

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.07.005

八氢番茄红素合成酶(PSY)的生物信息学分析*

麦秀英 熊建锐 王旭磊 李萍[△]

(西南交通大学生命科学与工程学院 四川 成都 610031)

摘要 目的:通过生物信息学方法对八氢番茄红素合成酶基因(PSY)及氨基酸序列分析,并构建三维结构。**方法:**运用生物信息学方法对八氢番茄红素合成酶基因及其蛋白质序列的理化性质、亲/疏水性、信号肽、跨膜结构域、糖基化位点、磷酸化位点、二级结构、功能结构域和三级结构进行预测分析。**结果:**PSY 基因含 1239bp 的开放阅读框,编码氨基酸数为 412,为碱性不稳定蛋白;八氢番茄红素合成酶富含 Arg、Leu、Ala、Ser、Val 等氨基酸,为亲水性蛋白质;PSY 为非跨膜蛋白,不含信号肽,具有多个磷酸化位点, α 螺旋和无规卷曲是其主要结构元件。**结论:**用同源建模的方法构建其三维结构,得到合理模型,为采用生物工程提高番茄红素产量提供理论依据。

关键词:八氢番茄红素合成酶;生物信息学分析;番茄红素

中图分类号:Q74 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)07-1217-05

Bioinformatic Analysis of Phytoene Synthase*

MAI Xiu-ying, XIONG Jian-rui, WANG Xu-lei, LI Ping[△]

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu, Sichuan, 610031, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the gene and amino acid sequence of eight hydrogen lycopene synthase (PSY) via bioinformatic methods, and build a three-dimensional structure. **Methods:** This research aimed to predict and analyze the physical and chemical properties, hydrophilicity and hydrophobicity, signal peptide, transmembrane domains, glycosylation and phosphorylation sites, secondary and tertiary structure of PSY gene and protein sequence by bioinformatic methods. **Results:** PSY gene is an alkali labile protein, which contains a long open reading frame of 1239bp, encodes 412 amino acid; PSY is hydrophilic protein, which is rich in Arg, Leu, Ala, Ser, Val etc; PSY is non-transmembrane protein, which has no signal peptide and contains several phosphorylation sites, α helix and random coil is its primary secondary structural elements. **Conclusions:** The reasonable three-dimensional structure of PSY was obtained by using homology modeling software. The research offer a theoretical basis to improve the yield of lycopene in biotechnology.

Key words: PSY; Bioinformatic analysis; Lycopene

Chinese Library Classification(CLC): Q74 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)07-1217-05

前言

番茄红素(lycopene)又名茄红素,是一种重要的类胡萝卜素,广泛存在于各种水果和蔬菜中。番茄红素是一种强抗氧化剂,具有清除人体的自由基,预防冠心病和多种癌症,维护骨骼健康,降低血压,治疗雄性不育和神经退行性疾病等生理功能^[1-4]。由于番茄红素的生理功能得到越来越广泛的关注,因此进一步研究其生物合成途径,提高其产量,具有重要意义。

八氢番茄红素合成酶(phytoene synthase, PSY)是番茄红素合成过程中的关键酶之一,其催化 2 分子的牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸(geranylgeranyl pyrophosphat, GGPP)缩合形成八氢番茄红素,八氢番茄红素由八氢番茄红素脱氢酶(phytoene desaturase, PDS)催化形成 ζ -胡萝卜素,再由 ζ -胡萝卜素脱氢酶(zeta-carotenoidesaturase, ZDS)连续催化形成番茄红素^[5-9]。

目前,八氢番茄红素合成酶的研究多数都只是进行 PCR

测序和基因克隆,还没有关于八氢番茄红素合成酶基因结构方面的研究。本研究主要运用生物信息学方法对八氢番茄红素合成酶核酸及相应氨基酸序列的组成、理化性质、亲疏水性、信号肽、跨膜结构域、糖基化/磷酸化位点、二级结构、功能结构域及三级结构进行预测和分析,为采用生物技术改造 PSY 基因,进而提高番茄红素产量提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 基因序列

番茄中八氢番茄红素合成酶基因(PSY)的核酸序列(EU734550)和氨基酸序列(ACE75885)均来自美国国立生物信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)核酸和蛋白质数据库。

1.2 方法及所用工具

用 BioEdit 软件和 ProtParam 在线工具分析 PSY 基因的核

* 基金项目:教育部留学回国人员科研启动基金(2013S03008)

作者简介:麦秀英(1989-),女,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学,电话:15281066497, E-mail: 408948449@qq.com

[△] 通讯作者:李萍(1962-),女,教授,博士,研究方向:生物化学与分子生物学, E-mail: wu_mengting@163.com

(收稿日期:2014-08-30 接受日期:2014-09-26)

酸及相应氨基酸序列的组成成分和理化性质;用 ProtScale^[10]在线工具预测八氢番茄红素合成酶基因 PSY 的亲疏水性;通过 SignalP 4.1^[11]和 TMHMM Server v. 2.0^[12]在线工具分析八氢番茄红素合成酶基因 PSY 的信号肽和跨膜结构域;运用 NetPhos 2.0^[13]和 NetNGlyc 1.0 分析八氢番茄红素酶的糖基化和磷酸化位点;用 SOPMA 软件分析八氢番茄红素合成酶 PSY 的二级结构;利用 NCBI 上 CDD^[14]在线工具对八氢番茄红素合成酶 PSY 的氨基酸序列进行功能结构域分析;运用 SWISS-MODEL^[15-17]对八氢番茄红素合成酶 PSY 建模得到其三维结构。

2 结果

2.1 八氢番茄红素合成酶基因 PSY 及相应氨基酸的理化性质分析

用 BioEdit 软件和 ProtParam 在线工具分析得到 PSY 基因的组成成分和理化性质:PSY 基因含 1239bp 的开放阅读框,编码氨基酸数目为 412, 分子式为 $C_{2055}H_{3252}N_{384}O_{618}S_{22}$, 分子量为 46733.2D, 理论等电点为 8.46。Arg, Leu, Ala, Ser, Val 等氨基酸含量较丰富, 分别占 9.0%, 8.3%, 8.0%, 7.5%, 7.3%, 不含 Pyl, Sec 两种氨基酸, 具体各氨基酸含量见图 1。经预测分析此蛋白为不稳定的碱性蛋白。

2.2 八氢番茄红素合成酶基因 PSY 亲疏水性分析

用 ProtScale 在线工具预测 PSY 亲疏水性(图 2), 得到 PSY 相对应的氨基酸中第 5 位氨基酸具有最高值 2.467, 具最强疏水性;第 54 位氨基酸具最低值 -2.700, 具最强亲水性。其中亲水性氨基酸占 66.09%, 疏水性氨基酸占 33.91%, PSY 基因的氨基酸整体表现为亲水性。

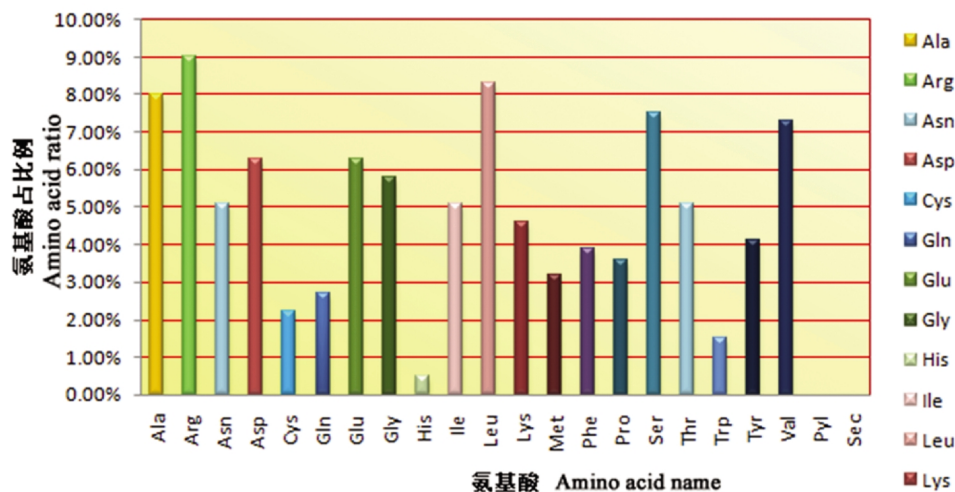


图 1 八氢番茄红素合成酶 PSY 的氨基酸组成

Fig. 1 Amino acids composition of PSY

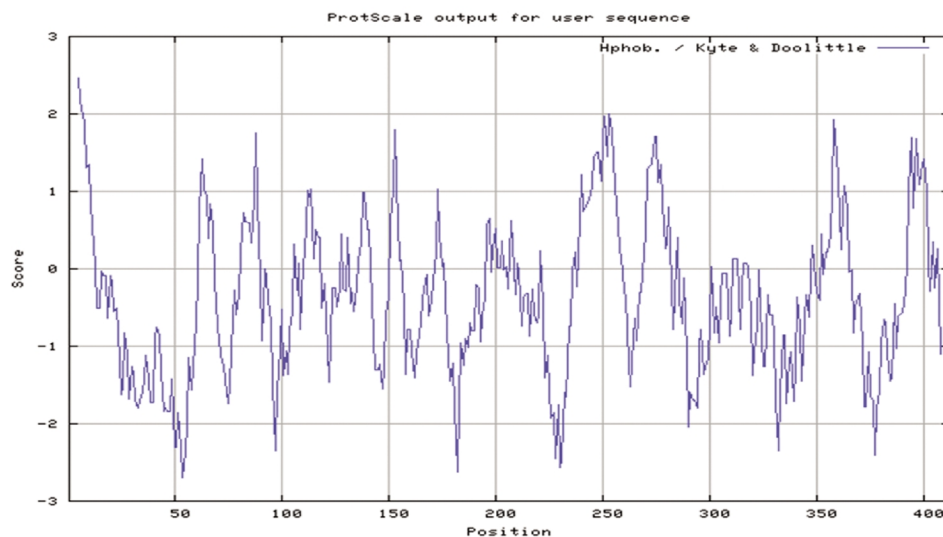


图 2 八氢番茄红素酶 PSY 的亲/疏水性分析

Fig. 2 Hydrophilic/hydrophobic analysis of PSY

2.3 八氢番茄红素合成酶基因 PSY 的信号肽和跨膜结构域分析

通过 SignalP 4.1 在线工具对八氢番茄红素合成酶的氨基酸序列信号肽进行分析, 结果如图 3 所示。C 值最大切割点在

第 18 位氨基酸, 分值为 0.374, 综合剪切点分值(Y 值)最高也在第 18 位氨基酸, 为 0.367, 信号肽最大分值(Max S)在第 6 个氨基酸位置, 分值为 0.480。从第 1-17 个氨基酸, 平均 S 值为 0.338, 平均 D 值为 0.351。因此, 我推断甜菜的八氢番茄红素合

成酶没有信号肽,不是分泌蛋白。用在线工具 TMHMM Server v. 2.0 预测分析。分析结果如图 4 所示,八氢番茄红素合成酶含有跨膜结构域总概率为 0.65450,整条肽链的跨膜结构域的可

能性小于 1,所以预测其不存在跨膜结构域。信号肽是指导靶蛋白质跨膜定位到膜上的 N 端氨基酸序列^[11,18],所以不含信号肽,理应无跨膜结构域,说明预测结果的合理性。

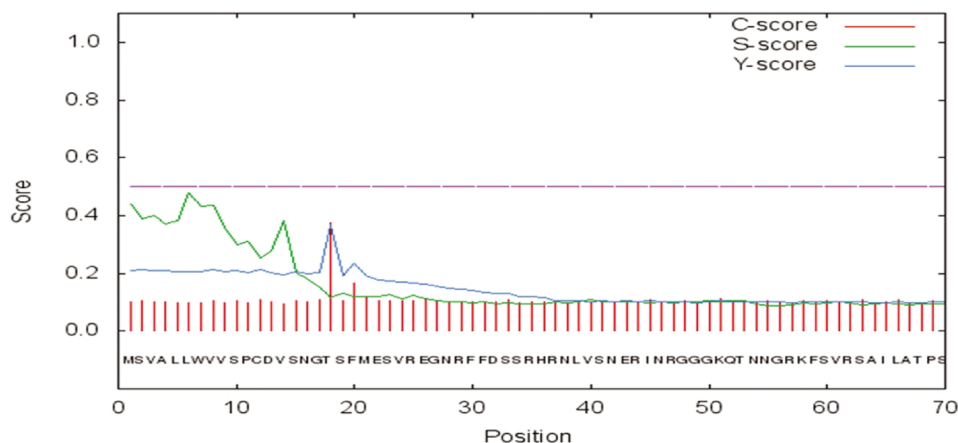


图 3 八氢番茄红素合成酶基因 PSY 的信号肽分析

Fig. 3 Signal peptides analysis of PSY

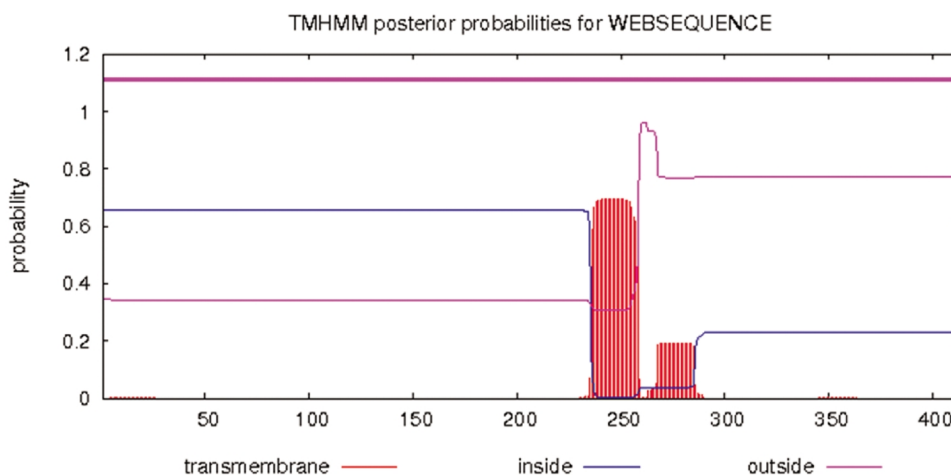


图 4 八氢番茄红素合成酶基因 PSY 跨膜结构域分析

Fig. 4 Transmembrane domains analysis of PSY

2.4 糖基化、磷酸化位点分析

分别运用 NetPhos 2.0 和 NetNGlyc 1.0 分析八氢番茄红素合成酶的糖基化和磷酸化位点。结果如图 5 所示。该蛋白糖基化位点只有一个,位于 16 位的 N-连接的糖基化。对该蛋白的磷酸化分析(见图 6)发现磷酸化位点 25 个,其中丝氨酸磷酸

化位点 14 个: S10, S19, S23, S34, S60, S70, S98, S228, S261, S267, S310, S350, S385 和 S404, 苏氨酸磷酸化位点 4 个: T76, T143, T265 和 T320, 酪氨酸磷酸化位点 7 个: Y121, Y171, Y230, Y237, Y375, Y383 和 Y405。而预测分值超过 0.99 的有 S23, S228, S310, 这些位点的磷酸化可能性更高。

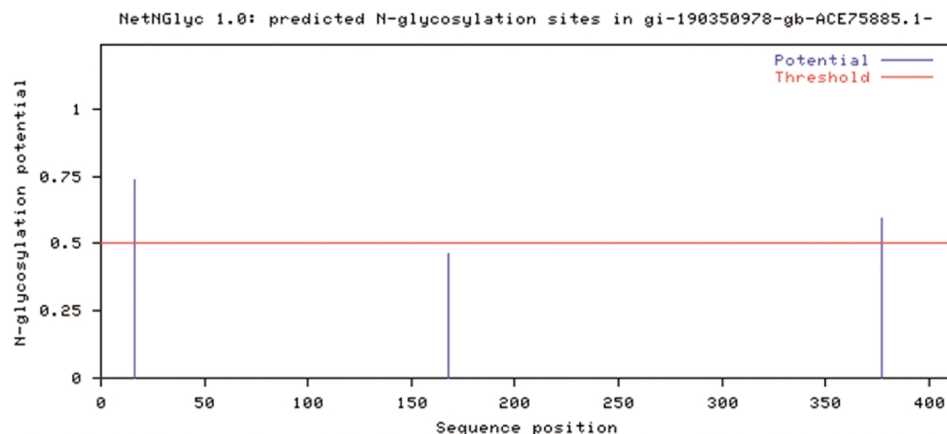


图 5 八氢番茄红素合成酶基因 PSY 糖基化位点分析

Fig. 5 Glycosylation sites analysis of PSY

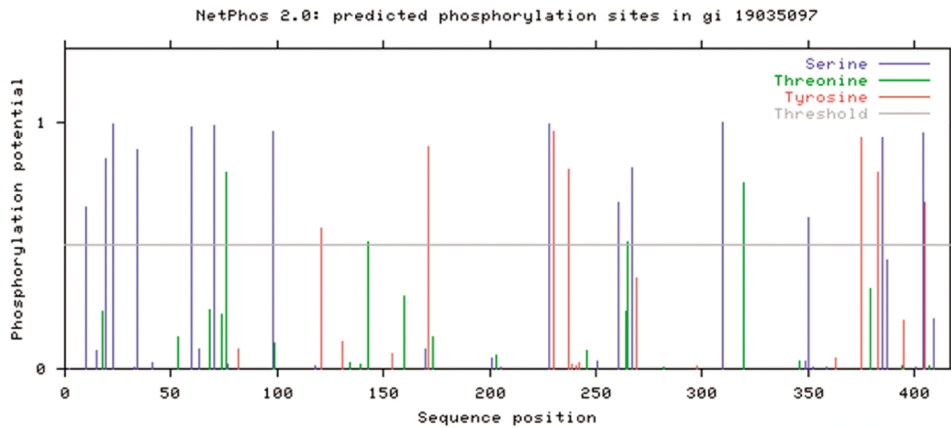


图6 八氢番茄红素合成酶基因 PSY 磷酸化位点

Fig. 6 Phosphorylation sites analysis of PSY

2.5 八氢番茄红素合成酶 PSY 的二级结构预测

用在线工具 NPS@ 中的 SOPMA 软件对八氢番茄红素合成酶 PSY 的二级结构分析,预测结果(图 7 和图 8)显示,在多肽链中 α 螺旋(蓝色部分的 h)出现概率为 60.92%, β 转角(红

色部分的 e)出现的概率为 4.37%,无规卷曲(橙色部分的 c)出现的概率为 26.94%,延伸链(绿色部分的 t)出现的概率为 4.37%。可见 α 螺旋和无规卷曲是八氢番茄红色合成酶肽链的主要二级结构,散布于整条多肽链中。

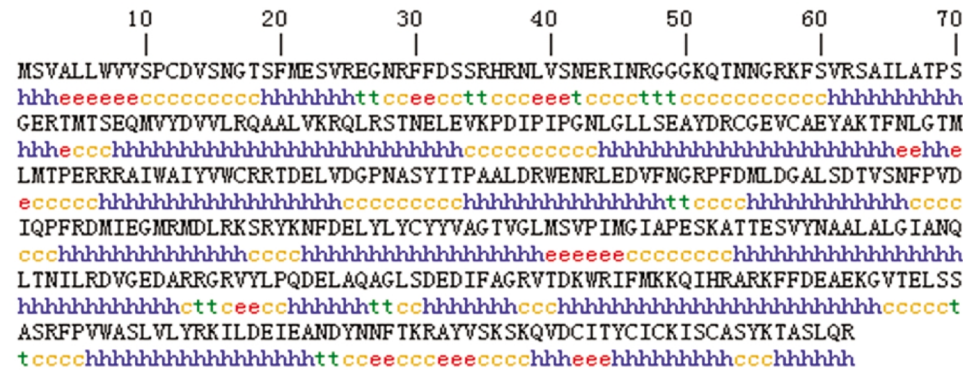


图7 八氢番茄红素合成酶 PSY 的二级结构预测

Fig. 7 PSY secondary structure prediction

2.6 八氢番茄红素合成酶 PSY 功能结构域分析

利用 NCBI 上 CDD 在线工具对八氢番茄红素合成酶 PSY 的氨基酸序列进行功能结构域分析,结果如图 9 所示,包含底物结合口袋, Mg^{2+} 结合位点,活性位点残基盖,催化残基和天冬氨酸富集区等功能结构域,其属于 Isoprenoid_Biosyn_C1 超家

族,为类异戊二烯生物合成酶,使用香叶基(C10),法呢基(C15)或香叶基香叶基(C20)二磷酸作为底物可以合成香叶酯/乙酸金合欢 diphosphates(GPP / FPP)或长链的异戊烯基二磷酸(IPP)和烯丙基二磷酸二磷酸(DMAPP)。

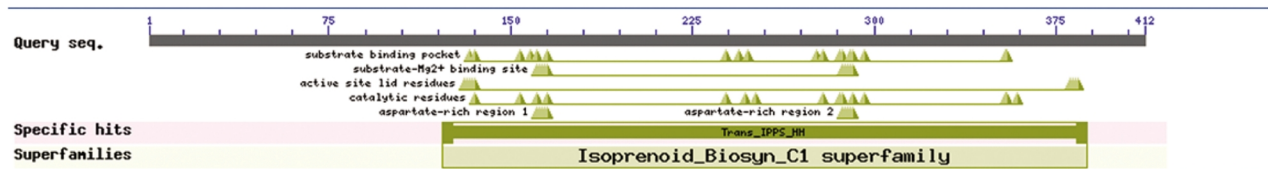


图8 八氢番茄红素合成酶 PSY 功能结构域分析

Fig. 8 Functional domains analysis of PSY

2.7 八氢番茄红素合成酶 PSY 的三级结构分析

运用 SWISS-MODEL 中的 Automated mode(自动模型)对八氢番茄红素合成酶 PSY 的氨基酸序列建模,得到其三级结构如图 10 所示,其中预测模型序列与模板序列相似度为 26.12%。用 3D Molecule Viewer 编辑得到了其三维结构空间的填充模型如图 11 所示。运用 Ramachandran Plot 对模型进行评估,结果见图 12,其中 86.84%的氨基酸位于完全允许区,

10.53%的氨基酸位于额外允许区,1.5%的氨基酸位于宽大允许区,只有 1.13%的氨基酸位于区域之外,说明预测所得结构是可靠的。

3 讨论

PSY 作为番茄红素合成过程中的关键酶一直备受关注。本研究用生物信息学方法对番茄红素合成酶基因 PSY 进行分

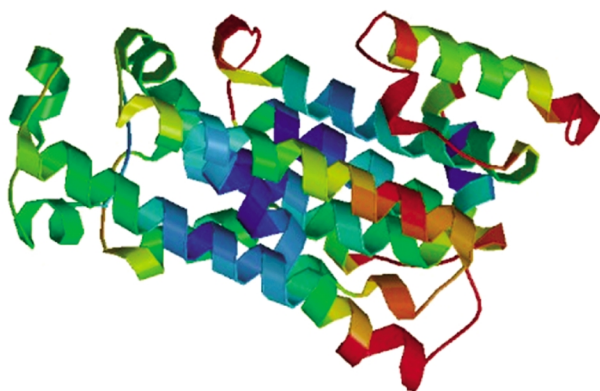


图9 八氢番茄红素合成酶的三级结构

Fig. 9 Tertiary structure prediction of PSY

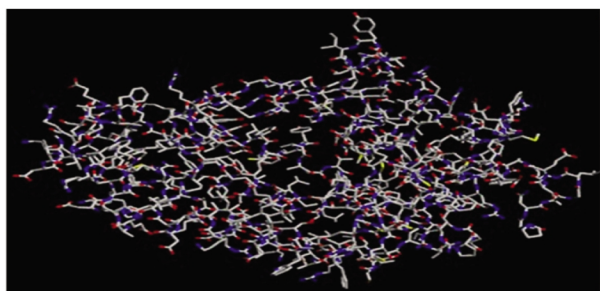


图10 八氢番茄红素合成酶空间填充模型

Fig. 10 Space-filling model of PSY

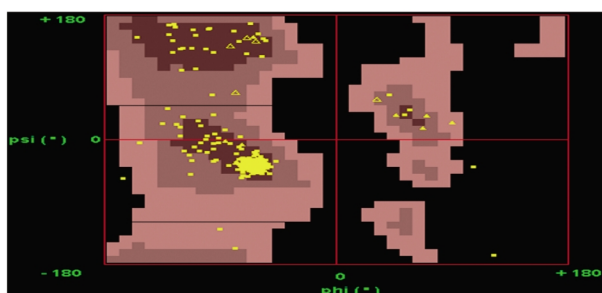


图11 八氢番茄红素合成酶三级结构可靠性分析

Fig. 11 Tertiary structure reliability analysis of PSY

析,得到如下结论:PSY 基因含 1239bp 的开放阅读框,编码氨基酸数为 412,为碱性不稳定蛋白;八氢番茄红素合成酶 PSY 为亲水性蛋白质;八氢番茄红素合成酶 PSY 为非跨膜蛋白,不含信号肽;八氢番茄红素合成酶 PSY 具有多个位点可能受蛋白激酶磷酸化,为今后基因表达调控,蛋白修饰提供参考位点; α 螺旋和无规卷曲是八氢番茄红色合成酶肽链的主要结构元件;得到八氢番茄红素合成酶 PSY 三维结构,并运用 Ramachandran Plot 验证了其合理性。

八氢番茄红素合成酶(PSY)是催化类胡萝卜素合成的关键酶^[9]。研究表明,PSY 是由等位基因自发形成功能突变体进而修饰形成的,展现定点突变,从而成为具有活性的酶^[20]。这一发现推进探索潜在的生物工程方法来提高类胡萝卜素的合成。本研究通过生物信息学方法进行合理预测为后续研究提供一定的理论基础。

参考文献(References)

- [1] Rao L G, Guns E, Rao A V. Lycopene: its role in human health and disease[J]. Agro Food, 2003, 7: 25-30
- [2] Ford N A, Erdman Jr J W. Are lycopene metabolites metabolically ac-

tive[J]. Acta Biochim Pol, 2012, 59(1): 1-4

- [3] 李春生. 番茄红素的研究概况[J]. 农产品加工. 学刊, 2009 (1): 71-74
Li Chun-sheng. The research situation of lycopene [J]. Agricultural products processing. Journal, 2009, (1): 71-74
- [4] 黄艳,夏秋瑜,刘四新,等. 番茄红素研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2006, 12(2):50-55
Huang Yan, Xia Qiu-yu, Liu Si-xin, et al. Reviewed lycopene [J]. Journal of South China tropical agriculture university, 2006, 12(2): 50-55
- [5] 芦小单,韩德复,苑芷茜,等. 龙胆八氢番茄红素合成酶(PSY) 基因及其功能研究 [J]. 吉林省第六届生命科学大型学术报告会议论文集, 2008,167-168
Lu Xiao-dan, Han De-fu, Yuan Zhi-qian, et al. Eight hydrogen lycopene synthetase (PSY) gene of Gentian and its functions[J]. Major academic report proceedings of the sixth Life Sciences in Ji Lin, 2008,167-168
- [6] 豆峻岭,刘文革. 番茄红素代谢及分子调控机理研究进展[J]. 果树学报, 2013, 4: 696-705
Dou Jun-ling, Liu Wen-ge. Progress in metabolic and molecular regulation mechanism of lycopene [J]. Journal of fruit trees, 2013, 4: 696-705
- [7] 朱海生,李永平,温庆放. 草莓八氢番茄红素合成酶基因的克隆及其表达特性[J]. 中国农业科学, 2011, 44(2):349-357
Zhu Hai-ping, Li Yong-ping, Wen Qing-fang. Cloning and the expression characteristics of strawberry phytoene synthase gene [J]. Chinese agricultural science, 2011, 44(2): 349-357
- [8] Giuliano G, Tavazza R, Diretto G, et al. Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in plants [J]. Trends in biotechnology, 2008, 26(3): 139-145
- [9] Elio Fantini, Giulia Falcone, Sarah Frusciante, et al. Dissection of Tomato Lycopene Biosynthesis through Virus-Induced Gene Silencing[J]. Plant physiology, 2013, 163(2): 986-998
- [10] Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J]. Methods Mol Biol, 1999, 112: 531-552
- [11] Petersen T N, Brunak S, von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature methods, 2011, 8(10): 785-786
- [12] A Krogh, B Larsson, G von Heijne, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes [J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 305 (3): 567-580
- [13] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. J Mol Biol, 1999, 294(5): 1351-1362
- [14] Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, et al. CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41:348-352
- [15] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. Nucleic acids research, 2014, [Epub ahead of print]
- [16] Kiefer F, Arnold K, Künzli M, et al. The SWISS MODEL Repository and associated resources [J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37: 387-392

(下转第 1289 页)

- 查分析报告[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 1-20
- Rao Ke-qin, Xu Ling, Chen Yu-de. Research on health services survey Chinese (report of fourth family health survey) [M]. Beijing: Peking Union Medical College press, 2009:1-20
- [2] Kurt-Sirin O, Yilmaz-Aydogan H, Uyar M, et al. Combined effects of collagen type I alpha 1 (COL1A1) Sp1 polymorphism and osteoporosis risk factors on bone mineral density in Turkish postmenopausal women[J]. *Gene*, 2014, 540(2): 226-231
- [3] G I Prada, I G Fita, R Nacu, et al. Risk factors for complications of osteoporosis in older people [J]. *European Geriatric Medicine*, 2013, 4(1): S25
- [4] Lampropoulos CE, Papaioannou I, D'Cruz DP. Osteoporosis-a risk factor for cardiovascular disease [J]. *Nature Reviews. Rheumatology*, 2012, 8(10): 587-598
- [5] B P W van Wunnik, P H E Weijers, S H Van Helden, et al. Osteoporosis is not a risk factor for the development of nonunion: A cohort nested case-control study[J]. *Injury*, 2011, 42(12): 1491-1494
- [6] Pumberger Matthias, Hughes Alexander P, Girardi Federico P, et al. Influence of Surgical Experience on the Efficiency of Discectomy in TLIF: A Cadaveric Testing in 40 Levels [J]. *Journal of Spinal Disorders & Techniques*, 2012, 25(8): E254-E258
- [7] Alok D Sharan, Ferdinand Cha, Praveen Kadimcherla. What is the Learning Curve for MIS TLIF [J]. *The Spine Journal*, 2012, 12(9): S152
- [8] Kersten, Paula, Ayse A, et al. The Use of the Visual Analogue Scale (VAS) in Rehabilitation Outcomes [J]. *Journal of Rehabilitation Medicine*, 2012, 44(7): 609-610
- [9] Carreon LY, Berven SH, Djurasovic M, et al. The Discriminative Properties of the SF-6D Compared With the SF-36 and ODI[J]. *Spine*, 2013, 3(1): 60-64
- [10] Sun CT. Minimally invasive technology is an ideal pursuit in treating lumbar degenerative disease [J]. *China Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 2012, 25(6): 445-447
- [11] Rowland, Nathan C, Gandhoke, et al. Interbody Fusion for Treatment of Lumbar Degenerative Disease: Part I-Choice of Approach[J]. *Con-temporary Neurosurgery*, 2012, 34(11): 1-5
- [12] Lin B, Xu Y, He Y, et al. Minimally invasive unilateral pedicle screw fixation and lumbar interbody fusion for the treatment of lumbar degenerative disease[J]. *Orthopedics*, 2013, 36(8): e1071-e1076
- [13] McGirt MJ, Parker SL, Wolinsky JP, et al. Vertebroplasty and kyphoplasty for the treatment of vertebral compression fractures: an evidenced-based review of the literature [J]. *Spine J*, 2009, 9(6): 501-508
- [14] Eric Francke, Chetan Patel. Minimally Invasive Surgery for Lumbar Spinal Stenosis[J]. *Seminars in Spine Surgery*, 2007, 19(3): 200-205
- [15] James J Yue MD, Richard Guyer, J Patrick Johnson, et al. The Comprehensive Treatment of the Aging Spine: Minimally Invasive and Advanced Techniques (Expert Consult - Online and Print)[M]. New York: Saunders, 2010: 388-395
- [16] Antonio Tsahtsarlis, Martin Wood. Minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion and spondylolisthesis [J]. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2012, 19(6): 858-861
- [17] Zhang Kai, Sun Wei, Zhao Chang-qing, et al. Unilateral versus bilateral instrumented transforaminal lumbar interbody fusion in two-level degenerative lumbar disorders: a prospective randomised study[J]. *International Orthopaedics*, 2014, 38(1): 111-116
- [18] Yung Park, Joong Won Ha, Yun Tae Lee, et al. The effect of a radiographic solid fusion on clinical outcomes after minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion [J]. *The Spine Journal*, 2011, 11(3): 205-212
- [19] Djurasovic M, Glassman SD, Garreon LY, et al. Cotemporary management of symptomatic lumbar spinal stenosis[J]. *Orthop Clin North AM*, 2010, 41(2): 183-191
- [20] 吴梅祥,何二兴,吴景白,等.小切口 TLIF 治疗腰椎退行性疾病的早期疗效观察[J].*中国骨科临床与基础研究杂志*, 2013, 5(3): 148-153
- Wu Mei-xiang, He Er-xing, Wu Jing-bai, et al. Small incision of TLIF for the treatment of lumbar degenerative disease early curative effect observation of[J]. *Chinese Department of orthopedics clinical and basic research journal*, 2013, 5(3): 148-153
- (上接第 1221 页)
- [17] Guex N, Peitsch M C, Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective[J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(S1):162-173
- [18] Seitz C, Eder C, Deiml B, et al. Cloning, functional identification and sequence analysis of flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase cDNAs reveals independent evolution of flavonoid 3', 5'-hydroxylase in the Asteraceae family [J]. *Plant molecular biology*, 2006, 61(3): 365-381
- [19] Cai C, Zhang X, Niu E, et al. GhPSY, a phytoene synthase gene, is related to the red plant phenotype in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Molecular biology reports*, 2014,41: 1-12
- [20] Shumskaya M, Bradbury L M T, Monaco R R, et al. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity [J]. *The Plant Cell Online*, 2012, 24(9): 3725-3741