

## 研究报告 Original Papers

## 甘蓝型油菜钙离子转运蛋白CAX家族基因生物信息学及其对镉胁迫响应表达分析

廖琼<sup>1,2</sup>, 周婷<sup>1,2</sup>, 肖燕<sup>1,2</sup>, 唐天骄<sup>1,2</sup>, 宋海星<sup>1,2</sup>, 官春云<sup>3</sup>, 华莹鹏<sup>1,2,\*</sup>, 张振华<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>湖南农业大学资源环境学院, 长沙410128<sup>2</sup>南方粮油作物协同创新中心, 长沙410128<sup>3</sup>国家油料作物改良中心湖南分中心, 长沙410128

**摘要:** CAXs (Cation/H<sup>+</sup> exchanger antiporter) 是一类重要的阳离子跨膜转运蛋白, 在调控植物Ca<sup>2+</sup>平衡, 参与转运金属离子Cd<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>中发挥了重要作用, 但在甘蓝型油菜中尚缺乏系统研究。本文利用生物信息学的方法对甘蓝型油菜CAX家族成员的基因拷贝数、系统进化、进化选择压力、分子特征、保守基序、染色体定位、基因结构及其启动子区域所能结合的顺式作用元件进行了预测和分析; 同时采用荧光定量PCR分析了甘蓝型油菜*BnaCAXs*的组织表达模式及其对Cd<sup>2+</sup>胁迫的响应。结果表明, 甘蓝型油菜CAX家族共包含17个成员, 系统进化分析结果表明*BnaCAXs*与拟南芥进化相似, 并且明显地分为5个亚家族。*BnaCAXs*家族所有基因成员的K<sub>a</sub>/K<sub>s</sub>值均小于0.3, 受到强烈的纯化选择作用。大部分*BnaCAXs*均属于稳定的疏水蛋白, 并包含8~11个跨膜结构域。基因结构差异明显, 内含子数目从6~11不等, 并且Dof、MYB以及W-BOX是其启动子上丰度较大的顺式作用元件, 可能参与到*BnaCAX*抗逆过程的调控。荧光定量PCR结果表明, 甘蓝型油菜CAX基因主要在地下部表达; *BnaC4.CAX1-2*和*BnaC3.CAX2-2*是该家族的核心基因, 并受到Cd<sup>2+</sup>胁迫的显著诱导。

**关键词:** CAX (Cation/H<sup>+</sup> exchanger antiporter); 甘蓝型油菜; 镉胁迫; 生物信息学

Ca<sup>2+</sup>作为一种中量元素在植物生长发育过程中起到了十分重要的作用。Ca<sup>2+</sup>的功能不仅体现在稳固细胞壁和细胞膜以维持细胞完整性方面; 还能作为第二信使参与到植物抵抗非生物胁迫的各种途径中(Sanders等2002; Qudeimat等2008)。植物缺钙时生长受阻并且极易引发因缺素而导致的疾病, 最终影响作物产量和品质; 但Ca<sup>2+</sup>浓度过高则会打破植物体内Ca<sup>2+</sup>平衡, 引起Ca<sup>2+</sup>中毒和代谢紊乱(张璐等2015), 因此, 调控细胞质Ca<sup>2+</sup>浓度对维持细胞功能以及应对环境胁迫十分重要。液泡是植物细胞主要的钙离子储存库, Ca<sup>2+</sup>离子向液泡的累积主要依赖于Ca<sup>2+</sup>通道、Ca<sup>2+</sup>-ATPase (Ca泵)和Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>反向转运蛋白(Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger antiporter, CAX)等。

CAX是一类定位在质膜和液泡膜上的转运蛋白, 广泛存在于动植物以及微生物中, 利用液泡膜质子泵建立起的质子浓度梯度向液泡中逆向转运Ca<sup>2+</sup>。拟南芥CAX基因家族有6个成员, 包括CAX1~CAX6。CAX1编码低亲和Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白, *At-CAX1*在叶中高度表达, 根、茎和花中表达适中

(Cheng等2005)。*AtCAX2*在整个植物体中均有表达, 并且在花、维管组织以及幼嫩的顶端分生组织中表达强烈(Pittman等2004), *CAX2*过表达后, 植物向液泡区隔重金属能力增强, 导致植物体内Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>和Cd<sup>2+</sup>的累积能力增强, 说明CAX基因家族具有转运多种无机阳离子的能力(Hirschi等2000)。*AtCAX3*主要表达在根部和花中, *cax3*突变体中Na<sup>+</sup>和Li<sup>+</sup>稳态发生改变, 并且表现出对低pH的高度敏感性(Zhao等2008); 但在烟草中过表达CAX3时, 植株表型变化不明显(Shigaki等2002)。*AtCAX4*在植物大多数组织中的表达非常微弱, 但在根部表达较高(Cheng等2002)。在烟草中过表达CAX4基因能显著提高植物液泡对Cd<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>和Mn<sup>2+</sup>区隔容量, 其中对

收稿 2018-12-17 修定 2019-04-06

资助 国家重点研发计划(2017YFD0200103)、国家自然科学基金(31801923、31101596和31372130)和湖南农业大学‘双一流’建设(kxk201801005)。

\* 共同通讯作者: 张振华(zhzh1468@163.com)、华莹鹏(yingpenghua89@126.com)

Cd<sup>2+</sup>的区隔能力最强(Korenkov等2007)。水稻包含6个CAXs基因, 包括*OsCAX1a*、*OsCAX1b*、*OsCAX1c*、*OsCAX2*、*OsCAX3*和*OsCAX4* (Pittman和Hirschi 2016a)。研究表明, 在酵母中异源表达除去*OsCAX2*以外的水稻CAXs基因均能增强酵母细胞对Ca<sup>2+</sup>的耐受性(Kamiya等2005)。OsCAX4不仅能转运Ca<sup>2+</sup>, 还具有转运Mn<sup>2+</sup>和Cu<sup>2+</sup>等多种阳离子的能力(Yamada等2014)。苹果CAX基因家族有8个成员, MdCAXs是一类具有典型CAXs基因结构特点的转运蛋白, 并且对不同盐离子胁迫具有不同的响应表达模式(张璐等2015)。

甘蓝型油菜是世界范围内广泛种植的油料作物, 不仅是植物类食用油的重要来源, 同时在促进养殖业及轻纺工业的发展中发挥重要作用。甘蓝型油菜(A<sup>n</sup>A<sup>n</sup>C<sup>n</sup>C<sup>n</sup>, 1 345 Mb, 2n=4x=38)属于十字花科芸薹属, 起源于7 500年前白菜(A<sup>r</sup>A<sup>r</sup>, 485 Mb, 2n=2x=20) (Wang等2010)与甘蓝(C<sup>o</sup>, 630 Mb, 2n=2x=18)两个二倍体在自然远缘杂交(Liu等2014)。甘蓝型油菜发生异源多倍体事件后, 油菜基因组中的重复片段同源区远超过同属于十字花科的拟南芥(125 Mb, 2n=2x=10)。拟南芥、水稻和苹果等植物CAX家族基因分析和功能鉴定均有报道, 但对甘蓝型油菜CAX家族基因的研究甚少。了解甘蓝型油菜CAX家族基因分子生物学特性和功能对油菜的生长发育具有重要意义。

本研究以拟南芥*AtCAX*家族基因序列为源, 搜索了油菜全基因组数据库, 从而鉴定甘蓝型油菜CAX家族基因成员, 通过分析其分子生物学特性、系统进化关系、基因结构以及保守基序特征, 预测其启动子上的顺式作用元件, 并分析其对Cd<sup>2+</sup>胁迫的响应, 旨在为研究*BnaCAXs*生物学功能奠定基础, 同时为研究甘蓝型油菜CAX家族基因功能提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

拟南芥6个*AtCAX*基因ID号、基因组序列、CDS序列以及氨基酸序列均下载于TAIR (the Arabidopsis Information Resource, <https://www.arabidopsis.org/>); 油菜全基因组数据下载于油菜基因组数据库(<http://www.genoscope.cns.fr/brassicapapus/>),

其他物种序列下载于NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

本研究选用甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)供试材料‘湘油15’, 由国家油料作物改良研究中心湖南分中心提供。用于构建系统进化树的材料包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、深山南芥(*Arabidopsis lyrata*)、芥蓝(*Camelina*)、柑橘(*Citrus*)、萝卜(*Raphanus*)、白菜(*Brassica rapa*)和甘蓝(*Brassica oleracea*)。

### 1.2 芸薹属植物CAX家族基因成员鉴定

首先以*AtCAXs*为原始序列, 利用Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)和SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析*AtCAXs*得到其所具有的典型的跨膜结构域(Mem-trans); 同时利用油菜全基因组序列, 构建本地BLAST数据库, 以*AtCAXs*家族基因的Mem-trans序列执行本地BLAST (1e-003)搜索, 检索参数设定为E值<e<sup>-6</sup>, 最后删除氨基酸同源性低于35%以及氨基酸数量小于50的序列, 再将由此得到的序列置于Pfam和SMART工具检验候选序列是否具有CAX家族所具有的的典型结构域。对符合以上条件的基因进行命名, 命名方式为甘蓝型油菜名称缩写+染色体定位+同源基因名称, 如*BnaC4.CAX1-1*则表示定位在C4号染色体上的CAX1。

### 1.3 甘蓝型油菜CAX家族成员理化性质分析

将甘蓝型油菜的氨基酸序列提交至ExPASy (<http://expasy.org/>)进行氨基酸大小、相对分子质量、等电点不稳定系数和平均亲水系数的分析; 同时利用TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测甘蓝型油菜CAX蛋白的跨膜结构域。

### 1.4 不同物种CAX家族系统进化树的构建

利用MEGA 6.0中的ClustalW工具对所鉴定的甘蓝型油菜*BnaCAXs*蛋白序列、拟南芥、深山南芥、芥蓝、柑橘、萝卜、白菜和甘蓝等NCBI数据库中已收录的CAX序列进行多重比较分析, 并采用邻接算法(Neighbor-Joining)对分析结果构建系统进化树, 选择泊松校正法计算遗传距离, 抽样次数bootstrap值设置为1 000。

### 1.5 甘蓝型油菜CAX家族基因染色体定位及保守基序分析

利用甘蓝型油菜的基因编号在BRAD数据库中搜索*BnaCAXs*家族基因在染色体上的位置, 并统

计好位置信息,最后利用MapInspect软件绘制各同源基因在染色体上的分布图。MEME (Multiple Expectation maximization for Motif Elicitation, Version 4.11.2)用于分析预测甘蓝型油菜*BnaCAXs*家族基因的保守基序(motif),将*BnaCAXs*的蛋白序列提交至MEME,参数设置如下: motif个数设置为10,长度设置为6~50 bp。

### 1.6 芸薹属作物*CAX*基因进化选择压力分析

分别从油菜、白菜以及甘蓝基因组数据库(<http://www.genoscope.cns.fr/brassicapapus/>、<http://brassicadb.org/brad/>、<http://119.97.203.210/bolbase/index.html>)下载*CAX*家族同源基因的CDS序列,并利用MEGA 6.0软件的ClustalW工具对这些同源基因进行密码子比对,以fasta格式输出比对结果并去掉终止密码子,最终将结果导入*K<sub>a</sub>K<sub>s</sub>* Calculator (<https://sourceforge.net/projects/kakscalculator2/>)计算非同义突变频率(*K<sub>a</sub>*)和同义突变频率(*K<sub>s</sub>*)。

### 1.7 甘蓝型油菜*CAX*家族基因结构及启动子区域所能结合的顺式作用元件分析

将甘蓝型油菜*CAX*家族的基因全长序列以及CDS序列导入到GSDS 2.0软件(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)即可绘制*BnaCAXs*基因结构示意图。在油菜数据库(<http://www.genoscope.cns.fr/brassicapapus/>)中下载*CAX*同源基因起始密码子上游2.0 kb的序列,并将该序列提交至PLACE 30.0 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)以分析可以结合到启动子区域的顺式作用元件。

### 1.8 甘蓝型油菜*CAX*家族基因的时空表达和基因共表达网络分析

#### 1.8.1 油菜培养及镉处理方法

本试验在湖南农业大学植物营养与养分高效利用课题组光照培养室进行。首先选取大小一致的油菜种子使用1%的NaClO灭菌处理10 min,用超纯水将种子冲洗干净并置于4°C条件下春化24 h。将春化后的种子均匀播种在育苗盘上,发芽后选取长势一致的苗移栽至5 L的塑料盆中,并用Hogland营养液培养。温室培养条件如下,温度:22°C,光照强度:300~320  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,湿度:60%~75%,光照周期:14 h光照,10 h黑暗。正常培养条件下,当幼苗生长至10 d后分地上部和地下部采样,

用于*CAX*基因组织表达模式测定。镉处理方式:当幼苗生长至10 d时,将幼苗移栽至含10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CdCl<sub>2</sub>的营养液中培养,以正常营养液培养的作为对照,6 h后分地上部地下部取样;所采集的样品迅速冻于液氮保存。所有处理均设3次生物学重复。

#### 1.8.2 基因表达分析

为确定甘蓝型油菜*CAX*家族基因组织表达模式及对Cd<sup>2+</sup>胁迫的表达变化,利用实时定量PCR测定了*CAX*家族基因的相对表达情况。在提取RNA后,用Prime Script<sup>TM</sup> RT reagent Kit对RNA进行反转录,采用SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II进行RT-qPCR反应,试验过程均按各试剂盒的使用说明书进行。RT-qPCR反应采用20  $\mu\text{L}$ 体系: SYBR Premix Ex Taq II 10  $\mu\text{L}$ ,正、反向引物各0.8  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), cDNA 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:95°C,3 min;95°C,10 s;60°C,30 s;72°C,30 s,40个循环。以*BnaEF1- $\alpha$* 为内参。采用2<sup>- $\Delta\Delta\text{CT}$</sup> 方法计算各基因的相对表达量。RT-qPCR反应设置3次技术重复,采用DPS 7.05软件对结果进行差异显著性分析。所用引物序列见表1。

#### 1.8.3 基因共表达网络分析

基因共表达网络分析参照Hua等(2018)方法。相关阈值设置为默认参数(<http://plantgrn.noble.org/DeGNServer/Analysis.jsp>),然后用CYTOSCAPE v.3.2.1 (<http://www.cytoscape.org/>)进行关系图谱绘制。

## 2 实验结果

### 2.1 十字花科植物*CAX*家族基因拷贝数分析比较

利用拟南芥*CAX*家族7个成员的基因ID号以及氨基酸序列为查询对象,在NCBI数据库和油菜数据库中进行BLAST搜索分析。我们分别在二倍体十字花科作物白菜和甘蓝中鉴定到了8个和9个*CAX*成员,同时在异源四倍体甘蓝型油菜中鉴定到17个*BnCAXs*(表2),表明甘蓝型油菜在形成过程发生基因重组时并未出现基因缺失和增加事件。甘蓝型油菜的基因组最大,而且包含的*CAX*成员也最多;但在甘蓝型油菜、白菜和甘蓝中,*CAX6*均发生缺失。与拟南芥*AtCAX*家族基因一样,甘蓝型油菜*CAX*家族基因同样划分为5个亚家族,即*BnaCAXI*

表1 油菜内参基因和CAX家族基因qRT-PCR引物信息

Table 1 The qRT-PCR primer of CAX genes and key genes in *B. napus*

引物	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>BnaEF1-α</i>	GCCTGGTATGGTTGTGACCT	GAAGTTAGCAGCACCCCTTGG
<i>BnaC4.CAX1-1</i>	CTTGACCATCATCGTGGCG	CCAATCCCTTCATGTAGTGC
<i>BnaC4.CAX1-2</i>	GACGCACAAGATGAGGATGATC	CCCATGATTCGGATGCG
<i>BnaA5.CAX1-3</i>	ACTGAATCTGTCACGAGCCAGT	TGGTGGCCACAACATACTCC
<i>BnaA4.CAX1-4</i>	ATTGCTGACATGTCCCTGAG	GCTTCCTCAATGGTGGCT
<i>BnaC5.CAX2-1</i>	CTACATTCGGGAATGTGACG	GCAGAAGAAAAGCACAGCCT
<i>BnaC3.CAX2-2</i>	GAACCTTGAGCACAAAAGCCTG	GATTTAGTGGCGTGTTCGTGA
<i>BnaC1.CAX2-3</i>	CTGGTCCACTACATGATAGATAGC	TTCAGTCACGTTCGCCAAG
<i>BnaA5.CAX2-4</i>	ACCTTTCGGTCTCTAGCG	GCCAATGGTGTAAATGCCTATC
<i>BnaA3.CAX2-5</i>	GATACGCCACAGAGCAACTG	ACCACACGTATCAATCCATTC
<i>BnaA1.CAX2-6</i>	ACCGTCTTAAAAGCATCAG	AAGAAAAGCGCAGCCGAGT
<i>BnaC7.CAX3-1</i>	CCAATAACAAAGTGGCAGTG	CAAACCCATAAGCAGCAAG
<i>BnaA3.CAX3-2</i>	ACCTGCGATTGATTCAGAAC	CAGCAAGAGGTGTCAGACCTA
<i>BnaCn.CAX4-1</i>	GTTGCTTTGCTCTCCGACTAT	AAAGATGACGGCACCAGC
<i>BnaA10.CAX4-2</i>	GAACCTGCATCTTGCTGTTTCTG	GAACATCTGATCCATCTTCGC
<i>BnaC6.CAX5-1</i>	TTCCGAGACAACAACACC	ATATCCGAGACGTTTCAGCC
<i>BnaC3.CAX5-2</i>	GGCCTCTTAAACGTACATTC	GAGCAGCGTCAGTTGTACAAG
<i>BnaA8.CAX5-3</i>	CCGAGAGCGAAGAAACTTG	AGCACCTTCTATGGCATCG

表2 拟南芥、甘蓝型油菜、白菜和甘蓝CAX家族基因的拷贝数比较分析

Table 2 Comparative analysis of the number of the CAX family genes in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica* crops

物种名称	基因组大小/Mb	CAX1家族 数量/个	CAX2家族 数量/个	CAX3家族 数量/个	CAX4家族 数量/个	CAX5家族 数量/个	CAX6家族 数量/个
拟南芥	125	1	1	1	1	1	1
油菜	1 345	4	6	2	2	3	0
白菜	485	2	3	1	1	1	0
甘蓝	630	2	3	1	1	2	0

到*BnaCAX5*亚家族,共包含17个成员,分别为4个*BnaCAX1*、6个*BnaCAX2*、2个*BnaCAX3*、2个*BnaCAX4*以及3个*BnaCAX5*。

## 2.2 甘蓝型油菜CAX家族基因系统进化分析

为了研究不同物种CAX蛋白之间的分子进化和系统发育关系,我们从8种植物包括拟南芥、深山南芥、芥蓝、柑橘、萝卜、白菜、甘蓝以及甘蓝型油菜中共鉴定到了128个CAX基因,并利用其氨基酸序列构建了系统进化树(图1)。根据进化树的拓扑结构,可以将8个物种所包含的128个CAX基因分成5个亚类,即CAX1~CAX5,表明CAX基因分化发生在物种形成之前。油菜、白菜和甘蓝的亲缘关系十分相近,因此,每个亚类分支上这三个

物种的所包含的CAX基因均聚集在一起。此外,在每个亚家族中,大多数CAX编码蛋白分支长度都很短(图1),表明了基因分化发生时间不长。

## 2.3 十字花科作物CAX家族基因进化选择压力分析

在遗传学中, $K_a$ 表示核苷酸的非同义突变频率, $K_s$ 则表示同义突变频率;一般认为,同义突变不受到自然选择作用,而非同义突变则受到自然选择的作用。 $K_a/K_s$ 的比值可以用于判断在进化过程中是否有选择压力作用于该基因。当 $K_a/K_s$ 大于1时表示有正选择效应,即有利突变受到选择; $K_a/K_s$ 等于1表示中性选择;而 $K_a/K_s$ 小于1则表示有纯化选择作用,即无用突变逐渐被消除(Nekrutenko等2002)。为了比较作用于十字花科作物CAX家族基

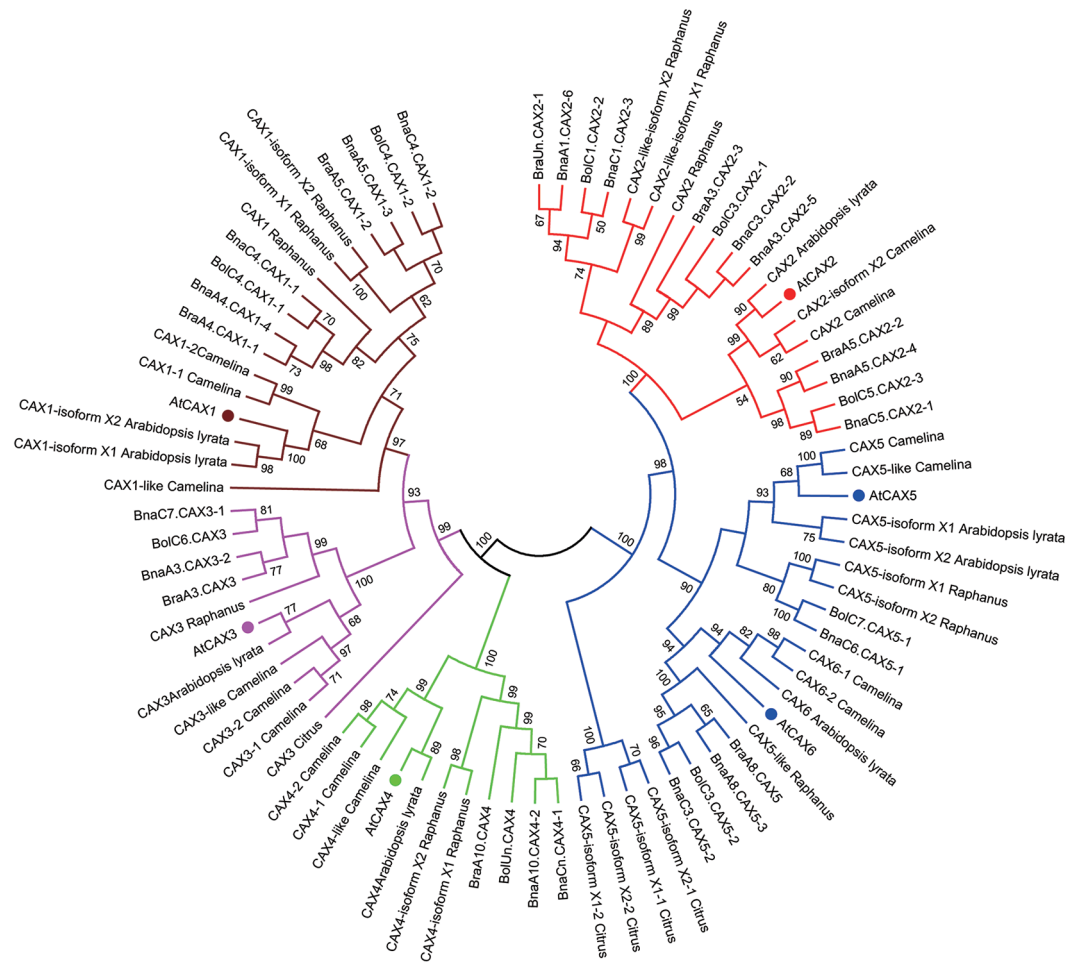
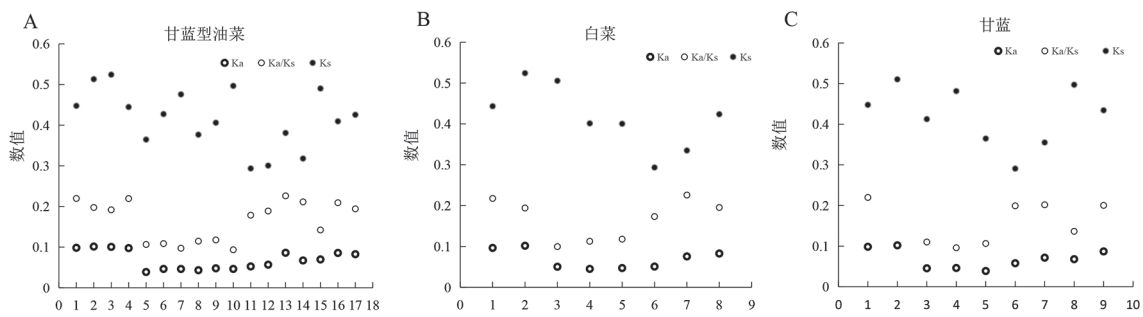


图1 8种植物的CAX家族进化关系分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of CAXs family in eight plant species

图2 十字花科作物CAX家族基因 $K_a$ 、 $K_s$ 及 $K_a/K_s$ 值Fig.2 The  $K_s$ ,  $K_a$  and  $K_a/K_s$  of CAX family genes in Brassica crops

因的选择压力, 我们利用 $K_a/K_s$  calculator软件计算了甘蓝型油菜、白菜以及甘蓝CAX基因的 $K_a/K_s$ 值。结果(图2)表明十字花科作物所有的CAX家

族基因成员 $K_a/K_s$ 值均小于0.3, 这也意味着这些基因受到强大的纯化选择作用, 更有助于保留基因功能。

## 2.4 甘蓝型油菜CAX家族成员理化特性分析

甘蓝型油菜共包含17个CAX成员, 其理化性质的基本信息见表2。17个*BnaCAXs*成员中编码序列最短的是*BnaCn.CAX4-1*, 长度为1 164 bp; 最长的是*BnaA3.CAX2-5*, 长度达1 503 bp, 两者分别编码了387和500个氨基酸。甘蓝型油菜CAX家族成员的等电点变化范围为4.71 (*BnaA1.CAX2-6*)~6.67 (*BnaCn.CAX4-1*)。大部分成员的不稳定系数均小于40, 只有*BnaC1.CAX2-3*、*BnaA3.CAX2-5*、*BnaA1.CAX2-6*和*BnaCn.CAX4-1*和*BnaA10.CAX4-2* 5个成员编码蛋白表现出较低的稳定性, 并且主要是*BnaCAX2*和*BnaCAX4*两个亚类的成员。甘蓝型油菜所有成员的平均亲水系数均为正值, 表明所有蛋白均属于疏水蛋白, 只是疏水程度大小不一。TMHMM Server v.2.0软件对*BnaCAXs*蛋白进行跨膜结构分析, 结果表明17个*BnaCAXs*成员均包含8~11个跨膜结构域。

## 2.5 甘蓝型油菜CAX家族基因染色体定位

为了更直观地观察甘蓝型油菜CAX家族基因的分布, 我们利用MapInspect软件绘制了染色体分

布图(图3)。甘蓝型油菜基因组包含A和C两个亚基因组, 17个*BnaCAXs*基因分别分布在6条A染色体(A1、A3、A4、A6、A8、A10)和7条C染色体上(C1、C3、C4、C5、C6、C7、Cn)。A染色体和C染色体分别包含8个和9个*BnaCAXs*。

## 2.6 甘蓝型油菜CAX家族成员保守基序鉴定与分析

甘蓝型油菜CAX家族成员按照与拟南芥CAX家族的同源性可划分为CAX1~5这5个亚类, 但亚类之间的氨基酸序列还是存在很大差异。为了确定甘蓝型油菜CAX蛋白序列的保守区域, 我们利用MEME对甘蓝型油菜CAX家族成员进行了保守基序的预测和分析, 保守基序(motif)的数目定义为10。预测结果如图4, 除*BnaCn.CAX4-1*以外的16个*BnaCAXs*成员编码蛋白均包含所预测的10个保守区段。*BnaCn.CAX4-1*的氨基酸序列只预测到7个保守基序, 不包括3、8、10这三个基序(图4-A)。由此可以推断其中的1、2、4、5、6、7、9这7个基序是甘蓝型油菜CAX家族的特征序列(图4-B), 可以作为鉴别*BnaCAX*家族成员的依据。

表3 甘蓝型油菜CAX家族成员信息

Table 3 Information of the CAX family members in *B. napus*

基因名称	基因库编号	编码序列长度/bp	氨基酸大小	相对分子质量/kDa	等电点	不稳定指数	平均亲水系数	跨膜结构域
<i>BnaC4.CAX1-1</i>	BnaC04g45720D	1 398	465	50 398.92	5.50	33.42	0.578	10
<i>BnaC4.CAX1-2</i>	BnaC04g07160D	1 398	465	50 293.76	5.64	32.88	0.567	8
<i>BnaA5.CAX1-3</i>	BnaA05g06490D	1 398	465	50 287.75	5.52	33.05	0.563	8
<i>BnaA4.CAX1-4</i>	BnaA04g21850D	1 398	465	50 341.87	5.50	33.31	0.589	8
<i>BnaC5.CAX2-1</i>	BnaC05g40050D	1 278	425	46 586.54	4.81	38.18	0.593	11
<i>BnaC3.CAX2-2</i>	BnaC03g37860D	1 383	460	50 358.64	5.04	38.93	0.492	10
<i>BnaC1.CAX2-3</i>	BnaC01g37750D	1 320	439	48 016.25	4.79	41.91	0.572	10
<i>BnaA5.CAX2-4</i>	BnaA05g26020D	1 323	440	48 207.55	4.91	39.26	0.596	11
<i>BnaA3.CAX2-5</i>	BnaA03g32760D	1 503	500	55 003.20	5.39	40.06	0.469	10
<i>BnaA1.CAX2-6</i>	BnaA01g29870D	1 329	442	48 306.44	4.71	40.95	0.546	10
<i>BnaC7.CAX3-1</i>	BnaC07g32560D	1 278	425	45 887.11	5.98	37.48	0.690	9
<i>BnaA3.CAX3-2</i>	BnaA03g41510D	1 383	460	49 829.33	5.57	37.67	0.532	11
<i>BnaCn.CAX4-1</i>	BnaCnng03980D	1 164	387	42 523.74	6.67	47.08	0.399	8
<i>BnaA10.CAX4-2</i>	BnaA10g27650D	1 467	488	53 277.35	5.89	45.52	0.491	11
<i>BnaC6.CAX5-1</i>	BnaC06g11060D	1 326	441	48 281.55	4.86	35.39	0.601	9
<i>BnaC3.CAX5-2</i>	BnaC03g70750D	1 236	411	45 192.98	5.02	35.57	0.632	11
<i>BnaA8.CAX5-3</i>	BnaA08g00350D	1 236	411	45 177.92	4.94	34.53	0.639	11

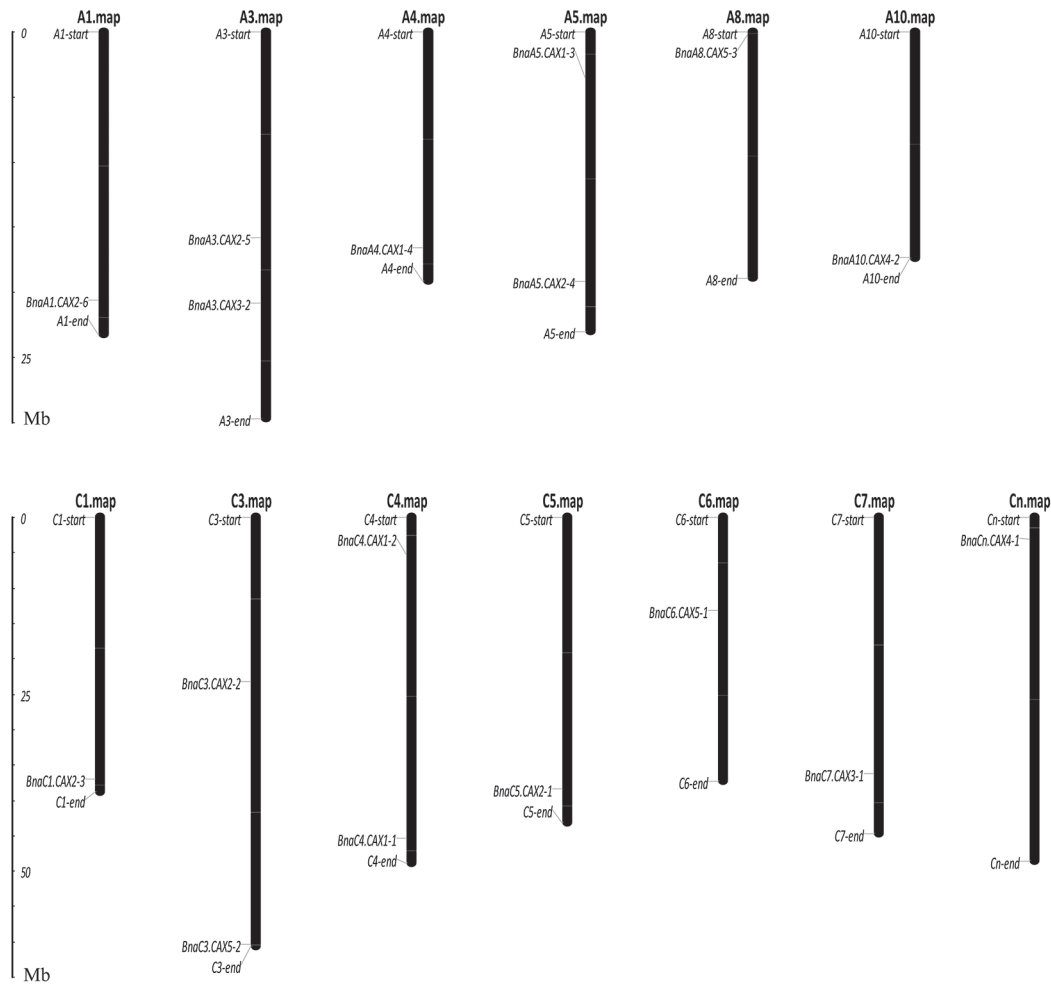


图3 甘蓝型油菜CAX家族基因染色体定位

Fig.3 Chromosomal location of the CAX family gene in *B. napus*

## 2.7 甘蓝型油菜CAX成员基因结构分析及其启动子位置所能结合的顺式作用元件分析预测

外显子-内含子的数目和结构是基因进化的典型印记。为确定甘蓝型油菜CAX家族基因的结构特征,我们利用*BnaCAXs*家族基因的基因序列和CDS序列绘制了基因结构图。结果表明,*BnaCAX1*和*BnaCAX3*两个亚家族分别包含4个和2个成员,这6个基因均包含9个内含子、10个外显子,并且内含子的长度比其他亚家族的成员长(图5-A)。在基因外显子-内含子的数目和结构上,*BnaCAX1*和*BnaCAX3*表现出一致性,同时这两个亚家族聚集在进化树的同一个大分枝,表明两者的进化关系十分相近(图1)。*BnaCAX2*亚家族有6个成员,但成

员之间的变异较大。具体而言,*BnaCAX2-1*包含8个内含子、9个外显子,*BnaCAX2-2*到*BnaCAX2-4*包含10个内含子、11个外显子,*BnaCAX2-5*和*BnaCAX2-6*包含11个内含子、12个外显子。内含子增益事件可能是基因选择性剪接的进化产物(Hua等2018)。*BnaCAX4-1*只包含6个内含子、7个外显子,而*BnaCAX4-2*包含11个内含子、12个外显子。*BnaCAX5*亚家族有3个成员,*BnaCAX5-1*包含10个内含子、11个外显子,*BnaCAX5-2*和*BnaCAX5-3*包含9个内含子、10个外显子。

转录因子(transcription factor)可以结合到基因启动子区域的顺式作用原件上,在调控基因表达方面起到了重要作用。为了研究甘蓝型油菜CAX家

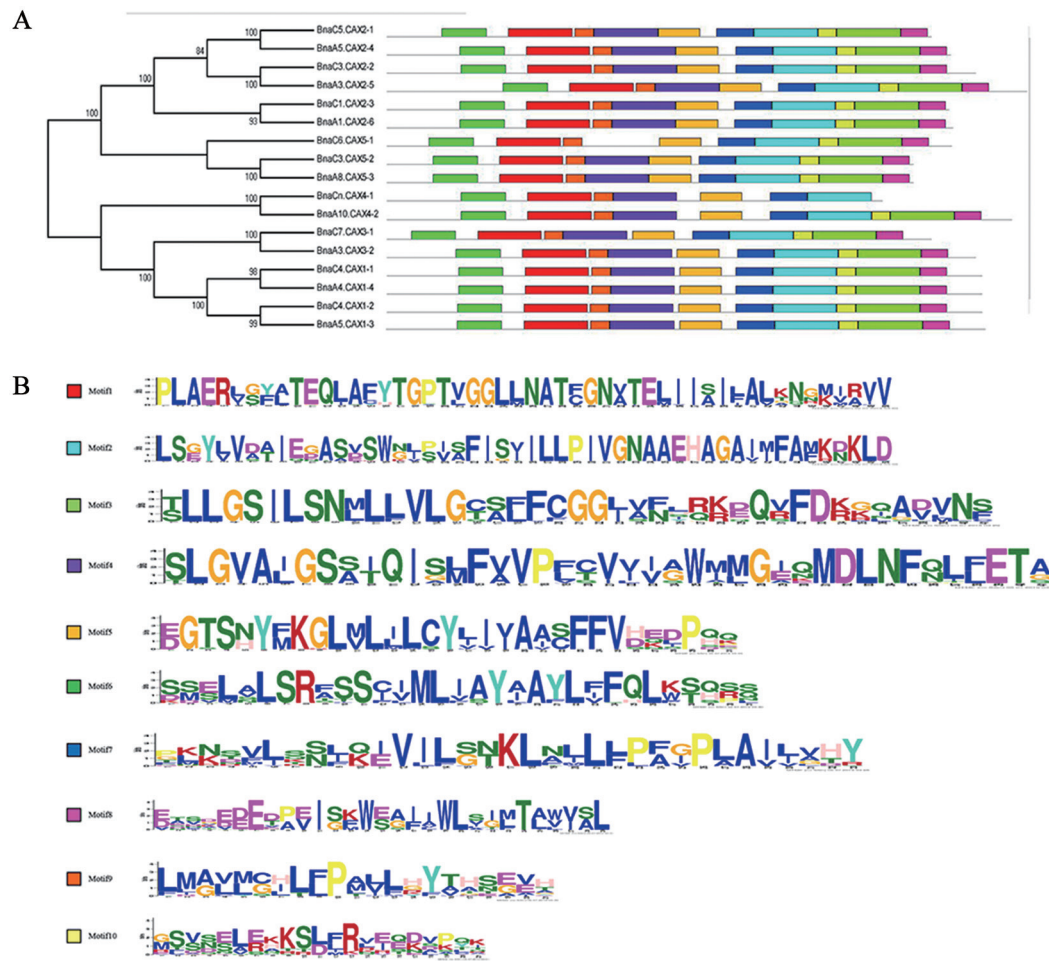


图4 甘蓝型油菜CAX家族成员进化关系及保守基序分布

Fig.4 Phylogenetic relationships and characterization of the conserved motifs in the CAX family members in *B. napus*

族基因启动子区域所能结合的顺式作用元件, 我们利用PLACE软件对*BnaCAXs*基因启动子进行了分析。结果如图5-B所示, 有22个顺式作用元件均能结合到*BnaCAX*家族基因的启动子, 其中丰度较大的主要有ARR1AT (NGATT)、CACTFTPPCA1 (YACT)、Dof (AAAG)、MYB、W-box和CAAT-BOX1。Dof和W-box元件在调控植物基因响应抗逆过程中发挥了重要作用。

## 2.8 甘蓝型油菜CAX基因组织表达模式及基因共表达分析

甘蓝型油菜CAX家族共包含17个成员, 但各成员的组织表达模式均有不同。如图6-A所示, *BnaCAX1*主要在地上部表达, 根部表达量较高的主要是*BnaC4.CAX1-1*和*BnaA4.CAX1-4*。在*Bna-*

*CAX1*亚家族中*BnaC4.CAX1-1*表现出绝对的高表达优势。而其他亚家族包括*BnaCAX2~5*都主要在根部表达, 但*BnaCAX5*家族的3个成员不论在地上部还是根部的表达都比较微弱。为了确定甘蓝型油菜CAX家族基因的核心成员, 我们构建了基因共表达网络, 结果(图6-B)表明在这17个*BnaCAX*成员中, *BnaC3.CAX2-2*和*BnaC4.CAX1-2*被确定为核心基因。正常生长条件下, *BnaC4.CAX1-2*主要在地上部表达, 而*BnaC3.CAX2-2*在根部的表达量较高。

## 2.9 甘蓝型油菜CAX家族主效基因对Cd<sup>2+</sup>胁迫的响应

CAX最初被确定为定位在液泡膜上负责将Ca<sup>2+</sup>转入液泡, 调节细胞质浓度的转运蛋白。但也有不少研究表明CAX转运蛋白的底物不仅仅局限于





图5 甘蓝型油菜CAX家族外显子和内含子分布图(A)及启动子区域结合的顺式作用元件(B)

Fig.5 Schematic representations of the exon-intron compositions (A) and identification of the putative *cis*-acting regulatory elements in promoter region of the CAX family in *B. napus*

$\text{Ca}^{2+}$ , CAX2和CAX4还能转运 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 等金属离子(Yamada等2014)。 $\text{Cd}^{2+}$ 是五大重金属元素之一,高浓度的 $\text{Cd}^{2+}$ 会抑制植物细胞的错配修复系统,导致DNA的损伤;镉对植物整体发育的影响主要表现在阻碍根系生长发育,使叶绿素降解,导致叶片黄化,降低光合作用速率和生物量甚至使植物死亡。为了确定甘蓝型油菜CAX家族基因对 $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫的响应,我们分别测定了BnaC4.CAX1-2和BnaC3.CAX2-2两个主效基因在 $\text{Cd}^{2+}$ 毒害条件下的基因表达量。结果(图7)表明BnaC4.CAX1-2和BnaC3.CAX2-2的表达均受到 $\text{Cd}^{2+}$ 的诱导。BnaC4.CAX1-2在地上部和根部的表达均受到 $\text{Cd}^{2+}$ 的显著诱导,诱导倍数分别达对照的2.3倍和3.8倍。

BnaC3.CAX2-2在地下部的表达倍数为对照的3.9倍,差异极显著。由此可见,甘蓝型油菜CAX家族基因很有可能参与到植物响应 $\text{Cd}^{2+}$ 胁迫过程。

### 3 讨论

甘蓝型油菜具有复杂而庞大的基因组,对其CAX家族基因进行系统性的分析鉴定具有重要意义。随着生物信息技术和测序技术的不断发展,通过比较基因组学的策略对不同基因家族进行分析已成为研究基因功能的热点。CAX编码 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运蛋白,在维持细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度,调控植物应对环境胁迫发挥重要作用。在拟南芥和水稻中均鉴定到6个CAX家族成员(Pittman和Hirschi 2016a),

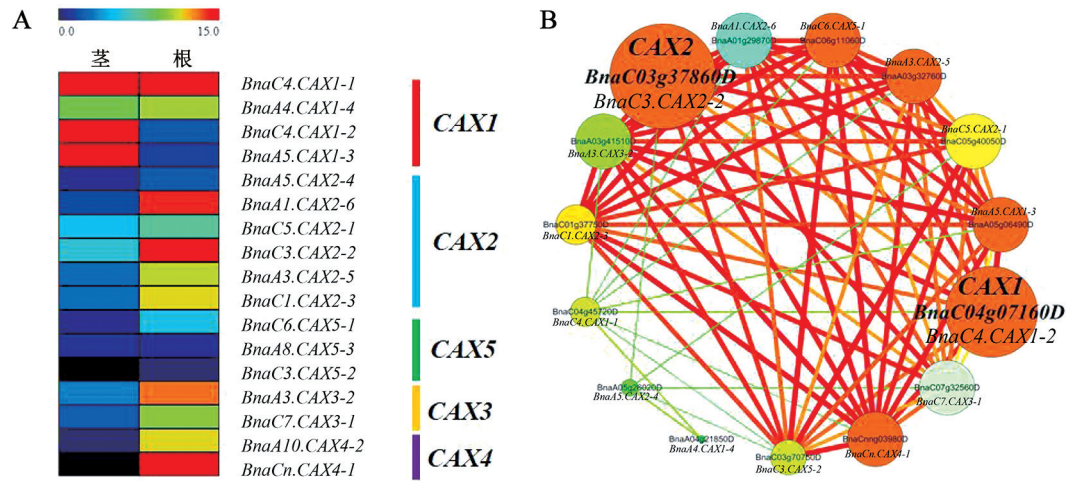


图6 甘蓝型油菜CAX基因表达图谱和基因共表达分析

Fig.6 Expression profiling and co-expression network analysis of the CAX family genes in *B. napus*

A: 在正常条件下地上部和地下部*BnaCAXs*基因表达谱; B: 甘蓝型油菜CAX家族基因共表达网络图。圆圈代表基因, 其大小代表该基因在网络中的作用, 2个圆圈之间的直线代表基因之间的相互作用。

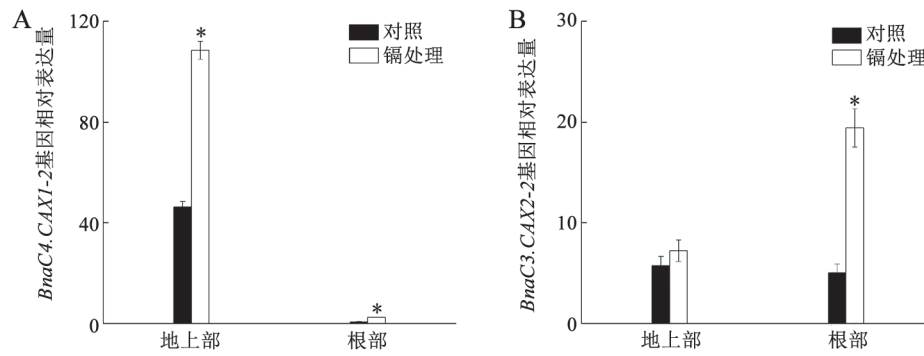


图7 Cd<sup>2+</sup>胁迫下甘蓝型油菜*BnaC4.CAX1-2*和*BnaC3.CAX2-2*基因表达分析

Fig.7 Expression of *BnaC4.CAX1-2* and *BnaC3.CAX2-2* genes of *B. napus* under Cd<sup>2+</sup> stress

误差线表示3个独立生物学重复的标准差, \*表示不同处理间差异性显著( $P < 0.05$ )。

苹果中CAX有8个(张璐等2015)。本研究利用拟南芥CAX家族基因为参考序列, 在甘蓝型油菜中鉴定到了17个CAX成员(表2), 数量远大于拟南芥、水稻及苹果中CAX的数量。这与基因组大小有密切关系, 拟南芥和水稻作为2种模式植物, 基因组大小分别为125和466 Mb, 苹果的基因组大小为742 Mb, 均小于甘蓝型油菜的基因组(1 345 Mb) (欧春青等2018)。此外, 甘蓝型油菜在形成过程中所经历的基因重复事件也是导致CAX家族基因数量扩充的主要原因。

系统进化分析结果表明甘蓝型油菜CAX家族

被分成5个亚类, 拟南芥、深山南芥和芥蓝中CAX5和CAX6亚家族在同一个大的进化分枝, 但油菜中CAX6亚家族缺失(图1), 这可能是由于CAX5和CAX6的基因功能相似, 在进化过程中导致CAX6成员的缺失。甘蓝型油菜CAX家族基因 $K_a/K_s$ 值均小于0.3 (图2), 表明该家族基因都受到强烈的纯化选择, 基因功能均得以保留(Nekrutenko等2002)。*BnaCAXs*与*AtCAXs*家族基因的内含子数目分别为6~11个和9~11个, 这两个物种的内含子数目十分接近, 表明该家族基因在进化过程中相对保守。此外, 通过PLACE软件预测到有22个顺式作用元

件均能结合到*BnaCAX*家族基因的启动子, 丰度较大的包括Dof、MYB和W-box等(图5-B), 这些元件在调控基因响应逆境胁迫均发挥了重要作用。研究发现, 水稻*OsCAX4*基因表达量在长时间盐胁迫条件下显著上升(Yamada等2014); 在拟南芥、烟草以及大豆中过表达*CAX1*能提高植物对盐胁迫的耐受性(Pittman和Hirschi 2016b)。此外, *AtCAX1*以及*GhCAX3*对于拟南芥和棉花适应低温条件必不可少(Catala等2003; Xu等2013)。由此可见, *CAX*家族在调控植物应对低温和盐胁迫逆境时发挥重要作用, 这可能也与Dof、MYB和W-box等顺式作用元件显著密切相关。

甘蓝型油菜共有17个*CAX*基因成员, 但其表达丰度和模式均有所差异。根据其表达模式差异, 我们利用基因共表达分析确定了*BnaCAX*家族的主效基因*BnaC3.CAX2-2*和*BnaC4.CAX1-2*。*CAX*最初被鉴定为Ca<sup>2+</sup>转运蛋白, 但随着研究不断深入, *CAX*的一些亚类还具有能转运Mn<sup>2+</sup>和Cd<sup>2+</sup>等金属离子的功能(Pittman和Hirschi 2016b)。Koren'kov等(2007)研究发现在烟草中过表达*CAX2*和*CAX4*能显著提高植物根部Cd<sup>2+</sup>累积, 限制其向地上部的转运。将景天的*CAX2-like*基因表达在烟草中同样能提高烟草对Cd<sup>2+</sup>的耐受性(Zhang等2016)。在Cd<sup>2+</sup>胁迫条件下, 拟南芥*AtCAX4*的表达显著提高(Mei等2009)。甘蓝型油菜*BnaCAX*家族中两个主效基因同样受到Cd<sup>2+</sup>胁迫的诱导(图7), 表明甘蓝型油菜*CAX*基因可能参与到转运Cd<sup>2+</sup>, 提高油菜Cd<sup>2+</sup>耐受性的过程, 但其功能和生理机制仍有待研究。

我国甘蓝型油菜主要分布在湖南、湖北和江西等南方稻油轮作区, 是重要的油料作物。然而, 南方稻油轮作区, 特别是湘南地区农业和工业面源污染, 以及土壤成土母质Cd<sup>2+</sup>背景值高等问题, 导致了较为严重的土壤Cd<sup>2+</sup>污染。甘蓝型油菜作为一种重要的经济作物, 具有生物量大、对重金属吸附能力强的特点(周旭丹等2015), 因此将甘蓝型油菜作为修复重金属污染的理想材料成为了当下研究的一个热点(冯刚等2018)。从分子生物学角度选育Cd<sup>2+</sup>耐受性强和富集能力高的油菜品种对于修复土壤Cd<sup>2+</sup>污染具有重要意义。我们的研究结果表明甘蓝型油菜*CAX*家族基因表达对Cd<sup>2+</sup>

胁迫具有特异性应答, 并从生物信息学的角度分析了*BnaCAX*家族基因的特征, 对后续深入研究甘蓝型油菜*CAX*家族基因在转运Cd<sup>2+</sup>及提高植物耐受性方面提供了理论依据。

### 参考文献(References)

- Catala R, Santos E, Alonso JM, et al (2003). Mutations in the Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> transporter *CAX1* increase *CBF/DREB1* expression and the cold-acclimation response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15 (12): 2940–2951
- Cheng N, Pittman JK, Shigaki T, et al (2002). Characterization of *CAX4*: an *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/cation antiporter. *Plant Physiol*, 128 (4): 1245–1254
- Cheng NH, Pittman JK, Shigaki T, et al (2005). Functional association of *Arabidopsis* *CAX1* and *CAX3* is required for normal growth and ion homeostasis. *Plant Physiol*, 138 (4): 2048–2060
- Feng G, Wang X, Bai JY, et al (2018). Analysis of the potential remediation of oilseed rape to soils contaminated with cadmium. *J Sichuan Univ*, 55 (1): 173–178 (in Chinese with English abstract) [冯刚, 王鑫, 白九元等(2018). 油菜对Cd污染土壤的修复潜力分析. *四川大学学报*, 55 (1): 173–178]
- Hirschi KD, Koren'kov VD, Wilganowski NL, et al (2000). Expression of *Arabidopsis* *CAX2* in tobacco altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol*, 124 (1): 125–133
- Hua YP, Zhou T, Song HX, et al (2018). Integrated genomic and transcriptomic insights into the two-component high-affinity nitrate transporters in allotetraploid rapeseed. *Plant Soil*, 427: 245–268
- Kamiya T, Akahori T, Maeshima M (2005). Expression profile of the genes for rice cation/H<sup>+</sup> exchanger family and functional analysis in yeast. *Plant Cell Physiol*, 46 (10): 1735–1740
- Koren'kov V, Park S, Cheng NH, et al (2007). Enhanced Cd<sup>2+</sup>-selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta*, 225 (2): 403–411
- Liu S, Liu Y, Yang X, et al (2014). The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nat Commun*, 5: 3930
- Mei H, Cheng NH, Zhao J, et al (2009). Root development under metal stress in *Arabidopsis thaliana* requires the H<sup>+</sup>/cation antiporter *CAX4*. *New Phytol*, 183 (1): 95–105
- Nekrutenko A, Makova KD, Li WH (2002). The *K<sub>A</sub>/K<sub>S</sub>* ratio test for assessing the protein-coding potential of genomic regions: an empirical and simulation study. *Genome Res*, 12 (1): 198–202

- Ou QC, Jiang SL, Wang F, et al (2018). Genome-wide identification and expression analysis of *auxin response factor* (*ARF*) gene family in pear. *Sci Agr Sin*, 51 (2): 327–340 (in Chinese with English abstract) [欧春青, 姜淑苓, 王斐等(2018). 梨全基因组生长素反应因子(ARF)基因家族鉴定及表达分析. *中国农业科学*, 51 (2): 327–340]
- Pittman JK, Shigaki T, Marshall JL, et al (2004). Functional and regulatory analysis of the *Arabidopsis thaliana* CAX2 cation transporter. *Plant Mol Biol*, 56 (6): 959–971
- Pittman JK, Hirschi KD (2016a). Phylogenetic analysis and protein structure modelling identifies distinct  $\text{Ca}^{2+}$ /Cation antiporters and conservation of gene family structure within *Arabidopsis* and rice species. *Rice (N Y)*, 9 (1): 3
- Pittman JK, Hirschi KD (2016b). CAX-ing a wide net: Cation/ $\text{H}^+$  transporters in metal remediation and abiotic stress signalling. *Plant Biol (Stuttg)*, 18 (5): 741–930
- Qudeimat E, Faltusz A M, Wheeler G, et al (2008). A  $\text{P}_{\text{HIB}}$ -type  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase is essential for stress adaptation in *Phycomitrella patens*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (49): 19555–19560
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, et al (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell*, 14: 401–417
- Shigaki T, Sreevidya C, Hirschi KD (2002). Analysis of the  $\text{Ca}^{2+}$  domain in *Arabidopsis*  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiporters CAX1 and CAX3. *Plant Mol Biol*, 50 (3): 475–483
- Wang DP, Zhang YB, Zhang Z, et al (2010). KaKs\_Calculator 2.0: a toolkit incorporating gamma-series methods and sliding window strategies. *Genom Proteom Bioinf*, 8: 77–80
- Xu L, Zahid KR, He LR, et al (2013). *GhCAX3* gene, a novel  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  exchanger from cotton, confers regulation of cold response and ABA induced signal transduction. *PLoS One*, 8 (6): e66303
- Yamada N, Theerawitaya C, Cha-um S, et al (2014). Expression and functional analysis of putative vacuolar  $\text{Ca}^{2+}$ -transporters (CAXs and ACAs) in roots of salt tolerant and sensitive rice cultivars. *Protoplasma*, 251 (5): 1067–1075
- Zhang M, Zhang J, Lu LL, et al (2016). Functional analysis of CAX2-like transporters isolated from two ecotypes of *Sedum alfredii*. *Biol Plant*, 60: 37–47
- Zhang L, Zhang S, Zhu LM, et al (2015). Bioinformatics and expression analysis of *CAX* gene family in apple. *J Nanjing Agri Uni*, 38 (1): 41–49 (in Chinese with English abstract) [张璐, 刘帅, 龙鸣等(2015). 苹果CAX基因家族生物信息学和表达分析. *南京农业大学学报*, 38 (1): 41–49]
- Zhao J, Barkla BJ, Marshall J, et al (2008). The *Arabidopsis cax3* mutants display altered salt tolerance, pH sensitivity and reduced plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase activity. *Planta*, 227 (3): 659–669
- Zhou XD, Zhao CL, Sun XG, et al (2015). Research on phytoremediation of cadmium polluted soil by *Capsella bursa-pastoris* and *Oilseed rape*. *Northern Horticulture*, (6): 167–172 (in Chinese with English abstract) [周旭丹, 赵春莉, 孙晓刚等(2015). 芥菜和油菜对镉污染土壤的修复效应研究. *北方园艺*, (6): 167–172]

## Identification and bioinformatics analysis of *CAX* family genes and their expression response to $\text{Cd}^{2+}$ stress in *Brassica napus*

LIAO Qiong<sup>1,2</sup>, ZHOU Ting<sup>1,2</sup>, XIAO Yan<sup>1,2</sup>, TANG Tian-Jiao<sup>1,2</sup>, SONG Hai-Xing<sup>1,2</sup>, GUAN Chun-Yun<sup>3</sup>, HUA Ying-Peng<sup>1,2,\*</sup>, ZHANG Zhen-Hua<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Resources and Environmental Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

<sup>2</sup>Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops, Changsha 410128, China

<sup>3</sup>National Center of Oilseed Crops Improvement, Changsha 410128, China

**Abstract:** *CAXs* (Cation/ $\text{H}^+$  exchanger antiporter) are a class of secondary energised ion transporter that primarily functioning in mediating  $\text{Ca}^{2+}$  transportation, which play an important role in transporting  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ . However, they are rarely studied in *Brassica napus*. In this study, the bioinformatical methods were employed to predict and analyze some bioinformatical parameters of *BnaCAXs*, including copy number, phylogenetic analysis, evolutionary selection pressure, molecular characteristics, conserved motifs, chromosome location, gene structures and the *cis*-acting elements binged in the promoter regions. Moreover, the expression pattern and gene expression response to  $\text{Cd}^{2+}$  of *BnaCAXs* were analyzed. The results showed that 17 members were identified in *BnaCAX* gene family, which divided into five subfamilies as *Arabidopsis thaliana*. The  $K_a/K_s$  of *BnaCAXs* were lower than 0.3, indicating a strong purify selection was acting on all the *BnaCAXs*. Most of the *BnaCAXs* were stable and hydrophobic, which compromised 8–11 transmembrane domains. The gene structures of *BnaCAXs* were varied, which were disrupted by 6–11 introns. Dof, MYB and W-BOX were the most abundant *cis*-acting elements binding to the promoter regions of *BnaCAXs*, which might participate in the regulation of stress tolerance. In addition, most of the *BnaCAXs* were mainly expressed in roots, and *BnaC4.CAX1-2* and *BnaC3.CAX2-2* were identified as the core members in *BnaCAX*, which were significantly induced by  $\text{Cd}^{2+}$ .

**Key words:** *CAX* (Cation/ $\text{H}^+$  exchanger antiporter); *Brassica napus*;  $\text{Cd}^{2+}$  stress; bioinformatics

Received 2018-12-17 Accepted 2019-04-06

This study was financially supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0200103), National Natural Science Foundation of China (31801923, 31101596 and 31372130), and Double First-Class Construction Project of Hunan Agricultural University (kxk201801005).

\*Co-corresponding authors: ZHANG ZH (zhzh1468@163.com), HUA YP (yingpenghua89@126.com).