

大豆 *MPBQ-MT* 基因的克隆与生物信息学分析

聂腾坤,赵琳,李海燕,李文滨

(东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:以大豆品种合丰 25 和 Bayfield 为材料,克隆大豆 2-甲基-6-植基-1,4-苯醌甲基转移酶(MPBQMTase)基因,获得 1 029 bp 的 *MPBQ-MT* 基因 cDNA 序列。通过序列比对发现 10 个大豆 *MPBQ-MT* 基因 cDNA 区内的潜在 SNP 位点。采用生物信息学方法分析 *MPBQ-MT* 基因编码的氨基酸序列和蛋白质结构。结果表明:*MPBQ-MT* 基因 CDS 区共编码 342 个氨基酸,其中缬氨酸(Val)含量最多,占该基因编码氨基酸总数的 8.8%;半胱氨酸(Cys)含量最少,占该基因编码氨基酸总数的 1.2%;MPBQ-MT 蛋白 N 端包含由 58 个氨基酸组成的叶绿体转运肽,为亲水性蛋白质。合丰 25 与 Bayfield 的 MPBQ-MT 蛋白质二级结构有所不同,2 个品种的 MPBQ-MT 蛋白质中 α -螺旋分别约占 25.44% 和 27.49%, β -转角分别约占 9.36% 和 9.06%,无规则卷曲分别约占 40.35% 和 38.60%。2 个品种的 MPBQ-MT 蛋白质中片层结构均约占 24.85%。两个品种的 MPBQ-MT 蛋白质均有 1 个 S-腺苷基甲硫氨酸结合位点。对 MPBQ-MT 蛋白三级结构进行预测,发现去掉转运肽后,MPBQ-MT 蛋白质三级结构主要由 11 个连续的 α -螺旋区域和 8 个连续的片层结构区域组成。结合 MPBQ-MT 蛋白三级结构对 *MPBQ-MT* 基因的生物學功能进一步分析,提出了较为合理的 MPBQ-MT 作用模型。由系统发生树可知 MPBQ-MT 蛋白在大豆与菜豆中的亲缘关系较近。

关键词:大豆;维生素 E;*MPBQ-MT* 基因;生物信息学分析
中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2016.01.0039

Cloning and Bioinformatics Analysis of *MPBQ-MT* Gene in Soybean

NIE Teng-kun,ZHAO Lin,LI Hai-yan,LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding Genetics of Chinese Agriculture Ministry,Northeast Agricultural University,Harbin 150030,China)

Abstract: Cloned the 2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone methyltransferase (MPBQMTase) of soybean and obtained the cDNA encoding MPBQMTase using Hefeng 25 and Bayfield as materials. The cDNA sequence analysis showed that the cDNA was 1 029 bp in length. Ten latent SNPs were found in CDS of *MPBQ-MT* gene in soybean by sequences blast. The amino acid sequence and protein structure of *MPBQ-MT* gene were analyzed by bioinformatics method. The result showed that the CDS region of *MPBQ-MT* gene encoded 342 amino acid residues with the most content of Valine which accounted for 8.8% of the total amino acids and the least content of Cysteine which accounted for 1.2% of the total amino acids. N-terminal of MPBQ-MT protein contains chloroplast transit peptide composed by 58 terminal amino acids and MPBQ-MT was hydrophilic protein. The secondary structure of MPBQ-MT protein was different in Hefeng 25 and Bayfield. About 25.44% and 27.49% of the protein sequence were alpha helixes respectively in the two varieties, about 9.36% and 9.06% of the protein sequence were beta turn, 40.35% and 38.60% of the protein sequence were random coil. 24.85% of the protein sequence were lamellar structure in both varieties. S-adenosyl methionine binding sites exist in MPBQ-MT protein of both varieties. The three stage structure analysis showed 11 continuous alpha helixes and 8 continuous film layer structure exist in MPBQ-MT protein. The model of *MPBQ-MT* was obtained based on the three stage structure of MPBQ-MT protein and biological function analysis of *MPBQ-MT*. Phylogenetic tree indicated the relationship of MPBQ-MT protein was close in soybean and bean.

Keywords: Soybean;Vitamin E;*MPBQ-MT* gene;Bioinformatics analysis

维生素 E 是一种脂溶性的维生素,又称生育酚、生殖维生素等,是一类广泛存在于高等动植物体内的天然强抗氧化剂。维生素 E 是一类同系物的总称,自然界中有 8 种类型,分别为 α 、 β 、 γ 和 δ -生育酚(toeopherol)及 α 、 β 、 γ 和 δ -生育三烯酚(tocotrienol)^[1],它们的区别在于苯环上甲基的位置和

数目的不同^[2],其中 α -生育酚是活性最高的形式^[3]。因此 α -生育酚更容易被稳定吸收并保留在体细胞中,所以它具有最高的营养价值。 α -生育酚在绿色叶片组织中含量最为丰富,在大多数油料作物的种子中的含量却较低。

高等植物维生素 E 的生物合成过程主要发生

收稿日期:2015-06-16
基金项目:中国博士后项目(20110491025);东北农业大学博士启动基金(2012RCB32)。
第一作者简介:聂腾坤(1990-),男,硕士,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:Chinantk@126.com。
通讯作者:李海燕(1978-),女,博士,副研究员,主要从事大豆遗传育种及生物技术研究。E-mail: lhy2112002@163.com;
李文滨(1958-),男,教授,博导,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

在叶绿体中^[4]。概括说来,维生素 E 的生物合成过程至少有 5 种酶直接参与,它们分别为:4-羟苯丙酮二加氧酶(HPPD)、尿黑酸叶绿醇转移酶(HPT)、2-甲基-6-植基-1,4-苯醌甲基转移酶(MPBQ-MT)、生育酚环化酶(TC)和 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)^[5]。其中 MPBQ-MT 是催化 α -生育酚和 α -生育三烯酚合成前体 2,3-二甲基-6-植基-1,4-苯醌(DMPBQ)和 2,3-二甲基-6-牻牛儿基牻牛儿基苯醌(DMGBQ)生成的关键酶。MPBQ-MT 催化 2-甲基-6-植基-1,4-苯醌(MPBQ)生成 DMPBQ,同时催化 2-甲基-6-牻牛儿基牻牛儿基苯醌(MGBQ)生成 DMGBQ。拟南芥中编码 MPBQ-MT 的基因已被克隆,进一步研究发现,在拟南芥和集胞藻 6803 (*Synechocystis* sp. PCC 6803)中 MPBQ-MT 虽然功能相同且底物特异性相近,但二者的氨基酸序列同源性却较低^[6]。天然 α -生育酚来源于绿色植物,利用改良的油料作物可以提高维生素 E 中 α -生育酚的含量,具有非常大的开发价值^[7]。虽然调控 MPBQ-MT 基因无法提高作物中维生素 E 总量,但可以通过提高 α -生育酚合成前体含量间接调高作物总维生素 E 中 α -生育酚的含量,从而提高作物总维生素 E 中可被人类利用的有效成分含量。大豆是典型的油料作物,维生素 E 是大豆中重要的营养成份。由于大豆中维生素 E 具有多种营养价值,且含量丰富、品质优良,所以大豆维生素 E 已成为大豆研究中的新的热点,选育高维生素 E 大豆新品种已成为大豆育种者的新目标^[8]。

本研究以大豆品种合丰 25 和 Bayfield 为材料,分别克隆 2 个大豆品种中的控制维生素 E 合成的关键基因 MPBQ-MT。通过比对基因序列,发掘 MPBQ-MT 基因 CDS 区中潜在的 SNP 位点,为大豆高维生素 E 品种的选育奠定基础。同时通过生物信息学和分子生物学等技术对基因功能进行分析,预测大豆中 MPBQ-MT 的蛋白质空间结构,以期进一步研究该基因在大豆维生素 E 合成中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种合丰 25 和加拿大品种 Bayfield 由东北农业大学大豆研究所提供;Trizol 试剂、cDNA 第一链合成试剂盒(TIANscript RT Kit)、pGM-T 克隆试剂盒均购自天根(TIANGEN)公司;琼脂糖凝胶回

收试剂盒(Gel Extraction Kit)购自 OMEGA 公司;Easy Taq DNA 聚合酶及其它生化试剂均为国产分析纯;PCR 引物合成及测序工作均由上海 Sangon 生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取、检测及反转录 取大豆 V1 期三出复叶叶片,采用 Trizol 试剂提取大豆叶片总 RNA。应用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性及纯度。采用 cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,实验步骤参照试剂盒使用说明书。

1.2.2 PCR 扩增目的基因 根据 NCBI 和 Phytozome V 10.1 数据库中大豆 MPBQ-MT 基因(Glyma.02G143700)编码区序列设计引物。MPBQ-MT-F: 5'-ATGGGTTTCAGTAATGCTCACTGG-3'; MPBQ-MT-R: 5'-TTAGATTGGCTGACCTTTGGGA-3'。以大豆叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为:cDNA 模板 1 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L, 用 ddH₂O 补足至 25 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55.4 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 扩增 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 置于 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 目的基因的连接、转化及测序 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,应用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的基因片段,回收的目的片段与 pGM-T 载体连接,连接产物转化 TOP10 大肠杆菌感受态细胞。选取阳性菌株,送上海 Sangon 生物工程有限公司测序。

1.3 蛋白质结构与功能分析预测

1.3.1 MPBQ-MT 蛋白质理化性质及一级结构分析

使用 DNAMAN 软件得到氨基酸序列,并对氨基酸序列进行同源比对;应用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)在线工具分析氨基酸序列理化性质^[9];利用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)工具中 Hphob. / Kyte & Doolittle 算法进行氨基酸序列亲水性与疏水性分析;应用 TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)及 MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?memsatsvm=1>)在线工具预测跨膜结构域;应用 NetNES 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>)及 ChloroP 1.1^[10] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>)进行信号肽预测。

1.3.2 MPBQ-MT 蛋白二级结构及结构域分析预测
使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 预测蛋白质二级结构;应用 CDD 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 分析蛋白质功能结构域。

1.3.3 MPBQ-MT 蛋白三级结构预测及系统发生树构建
使用 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 及 BioSerf v2.0 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/?bioserf=1>) 在线工具,以合丰 25 的 MPBQ-MT 蛋白氨基酸序列为模板,预测 MPBQ-MT 基因编码蛋白质三级结构;应用 Swiss-PdbViewer 软件对预测结果进行分析检验;利用 3DLigandSite (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dligandsite/>) 工具进行配体结合位点预测^[11]。

根据 MPBQ-MT 蛋白氨基酸序列,通过 NCBI 和 Phytozome V 10.1 数据库检索其它物种同源蛋白质,共计得到 22 个物种中的可用氨基酸序列。应用 MEGA 5.2 软件构建系统发生树^[12],即应用 ClustalW 分析同源蛋白序列,采用最小进化法 (minimum evolution method) 构建无根树 (unrooted tree),并用 Bootstrap (参数设为 1 000) 对系统发生树进行检验。

2 结果与分析

2.1 MPBQ-MT 基因的克隆

用上述引物通过 PCR 扩增,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,得到长度为 1 029 bp 的大豆 MPBQ-MT 基因 cDNA 全长序列,结果如图 1 所示。将目的基因回收转化后,挑取正确克隆进行测序。测序结果与 NCBI 数据库中的目的序列比对,结果显示合丰 25 和 Bayfield 的 MPBQ-MT 基因与目的序列相似度均为 98%。

表 1 合丰 25 与 Bayfield 的 MPBQ-MT 蛋白理化性质差异

Table 1 Physicochemical properties difference of MPBQ-MT in Hefeng 25 and Bayfield

品种 Variety	氨基酸数目 No. of aa	相对分子质量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical pI	总原子数 Total number of atoms	不稳定系数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	GRAVY 值 GRAVY
合丰 25 Hefeng 25	342	38424.4	9.07	5432	38.06	83.48	-0.200
Bayfield	342	38350.3	9.17	5427	38.04	84.62	-0.205

2.3 MPBQ-MT 基因编码蛋白质一级结构分析
两个品种的 MPBQ-MT 基因编码蛋白质一级结构基本相同。结合 TMpred 与 EMSAT- SVM 预测结果,发现 MPBQ-MT 基因编码蛋白在 307 ~ 332 位氨基酸之间存在跨膜区域,跨膜方向为由外向内,即 N 端跨膜结构,肽链 C 端留在细胞质基质中 (图 2 A)。利用 ProtScale 在线软件分析得出,该蛋白在 300 ~

2.2 MPBQ-MT 基因编码氨基酸序列理化性质分析

通过比对 2 个品种 MPBQ-MT 基因 CDS 区碱基序列和氨基酸序列发现 10 个碱基差异位点以及 3 个氨基酸差异位点。进一步分析表明合丰 25 的 MPBQ-MT 基因 CDS 区共编码 342 个氨基酸,氨基酸相对分子量为 38 424.4 kD,理论等电点为 9.07,总原子数为 5 432,分子式为 C₁₇₆₀H₂₇₁₆N₄₆₄O₄₈₁S₁₁。MPBQ-MT 基因编码的肽链中含有 20 种氨基酸,其中缬氨酸含量最多,为 30 个,占该基因编码氨基酸总数的 8.8%;半胱氨酸含量最少,为 4 个,占该基因编码氨基酸总数的 1.2%。该蛋白质不稳定系数为 38.06,说明此蛋白质为稳定蛋白;脂溶指数为 83.48;GRAVY 值为 -0.200,说明该蛋白为亲水性蛋白质。蛋白质理化性质分析表明 2 个品种的 MPBQ-MT 蛋白理化性质差异并不明显 (表 1)。

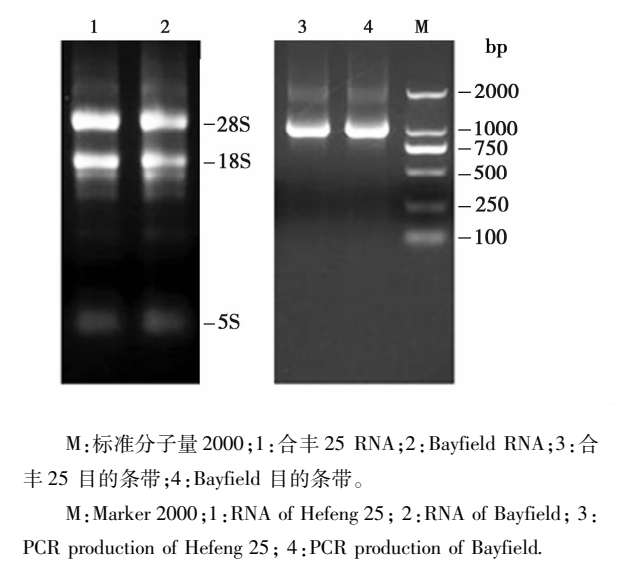
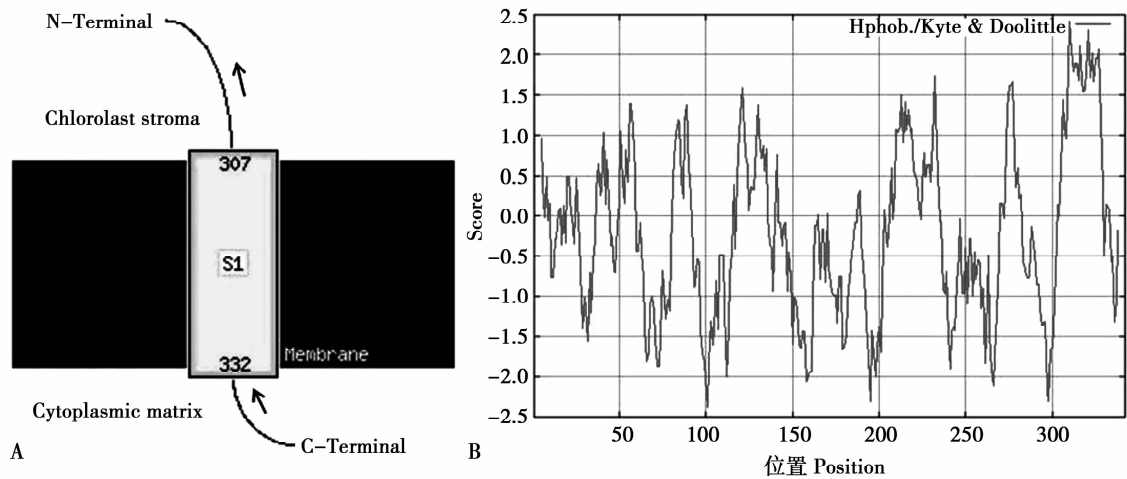


图 1 RNA 和 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of RNA and production of PCR

340 位氨基酸之间存在明显的疏水区域 (图 2 B),这与预测的蛋白质跨膜区域基本相同。对蛋白质信号肽预测发现 MPBQ-MT 基因编码蛋白 N 端含有信号肽序列,进一步应用 ChloroP 1.1 工具分析得出该信号肽为植物中叶绿体转运肽,并且该信号肽从第 1 位氨基酸开始,切割位点可能位于第 40 ~ 60 位氨基酸之间,这与预测的蛋白质跨膜方向基本符合。



A:MPBQ-MT 蛋白跨膜区域预测结果;B:肽链中疏水性与亲水性氨基酸位置分布图。

A:Prediction of MPBQ-MT transmembrane protein topology;B:Position map of hydrophobic and hydrophilic amino acid in peptide chain.

图 2 MPBQ-MT 蛋白跨膜区域和肽链中疏水性与亲水性氨基酸位置比较

Fig. 2 Comparison of MPBQ-MT transmembrane protein topology and position map of hydrophobic and hydrophilic amino acid in peptide chain

2.4 MPBQ-MT 蛋白质二级结构及结构域的分析比较

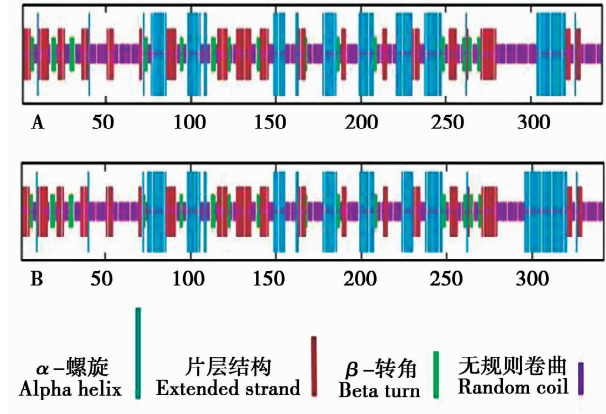
使用 SOPMA 与 PSIPRED V 3.3 工具分析蛋白质二级结构,结果表明合丰 25 的 MPBQ-MT 蛋白质二结构中 α -螺旋所占比例约为 25.44%;片层结构约占 24.85%; β -转角约占 9.36%;无规则卷曲约占 40.35%。由于 Bayfield 的 MPBQ-MT 蛋白氨基酸序列与合丰 25 相比有 3 个氨基酸差异位点,导致 Bayfield 的 MPBQ-MT 蛋白二级结构与合丰 25 有所不同。Bayfield 的 MPBQ-MT 蛋白质二结构中 α -螺旋所占比例约 27.49%;片层结构约占 24.85%; β -转角约占 9.06%;无规则卷曲约占 38.60%(图 3)。与合丰 25 的 MPBQ-MT 蛋白二级结构相比,Bayfield 蛋白二级结构中 α -螺旋相对较多; β -转角、无规则卷曲相对较少;而片层结构所占比例相同。

运用 CDD 工具分析 2 个品种 MPBQ-MT 基因编码蛋白的保守结构域(图 4),2 个品种 MPBQ-MT 基因编码蛋白的保守结构域相同,均含有 S-腺苷基甲硫氨酸结合位点(S-adenosylmethionine binding site),属于依赖 S-腺苷基甲硫氨酸参与反应的甲基转移酶,并且均属于依赖 S-腺苷基甲硫氨酸参与反应的甲基转移酶超家族(AdoMet-MTase superfamily)中的第一类型,此类型是该家族中蛋白质数量最多,蛋白质多样性最丰富的类型^[13-14]。

2.5 MPBQ-MT 蛋白质三级结构预测

结合 ChloroP 1.1 工具信号肽分析结果、DNA-MAN 同源比对分析结果及 BioSerf V 2.0 工具蛋白

质三级结构预测结果,进一步确定 MPBQ-MT 基因指导生成多肽链的转运肽为:从 N 端第 1 位氨基酸开始,切割位点为第 58 位氨基酸。由于叶绿体转运肽多不参加最终的蛋白质三级结构建成,因此以合丰 25 氨基酸序列为模板,采用穿线法,应用 Phyre2 工具,去掉 MPBQ-MT 的信号肽区段,从第 59 位氨基酸至第 342 位氨基酸预测 MPBQ-MT 蛋白质三级结构,应用 3DLigandStie 工具预测配体结合位点,其中 94% 的氨基酸残基空间位置被预测(被预测氨基酸残基所占比例大于 90% 认为结果可信)。同时采用 Swiss-Pdb Viewer 软件计算拉氏图,对蛋白质三级结构预测结果进行分析检验(图 5A)。



A:合丰 25 品种 MPBQ-MT 蛋白质二级结构;B:Bayfield 品种 MPBQ-MT 蛋白质二级结构。

A:Secondary structure of MPBQ-MT in Hefeng 25;B:Secondary structure of MPBQ-MT in Bayfield.

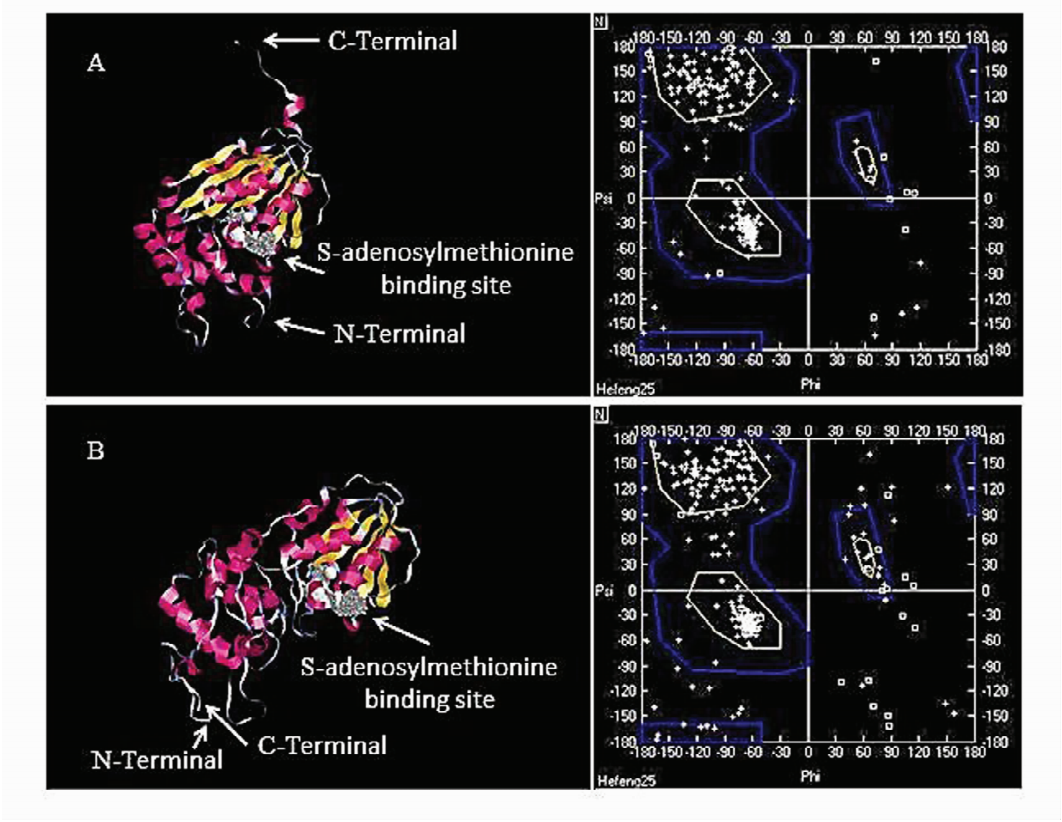
图 3 MPBQ-MT 蛋白质二级结构

Fig. 3 Secondary structure of MPBQ-MT protein

又因在某些情况下,转运肽可能不被切除,并且参与到蛋白质三级结构中^[15]。所以,又以合丰 25 的 MPBQ-MT 氨基酸全长序列为模板,同上方法进行预测,其中 91% 的氨基酸残基空间位置被预测(图 5B)。



图 4 MPBQ-MT 蛋白质结构域分析
Fig. 4 Analysis of structure domain of MPBQ-MT protein



A:去除转运肽的合丰 25 的 MPBQ-MT 蛋白三级结构及对应拉氏图;B:带有转运肽的合丰 25 的 MPBQ-MT 蛋白三级结构及对应拉氏图。

A: Protein tertiary structure and the corresponding ramachandran plot of MPBQ-MT protein removed of the transit peptide in Hefeng 25 tertiary structure;B: Protein tertiary structure and the corresponding ramachandran plot of MPBQ-MT protein with the transit peptide in Hefeng 25.

图 5 合丰 25 的 MPBQ-MT 蛋白三级结构

Fig. 5 Hefeng 25 MPBQ-MT protein tertiary structure

由图 5 可知,去掉转运肽后,MPBQ-MT 蛋白质三级结构主要由 11 个连续的 α -螺旋区域与 8 个连续的片层结构区域组成,同时含有 1 个配体结合位点。结合蛋白质结构域分析结果,认为该位点可能为 S-腺苷-L-甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine)与 MPBQ-MT 蛋白的结合位点。

2.6 系统发生树的构建

蛋白质同源性分析表明在双子叶植物中 MPBQ-MT 蛋白保守性较高,氨基酸同源性为 75% 以上,但与藻类植物相比,双子叶植物的 MPBQ-MT 蛋

白的氨基酸序列差异较大,同源性仅为 60% 左右。应用 MEGA 5.2 软件构建系统发生树(图 6),马铃薯(*Solanum tuberosum*)、野生番茄(*Solanum pennellii*)和茸毛烟草(*Nicotiana Tomentosiformis*)的 MPBQ-MT 蛋白亲缘关系较近;大豆品种合丰 25、Bayfield 与野生大豆(*Glycine soja*)、菜豆(*Phaseolus vulgaris*)亲缘关系较近;甘蓝型油菜(*Brassica napus*)与哥伦比亚型拟南芥(*Arabidopsis thaliana columbia*)亲缘关系较近;二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)与水稻(*Oryza sativa*)为同一分支;莱茵衣藻(*Chlamydo-*

monas reinhardtii) 与胶球藻 (*Coccomyxa subellipsoidea*) 为同一分支;柿 (*Diospyros kaki*) 与系统发生树中其它双子叶植物均不在同一分支,柿与系统发

生树中其它双子叶植物的 MPBQ-MT 蛋白同源性相对较低。

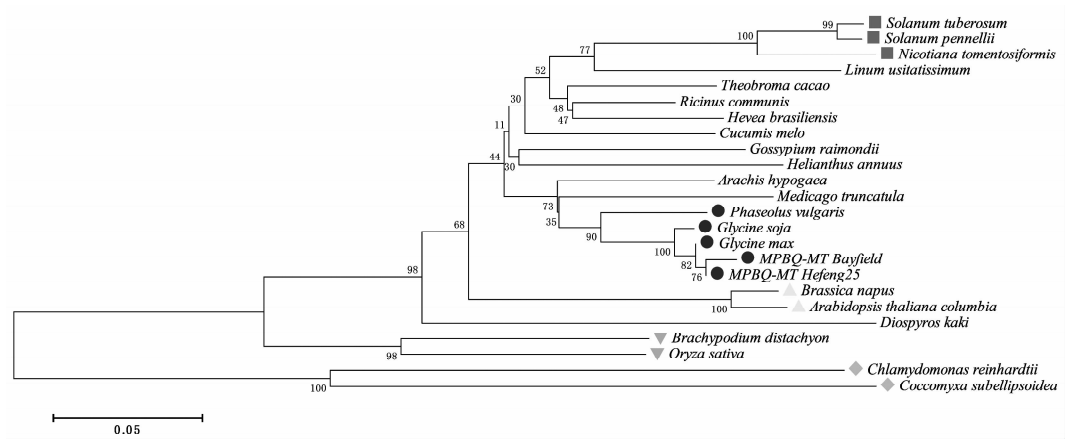


图 6 MPBQ-MT 蛋白质系统发生树
Fig. 6 Phylogenetic tree of MPBQ-MT protein

3 结论与讨论

3.1 MPBQ-MT 基因的克隆与序列分析

大豆 *MPBQ-MT* 基因 cDNA 序列全长1 029 bp, 共编码 342 个氨基酸。通过比对合丰 25 与 Bayfield 的 *MPBQ-MT* 基因碱基序列与氨基酸序列共发现该基因 cDNA 区中有 10 个潜在 SNP 位点。其中 7 个为潜在同义 SNP 位点,分别为第 234 位、408 位、456 位、459 位、477 位、690 位和 957 位碱基;3 个为潜在非同义 SNP 位点,分别为第 235 位碱基变化导致第 79 个氨基酸变化,第 670 位碱基变化导致第 224 个氨基酸变化,第 904 位碱基变化导致第 302 个氨基酸变化。在 10 个潜在 SNP 位点中,有 6 个为 T 和 C 之间发生转换 (transition);1 个为 A 和 G 之间发生转换;其余 3 个为颠换 (transversion);没有单碱基的缺失或插入。前人研究结果指出:从理论上分析,若单个碱基突变是随机的,则 SNP 位点中颠换所占比例应为转换的 2 倍,而实际上 SNP 位点的产生多由单个碱基的转换所引起^[16],并且 SNP 多发生在 T 和 C 之间^[17]。本研究结果与此相符。虽然本试验通过 3 次重复测序得出以上结论,但由于仅比较了 2 个大豆品种,样本量较小,因此还应对上述发现的潜在 SNP 位点通过高分辨率溶解曲线法 (high resolution melting, HRM) 等技术进一步验证。

3.2 MPBQ-MT 蛋白酶的作用模型及功能分析

蛋白质功能结构域分析说明:MPBQ-MT 蛋白质属于依赖 S-腺苷甲硫氨酸参与反应的甲基转移酶超家族中的第一类型。这也从侧面说明了 MPBQ-

MT 蛋白质在拟南芥和集胞藻 6803 中的氨基酸保守性低于其它 4 种合成维生素 E 关键酶^[18]的原因。叶绿体含有 3 种膜 (外膜、内膜和类囊体膜) 和 3 个多水区域 (内外被膜之间、间质和类囊体腔),蛋白质前体穿过外膜、内膜后在间质中被蛋白酶 (protease) 加工,切去转运肽 (或转运肽的一部分),成熟多肽进一步修饰 (如加入金属离子等) 后到达指定区域组装成复合物,再行使其功能^[19]。结合 MPBQ-MT 蛋白 N 端信号肽及蛋白质三级结构的预测结果可得出如下模型:MPBQ-MT 为核基因编码的叶绿体蛋白质,MPBQ-MT 基因在核中转录成 mRNA 后,由细胞质基质中的核糖体翻译成肽链,肽链 N 端包含 58 个氨基酸左右的叶绿体转运肽,在其牵引下 MPBQ-MT 蛋白前体 (即含有功能结构域部分的肽链) 穿过叶绿体外膜、内膜。由蛋白质跨膜区域预测可得 MPBQ-MT 蛋白位于质体膜上,因此叶绿体转运肽在牵引 MPBQ-MT 蛋白前体大部分穿过内膜后,在叶绿体基质中被切去转运肽^[20],折叠成具有功能的蛋白质三级结构,并最终形成成熟 MPBQ-MT 蛋白。综合 MPBQ-MT 蛋白质跨膜方向可知,N 端 1 ~ 58 位氨基酸转运肽被切去,59 ~ 306 位氨基酸 (即功能结构域所在部分) 在叶绿体基质内;307 ~ 332 位氨基酸在叶绿体内膜中,333 ~ 342 位氨基酸 (即 C 端) 暴露在叶绿体内外膜之间。

结合蛋白质功能结构域分析及蛋白质三级结构的预测结果可得:MPBQ-MT 蛋白酶内嵌在叶绿体内膜上,在叶绿体基质中行使功能,催化底物发生甲基化反应。MPBQ-MT 蛋白酶以 S-腺苷-L-甲

硫氨酸为甲基供体,催化 MPBQ 生成 DMPBQ,同时催化 MGGBQ 生成 DMGGBQ,其中 MPBQ 和 MGG-BQ 为甲基受体。S - 腺苷 - L - 甲硫氨酸在提供甲基后生成 S - 腺苷 - L - 高半胱氨酸(S-adenosyl-L-homocysteine)^[21]。

本研究通过序列比对等方法发现 *MPBQ-MT* 基因 cDNA 区内的 10 个潜在 SNP 位点,提出了较为合理的 MPBQ-MT 作用模型,同时对 *MPBQ-MT* 的生物学功能进行进一步分析,并构建 *MPBQ-MT* 基因系统发生树。由于本试验是以生物信息学方法为主进行分析预测,因此要切实明确大豆 MPBQ-MT 蛋白酶三级结构及其作用原理,还需通过试验进一步验证。

参考文献

[1] Sen C K, Khanna S, Roy S. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols [J]. Life Sciences, 2006, 78(18):2088-2098.

[2] Fryer M J. The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E(α-tocopherol) [J]. Plant, Cell & Environment, 1992, 15(4): 381-392.

[3] Traber M G, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2007, 43(1): 4-15.

[4] Vidi P A, Kanwischer M, Baginsky S, et al. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(16): 11225-11234.

[5] Della P D, Last R L. Progress in the dissection and manipulation of plant vitamin E biosynthesis [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 126(3): 356-368.

[6] Cheng Z, Sattler S, Maeda H, et al. Highly divergent methyltransferases catalyze a conserved reaction in tocopherol and plastoquinone synthesis in cyanobacteria and photosynthetic eukaryotes [J]. The Plant Cell, 2003, 15(10): 2343-2356.

[7] 李海燕. 大豆维生素 E 含量的遗传分析及 QTL 定位 [D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2010:1-10. (Li H Y. Genetic and QTL analysis of the content of vitamin E in soybean [D]. Northeast Forestry University, 2010:1-10.)

[8] Li H, Liu H, Han Y, et al. Identification of QTL underlying vitamin E contents in soybean seed among multiple environments [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(7): 1405-1413.

[9] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification

and analysis tools on the ExPASy server [M]. Germany:Humana Press, 2005: 571-607.

[10] Emanuelsson O, Nielsen H, Heijne G V. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites [J]. Protein Science, 1999, 8(5): 978-984.

[11] Wass M N, Kelley L A, Sternberg M J E. 3DLigandSite: Predicting ligand-binding sites using similar structures [J]. Nucleic Acids Research, 2010: w469-w473.

[12] Hall B G. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(5): 1229-1235.

[13] Chen Z, Young T E, Ling J, et al. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(6): 3525-3530.

[14] Kozbial P Z, Mushegian A R. Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins [J]. BMC Structural Biology, 2005, 5(1): 19.

[15] 朱玉贤, 李毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学[M]. 4 版. 北京:高等教育出版社, 2013:150-159. (Zhu Y X, Li Y, Zheng X F, et al. Modern molecular biology[M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2013:150-159.)

[16] Vignal A, Milan D, SanCristobal M, et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics [J]. Genetics Selection Evolution, 2002, 34(3): 275-306.

[17] 唐立群, 肖层林, 王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 12:154-158. (Tang L Q, Xiao C L, Wang W P. Research and application progress of SNP markers [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 12:154-158.)

[18] 李殷. 植物维生素 E 生物合成途径及调控 [D]. 上海:复旦大学, 2009:2-24. (Li Y. Engineering and regulating plant tocopherol biosynthetic pathway [D]. Shanghai:Fudan University, 2009:2-24.)

[19] 吴光耀. 核编码叶绿体蛋白中的转运肽 [J]. 植物生理学通讯, 1991(3):166-172. (Wu G Y. Transit peptides for nuclear encoded proteins import into chloroplasts [J]. Plant Physiology Communications, 1991(3):166-172.)

[20] Richter S, Lamppa G K. Structural properties of the chloroplast stromal processing peptidase required for its function in transit peptide removal [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(41): 39497-39502.

[21] Mato J M, Lu S C. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury [J]. Hepatology, 2007, 45(5): 1306-1312.