内不同细胞器的酸化, 包括吞噬体、早期内小体、溶酶体、突触体、高尔基体、网格蛋白凝聚体、致密核心分泌颗粒和植物液泡。利用生物信息学软件对V型ATP酶E亚基的理化性质、细胞内定位、保守结构及高级结构进行预测。基于NCBI数据库中有物种代表性的20种V型ATP酶E亚基序列构建了进化树。该序列的全长为725 bp, 可编码一条241个氨基酸的蛋白质, 理论相对分子质量为27 689.84 D, 定位于细胞质中, 无信号肽序列, 无跨膜区, 等电点为7.28, 属于亲水性氨基酸。相关结果期望为进一步研究该基因在马铃薯中特别是在抗青枯病分子育种中的功能提供相关依据。

关键词: 马铃薯; V型ATP酶E亚基; 生物信息学

Analysis of Bioinformatics for Potato V-ATPase E Subunit Gene

PANG Pengxiang, GAO Gang*

(College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen, Shanxi 041000, China)

Abstract: V-ATPase is widely distributed in eukaryotic cells and prokaryotic cells, responsible for proton transport on the plasma membrane and acidification of different organelles in cells, including phagosomes, early neutrophils, lysosomes, synaptosomes, golgi, clathrin aggregates, dense core secretory granules, and plant vacuoles. Bioinformatics software was used to analyze the physicochemical properties, intracellular localization, conserved structure, and high-level structure of amino acids of the V-ATPase E subunit. The gene evolution tree was constructed, based on the 20 species of V-type ATPase E subunit sequences represented by species in the NCBI database. The sequence is 725 bp in length and encodes a 241 amino acid protein with a theoretical relative molecular mass of 27 689.84 D. It is located in the cytoplasm. There is no signal peptide sequence, no transmembrane region, and the isoelectric point is 7.28, belonging to hydrophilic amino acid. These results could provide a basis for further study of the function of this gene in potato, especially in molecular breeding of resistance to bacterial wilt.

Key Words: potato; V-ATPase E subunit; bioinformatics

V型ATP酶(V-type ATPase, 以下简称V-ATP酶)主要存在于真核生物膜系统中, 通过将氢离子转运到囊泡或胞外, 酸化细胞环境, 以溶酶体和高尔基体2种细胞器参与其内吞途径^[1], 其利用ATP水解的能量转化为电化学势能, 进而介导氢

离子的跨膜转运^[2]。该酶在植物中的研究以拟南芥居多。在拟南芥中, 至少有26个基因编码了全酶的12个亚基^[3]。研究发现该酶在拟南芥不同的部位所行使的功能具有很大的差异。如: V-ATP酶C1亚基在膨大的子叶、黄化幼苗下胚轴、根伸长

收稿日期: 2018-07-26

基金项目: 国家自然科学基金(31771858)。

作者简介: 庞鹏湘(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子生物学。

*通信作者(Corresponding author): 郜刚, 教授, 主要从事马铃薯与青枯菌互作分子机制研究, E-mail: ggsxnu@126.com。

区中的表达, 支持了V-ATP酶在细胞体积增大中的作用; 在根冠, V-ATP酶影响根系的生长以及对中度盐胁迫的耐受性^[4]。同时研究发现ATP酶B亚基可能参与拟南芥花粉萌发、花粉管生长、细胞内物质流动和细胞应急胁迫、质子传递等生殖生物学过程^[5]。在对蝴蝶兰的研究中发现V-ATP酶E亚基在抵抗低温胁迫中有重要作用。

在拟南芥中, V-ATP酶E亚基有3个亚型, 各亚型间在功能上具有不同程度的特化, 其中AtVHA-E1是胚胎发育表达的主要亚型, 而AtVHA-E2是花粉特异表达亚型, 在配子体发育中具有专一性但又不是必需的, 主要在发育种子的胚乳及周围组织中表达的是AtVHA-E3亚基。对突变体研究表明, AtVHA-E3能够恢复AtVHA-E1缺失的表型, 而AtVHA-E2却不能。

目前, 没有太多的V-ATP酶在马铃薯中的表达、功能等相关研究。有文章报道, 在马铃薯中克隆一个V-ATP酶, 使用对照和150 mmol/L NaCl耐受性愈伤组织系的Tonoplast富集囊泡作为模型系统来研究其活性以及参与液泡作为马铃薯耐盐机制。结果发现液泡膜上的pH梯度和Na⁺/H⁺反向物质对盐的响应增加强烈, 使得Na⁺隔离到液泡, 在这个过程中V-ATP酶发挥一定的催化作用, 推论该酶有助于马铃薯耐盐性的表现^[4]。

利用分子生物学公用数据库, 对基因的分子生物学特性、生化特性进行分析, 预测其蛋白质的结构。本研究以马铃薯幼苗为材料, 克隆了V型ATP酶E亚基基因的全长, 并对其序列进行分析, 为下一步验证马铃薯V-ATP酶E亚基基因的功能及在青枯菌胁迫中的分子调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 V型ATP酶E亚基基因的电子克隆

将实验室前期工作中获得的一条受青枯菌诱导上调表达的马铃薯(基因型为ED13)的EST序列, 在NCBI中运行BLASTn程序^[6]。作为Query的EST与NCBI数据库中XM006352196.2基因相似最高为98%。通过Bioedit软件将序列拼接, 直到不能延伸为止。

1.2 V型ATP酶E亚基基因编码蛋白质的生物信息学分析

用在线服务器NCBI ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析核酸序列的开放阅读框。通过NCBI Conserved domains(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测相关的V-ATP酶的保守结构域; 运用ProtParam(<http://www.expasy.org/cgi-bin/ProtParam.pl>)和ProScale(<http://www.expasy.org/cgi-bin/ProtScale.pl>)^[7]进行分析蛋白的分子量(Molecular weight)、等电点(Theoretical pI)、亲水性平均系数(Grand average of hydropathicity, GRAVY)、不稳定指数(Instability index)和脂溶指数(Aliphatic index)。CBS服务器的SignalP4.1 server系统(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)用来分析信号肽^[8]。利用WOLF(PSORT)<https://wolfpsort.hgc.jp/>和TargetP2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)分析蛋白质的亚细胞定位^[9]。TMHMM Server分析蛋白质的跨膜区域^[10]。NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)分析蛋白质磷酸化位点。PSIPRED analysis(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)进行蛋白质二级结构预测^[11], SWISS models(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行蛋白质三级结构预测^[12]。

1.3 V型ATP酶E亚基基因序列的进化分析

进入NCBI, 输入目标基因的氨基酸序列, 点击BLAST进行同源性分析, 按照相似度由高到底的顺序, 选择一定条数的序列依次下载, 并使用MEGA 5.0软件的邻接法(Neighbor-Joining, NJ)用来构建系统树, 来进行进化地位分析^[8]。

2 结果与分析

2.1 V型ATP酶E亚基基因序列

马铃薯V型ATP酶E亚基序列通过电子克隆获得了一条碱基个数为1 257的序列(图1), 通过ORF Finder分析核酸序列的开放阅读框, 得到这条序列的开放阅读框碱基个数为726(126~852), 以ATG为起始密码子, 以TAG为终止密码子, 编码的蛋白质个数为241。NCBI Conserved domains保守结构域的预测, 得到一个保守结构域vATP-synt_E, 该家族包括液泡ATP合成酶E亚基以及古细菌ATP合成酶E亚基。

图1 V型ATP酶E亚基基因序列和推导的氨基酸

Figure 1 V-type ATPase E subunit gene sequence and deduced amino acid

每种氨基酸都有特定的理化性质，而整个蛋白质的性质则往往是其组成氨基酸性质的加和。V型ATP酶E亚基蛋白在马铃薯基因组中blastp，有4条目标基因，这4个基因染色体位置尚不明确，运用ProtParam和ProScal进行分析V型ATP酶E亚基蛋白理化性质分析，蛋白的分子量(Molecular weight)是27 689.84 D、等电点(Theoretical pI)是7.28、不稳定指数(Instability index)是44.06，该数值高于阈值40，为不稳定蛋白，V型ATP酶E亚基蛋白属于不稳定蛋白、半衰期在哺乳动物的网织红细胞中为30 h，在酵母细胞中大于20 h，在大肠杆菌体内大于10 h、脂溶指数是增加球形蛋白热稳定性的一个积极因素，该蛋白的脂溶指数(Aliphatic index)是95.06、正电荷残基数(Arg + Lys)和负电荷残基数(Asp + Glu)各是38个。蛋白质的种类、空间结构及活性、功能都与肽链中氨基酸的种类及顺序有关(表1)，该蛋白由20种氨基酸组成，其中Glu(E)含量最高，为11.2%，其次Lys(K)、Leu(L)，占9.1%；Thr(T)和Trp(W)含量最低，分别为0.8%、0.4%，亲水性平均系数(Grand average of hydropathicity, GRAVY)是-0.551，该数值为

了解蛋白质的空间结构不仅有利于认识蛋白质的功能，也有利于认识蛋白是如何执行其功能的。

表 1 V 型 ATP 酶 E 亚基蛋白的氨基酸组成
Table 1 Amino acid composition of V-type ATPase E subunit protein

氨基酸 Amino acid	个数 Number	比例(%) Ratio	氨基酸 Amino acid	个数 Number	比例(%) Ratio
Ala(A)	20	8.3	Ile(I)	16	6.6
Arg(R)	16	6.6	Leu(L)	22	9.1
Asn(N)	9	3.7	Lys(K)	22	9.1
Asp(D)	11	4.6	Met(M)	5	2.1
Cys(C)	5	2.1	Phe(F)	4	1.7
Gln(Q)	11	4.6	Pro(P)	8	3.3
Glu(E)	27	11.2	Ser(S)	13	5.4
Gly(G)	8	3.3	Thr(T)	2	0.8
His(H)	16	6.6	Trp(W)	1	0.4
Tyr(Y)	4	1.7	Val(V)	21	8.7

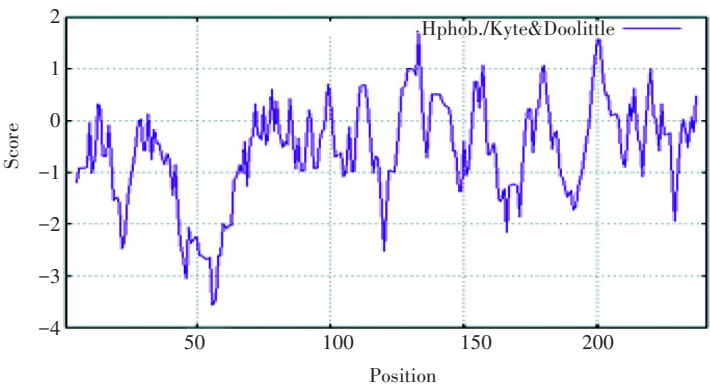


图 2 氨基酸结合水性
Figure 2 Amino acid binding water

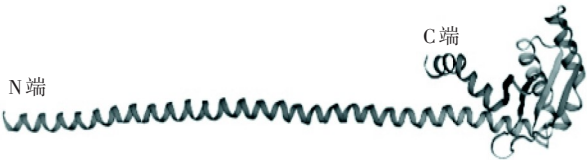


图 3 利用 SWISS model 预测得蛋白质三级结构
Figure 3 Tertiary structure of protein predicted by SWISS model

SWISS model 预测得到蛋白质三级结构(图 3)，利用 SWISS model 预测的蛋白质三级结构与模板之间的序列同源性为 32.09% (V-typeproton ATPase subunit E, SMTL ID: 3j9t.1P)。该蛋白质的三级结构有 α 螺旋、延伸链、 β 转角和不规则卷曲 4 种形式。其中最主要的二级结构是 α 螺旋，共由 168 个氨基酸参与形成 4 段 α 螺旋区域，占全部氨基酸的 69.71%；19 个氨基酸参与形成延伸链，占全部氨基酸的 7.88%； β 转

角由 9 个氨基酸形成，占全部氨基酸的 3.73%；45 个氨基酸形成不规则卷曲，占比为 18.67%。

2.3 V 型 ATP 酶 E 亚基基因系统进化分析

通过系统进化树，可以研究生物进化和系统发育过程，概括各种生物之间的亲缘关系。运行 MEGA 5.0 软件，将与该序列匹配度较高的 20 条序列输入，构建进化树(图 4)。从图 4 中可以看出，马铃薯 V-ATP 酶 E 亚基与马铃薯 E 亚基属于同一分支，

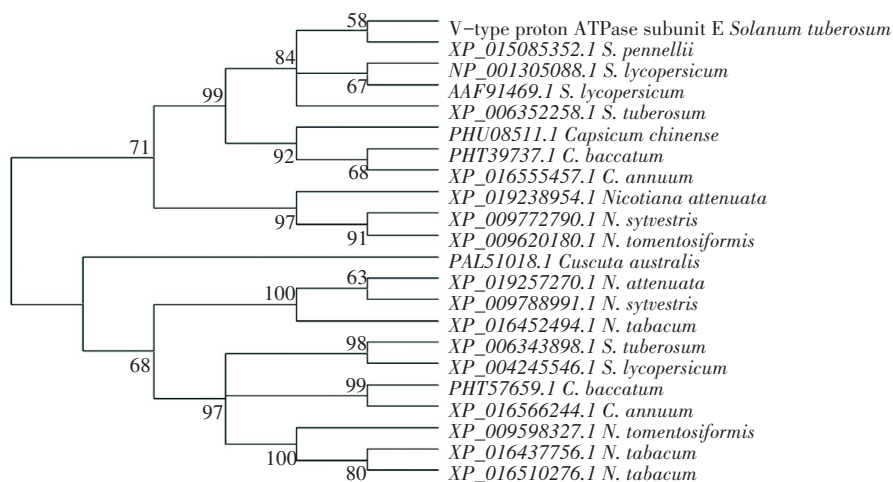


图4 V型ATP酶E亚基系统进化树

Figure 4 V-type ATPase E subunit phylogenetic tree

与烟草、烟草变种和潘那利番茄V-ATP酶E亚基的同源性也相对较高,而与木薯、巴西橡胶树、蓖麻、可可、榴莲属、米莎草(芭蕉亚种)、莲属、金鱼草等同源性较远。

3 讨论

从马铃薯中克隆了V-ATP酶E亚基基因的全长序列,并对其进行了生物信息学分析,结果表明,该序列没有信号肽,具有多种功能保守域,编码的蛋白质为一亲水性蛋白,具有水解酶活性,研究结果与其他生物V-ATPase E亚基的特征一致。

V-ATP酶在细胞内参与多种生化反应,例如含有与肌动蛋白结合和位点,参与细胞骨架的形成以及细胞的运动;具有调节hsp70活性的结构域,预测具有调节蛋白质的折叠、多肽在细胞器膜上的易位、协调对压力的反应,以及特定的蛋白质降解有关;多种酶的催化活性,参与细胞的生长,细胞内酸化的主要调节剂、参与物质的转运^[13,14]、参与到多种信号传导的过程^[15],涉及多种胁迫生理调控^[16,17],过表达V-ATPase E亚基的转基因拟南芥植物增强了对盐和甘露醇耐受性^[18]。其作用机制有待于进一步研究。显然,试验结果为进一步研究V-ATPase E亚基基因功能及在青枯菌胁迫下的响应机制提供了依据。

V型ATP酶E亚基蛋白位于KEGG中,V-ATP酶E亚基参与的途径分类范围属于生物特异性生物系统,包括吞噬、氧化磷酸化和代谢途径。吞噬作用是通过细胞摄取相对大颗粒的过程,并且是组织重塑,炎症和防御感染因子的中心机制。当吞噬细胞表面上的特异性受体识别颗粒表面上的配体时,形成吞噬体。形成后,新生的吞噬体逐渐获得消化特征。吞噬体的这种成熟涉及与其他膜细胞器的调节相互作用,包括再循环内体,晚期内体和溶酶体。吞噬体和溶酶体融合释放出有毒产物,杀死大多数细菌并将其降解成碎片。表明V-ATPase E亚基基因可能响应青枯菌胁迫。

V-ATP酶的分布广泛且结构复杂,对细胞的生理功能有着重要作用,研究表明V-ATP酶的表达及相应的调控有多种方式。V-ATP酶的功能调控方式包括V1和V0 2个结构域的解离和结合,内部巯基的可逆氧化,激活剂和抑制剂的影响,靶标膜的选择几个方面。V-ATP酶的表达调控方式包括转录水平的调控和转录后水平的调控。其中,翻译后修饰(PTM)是调节基因表达的关键水平之一,其决定了真核细胞翻译后蛋白质的命运,对疾病的诊断和预防有用,真核V-ATP酶E功能可以通过催化V1区和膜嵌入的V0区的可逆

解离来调节, 具体的调控机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 刘瑾, 段小红. ATP6 VOD2的结构、功能及应用 [J]. 医学分子生物学杂志, 2016, 13(4): 234-237.
- [2] Beyenbach K W, Wicczorek H. The V-type H⁺-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation [J]. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2006, 209(4): 577-589.
- [3] Sze H, Schumacher K, Muller M L, *et al.* A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(4): 157-161.
- [4] Padmanaban S, Lin X, Perera I, *et al.* Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit *c* genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi [J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1514-1526.
- [5] 马彬云. 拟南芥V型ATP酶B亚基参与细胞微丝骨架动态装配的生理生化功能研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [6] Altschul S F, Wootton J C, Gertz E M, *et al.* Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices [J]. FEBS Journal, 2005, 272(20): 5101-5109.
- [7] 王永刚, 马建忠, 马雪青, 等. 马铃薯 α -淀粉酶基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 食品科学, 2010, 31(19): 216-220.
- [8] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112(112): 531-552.
- [9] Horton P, Park K J, Obayashi T, *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35: W585-W587.
- [10] 刘英, 裴瑞芳, 王洁, 等. 马铃薯ACS基因克隆及生物信息学分析 [J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 50(1): 37-41.
- [11] 杨涛, 张宁, 栗亮, 等. 马铃薯可溶性淀粉合成酶SSⅢ基因克隆及生物信息学分析 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 545-549.
- [12] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(5): 1351-1362.
- [13] Parra K, Chan C Y. Yeast phosphofructokinase-1 subunit Pfk2p is necessary for pH homeostasis and glucose-dependent V-ATPase reassembly: The role of glycolysis [J]. BBA - Bioenergetics, 2014, 1837(28): e113-e113.
- [14] Schumacher K, Krebs M. The V-ATPase: small cargo, large effects [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2010, 13(6): 724-730.
- [15] Parra K J, Chan C Y, Chen J. *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar H⁺-ATPase regulation by disassembly and reassembly: one structure and multiple signals [J]. Eukaryotic Cell, 2014, 13(6): 706-714.
- [16] 袁秀云, 田云芳, 梁芳, 等. 蝴蝶兰液泡型ATP酶E亚基基因的克隆及序列分析 [J]. 河南农业科学, 2016, 45(6): 104-110.
- [17] Mirzaei M, Pascovici D, Atwell B J, *et al.* Differential regulation of aquaporins, small GTPases and V-ATPases proteins in rice leaves subjected to drought stress and recovery [J]. Proteomics, 2012, 12(6): 864-877.
- [18] Zhang X H, Li B, Hu Y G, *et al.* The wheat E subunit of V-type H⁺-ATPase is involved in the plant response to osmotic stress [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(9): 16196-16200.

欢迎订阅《中国马铃薯》杂志

《中国马铃薯》杂志是由东北农业大学和中国作物学会马铃薯专业委员会主办的国内唯一的马铃薯专业领域科技期刊。它以繁荣中国马铃薯事业为办刊宗旨, 设有遗传育种、栽培生理、土壤肥料、病虫害防治、综述、产业开发、品种介绍等栏目。

本刊国内外公开发行, 双月刊, 大16开本, 每期定价12.00元, 全年72.00元, 哈尔滨市邮局发行, 全国各地邮局订阅, 邮发代号: 14-167。读者也可直接汇款至编辑部订阅。

本刊承揽广告业务, 欢迎各界广为利用。

通讯地址: 哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部 邮编: 150030 电话: 0451-55190003