

## 红花光调控信号途径关键基因 *CtHY5* 的克隆及表达分析

谭政委, 鲁丹丹, 李磊, 余永亮, 许兰杰, 杨红旗, 杨青, 董薇, 李春明, 安素妨, 芦海灵, 梁慧珍\*  
河南省农业科学院 芝麻研究中心, 河南 郑州 450002

**摘要:** 目的 以药用植物红花 *Carthamus tinctorius* 为研究对象, 克隆光信号途径关键转录因子 *HY5* 基因, 并对其进行生物信息学和表达模式分析, 为红花 *HY5* 基因的功能研究提供参考。方法 以红花转录数据为参考, 设计引物, 采用 PCR 扩增方法从红花中克隆得到 *HY5* 的全长 cDNA 和 DNA 序列。运用生物信息学方法对该基因进行分析, 预测编码蛋白的结构与功能, 并通过荧光定量 PCR 方法检测 *CtHY5* 基因在红花不同组织及花发育不同时期的表达情况。结果 *CtHY5* 基因的 cDNA 全长为 462 bp, 编码 153 个氨基酸, DNA 全长为 1941 bp, 包含 4 个外显子和 3 个内含子。生物信息学分析表明, *CtHY5* 为亲水性蛋白, 定位于细胞核中。系统进化树及模体结构分析结果表明 *CtHY5* 与来自菊科的刺菜蓟、黄花蒿、薇甘菊、向日葵、莴苣中的 *HY5* 进化关系较近。定量分析表明, 在白色红花和红色红花中, *CtHY5* 基因均在花中表达量最高, 其次为茎和苞片, 在根中表达量最低。此外, 除了根外, *CtHY5* 基因在白色红花各组织中的表达量要明显高于红色红花。结论 首次从红花中克隆得到了光信号途径关键转录因子 *CtHY5* 基因, 并研究了该基因在不同花色红花品系中的表达模式, 为进一步研究其生物学功能奠定了基础。

**关键词:** 红花; 光信号途径; *HY5*; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)18-5825-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.026

## Cloning and expression analysis of *CtHY5*, a key gene involved in light signaling pathway in *Carthamus tinctorius*

TAN Zheng-wei, LU Dan-dan, LI Lei, YU Yong-liang, XU Lan-jie, YANG Hong-qi, YANG Qing, DONG Wei, LI Chun-ming, AN Su-fang, LU Hai-ling, LIANG Hui-zhen

Henan Sesame Research Center, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

**Abstract: Objective** *HY5* (ELONGATED HYPOCOTYL5) is a key transcription factor in light signaling pathway. In this study, the *CtHY5* gene was cloned from *Carthamus tinctorius*, and the bioinformatics and expression profile analysis of *CtHY5* were performed with bioinformatics and quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) methods to provide a reference for the functional study of the *HY5* gene. **Methods** Based on the transcription data of safflower, primers were designed and the full-length cDNA of *HY5* were cloned from safflower to obtain DNA sequences. The characteristics of physiochemical properties, structures and function of the deduced *CtHY5* protein were determined using a series of bioinformatics tools. The expression of *CtHY5* in different tissues and flower development stages of safflower was detected by fluorescence quantitative PCR. **Results** The full length cDNA sequence of *CtHY5* gene was 462 bp, encoding 153 amino acids, while the full length DNA sequences of *CtHY5* gene were 1 941 bp, containing four exons and three introns. Bioinformatics analysis showed that *CtHY5* was hydrophilic protein and was located in the nucleus. Phylogenetic tree and motif structure analysis revealed that *CtHY5* was more closely related to *HY5* homologous protein in *Cynara cardunculus*, *Artemisia annua*, *Mikania micrantha*, *Helianthus annuus* and *Lactuca sativa*, which all of them belonged to Asteraceae. The results of qRT-PCR analysis showed that the expression of *CtHY5* gene was the highest in the flowers, followed by stems and bracts, and the lowest in roots. And the expression of *CtHY5* gene in all tissues of safflower was significantly higher in white safflower line than that in red safflower line. **Conclusion** *CtHY5*, the key transcription factor of light signaling pathway, was first

收稿日期: 2022-02-11

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-21); 河南省中央引导地方科技发展专项自由探索类项目 (YDZX20214100001804); 河南省农科院新兴学科发展专项 (2022XK03); 河南省科技攻关项目 (222102110379、222102110466); 河南省农科院自主创新专项基金 (2022ZC64)

作者简介: 谭政委 (1983—), 男, 助理研究员, 从事分子药理学研究。Tel: (0371)65738565 E-mail: zhwtan@126.com

\*通信作者: 梁慧珍 (1968—), 女, 研究员, 从事药用植物遗传育种及品质改良工作。Tel: (0371)65751589 E-mail: lhz66666@163.com

isolated from safflower in this study. The expression pattern of *CtHY5* in different lines of safflower was studied, which laid a foundation for further study on its biological function.

**Key words:** *Carthamus tinctorius* L.; light signaling pathway; HY5; gene clone; expression analysis

转录因子 HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL5) 是基本亮氨酸拉链类 (basic leucine zipper, bZIP) 转录因子类的转录因子, 最早是在拟南芥中克隆得到<sup>[1]</sup>。HY5 编码的蛋白为光敏色素下游的核心光信号调节因子, 在光信号通路中具有十分重要的作用, HY5 的 C 末端具有特殊的 bZIP 结构域, 能够直接与基因启动子作用元件 G-box (CACGTG) 相结合, 从而能调控基因的表达它能通过不同的感受光信号接收光信号, 并将光信号传递给下游作用元件, 进而调控植物的生长发育<sup>[2-5]</sup>。

HY5 广泛参与植物生长发育各个生理过程的转录或转录后调控。HY5 通过结合 CAB 基因上游的 CUF-1 元件与之协同调控拟南芥幼苗叶绿素积累和光形态建成<sup>[6]</sup>, 此外, HY5 结合并正调控昼夜节律相关基因<sup>[7]</sup>, 促进矿物质营养元素转运基因的表达<sup>[8-9]</sup>。最新研究表明, 黄花蒿中 AaHY5 通过与 AaWRKY9 的启动子结合来激活其表达, 协同参与调控光和茉莉酸酯介导的青蒿素的生物合成<sup>[10]</sup>; 番茄中 SlHY5 在转录和翻译水平上直接调控果实成熟、花青素和类胡萝卜素合成相关基因的转录水平和蛋白翻译效率<sup>[11]</sup>。在不同的光照条件下, HY5 也可以直接结合花青素生物合成基因查耳酮合成酶 (CHS) 基因、查耳酮异构酶 (CHI) 基因等, 调节花青素的积累。光敏色素互作因子 PIF3 和 HY5 在光照下正调控花青素合成<sup>[12-13]</sup>。

HY5 基因已经从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.<sup>[1]</sup>、苹果 *Malus domestica* Borkh.<sup>[14]</sup>、油菜 *Brassica napus* Linn.<sup>[15]</sup>、梨 *Pyrus bretschneideri* Rehd.<sup>[16]</sup>、黄花蒿 *Artemisia annua* Linn.<sup>[10]</sup>、番茄 *Solanum lycopersicum* Linn.<sup>[17]</sup>、苦荞 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn<sup>[18]</sup>等物种中完成了分离和鉴定。但是, 目前在药用植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 中尚未见 HY5 基因的相关报道。

红花, 别名草红花、红蓝花、刺红花, 为菊科红花属一年生双子叶草本植物, 其干燥花入药, 具有活血通经、散瘀止痛的功效<sup>[19]</sup>, 红花花中主要的活性化合物是黄酮类化合物, 目前从红花中分离得到类黄酮化合物超过 60 种<sup>[20]</sup>。其花颜色多样, 如红色、白色、黄色、橙色等, 其花色差异推测可能是由类黄酮组成成分和含量不同引起的, 然而相关

分子机制还未见报道。

本研究根据前期红花花期转录组测序数据, 通过 PCR 扩增, 获得了红花 HY5 同源基因 *CtHY5* 的 cDNA 序列, 并以红花叶片 DNA 为模板获得 *CtHY5* 基因的全长 DNA 序列。通过生物信息学的分析方法对 *CtHY5* 蛋白的理化性质、保守结构域, 疏水性亲水性, 二级结构及三级结构进行了分析, 并对 *CtHY5* 进行了系统进化分析。另外, 检测了该基因在不同花色的红花品系、不同组织及不同花期的表达量, 以期为进一步阐明光调控红花花青素及类黄酮生物合成调控的机制奠定基础, 并为利用该基因改善红花中药材品质提供理论参考。

## 1 材料

供试材料为河南省农业科学院芝麻研究中心药用植物研究室收集的管状花为红色和白色红花品系, 经河南省农业科学院芝麻研究中心梁慧珍研究员鉴定为菊科红花属植物红花 *C. tinctorius* L., 种植于河南农业科学院现代农业研究开发基地, 自然条件生长, 待植株生长至开花期, 取根、茎、叶和苞片, 并在管状花从花冠总苞片露出的第 1、2、3、4、5 和 6 天取管状花, 分别标为 S1、S2、S3、S4、S5 和 S6 期, 所有组织部位和样品取 3 个生物学重复, 将采集的样品立即放入液氮中保存, 并转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存备 RNA 提取。

## 2 方法

### 2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

按照北京华越洋生物公司的 Quick RNA Isolation Kit 试剂盒说明书提取样品的总 RNA, 通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对提取的总 RNA 的质量和完整性进行检测, 用 NanoDrop 2000 分光光度计对总 RNA 浓度进行测定, 根据反转录试剂盒 (TaKaRa 公司, PrimeScript™MRT reagent Kit with gDNA Eraser) 说明书操作步骤 (Code No. RR047A), 将总 RNA 反转录为第一链 cDNA。

### 2.2 DNA 提取

按照北京华越洋 DNA 提取试剂盒提取红花幼叶 DNA 样品, 通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳对提取的 DNA 进行检测, 用 NanoDrop 2000 分光光度计对 DNA 浓度进行测定。

### 2.3 *CtHY5* 基因的克隆

根据转录组测序的 Unigene 基因序列设计引物, 上游引物: 5'-ATGCAAGAGCAAGCTGCAA-3', 下游引物: 5'-CTATTTCTTTCTTGCATACCG-3', 分别以管状花基本伸出苞片时的红花管状花 cDNA 和红花幼叶 DNA 为模板, 利用 KOD 酶进行 PCR 扩增得到 *CtHY5* 基因的全长 cDNA 和 DNA 序列, 反应程序如下: 94 °C、2 min (98 °C、10 s, 56 °C、30 s, 68 °C、2 min) × 35 循环 68 °C、5 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 并利用生工 Sangon Biotech SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (Lot.: AA24KA4369) 回收目的片段, 连接到 TaKaRa pMD19-T 载体上, 转入 TaKaRa DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 培养基上, 37 °C 培养 16 h。挑取单菌落, PCR 检测后, 将阳性菌落送往公司测序。通过 DNAMAN 软件拼接出 *CtHY5* 基因全长 cDNA 序列。

### 2.4 *CtHY5* 基因序列的生物信息学分析

通过 MEGA 7.0 软件比对 *CtHY5* 基因全长 cDNA 和 DNA 序列, 找出基因内含子序列。利用 ORF finder 在线软件 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 确认 *CtHY5* 的 CDS 序列, *CtHY5* 蛋白的氨基酸组成、蛋白质相对分子量、理论等电点及稳定性等参数进行分析, 通过在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 完成; 使用 NCBI 中的 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对氨基酸序列的保守结构域进行鉴定。*CtHY5* 蛋白的二级结构使用在线工具 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)), 三级结构通过 SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 进行。通过 TMHMM Server v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对 *CtHY5* 蛋白的跨膜结构域进行分析; 选用 SignalP-5.0Server 在线软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>) 以及 PSORT 在线软件 (<https://www.genscript.com/psort.html>) 分别进行信号肽预测和亚细胞定位分析。以 *CtHY5* 蛋白序列为模板, 通过 NCBI 数据库中进行 Blast P 模块进行比对分析, 找出其它物种中 *CtHY5* 蛋白的同源序列, 利用 DNAMAN 对 *CtHY5* 蛋白与其它物种的 *HY5* 同源蛋白的同源性进行分析; 通过 MEGA7.0 软件中的 Neighbor-joining 构建 *CtHY5* 蛋白系统化进化树, 并通过 Bootstrap 方法对进化树进行检测, Bootstrap 值设置

为 100。系统发育树中序列的模体结构采用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 在线网站进行分析。

### 2.5 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

通过 qRT-PCR 技术检测 *CtHY5* 基因在管状花为红色和白色 2 个红花品系中根、茎、叶和苞片以及花不同发育时期 1、S2、S3、S4、S5 和 S6 期中表达量, 利用 Premier 5 设计 *CtHY5* 基因的荧光定量 PCR 引物, 上游引物: 5'-AAAGCCCGGCTG-ACAAAGA-3', 下游引物: 5'-CGCACCTCCAACCTCCAACA-3', 内标参比基因为 *Ct60S* 基因, 上游引物: 5'-CATCCATTATCCAACAATC-3', 下游引物: 5'-AAGAGTAATCAGTCTCCA-3', 使用 TaKaRa TB Green®Premix Ex Taq™II (Tli RNaseH Plus) 进行 qRT-PCR 反应, 反应条件: 95 °C、3min, 随后进行 45 个循环的 95 °C、10 s; 55 °C、30 s; 72 °C、28 s。通过熔解曲线分析监测 PCR 扩增的特异性, 反应程序从 55 °C 到 94 °C 0.1 °C/s 速度。每个荧光定量 PCR 反应重复 3 次, 通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  相对定量法对基因进行表达水平分析。以 Student's *t* 检验 (Student's *t*-test) 方法对 *CtHY5* 基因在红色和白色两个红花品系中不同组织和花发育不同时期的表达量进行统计分析,  $P < 0.05$  表示差异具有显著水平。

## 3 结果与分析

### 3.1 *CtHY5* 基因的克隆

利用 RT-PCR 方法, 从管状花为红色的红花品系中得到了 1 个 cDNA 全长为 462 bp 的 *HY5* 基因同源基因 (图 1-A), 命名为 *CtHY5*。为了进一步对红花 *HY5* 基因的内含子和外显子结构进行分析, 以红花幼苗 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 经测序、比对分析发现红花 *HY5* 基因 DNA 全长为 1941 bp (图 1-B), 包含 4 个外显子, 长度分别为 97 bp、166 bp、157 bp 和 42 bp, 3 个内含子, 分别为 1083 bp、320 bp、和 76 bp (图 1-C)。

### 3.2 *CtHY5* 基因的序列分析

红花 *CtHY5* 基因 cDNA 序列经 ORF finder 在线软件分析, 显示其具有 1 个长度为 XX bp 的完整读码框, 编码 153 个氨基酸 (图 2-A), 通过在线软件 Prot Param 对 *CtHY5* 蛋白的氨基酸组成及比例进行分析, 统计结果表明 Glu 数量最多, 占 11.8%, trp 和 phe 数量最少, 占 0.7% (表 1)。其分子式为  $C_{711}H_{1204}N_{234}O_{239}S_5$ , 包含 2393 个原子, 相对分子质量为 17 015, 理论等电点为 9.73, 半衰期为 30 h,

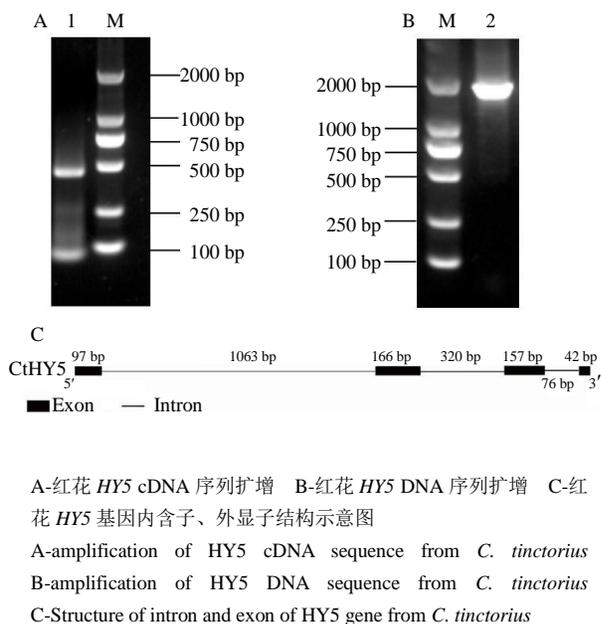


图 1 CtHY5 基因的扩增  
Fig. 1 Amplification of HY5 from *C. tinctorius*

带正电荷氨基酸残基和带负电荷氨基酸残基数目分别为 29、23，脂肪系数为 66.99，亲水性指数为 -1.014，不稳定指数为 58.82，表明 CtHY5 为不稳定的亲水性蛋白。

用 NCBI 的 CD-Search 分析 CtHY5 蛋白的功能结构域，结果显示该蛋白属于 bZIP 转录因子超家族中的一员，含有 3 个保守结构域，分别为 bZIP-HY5-like、BRLZ 和 bZIP-1 (图 2-A、B)。其中 bZIP-HY5-like 结构域包括 86 位到 136 位共 51 个氨基酸，其序列 RLKRLLRNRVSAQQARERKKAYLLELEVRVKELEKK NSEVEERFSTLQENQ; BRLZ 结构域包括 81 位到 143 位共 65 个氨基酸，其序列 KENKRLKRLLRNRVSAQQARERKKAYLLELEVRVKELEKKNSEVEERFSTLQEN Q MLRHILK; bZIP-bZIP-1 结构域包括 84 位到 143 位共 60 个氨基酸，其序列 KRLKRLLRNRVSAQQARERKKAYLLELEVRVKEL EKKNSEVEERFSTLQENQMLRHILK。

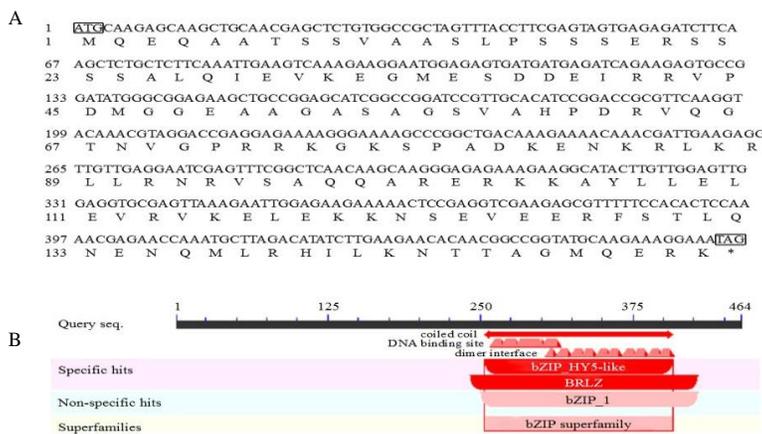


图 2 CtHY5 基因的核苷酸序列和编码的氨基酸序列及序列特征  
A-CtHY5 基因的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列，黑色方框代表起始密码子和终止密码子 B-CtHY5 蛋白保守结构域预测  
A-cDNA sequence and deduced amino acid sequence of CtHY5 gene, the start codon and stop codon marked in black box B-prediction of conserved domain of CtHY5 protein

表 1 CtHY5 氨基酸成分  
Table 1 Amino acid composition of CtHY5

氨基酸	数量	占比/%	氨基酸	数量	占比/%
Ala (A)	15	9.8	Leu (L)	12	7.8
Arg (R)	16	10.5	Lys (K)	13	8.5
Asn (N)	7	4.6	Met (M)	5	3.3
Asp (D)	5	3.3	Phe (F)	1	0.7
Gln (Q)	9	5.9	Pro (P)	5	3.3
Glu (E)	18	11.8	Ser (S)	17	11.1
Gly (G)	9	5.9	Thr (T)	5	3.3
His (H)	2	1.3	Tyr (Y)	1	0.7
Ile (I)	3	2.0	Val (V)	10	6.5

### 3.3 CtHY5 基因的生物信息学分析

利用 ExPASy-Prot Scale 在线工具对 CtHY5 蛋白的亲水/疏水性分析表明, 其中正值表示疏水性, 负值表示亲水性, 通过分析表明, CtHY5 蛋白负值数量多于正值数量, 且第 10 位缬氨酸 (Val, V) 具有最高分值 1.144, 疏水性最强, 第 84 位赖氨酸 (Lys, K) 具有最低分值 -3.044, 亲水性最强 (图 3)。

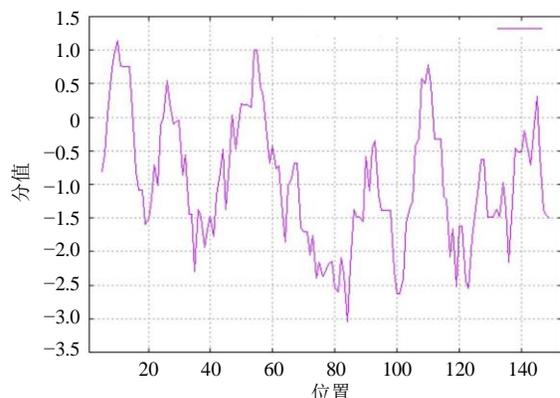


图 3 CtHY5 蛋白疏水性/亲水性预测

Fig. 3 Hydrophobicity or hydrophilicity prediction of CtHY5 protein

通过 ExPASy 中的 SOPMA tool 预测 CtHY5 蛋白的二级结构, 结果显示 CtHY5 蛋白的二级结构中  $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha$ -helices) 占 58.17%, 无规则卷曲 (random coil) 占 36.60%,  $\beta$ -折叠 ( $\beta$ -turn) 和延伸链 (extended strand) 较少, 分别为 3.92% 和 1.31% (图 4-A)。为了进一步了解红花 HY5 蛋白的结构, 利用 SWISS-MODEL 对 CtHY5 蛋白进行同源建模, 得到红花 HY5 蛋白的三维空间模型 (图 4-B), ExPASy structure assessment 程序评测推导, CtHY5 蛋白模型 6iak.1.A 得分为 0.74, 与来自鸡中 CREB3 蛋白

序列的相似性为 34.78%, 并且, 该蛋白可能以同源二聚体的形式发挥生物学功能。

利用 SignalP-5.0 Server 在线软件对 CtHY5 蛋白的氨基酸序列进行信号肽分析, 结果表明, 该蛋白中无信号肽存在, 为非分泌蛋白。为了进一步对 CtHY5 的功能进行预测, 通过 PSORT 在线软件对 CtHY5 蛋白亚细胞定位进行分析, 结果表明 CtHY5 定位于细胞核的概率为 95.7%, 定位与细胞质中的概率仅为 4.3%, 这与 CtHY5 作为转录因子在细胞核中调控基因表达的功能预测相一致。

### 3.4 CtHY5 蛋白的系统进化分析

通过 NCBI Blastp 查找 CtHY5 在其他物种中的同源氨基酸序列, 比对分析发现, CtHY5 与刺菜蓟 *Cynara cardunculus* Linn. HY5 的相似性最高, 为 96.08%, 与向日葵 *Helianthus annuus* Linn. HY5 的相似性为 88.05%, 与薇甘菊 *Mikania micrantha* Kunth HY5 的相似性为 86.71%, 与黄花蒿 *Artemisia annua* Linn. HY5 的相似性为 84.71%, 与莴苣 *Lactuca sativa* Linn. HY5 的相似性为 82.91%。与其他物种中 HY5 类似, CtHY5 具有此类蛋白所特有的典型的碱性亮氨酸拉链结构域和 DNA 结合域, 这些结构在不同物种中保守性较高, 也是其发挥转录因子功能所必须的 (图 5)。

通过在 NCBI、UniProt 数据库及文献报道中搜索已克隆研究的其物种中 HY5, 与 CtHY5 进行系统进化树构建, 分析 CtHY5 与其他物种中 HY5 的进化关系, 从进化树分析发现, CtHY5 与菊科中的刺菜蓟、黄花蒿、薇甘菊、向日葵、莴苣中的 HY5 亲缘关系较近, 在进化树种聚为一支, 而与来自其它科植物如芝麻、烟草、玉米、风信子中的 HY5 亲缘关系相对较远 (图 6)。

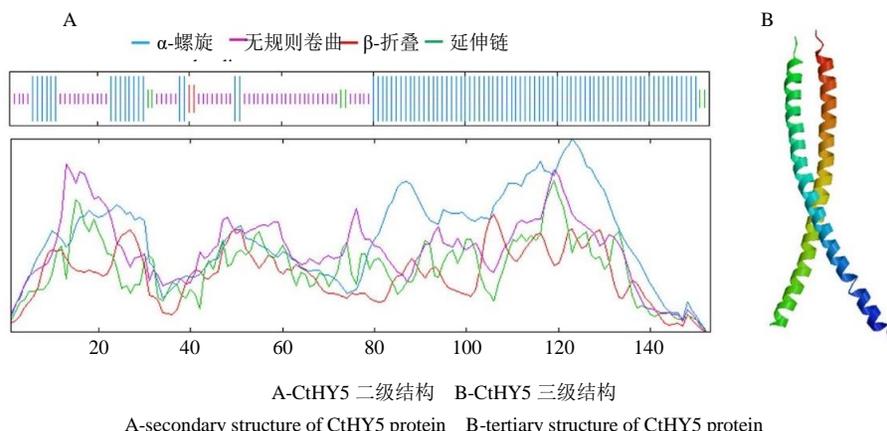
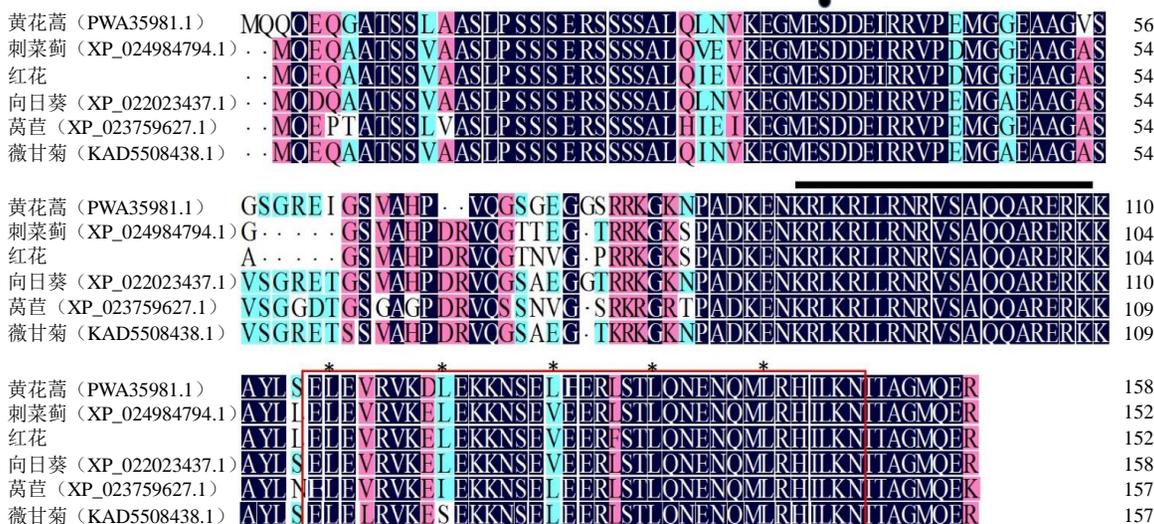


图 4 CtHY5 蛋白的二级结构和三级结构

Fig. 4 Secondary and tertiary structure of CtHY5 protein



●表示被酪蛋白激酶 II (CKII) 磷酸化的丝氨酸位点; 横线代表蛋白的碱性区域, \*标志为代表亮氨酸重复序列, 方框为亮氨酸拉链结构域  
 ●Black spot indicates a serine residue that is predicted to be phosphorylated by CKII; The basic region is underlined; \*Asterisks indicate the heptad repeat of leucines in the leucine repetitive region; The box indicates leucine zipper domain

图 5 红花和其他植物的 HY5 蛋白多序列比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment of HY5 protein from *C. tinctorius* and other plants

通过 MEME 对系统进化树中 17 个 HY5 序列进行模块结构分析, 分析表明基序 1 和 3 最保守, 在所有分析序列中都存在, 基序 5 和 6 较特异, 基序 5 只在油菜、玉米和风信子中存在, 而基序 6 只在红花和刺菜蓟中存在。从模块结构特征可以看出,

亲缘关系越近的物种中模块基序结构越相似。进一步比较分析发现, 在所有分析序列中, 只有刺菜蓟的模体基序与红花 HY5 一样, 均含有 4 个模块基序, 分别为基序 1、2、3 和 6, 这预示着它们可能具有相似的功能 (图 6)。

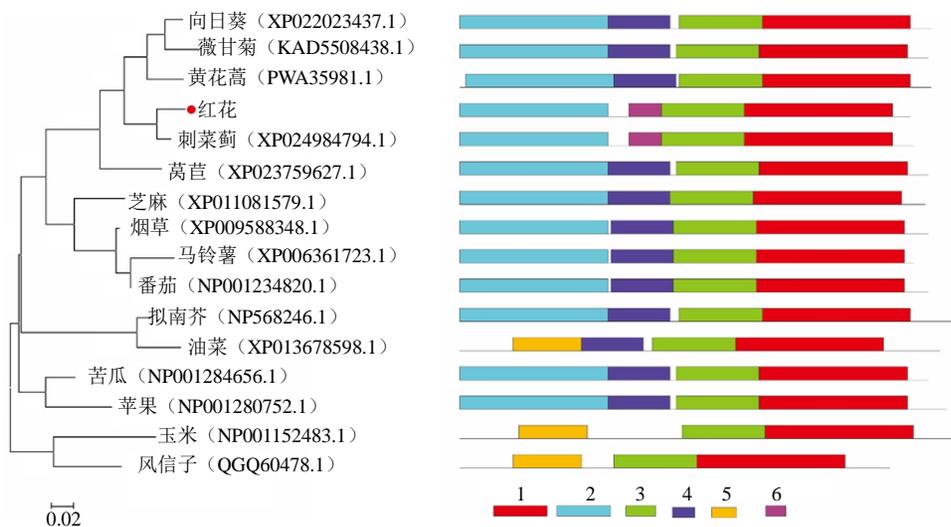


图 6 不同植物基于 HY5 氨基酸序列的邻接法系统进化树及模体分析

Fig. 6 A neighbor-joining phylogenetic tree and motif prediction of different plants based on amino acid sequences of HY5

### 3.5 *CtHY5* 基因表达分析

利用 RT-PCR 检测 *CtHY5* 基因的各组织中表达, 结果显示 *CtHY5* 基因在红花所有组织中均有表

达, 在花中表达量最高, 其次是苞片和茎, 在根中表达量最低, 并且白色红花的苞片和花中 *CtHY5* 基因表达量都明显高于红色红花 ( $P < 0.01$ ) (图 7-A)。

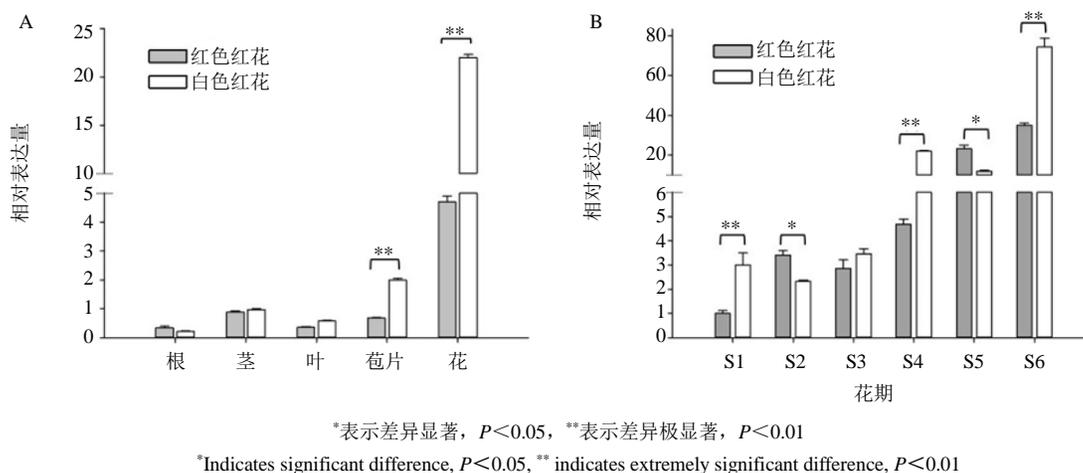


图7 CtHY5基因在不同组织部位(A)及花发育的不同时期(B)相对表达分析

Fig. 7 Relative expression analysis of CtHY5 gene in different tissues (A) and different stages (B) of flower development

对 CtHY5 基因在花发育的不同时期定量分析结果表明,红色红花品系中 CtHY5 基因的表达式呈现先增加后降低又增加的表达趋势,而白色红花品系中 CtHY5 基因的表达式则呈现先降低后增加的表达趋势,并表现出白色红花品系中 CtHY5 基因的表达式要整体高于红色红花,统计结果显示,白色和红色红花品系中 CtHY5 基因的表达式在花发育的 S1、S4 和 S6 时期差异极显著 ( $P < 0.01$ ), S2 和 S5 期差异显著 ( $P < 0.05$ ), S3 期差异不明显(图 7-B)。

#### 4 讨论

HY5 属于 bZIP 类转录因子家族,最早是在拟南芥中克隆得到<sup>[1]</sup>。HY5 作为光敏色素下游的核心光信号调节因子,在光信号途径中发挥着重要的作用<sup>[21-22]</sup>。依据红花转录组测序数据,本研究克隆得到一个 HY5 基因的 cDNA 和 DNA 全长序列,其 DNA 序列具有 4 个外显子和 3 个内含子。生物信息学分析显示, CtHY5 与为亲水性蛋白,二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋组成和无规则卷曲组成,仅含有少量  $\beta$ -折叠和延伸链,三级结构预测显示 CtHY5 蛋白呈拉链形状,并且以同源二聚体的形式存在。亚细胞定位分析表明,该蛋白定位于细胞核中,这与其转录因子作用角色相一致,这些结果与已报道的云梨、苦荞中的 HY5 分析结果相一致<sup>[16, 22]</sup>。

序列分析表明,红花 HY5 基因编码 153 个氨基酸,与拟南芥、苦荞和番茄中 HY5 相比氨基酸序列相对较短<sup>[11, 16, 22]</sup>。蛋白结构域预测分析发现,与黄花蒿中 HY5 蛋白类似<sup>[10]</sup>, CtHY5 蛋白也具有高度灵活、无序的 N 末端,这可能是造成 CtHY5 蛋白

比其它植物中 HY5 同源蛋白相对较短的原因之一。并且, HY5 蛋白 N 端含有一个酪蛋白激酶(casein kinase II)的磷酸化位点,该位点可以与具有 E3 泛素连接酶活性的 COP1 (constitutively photomorphogenic 1) 蛋白直接相互作用。COP1 与 HY5 在植物光信号转导中的作用相反,在黑暗条件下, COP1 进入细胞核与 HY5 互作并将其泛素化,并促进 26S 蛋白酶对它的降解。而光照条件下, HY5 被活化并相应光照参与其他生理反应调节过程<sup>[23-24]</sup>。本研究中 CtHY5 蛋白具有 COP1 蛋白磷酸化位点,这暗示着在红花中 HY5 极大可能通过与 COP1 蛋白互作参与植物光信号生理调节过程。

前人研究发现, HY5 可以直接影响约 3 000 个基因的表达, HY5 基因可以通过其 DNA 结合结构域直接结合启动子区域的顺式元件调控基因其表达,这些顺式元件包括 T/G box (CACGTT), E-box (CAATTG), GATA-box (GATGATA), ACE-box (ACGT), Z-box (ATACGGT), C-box (GTCANN), hybrid C/G (G) 和 C/A boxes, 通过结合于含有这些顺式元件的基因参与植物光信号、生物节律、开花时间、营养元素、植物激素响应等各个生理过程<sup>[25-26]</sup>。最近的研究表明, HY5 基因在植物逆境胁迫响应中也起着非常重要的作用,在番茄中, HY5 还可以通过结合于冷胁迫信号途径关键因子 CBF (C-repeat binding factors) 基因启动子区域激活其表达,从而增强番茄的抗冷性<sup>[27]</sup>。在拟南芥的研究中发现, HY5 可以结合于 ELIP2 基因启动子的一个新发现的顺式元件 B (GGCCACGCCA) 上并促进该基因在紫外、强光照和低温胁迫下的表达,从而提高植物

的胁迫反应<sup>[28]</sup>。本研究克隆的 CtHY5 也具有其典型的 DNA 结合结构域, 与拟南芥、番茄等植物一样, 该结构域也位于 CtHY5 蛋白的碱性区域内, 并且氨基酸序列具有高度的保守性, 通过荧光定量 PCR 分析发现, CtHY5 基因在红花的根、茎、叶、苞片和花等组织中呈现组成型表达, 在拟南芥中, AtHY5 在根、下胚轴、茎和花器官中也呈现组成型表达, 大量的研究表明, AtHY5 基因参与拟南芥光形态建成、侧根发育、生物及非生物胁迫的多个生理过程<sup>[22]</sup>, 这暗示着 CtHY5 基因也可能参与红花生长发育的多个生理过程中。

HY5 在植物色素生物合成调控中也发挥着重要作用, HY5 可以直接结合于植物的花青素生物合成途径相关基因 CHS1、DFR 基因的启动子区域 ACE 元件上, 调控这些基因的表达<sup>[12]</sup>。此外, HY5 基因还调控类胡萝卜素合成基因 PSY 及叶绿素合成基因 LHCA4、PORC、GUN5 的表达<sup>[29]</sup>。为了探索 CtHY5 基因在红花色素合成调控中的作用, 本实验对 CtHY5 基因在 2 个不同花色红花品系的不同组织、花发育不同时期中的表达模式进行了分析, 结果表明 CtHY5 基因在红花管状花中表达量比其它组织部位都高, 并且随着花发育进程呈现表达量增加的趋势, 并且在管状花为白色的红花品系中的表达量要明显高于管状花为红色红花品系中, 这说明 CtHY5 可能参与了红花花色素的合成或积累调控过程, 但其调控机制可能不同于其它植物, 这为后续 CtHY5 调控红花花色素的机制提供了思路。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Oyama T, Shimura Y, Okada K. The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl [J]. *Genes Dev*, 1997, 11(22): 2983-2995.
- [2] Ang L H, Chattopadhyay S, Wei N, et al. Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development [J]. *Mol Cell*, 1998, 1(2): 213-222.
- [3] Hardtke C S, Gohda K, Osterlund M T, et al. HY5 stability and activity in *Arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain [J]. *EMBO J*, 2000, 19(18): 4997-5006.
- [4] Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(3): 106-111.
- [5] Cluis C P, Mouchel C F, Hardtke C S. The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways [J]. *Plant J*, 2004, 38(2): 332-347.
- [6] Maxwell B B, Andersson C R, Poole D S, et al. HY5, circadian clock-associated 1, and a cis-element, DET1 dark response element, mediate DET1 regulation of chlorophyll a/b-binding protein 2 expression [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133(4): 1565-1577.
- [7] Lee J, He K, Stolz V, et al. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(3): 731-749.
- [8] Huang L F, Zhang H C, Zhang H Y, et al. HY5 regulates nitrite reductase 1 (NIR1) and ammonium transporter1;2 (AMT1;2) in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Sci*, 2015, 238: 330-339.
- [9] Chen X B, Yao Q F, Gao X H, et al. Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition [J]. *Curr Biol*, 2016, 26(5): 640-646.
- [10] Fu X Q, Peng B W, Hassani D, et al. AaWRKY9 contributes to light- and jasmonate-mediated to regulate the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2021, 231(5): 1858-1874.
- [11] Wang W H, Wang P W, Li X J, et al. The transcription factor SlHY5 regulates the ripening of tomato fruit at both the transcriptional and translational levels [J]. *Hortic Res*, 2021, 8(1): 83.
- [12] Shin J, Park E, Choi G. PIF3 regulates anthocyanin biosynthesis in an HY5-dependent manner with both factors directly binding anthocyanin biosynthetic gene promoters in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2007, 49(6): 981-994.
- [13] Shin D H, Choi M, Kim K, et al. HY5 regulates anthocyanin biosynthesis by inducing the transcriptional activation of the MYB75/PAP1 transcription factor in *Arabidopsis* [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(10): 1543-1547.
- [14] Liu W J, Wang Y C, Yu L, et al. MdWRKY11 participates in anthocyanin accumulation in red-fleshed apples by affecting MYB transcription factors and the photoresponse factor MdHY5 [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(32): 8783-8793.
- [15] 郭继平. 油菜 HY5 基因的电子克隆及生物信息学分析 [J]. 北方园艺, 2013(23): 116-118.
- [16] 苏俊, 陈璐, 张晓东, 等. “云红梨 1 号” HY5 基因的克隆及生物信息学分析 [J]. 北方园艺, 2020(10): 39-44.
- [17] Liu C C, Chi C, Jin L J, et al. The bZip transcription factor HY5 mediates CRY1a-induced anthocyanin

- biosynthesis in tomato [J]. *Plant Cell Environ*, 2018, 41(8): 1762-1775.
- [18] 邓娇, 赵佳利, 张丽洁, 等. 苦荞 FtHY5 基因克隆、生物信息学及参与苦荞花青素合成分析 [J]. 分子植物育种, 2021, 5: 12.
- [19] Chen Z W, Liu L, Liu Y Y, *et al.* Hydroxysafflor yellow A induces autophagy in human liver cancer cells by regulating Beclin 1 and ERK expression [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(4): 2989-2996.
- [20] Zhang L L, Tian K, Tang Z H, *et al.* Phytochemistry and pharmacology of *Carthamus tinctorius* L [J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(2): 197-226.
- [21] Jing Y J, Zhang D, Wang X, *et al.* *Arabidopsis* chromatin remodeling factor PICKLE interacts with transcription factor HY5 to regulate hypocotyl cell elongation [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(1): 242-256.
- [22] Gangappa S N, Botto J F. The multifaceted roles of HY5 in plant growth and development [J]. *Mol Plant*, 2016, 9(10): 1353-1365.
- [23] Osterlund M T, Hardtke C S, Wei N, *et al.* Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2000, 405(6785): 462-466.
- [24] Yu Y W, Wang J, Zhang Z J, *et al.* Ethylene promotes hypocotyl growth and HY5 degradation by enhancing the movement of COP1 to the nucleus in the light [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(12): e1004025.
- [25] Zhang H Y, He H, Wang X C, *et al.* Genome-wide mapping of the HY5-mediated gene networks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation [J]. *Plant J*, 2011, 65(3): 346-358.
- [26] Casal J J. Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64: 403-427.
- [27] Zhang L Y, Jiang X C, Liu Q Y, *et al.* The HY5 and MYB15 transcription factors positively regulate cold tolerance in tomato via the CBF pathway [J]. *Plant Cell Environ*, 2020, 43(11): 2712-2726.
- [28] Hayami N, Sakai Y, Kimura M, *et al.* The responses of *Arabidopsis* early light-induced Protein2 to ultraviolet B, high light, and cold stress are regulated by a transcriptional regulatory unit composed of two elements [J]. *Plant Physiol*, 2015, 169(1): 840-855.
- [29] Toledo-Ortiz G, Johansson H, Lee K P, *et al.* The HY5-PIF regulatory module coordinates light and temperature control of photosynthetic gene transcription [J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(6): e1004416.

[责任编辑 时圣明]