

橡胶草 *TkBZR* 家族基因的鉴定与原核表达分析

丁家辉^{1,2#}, 张倩玉^{1,2}, 袁红梅^{1,2*}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国; 2. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025 中国)

摘要: 为了进一步了解 *TkBZRs* 基因在橡胶草 (*Taraxacum kok-saghyz*) 生长发育和抵抗逆境中的作用, 本研究通过分析橡胶草的全基因组测序数据, 对 *TkBZR/BES* 家族基因进行鉴定分析, 得到了 6 个 *TkBZR/BES* 家族成员, 分别命名为 *TkBZR1* 至 *TkBZR6*, 并探讨其在染色体上的分布、结构域特征、组织特异性和时空表达特征。结果显示, 6 个 *TkBZR/BES* 家族成员分布在 6 条独立的骨架上。系统发育树显示, *TkBZR/BES* 基因家族成员在进化上保守, 橡胶草与莴苣的基因聚类在同一亚组, 表明两者之间可能存在较近的亲缘关系。基因结构和保守结构域分析结果显示, 除了 *TkBZR5* 外, 其余 *TkBZR* 基因都包含 2 个外显子和 1 个内含子, 所有成员都展示了高度保守的 BES1_N 结构域。表达模式分析发现, 有 5 个成员在所有 5 个组织中表达, 1 个成员几乎不表达。此外, 成功克隆获得表达丰度最高的 *TkBZR2* 基因, 该基因编码 307 个氨基酸。将 *TkBZR2* 同源重组至原核表达载体上, 重组成功后转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中并表达 *TkBZR2* 重组蛋白。

关键词: 橡胶草; BZR/BES; 基因家族; 基因结构分析; 原核表达

中图分类号: S576 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2026)03-0379-11

丁家辉, 张倩玉, 袁红梅. 橡胶草 *TkBZR* 家族基因的鉴定与原核表达分析[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026, 17(3): 379–389. DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.20250029 CSTR: 32425.14.j.cnki.rds wxb.20250029



油菜素内酯 (brassinosteroid, BR) 是一种植物生长调节剂, 在植物中广泛分布, 可参与多种细胞信号传导过程^[1]。BR 最早在油菜 (*Brassica napus*) 花粉中被分离并于 1979 年鉴定出分子结构和命名^[2-3], BR 及其衍生物能调节植物生长和发育活动, 包括细胞伸长和分裂、光形态发生、木质部分化、繁殖以及对逆境胁迫的反应^[4]。越来越多研究证明, 油菜素内酯在调控植物抗逆性方面具有重要的积极作用, BR 可以促进植物在非生物胁迫下的种子发芽率, 外源施加 BR 提升了高粱种子在渗透胁迫下的种子发芽率和幼苗存活率^[5], 在盐胁迫下, 外源施加 BR 能提高黄瓜 (*Cucumis sativus*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 种子的发芽率^[6-7]。BR 还可以促使植物的根系生长, 在盐胁迫下 BR 可以促进马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 根的生长^[8]。在干旱胁迫

下, BR 可以正向调节烟草 (*Nicotiana tabacum*) 幼苗根系生长和发育^[9]。因此, BR 是否也可以提高橡胶草 (*Taraxacum kok-saghyz*) 抗逆能力? BR 提高抗逆能力的分子机制有哪些? 这些问题的深入研究对于完善橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 的抗逆应答研究具有重要的参考价值。当 BR 被胞膜上的受体激酶 (brassinosteroid insensitive1, BRI1) 的外部结构域识别后, 会促使下游发生各种信号传递。这种结合使 BRI1 被激活, 随后触发了信号转导级联反应, 最终导致下游基因的转录调控^[10]。BRI1 激活涉及共受体激酶 BRI1 相关激酶 1 (BAK1) 的募集, BRI1 与 BAK1 在胞外的结合导致 BRI1 激酶抑制剂 1 (BKI1) 从细胞质膜解离, 进一步通过相互磷酸化使 BRI1 和 BAK1 的激酶结构域激活^[11-12]。激活后 BRI1 通过磷酸化激活



收稿日期: 2025-02-08

修回日期: 2025-03-07

基金项目: “崖州湾”菁英人才科技专项项目 (SCKJ-JYRC-2023-19); 海南省重点研发项目 (ZDYF2022XDNY251); 国家自然科学基金项目 (32260400)

***第一作者:** 丁家辉 (1997—), 男, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 25110901000092@hainanu.edu.cn

***通信作者:** 袁红梅 (1986—), 女, 教授, 博士生导师。研究方向: 作物抗逆分子基础与遗传调控。E-mail: yuanhongmei@hainanu.edu.cn

BR 信号激酶(BSK)和组成型差异生长 1(CDG1) 家族^[13]。然后, BSK 和 CDG1 激活 PP1 型磷酸酶 Brisuppressor1(BSU1), 随后, 使 Brassinosteroid insensitive2(BIN2)去磷酸化并失活^[14]。BSU1 能使失活的 BIN2 去磷酸化, 进而消除 BIN2 对 Brassinazole-resistant1(BZR1)和 Bri1-ems-suppressor1(BES1)的磷酸化抑制^[15-16]。

BZR/BES 是植物特异性转录因子和介导 BR 信号传导的关键调控因子^[11], BZR/BES 成员 N 端均有 1 个 bHLH 结构域, 它们能够直接与靶基因启动子区的 E-box 或 BRRE 元件结合从而调控这些基因的表达^[17-18]。这 2 个转录因子在氨基酸水平上有 88% 的同源性, 特别是 N 端结构域上, 同源性高达 91%。此外, BZR 有可以被各种激酶磷酸化的富集位点^[15-16]。BZR1 和 BES1 在功能上存在一些差别。BZR1 与 BR 的响应元件(CGTGT/CG 基序)结合, 从而抑制了有关 BR 生物合成基因的表达, 而 BES1 能够与 E-box(CANNTG 序列)结合, 从而激活 BR 诱导的基因表达^[16]。迄今为止, 已经在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和主要粮食作物水稻中完成了 *BZR1/BES1* 基因家族的全面鉴定, 这些基因家族的鉴定和克隆工作也在逐步进行中^[7, 17]。

橡胶草是一种多年生草本植物, 主要分布在中国西北(新疆)和华东等地区^[19]。因其产胶性质和质量与橡胶树相当, 成为研究产胶机制的模式植物^[20]。橡胶草根部分可以合成高分子质量的天然橡胶和其他化学物质, 并因其具有生命力强、适应环境变化广泛、转基因遗传转化体系较成熟等优势, 被认为是一种有潜力替代传统橡胶生产的经济作物, 成为产胶研究的模式植物^[21]。但是由于各种种植地环境因素影响, 橡胶草的种植和生产常受到干旱、高温、盐渍等胁迫的影响, 严重阻碍了橡胶草的生长发育, 限制了橡胶草产业的发展。但目前关于橡胶草抗逆分子机制的相关报道还较少, 因此, 对橡胶草抗逆基因的鉴定和功能研究具有重要意义^[22]。为了探究 *BZR/BES* 基因在植物中特别是橡胶草的生长发育和抵抗逆境中的重要作用, 本研究鉴定了橡胶草中 *BZR/BES* 家族基因成员, 构建系统进化树并系统地分析了其在染色体上的分布、结构域特征及表达模式。从橡胶草中成功克隆到表达丰度最高的 1 个 *TkBZR* 基因

TkBZR2, 并在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)中成功表达 *TkBZR2* 重组蛋白。经过对 *TkBZR2* 基因启动子区域的分析, 发现了激素响应元件和胁迫响应元件。这一发现不仅为后续 *TkBZR* 基因家族的深入研究打下了基础, 而且为橡胶草的抗逆性研究提供了理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料 本研究所使用的橡胶草采自新疆伊宁野外(42°51'36" N, 80°43'48" E), 取植株叶片, 经消毒后在无菌环境下, 将其切割成小块组织, 置于含有吲哚乙酸和细胞分裂素的 MS 培养基上, 通过组织培养扩繁得到无菌植株, 移栽至温度约 24 °C、湿度约 57% 的培养间, 光照周期为每天光照 16 h 加黑暗 8 h, 按常规栽培措施进行管理。

本研究所使用的化学试剂、RNA 提取试剂盒和质粒提取试剂盒均购于北京天根生物有限公司, 构建载体使用的 Ready-to-Use Seamless Cloning Kit 购于 BBI 生命科学有限公司。PrimeSTAR Max DNA 聚合酶、pMD-19T 载体购买于 Takara 生物公司, pET28a 载体大肠杆菌 DH5 α 、DE3 感受态细胞为本实验室留存。

1.2 橡胶草 BZR/BES 基因家族鉴定及蛋白理化性质分析 在基因组数据库(GWH; <http://bigd.big.ac.cn/gwh/>)中下载橡胶草的全基因组文件 PRJCA000437, 并使用 BioEdit 软件建立本地库。从 TAIR 网站(<http://www.arabidopsis.org/>)获取拟南芥已知的 AtBZR 氨基酸序列, 通过本地 BLAST 将 $P < 1e^{-10}$ 的序列筛选出 *BZR/BES* 基因家族候选成员。将候选基因序列利用 InterproScan(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>)和 SMART (<https://smart.embl.de/>)检测是否具有 BES1_N 结构域, 从而得到橡胶草 *BZR* 基因家族成员。将橡胶草 *BZR* 基因家族成员的氨基酸序列上传至 ExPASy 数据库 (<http://web.expasy.org/protparam/>)计算蛋白质的物理参数并预测蛋白的分子质量、等电点和亲疏水性。还利用在线网站 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>)对 *TkBZR*s 蛋白的亚细胞定位进行预测。

1.3 橡胶草 BZR/BES 基因家族系统进化分析 通过 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下

栽巴西橡胶树、拟南芥和莴苣 (*Lactuca sativa*) 中已被鉴定的 *BZR* 家族基因序列。通过 MEGA v6.0 的邻接法 (Neighbor-Joining) 将 Bootstrap 值设定为 1 000, 创建橡胶草 *BZR* 蛋白序列的系统发育树, 并利用 At*BZR*、Ls*BZR*、Hb*BZR* 和 Nt*BZR* 构建多物种进化树。

1.4 橡胶草 *BZR/BES* 基因家族成员染色体定位及保守结构域、基因结构和基序分析 根据基因组注释文件将橡胶草 *BZR/BES* 基因家族成员在染色体上的物理位置利用在线工具 MapGene2Chromosome v2.0 (http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/) 进行可视化展示。橡胶草 *BZR* 蛋白的保守基序利用 MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 网站进行分析, 并使用 TBtools 软件分析橡胶草 *BZR* 基因家族基因结构 (内含子-外显子)。

1.5 橡胶草 *BZR* 基因家族成员组织特异性与时空表达特征分析 将橡胶草全生育期划分为 S1 ~ S9^[23], 将无性繁殖而来的生根至 3 ~ 5 cm 的橡胶草移入组培瓶中生长 30 d 为 S1, 组培 60 d 为 S2, 组培 90 d 为 S3, 然后移栽土培, 土培 30 d 为 S4, 土培 60 d 为 S5, 土培 90 d 为 S6, 土培 120 d 为 S7, 土培 150 d 为 S8, 土培 180 d 为 S9。其中, S5 时期进行 30 d 的春化处理, S6 时期为盛花期, S7 时期为种子成熟期, S8 时期为衰老期, S9 时期为休眠期。课题组基于前期获得的转录组数据, 对橡胶草根、叶、胶乳、花及花萼等 5 个组织中的 *TkBZR* 成员表达水平 (FPKM 值) 进行系统分析, 同时整合全生育期 S1 ~ S9 阶段叶、根、胶乳组织的转录组数据。通过 TBtools 软件对上述 FPKM 值进行 log₂ 标准化转换, 最终构建了 *TkBZR*s 在组织特异性和发育时序维度上的差异表达热图。

1.6 橡胶草 *TkBZR2* 基因克隆与载体构建 收集约 100 mg 的橡胶草叶片组织用液氮低温研磨后, 按照 RNA 提取试剂盒说明书进行 RNA 的提取, 得到的 RNA 经微量分光光度计检测其浓度后, 使用反转录试剂盒, 根据其说明书进行反转录, 得到橡胶草 cDNA 后进行后续实验。

通过对橡胶草转录组数据分析后得出 *BZR/BES* 家族差异表达最显著的 *TkBZR2* 序列作为参考序列, 利用 Primer v6.0 软件设计特异性引物并以橡胶草 cDNA 为模板扩增 *TkBZR2*。并连接 pMD19-T Vector 并转化大肠杆菌感受态, 挑取抗性筛选培养

基上的阳性单克隆进行 PCR 检测后交由擎科生物公司测序。

1.7 橡胶草 *TkBZR2* 的载体构建与原核表达 利用 Primer v6.0 软件设计基因引物, 根据 *TkBZR2* 基因设计引物 (表 1) 进行 PCR 片段扩增。PCR 产物回收纯化后, 将 *TkBZR2* 通过同源重组法构建到 pET28a(+) 载体上 (总体积为 10 μL, 2×Seamless Cloning Master Mix 5 μL, 线性化载体 1 μL, 带有同源臂的基因片段 4 μL, PCR 仪中 50 °C 反应 20 min) 并转入大肠杆菌 DE3 感受态细胞, 加入不同浓度的 IPTG (0.01、0.10、0.50、1.00 mmol·L⁻¹), 分别在 28、37 °C 诱导 0、2、4、6、8 h。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

引物名称 Primer	序列 Primer sequence (5'-3')
<i>TkBZR2</i> -F	ATGACCGGCGCCGGTTCT
<i>TkBZR2</i> -R	TTAAATTACTACTTTTCCC
pET28a- <i>TkBZR2</i> -F	caaatgggtcgcggaATGACCGGCGCC
pET28a- <i>TkBZR2</i> -R	gagctcgaattcgagaAATTACTACTTT TCCCACTACCAAG

2 结果与分析

2.1 *TkBZR* 家族基因成员鉴定 为了了解 *TkBZR/BES* 家族成员的情况, 本研究利用软件 HMMER v3.0 的 hmmersearch 功能将 *BZR* 的保守结构域在橡胶草基因组文件 PRJCA000437 进行搜索, 将阈值 $P < 1e^{-10}$ 的序列作为 *TkBZR* 可能存在的成员。通过对候选成员进行结构域分析, 初步获得 9 个 *TkBZR/BES* 家族基因, 使用 InterproScan 和 SMART 数据库进一步分析候选基因, 去除不完整序列。最终鉴定出 6 个 *TkBZR/BES* 家族基因, 并根据其分子质量大小命名 *TkBZR1* ~ *TkBZR6*。从图 1 可知, 这 6 个基因分布于 6 个独立的基因组片段 (scaffold) 上。*TkBZR/BES* 家族的氨基酸长度为 151 ~ 316 aa, 理论等电点最低为 7.63, 最高为 9.38, 表明绝大多数 *TkBZR/BES* 家族蛋白是碱性蛋白, 亲水性系数均小于 0, 这说明 *TkBZR/BES* 家族蛋白均为亲水性蛋白 (表 2)。

2.2 *TkBZR* 家族基因系统进化分析 基于邻接法对橡胶草、橡胶树、莴苣、烟草和拟南芥的 20 个 *TkBZR* 家族成员进行 1 000 次 bootstrap 统计学检验得到其蛋白系统发育关系。如图 2 所示,

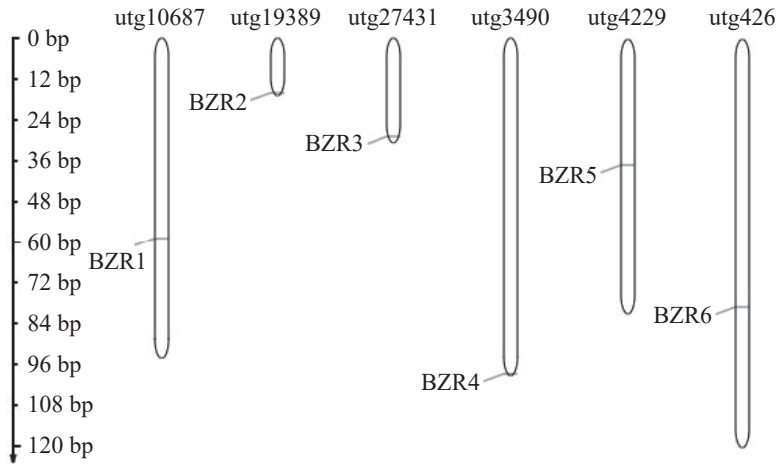


图 1 *TkBZR* 基因家族在橡胶草染色体上的基因分布

Fig. 1 Gene distribution of the *TkBZR* gene family on *Taraxacum kok-saghyz* chromosomes

注: 左侧标尺代表碱基数目, utg 编号代表 scaffold 名称。

Note: The scale on the left represents the number of bases, and the UTG number represents the scaffold name.

表 2 橡胶草基因组 *BZR/BES* 基因家族信息

Tab. 2 The information of *BZR/BES* gene family in *Taraxacum kok-saghyz* genome

基因名称 Gene	基因编号 Gene ID	染色体定位 Position	氨基酸数目/aa Length of amino acid	分子质量/kDa Molecular weight	等电点 <i>pI</i>	亲水性系数 Hydropathy Index	亚细胞定位 Subcellular location
<i>BZR1</i>	GWHPAAAA046609	utg9916	316	34.35	9.38	-0.705	细胞核Nucleus
<i>BZR2</i>	GWHPAAAA015365	utg19389	307	33.30	8.92	-0.589	细胞核Nucleus
<i>BZR3</i>	GWHPAAAA030593	utg3490	302	32.99	8.45	-0.753	细胞核Nucleus
<i>BZR4</i>	GWHPAAAA024338	utg27431	294	32.13	7.63	-0.711	细胞质Cytoplasm
<i>BZR5</i>	GWHPAAAA045865	utg950	263	28.39	8.66	-0.572	细胞质与细胞核 Cytoplasm and Nucleus
<i>BZR6</i>	GWHPAAAA001420	utg10687	151	17.13	9.13	-0.909	细胞核Nucleus

BZR 蛋白被分成了 5 个 (I ~ V) 亚组。其中, 橡胶草 *TkBZR/BES* 家族基因分布在 I、II、III、V 等 4 个亚组, 与莴苣具有相似分布模式; 橡胶草与莴苣的 *LsBZR* 家族基因聚类在同一亚组的成员更多, 这表明橡胶草蛋白与莴苣的系统发育关系较为密切。*TkBZR1* 大部分位于 V 和 II 亚组, 其他 4 个物种的 *TkBZR/BES* 基因在这 2 个亚组也有分布。

通过上述分析, 相同类型的 *BZR* 蛋白在理化性质方面相似程度较高, 且系统发育关系较为密切的蛋白之间理化性质更为相似。对进化树进行比较后发现, 在 II、III、V 亚组中莴苣和橡胶草 *BZR* 基因处于同一分支, 说明莴苣和橡胶草的 *BZR* 基因家族在进化过程中有较强的亲缘关系。

2.3 *TkBZR* 基因结构和保守基序分析 *TkBZR* 家族基因成员除 *TkBZR5* 外, 均含有 2 个外显子, 不同的 *TkBZR* 之间在保守结构基序和基因结构上的差异可能是影响其亚细胞定位和功能的重要原因。将 *TkBZR* 家族蛋白序列输入到 MEME

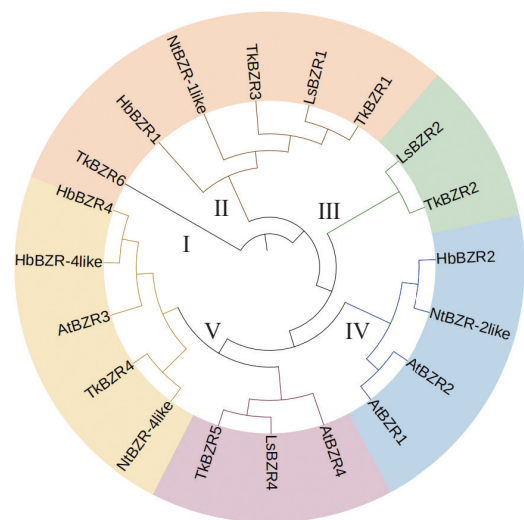


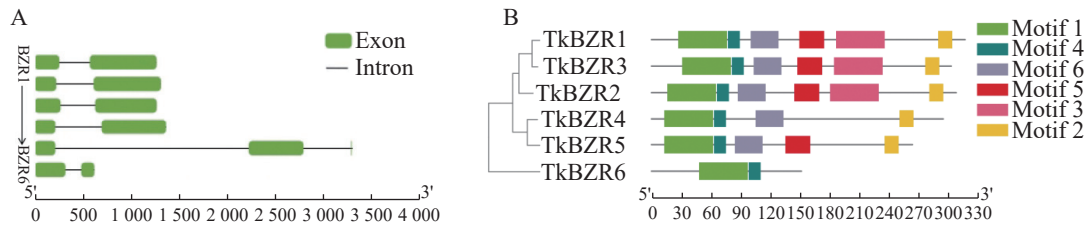
图 2 橡胶草和其他植物 *BZR* 基因家族进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree of *BZR* gene families in *Taraxacum kok-saghyz* and other plants

注: At. 拟南芥; Hb. 巴西橡胶树; Tk. 橡胶草; Ls. 莴苣; Nt. 烟草。

Note: At. *Arabidopsis thaliana*; Hb. *Hevea brasiliensis*; Tk. *Taraxacum kok-saghyz*; Ls. *Lactuca sativa*; Nt. *Nicotiana tabacum*.

网站上进行在线分析, 并利用 TBtools 将其与进化树结合和美化。根据保守基序分析, *TkBZR* 蛋白中鉴定出 6 个保守基序, *TkBZR1*、*TkBZR2* 和 *TkBZR3* 含有全部的 motif, 而 *TkBZR6* 只含有

motif 1 和 motif 2, motif1 和 motif2 与 *TkBZR* 家族的 BES1_N 保守结构域所在位置一致(表 3), 以上结果说明 *TkBZR* 家族结构高度相似, 它们在基因进化过程和功能模式上可能具有保守性(图 3)。



A. *TkBZR* 家族成员序列信息(方格表示外显子, 线条表示内含子); B. *TkBZR* 家族成员进化树分析和结构域信息(方块表示基序结构)。

A. Information of *TkBZR* family member sequence (the square indicates exons and the line represents introns); B. Phylogenetic analysis and domain information of *TkBZR* family genes (block represents motif structure).

图 3 *TkBZR* 家族的基因结构和基序分析

Fig. 3 Gene structure and motif analysis of *TkBZR* family

表 3 Motif 序列信息

Tab. 3 Sequence information of motifs

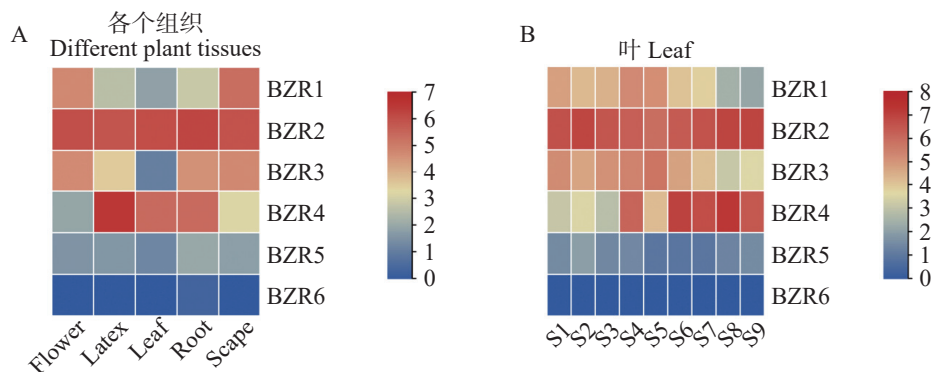
名称 Motif	序列 Motif sequence
Motif1	YAGLRAQGNYPKPKHCDNNEVLKALCEEAGWVW
Motif2	KAWEGERIHEVGVD
Motif3	FTKQSIPSNLFFASSAPTSPTRRHRFTPATIPECDESDCSTIDSCQW
Motif4	EPDGTTYRKGCKP
Motif5	NPSSLPLRISNSAPVTPPLSSPTSK
Motif6	STNTSPCSSQKPSPISSFPSPSPDQAS

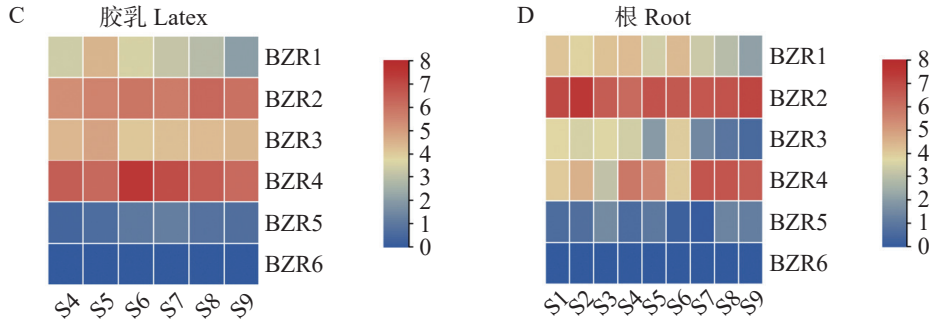
2.4 *TkBZR/BES* 家族基因成员表达模式分析

通过对橡胶草不同组织的转录组数据进行分析, 推测 *TkBZR*s 家族基因在根、叶、茎、胶乳等不同组织中的表达模式。如图 4 所示, *TkBZR*s 具有组织特异性, 除 *TkBZR6* 几乎在每个组织中都不表达外, *TkBZR*s 在不同组织中表达量均有显著差异。*TkBZR4* 在橡胶草 S6 生育期的胶乳组织中表达量达到最高。*TkBZR1* ~ *TkBZR5* 在根、茎、叶中均呈现先上升后下降的趋势, 但达到峰值的时期并不

相同, 这暗示 *TkBZR* 基因家族成员行使相似的功能, 但由于蛋白质序列的内部差异使 *TkBZR*s 基因在功能上既有相似性又有差异性。

2.5 *TkBZR2* 的克隆与分析 为了进一步探究 *TkBZR* 家族基因的功能, 本研究克隆了在全生育期表达丰度最高的 *TkBZR2*, 利用软件 Primer v6.0 设计引物, 以橡胶草叶片 cDNA 为模板克隆得到了 1 条长为 924 bp 的片段, 且与目的条带大小相符。将克隆得到的基因片段纯化回收后重组到





A. *Tk*BZR 家族基因在各组织中的表达情况; B~D. 叶、根、胶乳中 *Tk*BZR 家族基因时空表达分析。
A. Expression of *Tk*BZR family genes in various tissues; B~D. Spatiotemporal expression analysis of *Tk*BZR family genes in leaf, root, and latex.

图 4 *Tk*BZR 表达模式分析

Fig. 4 Analysis of *Tk*BZR expression patterns

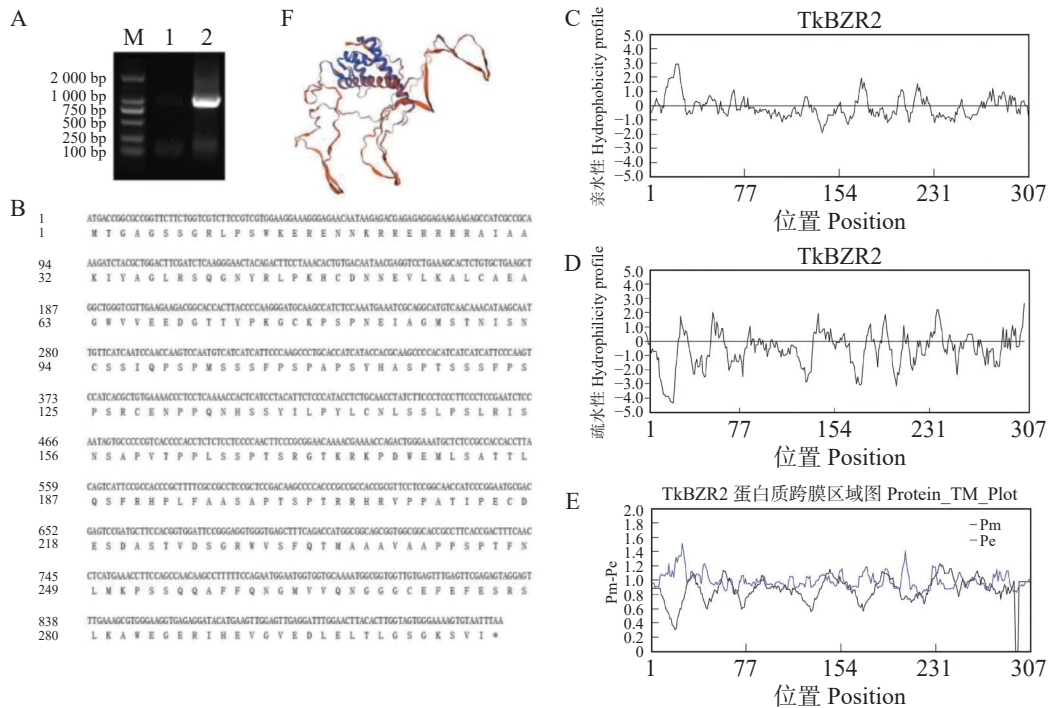
注: S4~S9 表示不同的植物组织, 从左至右分别为花、胶乳、叶片、根、茎; S1~S9 表达不同的橡胶草不同的生育期; 纵坐标表示基因表达的丰度值。

Note: S4~S9 represents different plant tissues, from left to right: flower, latex, leaf, root, and scape; S1~S9 represents different growth stages of *Taraxacum koksaghyz*; the y-axis indicates the gene expression abundance values.

pMD-19T 载体上, 挑取单克隆进行菌落 PCR 然后进行测序。然后在 NCBI 网站上运用 BLAST 工具对测序结果进行比对, 结果发现, 所得基因片段与预期的目标基因序列完全一致。使用 DNAMAN 将 *Tk*BZR2 氨基酸序列与其他物种中的 BZR 氨基酸序列进行比, 并预测其蛋白质的亲疏水性(图 5)。

2.6 *Tk*BZR2 启动子分析 启动子顺式元件与基因功能密切相关, 为了进一步探究 *Tk*BZR2 的调

控机制, 找到能够调控 *Tk*BZR2 的上游基因。如图 6 所示, 本研究提取 *Tk*BZR2 起始密码子前 2 000 bp 作为 *Tk*BZR2 的启动子进行分析, 将数据上传至 PlantCARE 网站进行顺式作用元件进行可视化分析, 结果如图 6 所示。从中可知, *Tk*BZR2 基因的启动子区域含有多种激素响应元件、非生物胁迫响应元件等, 这表明 *Tk*BZR2 基因可能受到多种激素的调控, 并能够对多种胁迫条件做出响应。



A. 电泳检测 *Tk*BZR2; B. *Tk*BZR2 与其他物种中 BZR 的氨基酸序列比对; C~D. *Tk*BZR2 的亲水性和疏水性分析; E. *Tk*BZR2 跨膜结构域预测; F. *Tk*BZR2 二级结构预测。

A. Electrophoresis detection of *Tk*BZR2; B. Amino acid sequence comparison between *Tk*BZR2 and BZR in other species; C~D. Hydrophilic and hydrophobic analysis of *Tk*BZR2; E. Prediction of transmembrane domain of *Tk*BZR2; F. Prediction of secondary structure of *Tk*BZR2.

图 5 *Tk*BZR2 基因的扩增与分析

Fig. 5 Amplification and analysis of *Tk*BZR2 gene

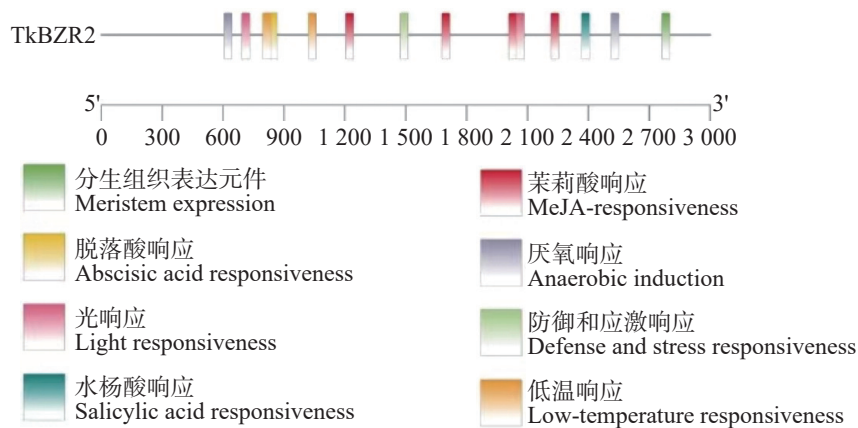


图 6 橡胶草 *BZR2* 启动子顺式作用元件分析

Fig. 6 Analysis of cis-acting elements of *BZR2* promoter of *Taraxacum kok-saghyz*

注: 不同颜色的方块代表不同的响应元件, 黑色线条表示启动子长度。

Note: Different colored blocks represent distinct response elements, the black lines indicate the length of the promoter region.

2.7 *TkBZR2* 原核表达条件的筛选 *BZR*s 是 BR 信号通路中重要的转录因子, 验证其是否具有转录因子的功能, 往往需要表达出目标转录因子蛋白来验证其功能, 表达出的 *TkBZR2* 蛋白可以为进一步探究其功能打下基础, 也为后续实验提供了材料。通过设置不同的诱导温度(28 °C 和 37 °C)和 IPTG 浓度(0.01、0.10、0.50、1.00 mmol·L⁻¹)对 *TkBZR2* 蛋白进行原核表达。利用 SDS-PAGE 电泳检测 pET28a-*TkBZR2* 的原核表达条件情况, 以找到最优的表达浓度、时间、温度。结果如图 7 所示, 所设的 4 个 IPTG 浓度诱导在 28 °C 和 37 °C 下诱导 2、4、6、8 h 均能诱导表达出条带大小约为 40 kDa 的 *TkBZR2*-His 融合蛋白, 且诱导 8 h 时蛋白表达量最大。所以选择 28 °C 0.01 mmol·L⁻¹ IPTG 作为表达 *TkBZR2* 蛋白的条件。后续纯化得到的蛋白经过 Western-blot 检验可以用于 EMSA、ChIP 等实验来进行 DNA 结合活性分析, 从而筛选和鉴定 *TkBZR2* 下游靶基因。

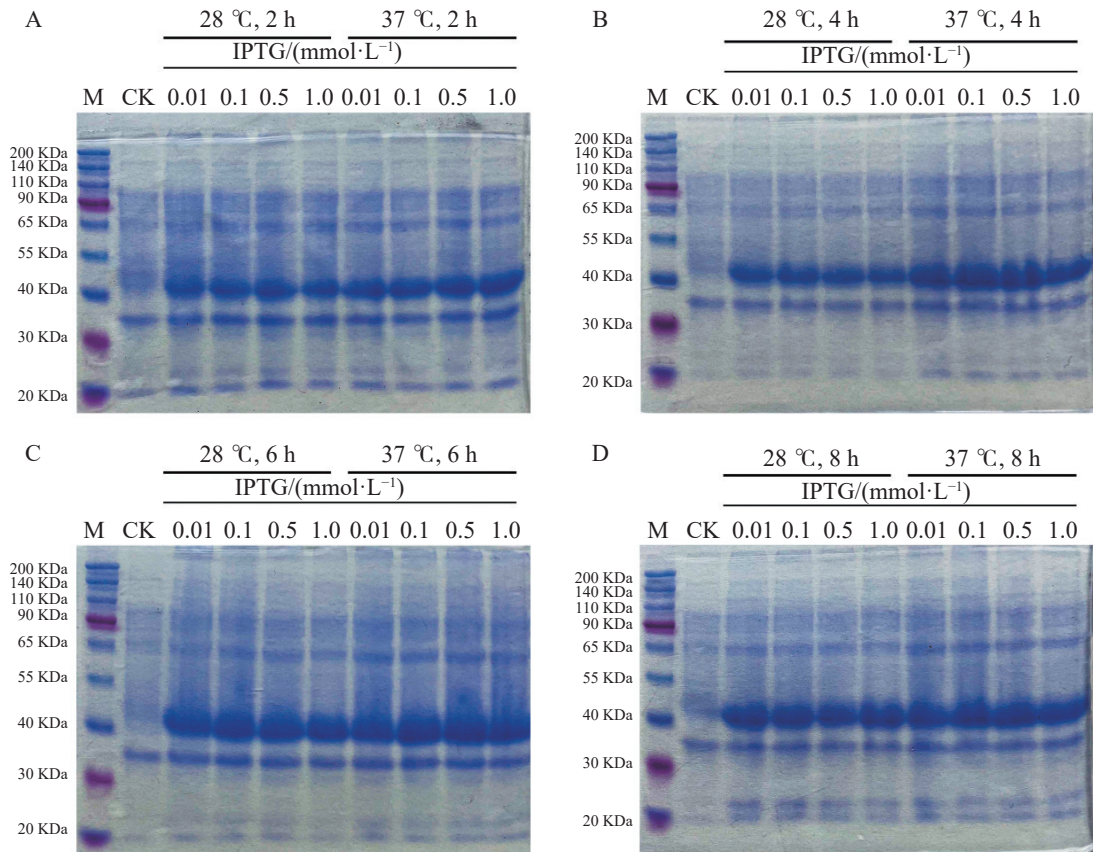
3 讨论

在植物基因家族研究不断深入的进程中, *BZR* 家族基因备受关注。当前, 众多物种中 *BZR* 家族基因的鉴定与分析工作正逐步推进, 本研究在橡胶草中鉴定出 6 个 *BZR/BES* 家族基因成员, 这与拟南芥^[18]、黄瓜^[6]、甜瓜^[24]、葡萄^[25]、枣^[26] 等植物中 *BZR/BES* 家族基因成员个数相同, 与水稻(4 个)^[7]、大麦(7 个)^[27]、番茄(9 个)^[28] 等作物中的家族基因成员各不相同, 暗示不同物种中需要不同个数的 *BZR* 成员行使功能。对不同物种中的

BZR 家族成员的系统发育进化树分析结果显示, 莴苣和橡胶草 *BZR* 基因家族在进化过程中有较强的亲缘关系。橡胶草 *BZR* 含有典型的 *BZR/BES* 保守结构基序, 表明 *BZR/BES* 基因家族在植物演化进程中具备高度的保守性。这意味着在漫长的植物进化历程中, *BZR/BES* 基因家族发挥着不可或缺且相对稳定的生物学功能, 可能参与了植物生长发育的基本调控过程, 为植物适应环境变化提供了重要的分子基础。

橡胶草 *TkBZR* 基因家族成员展现出独特的理化性质, 其平均等电点大多高于 7.5, 且多数成员主要定位于细胞核内。这一现象背后可能涉及多个关键因素, N 端的核定位信号序列可能引导这些成员向细胞核运输, 使其在细胞核内发挥转录调控等重要功能; 高度保守的 DNA 结合结构域使它们能够精准识别并结合特定的 DNA 序列, 从而调控下游基因的表达; 磷酸化位点的存在则为其功能调节提供了动态机制, 通过磷酸化与去磷酸化过程, 响应细胞内各种信号通路的变化, 进而调控基因表达活性; PEST 序列可能参与了蛋白质的降解过程, 确保细胞内 *TkBZR* 蛋白水平的精确调控; C 端结构域的特性也可能对其亚细胞定位及功能发挥产生影响, 例如参与蛋白质间的相互作用等。这些结构域和序列共同协作, 使得 *TkBZR* 基因家族成员在细胞内发挥着复杂而有序的生物学功能^[15-16]。

TkBZR 基因家族的基因结构相对简洁, 除 *TkBZR5* 包含 3 个外显子和 2 个内含子外, 其余成员均由 2 个外显子和 1 个内含子构成。值得注意



A ~ D. 28 °C、37 °C 诱导 2、4、6、8 h 后的蛋白表达量。
A-D. The protein expression was induced at 28 °C and 37 °C for 2, 4, 6 and 8 hours.

图 7 *TkBZR2* 的原核表达

Fig. 7 Prokaryotic expression of *TkBZR2*

注: M, Protein marker; CK, 诱导前的全蛋白; 3 ~ 6, 28 °C, 0.01、0.10、0.50、1.00 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导后的全蛋白; 7 ~ 10, 37 °C, 0.01、0.10、0.50、1.00 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导后的全蛋白。

Note: M, Protein marker; CK, Whole protein before induction; 3-6, At 28 °C, 0.01, 0.10, 0.50, 1.00 mmol·L⁻¹ IPTG, induced whole protein; 7-10, At 37 °C, 0.01, 0.10, 0.50, 1.00 mmol·L⁻¹ IPTG, induced whole protein.

的是, 橡胶草 *TkBZR* 基因与烟草^[29]、南瓜^[30] 和棉花^[31] *BZR* 基因家族的基因结构呈现出相似性, 多数成员也都只有 2 个外显子和 1 个内含子, 极少数成员有 3 个外显子和 2 个内含子。这种相似的基因结构暗示着这些 *BZR/BES* 基因家族成员在功能上可能具有一定的保守性, 它们可能通过相似的转录调控机制, 影响植物的生长发育、激素响应以及逆境适应等生理过程。例如, 在响应外界环境信号时, 这些基因可能通过类似的剪接方式产生不同的转录本, 进而调控不同的下游基因表达, 以适应环境变化对植物生长发育的需求。

在对 *TkBZR2* 启动子序列的深入剖析中, 预测到了一系列参与植物生长发育以及响应生物和非生物胁迫的结合元件。这一发现表明, *TkBZR2* 在植物应对各种胁迫时, 能够利用不同的信号通路精细调控植物的生理应答过程, 进而对植物生

长发育及胁迫响应产生深远影响。过往研究已明确, *BZR/BES* 作为油菜素内酯 (BR) 信号传导途径中的核心转录因子, 在植物激素信号转导网络中占据关键地位。例如, 在 *bzr1-1D* 突变体中, *BZR1* 能够与 ABA 响应元件结合, 抑制 *ABI5* 转录因子的转录激活, 从而降低该突变体对 ABA 信号的敏感性^[32-34]。此外, *BES1* 通过限制 *ABI3* 基因的转录活性, 阻断 *ABI3* 对 *ABI5* 的激活作用, 从而干扰 ABA 信号的传递过程。这一系列复杂的调控机制表明, *BZR/BES* 家族基因在植物激素互作网络中扮演着重要角色, 它们与 ABA 等激素信号通路相互交织, 共同调控植物的生长发育和逆境适应能力^[35-36]。

综上所述, 本研究在橡胶草 *BZR* 基因家族研究方面取得了一系列重要成果。通过全基因组鉴定, 本研究成功发现了 6 个橡胶草 *BZR* 基因家族

的新成员,丰富了对橡胶草基因资源的认识。对橡胶草 *BZR* 基因在不同组织部位表达特异性的分析,揭示了其表达具有组织特异性和时空表达特异性。同时,探索该基因在原核系统中的最佳表达条件,为进一步研究其功能提供了有力工具。这些研究结果能为橡胶草 *BZR/BES* 家族基因的功能研究提供重要参考,有助于深入解析调控橡胶草生长发育与抗逆响应的分子机制,对橡胶草的遗传改良和品种选育具有重要的理论指导意义,也为其他植物中 *BZR/BES* 家族基因的研究提供了有益借鉴。今后,可进一步深入研究 *TkBZR* 基因家族成员在橡胶草中的具体生物学功能,明确其上下游调控因子,揭示其在橡胶草生长发育及抗逆过程中的精细调控网络。

参考文献:

- [1] 陈秋惠, 杨玉双, 覃碧, 等. 橡胶草育种研究进展[J/OL]. 分子植物育种, 1-15(2023-12-16)[2025-02-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231215.0914.002.html>.
- [2] 张在宝, 王涵, 罗天, 等. 橡胶草育种及橡胶提取工艺研究进展[J/OL]. 宁夏大学学报(自然科学版), 1-8(2023-05-06)[2025-02-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/64.1006.N.20230504.1519.022.html>.
- [3] 贺俊亚, 杨雪, 邢剑锋, 等. 橡胶草 TCTP 基因家族的鉴定及表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 1-18(2023-11-15)[2025-02-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231114.1714.022.html>.
- [4] 刘星, 杨雪, 张芳, 等. 橡胶草乳管特异性高表达基因 *TkREF* 的启动子区段鉴定[J]. 分子植物育种, 2025, 23(4): 1154-1163.
- [5] 李闯, 王肖肖, 杨玉双, 等. 橡胶草 *Tk-bZIP11* 转录因子基因的克隆及其表达模式分析[J]. 分子植物育种, 2024, 22(5): 1444-1453.
- [6] Ma Y, Xu J, Qi J, et al. Crosstalk among plant hormone regulates the root development [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2024, 19(1): 2404807.
- [7] Mitchell J W, Mandava N, Worley J F, et al. Brassins: a new family of plant hormones from rape pollen [J]. *Nature*, 1970, 225(5237): 1065-1066. <https://doi.org/10.1038/2251065a0>
- [8] Grove M D, Spencer G F, Rohwedder W K, et al. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen [J]. *Nature*, 1979, 281(5728): 216-217. <https://doi.org/10.1038/281216a0>
- [9] Chaudhuri A, Halder K, Abdin M Z, et al. Abiotic stress tolerance in plants: brassinosteroids navigate competently [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23): 14577. <https://doi.org/10.3390/ijms232314577>
- [10] 杜巧丽, 刘均霞, 陈美晴, 等. 高粱 BR 信号转录因子 *BZR1* 基因家族的鉴定及激素应答分析[J]. 植物保护学报, 2022, 49(3): 848-856.
- [11] Luo S, Zhang G, Zhang Z, et al. Genome-wide identification and expression analysis of *BZR* gene family and associated responses to abiotic stresses in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 214. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04216-9>
- [12] Bai M Y, Zhang L Y, Gampala S S, et al. Functions of *OsBZR1* and 14-3-3 proteins in brassinosteroid signaling in rice [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(34): 13839-13844.
- [13] 李明, 颀嘉丽, 石铭福, 等. 外源 2, 4-表油菜素内酯对碱性胁迫下马铃薯根系生长、生理特性及土壤酶活性的影响[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(3): 394-402. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-4440.2024.03.002>
- [14] 丁丹阳, 张璐翔, 朱智威, 等. 叶面喷施 2, 4-表油菜素内酯对烟草抗旱性的影响[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(4): 50-57.
- [15] Li J, Chory J. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction [J]. *Cell*, 1997, 90(5): 929-938. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80357-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80357-8)
- [16] Yin Y, Vafeados D, Tao Y, et al. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2005, 120(2): 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.044>
- [17] Belkhadir Y, Jaillais Y. The molecular circuitry of brassinosteroid signaling [J]. *The New Phytologist*, 2015, 206(2): 522-540. <https://doi.org/10.1111/nph.13269>
- [18] Clouse S D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(4): 1219-1230. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
- [19] Kim T W, Guan S, Burlingame A L, et al. The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from *BRI1* receptor kinase to *BSU1* phosphatase and *GSK3*-like kinase *BIN2* [J]. *Molecular Cell*, 2011, 43(4): 561-571. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.037>
- [20] Wang Z Y, Nakaano T, Gendron J, et al. Nuclear-localized *BZR1* mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis [J]. *Developmental Cell*, 2002, 2(4): 505-513. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00153-3)
- [21] 赵同, 张盛敏, 曹杰, 等. 橡胶草 *bZIP* 基因家族鉴定及胶乳高表达基因功能分析[J]. 南方农业学报, 2025, 56(9): 2723-2735. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-1191.2025.09.003>
- [22] 郑立鹏, 吐汗姑丽·托合提, 高强, 等. 橡胶草萌发期耐盐碱性鉴定评价及优异种质挖掘 [J]. 南方农业学报,

- 2025, 56(9): 2736–2747. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-1191.2025.09.004>
- [23] He J X, Gendron J M, Sun Y, et al. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses [J]. *Science*, 2005, 307(5715): 1634–1638. <https://doi.org/10.1126/science.1107580>
- [24] Xu M, Zhang Y, Yang X, et al. Genome-wide analysis of the SWEET genes in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin: an insight into two latex-abundant isoforms [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2023, 194: 440–448. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.11.014>
- [25] 臧文蕊, 马明, 砗根, 等. 甜瓜 BZR 转录因子家族基因的全基因组鉴定及表达模式分析[J]. 生物技术通报, 2024, 40(7): 163–171.
- [26] 江倩倩, 王雨婷, 惠竹梅. 葡萄 BZR 基因家族的鉴定及表达分析[J]. 植物生理学报, 2021, 57(6): 1218–1228.
- [27] 尹魁林, 闫雪晴, 王玖瑞, 等. 枣 EIN3/EIL 基因家族鉴定及其在枣果实发育中的表达分析[J/OL]. 分子植物育种, 1–14(2024-08-08)[2025-02-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240808.1201.004.html>.
- [28] 薛正刚, 王树杰, 杨永乾, 等. 大麦 GRF 家族的基因组鉴定及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(6): 1750–1757.
- [29] 陈旭, 沈春洋, 莫福磊, 等. 番茄 BZR 基因家族鉴定及非生物胁迫下表达模式分析[J]. 东北农业大学学报, 2021, 52(11): 9–17. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9369.2021.11.002>
- [30] Chen X, Wu X, Qiu S, et al. Genome-wide identification and expression profiling of the BZR transcription factor gene family in *Nicotiana benthamiana* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10379. <https://doi.org/10.3390/ijms221910379>
- [31] 李春, 刘小俊, 蔡鹏, 等. 中国南瓜 BZR 基因家族的全基因组鉴定及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(19): 6324–6330.
- [32] 郭新磊, 路普, 王园园, 等. 棉花 BZR 基因家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. 棉花学报, 2017, 29(5): 415–427. <https://doi.org/10.11963/1002-7807.gxllf.20170830>
- [33] Liu Z Q, Yan L, Wu Z, et al. Cooperation of three WRKY-domain transcription factors *WRKY18*, *WRKY40*, and *WRKY60* in repressing two ABA-responsive genes *ABI4* and *ABI5* in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(18): 6371–6392. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers293>
- [34] Cai R, Zhao Y, Wang Y, et al. Overexpression of a maize *WRKY58* gene enhances drought and salt tolerance in transgenic rice [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2014, 119(3): 565–577. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0556-7>
- [35] Fahrendorf T, Dixon R A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XVIII: Molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450 [J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1993, 305(2): 509–515. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1454>
- [36] Ren X, Chen Z, Liu Y, et al. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 2010, 63(3): 417–429.

Genome-wide identification and prokaryotic expression analysis of TkBZR family genes in rubber dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*)

Ding Jiahui^{1,2#}, Zhang Qianyu^{1,2}, Yuan Hongmei^{1,2*}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: To further understand the role of the *TkBZR* family genes in the growth, development, and stress resistance of rubber dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*), the *TkBZR/BES* family genes were identified and analyzed by examining the whole genome sequencing data of *T. kok-saghyz*. A total of 6 members of the *TkBZR* family were identified, named from *TkBZR1* to *TkBZR6*, and their distribution on chromosomes, domain characteristics, tissue expression profiles and the spatial-temporal gene expression were analyzed. The results revealed that *TkBZR/BES* gene family members were distributed on 6 independent scaffolds. Phylogenetic trees indicate that *TkBZR/BES* gene family members are evolutionarily conserved, with rubber dandelion and lettuce genes clustering in the same subgroup, suggesting a possible close evolutionary relationship between the two. Gene structure and conserved domain analysis show that except for *TkBZR5*, all the other *TkBZR* genes contain two exons and one intron, and that all the family members exhibit a highly conserved BES1_N domain. Expression pattern analysis reveals that 5 members are expressed in all five tissues, while one member is almost unexpressed. Additionally, the *TkBZR2* gene with the highest expression abundance was successfully cloned, encoding 307 amino acids. Homologous recombination of *TkBZR2* was made into prokaryotic expression vector, and the recombinant plasmid was transferred into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein TkBZR2 was expressed in *E. coli* BL21 (DE3).

Keywords: *Taraxacum kok-saghyz*; BZR/BES; gene family; gene structure analysis; prokaryotic expression

(责任编辑: 潘学峰)