

烟草半胱氨酸蛋白酶的生物学分析

马世明¹, 罗家佐², 王德勋³, 户艳霞³, 范志勇³, 苏家恩^{3*} (1.大理州烟草公司南涧县分公司, 云南大理 675700; 2.大理州烟草公司巍山县分公司, 云南大理 672400; 3.云南省烟草公司大理州公司, 云南大理 671000)

摘要 [目的]研究烟草半胱氨酸蛋白酶的生物学特性。[方法]通过 PROTPARAM、CLUSTAL、MEGA、TMHMM、WOLF-PSORT、SOPMA 工具对烟草半胱氨酸蛋白酶的理化特性、进化树和跨膜结构进行生物学分析。[结果]NiCP-3 和 NiCP-4 氨基酸个数(361)最大, NiCP-5 氨基酸个数(349)最小; NiCP-1、NiCP-2、NiCP-3 和 NiCP-4 为酸性, NiCP-5 为碱性; NiCP 均属于稳定性蛋白, 且 NiCP-1 和 NiCP-2 的耐热性较好; NiCP-3 和 NiCP-4 属于亲水性蛋白, 其余为两性蛋白; NiCP 被分为 3 个亚组, NiCP-1 和 NiCP-2 为一组, NiCP-3 和 NiCP-4 为一组, NiCP-5 单独成一组; NiCP 均属于跨膜蛋白, 且 NiCP-5 具有 2 个跨膜结构。[结论]烟草半胱氨酸蛋白酶的生物学特性为广泛地参与烟草的生理反应奠定基础。
关键词 烟草; 半胱氨酸蛋白酶; 生物学
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)16-0017-03

Analysis on Biological of Cysteine Protease in Tobacco

MA Shi-ming¹, LUO Jia-zuo², WANG De-xun³ et al (1. Nanjian County Branch of Dali Tobacco Company, Dali, Yunnan 675700; 2. Weishan Branch of Dali Tobacco Company, Dali, Yunnan 672400; 3. Dali Prefecture Tobacco Company, Dali, Yunnan 671000)

Abstract [Objective] The research aimed to study the biological characteristics of tobacco cysteine protease. [Method] The physical and chemical properties, phylogenetic tree and transmembrane structure of tobacco cysteine protease were analyzed by using PROTPARAM, CLUSTAL, MEGA, TMHMM, WOLF-PSORT and SOPMA respectively. [Result] The amino acid numbers of NiCP-3 and NiCP-4 were the largest (361), and the NiCP-5 amino acid number was the smallest (349); NiCP-1, NiCP-2, NiCP-3 and NiCP-4 were acidic, and NiCP-5 was alkaline; NiCP belonged to the stability protein, and the heat resistance of NiCP-1 and NiCP-2 were better; NiCP-3 and NiCP-4 were hydrophilic proteins, and the rest were amphoteric proteins; NiCP was divided into three subgroups, NiCP-1 and NiCP-2 were one group, NiCP-3 and NiCP-4 were a group, and NiCP-5 was a single group; NiCP belonged to transmembrane protein, and NiCP-5 had 2 transmembrane structures. [Conclusion] The biological characteristics of tobacco cysteine protease laid the foundation for extensively participating in the physiological response of tobacco.
Key words Tobacco; Cysteine protease; Biology

半胱氨酸蛋白酶属于水解蛋白酶类的一部分, 催化底物反应^[1], 在植物的部分生理反应时参与其中, 如储存蛋白于细胞中的沉淀^[2], 或动员及降解^[3-4]; 抵抗或缓解非生物胁迫(盐胁迫、干旱和损伤等)^[1,5-6]、生物胁迫(病菌感染)^[7-8]; 参与植物细胞的衰老和程序性的死亡^[9-10]。近年来, 关于半胱氨酸蛋白酶的生物学研究主要集中在草莓^[11]、番木瓜^[12]、西瓜^[13]等, 而有关烟草半胱氨酸蛋白酶的生物学特性研究鲜见报道。笔者通过鉴定烟草半胱氨酸蛋白酶理化特性、分析各成员的进化树和跨膜结构, 为初步研究烟草半胱氨酸蛋白酶的特性提供依据。

1 材料与方法

1.1 烟草半胱氨酸蛋白酶家族成员的获取 通过美国 NCBI 数据库^[14], 获取烟草半胱氨酸蛋白酶的蛋白序列, 其登录号分别为 ABW71226.1、BAA96501.1、ACB70409.1、AAW78660.1 和 ADV41672.1, 并分别对其进行命名 NiCP-1、NiCP-2、NiCP-3、NiCP-4 和 NiCP-5^[15]。

1.2 方法 以理化特性 PROTPARAM 的工具^[16], 对烟草半胱氨酸蛋白酶的氨基酸数、分子量、理论等电点、不稳定指数、脂肪族指数和亲水性进行分析; 以 CLUSTAL 和 MEGA 工具^[17-18]对成员进行进化树分析; 以 TMHMM 工具^[19-20]分析

各成员的跨膜结构。

2 结果与分析

2.1 烟草半胱氨酸蛋白酶的理化特性分析 运用 PROTPARAM 对 NiCP 进行相关理化特性分析, 结果发现(表 1), NiCP-1 和 NiCP-2 的氨基酸数相等, 均为 360 个, NiCP-3 和 NiCP-4 均为 361 个氨基酸, NiCP-5 为 349 个氨基酸; 分子量较大的蛋白为 NiCP-4, 而 NiCP-5 的分子量最小; 经过烟草半胱氨酸蛋白酶的等电点测定, NiCP 的酸碱性存在分化, NiCP-1、NiCP-2、NiCP-3 和 NiCP-4 均呈现酸性, 且 NiCP-3 和 NiCP-4 的酸性相对较强, NiCP-5 呈现碱性; NiCP-3 和 NiCP-4 的不稳定指数相对较大, 但均小于 40, 即 NiCP 均属于稳定性蛋白; NiCP-1 和 NiCP-2 的脂肪指数较大, 即 NiCP-1 和 NiCP-2 的耐热性较好; NiCP-3 和 NiCP-4 的亲水性平均指数均小于 -0.5, 即 NiCP-3 和 NiCP-4 属于亲水性蛋白, NiCP-1、NiCP-2 和 NiCP-5 的值大于 -0.5, 且小于 0.5, 则 NiCP-1、NiCP-2 和 NiCP-5 属于两性蛋白质。

2.2 烟草半胱氨酸蛋白酶的进化树分析 运用 NiCP 的氨基酸序列与玉米和番茄的半胱氨酸蛋白酶的氨基酸序列进行同源比对, 并构建进化树, 结果如图 1 所示。根据同源性, 可将 NiCP 分为 3 个类别: 第 1 类为 NiCP-1 和 NiCP-2 与玉米的 CAA68192 的同源性最大, 其值为 100%; 第 2 类为 NiCP-3 和 NiCP-4 与番茄的 CEL26633 同源性较大, 其同源性为 85%; 第 3 类为 NiCP-5 与玉米的 ONL99021 和 ABW97700, 以及番茄的 AAM19209、AFP73354 和 AFP73353 的同源最大(88%), 表明烟草中的 NiCP-1 和 NiCP-2 聚成

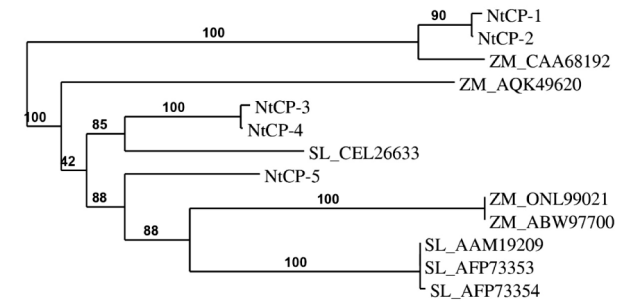
基金项目 中国烟草总公司云南省公司项目(2015YN20, 2016YN10)。
作者简介 马世明(1972—), 男, 云南南涧人, 助理农艺师, 从事烟叶生产技术指导工作。* 通讯作者, 高级农艺师, 硕士, 从事烟叶烘烤技术及烤房研究和推广工作。
收稿日期 2018-03-13

一类,NtCP-3 和 NtCP-4 聚成另一类,NtCP-5 为一类。通过进化树分析,说明烟草的 NtCP 具有多种保守性序列,每个 NtCP 具有特异的保守性序列,且该蛋白酶的进化与玉米和

番茄的进化较为相似,NtCP-1 和 NtCP-2 与 NtCP-3、NtCP-4、NtCP-5 的分化时间较长。

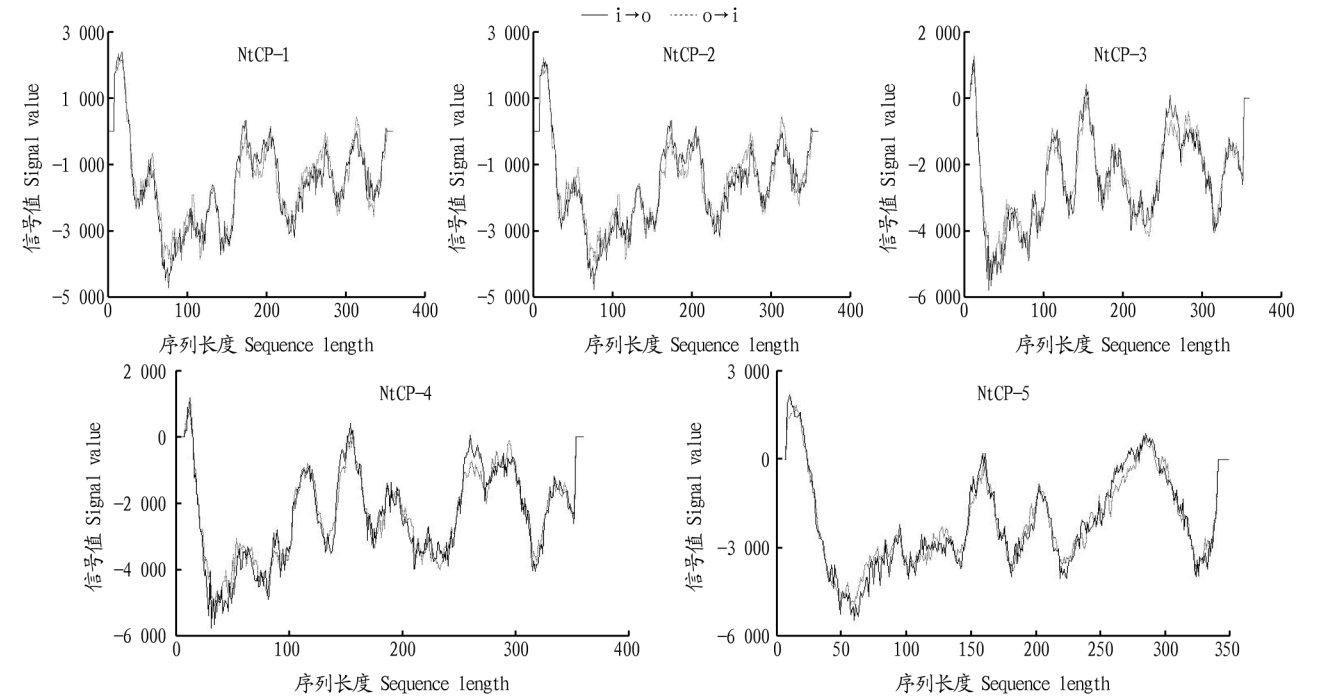
表 1 NtCP 的相关理化特性
Table 1 The related physicochemical properties of NtCP

蛋白名称 Protein name	氨基酸数 Amino acid number	分子量 Molecular weight	理论等电点 Theoretical isoelectric point	不稳定指数 Unstable index	脂肪族指数 Aliphatic Index	亲水性平均指数 Hydrophilic average index
NtCP-1	360	39 184.43	6.26	28.99	80.17	-0.141
NtCP-2	360	39 199.49	6.94	25.30	79.64	-0.150
NtCP-3	361	40 553.64	5.93	36.83	68.59	-0.578
NtCP-4	361	40 563.54	5.63	38.96	67.76	-0.568
NtCP-5	349	38 822.97	7.97	27.46	69.08	-0.412



注:NtCP 表示的物种为烟草;ZM 表示的物种为玉米;SL 表示的物种为番茄
Note:NtCP represents species of tobacco;ZM represents corn;SL represents tomatoes

图 1 烟草半胱氨酸蛋白酶与玉米和番茄的进化树
Fig.1 Phylogenetic tree of tobacco cysteine protease with corn and tomato



注:i 表示膜内,o 表示膜外
Note:i indicates that in the membrane,o represents the outer membrane

2.3 烟草半胱氨酸蛋白酶的跨膜结构分析 由于蛋白的跨膜结构存在,有利于蛋白锚定于质膜上,进而在特定的位置发挥作用。因此,对 NtCP 进行跨膜结构的预测,详情如图 2。从图 2 可看出,NtCP 各成员均包含多个跨膜螺旋域,NtCP-1 和 NtCP-2 共同具有 3 个从内向外的跨膜螺旋域,分别处于 164~184 位(score=321)、198~216 位(score=153)、343~360 位(score=92)的氨基酸,其特有的分别为 4~29(score=2391)、6~22(score=2219),而从外向内共有的跨膜螺旋域为 2 个,分别处于 195~215(score=7)、305~325(score=464),其特有的分别为 6~29(score=2220)、6~22(score=2219);NtCP-3 和 NtCP-4 共同具有 3 个从内向外的跨膜螺旋域,分别为 4~21(score=1229)、147~165(score=424)、251~271(score=76),从外向内共有的跨膜螺旋域为 1 个 148~165(score=127),其特有的分别为 4~21(score=913)、3~19(score=810);NtCP-5 从内向外的跨膜螺旋域为 3 个,分别

图 2 NtCP 的跨膜结构
Fig.2 Transmembrane structure of NtCP

为3~22(score=2193)、151~168(score=214)和274~294(score=872),从外向内的跨膜螺旋域为2个,分别为6~24(score=1829)和274~294(score=761)。当score>500时,蛋白序列存在跨膜结构的可能性较大。综上所述,NtCP-1、NtCP-2、NtCP-3和NtCP-4均具有1个跨膜结构,分别位于相应序列的第4~29、6~22、4~21和4~19位氨基酸;NtCP-5具有2个跨膜结构(6~22和274~294)。

3 结论与讨论

通过检测烟草半胱氨酸蛋白酶的等电点,NtCP-1、NtCP-2、NtCP-3和NtCP-4呈酸性,NtCP-5呈碱性,有利于NtCP在酸碱环境保持活性,且NtCP均属于稳定性蛋白,进而为其广泛地参与植物的生理反应提供保障^[21];NtCP-1和NtCP-2的热稳定性较强,且属于两性蛋白质,即有利于NtCP-1和NtCP-2参与较多的生理反应;通过进化树分析,NtCP被分为3个亚组,表明烟草半胱氨酸蛋白酶在进化的过程中发生分化,进而分化为不同类型的蛋白家族(Papain、legumain、caspase、calpain)^[1-2,22-23];烟草半胱氨酸蛋白酶均含有跨膜结构,且均位于蛋白序列的N端,表明NtCP属于跨膜蛋白,进而有助于膜外的N端接受信号,作用于效应区域(蛋白序列的C端),从而发挥作用^[24]。

参考文献

[1] WIEDERANDERS B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides[J]. *Acta biochimica polonica*, 2003, 50(3): 691-713.

[2] GRUDKOWSKA M, ZAGDA ŃSKA B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases[J]. *Acta biochimica polonica*, 2004, 51(3): 609-624.

[3] JONES J T, MULLET J E. A salt-and dehydration-inducible pea gene, *Cyp15a*, encodes a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine proteases[J]. *Plant molecular biology*, 1995, 28(6): 1055-1065.

[4] BECKER C, SENYUK V I, SHUTOV A D, et al. Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage-protein mobilization[J]. *European journal of biochemistry*, 1997, 248(2): 304-312.

[5] SIMOVA-STOILLOVA L, VASEVA I, GRIGOROVA B, et al. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery[J]. *Plant physiol biochem*, 2010, 48(2/3): 200-206.

[6] MACIEL F M, SALLES C M C, RETAMAL C A, et al. Identification and partial characterization of two cysteine proteases from castor bean leaves (*Ricinus communis* L.) activated by wounding and methyl jasmonate stress[J]. *Acta physiologiae plantarum*, 2011, 33(5): 1867-1875.

[7] ROJO E, MARTÍN R, CARTER C, et al. VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens[J]. *Current biology*, 2004, 14(21): 1897-1906.

[8] HAO L, HSIANG T, GOODWIN P H. Role of two cysteine proteinases in the susceptible response of *Nicotiana benthamiana* to *Colletotrichum destructivum* and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*[J]. *Plant science*, 2006, 170(5): 1001-1009.

[9] BHALERAO R, KESKITALO J, STERKY F, et al. Gene expression in autumn leaves[J]. *Plant physiology*, 2003, 131(2): 430-442.

[10] KUSAKA K, TADA Y, SHIGEMI T, et al. Coordinate involvement of cysteine protease and nuclease in the executive phase of plant apoptosis[J]. *FEBS Letters*, 2004, 578(3): 363-367.

[11] 朱海生, 温庆放. 草莓半胱氨酸蛋白酶基因 *FaCP* 的克隆及表达分析[C]//中国园艺学会. 中国园艺学会 2012 年学术年会论文摘要集. 北京: 中国园艺学会, 2012: 1.

[12] 申艳红, 陈晓静, 蔡雪玲, 等. 番木瓜半胱氨酸蛋白酶基因 *CpCP* 的分离及表达分析[J]. *园艺学报*, 2015, 42(9): 1789-1797.

[13] 阳永学, 程维舜, 曾红霞, 等. 西瓜半胱氨酸蛋白酶基因 *CICP1* 克隆及其生物信息学分析[J]. *安徽农业科学*, 2013, 41(28): 11286-11288, 11319.

[14] EDGAR R, DOMRACHEV M, LASH A E, et al. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository[J]. *Nucleic acids research*, 2002, 30(1): 207-210.

[15] 陈二龙, 苏家恩, 范志勇, 等. Bright Yellow 2 烤烟热激蛋白 90 生物信息学分析[J]. *南方农业学报*, 2017, 48(10): 1734-1740.

[16] LIU S C, ZHAO Y J, ZHANG X, et al. Bioinformatic analysis of function and structure of putative nucleocapsid protein sequences of SARS-CoV[J]. *Journal of Chinese biotechnology*, 2003, 23(12): 99-102.

[17] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.

[18] BAILEY T L, ELKAN C. The value of prior knowledge in discovering motifs with MEME[C]//Proceedings of the third international conference on intelligent systems for molecular biology. Menlo Park, CA: AAAI Press, 1995: 21-29.

[19] CHEN Y J, YU P, LUO J C, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT[J]. *Mammalian genome*, 2003, 14(12): 859-865.

[20] HORST R T, LOKKEMA J S. Rapid screening of membrane topology of secondary transport proteins[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2010, 1798(3): 672-680.

[21] 闫龙凤, 杨青川, 韩建国, 等. 植物半胱氨酸蛋白酶研究进展[J]. *草业学报*, 2005, 14(5): 11-19.

[22] FISCHER J, BECKER C, HILLMER S, et al. The families of papain-and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: Developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis[J]. *Plant molecular biology*, 2000, 43(1): 83-101.

[23] SUBBAIAH C C, KOLLIPARA K P, SACHS M M. A Ca^{2+} -dependent cysteine protease is associated with anoxia-induced root tip death in maize[J]. *Journal of experimental botany*, 2000, 51(345): 721-730.

[24] SLEE E A, HARTE M T, KLUCK R M, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner[J]. *Journal of cell biology*, 1999, 144(2): 281-292.

(上接第10页)

[17] 李广毅, 高国雄, 吕悦来, 等. 三种灌木植物形态特征及解剖结构的对比观察[J]. *水土保持研究*, 1995, 2(2): 141-145.

[18] 李正理, 李荣放. 我国甘肃九种旱生植物同化枝的解剖观察[J]. *植物学报*, 1981, 23(3): 181-185.

[19] 陈庆诚, 孙仰文, 张国梁. 疏勒河中游植物群落优势种生态-形态、解剖特性的初步研究[J]. *兰州大学学报(自然科学版)*, 1961(3): 61-96.

[20] YANG G, WANG C G. A preliminary study on the xeromorphic structures of some plants in xinjiang. Utilization and development of natural resources in arid and semi-arid lands[M]. Beijing: Science Press, 1989.

[21] 蒲汉丽, 许明宪. 杏叶片耐旱的解剖学和生理学特性初步研究[J]. *甘肃农业科技*, 1990(2): 14-16.

[22] 杨戈, 王常贵. 罗布泊地区几种旱生植物茎、叶结构的初步研究[J]. *干旱区研究*, 1984(1): 57-63.

科技论文写作规范——文内标题

文章内标题力求简短,一般不超过20字,标题内尽量不用标点符号。标题顶格书写,文内标题层次不宜过多,一般不超过4级,分别以1;1.1;1.1.1;1.1.1.1方式表示。