

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.02.029

甘蓝型油菜 *BnHY5* 基因的表达模式及非生物胁迫响应分析

方艳, 岳出, 李洁, 郭媛媛, 王茂林

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 为探究甘蓝型油菜中 *HY5* 的表达情况, 首先通过甘蓝型油菜基因组数据分析预测 *HY5* 及其同源基因 *HYH* (*HY5*-Homologous), 克隆获得了四个 *HY5* (命名为 *BnHY5*) 以及三个 *HYH* (命名为 *BnHYH*) 重复基因全长 cDNA 序列. 其次, 对 *BnHY5* 进行了蛋白结构预测、理化性质分析, 研究结果表明: *BnHY5* 蛋白为不稳定、亲水性蛋白, 主要结构域为亮氨酸拉链. 最后, 探究了甘蓝型油菜中该基因的表达情况, 用荧光定量 PCR 分析了 *BnHY5* 重复基因表达模式和响应非生物胁迫的情况, *BnHY5* 四个基因中, *BnHY5-2* 的表达水平最高, *BnHY5-1*、*BnHY5-2* 不存在组织表达差异且表达水平高于 *BnHY5-3*、*BnHY5-4*. *BnHY5* 基因不仅响应高温、低温、镉、高盐非生物胁迫, 而且参与 ABA 和 GA_3 激素信号响应, 说明 *BnHY5* 在逆境胁迫中有重要作用. 此外 *BnHY5* 重复基因在非生物胁迫下的表达模式发生改变, *BnHY5* 四个基因的表达占比与不同类型胁迫处理相关, 存在表达差异.

关键词: 甘蓝型油菜; *BnHY5*; 非生物胁迫; 表达分析; 重复基因

中图分类号: Q37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2020)02-0391-09

Expression pattern and abiotic stress response analysis of *BnHY5* in *Brassica napus* L.

FANG Yan, YUE Chu, LI Jie, GUO Yuan-Yuan, WANG Mao-Lin

(Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to explore the expression of *HY5* in *Brassica napus* L., firstly, *HY5* and its homologous gene *HYH* (*HY5*-Homologous) were predicted by genomic data analysis, and the full-length cDNA sequences of four duplication genes of *HY5* (named *BnHY5*) were cloned. As well as three duplication *HYH* (named *BnHYH*) were also cloned. Then, we predicted and analyzed the protein structure of *BnHY5* and its chemical properties. The results showed that *BnHY5* protein is an unstable and hydrophilic protein, and the main domain is leucine zipper. Finally, *BnHY5* duplication gene expression pattern was analyzed by real-time PCR with normal growth conditions and abiotic stress. The results showed that among 4 *BnHY5* genes, *BnHY5-2* has the highest expression level. *BnHY5-1* and *BnHY5-2* have no tissue expression differences and the expression level is higher than *BnHY5-3*, *BnHY5-4*. *BnHY5* gene not only responds to high temperature, low temperature, cadmium, high salt abiotic

收稿日期: 2019-04-21

基金项目: “国家重点研发计划”项目子课题(2018YFD0100500, 2016YFD010020002); 四川省科技成果转化项目(16NZ0065); 四川省育种攻关项目(2016NYZ0031)

作者简介: 方艳(1993-), 女, 硕士生, 主要从事植物遗传与分子生物学方向研究. E-mail: fangyan822@qq.com

通讯作者: 王茂林. E-mail: mlwang@scu.edu.cn

stress but also participates in ABA and GA₃ hormone signal responses, indicating that *BnHY5* plays an important role in abiotic stress. In addition, compared with the expression of *BnHY5* duplications in normal growth rape, the expression level of *BnHY5* duplications under different types of stress treatment changed. The expression ratio of the four genes of *BnHY5* has a relationship to different types of stress treatment.

Keywords: *Brassica napus* L.; *BnHY5*; Abiotic stress; Expression analysis; Duplication gene

1 引言

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是世界上重要的油料作物之一^[1]。HY5 转录因子对植物众多生理过程具有调节作用^[2],属于亮氨酸拉链(bZIP)家族^[3]。该家族转录因子参与植物对病原体的防御过程,花的发育和种子的成熟以及光和激素信号传递及反应过程等^[4]。植物 bZIP 类的蛋白在结合表达基因的 DNA 序列时,会优先与包含特定作用元件的 DNA 序列结合,因此植物 bZIP 类蛋白会偏向于优先识别有 G-box (CACGTG)、A-box (TACGTA)、C-box (GACGTC)等原件的序列^[5]。碱性亮氨酸拉链基本结构是以亮氨酸残基开头每 6 个氨基酸形成的 7 肽单元;多个七肽单元可稳定二聚化^[6]。拟南芥中 bZIP 家族有 78 个成员,这些转录因子依据功能和结构域特点被细分为十三组,目前为止,这些成员的其中四十多个尚未做系统的功能和序列的分析^[7]。HY5 及其同源基因 *HYH* 都含有 COP1 (Constitutive Photomorphogenesis1)相互作用结构域并有相似的功能,被单独分到了的一组,二者常常被一起研究。拟南芥 *HY5* 突变体在光照条件下具有细长的下胚轴的表现,在该突变体中过表达功能区完整的 *HYH* 可以弥补长的下胚轴表型^[8],说明拟南芥 *HY5* 基因与其同源基因 *HYH* 在功能上冗余。拟南芥中光形态建成应答调控机制的研究揭示了 *HY5* 在光应答中的中关键的调控作用^[2],*HY5* 调控着基因组中上千个光诱导基因的表达^[9]。近年来相关研究发现,*HY5* 不仅参与光信号响应,还可能参与非生物胁迫等过程^[10-11],*HY5* 转录因子位于调控的中心。但目前针对甘蓝型油菜 *BnHY5* 基因的研究较少,对非生物胁迫方面的研究也未见报道。基于该转录因子的重要作用,在甘蓝型油菜中研究其表达模式是非常必要的。本文研究分析了油菜 *BnHY5* 表达模式及胁迫逆响应,为进一步认识其功能与油菜遗传改良奠定基础。

2 材料与方法

2.1 材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)科乐油 1 号种植于植物光照培养室。

2.2 方法

2.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 油菜总 RNA 的提取用植物总 RNA 提取试剂盒 (E. Z. N. A R6627-02Plant RNA Kit OMEGA 公司),操作按照提取试剂盒说明书进行。提取高质量的 RNA 后立即进行 cDNA 的合成。总 RNA 反转录使用反转录试剂盒 (ONE-Step-gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒; TRANSGENE 公司)。cDNA 合成后于 -20 °C 保存备用。(体系为 20 μL,其中总 RNA 含量在 500 ng~5 μg)。

2.2.2 甘蓝型油菜 *BnHY5* 基因全长 cDNA 的克隆 以 Genbank 中已经公布的甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)数据库中预测的 *HY5* 和 *HYH* 各个基因开放阅读框序列同源部分设计特异性引物。

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物用凝胶电泳检测,PCR 产物经纯化后连接 T 克隆载体,蓝白斑筛选后挑取单菌落进行重组子鉴定,将阳性克隆扩大培养后提取质粒,送至华大基因有限公司进行测序。引物序列为见表 1。

表 1 PCR 引物
Tab. 1 PCR primer

Primer name	Primer sequence
<i>BnHY5</i> -F	5'-AATGCAGGAGCAAAC-3'
<i>BnHY5</i> -R	5'-TCAGCGTTAGAACCA-3'
<i>BnHYH</i> -F	5'-TGTCTCTTCAACGAC-3'
<i>BnHYH</i> -R	5'-AGCATTTTGCGAAGC-3'
<i>βactin</i> -F	5'-GTGACAATGGAAGTGAATGG-3'
<i>βactin</i> -R	5'-AGACGGAGGATAGCGTGAGG-3'

2.2.3 *BnHY5* 基因序列分析 目的基因测序结果用 DNAMAN 软件和 NCBI 中的 BLAST 工具进行比对分析。*BnHY5* 蛋白理化性质利用在线软件 ExPasy-Protparam 分析^[15]和 NCBI 在线工具完成,使用 SOPMA 对 *BnHY5* 蛋白二级结构进行预

测^[12], 而蛋白三级结构模型用 Swiss Model 在线工具分析. 使用使用邻接法推断了进化历史, MEGA-X 软件构建系统发育进化树^[13].

2.2.4 *BnHY5* 基因在各时期各器官的表达模式分析及胁迫处理 分别取光照和黑暗下的幼苗材料, 苗期(两叶一心期、四叶一心期)、抽薹期、花期的根、茎、叶材料. 取样后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用. 油菜盆栽培养至 2~3 片真叶, 将油菜根部泥土洗净置于 1/2 霍格兰溶液中继续培养. 培养至 3~4 片真叶进行胁迫激素处理和胁迫处理. 激素处理为 $150\text{ }\mu\text{mol/L}$ ABA 和 GA_3 , 分别添加 0.05% 的乙醇和 0.01% 的 Tween-20 表面活性剂^[1] 喷施叶面, 空白对照喷施含同浓度乙醇和表面活性剂的清水. 将甘蓝型油菜幼苗分别放置 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 光照培养箱做高温处理, 和 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷室内做低温处理, 正常光照; 盐胁迫, 镉胁迫处理分别在培养液中添加含 150 mmol/L 的氯化钠, $150\text{ }\mu\text{mol/L}$ 氯化镉, 未经过任何处理的材料作为空白对照. 所有材料在处理, 0、3、6、9、12、24 和 48 h (高温胁迫、低温胁迫处理后每隔 2 h) 进行一次取样. 取生长状况一致的幼苗地上部分, 液氮冷冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存. 每次实验重复 3 次, 实验结果是 3 次重复实验结果的平均值.

2.2.5 *BnHY5* 基因在逆境胁迫和外源激素处理下表达模式分析 *BnHY5* 基因的 qPCR 预实验确定了最佳的退火温度 ($56\text{ }^{\circ}\text{C}$) 和模板浓度. 以甘蓝型油菜管家基因 βactin (GenBank 登录号 AF111812) 为内参^[1], 设计特异性荧光定量引物, qPCR 引物序列见表 2.

表 2 qPCR 引物
Tab. 2 qPCR primer

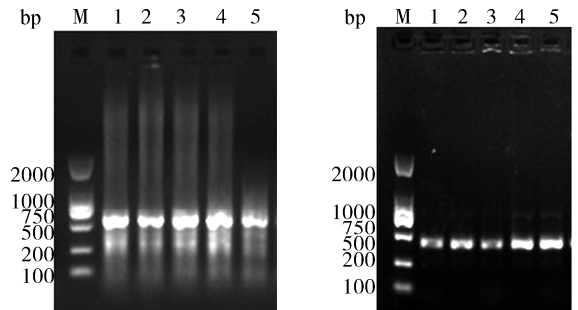
Primer name	Primer sequence
<i>QpcrHY5-1</i> F	5'-AAGGAAATCTCTGGATCGGCG-3'
<i>QpcrHY5-1</i> R	5'-TCAAGTTGAGAGTTTCTG-3'
<i>Qpcr-HY5-2</i> F	5'-AAGCAACGGTTCGGAGGAGAGA-3'
<i>Qpcr-HY5-2</i> R	5'-ATTTTCCAACCTACCCAAGTAAG-3'
<i>Qpcr-HY5-3</i> F	5'-ACATGAGGAGATACGGCGAGTA-3'
<i>Qpcr-HY5-3</i> R	5'-AAGCTCAGAGTTTCTGTTCTCT-3'
<i>Qpcr-hy5-4</i> F	5'-ATTCGAGTTCGGAGGAGAAGCC-3'
<i>Qpcr-hy5-4</i> R	5'-TTCCTCAACAACCTCTTTAGCC-3'
<i>qpcrHYH-1</i> F	5'-AACGTAACCTCAACCGCCAAGC-3'
<i>qpcrHYH-1</i> R	5'-TCTGCAACTCGTTAGCTCTTGA-3'
<i>qpcrHYH-2</i> F	5'-GAACTCGAGTCTTCTTCTCTCT-3'
<i>qpcrHYH-2</i> R	5'-GTATTCTTTATCGACTGGGTTA-3'
<i>qpcrHYH-3</i> F	5'-GGTTTCATCAAAATCTCAAAAGAC-3'
<i>qpcrHYH-3</i> R	5'-CCATGTCTGGAACCATCAACTC-3'
<i>qPCR-βactin</i> F	5'-CTTCCTACGCTATCCTCCG-3'
<i>qPCR-βactin</i> R	5'-AGCCGTCTCCAGCTCTTGC-3'

qPCR 检测 *BnHY5* 基因在不同胁迫处理后不同时间段的表达情况. 荧光定量 PCR 仪为美国 Bio-Rad CFX96^[1]. 荧光定量试剂盒 Trans Start Tip Green qPCR Supper Mix (TRANSGENE 生物公司). qRT-PCR 反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$: $10\text{ }\mu\text{L}$ $2\times$ Master Mix; $1\text{ }\mu\text{L}$ 模板 cDNA ($0.3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$); 正反向引物各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$ ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$); $8.2\text{ }\mu\text{L}$ 的 dd H_2O . qRT-PCR 采用三步法, 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 42 个循环 ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s; $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s) 同时绘制熔解曲线. 反应结束后, 目标基因的相对定量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法^[14] 计算, 每个样品都进行 3 次重复实验. 数据采用 SPSS 20 进行统计分析.

3 结果与分析

3.1 *BnHY5* 基因全长的克隆与编码蛋白质分析

BnHY5 及其同源基因 PCR 扩增见图 1(a) (b). 测序结果利用 NCBI 在线工具 Blastn 比对, 成功获得 HY5 基因及同源基因 HYH, 命名为 *BnHY5* 和 *BnHYH*. 并且在油菜中它们存在多个基因, *BnHY5* 有四个基因 HY5-1 (BnC09HY5. 1 ; 795bp); HY5-2 (BnA10HY5 ; 825bp); HY5-3 (BnA02HY5 ; 738bp); HY5-4 (BnC03HY5. 2 ; 752bp). 而 *BnHYH* 克隆到三个基因 HYH-1, HYH-2, HYH-3. 发现 *BnHY5-1* 与甘蓝型油菜预测转录因子 HY5 基因 (LOC106391328) 核苷酸序列相似性为 99%. 与拟南芥的 HY5 序列相似性为 83.08%, 与甘蓝的 HY5 序列相似性为 98%. 油菜 HY5 转录因子氨基酸序列的 N 端有能与 COPI 相互作用的结构域, C 端则是 bZIP 结构域. 同时, 油菜中 HY5 基因四个重复基因的 COPI interaction 区域与其主要作用结构域亮氨酸拉链的氨基酸序列基本上一致.



(a) *BnHY5*

(b) *BnHYH*

1. *BnHY5-1*; 2. *BnHY5-2*; 3. *BnHY5-3*; 4-5. *BnHY5-4*
1-2. *BnHYH-1*; 3-4. *BnHYH-2*; 5. *BnHYH-3*

图 1 基因全长 PCR 扩增

M. DNA marker; number. PCR products

Fig. 1 Full-length PCR amplification of *BnHY5* and *BnHYH* genes

拟南芥、甘蓝、芜菁 HY5 氨基酸序列与油菜 HY5 氨基酸序列比对见图 2。与拟南芥 HY5 氨基酸序列相比,油菜的氨基酸序列存在四处氨基酸不同。另外, *BnHY5* 氨基酸序列中部 50 个氨基酸处 *AtHY5* 氨基酸序列少了 4 个氨基酸 RESG(精氨酸,谷氨酸,丝氨酸,甘氨酸)这四个氨基酸均为亲水性较强的氨基酸;并且在 bZIP 的 LZ(亮氨酸拉链)基本结构区即七肽单元区末尾处存在个别氨基

酸的差异,例如肽链 50 个氨基酸处拟南芥的氨基酸是缬氨酸,而油菜的却是苏氨酸。甘蓝型油菜与两个亲本甘蓝和芜菁的 HY5 氨基酸序列进行比对,发现蛋白序列 76 与 158 个氨基酸处,甘蓝型油菜氨基酸差异与亲本芜菁和甘蓝有着相同的特点:甘蓝的为 G,芜菁的为 S,油菜 HY5-1 的为 G, HY5-2 的为 S(图 2)。

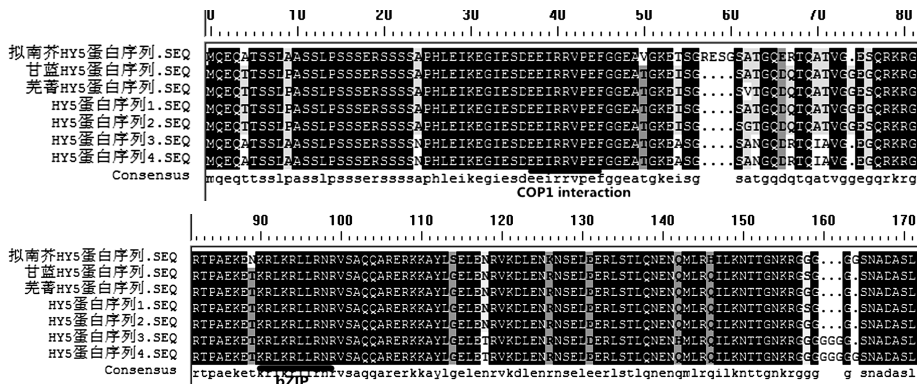


图 2 拟南芥 HY5 蛋白与芜菁、甘蓝、甘蓝型油菜 HY5 蛋白氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence comparison of *BnHY5* with *Arabidopsis AtHY5* and *HY5* of *brassica oleracea* amino acid sequence

3.2 BnHY5 蛋白理化性质分析与结构预测分析

3.2.1 BnHY5 蛋白理化性质分析

表 3 BnHY5 蛋白的理化性质

Tab. 3 Physicochemical properties of *BnHY5*

基因	氨基酸数	相对分子质量	不稳定指数	等电点	亲水性平均值
<i>BnCo3HY5.1</i>	164	18 037.82	61.67	9.29	-1.198
<i>BnA10HY5</i>	164	18 023.79	65.01	9.29	-1.211
<i>BnA02HY5</i>	166	18 101.87	56.85	9.51	-1.171
<i>BnCo3HY5.2</i>	167	18 163.04	58.81	9.51	-1.168

BnHY5-1 蛋白相对分子质量为 18 037.82, 不稳定指数为 61.67, 为不稳定类蛋白;等电点为 9.29;亲水性的平均值(GRAVY)为 -1.198。结果表明,该蛋白为不稳定、亲水性蛋白。

3.2.2 BnHY5 蛋白质三级结构预测

BnHY5 蛋白二级结构主要显示蛋白结构域主要是 α -螺旋结构,另外在非结构域部分为无规则卷曲和片层结构,以及少量 β -折叠。构象均存在亮氨酸拉链 α -螺旋以及 enhancer-binding protein beta 区域(CCAAT),进一步证明属于 bZIP 家族。*BnHY5* 氨基酸序列预测得到三级结构构象有 2 种:*BnHY5-1* 和 *BnHY5-4* 的构象如图 B1,而 *BnHY5-2*, *BnHY5-3* 的构象如图 B2;而拟南芥 *AtHY5* 转录

因子氨基酸序列预测得到的三级结构构象有两个独立构象(图 3),B3、B4 为分开的两个独立构象, B5 为合在一起的构象。根据 *BnHY5* 和 *AtHY5* 构象差异可以看出比拟南芥 *HY5* 能够产生的构象类型更为简单,推测甘蓝型油菜的 *HY5* 转录因子的作用功能更有可能与其他的转录因子相互作用以起到调控作用。

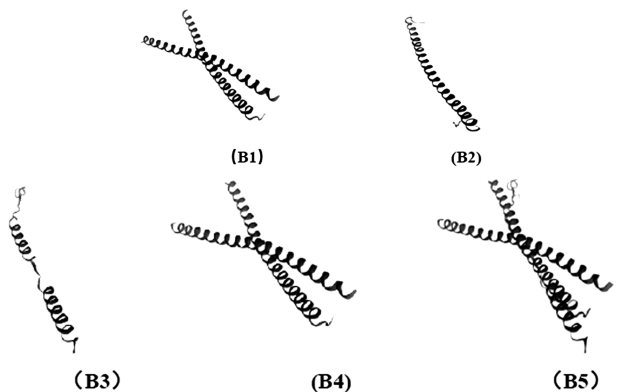


图 3 *BnHY5* 蛋白三级结构预测

B1. *BnHY5* 蛋白三级结构一类预测构象;B2. *BnHY5* 蛋白三级预测构象;B5. *AtHY5* 蛋白构象 1 和构象 2 共存时三级结构预测构象;B3, B4 为 *AtHY5* 蛋白构象 1 和构象 2;

Fig. 3 Prediction of tertiary structure of *BnHY5* protein

3.3 BnHY5 蛋白系统进化树的构建

利用 MEGA-X 软件^[13] 中 Neighbor Joining

算法构建系统进化树(图 4),使用泊松校正方法计算进化距离,使用最大复合似然法计算进化距离,

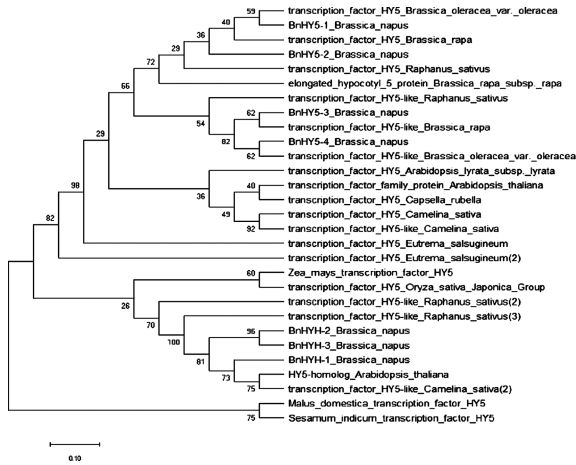


图 4 *BnHY5* 蛋白系统进化树分析

标尺上数字代表碱基替换率,在分支旁边显示了相关分类群在引导测试中聚集在一起的进化树的百分比(1 000 个重复).

Fig. 4 Evolutionary relationships of *BnHY5* protein

并以每个位点的碱基取代数为单位^[17]. *BnHY5* 与双子叶植物十字花科物种中甘蓝和芜菁 *HY5* 的亲源关系最近,与芜菁的同源性为 89%,与萝卜的为 86.8%. 与白菜等 *HY5* 的蛋白具有较高的同

源性. 与亚麻荠的亲源关系最远,蛋白同源性为 42.86%. 十字花科不同种属的植物的 bZIP 作用结构域是高度保守的. 进一步说明 bZIP 家族蛋白的遗传进化是保守的. 另外从进化树可以看出,甘蓝型油菜 *HY5* 与双子叶植物苹果、芝麻 *HY5* 的亲源关系较远;与单子叶植物水稻、玉米 *HY5* 的亲源关系又比双子叶植物的更远.

3.4 *BnHY5* 基因在油菜不同生长期不同组织的表达分析

以 β actin 为内参,油菜中各个器官中 *BnHY5* 基因的表达情况如图 5(ss2、ss4 表示苗期的二叶一心和四叶一心时期;bs 表示抽薹期,fs 表示花期). *BnHY5* 基因在甘蓝型油菜整个生长周期中均要表达,但表达量存在差异. 在油菜的营养生长期,叶中的表达量最高,根、茎中表达量递减,同一生长期茎中表达量最低. 但在甘蓝型油菜进入生殖生长期后发生变化,叶片中的表达量随着植物体逐渐老化而逐渐降低. 抽薹期根中的表达量显著升高 ($P < 0.05$);*BnHY5-1* 花期茎中的表达量比抽薹期的高出 1/3. 在不断膨大的油菜角果中的表达量也比较高,花中的表达量与同时期叶中的表达量相当.

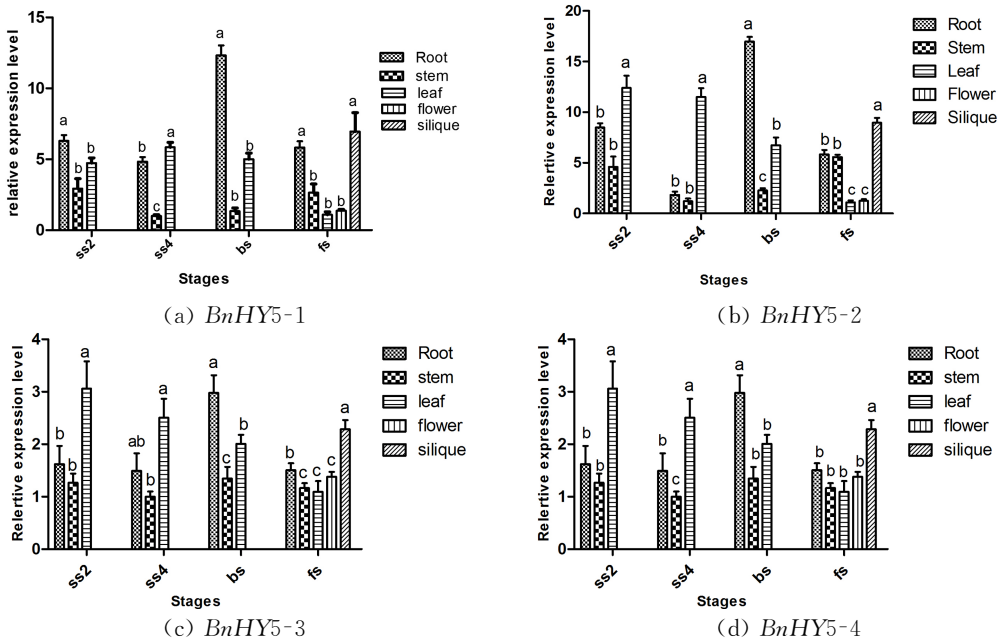


图 5 *BnHY5* 基因在油菜不同发育时期不同器官的相对表达量
a, b, c 表示 $P < 0.05$, 同组数据间达到差异显著

Fig. 5 Relative expression of *BnHY5* gene in different organs of different stages of rape

3.5 甘蓝型油菜 *BnHY5* 基因与同源基因 *BnHYH* 表达差异分析

光是影响 *HY5* 表达量变化的重要因素. 分析甘蓝型油菜 *BnHY5* 与其同源基因 *BnHYH* 在光

照和黑暗下的表达差异. 以 β actin 为内参基因, *BnHY5-1* 的表达量为标准, *BnHY5* 多个基因的表达量如图 6. 甘蓝型油菜 *HY5* 和 *HYH* 各基因光照下的表达量均高于黑暗下的表达量;但 *HYH* 各

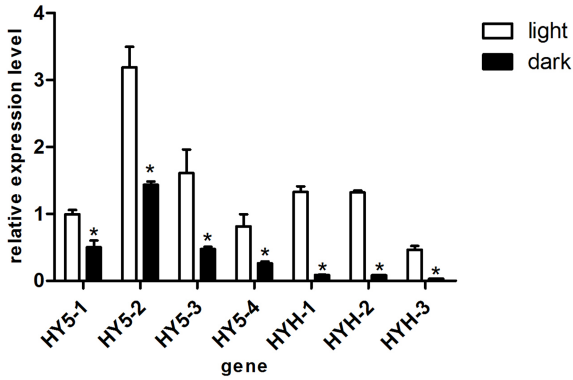
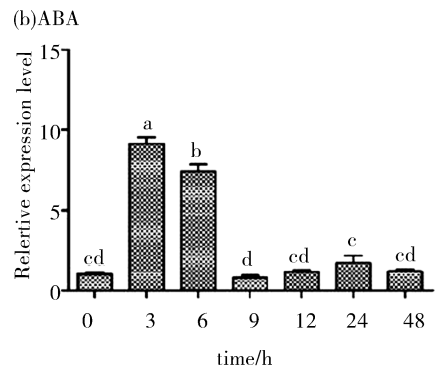
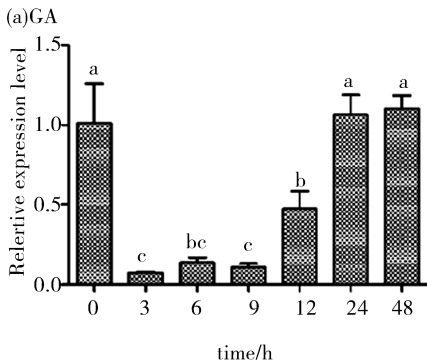


图 6 甘蓝型油菜幼苗光照与黑暗下重复基因的相对表达量

*: $P < 0.05$, 同个基因在光照下表达量与黑暗下的相比达到差异显著

Fig. 6 Relative expression of repeat genes in light and dark conditions of *Brassica napus* L.

基因在光照和黑暗下的表达差异要比 *HY5* 基因更大;并且在黑暗下,*HYH* 的表达量趋近于 0,说明黑暗条件下油菜中主要发挥作用的是 *HY5*. 甘蓝型油菜幼苗时期 *BnHY5* 四个基因均有表达,但表达量存在差异. 根据实验结果得知,无论是在黑暗还是光照下,*HY5-2* 与 *HY5-3* 的表达量相当且高于其他基因的表达量,*HYH-1* 和 *HYH-2* 的表达量高于其他基因的表达量. *HYH* 与 *HY5* 多个基因在无光条件下的表达量低于光照条件下的表达量. 表明 *BnHY5* 与 *BnHYH* 对光因子的响应存在



a, b, c, d 表示该处理下表达量数据间存在显著差异 ($P < 0.05$)

图 7 植物激素 ABA 与 GA_3 处理下甘蓝型油菜 *BnHY5-1* 基因的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *BnHY5-1* under ABA and GA_3 treatment

3.6 甘蓝型油菜 *BnHY5* 重复基因表达差异分析

与未做处理时油菜 *HY5* 各基因的表达量相比,甘蓝型油菜在高温胁迫(HT),冷胁迫(LT)和 ABA 喷洒后,*BnHY5* 的表达均上调. 在盐胁迫(salt)处理下,*BnHY5* 的表达均下调. 各个基因的表达量以同种处理中最低的一个为标准 1,甘蓝型油菜 *BnHY5* 各基因不同处理下的表达量见图 9

相似的表达调控机制和一定的协同性.

3.5 外源激素和非生物胁迫处理下 *BnHY5-1* 的表达分析

外源激素处理下甘蓝型油菜 *BnHY5-1* 基因的相对表达量如图 7 所示,以 0 h *BnHY5-1* 在油菜中的表达量为标准,得到该基因在不同时间段甘蓝型油菜中的相对表达量. 分析发现甘蓝型油菜在 GA_3 处理后,*BnHY5-1* 的表达下调,其 3 h 的表达量是 0 h 的 1/10;暗示 GA_3 是 *HY5* 的负调控因子. 在 ABA 处理后 *BnHY5-1* 表达上调,其 3 h 的表达量是 0 h 的 9 倍,在处理 3 h 后其表达量迅速增加,处理 9 h 后其表达量恢复至与 0 h 的相当非生物胁迫处理下甘蓝型油菜 *BnHY5-1* 的表达情况如下:盐胁迫与镉胁迫处理后 *BnHY5-1* 表达量如图 8(a), (b) 所示,分析发现甘蓝型油菜在盐胁迫下,*BnHY5-1* 的表达下调,暗示 *HY5* 是盐胁迫应答调控中的负调控因子. 镉胁迫处理后,*BnHY5-1* 表达上调,处理后 3 h 的表达量是未处理时的 3.2 倍;低温胁迫处理后 *BnHY5-1* 表达上调,并且其表达量在很短的时间内都呈大幅度变化的趋势,处理 2 h 后其表达量是未处理时的 12 倍,见图 8(d). 高温胁迫处理后,*BnHY5-1* 表达上调,处理 4 h 后其表达量是未处理时的 13 倍,见图 8(c),说明 *BnHY5-1* 响应非生物胁迫.

(a). 研究结果表明,在不同的非生物胁迫下,甘蓝型油菜中 *BnHY5* 四个基因表达量存在差异,*BnHY5-2* 的表达量是最高的. 以四个基因的表达量之和为 100%,分别计算单个基因的表达量占总量的比例,见图 9(b). 以此分析各基因在不同胁迫下表达量占比的差异. 据结果可以看出,同类型的胁迫下四个基因的表达模式相同,不同的胁迫下,四

个基因的表达模式发生变化. 例如在高温和低温胁迫下, 四个基因的表达量占比有着相同的特点: *HY5-2* 的表达量占比最高, 达到总量的一半, *HY5-4* 和 *HY5-3* 的占比为 24% 和 16%. 而 *HY5-1* 的占比最少. 而在盐胁迫中 (Salt stress), *HY5-1* 的表达量占比仅此于 *HY5-2*, 达到 31%. 由此可

知, 重复基因在非生物胁迫下的差异表达与非生物胁迫的类型相关. 不同类型的非生物胁迫, 植物中参与应答的调控通路不一样, 因此在这些通路中与 *HY5* 蛋白发生相互作用的因子就不同. 这可能是导致 *BnHY5* 重复基因在不同非生物胁迫下, 有不同的表达量占比的原因.

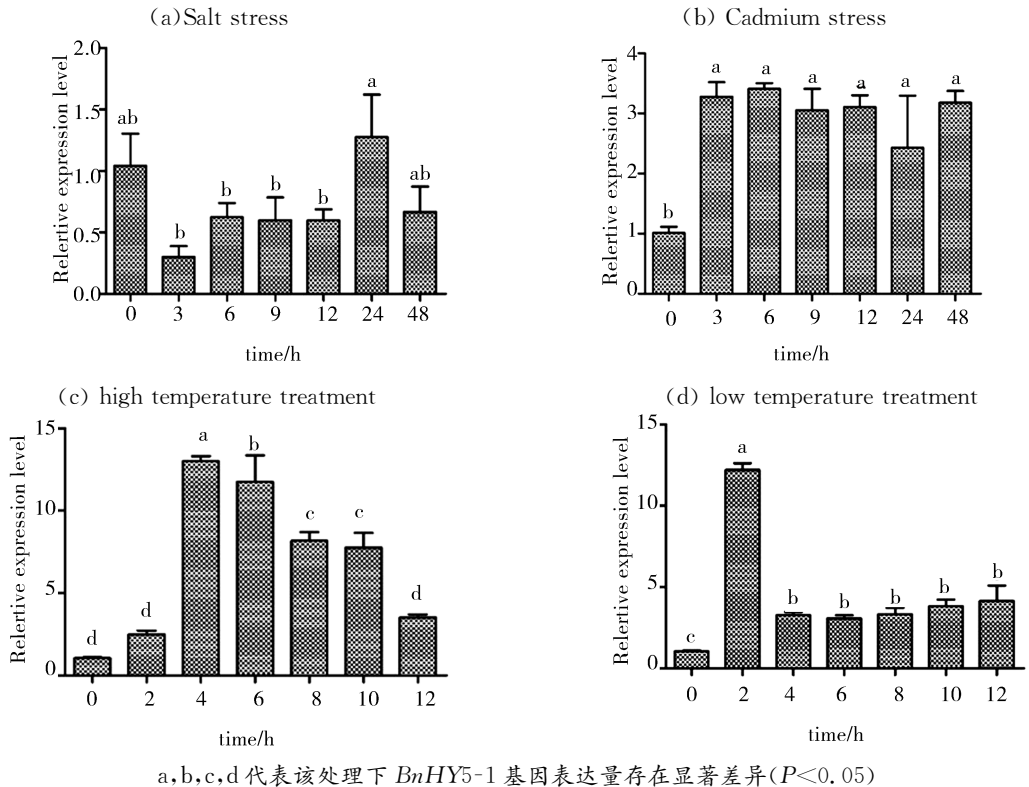


Fig. 8 Relative standard expression of *BnHY5-1* gene under abiotic stress treatment

4 讨论

4.1 拟南芥 *HY5* 蛋白与甘蓝型油菜 *HY5* 蛋白的差异分析

根据氨基酸序列比对, 找到了拟南芥 *HY5* 蛋白与油菜 *HY5* 蛋白主要的存在差异的部位. 发现氨基酸序列 50~60 处 4 个亲水性较强的氨基酸的缺少以及肽链中额外存在 4 处亲疏水性不同氨基酸的替代. 这种差异可能使得该结构域局部构型发生变化. 但是运用蛋白结构建模得出的 *HY5* 的 LZ 整体结构没有发生特别明显的改变. 这种差异对这个蛋白的结构与功能有什么影响需要进一步的研究.

4.2 甘蓝型油菜 *BnHY5* 与其同源基因 *BnHYH* 的异同

甘蓝型油菜 *HY5* 与其同源基因 *HYH* 在蛋白

结构上均有 bZIP 功能结构域和 COP1 interaction 区, 说明两者在光信号相关的信号通路中有着相似的功能. 甘蓝型油菜 *HYH* 蛋白亮氨酸拉链 (LZ) 部分关键的 50 个 (90~140) 氨基酸结构建模结果表明, 该部分不是仅仅可以形成 LZ Homodimer 部分, 还可以形成与异源二聚化和异源三聚化相关的 Nucleoporin Nup58/Nup45 Curated Alternative 类似的结构域; 和与核孔蛋白形成以及核定位相关的 Nuclear Distribution Protein Nude-like 1 结构. 而对油菜 *HY5* LZ 这 50 个氨基酸序列建模, 发现只存在亮氨酸拉链结构域; 说明油菜中 *HYH* 可能有着更多未知的功能. 甘蓝型油菜 *BnHY5* 与其同源基因 *BnHYH* 在黑暗下的表达量都低于光照下的表达量, 这与拟南芥中相关研究的结论一致^[8-9]. 光照条件下 *HY5* 不能与移动到细胞核外的 COP1

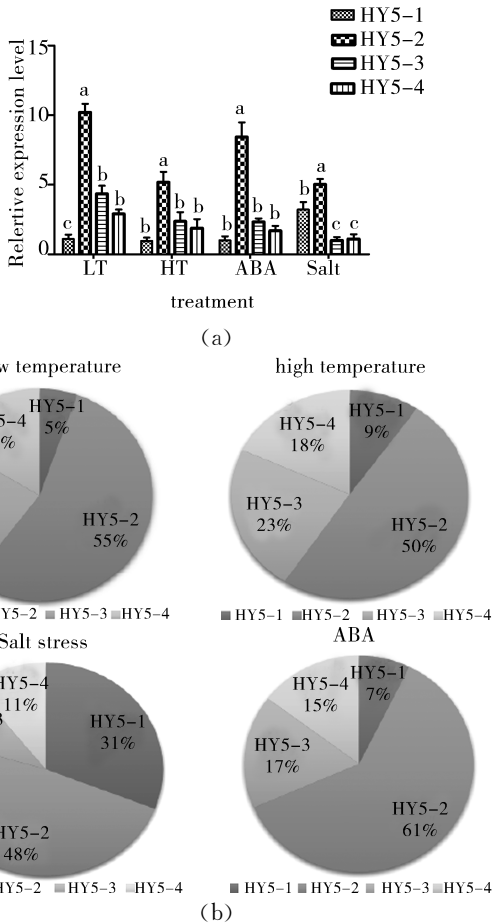


图9 甘蓝型油菜 *BnHY5* 重复基因在不同胁迫下的差异表达

(a) 不同处理下的各个基因的相对表达量;

(b) 不同处理下各个重复基因的表达占比, a, b, c 表示同个处理下基因相对表达量存在显著差异 ($P < 0.05$)

Fig. 9 Analysis of expression of *BnHY5* duplication with different treatments

相互作用,使其大量积累,促进了 HY5 转录因子下游信号的传递^[19]. 黑暗条件下, HY5 与在细胞核内积累的 COP1 的 N 末端结合使 HY5 蛋白泛素化降解,负调控 HY5 下游光形态建成下游基因的表达^[20],因此 HY5 在光照下比黑暗下的表达高. 油菜在黑暗下, HYH 的表达量趋近于 0,说明黑暗条件下油菜中主要发挥作用的是 HY5. 油菜 *BnHY5* 与其同源基因 *BnHYH* 在黑暗下的表达量都低于光照下的表达量,这与拟南芥中相关研究结论一致^[9,18,21]. 二者的表达模式与拟南芥 HY5 表达模式有着相同的特点,对 HY5 同源基因 HYH 功能差异方面的研究需要更加精细的结构研究和功能分析.

4.3 甘蓝型油菜 *BnHY5* 与非生物胁迫的关系

甘蓝型油菜 *BnHY5* 在非生物胁迫下表达量的变化是确实存在的,说明甘蓝型油菜 *BnHY5* 与

非生物胁迫相关. 盐胁迫下 *BnHY5* 的表达量下降,说明该基因在油菜盐胁迫的调控中是一个负调控因子. 甘蓝型油菜在外源 GA_3 处理后, *BnHY5* 的表达量下调了;这与其他研究中 GA_3 能够抑制 HY5 的积累^[21]的结论相证. 其他胁迫处理后 *BnHY5* 的表达变化证明了甘蓝型油菜 HY5 基因响应非生物胁迫. 从 *BnHY5* 表达分析看来,在油菜中具体的调控过程中, *BnHY5* 表达量的差异可能更强调量的变化带来的作用. 此外,同类型的胁迫处理下 *BnHY5* 重复基因有着相近的表达占比,而不同的非生物胁迫下, *BnHY5* 多个基因表达量占比存在差异;说明 *BnHY5* 重复基因很有可能与非生物胁迫相关. 推测在不同非生物胁迫下,它们的应答机制及反应时间和速度都是不同的. 但是重复基因表达的具体调控过程还需要更进一步的研究.

研究表明,在拟南芥光信号传递过程中有超过 60% 的基因是 HY5 的靶基因^[22-23]. HY5 转录因子 ACGT 序列是植物中的各种刺激响应基因启动子的一个核心区^[23]. HY5 转录因子参与植物胁迫下生命活动相关基因的调控,所以分析多种胁迫条件下 HY5 表达变化趋势是必要的. HY5 基因在非生物胁迫上的研究很少. 而甘蓝型油菜中该基因还存在多个重复基因. 本研究克隆所得四个甘蓝型油菜 HY5 重复基因存在功能,并且与非生物胁迫相关. 通过对甘蓝型油菜非生物胁迫下 *BnHY5* 的表达分析,了解到甘蓝型油菜在不同的非生物胁迫下的表达特点,以及重复基因对非生物胁迫的响应. 为未来培育抗逆性强的油菜品种提供了分子育种的理论基础.

参考文献:

- [1] 宋验红, 冯刚, 王茂林, 等. 甘蓝型油菜 *BnDHAR* 基因的克隆及表达分析[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2017, 54: 851.
- [2] Gangappa S N, Botto J F. The multifaceted roles of *hy5* in plant growth and development [J]. Mol Plant, 2016, 9: 10.
- [3] Chen X, Yao Q, Gao X, et al. Shoot-to root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition [J]. Curr Biol, 2016, 26: 640.
- [4] 崔荣秀, 张议文, 陈晓倩, 等. 植物 bZIP 参与胁迫应答调控的最新研究进展[J]. 生物技术通报, 2019, 35: 143.
- [5] Lindemose S, O'Shea C, Jensen M K, et al. Struc-

- ture, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 5842.
- [6] Yoon M K, Kim H M, Choi G, *et al.* Structural basis for the conformational integrity of the *Arabidopsis thaliana* HY5 leucine zipper homodimer [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 12989.
- [7] Dröge-Laser W, Snoek B L, Snel B. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family—an update [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2018, 45: 36.
- [8] Li C, Zheng L, Zhang J. Characterization and functional analysis of four HYH splicing variants in *Arabidopsis hypocotyl* elongation [J]. *Gene*, 2017, 619: 44.
- [9] Osterlund M T, Hardtke C S, Wei N, *et al.* Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2000, 405: 25.
- [10] Wang F, Zhang L, Chen X, *et al.* SlHY5 integrates temperature, light, and hormone signaling to balance plant growth and cold tolerance [J]. *Plant Physiol*, 2018, 179: 749.
- [11] Abbas N, Maurya J P, Senapati D, *et al.* *Arabidopsis* CAM7 and HY5 physically interact and directly bind to the HY5 promoter to regulate its expression and there by promote photomorphogenesis [J]. *Plant Cell*, 2014, 26: 1036.
- [12] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. *Comput Appl Biosci*, 1995, 11: 681.
- [13] Kumar S, Stecher G, Li M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35: 1547.
- [14] Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, *et al.* The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants [J]. *Plant Biotechnol J*, 2008, 6: 609.
- [15] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 24: 571.
- [16] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 11030.
- [17] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33: 1870.
- [18] Jonassen E M, Lea U S, Lillo C. HY5 and HYH are positive regulators of nitrate reductase in seedlings and rosette stage plants [J]. *Planta*, 2008, 227: 3.
- [19] Delker C, Sonntag L, James G V, *et al.* The DET1-COP1-HY5 pathway constitutes a multipurpose signaling module regulating plant photomorphogenesis and thermomorphogenesis [J]. *Cell Rep*, 2014, 9: 6.
- [20] Osterlund M T, Hardtke C S, Wei N, *et al.* Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2000, 405: 462.
- [21] Zhang Y, Liu Z, Liu R, *et al.* Gibberellins negatively regulate low temperature-induced anthocyanin accumulation in a HY5/HYH-dependent manner [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 5.
- [22] Riechmann J L, Heard J, Martin G, *et al.* *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. *Science*, 2000, 290: 2105.
- [23] Gangappa S N, Botto J F. The multifaceted roles of HY5 in plant growth and development [J]. *Mol Plant*, 2016, 10: 1353.

引用本文格式:

中文: 方艳, 岳出, 李洁, 等. 甘蓝型油菜 *BnHY5* 基因的表达模式及非生物胁迫响应分析 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2020, 57: 391.

英文: Fang Y, Yue C, Li J, *et al.* Expression pattern and abiotic stress response analysis of *BnHY5* in *Brassica napus* L. [J]. *J Sichuan Univ; Nat Sci Ed*, 2020, 57: 391.