

# 油菜中抗寒蛋白的挖掘和结构预测

Exploration and structure prediction of cold tolerance protein in *Brassica napus L.*

汇报人：李孟琼

小组成员：邓四平 丁艺 龚秋菊

# 目录

1

研究背景

2

比对分析

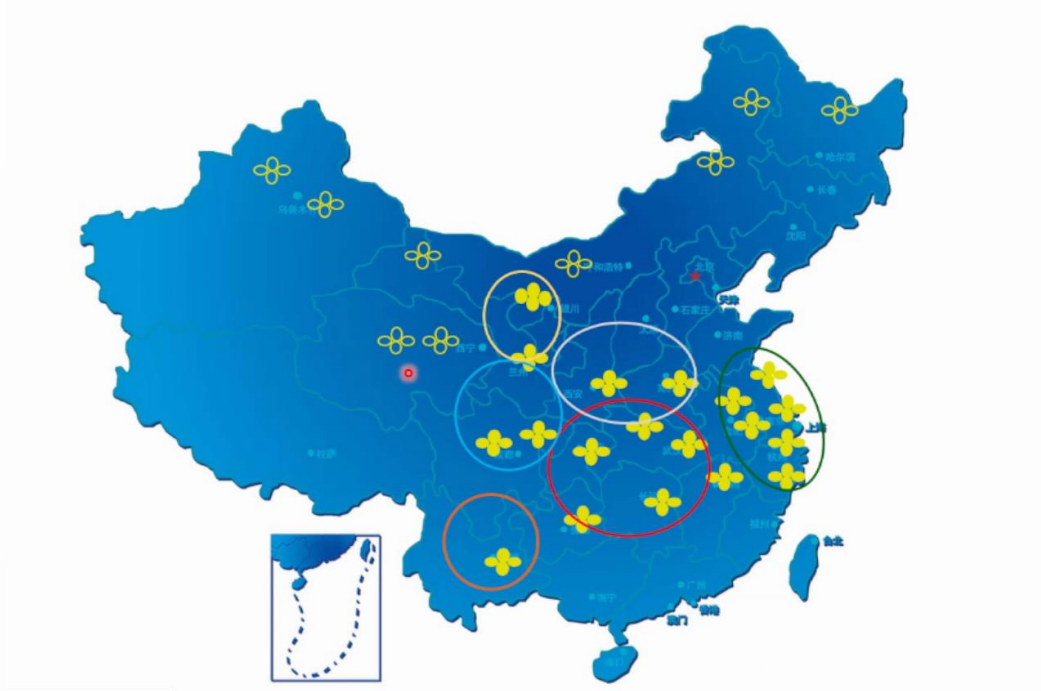
3

蛋白结构预测

4

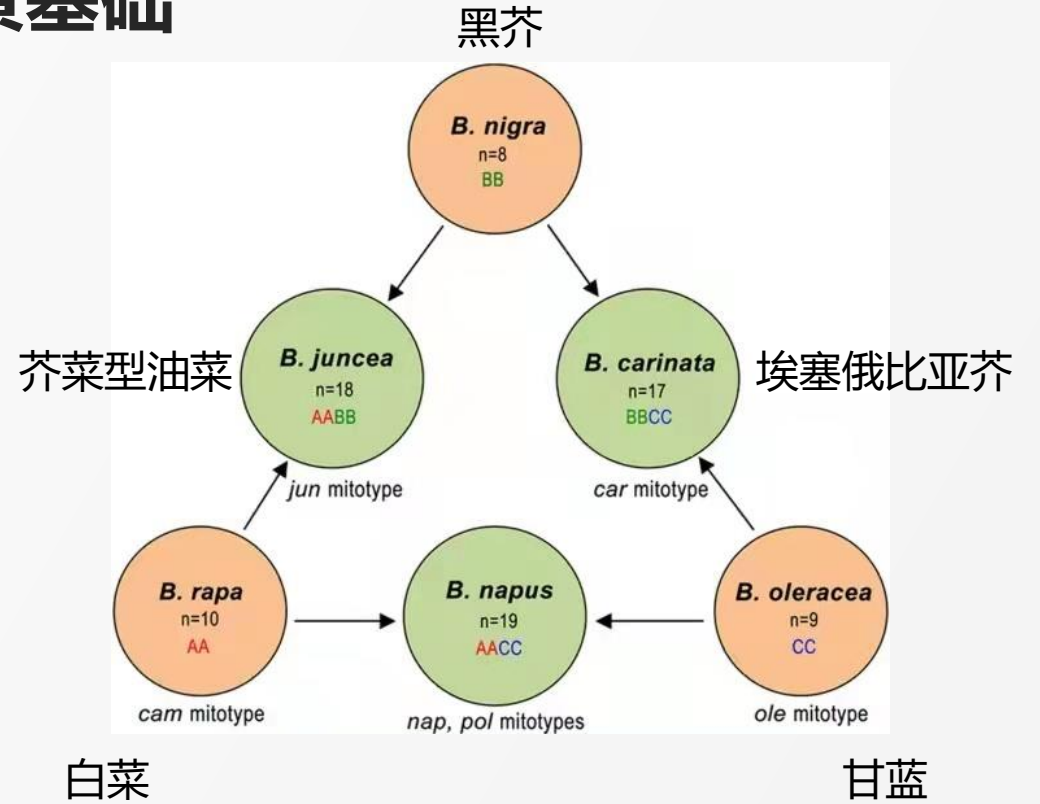
初步实验设计

# 01 研究背景基础



## 地理分布及生态型

- (1) 最早起源于地中海沿岸及欧洲国家，在中国主要分布于长江流域、黄淮以及云贵高原
- (2) 冬性 (Winter type) 半冬性 (Semi-winter type) 春性 (Spring type), 我国最重要是半冬性油菜



## 物种演化历史

由白菜和甘蓝天然杂交而成，异源四倍体，迄今大约7500年历史

# 01 研究背景



## 生长生活习性

(1) 长日照作物，环境温度一般在 $0\sim 23^{\circ}\text{C}$ ，低于 $4^{\circ}\text{C}$ 容易发生冷害



## 抗寒研究手段

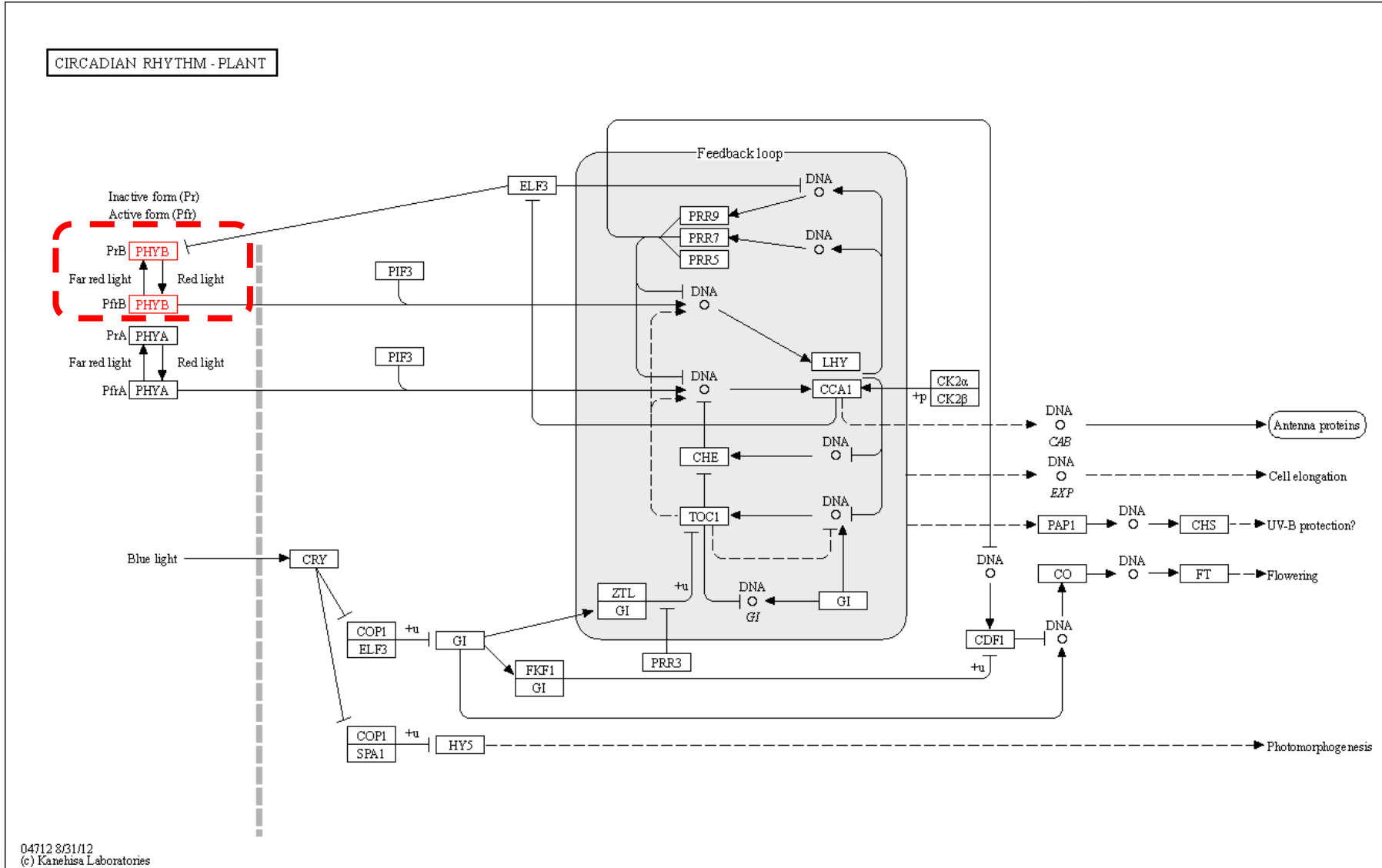
最好的办法是挖掘抗寒基因、对现有品种进行遗传改良

# 01 研究背景基础

## 光敏色素B如何发挥抗寒作用

(1) 光敏色素是在植物体内能够感受红光和远红光的一种光感受器。

(2) PhyB能感知环境温度变化，同时参与植物低温响应，通过调控胁迫应激及生长相关基因的表达正调控植物的抗冻能力。



## 02 序列比对分析

### 目标基因的选定

查阅文献发现拟南芥和水稻中的 Phytochrome B 均在抗寒中发挥作用，因此以 Phytochrome B 作为目标蛋白

蛋白名 Protein Name	序列条目名 Entry Name	登录号 Accession	氨基酸数目 AA	基因名称 Gene Name	物种 Organism
Transcription factor ICE1	ICE1_ARATH	Q9LSE2	494	AT3G26744	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)
GPCR-type G protein COLD1	COLD1_ORYSJ	Q7X7S8	468	Os04g0600800	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i> (Rice)
Cold-responsive protein kinase 1	CRPK1_ARATH	Q93YN1	390	At1g16670	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)
Phytochrome B	PHYB_ARATH	P14713	1172	At2g18790	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)
Phytochrome B	PHYB_ORYSJ	Q10MG9	1171	Os03g0309200	<i>Oryza sativa subsp. japonica</i> (Rice)
Calcineurin B-like protein 1	CNBL1_ARATH	O81445	213	At4g17615	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)



## 02 序列比对分析

### 多物种同源基因的挖掘

马铃薯、烟草、大豆中已鉴定的Phytochrome B蛋白

物种 Organism	序列条目名 Entry Name	登录号 Accession	氨基酸数目 AA
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Mouse-ear cress)	PHYB_ARATH	P14713	1172
<i>Solanum tuberosum</i> (Potato)	PHYB_SOLTU	P34094	1130
<i>Nicotiana tabacum</i> (Common tobacco)	PHYB_TOBAC	P29130	1132
<i>Glycine max</i> (Soybean) ( <i>Glycine hispida</i> )	PHYB_SOYBN	P42499	1156
<i>Oryza sativa subsp. japonica</i> (Rice)	PHYB_ORYSJ	Q10MG9	1171

## 02 序列比对分析

### 甘蓝型油菜中同源基因的挖掘

NCBI的在线BlastP,用已知的Phytochrome B蛋白序列比对到甘蓝型油菜中相似性在70%以上的序列，最终结果选择它们的**7条共有序列**

登录号 Accession	氨基酸数量 AA	基因 Gene	mRNA Accession mRNA序列登录号	BP 碱基对	CDS 编码区
CAF2100974	1169	LOC106452081	XM_022719638	4089	349-3858
KAH0839324	1169	LOC106452081	XM_022719638	4098	349-3858
KAH0880597	1191	LOC106400775	XM_022703334	4128	316-3825
KAH0927091	1170	LOC106452081	XM_022719638	4098	349-3858
XP_022555281	1155	LOC106358161	XM_022699560	4111	355-3822
XP_022559055	1169	LOC106400775	XM_022703334	4128	316-3825
XP_022575358	1169	LOC106452081	XM_022719638	4098	349-3858



## 02 序列比对分析

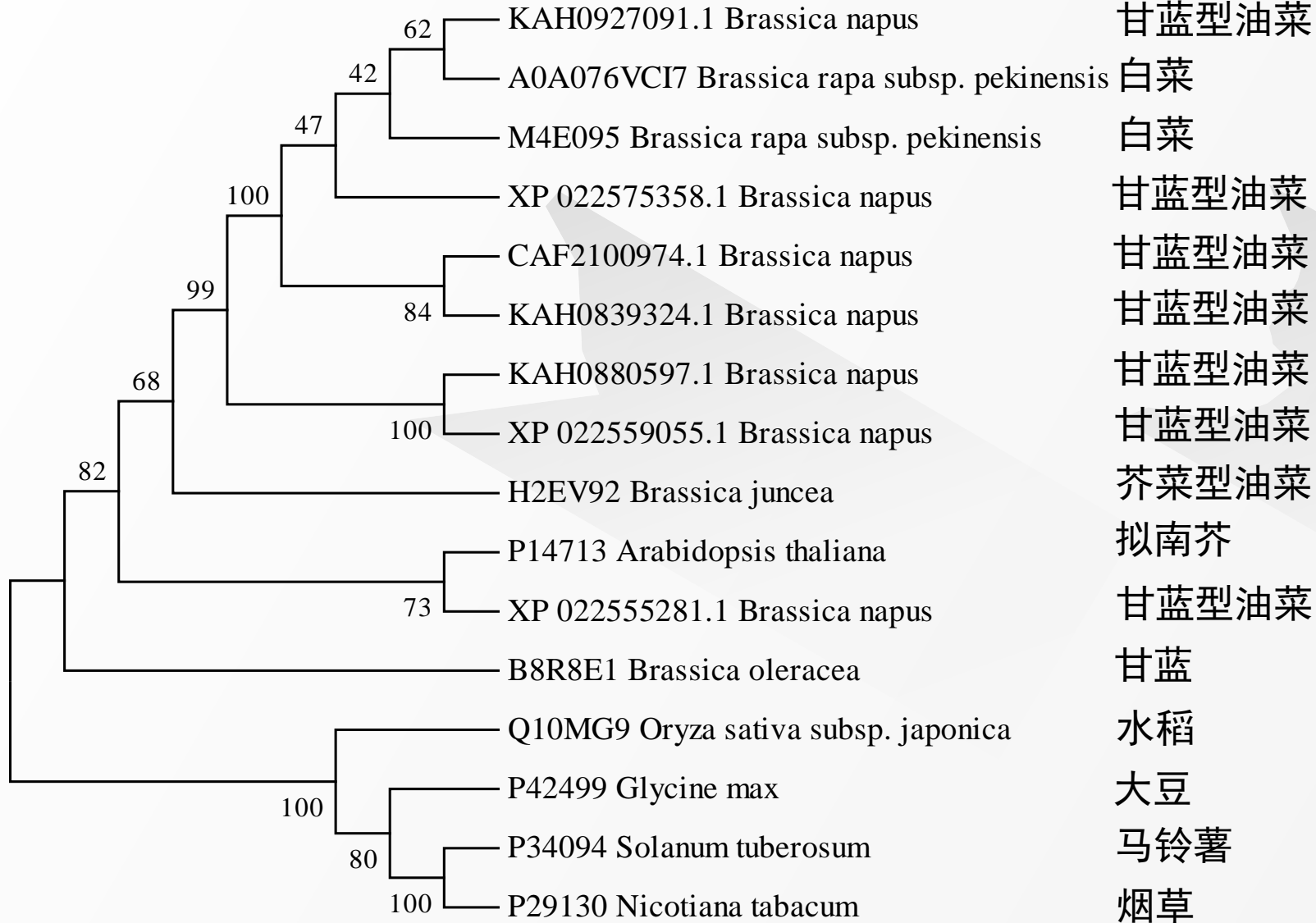
### 近缘物种同源基因的挖掘

- 使用UniProt高级检索，设置“Gene name[GN]:PHYB” AND “Organism[OS]:甘蓝型油菜近缘物种名”；
- 4条序列，均为Unreviewed，收录在TrEMBL数据库中

物种 Organism	序列条目名 Entry Name	登录号 Accession	长度 AA
<i>Brassica oleracea</i> (Wild cabbage)	B8R8E1_BRAOL	B8R8E1	653
<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> (Chinese cabbage) ( <i>Brassica pekinensis</i> )	M4E095_BRARP	M4E095	1192
<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> (Chinese cabbage) ( <i>Brassica pekinensis</i> )	A0A076VCI7_BRARP	A0A076VCI7	1193
<i>Brassica juncea</i>	H2EV92_BRAJU	H2EV92	514

# 02 序列比对分析

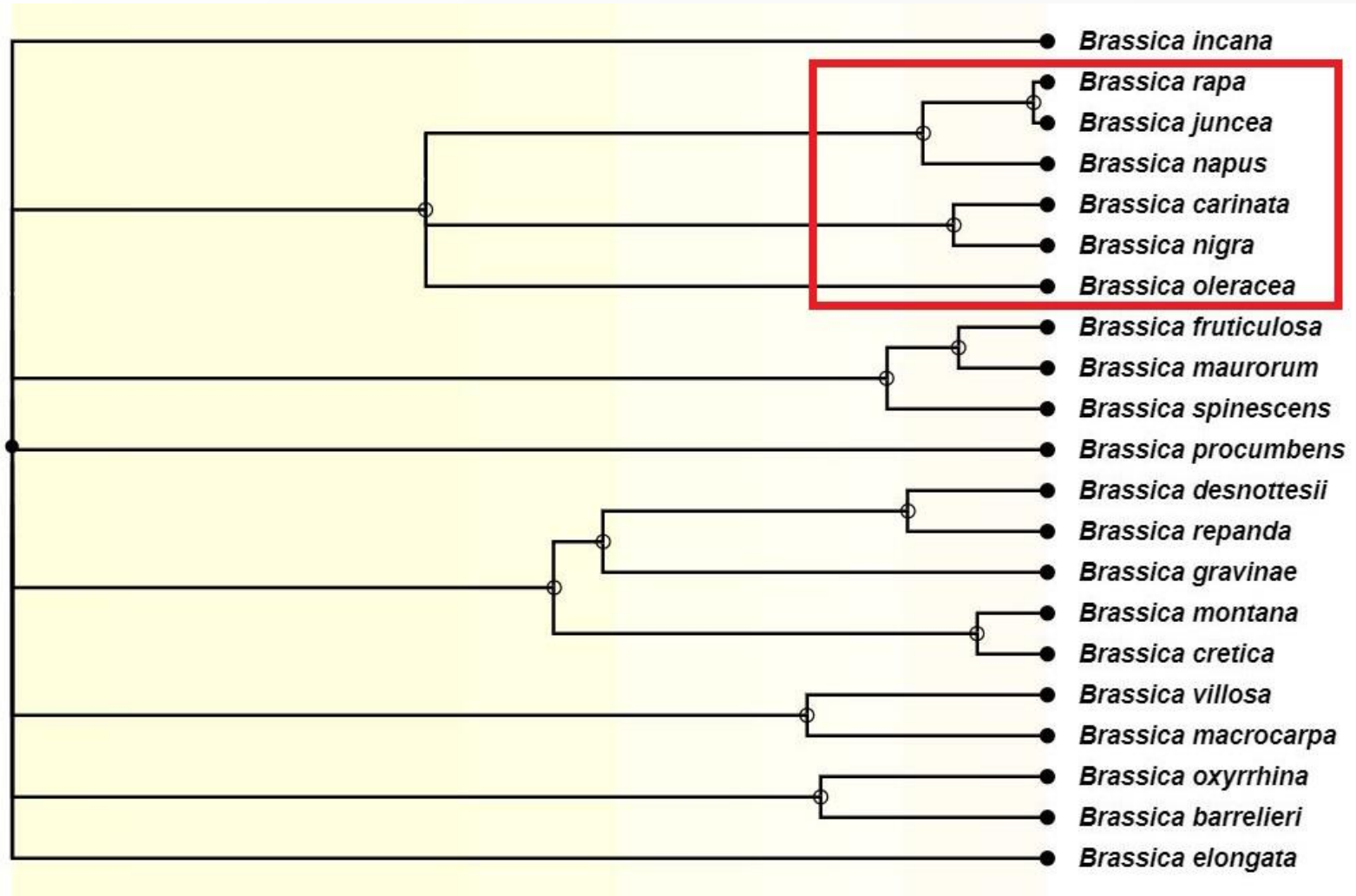
## MEGA进化树构建



- 来自不同物种的9条蛋白序列，以及预测的甘蓝型油菜的7条蛋白序列
- 使用MEGA7→Align by ClustalW→Phylogenetic Analysis→邻接法（Neighbor-Joining）
- Bootstrap method，选择自举法（Bootstrap）1000次作为稳定性检验，其余均采用默认值

## 02 序列比对分析

### Timetree进化树搜索

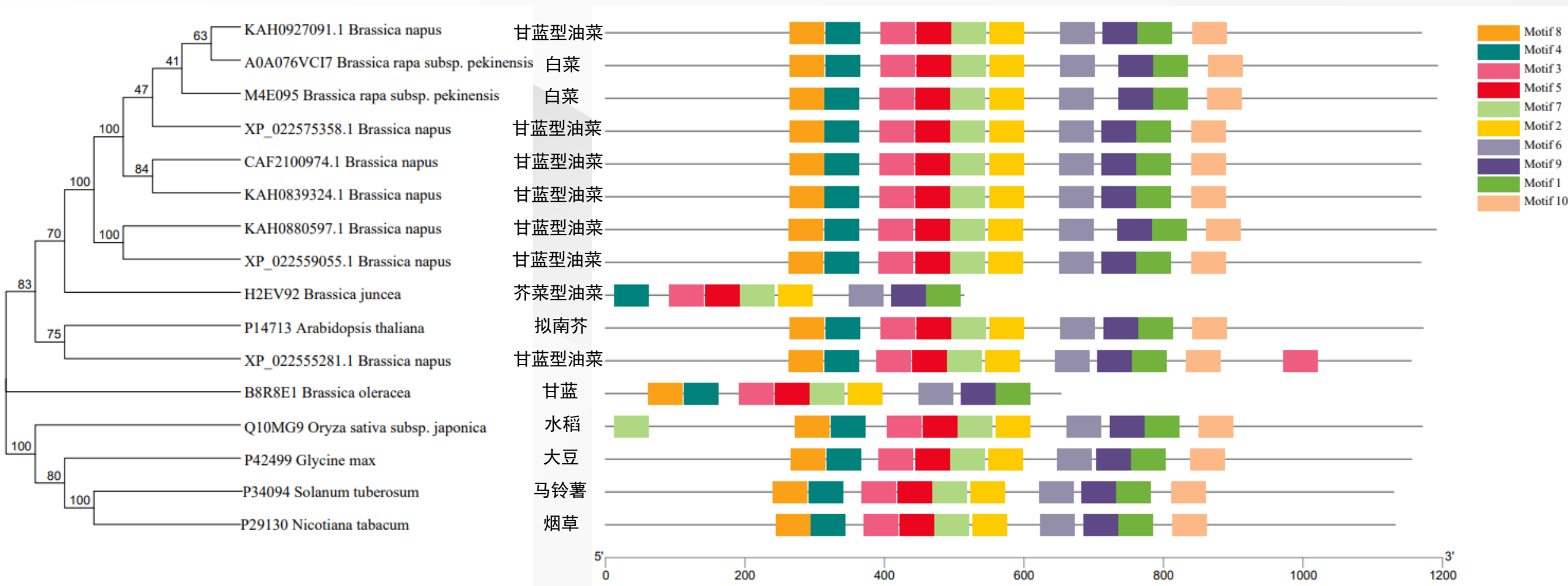


- 搜索Brassica(芸薹属) 获得结果
- 六个物种间进化关系与MEGA进化树结果一致

# 02 序列比对分析

## motif预测结果

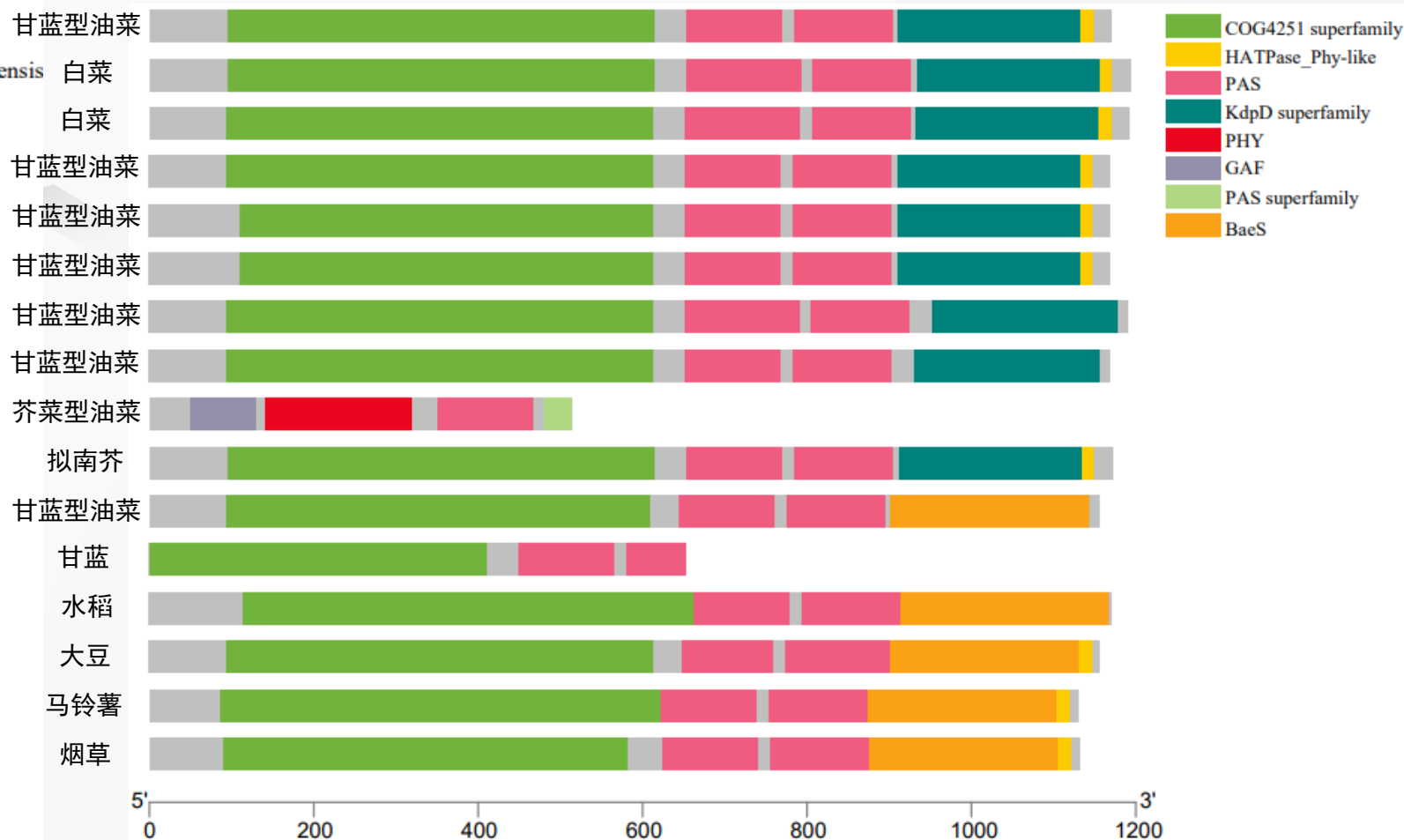
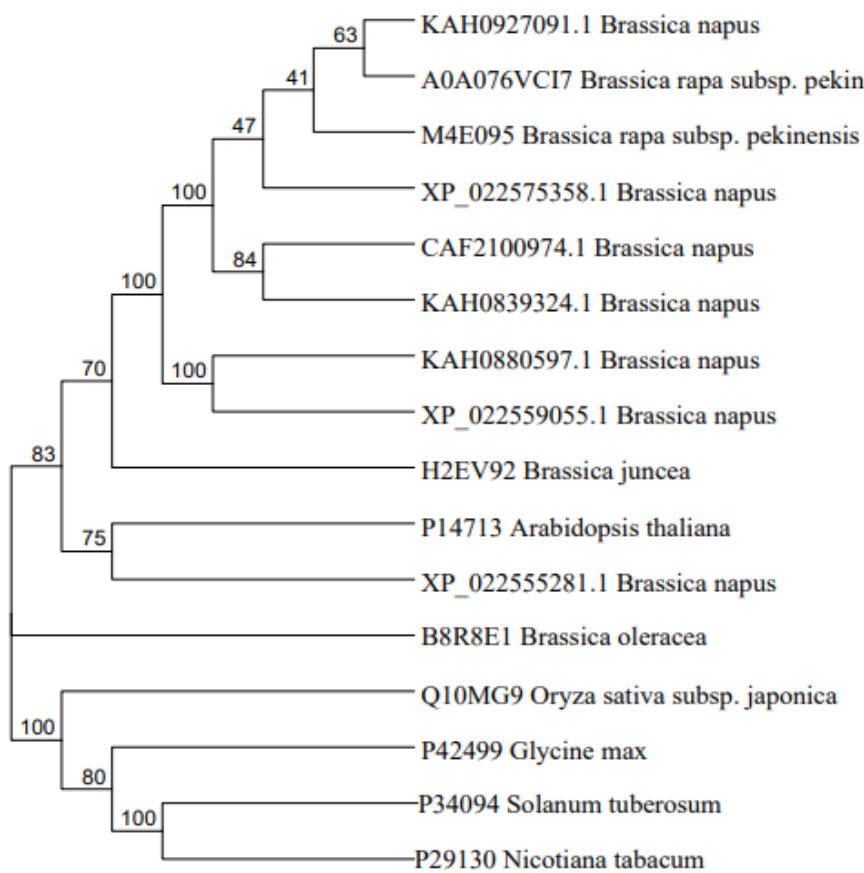
大部分motif的数量、排列顺序和分布区段高度相似



# 02 序列比对分析

## Domain预测结果

前三个Domain区域高度相似



使用工具: NCBI Batch Web CD-Search Tool

## 03 蛋白结构预测

### 不同物种来源的光敏色素蛋白信息

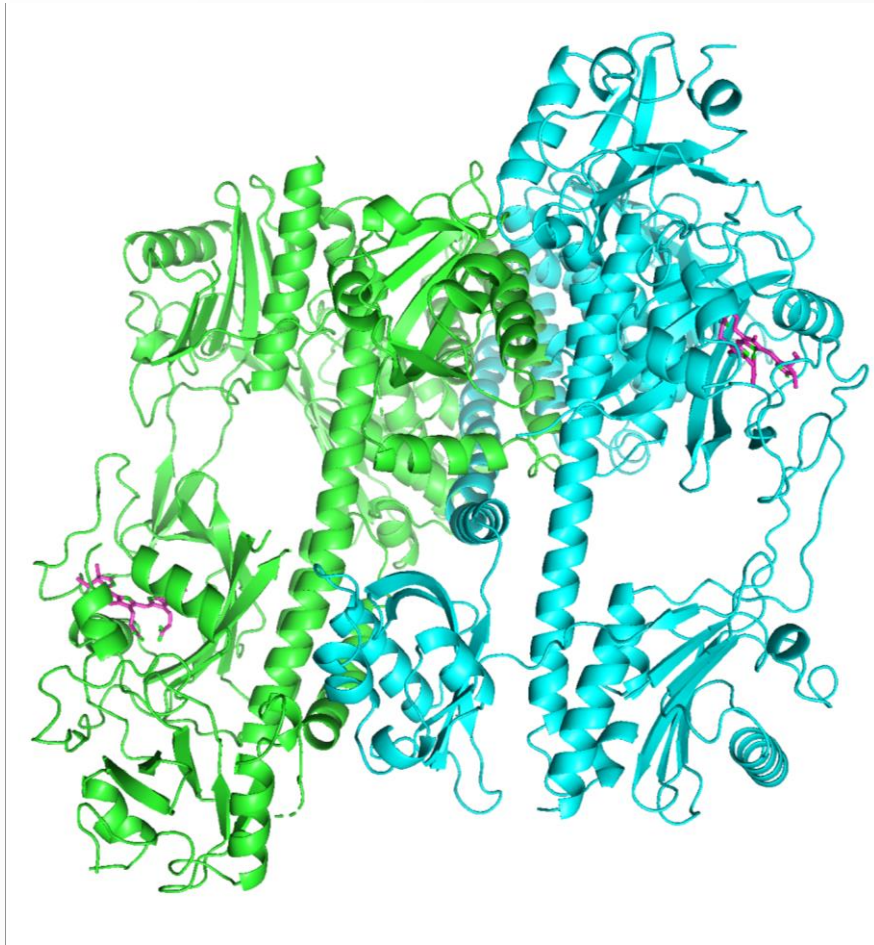
物种Organism	审阅状态	Entry Name 序列条目名	Accession 登录号	氨基酸长 度	有无晶体 结构	Swiss-model 预测结构	alphaFold2 预测结构
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	已审阅	PHYB_ARATH	P14713	1172	有	3	有
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	已审阅	PHYB_SOLTU	P34094	1130	无	5	有
烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	已审阅	PHYB_TOBAC	P29130	1132	无	4	有
大豆 <i>Glycine max</i>	已审阅	PHYB_SOYBN	P42499	1156	无	5	有
水稻 <i>Oryza sativa subsp</i>	已审阅	PHYB_ORYSJ	Q10MG9	1171	无	4	有
甘蓝 <i>Brassica oleracea</i>	未审阅	B8R8E1_BRAOL	B8R8E1	653	无	无	无
白菜 <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	未审阅	M4E095_BRARP	M4E095	1192	无	无	无
白菜 <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	未审阅	A0A076VCI7_BRARP	A0A076VCI7	1193	无	无	无
芥菜型油菜 <i>Brassica juncea</i>	未审阅	H2EV92_BRAJU	H2EV92	514	无	无	无

➤ 确定拟南芥来源的光敏色素蛋白 (PHYB\_ARATH) 为参考蛋白



## 03 蛋白结构预测

### 拟南芥光敏色素蛋白7rzw结构



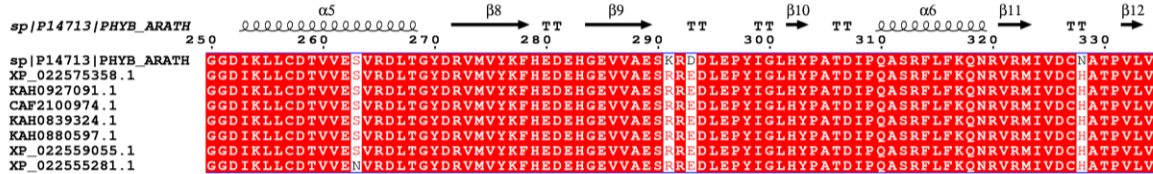
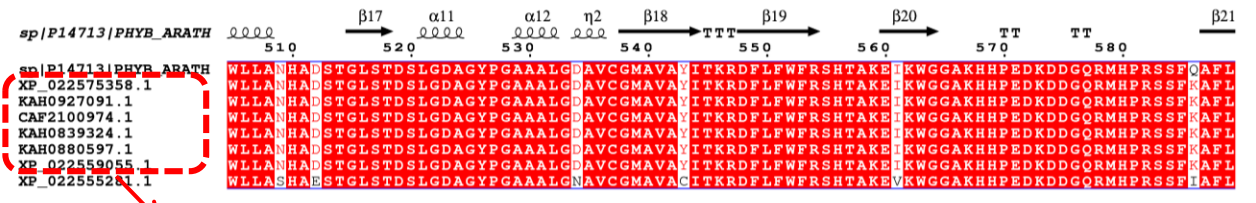
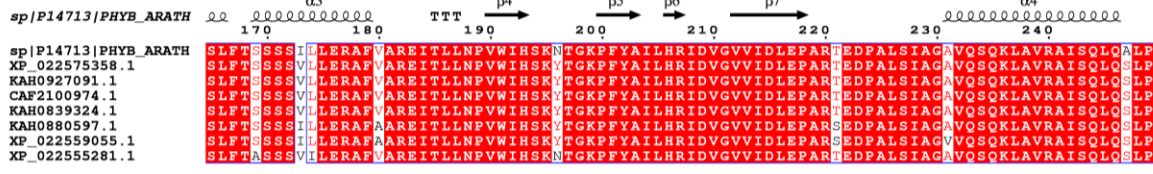
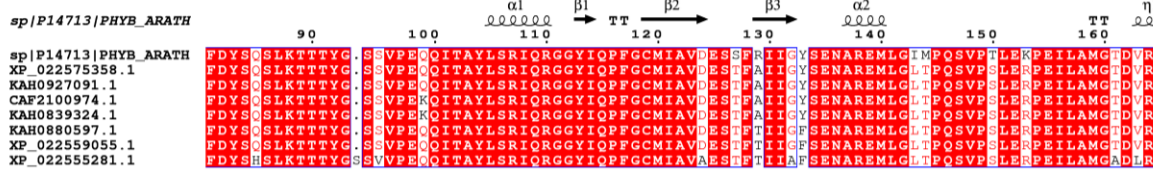
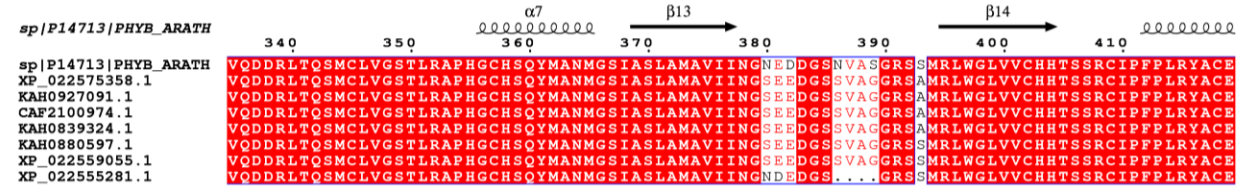
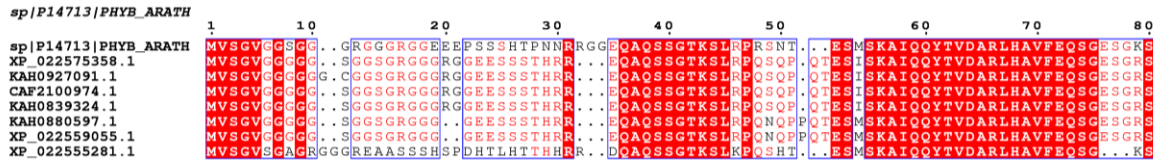
7rzw二聚体结构



7rzw单体结构

# 03 蛋白结构预测

## 拟南芥光敏色素与7个甘蓝油菜同源蛋白多序列比对



六条蛋白序列与拟南芥光敏色素蛋白极度保守

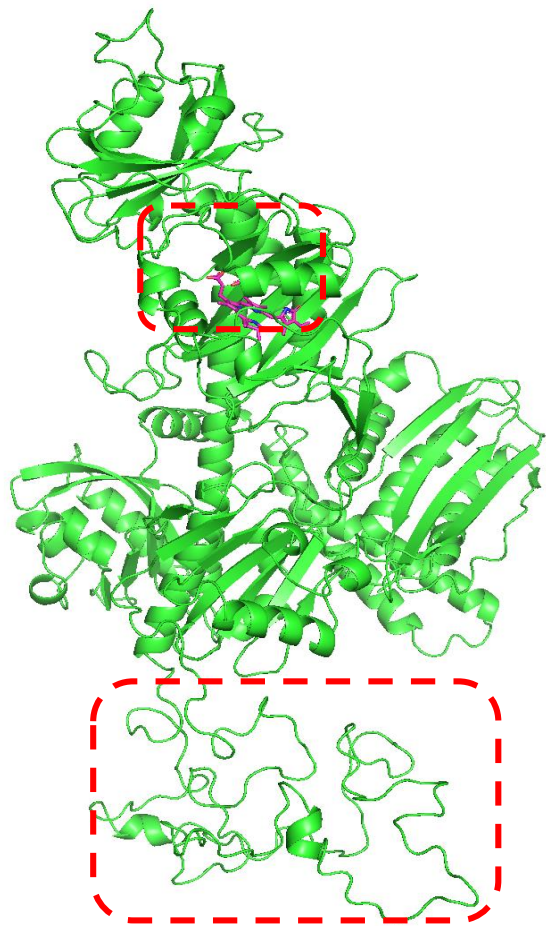
ESPrict参数

Secondary structure depiction: 7rzw  
 Similarity coloring scheme: %strict  
 Global score :0.7



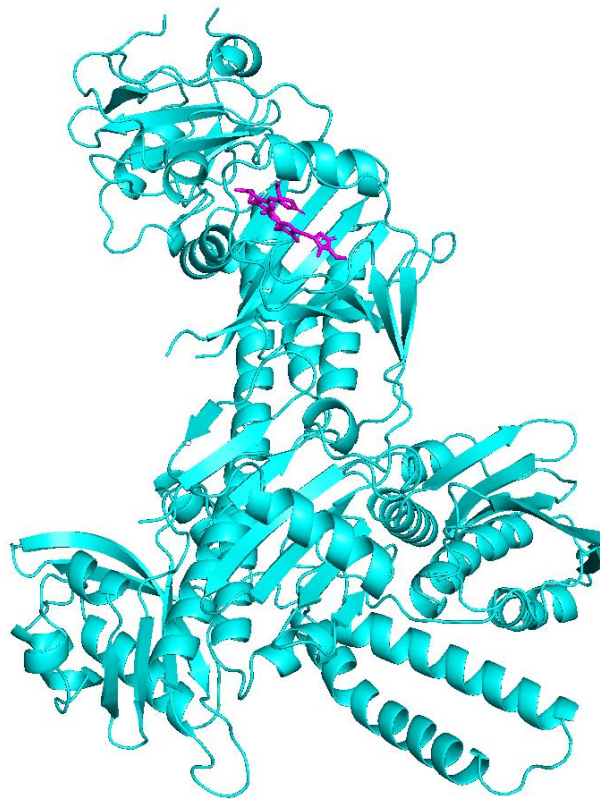
# 03 蛋白结构预测

## 预测甘蓝油菜同源的蛋白的晶体结构

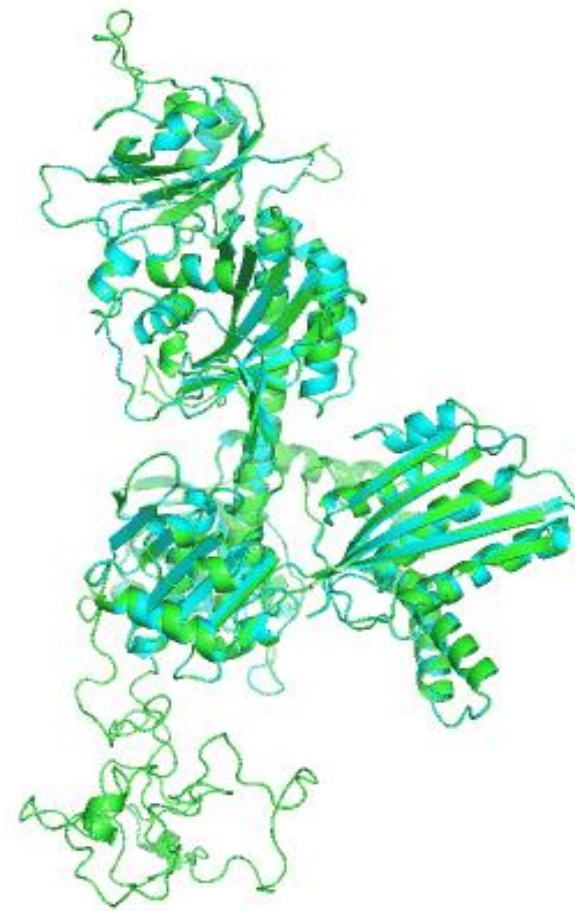


➤ 甘蓝油菜同源蛋白预测结构

- N端部分结构域存在新预测的loop区
- 与光敏色素结合的结构域高度保守



➤ 拟南芥7rzw



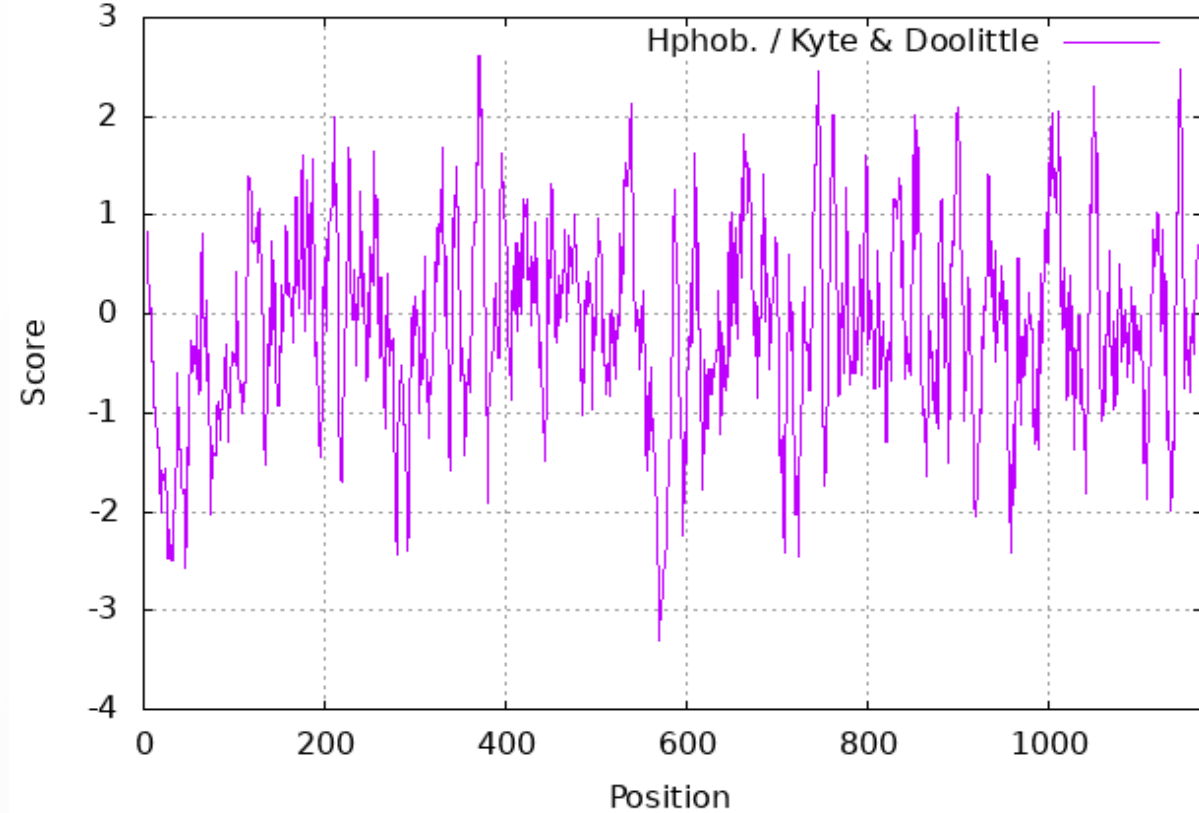
➤ Alignment

- 两者结构高度相似（除了N端部分结构域）
- 猜测两者具有相同的抗寒功能

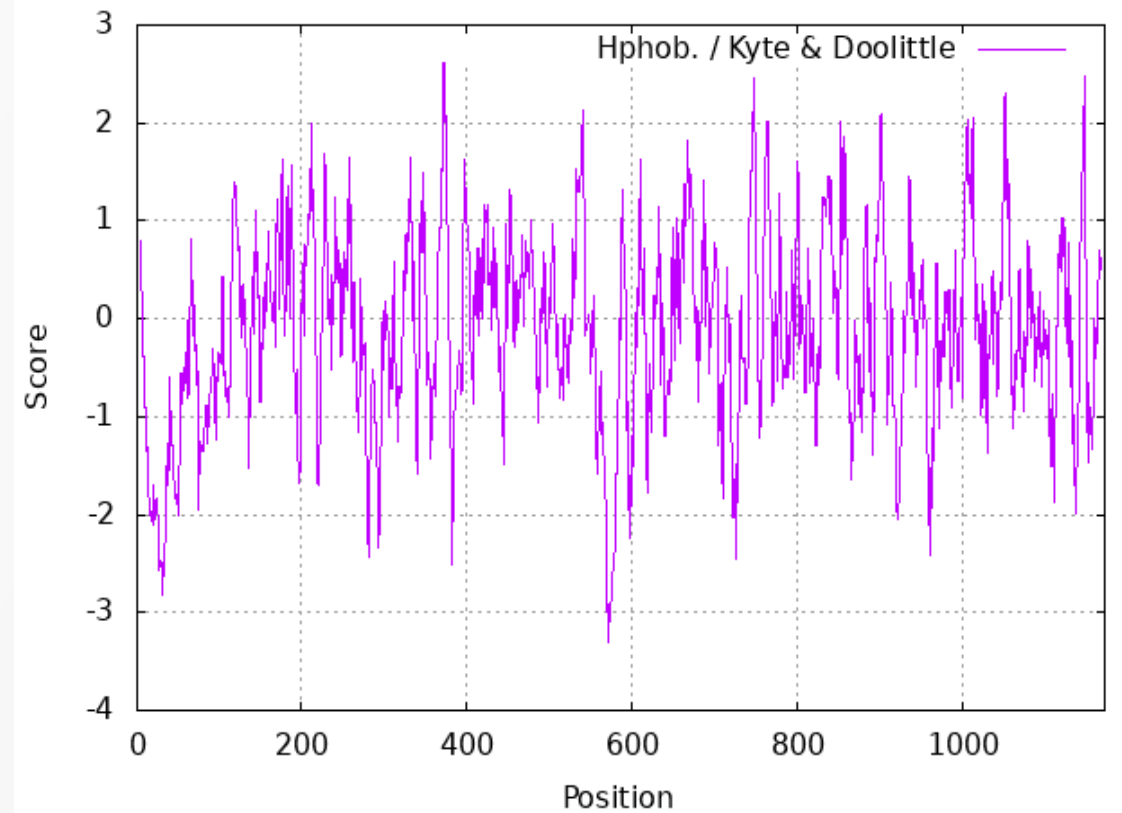
使用工具：PyMOL

# 03 蛋白结构预测

## 预测甘蓝型油菜同源蛋白的性质



- 甘蓝油菜同源蛋白亲水性图
- pI:5.69



- 拟南芥光敏色素亲水性图
- pI:5.81

两者拥有相似的亲水性和等电点

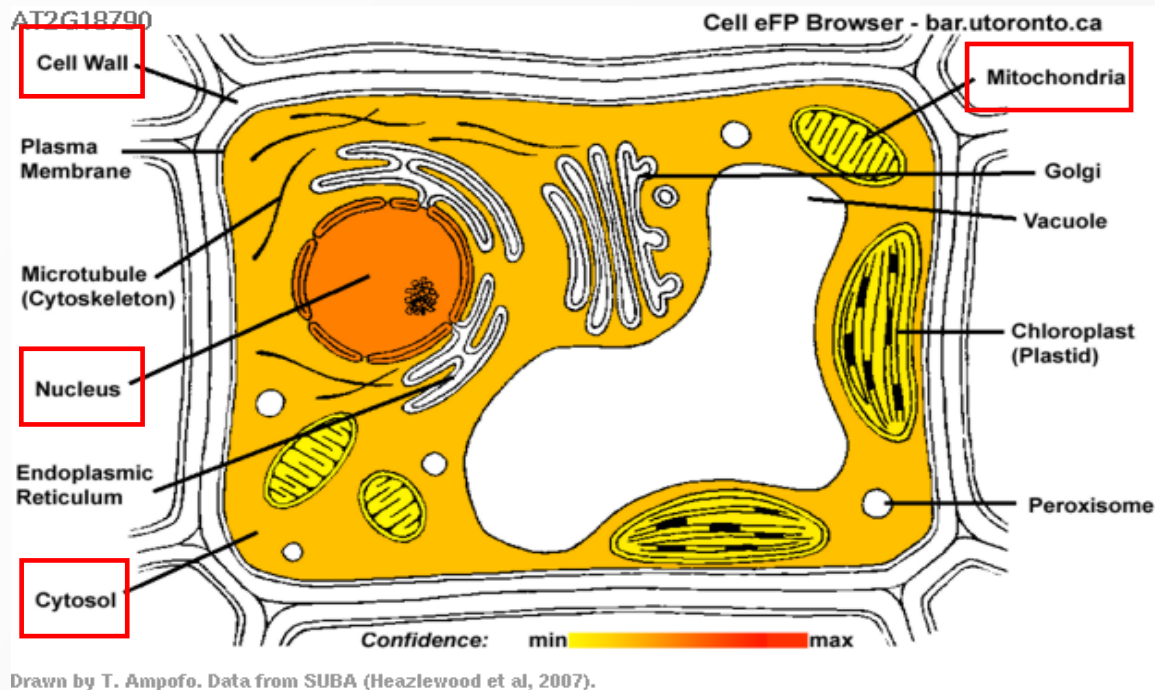
使用工具: ProtScale

# 04 初步实验设计

## 亚细胞定位预测

蛋白名	预测信息
CAF2100974.1	nucl: 4, plas: 4, chlo: 3, cyto: 1, vacu: 1, E.R.: 1
KAH0839324.1	nucl: 4, plas: 4, chlo: 3, cyto: 1, vacu: 1, E.R.: 1
KAH0880597.1	nucl: 5, plas: 3, chlo: 2, cyto: 2, E.R.: 1, golg: 1
KAH0927091.1	nucl: 5, chlo: 3, cyto: 2, plas: 2, E.R.: 1, pero: 1
XP_022555281.1	cyto: 7, nucl: 4, chlo: 1, vacu: 1, cysk: 1
XP_022559055.1	nucl: 5, plas: 3, chlo: 2, cyto: 2, E.R.: 1, golg: 1
XP_022575358.1	nucl: 4, plas: 4, chlo: 3, cyto: 1, vacu: 1, E.R.: 1

根据拟南芥的亚细胞定位实验结果，用在线网站画出在甘蓝型油菜中的亚细胞定位图，结果与文献报道中的的拟南芥实验结果相一致，和文献中光敏色素B主要分布在细胞质，黑暗中进入细胞核的表述相一致。



拟南芥定位图:BAR  
预测工具: 在线网站WoLF PSORT

## 04 初步实验设计

### 跨膜结构预测

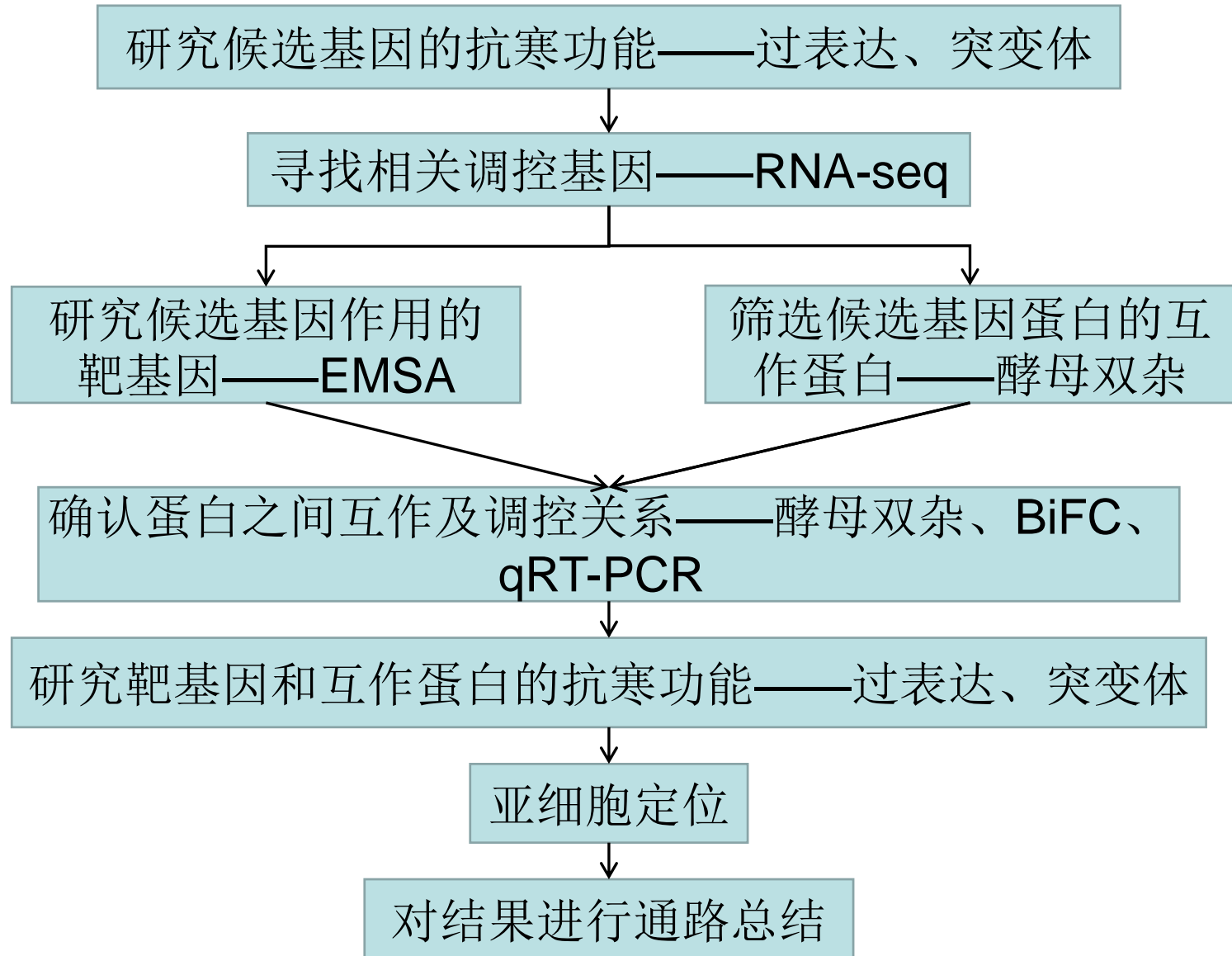
蛋白名	预测信息
CAF2100974.1	PredHel=0
KAH0839324.1	PredHel=0
KAH0880597.1	PredHel=0
KAH0927091.1	PredHel=0
XP_022555281.1	PredHel=0
XP_022559055.1	PredHel=0
XP_022575358.1	PredHel=0

7条候选蛋白预测均无跨膜结构，但是亚细胞定位预测该蛋白定位在膜上分数较高，推测在甘蓝型油菜中光敏色素B蛋白可能间接结合在膜上

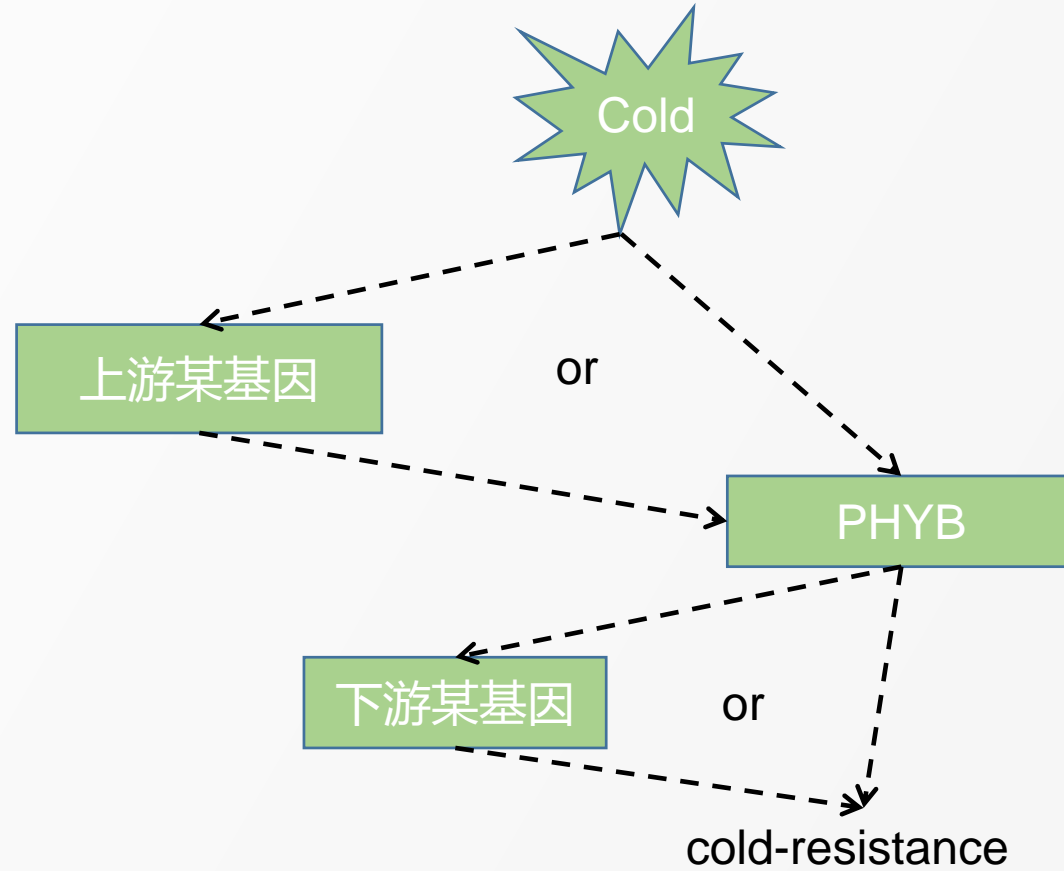
使用工具：在线网站TMHMM



# 04 初步实验设计



## 04 初步实验设计



THANKS