

• 药材与资源 •

蓖麻 PIP5Ks 基因的生物信息学及荧光定量 PCR 分析

梁塔娜¹, 赵永^{1,5}, 何智彪⁶, 曹清国⁷, 张幽静⁷, 张艳欣¹, 李丽丽¹, 杨丽凤¹, 常如慧¹, 黄凤兰^{1,2,3,4*}

1. 内蒙古民族大学生命科学院, 内蒙古 通辽 028000
2. 内蒙古自治区高校蓖麻产业工程技术研究中心, 内蒙古 通辽 028000
3. 内蒙古自治区蓖麻育种重点实验室, 内蒙古 通辽 028000
4. 内蒙古自治区蓖麻产业协同创新培育中心, 内蒙古 通辽 028000
5. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150000
6. 通辽市农业科学研究院, 内蒙古 通辽 028000
7. 内蒙古牙克石市乌尔其汉镇畜牧兽医草原站, 内蒙古 牙克石 022159

摘要:目的 预测磷脂酰肌醇 4-磷酸 5-激酶(PIP5Ks)基因家族 7 个基因的表达部位;测定 Lm 型雌性系蓖麻 aLmAB2 3 种品系不同时期的蓖麻花序中 PIP5Ks 各成员相对表达量。方法 利用生物信息学分析在线软件进行蛋白质理化性质分析、蛋白质疏水性分析、亚细胞定位预测、跨膜区分析。采用荧光定量 PCR 方法进行蓖麻 PIP5Ks 基因家族的生物信息学分析和采用 DNAMAN 程序进行序列比对。结果 蓖麻 PIP5Ks 共有 7 个成员,分别为 PIP5K1、PIP5K2、PIP5K4、PIP5K6、PIP5K8、PIP5K9、PIP5K11;蓖麻 PIP5K 对应的蛋白之间的氨基酸序列同源性达到 48.06%,蓖麻 PIP5Ks 所对应蛋白均为亲水性蛋白,除 PIP5K9 和 PIP5K11 为不稳定蛋白质其余均为稳定蛋白质;PIP5Ks 对应蛋白均不存在跨膜结构域,均为非跨膜蛋白。亚细胞定位结果显示 PIP5K1、PIP5K4、PIP5K6、PIP5K9、PIP5K11 蛋白具有导肽的可能性较低,并且无对应的氨基酸切割位点,即定位在其他细胞器或者可能为胞浆蛋白;PIP5K2 蛋白定位在叶绿体,叶绿体转运肽数值较高;PIP5K8 蛋白定位在分泌通路。利从 PIP5Ks 在差异表达的相对表达量变化上来看,除 PIP5K4 并未检测到荧光,其余 PIP5Ks 均有一定的差异表达,PIP5Ks 的相对表达量的变化趋势均较为相近,PIP5K1、PIP5K2 的相对表达量较多,其次为 PIP5K8、PIP5K9 的相对表达量,PIP5K6 及 PIP5K11 只有少量的表达。结论 PIP5Ks 在蓖麻中对花序轴性状可能有一定的影响,PIP5Ks 在花序轴上的差异含量与花序发育具有一定的规律性。

关键词:蓖麻; PIP5Ks; 生物信息学分析; 荧光定量; 花序

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)24-5892-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.24.024

Bioinformatics analysis and fluorescence quantitative PCR results of *Ricinus communis* PIP5Ks

LIANG Ta-na¹, ZHAO Yong^{1,5}, HE Zhi-biao⁶, CAO Qing-guo⁷, ZHANG You-jing⁷, ZHANG Yan-xin¹, LI Li-li¹, YANG Li-feng¹, CHANG Ru-hui¹, HUANG Feng-lan^{1,2,3,4}

1. College of Life Sciences, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028000, China
2. Research Institute of Castor Industry Engineering and Technology in Inner Mongolia Autonomous Region, Tongliao 028000, China
3. Key Laboratory of Castor Breeding in Inner Mongolia Autonomous Region, Tongliao 028000, China
4. Collaborative Innovation Cultivation Center of Castor Industry in Inner Mongolia Autonomous Region, Tongliao 028000, China
5. Northeast Forestry University, Harbin 150000, China
6. Tongliao Agricultural Science Research Institute, Tongliao 028000, China
7. Inner Mongolia Yakeshi City Animal Husbandry and Veterinary Prairie Station Urqihan Town, Yakeshi 022159, China

收稿日期: 2018-05-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31160290); 国家自然科学基金项目(31860353); 国家自然科学基金项目(31860071); 国家青年科学基金项目(31401418); 内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2017MS0339); 内蒙古自治区科技创新引导奖励资金项目(KJCX15002); 内蒙古自治区“草原英才”计划项目(201511); 内蒙古自治区草原英才创新团队——蓖麻分子育种创新研究团队支持项目(2017); 内蒙古自治区蓖麻育种重点实验室开放基金项目(MDK2016031, MDK2016030); 内蒙古自治区高校蓖麻产业工程技术研究中心开放基金项目(MDK2017030, MDK2018014, BMJ2015-07, MDK2016008); 内蒙古民族大学研究生科研项目(NMDSS1863); 内蒙古民族大学 2017 研究生重点建设课程项目(生物工程技术原理); 内蒙古民族大学 2018 年研究生重点建设课程项目(现代分子生物学新技术)

作者简介: 梁塔娜(1995—), 女, 蒙古族, 研究生, 研究方向为植物生物化学与分子生物学。E-mail: 2717931713@qq.com

***通信作者:** 黄凤兰, 研究方向为蓖麻分子育种研究。E-mail: huangfenglan2008@163.com

Abstract: Objective To predict the expression of seven genes in the PIP5K gene family, and to determine the relative expression of PIP5Ks in different stages of type Lm gynoeious *Ricinus communis* aLmAB2. **Method** Bioinformatics analysis of online software protein physicochemical properties analysis, protein hydrophobicity analysis subcellular localization prediction, transmembrane region analysis, etc. Bioinformatics analysis of hemp PIP5K gene family and DNAMAN for sequence alignment and real-time PCR. **Results** The results showed that there were seven members in the *R. communis* PIP5Ks, which were PIP5K1, PIP5K2, PIP5K4, PIP5K6, PIP5K8, PIP5K9, and PIP5K11. The amino acid sequence homology of the corresponding protein of *R. communis* PIP5K reached 48.06%, and the protein of *R. communis* PIP5Ks all are hydrophilic proteins. Except that PIP5K9 and PIP5K11 were unstable proteins, the rest were stable proteins, and the corresponding proteins of PIP5Ks have no transmembrane domain, and all were non-transmembrane proteins. Subcellular localization results showed that the proteins PIP5K1, PIP5K4, PIP5K6, PIP5K9, and PIP5K11 were less likely to have a lead peptide, and there was no corresponding amino acid cleavage site, ie, localized in other organelles or possibly cytoplasmic proteins; Protein PIP5K2 was localized in chloroplasts, the chloroplast transit peptide has a higher value, and the protein PIP5K8 was located in the secretory pathway. From the perspective of the relative expression of PIP5Ks in the differential expression, except that no fluorescence was detected in PIP5K4, the other PIP5Ks had a certain differential expression. The changes of relative expression of PIP5Ks showed similar trends, the levels of PIP5K1, PIP5K2 relative expression were high, followed by the relative expression of PIP5K8, PIP5K9, and PIP5K6 and PIP5K11 only have fewer expressions. **Conclusion** It is concluded that PIP5Ks may have a certain effect on the inflorescence axis traits in ramie. The differential expression of PIP5K on the inflorescence axis has the certain regularity with the development of inflorescence.

Key words: *Ricinus communis* L.; PIP5Ks; bioinformatics analysis; fluorescence quantitative; inflorescence axis

蓖麻 *Ricinus communis* L. 是一种用途很广、经济效益很大的非食用油料作物, 被人们视为很有开发潜力又可再生的“石油”资源, 中国是蓖麻第二大生产国^[1]。在蓖麻的花粉发育方面由于蓖麻很多品种的花粉萌发时期不近相同, 并且花粉萌发率有待提高, 花序轴性状有待优化。本实验以 Lm 型雌性系为材料, Lm 型雌性系是带有标志性状的蓖麻雌性系, 同时包含标雌、单雌和两性系 3 种花序类型的材料, Lm 型雌性系蓖麻是“一系两用”“两系法”育种的母本材料, 在前期工作基础上发现磷脂酰肌醇 4-磷酸 5-激酶(PIP5Ks) 基因家族 6 个基因与 Lm 型雌性系后代发育相关。

PIP5Ks 是生物体内的磷酸类激酶, 在同一种植物中 PIP5Ks 的不同家族成员参与不同代谢通路的调节^[2], 例如 PIP5K 基因对植物根生长发育的调控^[3]、对植物花的调控、对植物逆境胁迫的调控^[4]等方面, 特别是对环境因素的响应中起重要作用^[5], PIP5Ks 在植物中有多种同种型^[6], 其编码基因构成一个基因家族 PIP5Ks, 蓖麻 PIP5Ks 目前已知共有 7 个成员^[7]。PIP5Ks 基因家族代表了一组植物型磷脂酰肌醇-4-磷酸-5-激酶, 特异地催化 1-磷脂酰-1D-肌醇环上 5 位羟基磷酸化, 能催化 PI-4-磷酸 (PI4P) 的磷酸化, 合成 PI-4,5-二磷酸 (PI-4,5-P2), 这种转换是磷酸肌醇 (PI) 循环中的重要分支^[8]。膜磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP2) 被磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C (PI-PLC) 水解产生 2 种第二信使, 即参与胞内

Ca²⁺ 释放的肌醇-1,4,5-三磷酸和甘油二酯, 其参与各种蛋白激酶 C 同种型的活化^[9]。PIP2 通过调控小 GTP 结合蛋白 ARF 调控多种细胞过程, 例如通过与肌动蛋白结合蛋白直接相关的细胞骨架结构和囊泡运输^[10]。细胞中浓度必须保持足够高, 以便 PIP2 能够产生第二信使并执行其自身的生物学功能^[11]。PIP5Ks 基因家族参与植物的多种新陈代谢调控^[12]。在大多数真核生物中 PIP5Ks 有共同的脂质激酶结构域^[13]。

PIP5Ks 在花粉萌发等方面有一定相关性的研究, 尤其拟南芥中 PIP5K1 和 PIP5K2 都在早期花粉发育过程中表达, 并且在植物激素作用下, 转录水平会提高, 并且可以通过修饰与花诱导有关的基因的表达来抑制花启动^[14]。本实验室通过前期研究得到蓖麻 PIP5Ks 对蓖麻花序轴性状等方面有一定的调控作用^[1], 因此推测 PIP5Ks 在花粉发育方面有调控作用, 所以本实验对可能影响植物花粉萌发率的基因家族 PIP5Ks 在蓖麻中的生物信息学进行分析, 对 PIP5Ks 及其对应的蛋白质的生物学特征进行分析。并以 Lm 型雌性系蓖麻在营养生长期 (4 片真叶期)、营养生长到生殖生长转变期 (5 片真叶期)、主茎穗开花期、二级分枝开花期的标雌、单雌、两性系花序为研究对象, 测定其荧光定量相对表达量变化, 观察 PIP5Ks 与蓖麻花序轴性状方面的关联。

1 材料与方法

1.1 材料

样品由内蒙古民族大学特聘教授通辽市农业科学研究院朱国立研究员提供并鉴定为蓖麻 *Ricinus communis* L. [营养生长期 (4 片真叶期)、营养生长到生殖生长转变期 (5 片真叶期)、主茎穗开花期、二级分枝开花期] 的标雌、单雌和两性系 3 种品系的花序。RNA 提取使用北京庄盟国际生物基因科技有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒。

1.2 核酸及蛋白来源

数据库资料来源于 NCBI 核酸及蛋白数据库中已登录的蓖麻 PIP5K 蛋白的核酸序列及其对应的氨基酸序列: PIP5K1 (NCBI Reference Sequence: XM_015716053.1、LOC8274135)、PIP5K2 (NCBI Reference Sequence: XM_002513224.2、LOC8287614)、PIP5K4 (NCBI Reference Sequence: XM_002526870.2、LOC8270491)、PIP5K6 (NCBI Reference Sequence: XM_015715277.1、LOC8270872)、PIP5K8 (NCBI Reference Sequence: XM_015725448.1、LOC8285184)、PIP5K9 (NCBI Reference Sequence: XM_015719361.1、LOC8283966)、PIP5K11 (NCBI Reference Sequence: XM_015728603.1、LOC8286714)。

2 方法

2.1 蓖麻 PIP5Ks 生物信息学分析

生物信息学分析软件有蛋白质理化性质分析

(<https://web.expasy.org/protparam/>)、蛋白质疏水性分析 (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)、亚细胞定位预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)、跨膜区分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)、叶绿体转运肽信号肽预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)、Coil 区预测 (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)、蛋白质二级结构预测 (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>)、蛋白质三级结构预测 (<http://www.swissmodel.expasy.org/interactive>)、蛋白质功能预测 (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/Search/Sequence-search>)、结构域分析及 motif 搜索 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、蛋白质序列比对 DNAMAN。

2.2 蓖麻 PIP5Ks 荧光定量 PCR

用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计结果如表 1 所示, 利用 Primer Premier 5.0 软件, 设计 3'RACE 简并引物 F1 (1)、F2 (2); 结合已经克隆得到的蓖麻 PIP5K 3'端基因片段, 设计 5'RACE 特异性引物 F1 (2)、F2 (2); 采用 DNAMAN 软件对测定的核苷酸 5'端、3'端电子序列进行拼接合并, 从而获得 cDNA 全长, 在该基因编码区域的两端设计全长特异性引物 F、R 如表 1 所示。使用 18 S RNA 作为此荧光定量 PCR 的内参。本实验利用荧光定量 PCR 进行蓖麻的 PIP5Ks 基因家族的基因表达差异

表 1 荧光定量 PCR 引物设计

Table 1 Fluorescence quantitative PCR primer design

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物名称	引物序列 (5'→3')
18 S-F	AGGGGATAACCCCATGAATCCA	Phos6 (1)-F	GGAAGAAGCAAGGCGAGAC
18 S-R	TGCATGGTCTCCTGATACGGCCAAG	Phos6 (1)-R	CCTGAAAACAACAGGGCAA
ACTIN-F	TCCATAATGAAATGTGATGTTG	Phos6 (2)-F	GGAAGAAGCAAGGCGAGACTA
ACTIN-R	GGAAGGTGCTTAGAGATGC	Phos6 (2)-R	TCAAGAGATATGGCAGGAGCA
Phos1 (1)-F	TTCTTCGGTGTCCATTGTGTT	Phos8 (1)-F	TGTCAAAGAAGCAAAAAAGAAG
Phos1 (1)-R	TCCAGGTCCTTGAGAGTTGTG	Phos8 (1)-R	AATAGAGTAGTGTGGCGGTGTA
Phos1 (2)-F	TTCTTCGGTGTCCATTGTGTT	Phos8 (2)-F	TCAAAGAAGCAAAAAAGAAG
Phos1 (2)-R	GGCTTATCTGTTGTGCGGC	Phos8 (2)-R	TAGAGTAGTGTGGCGGTGTA
Phos2 (1)-F	TTAATTTTGTGTTTCGGC	Phos9 (1)-F	CGCACAACCGTAGCAGGAGAA
Phos2 (1)-R	AGCAAGTGATAACCTCGC	Phos9 (1)-R	GCGGGGGACTAAGACAAGACC
Phos2 (2)-F	GACGCTTCTCCGTATCT	Phos9 (2)-F	CAATCTCTAACGCACAACCG
Phos2 (2)-R	TGCCTTTTCTCCACTCT	Phos9 (2)-R	TATGAGGACCCACAACAACA
Phos4 (1)-F	GTCACAATCCTACCATCACAGA	Phos11 (1)-F	ATTGAGTTTTGCTGATGCTT
Phos4 (1)-R	CATCCTCACCATTAGACCTAA	Phos11 (1)-R	TGTTCTCCTACTTCTGTCTGT
Phos4 (2)-F	CCTGATGGGAGTTTTTATGTAG	Phos11 (2)-F	TGATTACTTAGAGGAAGAGGGC
Phos4 (2)-R	TCTGTGATGGTAGGATTGTGAC	Phos11 (2)-R	GGGAGAAGAAGATGTAGTGGAG

分析,提取时要保持试剂盒内的所有试剂的澄清,避免影响提取效果,按照试剂盒说明书进行 RNA 提取。再进行 PCR 反应体系,在冰上配制 20 μL 的 PCR 反应体系。反应体系为 SYBR Premix Ex Taq™ II (2×): 10 μL, PCR Forward Primer (10 μmol/L): 0.8 μL, PCR Reverse Primer(10 μmol/L): 0.8 μL, ROX Reference Dye (50×): 0.4 μL, DNA 模板: 2 μL, 灭菌蒸馏水 6 μL。

3 结果与分析

3.1 PIP5Ks 基因家族成员的生物信息学分析

3.1.1 PIP5Ks 基因家族各成员核酸序列分析 在 NCBI 搜索^[15]PIP5K 得到蓖麻 PIP5Ks 基因家族各成员的参考序列,并于表 1 中列出。通过初步分析从数据库下载的 7 个蓖麻 PIP5K 基因(表 2) 可以看到,除了 PIP5K11 的序列全长为 1 501 bp,其他基因的序列全长均在 2 853~3 246 bp。PIP5K11 的序列全长为其他序列的二分之一左右,其编码的多肽链也因此较短。

3.1.2 PIP5Ks 基因家族各成员蛋白质理化性质分析 根据组成蛋白质的 20 多种氨基酸的

物理和化学性质^[16],可以对其基本特征进行分析。使用 ProtParam 在线工具对蓖麻 PIP5K 基因家族对应氨基酸进行理化分析,通过初步分析从数据库下载的 7 个蓖麻 PIP5K 基因(表 3) 可以看到,除了蛋白 PIP5K11 的氨基酸数目为 395 以外,其他的均在 711~831 bp 内。而 PIP5Ks 对应的氨基酸的相对分子质量除了蛋白 PIP5K11 的较小为 45 824.16 以外,其他的均在 81 072.46~93 873.98 内。由此可以看出除了蛋白 PIP5K11 以外的其他基因家族对应的氨基酸数目及相对分子质量相似度较高。从表 2 中的蛋白质不稳定系数(instability index)可知,蓖麻 PIP5Ks 基因家族对应的蛋白除了 PIP5K9 和 PIP5K11 为不稳定蛋白质,其他均为稳定蛋白质,表中基因家族对应的蛋白亲水性平均系数(GRAVY)值均为负数,可知基因家族对应的所有蛋白均为亲水性蛋白。并且 PIP5Ks 基因家族各成员的等电点均大于 6 (6.61~9.22)。

3.1.3 蓖麻 PIP5K 蛋白信号肽、导肽及亚细胞定位预测分析 以空间分布特征为主线研究蛋白质结构是理解其结构与功能关系的一个重要视角^[15]。对于 PIP5K 基因家族各成员的亚细胞定位预测分析有助于对其功能的预测^[16]。使用 TargetP 在线工具对 PIP5K 蛋白进行亚细胞定位,结果如表 4 所示。结果表明,蛋白 PIP5K1、PIP5K4、PIP5K6、PIP5K9、PIP5K11 的分泌途径为-型,其叶绿体转运肽、线粒体目标肽及信号肽的分值均较低,并且无对应的氨基酸切割位点,其具有导肽的可能性较低,即定位在其他细胞器或者可能为胞浆蛋白;蛋白 PIP5K2 的分泌途径为 C 型,即定位在叶绿体,叶绿体转运肽数值较高,预测剪切位点的序列长度为 29 个氨基酸;蛋白 PIP5K8

表 2 PIP5Ks 基因家族各成员核酸序列分析
Table 2 Nucleic acid sequence analysis of PIP5Ks gene family members

基因名称	mRNA 登录号	序列全长/bp	基因位点
PIP5K1	XM_015716 053.1	3 246	LOC8274135
PIP5K2	XM_002513 224.2	3 008	LOC8287614
PIP5K4	XM_002526 870.2	2 948	LOC8270491
PIP5K6	XM_015715 277.1	3 191	LOC8270872
PIP5K8	XM_015725 448.1	2 980	LOC8285184
PIP5K9	XM_015719 361.1	2 853	LOC8283966
PIP5K11	XM_015728 603.1	1 501	LOC8286714

表 3 PIP5Ks 基因家族对应氨基酸理化性质分析
Table 3 Analysis of physicochemical properties of PIP5Ks gene family

基因名称	GeneBank 登录号	氨基酸数目	相对分子质量	理论等电点	脂肪族氨基酸指数	蛋白质不稳定系数	亲水性平均系数
PIP5K1	XM_015716 053.1	734	83 409.21	9.05	63.83	31.69	-0.704
PIP5K2	XM_002513 224.2	711	81 072.46	6.97	65.78	27.40	-0.625
PIP5K4	XM_002526 870.2	767	87 508.70	6.84	63.56	33.92	-0.649
PIP5K6	XM_015715 277.1	786	89 132.07	7.87	60.90	27.85	-0.676
PIP5K8	XM_015725 448.1	801	90 561.34	9.22	73.10	39.57	-0.530
PIP5K9	XM_015719 361.1	831	93 873.98	8.63	76.25	46.14	-0.528
PIP5K11	XM_015728 603.1	395	45 824.16	6.61	80.43	46.85	-0.459

表 4 亚细胞定位预测分析结果

Table 4 Analysis results of subcellular localization prediction

基因名称	氨基酸数目	叶绿体转运肽	线粒体导肽	信号肽	其他类型	亚细胞定位	可靠性	剪切位点序列长度/bp
PIP5K1	734	0.397	0.036	0.032	0.814	细胞质	3	—
PIP5K2	711	0.629	0.095	0.090	0.594	叶绿体	5	29
PIP5K4	767	0.138	0.178	0.155	0.671	细胞质	3	—
PIP5K6	786	0.210	0.251	0.113	0.506	细胞质	4	—
PIP5K8	801	0.015	0.274	0.492	0.455	信号肽	5	28
PIP5K9	831	0.212	0.136	0.064	0.692	细胞质	3	—
PIP5K11	395	0.059	0.316	0.042	0.835	细胞质	3	—
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000	细胞质		

的分泌途径为 S 型，所含信号肽的数值较高，即定位在分泌通路，预测剪切位点序列长度为 28 个氨基酸。

组成生物体的蛋白质大多是在细胞质中的核糖体上合成的，各种蛋白质合成之后要分别运送到细胞中的不同部位，以保证细胞生命活动的正常进行。可分为分泌蛋白、细胞器蛋白等，一般来讲，信号肽在蛋白质 N 端，极少超过 45 个氨基酸残基。所以在序列中仅 N 端部分序列对信号肽的分析预测具有重要作用。默认为分析 N 端 70 个氨基酸，后面的不进行分析。使用在线软件 SignalP-3.0^[16]对除 PIP5K2 的其他基因进行预测，结果表明除 PIP5K2 外的 PIP5Ks 对应的蛋白均为非分泌蛋白。由于蛋白 PIP5K2 亚细胞定位预测定位在叶绿体转运肽上，则使用 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) 对蛋白 PIP5K2 进行预测，结果表明 PIP5K2 无氨基酸残基位点，因此可能不存在导肽酶切位点，不具有导肽结构，可能在细胞中直接发挥自身的功能，定位于叶绿体上，具有叶绿体转运肽结构，预测长度为 29 个氨基酸，是一个具有 N 末端叶绿体转运肽与无信号肽结构的非分泌蛋白。蛋白 PIP5K8 的分泌途径为 S 型，即定位在分泌通路，预测剪切位点序列长度为 28 个氨基酸。

3.1.4 蓖麻 PIP5K 蛋白跨膜结构域的预测与分析膜蛋白这种特殊的环境决定了跨膜区必须由强疏水的氨基酸组成，同时磷脂双层的厚度又决定了膜蛋白的跨膜区一般大约由 20 个强疏水性的氨基酸组成^[17]。跨膜结构域的预测和分析，有利于正确认识和理解蛋白质的结构、功能、分类及在

细胞中的功能部位。用 CBS 的 TMHMM2.0 对蓖麻 PIP5K 蛋白氨基酸序列的跨膜结构域进行预测，结果如图 1-A 所示。结果表明，7 个 PIP5Ks 基因家族对应的 PIP5K 蛋白跨膜结构域均小于 1，即均不存在跨膜结构域，所有氨基酸均位于细胞膜表面。

3.1.5 蓖麻 PIP5K 蛋白亲水性/疏水性分析用 ExPASy 的 ProtScale 程序分析 PIP5K 蛋白的疏水性结果如图 1-B 所示。PIP5K1 多肽链的第 539 位的氨基酸具有最高的分值 2.067，疏水性最强；第 33 位的氨基酸具有最低的分值 -3.511，亲水性最强。整条多肽链没有明显的疏水区域，表现为亲

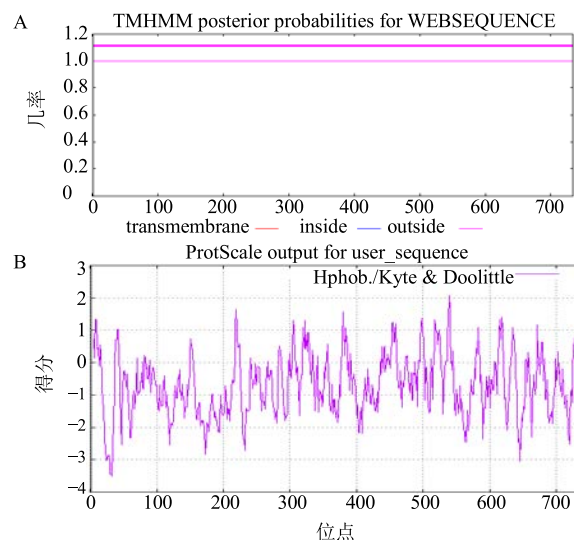


图 1 蓖麻 PIP5K1 蛋白跨膜结构域预测 (A) 与亲水性/疏水性预测 (B) 结果

Fig. 1 Prediction results of castor PIP5K1 protein transmembrane structure (A) and hydrophilic/hydrophobicity of castor PIP5K protein (B)

水性。这与上述跨膜结构域的预测分析结果一致。

3.1.6 蓖麻 PIP5K 蛋白二级/三级结构的预测分析 利用 SSpro 在线工具对蓖麻 PIP5K 蛋白的二级结构进行预测，结果如表 5 所示。结果表明，β-折叠是 PIP5K 蛋白比较主要的结构元件，不同 PIP5K 蛋白的 β-折叠有一定的差异，其中蛋白

表 5 蓖麻 PIP5K 蛋白二级结构的组成

Table 5 Composition of secondary structure of castor PIP5K protein

基因名称	氨基酸长度/bp	α-螺旋/%	β-折叠/%	无规卷曲/%
PIP5K1	734	12.40	25.20	62.40
PIP5K2	711	14.35	23.49	62.17
PIP5K4	767	13.82	23.99	62.19
PIP5K6	786	14.50	22.26	63.23
PIP5K8	801	15.23	20.85	63.92
PIP5K9	831	14.68	20.82	64.50
PIP5K11	395	25.82	14.18	60.00

PIP5K11 的 β-折叠比例明显少于其他 PIP5K 蛋白；α-螺旋在 PIP5K 蛋白中所占的比例较少，除蛋白 PIP5K11 所占比例较高外，其他 PIP5K 蛋白 α-螺旋的比例较为相近。结果表明，蓖麻 PIP5K 蛋白二级结构显示 PIP5Ks 对应的蛋白均为非跨膜蛋白。用 ExPASy 的 SWISS-MODEL 对蓖麻 PIP5K 蛋白的氨基酸序列进行蛋白质三维结构同源性建模^[18]。同源建模法避免了使用从头计算蛋白质结构的方法，而是使用已知的同源蛋白作为模板构建三级结构。预测结果如图 2 所示。可以看出 PIP5K 蛋白的三维结构不尽相同。

3.1.7 蓖麻 PIP5K 基因家族各成员的氨基酸序列比对分析及蛋白结构域分析 使用 DNAMAN 程序对蓖麻 PIP5K 基因家族各成员的氨基酸序列进行比对分析，结果如图 3 所示。蓖麻 PIP5K 基因家族中不同 PIP5K 蛋白之间的氨基酸序列同源性

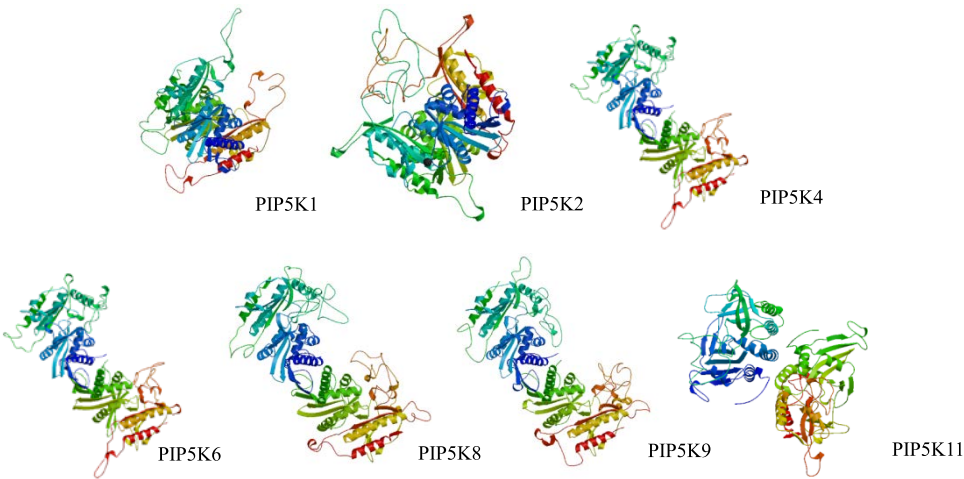


图 2 蓖麻 7 种 PIP5K 蛋白的三级结构预测结果

Fig. 2 Prediction results of three levels of PIP5K protein in castor bean

并不高，达到 48.06%，完全一致的氨基酸数量并不多。结构域是在蛋白质三级结构中介于二级和三级结构之间可以明显区分但又相对独立的单元，每个结构域自身形成紧实的三维结构，可以独立存在或折叠，结构功能域通常由 25~300 个氨基酸残基组成，不同蛋白质分子中结构域的数目不同，同一蛋白质分子中的几个结构域彼此相近或不尽相同。结构域是蛋白质的功能、结构和进化单元，结构功能域分析对于蛋白质结构的分类和预测有着重要作用。模体在蛋白、DNA、RNA 序列中都存在，通常由 2、3 个二级结构组成，一般为 α-螺旋、β-折

叠和环。模体作为结构域中的压单元，表现结构域的各种生物学功能。使用 SMART 服务器分析蓖麻 PIP5K 蛋白的结构功能域以及模体搜索，结果如表 6 所示，PIP5Ks 对应的蛋白除了蛋白 PIP5K11 的功能结构域位置均在 399 后直至氨基酸序列末尾。而模体数量及低复杂度数量较为相近。PIP5K11 的功能结构域位置在 9-374，模体数量及低复杂度数量均为 0。

3.2 蓖麻 PIP5K 基因家族荧光定量分析结果

本实验引用荧光定量 PCR 来测定蓖麻 PIP5Ks 基因家族中不同基因的差异表达量，分别有蓖麻

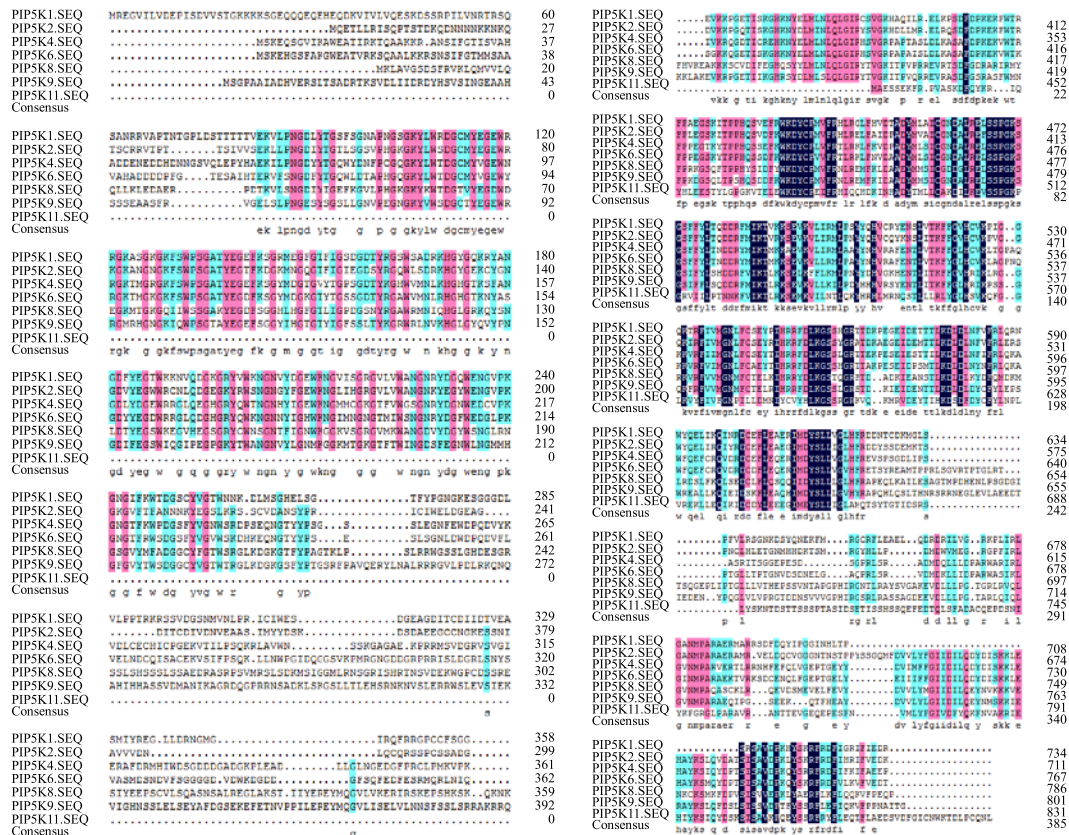


图 3 蓖麻不同 PIP5K 蛋白的氨基酸序列比对结果

Fig. 3 Amino acid sequence comparison of different PIP5K proteins in castor bean

表 6 蓖麻 PIP5K 结构功能域及模体搜索结果

Table 6 Structure function domain and model search results of castor PIP5K

基因名称	氨基酸数目	功能域位置	模体数量	低复杂度数量
PIP5K1	734	399~731	8	1
PIP5K2	711	340~708	7	1
PIP5K4	767	403~764	7	1
PIP5K6	786	404~783	8	1
PIP5K8	801	406~797	8	2
PIP5K9	831	439~825	8	2
PIP5K11	395	9~374	0	0

PIP5K 基因家族各成员在不同花序轴部位中不同时期的相对表达量及蓖麻 PIP5K 基因家族各成员在同种花序中不同基因的差异表达量。

3.2.1 蓖麻 PIP5K 基因家族各成员在不同花序轴中不同时期的相对表达量 实验材料均为 Lm 型雌性系蓖麻 aLmAB2。以 PIP5K1 的荧光定量 PCR 结果为例如图 4 所示，在单雌植株中 PIP5K1 在 4 叶期表达量较高、5 叶期时表达量降低，主茎穗期的表达量骤减达到最低，在二

级分枝期表达量有个上升的过程，但幅度不大。在标雌植株中 PIP5K1 的表达量趋势与单雌植株有不同，从 4 叶期到 5 叶期相对表达量有一个大幅度的增长，到主茎穗期时有一个聚减的过程，到二级分枝期比主茎穗期略减一部分。在两性植株中 PIP5K1 的相对表达量变化与前 2 种植株不同，在 4 叶期时相对表达量较高，到 5 叶期的相对表达量为最高，再到主茎穗期有不同程度的减弱，再到二级分枝期相对表达量上升但没有 5 叶期高。从上可知 PIP5K1 在不同种植株的不同时期均有不同的表达量。在两性植株中的相对表达量与单雌和标雌植株的表达量差异较大，而一般两性植株及二级分枝期中才有开花及花粉的萌发。

以 PIP5K2 的荧光定量 PCR 的相对表达量为例如图 4 所示，标雌植株的 PIP5K2 在 5 叶期的相对表达量非常高。单雌和标雌的相对表达量变化趋势较为相近，而在两性植株中的表达量随时期变化呈现在 5 叶期升高后再次下降，而后提高但幅度不大的趋势。从图中的趋势可知不同 PIP5K 基因单雌的

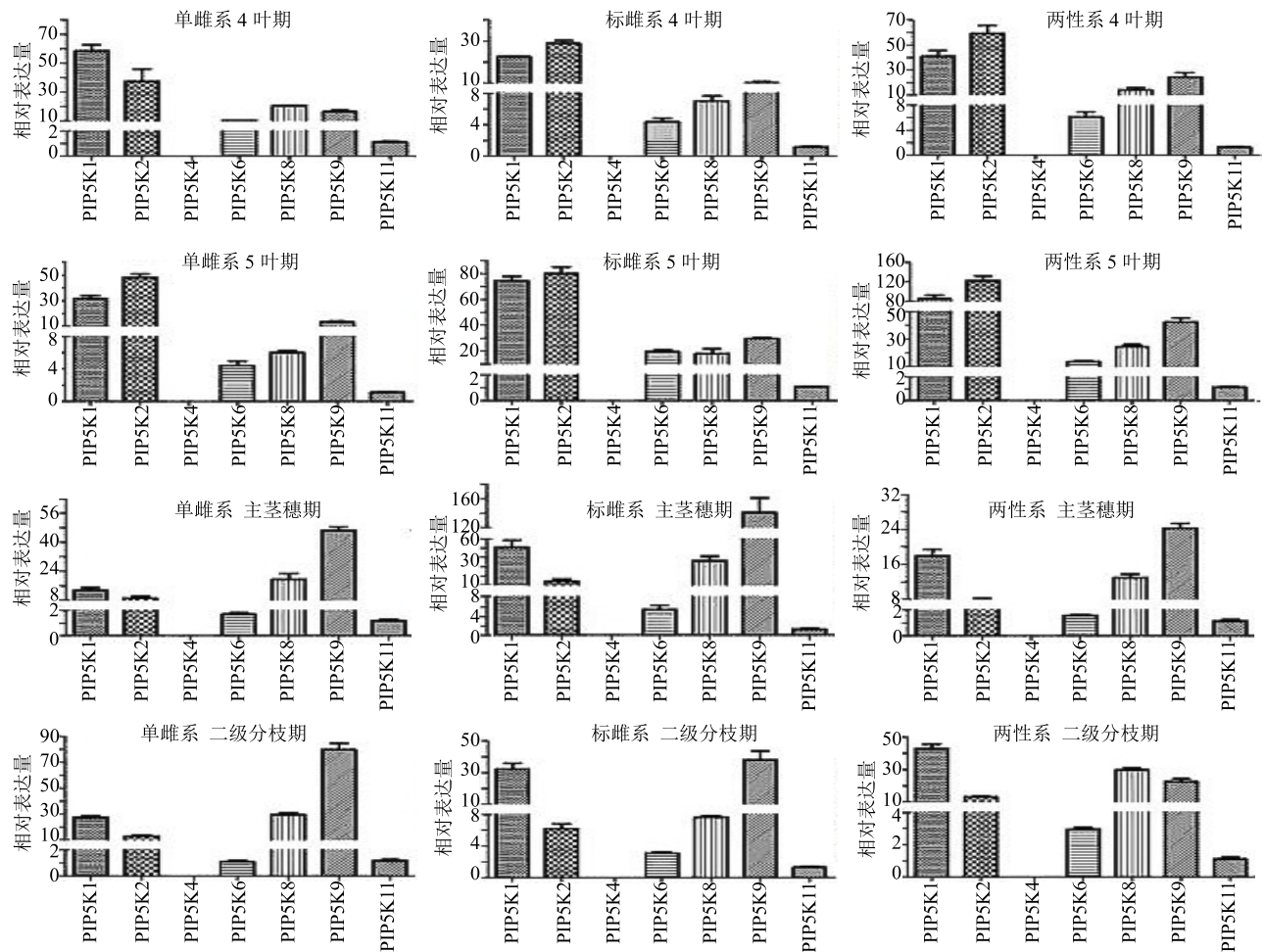


图4 PIP5K1~PIP5K11 不同种类植株中的差异表达量

Fig. 4 Difference expression of PIP5K1—PIP5K11 different types of plants

相对表达量中属4叶期和5叶期的表达量较高,而在主茎穗时期的表达量均有不同幅度的较少,在二级分枝期的表达量变化不尽相同。在标雌植株中 PIP5K 基因家族的表达量相对变化较为一致除 PIP5K9 的相对表达量是在主茎穗时期最高外,其余均是在5叶期时的相对表达量为最高。在两性植株中较为明显的特征是在4叶期时相对表达量均较高,到5叶期的时候相对表达量均有不同幅度的提高。到主茎穗时期时相对表达量为最低。从 PIP5K 基因家族在差异表达的相对表达量变化上来看,除 PIP5K4 并未检测到荧光,其余 PIP5Ks 均有一定差异表达,因此猜测其在花序轴性状有一定的调控作用。

3.2.2 蓖麻 PIP5K 基因家族各成员在同种花序不同基因的相对表达量 综合图4的荧光定量 PCR 结果来看,除 PIP5K4 的表达未能检测到荧光,因此 PIP5K4 可能与花序轴性状无太大关系,有待进一步探究。而 PIP5K1、PIP5K2、PIP5K8、

PIP5K9 的相对表达量较高。PIP5K6 及 PIP5K11 均有少量的表达。并且无论在单雌、标雌还是两性植株中,无论在4叶期、5叶期、主茎穗期及二级分支期,PIP5Ks 基因家族的相对表达量的变化趋势都较为相近。因此判断蓖麻 PIP5Ks 基因家族对蓖麻花序轴性状起到共同调控的作用。其调控机制有待进一步研究。

4 讨论

PIP5K 是生物体内的磷酸类激酶,本实验以蓖麻 PIP5K 基因家族 (PIP5Ks) 为研究对象,对蓖麻 PIP5Ks 的各成员进行了生物信息学分析,并对实验材料为 Lm 型雌性系蓖麻 aLmAB2 3 种品系的不同时期的蓖麻材料进行荧光定量分析。结果表明,蓖麻 PIP5Ks 共有7个成员,分别为 PIP5K1、PIP5K2、PIP5K4、PIP5K6、PIP5K8、PIP5K9、PIP5K11,蓖麻 PIP5Ks 对应的蛋白之间的氨基酸序列同源性达到 48.06%、蓖麻 PIP5Ks 所对应蛋白均为亲水性蛋

白,除 PIP5K9 和 PIP5K11 为不稳定蛋白质其余均为稳定蛋白质、PIP5Ks 对应蛋白均不存在跨膜结构域,均为非跨膜蛋白。亚细胞定位结果显示蛋白 PIP5K1、PIP5K4、PIP5K6、PIP5K9、PIP5K11 具有导肽的可能性较低,并且无对应的氨基酸切割位点,即定位在其他细胞器或者可能为胞浆蛋白;蛋白 PIP5K2 定位在叶绿体,叶绿体转运肽数值较高;蛋白 PIP5K8 定位在分泌通路。利用荧光定量 PCR 测定蓖麻 PIP5Ks 各成员相对表达量的变化。从 PIP5Ks 的相对表达量变化上来看,除 PIP5K4 并未检测到荧光,其余 PIP5Ks 均有一定的差异表达,PIP5Ks 的相对表达量的变化趋势都较为相近,PIP5K1、PIP5K2 的相对表达量较多,其次为 PIP5K8、PIP5K9 的相对表达量,PIP5K6 及 PIP5K11 只有少量的表达。

本实验对蓖麻 PIP5K 基因家族的生物信息学分析及荧光定量 PCR 及对应的蛋白进行了整理,并进行了生物信息学的预测和分析,以及对蓖麻 PIP5K 的荧光定量 PCR 数据统计,结果表明 PIP5Ks 在蓖麻中对花序轴性状可能有一定的影响,PIP5K 在花序轴上的差异含量与花序发育具有一定的规律性,PIP5K 参与开花,这似乎是压力诱导。对蓖麻 PIP5K 基因家族的生物信息学分析可为后期 PIP5K 基因家族及 PIP5K 蛋白氨基酸的序列、结构、功能域,蛋白质空间结构、性质及 PIP5K 在植物中的相对表达等方面提供一定的理论依据,但是 PIP5K 基因家族 6 个基因如何参与花序轴发育,相关调控机制尚不清楚,有待进一步验证。

参考文献

- [1] 赵永,朱国立,何智彪,等. 蓖麻标雌/单雌/两性系花序 MSAP 反应体系的建立 [J]. 华北农学报, 2016, 31(3): 114-120.
- [2] 梅钰. 拟南芥磷脂酰肌醇磷酸激酶 PIP5K2 在侧根发育、向重性及耐盐中的功能和作用机制研究 [D]. 上海: 中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所, 中国科学院上海生命科学研究院, 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 2010.
- [3] 孙冲,姚远,耿梦婷,等. 木薯磷脂酰肌醇磷酸 5-激酶 PIP5K9 基因的克隆及表达分析 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 2016.
- [4] Funakoshi Y, Hasegawa H, Kanaho Y. Activation mechanisms of PIP5K isozymes by the small GTPase ARF6 [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2010, 50(1): 72-80.
- [5] Boronenkov I V, Anderson R A. The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(7): 2881.
- [6] Halstead J R, van Rheenen J, Snel M H J, et al. A role for PtdIns (4,5) and PIP5K α in regulating stress-induced apoptosis [J]. *Current Biol*, 2006, 16(18): 1850-1856.
- [7] 马晖. 水稻磷脂酰肌醇信号传导途径中——磷酸磷脂酰肌醇激酶 (OsPIP5K1) 的分子遗传分析 [D]. 上海: 中国科学院上海生命科学研究院, 2003.
- [8] 胡敏. 蛋白质结构的空分布特征研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [9] 蔡健宇, 武晓云, 郭玉双, 等. 烟草基因组中 AGO 蛋白的生物信息学分析 [J]. 江西农业学报, 2017, 29(2): 1-8.
- [10] Bendtsen J D, Nielsen H, Von H G, et al. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0 [J]. *J Mol Biol*, 2004, 340(4): 783-795.
- [11] 邱建丁, 梁汝萍, 谭学才, 等. 膜蛋白跨膜区段的预测分析 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(5): 831-836.
- [12] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [13] 陈兴娟, 张熙东, 张璇, 等. 蛋白激酶 C 和磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸之间相互调节作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(11): 1497-1499.
- [14] Weernink P A, Meletiadis K, Hommeltenberg S, et al. Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 7840-7849.
- [15] Mikami K, Katagiri T, Iuchi S, et al. A gene encoding phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase is induced by water stress and abscisic acid in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J Cell Mol Biol*, 1998, 15(4): 563-568.
- [16] Ugalde J M, Rodriguez-Furlán C, Rycke R D, et al. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinases 1 and 2 are involved in the regulation of vacuole morphology during *Arabidopsis thaliana*, pollen development [J]. *Plant Sci Int J Exper Plant Biol*, 2016, 250: 10-19.
- [17] 茹家康, 袁琳. 基因序列的搜索与相似性比对 [J]. 河南教育学院学报: 自然科学版, 2016, 25(1): 25-31.
- [18] Wilkins M R, Al E. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Meth Mol Biol*, 1999, 112(112): 531-538.