



来艳华,赵亚中.玉米蔗糖合成酶基因 *Sh1* 生物信息学分析[J].黑龙江农业科学,2019(10):4-9.

玉米蔗糖合成酶基因 *Sh1* 生物信息学分析

来艳华,赵亚中

(黑龙江省农业综合开发设计所,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:蔗糖合成酶是玉米生物合成及代谢途径实现蔗糖合成和分解的关键酶,蔗糖合成酶基因 *Sh1* 位于玉米第9号染色体的短臂,基因全长 5 816 bp。*Sh1* 编码蛋白 SH1 含 802 个氨基酸,由 1 个蔗糖合成酶亚基(PF00862)和 1 个糖基转移酶亚基(PF00534)组成,是一种具有催化合成和分解双重作用的可逆酶,不存在跨膜结构,属于稳定型膜外蛋白,3 种可能的结构模型显示其具有复杂的空间结构,玉米籽粒蔗糖生物合成的关键时期是授粉后 12~27 d。生物进化结果显示,玉米和高粱、甘蔗的蔗糖合成酶基因 *Sh1* 在物种进化演变中序列高度保守。为揭示玉米蔗糖代谢途径的分子机制,本研究对 *Sh1* 基因结构及功能进行了分析,并对 *Sh1* 编码蛋白结构进行了基本理化性质和物种进化分析。

关键词:玉米;蔗糖合成酶;*Sh1* 基因

玉米(*Zea mays* L.)是主要的粮食作物和工业原料,在国民生产中具有重要的作用。在高等植物中,光同化产物主要以蔗糖的形式运输,蔗糖一般是在叶细胞进行生物合成并转移到韧皮组织,通过长距离的运输在果实中积累^[1]。蔗糖合成酶是玉米种子生物合成代谢途径中必需的关键酶之一^[2],通过催化果糖和核苷二磷酸(NDP)(蔗糖+NDP \leftrightarrow NDP-葡萄糖+果糖)之间葡萄糖基的可逆转化,实现蔗糖的合成和分解^[3-5]。玉米蔗糖合成酶基因 *Sh*(全称 *Shrunken*)是决定玉米糖分的主要基因,当其发生隐性突变出现纯合体将引起胚乳生理缺陷,造成淀粉合成受阻,从而大量积累蔗糖。*Sh* 有两个基因(*Sh1* 和 *Sh2*),其中 *Sh1* 基因对玉米含糖量的决定作用尤为重要。已有研究表明,不同的蔗糖合成酶基因可能在糖循环和糖在源库组织中的利用发挥不同的作用^[6]。SH1 蛋白的 N 末端具有典型的线粒体靶向肽(mTP)结构,表明该蛋白是玉米线粒体蛋白质组的组成部分^[7]。

本研究对已知玉米蔗糖合成酶基因 *Sh1* 及其编码蛋白进行了基因开放读码框(ORF)、基因结构域、CpG 岛、蛋白质物理性质、蛋白跨膜结构和启动子的预测与分析,旨在利用生物信息学分析手段为深入鉴定玉米蔗糖生物合成关键酶基因 *Sh1* 的分子功能及作用机制奠定基础,同时为相关基因生物信息学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源

玉米 *Sh1*(全称:Shrunken1)基因来源于玉米遗传学和基因组学数据库(MaizeGDB, <https://www.maizegdb.org/>),登录号为:GRMZM2G089713,其在美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库的基因名为 LOC542365, Genbank ID:NC_024467.2,调取玉米 *Sh1* 基因 cDNA 序列及其编码的蛋白质序列。

1.2 生物信息学分析

利用 GENSCAN 软件(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)预测基因开放读码框(ORF);转录终止信号预测采用 POLYAH 软件(www.softberry.com/berry.phtml?topic=polyah&group=programs&subgroup=promoter);利用 NCBI 数据库的 Conserved domains 程序,预测基因的结构域;CpGPlot(http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/)进行 CpG 岛的预测;利用 expasy 在线数据库(<https://www.expasy.org/>)的 protparam 工具预测蛋白质的物理性质,TPred 程序预测蛋白的跨膜结构;Promoter 2.0 Prediction Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/promoter/>)进行启动子预测。MEGA^[8] 软件用于系统进化树的构建。

2 结果与分析

2.1 玉米 *Sh1* 基因结构及功能分析

2.1.1 基因结构分析 玉米 *Sh1* 基因位于第 9

收稿日期:2019-04-17

第一作者简介:来艳华(1980-),女,硕士,高级农艺师,从事农业开发项目管理工作。E-mail:15004508409@163.com。

号染色体(bin:9.01)的短臂上 10907132 位点到 10912947 位点之间,经基因组扫描,将其定位于染色体框架图(图 1),基因全长 5 816 bp,GC 含量为 45.7%,CDS 长 2 409 bp,共含有 17 个

ORF(预测长度介于 6~319 bp),3 个 CpG 岛(4022..4277,4374..4735 和 5239..5611)和 3 个潜在的 polyA 位点(1595,2603 和 3987),启动子预测位于 3 200 位点(图 2)。

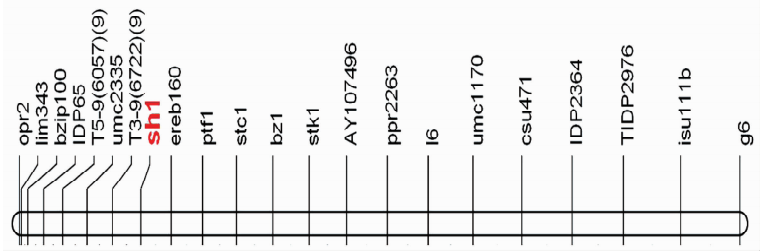


图 1 Sh1 基因在 9 号染色体上的位置

Fig. 1 The position of Sh1 gene on chromosome 9

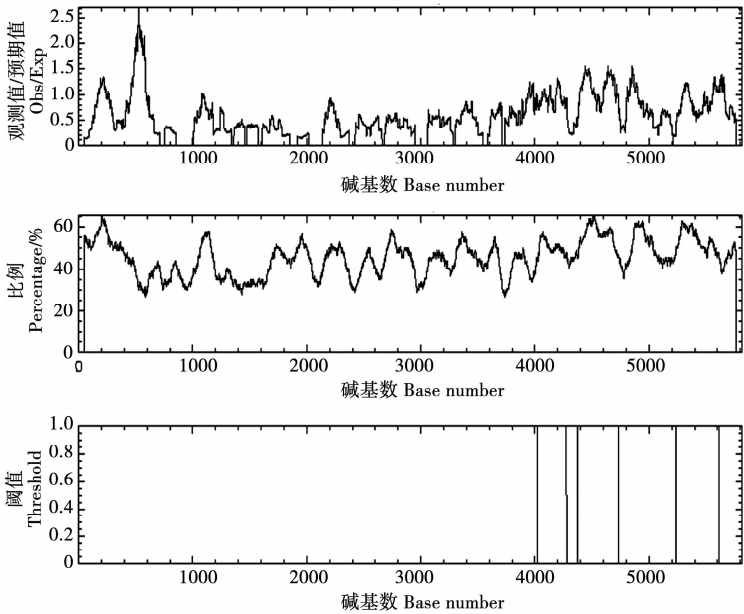


图 2 CpG 岛预测图示

Fig. 2 CpG islands predicting graphic

2.1.2 基因功能 Sh1 基因的 Gene ontology(GO)功能分类分析(图 3)表明,该基因参于生物进程(Biological Process)中蔗糖代谢进程(GO:0005985),其分子功能(Molecular Function)属于蔗糖合酶活性(GO:0016157),不参与细胞组分(Cellular Component)。

2.2 SH1 蛋白结构分析

2.2.1 基本理化性质分析 Sh1 基因编码蛋白 SH1(GRMZM2G089713)含 20 种共 802 个氨基酸,各种氨基酸的数量及比例统计如表 1,其中含量最高的是 Leu(11.1%),含量最低的是 Cys(0.9%),正(Asp+Glu)、负(Arg+Lys)电荷残基数分别为 103 和 91。该蛋白分子式为 C₄₁₅₃

H₆₄₃₈N₁₀₉₂O₁₂₀₀S₂₇,共 12 910 个原子,分子量为 91 731.02,蛋白水溶液在 280 nm 处的消光系数为 107 985,不稳定系数为 36.29,属于稳定型膜外蛋白,且不存在跨膜结构,以 Met 为 N 末端的蛋白质体外半衰期为 30 h。该蛋白的脂肪系数(Aliphatic index)为 90.46,亲水系数总平均值(Grand average of hydropathicity, GRAVY)为-0.264。

2.2.2 蛋白结构分析 预测 SH1 蛋白结构域如图 4 所示,包含 1 个蔗糖合成酶亚基(PF00862)和 1 个糖基转移酶亚基(PF00534),表明该蛋白在蔗糖生物合成中同时具有催化合成和分解的双重作用,是一种调节蔗糖生物合成的可逆酶。

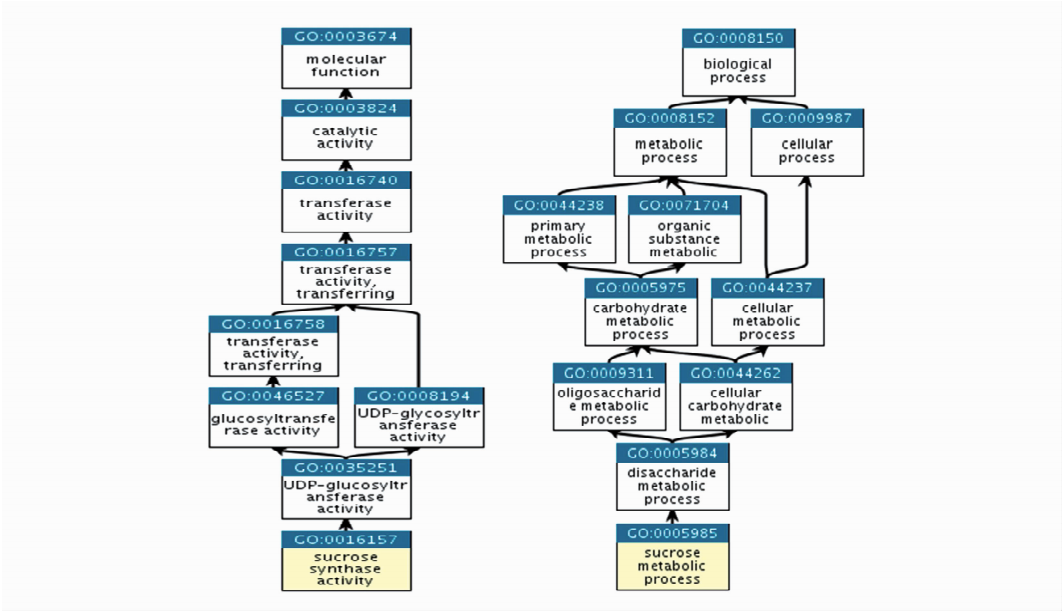


图 3 基因 GO 功能分类(a:分子功能;b:生物进程)

Fig. 3 Functional classification of GO gene(a: Molecular function; b: Biological process)

表 1 蛋白质氨基酸数量及比例

Table 1 Number and proportion of protein amino acid

氨基酸 Amino acid	缩略词 Abbreviation	数量 Number	比例 Proportion/%	氨基酸 Amino acid	缩略词 Abbreviation	数量 Number	比例 Proportion/%
Ala	A	51	6.40	Leu	L	89	11.10
Arg	R	42	5.20	Lys	K	49	6.10
Asn	N	30	3.70	Met	M	20	2.50
Asp	D	48	6.00	Phe	F	40	5.00
Cys	C	7	0.90	Pro	P	35	4.40
Gln	Q	30	3.70	Ser	S	52	6.50
Glu	E	55	6.90	Thr	T	40	5.00
Gly	G	47	5.90	Trp	W	9	1.10
His	H	23	2.90	Tyr	Y	39	4.90
Ile	I	49	6.10	Val	V	47	5.90

蛋白质二级结构分析,SH1 蛋白 α 螺旋结构 Helix(H) = 47.0%, β 折叠结构 Strand(E) = 12.5%,无规则卷曲 Loop(L) = 40.5%(图 5),共有 7 个二硫键位置(343..428..457..656..681..689..725),表明该蛋白生物活性的稳定性较高。

利用 SWISS-MODEL 软件 (<http://swiss-model.expasy.org/>) 的同源建模法进行蛋白质三维结构预测,获得 3 种可能的模型,通过 SWISS-PdbViewer(<http://ca.expasy.org/spdbv/>) 工具展示三维模型(图 6),结果与二级结构中 Helix 和 Loop 结构所占比例较高一致,同样显示 SH1

蛋白的空间结构比较复杂。

对玉米 SH1 蛋白序列覆盖丰度分析,未识别出磷酸化肽和磷酸化位点,只有非修饰肽,非修饰蛋白丰度标准化结果见图 7,表明 SH1 蛋白的高强度表达发生在授粉后 12~27 d,这一时期是玉米籽粒蔗糖生物合成的关键阶段。

2.3 物种进化分析

利用玉米 Sh1 编码蛋白(NP001334812.1)序列进行 BLASTp 同源蛋白检索,进行不同物种间 SH1 的进化分析,结果表明,玉米 SH1 属于 PLN00142 超家族(图 8),检索到 40 种与 SH1 同

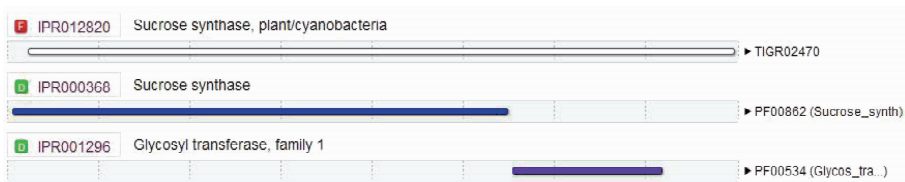


Fig. 4 Protein domains and functional sites

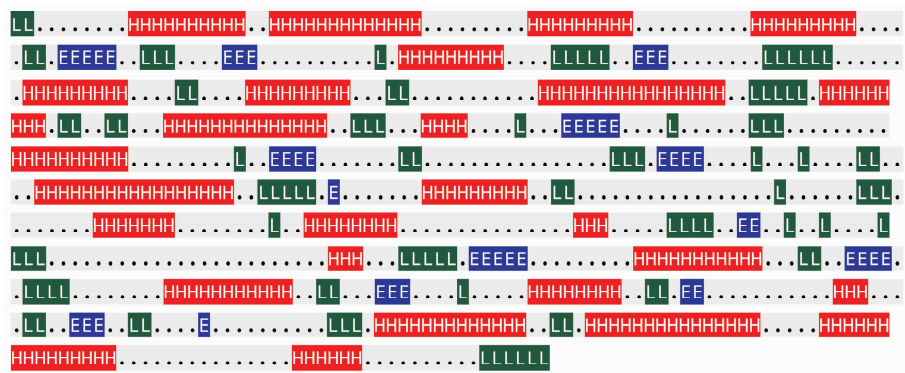


Fig. 5 Secondary structure simulation diagram of SH1

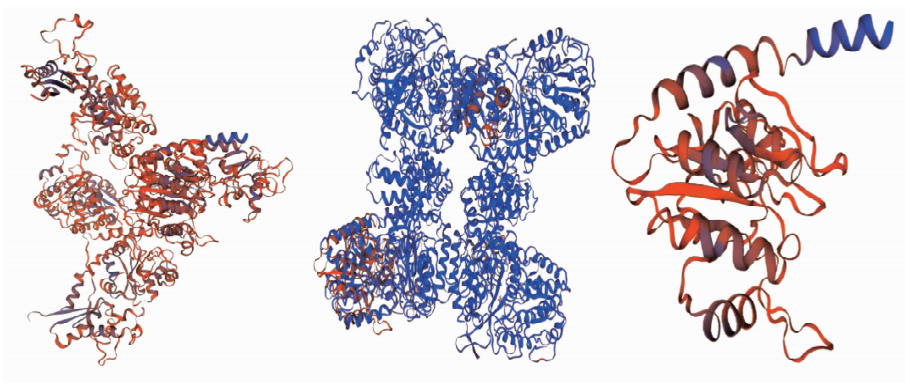


Fig. 6 Tertiary structure model of protein

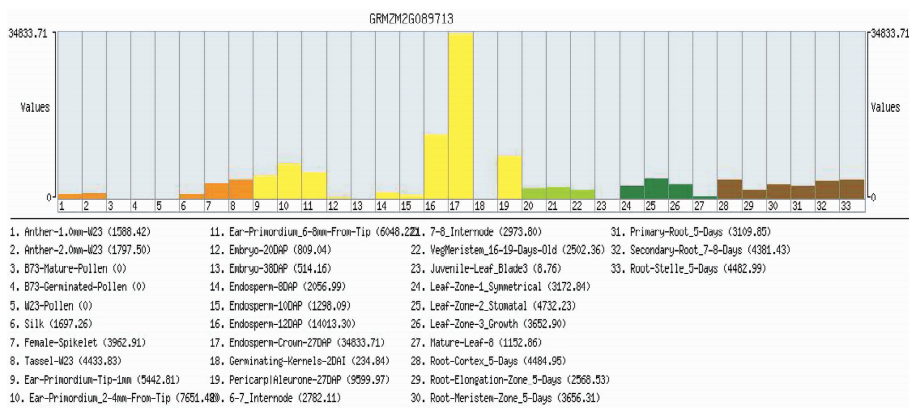


Fig. 7 Abundance of non-modified protein

源性较高的已知蛋白序列,其中高粱(XP 021305168.1)、甘蔗(AAM68126.1)与玉米的SH1蛋白亲缘关系最近(图9),推断高粱、甘蔗和

玉米在蔗糖生物合成的物种进化进程中具有很高的相似性,甚至SH1在上述植物的分化演变中序列高度保守且结构功能一致。

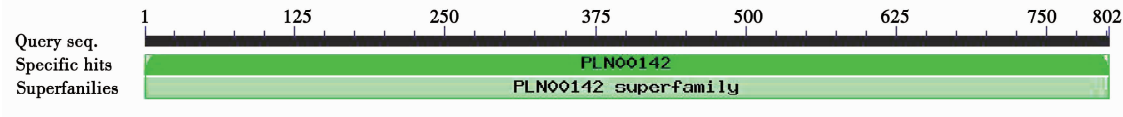


图 8 SH1 预测保守域
Fig. 8 Putative conserved domains of SH1

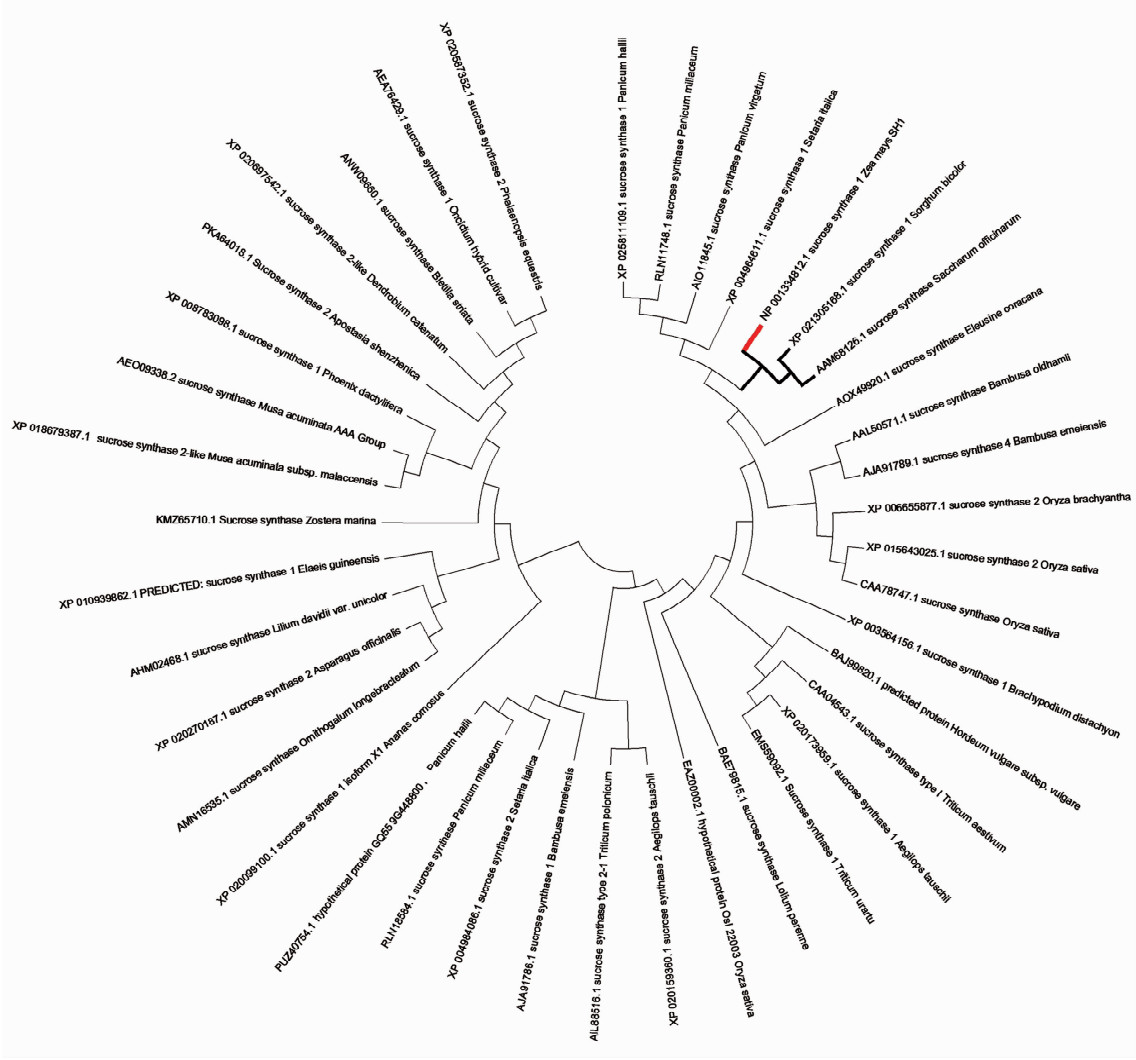


图 9 基于 SH1 的物种进化树(红线表示玉米 SH1)
Fig. 9 Species evolution tree based on SH1(The red line representing maize SH1)

3 结论与讨论

3.1 讨论

基因的结构分析是其生物学功能研究的基础。任何表型功能的缺失都与基因的结构或功能异常有关,因此,阐明表型变异的分子机制和进行

有效的人工干预,均需要以解释基因的结构和功能为基础。基因表达是一个复杂的过程,从基因及其编码蛋白的结构入手,进行结构变异和功能预测,是解开生物表型进化和遗传发育谜团的第一步,基因表达水平由基因的结构或调控区域的

突变决定。在玉米(特别是甜玉米)生物代谢合成中,蔗糖合成酶基因 *Sh1* 在糖分积累及植株生长发育过程中具有重要作用。

有研究表明,玉米 SH1 通过与其他亚基(SSIII、SSIIa、SBEIIa 和 SBEIIb)组装成 670-kD 的复合物在生长发育过程中代谢途径间碳分配的全局调控中发挥作用^[9]。在 *Sh1* 的 4 个突变位点(*Sh1*-2、*Sh1*-3、*Sh1*-4 和 *Sh1*-5), ATGT 和 GTGC 的两种单倍型分别与温度和玉米自交系的热带起源有关^[10]。本研究中预测的 3 种可能蛋白三级结构模型与已知 SH1 有 3 种亚型的说法完全一致^[7]。

当某些植物和动物内含子被放置在转录单元的 5'区时,它们的蛋白质编码序列的表达会增加。为了探讨内含子介导扩大的机制,Clancy M 等^[11]利用基因融合技术来识别培养的玉米细胞中扩大所需的 *Sh1* 第一内含子的特征,发现 *Sh1* 内含子的剪接对扩大是不可或缺的,由 T-rich motif 和剪接引发的转录修饰可能将 mRNA 与细胞的转运系统连接起来。本研究对玉米 SH1 蛋白的高强度表达的分析中发现高该蛋白的表达发生在授粉后 12~27 d,这一时期是玉米蔗糖生物合成的关键阶段。

此外,玉米蔗糖合酶编码基因(*Sh1*)在未被 *Fusarium verticillioides* 菌株侵染的玉米籽粒胚中正常表达,但在玉米蛋白质微粒和胚盘中经过该病原菌侵染才能诱导表达^[12],或许该基因参与了与病原菌的互作,还需进一步验证。

3.2 结论

Sh1 是编码玉米蔗糖合成酶的关键基因,在玉米的糖分代谢途径中具有重要作用。*Sh1* 基因位于玉米 9 号染色体短臂,全长 5 816 bp,在 GO 功能分类中参与蔗糖代谢进程,且具有蔗糖合酶活性。*Sh1* 基因编码蛋白含 20 种 802 个氨基酸,属于稳定型膜外蛋白,其二级结构中主要以 α 螺旋 Helix 和无规则卷曲 Loop 为主,兼具合成和分解酶活性亚基的 3 种三维模型,经蛋白序列丰度预测其功能表达发生在玉米授粉后 12~27 d。基于 SH1 的物种进化分析表明,玉米和高粱、甘蔗在蔗糖生物合成的物种进化演变中序列高度保

守。对 *Sh1* 基因及其编码蛋白的生物信息学分析,为揭示玉米蔗糖代谢途径的分子机制提供了依据。

参考文献:

- [1] Wu Y, Lee S K, Yoo Y, et al. Rice transcription factor OsD-OF11 modulates sugar transport by promoting expression of sucrose transporter and *SWEET* genes [J]. *Molecular Plant*, 2018, 11: 833-845.
- [2] Chen C, Yuan Y, Zhang C, et al. Sucrose phloem unloading follows an apoplastic pathway with high sucrose synthase in *Actinidia* fruit [J]. *Plant Science*, 2017, 255: 40-50.
- [3] Horst I, Welham T, Kelly S, et al. Tilling mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144: 806-820.
- [4] Gordon A J, Minchin F R, James C L, et al. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation [J]. *Plant Physiology*, 1999, 120: 867-878.
- [5] Schmolzer K, Gutmann A, Diricks M, et al. Sucrose synthase: A unique glycosyltransferase for biocatalytic glycosylation process development [J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34: 88-111.
- [6] Tong X, Wang Z, Ma B, et al. Structure and expression analysis of the sucrose synthase gene family in apple [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17: 847-856.
- [7] CC S, A P, K D, et al. Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 15625-15635.
- [8] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35: 1547-1549.
- [9] TA H, Q L, F G, et al. Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts [J]. *Plant Physiology*, 2009, 149: 1541-1559.
- [10] Cao W B, Zheng L L, Zhang Z F, et al. Genetic diversity of starch synthesis genes of Chinese maize (*Zea mays* L.) with SNPs [J]. *Molecular Biology*, 2009, 43(6): 937-945.
- [11] Clancy M, Hannah L C. Splicing of the maize *Sh1* first intron is essential for enhancement of gene expression, and a T-rich motif increases expression without affecting splicing [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(2): 918-929.
- [12] Shu X, Livingston D P, Franks R G, et al. Tissue-specific gene expression in maize seeds during colonization by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(7): 662-674.



王禹,耿月伟,谭巍,等. 童子一号草莓组织培养快繁体系的建立[J]. 黑龙江农业科学,2019(10):10-14.

童子一号草莓组织培养快繁体系的建立

王禹,耿月伟,谭巍,于非,张毓,刘博文,刘万达

(黑龙江省农业科学院园艺分院,黑龙江哈尔滨 150069)

摘要:为提高草莓种苗的繁殖速度及质量,以童子一号的茎尖为外植体,研究适宜的生长、丛生芽增殖的培养基、继代时间、继代次数以及生根培养基,并探讨了适宜的移栽条件。结果表明:草莓茎尖生长培养基为 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.2 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA;增殖培养基为 $\text{MS}+2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA,每30~40 d继代一次,可连续继代4次;生根培养基为 $0.2 \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA+ $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA;组培苗根系长至2 cm,植株高4 cm时进行移栽,移栽后遮光率不高于60%、空气湿度不高于60%、环境温度高于20℃,移栽成活率可达到87%。

关键词:草莓;茎尖;组织培养;移栽;成活率

草莓属于蔷薇科草莓属(*Fragaria ananassa* Duch.)多年生草本植物,其果实鲜嫩多汁,香气浓郁,酸甜适口,富含维生素C和P、Zn、Fe等营养成分以及多种氨基酸,具有较高的营养价值与保健功能,是一种经济价值较高的水果,在世界范围内被广泛栽培^[1]。草莓具有植株矮小、耐低温、耐弱光、生育期短、适应性强的特性^[2-4]。黑龙江省气候特点是冬季光照弱、温度低,适合草莓的生长发育。黑龙江省草莓栽培面积呈逐年上升的趋势,草莓优良种苗需求也逐年增多。草莓种苗一般采用无性繁殖,在繁殖过程中极易感染病毒,从

而造成草莓品种的种性退化,出现果实变小、品质变劣、产量降低等现象。

植物组织培养具有可脱除部分病毒和生育期短的特点,利用草莓组织培养技术繁育草莓种苗,可提高种苗的繁殖速度及质量^[5-8]。本试验以草莓茎尖为材料,研究适宜的生长、丛生芽增殖的培养基、继代时间、继代次数以及生根培养基,并探讨了适宜的移栽条件,以期建立草莓组织培养快繁体系,提高草莓种苗的繁殖速度及质量。

1 材料与方法

1.1 材料

试验以黑龙江省主要栽培草莓品种童子一号的当年生匍匐茎的茎尖为材料;采集地为黑龙江省农业科学院园艺分院;采集时间为2018年7月初至9月初。

收稿日期:2019-05-19

基金项目:黑龙江省农业科学院院级科研项目(YYYF039)。

第一作者简介:王禹(1982-),女,硕士,助理研究员,从事植物组织培养的研究。E-mail:liuwanda1982@126.com。

Bioinformatics Analysis on *Sh1* Gene of Maize Sucrose Synthase

LAI Yan-hua, ZHAO Ya-zhong

(Heilongjiang Agriculture Development Design Institute, Harbin 150040, China)

Abstract: Sucrose synthase is a key enzyme in the biosynthesis and metabolic pathway of maize to achieve sucrose synthesis and decomposition. Sucrose synthase gene *Sh1* is located in the short arm of chromosome 9 of maize, with the total length of 5 816 bp. *Sh1*-encoded protein SH1, containing a sucrose synthetase subunit(PF00862) and a glycosyl transferase subunit (PF00534) with 802 amino acids, was a combination of reversible enzyme catalytic synthesis and decomposition, which belongs to the stable type of membrane protein without transmembrane structure, and the three possible model shows that it has the complicated space structure. The key period of sucrose biosynthesis in maize is 12-27 days after pollination. In order to reveal the molecular mechanism of sucrose metabolism pathway in maize, the structure and function of *Sh1* gene were analyzed, and the basic physical and chemical properties and species evolution of *Sh1* encoding protein structure were studied.

Keywords: maize; sucrose synthase; *Sh1* gene