

福州宦溪野生蕉(*Musa* spp., AB group) 2 个 *PSAG* 成员的克隆及生物信息学分析

刘炜娅, 赖钟雄*

福建农林大学园艺植物生物工程研究所, 福建福州 350002

摘要 植物光系统 反应中心亚基 (photosystem reaction center subunit, 简称 PSAG 或 PS -G) 是光合系统 的主要组件, 具有维持 PS 复合体稳定性的重要作用, 并与抗盐密切相关。本研究以福州宦溪野生蕉 (*Musa* spp. AB group) 叶片为材料, 采用同源克隆的方法, 首次分离到 *PSAG* 基因的 2 个成员: *PSAG1*、*PSAG2* (GenBank 登录号分别为 JX317082、JX317083), 分别为 800、827 bp, 分别编码 150、160 个氨基酸; *PSAG1*、*PSAG2* 的基因组序列分析表明 2 个成员均没有内含子。生物信息学分析表明: *PSAG1*、*PSAG2* 具有 PS 的 亚基超家族 (photosystem reaction center subunit psaK) 保守结构域, 是不具有信号肽的跨膜蛋白, 具有亲水性; *PSAG1*、*PSAG2* 均有 4 个位点发生磷酸化。宦溪野生蕉 *PSAG* 在进化过程中形成了特殊的结构特征, 即 *PSAG1* 和 *PSAG2* 没有内含子, 并且在不同物种间保守区具有高度的一致性, 为保持 *PSAG* 功能的稳定性提供了重要保证。

关键词 宦溪野生蕉 (*Musa* spp. AB group); *PSAG*; 基因克隆; 内含子; 生物信息学
中图分类号 S668.1 文献标识码 A

Cloning and Bioinformatics Analysis of Two Members of *PSAG* in the Wild Banana (*Musa* spp., AB Group) from Huanxi Town in Fuzhou

LIU Weihua, LAI Zhongxiong

Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract Photosystem reaction center subunit (*PSAG* or *PSI-G*) is one of the main components of photosystem , and it is important for the stability of the PS complex, and closely related with salt resistance. In this report, the leaves of the wild banana (*Musa* spp., AB Group) from Huanxi Town were used as the materials for cloning *PSAG* genes by the homologous cloning method, and the two members of *PSAG* were firstly isolated and named as *PSAG1* and *PSAG2* (the accession numbers were JX317082 and JX317083 in GenBank, respectively). The sequences of the full-length cDNA of *PSAG1* and *PSAG2* were 800 bp and 827 bp, encoding 150 and 160 amino acids, respectively. The genomic DNA sequencing analysis of *PSAG1* and *PSAG2* indicated that there were no introns in the two members. Bioinformatics analysis showed that both of the two members of *PSAG* were with the super-family conservative domain of photosystem reaction center subunit (psaK), and they were hydrophilic and without the signal peptide, belonging to the transmembrane protein. Both *PSAG1* and *PSAG2* had four phosphorylation sites. The special structure characteristics of *PSAG* in the wild banana (*Musa* spp., AB Group) from Huanxi Town formed in the evolution, i.e., without introns and the high consistency of the conservative sequence among different species, were essential to guarantee maintaining the stability of the *PSAG* functions.

Key words Wild banana (*Musa* spp., AB Group) from Huanxi Town; *PSAG*; Gene cloning; Intron; Bioinformatics
doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2013.01.010

光合作用的研究一直是生物科学领域的热点, 美国《Science》杂志把光系统 精细机构研究成果评为 2011 年 10 大科学突破之一^[1]。光合作用中心存在 2 种不同的光合蛋白复合色素体系, 分别进行 2 种不同的光化学反应, 它们分别称作光合系统 (简称 PS , 蛋白复合体结合叶绿素 a P700, 吸收远红光) 和光合系统 (简称 PS , 蛋白复合体

结合叶绿素 a P680, 吸收红光)^[1]。20 世纪 70 年代末 Nelson^[2]首次提出 PS 是由许多蛋白质亚基组成, 并认为大亚基是反应中心主体, 且比小亚基具有更多的功能。研究发现在 PS 众多亚基里, 大于 60 ku 的大亚基 PsaA 和 PsaB 形成异二聚体作为 PS 的反应中心, PsaC、PsaD 和 PsaE 作为外周蛋白与 PsaL、PsaK、PsaF、PsaI 和 PsaJ 5 个膜内周蛋白

收稿日期 2012-09-18

修回日期 2012-11-05

基金项目 国家香蕉产业技术体系专项资金 (No. CARS-32-11); 福建省科技厅农业科技平台建设项目 (No. 2008 N2001)。

作者简介 刘炜娅 (1986 年—), 女, 硕士生; 研究方向: 园艺植物生物技术。*通讯作者: 赖钟雄, E-mail: Laizx01@163.com。

存在于蓝细菌、绿藻、高等植物 PS 复合物中，在蓝细菌的 PS 中发现了 PsaM，在绿藻和高等植物等真核生物中还发现 PsaG、PsaH 和 PsaN 亚基。其中 A、B、C、I、J 亚基蛋白由叶绿体基因组编码，而其他亚基蛋白由核基因组编码。因此，PsaG 亚基蛋白定位于叶绿体类囊体上，却是核基因编码的蛋白。植物光系统 反应中心亚基 (photosystem reaction center subunit, 简称 PSAG 或 PS -G) 作为高等植物 PS 的重要组件，具有维持 PS 稳定性的功能，缺乏 PSAG 容易导致光伤害^[3]；最近的研究表明，PSAG 还与抗盐密切相关^[4]。但是，其分子生物学研究还很少。目前，在 GenBank 上登录的完整的 *PSAG* 序列已在 20 种植物获得，其中单子叶植物仅 5 种。在香蕉上，目前还没有 *PSAG* 基因克隆的报道。

2006~2012 年，我们在福建省发现大面积野生蕉^[5-10]，其中福州宦溪野生蕉具有深紫色的果实、抗逆性强，具有很高的观赏及利用价值^[10]。本研究拟通过对影响光系统稳定性及具有抗盐功能的 *PSAG* 的克隆，为挖掘福建野生香蕉的观赏及抗性基因资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验的材料为宦溪野生蕉(*Musa* spp., AB Group)的叶片，由福建农林大学园艺植物生物研究所野生香蕉种质资源圃提供。

1.2 方法

1.2.1 宦溪野生蕉叶片总 RNA、基因组 DNA 的提取及其质量检测 宦溪野生蕉叶片总 RNA 提取按照北京天恩泽基因有限公司的柱式植物 RNA out 2.0 (Column Plant RNAout2.0)CAT#:90404B-50 的试剂盒说明书进行提取。

采用琼脂糖凝胶电泳对提取的总 RNA 进行质量检测^[11]。

采用改良 CTAB 小量法提取宦溪野生蕉叶片基因组 DNA^[12]。

将提取的 DNA 用琼脂糖凝胶电泳检测后，然后采用紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。

1.2.2 宦溪野生蕉 *PSAG* 基因克隆 采用 Fermentas 公司 RevertAid™ First-Strand cDNA Synthesis Kit 的试剂盒进行 cDNA 第一链合成，具体操作和流程按照说明书完成，同时将 Olig(dT)18 primer 换成 AP，AP 序列为 5'-GTACTAGTCGACGCGTGGCC-3'，将该 cDNA 编号为 cDNA-1，此 cDNA 主要用于克隆

PSAG 3'RACE 和开放阅读框(ORF)。采用 Invitrogen 公司 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 的试剂盒进行 5'RACE cDNA 的第一链合成。逆转录的步骤为：cDNA 第一链的合成，加同聚物尾，在加尾的基础上进行 cDNA 第二链的合成。cDNA 第一链的合成时加入 0.2 μL 2 pmol/μL 5'PSAG 特异引物 *PSAG* GSP: TTGAGG TGGCGAGGATGTAGTAAG，cDNA 第二链的合成时加入 10 μmol/L 接头引物：5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTGTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTT-3' 1.0 μL，其他按照试剂盒完成，将 5'RACE cDNA 编号为 cDNA-2，主要用于 5'RACE 的克隆。

根据 GenBank 中的已经登录的多种植物的 *PSAG* 基因核酸序列信息进行多重序列比对，分析发现，3'端序列比较特异，故选择特异性较高的片段进行 3'端上游引物设计，此条引物为顺式引物。分析其他物种 *PSAG* 核酸序列，发现 *PSAG* 全长较短，约 700 bp，故略过保守区域的克隆，在得到的 3'已知序列的基础上选择较特异的片段直接进行 5'引物设计，5'端引物为反式下游引物。宦溪野生蕉 *PSAG* 开放阅读框引物设计根据拼接得到的宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 全长，分别设计 1 条包含起始密码子 ATG 的上游顺式引物，和包含终止密码子 TGA 的下游反式引物。比较得到的 *PSAG1* 和 *PSAG2* 全长序列发现 2 个基因的相似性达到 95.89%，差异在于基因上游前 33 bp 的核酸序列及序列中间的一个碱基，下游有约 400 bp 左右核酸序列一致，故在差异大的区域设计开放阅读框的上游引物，用同一条下游引物进行开放阅读框的验证。序列分析及引物设计采用 DNAMAN 6.0 软件进行，引物合成由北京华大基因公司完成。具体特异引物和通用引物序列如表 1：

PSAG1、*PSAG2* 3'扩增以 cDNA-1 为模板，用 3' GSP 和 3P、3NP 为上下游引物进行 3' RT-PCR 第一轮和第二轮扩增。

表 1 宦溪野生蕉 *PSAG* 基因克隆所用引物

引物名称	引物序列(5'-3')
3'GSP-1	GGCGTGACCGCACTTCGAGGCCCGGC
3'GSP-2	ATCCTTGCCACCTCCAGCAATGGGT
5'GSP-1	CAAAATGTACAACCAGAAGCCTTC
5'GSP-2	GCCTTCTTACATGATTCAACAGCGAT
<i>PSAG1</i> ORF-F	ACATGGGCTTCCAGTCTCTTCACCT
<i>PSAG2</i> ORF-F	GCAGAGTACATGGGAAAGACGAAC
<i>PSAG1</i> 、 <i>PSAG2</i> ORF-R	AGTGACCAAGAATAACCCAAG

将 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 如为目的片段, 运用试剂盒将目的片段切胶回收, 然后连接 pMD 18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性单克隆子, 进行菌液 PCR 鉴定后送上海博尚生物公司测序。

PSAG1、*PSAG2* 5' 扩增、ORF 验证与 *PSAG1*、*PSAG2* 3' 扩增步骤一样, *PSAG1*、*PSAG2* 3' 扩增、5' 扩增、ORF 验证过程中用到的模板、引物、退火温度、延伸时间如表 2。

采用 *PSAG1*、*PSAG2* ORF 的上下游引物分别扩增宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 基因组 DNA。扩增片段回收做 TA 克隆后测序。

1.2.3 宦溪野生蕉 *PSAG* 基因进化树的构建 从 NCBI 上下载具有代表性的植物 *PSAG* 序列构建进化树, 这些植物分别为: 绿藻中的微单胞菌属 (*Micromonas* spp. RCC299)、苔藓植物植物中的念

珠藻 (*Tortula ruralis*)、单子叶植物中禾本目中的玉米 (*Zea mays*)、泽泻目中的无根萍属 (*Wolffia australiana*)、双子叶植物十字花目中的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、豆目中的蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*)、葡萄目中的葡萄 (*Vitis vinifera*)、石竹目中的菠菜 (*Spinach*)。然后运用 ClustalX 1.8 和 MAGA 5.0 (Maximum Likelihood Tree) 软件进行系统进化树的构建。进化树中数字代表 bootstrap 值, 重复检测 1 000 次。

2 结果与分析

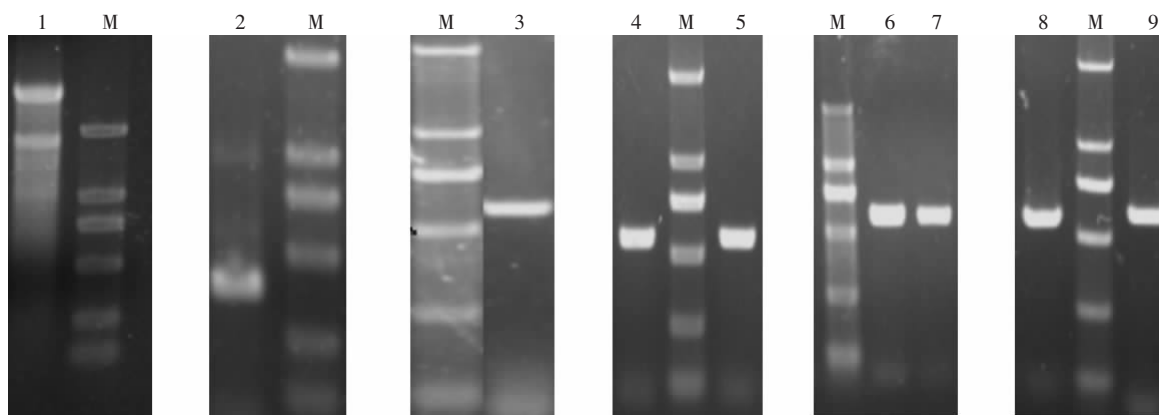
2.1 宦溪野生蕉叶片总 RNA 的提取与质量检测

将提取的宦溪野生蕉叶片总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1。

从图 1 中可见总 RNA 条带清晰, 基本上没有 DNA、多酚、多糖、蛋白质等污染, 表明提取的宦溪野生蕉叶片总 RNA 质量较高, 可以用于基因克隆。

表 2 *PSAG1*、*PSAG2* 3'PCR 扩增过程中用到的模板、引物、退火温度、延伸时间

项目	模板	引物		退火温度/℃	延伸时间/s
		上游引物	下游引物		
3' RACE 第一轮	cDNA-1	3' GSP-1	3P	54	30
3' RACE 第二轮	3'RACE 第一轮产物	3' GSP-2	3NP	57	30
5' RACE 第一轮	cDNA-2	3P	5' GSP-1	54	40
5' RACE 第二轮	5'RACE 第一轮产物	3NP	5' GSP-2	54	40
<i>PSAG1</i> ORF 扩增	cDNA-1	<i>PSAG1</i> ORF-F	<i>PSAG1</i> <i>PSAG2</i> ORF-R	55	40
<i>PSAG2</i> ORF 扩增	cDNA-1	<i>PSAG2</i> ORF-F	<i>PSAG1</i> <i>PSAG2</i> ORF-R	54	40



1: 叶片 RNA; 2: 3' RACE 扩增产物; 3: 5' RACE 扩增产物; 4, 5: *PSAG1* ORF 扩增产物; 6, 7: *PSAG2* ORF 扩增产物; 8, 9: 宦溪野生蕉基因组 DNA *PSAG1*、*PSAG2* 基因扩增产物; M: DL 2 000 MAKER, 分子量从上到下分别是 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp。

图 1 宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 各个阶段 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

2.2 宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 基因克隆结果

2.2.1 宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* cDNA 3'RACE 克隆 经过 2 轮巢式 3' RACE PCR 扩增后, 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1, 在目的片段大小 400 bp 左右的位置出现一条较亮的条带, 切胶回收

目的条带, 加以纯化, 再进行 TA 克隆。菌液 PCR 后, 挑选单一较亮的目的条带的菌液送去公司测序。测序共得到 365 bp 基因序列。并且所得到的序列包含有 3' 特有的“A 尾巴”结构, 因此可以认为该序列是宦溪野生蕉 *PSAG* 的 3' 端核酸序列。

2.2.2 宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* cDNA 5'RACE 克隆 经过 5' RACE PCR 巢式扩增，在 500 bp 大小左右的位置有一条较亮的特异条带(图 1)，切胶回收并做 TA 克隆，测序分别得到 *PSAG1* 5' 核

酸序列 513 bp、*PSAG2* 5' 核酸序列 540 bp。

2.2.3 宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 全长拼接 利用 DNAMAN6.0 进行 *PSAG1*、*PSAG2* 序列拼接，结果如图 2、3。

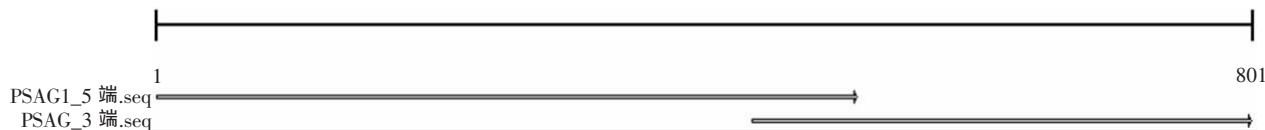


图 2 宦溪野生蕉 *PSAG1* 全长核酸序列拼接图

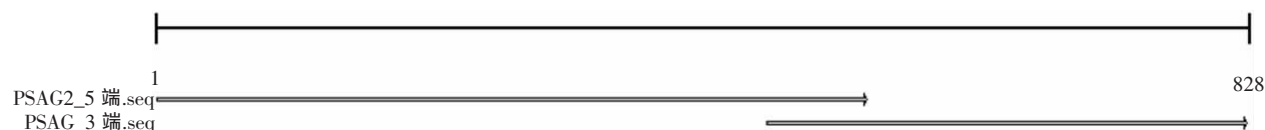


图 3 宦溪野生蕉 *PSAG2* 全长核酸序列拼接图

2.2.4 宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* ORF 扩增

(1)利用 *PSAG1*、*PSAG2* ORF 特异引物进行 PCR 扩增后，在 600 bp 左右出现目的条带(图 1)，进行 TA 克隆后送测序，测序得到 571、603 bp 序列，这与之前得到的 *PSAG1*、*PSAG2* ORF 序列一致，故验证了之前克隆的宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 核酸序列的正确性。

(2)将 *PSAG1*、*PSAG2* ORF 核酸序列 BLAST 后结果如图 4、5。从图 4、5 可以看出其与短柄草、玉米等多种植物的 *PSAG* 高度同源。

(3)从图 4、5 ORF BLAST 结果可以看出，不同物种间虽然 *PSAG* 的同源性差异比较大，但是，其保守区域在不同物种间保持高度的一致性(覆盖度基本上为 52%，少数为 51%、53%或 54%。最大相似度在 83%~86%之间，多为 85%)。

(4)运用 DNAMAN 分析宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 基因发现 *PSAG1*、*PSAG2* 分别编码了 150、160 个氨基酸，将这些氨基酸 BLAST 后发现与蓖麻、拟南芥等多种植物的 *PSAG* 编码的氨基酸序列高度同源，故再次验证了得到的 *PSAG1*、*PSAG2* 为 *PSAG*。

(5)将本试验得到的 2 个 *PSAG* 成员的 ORF 序列与小果野蕉(*M. acuminata*, AA Group)基因组测序公布的 *PSAG* 序列(见<http://banana-genome.cirad.fr>)进行多序列比对，结果如图 6。

(6)由图 6 可以看出，3 个 *PSAG* ORF 序列前 57 bp 有明显差异，宦溪野生蕉在第 55~57 bp 处多了 3 个碱基 CCT，其中宦溪野生蕉 *PSAG1* 在前面还少了 30 个碱基，*PSAG2* 虽然第 1~30 bp 之间长度一致，但也有 2 个碱基不同。宦溪野生蕉 *PSAG* 在

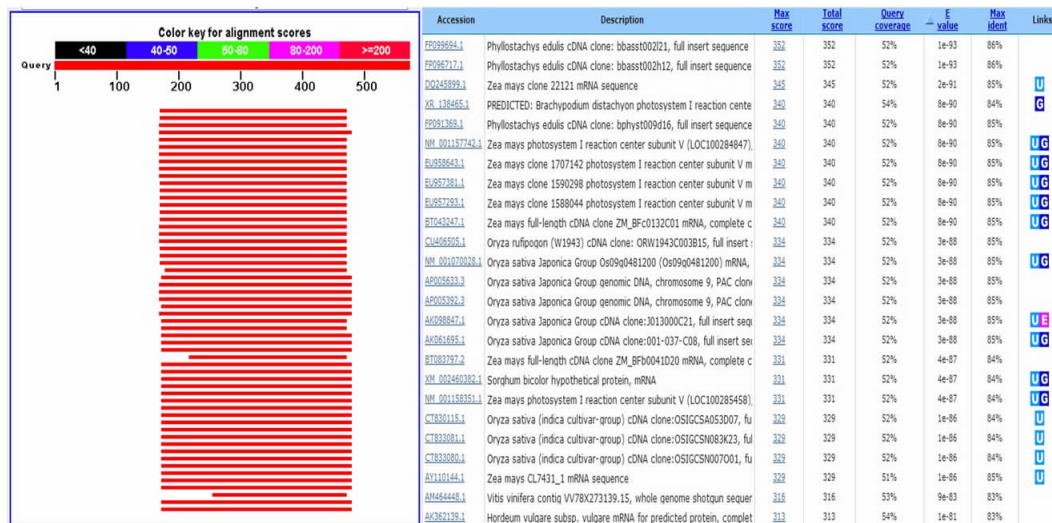


图 4 宦溪野生蕉 *PSAG1* ORF 核酸序列 BLAST 结果



图 5 宦溪野生蕉 PSAG2 ORF 核酸序列 BLAST 结果

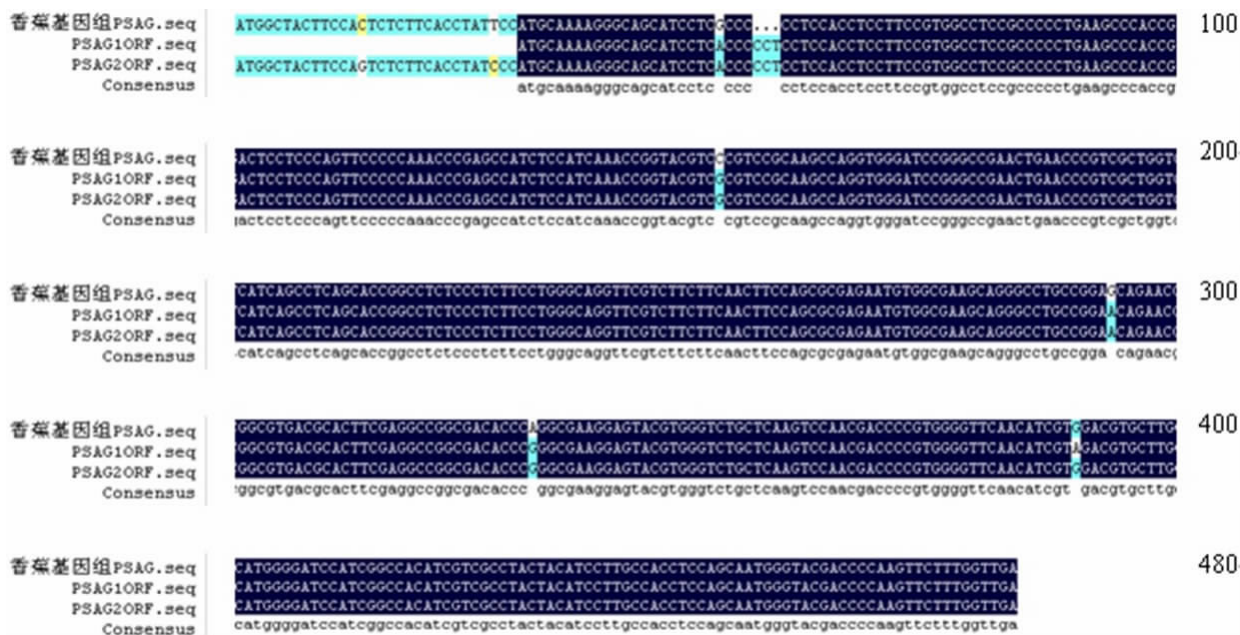


图 6 宦溪野生蕉 2 个 PSAG 成员的 ORF 序列与小果野蕉基因组的 PSAG 序列比对结果

60~480 之间也有个别碱基不同。这表明在进化过程中宦溪野生蕉和小果野蕉的 PSAG 在基因结构上已产生一定的差异, 推测在功能上也有所不同。

2.3 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 生物信息学分析

2.3.1 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 编码蛋白理化性质预测与分析

采用 ProtParam 工具对 PSAG1、PSAG2 编码蛋白的理化性质进行预测。由预测可知 PSAG1、PSAG2 蛋白原子组成为 C₇₄₈H₁₁₇₄N₂₀₆O₂₁₁S₁、C₇₉₉H₁₂₄₈N₂₁₆O₂₂₆S₂; 总原子数为 2 340、2 491; 分子量为 16 460.8 Da、17 560.1 Da; 等电点 pI 为 10.13、10.05, 因此属于碱性蛋白; 氨基酸正电 (Arg+Lys) 与负电 (Asp+Glu) 分别为 18, 10; 在哺乳动物网状

红细胞、酵母和大肠杆菌体外表达半衰期分别为 30 h, 大于 20 h 和大于 10 h; 不稳定系数是 30.94、31.91, 小于阈值, 因此推测 PSAG1、PSAG2 蛋白属于稳定蛋白; 脂肪系数为 86.40、84.06; 此外, 280 nm 处的摩尔消光系数为 11 460 L/(mol·cm)、12 950 L/(mol·cm), 吸光值为 0.696、0.737。总平均疏水性为-0.145、-0.109, 预测该蛋白是亲水蛋白。2.3.2 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白的亲疏水特性进行预测及分析 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白经过 ProtScale 程序的亲水性和疏水性预测表明: 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 最大的疏水性值都为 2.011, 最大的亲水性值都为-1.867, 且都发

现有 6 处最大亲水峰, 值在 -1.5 以下。正值代表疏水性氨基酸, 负值为亲水性氨基酸, 亲水性氨基酸明显多于疏水性氨基酸, 且预测结果显示 scale 为 Hydropathicity, 即为亲水性, 这与 PSAG1、PSAG2 理化性质中预测结果相同。因此推测宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 整个多肽链表现为亲水性。

2.3.3 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白信号肽分析预测 信号肽常用来特指指导蛋白质跨过内质网的信号, 更广泛的讲, 它通常为任何一段连续的疏水氨基酸序列, 多在 N-末端, 新生的多肽由它引导就能够通过内质网膜进入腔内, 最终被分泌到胞外。用 SignalP4.0 Server 对宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 进行信号肽的预测和分析, 结果表明 C、Y、S 3 个值均小于 0.5, 由此预测宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 不具有信号肽。

2.3.4 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白的跨膜结构预测与分析 使用 Tmpred 工具在线分析宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白跨膜结构, 结果表明 PSAG1、PSAG2 可能都存在 2 个跨膜螺旋, 分值都超过 500。因此预测宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白具有跨膜结构, 是一个跨膜蛋白。

2.3.5 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 亚细胞定位预测与分析 亚细胞定位是指某种蛋白或表达产物在细胞内的具体存在部位, 预测蛋白亚细胞定位可以更好的了解基因的功能。

通过 PSORT 对宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 亚细胞进行定位预测及分析, 预测结果表明: 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 定位在微体细胞(过氧化物酶体)的可能性最大, 可信度都达 0.640, 而 PSAG1 定位在线粒体基质、叶绿体基质和线粒体内膜的可信度分别为 0.425、0.400、0.102; PSAG2 定位在细胞质、溶酶体、线粒体基质的可信度分别为 0.450、0.254、0.100。因此推断宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 编码的蛋白是一种微体细胞蛋白(过氧化物酶体)。

2.3.6 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 保守结构域分析

将宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 基因编码的氨基酸序列在 NCBI 中进行比对的结果, 结果表明宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 编码的氨基酸序列有一个光系统的亚基超家族(photosystem reaction center subunit, psaK)保守结构域。*PSAG1*、*PSAG2* 基因 PSI-PSAK superfamily 分布的氨基酸位点分别约为 7~150、1~160。

2.3.7 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 同源蛋白质家族比较分析 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 通过程序 InterProScan 的 EBI-InterPro 数据库进行同源蛋

白质家族比较分析的结果, 结果表明宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 与 PSI-PSAK superfamily 具有同源性, 这与 NCBI 上所得的宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 保守结构域结果一致, 这类蛋白质在细菌、蓝藻细菌中收集的家族成员最多, 有 109 个蛋白质成员, 在病毒中最少, 只有 3 个蛋白质成员。

2.3.8 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白磷酸化位点分析 运用 NetPhos 2.0 Serve 软件对宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 基因编码的氨基酸进行磷酸化位点的预测及分析, 结果表明宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 整个多肽链中预测分值大于阈值 0.5 的氨基酸位点各有 4 个, 推测宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 磷酸化位点各有 4 个, 其中丝氨酸磷酸化位点分布于肽链的 N 端, 苏氨酸磷酸化位点一个分布在 N 端, 另一个靠近 C 端, 没有酪氨酸磷酸化位点。在 PSAG1 氨基酸肽链第 13、35 位发生丝氨酸磷酸化, 在肽链第 8、100 位苏氨酸发生磷酸化; 在 PSAG2 氨基酸肽链第 23、45 位发生丝氨酸磷酸化, 在肽链第 18、110 位苏氨酸发生磷酸化。由此推知宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 在 2 个 Ser、2 个 Thr 氨基酸位点发生磷酸化修饰。宦溪野生蕉 *PSAG1*、*PSAG2* 序列翻译后在肽链 13 位、23 位 N 末端有 Ser 磷酸化位点, 分值最高, 为 0.992, 推测 Ser 磷酸化位点可能会影响宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 构象和定位等。这些磷酸化位点都在 PS - PSAK superfamily 氨基酸这一结构功能域内, 可能对该结构功能域有调控作用。

2.3.9 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白质卷曲螺旋预测 利用 COILS 分析工具, 预测分析了宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 形成卷曲螺旋的情况, window=14, 21 和 28 3 个参数的结果都表明宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 没有形成卷曲螺旋。

2.3.10 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白二级结构预测 运用 JPred 对宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 二级结构进行预测, 结果显示: PSAG1、PSAG2 的无规则卷曲所占比例为 56.67%、60.00%; α 螺旋为 18.67%、16.25%; 伸展构象为 24.67%、23.75%。故宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 二级结构主要以无规则卷曲为主、伸展构象其次, α 螺旋比较少。

此外, 运用 PSIPRED 对宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 二级结构进行预测也是主要以无规则卷曲为主, 伸展构象和 α 螺旋比例相差不大。

2.3.11 宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白三级结构预测 图 7 为宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 的氨基酸序列由 SWISS-MODEL 预测的蛋白质的三级结

构, 左图为 PSAG1, 右图为 PSAG2。由图 7 可以看出, 蛋白主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成。

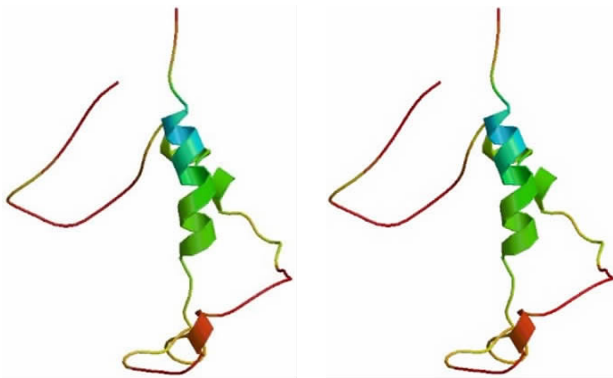
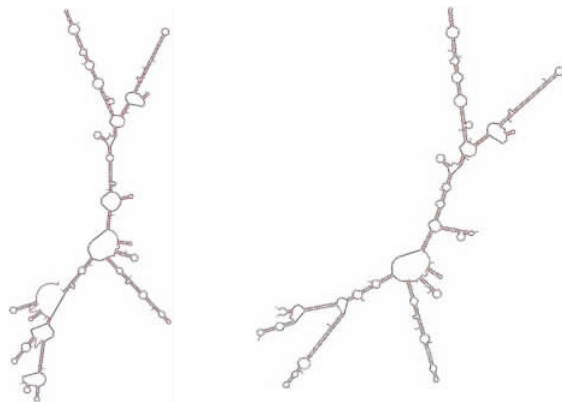


图 7 宜溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白三维结构预测

2.3.12 宜溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 ORF 的二级结构分析 利用 Mfold 进行 PSAG1、PSAG2 ORF 二级结构预测, 见图 8。PSAG1、PSAG2 碱基仅少量差别, 但其二级结构有较大差别, 可能与 RNA 的调控有关。



dG=-229.26[Initially-249.40]
12Aug15-08-20-08

dG=-225.70[Initially-243.10]
12Aug15-08-22-10

图 8 宜溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 ORF 的二级结构分析

2.3.13 宜溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白系统进化树构建 从 PSAG 进化树中可以看出, 从总体上分为 2 大类, 绿藻中的微单胞菌属和苔藓植物植物中的念珠藻聚为一大类, 其余的为另一大类, 在这一大类中其中单子叶植物中禾本目中的玉米首先从大类中分出来为单独一类, 其次是宜溪野生蕉的 2 个 PSAG 成员聚为一类, 然后双子叶植物中的葡萄、单子叶植物中的泽泻目中的无根萍属、双子叶植物十字花目中的拟南芥先后分出来成为一小类, 最后是双子叶植物中石竹目中的菠菜和豆目中的蒺藜苜蓿聚为小类。宜溪野生蕉 2 个 PSAG 成员与葡萄的进化距离最近(图 9)。

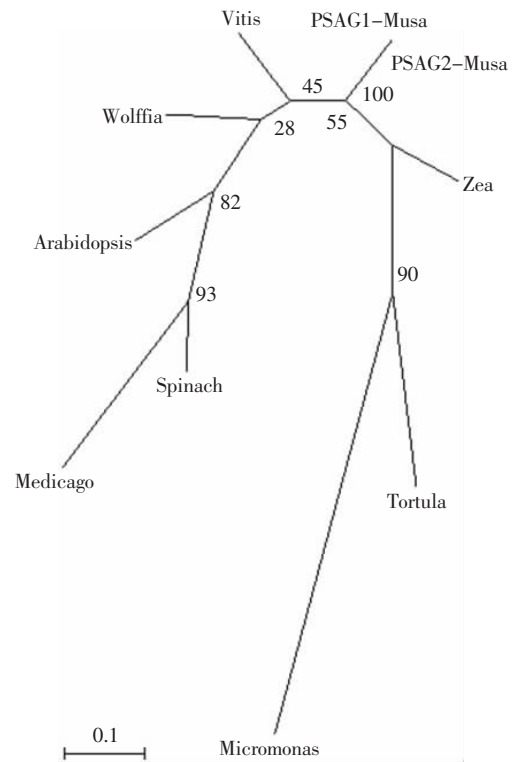


图 9 宜溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白系统进化树

2.4 宜溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 基因组 DNA 的克隆

以 PSAG1、PSAG2 ORF 的上下游引物分别扩增宜溪野生蕉的基因组 DNA (图 1), 分别得到 600 bp 左右的目的条带, 做 TA 克隆后测序得到 453 bp 和 483 bp 序列 (GenBank 登录号分别为 JX678610、JX678609)。将得到的 DNA 序列与 PSAG1、PSAG2 ORF 比对后发现序列一致, 表明宜溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 不存在内含子。

3 讨论与结论

3.1 宜溪野生蕉 PSAG 基因结构特征保证了其功能的稳定性

宜溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 ORF BLAST 结果表明, 不同物种间虽然 PSAG 的同源性差异比较大, 但其保守区域在不同物种间保持高度的一致性, 这种高度一致性比较少见。保守区域与该基因的功能应该是密切相关的, 这种保守区的高度一致性保证了 PSAG 行使维持 PSI 稳定性的重要功能。同时, PSAG 没有内含子, 避免了基因表达过程中 ORF 产生可变剪接体的可能, 能够进一步保证形成正常的 mRNA 以及表达出正常的蛋白质。PSAG 的这 2 个结构特征保证了 PSAG 功能上的稳定性。

在拟南芥的研究中发现, 缺乏 PSAG 会导致

PS 复合体不稳定, 容易受到光伤害^[3], 表明 PSAG 的存在对植物生长发育的重要性。本研究结果表明, 香蕉的进化过程中, PSAG 的结构特征为保持 PSAG 功能的稳定性提供了重要保证。

此外, 2 个 PSAG 成员的核苷酸序列及氨基酸序列都同源性高, 且蛋白的三级结构也差异不大, 这种基因的功能冗余进一步保证了 PSAG 功能上的稳定性; 但是, 用 Mfold 预测的 mRNA 二级结构发现 2 个基因成员有较大差异, 可能与其表达调控有关。

3.2 宦溪野生蕉 PSAG 蛋白预测特征反映了其功能上的多样性

Ihalainen 等^[13]在拟南芥的研究中发现 PS -G (即PSAG)在光系统中参与反应中心与外周天线蛋白之间的相互作用。Zygadlo 等^[3]还发现拟南芥 PSAG 具有维持 PS 的稳定性、避免光伤害的功能。宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白理化性质预测表明其为亲水蛋白, 这与 PSAG1、PSAG2 蛋白亲疏水性预测结果一致。宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 蛋白不具有信号肽但属于跨膜蛋白。宦溪野生蕉 PSAG1、PSAG2 基因编码的氨基酸序列有一个光系统的亚基超家族(photosystem reaction center subunit psaK)保守结构域, 推测 PSAG1、PSAG2 与这一超家族在功能上可能有一定的联系或相似性。亚细胞定位表明 PSAG1、PSAG2 定位于微体细胞(过氧化物酶体)的可能性最大, PSAG1 定位于叶绿体、PSAG2 定位于细胞质中的可能性也较高, 即 PSAG1、PSAG2 mRNA 可能在细胞核合成后穿过核孔进入细胞质, 在核糖体合成 PSAG1、PSAG2 蛋白, 然后跨叶绿体外膜、内膜进入叶绿体基质, 最后定位于叶绿体基粒(类囊体)进行光反应发挥功能, 这之前研究的 PSAG 定位于叶绿体中的结论一致。蛋白质磷酸化是生物体内一种普通的调节方式, 在细胞信号转导的过程中起重要作用。磷酸化位点分析表明在 PSAG1 氨基酸肽链第 13、35 位发生丝氨酸磷酸化, 在肽链第 8、100 位苏氨酸发生磷酸化; 在 PSAG2 氨基酸肽链第 23、45 位发生丝氨酸磷酸化, 在肽链第 18、110 位苏氨酸发生磷酸化。这些磷酸化可能影响基因的构象和定位, 且磷酸化位点都在 PS -PSAK superfamily 这一结构功能域内, 可能对该结构功能域有调控作用。PSAG 的以上特征可能与该基因蛋白参与 PSI 中反应中心与外周天线蛋白之间的相互作用以及维持 PSI 的稳定性、避免光伤害的功能有关。

此外, Zhang 等^[14]还发现在盐藻(*Dunaliella salina*)的 PSAG 与耐盐性密切相关^[4]。蛋白质的磷酸化过程也是植物细胞发生抗性反应的重要步骤。本研究

中 PSAG 的丝氨酸磷酸化、苏氨酸磷酸化位点, 可能与其抗盐功能有关。

参考文献

- [1] 郭礼和. 美国《Science》杂志评出 2011 年十大科学突破——介绍光合系统的结构研究成果[J]. 中国细胞生物学学报, 2021, 34(3): 295-297.
- [2] 邓丽娜, 顾培育. 光系统 研究概述[J]. 山东林业科技, 2008, (5): 90-92.
- [3] Zygadlo A, Jensen PE, Leister D, et al. Photosystem I lacking the PSI-G subunit has a higher affinity for plastocyanin and is sensitive to photodamage[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1708: 154-163.
- [4] Zhang XN, Lin CF, Zhang HW, et al. Isolation and characterization of a salt-induced PsaG of photosystem in *Dunaliella salina*[J]. Mitochondrial DNA, 2002, 13(3): 173-177.
- [5] 赖钟雄, 陈源, 林玉玲, 等. 三明野生蕉基本生物学特性调查[J]. 亚热带农业研究, 2006, 2(4): 241-244.
- [6] 赖钟雄, 陈源, 林玉玲, 等. 福州野生蕉(*Musa* spp., AA Group)的发现及其分类学地位的初步确定[J]. 亚热带农业研究, 2007, 3(1): 1-5.
- [7] 陈源. 福建栽培和野生香蕉种质资源和离体保存及 RAPD 分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- [8] 张锐. 福建野生蕉资源 RAPD 分析、离体培养与 SOD 基因克隆[D]. 福州: 福建农林大学, 2011.
- [9] 陈红俊. 福州和泉州野生蕉 ISSR 分析及其离体保存初步研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [10] Liu WH, Lai ZX, Lai GT, et al. A study on taxonomic status and in vitro propagation of the wild banana(*Musa* spp., AB Group)from Huanxi Town in Fujian Province of China [A]. Guangzhou, China: 5th International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits[C], ISHS, 18-20 June, 2012.
- [11] 林鹤延. 转基因兰花培养物继代保持及文心兰 ACO 基因克隆与表达分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [12] 张妙霞. 野生香蕉(*Musa* spp., AB group)抗寒相关基因的克隆与表达分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [13] Ihalainen J A, P E Jensen, A Haldrup, et al. Pigment organization and energy transfer dynamics in isolated photosystem (PS) complexes from *Arabidopsis thaliana* depleted of the PS -G, PS -K, PS -L, or PS -N subunit[J]. Biophysical Journal, 2002, 83: 2190-2201.
- [14] 朱兆海. 拟南芥 *snc1* 相关突变体调控基因的确定及抗病功能研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.

责任编辑: 黄 艳