

苹果 *AAT* 基因家族的生物信息学分析

小组：4G10

汇报人：梁兆林

组员：叶宇 孟德双 赵亮亮 梁兆林

小组成员

编号	姓名	研究所	导师	研究方向
4G10A	叶宇	果树所	姜淑苓	梨遗传育种
4G10B	孟德双	特产所	彭英华	鹿茸干细胞外泌体治疗皮肤损伤
4G10C	赵亮亮	果树所	赵德英	梨生理与栽培
4G10D	梁兆林	果树所	丛佩华	苹果遗传育种

目录

1.研究背景

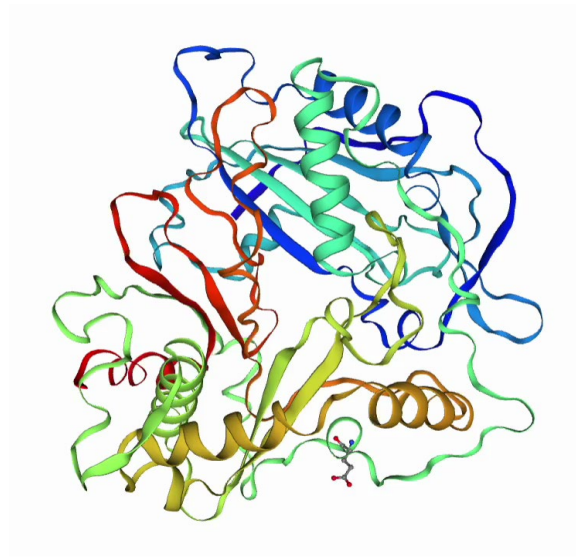
2.研究目的与意义

3.系统进化树的构建

4.基因结构分析与染色体定位

5.AAT蛋白三维结构分析

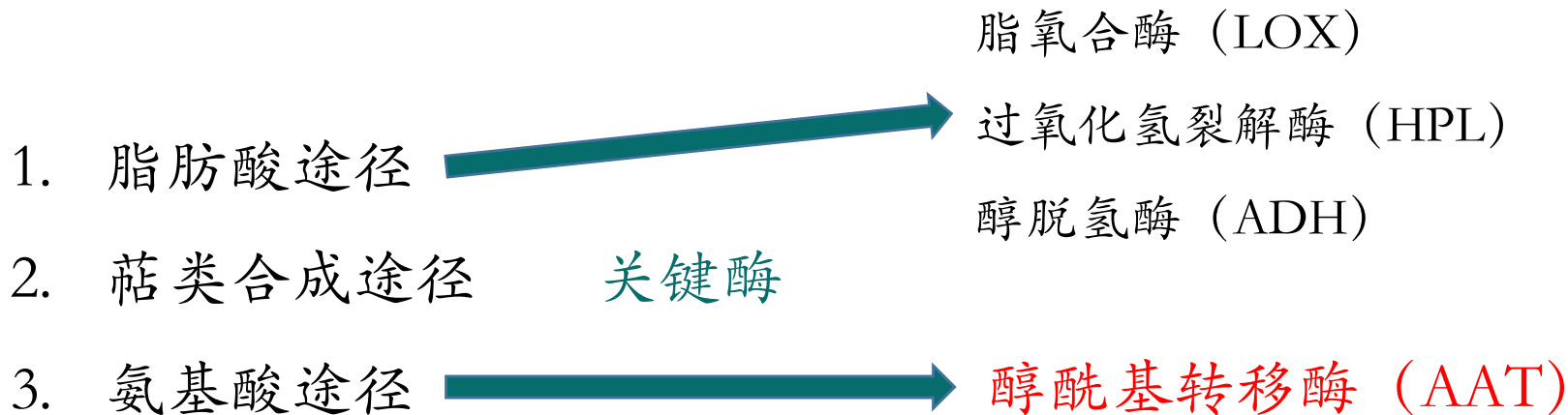
6.总结



1. 研究背景

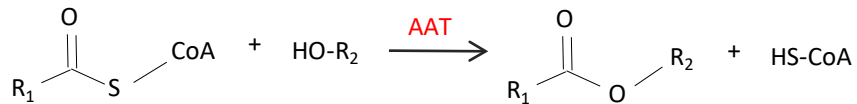
香气物质作为苹果的一项品质指标，是在果实的成熟过程中，通过一系列酶修饰前体物质如脂肪酸、氨基酸等所形成的，同时其属于果实的次级代谢产物，由上千种挥发性化合物组成，主要包括酚类、酯类、醛类、萜类、醇类及含硫化合物等。不同的种类或同一种类的不同品种间，香气物质的组成成分不同，例如苹果有 350 多种。

1. 研究背景



1. 研究背景

氨基酸途径代谢形成果实香气物质中的支链脂肪族醇、醛、酮和酯类物质，氨基酸由转氨作用形成支链酮酸后就分为两个途径：一条为脱羧形成支链醛进而脱氢生成支链醇；另一条与辅酶 A 生成酰基辅酶 A，然后在**醇酰基转移酶 (AAT)** 作用下形成支链酯类物质。



醇酰基转移酶催化酯类合成

2. 研究背景

the plant journal



The Plant Journal (2014) 78, 903–915

doi: 10.1111/tpj.12518

FEATURED ARTICLE

The *AAT1* locus is critical for the biosynthesis of esters contributing to 'ripe apple' flavour in 'Royal Gala' and 'Granny Smith' apples

Edwige J. F. Souleyre^{1,*}, David Chagné², Xiuyin Chen¹, Sumathi Tomes¹, Rebecca M. Turner¹, Mindy Y. Wang¹, Ratnasiri Maddumage¹, Martin B. Hunt², Robert A. Wenz², Claudia Wiedow², Cyril Hamiaux¹, Susan E. Gardiner², Daryl D. Rowan² and Ross G. Atkinson¹

¹The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited (PFRL), Private Bag 92169, Victoria Street West, Auckland 1025, New Zealand, and

²The New Zealand Institute for Plant and Food Research Limited (PFRL), Private Bag 11600, Palmerston North 4442, New Zealand

Received 7 October 2013; revised 16 January 2014; accepted 17 March 2014; published online 24 March 2014.

*For correspondence (e-mail edwige.souleyre@plantandfood.co.nz).

GenBank accession numbers: AAT1-RGa (KC291129); AAT1-RGb (KC291130); AAT1-RGc (KC291131); AAT1-GSa (KC291132); AAT1-GSd (KC291133); AAT1-GSe (KC291134); AAT1-GSd (KC291135)

相关文献表示嘎啦苹果和青苹果中的*AAT1*基因存在多种变异，但是只有AAT1RGA和AAT1GSA具有功能且在果皮中高表达，AAT1RGA催化高酯合成，AAT1GSA催化低酯合成。

另外相关文献经过筛选得到了果实香气调控的候选基因*AAT2*。



2.研究目的与意义

研究目的:

利用生物信息学对苹果 *AAT* 基因家族进行分析, 为果实香气调控基因的功能差异提供分子理论基础。

研究意义:

通过对苹果 *AAT* 基因家族的系统鉴定、进化分析, 分析其序列的基本特性以及家族成员之间的进化关系和对应蛋白质的三维结构。为进一步研究苹果 *AAT* 基因的功能以及香气物质的合成提供理论依据。

3. 系统进化树的构建

Swiss-prot 检索

Entry	Entry name	Organism
Q64FJ6	ATRG_MALDO	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)
AOA498KFL4	ATGSA_MALDO	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)
Q6R311	AAT2_MALDO	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)
AOA498KE69	ATRGC_MALDO	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)
AOA498KJ69	ATGSC_MALDO	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)
V9P9S4	ATGSB_MALDO	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)
AOA498KIQ3	ATGSD_MALDO	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)
V9P9L8	ATRGB_MALDO	Malus domestica (Apple) (Pyrus malus)

在Swiss-prot数据库检索到8条苹果AAT基因家族蛋白序列

提取Swiss-prot数据库中拟南芥，水稻，印度蛇根草，矮牵牛5个代表物种的AAT基因家族蛋白序列信息，使用MAGA7通过邻接法，Bootstrap值设置为100，模型选择p-distance构建系统发生树。

Entry	Entry name	Organism
Q9SZ58	BRAT1_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
064470	SHT_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q94CD1	HHT1_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9FF86	DCR_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9FI78	HST_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
080467	SDT_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
023393	BIA1_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9LJB4	5MAT_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9SRQ2	CHAT_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q39048	CER2_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q940Z5	PMAT1_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9ZWB4	3AT1_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9FH97	EPS1_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9LR73	3AT2_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9SVM9	CER26_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)

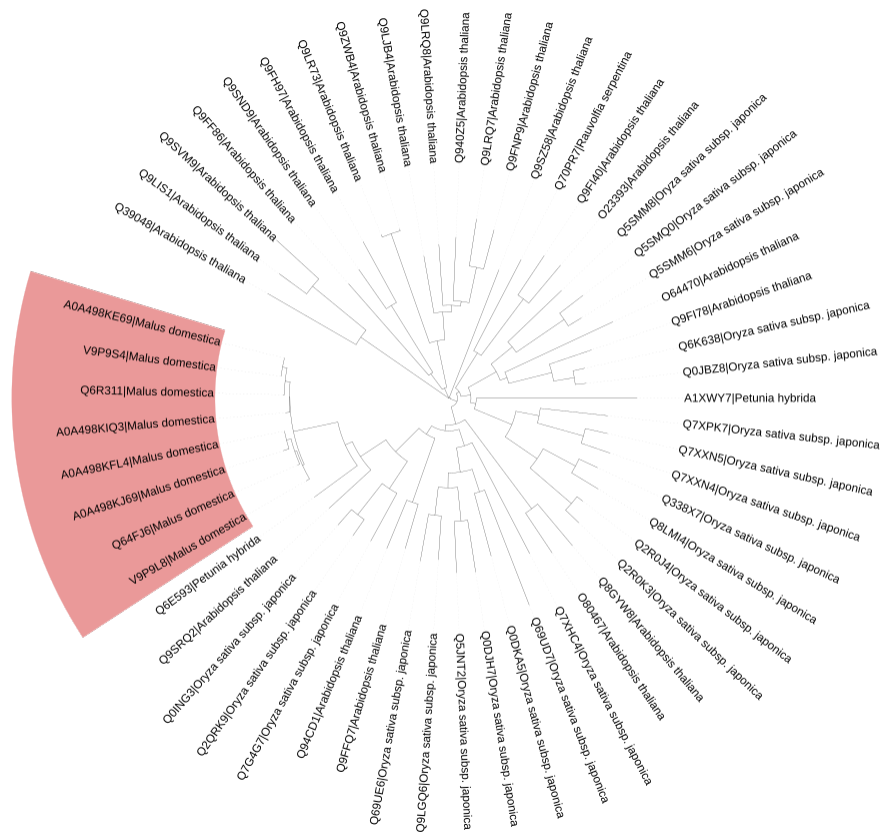
Entry	Entry name	Organism
Q8GYW8	SCT_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9FFQ7	FACT_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9FNP9	AGCT_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9LIS1	CR26L_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9LRQ8	PMAT2_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9FI40	BAHD1_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9LRQ7	BAHD2_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q9SND9	Y3028_ARATH	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q8LMI4	THT2_ORYSJ	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)
Q338X7	THT1_ORYSJ	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)
Q5JNT2	AT4_ORYSJ	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)
Q2ROK3	TBT1_ORYSJ	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)
Q5SMM6	HCT4_ORYSJ	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)
Q7XXN4	PUHT_ORYSJ	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)
Q7G4G7	AT1_ORYSJ	Oryza sativa subsp. japonica (Rice)

Entry	Entry name	Organism
Q69UE6	AT10_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q5SMM8	PHT1_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q7XXN5	PHT3_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q7XPK7	AHT1_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q2ROJ4	TBT2_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q0DKA5	AT7_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q5SMQ0	PHT2_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q0DJH7	AT5_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q0ING3	SHT2_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q7XHC4	AT15_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q69UD7	AT8_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q0JBZ8	HCT1_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q9LGQ6	AT9_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q2QRK9	SHT1_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)
Q6K638	HCT2_ORYSJ	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica (Rice)

Entry	Entry name	Organism
Q64FJ6	ATRGA_MALDO	<i>Malus domestica</i> (Apple) (<i>Pyrus malus</i>)
A0A498KFL4	ATGSA_MALDO	<i>Malus domestica</i> (Apple) (<i>Pyrus malus</i>)
Q6R311	AAT2_MALDO	<i>Malus domestica</i> (Apple) (<i>Pyrus malus</i>)
A0A498KE69	ATRGC_MALDO	<i>Malus domestica</i> (Apple) (<i>Pyrus malus</i>)
A0A498KJ69	ATGSC_MALDO	<i>Malus domestica</i> (Apple) (<i>Pyrus malus</i>)
V9P9S4	ATGSB_MALDO	<i>Malus domestica</i> (Apple) (<i>Pyrus malus</i>)
A0A498KIQ3	ATGSD_MALDO	<i>Malus domestica</i> (Apple) (<i>Pyrus malus</i>)
V9P9L8	ATRGB_MALDO	<i>Malus domestica</i> (Apple) (<i>Pyrus malus</i>)
Q70PR7	VINSY_RAUSE	<i>Rauvolfia serpentina</i> (Serpentine wood)
Q6E593	BEBT1_PETHY	<i>Petunia hybrida</i> (Petunia)
A1XWY7	CFAT_PETHY	<i>Petunia hybrida</i> (Petunia)

通过系统发生树结果，可以发现苹果AAT蛋白聚为一支，初步推断AAT1基因和AAT2基因是在苹果这一物种形成之后分化产生的。

Tree scale: 1



4. 基因结构分析与染色体定位

通过系统发生树，我们发现苹果AAT基因家族在物种形成后发生分化，接下来我们通过基因结构分析来了解基因的分化程度和结构变化。

利用基因结构 GSDS2.0(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 在线分析软件，对 AAT 基因序列进行内含子和外显子结构分析。

GSDS2.0 Gene Structure Display Server

Home | Help | About | FAQ | Links: PlantRegMap

● Gene Features

Format: Sequence(FASTA)

Please keep the sequence IDs consistent in the two fields.

▶▶ CDS sequence (FASTA)

Input data:

```
>AAT1RGA CDS sequence
ATGATGTCATTCTCAGTACTTCAGGTGAAAAGATTGCAACCGAACTTATAACTCGGCAAAGTCAA
CCG
CTCAAGAAAACAAAGTTTCTCTCAGATATTGAAGCACAAGAAAGCTTGAGAGTTCAGATTCCAATCAT
AAT
GTGTTACAAAGACAACCCCTTCACTTAATAAAAAATCGTAATCCCGTTAAGGCAATTAGGGAAGCCTTA
AGT
```

or upload file:

▶▶ Genomic sequence (FASTA)

Input data:

```
>AAT1RGA Gene Sequence
CTGGTCTTAAAGCTGGTACTGAAATGATGTCATTCTCAGTACTTCAGGTGAAAAGATTGCAACCGG
AAC
TTATAACTCGGCAAAGTCAAAGCCTCAAGAAAACAAAGTTTCTCTCAGATATTGAAGCACAAGAAAG
GTT
GAGAGTTCAGATTCCAATCATAATGTTACAAGACAACCCCTTCACTTAATAAAAAATCGTAATCCC
GTT
```

or upload file:

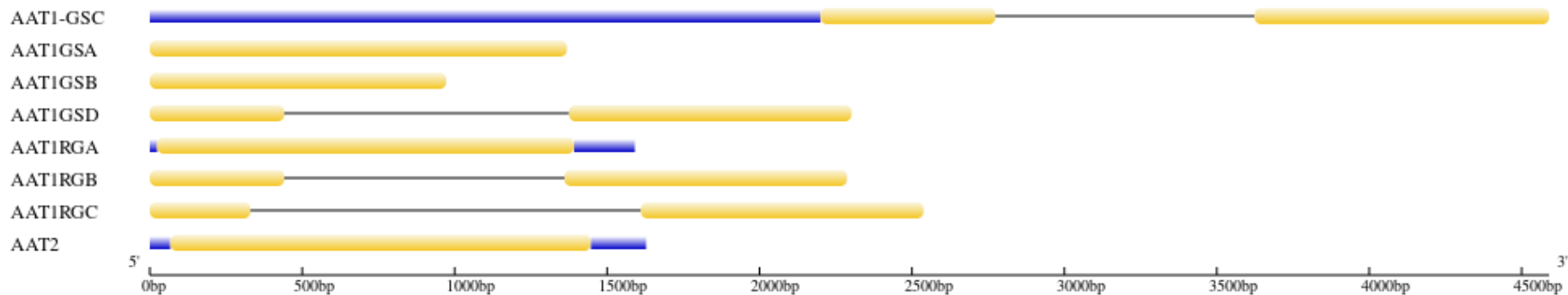
● Other Features to Display

● Output (Phylogenetic Tree/Order)

● Image Format: SVG

通过 GSDS2.0 进行外显子内含子作图, 发现苹果基因序列AAT1GSA, AAT1GSB, AAT1RGA, AAT2无内含子, 基因序列AAT1-GSC, AAT1GSD, AAT1RGB, AAT1RGC有内含子。

结合相关文献, 只有AAT1GSA, AAT1RGA, AAT2具有功能, 我们推断AAT1-GSC, AAT1GSD, AAT1RGB, AAT1RGC功能的缺失可能与内含子的插入有关, 而AAT1GSB的功能缺失可能是序列较短缺少转录或翻译的特定结合序列。



Legend:

■ CDS ■ upstream/ downstream — Intron

Souleyre EJ, Chagné D, Chen X, Tomes S, Turner RM, Wang MY, Maddumage R, Hunt MB, Winz RA, Wiedow C, Hamiaux C, Gardiner SE, Rowan DD, Atkinson RG. The AAT1 locus is critical for the biosynthesis of esters contributing to 'ripe apple' flavour in 'Royal Gala' and 'Granny Smith' apples. *Plant J.* 2014 Jun;78(6):903-15. doi: 10.1111/tpj.12518. Epub 2014 May 23. PMID: 24661745.

为进一步解析苹果 *AAT* 家族基因的组织形式，从蔷薇科基因组数据库(GDR) (<https://www.rosaceae.org/>) 上获取苹果 *AAT* 基因家族的染色体定位情况，发现有6条序列均定位在苹果的2号染色体。

AAT, KC291130.1-AAT (gene) Malus x domestica

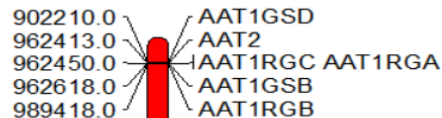
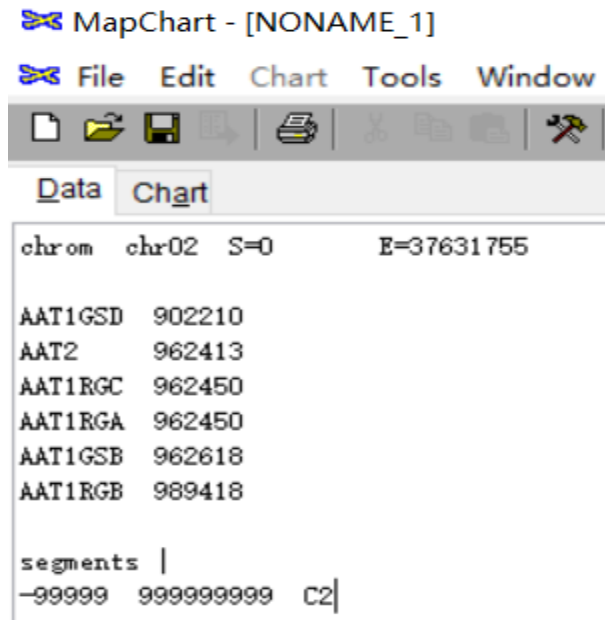
Overview
Alignments
Analyses
Cross References
Relationships
Sequences

Alignments

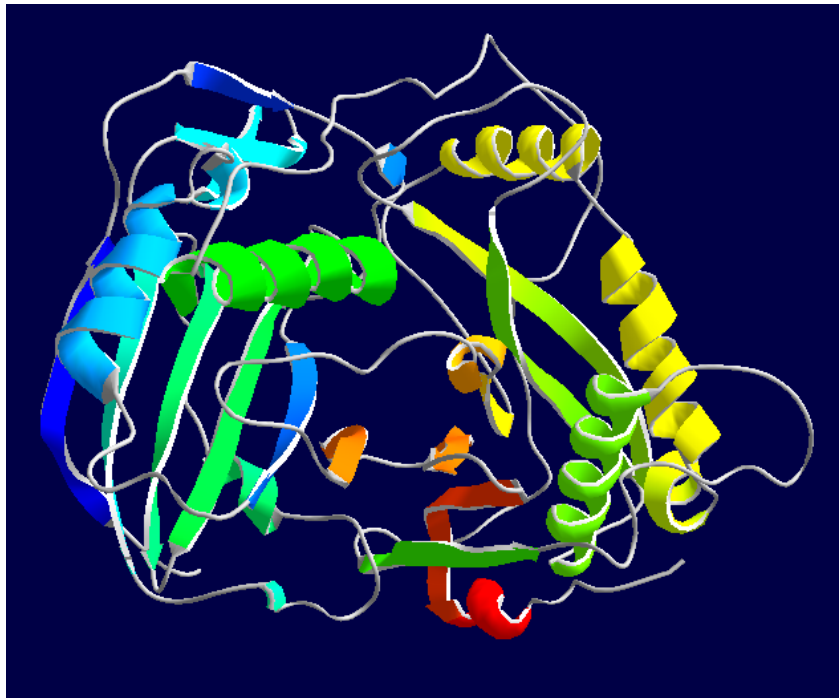
Feature Name	Type	Location	Analysis
KC291130	region	KC291130:1997..4283+	NCBI Rosaceae gene and mRNA sequences
Chr02	chromosome	Chr02:969418..991702-	Malus x domestica GDDH13 v1.1 Whole Genome Assembly & Annotation

基因名	基因登录号	蛋白登录号	染色体定位	基因长度
AAT1RGA	KC291129	Q64FJ6	Chr02:962450..991702	2492bp
AAT1RGB	KC291130	V9P9L8	Chr02:989418..991702	2287bp
AAT1RGC	KC291131	A0A498KE69	Chr02:962450..964984	2538bp
AAT1GSA	KC291132	A0A498KFL4	N/A	1368bp
AAT1GSB	KC291133	V9P9S4	Chr02:962618..965085	972bp
AAT1-GSC	KC291134	A0A498KJ69	N/A	4590bp
AAT1GSD	KC291135	A0A498KIQ3	Chr02:902210..904519	2302bp
AAT2	AY517491	Q6R311	Chr02:962413..965095	1628 bp

利用已知的染色体定位信息，使用MapChart软件绘制苹果*AAT*基因家族成员的染色体定位图。发现苹果*AAT*家族基因均定位在苹果2号染色体端部，推测*AAT*基因家族成员AAT2与AAT1GS/AAT1RG可能具有串联重复关系。

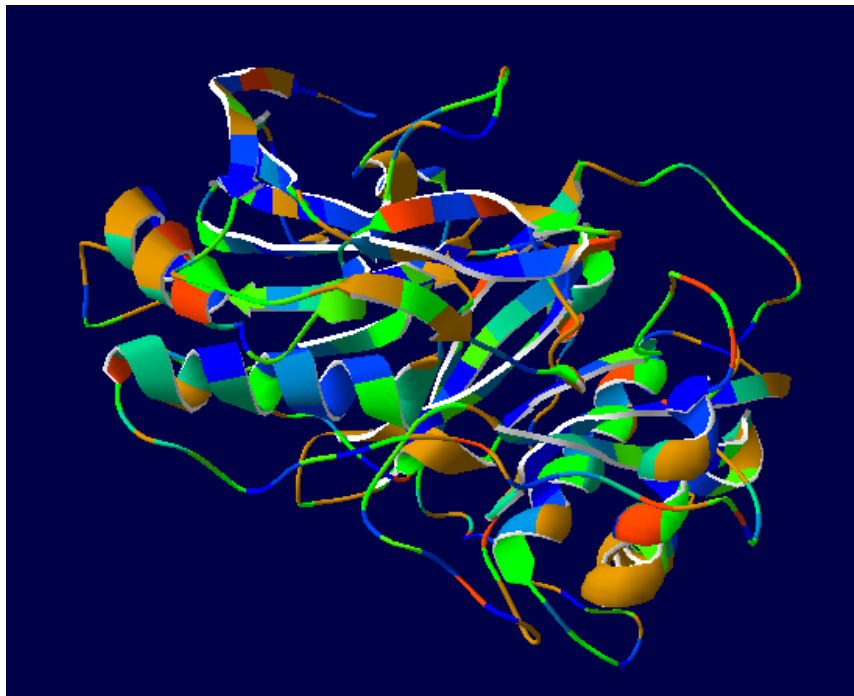


5.AAT蛋白三维结构分析 —— 以AAT1RGA蛋白为例



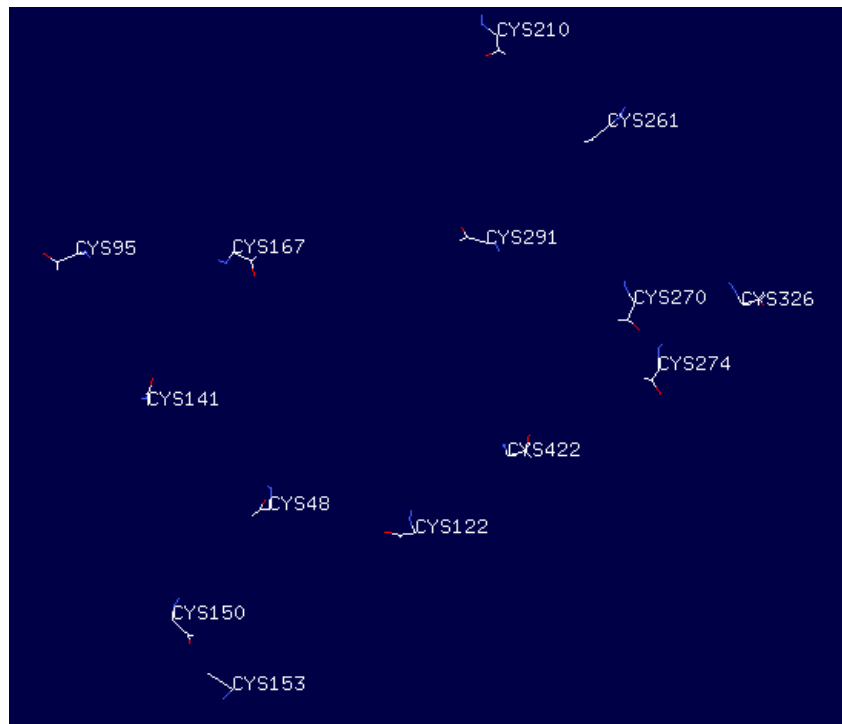
AAT蛋白全长455aa，
属于alpha螺旋和beta折叠
兼有的蛋白质。

5.AAT蛋白三维结构分析 —— 以AAT1RGA蛋白为例



深蓝色代表缬氨酸 (Val)、亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile) 等疏水氨基酸，这些疏水氨基酸分布更倾向于分子内部。

5.AAT蛋白三维结构分析 —— 以AAT1RGA蛋白为例



AAT蛋白有14个半胱氨酸（Cys），可形成7个二硫键，这对稳定其三维构象发挥极大的作用。

6.总结

通过构建系统发生树，我们推测苹果*AAT1*基因和*AAT2*基因是在苹果物种形成后分化产生的。

紧接着，通过对苹果*AAT*基因家族成员进行内含子和外显子作图，我们推断*AAT1-GSC*，*AAT1GSD*，*AAT1RGB*，*AAT1RGC*功能的缺失可能与内含子的插入有关，而*AAT1GSB*的功能缺失可能是序列较短缺少转录或翻译的特定结合序列。

随后，我们绘制了苹果*AAT*基因家族成员的染色体定位图，发现其中成员可能具有串联重复关系。

最后，我们对*AAT*蛋白的三维结构进行了分析，发现14个半胱氨酸对其三维结构的稳定发挥了极大的作用。

Thank you for watching

