



中央民族大学
MINZU UNIVERSITY OF CHINA



第十一届全国生物多样性科学与保护研讨会
—转基因技术与生物多样性

转 *ThPER32* 烟草抗逆性的 根蛋白质组学分析

中央民族大学生命与环境科学学院
周宜君

2014. 8. 14. 辽宁沈阳



报告内容

- ① 研究背景
- ② 研究问题——内容
- ③ 结论与思考



一、研究背景

- 全球气候变化

- 逆境

- 干旱、盐渍、低温、水涝...

- 农作物减产

- 粮食安全

生物技术的应用

- 解决途径

- 抗逆物种的培育

- 杂交育种

- 转基因育种

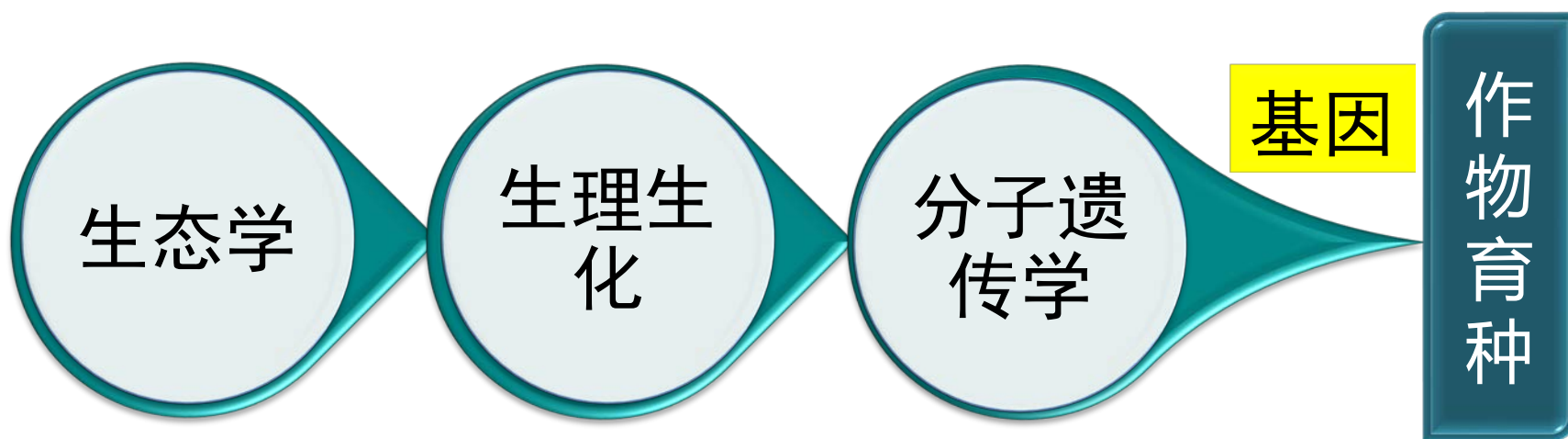
- 基础研究

- 抗逆机制?

- 抗逆基因的发掘

一、研究背景

- 植物抗逆机制与抗逆基因的发掘
 - 能够在逆境中生长的植物
- 研究策略?



二、科学问题

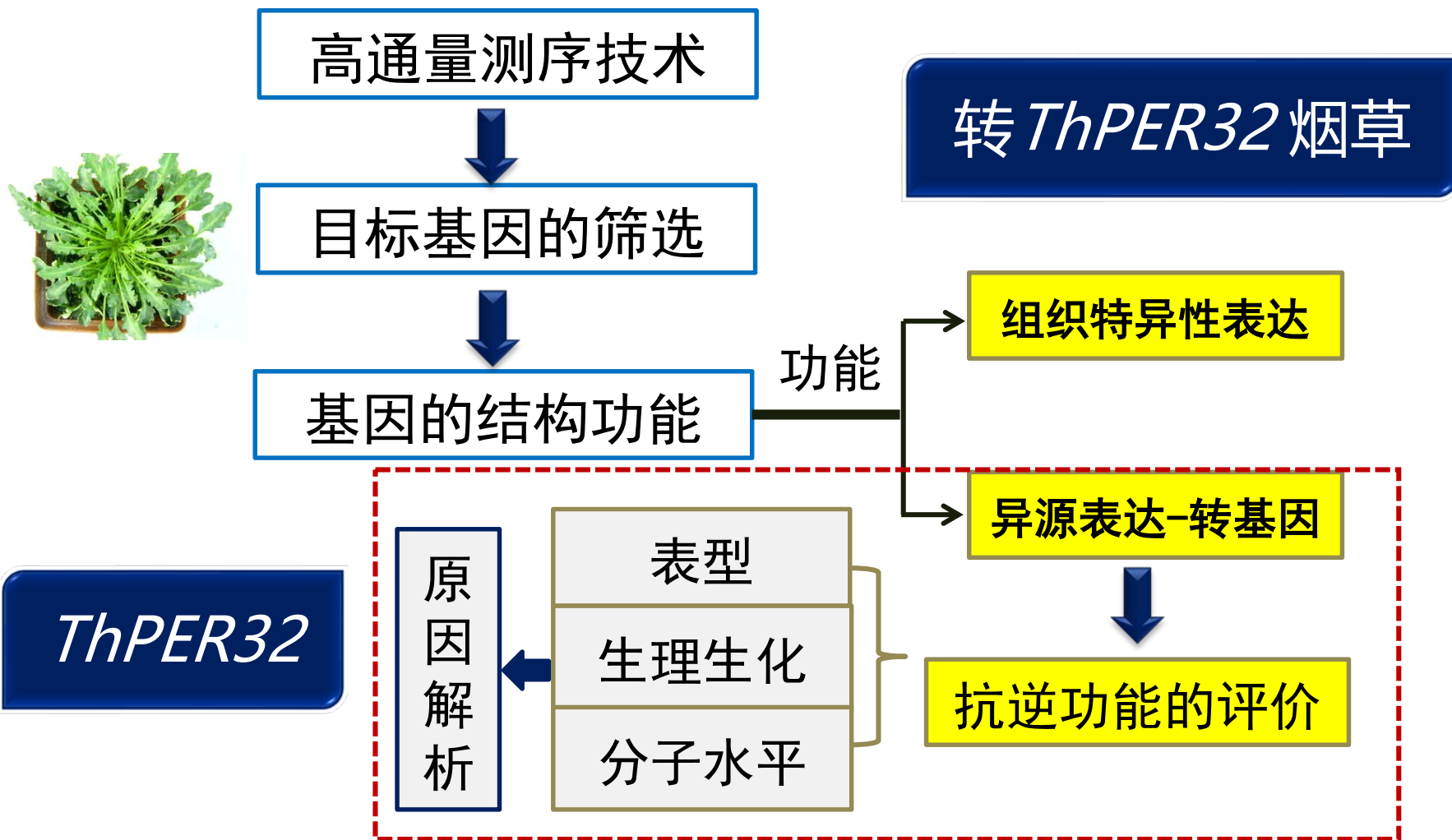
- 如何探讨抗逆机制？
- 如何发掘抗逆相关基因？
- 如何应用？
- 材料？

利用哪些现代
生物技术？



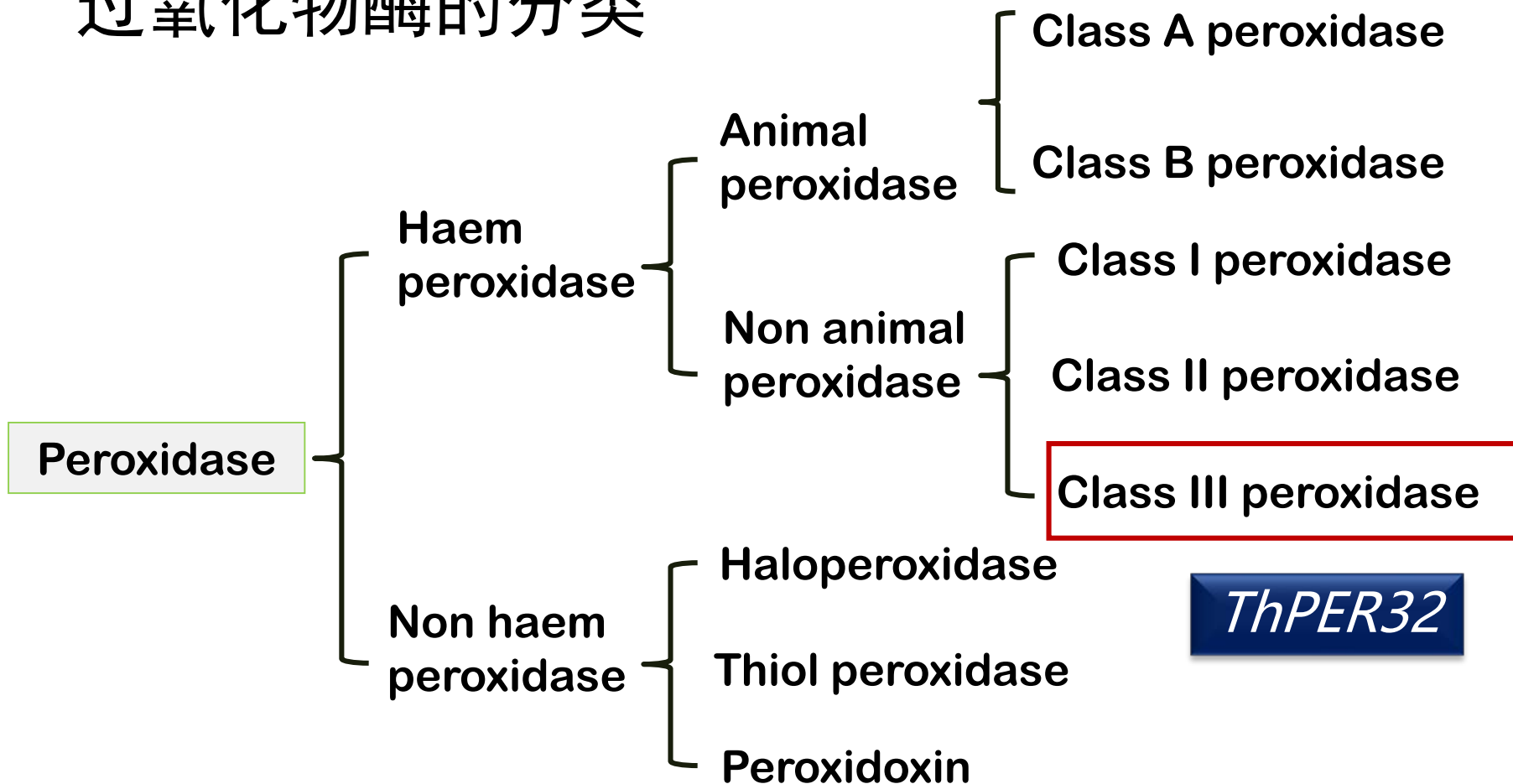
盐芥，十字花科 (Brassicaceae) 盐芥属 (*Thellungiella*)，与拟南芥近缘。耐盐，耐干旱，耐低温，耐受低氮。

二、科学问题



二、科学问题

过氧化物酶的分类



二、科学问题

● 植物过氧化物酶的功能

超家族

拟南芥: 73
水稻: 138

ThPER32

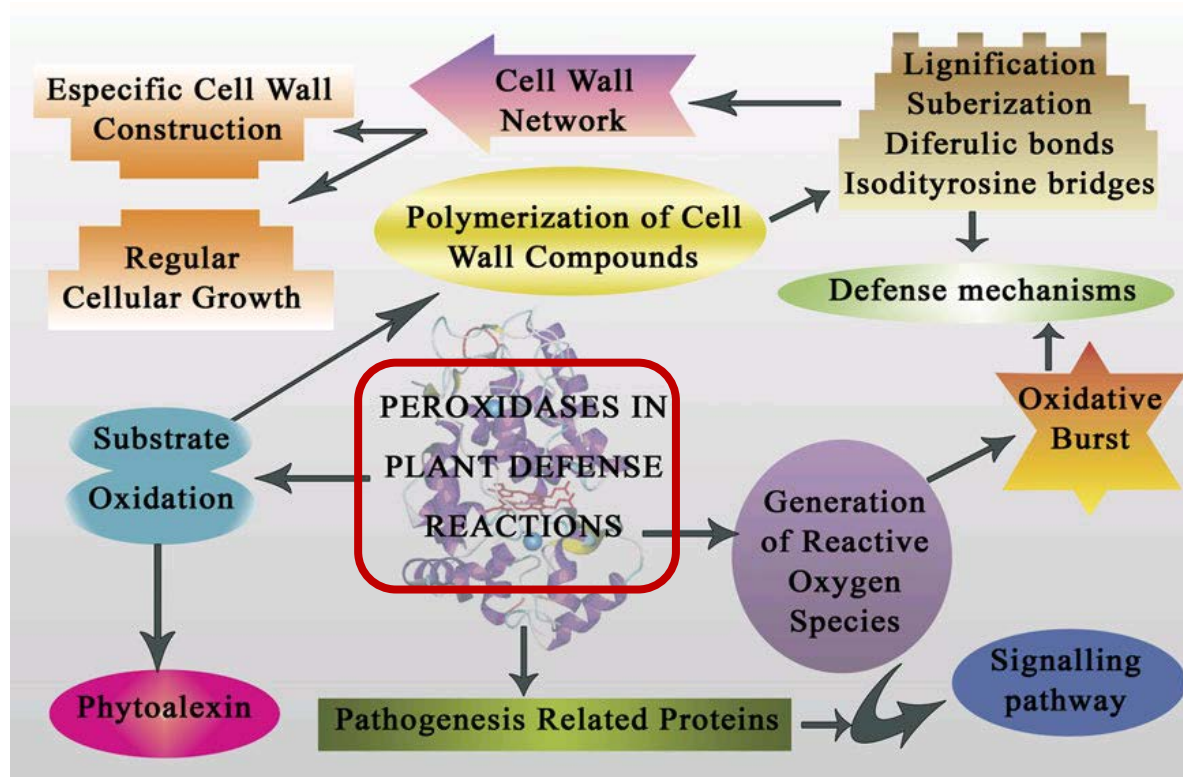


图1 过氧化物酶的功能 (Almagro *et al.*, 2009)

二、科学问题



转 *ThPER32* 烟草



- ① 转 *ThPER32* 烟草的抗逆性如何？
- ② 需要测定哪些生理生化指标？
- ③ 导入一个基因提高了植物的抗逆性，说明该基因有效。通过哪些途径实现？体内代谢变化？——蛋白谱的特征如何？

问题1:

转 *THPER32* 烟草的抗逆性如何?

- 转 *THPER32* 烟草T2代的筛选与鉴定;
- 胁迫下的表型特点.

(一) 转 *ThPER32* 烟草T2代的筛选与鉴定

1. T2 代转基因烟草的筛选

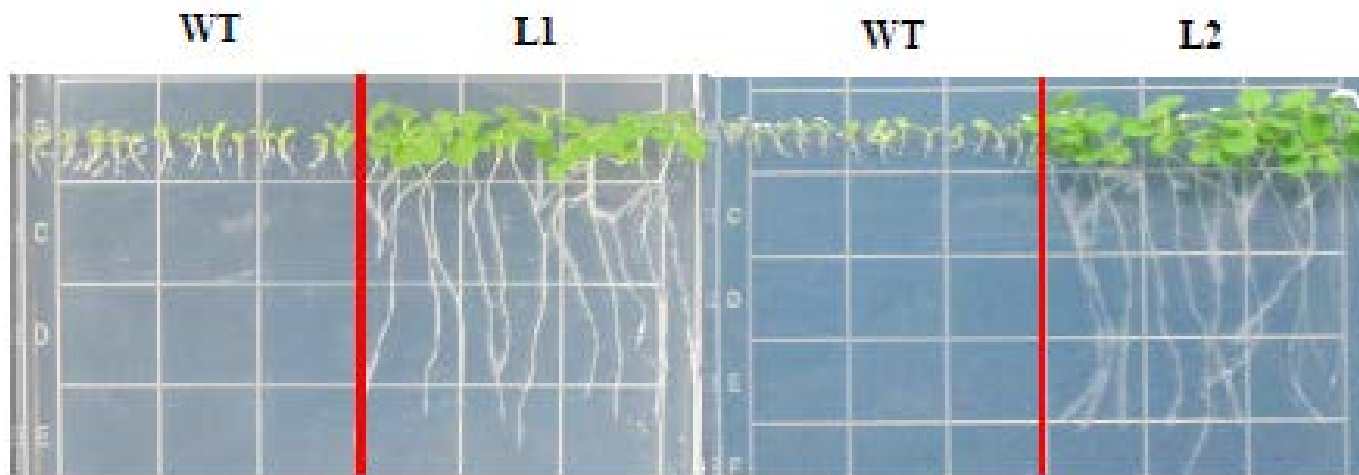


图2 野生型和转基因烟草在含卡那霉素 (Kan) MS 的培养基中的生长情况
WT: 野生型; L1: *ThPER32*-L1; L2: *ThPER32*-L2

(一) 转 *ThPER32* 烟草T2代的筛选与鉴定

2. T2 代转基因烟草基因组的鉴定

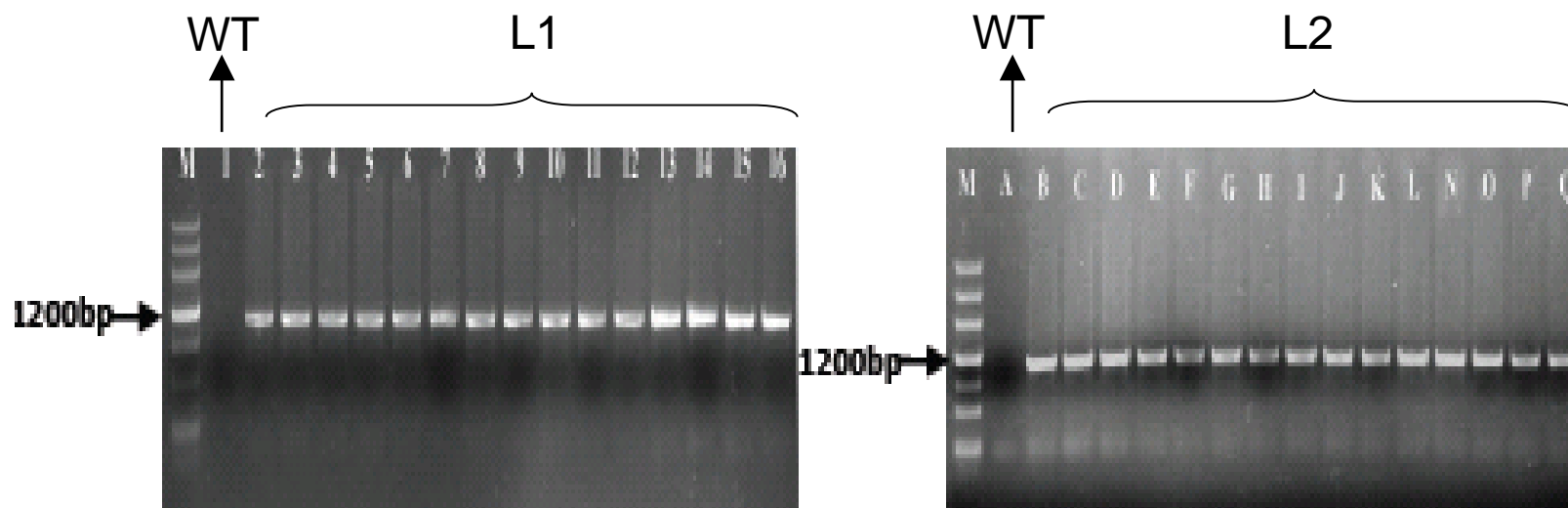


图3 转基因植株的基因组PCR 扩增

M:Marker; 1: 野生型; 2-16: *ThPER32*-L1; A: 野生型; B-Q: *ThPER32*-L2

(一) 转 *THPER32* 烟草T2代的筛选与鉴定

3. T2 代转基因烟草转录水平的鉴定

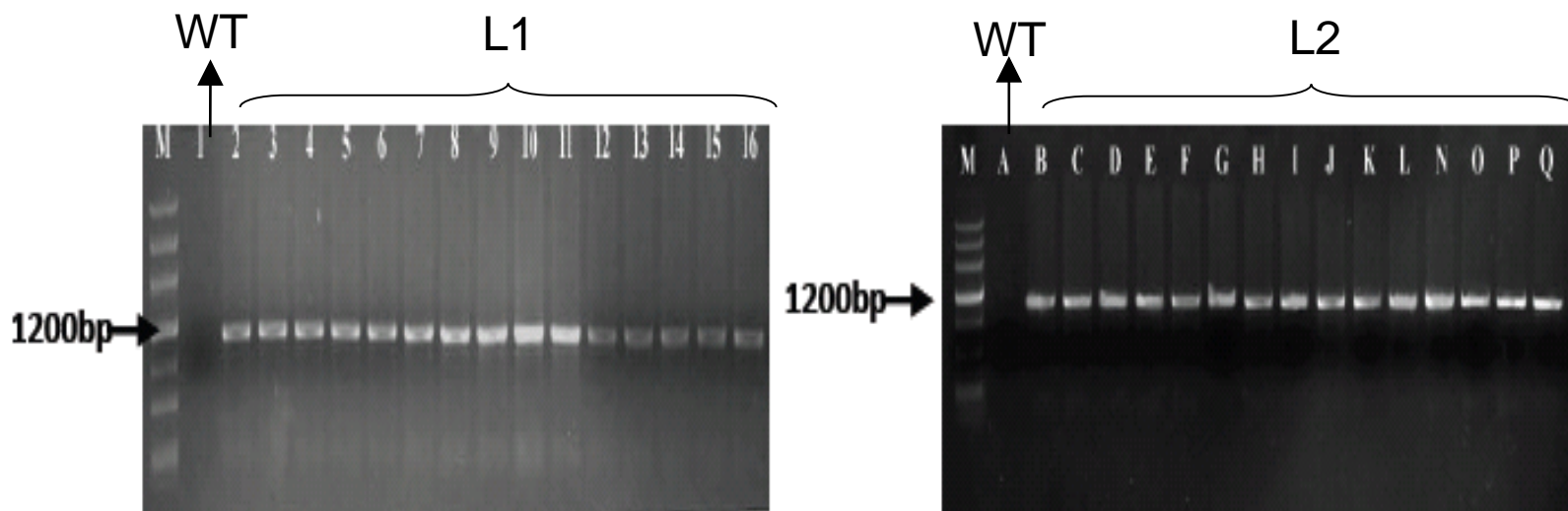


图4 转录组PCR 结果

M:Marker; 1: 野生型; 2-16: ThPER32-L1; A: 野生型; B-Q: ThPER32-L2

(二) 转 *ThPER32* 烟草T2代抗逆性评价

正常条件下的野生型与转基因烟草

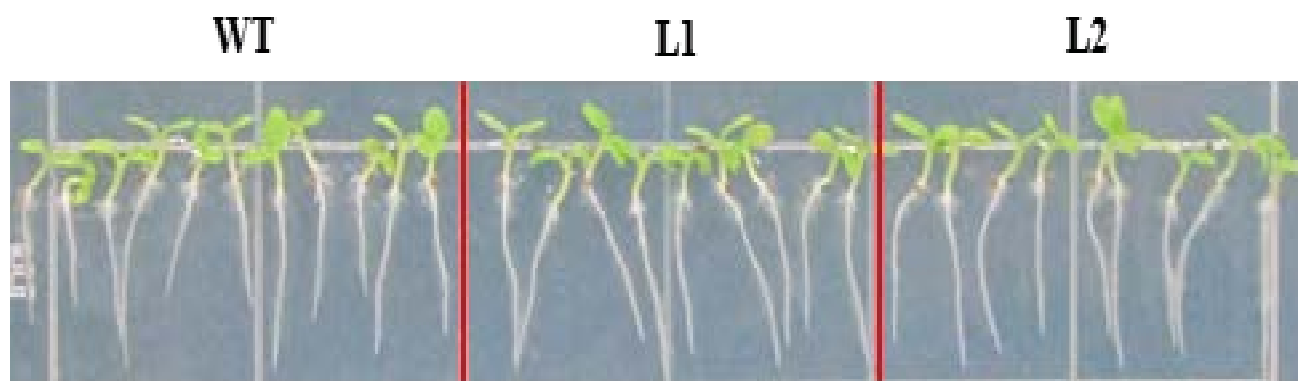


图5 MS培养基上野生型和转基因烟草的萌发及生长
WT: 野生型; L1: *ThPER32*-L1; L2: *ThPER32*-L2

(二) 转 *ThPER32* 烟草T2代抗逆性评价

1. 转基因烟草提高干旱耐受性

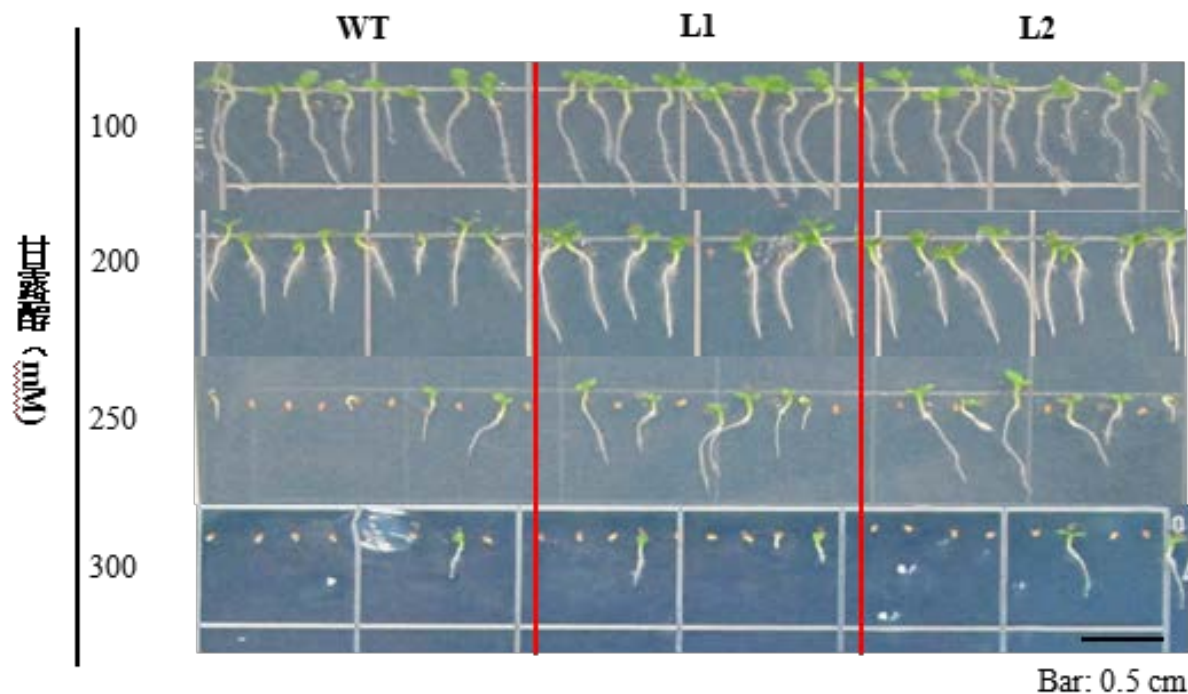


图6 含甘露醇MS培养基上野生型和转基因烟草的萌发及生长
WT: 野生型; L1: *ThPER32*-L1; L2: *ThPER32*-L2

(二) 转 *ThPER32* 烟草T2代抗逆性评价

2. 转基因烟草提高盐胁迫耐受性

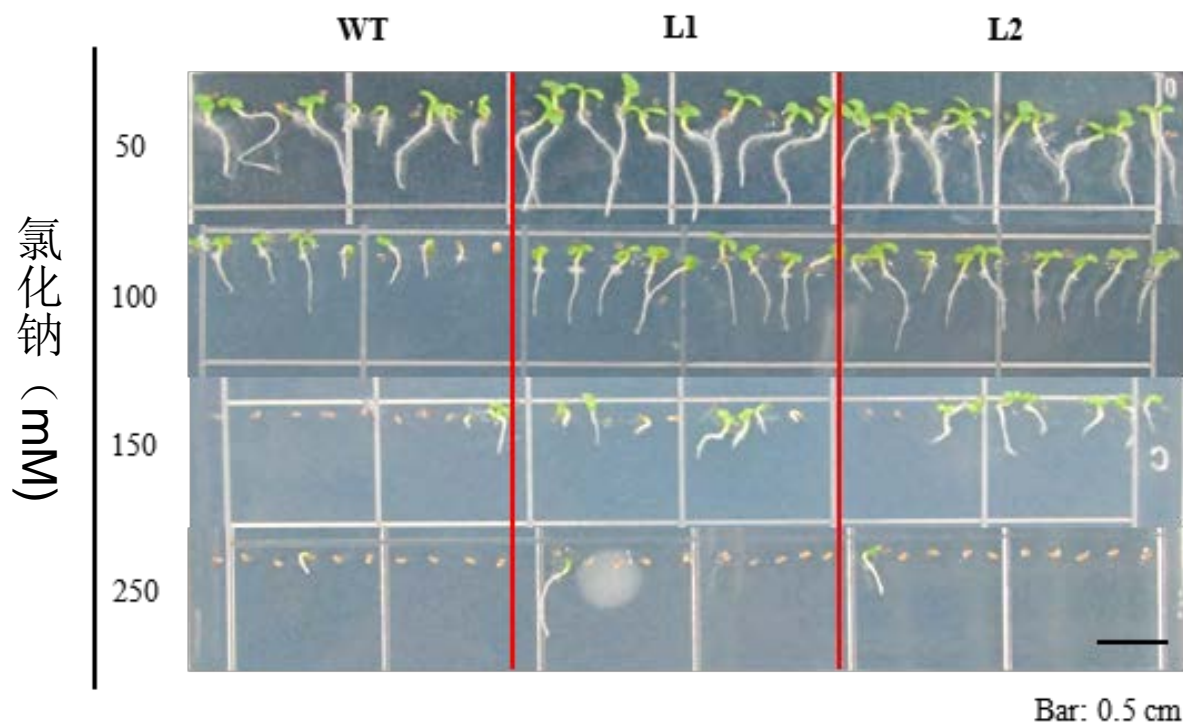


图7含NaCl MS培养基上野生型和转基因烟草的萌发及生长
WT: 野生型; L1: *ThPER32*-L1; L2: *ThPER32*-L2

(二) 转 *THPER32* 烟草T2代抗逆性评价

3. 转基因烟草提高氧化胁迫耐受性

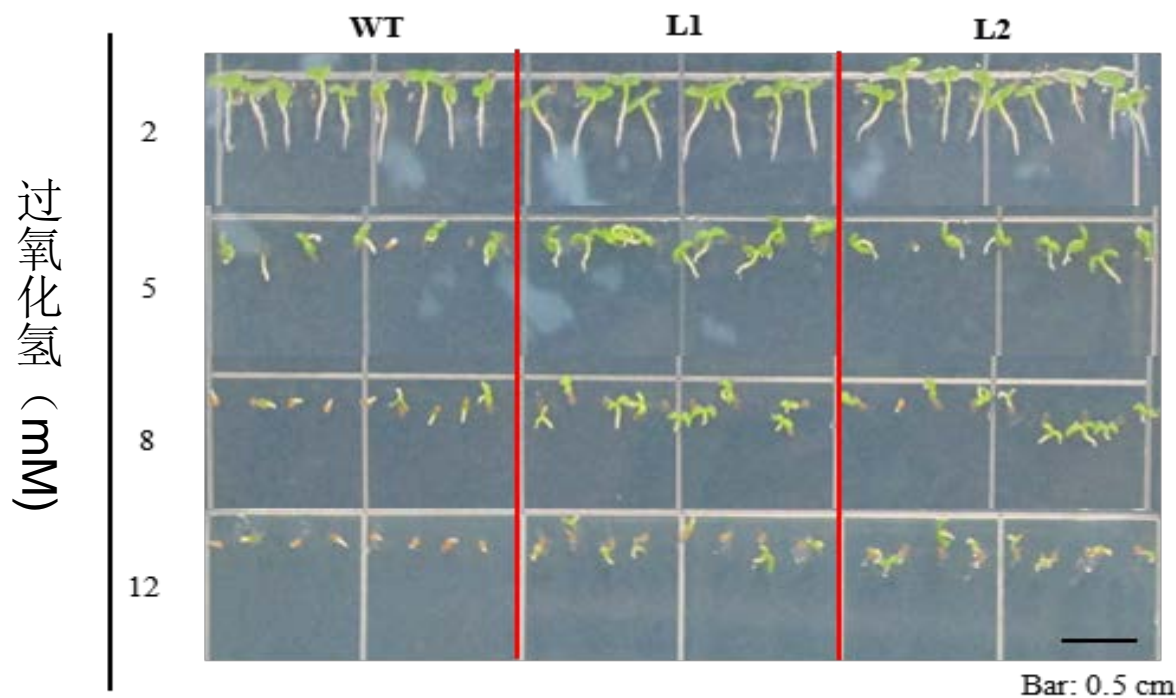
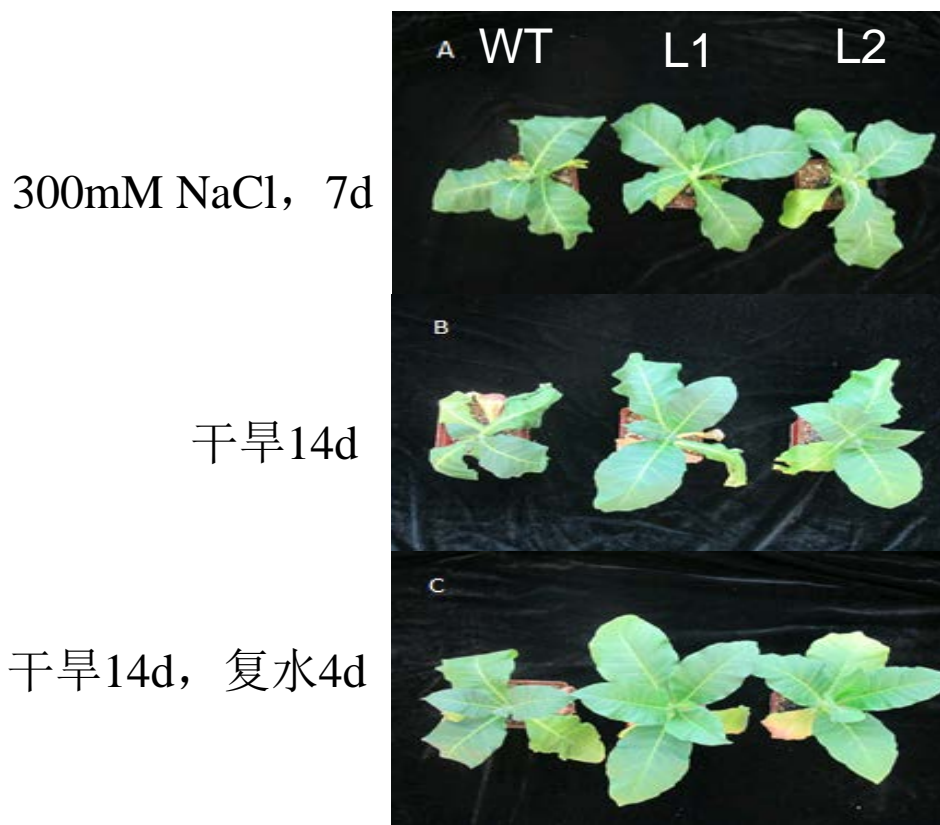


图9 含 H_2O_2 MS培养基上野生型和转基因烟草的萌发及生长
WT: 野生型; L1: *ThPER32*-L1; L2: *ThPER32*-L2

(二) 转 *THPER32* 烟草T2代抗逆性评价

4. 土培条件下转基因型烟草的抗逆性提高



问题2:

转 *THPER32* 烟草抗逆

生理生化特征如何?

- 胁迫条件下的ROS清除能力
- 抗氧化酶活性
- 膜脂过氧化程度

1. 胁迫条件下的ROS清除能力

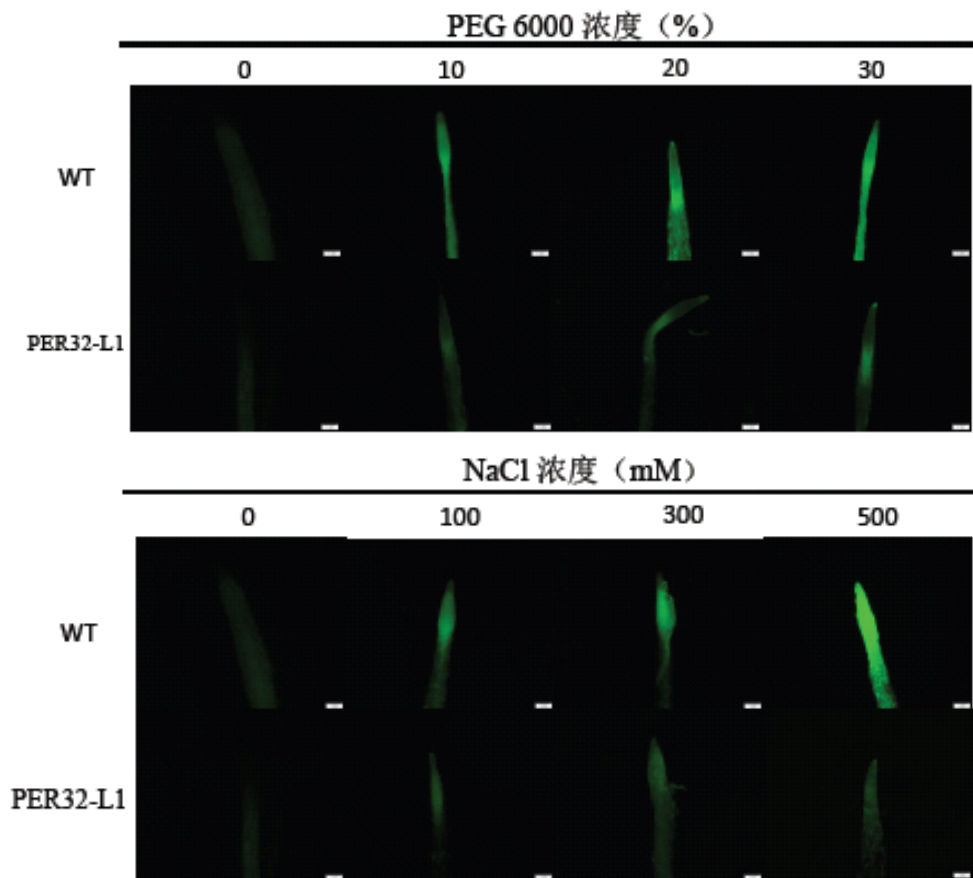


图10 不同浓度PEG 6000处理野生型和转基因植株根尖的ROS活性

2. 抗氧化酶活性

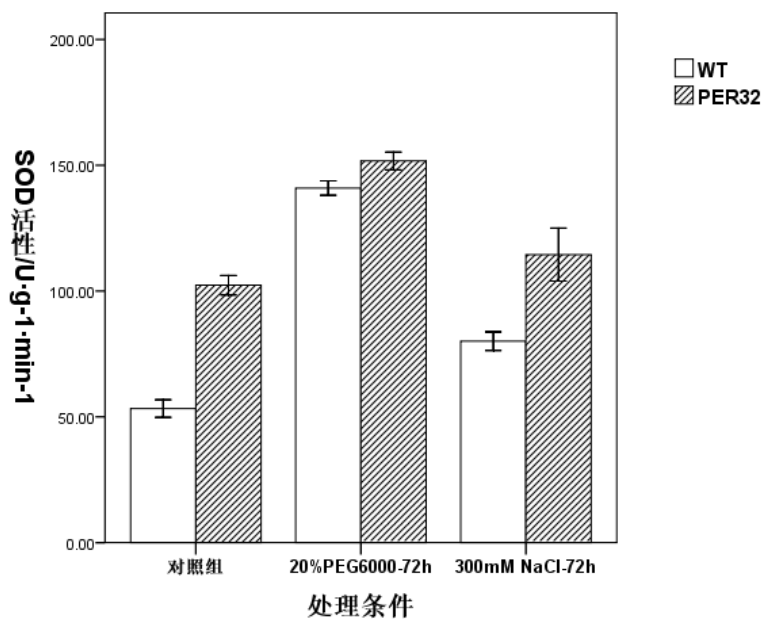


图12 不同胁迫条件下野生型与转基因烟草根中的SOD活性

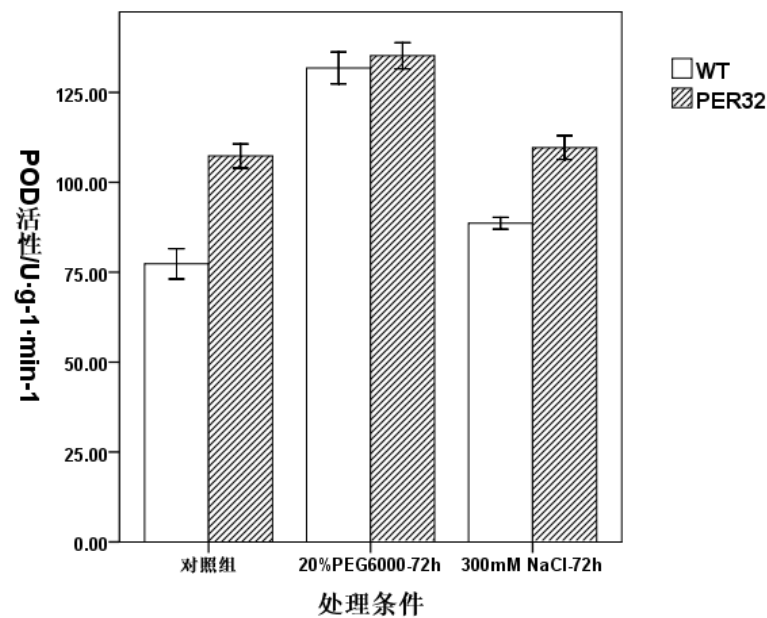


图13 不同胁迫条件下野生型与转基因烟草根中的POD活性

3. 膜脂过氧化程度

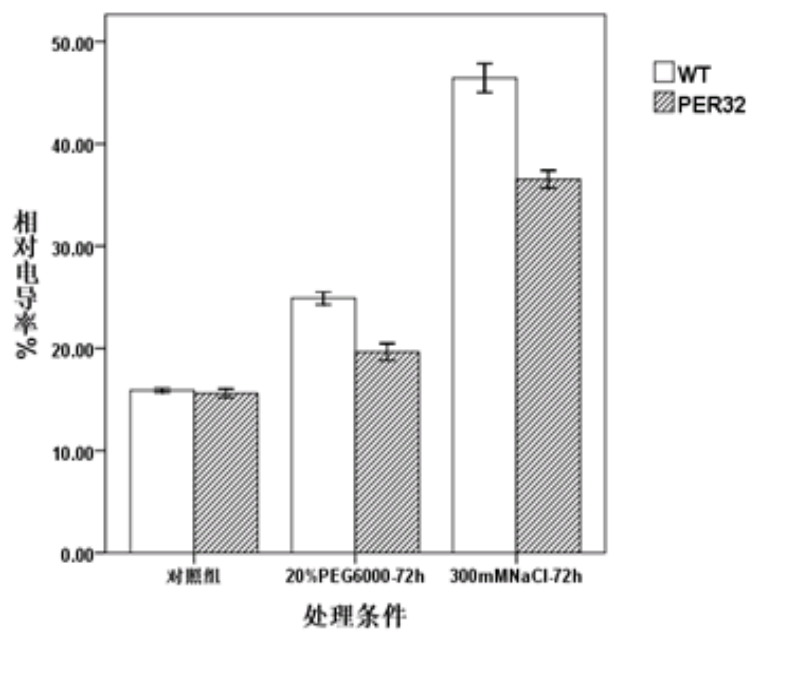


图14 不同胁迫条件下野生型与转基因烟草根中的相对电导率

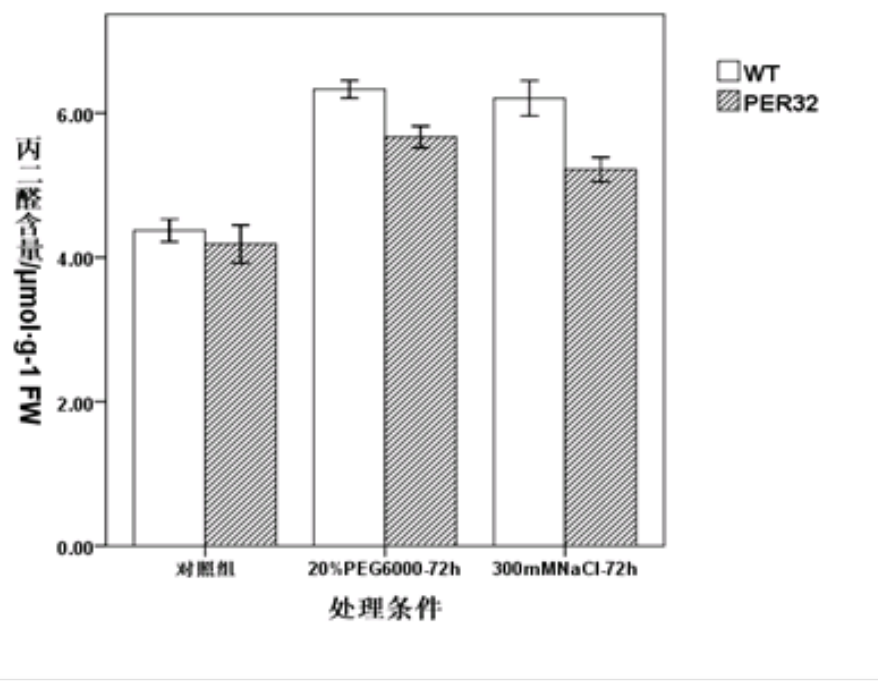


图15 不同胁迫条件下野生型与转基因烟草根中的丙二醛含量

● 基因与表型



- 转录组分析
- 蛋白质组学分析
- 代谢组学分析

根

问题3:

转 *THPER32* 烟草抗逆提高的原因?

- 蛋白质组学分析
- 差异表达蛋白



蛋白质组学分析——差异表达蛋白

WT
与
转*ThPER32*

正常条件

WT与转*ThPER32*蛋白表达差异

干旱胁迫

WT与转*ThPER32*应答胁迫表达的
蛋白特点

20%PEG6000,72h

高盐胁迫

WT与转*ThPER32*应答胁迫表达的
蛋白特点

300mMNaCl,72h

根

2-DE

pH4 -7, 24cm, 1200 μ g

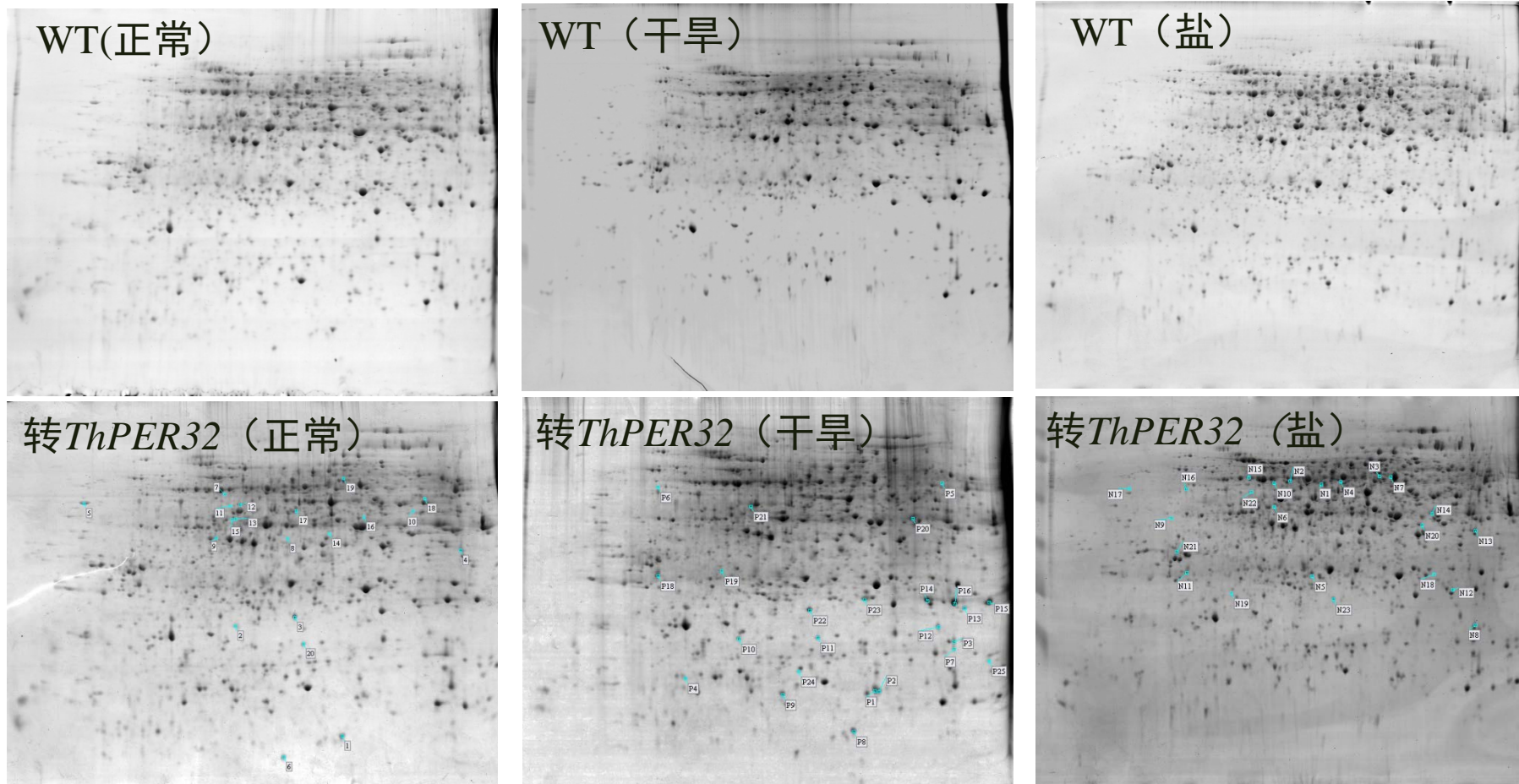


图16 不同条件下野生型和转*ThPER32*烟草根组织差异表达蛋白的双向电泳图,

14-96KDa, 2200多个点, 1800个点匹配



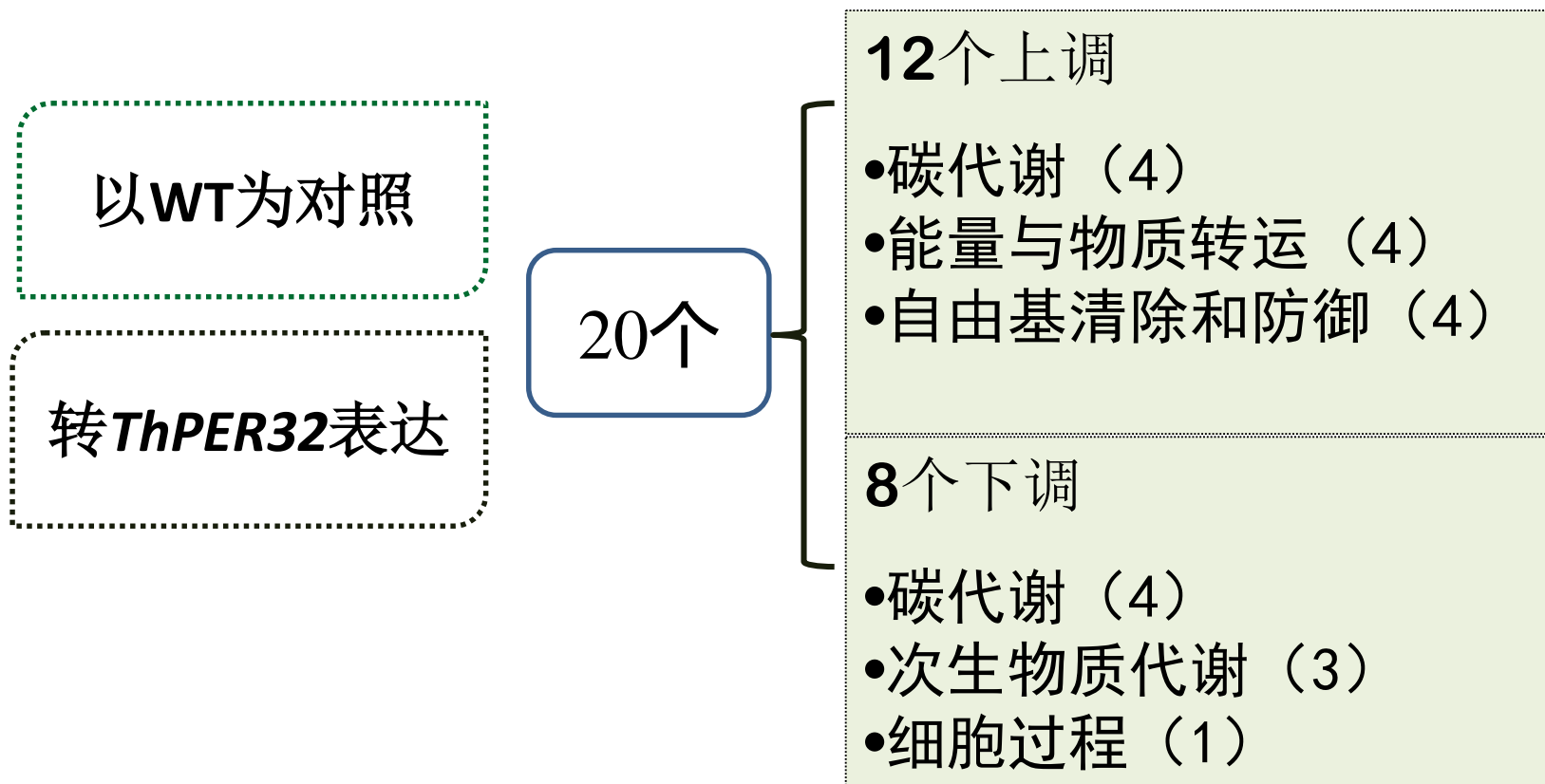
1. 检出的差异表达蛋白点

表1. 不同条件下的检出的差异表达蛋白点数量

处理条件	对照设置	鉴定的蛋白质数量				未鉴定	备注
		物种	总数	已知功能	未知功能		
正常条件	WT	WT	-	-	-	-	
		转 <i>ThPER32</i>	20	20	0	0	
20% PEG6000	WT	WT	19	14	3	1	共响应3个点（1个已知功能，1个未知功能，1个未鉴定）
	转 <i>ThPER32</i>	转 <i>ThPER32</i>		1	3	5	
300mM NaCl	WT	WT	17	7	1	4	共响应2个点（2个已知功能）
	转 <i>ThPER32</i>	转 <i>ThPER32</i>		11		2	
	小计		56	50	6	12	
	总计					68	

Ratio>1.5, P<0.05

2. 正常条件下WT和转*ThPER32*植株的差异蛋白





2. 正常条件下WT和转ThPER32植株的差异蛋白

- Fasciclin-like arabinogalactan protein 9-like
- Acyl-CoA-binding protein
- Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like
- Fructokinase-2
- ATP synthase subunit beta
- **Superoxide dismutase**
- Isoflavone reductase homolog A622
- GDP-mannose 3,5-epimerase
- **Thioredoxin-dependent peroxidase**
- Annexin D4-like
- V-type proton ATPase subunit G 1
- Copper binding protein plastocyanin

上调表达



2. 正常条件下，WT和转ThPER32植株的差异蛋白

- Quinolinate phosphoribosyltransferase
- Putrescine N-methyltransferase
- Cytosolic phosphoglycerate kinase
- Isocitrate dehydrogenase
- Glucose-6-phosphate dehydrogenase
- Caffeic acid O-methyltransferase II
- Actin-7-like

下调表达



2. 正常条件下，WT和转*ThPER32*植株的差异蛋白

■ 小结:

- (1) 过表达*ThPER32*烟草，引起了一些蛋白表达的变化。
- (2) 根据鉴定差异表达蛋白的功能，主要与碳代谢、能量与物质转运、自由基清除和防御、次生物质代谢有关蛋白变化。
- (3) 差异表达蛋白为阐释*ThPER32*基因功能提供依据。



3. 20%PEG6000胁迫下,

WT和转*ThPER32*植株响应的差异蛋白

分别以正常生长
WT和转*ThPER32*
对照

25个点
鉴定19个点
14个已知功能

● WT

14个已知功能，上调，功能为

- 自由基清除和防御（10个）
- 碳代谢（1个）
- 能量与物质转运（1个）
- 信号传导（1个）
- 细胞过程（胞内运输）（1个）。

1个已知功能，上调，功能为

- 自由基清除和防御1个

● 转*ThPER32*



3. 20%PEG6000胁迫下,

WT和转*ThPER32*植株响应的差异蛋白

■ 在应答渗透胁迫方式上的表现特点

- (1) 转*ThPER32*烟草, 由于过表达*ThPER32*, 使对20%PEG6000抗性提高。可能与自身存在的已经高表达的蛋白有关, 如3个蛋白分别为与自由基清除和防御相关 (Thioredoxin-dependent peroxidase和Superoxide dismutase)、与物质转运相关 (V-type proton ATPase subunit G1)。
- (2) 20%PEG6000胁迫引起氧化胁迫, WT需要表达大量的自由基清除和防御的蛋白。而转*ThPER32*植株由于已经表达了一些与其相关的蛋白, 因此新表达的与自由基清除和防御的蛋白较少。



4. 300mMNaCl胁迫下,

WT和转*ThPER32*植株响应的差异蛋白

■ WT

分别以正常生长WT
和转*ThPER32* 对照

23个点
鉴定17个点
16个已知功能

7个已知功能，6个上调，功能为

- 自由基清除和防御（2个）
- 碳代谢（1个）
- 能量与物质转运（1个）
- 次级代谢（1个）
- 翻译调控（1个）。



4. 300mMNaCl胁迫下,

WT和转*ThPER32*植株响应的差异蛋白

■ 转*ThPER32*

分别以正常生长WT
和转*ThPER32* 对照

23个点
鉴定17个点
16个已知功能

11个已知功能，10个上调，功能为

- 自由基清除和防御（2个）
- 碳代谢（1个）
- 氮代谢（2个）
- 能量与物质转运（2个）
- 次级代谢（1个）
- 翻译调控（2个）。



4. 300mMNaCl胁迫下,

WT和转*ThPER32*植株响应的差异蛋白

■ 在应答高盐胁迫方式上的表现特点

- (1) 300mMNaCl处理引起的胁迫较为复杂, 因此WT与转*ThPER32*植株都采取了各自的方式进行积极的应答, 高表达的蛋白多样, 包括自由基清除和防御、碳代谢、能量与物质转运、次级代谢和翻译调控等。
- (2) WT与转*ThPER32*植株在应对300mMNaCl胁迫时除了有共响应的的2个蛋白外, 其他蛋白的种类功能不同, 说明应答所采取的方式有别。



三、结论与思考

- ① 转盐芥中编码过氧化物酶基因 (*ThPER32*) 能够提高烟草的抗逆性。抗逆性的改变与过氧化物酶基因的功能有关。
- ② *ThPER32* 可能通过参与ROS水平调节提高抗逆性途径。
- ③ 蛋白质组学分析表明, 转 *ThPER32* 烟草以独特的蛋白表达模式, 提高植株抗逆性。
- ④ 转入外源基因对受体植株的多种代谢途径产生影响。



三、结论与思考

- 转基因技术与生物多样性——生物安全
 - ① 转 *ThPER32*烟草提高了抗逆性——候选基因
 - ② 若应用于作物育种——提高抗逆性，利于生长；
 - ③ 抗逆性提高——与对受体植株代谢的影响相关。
 - ④ 对受体植株的影响与目标基因的功能有关——一个案例分析的必要性。
 - ⑤ 采用蛋白质组学技术有助于阐释转入基因是否对受体产生影响？



项目资助与研究人员

- 国家自然科学基金项目 (31070361,31370356)
- 高等学校学科创新引智计划项目 (B08044)
- 国家985工程项目(MUC985)



谢谢!