

水稻LEA蛋白生物信息学分析及 功能分析

2012年寒假班3组

曹建

祝步拓

李田田

张华光

实验背景

Introduction

LEA 蛋白

(late embryogenesis
abundant)

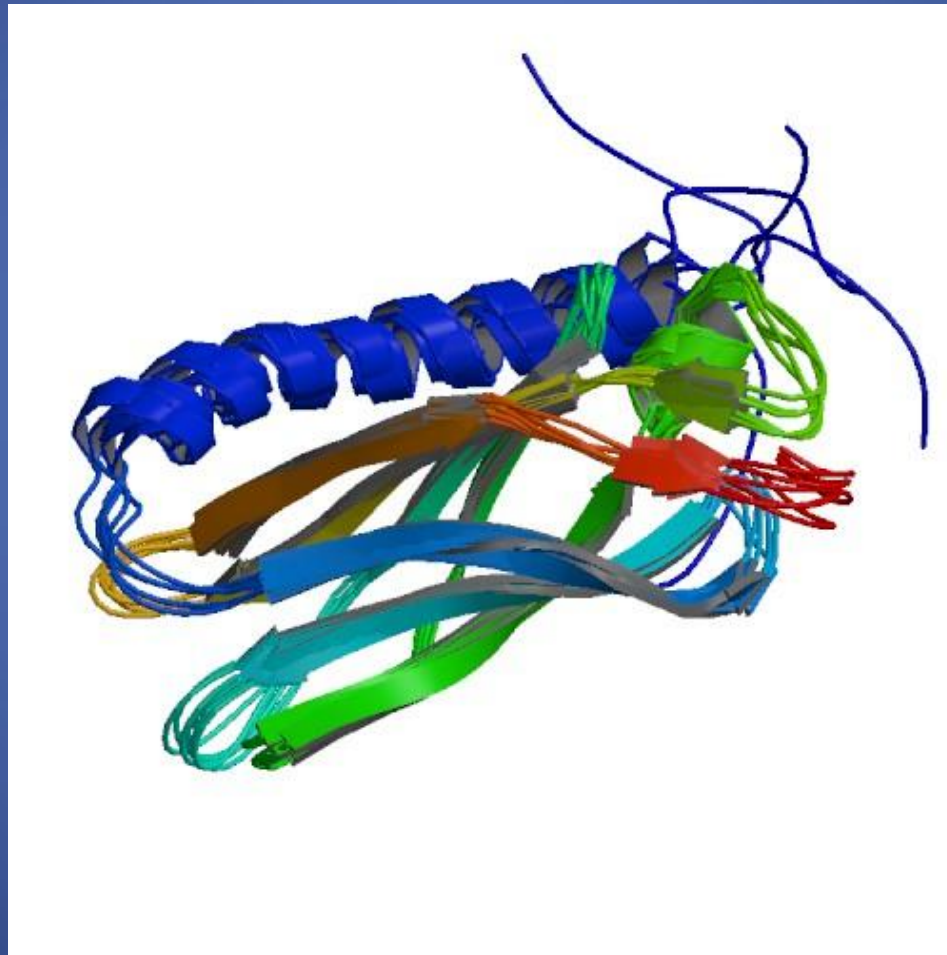
胚胎晚期富集蛋白

LEA 基因是在种子成熟和发育阶段表达的基因, 在种子发育过程中的胚胎晚期引起LEA蛋白的高度富集.

除此之外, 在植物受到干旱、低温和盐渍等环境胁迫后造成脱水的营养组织中, LEA基因也有所表达。

Xu等（1996）将大麦的LEA蛋白基因（HVA1）转入水稻中，发现该蛋白在转基因水稻的根和叶中大量表达，第二代转基因水稻明显表现出抗旱和抗盐的功能，而且提高的幅度与LEA蛋白的表达量一致。

拟南芥中的LEA蛋白的三维结构



LEA蛋白的分类

LEA1

LEA1蛋白高度亲水，其序列内含20个氨基酸的保守基序 (TRKEQG[T/E]EGY[Q/K]EMGR KGG[L/E])

LEA2(脱水素)

- 通常具有由15个氨基酸组成的K片段 (EKKGIMDKIKEKLPG)

LEA3

具有高保守的11-氨基酸序列
(TAQAAKEKAGE)

LEA4

- N端多为由70~80个氨基酸组成的保守区域

LEA5

- LEA5 蛋白与其他LEA 蛋白相比有较大差异。
- 它通常含有高比例疏水氨基酸残基，且不具有对热的稳定特性。LEA5 蛋白为球蛋白

LEA6

- LEA6 蛋白序列内有4 个保守基序。其中的基序1 (LEDYKMQGYGTQGHQQPKPGRG) 和基序2(GSTDAPTLSSGGAV) 高度保守，且基序下划线部分的氨基酸序列在已发现的36 个LEA6 蛋白中的保守性可达100%

LEA 蛋白的保护作用机制

1. LEA 蛋白对蛋白质的保护作用及其机制

- 冻融和干燥引起的脱水可导致乳酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、延胡索酸酶和异硫氰酸酶活性的下降甚至完全丧失。LEA 蛋白可通过保护这些酶的活性，起到保护细胞及细胞器的作用。
- LEA 蛋白也可能通过蛋白质间的相互作用保护蛋白质活性。干燥蛋白形成大量 α -螺旋，后者可与部分变性的蛋白质的疏水基团互作，起到稳定蛋白质的作用。

2.LEA 蛋白与非还原性糖互作的玻璃化模型

- 在胁迫条件下，生物体内非还原糖 (如蔗糖和海藻糖) 的合成和积累增加，形成玻璃化状态。同时，细胞内大量表达的LEA 蛋白可参与非还原糖的玻璃态形成过程。在干燥胁迫下，LEA 蛋白可形成 α -螺旋结构，继而形成微纤维。这不仅有助于增强细胞的机械稳定性，提高细胞质玻璃体的强度，增强细胞质粘滞性，抑制了有害分子在细胞内的扩散

3.与细胞膜结构的结合及对膜的稳定作用

- 转基因实验结果显示，转大麦*HVA1*基因的水稻经干旱胁迫后，细胞膜透性降低，表明过量表达的*HVA1*蛋白可通过保护细胞膜提高植株抗旱性.
- 胁迫发生时，线粒体基质中的LEA蛋白也可保护线粒体内膜

4.结合金属离子

LEA 蛋白可螯合过多的离子，减轻离子毒害，这可能是LEA 蛋白的一个重要功能.

5.保护DNA

- 柑橘的COR15 蛋白在 Zn^{2+} 作用下可与DNA 和tRNA 发生非特异相互作用。LEA 蛋白序列中富含组氨酸和赖氨酸的结构域可能在与DNA 互作时起关键作用。以上研究表明CuCOR15 蛋白可能对DNA/RNA有一定的保护作用

研究目的

- 1 验证LEA六个家族。
- 2 对水稻基因组数据库中的粳稻和籼稻LEA蛋白进行结构预测和功能分析

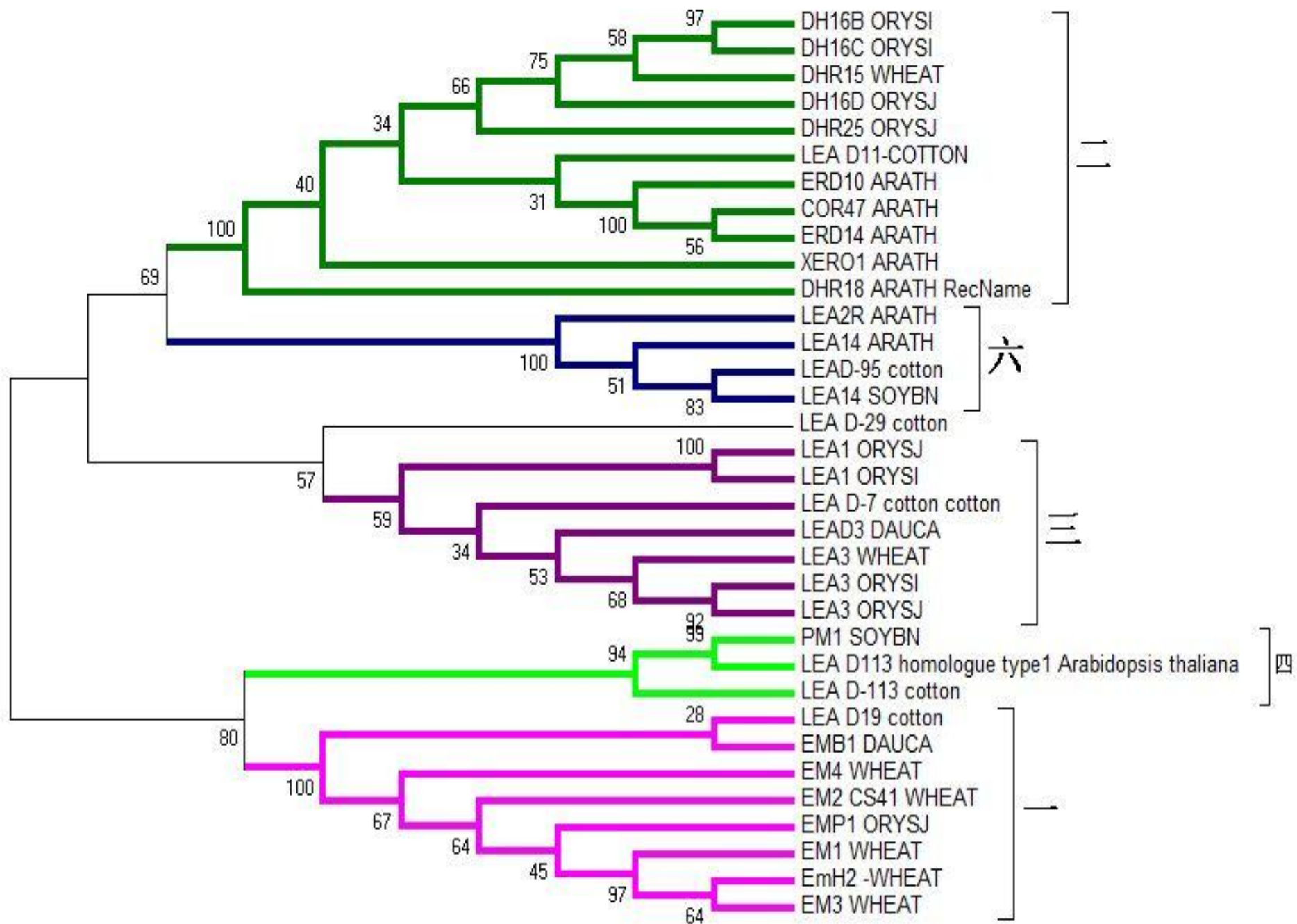
研究方法与结果分析

研究方法

- 通过已克隆的棉花中的6个LEA蛋白氨基酸序列在NCBI数据库中Blast搜索6种已经克隆的物种的LEA蛋白质并构建系统进化树
- 在国家水稻数据中心分别检索籼稻和粳稻的基因信息
- 在NCBI数据库检索出籼稻和粳稻的蛋白质序列，利用pepinfo、Tmap、PEPSTAT、porter等软件对该蛋白序列的组成成分进行分析，并进行二级结构预测
- 结果分析，探讨结构与功能的关系

6个物种的LEA蛋白分类

物种	LEA D19	LEA D11	LEA D7	LEA D113	LEA D29	LEA D95	种系
棉花	LEA D19	LEA D11	LEA D7	LEA D113	LEA D29	LEA D95	双子叶锦葵目
大豆				PM		LEA14	双子叶豆目
小麦	EM	DHR	LEA3				单子叶禾本目
水稻	EMP1	DH DHR	LEA1 LEA3				单子叶禾本目
胡萝卜	EMB1		LEAD3				双子叶伞形目
拟南芥		ERD COR XER DHR		LEA D113 homologue type1		LEA2R LEA14	双子叶十字花木



• 结果分析:

- 1 由进化树可知所要研究的水稻LEA3, LEA1属于第三组, DH基因属于第二组, 可知LEA家族先进化再分化。
- 2 从进化树中也可看到可以看到, 这六种植物的LEA蛋白也聚成了六类, 6类蛋白根据其进化的顺序分类, 与植物的氨基酸残基分类有一定的一致性。这六类蛋白中, 第1类和第4类被聚成了一个亚类, 第3类和第5类被聚成了一个亚类, 第2类和第6类被聚成了一个亚类。

水稻基因组数据库中的籼稻LEA蛋白基因

Google hao123 - ... 百度文库搜... 中国农业科... 坚持以人为... 中国水稻信... RiceData=... 晚期胚胎富... 中国农业科...

www.ricedata.cn/gene/list/1965.htm

建议网站 网页快讯库



国家水稻数据中心

首页 优异种质 突变体 分子标记 基因 QTL ONTOLOGY 区试 品种 文献 水稻百科 国稻论坛

· 常规信息

基因(座)名称	晚期胚胎富集蛋白基因 <i>Late embryogenesis abundant protein gene; Em-Like Protein</i>
基因符号	<i>OsLEA1a</i>
所在染色体	1 (已克隆)

晚期胚胎富集蛋白OsLEA1a具有植物Em蛋白类似的N端序列,但是缺少典型Em蛋白具有的20-mer特征基序。*OsLEA1a*主要在胚中表达,而在渗透胁迫处理的营养器官中没有或者只有很少的转录本存在。结构分析发现在溶液中OsLEA1a蛋白具有大量无序构象,而干燥可以诱导蛋白构象改变。大分子互作分析表明OsLEA1a与非还原糖和磷脂互作,而不能与多聚L-赖氨酸相互作用。但是和其他组类的亲水性LEA蛋白不同,OsLEA1a不能行使分子伴侣功能(Shih et al. 2010)。

【其它生物数据库关于本基因及产物的记载】

NCBI GeneBank: [AK064055](#), [AK122153](#)

RAP-DB: [Os01g0159600](#)

MSU: [LOC_Os01g06630](#)

· 参考文献

- Ming-Der Shih;Lin-Tzu Huang;Fu-Jin Wei;Ming-Tsung Wu;Folkert A. Hoekstra;Yue-Ie C. Hsing
OsLEA1a, a new Em-like protein of cereal plants
Plant and Cell Physiology, 2010, 51(12): 2132-2144

水稻基因组数据库中的粳稻LEA蛋白基因

Google hao123 - ... 百度文库搜... 中国农业科... 坚持以人为... 中国水稻信... RiceData=... 晚期胚胎富... 中国农业科...

www.ricedata.cn/gene/list/1480.htm

建议网站 网页快讯库



国家水稻数据中心

首页 优异种质 突变体 分子标记 基因 QTL ONTOLOGY 区试 品种 文献 水稻百科 国稻论坛

· 常规信息

基因(座)名称	晚期胚胎富集蛋白基因 <i>Late embryogenesis abundant protein gene</i>
基因符号	<i>OsLEA3; OsLEA3-1</i>
所在染色体	5 (已克隆)

OsLEA3-1 是 *OsLEA3* 位点上的等位基因。干旱、盐和脱落酸等胁迫可诱导 *OsLEA3-1* 的表达，但低温不能。带有合适启动子的 *OsLEA3-1* 的过表达植株耐旱性显著增强但产量不减 (Xiao et al. 2007)。

【其它生物数据库关于本基因及产物的记载】

NCBI GeneBank: [DQ789359](#)
RAP-DB: [Os05g0542500](#)
MSU: [LOC_Os05g46480](#)

· ONTOLOGY及相关基因

性状分类	抗旱 (TO:0000276)
生物学过程	缺水胁迫反应 (GO:0009414), 脱落酸刺激响应 (GO:0009737), 盐胁迫响应 (GO:0009651)

· 参考文献

- Benze Xiao;Yuejin Huang;Ning Tang and Lizhong Xiong
Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions
Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(1): 35-46
- Arn Moons;Arnick De Keyser;Marc Van Montagu

水稻基因组中LEA基因的氨基酸 序列分析

late embryogenesis abundant protein
[Oryza sativa Japonica Group]

GenBank: BAG88987.1

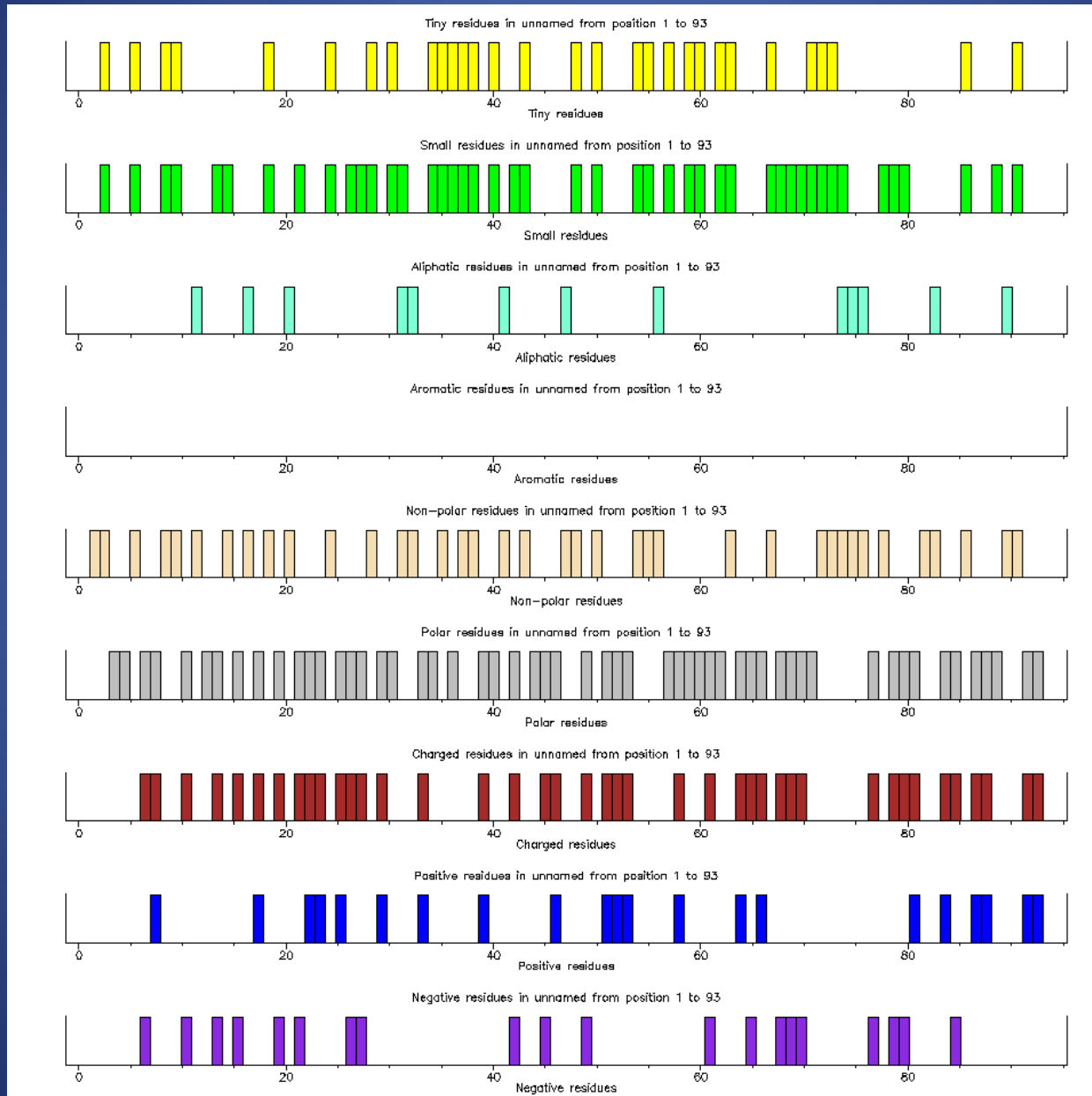
maqqaekaaelqdpeira
eldrrarddgktviksgtgk
sldaquerlaegrkkgglstrt
esgkeradddtgavliepd
dkmlkeakknlgrk

late embryogenesis abundant protein
[Oryza sativa Indica Group]

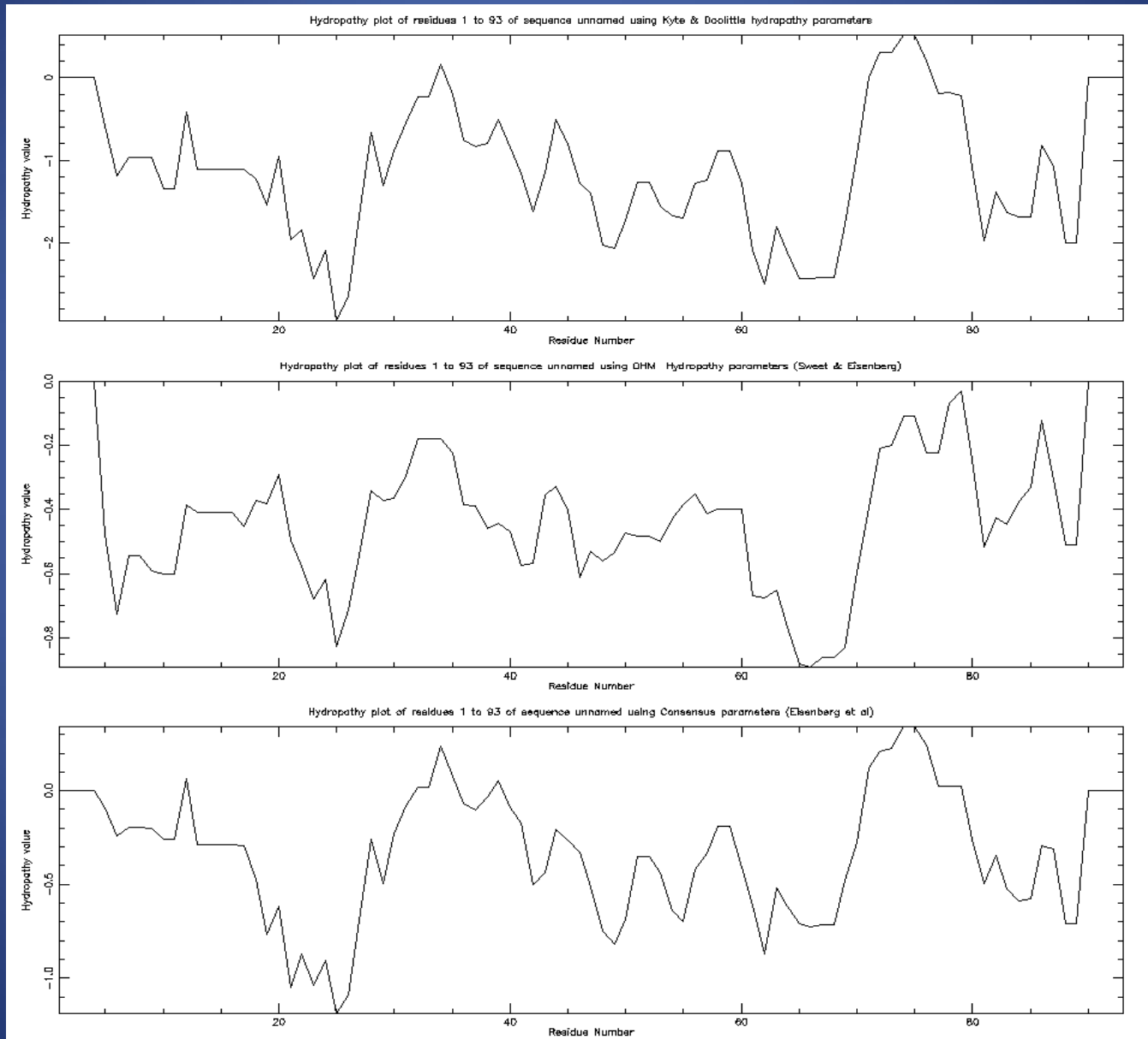
GenBank: ABG80549.1

mashqdaqasyragetkahteekag
qvmgaskdkaseakdraseaagh
aagkgqdtkeatkekaqaakeras
etaqaakdksstsqaardkaaesk
dqtggflgekterqakqkaaetaga
kqktaetaqytkdsaiagkdktgsvl
qqaseqvkstvvgakdavamstlgm
tedeagtddgankdtsataatett
ardh

籼稻亚种的氨基酸组分分析结果(Pepinfo分析结果1)



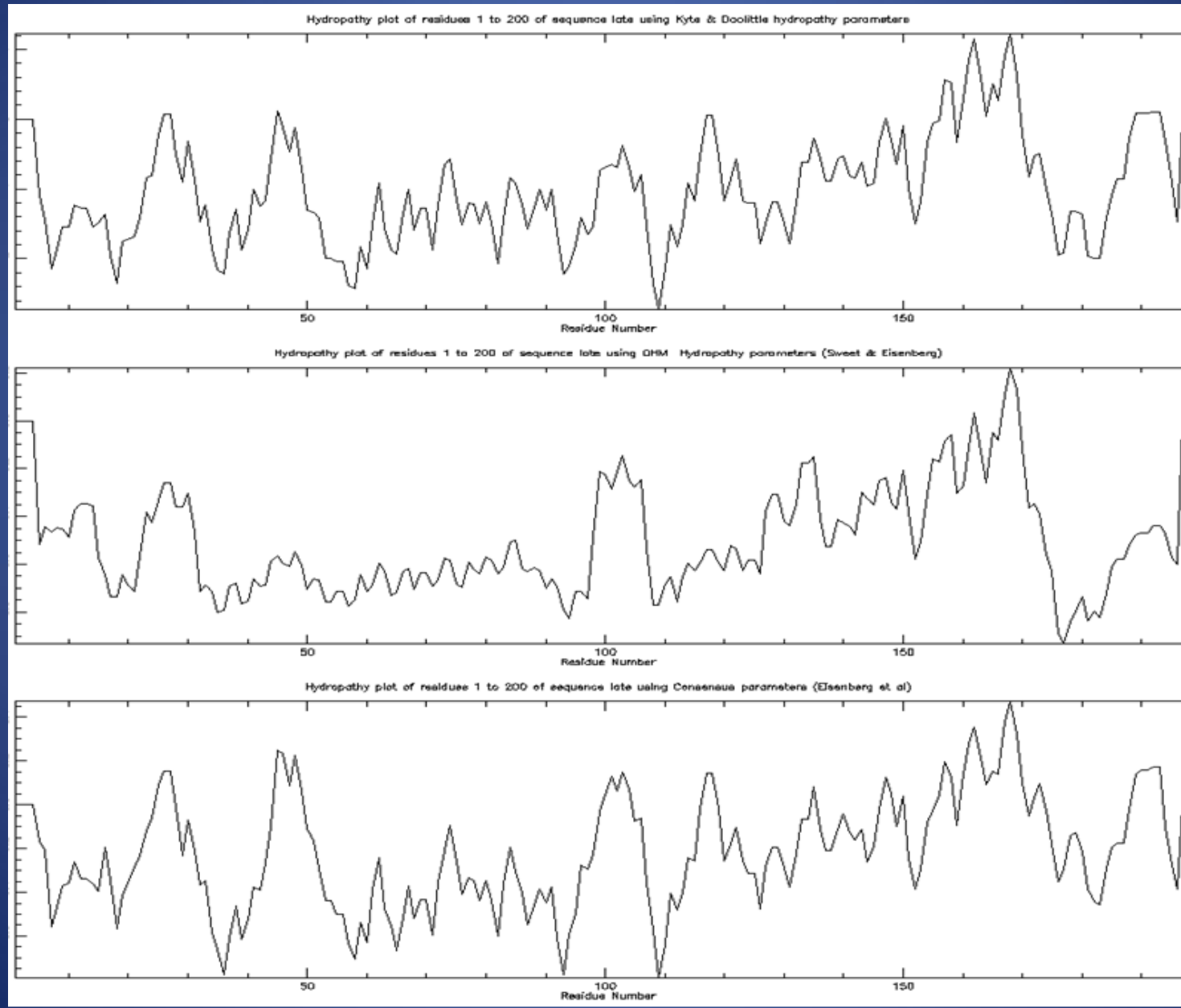
籼稻亚种LEA蛋白Pepinfo分析结果2



粳稻亚种LEA蛋白氨基酸组分分析



粳稻亚种LEA蛋白Pepinfo分析结果2



两个亚种水稻LEA蛋白氨基酸 序列分析

Oryza sativa Japonica Group

- Rice_J.pepstats
- PEPSTATS of unnamed from 1 to 93

- Molecular weight = 10136.29
Residues = 93
- Average Residue Weight = 108.992
Charge = 1.0
- Isoelectric Point = 9.1021
- A280 Molar Extinction Coefficient = 0
- A280 Extinction Coefficient 1mg/ml = 0.00
- Improbability of expression in inclusion bodies = 0.631

Oryza sativa Indica Group

- Rice_I.pepstats
- PEPSTATS of late from 1 to 200

- Molecular weight = 20514.06
Residues = 200
- Average Residue Weight = 102.570
Charge = -1.0
- Isoelectric Point = 6.1524
- A280 Molar Extinction Coefficient = 2560
- A280 Extinction Coefficient 1mg/ml = 0.12
- Probability of expression in inclusion bodies = 0.620

籼稻亚种LEA蛋白中氨基酸性质分析

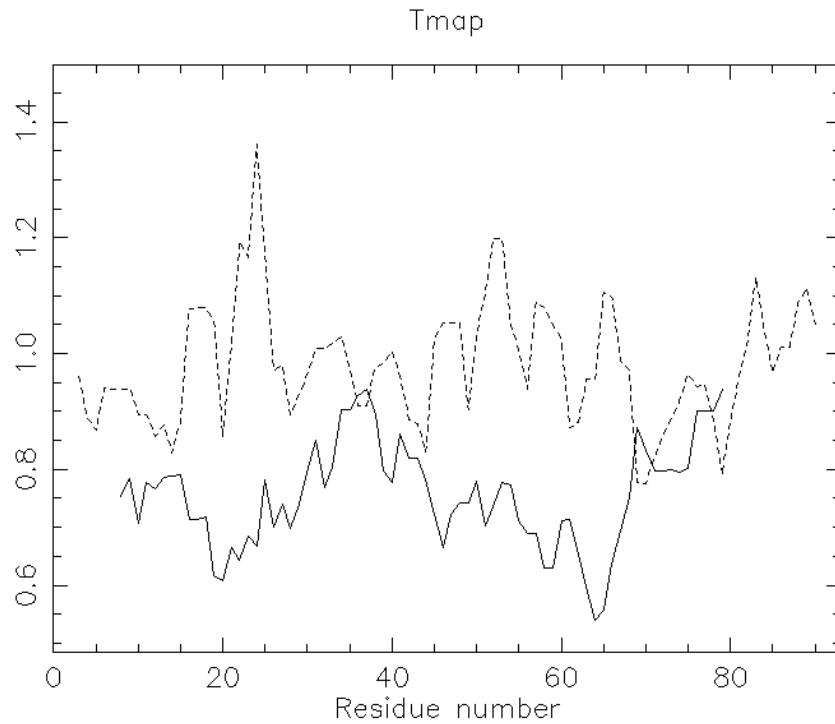
Property	Residues	Number	Mole%
Tiny	(A+C+G+S+T)	30	32.258
Small	(A+B+C+D+G+N+P+S+T+V)	45	48.387
Aliphatic	(A+I+L+V)	24	25.806
Aromatic	(F+H+W+Y)	0	0.000
Non-polar	(A+C+F+G+I+L+M+P+V+W+Y)	38	40.860
Polar	(D+E+H+K+N+Q+R+S+T+Z)	55	59.140
Charged	(B+D+E+H+K+R+Z)	41	44.086
Basic	(H+K+R)	21	22.581
Acidic	(B+D+E+Z)	20	21.505

粳稻亚种LEA蛋白中氨基酸性质分析

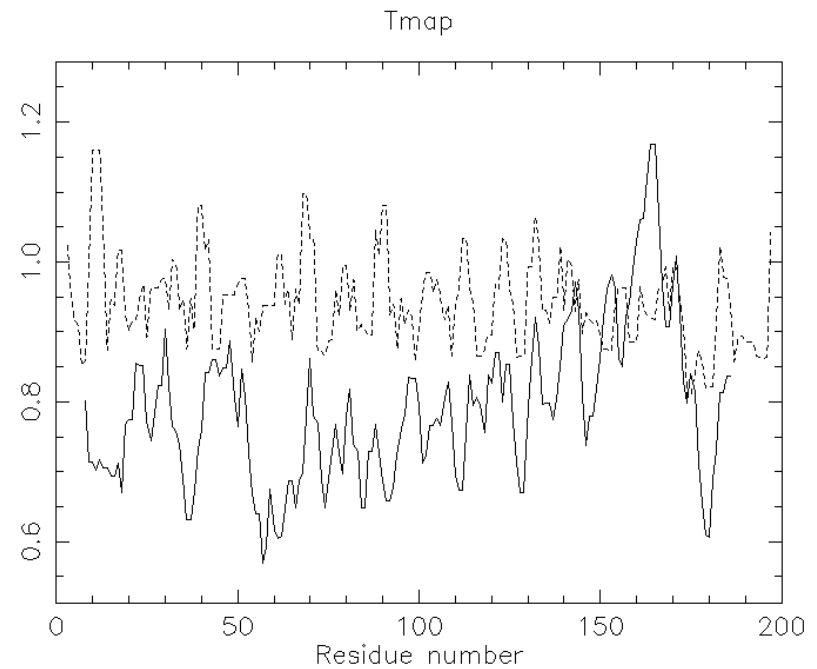
Property	Residues	Number	Mole%
Tiny	(A+C+G+S+T)	100	50.000
Small	(A+B+C+D+G+N+P+S+T+V)	122	61.000
Aliphatic	(A+I+L+V)	55	27.500
Aromatic	(F+H+W+Y)	7	3.500
Non-polar	(A+C+F+G+I+L+M+P+V+W+Y)	78	39.000
Polar	(D+E+H+K+N+Q+R+S+T+Z)	122	61.000
Charged	(B+D+E+H+K+R+Z)	67	33.500
Basic	(H+K+R)	34	17.000
Acidic	(B+D+E+Z)	33	16.500

蛋白质跨膜螺旋分析结果 (Tmap分析)

Oryza sativa Japonica Group



Oryza sativa Indica Group



粳稻亚种氨基酸序列二级结构预测

MASHQDQASYRAGETKAHTEEKAGQVMGASKDKASEAKDRASEAAGHAAGKGQDTKEATK
CCCHHH

EKAQAAKERASETAQAAKDKTSSTSQAARDKAAESKDQTTGGFLGKTEQAKQKAAETAGA
HH

AKQKTAETAQYTKDSAIAGKDKTGSVLQQASEQVKSTVVGAKDAVMSTLGMTEDAEAGTDD
HH
CCCCCCHHHHH

GANKDTSATAAATETTARDH
HHHHHHHHHHHHCCCCCCCC

籼稻LEA蛋白质序列二级结构 预测

MAQQAEKAAELQDPEIRAELDRRARDDGKTVIKSGTGGKSLDAQERLAEGRKKGGLSRTT
CHHHHHHHHCCCHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCCCCCC

ESGKERADDDTGAVLIEPDDKMLKEAKKNLGRK
CCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCCC

结果分析

- 1.两个蛋白质尽管序列长度，氨基酸组成不尽相同，但是同样有很多相似之处，如，极性氨基酸占到了序列组成中的大多数，且 α 螺旋结构较多，推测这对于LEA蛋白发挥抗逆功能有很大帮助
- 2.与籼稻LEA蛋白相比，粳稻LEA蛋白氨基酸数目，极性氨基酸数量，比例， α 螺旋区更为丰富，推测这也是粳稻抗逆性比籼稻更强的原因之一。

谢谢罗老师！
谢谢各位同学！

