

丁 鹏,高 月,谭小力,等. 甘蓝型油菜 *BnaC. RECQ4B* 基因的生物信息学与组织表达分析[J]. 江苏农业科学,2023,51(12):57-64.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.12.007

甘蓝型油菜 *BnaC. RECQ4B* 基因的生物信息学与组织表达分析

丁 鹏,高 月,谭小力,朱克明

(江苏大学生命科学学院,江苏镇江 212013)

摘要:RECQ 解旋酶是机体分子代谢途径中重要的调控蛋白,本研究为了探究甘蓝型油菜减数分裂中解旋酶 RECQ 的功能及其表达模式。首先,运用 RT-PCR 技术克隆获得 1 个甘蓝型油菜 *RECQ* 基因,并命名为 *BnaC. RECQ4B*,运用 PCR 技术克隆获得 *BnaC. RECQ4B* 的启动子序列,命名为 Pro. *BnaC. RECQ4B*;并对该基因编码的蛋白以及启动子序列进行生物信息学分析;最后,运用 qRT-PCR 技术对甘蓝型油菜不同组织进行基因表达量分析。结果表明,*BnaC. RECQ4B* 开放阅读框(ORF)长度为 3 477 bp,编码 1 158 个氨基酸,分子质量为 18 086 u,等电点为 8.38,属于亲水性不稳定碱性蛋白,可能是非分泌蛋白,蛋白质二级和三级结构显示无规则卷曲和 α -螺旋所占比例较高,*BnaC. RECQ4B* 与拟南芥的氨基酸序列相似性达到 74%,该基因启动子不仅包含多种响应逆境胁迫的顺式元件,还包含大量的光反应与光响应相关调控元件,*BnaC. RECQ4B* 在花苞、花中表达量较高,分别是根中的 11.94、11.19 倍;在叶、茎、角果中也有较高表达,分别是根中的 10.50、4.73、5.93 倍。上述结果初步表明,*BnaC. RECQ4B* 具有解旋酶功能,可能参与植物体的 DNA 损伤修复等功能,为进一步探讨甘蓝型油菜 *BnaC. RECQ4B* 基因表达调控及作用机制提供了理论支持与实践基础。

关键词:甘蓝型油菜;RECQ 解旋酶;生物信息学;克隆;基因表达量

中图分类号:S634.301 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)12-0057-08

优良种子是我国粮油安全的关键。只有攥紧中国种子,才能端稳中国饭碗,才能让油瓶子多装中国油,实现我国的粮油安全。甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)是我国重要的油料作物,菜籽油占我国自产植物油的 47%^[1-3]。甘蓝型油菜原产于欧洲地中海地区,20 世纪 20 年代从日本引进我国,后来又从欧洲引入原产品种^[4]。由于我国甘蓝型油菜的栽种历史只有近百年,缺乏优异的种质资源。而油菜种质资源是开展优良品种选育、促进作物科技创新的基础和源泉,开展优异种质资源的研究是作物新品种不断育成和农业生产可持续发展的重要保障,也是一个国家在作物育种领域核心竞争力的体现^[2,5]。

减数分裂是生殖细胞成熟过程中发生的特殊分裂方式,它会导致含有一半物种染色体互补的配

子的形成。这种倍性减少是由染色体复制 1 次和随后的 2 次染色体分离造成的:第 1 次分离是同源染色体的缩减分裂,第 2 次分离是姐妹染色单体的等式分离^[6]。减数分裂重组对于染色体的正确分离、形成交叉,即同源染色体之间遗传物质的相互交换是必不可少的^[7]。生物基因组通过减数分裂进行染色体交叉互换,进行等位基因的重组等,加大了生物遗传信息突变和重组的概率,从而加速了生物进化的进程^[8-10]。其中,交叉对于作物育种至关重要,增加交叉频率这一策略有可能推动作物基因组的大规模交叉提升,并加速育种^[11]。因此对减数分裂重组频率和分布的调控研究在作物育种中有着广阔的应用前景^[12]。在真核生物中,SPO11 复合体在减数分裂前期程序性诱导染色体 DNA 双链断裂,在 ZMM 蛋白与 MLH1/3 蛋白作用下形成 I 类交叉;而在 MUS81 蛋白作用下形成 II 类交叉^[6,11]。但是在大多数的真核生物中,交叉数量是一定的,这是由于 II 类交叉形成过程中的中间产物会在 FANCM 以及 RECQ4 蛋白的作用下形成非交叉,从而限制了交叉数,这也从一定程度上限制了突变产生^[12-13]。RECQ 解旋酶家族从细菌到动植物是一个进化上保

收稿日期:2022-08-09

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:31671720)。

作者简介:丁 鹏(1998—),男,江西上饶人,硕士,从事油菜功能基因研究。E-mail:2212017003@stmail.ujjs.edu.cn。

通信作者:朱克明,博士,副研究员,主要从事油菜功能基因研究。

E-mail:uegzk@sina.com。

守的蛋白质家族。它们是依赖于三磷酸腺苷和脱氧核糖核酸的解旋酶,将双链 DNA 沿 3'→5'方向进行解链^[14]。RECQ 蛋白的功能在人体细胞中研究的较多,如端粒稳定性^[15],DNA 复制^[16-17],DNA 重组^[18]和 DNA 修复^[19-20]。在水稻、豌豆中,研究发现仅突变 *RECQ4* 就能极大地增加水稻、豌豆杂交种中的染色体重组频率^[21]。在拟南芥中,发现 *RECQ4A* 和 *RECQ4B* 具有减数分裂抗交叉活性,*RECQ4A* 和 *RECQ4B* 的双突变体导致交叉频率增加 6 倍^[8]。在番茄中,利用 CRISPR/Cas9 技术对杂交种 F₁ 代进行 *RECQ4* 敲除,发现雄性减数分裂过程中,交叉现象显著增加^[22]。这些研究表明,*RECQ4* 突变能提高植物染色体的同源交换频率。

目前关于油菜 *BnaC. RECQ4B* 基因的功能特征未有报道。本研究采用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR),从甘蓝型油菜 ZS11 中克隆得到 1 个 C 染色体上 *RECQ4B* 基因的全长 cDNA 以及启动子序列,利用生物信息学方法,分析和预测该基因编码蛋白的氨基酸组成、理化性质、亲/疏水性、亚细胞定位及三级结构等^[23],旨在为进一步探究甘蓝型油菜 *RECQ4B* 基因的功能提供理论与实践基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

基因克隆以及实时荧光定量分析分别以甘蓝型油菜 ZS11 和 Y127 为背景。2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus) (P525-01)、Hiscript® II QRT SuperMix、RNA isolater Total RNA Extraction Reagent (R401-01)、FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit (DC301-01)、qPCR SYBR Master Mix (Q111-02)、DL5000 DNA Marker (MD102-01) 均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;琼脂糖 (A620014) 购自加拿大 BBI 公司。

1.2 引物设计与合成

根据华中农业大学提供的甘蓝型油菜基因组网站 (<http://cbi.hzau.edu.cn/bnapus/>) 设计基因克隆引物(表 1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 甘蓝型油菜 DNA 和 RNA 的提取

使用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取甘蓝型油菜 ZS11 叶片组织的 DNA;使用 Trizol 法提取甘蓝型油菜 ZS11 花蕾组织的 RNA,提取的 DNA、RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检验,并用 OD-

表 1 引物序列及用途

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
C09-F	ATGGTGTTGTTTACAAGCGACG	基因克隆
C09-R	TCAACATGTAGCTTCTTCACACG	基因克隆
ProC09F	CCTCGATCTACCACCATCTAC	启动子克隆
ProC09R	GAATCTCTCTCTCCCCCTCACA	启动子克隆
Q-C09-F	TAGCACACCCAGCTAGACAG	荧光定量 PCR
Q-C09-R	TAACTCAGGAGGCAACACAGG	荧光定量 PCR
Actin-QF	TGTTGCTATCCAGGCTGTTCTTTC	荧光定量 PCR
Actin-QR	GATAGCGTGAGGAAGAGCATAACC	荧光定量 PCR

1000-OneDrop 仪器测定其浓度,将质量较好的 RNA 按照 Hiscript® II QRT SuperMix for Q-PCR 反转录试剂盒的说明书进行逆转录反应,得到 cDNA。

1.4 实时荧光定量 PCR

以甘蓝型油菜 Y127 的各组织(根、茎、叶、子叶、下胚轴、花、花苞、角果)的 cDNA 为模板,持家基因 Actin 作为内参,以克隆得到的 *BnaC. RECQ4B* 序列为参考,按照 qPCR 引物设计原则进行 qPCR 引物设计,引物序列见表 1。试验设置 3 次生物学重复和 3 次技术重复。反应体系:2 × qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL, Q-PrimerF、Q-PrimerR 各 0.4 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 7.2 μL。反应程序为 95 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s, 57 ℃ 30 s, 循环 40 次;95 ℃ 15 s;60 ℃ 60 s;95 ℃ 15 s。反应完成后收集整理数据,利用 2^{-ΔΔC_T} 法分析试验数据,计算出基因的相对表达量。使用 Graphpad 软件作图,以根中基因的表达量作为对照,使用 *t* 检验进行显著性差异分析。

1.5 *BnaC. RECQ4B* 基因的克隆与启动子序列获得

分别以 cDNA 与 DNA 为模板,采用 20 μL 的 PCR 反应体系进行 PCR 扩增,包括:2 × Phanta Max Master Mix 10 μL、上游引物(10 μmol/L) 1 μL、下游引物(10 μmol/L) 1 μL、模板 1 μL、ddH₂O 7 μL。*BnaC. RECQ4B* PCR 反应扩增程序为 95 ℃ 3 min;变性 95 ℃ 30 s,退火 58 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 3 min 30 s,循环 34 次,修复延伸 72 ℃ 5 min;启动子 PCR 反应扩增程序为 95 ℃ 3 min;变性 95 ℃ 30 s,退火 56.9 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 2 min 20 s,循环 34 次;修复延伸 72 ℃ 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用 DC301-01 试剂盒回收纯化目的条带,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.6 克隆基因的生物信息学分析

利用 NCBI 的 ORF finder 在线程序及 Conserved

domains 数据库对测序获得的 cDNA 序列的开放阅读框 (ORF) 及保守功能结构域进行分析。通过 ProtParam 对蛋白理化性质进行分析;使用 HMMER 在线分析蛋白结构域;利用 ProtScale 分析蛋白的亲疏水性。采用 TMHMM Server v. 2.0 分析编码氨基酸的跨膜结构域;利用 SignalP 5.0 Server 预测信号肽;用在线软件 Psort 分析亚细胞定位情况。通过 SOPMA 及 SWISS - MODEL 预测蛋白质的二级结构和三级结构;用 MEGA 7.0 构建系统进化树以及序列对比,用 GeneDoc 展示不同物种氨基酸比对结果。使用在线工具 PlantCARE 分析油菜 *BnaC.RECQ4B* 基因启动子区域的顺式作用元件。

2 结果与分析

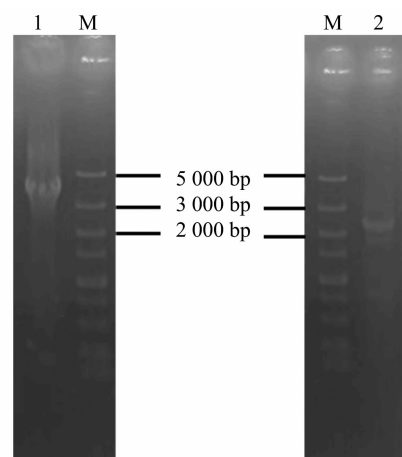
2.1 *BnaC.RECQ4B* 基因的克隆以及启动子的获得

通过 RT - PCR 克隆获得 ZS11 的 *BnaC.RECQ4B* 基因,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析可知,在 3 000 ~ 5 000 bp 之间有明显扩增条带(图 1 左),凝胶产物回收并测序。根据测序结果进行拼接组装,得到最终序列。序列分析结果表明,*BnaC.RECQ4B* 基因的 ORF 长度为 3 477 bp,编码 1 158 个氨基酸。

通过 PCR 克隆获得 ZS11 的 *BnaC.RECQ4B* 基因启动子(Pro. *BnaC.RECQ4B*)序列,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析可知,在 2 000 ~ 3 000 bp 之间有明显扩增条带(图 1 右),凝胶产物回收并送公司测序。根据测序结果进行拼接组装,获得 *BnaC.RECQ4B* 基因的启动子序列,与华中农业大学 (<http://cbi.hzau.edu.cn/bnapus/>) 公布的序列比对仅有 1 个 T 碱基的区别。

2.2 *BnaC.RECQ4B* 基因生物信息学分析

2.2.1 理化性质、亚细胞定位分析结果 *BnaC.RECQ4B* 蛋白分子式为 $C_{5653}H_{9011}N_{1623}O_{1743}S_{56}$, 理论分子量为 18 086 u。通过 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 发现该蛋白亲水性指数在 -3.567 ~ 2.744 之间,亲水性平均系数为 -0.461 (图 2 - A)。其中,*BnaC.RECQ4B* 的第 505 位氨基酸的分值最高,为 2.744,表明该位点氨基酸疏水性最强;第 1 119 位氨基酸的分值最低,为 -3.567,该位点氨基酸亲水性最强。不稳定系数 (II) 为 46.50,是不稳定蛋白;脂溶指数为 80.82;负电荷残基有 130 个,正电荷残基有 140 个,理论等电点为



1—*BnaC.RECQ4B*; M—DL5000 DNA marker;
2—Pro.*BnaC.RECQ4B*

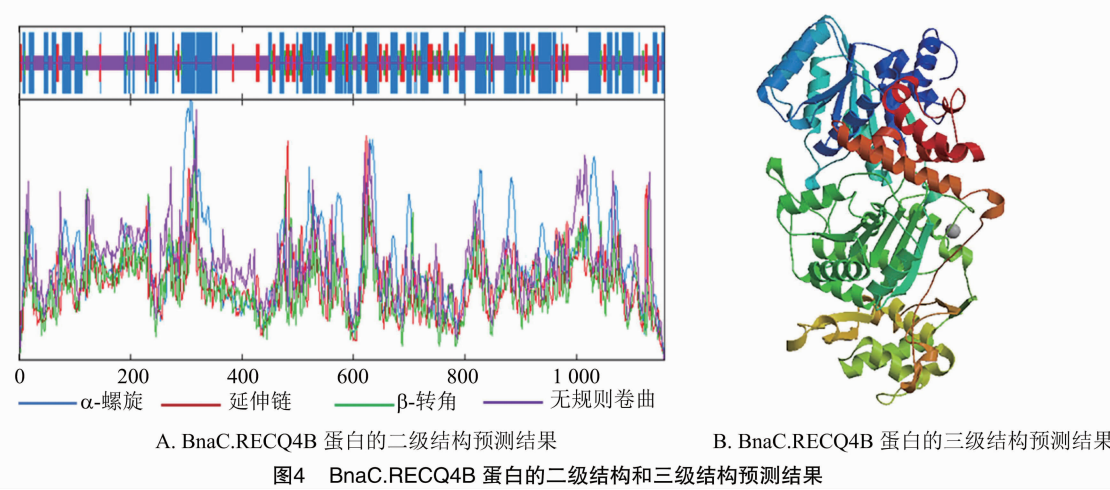
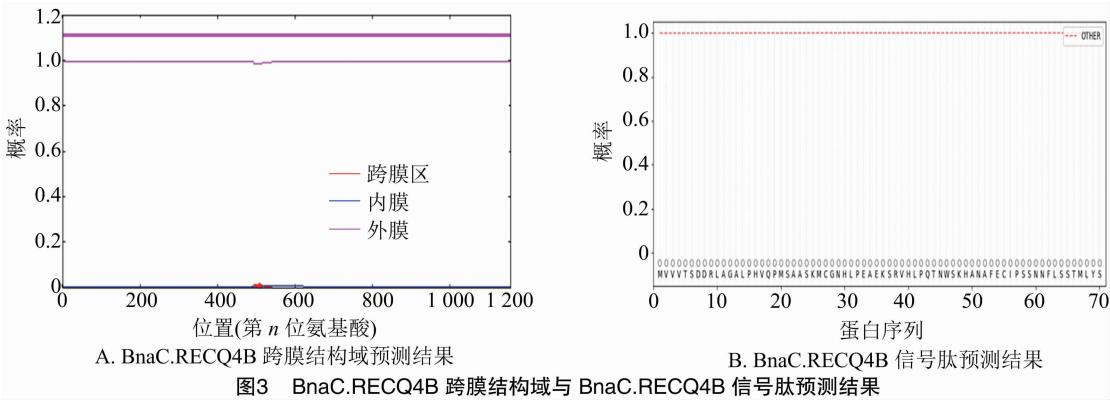
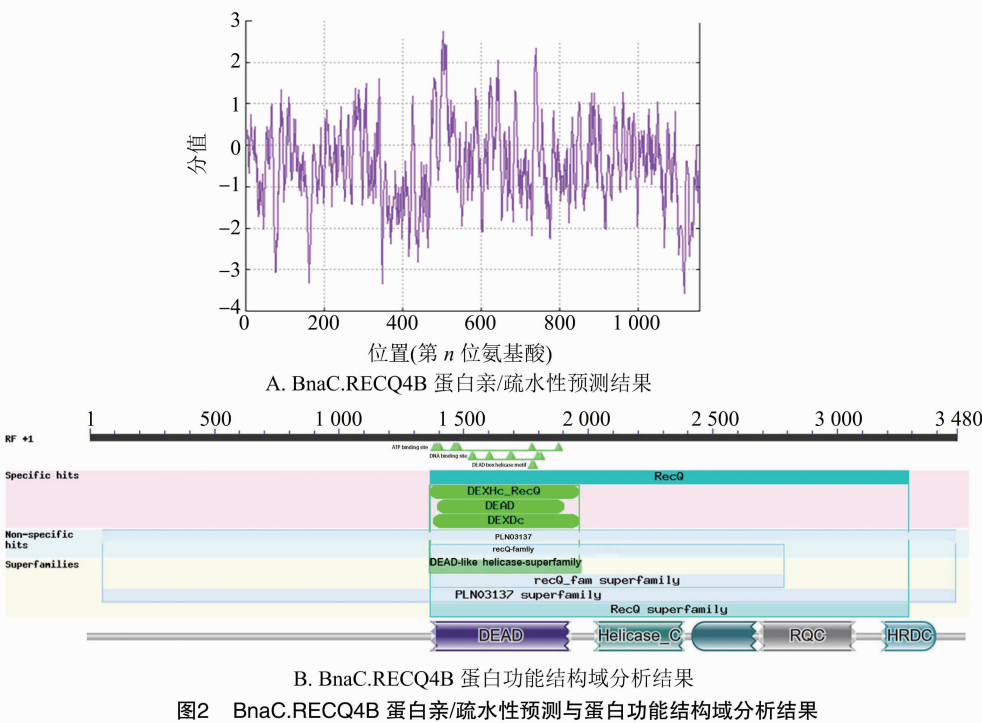
图1 *BnaC.RECQ4B*和 Pro.*BnaC.RECQ4B* 克隆片段的 PCR 电泳结果

8.38,偏碱性。以上结果表明,*BnaC.RECQ4B* 蛋白为亲水性不稳定碱性蛋白。亚细胞定位结果显示,*BnaC.RECQ4B* 主要分布于细胞核中。

对 *BnaC.RECQ4B* 的蛋白结构域进行分析,发现其保守结构域为第 586 位至第 595 位的氨基酸,该蛋白属于 PLN03137 超家族(图 2 - B)。第 465 位至第 636 位为 DEAD/DEAH box helicase 结构域;第 668 位至第 778 位为 Helicase conserved C - terminal 结构域;第 789 位至第 870 位为 RecQ zinc - binding;第 873 位至第 993 位为 RQC 结构域;第 1 026 位至第 1 095 位为 HRDC 结构域。

2.2.2 跨膜结构域的预测分析及信号肽预测 跨膜区连接膜内和膜外,主要功能为固定蛋白,部分还有一些介导信号传递的作用。对于能够在细胞膜或质膜上发挥作用的蛋白质,通过了解多肽链中疏水氨基酸区的数量和位置,可以知道蛋白质的穿膜情况^[24]。结果表明,*BnaC.RECQ4B* 不具有跨膜结构域(图 3 - A)。利用 SignalP 5.0 Server 在线软件对蛋白的信号肽进行预测,结果表明,*BnaC.RECQ4B* 不具有信号肽,属于非分泌蛋白(图 3 - B)。

2.2.3 *BnaC.RECQ4B* 蛋白结构分析 利用 SOPMA 对蛋白质的二级结构进行在线预测,发现 *BnaC.RECQ4B* 具有丰富的二级结构,其中无规则卷曲占 44.30%, α - 螺旋占 39.29%, β - 转角占 5.44%,延伸链占 10.97% (图 4 - A)。通过 SWISS - MODEL 对蛋白质的三级结构进行预测并构建 *BnaC.RECQ4B* 的三级结构模型(图 4 - B),但 GMQE 值(全球性模型质量估测)是 0.32,表明可信度一般。



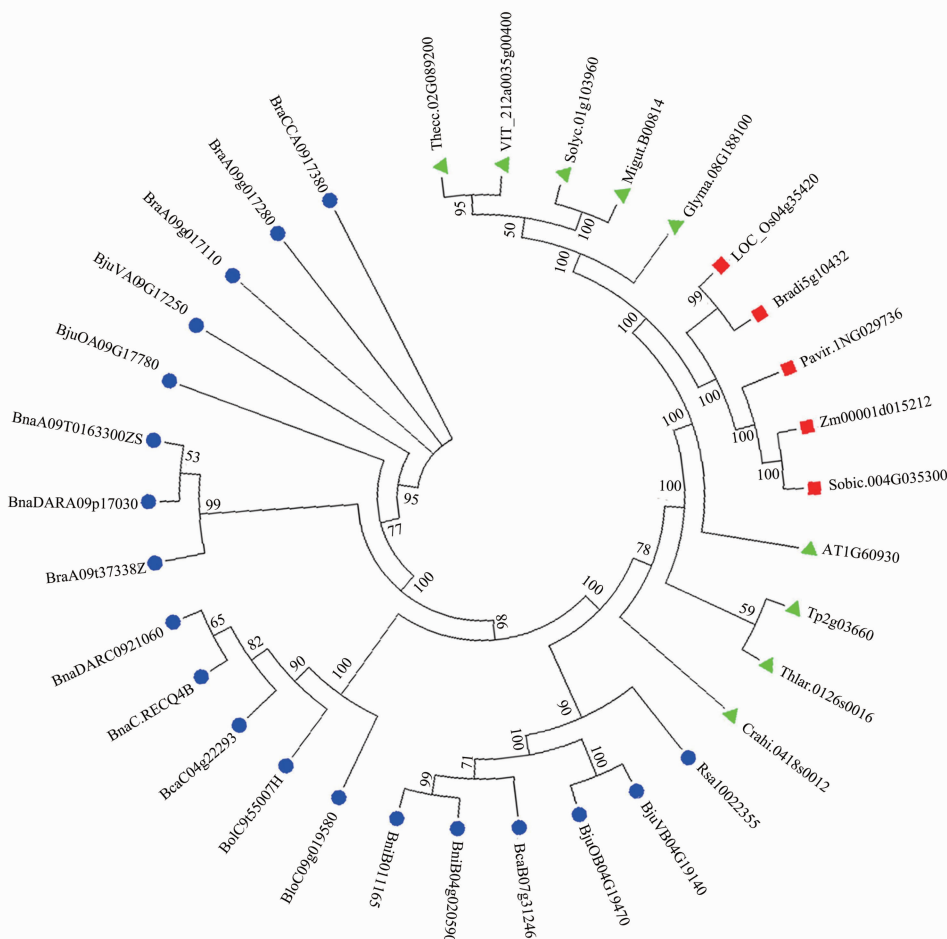
2.2.4 系统进化树分析及不同物种氨基酸比对
通过 BLASTp 在 Phytozome 以及芸薹属基因组数据

库中筛选获取单子叶、双子叶以及芸薹属物种
RECQ4B 基因的同源蛋白质序列。使用 MEGA 7.0

软件中的邻接(NJ)法构建 *BnaC. RECQ4B* 系统发育树,整体上所有的基因主要可以分为 3 个大的类群(图 5)。第 1 类群单子叶植物水稻、玉米等的基因都处于 1 个大分支中,说明进化上亲缘性最为相近;第 2 类群双子叶植物大豆、番茄、葡萄、拟南芥等的基因处于 2 个不同的分支中,说明大豆、番茄、葡萄与拟南芥等植物的亲缘性较低;第 3 类群芸薹属的基因处于 1 个分支,并且与拟南芥处于 1 个大分支中,而与大豆、番茄、葡萄处于不同分支,这说明芸薹属植物与拟南芥有着更高的亲缘性,与大豆、番茄、葡萄等的亲缘性较低。*BnaC. RECQ4B* 与芸薹

属甘蓝、擘蓝的基因处于 1 个分支,与芥菜、白菜分支不同,说明 *BnaC. RECQ4B* 与甘蓝、擘蓝亲缘性较高,与芥菜、白菜亲缘性较低,进一步说明 *BnaC. RECQ4B* 可能起源于甘蓝、擘蓝基因组。

分别选取单子叶代表性植物水稻及双子叶植物拟南芥、大豆、番茄的氨基酸序列与油菜 *RECQ4B* 进行氨基酸序列比对。发现, *BnaC. RECQ4B* 与水稻、拟南芥、大豆、番茄的序列相似性分别为 44%、74%、50%、50% (图 6)。其中拟南芥与油菜的 *RECQ4B* 蛋白序列最相似,这与 2 个物种同属十字花科是相一致的。



绿色三角形表示双子叶植物;红色正方形代表单子叶植物;蓝色圆代表芸薹属植物。Glyma.08G188100—大豆

(*Glycine max*); Migut.B00814—猴面花(*Mimulus guttatus*); Solyc.01g103960—番茄(*Solanum lycopersicum*);

VIT_212s0035g00400—葡萄(*Vitis vinifera*); Thecc.02G089200—可可树(*Theobroma cacao*); Bradi5g10432—

二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*); LOC_Os04g35420—水稻(*Oryza sativa*); Pavir.1NG029736—柳枝稷

(*Panicum virgatum*); Sobic.004G035300—高粱(*Sorghum bicolor*); Zm00001d015212—玉米(*Zea mays*);

AT1G60930—拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); Thlar.0126s0016—遏蓝菜(*Thlaspi arvense*); Tp2g03660—北美乔柏

(*Thuja plicata*); Crahi.0418s0012—西班牙两节芥(*Crambe hispanica*); BraA09g017110、BraA09g017280、

BraCCAA0917380、BraA09t37338Z—青菜(*Brassica rapa*); BjuVA09G17250、BjuOA09G17780、BjuVB04G19140、

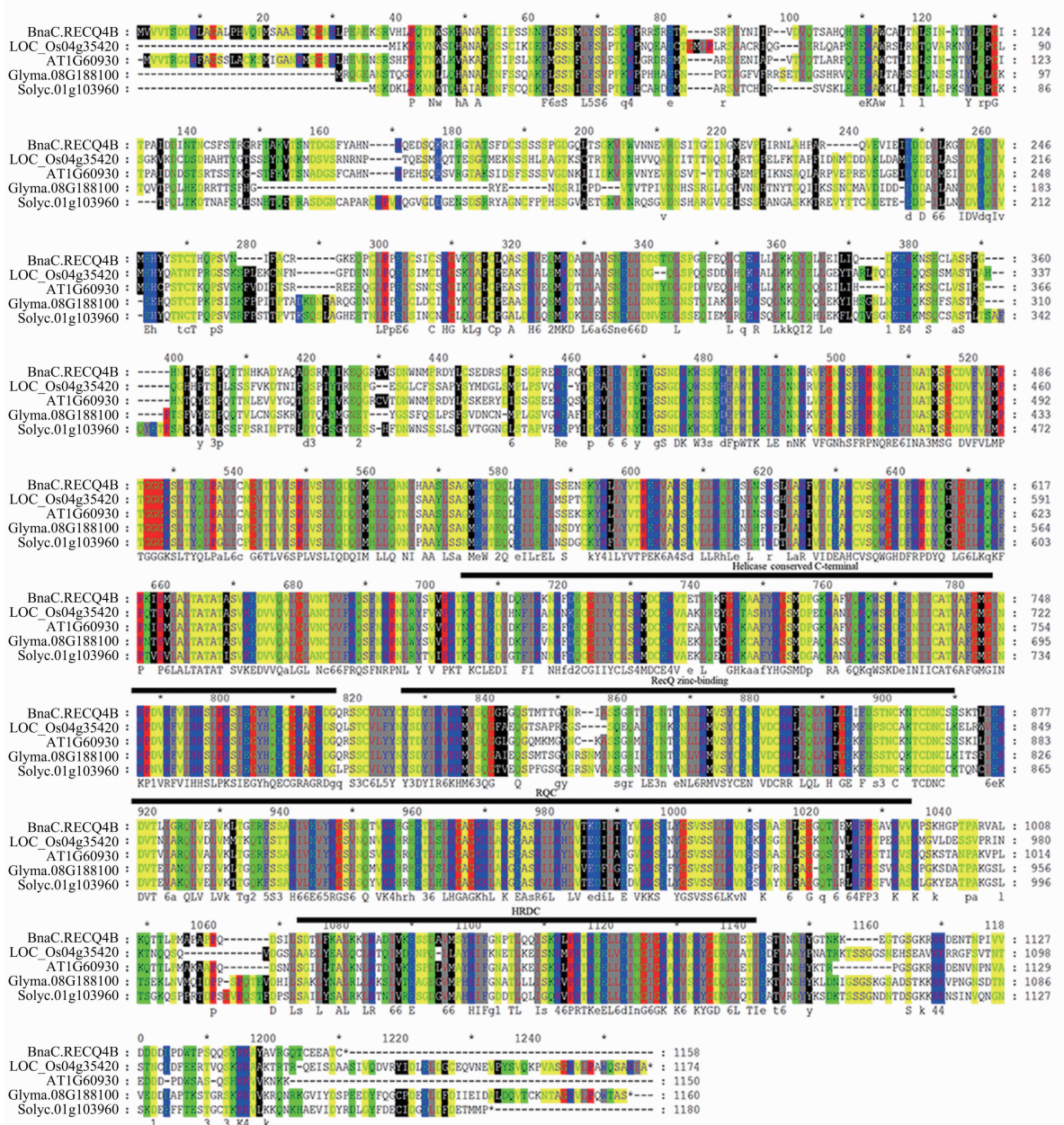
BjuOB04G19470—芥菜(*Brassica juncea*); BnaDARA09p17030、BnaA09T0163300ZS、BnaC.RECQ4B、

BnaDARC0921060—油菜(*Brassica napus*); BcaC04g22293、BcaB07g31246—擘蓝(*Brassica caulorapa*); BniB011165、

BniB04g020590—苦芥(*Brassica integrifolia*); BolC9t55007H、BolC09g019580—甘蓝(*Brassica*

oleracea); Rsa10022355—萝卜(*Raphanus sativus*)

图5 *RECQ4B* 蛋白质各物种的系统进化树



BnaC.RECQ4B—油菜(*Brassica napus*); LOC_Os04g35420—水稻(*Oryza sativa*); AT1G60930—拟南芥(*Arabidopsis thaliana*); Glyma.08G188100—大豆(*Glycine max*); Solyc.01g103960—番茄(*Solanum lycopersicum*)

图6 不同植物 RECQ4B 氨基酸多序列对比

2.2.5 *BnaC*.RECQ4B 启动子顺式元件分析 对 *BnaC*.RECQ4B 起始密码子上游 2 251 bp 的启动子区域进行分析,结果(表 2)表明,该基因的启动子不仅含有 TATA-box 和 CAAT-box 真核生物启动子固有元件,还包含了 2 个 A-box 顺式作用调控元件;5 个 ABRE 参与脱落酸反应的顺式作用调控元件;1 个 AE-box 光响应;3 个 ARE 顺式作用调节元件对无氧诱导至关重要;5 个 Box4 参与光响应的保守 DNA 模块的一部分;2 个 CGTCA-motif 参与茉莉酸甲酯(MeJA)反应的顺式作用调节元件;1 个

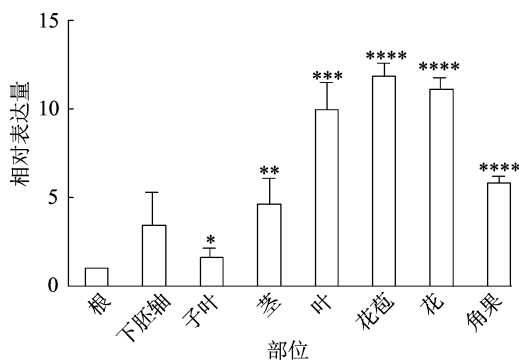
GATA-motif 光反应元件;1 个 LAMP-element 光反应元件;1 个 LTR 参与低温响应的顺式作用元件;1 个 MBSI MYB 结合位点参与类黄酮生物合成基因调控;1 个 MRE MYB 结合位点参与光响应; O_2 -site 参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式作用调节元件;1 个 Sp1 光反应元件;2 个 TGACG-motif 参与 MeJA 反应的顺式作用调节元件;1 个 chs-CMA1a 光反应元件。研究结果表明,该启动子不仅包含多种响应逆境胁迫的顺式元件,还包含大量的光反应与光响应相关调控元件。

表 2 *BnaC. RECQ4B* 启动子区的顺式作用元件分布及功能

元件名称	序列	功能	位置(bp)
A - box	CCGTCC	顺式作用调控元件	907,922
ABRE	AACCCGG	参与脱落酸反应的顺式作用调控元件	1 574,2 167,2 047,1 585,2 143
AE - box	AGAAACTT	光响应模块的一部分	549
ARE	AAACCA	顺式作用调节元件对无氧诱导至关重要	219,406,1 494
Box4	ATTAAT	参与光响应的保守 DNA 模块的一部分	349,967,1 929,1 973,2 107
CGTCA - motif	CGTCA	参与 MeJA 反应的顺式作用调节元件	1 010,2 056
GATA - motif	AAGATAAGATT	部分光反应元件	1 943
LAMP - element	CTTTATCA	部分光反应元件	1 078
LTR	CCGAAA	参与低温响应的顺式作用元件	2 127
MBSI	TTTTTACGGTTA	MYB 结合位点参与类黄酮生物合成基因调控	997
MRE	AACCTAA	MYB 结合位点参与光响应	1 266
O ₂ - site	GTTGACGTGA	参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式作用调节元件	239
Sp1	GGGCGG	光反应元件	825
TGACG - motif	TGACG	参与 MeJA 反应的顺式作用调节元件	1 010,2 056
chs - CMA1a	TTACTTAA	部分光反应元件	1 953

2.3 实时荧光定量 PCR 表达分析

利用 RT - qPCR 分析 *BnaC. RECQ4B* 在 Y127 油菜各组织中的相对表达含量,结果(图 7)表明,*BnaC. RECQ4B* 在油菜不同部位均有表达,但不同部位表达差异较大。在根中的表达量最少,而在花苞、花中表达量较高,分别是根中的 11.94、11.19 倍;在叶、茎、角果中也有较高表达,分别是根中的 10.50、4.73、5.93 倍。该结果与 *BnaC. RECQ4B* 可能参与减数分裂非交叉形成的生物学功能是一致的。



*, **, ***, **** 分别表示与根相比在 0.05、0.01、0.001、0.000 1 水平上差异显著

图7 *BnaC.RECQ4B* 基因在油菜不同组织的相对表达量

3 讨论与结论

甘蓝型油菜是我国及世界上最重要的油料作物之一。我国 2019—2020 年度油菜播种面积达 500 万 hm^2 , 年产油量 520 万 t, 占国产油料产油的 50% 以上, 是第一国产食用植物油来源^[25-26]。我

国虽有本地的芥菜型油菜与白菜型油菜, 但是产量不高, 抗性不强, 故目前主要栽种的是由国外引进的甘蓝型油菜^[2]。我国在甘蓝型油菜的种质资源方面匮乏, 因此发掘新的油菜种质资源是必要的。育种的基础条件是基因的等位变异, 这种变异在减数分裂重组时会自然地重新洗牌, 并通过配子传递。这创造了新的等位基因组合, 而育种者就是利用这样的原理来创造新的优异表型。然而, 同源染色体之间的减数分裂重组受到每条染色体交叉数量的限制(通常每对染色体只形成 1~3 个)^[27]。在植物基因组中, 重组频率可能在染色体不同区域之间差异高达 100 倍^[28]。因此, 使减数分裂过程易于操纵以增强或靶向基因重组是非常可取的。RecQ 解旋酶是维持基因组完整性的一系列 DNA 修复和重组途径中的关键因子。在拟南芥等植物中的研究都表明, *RECQ4B* 基因在减数分裂细胞中通过影响染色体交叉数量从而影响染色体的重组, 该基因的研究有利于新的种质资源的创建。

本研究以甘蓝型油菜品种 ZS11 为材料, 克隆了 *BnaC. RECQ4B* 基因以及启动子序列, 并通过生物信息学方法分析了其基本理化性质以及结构特点等。利用 NCBI 的 CDD 数据库分析, 发现 *BnaC. RECQ4B* 蛋白属于植物 PLN03137 超家族, 利用 HMMER 蛋白质结构域在线预测分析该蛋白有 DEAD/DEAH box helicase 结构域、Helicase conserved C - terminal 结构域、RecQ zinc - binding、RQC 结构域、HRDC 结构域, 这与先前的研究^[29-30]

相吻合。蛋白质疏水性预测表明该蛋白为亲水性不稳定碱性蛋白,主要分布于细胞核中。*BnaC. RECQ4B* 属于非分泌蛋白,该蛋白质的二级结构以无规则卷曲为主。通过构建系统进化树及不同物种氨基酸序列比对,发现甘蓝型油菜 *BnaC. RECQ4B* 基因与甘蓝、擘蓝亲缘性最近,推测该基因来源于甘蓝的基因组,拟南芥的氨基酸序列与油菜最为相似,相似性达到 74%。启动子序列分析结果表明,该启动子不仅包含多种响应逆境胁迫的顺式元件,还包含大量的光反应与光响应相关调控元件。RT-qPCR 分析结果表明,*BnaC. RECQ4B* 在花苞中表达量最高,这与该基因的可能的生物学功能是相一致的。本研究结果为进一步探讨甘蓝型油菜 *BnaC. RECQ4B* 基因表达调控及作用机制提供了理论支持与实践基础。

参考文献:

- [1] 罗桂环. 中国油菜栽培起源考[J]. 古今农业,2015(3):23-28.
- [2] 李利霞,陈碧云,闫贵欣,等. 中国油菜种质资源研究利用策略与进展[J]. 植物遗传资源学报,2020,21(1):1-19.
- [3] 王汉中. 以新需求为导向的油菜产业发展战略[J]. 中国油料作物学报,2018,40(5):613-617.
- [4] Lu K, Wei L J, Li X L, et al. Whole-genome resequencing reveals *Brassica napus* origin and genetic loci involved in its improvement[J]. Nature Communications,2019,10:1154.
- [5] 鲁飞. 保护种质资源 保障国家粮食安全[J]. 农经,2020(5):40-43.
- [6] Fayos I, Mieulet D, Petit J, et al. Engineering meiotic recombination pathways in rice[J]. Plant Biotechnology Journal,2019,17(11):2062-2077.
- [7] Blary A, Jenczewski E. Manipulation of crossover frequency and distribution for plant breeding[J]. Theoretical and Applied Genetics,2019,132(3):575-592.
- [8] Séguéla - Arnaud M, Crismani W, Larchevêque C, et al. Multiple mechanisms limit meiotic crossovers; TOP3 α and two BLM homologs antagonize crossovers in parallel to FANCM[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2015,112(15):4713-4718.
- [9] Serra H, Lambing C, Griffin C H, et al. Massive crossover elevation via combination of *HEI10* and *recq4a recq4b* during *Arabidopsis meiosis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2018,115(10):2437-2442.
- [10] 朱永生,李汉仁,陈纪鹏. 芸薹属种内与种间杂种遗传学特征[J]. 江苏农业科学,2021,49(24):85-89.
- [11] Székely L, Ohta K, Nicolas A. Initiation of meiotic homologous recombination: flexibility, impact of histone modifications, and chromatin remodeling[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,2015,7(5):a016527.
- [12] Blary A, Gonzalo A, Eber F, et al. FANCM limits meiotic crossovers in *Brassica crops*[J]. Frontiers in Plant Science,2018,9:368.
- [13] Crismani W, Girard C, Froger N, et al. FANCM limits meiotic crossovers[J]. Science,2012,336(6088):1588-1590.
- [14] Kaiser S, Sauer F, Kisker C. The structural and functional characterization of human RecQ4 reveals insights into its helicase mechanism[J]. Nature Communications,2017,8:15907.
- [15] Singh D K, Ghosh A K, Croteau D L, et al. RecQ helicases in DNA double strand break repair and telomere maintenance[J]. Mutation Research,2012,736(1/2):15-24.
- [16] Gupta S V, Schmidt K H. Maintenance of yeast genome integrity by RecQ family DNA helicases[J]. Genes,2020,11(2):205.
- [17] Ruchert J M, Brady M M, McMahan S, et al. BLM helicase facilitates rapid replication of repetitive DNA sequences in early *Drosophila* development[J]. Genetics,2022,220(1):169.
- [18] Garnier F, Debat H, Nadal M. Type IA DNA topoisomerases: a universal core and multiple activities[J]. Methods in Molecular Biology,2018,1703:1-20.
- [19] Fu W Q, Ligabue A, Rogers K J, et al. Human RECQ helicase pathogenic variants, population variation and missing diseases[J]. Human Mutation,2017,38(2):193-203.
- [20] Lu H M, Davis A J. Human RecQ helicases in DNA double-strand break repair[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology,2021,9:640755.
- [21] Mieulet D, Aubert G, Bres C, et al. Unleashing meiotic crossovers in crops[J]. Nature Plants,2018,4(12):1010-1016.
- [22] de Maagd R A, Loonen A, Chouaref J, et al. CRISPR/Cas inactivation of RECQ4 increases homeologous crossovers in an interspecific tomato hybrid[J]. Plant Biotechnology Journal,2020,18(3):805-813.
- [23] Rezaei - Moshaei M, Bandehagh A, Dehestani A, et al. Molecular cloning and in-depth bioinformatics analysis of type II ribosome-inactivating protein isolated from *Sambucus ebulus* [J]. Saudi Journal of Biological Sciences,2020,27(6):1609-1623.
- [24] 尹桂芳,段迎,杨晓琳,等. 苦芥 *Fit4H* 基因克隆与生物信息学分析[J]. 作物杂志,2022(1):77-83.
- [25] 刘成,冯中朝,肖唐华,等. 我国油菜产业发展现状、潜力及对策[J]. 中国油料作物学报,2019,41(4):485-489.
- [26] 殷艳,尹亮,张学昆,等. 我国油菜产业高质量发展现状和对策[J]. 中国农业科技导报,2021,23(8):1-7.
- [27] Mercier R, Mézard C, Jenczewski E, et al. The molecular biology of meiosis in plants[J]. Annual Review of Plant Biology,2015,66:297-327.
- [28] Mézard C, Jahns M T, Grelon M. Where to cross? New insights into the location of meiotic crossovers[J]. Trends in Genetics,2015,31(7):393-401.
- [29] Hartung F, Puchta H. The RecQ gene family in plants[J]. Journal of Plant Physiology,2006,163(3):287-296.
- [30] Das T, Pal S, Ganguly A. Human RecQ helicases in transcription-associated stress management: bridging the gap between DNA and RNA metabolism[J]. Biological Chemistry,2021,402(5):617-636.