

大豆病程相关蛋白 PR-5 及其同源蛋白 TPLs 的生物信息学分析

魏 崧^{1,2}, 张 丽¹, 王伟威¹, 于志远¹, 喻德跃², 刘丽君¹

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 南京农业大学 农学院 江苏 南京 210095)

摘要: 大豆病程相关蛋白 PR-5 又称为类甜蛋白 TLPs, 广泛分布于高等植物体内, 各种生物和非生物胁迫诱导(病原微生物、渗透胁迫、机械损伤和植物激素等)均可诱导其表达。本研究以 PR-5 编码基因 *Glyma01g42670.1* 为目的基因, 对该基因及其同源蛋白的结构和功能进行了分析; 通过生物信息学的方法, 共筛选获得 42 条大豆 TLPs 蛋白质序列, 并用 Mega 4.1 软件构建其系统进化树; 同时对 SoyBase 中的大豆 TLPs 相关的表达数据进行分析。结果表明: 大豆病程相关蛋白 PR-5 的编码基因 *Glyma01g42670.1* 编码 240 个氨基酸的多肽链, pI 6.26, 是一种酸性蛋白, 属于疏水蛋白, 该蛋白质具有典型的 TLP 家族的保守结构域, 具有指导 PR-5 蛋白的跨膜转移(定位)的 N 端信号肽序列, PR-5 蛋白不含有跨膜螺旋结构, 主要存在于质外体中, 属于分泌蛋白, 推测该蛋白具有内切葡聚糖酶的催化活性。进化分析表明: 该编码基因与拟南芥的 *NP_192902.1* 基因属于直系同源基因, 它们是具有相同功能和共同起源的基因。组织表达特异性分析表明该基因主要在根部和花中表达。

关键词: 大豆病程相关蛋白; 类甜蛋白; 系统进化分析; 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.1000-9841.2016.03.0380

Bioinformatics Analysis on Soybean Pathogenesis-related Protein(PR-5) and Its Homology Proteins TPLs

WEI Lai^{1,2}, ZHANG Li¹, WANG Wei-wei¹, YU Zhi-yuan¹, YU De-yue², LIU Li-jun¹

(1. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Agronomy College of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Protein PR-5 of soybean is one of the PRs, known as TLPs, which exist in higher plants and can be induced to express by biotic and abiotic stress (including pathogenic microorganisms, osmotic stress, mechanical damage and phytohormone etc.). In present study, the structure and function of gene *Glyma01g42670.1* and its homologous protein were analyzed through bioinformatics, meanwhile 42 soybean TLPs protein sequences were collected to build a phylogenetic tree by software Mega 4.1, and all the expression data of TLPs from website SoyBase were analyzed. The results showed: Gene *Glyma01g42670.1* coded peptide with 240 amino acids, and the protein was acidic and hydrophobic with pI 6.26, which had typical domain as TLP family. It had N-terminal signal peptide leading protein membrane transportation, but without transmembrane helix structure, and mainly existed in apoplast. It belonged to secreted proteins and inferred to have endoglucanase catalytic activity. From the results of evaluation analysis, gene *Glyma01g42670.1* was the orthologous gene of gene *NP_192902.1* from *Arabidopsis*, which had the same function and the same origin. From the results of tissue differential analysis, this gene mainly expressed in roots and flowers. All the research helps to clarify the function and molecular mechanism of how TLPs gene family did during the plant development.

Keywords: Soybean pathogenesis-related proteins; TLPs; Evaluation analysis; Bioinformatics

PRs (pathogenesis-related proteins) 是植物在病原物入侵等条件下, 诱导表达的逆境蛋白。van Loon 等^[1]根据 PRs 的氨基酸序列、结构及作用方式将其分为 17 个家族, 其中 PR-5 是第五家族蛋白。由于 PR-5 蛋白与甜类蛋白在结构上高度相似, 因此 PR-5 蛋白又被称为类甜蛋白 TLPs (thaumatin-like proteins)^[1-3]。PR-5 蛋白广泛分布于高等植物体

内, 各种生物和非生物胁迫(病原微生物、渗透胁迫、机械损伤和植物激素等)均可诱导其表达; 然而某些 TLPs 基因只在特定的组织或发育时期表达, 可能与其参与植物体内特定的生理过程有关^[4]。此外研究发现类甜蛋白包括一个参与交叉反应过程的泛过敏原家族^[5-6]。目前, 根据现有的植物基因组和 EST 数据库, 拟南芥和水稻的 TLPs 成员分别

收稿日期: 2015-07-13

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-04-PS05); 哈尔滨市应用技术与开发项目(2013RFQYJ016); 黑龙江省农业科技创新工程(2014ZD011)。

第一作者简介: 魏崧(1985-), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事大豆分子育种研究。E-mail: adalwei@126.com。

通讯作者: 刘丽君(1958-), 女, 研究员, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: nkysbd@126.com。

为 28 和 31 个^[4,7]。体外抗真菌试验表明 TLPs 具有明显抑制病原菌生长的能力; TLPs 可明显抑制黄萎病菌、尖孢镰刀菌、丝核菌、番茄灰霉病菌、苹果腐烂病菌、黑曲霉、烟曲霉和绿色木霉的生长^[8-10]。PR-5 蛋白中一般含有由 16 个保守的半胱氨酸残基组成的 8 个二硫键, 它们分布于 PR-5 蛋白典型的 TLPs 三级结构域中, 从而显著提高 PR-5 在极端 PH 和热激条件下的稳定性^[2,11]。PR-5 蛋白的最重要的结构特征为位于结构域 I 和结构域 II 间的酸性凹槽, 它包含具有内切葡聚糖酶催化活性的氨基酸对。酸性凹槽与类甜蛋白的抗真菌活性和葡聚糖酶活性密切相关^[12-14]。 β -1,3 葡聚糖是真菌细胞壁的共同组成成分, 因而部分 TLPs 具有 β -1,3 葡聚糖酶活性即具有了抗真菌活性的能力^[2,15]。此外最新的研究发现 TLPs 抗真菌活性的缺失不仅与酸性凹槽有关, 而且与缺失的结构域 III 和结构域 I 引起的分子表面构架的改变存在一定的联系^[9]。

本研究利用生物信息学的方法对本实验室已克隆得到的大豆 PR-5 编码基因 *Glyma01g42670.1* 编码的蛋白序列及其同源蛋白进行分析, 总结其序列特征、分子进化和组织特异性表达等特性, 旨在为该基因后续的功能研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品系 HD-2 由本课题组培育; pGEM-T 载体购自 Promega 公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、DNA Marker(D2000) 和 RNA 提取试剂盒(RNAPrep Pure Plant Kit ,DP441) 购自 TIANGEN 公司; cDNA 反转录试剂盒(High-Capacity cDNA Reverse Transcription) 购自 ABI 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 测序工作由 Invitrogen 公司完成。

1.2 方法

1.2.1 *Glyma01g42670.1* 基因的克隆 根据 SoyBase 网站中已经提交的大豆 PR-5 编码基因 *Glyma01g42670.1* 的 cDNA 序列设计全长克隆引物(上游引物 5'-ATGCTTTACTTGGCACTGTGCTCTC-3'; 下游引物: 5'-TTACTGCTGGCGGTACTAGCAGGC-3')。以本实验室的大豆品系 HD-2 幼苗期的叶片组织总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。对 PCR 产物进行凝胶回收纯化, 将获得的纯化产物克隆到 pGEM-T 载体, 转化后挑取阳性克隆进行测序分析。

1.2.2 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白的理化特性

分析 利用在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)、kinasephos (<http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/>)、SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分别对 *Glyma01g42670.1* 基因编码蛋白 PR-5 (*Glyma01g42670.1*) 的分子量、稳定性、磷酸化位点、信号肽及跨膜区域等理化特性进行预测分析。

1.2.3 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白的保守结构域分析 利用 NCBI 数据库在线分析软件 CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 及 SMART 在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白的保守结构域进行分析。

1.2.4 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白的二级结构预测 利用 Phyre2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 在线软件对 PR-5 (*Glyma01g42670.1*) 蛋白的二级结构进行预测。

1.2.5 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白的三级结构预测 利用同源建模服务器 Swiss-Model(<http://swissmodel.expasy.org/>) 和 Swiss-PdbViewer 4.1 对 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白三级结构进行预测。大豆 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白质 3D 建模的模板为葡萄类甜蛋白(4L5HB)。

1.2.6 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 同源序列比对与进化树分析 从 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 数据库下载拟南芥的 28 条 TLPs 序列^[6,16] 及 NCBI 中已经提交的大豆 TLPs 序列, 将上述序列在大豆核酸及蛋白质数据库 SoyBase(<http://www.soybase.org/>) 中进行同源比对, 下载相似性较高的序列, 并将所得的数据在 NCBI CD Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 中进行进一步检验, 保留具有完整编码框的大豆 TLPs 序列。

通过 Clustal X 软件对本文获得的大豆 TLPs 序列进行比对分析。应用 Mega 4.1 进行进化树校验生成无根进化树。进化树生成采用 Neighbor-joining 方法, 由 1 000 次自举值重复抽样组成。

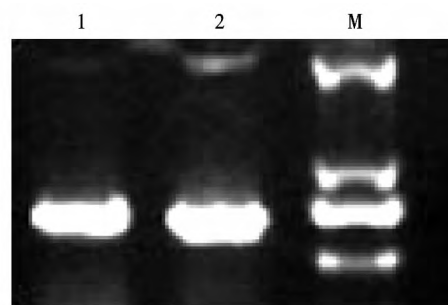
1.2.7 大豆 *GmTLPs* 基因的组织特异性表达分析

从 SoyBase 中查找大豆 *GmTLPs* 基因家族在不同组织及同一组织不同时间段的表达数据, 该数据由 Severin 等提供^[17]; 利用 Me V 4.0 软件分析大豆 *GmTLPs* 基因家族的表达模式, 分析大豆 *GmTLPs* 基因家族的组织表达特异性。

2 结果与分析

2.1 *Glyma01g42670.1* 基因的克隆与序列比对

以本实验室培育的大豆品系 HD-2 幼苗期的叶片组织总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,并根据 *Glyma01g42670.1* 的 cDNA 序列设计特异性引物 PCR 扩增获得目的片段,PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳检测,其大小约为 750 bp(图 1)。对 PCR 产物进行凝胶回收纯化,将获得的纯化产物克隆到 pGEM-T 载体,转化后挑取阳性克隆进行测序分析。将测序结果与 SoyBase 中的 *Glyma01g42670.1* 序列进行比对分析(图 2),其序列的一致性为 100%,即我们克隆得到 *Glyma01g42670.1* 的 cDNA 序列。



1 2: *Glyma01g42670.1* 的 PCR 产物; M: Marker D2000。

1 2: PCR products of *Glyma01g42670.1*; M: Marker D2000.

图 1 大豆 *Glyma01g42670.1* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *Glyma01g42670.1*

<i>Glyma01g42670.1</i>	ATGGCCAAAGACAGTACAGGCTTTCTTGCATGATGAACCTGATAACGTTCACTGGAGACATGGTGGCC	70
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	ATGGCCAAAGACAGTACAGGCTTTCTTGCATGATGAACCTGATAACGTTCACTGGAGACATGGTGGCC	70
<i>Glyma01g42670.1</i>	CTCCCACTTATGATGCTTTAACAAGCTTTTGAAGAAGGAAGAACAAAGGAGTGGACAGAAGGATCATT	140
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	CTCCCACTTATGATGCTTTAACAAGCTTTTGAAGAAGGAAGAACAAAGGAGTGGACAGAAGGATCATT	140
<i>Glyma01g42670.1</i>	CGAGGAGATAGTCCAAAATGCTATTAACTCATGGGAGATGGAGCTCTCACACAAGACCCGTTTGCAGGAC	210
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	CGAGGAGATAGTCCAAAATGCTATTAACTCATGGGAGATGGAGCTCTCACACAAGACCCGTTTGCAGGAC	210
<i>Glyma01g42670.1</i>	TTCAAGACAATAAACCCCTGAGAAGTTCAAGCTCTTTGTGAATGCCAGGGAAGGATTATCTGGAGAGGATA	280
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	TTCAAGACAATAAACCCCTGAGAAGTTCAAGCTCTTTGTGAATGCCAGGGAAGGATTATCTGGAGAGGATA	280
<i>Glyma01g42670.1</i>	CTCTAAGCCTGGGAAGTTATAATGCTTTGTTCGAAAGTTCTCTGCTGAAGACTTGAAGCCTTACAAAGC	350
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	CTCTAAGCCTGGGAAGTTATAATGCTTTGTTCGAAAGTTCTCTGCTGAAGACTTGAAGCCTTACAAAGC	350
<i>Glyma01g42670.1</i>	AGATGAAGAGACTTTTGAATCATCTCATGAAGCGTTCAAATCAGCTTTTCTAGAGCGTTTGTCTGGGAA	420
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	AGATGAAGAGACTTTTGAATCATCTCATGAAGCGTTCAAATCAGCTTTTCTAGAGCGTTTGTCTGGGAA	420
<i>Glyma01g42670.1</i>	GTGATCAAAGTTTATAGTGGACCACTGAAATTTGCTTTCAAGTTTAGGCACTGGGGCTTCTTTGAAGGTC	490
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	GTGATCAAAGTTTATAGTGGACCACTGAAATTTGCTTTCAAGTTTAGGCACTGGGGCTTCTTTGAAGGTC	490
<i>Glyma01g42670.1</i>	CTTTTAAGGGACATGCCCTTACCGGGAAGATGGCCCAATTCATGGCTTGGGAAGTGTCAAGGTGGATGA	560
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	CTTTTAAGGGACATGCCCTTACCGGGAAGATGGCCCAATTCATGGCTTGGGAAGTGTCAAGGTGGATGA	560
<i>Glyma01g42670.1</i>	CTCTTTGAAGGTTGAAGAGGTGGAGATTACTATGACCCGGCAGAGCTTCTTGAGCGCTTCTTTGAGGG	630
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	CTCTTTGAAGGTTGAAGAGGTGGAGATTACTATGACCCGGCAGAGCTTCTTGAGCGCTTCTTTGAGGG	630
<i>Glyma01g42670.1</i>	AACCACATAAATCACCAATTGAAGAGGATGGCACCACCAAACTTCAGCACCTTCCCAAGGATGTCCTTCT	700
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	AACCACATAAATCACCAATTGAAGAGGATGGCACCACCAAACTTCAGCACCTTCCCAAGGATGTCCTTCT	700
<i>Glyma01g42670.1</i>	CCAAATA	707
<i>Glyma01g42670.1-ex</i>	CCAAATA	707

Glyma01g42670.1-ex: *Glyma01g42670.1* 的 PCR 产物测序结果。

Glyma01g42670.1-ex: The sequencing results of *Glyma01g42670.1* PCR products.

图 2 *Glyma01g42670.1* 测序结果比对

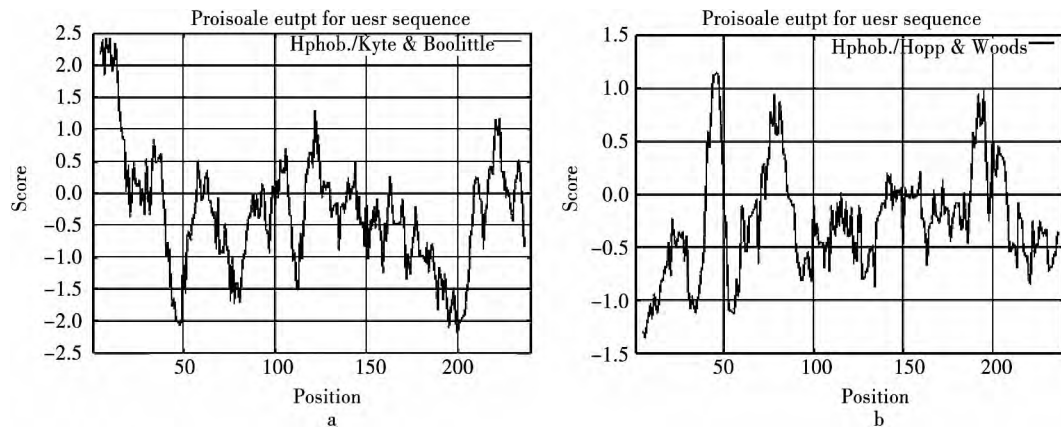
Fig. 2 The sequencing results of *Glyma01g42670.1*

2.2 PR-5 (*Glyma01g42670.1*) 蛋白的理化特性分析

分析结果显示 *Glyma01g42670.1* 编码的 PR-5 蛋白是包含 240 个氨基酸的多肽链,理论分子量约为 25.87 kDa, pI 6.26, 属于一种酸性蛋白。该蛋白的半衰期(estimated half-life)为 30 h, 不稳定系数(instability index, II)为 33.17, 表明该蛋白为稳定蛋白。

应用 ProtScale 程序绘制 PR-5(*Glyma01g42670.1*)

蛋白的疏水性图谱。分别用 ProtScale 中的 Hphob./Kyte&Doolittle 和 Hphob./Hopp&Woods 算法预测氨基酸序列的疏水性和亲水性^[17], PR-5(*Glyma01g42670.1*) 在 0~20 AA 具有明显的疏水区, 此外在 90~180 AA 也有比较强的疏水区(图 3)。此外利用 ProtParam 软件分析可知 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白的亲水指数为 -0.277, 即该蛋白属于疏水蛋白。



a: Hphob. /Kyte&Doolittle 算法; b: Hphob. /Hopp&Woods 算法。

a: Hphob. /Kyte&Doolittle algorithm; b: Hphob. /Hopp&Woods algorithm.

图 3 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白的疏水性及亲水性

Fig. 3 Hydrophobic and Hydrophilic analysis of PR-5(*Glyma01g42670.1*)

2.3 PR-5 (*Glyma01g42670.1*) 蛋白保守结构域分析

利用 NCBI 数据库在线分析软件 BLAST 进行同源性比对可知 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 氨基酸序列具有典型的 THN 结构域(TLP 家族的保守结构域)(图 4)。SMART 在线软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析进一步证明了 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白质具有典型的 TLP 家族的保守结构域, 其氨基酸序列为 24 ~ 223 AA; 且在 N 端存在潜在的信号肽序列(图 5)。研究发现大部分 PR-5(*Glyma01g42670.1*)

蛋白具有跨膜转移(定位)的 N 端信号肽序列。在 N 端信号肽的引导下, PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白被分泌到植物外体或液泡中。而在某些情况下, PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白在 C-末端多肽的引导下最后定位并积累于植物细胞的液泡中^[18-20]。由 SignalP 的分析结果可知该蛋白在 1 ~ 20 AA 存在信号肽序列, 且剪切位点位于 21 和 22 AA。此外由 TMHMM 软件可知 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白不含有跨膜螺旋结构, 进一步证实该蛋白主要存在于质外体中, 属于分泌蛋白。

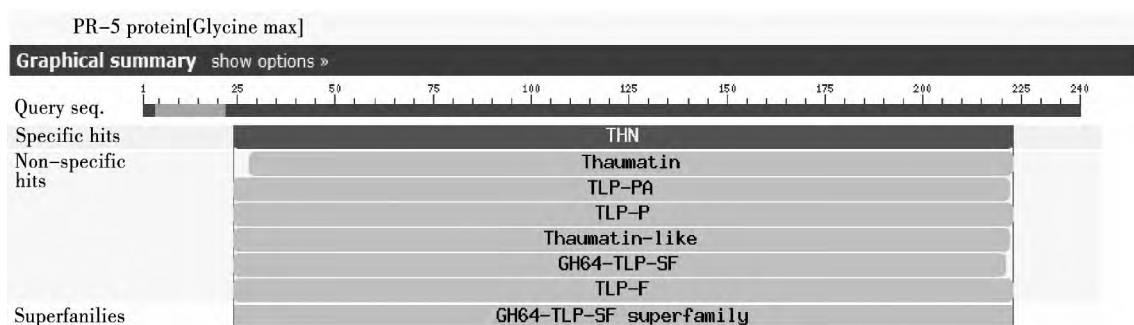


图 4 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 的保守域分析图

Fig. 4 Conserved domains analysis of PR-5(*Glyma01g42670.1*)

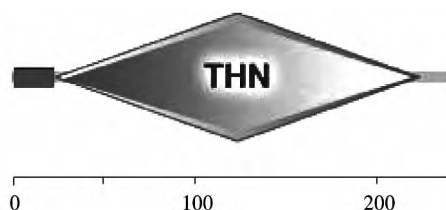


图 5 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 的 SMART 预测结果

Fig. 5 SMART prediction of PR-5 (*Glyma01g42670.1*)

2.4 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白二级结构预测

二级结构预测结果显示 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白与烟草的 PR-5d 蛋白在结构上相一致的置信度为 100%。由图 6 可知 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白含有 3 个 α -螺旋和 13 个 β -折叠二级结构, 且 N 端信号肽为 α -螺旋。

2.5 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白三级结构预测

三级结构预测的结果显示该蛋白存在明显的 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白的典型结构域, 且该蛋白包含的卷曲结构大都暴露在蛋白分子外侧; 而

13 个 β -折叠结构近似排列成桶状几乎全部位于蛋白内部(图 7a); 由图 7b 可知 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 氨基酸序列中含有 17 个半胱氨酸(*cys*) 残基, 即该蛋白含有由 16 个保守的半胱氨酸残基组成的 8 个二硫键, 它们存在于 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白

的三级结构域, 从而在蛋白的稳定性中起着重要作用; 此外由图 7c 可知该蛋白存在明显的凹槽, 且该凹槽位于结构域 I 和结构域 II 之间, 因而推测 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白可能具有内切葡聚糖酶催化活性。



图 6 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 二级结构预测

Fig. 6 Secondary structure prediction of PR-5(*Glyma01g42670.1*)

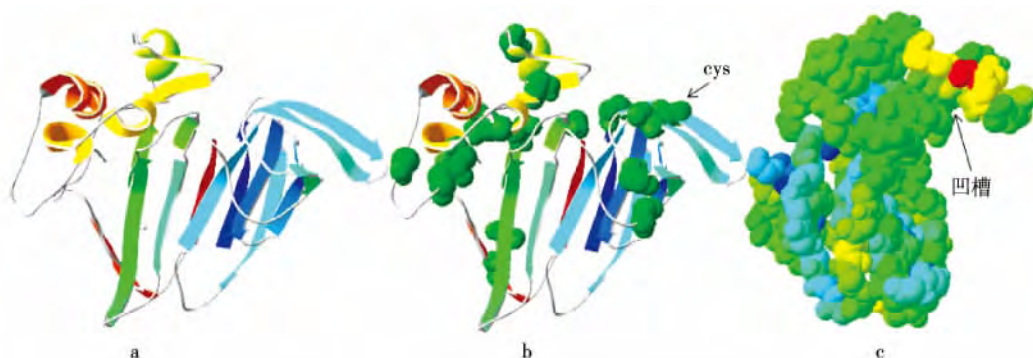


图 7 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 蛋白 3D 结构预测

Fig. 7 The 3D structure prediction of PR-5(*Glyma01g42670.1*) proteins

2.6 PR-5(*Glyma01g42670.1*) 同源蛋白 TLPs 的多序列同源比对及进化分析

通过比对分析, 本文共从 SoyBase 数据库中得到 42 条具有完整编码框的大豆 TLPs 序列。应用 Clustal X 软件对本文获得的 42 条大豆 TLPs 序列进行序列比对分析, 可知大豆的 TLPs 氨基酸序列相似性较高, 但在 N 端和 C 端存在一定的差异性。

以多序列比对的结果为基础, 利用 Mega 4.1 构建了大豆及拟南芥 TLPs 家族的系统进化树(图 8)。

由进化分析结果可知, 整个系统进化树分成 7 个分支, 即 Group I ~ Group VII, 其中 *Glyma01g42670.1* 属于 Group VII。

结合 Liu 等^[4]的结果可知 *Glyma01g42670.1* 与拟南芥 NP_193559.2、NP_198644.1 和 NP_177182.2 聚为一类; 拟南芥的这 3 个基因编码 PR5K 受体蛋白, 该蛋白同时含有类甜蛋白结构域和激酶区。由图 8 可知 *Glyma01g42670.1* 属于 Group VII, 且该基因与拟南芥 NP_192902.1 属于直

系同源基因,它们具有相同功能和共同起源的基因。*NP_192902.1* 编码的拟南芥渗透蛋白又称为 AtOSM34; AtOSM34 参与了拟南芥响应病原微生物及盐胁迫的信号途径; 因而推测大豆 PR-5 (*Glyma01g42670.1*) 可能具有抵御病原体、响应盐

胁迫的功能。*Glyma01g42670.1* 与 *Glyma05g38130.1*、*Glyma05g38110.1* 属于旁系同源基因,它们可能共同参与了大豆抵御病原体、响应外界压力以适应不良环境过程,但在功能上存在一定的差异性。

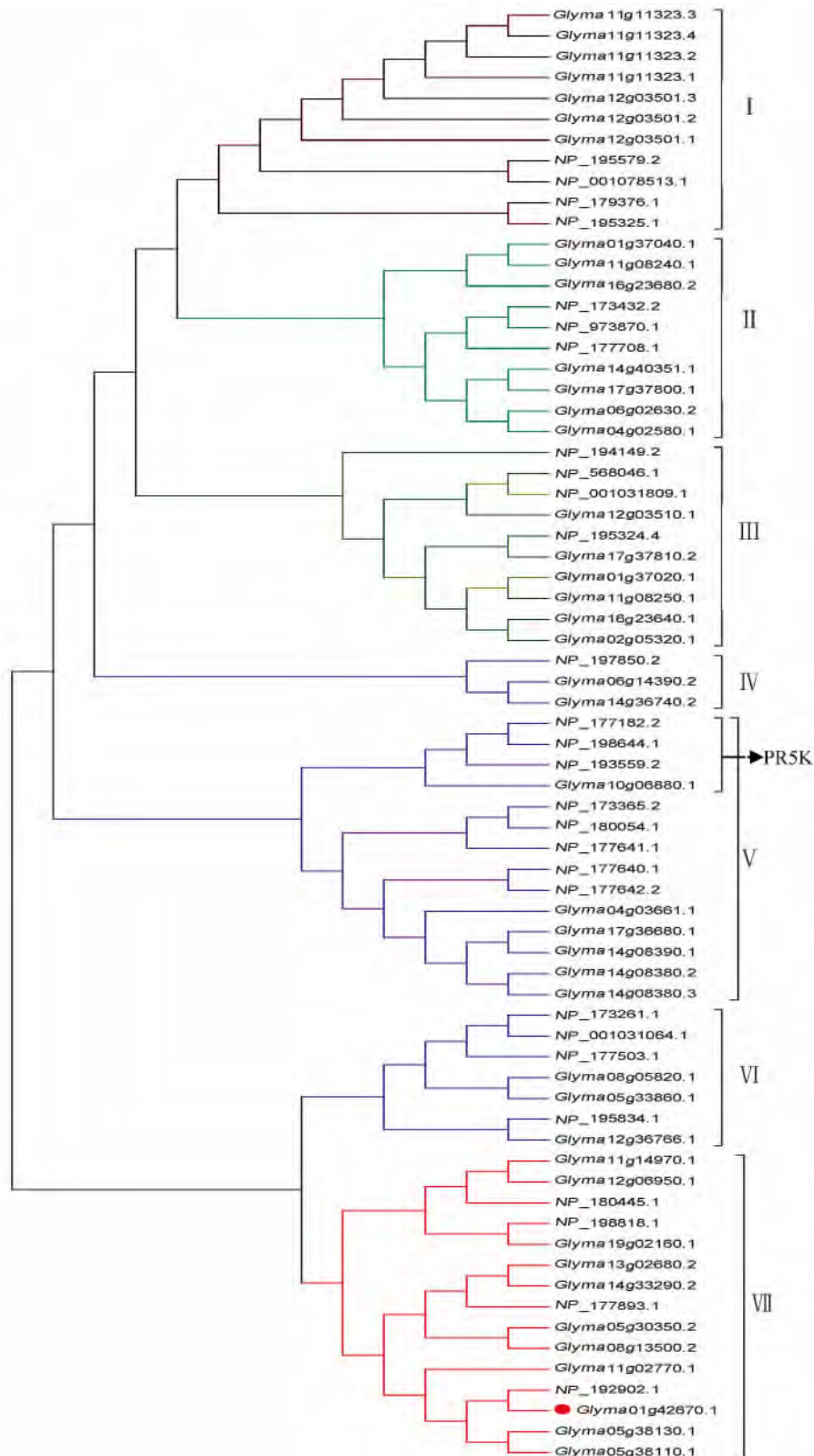


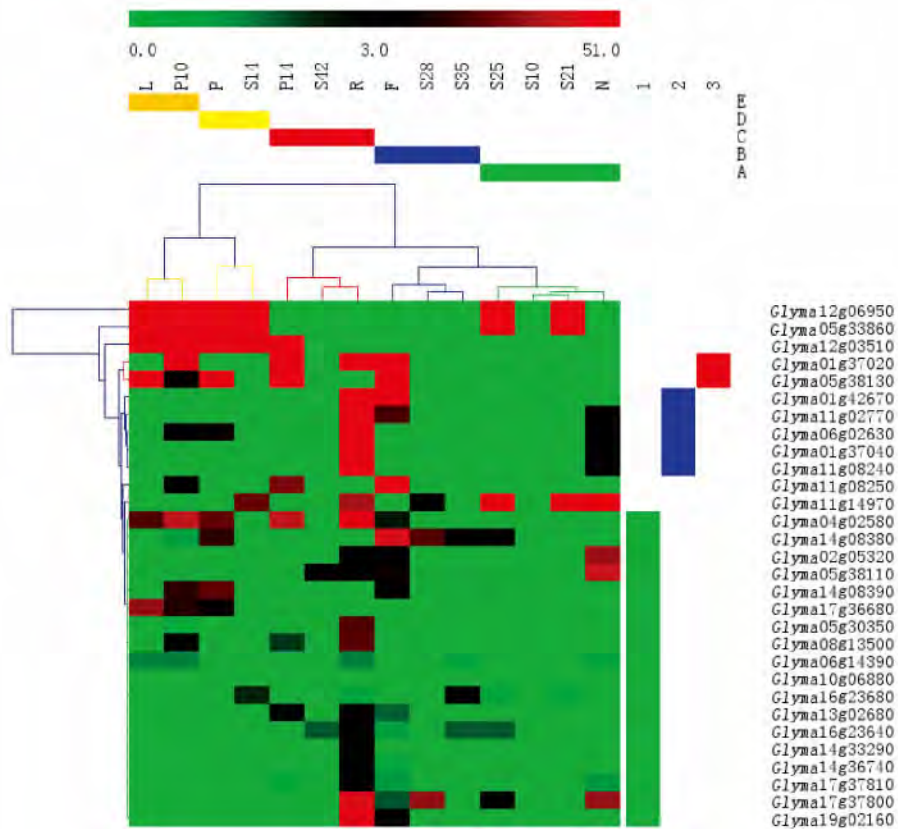
图8 *GmTLPs* 基因家族系统进化树

Fig. 8 Phylogenetic of *GmTLPs* gene family

2.7 大豆 *GmTLPs* 基因的组织特异性表达分析

由 Severin 等^[17] 提供的大豆的 RNA 测序图谱的数据可知: 本文获得 30 个 *GmTLPs* 基因的表达数据。由大豆 *GmTLPs* 基因家族层次聚类分析表达谱 (图 9) 可知除个别基因外, 根据基因在不同组织中的表达模式, *GmTLPs* 可聚为 3 类; 第 1 类包括的 18 个基因中除 *Glyma17g36680*、*Glyma14g08390*、*Glyma10g06880* 外, 剩余的 15 个基因在根部的表达水平最高; 第 2 类的 5 个基因主要在根部和根瘤部

表达; 第 3 类的 2 个基因属于泛表达基因, 且在开花 14 d 后的豆荚中表达量最高。根据 *GmTLPs* 基因的组织表达情况, 可将大豆 6 个组织及同一组织不同时间段的 14 组表达数据聚为 5 类 (A-E), 且大部分 *GmTLPs* 基因主要在根部表达。 *Glyma01g42670*、1 属于第 2 类, 在试验中的 6 个组织中均可检测到, 属于泛表达基因; 它在根部和花中表达水平较高, 而在种子形成的各时间段表达水平很低或不表达。



L: 幼叶; F: 花; P: 1 cm 豆荚; P10: 开花 10 d 后的荚皮; P14: 开花 14 d 后的荚皮; S10: 开花 10 d 后的种子; S14: 开花 14 d 后的种子; S21: 开花 21 d 后的种子; S25: 开花 25 d 后的种子; S28: 开花 28 d 后的种子; S35: 开花 35 d 后的种子; S42: 开花 42 d 后的种子; R: 根; N: 根瘤; DAF: 开花后的天数。

L: Young leaf; F: Flower; P: 1 cm pod; P10: Pod shell of 10 DAF; P14: Pod shell of 14 DAF; S10: Seed of 10 DAF; S14: Seed of 14 DAF; S21: Seed of 21 DAF; S25: Seed of 25 DAF; S28: Seed of 28 DAF; S35: Seed of 35 DAF; S42: Seed of 42 DAF; R: Root; N: Nodule; DAF: Days after flowering.

图 9 *GmTLPs* 基因家族表达模式层次聚类分析

Fig. 9 Hierarchical cluster analysis of *GmTLPs* gene family

3 结论与讨论

TLPs 属于多基因家族, 目前已从拟南芥和水稻的基因组和 EST 数据库中分离得到的 *TLPs* 家族成员分别为 28 和 31 个^[4,7]。本文通过比对分析共得到 42 条大豆 *TLPs* 序列, 由 *GmTLPs* 家族基因进化树可知这几个亚家族是由多个基因复制进化而来的, 在基因复制后一些短序列的插入或缺失、点突

变和结构域的并置导致具有新的功能的 *GmTLPs* 基因的产生; 一些 *GmTLPs* 基因存在旁系同源家族, 它们是经过最新的基因复制后产生的^[4,21]。此外在 *GmTLPs* 家族基因复制的过程中这 42 个成员保留了保守的结构区域, 但 N 端和 C 端的变化较大。在基因复制过程中不同 *TLPs* 氨基酸序列的差异及组织表达的特异性可能赋予了它们功能的多样性。例如拟南芥 NP_193559.2、NP_198644.1、NP_

177182. 2、大豆 PR-5(*Glyma01g42670. 1*) 和水稻 NP_001041821 均属于 PR5K 受体蛋白, 该蛋白属于植物类受体蛋白激酶; Liu 等^[4]推断在单子叶和双子叶植物分化后, PR5K 受体蛋白在基因复制过程中形成新的结构域和功能。

植物 TLPs 基因在病原微生物、机械损伤、植物激素和渗透压力等因素的诱导下均可表达, 且部分 TLPs 基因表达具有明显的时空性^[4 22-23]。大豆 *GmTLPs* 基因的特异性表达分析的结果表明 *GmTLPs* 基因在多个组织及同一组织不同的发育阶段均可检测到其表达量即存在表达时空性, 但大部分基因主要在根中表达。其中 *Glyma01g42670. 1* 在根部的表达水平最高, 且与拟南芥 NP_192902. 1 属于直系同源基因, 推测 *Glyma01g42670. 1* 基因通过在根部表达可能参与了大豆抵御病原体、响应盐胁迫的过程。目前关于 TLPs 的生物学功能和作用机制尚不明确, 因而仍需在 TLPs 基因的组织特异性及生物功能等方面进行进一步的验证。

参考文献

- [1] van Loon L C, Rep M, Pieterse C M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants[J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44: 135-162.
- [2] Singh N K, Kumar K R R, Kumar D, et al. Characterization of a pathogen induced thaumatin-like protein gene *AdTLP* from *Arachis diogeni*, a wild peanut[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83963.
- [3] Kumar S A, Kumari P H, Kumar G S. Osmotin: A plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin[J]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 163.
- [4] Liu J J, Sturrock R, Ekramoddoullah A K M. The superfamily of thaumatin-like proteins: Its origin, evolution, and expression towards biological function[J]. Plant Cell Reports, 2010, 29: 419-436.
- [5] Torres M, Alvarez-García E, Bartra J, et al. The allergenic structure of the thaumatin-like protein Ole e 13 is degraded by processing of raw olive fruits[J]. Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology, 2014, 24(3): 162-168.
- [6] Palacín A, Rivas L A, Gómez-Casado C, et al. The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: A multicenter study using a specific protein microarray. [J] PLoS One, 2012, 7(9): e44088.
- [7] Liu J J, Zamani A, Ekramoddoullah A K M. Expression profiling of a complex thaumatin-like protein family in western white pine [J]. Planta, 2010, 231: 637-651.
- [8] Wang Q H, Li F G, Zhang X, et al. Purification and characterization of a CkTLP protein from *Cynanchum komarovii* seeds that confers antifungal activity[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e01693.
- [9] Mani T, Sivakumar K C, Manjula S. Expression and functional analysis of two osmotin (PR5) isoforms with differential antifungal activity from pipercolubrinum: Prediction of structure – function relationship by bioinformatics approach[J]. Molecular Biotechnology, 2012, 52: 251-261.
- [10] Vincent S M, Ho J H, Ng T B. A thaumatin-like antifungal protein from the emperor banana[J]. Peptides, 2007, 28: 760-766.
- [11] Fierens E, Gebruers K, Voet A R, et al. Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2009, 24: 646-654.
- [12] Monteiro S, Picarra-Pereira M A, Teixeira A R, et al. Environmental conditions during vegetative growth determine the major proteins that accumulate in mature grapes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 4046-4053.
- [13] Min K, Ha S C, Hasegawa P M, et al. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004, 54: 170-173.
- [14] Marangon M, van Sluyter S C, Waters E J, et al. Structure of haze forming proteins in white wines: Vitis vinifera thaumatin-like proteins[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e113757.
- [15] Grenier J, Potvin C, Asselin A. Some fungi express β -1,3-Glucanases similar to thaumatin-like proteins[J]. Mycologia, 2000, 92: 841-848.
- [16] Deihimi T, Niazi A, Ebrahimi M, et al. Finding the undiscovered roles of genes: An approach using mutual ranking of coexpressed genes and promoter architecture-case study: Dual roles of thaumatin like proteins in biotic and abiotic stresses[J]. SpringerPlus, 2012, 1: 30.
- [17] Severin A J, Woody J L, Bolon Y T, et al. RNA-Seq atlas of *Glycine max*: A guide to the soybean transcriptome[J]. Biomed Central Plant Biology, 2010, 10: 160.
- [18] Melcher L S, Sela-Buurlage M B, Vloemans S A, et al. Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21: 583-593.
- [19] Neuhaus J M, Sticher L, Meins F, et al. A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to plant vacuole[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 88: 10362-10366.
- [20] Sato F, Koiwa H, Sakai Y, et al. Synthesis and secretion of tobacco neutral PR-5 protein by transgenic tobacco and yeast[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 211: 909-913.
- [21] Brandazza A, Angeli S, Tegoni M, et al. Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals[J]. The Federation of European Biochemical Societies, 2004, 572: 3-7.
- [22] Jung Y C, Lee H J, Yum S S, et al. Drought-inducible-but ABA-independent-thaumatin-like protein from carrot (*Daucus carota* L.) [J]. Plant Cell Reports, 2005, 24: 366-373.
- [23] Kalpana K, Maruthasalam S, Rajesha T, et al. Engineering sheath blight resistance in elite indica rice cultivars using genes encoding defense proteins [J]. Plant Science, 2006, 170: 203-215.