

· 论著 ·

催化菘蓝活性木脂素生物合成的漆酶基因家族生物信息学分析

陈亮^{1,2},李卿²,陈军峰²,冯婧娴²,张磊³,陈万生^{1,2} (1.福建中医药大学药学院,福建福州350122;2.第二军医大学附属长征医院药学部,上海200003;3.第二军医大学药学院药用植物学教研室,上海200433)

[摘要] 目的 从转录组数据库中发掘并分析了参与菘蓝落叶松脂素生物合成的关键合成酶之一——漆酶(laccase)的基因序列,并进行生物信息学分析,为以后的功能研究提供可靠依据。方法 利用生物信息学分析软件,从已有菘蓝转录组数据库中寻找漆酶并分析其各项特征,主要包括理化性质、同源性分析、蛋白结构分析和茉莉酸甲酯(MeJA)诱导后表达特征等分析。结果 菘蓝漆酶基因(*Iilacs*)中的*Iilac3*和*Iilac5*在MeJA诱导下的转录水平与药效成分的积累相一致,推测其可能为参与落叶松脂素合成的潜在的功能基因。结论 通过对菘蓝漆酶进行详细的生物信息学分析,可为今后功能蛋白的筛选和进一步研究其生理生化机制和结构特征打下坚实的基础。

[关键词] 菘蓝;漆酶;生物信息学;落叶松脂素

[中图分类号] R28

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)03-0208-07

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.005

Bioinformatics analysis of laccases involved in active lignans' biosynthesis in *Isatis indigotica*

CHEN Liang^{1,2}, LI Qing², CHEN Junfeng², FENG Jingxian², ZHANG Lei³, CHEN Wansheng^{1,2} (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 3. Department of Pharmaceutical Botany, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** Identifying laccases, as one of the key synthetases in the lariciresinol biosynthetic pathway, by analyzing the transcriptome sequencing results in *Isatis indigotica* would provide a dependable foundation for later functional study of *Isatis indigotica*'s laccases. **Methods** Bioinformatical softwares and kinds of analytical methods online were used to find out the characteristics of the laccases from *I. indigotica*, including physical and chemical properties, homology, and the properties after induction of MeJA. **Results** The transcriptional results showed that *Iilac3* and *Iilac5* from *I. indigotica* were corresponded with the accumulation of the effective metabolites, making them the potential functional genes participated in lariciresinol synthesis. **Conclusion** Through the detailed bioinformatical analysis of *Iilacs*, which laid a solid foundation for the further study of the physiological and biochemical mechanisms and structural characteristics of the functional proteins.

[Key words] *Isatis indigotica* Fort; laccase; bioinformatics; lariciresinol

菘蓝(*Isatis indigotica* Fort.)为十字花科(Cruciferae)菘蓝属(*Isatis*)植物,其干燥根为板蓝根,其干燥叶为大青叶,是一种常用药用植物。板蓝根和大青叶具有清热解毒、凉血利咽之功效,广泛应用于流行性感、流行性乙型脑炎、流行性腮腺炎、

急慢性肝炎和带状疱疹等病毒性疾病的防治^[1]。

前期研究表明,板蓝根的抗病毒有效成分主要是以落叶松脂素(lariciresinol)和其衍生物(开环异落叶松脂素、罗汉松树脂和开环异落叶松脂素二葡萄糖苷)为代表的木脂素类成分^[2-4]。目前,菘蓝抗病毒成分的生物合成途径已经非常清楚,如图1所示,该途径中的关键酶基因包括聚合蛋白酶(dirigent protein, DIR)、松脂醇还原酶(pinoresinol reductase, PLR)、开环异落叶松脂素脱氢酶(secoisolariciresinol dehydrogenase, SIRD)和糖基转移酶(UDP-sugar-dependent glycosyl transferase, UGT)等^[5]。其中DIR作为催化松柏醇到松脂醇这个步

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81325024, 81303160, 81673550, 31670292)

[作者简介] 陈亮,硕士研究生,研究方向:中药品质调控。Tel: 18516580296; Email: chenliang1990@163.com

[通讯作者] 陈万生,博士,教授,博士生导师,研究方向:中药品质调控。Tel: (021)81886181; Email: chenwanshengsmmu@aliyun.com

骤的关键酶需要在氧化酶(例如漆酶)的催化下才能够发挥其立体选择性作用^[6];而漆酶作为广泛存在于植物中的含铜离子的氧化酶,不仅参与了植物木质素的形成^[7],还能够降解有毒物质^[8],正受到越来越多

的关注。本研究从菘蓝转录组库^[9]中筛选出了30条菘蓝漆酶基因(*Iilacs*),包括16条完整基因和14条片段基因,对其中的16条完整基因进行了详细的生物信息学分析,以期为*Iilacs*的后续研究提供依据。

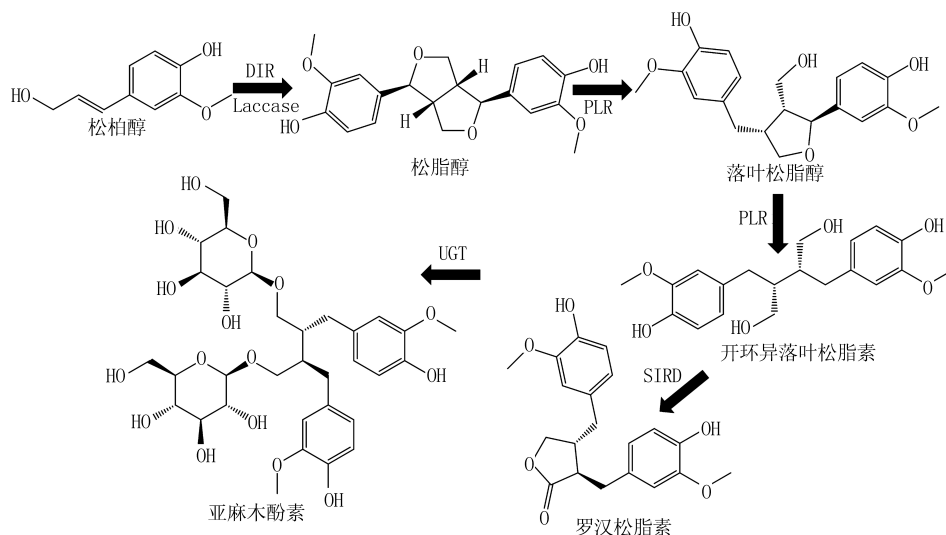


图1 菘蓝抗病毒活性成分落叶松脂素生物合成途径示意图

1 材料与方法

1.1 菘蓝漆酶的寻找与确认 以 laccase 为关键词,在美国国立生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI)公共数据库中分别搜索漆酶的相关核苷酸和蛋白序列。将获得的漆酶核苷酸和蛋白序列分别作为检索序列,通过 blastall 2.2.26 软件的 blastn 和 tblastn 算法在菘蓝转录组库^[9]中寻找漆酶基因。将得到的候选菘蓝漆酶基因通过 blastx 与 NCBI 数据库进行比对,删除非漆酶序列。将筛选后的漆酶取其开放阅读框(ORF, open reading frame),翻译成氨基酸序列后,通过 NCBI 数据库的 blastp 功能,确认其是否具有完整的漆酶功能域,从而判断其是否为漆酶。

1.2 菘蓝漆酶的生物信息学分析 将获得的菘蓝漆酶氨基酸序列,用 ProtParam 在线工具对其进行组成成分和理化性质的预测分析;用 SignalP 4.1 Server、TargetP 1.1 Server 和 TMHMM Server v. 2.0 分别对其进行信号肽、导肽和跨膜结构域的预测分析;用 ClustalX2 本地软件对其进行多重比对,并用 GeneDoc 显示比对结果,分析序列的结构特征;Pairwise 相似性通过 p-distance 计算模式,将多重比对结果导入 MEGA 5.05 软件计算获得。以上程序均采用默认设置。菘蓝漆酶蛋白的二级结构预测用 SOPMA 在线工具完成;蛋白高级结构同源建模采用 Phyre2 在线分析工具的头计算(Inten-

sive)模式完成;NJ 进化树(neighbor-joining, 邻位连接法)构建使用 MEGA 5.05 软件完成。重复抽样次数(No. of bootstrap replication)设为1000,用自举(Bootstrap)方法检验进化树的拓扑结构,将大于50%的 Bootstrap 值显示在进化树上。

2 结果

2.1 菘蓝漆酶基因的获得与确认 通过参考序列与菘蓝转录组的同源比对以及候选漆酶基因与 NCBI 的确认比对,最后从菘蓝转录组中找到了30条 *Iilacs*。漆酶作为一种多酚氧化酶,含有3个特定的铜离子结构域。为了确认这30条 *Iilacs* 是否为真正的漆酶基因,我们对其进行了铜离子结构域的寻找,发现30条 *Iilacs* 中,16条分别具有3个完整的铜离子结构域,为完整的漆酶基因;剩下的14条为漆酶的片段基因。

2.2 菘蓝漆酶蛋白与同源蛋白的相似性比较 将16条完整基因编码的蛋白通过 NCBI 的同源性比较,发现它们均与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)或者芜菁(*Brassica rapa*)的漆酶蛋白有很高的相似度(表1)。其中与芜菁匹配上的菘蓝漆酶蛋白有9个,相似度均在90%以上,最高的为 *IiLAC5* (97%)。与拟南芥匹配的有7个,相似度最高的是 *IiLAC6*,与拟南芥漆酶 *AtLAC4* 的相似度高达95%。*IiLAC7* 和 *IiLAC8* 均与 *AtLAC8* 匹配上,它们的相似度分别为77%和76%。

表1 菘蓝漆酶蛋白与同源蛋白的相似性比较

序列编号	命名	同源基因			
		名称	来源	相似性(%)	NCBI 登录号
comp8225_c0_seq1	<i>IiLAC1</i>	laccase22	<i>B. rapa</i>	91	XP_009146739.1
comp12809_c0_seq1	<i>IiLAC2</i>	laccase 7	<i>B. rapa</i>	91	XP_009146941.1
comp13376_c0_seq1	<i>IiLAC3</i>	laccase 5	<i>B. rapa</i>	94	XP_009143220.1
comp13910_c0_seq1	<i>IiLAC4</i>	laccase 17	<i>B. rapa</i>	95	XP_009131958.1
comp15339_c0_seq1	<i>IiLAC5</i>	laccase 3	<i>B. rapa</i>	97	XP_009141050.1
comp15356_c0_seq1	<i>IiLAC6</i>	laccase 4	<i>A. thaliana</i>	95	NP_565881.1
comp24674_c0_seq1	<i>IiLAC7</i>	laccase 8	<i>A. thaliana</i>	77	NP_195724.1
comp24674_c0_seq2	<i>IiLAC8</i>	laccase 8	<i>A. thaliana</i>	76	NP_195724.1
comp27829_c0_seq2	<i>IiLAC9</i>	laccase 13	<i>B. rapa</i>	95	XP_009122370.1
comp29314_c0_seq1	<i>IiLAC10</i>	laccase 11	<i>B. rapa</i>	96	XP_009125488.1
comp30628_c0_seq1	<i>IiLAC11</i>	laccase 1	<i>B. rapa</i>	92	XP_009110363.1
comp32641_c0_seq1	<i>IiLAC12</i>	laccase 6	<i>A. thaliana</i>	91	NP_182180.1
comp32641_c0_seq2	<i>IiLAC13</i>	laccase 6	<i>A. thaliana</i>	91	NP_182180.1
comp32641_c0_seq3	<i>IiLAC14</i>	laccase 6	<i>A. thaliana</i>	91	NP_182180.1
comp32641_c0_seq4	<i>IiLAC15</i>	laccase 6	<i>A. thaliana</i>	91	NP_182180.1
comp236099_c0_seq1	<i>IiLAC16</i>	laccase 2	<i>B. rapa</i>	93	XP_009144396.1

2.3 菘蓝漆酶蛋白的理化特性分析 将16条完整的菘蓝漆酶蛋白通过 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)进行理化特性的分析,结果如表2所示。16条菘蓝漆酶的氨基酸残基数在569左右,其中 *IiLAC6* 最少,为558; *IiLAC7* 最多,为593。相对分子质量在61 000~66 000之间。所有漆酶蛋白的碱性氨基酸均多于酸性氨基酸,呈碱性,

它们的等电点也均在8.0以上,进一步证实菘蓝漆酶蛋白为碱性蛋白。蛋白的稳定性由不稳定系数来衡量,当蛋白的不稳定系数大于40时其稳定性比较差。在16条菘蓝漆酶中有13条的不稳定系数在40以下,说明大多数菘蓝漆酶蛋白的稳定性较好。菘蓝漆酶蛋白亲水性平均系数(grand average of hydropathicity, GRAVY)均小于0。

表2 菘蓝漆酶蛋白的理化性质分析

蛋白名称	氨基酸残基数(个)	相对分子质量($\times 10^3$)	理论等电点	酸性氨基酸数(个)	碱性氨基酸数(个)	不稳定系数	脂肪系数	亲水性平均系数
<i>IiLAC1</i>	561	61.86	9.00	37	46	31.46	84.58	-0.122
<i>IiLAC2</i>	568	62.46	8.86	36	43	38.87	85.99	-0.013
<i>IiLAC3</i>	581	64.09	8.77	40	47	32.23	82.56	-0.120
<i>IiLAC4</i>	572	63.61	9.19	35	47	31.62	81.96	-0.132
<i>IiLAC5</i>	570	64.21	9.61	37	53	42.76	77.68	-0.246
<i>IiLAC6</i>	558	61.50	9.33	33	48	33.11	87.44	-0.067
<i>IiLAC7</i>	593	66.73	8.73	36	42	42.47	82.16	-0.090
<i>IiLAC8</i>	585	65.64	8.91	34	42	42.52	82.79	-0.075
<i>IiLAC9</i>	568	63.14	8.06	41	43	39.31	81.55	-0.132
<i>IiLAC10</i>	561	62.30	8.85	40	47	34.80	83.53	-0.105
<i>IiLAC11</i>	578	65.07	8.04	52	54	31.20	79.58	-0.225
<i>IiLAC12</i>	569	63.78	8.20	45	48	29.28	83.09	-0.169
<i>IiLAC13</i>	569	63.78	8.20	45	48	29.28	83.09	-0.169
<i>IiLAC14</i>	569	63.78	8.20	45	48	29.28	83.09	-0.169
<i>IiLAC15</i>	569	63.78	8.20	45	48	29.28	83.09	-0.169
<i>IiLAC16</i>	578	64.28	9.55	27	48	36.94	81.76	-0.129

2.4 菘蓝漆酶蛋白信号肽和导肽的预测和分析 *IiLACs* 信号肽预测结果显示,16个参与分析的 *IiLACs* 都具有信号肽。为了验证这个结果,同时

利用导肽(导向序列)分析软件对菘蓝漆酶进行了导肽分析,结果表明这16个漆酶的导肽均为分泌途径的信号肽,且预测长度与信号肽预测结果一致

(*i*LAC16 除外)。

2.5 菘蓝漆酶蛋白的跨膜结构域的预测和分析

利用在线工具 TMHMM Server v. 2.0 对 *i*LACs 进行跨膜结构分析,结果显示, *i*LAC1、4、6、9、11、12、13、14、15、16 不存在跨膜结构,整条肽链都位于细胞膜之外; *i*LAC2、3、5、7、8、10 分别具有 1 个跨膜结构域。其中, *i*LAC2 的跨膜结构域位于该漆

酶序列的第 7 位氨基酸至 26 位氨基酸; *i*LAC3 的跨膜结构域位于第 12 位氨基酸至 30 位氨基酸, *i*LAC5 和 *i*LAC10 的跨膜域均位于第 7 位氨基酸至 29 位氨基酸, *i*LAC7 和 *i*LAC8 的跨膜结构域均位于第 20 位氨基酸至 42 位氨基酸。

2.6 菘蓝漆酶蛋白的多重序列比对分析 将 16 条 *i*LACs 进行多重序列比对,结果如图 2 所示。其中

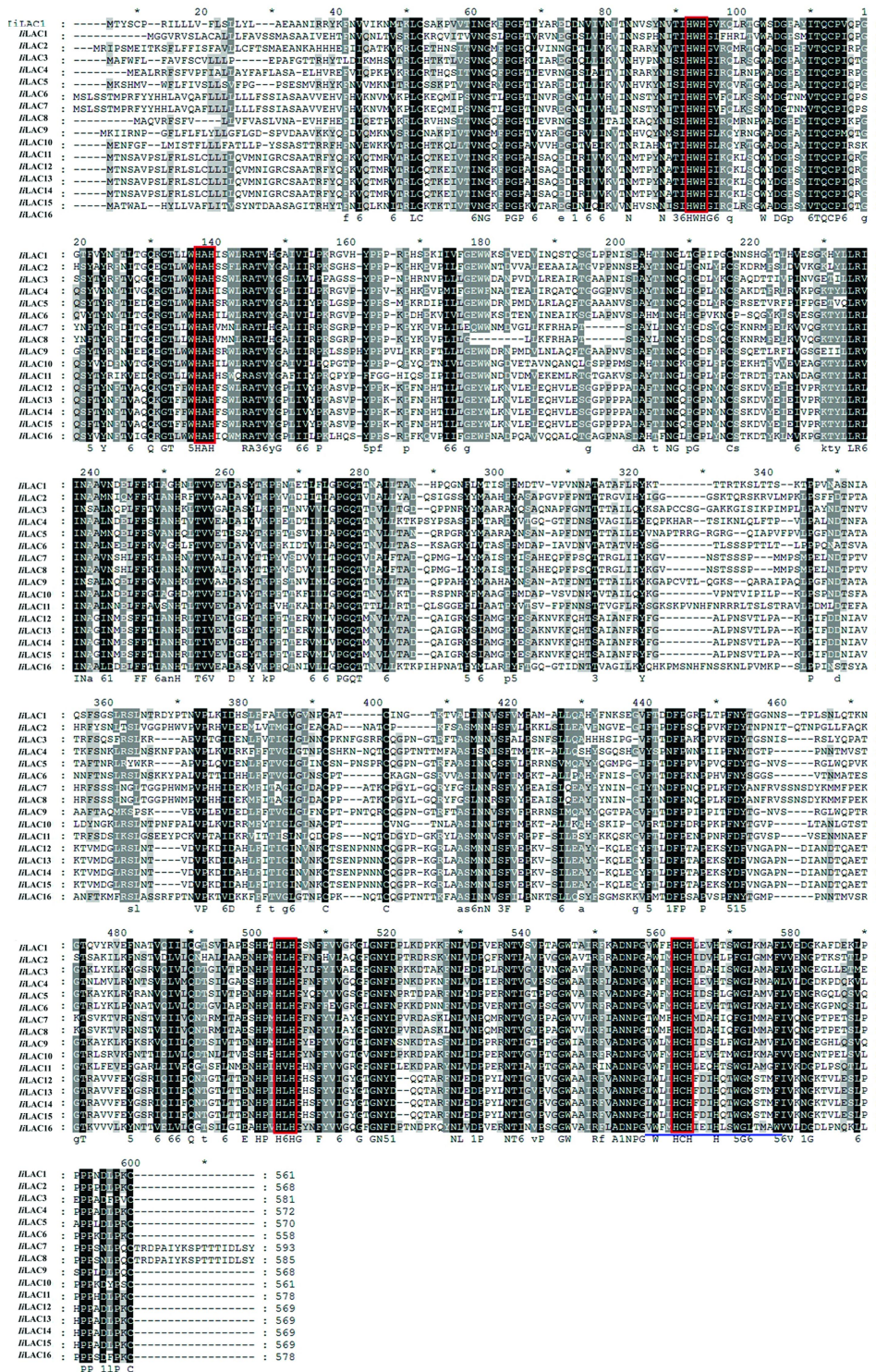


图 2 菘蓝漆酶的多重序列比对

黑色背景部分是共同含有的氨基酸;灰色背景部分是不完全相同的部分;HWH、HAH、HLH和HCH是4个铜离子结合位点;蓝色下划线部分为漆酶显蓝色的重要结构位点。

2.7 菘蓝漆酶蛋白氨基酸的相似性比较及系统发生树构建 对这16条菘蓝漆酶进行序列相似性比较,发现蛋白序列间两两比较(pairwise comparison)相似性从40.1%(*IiLAC7*与*IiLAC16*)到100%(*IiLAC12*,*IiLAC13*,*IiLAC14*和*IiLAC15*)不等,绝大多数序列间的相似性在45%左右。通过MEGA 5.0使用neighbor-joining(NJ)法,在重复1000次计算下构建了16条*IiLACs*与模式植物拟南芥漆酶蛋白的系统发生树(图3)。其中*IiLAC6*、*IiLAC10*、*IiLAC4*分别与*AtLAC4*、*AtLAC11*、*AtLAC17*有很高的相似度,而拟南芥中这3个漆酶的功能主要与木质素的合成有关^[10,11],提示菘蓝中的这3条漆酶极有可能行使相同的功能。研究表明^[12],*AtLAC2*在盐胁迫下的转录水平会大幅提高,同时改变根的伸长以适应环境。因此,与*AtLAC2*最接近的*IiLAC16*可能与植物的抗逆机制有关,这需要进一步实验验证。*IiLAC7*和*IiLAC8*与*AtLAC8*在同一小簇,报道称,*AtLAC8*与花的发育有关(突变掉*AtLAC8*后,拟南芥会提前开花,而且花枝的叶片会减少)^[12],那么*IiLAC7*和*IiLAC8*可能具有相似的作用。

2.8 菘蓝漆酶蛋白的二级和三级结构预测分析 菘蓝漆酶蛋白序列的二级结构预测结果如表3所示,其蛋白序列由4个结构组件组成,分别是α螺旋、β折叠、延伸链和无规则卷曲。从表中可以看出无规则卷曲和延伸链为主导,α螺旋次之,β折叠所占比例最小。

*IiLACs*蛋白的三级结构预测采用Phyre2线串法的从头计算模式完成,结果如图4所示。

2.9 MeJA 诱导后的菘蓝漆酶蛋白表达特征分析

对菘蓝毛状根用MeJA(50 μmol/L)进行处理,收获不同处理时间的样品,提取RNA进行转录组测序得到菘蓝基因的表达谱^[9]。分析菘蓝漆酶的表达特征热图,从绿色到红色表达量逐渐升高(图5)。从图5中可以看出16条*IiLACs*的表达量呈现不同的变化趋势,其中*IiLAC1*、*IiLAC13*和*IiLAC14*因表达量太低而未能检测到。*IiLAC8*在1h和6h的表达量均很高。*IiLAC3*、*IiLAC4*、*IiLAC5*、*IiLAC6*和*IiLAC10*的表达量随着时间推移而增加,均在6h的时候达到顶峰,随后逐步下降,与落叶松脂素的积累变化相一致^[9],表明它们极有可能

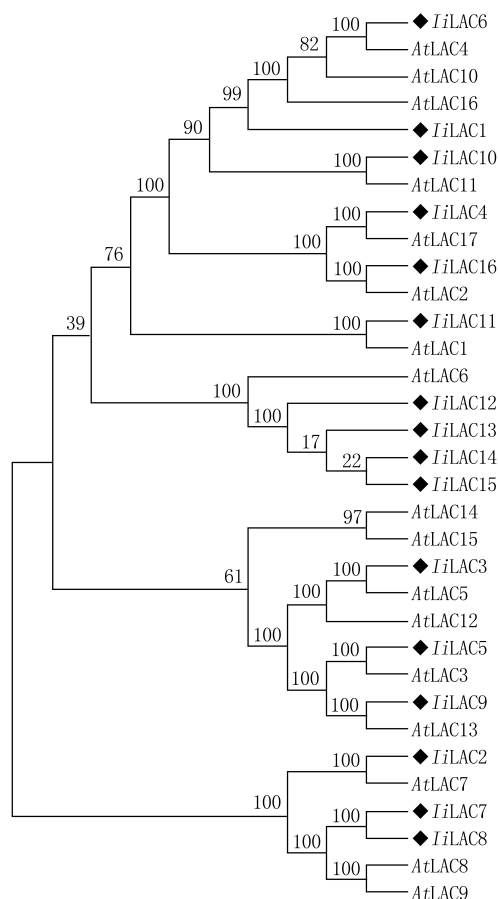


图3 菘蓝与拟南芥漆酶蛋白的系统发生树

表3 菘蓝漆酶二级结构主要构成组件比例

名称	α-螺旋 (%)	延伸链 (%)	β-折叠 (%)	无规则卷曲 (%)
<i>IiLAC1</i>	17.47	29.95	9.80	42.78
<i>IiLAC2</i>	20.07	28.70	11.44	39.79
<i>IiLAC3</i>	18.07	29.78	8.61	43.55
<i>IiLAC4</i>	13.99	31.47	9.09	45.45
<i>IiLAC5</i>	17.37	28.77	9.65	44.21
<i>IiLAC6</i>	15.59	34.23	10.57	39.61
<i>IiLAC7</i>	16.86	30.69	9.78	42.66
<i>IiLAC8</i>	16.24	30.60	9.91	43.25
<i>IiLAC9</i>	16.55	32.92	8.98	41.55
<i>IiLAC10</i>	14.80	34.05	10.70	40.46
<i>IiLAC11</i>	16.96	32.18	9.86	41.00
<i>IiLAC12</i>	17.40	29.53	10.19	42.88
<i>IiLAC13</i>	17.40	29.53	10.19	42.88
<i>IiLAC14</i>	17.40	29.53	10.19	42.88
<i>IiLAC15</i>	17.40	29.53	10.19	42.88
<i>IiLAC16</i>	13.32	31.14	10.21	45.33

参与落叶松脂素的生物合成。而*IiLAC7*在24h的时候表达量才有提高,说明其响应较慢。*IiLAC11*和*IiLAC16*随着时间的推移,在24h时表达量受到了明显的抑制。

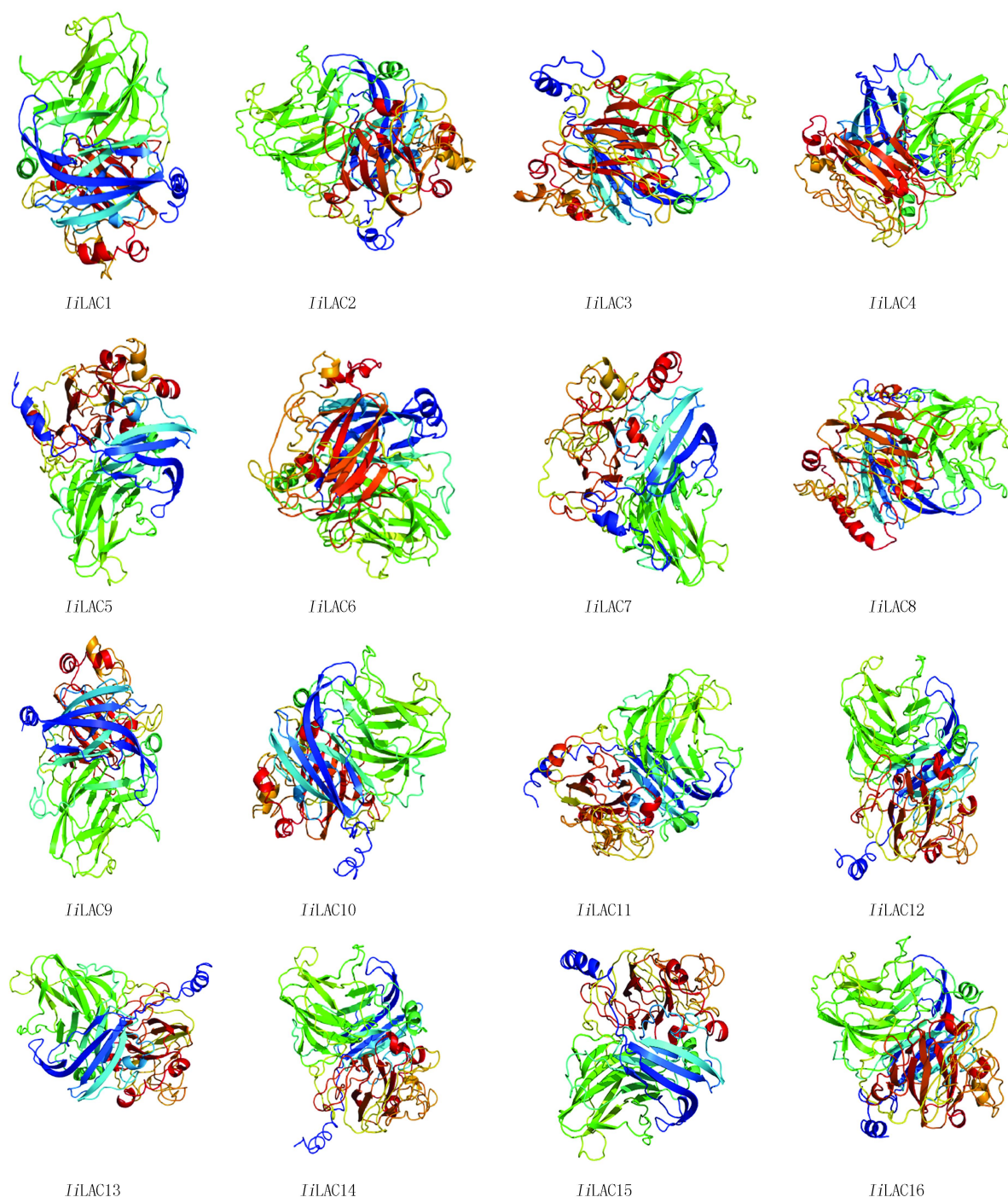


图4 菘蓝漆酶蛋白的三维结构预测图

3 讨论

漆酶作为一种氧化酶在造纸、食品、纺织、污水处理和化学合成等行业中有着不错的前景。从真菌到细菌再到植物,漆酶的研究范围越来越广,功能研究也在不断深入,然而漆酶在植物中的研究才触及冰山一角。漆酶在体内代谢功能研究领域里除了与木质素合成相关的研究成果比较丰硕以外,其他的

功能还有待进一步挖掘。本研究从文献入手,找到了与漆酶相关的药效成分代谢途径,借助生物信息学手段,对可能参与落叶松脂素生物合成途径的漆酶进行了全面的分析,不仅分析了菘蓝漆酶的序列同源性、基本理化性质、蛋白结构、信号肽等,还与其他植物漆酶蛋白进行横向比较,使 IiLACs 从结构上、功能上更加清晰与分明。

MeJA 作为植物次生代谢中重要的信号分子,

能够调控大量次生代谢产物的积累。通过分析发现 MeJA 诱导后, 菘蓝木脂素类的含量积累变化与 *IiLAC3*、*IiLAC4*、*IiLAC5*、*IiLAC6* 和 *IiLAC10* 的表达量相一致, 而 *IiLAC4*、*IiLAC6* 和 *IiLAC10* 可能与木质素合成相关, 因此, *IiLAC3* 和 *IiLAC5* 极有可能是参与落叶松脂素合成的相关漆酶蛋白,

但仍有待进一步实验验证。本文通过对重要基因的挖掘、分析以及筛选, 为进一步研究参与菘蓝落叶松脂素生物合成相关的漆酶基因的代谢机制、结构功能提供了线索和依据, 为通过基因工程提高菘蓝抗病毒成分——落叶松脂素的含量提供了有利基础。



图5 菘蓝漆酶在 MeJA 诱导下的表达

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 205-206.
- [2] 李彬. 板蓝根活性成分及品质评价[D]. 上海: 第二军医大学, 2003.
- [3] Satake H, Ono E, Murata J. Recent advances in the metabolic engineering of lignan biosynthesis pathways for the production of transgenic plant-based foods and supplements[J]. J Agr Food Chem, 2013, 61(48): 11721-11729.
- [4] Yang Z, Wang Y, Zheng Z, et al. Antiviral activity of *Isatis indigotica* root-derived clemastanin B against human and avian influenza A and B viruses *in vitro* [J]. Int J Mol Med, 2013, 31(4): 867-873.
- [5] Nakatsubo T, Mizutani M, Suzuki S, et al. Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinorensinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis [J]. J Biol Chem, 2008, 283(23): 15550-15557.
- [6] Davin LB, Lewis NG. Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis [J]. Plant Physiol, 2000, 123(2): 453-462.
- [7] Bao W, O'Malley DM, Whetten R, et al. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem [J]. Science, 1993, 260(5108): 672-674.
- [8] Wang GD, Li QJ, Luo B, et al. Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(7): 893-897.
- [9] Chen J, Dong X, Li Q, et al. Biosynthesis of the active compounds of *Isatis indigotica* based on transcriptome sequencing and metabolites profiling [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 857.
- [10] Berthet S, Demont-Caulet N, Pollet B, et al. Disruption of LACCASE 4 and 17 results in tissue-specific alterations to lignification of *Arabidopsis thaliana* stems [J]. Plant Cell, 2011, 23(3): 1124-1137.
- [11] Zhao Q, Dixon RA. LACCASE is necessary and nonredundant with PEROXIDASE for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2013, 25(10): 3976-3987.
- [12] Cai X, Davis EJ, Ballif J, et al. Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot, 2006, 57(11): 2563-2569.

〔收稿日期〕 2017-02-21 〔修回日期〕 2017-04-15

〔本文编辑〕 顾文华