

Sequence and structure analysis of a carotenoid isomerase in rice

水稻类胡萝卜素异构酶的序列和结构分析

3G06

主讲人：李沛远（基因定位，序列分析与功能预测，文献查证）

组员：高维崧、金文涌、孙莹（蛋白质序列分析，结构预测，文献查证）

CATALOG

- 1 Background
- 2 Map-based cloning
- 3 Sequence analyse
- 4 Structure prediction

background

大田生长突变体 (2020F)

- 多分蘖
- 矮秆

品种	株高	分蘖
VP-3	76.5	3
	75	4
	78	6
	88	4
	75	4
	71	11
	71	3
	90	3
	76	5
	63	4
VM-132	38	21
	39	21
	36.5	25
	39	32
	43	23
	36	21
	39.5	18

Map-based cloning and precise positioning

Chromosome 11 21.2M

...

CDS (1761bp)

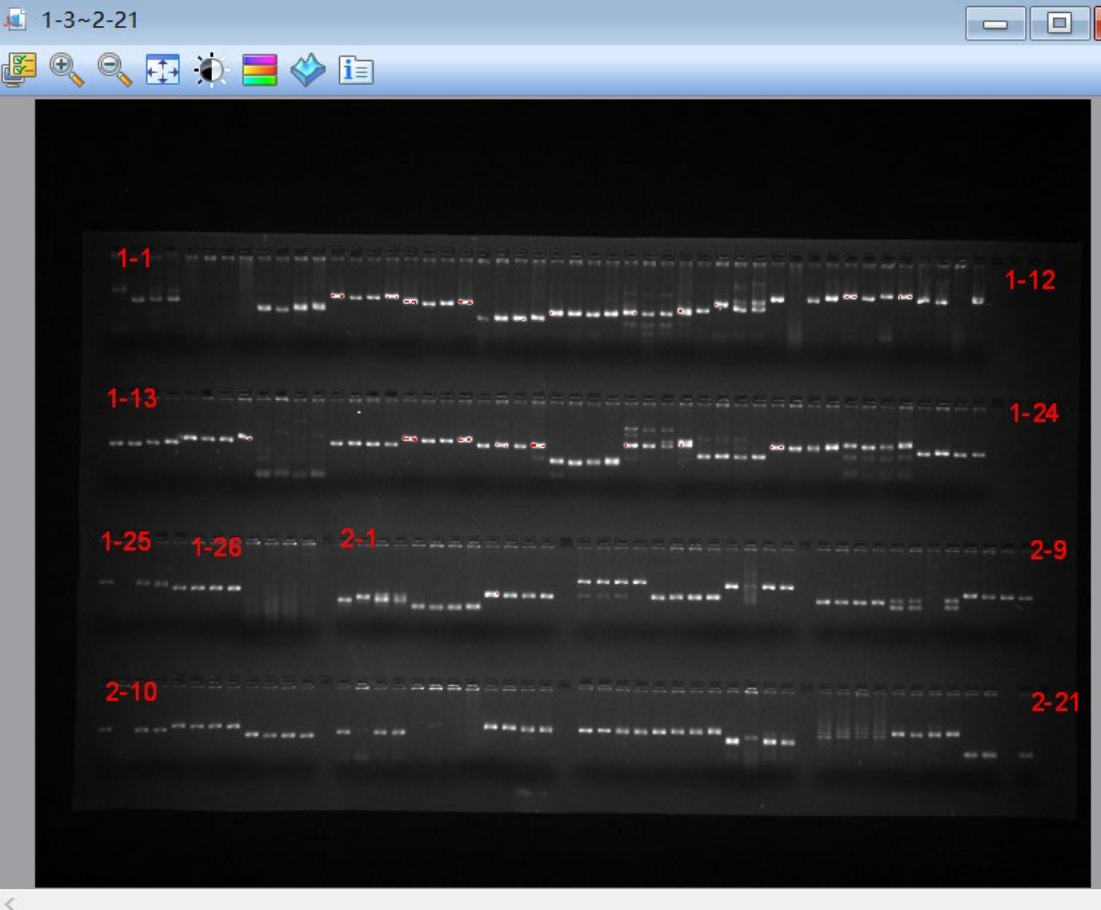
Map-based cloning and precise positioning

Step 1: 构建群体, 获得群体dna

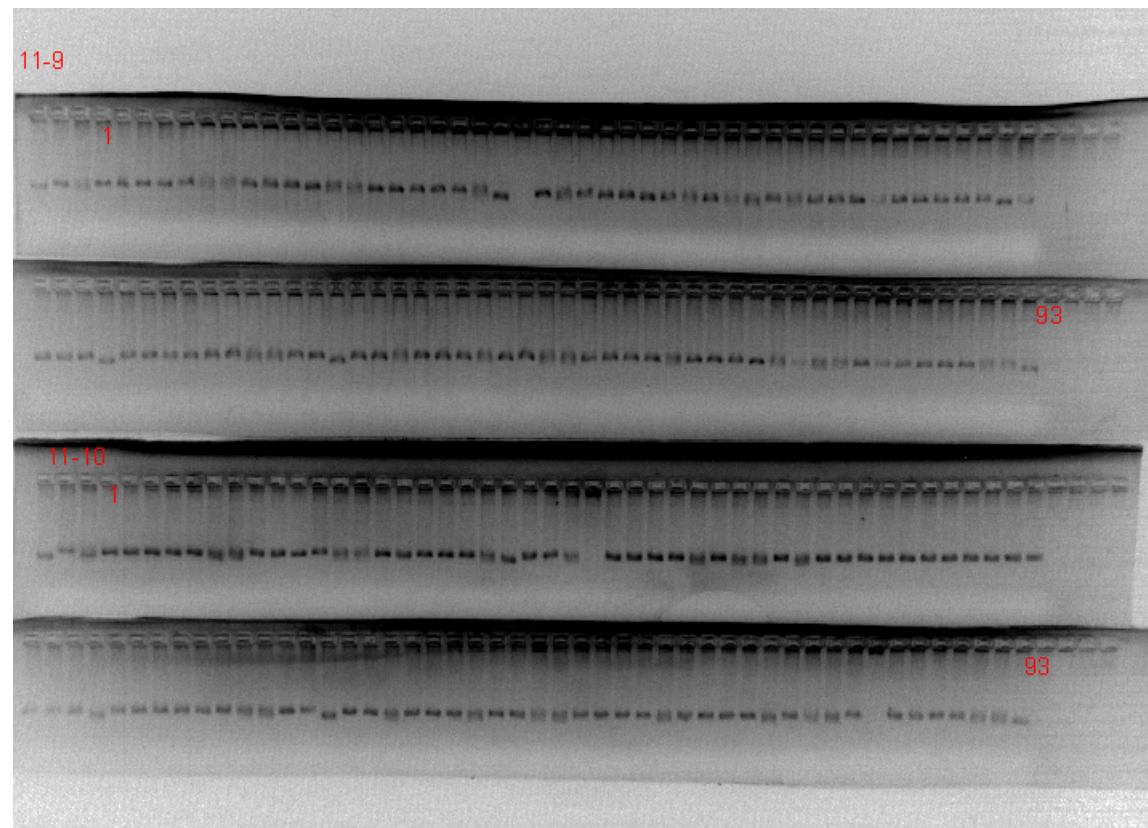
Step 2: 使用公用引物进行粗定位 (12条染色体上平均分布的可靠引物)

Step 3: 根据粗定位的结果确定可能的区间, 在区间内设计引物 (使用primer 3)

检索出两个基因组 (籼稻和粳稻) 染色体序列上的区间两边的引物, 在其中选择一定长度的序列, 和参考基因组进行序列比对, 寻找可用的indel序列, 复制进primer3网站进行引物设计, 每个位点要取多条引物



Step 2: 使用公用引物进行粗定位 (12条染色体上平均分布的可靠引物) 父本 母本 f1 混池



Step 3: 根据粗定位的结果确定可能的区间, 在区间内设计引物 (使用primer 3)

Step 3: 检索出两个基因组（籼稻和粳稻）染色体序列上的区间两边的引物，在其中选择一定长度的序列，和参考基因组进行序列比对，寻找可用的indel序列，复制进primer3网站进行引物设计，每个位点要取多条引物，所有引物都需要验证多态性

after 31-24 9311	14/8/2020 下午3:19	EditSeq DNA Se...	395 KB
after 31-24 cj06	14/8/2020 下午3:22	EditSeq DNA Se...	396 KB
after 31-26 9311	14/8/2020 下午4:46	EditSeq DNA Se...	399 KB
after 31-26 cj06	14/8/2020 下午4:50	EditSeq DNA Se...	411 KB

Lasergene系列软件，对比使用megalign

中间形成一定长度的空缺，上下游序列即有可能产生indel标记，将序列复制进primer3网站，选择参数即可



Step 4: 逐步逼近, 精细定位 (计算交换律推测可能的位置)

31=11 ▾	31=14 ▾	▾	Zebra2 ▾	31=32 ▾
20,329,233	20,419,709		21.38M	23226248

Chromosome 11 21.2M

...

CDS (1761bp)

使用软件EditSeq进行翻译

Molecular Weight 63543.40 Daltons

586 Amino Acids

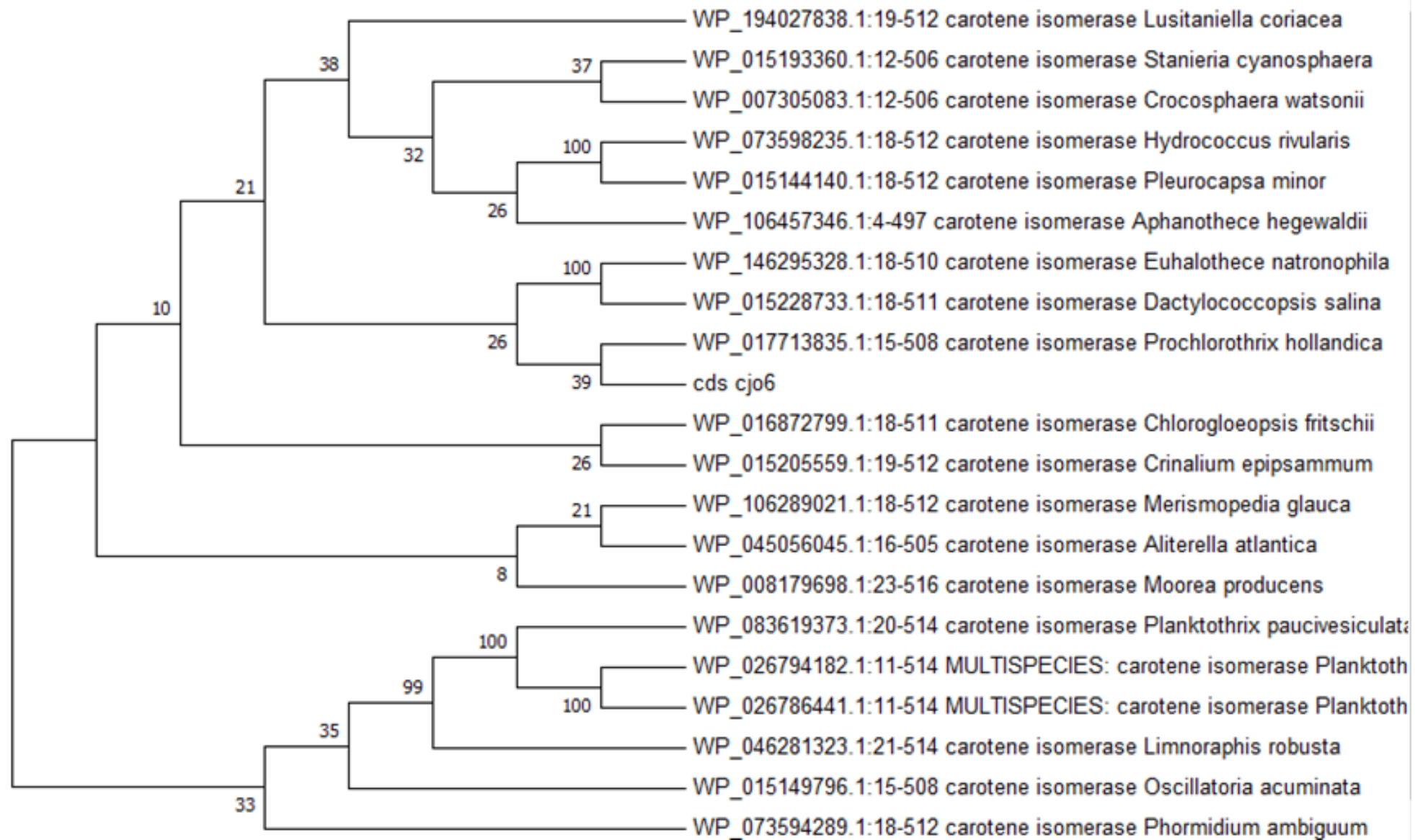
62 Strongly Basic(+) Amino Acids (K,R)

66 Strongly Acidic(-) Amino Acids (D,E)

229 Hydrophobic Amino Acids (A,I,L,F,W,V)

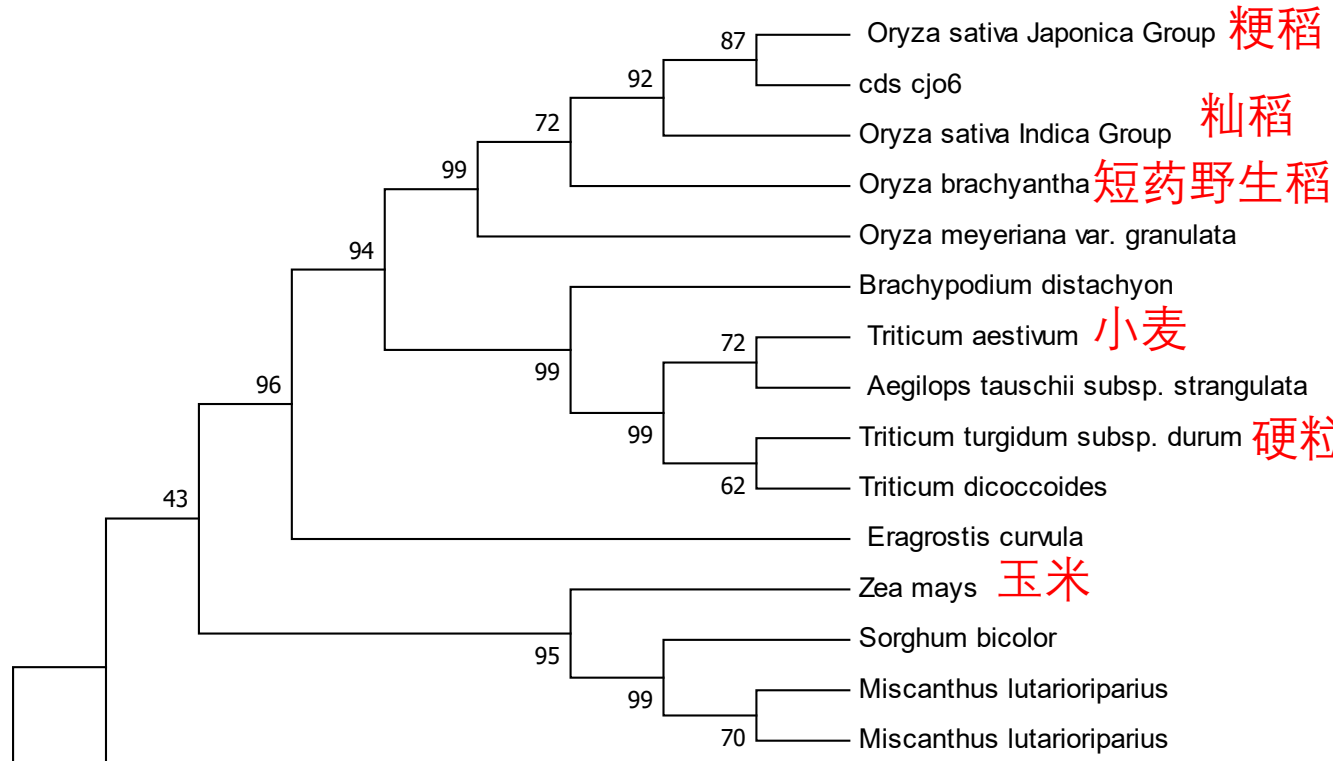
115 Polar Amino Acids (N,C,Q,S,T,Y)

- 进行blastp, 在数据库中检出覆盖率大于60%的序列超过一百条, 相似度在60%以上的序列共有58条。



- 禾本科无结果，更换数据库。
- 检索到两条粳稻类胡萝卜素异构酶序列，相似度为100%

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	carotenoid isomerase, putative, expressed [Oryza sativa Japonica Group]	Oryza sativa Japonica Group	1201	1201	99%	0.0	100.00%	586	ABA94396.2
<input checked="" type="checkbox"/>	prolycopene isomerase 1, chloroplastic [Oryza sativa Japonica Group]	Oryza sativa Japonica Group	1199	1199	99%	0.0	100.00%	641	XP_015617022.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hypothetical protein Os1_35549 [Oryza sativa Indica Group]	Oryza sativa Indica Group	1163	1163	99%	0.0	93.25%	620	EEC68393.1
<input checked="" type="checkbox"/>	prolycopene isomerase, chloroplastic [Oryza brachyantha]	Oryza brachyantha	1065	1065	96%	0.0	92.32%	584	XP_006663539.2
<input checked="" type="checkbox"/>	prolycopene isomerase, chloroplastic isoform X1 [Brachypodium distachyon]	Brachypodium distachyon	1039	1039	99%	0.0	87.71%	591	XP_003561798.1

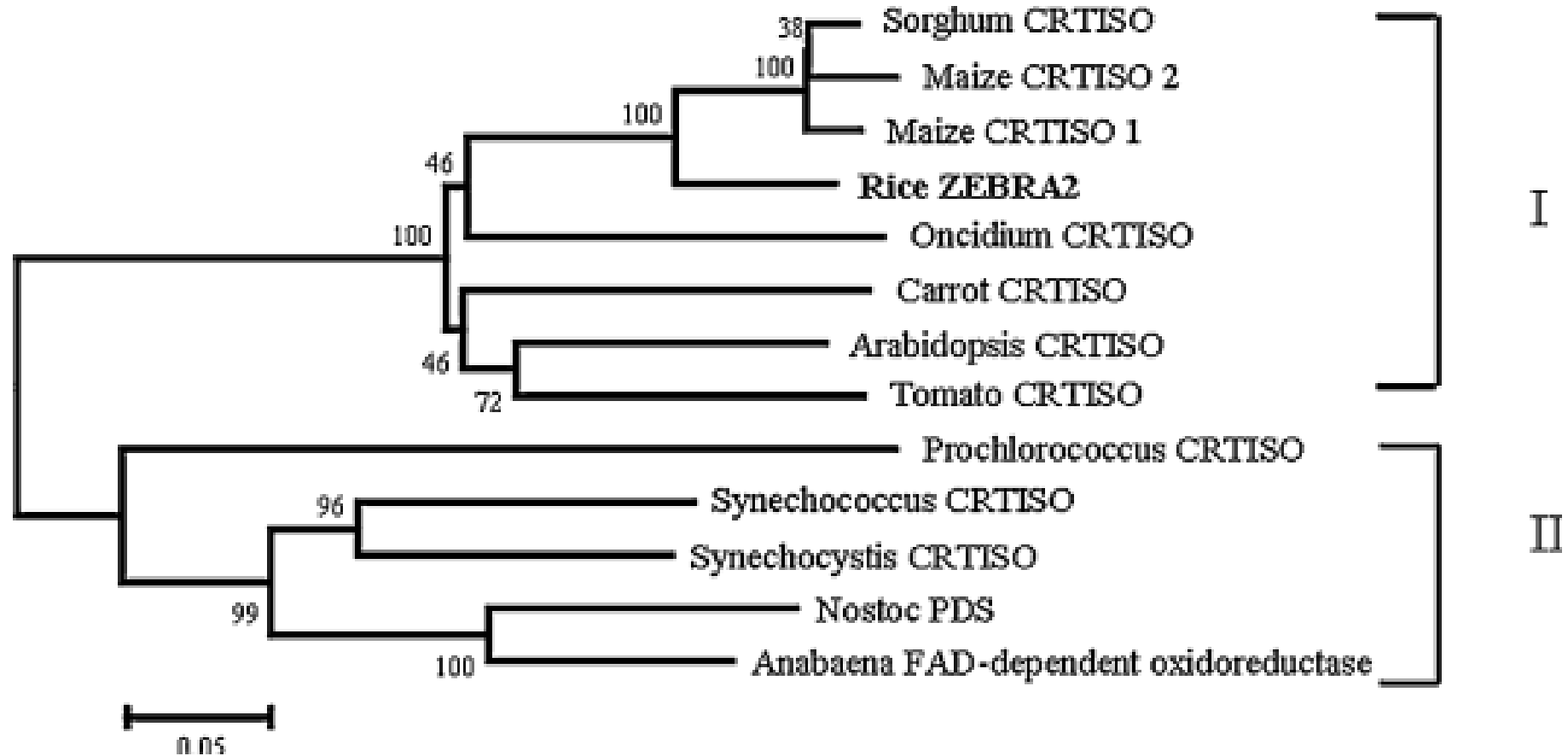


这是根据blastp结果构建的禾本科crtiso进化树

和timetree数据进行对比

粳稻

基于这个结果，我们查阅了上传序列的参考文献（Yin et al. 2015）。结合苗期性状（多分蘖，节间变短），我们认为该序列就是编码CRTISO的基因。下一步需要在群体中寻找极端个体进行测序验证（是否为该基因突变）



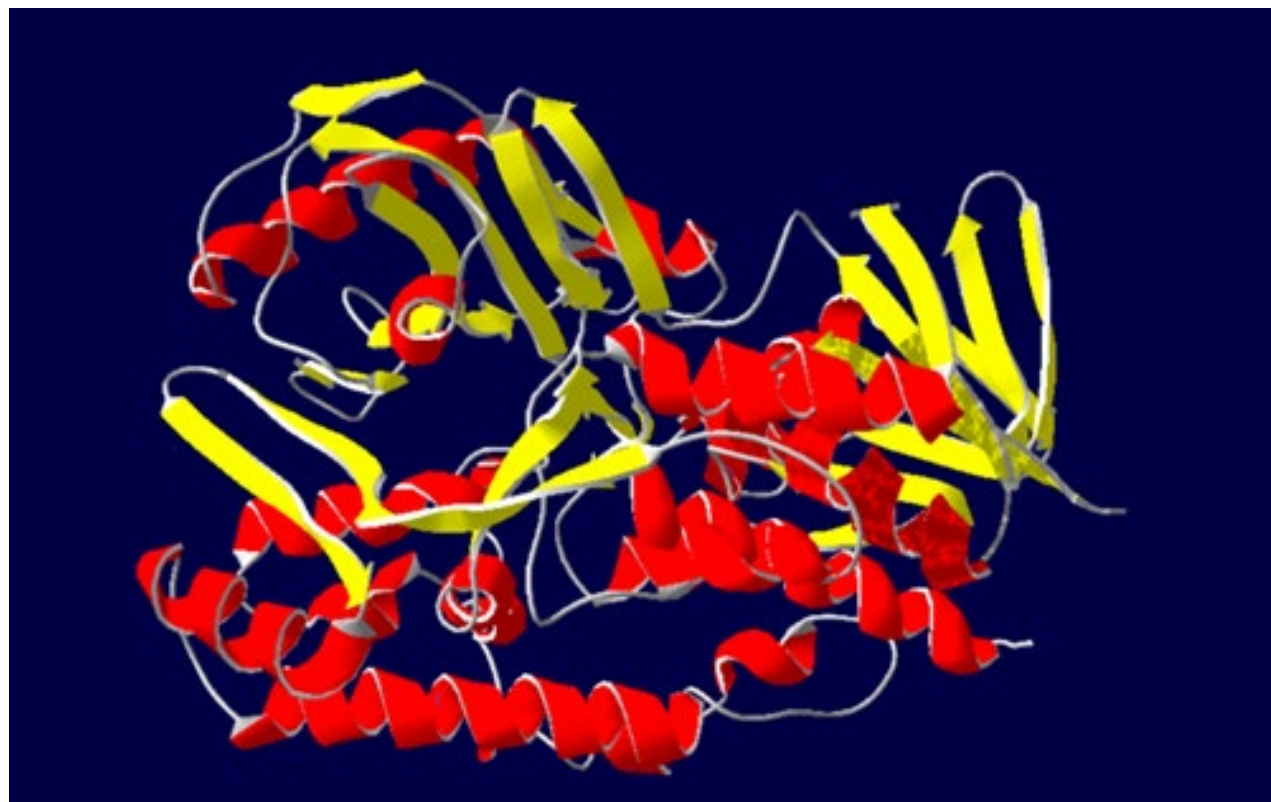
我们查阅相关文献判断突变体导致的原因

- OsCRTISO在水稻叶绿素合成及叶绿体发育中起着重要作用。类胡萝卜素生物合成受阻，引起光氧化和ABA缺陷，这可能是引起水稻穗发芽和斑马叶的主要原因（Chai et al. 2011; Fang et al. 2008），但进一步研究认为四-顺式-番茄红素的光周期积累和过量 10^2 产生才是斑马叶产生的主因（Han et al. 2012）。
- MHZ5介导的ABA途径作用于乙烯信号的下游，抑制根的生长。胚芽鞘中，MHZ5介导的ABA途径可能作用于上游但是负调乙烯信号，进而控制胚芽鞘生长（Yin et al. 2015）。
- 乙烯合成关键酶ACC氧化酶1在突变体分蘖芽中上调,说明乙烯可能促进分蘖的发生。

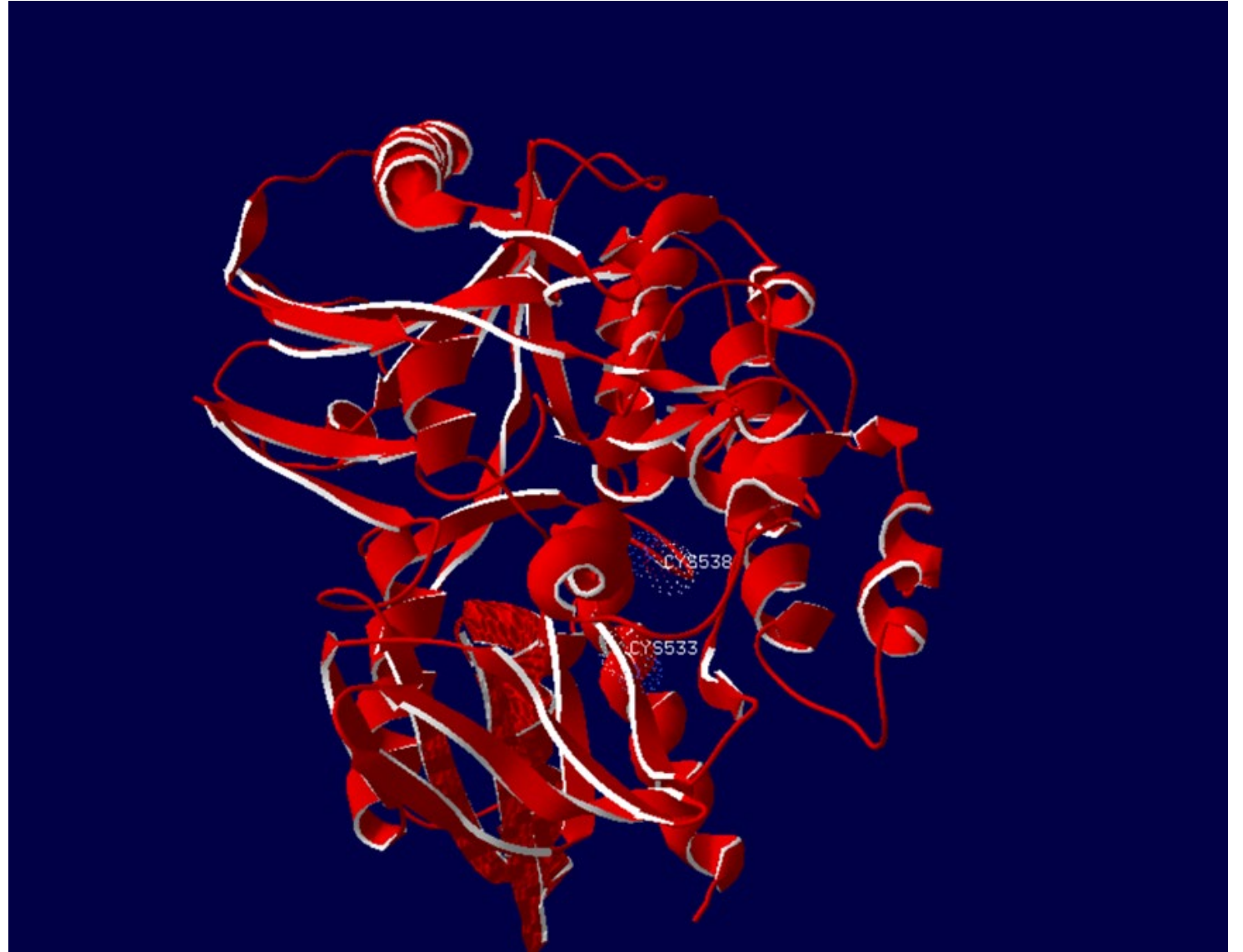
单链



有alpha螺旋和beta折叠



从图中可以看出在预测的蛋白质结构中在533位和538位有两个半胱氨酸，可能形成了二硫键。

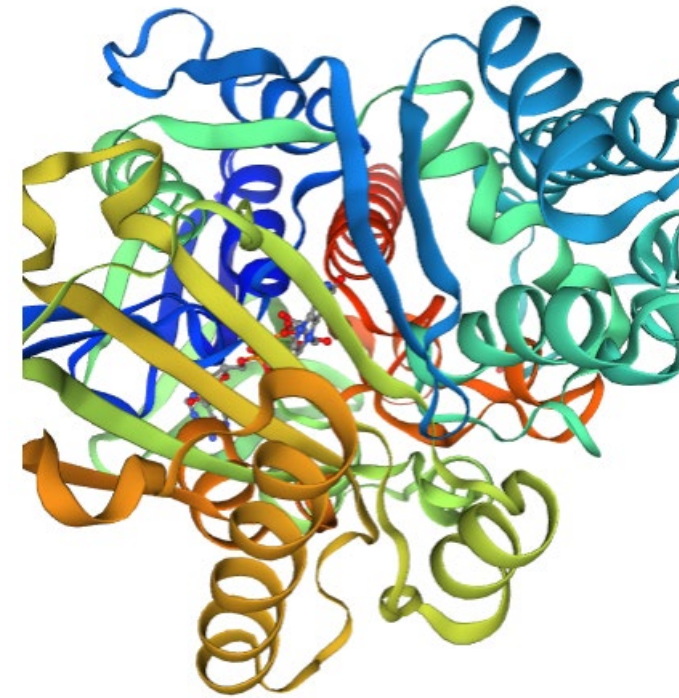


预测的链接方式如下

模板: SMTL ID : 4rep.1

Crystal Structure of gamma-carotenoid desaturase

- 底物结合域却呈现出一种新的结构, 形成一个长度为~40Å的疏水隧道。分子对接模拟结果表明, 该隧道为类胡萝卜素提供了一个合适的底物结合位点



Crystal structure of 1'-OH-carotenoid 3,4-desaturase from *Nonlabens dokdonensis* DSW-6.

Ahn JW, Kim KJ

Enzyme Microb. Technol. 77 29-37 (2015) 29-37(2015)

参考文献

1. Cui-Cui Yin;Biao Ma;Derek Phillip Collinge;Barry James Pogson;Si-Jie He;Qing Xiong;Kai-Xuan Duan;Hui Chen;Chao Yang;Xiang Lu;Yi-Qin Wang;Wan-Ke Zhang;Cheng-Cai Chu;Xiao-Hong Sun;Shuang Fang;Jin-Fang Chu;Tie-Gang Lu;Shou-Yi Chen;Jin-Song Zhang
Ethylene Responses in Rice Roots and Coleoptiles Are Differentially Regulated by a Carotenoid Isomerase-Mediated Abscisic Acid Pathway
The Plant Cell, 2015, 27(4): 1061-1081
2. 刘胜;魏祥进;邵高能;唐绍清;胡培松
一个水稻“斑马叶”叶色突变体基因zebra leaf2(zl2)的图位克隆
中国水稻科学, 2013, 27(3): 231-239
3. Su-Hyun Han;Yasuhito Sakuraba;Hee-Jong Koh;Nam-Chon Paek
Leaf variegation in the rice zebra2 mutant is caused by photoperiodic accumulation of tetra-Cis-lycopene and singlet oxygen
Molecules and Cells, 2012, 33(1): 87-97
4. Chenglin Chai;Jun Fang;Yang Liu;Hongning Tong;Yanqing Gong;Yiqin Wang;Min Liu;Youping Wang;Qian Qian;Zhukuan Cheng;Chengcai Chu
ZEBRA2, encoding a carotenoid isomerase, is involved in photoprotection in rice
Plant Molecular Biology, 2011, 75(3): 211-221
5. Jun Fang;Chenglin Chai;Qian Qian;Chunlai Li;Jiuyou Tang;Lei Sun;Zejun Huang;Xiaoli Guo;Changhui Sun;Min Liu;Yan Zhang;Qingtao Lu;Yiqin Wang;Congming Lu;Bin Han;Fan Chen;Zhukuan Cheng;Chengcai Chu
Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to pre-harvest sprouting and photo-oxidation in rice
The Plant Journal, 2008, 54(2): 177-189