

蓖麻生长素外输载体 PIN 蛋白家族 的生物信息学分析

郑钧伦, 罗 琼, 李子彤, 门淑珍

(南开大学 生命科学学院, 天津 南开 300071)

摘 要 PIN 蛋白家族是植物重要的生长素外输载体,通过介导细胞间的生长素极性运输来调控生长素在植物组织间的差异分布,从而调控植物的生长发育。**目的:**分离鉴定出蓖麻中 PIN 蛋白家族成员,为蓖麻生长素极性运输机制的研究奠定基础。**方法:**利用生物信息学分析软件,以拟南芥 PIN 基因家族序列为模板,在蓖麻基因组数据库中进行 PIN 基因鉴定,并对鉴定到的候选基因进行序列分析、所编码蛋白的结构域分析、信号肽预测、磷酸化位点分析以及系统进化分析。**结果:**蓖麻中共鉴定到 7 条编码 PIN 蛋白的同源序列,平均长度为 537 个氨基酸残基,平均分子量为 58.64 ku,均属于脂溶性较好的碱性蛋白,结构稳定,具有 9 至 10 个跨膜结构域。系统进化分析结果表明,蓖麻 PIN 基因与同属于大戟科的木薯、橡胶树和麻风树的 PIN 基因进化关系较为密切。利用蓖麻基因表达数据库对鉴定到的 *RcPIN* 基因的表达模式进行了分析,并利用 RT-PCR 进行了验证,结果表明,*RcPIN1-1* 和 *RcPIN1-2* 在根、叶、雌花和胚中表达水平较高,*RcPIN2* 主要在根中表达,*RcPIN3*、5、6 和 8 在所有检测的组织均有表达。

关键词 蓖麻;生长素;PIN 蛋白家族;生物信息学分析

中图分类号 Q94

文献标识码 A



开放科学(资源服务)标识码(OSID)

Bioinformatics Analysis of the Auxin Efflux Carrier PIN Proteins of *Ricinus communis* L.

ZHENG Junlun, LUO Qiong, LI Zitong, MEN Shuzhen

(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract PIN family proteins are important auxin efflux carriers in plants, which regulate the differential distribution of auxin between plant tissues by mediating the polar auxin transport between cells, thus regulating the growth and development of plants. **Objective:** To isolate and identify PIN protein family members in castor bean and lay a foundation for the study of polar auxin transport mechanism in castor bean (*Ricinus communis* L.). **Methods:** Using bioinformatics analysis software, *Arabidopsis thaliana* PIN gene family sequences were used to identify the *RcPIN* genes in castor bean genome database. Sequence analysis, domain analysis, signal peptide prediction, phosphorylation site analysis and phylogenetic analysis of the identified candidate genes were carried out. **Results:** Seven PIN protein homologous sequences were identified in castor bean, with an average length of 537 amino acid residues and an average molecular weight of 58.64kD.

收稿日期:2020-12-05

基金项目:国家自然科学基金项目(31870230,31570247,91417308)资助

通讯作者:门淑珍,女,汉族,博士,教授,博士生导师,研究方向:植物生理与分子生物学,E-mail:shuzhenmen@nankai.edu.cn.

All of them were basic proteins with good fat-solubility, stable structure and with 9 to 10 transmembrane domains. Phylogenetic analysis demonstrated that *PIN* genes in castor bean is closely related to the ones in *Manihot esculenta*, *Jatropha curcas* and *Hevea brasiliensis*. Expression patterns of the *RcPIN* genes were analyzed using publicly available transcriptome database and by RT-PCR. The results showed that *RcPIN1-1* and *RcPIN1-2* genes were strongly expressed in root, leaf, female flower and embryo; *RcPIN2* gene was mainly expressed in root; *RcPIN3, 5, 6* and *8* genes were expressed in all the tissues examined.

Key words Castor bean (*Ricinus communis* L.); Auxin; PIN protein family; Bioinformatics

0 引言

生长素(auxin)广泛存在于各种植物中,是最早在植物体被发现并进行研究的激素之一。虽然结构简单,但其能实现的功能却十分复杂,在植物生长和发育的许多过程中都发挥着至关重要的作用。生长素通过在不同的组织建立浓度梯度影响植物细胞的伸长、分裂与分化等过程,从而调节植株的向重力性和向光性生长,调控植物组织器官的发育和分化,如胚的形成、器官发生和形态建成、花芽的萌发以及果实的发育与成熟等^[1,2]。一般认为,生长素在茎尖、根尖和正在发育的幼叶等生长活跃的组织中合成,通过维管系统以被动运输或主动运输的方式运送至目标组织和器官。研究表明,植物产生生长素浓度梯度主要是通过主动运输,该运输方式就是生长素所特有的极性运输(polar auxin transport, PAT)机制。

在极性运输的作用下,植物的一些发育特性开始出现,比如维管发生、顶端优势和向性生长等等^[2]。一般生长素在植物中的极性运输主要指茎尖向茎基部,以及茎基向根部的运输。进一步的研究表明,生长素极性运输除了上述运输途径外,还包括在组织内部的局部定向运输,例如生长素在根的表皮细胞和侧根冠细胞中的向基(从根尖向根基部)运输及其通过皮层细胞向根尖的回流^[3,4]。

生长素浓度梯度分布决定了植物的生长发育模式,而生长素的转运蛋白对于生长素的梯度分布起着关键作用。因此,对生长素极性运输的载体蛋白及其调节机制的研究是生长素研究的热点。截至现在,人们已经鉴定出几种生长素转运蛋白,包括 AUXIN1/LIKE-AUX1(AUX / LAX)、PIN-FORMED(PIN)、ABCB(ATP-binding cassette transporters B sub-family)转运蛋白和类 PIN 蛋白(PIN-LIKES, PILS)转运蛋白^[3,5]。这些生长素的载体蛋白根据亚细胞定位及功能不同可分成两类:一类定位于细胞质膜,作为生长素的输入或输出载体负责细胞间的生长素极性运输,包括 AUX/LAX 家族蛋白、大部分 PIN 家族蛋白以及 ABCB 转运蛋白;另一类主要定位于内质网膜,维持细胞内生长素的稳态^[3],包括 PILS 以及 PIN 蛋白的短链亚族成员。

PIN 蛋白由两侧的疏水区与一个位于中央的亲水区构成。研究最多的是拟南芥 AtPIN 家族,有 8 个成员(AtPIN1-AtPIN8),由于最先发现的 *atpin1* 突变体花序呈针状(pin-formed)而得名。后根据亲水环长度及亚细胞定位不同将其分为三个亚族:第一类包括 AtPIN1-AtPIN4 和 AtPIN7,它们都具有长的亲水环,极性定位于质膜;第二类包括 AtPIN5 和 AtPIN8,具有短的亲水环,定位于内质网膜;AtPIN6 属于第三类,具有较长的亲水环,具有质膜和内质网膜的双重定位^[5,6]。研究表明,*PIN* 基因家族是从同一祖先基因进化而来,其成员之间的蛋白结构的差异主要来自于其中央亲水环的差异,并通过对中央亲水环不同的磷酸化位点修饰使 AtPIN 蛋白家族成员功能各异^[6-8]。长链家族的 AtPIN1-AtPIN4 以及 AtPIN7 的功能研究比较深入,它们都极性定位于细胞膜,将胞内的生长素运输至细胞外,形成与维持组织中生长素的浓度梯度^[2-5,9]。PIN1 蛋白主要定位于维管组织细胞的底部细胞膜,参与生长素的极性运输,同时影响器官发生、维管分化、花芽和叶脉的形成^[2-5,9];PIN2 蛋白在根尖伸长区和胚中表达,也参与极性运输,调控植物的向重力生长^[10]。PIN1、PIN3、PIN4 和 PIN7 蛋白也参与根的向重力生长和茎的负向重力生长^[11]。此外, PIN3 和 PIN4 蛋白还参与控制植物的向光性生长,并与早期侧根的发育有关^[12]。PIN5 蛋白定位于内质网,负责生长素从胞质到内质网的运输,通过调节细胞质内的生长素浓度而参与侧根生长、早期胚的发生以及根与子叶的生长等一系列与生长素调控有关的植物发育过程^[13];PIN6 蛋白由于磷酸化作用的影响,使它既可以定位于细胞膜也可以定位于内质网,通过两种定位方式来同时调节胞内外的生长素极性运输与胞质间的生长

素动态平衡, PIN6 蛋白也参与了由生长素信号转导决定的植物发育过程, 如主/侧根的发育和生长、根毛的生长以及顶端优势的形成等等^[14]。PIN8 蛋白定位于内质网, 参与花粉、雄配子体以及孢子体的形成^[15]。

迄今为止, 人们已经通过全基因组测序在三十余种植物中鉴定出 PIN 基因家族, 成员数目在 4(地钱, *Marchantia polymorpha*) 至 23(大豆, *Glycine max*) 之间^[3]。遗传学分析证明, 在进化过程中的基因组重复是导致 PIN 基因在不同物种中的数量差异的主要原因。尽管人们对 PIN 蛋白家族的研究在不断深入, 许多植物的 PIN 基因也不断被发现, 但一些需要受到研究关注的植物却一直没有研究。蓖麻(*Ricinus communis L.*) 是大戟科(Euphorbiaceae) 蓖麻属(*Ricinus*) 下的唯一物种。它原产于非洲, 目前在中国、印度和巴西均有大面积栽培。作为世界十大油料作物之一, 蓖麻产出的蓖麻籽可以用于提炼榨取蓖麻油, 其不仅可以作为生物柴油, 而且还是化工领域中重要的原材料之一。在人类对生态环境保护日益重视的今天, 由于蓖麻的含油量高、油质好且具有一定的可再生性, 被认为是最有希望的石油替代者^[16]。

本研究以功能已基本明确的拟南芥 PIN 蛋白家族序列为参考, 在蓖麻基因组数据库中检索蓖麻编码 PIN 蛋白的同源基因序列, 并通过生物信息学方法系统分析目的基因的序列信息, 以及该基因家族的进化关系和保守基序特征, 旨在为将来开展蓖麻 PIN 蛋白家族的生物学功能研究提供参考信息, 为蓖麻生长素的极性运输机制研究奠定基础, 为蓖麻种植行业的发展提供理论依据。

1 实验方法

1.1 实验材料

蓖麻种子由南开大学生命科学学院的李秀兰老师提供, 于南开大学生命科学学院试验田种植。剪取水培蓖麻幼苗的根、土中正常生长植株二叶期的茎和叶、盛花期植株的雌花、雄花和果实组织用于提取表达分析所用的总 RNA。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成。采用北京全式金生物技术有限公司 RNA 提取试剂盒(ET121) 提取蓖麻各组织材料的总 RNA。采用北京全式金生物技术有限公司反转录试剂盒(AE301) 合成 cDNA 第一链。

表 1 RT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
ReACTIN7_F	ACTGGAATGGTGAAGGCTGG
ReACTIN7_R	GCAGTCTCAAGTTCTTGCTCG
RePIN1-1_F	AGCCTCATTGGCCTTACCTG
RePIN1-1_R	CCCACCTTTGTTCCCTCCTT
RePIN1-2_F	ATGATCACAGCTTTAGACTTTTACC
RePIN1-2_R	ACCATCTTCTTTAATCTCAGCTTC
RePIN2_F	GCTCAAGTGCCTCTCCAGTT
RePIN2_R	GTGGCCACGAAGACCAATA
RePIN3_F	AATGCTAGTGGCCCTTGGTC
RePIN3_R	GGATTTCGGCGCTGGATAAGA
RePIN5_F	CACTAGTCGTGGGTGTTCTT
RePIN5_R	TAACACCGGAAGCGACACAA
RePIN6_F	AATACCCTGCGCCATTCA
RePIN6_R	CACAAATGAACCGGATCGCC
RePIN8_F	TGTCTACCATGTGGTGGCTT
RePIN8_R	GCTTGCCCATATCAGACCCA

1.2.2 *RcPIN* 基因在蓖麻各组织的表达。以上述获得的 cDNA 为模板,利用 *RcPIN* 基因的特异引物进行 RT-PCR。利用蓖麻的 *RcACTIN7* 基因作为内参。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

1.2.3 生物信息学分析工具。实验使用的序列数据来自于 TAIR 数据库、NCBI 数据库和 Phytozome 数据库。通过生物信息学手段分析蓖麻中编码 PIN 蛋白的同源基因,使用的生物信息学分析工具如表 2。

表 2 生物信息学分析工具

软件/数据库名称	版本/网址	使用功能
TAIR ^[17]	https://www.arabidopsis.org/	拟南芥序列查找
NCBI BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	BLAST 分析
Phytozome ^[18]	https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!search?show=BLAST	BLAST 分析
maizeGDB ^[19]	https://www.maizegdb.org/	玉米序列查找
RGAP 7 ^[20]	http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml	水稻序列查找
ExPASy ^[21]	http://web.expasy.org/protparam/	理化性质分析
CDD ^[22]	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd	保守结构域分析
MAFFT Version 7 ^[23,24]	https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/	多序列比对
MEGA ^[25-28]	Version 7.0.26	进化树构建
GSDS2.0 ^[29]	http://gsds.cbi.pku.edu.cn/	基因结构分析
SOPMA ^[30]	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html	二级结构分析
HMMTOP ^[31,32]	http://www.enzim.hu/hmmtop/index.php	跨膜结构域分析
TMRPres2D ^[33]	http://biophysics.biol.uoa.gr/TMRPres2D/index.jsp	跨膜结构域绘制
SignalP5.0 ^[34]	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php	信号肽预测
NetPhos 3.1 ^[35,36]	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/	磷酸化位点分析
Jalview ^[37]	Version 2.11.1.0	序列比对图绘制
RcDB	https://woodyoilplants.iflora.cn/	基因表达分析
TBtools ^[38]	Version 0.674	热图绘制

2 实验结果

2.1 蓖麻 PIN 蛋白家族的序列分析

为了检索蓖麻中编码 PIN 蛋白的同源序列,以拟南芥的 8 条 PIN 蛋白序列为模板,在蓖麻基因组数据库中进行比对,删除掉得分较低的亚型,共获得 7 条蓖麻 PIN 蛋白序列,对其逐一进行分析。

表 3 蓖麻 PIN 蛋白家族成员信息

蛋白	RcPIN1-1	RcPIN1-2	RcPIN2	RcPIN3	RcPIN5	RcPIN6	RcPIN8
序列编号	LOC_8269287	LOC_8283128	LOC_8289123	LOC_8258189	LOC_8275005	LOC_8277845	LOC_8276026
氨基酸数量(aa)	592	609	637	646	357	565	356
分子量(u)	64079.060	66926.160	69389.300	70391.180	38889.160	61771.950	39047.540
理论等电点(pI)	8.780	8.880	9.240	8.170	8.260	9.040	9.520
不稳定系数(II)	33.440	34.120	39.240	39.350	35.210	35.550	33.800
亲水性系数(GRAVY)	0.247	0.040	0.120	0.094	0.787	0.282	0.635
脂溶指数(AI)	98.990	86.190	88.370	91.520	114.710	101.650	122.250
Mem_trans	9-190,	9-190,	9-190,	9-190,	10-350	10-189,	9-351
结构域位置	431-591	415-604	476-636	485-641		380-560	

理化性质分析结果显示,蓖麻 PIN 蛋白平均长度约为 537 个氨基酸残基,平均分子量为 58.64 ku。编

码氨基酸最长的是 RcPIN3 蛋白,长度为 646 个氨基酸残基,预测分子量为 70.39 ku;编码氨基酸最短的是 RcPIN8 蛋白,长度为 356 个氨基酸,预测分子量为 39.05 ku。蓖麻 PIN 蛋白的理论等电点变化范围在 8.17 (RcPIN3)至 9.52(RcPIN8)之间,均大于 7,平均理论等电点为 8.84,结果如表 3 所示。不稳定系数分析结果显示,RcPIN1-1、RcPIN1-2、RcPIN2、RcPIN3、RcPIN5、RcPIN6、RcPIN8 蛋白不稳定系数均小于 40,为稳定蛋白。它们的脂溶指数都较高,证明它们脂溶性较好。亲水性系数分析结果显示,根据亲水性系数正值为亲水性,负值为疏水性,介于-0.5 至+0.5 之间为两性蛋白的原则^[39],RcPIN5、RcPIN8 蛋白为疏水性蛋白,其余蛋白均为两性蛋白。保守结构域分析结果显示,除了 RcPIN5、RcPIN8 只有一个 Mem_trans 保守结构域外,其余 PIN 蛋白均具有两个 Mem_trans 保守结构域,结果如表 3 所示。

通过比对拟南芥和蓖麻的 PIN 蛋白序列,构建进化树,然后进行基因结构分析,结果显示,拟南芥与蓖麻聚集到一起的基因均有较为相似的基因结构,如图 1 所示。RcPIN1-1、RcPIN1-2 与 AtPIN1 均有 5 个内含子,6 个外显子。AtPIN2 有 8 个内含子,9 个外显子,而 RcPIN2 有 5 个内含子,6 个外显子。RcPIN3、AtPIN3、AtPIN4 和 AtPIN7 均有 5 个内含子,6 个外显子。RcPIN5 和 AtPIN5 均有 4 个内含子,5 个外显子。RcPIN6 与 AtPIN6 均有 6 个内含子,7 个外显子。AtPIN8 与 RcPIN8 均有 5 个内含子,6 个外显子。

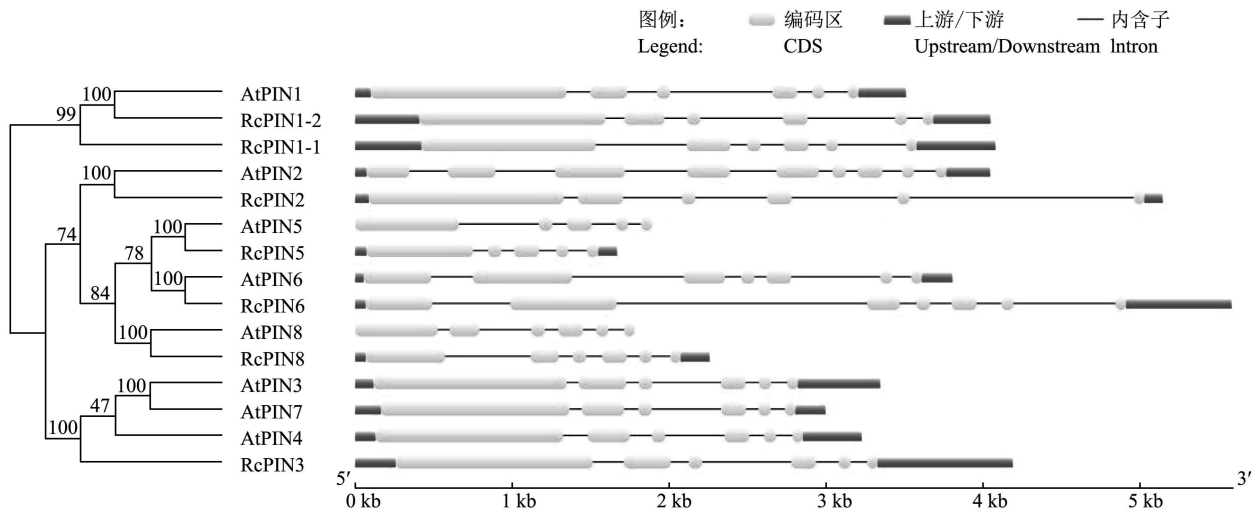


图 1 拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白家族的进化关系与基因结构

对蓖麻 PIN 蛋白的二级结构进行分析,结果如表 4 所示。从二级结构分析结果可以看出,它们的二级结构主要由 α 螺旋、延伸链、 β 转角和无规则卷曲组成。其中 RcPIN1-1、RcPIN1-2、RcPIN2、RcPIN3 和 RcPIN6 的二级结构的数量表现为无规则卷曲> α 螺旋>延伸链> β 转角,而 RcPIN5 和 RcPIN8 则表现为 α 螺旋>无规则卷曲>延伸链> β 转角, β 转角是这些蛋白中数量最少的结构。

表 4 蓖麻 PIN 蛋白家族的二级结构

基因	α 螺旋	延伸链	β 转角	无规则卷曲
RcPIN1-1	180(30.14%)	90(15.20%)	31(5.24%)	291(49.16%)
RcPIN1-2	189(31.03%)	93(15.27%)	29(4.76%)	298(48.93%)
RcPIN2	194(30.46%)	100(15.70%)	30(4.71%)	313(49.14%)
RcPIN3	204(31.58%)	108(16.72%)	35(5.42%)	299(46.28%)
RcPIN5	188(52.66%)	51(14.29%)	20(5.60%)	98(27.45%)
RcPIN6	195(34.51%)	88(15.58%)	25(4.42%)	257(45.49%)
RcPIN8	198(55.62%)	49(13.76%)	21(5.90%)	88(24.72%)

PIN 蛋白主要负责将生长素转运至胞外,是植物细胞重要的跨膜蛋白,因此跨膜结构域是其重要特征。跨膜结构域分析结果显示,所有 AtPIN 家族与 RcPIN 家族成员均有 N 端和 C 端两个疏水区域(5 次跨膜)

和一个中央的亲水环(图 2)。亲水环结构位于细胞内。RcPIN1-1、RcPIN1-2、RcPIN2、RcPIN3 以及 RcPIN6 蛋白的亲水环较长,而 RcPIN5 和 RcPIN8 蛋白的亲水环较短。分别与 AtPIN1、AtPIN2、AtPIN3、AtPIN6、AtPIN5 以及 AtPIN8 对应,拓扑结构相似性非常高(图 2)。

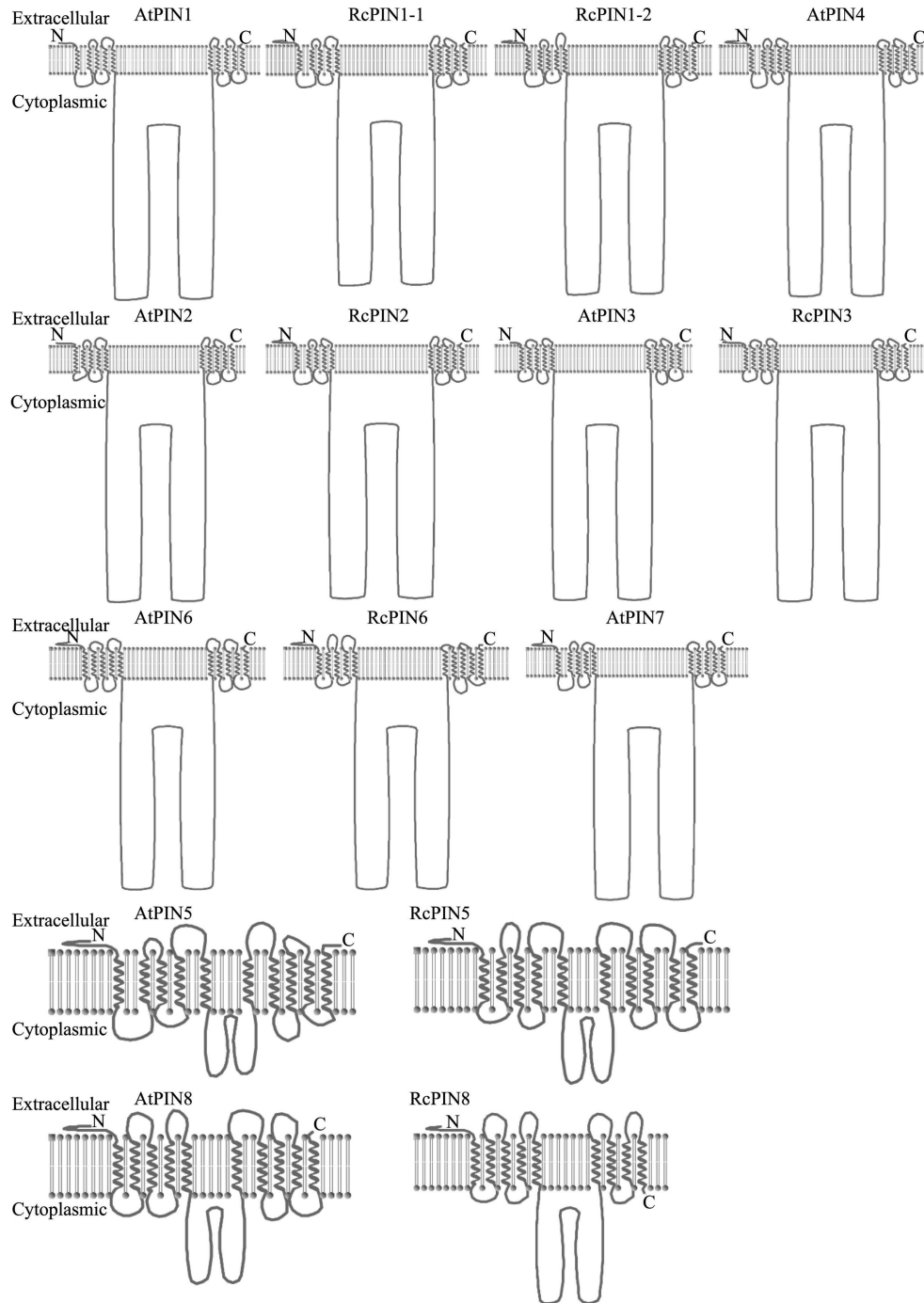


图 2 拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白家族的跨膜结构域

使用 SignalP 5.0 在线工具预测拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白的信号肽,结果发现这 15 个 PIN 蛋白均不存在信号肽(分析结果未展示),暗示 PIN 蛋白不会向细胞外表达,为非分泌性蛋白。PIN 蛋白的磷酸化对其细胞膜极性定位和转运活性有重要影响,因此,使用 NetPhos 3.1 在线工具分析了拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白的磷酸化位点。结果显示,与拟南芥类似,蓖麻 PIN 蛋白的磷酸化位点也大多分布于蛋白序列中间的亲水环区域,潜在的磷酸化位点多数为丝氨酸残基和苏氨酸残基,少数为酪氨酸残基(图 3)。

使用 Mafft Version 7 在线工具进行序列比对后用 Jalview 软件绘制出序列比对分析图,结果如图 4 所示。结果表明,PIN 家族蛋白的两端跨膜结构域较为保守,而构成中央亲水环的氨基酸序列差异较大。

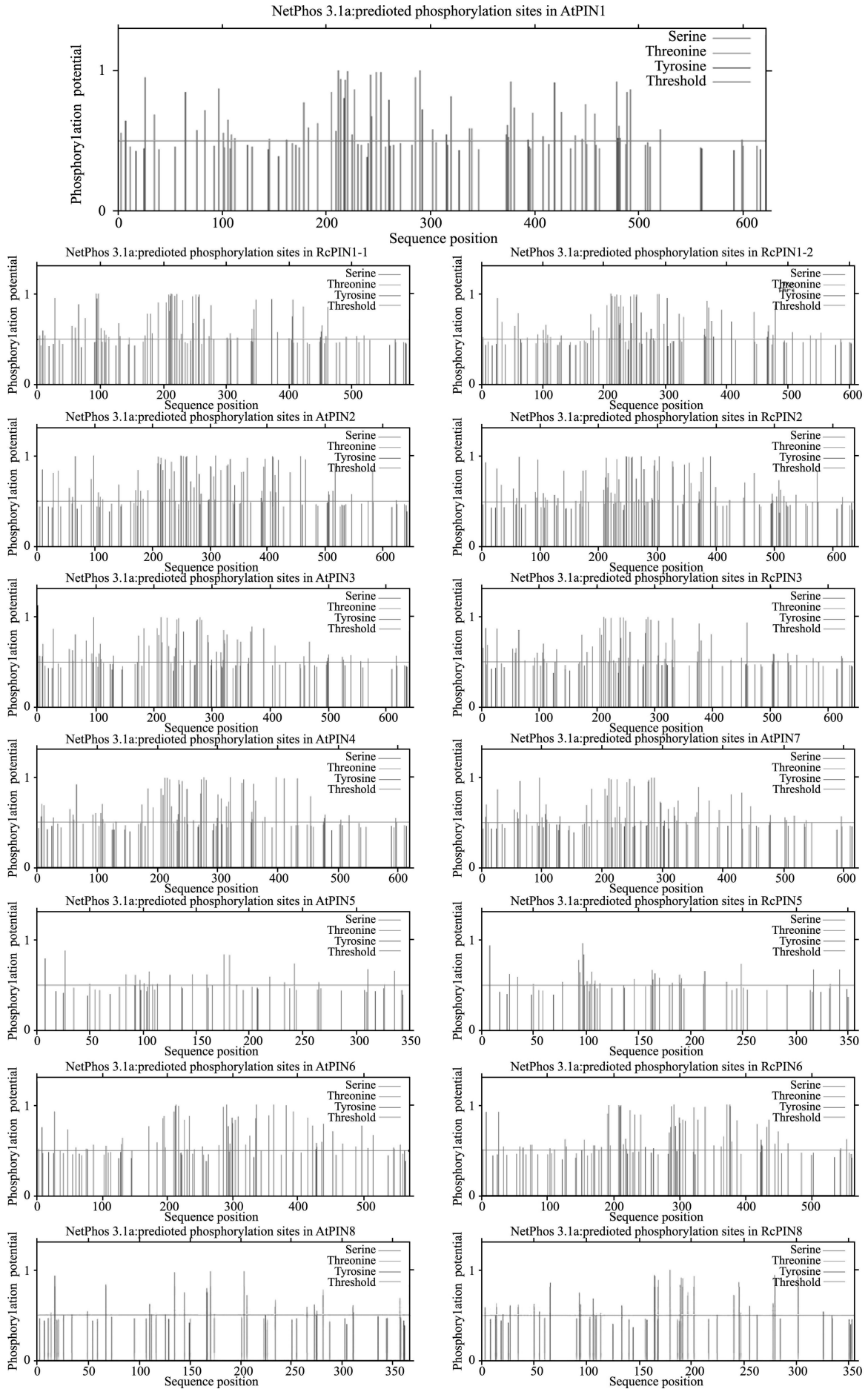


图3 拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白家族的磷酸化位点预测

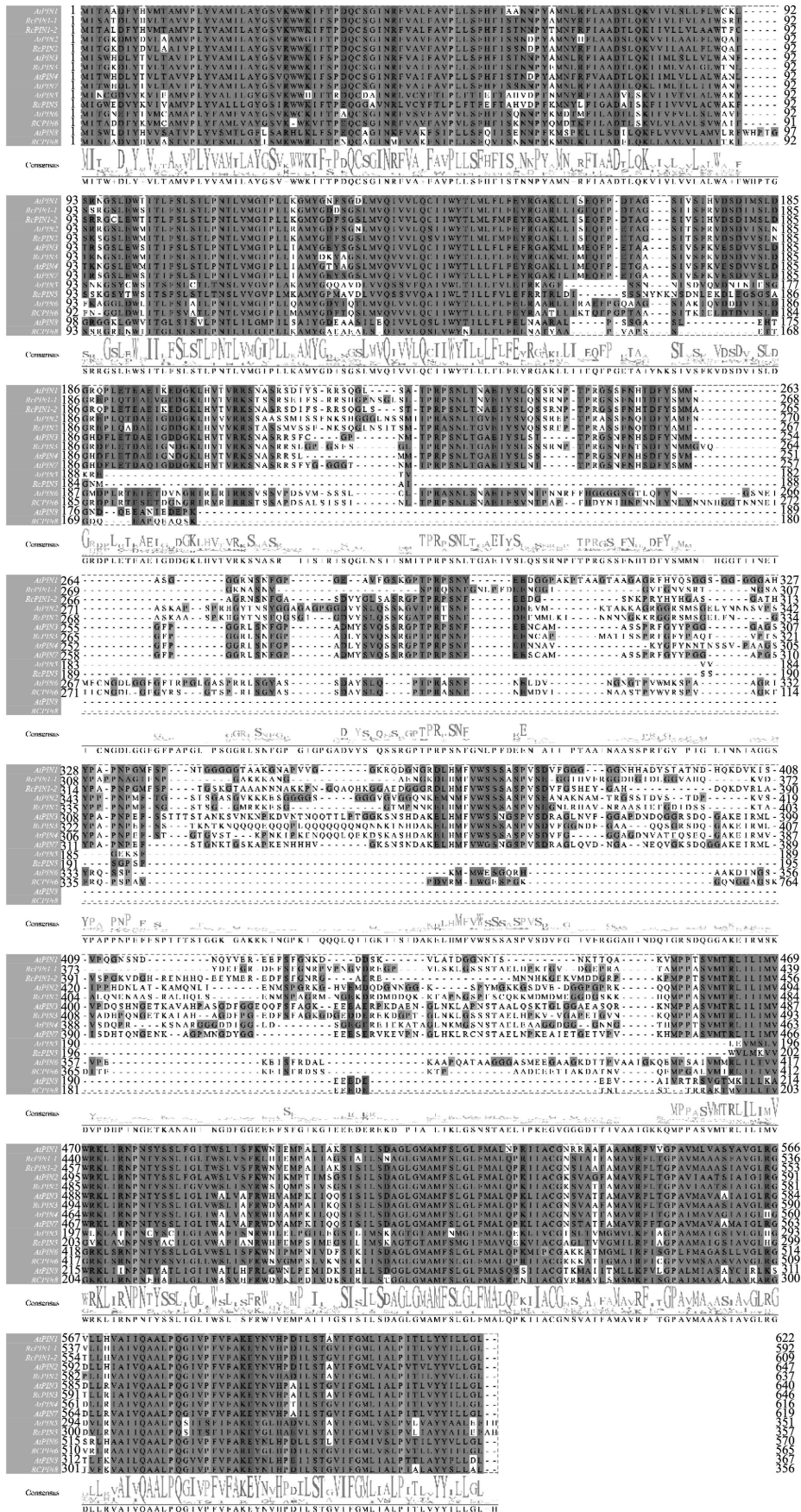
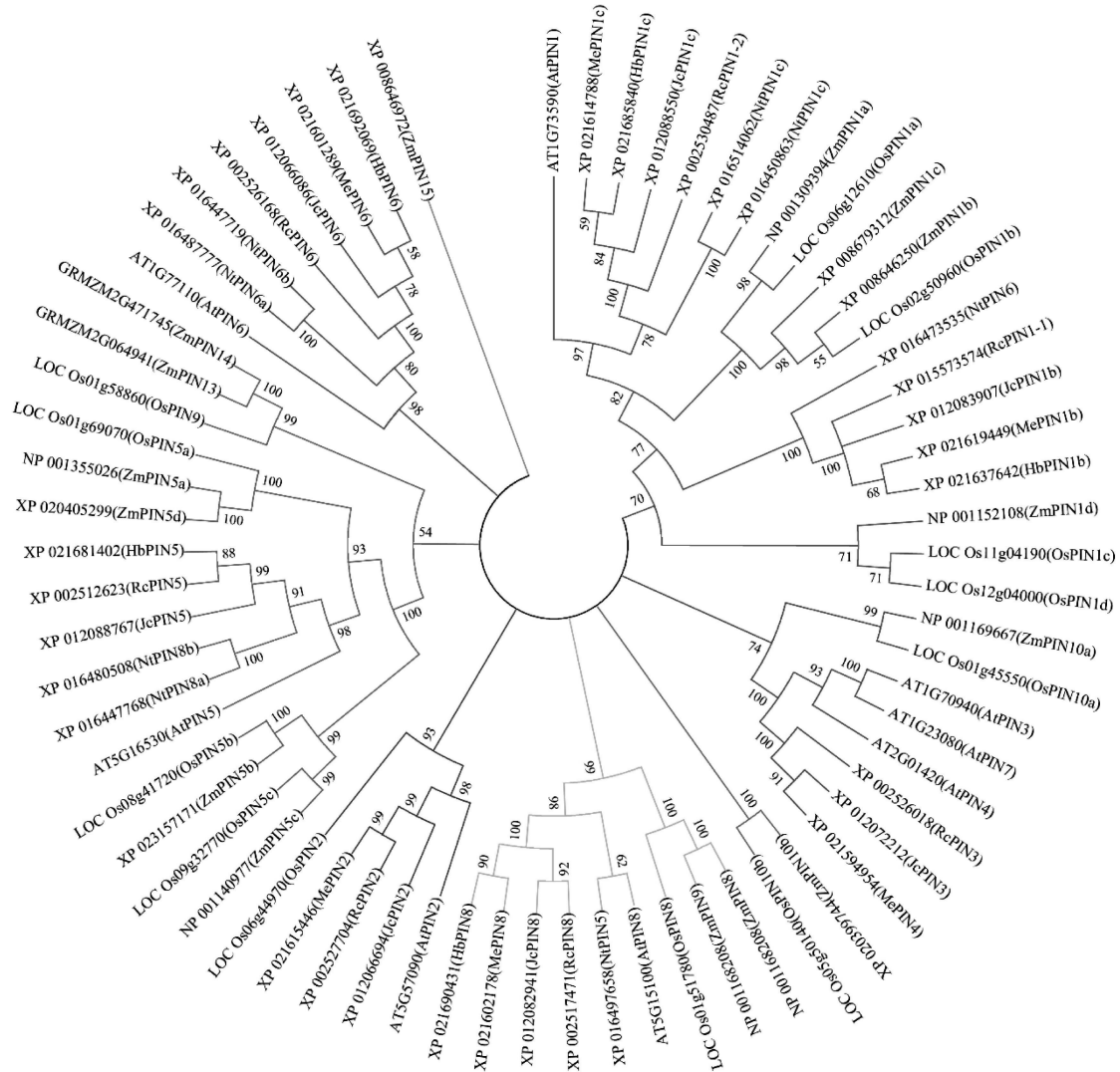


图 4 拟南芥与蓖麻 PIN 蛋白家族的序列比对分析结果

2.2 蓖麻PIN基因家族的系统进化分析

选择双子叶植物烟草,大戟科的木薯、橡胶树和麻风树,单子叶植物水稻和玉米作为分析对象,与蓖麻和拟南芥PIN蛋白序列一起置于MEGA7.0软件中使用邻接法构建进化树。结果显示,蓖麻与同科的木薯、橡胶树和麻风树聚在一起,表示PIN蛋白在大戟科植物中序列比较保守。拟南芥和烟草等双子叶植物聚拢于一起,而单子叶植物水稻和玉米聚拢于一起。此结果与植物分类学一致,结果如图5所示。



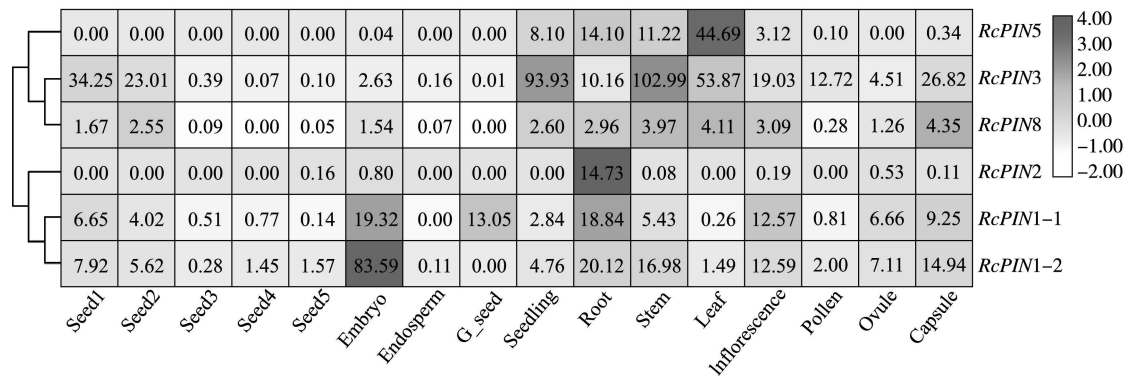
注:At:拟南芥;Rc:蓖麻;Me:木薯;Hb:橡胶树;Jc:麻风树;Nt:烟草;Os:水稻;Zm:玉米。

图5 蓖麻与其他植物的PIN蛋白家族系统进化树分析

2.3 蓖麻PIN基因的表达分析

为了初步研究所筛选出的PIN蛋白的功能,我们首先利用蓖麻基因表达数据库(RcDB, <https://woodyoilplants.iflora.cn/>),对这些PIN基因的表达模式进行了分析。结果显示,*RcPIN1-1*和*RcPIN1-2*基因在胚和根中的表达水平较高,而且*RcPIN1-1*基因在胚中的表达水平明显强于其它组织(图6),暗示其在胚发育中有重要的功能。*RcPIN2*基因在根中特异表达。*RcPIN3*基因在所有检测的组织中均有表达,且在幼苗、茎、叶片和幼嫩的种子中表达水平较高。*RcPIN5*基因主要在叶、根和茎中表达,而且在叶片中表达水平明显强于其它组织。在该数据库中未检索到*RcPIN6*基因的表达。而相对于其它的蓖麻PIN基因,*RcPIN8*在所有组织中的表达均较弱(图6)。

我们进一步利用RT-PCR对这些*RcPIN*基因的组织表达水平进行了验证,实验结果与上述数据库的结果基本吻合(图7)。*RcPIN1-1*和*RcPIN1-2*基因在根、叶、雌花和幼嫩的种子中表达水平较高;*RcPIN2*基因主要在根中表达;*RcPIN3*、*5*、*6*和*8*基因在所有检测的组织均有表达,其中*RcPIN5*基因的表达水平较低。



注: 比例尺表示标准化后的相对表达水平, 无色框表示较低的表达水平, 有色框表示基因的转录水平较高; 种子 1-5 表示种子的不同发育阶段(10-50 天)。

图 6 蓖麻 PIN 基因家族在不同组织中的表达模式

3 讨论与分析

本研究共检索出 7 条蓖麻 PIN 基因序列, 根据其与拟南芥 PIN 基因序列相似程度分别命名 *RcPIN1-1*、*RcPIN1-2*、*RcPIN2*、*RcPIN3*、*RcPIN5*、*RcPIN6*、*RcPIN8*。这些蛋白均呈碱性, 序列长度为 356-646 个氨基酸残基, 分子量大小为 38.89-70.39 ku。其中 *RcPIN5*、*RcPIN6* 和 *RcPIN8* 的氨基酸长度小于 *RcPIN1-1*、*RcPIN1-2*、*RcPIN3*, 符合上述亚族分类规律。这 7 种 *RcPIN* 蛋白均为稳定蛋白, 但 *RcPIN2* 和 *RcPIN3* 不稳定系数接近 40, 无法确切判断。除 *RcPIN5* 和 *RcPIN8* 蛋白为疏水性蛋白外, 其余 *RcPIN* 蛋白均为两性蛋白。另外, *RcPIN5*、*RcPIN6* 和 *RcPIN8* 有相比于其他蛋白更高的脂溶指数。研究认为, 脂溶指数更高说明 PIN5、PIN6 和 PIN8 所在亚族的蛋白质热稳定性更高^[8]。推测这两个特性与其亲水环长度较小有关。信号肽预测结果显示, 蓖麻 PIN 蛋白与拟南芥 PIN 蛋白一样都为非分泌性蛋白。从二级结构和跨膜结构域分析来看, 与其他蛋白相比, *RcPIN5* 和 *RcPIN8* 的二级结构的构成不同, 且跨膜结构域的亲水环结构较不明显, 由于其氨基酸长度较短, 这可能导致 *RcPIN5* 和 *RcPIN8* 跨膜结构域模型与其他成员有差别。序列比对结果表明, PIN 蛋白序列两端的序列较为保守, 而中间的亲水环区域则差异较大。据此推测, 其不同的生物学功能可能与其亲水环的差异有关。这些结果进一步从生物信息学的角度证明了拟南芥典型 PIN 的中心胞质亲水环(HL 结构域)是导致它们功能差异的原因之一^[7,39]。系统进化分析显示, 蓖麻和与其同属大戟科的木薯、橡胶树和麻风树进化关系较为密切, 与双子叶模式植物拟南芥和烟草的进化关系也较为亲密, 可以参照这些植物 PIN 蛋白已知的生物学功能对蓖麻 PIN 蛋白进行下一步的研究。

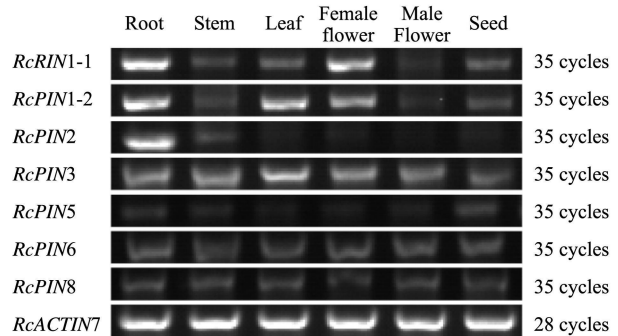


图 7 蓖麻 PIN 基因家族在不同组织中的转录水平

我们注意到, 蓖麻中似乎缺少与 *AtPIN4* 以及 *AtPIN7* 类似的蛋白。 *AtPIN3*、*AtPIN4* 和 *AtPIN7* 蛋白属同一亚族, 在系统进化树中可以看到, *AtPIN3*、*AtPIN4* 和 *AtPIN7* 蛋白聚成一个枝, 进化关系十分密切。与蓖麻同属大戟科的植物同样缺少 PIN3、PIN4 和 PIN7 中的一个或两个, 这些植物的生物信息学研究亦出现类似的结果。研究表明, *AtPIN3*、*AtPIN4* 和 *AtPIN7* 的进化关系亲密且生物学功能较为冗余, 原因是拟南芥中的 *AtPIN1*、*AtPIN3*、*AtPIN4* 和 *AtPIN7* 基因来源于进化中最近发生的一次染色体重复^[7,39,40]。

蓖麻具有适应能力强、含油量高和经济效益高等特点, 获取的蓖麻油粘度较高, 摩擦系数较低, 适合作为工业用油。获得产油率高、生长周期短且可用于大规模种植的优良转基因植株是蓖麻育种的首要目标, 对蓖麻的市场地位与国家的新能源战略布局均有较大提升。生长素作为植物中重要的内源性激素, 对植株的生

长素作为植物中重要的内源性激素, 对植株的生

长发育影响较大。生长素相关基因对蓖麻生长发育及抗逆性的研究,可为蓖麻育种提供有益的线索。PIN蛋白是生长素极性运输的主要承担者,目前对其在拟南芥等植物生长发育过程中功能的研究已有许多进展。若能以此为依据,探明蓖麻中PIN蛋白的生物学功能,则可以为其生长素极性运输机制的研究奠定基础,为选育蓖麻新品种和蓖麻种植行业的发展提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 宋丽珍,王逸,杨青华,等.生长素在植物胚胎早期发育中的作用[J].植物学报,2013,48(4):371-380.
- [2] 李俊华,种康.植物生长素极性运输调控机理的研究进展[J].植物学通报,2006,23(5):466-477.
- [3] ZHOU J J,LUO J.The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plants[J].International Journal of Molecular Sciences,2018,19(9):2759.
- [4] 郑元,周安佩,刘玉鲲,等.植物生长素极性运输及调控机制的研究进展[J].云南农业大学学报(自然科学),2013,28(6):878-884.
- [5] 邹纯雪,门淑珍.生长素的外输载体PIN蛋白家族研究进展[J].中国细胞生物学学报,2013(5):574-582.
- [6] ZHANG Y Z,HARTINGER C,WANG X J,et al.Directional auxin fluxes in plants by intramolecular domain-domain coevolution of PIN auxin transporters[J].New Phytologist,2020,227(5):1406-1416.
- [7] ZHANG Y Z,RODRIGUEZ L,LI L X,et al.Functional innovations of PIN auxin transporters mark crucial evolutionary transitions during rise of flowering plants[J].Science Advances,2020,6(50):eabc8895,[2021-02-02].<http://advances.sciencemag.org/>.DOI: 10.1126/sciadv.abc8895.
- [8] ARMENGOT L,MARQUÈ S-BUENO M M,JAILLAIS Y.Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases[J].Journal of Experimental Botany,2016,67(14):4015-4037.
- [9] FRIML J,VIETEN A,SAUER M,et al.Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of Arabidopsis[J].Nature,2003,426(6963):147-53.
- [10] RIGO G,AYAYDIN F,TIETZ O,et al.Inactivation of plasma membrane-localized CDPK-RELATED KINASE5 decelerates PIN2 exocytosis and root gravitropic response in Arabidopsis[J].Plant Cell,2013,25:1592-1608.
- [11] RAKUSOVA H,ABBAS M,HAN H,et al.Termination of shoot gravitropic responses by auxin feedback on PIN3 polarity[J].Current Biology,2016,26:3026-3032.
- [12] DING Z,GALVÁN-AMPUDIA C S,DEMARSY E,et al.Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in Arabidopsis[J].Nature Cell Biology,2011,13(4):447-52.
- [13] MRAVEC J,SKUPA P,BAILLY A,et al.Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter[J].Nature,2009,459:1136-1140.
- [14] SIMON S,SKUPA P,VIAENE T,et al.PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in Arabidopsis[J].New Phytologist,2016,211:65-74.
- [15] DAL BOSCO C,DOVZHENKO A,LIU X,et al.The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis[J].Plant Journal,2012,71:860-870.
- [16] 王光明.蓖麻育种与栽培[M].北京:中国农业出版社,2013.
- [17] BERARDINI T Z,REISER L,LI D H,et al.The Arabidopsis information resource:making and mining the "gold standard" annotated reference plant genome[J].Genesis,2015,53(8):474-85.
- [18] GOODSTEIN D M,SHU S Q,HOWSON R,et al.Phytozome: a comparative platform for green plant genomics[J].Nucleic Acids Research,2012,40(1):1178-1186.
- [19] PORTWOOD J L II,WOODHOUSE M R,CANNON E K,et al.MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database[J].Nucleic Acids Research,2019,47(D1):D1146-D1154.
- [20] KAWAHARA Y,BASTIDE M,HAMILTON J P,et al.Improvement of the Oryza sativa nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data[J].Rice,2013,6(1):4-10.
- [21] WILKINS M R,GASTEIGER E,BAIROCH A,et al.Protein identification and analysis tools in the ExPASy server[J].Methods in Molecular Biology (Clifton,N J),1999,112:531-52.
- [22] LU S N,WANG J Y,CHITSAZ F,et al.CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020[J].Nucleic Acids Research,2020,48(D1):265-268.
- [23] KATO H K,ROZEWICKI J,YAMADA K D.MAFFT online service:multiple sequence alignment,interactive sequence choice and visualization[J].Briefings in Bioinformatics,2019,20(4):1160-1166.

- [24] KURAKU S,ZMASEK C M,NISHIMURA O,et al.aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity[J].Nucleic Acids Research,2013(41):22-28.
- [25] SAITOU N,NEI M.The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J].Molecular Biology and Evolution,1987(4):406-425.
- [26] FELSENSTEIN J.Confidence limits on phylogenies:an approach using the bootstrap[J].International Journal of Organic Evolution,1985(39):783-791.
- [27] ZUCKERKANDL E,PAULING L.Evolutionary divergence and convergence in proteins[M].1965.
- [28] KUMAR S,STECHER G,TAMURA K.MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J].Molecular Biology and Evolution,2016(33):1870-1874.
- [29] HU B,JIN J P,GUO A Y,et al.GSDS 2.0:an upgraded gene feature visualization server[J].Bioinformatics,2015,31(8):1296-1297.
- [30] COMBET C,BLANCHET C,GOURJON C,et al.NPS@:network protein sequence analysis[J].Trends in Biochemical Sciences,2000,25,3(291):147-150.
- [31] TUSNADY G E,SIMON I.Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction [J].Journal of Molecular Biology,1998,283:489-506.
- [32] TUSNADY G E,SIMON I.The HMMTOP transmembrane topology prediction server[J].Bioinformatic,2001,17:849-850.
- [33] IOANNIS C S,THEODORE D L,PANTELIS G B,et al.TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models[J].Bioinformatics,2004,20:3258-3260.
- [34] ALMAGRO ARMENTEROS J J,TSIRIGOS K D,SONDERBY C K,et al.SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J].Nature Biotechnology,2019,37(4):420-423.
- [35] BLOM N,GAMMELTOFT S,BRUNAK S.Generic predictions:Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites[J].Journal of Molecular Biology,294(5):1351-1362,1999.
- [36] BLOM N,SICHERITZ-PONTEN T,GUPTA R,et al.Kinase specific predictions:prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence[J].Proteomics,2004,4(6):1633-1649.
- [37] WATERHOUSE A M,PROCTER J B,MARTIN D M A,et al.Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench[J].Bioinformatics,2009,25(9):1189-1191.
- [38] CHEN C J,XIA R,CHEN H,et al.TBtools,a Toolkit for Biologists integrating various HTS-data handling tools with a user-friendly interface[J].Molecular Plant,2020,13(8):1194-1202.
- [39] IVAN A,TEALE W D,TREBAR M,et al.The PIN auxin efflux facilitators:evolutionary and functional perspectives[J].Trends in Plant Science,2005,10(4):170-177.
- [40] WANG J R,HU H,WANG G H,et al.Expression of PIN genes in rice (*Oryza sativa* L): tissue specificity and regulation by hormones[J].Molecular Plant,2009,2(4):823-831.