

鱼腥草中*HtbZIP60*基因的克隆和生物信息分析

叶 茜*, 张楠楠*, 刘 鑫, 陈 丽, 杨正婷#

贵州师范大学生命科学学院, 西南喀斯特山区生物多样性保护国家林业局重点实验室, 贵州 贵阳

收稿日期: 2023年12月8日; 录用日期: 2024年1月9日; 发布日期: 2024年1月19日

摘 要

bZIP是植物抗逆性领域关键的转录因子, 能调控细胞生物学中的各种生命过程, 包括生长、发育、应激响应和代谢调控。为了深入研究鱼腥草中bZIP60基因的功能与调控机制, 以鱼腥草为材料提取总RNA, 合成cDNA第一链, 然后成功克隆出鱼腥草*HtbZIP60*基因, 并对其进行相关的生物信息学分析。结果表明, *HtbZIP60*的编码序列全长为996 bp, 编码331个氨基酸, 蛋白质分子质量37447.00 ku, 不含信号肽剪切位点, 包含跨膜结构域, 以 α 螺旋为主要构成, 定位于细胞核, 具有30个已知功能的启动子。这些发现为深入研究*HtbZIP60*在鱼腥草生长与发育中的生物学功能提供了科学基础。

关键词

鱼腥草, *HtbZIP60*, 生物信息分析, 基因克隆

Cloning and Bioinformatic Analysis of the Analysis of *HtbZIP60* Gene in *Houttuynia cordata thunb*

Qian Ye*, Nannan Zhang*, Xin Liu, Li Chen, Zhengting Yang#

Key Laboratory of State Forestry Administration on Biodiversity Conservation in Karst Mountainous Areas of Southwestern China, School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang Guizhou

Received: Dec. 8th, 2023; accepted: Jan. 9th, 2024; published: Jan. 19th, 2024

Abstract

bZIP is a key transcription factor in the field of plant stress resistance, capable of regulating vari-

*共一作者。

#通讯作者。

文章引用: 叶茜, 张楠楠, 刘鑫, 陈丽, 杨正婷. 鱼腥草中 *HtbZIP60* 基因的克隆和生物信息分析[J]. 植物学研究, 2024, 13(1): 63-74. DOI: 10.12677/br.2024.131008

ous biological processes in cell biology, including growth, development, stress response, and metabolic regulation. To investigate the function and regulatory mechanism of the *HtbZIP60* gene in *Houttuynia cordata thunb*, total RNA was extracted from *Houttuynia cordata thunbas* the material, and the first strand of cDNA was synthesized. Subsequently, the *HtbZIP60* gene from *Houttuynia cordata thunb* was successfully cloned, and relevant bioinformatics analysis was conducted. The results revealed that the coding sequence of *HtbZIP60* is 996 bp in length, encoding 331 amino acids, with a protein molecular weight of 37447.00 ku. It lacks a signal peptide cleavage site but contains a transmembrane structure domain, predominantly composed of α -helices. The protein is localized in the cell nucleus and possesses 30 known functional promoters. These findings provide a scientific foundation for further exploring the biological functions of *HtbZIP60* in the growth and development of *Houttuynia cordata thunb*.

Keywords

Houttuynia cordata thunb, *HtbZIP60*, Bioinformatics Analysis, Gene Cloning

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

鱼腥草是一种常见的草药, 其全草或干燥的地上部分含有丰富的黄酮、有机酸和无机盐等多种具有药效的成分[1]。这些成分赋予了鱼腥草多种潜在的药用功效, 包括抗菌、抗病毒、抗炎症等作用, 有助于缓解感冒、流感和其他呼吸道感染[2]; 同时, 它还具有排毒、清热解毒、利尿、免疫增强以及潜在的抗癌作用[3] [4] [5]。然而, 鱼腥草的生存能力和种群扩张受到了干燥、寒冷和重金属污染等环境压力的严重影响。为提高鱼腥草在环境压力下的生存能力, 了解其环境应激信号通路对于鱼腥草的研究和保护至关重要。

bZIP 转录因子因其独特的 bZIP 结构域而命名, 其中包括一个碱性区域和一个亮氨酸拉链区域[6]。这一结构域是 bZIP 转录因子的标志性特征, 它们通过该结构域与 DNA 结合并参与基因的调控。bZIP 转录因子家族涵盖了多种不同成员, 广泛分布于真核生物, 包括植物、动物和真菌等[7] [8], 这种广泛性表明 bZIP 家族在生物体内具有高度的保守性和重要性。bZIP 转录因子在细胞中扮演着多种角色, 涉及到广泛的生物学过程。它们可以调控基因的转录, 并参与发育、生长、分化、应激响应、代谢和疾病等多个生物学过程[9] [10]。许多 bZIP 转录因子在细胞面对环境应激时发挥关键作用[10]。例如, 一些家族成员在细胞应激响应中起重要作用, 帮助细胞应对氧化应激、热应激、脂质代谢等情况。此外, 一些 bZIP 转录因子与疾病的发生和发展密切相关。例如, CHOP (C/EBP Homologous Protein)在内质网应激和细胞凋亡中发挥关键作用, 与多种疾病如癌症、糖尿病和神经退行性疾病等相关[11]。

AtbZIP60 是拟南芥中的一个重要转录因子, 对协调各种生物学响应起着重要作用。它调控与内质网应激、热应激、病原体感染、防御激素响应和其他关键过程相关的基因表达[12] [13]。*ZmbZIP60* 在玉米中对植物的多种适应性过程起着贡献作用, 它有助于适应升高的温度、保持内质网稳定、增强抵抗病原体的能力, 并帮助应对干旱[14]。同样, 在环境应激条件下, *SibZIP60* 在番茄植物中被激活。这种激活调节了特定基因的表达, 增强了植物对高温和病毒感染等环境应激因素的抵抗力[15]。然而, 关于鱼腥草中 *HtbZIP60* 的调控机制的深入研究尚未见报道。因此研究鱼腥草中 *HtbZIP60* 的关键基因序列和结构信息

对于阐明其代谢机制至关重要。

因此, 在前期研究中我们利用鱼腥草转录组数据, 通过逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR)克隆获得了 *HtbZIP60* 基因序列, 并利用生物信息学方法对其结构和功能进行了分析。这为我们进一步探究 *HtbZIP60* 基因在胁迫环境中的功能提供了科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验试剂

少量提取植物组织 Total RNA 试剂盒, 逆转录试剂盒(TakaRa)、普通 DNA 产物纯化试剂盒(离心柱型)。

2.2. 基因克隆的克隆

我们使用少量提取植物组织 Total RNA 试剂盒来萃取高质量的 RNA。然后, 使用逆转录试剂盒(TakaRa)将 RNA 反转录成 cDNA。再利用在线网站 Primer3Plus (<http://www.primer3plus.com/>)设计 PCR 引物(F': ATGGCAGATCAGCGCGAGGA, R': CTTCTGTTTTGTGGCTCTAA)。采用鱼腥草 cDNA 为底物, 制备 50 μ L 的 PCR 反应液体系(cDNA 2 μ L; 引物各 2.5 μ L; Prime STAR Max Premix (2X) 25.0 μ L; ddH₂O 18 μ L)。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 4 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 50 s, 68 $^{\circ}$ C 10 min, 共 35 个循环, 并以 4 $^{\circ}$ C 保存为程序, 扩增目的基因片段。最终, 我们将扩增得到的目的基因片段提交给上海擎科生物科技有限公司进行测序。

2.3. 生物信息分析

将所得序列进行以下生物信息学分析。

2.3.1. 基因基本信息分析

通过对生工生物公司送测的结果进行深入分析和科研研究, 成功地获取了 *HtbZIP60* 基因的重要基本信息。我们将该基因的序列特征等特征进行分析总结。

2.3.2. 蛋白质结构域预测

通过 CNBI 在线网站对 *HtbZIP60* 基因序列进行翻译, 随后将所得的氨基酸序列输入至 Interproscan 在线工具(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/>)进行分析, 以推测该基因可能存在的蛋白质结构域。

2.3.3. 同源基因分析与多序列对比

我们将 *HtbZIP60* 基因上传至 NCBI 数据库, 并运用 NCBI 在线工具执行 BLAST 分析, 以检索出与 *HtbZIP60* 基因相似的同源序列。随后, 从中选取前三个具有最高相似性的基因, 进行详尽的基因分析。接下来, 我们使用 Clustal Omega 在线工具(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)对这四个基因进行多序列比对, 并构建系统发育树, 以进一步研究它们之间的关系和进化历史。

2.3.4. 蛋白质特性分析

将 *HtbZIP60* 的基因序列上传至 Clustal Omega 在线工具(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)进行分析, 以获得关于 *HtbZIP60* 蛋白质特性的信息。再利用 PRABI-GERLAND 工具(<https://doua.prabi.fr/templates/services>)对 *HtbZIP60* 的蛋白质结构进行详细分析。

2.3.5. 跨膜域结构与信号肽分析

利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线软件对 *HtbZIP60* 基因进行了跨膜结构

分析, 并利用 Novopro (<https://novopro.cn/tools/signalp.html>)在线工具对 *HtbZIP60* 基因进行分析, 得出 HtbZIP60 蛋白质的信号肽分析结果。

2.3.6. 蛋白质二级、三级结构预测

利用 PSIPED Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)在线软件对 *HtbZIP60* 基因和与该基因同源性更近的基因进行蛋白质二级结构的分析。再利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)在线软件对 *HtbZIP60* 基因进行蛋白质三级结构的模型建构。

2.3.7. 亚细胞定位预测

使用在线工具 PSORT (<https://www.genscript.com/tools/psort>)对 *HtbZIP60* 基因进行了亚细胞定位的预测分析, 以了解该基因在细胞内可能的位置。

2.3.8. 启动子分析

使用 Plantcare 在线工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)对 *HtbZIP60* 基因的启动子区域进行分析, 以获取与顺式作用元件相关的数据。

3. 结果与分析

3.1. 鱼腥草 *HtbZIP60* 基因的克隆及其序列基本信息分析

提取鱼腥草的 RNA 后, 将其逆转录为 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板, F (ATGGCAGATCAGCGCGAGGA) R (CTTCTGTTTTGTGGCTCTAA)为进行 *HtbZIP60* 基因的全长扩增, 电泳结果显示在 750 bp 偏上, 1000 bp 左右处有一条单一的高亮度目的条带(如图 1)。将剩余的 PCR 产物进行测序, 得到全长为 956 bp 的基因序列, 经 NCBI blastn 对比后命名为鱼腥草 *HtbZIP60* 基因。

利用 ORF finder 确定 *HtbZIP60* 基因的开放阅读框为 956 bp (如图 2(a), 编码 331 个氨基酸(如图 2(b))。

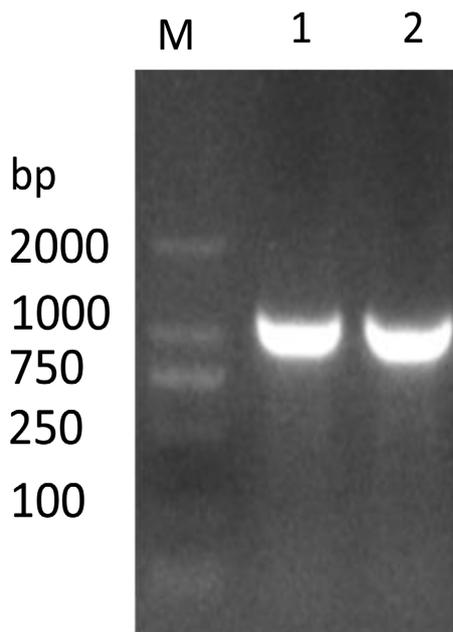


Figure 1. Electrophoresis of PCR amplification products of *Houttuynia cordata thumb* *HtbZIP60* gene (M stands for Marker, 1 and 2 are PCR samples)

图 1. 鱼腥草 *HtbZIP60* 基因 PCR 扩增产物电泳(M 为 Marker, 1, 2 为 PCR 样品)

```

1   ATGGCAGATC AGCGCGAGGA GGACTGTGGG CTCAACGATG ATCTCTTAGA TTGGGTTCTT
61  CAATACGTTT CAGACTCTCT GGACAACCTG GACGAAGATC TTCGTCTCCT CAATGCCACT
121 TCGGTTGAAA ATCCGGGTCA TGAGAATGTC GATCCATCAT CTTTAGTGCC GATTCTCCA
181 GGACTGGACG ATATTGGGCA GTTCTGCTC GGCGATGCGG CAGATAATGG ACTAGTTGTC
241 GAGCCGAGTC GTGAAGTGGG AGATGATTTC TTTGCCGATC TTCATATTGA TTCGTCCGAC
301 GCGCTGTCCG GTGAAACAAG GGCTTCCAGC GACCAGACGC TCAGTCTAGT TGTTGTCCAG
361 GAAAATAAGG GTTCTGATGT TGAGGAAGAT CAGGACGCGG GAGATAACTC GGAAAACGAG
421 AGGATTGATT CTAAGTACCC TGAGGATGTT CAGGAAGATG AGCCCTTGAG CAAAAACGCG
481 AAAAGGCAAT TGAGGAACCG GGACTCGGCC ATGAGGTCAA GAGAGAGGAA GAAGCTATAT
541 GTCAGAGACC TGGAGTTGAA GAGCAAGTAT CTGGAAGGAG AGTTAAGGAA ATTACAGTAT
601 GCACTCAGCT GCTGTGCAGC CGAGAATCAA ATACTTCACA ATCAGTTGCA AGCAGCAATG
661 GCCTTTGATG CTTTCTGACC AAAACAGGAG TCTGCCGTAC TCCCCTGTTG ATCCCTGCTG
721 TTGGGTTCCC TGTGTTGGCT CATGAGCATC GTGTGCCTCT TCCTCTGCCC CGCCGCCAAT
781 CTGATAAGTC CAGTGCAAAA AATGAGCGGC CGGCTAGTAA GAAATCGACA CCACCAAGTG
841 GGTCAACAAG TCGCAGAAAA GTGGCCAGAA AATGAGGAGG AAGTAGCAAA GTTGCAAGTC
901 GTCTTCGAC  TGGCTTGGAC GAGGAGACGA TGGAAATGCA CAAAGTGGAG AATGAAGTGG
961 GCTGCTAGTT ATCTGTCTTC TGTGTTGTGG CTCTAA
(a)

1   MADQREEDCG LNDDLDDWVL QYVPDSLNDL DEDLRLNAT CVENPGHENV DPSSLVAIPP
61  GLDDIGQFLL GDAADNGLVV EPSREVGDDF FADLHIDSSD ALSGETRASS DQTLSPSVVQ
121 ENKGS DVEED QDAGDNSENE RIDSTDPEDV QEDEPLSKKR KRQLRNRDSA MRSRERKKLY
181 VRDLELKSKY LEGELRKLQY ALSCCAENQ ILHNQLQARM AFDASVPKQE SAVLPLESL
241 LGSFLWMSI VCLFLLPAAN LISPVQKMSG RLVNRNRHHQV GHKVAEKWPE NEEVAKLQS
301 VFGLAWTRRR WKCTKWRMKW AASYLSSVLW L*
(b)

```

Figure 2. *Houttuynia cordata* *thunb HtbZIP60* open reading frame (a) and amino acid sequence of the coding region (b)
图 2. 鱼腥草 *HtbZIP60* 开放阅读框(a)及编码区氨基酸序列(b)

3.2. 生物信息分析结果

3.2.1. 蛋白质结构域预测

利用 Interproscan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/>)在线工具分析得出, *HtbZIP60* 基因家族成员有一个碱性亮氨酸拉链(bZIP)结构域转录因子, 它的真核生物的蛋白质包含介导序列特异性 DNA 结合的基本区域, 随后是二聚化所需的亮氨酸拉链区域。目前, bZIP 的几个结构及其功能已得到解决。碱性区域和亮氨酸拉链形成连续的 α -螺旋, 其中亮氨酸拉链的四个疏水残基定向在一侧。这种构象允许平行二聚化, 并且使螺旋弯曲, 以便新功能的二聚体形成灵活的叉, 其中 N 末端开放端的基本结构域可以与 DNA 相互作用。因此, 可以使两个亮氨酸拉链的方向垂直于 DNA。

3.2.2. 同源基因分析与多序列对比

利用 NCBI 在线软件, 对该 *HtbZIP60* 基因进行 BLAST 操作, 共分析出 9 个同源序列, 提取前三个相似度最高的基因(XM_006849869、XM_020846332、JX169820)的蛋白质序列, 然后对以上三个基因的功能进行功能预测, 发现这三个基因都与 *HtbZIP60* 基因有着相同的蛋白质功能, 它们都在调控与内质网应激相关的基因方面发挥着关键作用。

利用 Clustal Omega(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)在线软件对 *HtbZIP60*、XM_006849869、XM_020846332、JX169820 这四个基因进行多序列对比和系统发育树建构, 结果如图 3、图 4。从系统发育树来看, 我们可以看出 *HtbZIP60* 基因与 XM_020846332 同源关系更紧密。从多序列对比图中可以看出, 与其他三个基因相比, 它主要是在 152 号、312 号等位点与其他三个基因不同。

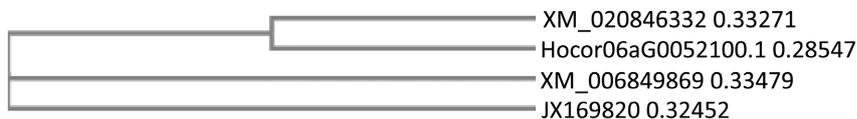


Figure 3. The developmental tree of *XM_006849869*, *XM_020846332*, *JX1698205*, and *HtbZIP60* (Hoco06aG0052100.1.0.28547 is *HtbZIP60*)

图 3. *XM_006849869*, *XM_020846332*, *JX1698205*, *HtbZIP60* 发育树(Hoco06aG0052100.1.0.28547 为 *HtbZIP60*)



Figure 4. Multiple sequence alignment of the *XM_006849869* protein, *XM_020846332* protein, *JX1698205* protein, and *HtbZIP60* protein (Hoco06aG0052100.1.0.28547 is *HtbZIP60*)

图 4. *XM_006849869*, *XM_020846332*, *JX1698205*, *HtbZIP60* 多序列对比(Hoco06aG0052100.1.0.28547 为 *HtbZIP60*)

3.2.3. 蛋白质特性分析

利用 ExPaSy-ProParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)在线工具对 *HtbZIP60* 基因进行蛋白质特性分析可得: 该蛋白质分子质量为 37447.00 ku, 等电点为 4.76, 带负电荷的残基总数(Asp + Glu): 59, 带正电荷的残基总数(Arg + Lys): 39, 原子组成: 碳 C: 1631、氢气 H: 2587、氮气 N: 465、氧气 O: 522、硫磺 S: 12, 其分子式: $C_{1631}H_{2587}N_{465}O_{522}S_{12}$, 原子总数: 5217; 不稳定指数(II)计算为 61.01, 故将该蛋白质归类为不稳定的。脂肪指数: 88.67, 亲水性总平均值(GRAVY): -0.548, 故推测为亲水性蛋白。

利用 PRABI-GERLAND (<https://doua.prabi.fr/templates/services>)在线工具对 *HtbZIP60* 基因进行分析, 发现 *HtbZIP60* 蛋白质的氨基酸组分中 186 个为 α 螺旋, 占比 56.19%; 12 个延伸链, 占比 3.63%, 6 个 β 转角, 占比 1.81%, 127 个无规则卷曲, 占比 38.37%。

3.2.4. 跨膜域结构与信号肽分析

利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)在线软件对 *HtbZIP60* 基因进行了跨膜结构分析, 结果如图 5。发现该基因有发现该基因有 1 个跨膜螺旋, 位于第 243 号氨基酸到 265 号氨基酸。

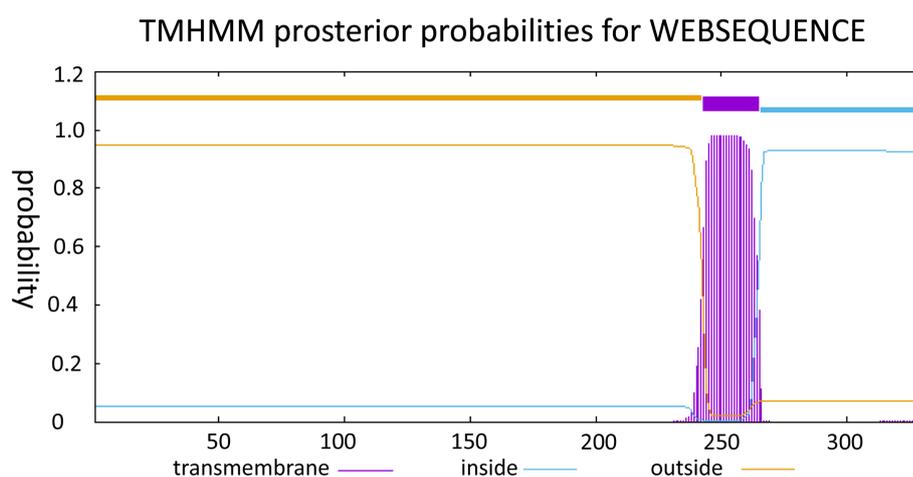


Figure 5. Transmembrane structure diagram of *HtbZIP60*
图 5. *HtbZIP60* 跨膜结构图

使用 Novopro (<https://novopro.cn/tools/signalp.html>)在线工具对 *HtbZIP60* 基因进行了分析。根据结果显示(见图 6), *HtbZIP60* 蛋白质中含有信号肽的概率仅为 0.041%, 并且未检测到其他相关内容。这一结果表明, *HtbZIP60* 蛋白是一种不包含信号肽的蛋白质。进一步推测, 该蛋白可能属于非分泌蛋白质类型。

3.2.5. 蛋白质二级、三级结构预测

利用 PSIPED Workbench (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)在线软件对 *HtbZIP60* 基因和与该基因同源性更近的 *XM_006849869* 基因进行蛋白质二级结构的分析(如图 7)。从图中可以看出, *HtbZIP60* 和 *XM_006849869* 基因的序列基本相似, 3 号、4 号、5 号、8 号、9 号、10 号、11 号、12 号、14 号位点等多个位点发生了明显的变化。3 号位点由天冬酰胺变成了谷氨酸, 4 号位点由谷氨酰胺变成了亮氨酸, 5 号位点由精氨酸变成了缬氨酸, 8 号位点由天冬酰胺变成了丝氨酸, 9 号位点由半胱氨酸变成了苯丙氨酸, 10 号位点由甘氨酸变成了精氨酸, 11 号位点由亮氨酸变成了谷氨酸, 12 号位点由天冬酮变成了天冬酰胺, 14 号位点由天冬氨酸变成了色氨酸, 可能与该基因调控不同情况的调节应激响应基因方面的功能与该突变有关, 这一点有待研究。

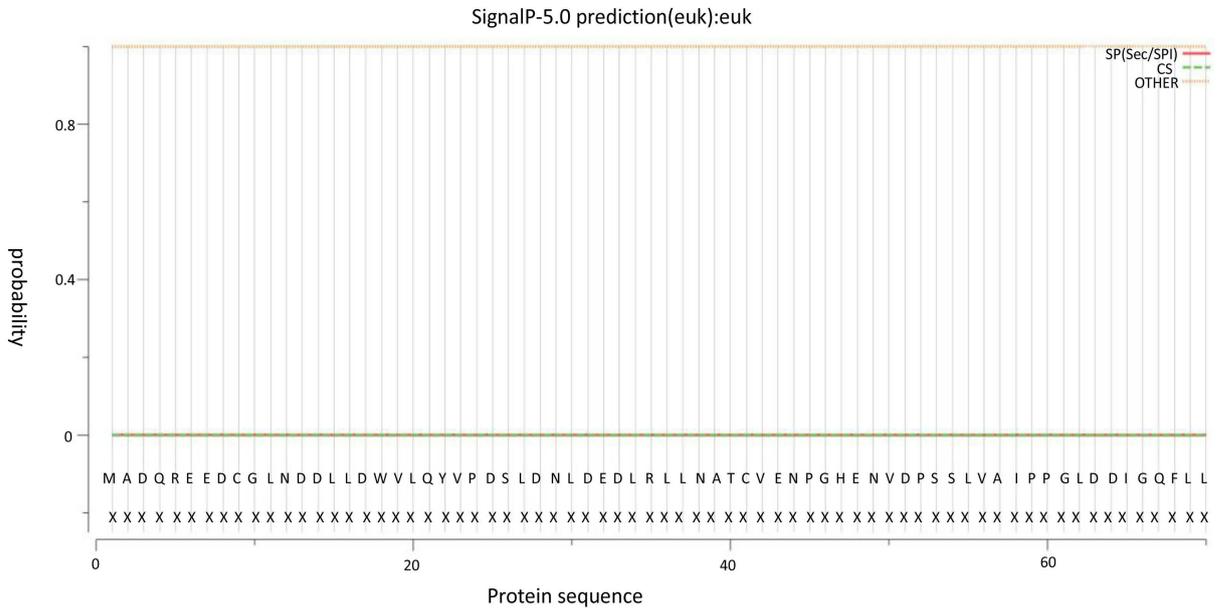


Figure 6. Signal peptide diagram of *HtbZIP60*
图 6. *HtbZIP60* 信号肽图

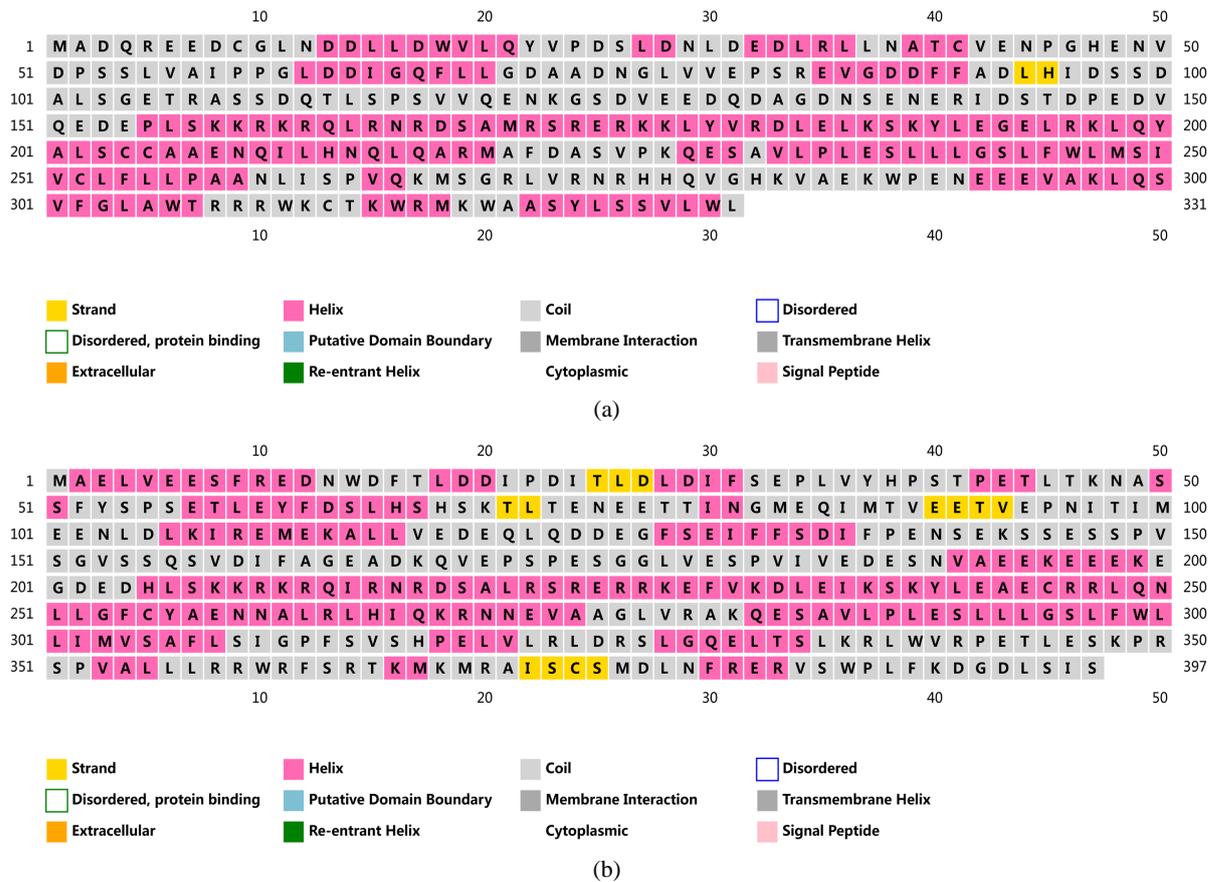


Figure 7. Gene Protein secondary structure diagrams of *htbzip60* and *xm_006849869* ((a) *htbzip60* secondary structure diagram; (b) *xm_006849869* secondary structure diagram)

图 7. *HtbZIP60* 和 *XM_006849869* 基因蛋白质二级结构图((a) *HtbZIP60* 二级结构图; (b) *XM_006849869* 二级结构图)

利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)在线软件对 *HtbZIP60* 基因进行蛋白质三级结构的模型建构(如图 8)。可以看出该基因多为 α 螺旋, 所以该基因蛋白稳定性较好, 且该蛋白质为亲水蛋白质。



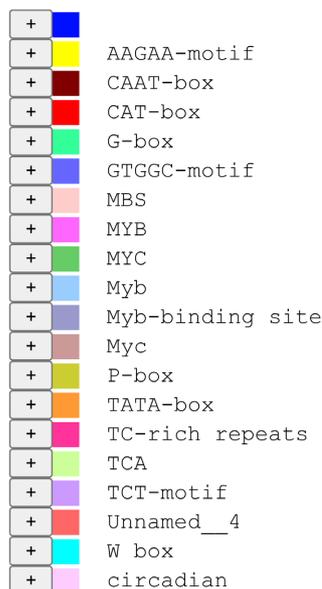
Figure 8. Gene protein tertiary structure diagram of *HtbZIP60*
图 8. *HtbZIP60* 基因蛋白质三级结构图

3.2.6. 亚细胞定位预测

利用 PSORT (<https://www.genscript.com/tools/psort>)在线软件分析, 发现 *HtbZIP60* 基因的位置最有可能位于细胞核, 数据显示, *HtbZIP60* 基因在细胞核上的占比高达 73.9%, 由此可以得出 *HtbZIP60* 基因主要定位于细胞核中。同时它也有可能定位于细胞质膜、细胞质基质、分泌系统的囊泡、线粒体。数据显示细胞质膜与细胞质基质均占 8.7%, 其余各占 4.3%。通过预测结果我们可以直接的在相应位置找出 *HtbZIP60* 基因所表现出的相关功能, 比如分泌蛋白合成过程中, *HtbZIP60* 基因作为参与基因调控和信号传导等生物过程中的重要蛋白质, 进行应激响应。通过对基因的亚细胞定位预测, 可以为后续实验研究提供相应参考。

3.2.7. 启动子分析

用 Plantcare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线软件对 *HtbZIP60* 基因进行分析, 结果如图 9, 分解结果得出该基因启动子区 59 个顺式作用元件, 其中已知有功能的元件共 30 个, 具有功能的元件如表 1 所示, 包括(1)启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件 CAAT-box(2)与分生组织表达相关的顺式调控元件 CAT-box(3)参与昼夜节律调控的顺式调控元素 circadian、G-box(4)光响应元件的一部分 GTGGC-motif(5)参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MBS(6)赤霉素响应元件 P-box(7)转录起始点周围的核心启动子元件(位于-30 位置附近)TATA-box(8)参与防御和应激响应的顺式调控元素 TC-rich repeats(9)短函数。

Figure 9. Cis-acting Elements of *HtbZIP60*图 9. *HtbZIP60* 顺式作用元件Table 1. Analysis of the regulatory elements of the *HtbZIP60* gene表 1. *HtbZIP60* 基因作用元件分析

类型	名称	序列	数量	物种
启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件	CAAT-box	CCAAT	3	拟南芥
		CAAAT	1	拟南芥
与分生组织表达相关的顺式调控元件	CAT-box	GCCACT	3	拟南芥
		circadian	1	番茄
参与昼夜节律调控的顺式调控元素	G-box	CACGAC	1	玉米
		GTGGC-motif	2	拟南芥
光响应元件的一部分	MBS	CAACTG	1	拟南芥
参与干旱诱导的 MYB 结合位点	P-box	CCTTTTG	1	水稻
赤霉素响应元件	TATA-box	TATA	1	拟南芥
转录起始点周围的核心启动子元件(位于 -30 位置附近)	TC-rich repeats	GTTTICTTAC	1	烟草
参与防御和应激响应的顺式调控元素	\	motif_sequence	15	任何生物体或有机体

4. 讨论和结论

本研究利用鱼腥草转录组测序结果, 成功从鱼腥草中克隆了 *HtbZIP60* 基因, 该基因编码的蛋白质由 331 个氨基酸组成, 属于 bZIP 家族成员。对 *HtbZIP60* 蛋白质进行分析发现, 它的等电点为 4.76, 具有偏酸性, 在酸性环境中容易沉淀; 同时, 它具有较高的稳定值, 属于不稳定的亲水性蛋白质。通过跨膜结构域和信号肽分析发现, *HtbZIP60* 蛋白质不含信号肽剪切位点, 但包含一个跨膜结构域, 这表明它可

能参与跨膜运输。亚细胞定位预测结果显示 *HtbZIP60* 主要定位于细胞核, 这表明细胞核是 *HtbZIP60* 蛋白质发挥功能的主要位置。进一步预测蛋白质结构域时发现, *HtbZIP60* 翻译的蛋白质仅具有一个 bZIP 结构域, 对内质网应激相关基因的调控发挥关键作用。

另外, 通过氨基酸序列比对和进化树分析发现, *HtbZIP60* 与其他相关基因存在密切的关系, 尤其是与具有类似功能的基因之间。然而, 在预测的二级结构中, 我们观察到了与这些相似基因的差异, 这可能会对 *HtbZIP60* 在应激响应中的功能产生影响。这为今后深入研究 bZIP 家族在不同生物中的调控机制提供了重要的参考。

此外, 通过生物信息学分析, 我们发现鱼腥草的 *HtbZIP60* 基因具有多个功能启动子, 这些启动子参与了分生组织表达、昼夜节律调控、赤霉素响应、干旱应答、防御和应激响应等多个生物学功能。这些结果对于我们深入了解植物的生长机制、适应逆境环境以及基因调控网络提供了重要的思考方向。

在本实验成功地利用 RT-PCR 法克隆了鱼腥草 *HtbZIP60* 基因, 并通过生物信息学方法对 *HtbZIP60* 蛋白进行了理化性质、二级和三级结构预测、同源性分析以及系统进化树的构建。这些分析揭示了该基因的重要分子特征, 为进一步深入研究鱼腥草在逆境条件下的基因调控机制奠定了理论基础。

基金项目

贵州师范大学大学生创新训练项目(S202310663056)。

参考文献

- [1] 胡汝晓, 肖冰梅, 谭周进, 等. 鱼腥草的化学成分及其药理作用[J]. 中国药业, 2008(8): 23-25.
- [2] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 3-417.
- [3] 王慧玲, 崔伟, 秦鑫, 等. 鱼腥草对致热大鼠下丘脑 cAMP 和腹中隔区精氨酸加压素含量的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007(1): 78-81.
- [4] 洪佳璇, 高雅文, 汪柏尧, 冯丙江, 莫金海, 王砚, 徐小青, 姚红伊, 赵玮, 唐法娣. 鲜鱼腥草提取物抗菌作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2007(6): 418.
- [5] 杨慧, 李剑琦, 杨斌, 冷红文, 何士勤, 俞红, 周南进. 鱼腥草抗甲型流感病毒诱导细胞程序化死亡的初步研究[J]. 江西医药, 2006(12): 960-961.
- [6] 王金英, 丁峰, 潘介春, 张树伟, 杨亚涵, 黄幸, 范志毅, 李琳, 王颖. 植物 bZIP 转录因子家族的研究进展[J]. 热带农业科学, 2019, 39(6): 39-45.
- [7] Glover, J.M. and Harrison, S.C. (1995) Crystal Structure of the Heterodimeric bZIP Transcription Factor cFos-c-Jun Bound to DNA. *Nature*, **373**, 257-261. <https://doi.org/10.1038/373257a0>
- [8] 龚道勇. 慈竹 bZIP 和 NRT 基因克隆及功能初步研究[D]: [硕士学位论文]. 绵阳: 西南科技大学, 2018.
- [9] 刘莉. DREBs、bZIP 转录因子与植物抗旱性研究进展[J]. 浙江农业科学, 2013(1): 98-102.
- [10] Takahashi, H., Kawakatsu, T. and Wakasa, Y. (2012) A Rice Transmembrane bZIP Transcription Factor, OsbZIP39, Regulates the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Plant and Cell Physiology*, **53**, 144-153. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr157>
- [11] Yoshida, T., Fujita, Y. and Maruyama, K. (2015) Four *Arabidopsis* AREB/ABF Transcription Factors Function Predominantly in Gene Expression Downstream of SnRK2 Kinases in Abscisic Acid Signalling in Response to Osmotic Stress. *Plant, Cell & Environment*, **38**, 35-49. <https://doi.org/10.1111/pce.12351>
- [12] Moreno, A.A., Mukhtar, M.S., Blanco, F., et al. (2012) IRE1/bZIP60-Mediated Unfolded Protein Response Plays Distinct Roles in Plant Immunity and Abiotic Stress Responses. *PLOS ONE*, **7**, e31944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031944>
- [13] Nagashima, Y., Iwata, Y., Ashida, M., et al. (2014) Exogenous Salicylic Acid Activates Two Signaling Arms of the Unfolded Protein Response in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, **55**, 1772-1778. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu108>
- [14] Li, Z., Tang, J., Srivastava, R., et al. (2020) The Transcription Factor bZIP60 Links the Unfolded Protein Response to the Heat Stress Response in Maize. *Plant Cell*, **32**, 3559-3575. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00260>

- [15] Kaur, N. and Kandoth, P.K. (2021) Tomato bZIP60 mRNA Undergoes Splicing in Endoplasmic Reticulum Stress and in Response to Environmental Stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, **160**, 397-403.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.033>