

## 白及 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的结构与功能特征分析

汪牧非<sup>1</sup>, 李清清<sup>2</sup>, 黄恻隐<sup>2</sup>, 范振源<sup>2</sup>, 廖书胜<sup>3</sup>, 徐德林<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>遵义医科大学 2020 临床医学南山班 贵州遵义

<sup>2</sup>遵义医科大学细胞生物学教研室 贵州遵义

<sup>3</sup>遵义医科大学附属医院神经内科 贵州遵义

**【摘要】**基于转录组测序的差异表达基因分析结果, 采用生物信息学方法对白及  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 (*Bsbg*) 进行序列特征和功能预测分析。结果表明 *Bsbg* 全长 1933 bp, 包含完整的开放阅读框, 共编码 521 个氨基酸。疏水性分析发现其编码了理论等电点 (pI) 为 8.79 的亲水蛋白, 信号肽和亚细胞检测该蛋白含有信号肽序列和跨膜区以及 47 个潜在的磷酸化位点。对氨基酸序列分析发现, 该蛋白包含 Glyco\_hydro\_1 家族蛋白的保守结构域和 26 个 motif。进一步对其二级结构和 3D 结构进行了数据库比对和结构预测。进化树分析发现白及的 BSBG 蛋白与现有数据库中白山沉水樟的亲缘关系最近。本分析结果为白及  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究提供了基础数据, 也为植物  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的分子研究提供了理论依据和基础资料。

**【关键词】**白及;  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因; 序列特征; 功能预测

**【基金项目】**国家自然科学基金项目 (31560079、31560102); 贵州省科学技术基金项目 (黔科平台人才[2019]-027, 黔科合平台人才[2017]5733-050); 遵义市科技局遵义医科大学科学技术联合资金招标专项 (遵市科合 HZ 字 (2020) 91 号)

### Structural and functional characteristics of $\beta$ -glucosidase genein *Bletilla striata*

Mufei Wang<sup>1</sup>, Qingqing Li<sup>2</sup>, Ceyin Huang<sup>2</sup>, Shenyuan Fan<sup>2</sup>, Shusheng Liao<sup>3</sup>, Delin Xu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Nanshan Class of 2020 Clinical Medicine, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, Guizhou, China

<sup>2</sup>Department of Cell Biology, Zunyi Medical University, Zunyi 563099, China

<sup>3</sup>Department of Neurology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

**【Abstract】**Based on the results of differentially expressed genes analyzed by transcriptome sequencing, bioinformatics method was used to analyze the sequence characteristics and function prediction of a  $\beta$ -glucosidase genein *Bletilla striata* (*Bsbg*). The results showed that the length of *Bsbg* was 1933 bp, which contained a complete open reading frame and encoded 521 amino acids. Hydrophobicity analysis revealed that it encoded a hydrophilic protein with a theoretical isoelectric point (PI) of 8.79. The signal peptide and subcellular detection revealed that the protein contained a signal peptide sequence, a transmembrane region and 47 potential sites of phosphorylation. Amino acid sequence analysis revealed that the protein contained a conserved domain of Glyco\_hydro\_1 family with 26 motifs. Furthermore, database comparison and structure prediction were performed for the secondary structure and 3D structure. The phylogenetic tree analysis showed that the protein sequences of BSBG and  $\beta$ -glucosidase from *Cinnamomum micranthum* f. *kanehiraewere* clustered in the same branch. The results of this analysis provided a basic data for the study of *B. striata*  $\beta$ -glucosidase, and also provided a theoretical basis for the molecular study of  $\beta$ -glucosidase genes in plants.

**【Keywords】***Bletilla striata*,  $\beta$ -glucosidase gene, sequence analysis, function prediction

第一作者: 汪牧非 (2002-), 男, 本科, 专业: 临床医学 (南山班)。

\*通讯作者: 徐德林 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药材资源开发与利用。

临白及是一味具有广泛用途的民族中药材, 化学成分丰富, 在人体中具有潜在的抗神经炎症等药理活性<sup>[1]</sup>。据记载, 白及有去除瘀血和死肌腐肉、止血养胃等诸多作用, 药用价值十分广泛<sup>[2]</sup>。而药理活性成分是白及发挥广泛用途的物质基础, 目前已从白及块茎中分离鉴定出糖苷、联苜、菲、醌、联苜、二氢菲、花青素、类固醇、三萜、酚酸等化合物, 其中多糖 (polysaccharide fraction from *Bletilla striata*) 和糖苷是白及块茎中含量最高的化学成分, 在胃粘膜中发挥重要的细胞保护作用<sup>[3]</sup>, 且多糖和糖苷含量还是鉴别白及品质的重要衡量标准<sup>[2]</sup>。

$\beta$ -葡萄糖苷酶是生物合成多糖和糖苷的重要酶, 且该化合物本身在生物体内也有着丰富的作用。根据葡萄糖苷键的成键方式, 葡萄糖苷酶分为  $\alpha$ -葡萄糖苷酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 其中  $\beta$ -葡萄糖苷酶主要存在于植物体和细菌体内, 它既具有纤维素的糖化作用, 又与醇系香气密切相关, 还在抗病虫害方面有着很大的潜在价值<sup>[4]</sup>。Lelieveld 等研究证实  $\beta$ -葡萄糖苷酶是一种生物体重普遍存在的必须酶, 在植物体中  $\beta$ -葡萄糖苷酶主要功能是水解纤维素形成葡萄糖、纤维二糖、纤维低聚糖等<sup>[5, 6]</sup>, 对葡聚糖也表现出足够的水解活性<sup>[7]</sup>, YAN 等人研究还发现  $\beta$ -葡萄糖苷酶在大豆制品中应用于异黄酮苷类转化为苷元<sup>[8]</sup>, Méndez-Líter 等人也证实  $\beta$ -葡萄糖苷酶在糖苷合成中的作用<sup>[5]</sup>, 这些研究都说明了  $\beta$ -葡萄糖苷酶在植物的糖代谢过程中发挥着重要作用。因此,  $\beta$ -葡萄糖苷酶的应用前景广泛, 它在改良果汁、果酒、茶叶风味中都可发挥作用, 在高效生产大豆异黄酮苷元、天然色素栀子蓝中也起到关键作用<sup>[9]</sup>。此外, 在动物方面的研究也发现, 动物体缺乏  $\beta$ -葡萄糖苷酶会导致各种疾病<sup>[10]</sup>。

因此, 克隆和鉴定白及  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 (*Bsbg*) 不仅对白及的资源评价和优良品种选育有着重要意义, 也为探索兰科植物多糖合成的分子机制提供实验基础。然而, 目前尚无有关 *Bsbg* 克隆和功能分析的文献报道, 这大大制约了白及资源评价、良种选育、品种鉴定和品质形成的分子机制等工作的开展, 使得在运用  $\beta$ -葡萄糖苷酶的实践中缺乏理论依据。

本研究基于前期对 *Bsbg* 序列的克隆, 对其进行

分析, 以期对白及相关研究提供理论基础。本研究从转录组数据中筛选出 *Bsbg* 全长序列后用生物信息学方法进行序列的理化性质、二级结构、三级结构、基序和保守结构域、跨膜区、磷酸化位点、疏水性、信号肽、亚细胞定位、同源序列进化树构建等分析, 并依据 Ishiguro 等人有关蛋白质结构与功能密切关联的研究结果<sup>[7]</sup>, 推测 *Bsbg* 的核苷酸和氨基酸序列的结构和功能特点, 以期对 *Bsbg* 基因的功能验证、作用机理提供理论基础, 也为 *Bsbg* 基因的分子研究提供基础资料和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白及材料是来源于遵义市正安县并种植在本实验室的种质圃的资源材料, 收获蒴果后用组培技术诱导愈伤组织, 选取优质愈伤接种到液体培养基中进行悬浮培养, 从接种 0 天开始到 45 天, 每隔三天随机选取培养的细胞用于总 RNA 的提取和次生代谢物的分离检测<sup>[11]</sup>, 将全部的总 RNA 等量混合后在 PacBio Sequel 测序平台上进行测序和后续的拼接以及注释<sup>[12]</sup>, 将结果中注解为  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的核苷酸序列用于后续分析。

### 1.2 方法

信息学分析主要运用的在线网站服务和软件如表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Bsbg* 核苷酸序列分析

使用 BioEdit 对 DNA 序列进行分析, 该序列全长 1933bpCG 含量为 42.42%。应用 ORFfinder 分析发现该序列有完整开放阅读框, 长 1566bp 共编码 521 个氨基酸。

### 2.2 系统发育分析

对 BSBG 蛋白序列进行 NCBI 的在线 Blast 搜索, 找出和该蛋白同源比分值高的序列, 共涉及 22 个物种。利用 MEGAX, 选择 NJ 法构建进化树, 如图 1。结果表明, BSBG 与来源于罂粟 (*Papaver somniferum*) 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因同属于一小分支, 与白山沉水樟 (*Cinnamomum micranthum f. kanehirae*) 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因同属于第二小分支, 说明其与白山沉水樟  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因亲缘关系最近, 与罂粟的次之。



### 2.3 理化性质分析

使用 ExPASy 对蛋白质序列进行分析。结果表明, BSBG 蛋白相对分子量为 59464.80, 原子组成  $C_{2706}H_{4111}N_{721}O_{761}S_{17}$ , 由 20 种氨基酸组成, 理论等电点 (pI) 为 8.79, 负电荷残基 (Asp+Glu) 57 个, 正电荷残基 (Arg+Lys) 63 个, 在所有成对的 Cys 残基均形成胱氨酸的条件下, 消光系数为 89980; 在所有 Cys 残基均减少的条件下, 消光系数为 89730, 不稳定系数为 29.65 ( $<40$  较稳定), 脂肪系数为 76.18, GRAVY 为-0.392。

利用 Prot Scale 对 BSBG 蛋白进行疏水性分析, 其中正值代表疏水, 负值代表亲水。结果表明位点

21、22 疏水性最强分值为 3.178, 位点 92 亲水性最强分值为-2.722。总体看来该蛋白的 GRAVY 值为-0.392, 是一个亲水性蛋白 (图 2)。

### 2.4 磷酸化位点预测分析

蛋白质翻译后的修饰包括多种形式, 其中磷酸化是最为常见又十分重要的一种共价修饰方式。蛋白质的磷酸化主要位点是丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。蛋白质磷酸化的定量研究在探索蛋白质功能方面有重要研究价值, 使用 NetPhos 3.1 对 BSBG 蛋白进行分析。结果表明, BSBG 蛋白共有 47 个潜在的磷酸化位点 (图 3)。

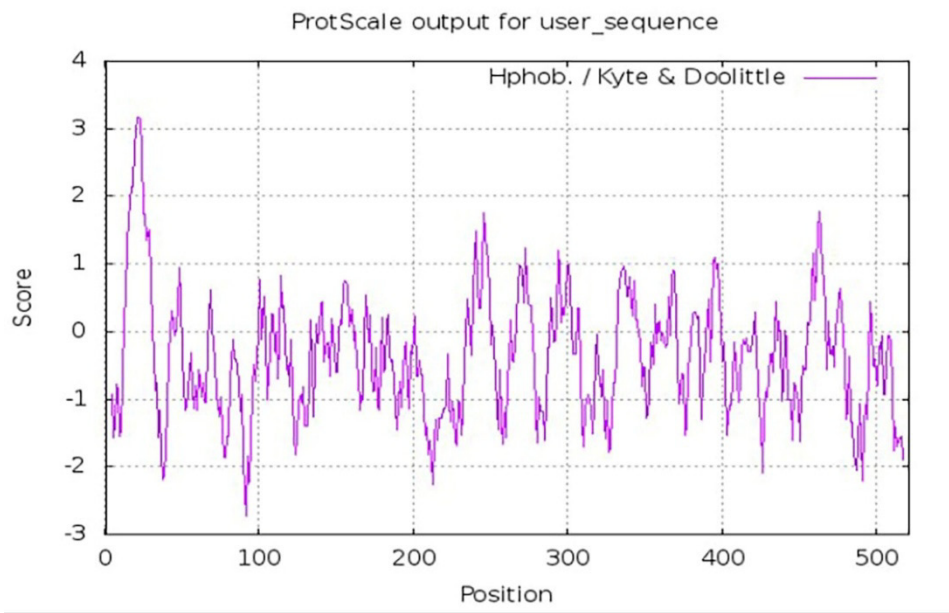


图 2 BSBG 蛋白疏水性分析

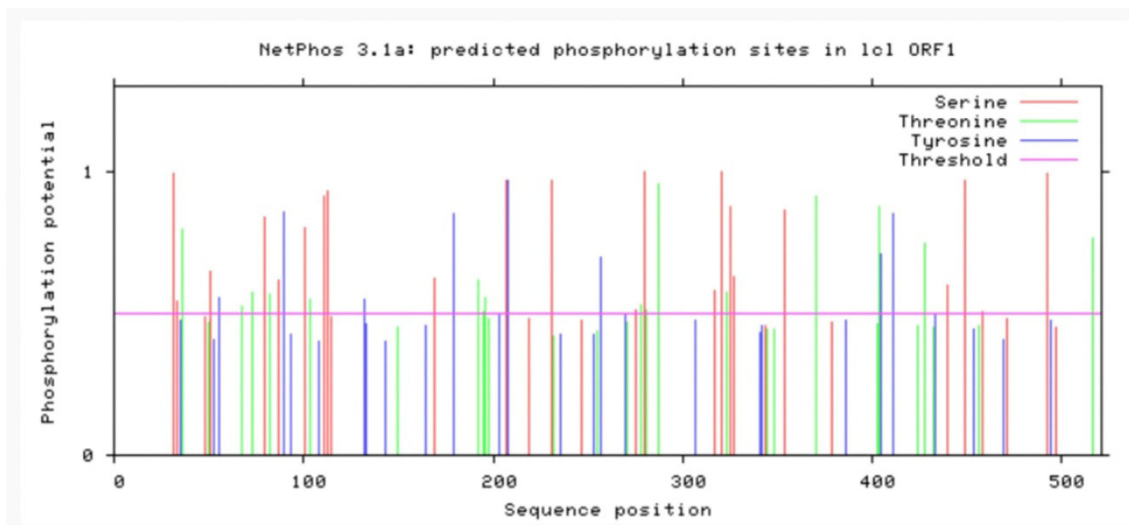


图 3 BSBG 磷酸化位点分析结果

### 2.5 BSBG 基序和保守结构域预测分析

使用 MEME 分析 BSBG 蛋白基序, 得到 26 个 motif, 如图 4。使用 SMART 分析 BSBG 保守结构域。结果表明从位点 36 至 504 是 Glyco\_hydro\_1 家族蛋白的保守结构域, 如图 5。该结果表明 BSBG 蛋白保守结构域占比很大, 可以推测其与 Glyco\_hydro\_1 家族蛋白有相似的功能。

### 2.6 BSBG 蛋白二级结构和三级结构预测分析

使用 SOPMA 对 BSBG 二级结构进行预测。结果表明, 该二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋 (191aa, 占 36.66%)、延伸链 (83aa, 占 15.93%) 和无规则卷曲 (210aa, 占 40.31%) 构成, 另含有 7.10% 的  $\beta$ -转角 (37aa) (图 6A)。使用 SWISS-MODEL 绘制 BSBG 蛋白三级结构图, 其中  $\alpha$ -螺旋与无规则卷曲占据空间较多, 三级结构与二级结构结果相吻合 (图 6B)。

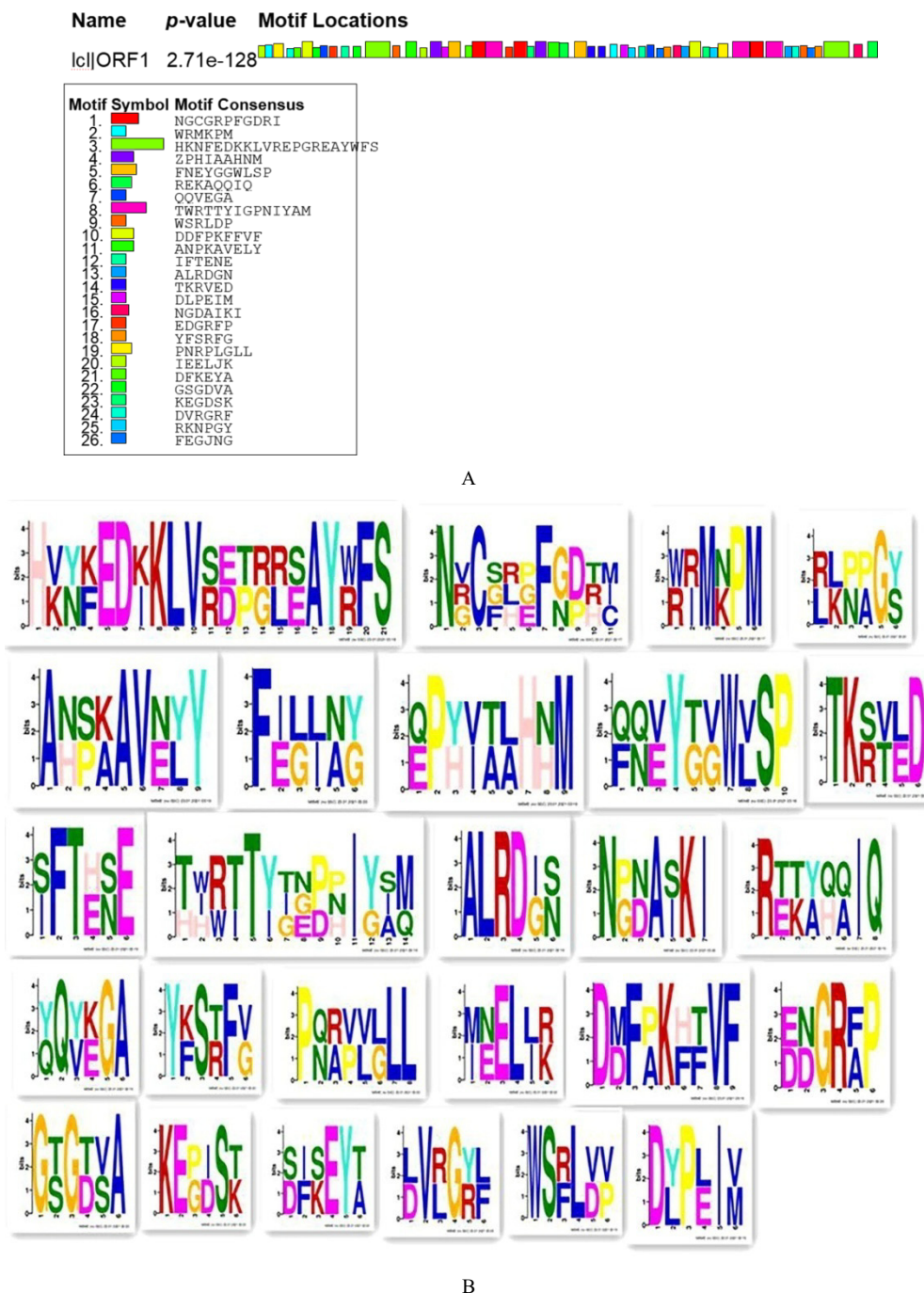


图 4 BSBG 蛋白的 motif 的大小、位置和序列分析结果。A.不同色块长度和位置代表 motif 实际大小和位置; B.motif 序列。

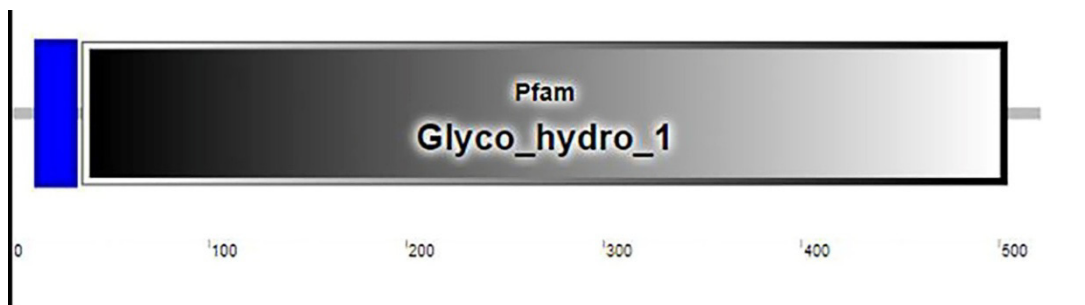
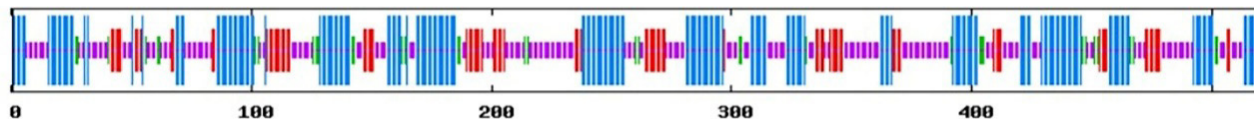
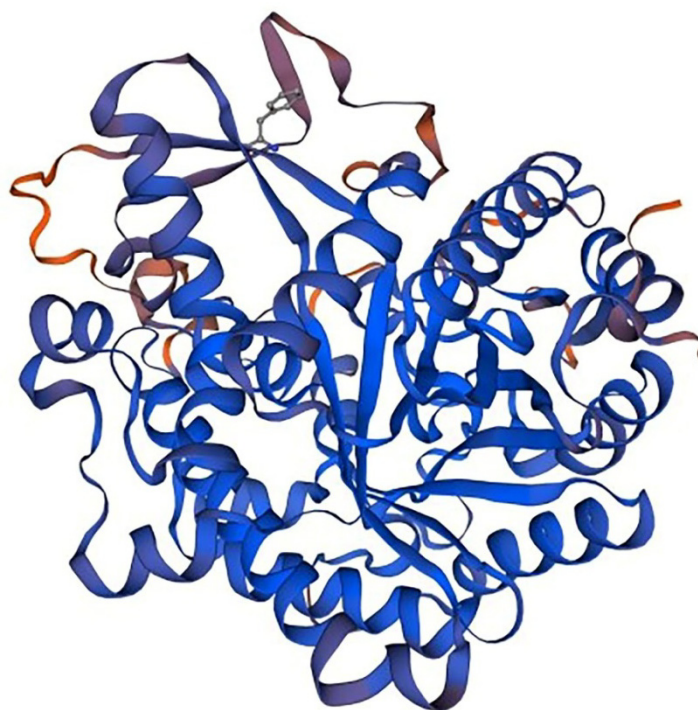


图 5 蛋白质保守结构域分析结果。



A



B

图 6 BSBG 蛋白的二级和三级结构。A.二级机构：其中蓝色代表  $\alpha$ -螺旋，红色代表延伸链，紫色代表无规则卷曲、绿色代表  $\beta$ -转角。B 三级结构。

### 2.7 信号肽预测、跨膜区预测和亚细胞定位预测分析

使用 Signalp 5.0 预测 BSBG 蛋白是否有信号肽。结果表明，BSBG 蛋白可能含有 Sec 信号肽 (Sec/SPI)，可能性为 73.05%。使用 TMHMM 2.0 对 BSBG 蛋白跨膜区进行预测。结果表明，BSBG 蛋白从位点 1 至 12 处于膜内、13 至 32 属于跨膜区 (图 7)。使用 PSORTII 对 BSBG 蛋白进行亚细胞定位预测。结果显示，55.6% 定位于细胞外 (包括细

胞壁)、22.2% 定位于液泡内、11.1% 定位于细胞质内。11.1% 定位于线粒体内。信号肽可以指导蛋白质跨膜转运，它被内质网上的受体识别并与之结合；贯穿整个磷脂双分子层的蛋白称为跨膜蛋白；蛋白质合成后，需要转运到合适的亚细胞位置才能正常发挥功能。结果表明，BSBG 蛋白由核糖体合成后，很可能经过跨膜运输至细胞膜上，大部分在细胞外，发挥其功能。

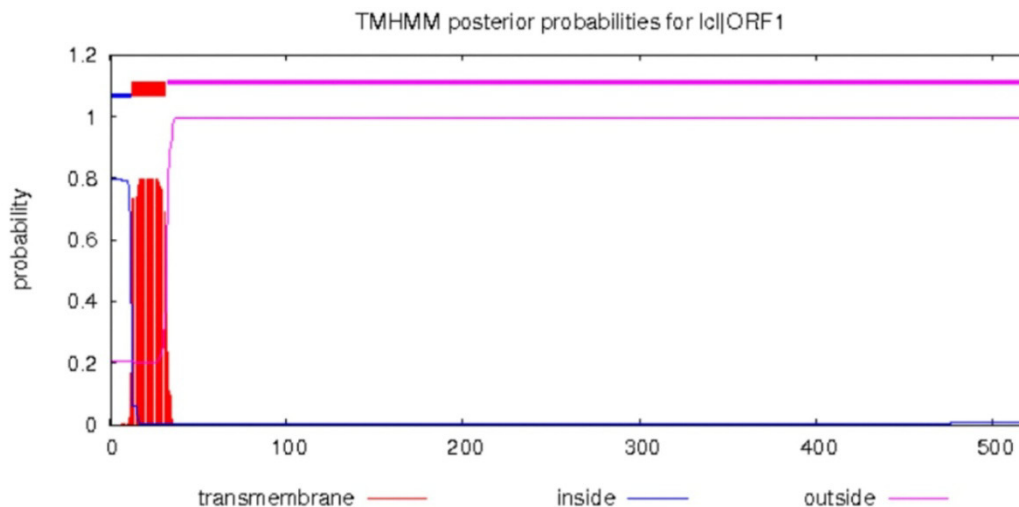


图7 BSBG 蛋白跨膜区预测。

### 3 讨论

本文发现 BSBG 蛋白有高度保守性且与 GH1 家族蛋白高度相似。BSBG 蛋白从位点 36 至 504 是 Glyco\_hydro\_1 家族蛋白的保守结构域。一般来说,  $\beta$ -葡萄糖苷酶有两种分类方法, 一种基于对底物的特异性; 一种考虑核苷酸序列的同一性。其中后者被广泛接受, 其中的 GH1 家族蛋白主要来源太古代细胞、植物和哺乳动物<sup>[13]</sup>, 本文研究对象 BSBG 属于 GH1 家族。根据这一分类, 后续对 BSBG 的研究可以更倾向于与 GH1 家族蛋白类比, 有一定的启发作用。与其他类  $\beta$ -葡萄糖苷酶的二级结构对比, BSBG 蛋白二级结构预测结果中没有出现  $\beta$ -折叠且其他组成比例与嗜酸乳杆菌 GIM1.208 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶<sup>[14]</sup>差别较大, 这说明不同种类的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的功能可能有一定的差异。

结果表明 BSBG 蛋白可能有信号肽。 $\beta$ -葡萄糖苷酶对于结合末端非还原性的  $\beta$ -D-葡萄糖苷键具有催化特异性, 能够转移葡萄糖基, 同时  $\beta$ -葡萄糖苷酶与醇系香气有关, 而结合态的香气化合物需包括  $\beta$ -葡萄糖苷酶在内的酶水解才可发出香气<sup>[14, 15]</sup>。据此推测 BSBG 蛋白可能含有的信号肽在  $\beta$ -葡萄糖苷酶的认识与功能发挥中有着重要作用。

进行多物种蛋白质序列同源比对发现, 白及与白山沉水樟亲缘关系最近, 罂粟次之, 说明多数 BSBG 与白山沉水樟的  $\beta$ -葡萄糖苷酶功能相似。

本研究首次对白及  $\beta$ -葡萄糖苷酶进行了生物信息学分析, 以期对 Bsbg 基因功能研究, 提供一定的

理论基础, 为白及开发应用提供理论依据和资料。

### 参考文献

- [1] Zhou, D., et al., *Stilbenes from the tubers of Bletilla striata with potential anti-neuroinflammatory activity*. Bioorg Chem, 2020. **97**: p. 103715.
- [2] Xu, D., Y. Pan, and J. Chen, *Chemical Constituents, Pharmacologic Properties, and Clinical Applications of Bletilla striata*. Frontiers in Pharmacology, 2019. **10**(1168).
- [3] Zhang, C., et al., *Chemical characterization and gastroprotective effect of an isolated polysaccharide fraction from Bletilla striata against ethanol-induced acute gastric ulcer*. Food Chem Toxicol, 2019. **131**: p. 110539.
- [4] 李远华,  $\beta$ -葡萄糖苷酶的研究进展 (综述). 安徽农业大学学报, 2002. **29**(4): p. 421~ 425.
- [5] Méndez-Líter, J.A., et al., *A glucotolerant  $\beta$ -glucosidase from the fungus Talaromyces amestolkiae and its conversion into a glycosynthase for glycosylation of phenolic compounds*. Microb Cell Fact, 2020. **19**(1): p. 127.
- [6] Ahmed, S.A., et al., *Chemical modification of Aspergillus niger  $\beta$ -glucosidase and its catalytic properties*. Braz J Microbiol, 2015. **46**(1): p. 23-8.
- [7] Ishiguro, R., et al., *Function and structure relationships of a  $\beta$ -1,2-glucooligosaccharide-degrading  $\beta$ -glucosidase*. FEBS Lett, 2017. **591**(23): p. 3926-3936.
- [8] Yan, F.Y., et al., *Characterization of  $\beta$ -glucosidase from*

- Aspergillus terreus* and its application in the hydrolysis of soybean isoflavones. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2016. **17**(6): p. 455-64.
- [9] 潘利华 and 罗建平, 葡萄糖苷酶的研究及应用进展. *食品科学*, 2006. **27**: p. 803-807.
- [10] Lelieveld, L.T., et al., *Role of  $\beta$ -glucosidase 2 in aberrant glycosphingolipid metabolism: model of glucocerebrosidase deficiency in zebrafish*. *J Lipid Res*, 2019. **60**(11): p. 1851-1867.
- [11] Pan, Y., et al., *Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb.f. using a callus suspension culture*. *PLoS One*, 2020. **15**(2): p. e0220084.
- [12] Li, L., et al., *Full Transcriptome Analysis of Callus Suspension Culture System of *Bletilla striata**. *Front Genet*, 2020. **11**: p. 995.
- [13] Srivastava, N., et al., *Microbial Beta Glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversion for Biofuels Application*. *Biomolecules*, 2019. **9**(6).
- [14] 余奕宏, et al., 嗜酸乳杆菌 GIM1.208  $\beta$ -葡萄糖苷酶的异源表达、纯化及酶学性质研究. *生物化学与生物物理进展*, 2021. **48**(1): p. 88-99.
- [15] 覃秋杏, et al., 非酿酒酵母产生的  $\beta$ -葡萄糖苷酶在发酵酒中的应用. *食品科学*, 2020. [2021-01-29]: p. 1-13.

**收稿日期:** 2021 年 5 月 30 日

**出刊日期:** 2021 年 6 月 30 日

**引用本文:** 汪牧非, 李清清, 黄恻隐, 范振源, 廖书胜, 徐德林, 白及  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因的结构与功能特征分析[J]. *细胞与分子生物学研究*, 2021, 1(1): 15-22. DOI: 10.12208/j.ijcmbr.20210004

**检索信息:** 中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA) 等数据库收录期刊

**版权声明:** ©2021 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。 <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



**OPEN ACCESS**