

白桦*BpUVR8*基因的序列与表达模式分析

李晓一, 詹亚光, 娄晓瑞, 曾凡锁*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨150040

摘要: 本研究克隆了白桦(*Betula platyphylla*) *UVR8*基因, 命名为*BpUVR8* (GenBank: AHY02156)。生物信息学分析表明该基因全长1 326 bp, 编码441个氨基酸, 为稳定性蛋白, 不存在信号肽, 具有2个跨膜区。二级结构分析表明该蛋白属于混合型。三级结构预测结果显示, *BpUVR8*与*AtUVR8*蛋白结构具有较高相似性, 均由7个 β 螺旋组成片层结构。*BpUVR8*表达模式分析表明, 其主要在白桦叶片中表达, 且8月份表达量最高; 紫外诱导6 h, 其转录表达水平上调约2倍; 同时, 非生物胁迫以及信号诱导在一定时间内也能影响该基因的转录表达。本文为研究白桦对UV-B信号的响应以及对*UVR8*功能的深入研究提供参考。

关键词: 白桦; UV-B; *UVR8*; 生物信息学分析

太阳光作为自然界中重要的环境因子, 不仅为植物的光合作用提供能量, 而且影响植物的整个生长发育过程。UV-B是太阳光谱中的固有成分, 植物在接受太阳光能的同时, 不可避免地受到了UV-B的照射, 在长期的进化中, 植物体内形成了一套独特的响应和防御UV-B信号的机制。但是, 近年来大量研究表明, 由于大气臭氧层变薄, UV-B辐射增强, 这一机制遭到破坏, 植物的生长和发育受到了影响(Caldwell等1998; Brosché和Strid 2003; Jenkins和Brown 2007)。

植物通过光受体感知光信号, 通过各种信号转导途径调控和维持植物的生长发育, 而光受体又是由光吸收色素即发色团以及载体蛋白组成, 发色团决定了光受体的光谱敏感性。目前, 在植物中发现了4种主要的光受体: 光敏色素(phytochrome, phy)、隐花色素(cryptochrome, cry)、向光素(phototropin, phot)和UV RESISTANCE LOCUS 8 (*UVR8*)。*UVR8*是最新从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中分离并鉴定出的UV-B特异光受体(Rizzini等2011)。不同于其他3种光受体, *UVR8*没有任何外部的辅助因子作为发色团, 而是利用其固有的色氨酸Trp285和Trp233来充当发色团吸收UV-B (Wu等2012)。模式植物拟南芥中*AtUVR8*编码440个氨基酸残基, 与人类鸟嘌呤核苷酸因子regulator of chromatin condensation 1 (*RCC1*)蛋白有50%的序列相似, 但是这种相似仅仅是结构上的相似, 目前还没有研究发现二者在功能上的相似之处(Kliebenstein等2002)。*UVR8*作为UV-B特异光受体, 在高等植物中普遍存在且蛋白结构保守, 其对植物的光形态建成乃至整个生长发育历程具有重要的作用。

但是目前关于*UVR8*的研究主要集中于拟南芥等模式生物中, 木本植物中甚少。

本研究对前期获得的白桦(*Betula platyphylla*) *BpUVR8*基因进行了详细的生物信息学分析, 并通过与模式生物拟南芥*AtUVR8*的同源性比较, 对*BpUVR8*基因的功能进行了预测。同时, 对野生型白桦进行了不同时间和不同部位取材, 揭示了该基因的组织表达模式。本文亦研究了非生物胁迫、UV-B辐射等对该基因表达模式的影响, 旨在为进一步研究白桦*BpUVR8*基因的功能以及白桦自身对于UV-B信号的响应机制奠定基础。

材料与方法

1 材料

白桦(*Betula platyphylla* Suk.)植株取材于东北林业大学实验林场, 白桦茎段悬浮细胞由本实验诱导培养。

2 方法

5~9月的每月月初, 分别取白桦木质部、韧皮部、花序和叶片用液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱备用。将白桦茎段细胞在含有 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 噻苯隆(thidiazuron, TDZ)和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, 6-BA)的NT液体培养基中进行悬浮培养(温度 25°C , 湿度60%)。对白桦悬浮细胞进行低温(4°C)、高温(37°C)、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨

收稿 2015-12-07 修定 2016-04-17

资助 中央高校基本科研业务费专项资金(2572014DA04)、国家自然科学基金(31200463)和黑龙江省博士后启动基金(LBH-Q12166)。

* 通讯作者(E-mail: zengfansuo@126.com)。

酸(salicylic acid, SA)、 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱落酸(abscisic acid, ABA)以及 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl诱导处理, 每个处理均3次重复, 分别于处理后6、12和24 h取样, 每个时间点均设置未处理作为对照。UV-B照射处理白桦实生苗, 分别于处理后1、3和6 h取样, 3次重复并以未处理为对照。

采用荧光定量PCR技术对白桦UVR8基因在不同处理下的表达模式进行检测。应用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取不同样品的RNA, 反转录成cDNA进行RT-PCR, 扩增产物150~250 bp。模板为稀释10倍的cDNA, 所用引物详见表1, 实时荧光定量反应体系参照SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (TaKaRa)说明书进行, 每个样品重复3次。

表1 引物序列信息

Table 1 Information of primer sequences

名称	序列(5'→3')	用途
UVR8-F	TTGGGGACGAGGAGAGGATG	定量引物
UVR8-R	AATGCTTTGATTGGCTGAGGAGT	定量引物
TU-F	TCAACCGCCTTGCTCTCAGG	内参引物
TU-R	TGGCTCGAATGCACTGTTGG	内参引物

实验结果

前期研究克隆到了白桦*BpUVR8*全长基因(1 326 bp), 编码441个氨基酸, 提交GenBank登记号为AHY02156。

1 白桦*BpUVR8*基因核酸序列分析

利用BioXM软件对*BpUVR8*基因的cDNA序列进行分析, 结果显示该基因序列长度为1 326 bp; A、C、G、T碱基数目(比例)分别为337 (25.4%)、245 (18.5%)、378 (28.5%)和366 (27.6%); 分子量为817.44 kDa。

2 氨基酸的理化性质分析

利用在线软件ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)对*BpUVR8*蛋白的理化性质进行预测分析(Walker 2005), 结果表明, 该蛋白由441个氨基酸残基组成, 其中带负电荷的氨基酸残基有49个, 带正电荷的氨基酸残基有36个, 相对分子质量为47 369.7, 理论等电点为5.70, 不稳定系数为36.92 (该值小于40时, 预测蛋白质稳定, 反之则不稳定), 为稳定蛋白。

3 白桦*BpUVR8*蛋白的一级结构预测

3.1 亲水/疏水区域预测

疏水作用是维持蛋白质三级结构最重要的作用力, 其对蛋白质的稳定性、构象和功能具有重要意义。本文利用在线软件ProScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)对*BpUVR8*蛋白进行了疏水性预测(>0.5区域为疏水区, <-0.5区域为亲水区, 介于-0.5~+0.5之间主要为两性区域) (Walker 2005), 结果如图1所示, 数据统计发现该蛋白有194个亲水区域, 67个疏水区域, 总的平均疏水性为-0.337, 为亲水性蛋白。

3.2 信号肽及跨膜结构域的预测与分析

信号肽是指合成多肽链中用于指导蛋白质跨膜转移的氨基酸序列, 一般由15~30个氨基酸组成。利用在线软件SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对*BpUVR8*蛋白进行了信号肽的预测(Petersen等2011), 结果显示该蛋白的Y和C值不高, 且分值曲线不典型, 所以判定该蛋白不存在信号肽。

α 螺旋跨膜区主要由20~30个疏水性氨基酸组成。利用在线软件TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)对*BpUVR8*蛋白进行跨膜结构域的预测(Hofmann和Stoffel 1993), 结果如图2所示: 该蛋白跨膜预测曲线中有4个明显的跨膜特征, 从里到外有2个跨膜区域, 分别在16~38与229~250 aa之间; 从外到里有2个跨膜区域, 分别在16~35与225~250 aa之间。

4 蛋白质二级结构分析

蛋白质的二级结构是指多肽链主链骨架盘绕折叠而形成的构象, 借氢键维系。蛋白质二级结构可分为H、E、T和C四型, 分别代表螺旋、折叠、卷曲和线圈。当H>45%、E<5%时, 为全 α 型; 当H<5%、E>45%时, 为全 β 型; 当H>30%、E>20%时, 为 α - β 型; 其他情况为混合型。应用SOPMA在线软件(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)对*BpUVR8*蛋白的二级结构进行预测和分析(Sen等2005), 结果(图3)显示: α 螺旋占11.34%, 延伸链(extended strand)占26.53%, 因此, 该蛋白属于混合型。

5 蛋白质的三级结构分析

将*BpUVR8*蛋白序列提交到在线软件SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), 得到蛋白

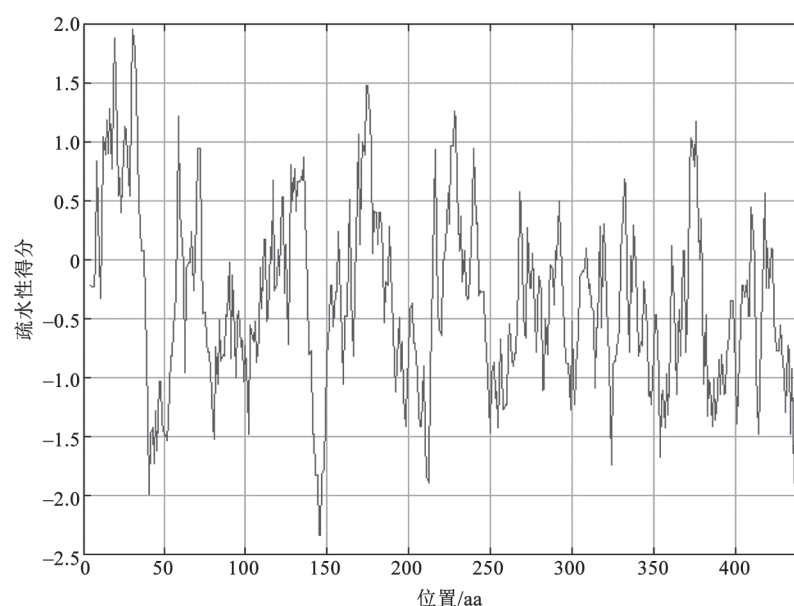


图1 白桦*BpUVR8*蛋白的亲/疏水性分析

Fig.1 Hydrophilic/hydrophobic analysis of *BpUVR8* protein in birch

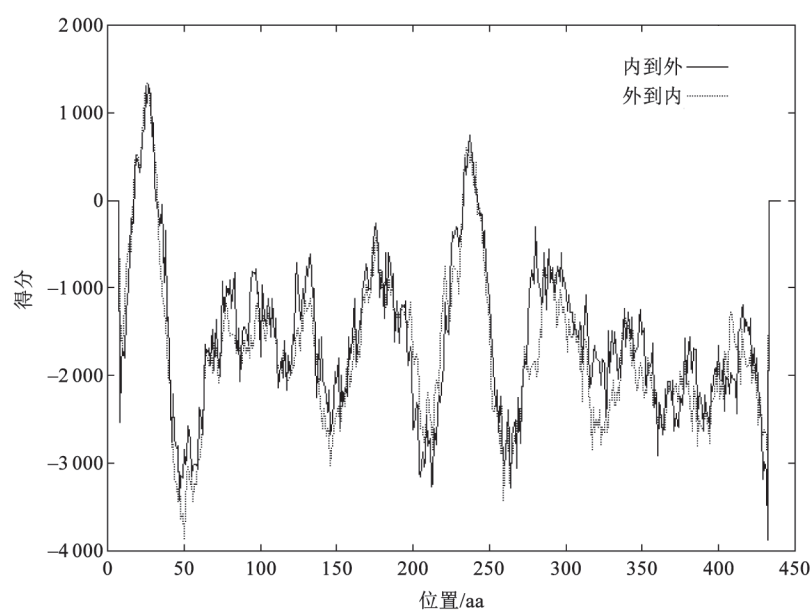


图2 白桦*BpUVR8*蛋白跨膜域预测与分析

Fig.2 Prediction and analysis of *BpUVR8* protein transmembrane domain in birch

质的三级结构(图4)。对比拟南芥*AtUVR8*蛋白的三维结构,我们发现*BpUVR8*与*AtUVR8*三维结构相似,均为由7个 β 螺旋构成的片层结构。

6 基因同源进化分析

利用NCBI数据库对*BpUVR8*基因编码的氨基酸序列进行同源序列比对。白桦中的*BpUVR8*蛋

白与芜菁(*Brassica rapa*)、拟南芥和棉花(*Gossypium raimondii*)等多种蛋白同源性极高,一致性均在80%以上。

系统发育树可以用来研究物种的进化史。选取同源性较高的15个物种的*UVR8*蛋白,利用MEGA 5.0软件,采用邻位相连(neighbor-joining)法

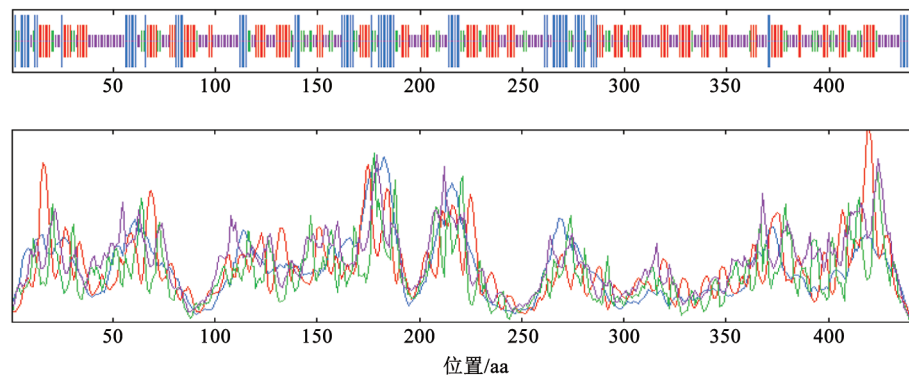


图3 白桦BpUVR8蛋白二级结构预测与分析

Fig.3 Prediction and analysis of secondary structure of BpUVR8 protein in birch

蓝色代表 α 螺旋, 红色代表延伸链, 绿色代表 β 转角, 紫色代表无规则卷曲。



图4 白桦BpUVR8蛋白三级结构预测

Fig.4 Prediction of tertiary structure of BpUVR8 protein in birch

构建系统发育树(Tamura等2007)。如图5所示, 15个物种的UVR8蛋白大致可分为2大类, 蓖麻(*Ricinus communis*)、烟草(*Nicotiana sylvestris*)、拟南芥、谷子(*Setaria italica*)和梅花(*Prunus mume*)为一类, 白桦、芜菁、棉花、胡杨(*Populus euphratica*)、葡萄(*Vitis vinifera*)、苹果(*Malus × domestica*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、玉米(*Zea mays*)和甜瓜(*Cucumis melo*)为另一类; 其中, BpUVR8与芜菁、胡杨UVR8蛋白的遗传距离较近, 说明他们进化的亲缘关系比较密切, 而与模式生物拟南芥UVR8蛋白的遗传距离较远, 说明他们进化的亲缘关系较远。

7 BpUVR8蛋白功能预测

为了进一步预测BpUVR8蛋白的功能, 将白桦

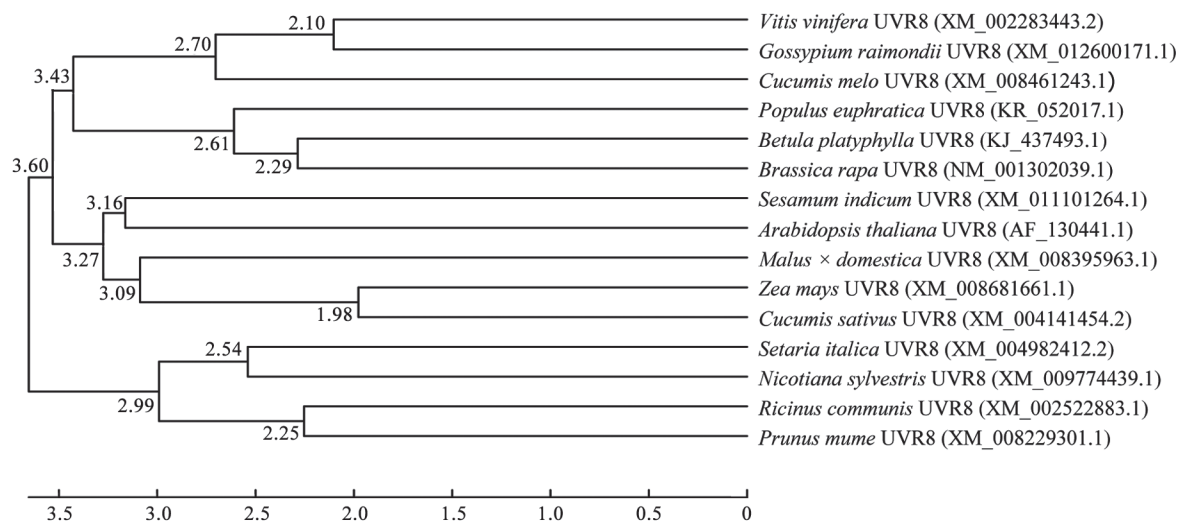


图5 白桦BpUVR8蛋白系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of BpUVR8 protein in birch

*BpUVR8*蛋白与拟南芥*AtUVR8*蛋白的保守功能域进行了对比。从图6中可以看出*BpUVR8*与*AtUVR8*均具有7个RCC1的蛋白保守结构域, RCC1是人类鸟嘌呤核苷酸因子, 说明这2个基因行使的功能和途径是相似的。将*BpUVR8*与*AtUVR8*基因编码的氨基酸进行对比, 发现这2种UVR8蛋白均含有14个高度保守的色氨酸残基, 拟南芥中Trp285和Trp233具有UV-B发色团的作用, 此外对RCC1的7个片层结构形成非常重要的4个甘氨酸残基在*AtUVR8*中是高度保守的(Wu等2011)。*BpUVR8*的氨基酸序列亦是如此。Christie等(2012)对UVR8重组蛋白的晶体结构进行分析, 证实*AtUVR8*是由7个片状的 β 螺旋纵向排列组成的环形结构, 中间形成充水通道, 这与我们预测的*BpUVR8*蛋白的结构相似。

8 白桦UV-B受体基因*BpUVR8*的表达模式分析

8.1 *BpUVR8*基因的组织表达模式分析

对白桦不同组织部位取样, 分析*BpUVR8*基因在白桦不同组织部位的表达情况。如图7所示, *BpUVR8*基因主要在白桦的叶片中高表达, 表达量约为花序中的6.5倍, 其他部位表达量较少, 由此推测, 白桦对于UV-B信号的响应可能主要发生在叶片中。

8.2 不同月份白桦叶片中*BpUVR8*的表达分析

*BpUVR8*基因在叶片中高表达, 所以我们选取了不同月份的白桦叶片分析其表达模式。如图8所示, 从6月开始, 白桦*BpUVR8*基因的表达量呈上升趋势, 8月*BpUVR8*的表达量最高, 约为6月的2倍。

8.3 UV-B诱导白桦*BpUVR8*基因的表达分析

对白桦实生苗进行UV-B胁迫处理, 在不同时

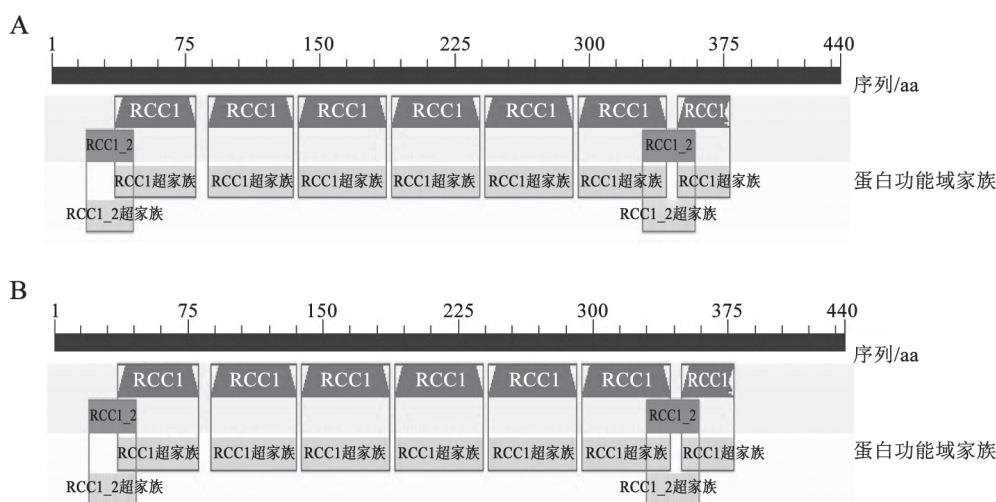


图6 *BpUVR8* (A)和*AtUVR8* (B)蛋白保守功能域示意图

Fig.6 The conserved functional domains of *BpUVR8* (A) and *AtUVR8* (B)

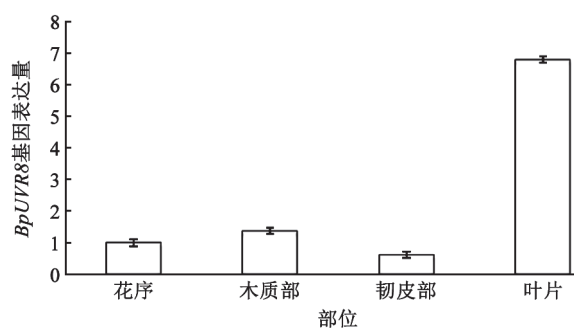


图7 白桦*BpUVR8*基因在不同器官中的表达

Fig.7 Expression pattern of *BpUVR8* in various tissues in birch

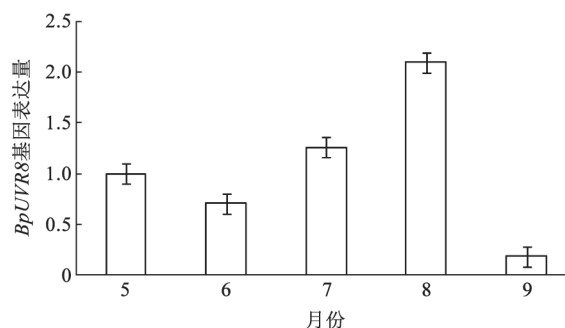


图8 不同月份白桦叶片中*BpUVR8*基因的表达分析

Fig.8 Expression of *BpUVR8* in birch leaves in different months

间点取样,分析*BpUVR8*基因表达量的变化(图9)。在UV-B诱导1和3 h后*BpUVR8*基因的表达量略有上升,但幅度不大,在诱导6 h后,*BpUVR8*基因的表达量约为对照的2倍。总体来说,*BpUVR8*基因的表达量上升得并不明显。

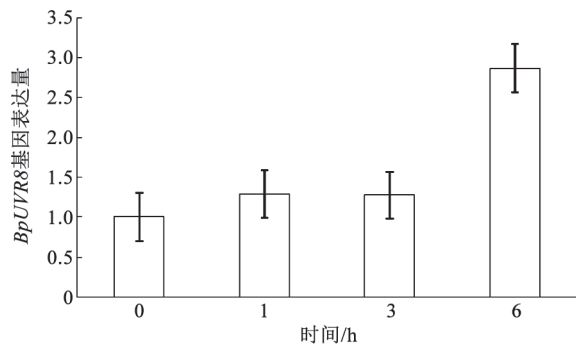


图9 紫外诱导不同时间下*BpUVR8*基因的表达分析
Fig.9 Expression of *BpUVR8* gene under UV induction after different time periods

8.4 白桦*BpUVR8*基因的非生物胁迫及信号诱导表达分析

对白桦悬浮细胞进行低温、高温、SA、ABA以及盐处理,并在处理后不同时间点取样。以未处理作为对照,用处理后测得的表达量减掉对照的表达量,表达水平上调为正,表达水平下调为负,结果如图10所示,低温处理6、12和24 h后,*BpUVR8*基因均表现为上调表达,其中6 h表达量最高;高温37°C处理6、12和24 h后,*BpUVR8*基因的表达模式也均为上调表达,24 h时表达量最高。

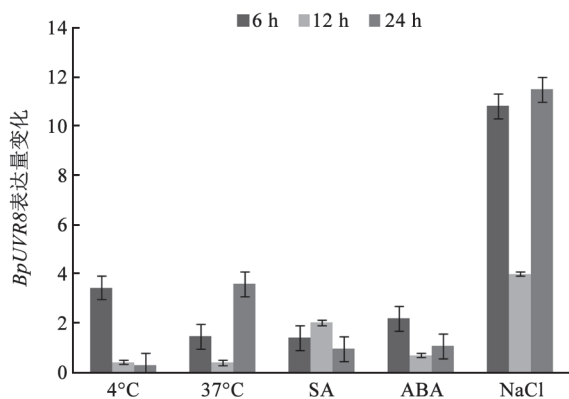


图10 非生物胁迫下*BpUVR8*基因的表达分析
Fig.10 Expression of *BpUVR8* under abiotic stress in birch

SA是植物中一种内生信号,用其处理悬浮细胞后,6、12和24 h时*BpUVR8*基因均表现为上调表达,说明在处理6 h之后,该基因对SA信号产生了响应。ABA处理后,*BpUVR8*基因为上调表达,且6 h时表达量最高,说明该基因在处理6 h后对ABA信号产生了响应,ABA在一定程度上能够影响该基因的表达。盐胁迫处理后,*BpUVR8*基因的表达模式为上调表达,且对比其他胁迫处理,该基因对盐胁迫处理的响应最明显。综上,*BpUVR8*基因对于非生物胁迫以及信号诱导具有响应。

讨 论

UVR8作为UV-B的特异光受体,通常以二聚体的形式存在于植物体中。当受到UV-B照射后,UVR8二聚体解聚为单体,在细胞核积累,与E3泛素连接酶CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)相互作用,释放HY5及HYH转录因子,打开了UV-B的信号通路,诱导了一系列防御基因的表达(Brown等2009)。拟南芥中*AtUVR8*基因编码440个氨基酸,其蛋白单体是由7个片状的 β 螺旋组成的球型蛋白, β 螺旋的顶端为色氨酸,*AtUVR8*蛋白中的14个氨基酸在不同物种中是相对保守的,其中Trp285和Trp233为UVR8蛋白的发色团。本研究中,我们将*BpUVR8*蛋白序列提交到SWISS-MODEL,得到蛋白质的三级结构,发现白桦*BpUVR8*蛋白与拟南芥*AtUVR8*蛋白三维结构相似,并且它们均含有相同的蛋白保守功能域,由此推测白桦*BpUVR8*与拟南芥*AtUVR8*基因行使的功能和作用是类似的。

光作为一种信号因子,不仅参与了植物的整个生长发育历程,而且还是植物逆境胁迫响应的重要信号来源。在进化过程中,植物体内形成了多种光受体,用来感知光信号,通过各种信号转导途径调控和维持植物的生长发育。光敏色素是植物感受外界光环境变化最重要的光受体之一,不仅参与调控了植物的生长发育,还参与介导了植物对各种生物和非生物胁迫的响应(Franklin等2014)。研究表明,光敏色素参与调控了植物干旱胁迫的响应,并且这种响应主要是通过ABA途径来进行的(Carvalho等2010)。干旱胁迫环境中,光敏色素PHYB过表达的棉花植株的单株结铃数、

单铃质量和籽棉产量均比对照植株高(Shamim等2013)。UVR8是目前唯一确定的UV-B的光受体, 本研究中我们发现, 对白桦悬浮细胞进行非生物胁迫处理以及信号诱导后, 内源的*BpUVR8*基因均表现为明显的上调表达, 其中, *BpUVR8*基因对盐胁迫处理的响应最为明显, 其表达量与对照相比上调最高。我们推测, 与光敏色素类似, UVR8作为光受体的一种可能也参与调控了植物的非生物胁迫的响应, 但其机制有待进一步研究。

目前, 对于UVR8介导的UV-B信号转导途径的研究取得了明显进展, 但是在UV-B信号转导途径中仍有很多机制尚不清楚。UVR8如何诱导基因的表达, 是否还有新的转录因子存在, 这些都有待进一步研究。

参考文献

- Brosché M, Strid Å (2003). Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiol Plantarum*, 117 (1): 1–10
- Brown BA, Headland LR, Jenkins GI (2009). UV-B action spectrum for UVR8-mediated *HY5* transcript accumulation in *Arabidopsis*. *Photochem Photobiol*, 85 (5): 1147–1155
- Caldwell MM, Björn LO, Bornman JF, Flint SD, Kulandaivelu G, Teramura AH, Tevini M (1998). Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 46 (1): 40–52
- Carvalho RF, Quecini V, Peres LEP (2010). Hormonal modulation of photomorphogenesis-controlled anthocyanin accumulation in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) hypocotyls: physiological and genetic studies. *Plant Sci*, 178 (3): 258–264
- Christie JM, Arvai AS, Baxter KJ, Heilmann M, Pratt AJ, O'Hara A, Kelly SM, Hothorn M, Smith BO, Hitomi K, et al (2012). Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science*, 335 (6075): 1492–1496
- Franklin KA, Toledo-Ortiz G, Pyott DE, Halliday KJ (2014). Interaction of light and temperature signalling. *J Exp Bot*, 65 (11): 2859–2871
- Hofmann K, Stoffel W (1993). TMbase – A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, 374: 166
- Jenkins GI, Brown BA (2007). UV-B perception and signal transduction. In: Whitelam GC, Halliday KJ (eds). *Light and Plant Development*. Oxford: Blackwell Publishing, 155–182
- Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL (2002). *Arabidopsis UVR8* regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human *regulator of chromatin condensation 1*. *Plant Physiol*, 130 (1): 234–243
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, 8 (10): 785–786
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, et al (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science*, 332 (6025): 103–106
- Sen TZ, Jernigan RL, Garnier J, Kloczkowski A (2005). GOR V server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*, 21 (11): 2787–2788
- Shamim Z, Rashid B, ur Rahman S, Husnain T (2013). Expression of drought tolerance in transgenic cotton. *ScienceAsia*, 39: 1–11
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Boil Evol*, 24 (8): 1596–1599
- Walker JM (2005). *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 571–607
- Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan C, Huang X, Zhang J, Yang P, Deng H, Wang J, et al (2012). Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature*, 484 (7393): 214–219
- Wu M, Grahn E, Eriksson LA, Strid Å (2011). Computational evidence for the role of *Arabidopsis thaliana* UVR8 as UV-B photoreceptor and identification of its chromophore amino acids. *J Chem Inf Model*, 51 (6): 1287–1295

The sequence and expression analysis of *BpUVR8* gene in birch

LI Xiao-Yi, ZHAN Ya-Guang, LOU Xiao-Rui, ZENG Fan-Suo*

College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: As a photoreceptor specifically for UV-B light, *BpUVR8* gene plays an important role in the photomorphogenesis and growing development in plants. We cloned the *UVR8* gene in birch, and named it as *BpUVR8* (GeneBank ID: AHY02156). The bioinformatics analysis shows that this sequence consists of 1 326 bp with a complete open reading frame, and encodes 441 amino acids. Furthermore, it is a stable hydrophobic protein. This protein may not contain signal peptide but have the transmembrane ability. The protein has two transmembrane domains. According to the tertiary structure prediction, the protein is constituted by a seven-bladed β -propeller, which has a high structural homology with AtUVR8 in *Arabidopsis thaliana*. The expression analysis of *BpUVR8* indicates that this gene expressed in various tissues, and the expression level in leaves is higher than others. The expression of *BpUVR8* in August is highest. Besides, this gene is not sensitive to the induction of UV-B signal. Abiotic stress can induce the expression of *BpUVR8* gene. This paper can provide a reference for the study of gene function in response to the UV-B signals.

Key words: *Betula platyphylla*; UV-B; UVR8; bioinformatics analysis

Received 2015-12-07 Accepted 2016-04-17

This work was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No. 2572014DA04), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31200463), and the Startup Funds for Postdoctoral Research in Heilongjiang Province (Grant No. LBH-Q12166).

*Corresponding author (E-mail: zengfansuo@126.com).