

七种不同抗冷性植物甘油-3-磷酸转酰酶 mRNA 二级结构研究*

柳维波, 曹 槐, 刘世熙, 刘次全

(云南大学现代生物医学研究中心, 云南 昆明 650091)

摘要: 对南瓜、豌豆、黄瓜、拟南芥菜、红花、菠菜、黑子南瓜等 7 种不同抗冷性植物甘油-3-磷酸酰基转移酶的 mRNA 序列作了三核苷酸碱基模式分析, 并用 Zuker 方法对其 mRNA 序列的翻译区进行了二级结构分析, 统计出发夹、内环、膨胀环、三分支环、四分支环等二级结构的基本结构单元数, 通过对编码脯氨酸的密码子在 mRNA 二级结构中的分布位置的研究, 发现这些密码子主要是分布在茎的末端、环的根部、膨胀环或分支环上, 占到了序列中所有编码脯氨酸的密码子总数的 69% 到 97% 的比例, 这与我们在研究其他物种的 mRNA 二级结构时的发现是一致的。

关键词: GPAT 酶; 抗冷性; mRNA 二级结构; 脯氨酸

中图分类号: Q 943 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2002)04-0463-08

Study on the Predicted mRNA Secondary Structures of Plant Glycerol-3-Phosphate Acyltransferases

LIU Wei-Bo, CAO Huai, LIU Shi-Xi, LIU Ci-Quan

(Research Center for Modern Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: 3-nucleotide sequence modes were extracted from the mRNA sequences of glycerol-3-phosphate acyltransferases (GPAT) from different chill-resistance plants, squash (*Cucurbita moschata*), pea (*Pisum sativum*), cucumber (*Cucumis sativus*), *Arabidopsis thaliana*, redflow (*Carthamus tinctorius*), spinach (*Spinacia oleracea*) and figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia*). The mRNA secondary structures of translation domains in the reported sequences were predicted using Zuker's prediction, respectively. All the structural subunits including hairpin loops, internal loops, bulge loops, 3-branch loops, and 4-branch loops were searched out. In the analysis of the distribution of codons which code proline, we found that most of these codons locate at the specific areas in the secondary structures, such as the end of strands, the root of loops, the bulge loops, and the loops with 3 branchese or 4 branchese. The codons occuring in the areas of 3D significant count up to the ratios from 69% to 97%, and it is the case we found in the study of other species.

Key words: GPAT; Chilling tolerance; mRNA secondary structure; Proline

* 基金项目: 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室基金 (CME2002)

收稿日期: 2002-01-04, 2002-04-02 接受发表

作者简介: 柳维波 (1960-) 男, 助理研究员, 主要从事理论生物学的研究。

植物抗冷性是植物学研究中的一个重要问题,它对于农作物来说尤其重要。迄今为止的研究表明,甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPAT)与植物的抗冷性有密切关系。通过对 GPAT 的研究(Frentzen 等,1983;Murata 等,1992)已经弄清了 GPAT 酶是磷酸酰基甘油(PG)生物合成过程中的第一个酰基酯化酶,不同抗冷性植物的 GPAT 酶对底物酰基具有不同的选择性,即抗冷性强的植物其 GPAT 酶优先选择油酸,而冷敏感植物中的 GPAT 酶对棕榈酸和油酸具有相同的选择性。GPAT 酶对底物的这种选择性差异,影响着植物生物膜中 PG 分子的饱和程度,从而决定了植物的抗冷性。国外对南瓜(Ishzaki 等,1988)、豌豆(Weber 等,1991)、黄瓜(Thomas 等,1992)、拟南芥菜(Hishda 等,1993)、菠菜(Nishizawa 等,1994)和红花(Bhillal 等,1994)等不同抗冷性植物的 GPAT 酶进行过研究,并在烟草上成功地获得了 GPAT 基因 cDNA 片段的转基因抗性植株。我国科学工作者对黑子南瓜(杨明挚等,1999)和水稻(刘继梅等,2000)等的 GPAT 基因进行了研究,并对不同抗冷性植物 GPAT 基因的推导氨基酸作了一维序列的比较研究,发现在一些特定序列位点上不同抗冷性植物的核苷酸和推导氨基酸存在着差异,尤其是序列中脯氨酸的位点。Schalk 等(1999)的研究也发现,在植物 P450(CYP73A1)基因中的第 448 位脯氨酸被其他氨基酸替换后,该基因所表达的蛋白质就失去了原有的催化活性,同时其表达水平大大降低。已报道的这些不同抗冷性植物 GPAT 酶的序列比较研究,和特定推导氨基酸位置的确定均是在一维序列的基础上进行的,迄今还未见关于这些植物 GPAT 基因 mRNA 序列的二级结构方面的报道。本研究通过构建南瓜、豌豆、黄瓜、拟南芥菜、菠菜、红花和黑子南瓜等 7 种不同抗冷性植物 GPAT 酶的基因序列的 mRNA 二级结构,获得了有关它们二级结构中的一些基本结构单元的信息,并发现对蛋白质分子空间构象有重要影响的脯氨酸密码子在这些对应的模板 mRNA 二级结构中也具有特殊的分布规律。

1 材料和方法

1.1 7 种不同抗冷性植物 GPAT 酶的 mRNA 序列:(1)南瓜(Ishzaki 等,1988);(2)豌豆(Weber 等,1991);(3)黄瓜(Johson 等,1992);(4)拟南芥菜(Hishda 等,1993);(5)菠菜(Nishizawa 等,1994);(6)红花(Bhillal 等,1994);(7)黑子南瓜(杨明挚等,1999)。

1.2 方法:先用 Hashing 平移滑动方法分别对 7 种植物的基因序列作三核苷酸模式的提取分析,再将各个 mRNA 中的翻译区序列分别用 Zuker 方法构建其二级结构。从每个序列所获得的 mRNA 二级结构当中,选出初始自由能最低的二级结构,统计出每个二级结构中的结构单元数。最后定出编码脯氨酸的密码子在各个 mRNA 二级结构中的分布位置,并分别计算这些密码子在各个二级结构中出现在茎的末端、环的根部、内环、膨胀环及分支环的数目。按照杨明挚等(2000)所报道的从剪切位点起的编码第 84 个氨基酸的位点,在 7 种植物的 mRNA 二级结构中进行了二级结构搜索定位。

2 结果与讨论

2.1 由于在翻译时是 3 个核苷酸编码一个氨基酸,所以对分析的序列作三核苷酸模式的提取分析就能够了解合成蛋白质中的各氨基酸的含量。对 7 种植物的基因序列作三核苷酸模式分析的结果如表 1 所示(由于篇幅所限,表 1 中每种植物只列出了较多的 3 种模式和较少的 3 种模式)。

2.2 用 Zuker(1999)的 MFOLD 构建二级结构。7 种植物翻译区(南瓜 CDS:124..1314;

豌豆 CDS :4.. 1377 ; 黄瓜 CDS :1.. 1413 ; 拟南芥菜 CDS :58.. 1437 ; 菠菜 CDS :55.. 1473 ; 红花 CDS :76.. 1467 ; 黑子南瓜 CDS :1.. 1191) 所得到的最低初始自由能的 mRNA 二级结构如图 1 中的 A ~ G 图所示。

2.3 编码脯氨酸的密码子在 7 种植物 GPAT 酶的 mRNA 二级结构中的分布情况如表 3 所示。我们特别对杨明挚等 (2000) 所报道的从剪切位点起的编码第 84 个氨基酸的位点进行了二级结构搜索定位, 结果如图 2 所示。

表 1 7 种植物 GPAT 酶 mRNA 序列中相对较多和较少的 3-核苷酸模式

Table 1 3-nucleotide modes frequently and rarely occurring in the mRNA sequences from seven plant glycerol-3-phosphate acyltransferases

南瓜 squash	豌豆 pea	黄瓜 cucumber	拟南芥菜 A. thaliana	红花 redflow	菠菜 spinach	黑子南瓜 figleaf gourd
att 54	aaa 67	ttc 76	aaa 61	tct 60	tct 57	aaa 39
ttc 51	ttc 59	ett 60	gaa 54	aaa 50	ctt 49	ttg 37
ttg 50	ctt 57	att 59	aca 48	ctc 49	ttc 49	gaa 34
acg 7	gcg 7	cgg 10	ggc 11	cga 10	ggc 8	gta 6
cgt 5	cgg 4	acg 9	ggg 11	gac 9	acg 5	gcg 4
gcg 3	acg 3	gcg 5	ccc 10	acg 7	gcg 5	cgt 2

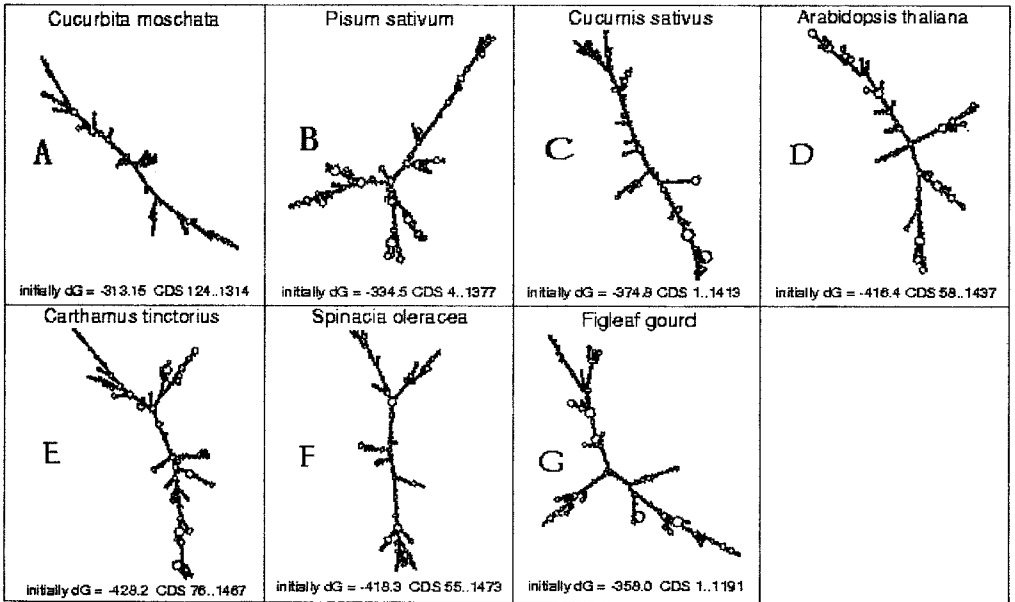


图 1 不同抗冷性植物 GPAT 酶的 mRNA 二级结构, 其中 A : 南瓜 ; B : 豌豆 ; C : 黄瓜 ; D : 拟南芥菜 ; E : 菠菜 ; F : 红花 ; G : 黑子南瓜, Zuker 法的初始自由能 dG 的单位为 kcal/mol。

Fig. 1 Predicted mRNA secondary structures of plant GPATs with different chilling tolerance, where A is for squash, B for pea, C for cucumber, D for Arabidopsis thaliana, E for spinach, F for redflow, and G for figleaf gourd. The unit of initial free energy dG in the Zuker's prediction is kcal/mol.

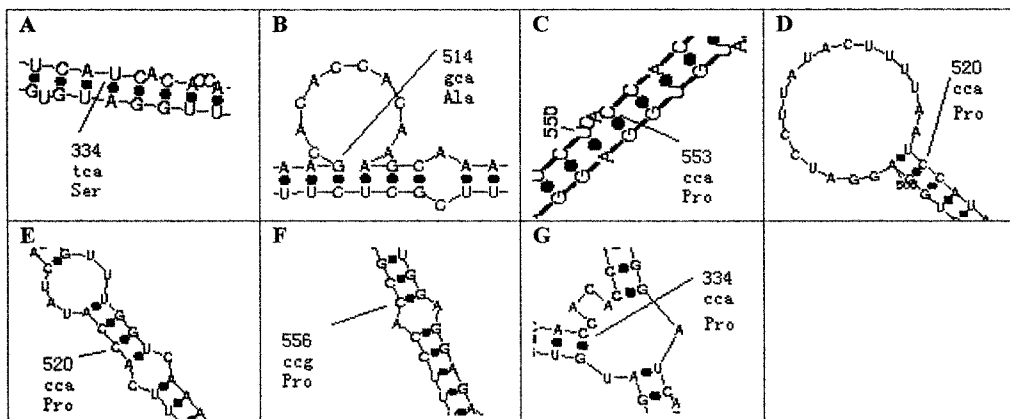


图2 不同抗冷性植物 GPAT 酶的 mRNA 二级结构中, 从剪切位点起的编码第 84 号氨基酸的密码子所处的位置示意图, 其中 A: 南瓜; B: 豌豆; C: 黄瓜; D: 拟南芥菜; E: 菠菜; F: 红花; G: 黑子南瓜。

Fig. 2 Site schemes of the codons which code No 84 amino acid residues starting from the processing sites in the predicted mRNA secondary structures of plant GPATs, where A is for squash, B for pea, C for cucumber, D for *Arabidopsis thaliana*, E for spinach, F for redflow, and G for figleaf gourd.

表 2 植物 GPAT 酶 mRNA 二级结构中的结构单元比较表

Table 2 Comparisons of subunits in the predicted mRNA secondary structures of plant GPATs

	南瓜 squash	豌豆 pea	黄瓜 cucumber	拟南芥菜 A. thaliana	红花 redflow	菠菜 spinach	黑子南瓜 figleaf gourd
翻译区核苷酸数/个	1191	1374	1413	1380	1392	1419	1191
发夹/个	18	24	21	23	22	20	17
4 碱基环发夹/个	5	3	5	4	8	6	4
5 碱基环发夹/个	4	6	6	3	2	0	4
内环/个	30	32	32	32	30	41	28
膨胀环/个	21	11	12	16	12	15	14
三分支环/个	14	18	18	9	17	15	18
四分支环/个	0	2	1	7	2	1	1

2.4 讨论

对不同抗冷性植物 GPAT 基因序列在一维序列上的比较研究曾表明, 序列中相对保守的那些氨基酸残基占到了氨基酸总数的 82.2%, 这部分残基与植物的种类和抗冷性关系不大。从表 1 序列模式分析看到, 黑子南瓜、拟南芥菜、红花、豌豆等含有较多的编码赖氨酸的 aaa 模式, 红花、菠菜含有较多的编码丝氨酸的 tet 模式, 黄瓜、南瓜、豌豆、菠菜则含有较多的编码苯丙氨酸的 ttc 模式, 而 7 种植物都含有较多编码亮氨酸的 ctt 和 ttg 等模式。从较少的模式来看, 7 种植物所含较少的是编码丙氨酸的 gcg 模式、编码苏氨酸的 acg 模式, 以及编码精氨酸的 cgt、cgg、cga 等模式。这表明不同种属的生物三联密码子的使用频率是不同的。已经知道, 生物大分子的功能除了与其组成有关外, 主要是决定于分子的空间结构, 而大分子高级结构单元的多寡, 只能反映其在生物大分子空间结构中出现的概率, 与生物功能发挥密切相关的应该是蛋白质空间结构中的局部活性位点。从表 2 可

续表 3

样 本	编码脯氨酸的密码子在翻译区中的序号 及在 mRNA 二级结构中的分布位置										统计结果						
	Total	SE	LR	BL	BL3	BL4	Ratio										
红 花	19	28	61	73	85	103	106	130	148	169							
	cct	cct	cct	cct	cct	cct	cct	cct	cct	cct							
	BL3	BL3	BL3	SE	SM	SE	SE	SE	LR	SE	LR						
	220	226	256	361	433	505	520	544	583	703							
cog	cog	cog	cca	cct	cog	cca	cct	cct	cca								
LR	SE	SE	BL3	SE	SE	SE	SE	LR	BL	BL3	36	12	9	3	9	2	97%
739	793	865	964	985	991	1012	1018	1090	1120								
ccc	cct	cct	cca	cca	cct	cog	cog	cct	ccc								
BL3	SE	SE	BL	BL4	LR	BL3	LR	BL4	LR								
1123	1126	1198	1240	1351	1372												
cct	cct	cog	ccc	cca	ccc												
LR	BL	BL3	SE	LR	BL3												
25	28	202	283	397	541	553	556	580	619								
cca	ccc	cog	cct	cct	cct	cca	cog	cct	cca								
LR	BL	LM	BL3	LR	BL3	LR	SE	BL3	LR								
菠 菜	739	829	841	901	997	1018	1045	1108	1123	1153							
ccc	cct	ccc	ccc	ccc	cca	cog	cct	cca	ccc	25	3	8	4	8	0	92%	
BL3	BL3	BL	SM	LR	SE	BL3	LR	LR	SE								
1156	1159	1231	1384	1405													
cct	cca	cca	cog	cct													
LR	BL	BL	BL3	BL3													
88	175	178	247	319	334	358	397	433	517								
cog	cct	cca	cca	cct	cca	cog	cca	cct	cca								
LR	LR	SE	SM	LR	LR	SM	SE	SE	BL								
子 南 瓜	553	607	619	679	775	796	802	823	829	886							
cca	cct	ccc	cct	ccc	cog	cct	cca	ccc	cct	26	6	9	1	3	1	77%	
BL3	LM	BL4	SE	LR	LR	LR	LR	LM	SM								
901	931	934	937	1009	1051												
ccc	cog	cct	ccc	cct	cct												
BL3	BL3	SE	SE	SM	LR												

* 注：
 a. 在构建 mRNA 二级结构时，翻译区的核苷酸顺序从 1 开始编号（这是 Zuker 方法在构建 mRNA 二级结构时 MFOLD 程序对所提交序列的自动编号方法），密码子上边数字是指翻译区 mRNA 二级结构中密码子的第一个核苷酸的顺序号；
 b. 表中密码子下边的黑体大写字母分别表示密码子在 mRNA 二级结构中的分布位置，即：SE 表示茎的末端；SM 表示茎的中部；LR 表示环的根部；LM 表示环的中部；BL3 表示三分支环；BL4 表示四分支环；BL 表示膨胀环；
 c. 统计结果中，Total 表示编码脯氨酸的密码子总数，SE 表示位于茎末端的数目，LR 表示位于环根部的数目，BL 表示位于膨胀环的数目，BL3 表示位于三分支环的数目，BL4 表示位于四分支环的数目，Ratio 表示分布在 SE、LR、BL、BL3、BL4 的数目的总和占 Total 的百分比。

以看出，除了抗冷性较差的南瓜没有四分支环和抗冷性强的拟南芥菜有较多的四分支环（多达 7 个）和较少的三分支环以外，7 种植物在发夹（包括 4 碱基环发夹和 5 碱基环发

夹)、内环、膨胀环等 mRNA 二级结构基本结构单元数方面,没有什么太大的区别。这就需要从二级结构中进一步分析。图 1 给出的是 7 种不同抗冷性植物 GPAT 酶的 mRNA 二级结构图,7 个二级结构的共同点是中间都有一个由碱基配对形成的主链,并在主链上的一定位置通过分支环向空间伸展开来,所不同的是,南瓜(图 1:A)和黄瓜(图 1:C)在三分支环或四分支环处向空间伸展的分支要小一些,而豌豆(图 1:B)、拟南芥菜(图 1:D)、红花(图 1:E)、菠菜(图 1:F)、黑子南瓜(图 1:G)的 mRNA 二级结构在三分支环或四分支环处向空间伸展的分支明显要大一些。对杨明攀等(2000)所报道的 7 种植物从剪切位点开始的第 84 号氨基酸的位点做了二级结构的定位,结果发现,编码第 84 号氨基酸的密码子全部是位于膨胀环、内环、三分支环和端环处(图 2)。这从另一个方面证明了,从剪切位点开始的第 84 号氨基酸对这几种植物 GPAT 酶分子的空间构象具有重要的意义。除了特定序列位置在 mRNA 二级结构中的分布而外,还需要看编码特定氨基酸的密码子在 mRNA 二级结构中的分布规律。我们对编码脯氨酸的所有密码子在 7 种植物的 mRNA 二级结构中的分布位置进行了详细定位。从表 3 显示的统计结果可以看出,编码脯氨酸的密码子主要都是分布在茎的末端、环的根部、膨胀环、以及三分支环或四分支环上,这 5 个部位编码脯氨酸的密码子的总和占到了编码脯氨酸的密码子总数的 69% 到 97%(南瓜占到 84%、豌豆占到 93%、黄瓜占到 69%、拟南芥菜占到 86%、红花占到 97%、菠菜占到 92%、黑子南瓜占到 77%)。编码脯氨酸的密码子在 7 种不同抗冷性植物 GPAT 酶的 mRNA 二级结构中的分布规律,与我们在对人尿激酶原(human prourakinese)、*Desulfovibrio vulgaris* 细胞色素 c533、Bmk M8(*Buthus matenssi* Karsch 蝎子酸性神经毒素)、小麦脂质转移蛋白(wheat lipid transfer protein)、人 tenascin(third fibronectin type III repeat)、eglin C(在大肠杆菌中克隆和表达的合成基因)、RNase T1(从 *Aspergillus oryzae* RNase T1 基因)等其他生物样本研究时发现的分布规律是一致的。

〔参 考 文 献〕

- 刘次全,白春礼,张静,1997. 结构分子生物学[M],北京:高等教育出版社,113—115
- 刘次全,曹恩华,白春礼等,2000. 核酸结构多态性[M],北京:高等教育出版社,240—243
- Liu JM(刘继梅),Chen SN(陈善娜),Yan B(鄢波),*et al*,2000. Sequence comparison of part cDNAs coding for glycerol-3-phosphate acyltransferase from rice strains with different chilling-resistance[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究),22(3):317—321
- Yang MZ(杨明攀),Chen SN(陈善娜),Yan B(鄢波),*et al*,1999. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for the glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Cucurbita ficifolia*[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究),21(2):139—143
- Yang MZ(杨明攀),Chen SN(陈善娜),Yan B(鄢波),*et al*,2000. A Research on the relationship between GPAT and plant chill-resistance[J]. *Acta Botanica Yunnanica*(云南植物研究),22(2):169—174
- Bhella RS, Mackenzie SL,1994. Nucleotide sequence of a cDNA from *Carthamus tinctorius* encoding a glycerol-3-phosphate acyltransferase[J]. *Plant Physiol*,106:1713—1714
- Fentzen M, Heins E, Mekeon A,*et al*,1983. Specificatives and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts[J]. *FEBS*,129—625
- Ishizaki O, Nishida I, Agata K,*et al*,1988. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for the plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase from squash[J]. *FEBS Lett*,238:424—430

