

DOI: 10.3969/j.issn.0488-5368.2024.01.002

烟草 Nt-GAD 的氨基酸序列分析

龙 岗,陈树鸿,龙建林,高 萍,赵 娟

(四川省烟草公司凉山州公司会理分公司,四川 会理 615100)

摘要:为从分子层面研究烟草 Nt-GAD 的氨基酸序列,采用 ProtParam、InterPro、Blast、Muscle、Phyml 和 TreeDyn 工具,分析烟草 Nt-GAD 氨基酸序列的理化特性、结构域和进化树。结果表明:烟草 Nt-GAD 成员的等电点均处于 5.5~6 之间,且 Nt-GAD1 和 Nt-GAD2 同源性最高,此外 Nt-GAD2 的耐热性最好,Nt-GAD3 的稳定性最强;烟草 Nt-GAD 属于磷酸吡哆醛依赖性脱羧酶家族和谷氨酸脱羧酶家族,且具有磷酸吡哆醛依赖性转移酶同源超家族结构域,C 末端存在独特区域钙调蛋白结构域,通过进化树分析烟草 Nt-GAD 成员被划分为三组,其中烟草 Nt-GAD3(第一组)分化较为突出,而 Nt-GAD2(第三组)则较为保守,而 Nt-GAD1 和 Nt-GAD4 被划分为第二组。

关键词:烟草;谷氨酸脱羧酶;生物学

中图分类号:S511 **文献标识码:**A **文章编号:**0488-5368(2024)01-0007-04

Amino Acid Sequence Analysis of Nt-GAD in Tobacco

LONG Gang¹, CHEN Shuhong¹, LONG Jianlin¹, GAO Ping¹, ZHAO Juan¹

(Huili Branch, Liangshan Prefecture Company, Sichuan Tobacco Corporation, Huili, Sichuan 615100, China)

Abstract: To investigate the amino acid sequence of tobacco Nt-GAD at the molecular level, the physical and chemical characteristics, structural domains and evolutionary trees of tobacco Nt-GAD amino acid sequence were analyzed using the tools of ProtParam, InterPro, Blast, Muscle, Phyml and TreeDyn. The results showed that the isoelectric points of tobacco Nt-GAD members ranged between 5.5~6, and Nt-GAD1 exhibited the highest homology with Nt-GAD2. In addition, Nt-GAD2 had the best heat resistance and Nt-GAD3 had the strongest stability. Tobacco Nt-GAD was classified within the pyridoxal phosphate-dependent decarboxylase family and the glutamate decarboxylase family, possessing the pyridoxal phosphate-dependent transferases homologous superfamily domain. A distinctive calmodulin domain was located at the C-terminal. Based on evolutionary tree analysis, tobacco Nt-GAD members were categorized into three groups. Among these group, tobacco Nt-GAD3 (group 1) is more prominent, whereas Nt-GAD2 (group 3) is more conservative, Nt-GAD1 and Nt-GAD4 constitute the second group.

Key words: Tobacco; Glutamate decarboxylase; Biology

引言

烟草在大田生长过程中,为应对大自然不利因素的影响,可通过烟草谷氨酸脱羧酶(Nt-GAD),

催化谷氨酸盐或 L-谷氨酸形成 γ -氨基丁酸(GABA)^[1],进而调节氮和碳含量,增强对外界胁迫的抵抗能力^[2],同时,可调节乙烯含量,影响烟叶成熟进程^[3],此外,烟草青枯病的发生与烟草 Nt-GAD 具有一定的相关性^[4],茄科劳尔氏菌可促进烟草

收稿日期:2023-03-11 修回日期:2023-05-05

第一作者简介:龙岗(1979-),男,大学本科,助理农艺师,主要从事烟草标准化研究。

通信作者:陈树鸿。

γ -氨基丁酸大量产生,并利用烟草中 γ -氨基丁酸进行繁殖生长,最终导致烟草发生青枯病。目前,关于谷氨酸脱羧酶的研究,主要集中在大肠杆菌、短乳杆菌、芽孢杆菌等^[5~7],以及主要从催化活性、热稳定性、分离纯化等方面进行研究^[8~10]。为此,该文主要从生物信息学的角度对烟草 Nt-GAD 氨基酸序列进行分析,以对烟草 Nt-GAD 分子层面的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

通过 NCBI 数据库^[11]收集烟草谷氨酸脱羧酶氨基酸序列,获得成员序列登录号:AAB40608, NP_001312970, XP_016466778 和 XP_016496063,参照命名规则^[12],依次将其命名为:Nt-GAD1、Nt-GAD2、Nt-GAD3 和 Nt-GAD4。

1.2 方法

通过采用 Protparam、Interpro、Blast、Muscle、Phyml 和 Treedyn 工具^[13~16],对烟草 Nt-GAD 的氨基酸序列进行理化特性、结构域和进化树分析。

2 结果与分析

2.1 烟草 Nt-GAD 氨基酸序列的理化特性分析

通过对烟草 Nt-GAD 氨基酸序列的理化特性分析,获得各成员的分子式,Nt-GAD1 为 $C_{2510}H_{3941}N_{669}O_{742}S_{21}$, Nt-GAD2 为 $C_{2518}H_{3950}N_{668}O_{735}S_{19}$, Nt-GAD3 为 $C_{2549}H_{3973}N_{673}O_{742}S_{21}$, Nt-GAD4 为 $C_{2044}H_{3201}N_{541}O_{592}S_{14}$,其分子量以 Nt-GAD3 最大(56 591.91 Da),Nt-GAD4 最小(45 275.01 Da);此外,四组成员(Nt-GAD1、Nt-GAD2、Nt-GAD3 和 Nt-GAD4)的氨基酸个数依次为 496、491、502 和 401,各氨基酸所占比,如图 1 所示,尽管各序列之间存在一定差异,但通过 Nt-GAD 氨基酸序列排布,以及相同氨基酸之间的对比可知,Nt-GAD1 和 Nt-GAD2 同源性最高。Nt-GAD1、Nt-GAD2、Nt-GAD3 和 Nt-GAD4 半衰期均大于 20 h(于酵母菌体内),说明四组成员均能够较长时间的执行功能,进而有效地行使烟草 Nt-GAD 的作用;通过不稳定指数进一步分析,Nt-GAD4 的不稳定指数最大,为 34.44,其次为 Nt-GAD2,不稳定指数为 32.26,再次之为 Nt-GAD1,不稳定指数为 32.05,Nt-GAD3 的

不稳定指数最小,为 31.19,四组成员的不稳定指数均小于 40,因此表明以上成员均属于稳定性蛋白,但 Nt-GAD3 的不稳定指数最小,且 Nt-GAD1 和 Nt-GAD3S 元素数量最多,达 21 个,由此推断 Nt-GAD3 最为稳定,可更好的发挥作用;Nt-GAD1、Nt-GAD2、Nt-GAD3 和 Nt-GAD4 的等电点依次为 5.67、5.64、5.92、5.95,均属于酸性,其中 Nt-GAD2 等电点最小,表明 Nt-GAD2 酸性较强;烟草 Nt-GAD 各成员的脂肪指数分别为 88.63、92.26、87.53 和 91.37,其中,Nt-GAD2 的脂肪指数最大,说明 Nt-GAD2 的耐热性最好。

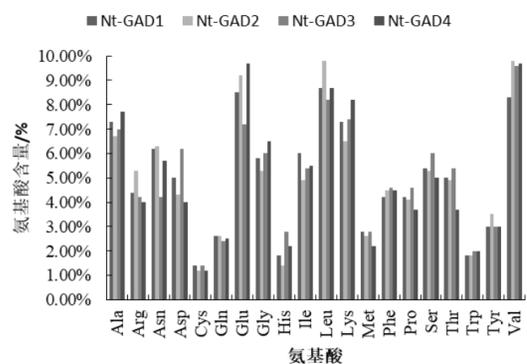


图 1 烟草 Nt-GAD 各成员氨基酸含量

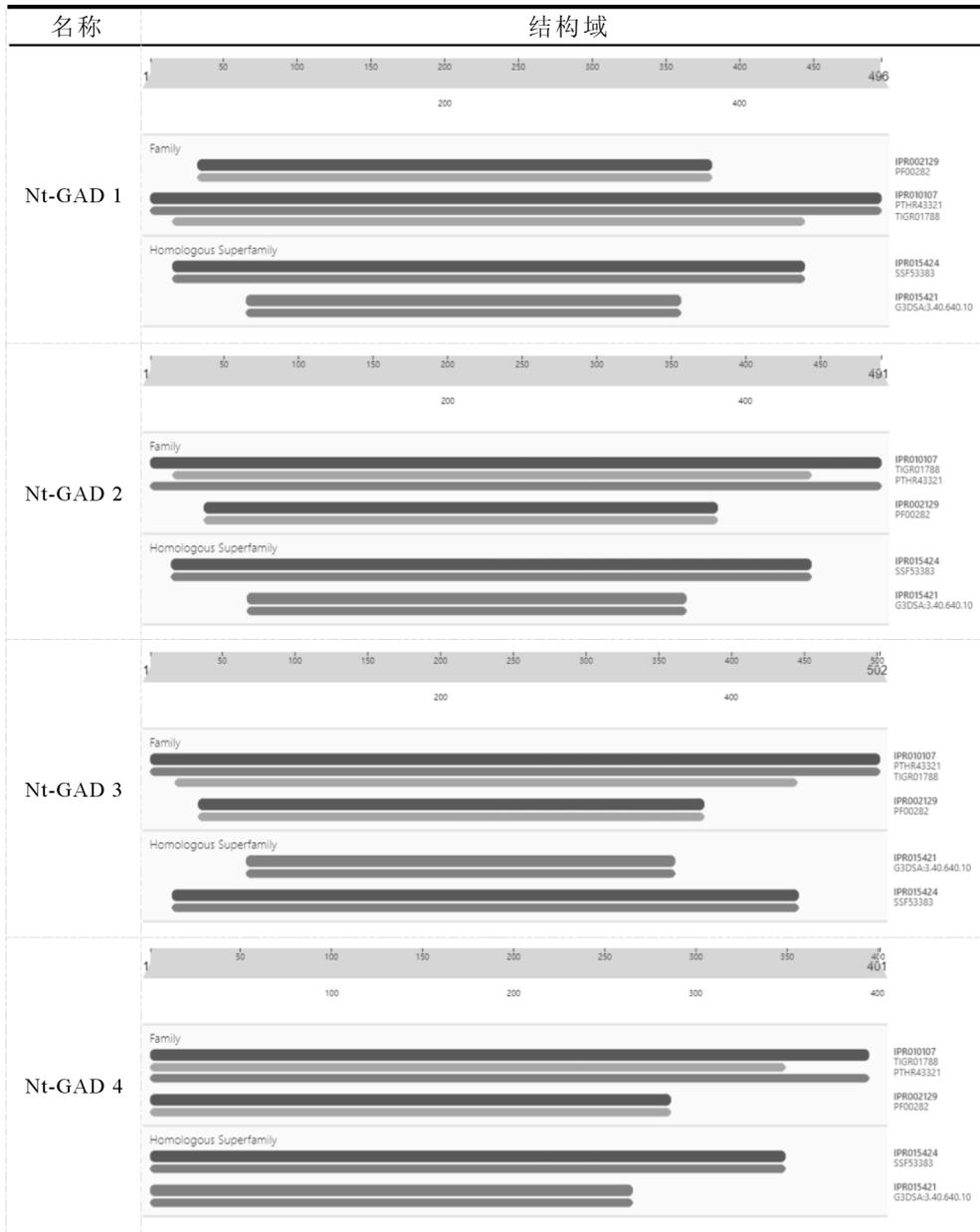
2.2 烟草 Nt-GAD 氨基酸序列的蛋白结构分析

通过对烟草 Nt-GAD 氨基酸序列的蛋白结构分析,结果如表 1 所示。Nt-GAD1、Nt-GAD2、Nt-GAD3 和 Nt-GAD4 均检测出相同的家族和同源性超家族,其中通过 Pfam 数据库检测出烟草 Nt-GAD 具有吡哆醛依赖性脱羧酶保守结构域(PF00282),属于磷酸吡哆醛依赖性脱羧酶家族(IPR002129),同时通过 PANTHER 和 TIGRFAMs 数据库检测出烟草 Nt-GAD 具有谷氨酸脱羧酶结构域(PTHR43321、TIGR01788),属于谷氨酸脱羧酶家族(IPR010107),四组成员的吡哆醛依赖性脱羧酶保守结构域序列分别为:33-381、37-381、34-381 和 1-286,PANTHER 检测出的谷氨酸脱羧酶结构域分别位于:1-496、1-491、1-502 和 1-395,TIGRFAMs 检测出的谷氨酸脱羧酶结构域分别位于:16-444、16-444、18-445 和 1-349;通过 SUPERFAMILY 数据库检测出烟草 Nt-GAD 具有 PLP 依赖性转移酶结构域(SSF53383),属于磷酸吡哆醛依赖性转移酶同源超家族(IPR015424),CATH-Gen3D 数据库检测出烟草 Nt-GAD 具有 I 型 PLP 依赖性天冬氨

酸氨基转移酶结构域(G3DSA:3.40.640.10),同样属于磷酸吡哆醛依赖性转移酶同源超家族(IPR015421),其中 SUPERFAMILY 检测出的序列分别位于:16-444、15-444、16-446 和 1-349,CATH-Gene3D 检测出的序列分别位于:66

-360、66-360、67-361 和 1-265;磷酸吡哆醛依赖性脱羧酶家族主要参与羧酸代谢过程,其分子功能分别为碳碳裂合酶活性和磷酸吡哆醛结合,谷氨酸脱羧酶家族主要参与谷氨酸代谢过程,其分子功能分别为谷氨酸脱羧酶活性和磷酸吡哆醛结合。

表 1 烟草 Nt-GAD 各成员结构域



2.3 烟草 Nt-GAD 氨基酸序列的进化树分析

为对烟草 Nt-GAD 氨基酸序列进行进化树分析,以辣椒成员(PHT64857、KAF3656116、XP_016537477),番茄成员(NP_001233822、NP_001306255、XP_004237250、NP_001233827),拟南芥成员(NP_197235、NP_001324150、NP_001117556)和大豆成员(XP_003519319、XP_

003534114)进行比对,并通过 20 次迭代,得出结果如图 2 所示。通过对四个物种之间的比对,各成员之间表现出一定分化,根据分支支持值,将包括烟草在内的五个物种划分为三组,其中 Nt-GAD3 被划分至第一组,该类物种和成员数最少,除 Nt-GAD3 外,仅包含大豆(XP_003534114),且根据分支支持值,烟草 Nt-GAD3 和大豆(XP_

003534114) 进化最为一致, Nt-GAD1 和 Nt-GAD4 被划分至第二组, 除大豆外, 包含所有物种, Nt-GAD2 被划分至第三组, 该组包含所有物种, 且成员最多。综上, 表明烟草 Nt-GAD 出现明显

的分化, 且个成员之间存在一定的差异, 其中烟草 Nt-GAD3 与大豆(XP_003534114), 即豆科类植物进化较为一致, 表明烟草 Nt-GAD3 分化较为突出, 而 Nt-GAD2 则较为保守。

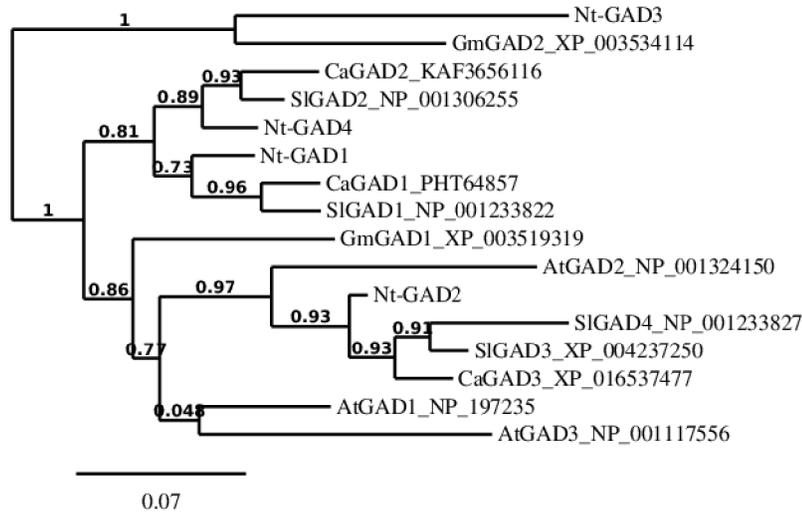


图 2 烟草 Nt-GAD 的进化树

注: CaGAD 表示辣椒的谷氨酸脱羧酶, SIGAD 表示番茄的谷氨酸脱羧酶, AtGAD 表示拟南芥的谷氨酸脱羧酶, GmGAD 表示大豆的谷氨酸脱羧酶。

3 讨论与结论

烟草 Nt-GAD 成员的等电点均处于 5.5~6 之间, 因植物 GAD 的最适等电点处于该区间^[17], 当 Nt-GAD 处于等电点 7~8 时, 难以发挥活化作用, 其主要原因是该条件下 Nt-GAD 以二聚体的结构方式存在, 只有 Nt-GAD 处于等电点 5~6 时, 以六聚体的结构方式存在, 从而发挥其活化作用^[18], 另外, 由于 Nt-GAD2 的耐热性最好, Nt-GAD3 的稳定性最强, 在工业生产过程中, 可重点选用这两个成员促进生产^[19]; 烟草 Nt-GAD 属于磷酸吡哆醛依赖性脱羧酶家族和谷氨酸脱羧酶家族, 说明烟草 Nt-GAD 可以通过水解或氧化以外的其他方式催化 CC 键的裂解, 或相反地向双键添加一个基团, 同时也可以催化 L-谷氨酸形成 γ -氨基丁酸和 CO_2 , 亦能与吡哆醛 5-磷酸盐、3-羟基-5-(羟甲基)-2-甲基-4-吡啶甲醛 5-磷酸盐、维生素 B6 的生物活性形式结合, C 末端存在独特区域钙调蛋白结构域, 可感知 Ca^{2+} 信号^[20]; 通过进化树分析烟草 Nt-GAD 成员被划分为三组, 其中烟草 Nt-GAD3 分化较为突出, 而 Nt-GAD2 则较为保守, 作为两个极端, 可为研究烟草 Nt-GAD 功能提供一定基础。

参 考 文 献:

- [1] Zhang Q F, Hu S, Zhao W R, *et al.* Parallel Strategy Increases the Thermostability and Activity of Glutamate Decarboxylase[J]. *Molecules*, 2020, 25(3):
- [2] 李楠楠, 李彤彤, 侯春燕, 等. γ -氨基丁酸在植物抵抗逆境胁迫中的作用[J]. *植物生理学报*, 2020, 56(2): 134-140.
- [3] Bown A W, Shelp B J. Plant GABA: Not Just a Metabolite[J]. *Trends in Plant Science*, 2016, 21(10):
- [4] Xian L, Yu G, Wei Y, *et al.* A Bacterial Effector Protein Hijacks Plant Metabolism to Support Pathogen Nutrition[J]. *Cell host & microbe*, 2020.
- [5] 于平, 刘航, 朱鹏志, 等. 大肠杆菌谷氨酸脱羧酶 A 的基因克隆与表达及其酶学性质[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(8): 35-45.
- [6] 方舟. 短乳杆菌谷氨酸脱羧酶活性中心关键位点的研究[D]. 杭州: 浙江科技学院, 2019.
- [7] 王一然, 张俊帅, 李家龙, 等. 巨大芽孢杆菌谷氨酸脱羧酶的表达及其酶活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2017(8): 63-68.
- [8] 林玲. 利用定向进化及半理性设计提高谷氨酸脱羧酶催化活性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [9] 汪钟. 短乳杆菌谷氨酸脱羧酶热稳定性的理性改造[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.