

毛果杨全基因组磷酸根转运蛋白 家族成员序列分析

王 策¹, 秦静静¹, 甘红豪¹, 李 红², 罗志斌^{1,3}

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100; 3. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 磷酸根转运蛋白是一类主动转运磷酸根的重要载体蛋白。主要探讨毛果杨 *Populus trichocarpa* 全基因组中磷酸根转运蛋白 (phosphate transporter) 家族成员的系统发生和部分成员的理化性质、结构特点及亚细胞定位。以从毛果杨全基因组数据库中搜索并筛选得到的目标蛋白序列为基础, 利用相关生物信息学软件对其进行系统发育分析, 并利用一系列在线服务器对部分成员的理化参数、亲/疏水性、跨膜域、二级结构、三级结构和亚细胞定位进行了重点分析。结果表明, 在毛果杨全基因组中共发现了 31 个磷酸根转运蛋白家族成员, 根据其序列相似性, 可分为 4 个亚家族, 即 PtrPHT1, PtrPHT2, PtrPHO1 和 PtrPHO2; PHT 亚家族内的序列相似性高于 PHO, 并且高度保守; 它们均为疏水性的全 α 型蛋白质, PHTs 一般具有 12 个跨膜域, 多于 PHOs; 不同亚家族成员的亚细胞定位不尽相同。因此, 毛果杨磷酸根转运蛋白不同亚家族间分开较早, 它们在杨树磷素代谢中可能起着不同的作用, 共同维持并调控杨树体内的磷素平衡。图 6 表 4 参 17

关键词: 生物化学; 磷素; 杨树; 基因组; 序列分析; 生物信息

中图分类号: S718.3; Q51 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2012)04-0516-11

Genome-wide analysis of the phosphate transporter gene family in *Populus trichocarpa*

WANG Ce¹, QIN Jing-jing¹, GAN Hong-hao¹, LI Hong², LUO Zhi-bin^{1,3}

(1. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 2. College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China; 3. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: Phosphate transporters are a family of proteins which actively transport phosphate. To investigate members of phosphate transporter family and their physical, chemical and structural properties in the woody model *Populus trichocarpa*, phylogenesis of the phosphate transporter family members and their physical, chemical, structural properties as well as sub-cellular locations of four phosphate transporters (PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1, and PtrPHO1-N1) from the sequenced genome of *Populus trichocarpa* were studied. A phylogenetic analysis of the transporters was conducted using local bioinformatics software, such as CLUSTALX 2.0, GeneDOC, and MEGA5. In addition, online bioinformatics software was utilized to analyze the physical and chemical properties, hydrophilicity/hydrophobicity, transmembrane domains, secondary and three-dimensional structures, and sub-cellular locations. Results showed 31 phosphate transporters in the *P.*

收稿日期: 2011-08-10; 修回日期: 2011-11-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划)项目 (2012CB416902); 国家自然科学基金资助项目 (31070539); 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-08-0468); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20090204110027); 霍英东教育基金会资助项目 (121026)

作者简介: 王策, 从事植物分子生物学研究。E-mail: wangce_@126.com。通信作者: 罗志斌, 教授, 博士生导师, 从事植物生态生理与分子生理研究。E-mail: luozhibin@nwsuaf.edu.cn

trichocarpa genome divided into four subfamilies (PtrPHT1, PtrPHT2, PtrPHO1, and PtrPHO2) according to their sequencing similarities. The sequence identity of amino acids within PtrPHT's was higher than in PtrPHO's, and was highly conserved. The transporters were hydrophobic α -protein. Also, PtrPHT's contained 12 transmembrane domains which were more than the PtrPHO's with the PtrPHT family members being located at different sub-cellular locations. Therefore, phosphate transporter subfamilies in *P. trichocarpa* could have separated in an early stage during their evolutionary processes, and these transporters could have played different roles in phosphorus metabolism to maintain phosphorus homeostasis for changing phosphorus conditions. [Ch, 6 fig. 4 tab. 17 ref.]

Key words: biochemistry; phosphorus; *Populus*; genome; sequence analysis; bioinformatics

磷酸根转运蛋白是一类广泛存在于微生物、植物及动物膜系统中主动转运磷酸根的载体蛋白。磷酸根转运蛋白分为 PHT 和 PHO 等 2 类, 其中 PHO 是 PHT 在进化过程中形成的突变体^[1]。在不同植物中, PHT 的亚家族数不尽相同, 如水稻 *Oryza sativa* 具有 PHT1, PHT2 和 PHT3^[2], 而拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 具有 6 个 PHT 亚家族^[1]。PHO 在序列和功能上与 PHT 有较大差别, PHO 具有 PHO1 和 PHO2 亚家族。PHT1 亚家族为高亲和力的磷酸根转运蛋白, 位于细胞膜上, 负责根系对土壤磷的吸收, 是研究得最为深入的植物磷酸根转运蛋白。其他 PHT 亚家族蛋白在不同物种中则具有不同的亚细胞定位, 并执行不同的功能。以低亲和力的磷酸根转运蛋白 PHT2 为例, 拟南芥的 PHT2-1 位于细胞膜上负责根细胞的磷酸根跨膜转运^[3], 而马铃薯 *Solanum tuberosum* 的 PHT2-1 位于质体膜上, 负责质体与细胞质基质之间的磷酸根转运^[4]。PHO 中的 PHO1 主要负责将磷由根系薄壁细胞载入木质部运向地上部, PHO2 主要负责磷进入韧皮部向根系运输^[5]。毛果杨 *Populus trichocarpa* 的全基因组测序已经完成, 数据库 *Populus trichocarpa* v1.1 (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html) 公布了全部序列。此后, 在第 1 次测序基础上, 进行了第 2 次补充测序。毛果杨全基因组最新数据已包含在数据库 Phytozome v7.0 (<http://www.phytozome.net/poplar>) 中^[6]。目前, 有关磷酸根转运蛋白的研究多集中在酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 以及拟南芥、水稻和番茄 *Solanum lycopersicum* 等 1 年生草本植物中, 木本植物中磷酸根转运蛋白的报道比较少见, 而有关木本植物磷酸根转运蛋白三维拓扑结构研究的报道尚未见到。Martin^[7] 曾对毛果杨磷酸根转运蛋白家族特征及其表达模式进行过初步研究, 通过试验对其中的 13 个基因模型进行了鉴定与命名, 包括 11 个 PHT1 亚家族成员和 2 个 PHT2 亚家族成员。然而, 这只是毛果杨磷酸根转运蛋白家族的部分成员, 并且 Martin 的研究未涉及其生物信息学特征。因此, 有必要对毛果杨磷酸根转运蛋白进行系统的生物信息学分析, 为后续的试验分析与鉴定提供理论基础。本研究以毛果杨基因组数据库中检索到的磷酸根转运蛋白序列为切入点, 获得毛果杨全基因组中磷酸根转运蛋白家族的成员信息, 利用数据库及生物信息学软件 CLUSTALX, GeneDOC 等对这些序列进行剔除和多重序列比对, 并利用 MEGA5 构建系统树的方法, 建立了毛果杨全基因组中磷酸根转运蛋白的系统发育树。此外, 还对部分磷酸根转运蛋白进行了理化性质及亚细胞定位的计算机分析, 最后还通过软件分析预测了部分磷酸根转运蛋白的跨膜结构域以及三维拓扑结构等。本研究可丰富毛果杨磷酸根转运蛋白家族信息, 为毛果杨的磷素吸收转运机理研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 毛果杨磷酸根转运蛋白家族序列的获取

在 JGI 的毛果杨全基因组数据库 *Populus trichocarpa* v1.1 中, 以“Phosphate Transporter”为关键词进行搜索, 可以获得 Phosphate Transporter 基因模型。根据其他生物中磷酸根转运蛋白序列的长度, 剔除长度不在 400~700 个氨基酸之间的序列, 同时, 对比它们的基因座位, 只保留基因座位不同的模型。之后, 将这些序列在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行 BLAST, 查看相似序列蛋白质在其他植物中的功能, 将与磷酸根转运功能不相关的基因模型剔除。最后, 将保留下来的序列导入最新的毛果杨全基因组数据库 Phytozome v7.0 中进行 BLAST, 寻找其他可能的蛋白序列。

1.2 毛果杨磷酸根转运蛋白的系统发育与保守序列分析

在获取的毛果杨磷酸根转运蛋白序列的基础上,以“Phosphate Transporter”为关键词,在美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中搜索拟南芥、水稻和酵母等模式生物的磷酸根转运蛋白序列。将获取的序列导入 CLUSTAL X2.0 软件中进行多重序列比对,并将结果导入到序列分析软件 MEGA5 中查看序列相似度。同时利用 MEGA5 中的 CLUSTALW 程序进行比对并构建系统发育树,并对生成的发育树进行 1 000 次抽样的 Bootstrap 校正^[8]。利用 MEME 在线服务器(http://meme.nbcr.net/meme4_6_0/cgi-bin/meme.cgi),分析毛果杨磷酸根转运蛋白的保守基序,基序长度设为介于 6~200 个氨基酸之间,基序最大数目设为 15^[9]。

1.3 毛果杨磷酸根转运蛋白一级结构分析及跨膜区预测

以毛果杨全基因组数据库中已命名的 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9 和 PtrPHT2-1 以及通过 NCBI 数据库初步确认的 PHO1 亚家族成员 PtrPHO1-N1 为研究对象,利用瑞士生物信息学研究所提供的 ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>)程序,分别对上述 4 种蛋白质的氨基酸残基数目、组成、相对分子量、理论等电点及稳定性等理化性质进行了在线分析^[10]。利用瑞士生物信息学研究所提供的 ProtScale (<http://expasy.org/tools/protscale.html>)程序和斯德哥尔摩大学理论化学蛋白质预测服务器 Topred 2(<http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2>),在线预测这 4 种蛋白质的亲/疏水性,并通过后者同时预测跨膜蛋白跨膜区的拓扑结构^[10-11]。

1.4 毛果杨磷酸根转运蛋白的二级结构与三级结构预测

利用英国伦敦大学帝国理工学院生物信息学小组创建的 PHYRE2(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre>)服务器,通过折叠识别法预测 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 蛋白的三级结构^[12],服务器自动在 PDB 蛋白晶体库中搜索匹配度最高的折叠子结构,在此基础上预测出蛋白质的三维结构,并同时给出蛋白质的二级结构预测结果。最后,利用 Raswin 软件查看其三维结构。

1.5 毛果杨磷酸根转运蛋白的亚细胞定位分析

WoLF PSORT 是一种常用的蛋白质亚细胞定位预测工具,它根据氨基酸组成和 iPSORT 等特征来分析生物体中蛋白序列的亚细胞定位。将 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 蛋白序列导入在线分析程序(<http://wolffpsort.seq.cbrc.jp>),按照 Horton 等^[13]的分析方法,对毛果杨磷酸根转运蛋白的亚细胞定位进行预测分析。

2 结果与分析

2.1 毛果杨磷酸根转运蛋白家族序列

通过毛果杨全基因组数据库中的详细注释对检索结果进行筛选,并利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库进行 BLAST,最后从检索到的 9 763 个磷酸根转运蛋白基因模型中筛选出 31 个基因模型(表 1)。其中 13 个基因模型已被 Martin^[7]注明家族归属并命名。另有 5 个基因模型通过在 NCBI 数据库中进行 BLAST,初步确定为 PHO1 亚家族蛋白序列,分别命名为 PtrPHO1-N1~PtrPHO1-N5,还有 2 个基因模型虽然在 NCBI 数据库的 PHO1 亚家族中没有明确的对应物,但其序列与 PtrPHO1 亚家族的 5 个基因高度相似,因此,将其命名为 PtrPHO1-N6 和 PtrPHO1-N7。对于另外 11 个数据库中未注明家族归属的蛋白模型,也根据系统发育树的亚家族划分,分别命名为 PtrPHT1-N1, PtrPHT1-N2 及 PtrPHO2-N1~PtrPHO2-N9。由表 1 中所列基因座位可知,毛果杨磷酸根转运蛋白基因零散分布于整个基因组,其中也有不少多种蛋白连锁在同一染色体上的情况。如 PtrPHT1-1, PtrPHT2-1, PtrPHO1-N2, PtrPHO1-N3 和 PtrPHO1-N4 连锁在 LG_X 上;在 LG_I, LG_II, LG_V, LG_VIII, LG_IX 和 scaffold_273 染色体上也有磷酸根转运蛋白基因连锁的情况。

2.2 毛果杨磷酸根转运蛋白的系统发育与保守序列

由构建的系统发育树(图 1)可见:毛果杨磷酸根转运蛋白家族可分为 PHT 和 PHO 等 2 个亚家族,而 PHT 和 PHO 又可进一步分为 PHT1 和 PHT2 以及 PHO1 和 PHO2 亚家族。PHT1 亚家族中包含了 11 条数据库中已命名的序列和 2 条未命名序列 PtrPHT1-N1 和 PtrPHT1-N2;而 PHT2 亚家族中只有 2 条已命名序列。PHO1 亚家族包含 7 个成员;PHO2 亚家族共有 9 个成员。

表 1 毛果杨中磷酸根转运蛋白家族成员及其基因组位置

Table 1 Family members of phosphate transporters and their genome locations in *Populus trichocarpa*

| 蛋白家族 | 位点名称 | 基因模型名称 | 基因座位 |
|----------------|------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| PtrPHT1-1 | POPTR_0010s08270 | grail3.0144000201 | LG_X; 8140352-8142003 |
| PtrPHT1-2 | POPTR_0010s08250 | eugene3.02730014 | scaffold_273; 111003-112887 |
| PtrPHT1-3 | POPTR_0010s08230 | fgenes4_pg.C_scaffold_273000008 | scaffold_273; 80294-82343 |
| PtrPHT1-4 | POPTR_0005s24490 | estExt_fgenes4_pm.C_LG_V0552 | LG_V; 15521486-15524902 |
| PtrPHT1-5 | POPTR_0002s04000 | fgenes4_pg.C_LG_II000363 | LG_II; 2497561-2499132 |
| PtrPHT1-6 | POPTR_0005s15880 | grail3.0002010901 | LG_V; 11249645-11251275 |
| PtrPHT1-7 | POPTR_0005s24500 | eugene3.00051302 | LG_V; 15530842-15532607 |
| PtrPHT1-8 | POPTR_0019s08990 | fgenes4_pg.C_scaffold_125000020 | scaffold_125; 842075-845719 |
| PtrPHT1-9 | POPTR_0002s00700 | eugene3.000200047 | LG_II; 297489-299849 |
| PtrPHT1-10 | POPTR_0015s06110 | gw1.197.29.1 | scaffold_197; 176263-177795 |
| PtrPHT1-11 | POPTR_0005s27740 | gw1.V.2233.1 | LG_V; 17693016-17695174 |
| NA(PtrPHT1-N1) | NF | fgenes4_pm.C_LG_I000986 | LG_I; 25107565-25109172 |
| NA(PtrPHT1-N2) | NF | gw1.XIII.3248.1 | LG_XIII; 10212693-10222105 |
| PtrPHT2-1 | NF | gw1.X.5216.1 | LG_X; 7039340-7042273 |
| PtrPHT2-2 | NF | gw1.VIII.2455.1 | LG_VIII; 12708522-12714885 |
| NA(PtrPHO1-N1) | NF | eugene3.00081561 | LG_VIII; 11416571-11421314 |
| NA(PtrPHO1-N2) | NF | estExt_Genewise1Plus.C_LG_X0952 | LG_X; 5102917-5111260 |
| NA(PtrPHO1-N3) | NF | eugene3.00101563 | LG_X; 15188979-15191731 |
| NA(PtrPHO1-N4) | NF | eugene3.00101557 | LG_X; 15170252-15173056 |
| NA(PtrPHO1-N5) | POPTR_0010s17310 | gw1.2076.3.1 | scaffold_2076; 3805-8086 |
| NA(PtrPHO1-N6) | NF | eugene3.00080841 | LG_IX; 7992195-7994914 |
| NA(PtrPHO1-N7) | POPTR_0004s05990 | fgenes4_pg.C_LG_IV000368 | LG_IV; 3321037-3324794 |
| NA(PtrPHO2-N1) | NF | fgenes4_pm.C_LG_IX000563 | LG_IX; 7871156-7876075 |
| NA(PtrPHO2-N2) | NF | e_gw1.I.972.1 | LG_I; 16930337-16935151 |
| NA(PtrPHO2-N3) | NF | estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV1296 | LG_XIV; 2533769-2540584 |
| NA(PtrPHO2-N4) | NF | eugene3.01520060 | scaffold_152; 455042-462969 |
| NA(PtrPHO2-N5) | NF | eugene3.00181085 | LG_XVIII; 11872290-11880296 |
| NA(PtrPHO2-N6) | NF | fgenes4_pm.C_LG_IX000016 | LG_IX; 161529-162857 |
| NA(PtrPHO2-N7) | NF | gw1.IX.3904.1 | LG_IX; 7992195-7994914 |
| NA(PtrPHO2-N8) | NF | estExt_Genewise1Plus.C_LG_I4634 | LG_I; 17049855-17052250 |
| NA(PtrPHO2-N9) | NF | e_gw1.XVI.3503.1 | LG_XVI; 10308453-10313313 |

说明：NF(not found)：该数据库中未找到；NA(no annotation)：数据库中尚未注释该蛋白序列。

同源性比较发现：毛果杨磷酸根转运蛋白各亚家族之间同源性较低，均为 10%左右；而同一亚家族内各成员同源性相对较高，以成员数量较多的 PHT1 亚家族为例，该亚家族成员可按序列相似性划分为两部分。这两部分成员间的相似性为 40%~60%，而各部分内成员的相似性很高，为 90%左右。这说明毛果杨中不同亚家族磷酸根转运蛋白可能在很早以前就由于各种原因而彼此分开，并向着各自的方向进化，而后续进化过程中，各亚家族内的分化不显著。

从毛果杨磷酸根转运蛋白基因的外显子/内含子结构可知，PHT1 亚家族成员内含子数量较少，除 PtrPHT1-N1 外，最多只有一个内含子；PHT2 亚家族的 2 个成员各有 2 个内含子；而 2 个 PHO 亚家族

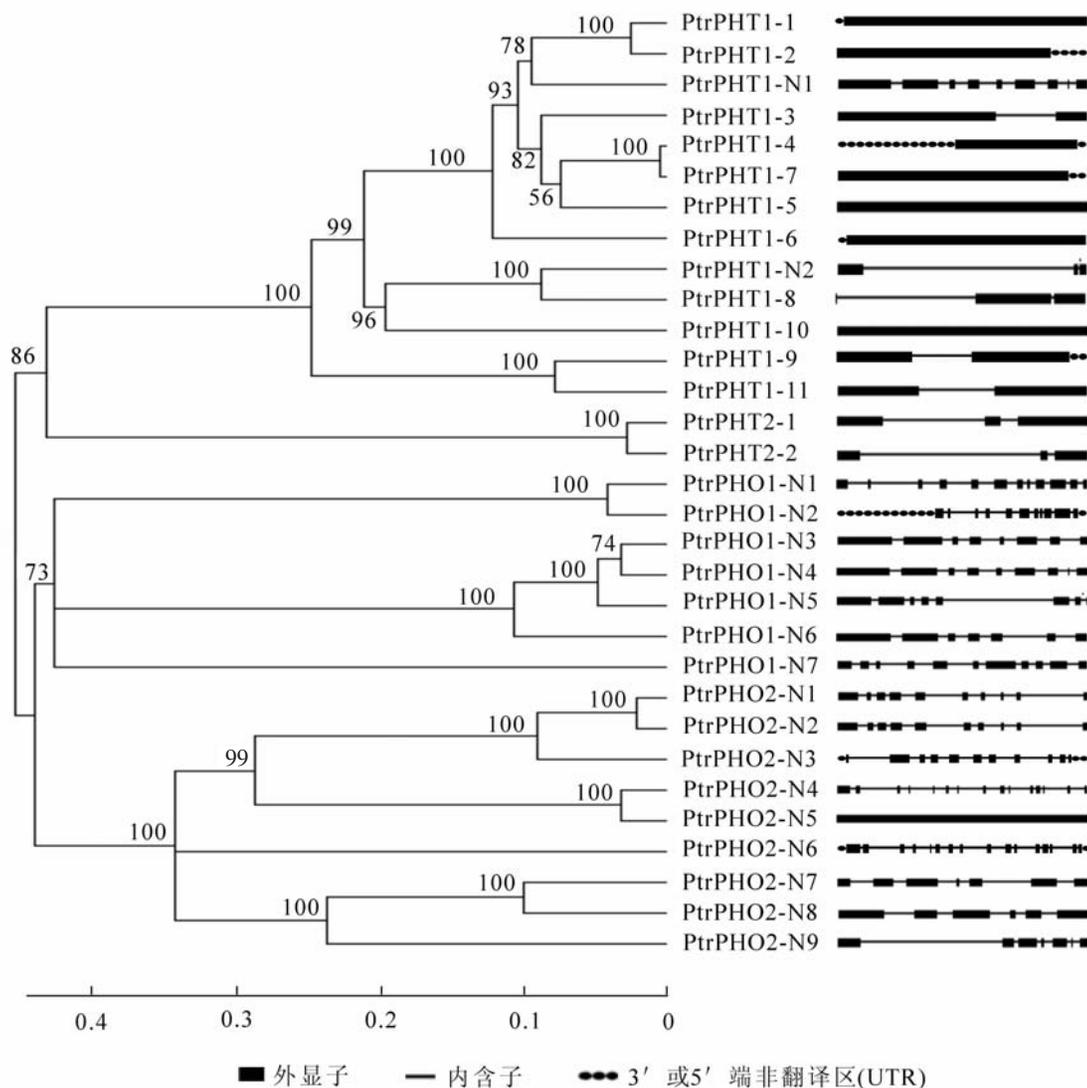


图 1 毛果杨磷酸根转运蛋白家族的 NJ 系统进化树及其基因外显子 / 内含子结构图

Figure 1 Phylogenetic tree and the exon/intron structures of phosphate transporters in *Populus trichocarpa*

成员内含子数量均较多, 且其数目有一定的差异。由此可见: PHT 的基因结构较 PHO 保守。

毛果杨磷酸根转运蛋白保守基序的预测结果如图 2 所示。发现 PHT1 亚家族的保守性较高, 具有保守基序 1~4 和保守基序 6, 而蛋白 PtrPHT1-1~PtrPHT1-7 以及 PtrPHT1-N1 和 PtrPHT1-N2 还同时具有保守基序 5。这也进一步验证了之前通过 MEGA5 的比对, 按序列相似性将 PHT1 亚家族分为两部分这一结论。然而, PtrPHT1-N2 不含家族内其他成员中分别位于序列首尾的基序 1 和基序 6, 是 PHT1 亚家族中的一个例外。PHT2 亚家族共用基序 2, 4 和 7, 并且基序 2 在序列末尾各有一段重复, 因此 PHT2 亚家族的保守性也较高。PHO1 亚家族主要包含基序 8~13 等, 其中基序 8, 9 和基序 11~13 为该亚家族所特有。PHO2 亚家族主要包含基序 6, 7, 10, 14 和 15 等, 其中基序 7, 14 和 15 为该亚家族所特有。PHO 的保守性较 PHT 小, 但 PHO1 和 PHO2 亚家族中均有部分成员的序列也具有很高的相似性。

在毛果杨与其他模式生物的磷酸根转运蛋白的系统进化树(图 3)中发现, 毛果杨 PHT1 亚家族与拟南芥、水稻同亚家族的同源性均高于 60%, 且部分成员同源性可达 80% 以上, 而与各物种 PHT2 亚家族的同源性低于 20%, 与各物种 PHO 亚家族的同源性低于 10%。毛果杨 PHT2 亚家族也只与拟南芥、水稻的 PHT2 亚家族同源性较高, 为 70%~80%, 与其他序列同源性均低。毛果杨 PHO1 亚家族与拟南芥、水稻 PHO1 亚家族同源性为 50%~60%, 而毛果杨 PHO1 和 PHO2 亚家族与酵母磷酸根转运蛋白同源性均低于 10%。由此可见, 磷酸根转运蛋白同亚家族成员在物种内及物种间的同源性都较高, 而不同亚家族成员无论在物种内还是物种间同源性均较低。

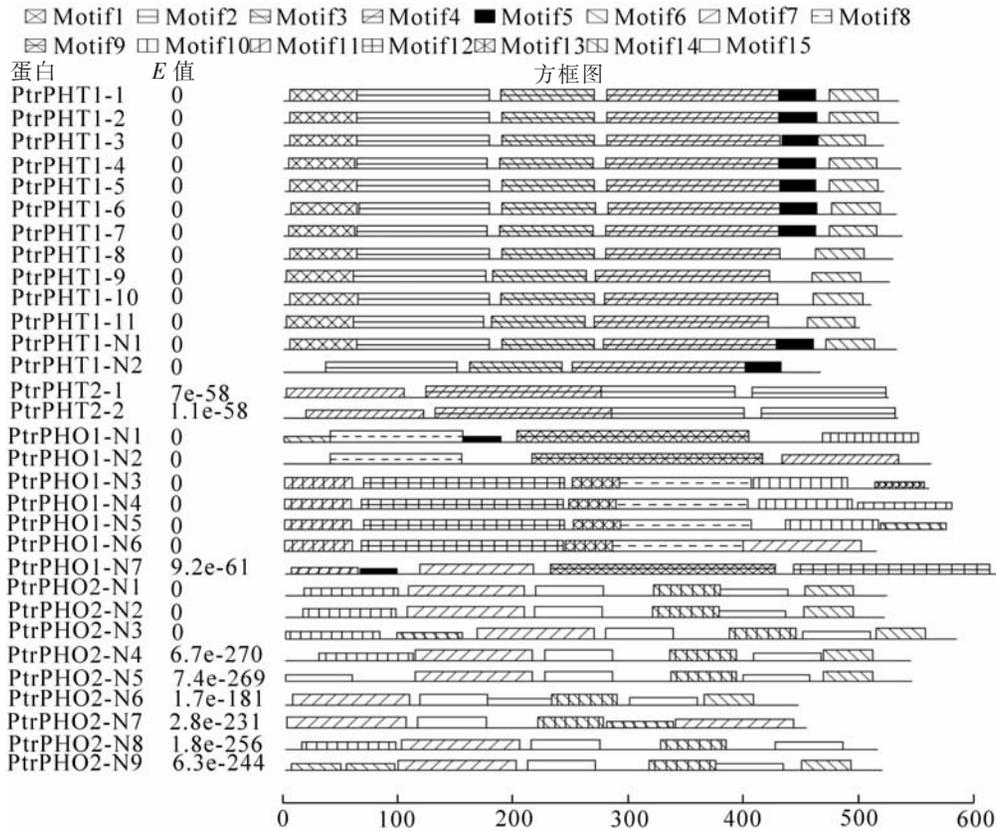


图 2 毛果杨磷酸根转运蛋白保守基序示意图

Figure 2 Conserved motifs of phosphate transporters in *Populus trichocarpa*

2.3 毛果杨磷酸根转运蛋白一级结构及跨膜区

PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 的基本理化参数预测结果(表 2)表明, 4 种蛋白的理论等电点均偏碱性, 说明其氨基酸序列中带正电的氨基酸残基数多于带负电的氨基酸残基数, 这可能与膜转运蛋白的功能相关。4 种蛋白的总平均疏水性均为正值, 表明它们均为疏水性蛋白质。其中, PtrPHT2-1 疏水性最强, PtrPHO1-N1 疏水性最弱, PtrPHT1-1 和 PtrPHT1-9 疏水性近似。此外, 4 种蛋白的稳定系数差别不大, 并且都相对稳定, 这表明该类蛋白可能较适于进行体外试验。

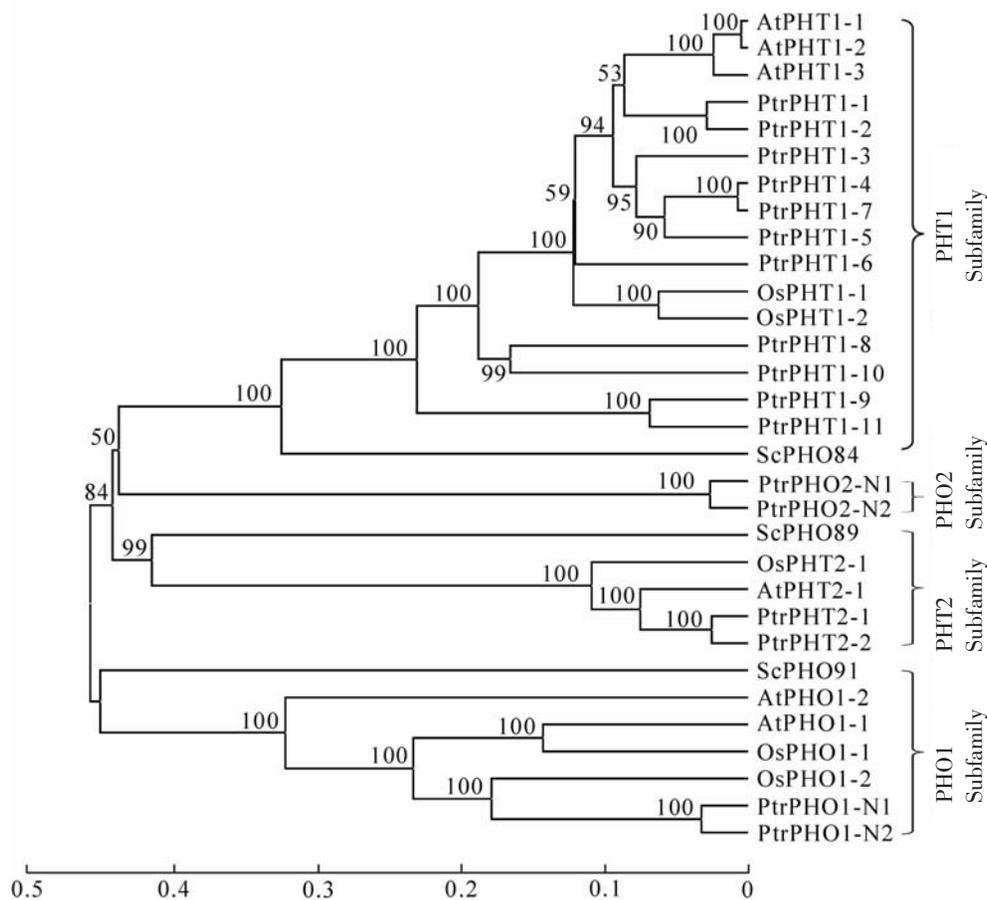
PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 的亲/疏水性分析结果如图 4 所示。图中正值越大表示疏水性越强, 负值越大表示亲水性越强, 因此, PtrPHT1-1, PtrPHT1-9 和 PtrPHT2-1 均有 12 个疏水性区域, 而 PtrPHO1-N1 的疏水区明显偏少, 只有 6 处。这表明与 3 种 PHT 蛋白相比, 在进化上 PtrPHO1-N1 可能发生了较大程度的变异, 导致蛋白质整体疏水性降低, 疏水性区域减少, 这一结论与蛋白质理化参数分析结果一致。此外, 还利用 ProtScale 软件的 Kyte & Doolittle 算法(K-D 法)对 4 种蛋白进行了亲/疏水性分析^[10], 结果与此一致。对 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 进行的跨膜

表 2 毛果杨磷酸根转运蛋白 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 的理化参数

Table 2 Physical and chemical characteristics of PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 and PtrPHO1-N1 in *Populus trichocarpa*

| 蛋白 | 氨基 酸残 基数 | 分子量 | 理论等 电点 | 带负电荷 的氨基酸 残基数 | 带正电荷 的氨基酸 残基数 | 吸光度(280 nm)0.1% | | 不稳定指数 | 脂肪指数 | 总平均 疏水性 |
|------------|----------------|----------|-----------|---------------------|---------------------|-----------------|--------|-----------|--------|------------|
| | | | | | | 形成胱氨酸 | 不形成胱氨酸 | | | |
| PtrPHT1-1 | 536 | 58 478.3 | 9.01 | 34 | 42 | 1.380 | 1.374 | 29.24(稳定) | 92.20 | 0.387 |
| PtrPHT1-9 | 528 | 59 122.2 | 8.54 | 42 | 47 | 1.174 | 1.163 | 31.34(稳定) | 96.97 | 0.320 |
| PtrPHT2-1 | 519 | 54 293.4 | 9.11 | 27 | 33 | 1.271 | 1.268 | 24.62(稳定) | 107.57 | 0.633 |
| PtrPHO1-N1 | 547 | 63 420.5 | 9.65 | 39 | 66 | 1.464 | 1.455 | 29.43(稳定) | 95.16 | 0.176 |

说明: 带负电荷的氨基酸为天冬氨酸和谷氨酸, 带正电荷的氨基酸为精氨酸和赖氨酸。



几种模式植物的 NCBI 蛋白序列号 AtPHT1-1(*Arabidopsis thaliana*): NP_199149.1; AtPHT1-2: NP_199151.1; AtPHT1-3: NP_199150.1; AtPHT2-1: NP_850633.1; AtPHO1-1: NP_564940.1; AtPHO1-2: NP_178425.2; OsPHT1-1(*Oryza sativa*): Q8H6H4.1; OsPHT1-2: Q8GSD9.1; OsPHT2-1: BAD34093.1; OsPHO1-1: Q657S5.2; OsPHO1-2: Q6K991.1; ScPHO84(*Saccharomyces cerevisiae*): P25297.2; ScPHO89: P38361.1; ScPHO91: P27514.2。

图3 磷酸根转运蛋白家族在几种模式生物中的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of phosphate transporters in several model plants

区拓扑结构预测结果(图5)与图4相对应,疏水性大于1.0的片段可确定为跨膜区,介于0.6~1.0的片段为疑似跨膜区。由图5可知:PtrPHT1-1和PtrPHT2-1具有12个跨膜域,而PtrPHT1-9和PtrPHO1-N1中各有1个疑似跨膜域,PtrPHT1-9具11个跨膜域,PtrPHO1-N1具有5个跨膜域。预测结果同时显示,4种跨膜蛋白的C端以及PtrPHT1-1和PtrPHT2-1的N端都位于细胞膜的胞质一侧,而PtrPHT1-9和PtrPHO1-N1的N端可能也位于细胞膜的胞质一侧。其中PtrPHT1-1和PtrPHT1-9的预测结果与Karandashov^[14]报道的植物PHT1亚家族的跨膜区结构特点一致;对PtrPHT2-1的预测结果也符合Raghothama^[15]对AtPHT2-1跨膜域结构的阐述。而有关植物PHO的跨膜区结构未见文献报道。

2.4 毛果杨磷酸根转运蛋白的二级结构与三级结构

PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1和PtrPHO1-N1的二级结构预测结果如表3。4种蛋白的二级结构组分中, α -螺旋所占比例最高,均超过70%;无规卷曲和 β -折叠所占比例较小。因此,4种蛋白质均属于全 α 型蛋白质(α -螺旋所占比例大于45%)^[16],是跨膜蛋白的主要类型。

PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1和PtrPHO1-N1三级结构的预测结果如图6所示。PtrPHT1-1和PtrPHT1-9的折叠子模型为d1pw4a,是大肠埃希菌*Escherichia coli*中的甘油-3-磷酸转运蛋白(glycerol-3-phosphate transporter)家族成员。该折叠子与PtrPHT1-1和PtrPHT1-9的匹配性较好,E值分别为 $1.2e-26$ 和 $2e-26$,预测准确度均为100%;PtrPHT2-1和PtrPHO1-N1的折叠子模型为d2cfqa1,是大肠埃希菌乳糖透性酶(lactose permease)家族成员。该折叠子与PtrPHT2-1和PtrPHO1-N1的匹配性也较好,E值分别为 $7.8e-06$ 和0.036,预测准确度均为95%。因此,对4种蛋白的三级结构预测结果较准确。

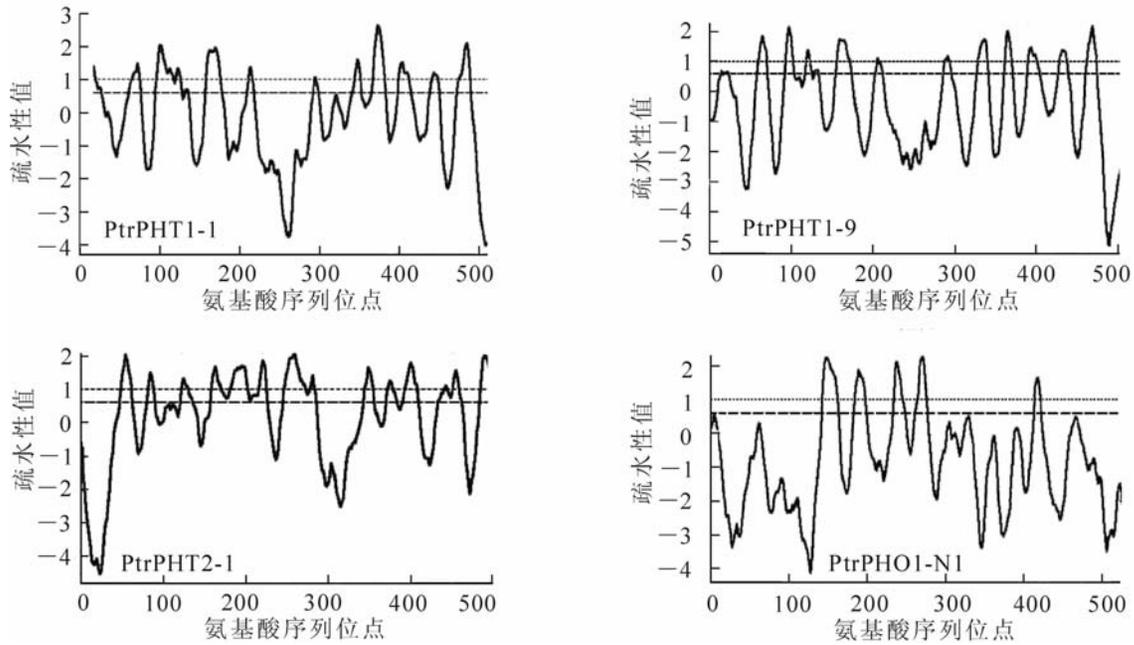


图 4 毛果杨磷酸根转运蛋白 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 的亲/疏水性分析结果图

Figure 4 Analysis of hydrophilicity/hydrophobicity of PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 and PtrPHO1-N1 in *Populus trichocarpa*

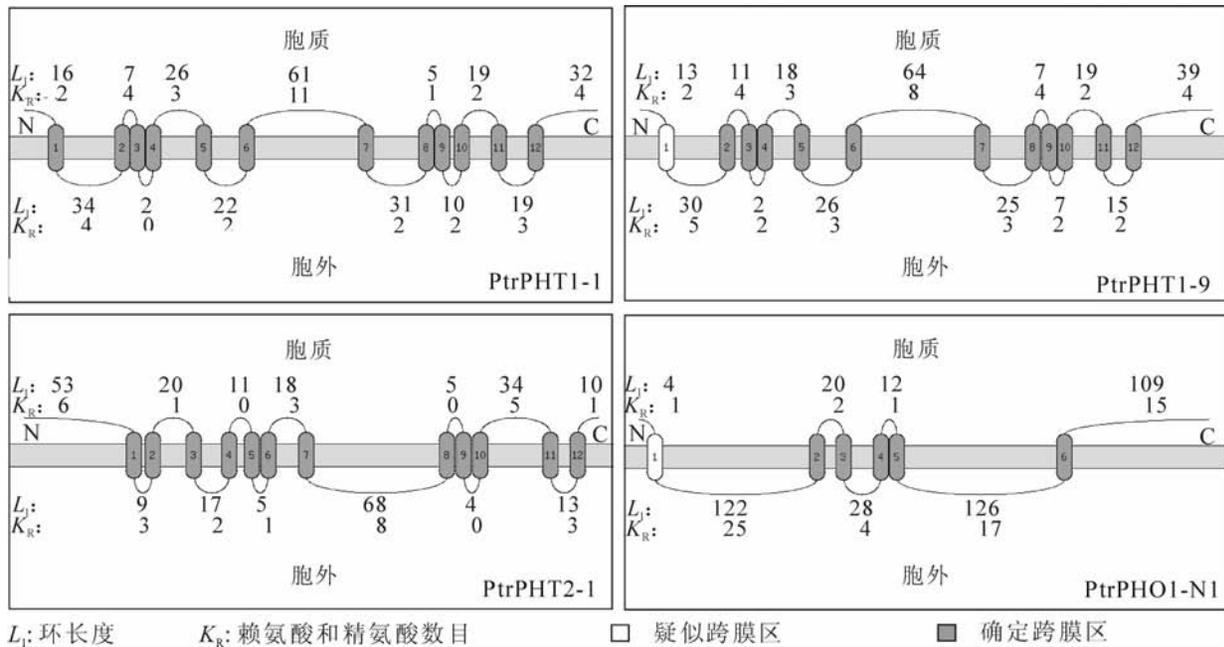


图 5 毛果杨磷酸根转运蛋白 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 的跨膜拓扑结构预测结果图

Figure 5 Transmembrane topology of PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 and PtrPHO1-N1 in *P. trichocarpa*

图 6 表明：它们均为主要由 α -螺旋构成的全 α 型蛋白质。此类型的跨膜蛋白中， α -螺旋一般也就是其跨膜区^[16]。PtrPHT1-1, PtrPHT1-9 和 PtrPHT2-1 的 α -螺旋均为 12 个，这也与图 5 中的结果相一致。而 PtrPHO1-N1 的 α -螺旋数略少于 3 种 PHT 蛋白，为 10 个。同时发现，PtrPHO1-N1 中的 α -螺旋长度较 3 种 PHT 蛋白短，根据之前预测的 PtrPHO1-N1 含有 5~6 个跨膜域可推测，PtrPHO1-N1 中的部分 α -螺旋可能由于长度过短、疏水性不足而无法形成跨膜区。根据前面对 4 种蛋白质各种特性的预测结果进行比较，可以认定本试验对 4 种毛果杨磷酸根转运蛋白三级结构的预测结果准确性较高。

表3 毛果杨磷酸根转运蛋白 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 的二级结构预测

Table 3 Secondary structures of PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 and PtrPHO1-N1 in *Populus trichocarpa*

| 二级结构 | α -螺旋 | β -折叠 | 无规卷曲 | 氨基酸残基数 |
|------------|--------------|-------------|------------|--------|
| PtrPHT1-1 | 389(72.6%) | 5(0.9%) | 142(26.5%) | 536 |
| PtrPHT1-9 | 387(73.3%) | 5(0.9%) | 136(25.8%) | 528 |
| PtrPHT2-1 | 394(75.9%) | 7(1.4%) | 118(22.7%) | 519 |
| PtrPHO1-N1 | 389(71.1%) | 14(2.6%) | 144(26.3%) | 547 |

2.5 毛果杨磷酸根转运蛋白的亚细胞定位

PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 的亚细胞定位分析结果(表4)表明: PtrPHT1-1, PtrPHT1-9 和 PtrPHO1-N1 位于质膜上, 参与细胞对磷酸根的吸收转运。PtrPHT2-1 可能定位于质膜、液泡膜或高尔基体膜, 若定位于液泡膜, 可能说明植物体利用某些磷酸根转运蛋白, 将吸收的磷酸根转运至液泡中, 暂时储存磷素营养, 同时调控细胞内磷浓度的稳态; 若定位于高尔基体膜, 其功能可能是将胞质中的磷酸根转运至高尔基体, 用于各类蛋白质合成后的磷酸化修饰。

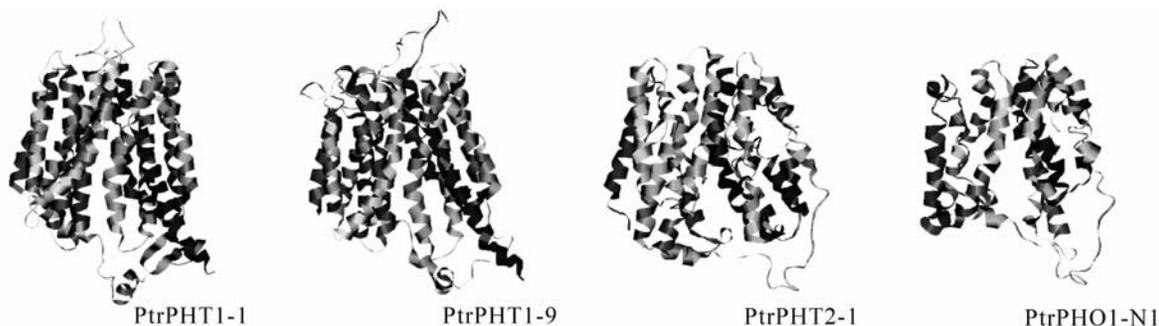


图6 毛果杨磷酸根转运蛋白 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 三维结构预测示意图

Figure 6 Three-dimensional structures of PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 and PtrPHO1-N1 in *P. trichocarpa*

表4 毛果杨磷酸根转运蛋白 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 的亚细胞定位结果

Table 4 Subcellular localizations of PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 and PtrPHO1-N1 in *P. trichocarpa*

| 亚细胞定位 | 质膜 | 高尔基体 | 内质网 | 液泡膜 | 胞质溶胶 |
|------------|------|------|-----|-----|------|
| PtrPHT1-1 | 11.0 | — | — | 1.0 | 1.0 |
| PtrPHT1-9 | 7.0 | — | 2.0 | 3.0 | 1.0 |
| PtrPHT2-1 | 5.0 | 3.0 | 2.0 | 3.0 | — |
| PtrPHO1-N1 | 10.0 | — | 3.0 | — | — |

3 讨论

本试验的研究对象来自于毛果杨全基因组数据库中的磷酸根转运蛋白序列, 获得的 31 条序列中, 除了 13 条磷酸根转运蛋白序列已公布外^[7], 还另外发现了 18 个该家族成员。经软件比对得知, 新发现的 18 个蛋白成员中除 PtrPHT1-N1 和 PtrPHT1-N2 外, 均属于 PHO1 和 PHO2 亚家族。同源性比较发现, 毛果杨磷酸根转运蛋白亚家族序列之间相似性较低, 均为 10% 左右, 而与其他模式生物同一亚家族间相似性较高, 可达 70%~80%。磷酸根转运蛋白在各物种内的 PHT 与 PHO 亚家族之间的相似性都较低, 而各 PHT 亚家族之间相似性稍高, 说明 PHT 与 PHO 亚家族可能最早分开, 独立进化。

磷酸根转运蛋白 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 均为疏水性蛋白, 这也属于跨膜蛋白的基本性质。3 种 PHT 蛋白均含有 12 个跨膜域, PtrPHO1-N1 的跨膜域数为 5~6 个, 这也印证了其疏水性低于 3 种 PHT 蛋白的预测。4 种蛋白都属于全 α 型蛋白质, 并且各种构件所占比例相似。

三级结构的预测是蛋白质结构预测的重点和难点, 同时也是解释蛋白质结构与功能之间关系的关键

步骤。目前, 通过计算机预测蛋白质三级结构的方法主要有 3 种: 同源建模、折叠识别和从头预测法^[12]。试验中对 PtrPHT1-1, PtrPHT1-9, PtrPHT2-1 和 PtrPHO1-N1 三级结构的预测首先使用的是同源建模法。然而, 服务器自动在 PDB 蛋白晶体库中搜索到的模型匹配度均未达到 30% 的要求^[17], 预测结果准确性较低, 故进而采用折叠识别法对其进行三级结构的预测。结合预测结果可分析出, PtrPHO1-N1 中的 α -螺旋比例并不少于 PHT 亚家族的 3 个成员, 而只是其多数 α -螺旋较短, 从而使其具有更多数量的 α -螺旋片段。这也导致 PtrPHO1-N1 中的部分 α -螺旋没有足够强的疏水性, 因而无法跨膜, 便印证了它只有 5~6 个跨膜域的分析结果。本研究的亚细胞定位结果表明, PtrPHT1-1, PtrPHT1-9 和 PtrPHO1-N1 位于质膜上, 参与磷酸根的吸收转运。而 PtrPHT2-1 可能定位于质膜、液泡膜或者高尔基体膜。根据文献报道及本研究中对其他磷酸根转运蛋白亚家族的定位与功能分析, PtrPHT2-1 定位于液泡膜的可能性最大。若定位于液泡膜, 可能说明植物通过磷素跨液泡膜的双向运输实现细胞质中磷浓度的稳态^[15]。

4 结论

在毛果杨全基因组数据库中发现的 31 个毛果杨磷酸根转运蛋白可分为 4 个亚家族, 即 PHT1, PHT2, PHO1 和 PHO2。磷酸根转运蛋白定位于生物膜上起转运磷酸根的作用。保守基序预测得知, 毛果杨 PHT 亚家族内的保守性高, 而亚家族之间的差异较大; PHO 的保守性较 PHT 小。系统发育分析得知, 毛果杨磷酸根转运蛋白各亚家族可能分开较早, 尤其是 PHT1, PHT2 亚家族与 PHO1, PHO2 亚家族两者之间差异显著, 共同基序更少。毛果杨磷酸根转运蛋白均为疏水性的全 α 型蛋白质, 家族内三维结构相似, 其中 PHT 一般具有 12 个跨膜域, 多于 PHO。亚细胞定位预测得知, 毛果杨不同亚家族成员的亚细胞定位不尽相同, 这说明磷酸根转运蛋白家族各成员在杨树磷素代谢中起着不同的作用, 共同维持并调控杨树体内的磷素平衡。

参考文献:

- [1] OKUMURA S, MITSUKAWA N, SHIRANO Y, *et al.* Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *DNA Res*, 1998, **5**: 261 - 269.
- [2] 高佳, 刘雄伦, 刘玲, 等. 水稻磷酸盐转运蛋白 Pht1 家族研究进展 [J]. 中国农学通报, 2009, **25** (15): 31 - 34. GAO Jia, LIU Xionglun, LIU Ling, *et al.* Advance of rice phosphate transporter Pht1 [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2009, **25** (15): 31 - 34.
- [3] DARAM P, BRUNNER S, RAUSCH C, *et al.* *Phl2;1* encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1999, **11**: 2153 - 2166.
- [4] VERSAW W K, HARRISON M J. A chloroplast phosphate transporter PHT2 (1) influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**: 1751 - 1766.
- [5] TICCONI C A, ABEL S. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, **9** (11): 548 - 555.
- [6] TUSKAN G A, DIFAZIO S, JANSSON S, *et al.* The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. and Gray) [J]. *Science*, 2006, **313**: 1596 - 1604.
- [7] MARTIN F. *The Poplar Phosphate Transporter Multigene Family: Characterization and Gene Expression* [R]. Southampton: The Third Popyomics Meeting, 2004.
- [8] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, **24**: 1596 - 1599.
- [9] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, *et al.* MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**: 202 - 208.
- [10] GASTEIGER E, HOOGLAND C, GATTIKER A, *et al.* *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server* [M]. Springer: The Proteomics Protocols Handbook, 2005: 571 - 607.
- [11] CLAROS M G, von HEIJNE G. TOPPED II: An improved software for membrane protein structure predictions [J]. *Comput Appl Biosci*, 1994, **10**: 685 - 686.
- [12] 吴祖建, 高芳奎, 沈建国. 生物信息学分析实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 134 - 137.

- [13] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, *et al.* WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**: 585 – 587.
- [14] KARANDASHOV V, BUCHER M. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, **10** (1): 22 – 29.
- [15] RAGHOTHAMA K G. Phosphate transport and signaling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, **3** (3): 182 – 187.
- [16] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学: 下[M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 229 – 231.
- [17] BORDOLI L, KIEFER F, ARNOLD K, *et al.* Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace [J]. *Nat Protoc*, 2009, **4**: 1 – 13.

“新型木竹材保护剂制备关键技术研究及应用” 获 2011 年度浙江省科学技术奖一等奖

2012年5月2日,中共浙江省委、浙江省人民政府召开全省推进国家技术创新工程试点省建设工作电视电话会议,表彰2011年度在全省科技工作方面做出突出贡献的先进单位和个人,深入部署推进国家技术创新工程试点省建设工作。

由浙江农林大学鲍滨福教授主持完成的科研项目“新型木竹材保护剂制备关键技术研究及应用”荣获2011年度浙江省科学技术奖一等奖。该项目主要针对木竹防腐、防霉等领域存在的技术难题,对改性壳聚糖金属配合物木竹材保护剂、水基型有机木竹材保护剂和竹醋液基木竹材保护剂的制备工艺与技术等进行了深入系统研究,历时10余年,共获6项国家发明专利,研发了三大系列新型木竹材保护剂,实现了理论和技术的重大创新。

该项成果研发的防腐、防霉等木竹产品,已在国内众多企业投入生产和使用,部分产品出口国际市场,促进了木竹材资源高效增值加工利用,取得了显著的社会经济效益。