

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201702004

引文格式: 赵宏魁, 殷恒霞, 胡桂莲, 等. 春性甘蓝型油菜 *BnFY34* 基因的克隆及序列分析 [J]. 广西植物, 2018, 38(1): 84-89
ZHAO HK, YIN HX, HU GL, et al. 春性甘蓝型油菜 *BnFY34* 基因的克隆及序列分析 [J]. *Guihaia*, 2018, 38(1): 84-89

春性甘蓝型油菜 *BnFY34* 基因的克隆及序列分析

赵宏魁^{1,2}, 殷恒霞^{3*}, 胡桂莲¹, 罗玉秀⁴, 周华坤², 石国玺², 姚步青²

(1. 海南州少数民族科普和信息中心, 青海 恰卜恰 813099; 2. 中国科学院西北高原生物研究所 青海省寒区恢复生态学重点实验室, 西宁 810008; 3. 青海大学 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016; 4. 青海大学 生态环境工程学院, 西宁 810016)

摘要: 春性甘蓝型油菜杂交种由于发育期较长, 极大地限制了该油菜在高寒地区的推广。为了从春性特早熟甘蓝型油菜中筛选出苗期和蕾期差异表达的基因, 该研究以春性特早熟甘蓝型油菜为材料, 利用 cDNA-AFLP 技术筛选出 1 个春性特早熟甘蓝型油菜苗期特异表达的基因片段, 并采用 RACE 技术成功分离克隆了该基因, 命名为 *BnFY34*。通过对该基因的测序和生物信息学分析, 发现该基因序列大小为 455 bp, 包含完整的开放阅读框(ORF), 编码一个由 71 个氨基酸残基组成的蛋白, 推测的蛋白质分子量为 8.04 kD, 理论等电点为 10.25, 其三级结构中含有 3 个 α 螺旋, 不含 β 折叠。同时, 将 *BnFY34* 基因与甘蓝型油菜基因组序列进行比对, 结果显示 *BnFY34* 基因位于 C4 染色体上, 由 3 个外显子和 2 个内含子组成。另外, 通过对该基因与其他植物同源基因的亲缘关系进行了分析, 结果表明 *BnFY34* 基因与芸薹属植物属于同一亚族, 并且与甘蓝型油菜中已报到的未注释基因 XM_013837282.1 的相似度达 100%, 其功能有待进一步研究。该研究结果对春油菜产量和品质的早熟转基因育种具有重要意义。

关键词: 甘蓝型油菜, 发育, 基因表达, cDNA-AFLP

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)01-0084-06

Clone and sequence analysis on gene *BnFY34* from spring rapeseed (*Brassica napus*)

ZHAO Hongkui^{1,2}, YIN Hengxia^{3*}, HU Guilian¹, LUO Yuxiu⁴,
ZHOU Huakun², SHI Guoxi², YAO Buqing²

收稿日期: 2017-07-04

基金项目: 国家自然科学基金(31472135, 31672475); 青海省海南州科技合作项目(2015-HZ-01); 三江源生态与高原农牧业国家重点实验室开放课题(2017-KF-02)和自主课题(2017-ZZ-09); 青海省重点实验室发展专项(2014-Z-Y01); 青海省创新平台建设专项(2017-ZJ-Y20); 青海省自然科学基金(2017-ZJ-940Q, 2016-ZJ-910, 2016-ZJ-957Q) [Supported by the National Science Foundation of China (31472135, 31672475); Science and Technology Cooperation Program of Hainan Prefecture of Qinghai Province (2015-HZ-01); Open Program (2017-KF-02) and Independent Program (2017-ZZ-09) of State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University; Special Fund for the Development of Key Laboratory Program of Qinghai Province (2014-Z-Y01); Special Fund for Innovation Platform Program, Qinghai Province (2017-ZJ-Y20); National Science Foundation of Qinghai Province (2017-ZJ-940Q, 2016-ZJ-910, 2016-ZJ-957Q)].

作者简介: 赵宏魁(1964-), 男, 青海大通人, 高级工程师, 主要从事高原农牧业与生态保护研究 (E-mail) 1156382012@qq.com。

*通信作者: 殷恒霞, 讲师, 主要从事植物适应性进化等研究 (E-mail) hengxiayin@lzb.ac.cn。

(1. Hainan State Ethnic Minority Science and Information Center , Qiabuqia 813099 , Qinghai , China; 2. Northwest Plateau Institute of Biology , Chinese Academy of Sciences , Key laboratory of restoration ecology of cold area in Qinghai Province , Xining 810008 , China; 3. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture , Qinghai University , Xining 810016 , China; 4. College of Ecological Environment and Engineering , Qinghai University , Xining 810016 , China)

Abstract: Rape , belonging to *Brassica* (Cruciferae) , is an important oil crop widely cultivated in China due to its wide adaptability. Spring rapeseed (*Brassica napus*) is widely cultivated in Qinghai Province due to its high yield and quality , however , it has been greatly restricted the promotion of rape in alpine region because of its long development period. Therefore , screening differentially expressed genes in seedling and bud stages plays an important role in early seedling breeding of spring rape with high yield and quality. In this study , a gene , named *BnFY34* , specifically expressed gene under seedling stage , was screened out with cDNA-AFLP , and successfully cloned in full-length 455 bp with RACE , including complete Open Reading Frame (ORF) and coding a protein with 71 amino acid residues. The protein has a molecular weight of 8.04 kD and a theoretical isoelectric point of 10.25. Furthermore , three α -helix and no β folding structures existed in the tertiary structure of protein *BnFY34*. The *BnFY34* gene was compared with the genome sequence of *Brassica napus*. The results showed that the *BnFY34* gene located in the C4 chromosome of *B. napus* and consisted of three exons and two introns. In addition , the genetic relationship between the gene *BnFY34* and homologous genes in other plants showed that the gene *BnFY34* was under the same subfamily as the *Brassica* species , and was similar to that of the untranslated gene XM_013837282.1 reported in *B. napus* up to 100% , but its function needs to be further studied.

Key words: *Brassica napus* , development , gene expression , cDNA-AFLP

油菜是十字花科芸薹属植物 , 是我国重要的油料作物之一。青海省是春油菜产区 , 主要种植春性甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 和春性白菜型油菜 (*B. campestris*) 2 种 , 春油菜种植区域绝对无霜期短 , 适合早熟性品种种植 , 春性甘蓝型油菜杂交种产量高、品质好 , 但生育期长 , 不能在春性白菜型油菜产区正常成熟 (Du et al , 2010) 。因此 , 选育具有广适性的春性甘蓝型油菜早熟品种 , 不仅可扩大春油菜产区油菜种植区域 , 而且还可以提高白菜型油菜产区的油菜产量 , 为社会带来巨大的经济效益和社会效益 (Wang et al , 2011) 。近年来 , 分子育种已成为目前国内外油菜育种研究的重点内容之一 (汤华等 , 2006) 。转基因育种日趋成熟 , 且广泛应用于油菜遗传育种当中 , 大大提高了育种的效率。对油菜早熟性状进行转基因育种 , 首先必须弄清影响早熟性状的关键基因的结构、功能及表达模式。因此 , 筛选和分离苗期向蕾期转换相关的基因 , 将有助于探究油菜早熟分子机理 , 为油菜熟期改良分子育种工作提供有价值的基因资源和理论依据 (Luo et al , 2014) 。

植物发育受许多特异性基因按一定的时空顺序启动和关闭表达所控制。模式植物拟南芥的研究表明 , 植物开花是在 4 种途径 (光周期途径、自主途径、春化途径和赤霉素途径) 内源和外源信号同时诱导下 , 多个特异性基因在时间和空间上顺序表达的结果 (罗玉秀和罗春燕 , 2015) 。在控制植物成花的五个途径中 , 自主开花途径的分子机理尚不清楚。目前 , 自主途径相关的 6 个基因 *FVE*、*FCA*、*FPA*、*FLD*、*LD* 和 *FY* 在拟南芥中都被克隆 , 这些基因可能参与染色质转录后修饰 , 通过抑制 *FLC* 基因的表达促进开花 (张生萍等 , 2016; Hu et al , 2014) 。尽管自主途径在拟南芥中研究的很多 , 但在油料作物油菜中的研究还处于起步阶段。cDNA 扩增性片段长度多态性 (cDNA-AFLP) 是一种基于 RT-PCR 和 AFLP 相结合的实验技术 , 该技术已成功用于植物生物学的各个领域 , 比如植物响应非生物胁迫 , 植物-微生物的相互作用 , 植物激素信号转导和植物之间差异表达基因分析等。本研究以 86 号油菜 (春性甘蓝型油菜与青藏高原白菜型油菜种间杂交的新品系) 为材料 , 用

cDNA-AFLP 技术分离苗期和蕾期差异表达片段, 筛选和鉴定控制开花时间的新基因, 并利用生物信息技术对该基因进行同源性分析和功能分析, 为优质、早熟油菜分子育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料为春性甘蓝型油菜与青藏高原白菜型油菜种间杂交获得的 86 号品系, 其表现特早熟, 对光周期和春化不敏感, 由青海大学农林科学院春油菜研究中心提供。首先选取籽粒饱满的种

子种植于人工气候箱中, 设置的培养条件为温度 22/18 °C (昼/夜), 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度为 350 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 相对湿度为 60%; 然后分别取其苗期(两叶一心)和蕾期(现蕾初期)的茎尖嫩叶, 液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱备用。

所用主要试剂及试剂盒: 大肠杆菌菌株 DH5 α 、克隆载体 pMD18-T、各种内切酶、T4 连接酶、引物接头、植物总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒。各试剂盒由 TaKaRa 公司提供, 所用引物由上海生工合成, 引物序列见表 1。

1.2 总 RNA 提取和双链 cDNA 合成

按照试剂盒说明, 采用 TaKaRa 公司的 RNAiso

表 1 本研究所用引物和接头序列
Table 1 Sequence primers and adaptors used in this study

用途 Function	名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
接头 Adaptor	PF	CTCGTAGACTGCGTACATGCA
	PR	TGTACGGAGTCTAC
	MF	GACGATGAGTCCTGAG
	MR	TACTCAGGCTCAT
预扩增 Pre-amplification	PO	GACTGCGTACATGCAG
	MC	GATGAGTCCTGAGTAAC
选择性扩增 Selective amplification	P08	GACTGCGTACATGCAGGCT
	MC09	GATGAGTCCTGAGTAACCA
3'-RACE	100-8-3RACE1	AGTATCTAAGACAGTCGCAATGTTCC
	100-8-3RACE2	CAGTCGCAATGTTCTCTGTGTA
5'-RACE	100-8-5RACE-1	TGGATTACACAGAGGAAACATTGCC
	100-8-5RACE-2	CAGAGGAAACATTGCCACTGTCTTAGA

Reagent 试剂盒提取苗期和蕾期叶片的总 RNA, 用 DNase I 除去提取的总 RNA 中残留的基因组 DNA。取苗期和蕾期各 5 个单株的总 RNA 将其等量混合, 形成两个样品(苗期和蕾期)。cDNA 第 1 链和第 2 链的合成参照 T Double-Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒方法进行。

1.3 BnFY34 特异片段的获得

cDNA-AFLP 技术流程及体系参考 Yu et al

(2011) 中的方法进行。将 cDNA 双链经 *Pst* I / *Mse* I 双酶切后, 用 T4 连接酶将 *Pst* I 和 *Mse* I 的接头与酶切产物相连接; 最后将连接产物稀释 5 倍后作为模板, 先用预扩增引物 PO/MC 进行预扩增, PCR 反应程序如下: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 20 cycles; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。然后, 将预扩增产物稀释 25 倍后作为选择性扩增的模板, 用选择性引物 (P08/MC09) 进行扩增。

PCR 扩增条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min, 13 cycles, 每循环降 0.7 °C; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 23 cycles; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。

1.4 *BnFY34* cDNA 全长克隆

用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳将选择性扩增产物进行分离, 然后将差异片段聚丙烯酰胺凝胶条带切胶回收纯化后为模板, 用 P08/MC09 引物进行二次 PCR 扩增, PCR 反应条件与选择性扩增反应相同。将扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行分离并切胶回收纯化, 回收纯化产物经连接、转化和单克隆培养, 挑取白斑进行菌液验证后送上海生工测序。测序结果在 NCBI 网站上进行 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 根据 cDNA-AFLP 得到的差异片段的测序结果, 分别设计 1 对 3'-RACE 和 5'-RACE 特异引物(表 1), 按 TaKaRa 公司的 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 和 5'-RACE Kit 获得 cDNA 全长序列。PCR 反应体系为 10 μL, PCR 反应体系包括 cDNA 模板 2 μL, 10×Buffer 1.4 μL, 2.5 mol · L⁻¹ dNTPs 1 μL, 10 pmol · L⁻¹ 的上下游引物各 0.3 μL, rTaq 0.2 μL, ddH₂O 4.8 μL。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物的回收、连接、转化、鉴定、测序等步骤同上。

1.5 *BnFY34* 序列分析

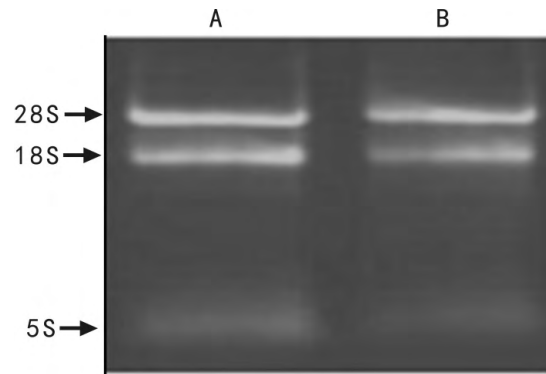
将获得的 *BnFY34* 基因序列在 NCBI 网站上进行 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 寻找开放阅读框; 通过 DNASTar 软件进行多重序列比较和氨基酸同源性分析, 利用产生的比对序列用 MEGA4.0 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取和双链 cDNA 合成

提取的总 RNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果表明, 28S、18S 和 5S 条带清晰, 且 28S RNA 的亮度约为 18S RNA 的 2 倍(图 1); 经紫外分光

光度计检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的值在 1.9~2.0, 说明提取的 RNA 纯度较高、完整性较好, 没有基因组 DNA 残留, 可用于后续实验。



注: A. 苗期叶片; B. 蕾期叶片。

Note: A. Leaves in seedling stage; B. Leaves in bud stage.

图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 AGE analysis of total RNA

合成的双链 cDNA 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示双链 cDNA 呈现为 300~3 000 bp 的弥散条带, 符合植物双链 cDNA 的特征, 可以用于进一步的试验分析。

2.2 *BnFY34* 特异片段的获得

利用 P08/MC09 组合对 86 号油菜苗期(两叶一心)和蕾期(现蕾初期)叶片差异表达基因进行分析, 获得了 1 条 158 bp 的在苗期特异表达的基因片段, 经同源性比对, 该段序列位于甘蓝型油菜的 C4 染色体上, 该基因序列与甘蓝型油菜中的未知功能基因 XM_013837282.1 的相似度达 100%, 命名为 *BnFY34*。

2.3 *BnFY34* cDNA 全长克隆

根据 GenBank 数据库中已报道的甘蓝型油菜未知基因 XM_013837282.1 与 *BnFY34* 基因序列的保守区, 用 Primer 5 设计 RACE 引物, 用 86 号甘蓝型油菜苗期叶片 cDNA 为模板, 采用 3' 和 5' RACE 技术扩增出了 *BnFY34* 基因 3' 端 224 bp 的序列和 5' 端 292 bp 的序列, 两端序列中间部分重叠。经拼接, 获得了 *BnFY34* 基因的 cDNA 全长 455 bp(图 2)。

BnFY34 基因与甘蓝型油菜基因组(NC_027770.1)

CCTGACGAGTTTTTCGAAGAATCTCCGTCAGTTTGGAAAGAAAGAGAG
 ATGCCACACAGAACAAGGCCTTTGACGGGACTCTTGCTTTTCACTGGA
 ATCAACGCTGTTTTGGTGCAGACCATCACTCCTGTCTATGACTTCGTCTG
 CTTCTTGCCCTACTGGGAGAGAAGGAGAGAGCGAATCCGGAAGGAGC
 GTGAAGCGGTGGCTGCATCATTAAACAGCAACACCTCAGCACATAATG
 CTAAGCATCTGTTGGTTGATGCAGTATCTAAGACAGTCGCAATGT
 TTCCTCTGTGTAATCCAAGTGTGTTACAATCTCTAGCACTGAATAATTGAG
 AGCCTGCAGCTACAATTTTCGTAATGGCCCATATAAAGGCCCAAATTTG
 GCATGTTGTCTTTATGTTGCTGCATATGGCCATTAGTATCGAGTATTGTT
 AAGTTCAGAAGTCGCA

注: 下划线部分表示 3' 和 5' RACE 引物设计部位; 方框表示起始密码子和终止密码子部位;
 蓝色表示第一外显子; 绿色表示第二外显子; 红色表示第三外显子。

Note: Underlines indicate the position of 3' and 5' RACE primers; Boxes show the Initiation codon and termination codon;
 the blue, green and red indicates the first, the second and third exon, respectively.

图 2 *BnFY34* 基因 cDNA 全长序列

Fig. 2 cDNA full-length sequence of *BnFY34* gene

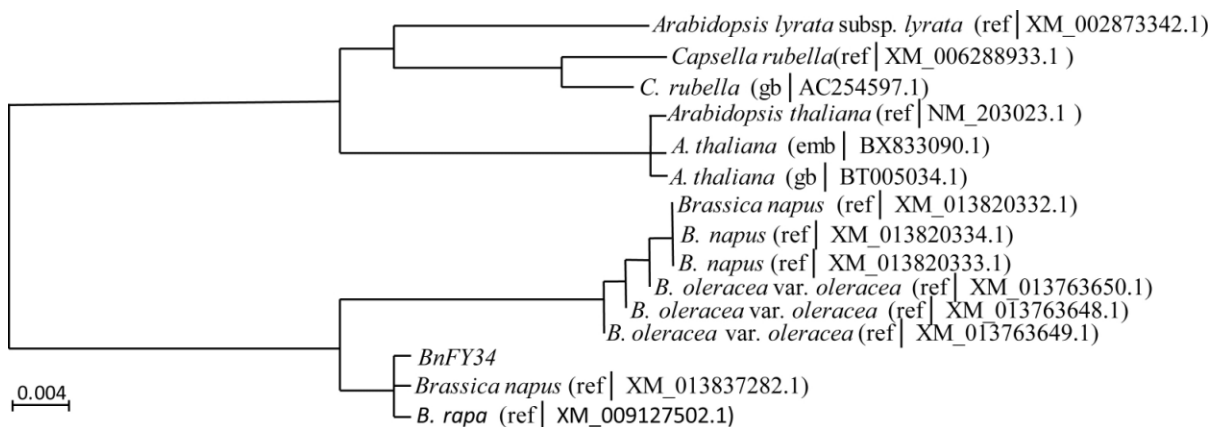


图 3 *BnFY34* 基因系统进化树分析

Fig. 3 Cluster analysis of gene *BnFY34*

序列比对结果发现,该基因由 3 个外显子,两个内含子组成。第一外显子最短(28 bp),第三外显子最长(286 bp)。另外,*BnFY34* 基因在甘蓝型油菜的 C2 染色体上存在同源区段。*BnFY34* 基因包含完整的编码框(图 2),*BnFY34* 基因的编码序列全长为 216 bp,编码 71 个氨基酸残基组成的蛋白质。

2.4 *BnFY34* 序列分析

BnFY34 基因序列分析结果表明,该基因与已公布的甘蓝型油菜未知基因 XM_013837282.1 (C4) 相似度达 100%;与甘蓝型油菜 C2 染色体上的转录因子 XM_013820332.1 和 XM_013820333.1 的相似度分别为 88% 和 87%;与深山南芥亚种未知功能基因 XM_002873342.1 相似性为 90%。进一步分析该基因与其他植物同源基因的亲缘关系,图 3 结果表明,86 号甘蓝型油菜 *BnFY34* 基因与芸薹属属于同一亚族,与甘蓝型和白菜型油菜亲缘关系最近。

氨基酸序列分析结果显示,*BnFY34* 蛋白相对分子质量和理论等电点分别为 8.04 kD 和 10.25。通过 SignalP4.0 预测结构表明,*BnFY34* 为非分泌蛋白。TMHMM 跨膜预测结果表明,*BnFY34* 为非膜蛋白。SWISS-MODEL 网上在线预测了 *BnFY34* 的三级结构,结果显示该蛋白含有 3 个 α 螺旋,不含 β 折叠。

早熟是春性甘蓝型油菜的重要育种目标之一。现蕾是其从营养生长向生殖生长转变的一个重要标志(罗玉秀和罗春燕,2015)。在模式植物拟南芥中,与成花相关的数十个基因被相继克隆,而同为十字花科的芸薹属植物甘蓝型油菜中只有少数开花相关基因被克隆,如光周期基因(*BnCO*),自主开花基因 *BnFCA*、*BnFLD* 等(Luo et al, 2014; 张生萍等,2016; Hu et al, 2014)。本研

究采用 cDNA-AFLP 技术成功筛选出了一个苗期特异表达的基因片段,并采用 RACE 技术对其进行了全长序列克隆,序列分析发现该基因在 C4 染色体上,编码 71 个氨基酸残基组成的蛋白。该基因的时空表达模式以及功能有待进一步研究。

参考文献:

- DU DZ, NIE P, XU L, et al, 2010. Rapeseed heterosis of different ecotypes in Qinghai province [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 32(2): 180-186.
- HU Q, JIN Y, SHI HZ, et al, 2014. *GmFLD*, a soybean homolog of the autonomous pathway gene *FLOWERING LOCUS D*, promotes flowering in *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biol*, 14(1): 1-12.
- LUO YX, LUO CY, 2015. Genetic analysis of flowering time in spring rapeseed (*B. napus* L.) [J]. *Nor Hort*, 19: 1-6. [罗玉秀, 罗春燕, 2015. 春性甘蓝型油菜开花时间的遗传分析 [J]. *北方园艺*, 19: 1-6.]
- LUO YX, LUO CY, DU DZ, et al, 2014. Quantitative trait analysis of flowering time in spring rapeseed (*B. napus* L.) [J]. *Euphytica*, 200(3): 321-335.
- TANG H, SHUAI AH, XIANG FY, 2006. A review of methods and progress in plant gene differential expression researches [J]. *Nat Sci J Hainan Univ*, 24(3): 309-314. [汤华, 帅爱华, 向福英, 2006. 植物基因差异表达的研究方法及进展 [J]. *海南大学学报*, 24(3): 309-314.]
- WANG J, LYDIATE DJ, PARKIN IA, et al, 2011. Integration of linkage maps for the amphidiploid *Brassica napus* and comparative mapping with *Arabidopsis* and *Brassica rapa* [J]. *BMC Genom*, 12(1): 101.
- YU G, DUAN J, YAN H, et al, 2011. cDNA-AFLP analysis of gene expression differences between the flower bud and sprout-shoot apical meristem of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels [J]. *Genet Mol Biol*, 34(2): 274-279.
- ZHANG SP, LUO YX, DU DZ, et al, 2016. A novel alternative splicing isoform of *FCA* homologue in spring rapeseed [J]. *J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed)*, 44(4): 64-73. [张生萍, 罗玉秀, 杜德志, 等, 2016. 春性甘蓝型油菜 *FCA* 同源基因新可变剪接体的克隆及表达研究 [J]. *西北农林科技大学学报*, 44(4): 64-73.]