

烟草 β -1,3-葡聚糖酶的特性和结构分析

刘彪, 杨柳*, 罗万麟, 赵爽, 殷雪艳 (凉山州烟草公司, 四川西昌 615000)

摘要 [目的]对烟草 β -1,3-葡聚糖酶的特性和结构进行分析。[方法]以烟草为材料,采用 PROTS-SCALE、TargetP 1.1、NPSA-PRABI 和 SWISS-MODEL 工具分别测定烟草葡聚糖酶的疏/亲水性、亚细胞定位、二级结构和三级结构。[结果]NtBGL 属于亲水性蛋白,NtBGL-1 和 NtBGL-2 的疏/亲水性较为相似,N 端和中部区域的疏水性较强,NtBGL-3 以 N 端的疏水性较强;NtBGL 均含有信号肽,且其切割位点分别位于第 21、32 和 29 位氨基酸处,NtBGL-1 和 NtBGL-2 定位于液泡,NtBGL-3 定位于细胞外;NtBGL 的二级结构均以 α -螺旋比例最大,依次为 36.21%、35.14%、35.28%,三级结构呈现“C”型。[结论]该研究可为有效发挥烟草葡聚糖酶的功能特性奠定基础。

关键词 烟草; β -1,3-葡聚糖酶;结构;特性

中图分类号 S572 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)18-0076-03

Characterization and Structure Analysis of Tobacco β -1,3-Glucanase

LIU Biao, YANG Liu, LUO Wan-lin et al (Liangshan Tobacco Company, Xichang, Sichuan 615000)

Abstract [Objective] To study the characteristics and structure of tobacco β -1,3-glucanase. [Method] Tobacco was used as test material, PROTS-SCALE, TargetP 1.1, NPSA-PRABI and SWISS-MODEL tools were used to determine the hydrophile/hydrophilicity, subcellular location, secondary structure and tertiary structure of tobacco glucanase. [Result] NtBGL belonged to the hydrophilic protein, NtBGL-1 and NtBGL-2 had similar sparse/hydrophilic properties, N-terminal and central region had strong hydrophobic, NtBGL-3 only had hydrophobicity at N-terminal. NtBGL contained a signal peptide with cleavage sites at amino acids 21, 32 and 29, NtBGL-1 and NtBGL-2 localized to the vacuole, and NtBGL-3 localized outside the cell. The secondary structure of NtBGL in alpha helix proportion was the largest, followed by 36.21%, 35.14%, 35.28%. The tertiary structure showed “C” type. [Conclusion] The study can lay a foundation for playing the functional properties of tobacco glucanase.

Key words Tobacco; β -1,3-glucanase; Structure; Characteristics

β -1,3-葡聚糖酶具有两种重要的功能^[1],一种为降解植物细胞壁,促使植物体软化^[2],另一种为病原微生物入侵时,体内葡聚糖酶的含量和活性增加,从而抵抗真菌和细菌的入侵^[3-5]。植物葡聚糖酶的含量和活性增加,不仅可以依靠外来微生物的入侵,还可以通过外源植物激素,如水杨酸和乙烯等^[6-8],进而增加植物的抗性。研究表明,根据植物葡聚糖酶的定位和功能特性,葡聚糖酶被划分为四类:碱性葡聚糖酶(定位于液泡)、酸性葡聚糖酶(定位于胞间隙)、胞外诱导型和胞外非诱导型葡聚糖酶^[9],碱性葡聚糖酶具有破坏并降解病原菌细胞壁的作用^[10],而酸性葡聚糖酶无抑制病菌的活性^[11]。目前,对于烟草葡聚糖酶的研究主要为烟草相关病原微生物与葡聚糖酶的关系^[12-15]。笔者通过生物分析法,更深刻地研究烟草葡聚糖酶的序列特性,以期为进一步发挥烟草葡聚糖酶的功能特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 筛选烟草 β -1,3-葡聚糖酶家族成员 采用 PROTEIN^[16] 数据库在线检索,筛选烟草葡聚糖酶相关的蛋白序列,获取的登录号分别是 AAA63541.1、ACF93731.1 和 AAA63542.1,依据优势氨基酸和氨基酸数进行命名,分别为 NtBGL-1、NtBGL-2 和 NtBGL-3^[17]。

1.2 方法 采用 Hphob./ Kyte & Doolittle 法,且利用线性的重量变化模型,以 PROTS-SCALE 工具^[18]测定烟草葡聚糖酶序列的疏/亲水性;使用 TargetP 1.1 的在线服务^[19],获取烟草葡聚糖酶的亚细胞结构及其相关数据;采用 NPSA-PRABI 工具^[20],测定烟草葡聚糖酶的二级结构,其 Similarity thresh-

old 值为 8,构象类型为 4;使用 SWISS-MODEL 工具^[21],根据同源相似原理,构建烟草葡聚糖酶的三级结构。

2 结果与分析

2.1 烟草 β -1,3-葡聚糖酶的疏/亲水性分析 由图 1 可知,NtBGL-1 和 NtBGL-2 疏/亲水性较为相似,含有相同的最大值(2.956)甘氨酸,即疏水性相对较强,但位置不同,NtBGL-1 的最大值位于第 8 位甘氨酸,而 NtBGL-2 位于第 19 位甘氨酸,此外,NtBGL-1 和 NtBGL-2 含有相同的最小值(-2.833)精氨酸,即亲水性相对较强,NtBGL-1 的最小值位于第 231 位精氨酸,NtBGL-2 位于第 242 位精氨酸,2 组序列均以 N 端和中部区域的疏水性较强,整体的疏/亲水性值分别为-0.112 和-0.137,则 NtBGL-1 和 NtBGL-2 均为亲水性蛋白;NtBGL-3 以第 18 位甘氨酸值最大(3.356),即疏水性相对较强,以第 317 位天冬酰胺的最小(-2.500),即亲水性相对较强,且该序列仅以 N 端的疏水性较强,整体的疏/亲水性值为-0.113,则 NtBGL-3 属于亲水性蛋白。综上所述,NtBGL 的各成员均属于亲水性蛋白,且疏水区域为 N 端。

2.2 烟草 β -1,3-葡聚糖酶的亚细胞定位和二级结构分析 为明确 NtBGL 属于 4 种类型的哪几种,以及在特定的亚细胞中发挥作用,依据氨基酸序列的信号肽对 NtBGL 进行亚细胞定位。由表 1 可知,序列长度为 359 aa 的 NtBGL-1,在第 21 位存在切割位点(概率为 0.967),根据信号肽判断 NtBGL-1 可能定位于液泡或细胞外,但定位于液泡的分值(4.0)大于细胞外(1.0),因此 NtBGL-1 定位于液泡;NtBGL-2 的序列长度为 370 aa,于第 32 位处存在切割位点(概率为 0.838),定位于液泡内,其可靠性相对较低,级别为 2;NtBGL-3 定位于细胞外,其切割位点位于 343 aa 的第 29 号,概率最大(0.991),且级别为 1。NtBGL 二级结构在一定程度上决定高级结构,

作者简介 刘彪(1990—),男,四川眉山人,硕士,从事烟草标准化研究。*通讯作者,助理农艺师,从事烟草标准化研究。

收稿日期 2018-04-02

影响蛋白序列的功能,为此,对 NtBG1 序列的无规则卷曲、 β -折叠、 β -转角和 α -螺旋组成含量进行分析。由图 2 可知, NtBG1-1、NtBG1-2 和 NtBG1-3 的无规则卷曲分布无规律可寻,其所占比例依次为31.75%、33.78%、31.78%;NtBG1-1和

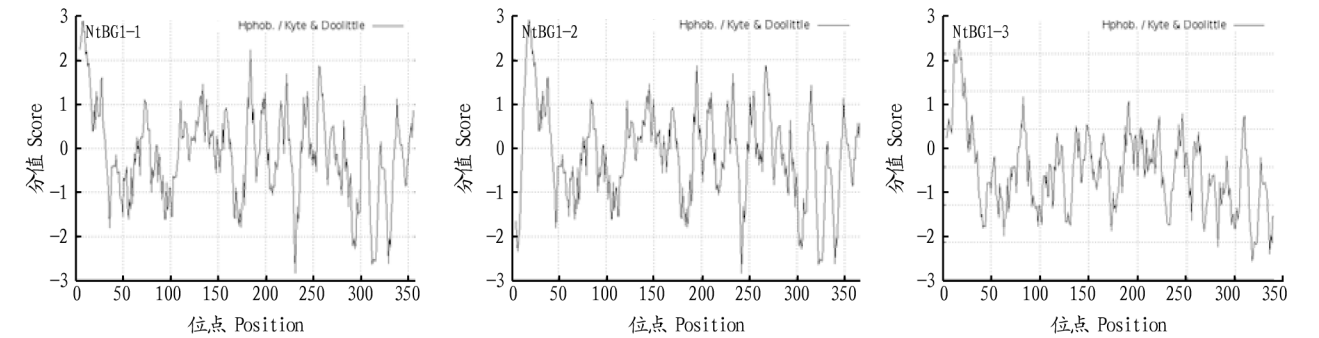


图 1 NtBG1 的疏/亲水性分布
Fig.1 The sparse/hydrophilic distribution of NtBG1

名称 Name	位点 Position	信号肽的概率 Probability of signal peptide	切割位点 Cleavage site	定位 Positioning		RC
				液泡 Vacuole	细胞外 Extracellular	
NtBG1-1	359	0.967	21	4.0	1.0	1
NtBG1-2	370	0.838	32	4.5	—	2
NtBG1-3	343	0.991	29	—	11.0	1

注:RC 表示可靠性级别(1~5),“1”的可靠性最强
Note:RC was the level of reliability(1-5),and “1” was the most reliable

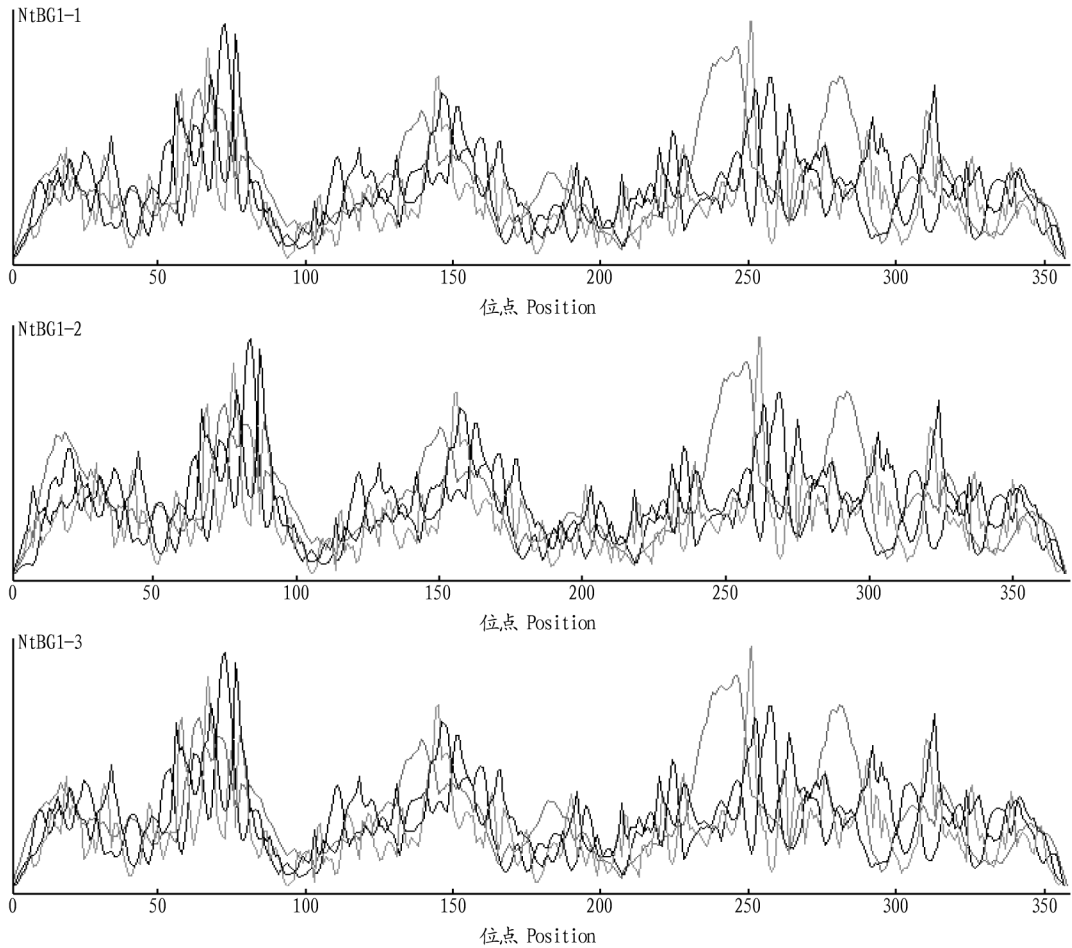


图 2 NtBG1 的二级结构分布
Fig.2 Secondary structure distribution of NtBG1

NtBGL-2 的 β -折叠相对集中,而 NtBGL-3 较为分散,所占比例依次为 21.73%、21.35%、20.12%; β -转角于整个序列中所占的比例最小,依次为 10.31%、9.73%、12.83%;NtBGL-1 和 NtBGL-2 的 α -螺旋在序列中表现为每隔 50 个氨基酸出现 1 次较为集中的 α -螺旋序列,而 NtBGL-3 仅表现在中间和 C 端区域,NtBGL 的 α -螺旋所占比例最大,分别为 36.21%、35.14%、35.28%。

2.3 烟草 β -1,3-葡聚糖酶的三级结构分析 经 Blast 和 HHBlits 的同源比对方法,依据 NtBGL 的氨基酸序列,检索 SWISS-MODEL 的三级结构数据库,经筛选,以巴西橡胶树的糖基化 β -1,3-葡聚糖酶的晶体结构和马铃薯内切-1,3- β -葡聚糖酶为模板(其模板序列分别 4hpg.1 和 4gzi.1),构建

NtBGL 的三级结构,结果如图 3。NtBGL-1 和 NtBGL-2 依据巴西橡胶树的糖基化 β -1,3-葡聚糖酶的晶体结构,构建三级结构,其中 NtBGL-1 以 0.87% 的覆盖率和 63.78% 的相似度获得其三级结构,含有的 β -折叠、 β -转角和 α -螺旋数依次为 22、30 和 16 个;NtBGL-2 的覆盖率为 0.84%,其相似度为 64.10%,二级结构数与 NtBGL-1 相同;NtBGL-3 依据马铃薯内切-1,3- β -葡聚糖酶构建三级结构,覆盖率和相似度均最大,分别为 0.92% 和 79.30%, β -折叠、 β -转角和 α -螺旋数分别为 21、33 和 17 个;NtBGL-1、NtBGL-2 和 NtBGL-3 的三级结构均表现为“C”型,因此,NtBGL 通过中间的功能域参与相应的生理反应。

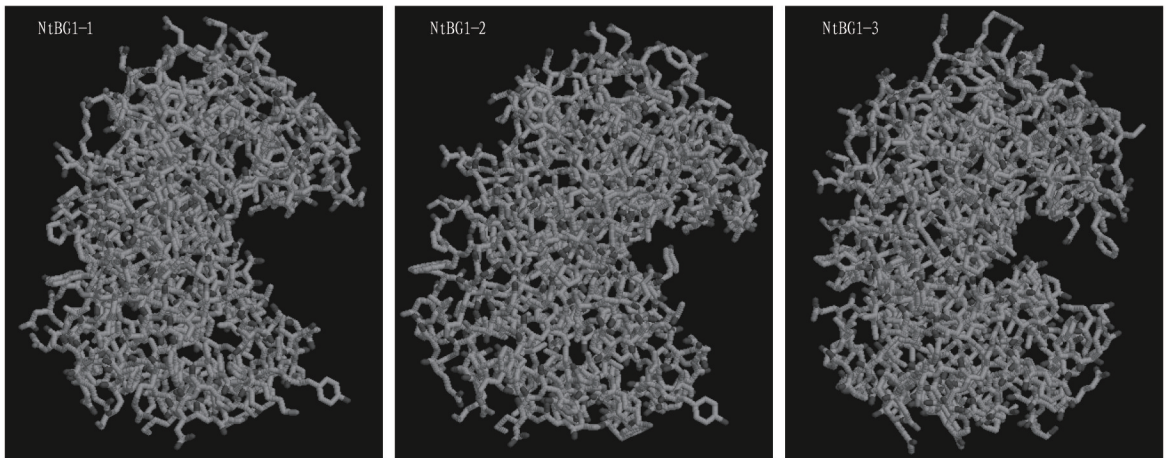


图 3 NtBGL 的三级结构分布

Fig.3 The tertiary structure distribution of NtBGL

3 结论与讨论

NtBGL 的各成员均属于亲水性蛋白,且疏水区域为 N 端,有利于 NtBGL 形成跨膜结构,锚定于特定的质膜上发挥作用^[22];NtBGL-1 和 NtBGL-2 均定位于液泡中,表明该蛋白属于碱性 β -1,3-葡聚糖酶,即该蛋白可能参与降解病原菌菌丝,增加植物的抗性^[23];NtBGL-3 属于酸性 β -1,3-葡聚糖酶^[9];NtBGL-1、NtBGL-2 和 NtBGL-3 的二级结构均以 α -螺旋的比例最大,有利于保证三级结构的稳定^[17];NtBGL 的三级结构表现为“C”型,说明该酶的催化活性区可能位于空间结构的凹陷处。

参考文献

- [1] SELITRENNIKOFF C P. Antifungal proteins[J]. Applied & environmental microbiology, 2001, 67(7): 2883-2894.
- [2] CHOURASIA A, SANE V A, SINGH R K, et al. Isolation and characterization of the *MiCel1* gene from mango: Ripening related expression and enhanced endoglucanase activity during softening[J]. Plant growth regulation, 2008, 56(2): 117-127.
- [3] COLLINGE D B, SLUSARENKO A J. Plant gene expression in response to pathogens[J]. Plant molecular biology, 1987, 9(4): 389-410.
- [4] LIU A X, DONG H S, LIANG Y C, et al. Inhibition of tobacco chitinase and beta-1,3-glucanase to some pathogenic fungi[J]. Microbiology, 1999, 26(1): 15-17.
- [5] 欧阳波, 李汉霞, 叶志彪. 植物 β -1,3-葡聚糖酶及其基因[J]. 中国生物工程杂志, 2002, 22(6): 18-23.
- [6] ZAVALIEV R, UEKI S, EPEL B L, et al. Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata[J]. Protoplasma, 2011, 248(1): 117-130.
- [7] DOXEY A C, YAISH M W F, MOFFATT B A, et al. Functional divergence

- in the *Arabidopsis* β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states[J]. Molecular biology & evolution, 2007, 24(4): 1045-1055.
- [8] LANGEBAERTS C, ERNST D, KANGASJÄRVI J, et al. Ozone effects on plant defense[J]. Methods in enzymology, 2000, 319: 520-535.
- [9] 何江峰, 韩冰, 赵宏鑫. 植物 β -1,3-葡聚糖酶的研究进展[J]. 内蒙古农业科技, 2006(5): 21-25.
- [10] VAN KAN J A L, JOOSTEN M H A J, WAGEMAKERS C A, et al. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*[J]. Plant molecular biology, 1992, 20(3): 513-527.
- [11] MAUCH F, STAEHELIN L A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves[J]. Plant cell, 1989, 1(4): 447-457.
- [12] 迟彦, 大豆 β -1,3-葡聚糖酶基因转化烟草及抗病性的研究[J]. 大连大学学报, 2001, 22(6): 37-41.
- [13] PAZ LAGO D, GUTIERREZ A, LUZARDO L. Biological relevance of beta 1,3 glucanase enzyme to activate the systemic resistance of tobacco as induced by fungal cell wall[J]. Cultivos tropicales, 1998, 19(3): 25-27.
- [14] KANG M K, PARK K S, CHOI D. Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco[J]. Molecules & cells, 1998, 8(4): 388-392.
- [15] REPKA V, TAMÁS L, FISCHEROVÁ I, et al. Identification and partial characterization of beta-1,3-glucanase from virus-infected cucumber cotyledons[J]. Acta virologica, 1997, 41(1): 35-39.
- [16] SAYERS E. NCBI protein resources[M]// MCENTYRE J, OSTELL J. The NCBI handbook. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, 2013.
- [17] 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.

(下转第 94 页)

林地综合利用效率,增加林农收益。

利用林下土地资源,大力发展林业多目标复合经营,可有效缓解林、农、牧矛盾。开展竹林生态立体复合经营模式,开发林笋、林林、林酒、林禽、森林休闲等复合经营模式与技术,转变经营模式,是转变林业经济增长方式、促进林农增收的重要途径。依托彩色健康森林建设、村庄绿化、竹林资源等森林资源,充分利用乡村景观,结合乡土文化、乡村民俗等文化内涵,发展“农家乐”、森林人家等森林休闲养生业,开发富有地方特色的森林食品、竹林鸡、竹筒酒等森林旅游商品。通过三产开发反哺一产发展,将森林旅游与森林休闲、三笋开发、竹制品加工、茶叶采摘、椅业发展等相结合,一二三产协调经营竹林,发展以森林休闲养生业为主的林下经济。

刘家塘村从 2013 年开始转变竹林经营模式,开始发展竹林复合经营,竹林产值明显增加,从 2011 年的 1.5 万元/hm² 增加到 2015 年的 9.0 万元/hm²,产值增加了 6 倍,这说明竹林复合经营可以明显提高竹林效益,增加林农收入。

4.2 发展生态循环经济 充分利用有限的林地资源,发展林下经济,符合当前我国发展循环经济、建设节约型社会的客观要求。为了实现“以林养林”的可持续发展目标,需要立足生态,以林地生态系统为载体,通过林下土壤、空间及生物资源的循环综合利用,有效提高林地的经济产出和土地利用效率,突破退耕还林后农民致富的瓶颈,达到经济、生态和社会效益的有机统一^[7]。发展林下经济进行种植养殖生产活动,不是简单地把传统的种植养殖生产活动移植到林下来进行,而是一种层次更高的生产,是生态林业。还可发展有机林业、循环林业,使林下复合生态系统实现结构稳定、清洁运转、良性循环。还可以与当前的休闲、观光林业、体验林业相结合,丰富现代林业的内涵^[5]。

刘家塘村以狮子石毛竹现代园为基础发展森林休闲养生业,将园区逐步变成景区。同时,充分利用竹林下空间和优良的竹林生态环境,发展竹林鸡、竹筒酒等生态健康食品,竹林为林下经济创造了赖以生长的发展环境,林下经济反过来又对树木生长和林分质量产生明显促进作用。据测算,发展林下经济地区的树木,生长量比一般林地平均高 15%~20%^[8]。林下种植、栽培、养殖还可对林木产生以耕代抚、改善土壤、扩大肥力、增加浇灌、防虫治虫等附带效应。林下经济发展反哺竹林发展,两者相辅相成,最终走出了一条近期得利、长期得利、远近结合、以短补长的新路子。如刘家塘村在竹林下养殖竹林鸡,竹林鸡充分利用竹林下的广阔空间,以林下杂草和各种虫类为主食,以玉米、稻谷等杂粮为辅食,

大大节省饲养成本,同时竹林鸡的粪便又可以作为肥料还到土壤,大大增加土壤有机质含量,促进毛竹生长(图 2)。一条生态循环经营发展的路子,不断推动环境提升、竹林发展和林农增收。

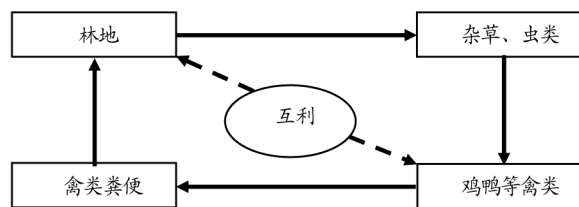


图 2 林禽模式^[4]

Fig.2 The diagram of the under-forest economy with poultry

4.3 发展林下经济技术推广与示范 上墅乡刘家塘村依托竹林资源,大力推进林下经济建设,发展林下种植、林下养殖、竹筒酒和森林生活体验,以森林三产反哺一产,以“合作社+农户+村民”形式,逐步形成以竹林复合经营为主的刘家塘模式,目前全村经营竹林面积 33.33 hm²,产值 9 万元/hm²。在刘家塘村抓好一批不同类型的林下经济示范基地,培育一批典型的林下经济大户,逐步宣传发展林下经济给林农增收带来的效益,宣传林下经济大户、公司、合作社的成功经验,激发群众发展林下经济的热情和积极性。

发展林下经济,倡导分类经营,根据自然条件,偏远和高山、交通不便、生产成本过高的竹林逐步退出生产经营,采用封山育林和人工促进,改造成林分质量更高、生态更安全的混交林、阔叶林;中下坡位的竹林采用“捏油、钩梢、护笋养竹、按年龄和密度合理砍伐”粗放、生态的经营方针;交通便利、坡度适宜、山脚小面积立地条件好的竹林高强度经营,开发笋用林或者林下套种等,获取较高的效益。

参考文献

- [1] 崔明杰,王玉华,柏鲁林,等.商河县林下经济种养模式及效益分析[J].中国林副特产,2012(4):97-100.
- [2] 彭斌,刘俊昌.基于 DEA 模型的广西林下经济发展效率研究[J].广西民族大学学报(哲学社会科学版),2014,36(1):168-172.
- [3] 沈振志,王义山,刘玉英,等.大力发展林下经济 拓宽农民致富道路[J].吉林农业,2012(1):125.
- [4] 林文树,周沫,吴金卓.基于 SWOT-AHP 的黑龙江省林下经济发展战略分析[J].森林工程,2014,30(4):172-177.
- [5] 袁顺全,王锐,韩洁,等.适合生态涵养区农业发展的林下经济模式:以北京市怀柔区为例[J].中国食物与营养,2010(11):26-29.
- [6] 卢春英.龙岩市林下经济发展规划[J].现代农业科技,2015(14):190-193.
- [7] 范远江,袁淑清.民族地区林下经济发展模式解析:以三峡库区石柱县为例[J].黑龙江民族丛刊,2011(3):50-55.
- [8] 万小军,孔霞,吴雅丽,等.发展林下经济 走可持续“森林重庆”之路:城郊型林下经济初探[J].南方农业,2010(11):15-17.

(上接第 78 页)

- [18] JAMAL S,SUNITA.Study of transmembrane protein using bioinformatics and data mining[J].Asian journal of bio science,2014,9(1):71-75.
- [19] ZYBAILOV B,RUTSCHOW H,FRISO G,et al.Sorting signals,N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome[J].PLoS One,2008,3(4):1-19.
- [20] 赵浩,赵立卿,巩校东,等.玉米大斑病菌 Homeobox 转录因子家族全基因组鉴定及其表达规律分析[J].中国农业科学,2017,50(4):669-678.

- [21] GUEX N,PEITSCH M C,SCHWEDE T.Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer:A historical perspective[J].Electrophoresis,2009,30(S1):S162-S173.
- [22] 马云,骆莹莹,李芬,等.牛 ANGPLT4 基因结构和功能的生物信息学分析[J].江西农业大学学报,2010,32(1):135-140.
- [23] ANFOKA G,BUCHENAUER H.Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus[J].Physiological & molecular plant pathology,1997,50(2):85-101.