园　艺　学　报　2013，40（1）：79 – 88　　http: // www. ahs. ac. cn
Acta Horticulturae Sinica　　E-mail: yuanyixuebao@126.com

‘津田’芜菁光形态建成抑制因子 COP1 蛋白 cDNA 的克隆及表达分析

孙　梅，周　波，王　宇，刘明雪，安春鹏，李玉花*

（东北林业大学生命科学学院，哈尔滨 150040）

摘　要：通过 RT-PCR 和 RACE 的方法得到了编码‘津田’芜菁（*Brassica rapa* L. ssp. *rapifera*‘Tsuda’）BrCOP1 的 cDNA 序列，长 2 034 bp，编码 677 个氨基酸，与拟南芥同源性达 94%，命名为 BrCOP1，GeneBank 收录号为 JF738111。Northern 杂交分析表明 *BrCOP1* 的表达没有组织特异性，而在整株幼苗及成熟植株肉质根表皮中受长波紫外线（UV-A）诱导表达，但成熟植株的直根表皮中表达量不随处理时间延长而增加。这暗示 BrCOP1 作为光控发育的重要调控因子，可能在 UV-A 诱导‘津田’芜菁花青素合成及光信号转导中起重要作用。

关键词：芜菁；COP1；克隆；表达特性

中图分类号：S 631.3　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0513-353X（2013）01-0079-10

cDNA Cloning and mRNA Expression of Photomorphogenic Negative Regulator COP1 in‘Tsuda’Turnip（*Brassica rapa* L. ssp. *rapifera*）

SUN Mei，ZHOU Bo，WANG Yu，LIU Ming-xue，AN Chun-peng，and LI Yu-hua*

（*College of Life Sciences*，*Northeast Forestry University*，*Harbin* 150040，*China*）

Abstract：The *COP1* gene（*BrCOP1*，accession number JF738111）was isolated from total RNA of *Brassica rapa* L. ssp. *rapifera*‘Tsuda’by RT-PCR and RACE. *BrCOP1* cDNA contained an opening reading frame of 2 034 bp，encoding a predicted protein of 677 amino acid residues. The deduced amino acid sequence of BrCOP1 shared 94% identity with *Arabidopsis thaliana* COP1. Northern blotting results demonstrated that expression of *BrCOP1* exhibited no tissue specificity，and had no obvious difference in seedlings under various treatments but was induced by UV-A light，while the expression of *BrCOP1* was induced after exposed to UV-A for 6 hours in the swollen hypocotyls，however expression level was not increased with the prolongation of time. The above results suggested that BrCOP1，as a key factor of light-dependent development，might play a crucial role in UV-A induced anthocyanin biosynthesis and light signal transduction.

Key words：turnip；COP1；cloning；expression analysis

光作为重要的环境因子控制着植物一系列生长发育过程。研究表明拟南芥中至少存在 3 类感受

收稿日期：2012 – 06 – 15；**修回日期**：2012 – 11 – 25

基金项目：国家自然科学基金项目（30730078）

* 通信作者 Author for correspondence（E-mail：lyhshen@126.com）

光信号的系统，感受红光和远红光的光敏色素（phytochromes，phyA-E），感受蓝光/UV-A 的隐花色素（cryptochromes，cry1 和 cry2）和向光色素（phototropins，phot1 和 phot2）以及感受中波紫外线（UV-B）的受体 UVR8（UV RESISTANCE LOCUS 8）（Brosche & Strid，2003；Gyula et al.，2003；Rizzini et al.，2011；Wu et al.，2011）。植物在光下和黑暗中表现不同的生长特性，黑暗中萌发的幼苗具有长的下胚轴，未分化的叶绿体和未展开的子叶，称为暗形态建成。而光形态建成（光下萌发的幼苗）包括下胚轴伸长的抑制，叶绿素的积累、叶绿体的分化、子叶的开展以及花青素的积累。

目前，有两类光形态建成的突变体，一类是光下表现黄化的暗形态建成表型，称为 long hypocotyl 或 hy 突变体（Koornneef et al.，1980）；另一类是黑暗中表现光形态建成的表型，包括 cop/det/fus（constitutive photomorphogenic/de-etiolated/fusca）突变体群（Chory，1992；Hardtke & Deng，2000）。cop1 突变体植株在暗处生长时表型为光形态建成（Deng et al.，1992；Mcnellis et al.，1994a），而遗传转化研究发现，过量表达 COP1 的转基因植株即使生长在光环境下，其表型仍为暗形态建成，表明 COP1 是一个光形态建成的抑制子（Mcnellis et al.，1994b）。

研究表明，COP1 与具有 G-box 结合位点的核定位 bZIP 蛋白 HY5，以及 HYH 结合调控光诱导基因的表达，在黑暗下 HY5 及 HYH 特异地与 COP1 的 WD-40 结构域结合（Ang & Deng，1994；Oyama et al.，1997；Ang et al.，1998；Torii et al.，1998；Osterlund et al.，2000；Magnus et al.，2002）。COP1 是一个核质穿梭蛋白，在黑暗下定位在细胞核内，光下则定位在细胞质内（von Arnim & Deng，1994）。COP1 具有 E3 泛素连接酶活性使转录调控因子 LAF1、HY5、HFR1 等泛素化，并调控其降解，在光信号转导及植物光形态建成中起重要作用（Saijo et al.，2003；Seo et al.，2003；Dornan et al.，2004；Jang et al.，2005）。而在拟南芥 UVR8 介导的 UV-B 光信号转导途径中，COP1 的作用有所不同。在 UV-B 的照射下，COP1 与 HY5 表达量增加，UVR8 由二聚体变成单体，COP1、HY5、UVR8 在细胞核内聚集，UVR8 与 COP1 相互作用阻断了 COP1 参与降解 HY5/HYH 的途径，HY5 启动下游基因的表达（Attila et al.，2006；Kaiserli & Jenkins，2007；Favory et al.，2009；Rizzini et al.，2011）。

在拟南芥中 *COP1* 已经被分离克隆并研究了其功能。除拟南芥外，目前从豌豆、番茄、玉米和水稻等几种植物中分离鉴定出 COP1 蛋白，估计其它植物中也存在 COP1 蛋白，但它的功能是未知的。*COP1* 在‘津田’芜菁中的结构和功能以及作用机制是否与拟南芥完全一致，尚不清楚。

本研究中克隆了 *COP1* 基因 cDNA 的全长，并研究其在花青素合成光敏感型‘津田’芜菁中的表达特性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

‘津田’芜菁（*Brassica rapa* L. ssp. *rapifera*‘Tsuda’）于 2006 年取自东北林业大学花卉生物工程研究所温室。光敏感的‘津田’芜菁的肉质根表皮见光部分合成花青素呈现红色，不见光部分不合成花青素呈现白色。取日光下生长的成熟植株的叶片、花、肉质根表皮以及埋在土里未见光的肉质根白色表皮；UV-A 光（352 nm，15 W · m^{-2}）分别光照处理一直处于土壤中生长的肉质根表皮 6、12、18 和 24 h；成熟的种子于黑暗中生长 2 d，用 UV-A（352 nm，15 W · m^{-2}）、蓝光（470 nm，12 W · m^{-2}）、红光（660 nm，13 W · m^{-2}）、远红光（735 nm，14 W · m^{-2}）分别光照处理 48 h 整株幼苗。以上所有材料取样后液氮速冻，－80 ℃保存备用。

1.2　*COP1* 全长 cDNA 的分离

液氮研磨，采用改良 2%CTAB 法提取试材总 RNA（周波　等，2008）。以 DNase Ⅰ酶（RNase free）消化处理后的柱头总 RNA 为模板，采用 AMV 反转录酶（TaKaRa）和锚定引物 Oligo(dT)$_{18}$进行 RNA 反转录。反转录的程序为：42 ℃孵育 30 min，99 ℃变性 5 min 和 4 ℃孵育 5 min。

根据 GenBank 中与芜菁亲缘关系相近的物种拟南芥 *COP1* 基因保守区的核苷酸序列，设计上下游特异性引物 COP1F（5′-GAGTATGAAGAGCACGAA-3′）和 COP1R（5′-AACTTTGATGGTTCCTTG-3′），以反转录产物 cDNA 第一链为模板，利用 LA *Taq* DNA 聚合酶（TaKaRa）进行 PCR 扩增。扩增条件为：94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，共 30 个循环后，72 ℃延伸 7 min。

PCR 产物利用 TOYOBO DNA 回收试剂盒（TOYOBO MagExtractor-pcr & Gel Clean up kit）回收特异片段，与 pGEM-T 载体连接，转化到 Top10 菌株中，通过蓝白斑筛选，挑选阳性克隆并进行核酸序列测定（东北林业大学生命科学学院，MegaBASE 500）。

根据所得的部分 *COP1* 的 cDNA（*BrCOP1*）序列，设计 RCAE 特异性引物 COP1 3′GSP（5′-GAGCTTGCGTCTGCGTCTACTGATA-3′）和 COP1 5′GSP（5′-CCGCAATGAAGTTGCTTGAGCCAGGATT-3′）。利用 RACE 反应试剂盒（Marathon^{TM} cDNA Amplification Kit）中接头引物 AP1（5′-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3′）、AP2（5′-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3′）及 RCAE 特异性引物 COP1 3′GSP 和 COP1 5′GSP 进行 cDNA 末端快速 PCR 扩增，获得的特异片段同上回收测序。将获得的中间序列和末端序列拼接 cDNA 全长序列，根据测得的序列设计 COP1 全长引物 COP1 CFP（5′-GGAAAACGAATTATGGAAGAG-3′）和 COP1 CRP（5′-TTACAATCAAGCAGCGAGT-3′）。

利用 RT-PCR 的方法获得全长片段，获得的特异片段同上回收测序。将测序获得的核酸序列及其推导的氨基酸序列用 NCBI（http：//www. ncbi. nlm. nih. gov/）数据库 ORF finder 进行分析，用 BLAST 比对分析其所含的保守功能域。亲缘关系进化树分析采用 EBI（http：//www. ebi. ac. uk/）数据库 clustalw 进行分析。

1.3　*BrCOP1* 的 Northern 杂交分析

分别提取处于开花期的‘津田’芜菁叶（L）、花（F）和暴露于日光变红的肉质根表皮（S）、黑暗中的肉质根表皮（D）、UV-A 处理 24 h（UV-A）的肉质根表皮的总 RNA（10 μg）进行 Northern 杂交，检测 *BrCOP1* 的表达量；提取 UV-A 处理 6、12、18 和 24 h 的黑暗中的肉质根表皮总 RNA；提取在黑暗中播种并生长 48 h 的幼苗，分别用 UV-A（352 nm）、蓝光（470 nm）、红光（660 nm）、远红光（735 nm）处理 48 h，分析幼苗在单色光下形态建成过程中 *BrCOP1* 的表达丰度。

提取的总 RNA（10 μg），用 8 g · L^{-1} 琼脂糖凝胶电泳分离；然后将 RNA 片段转移到 Hybond^{TM}-N 尼龙膜上；探针是利用 *BrCOP1* 序列的设计的引物 COP1-F 和 COP1-R，地高辛标记获得；尼龙膜在 65 ℃水浴锅中过夜杂交；杂交后，用 2% SSC 和 0.1% SDS 的溶液在室温下洗膜两次，每次 5 min；再用 0.1% SSC 和 0.1% SDS 溶液在 65 ℃洗 30 min，进行 X 光片显影。

2　结果与分析

2.1　*BrCOP1* 基因的克隆与序列分析

根据已知拟南芥 *COP1* 的核酸序列设计引物，以‘津田’芜菁总 RNA 为模板，通过 RT-PCR 的

方法获得一个长为 639 bp 的 cDNA 序列。通过 5′RACE 和 3′RACE 的方法分别获得长度约为 1 700 bp 的 5′末端序列和 700 bp 的 3′末端序列。将最终 RT-PCR 的扩增片段进行测序分析，获得了 2 046 bp 的全长 cDNA 序列，命名为 *BrCOP1*，GenBank 登录号为 JF738111。*BrCOP1* 全长 cDNA 包含 2 034 bp 的开放阅读框（open reading frame，ORF），对应编码一个含 677 个氨基酸的蛋白质，分子量约为 76 kD（图 1）。

```
13   atggaagagattaggaaggatccgctagttccggctgtgaaacccgatccgagaacctcctccatcggagaaggccccaaccaccgccac
     M  E  E  I  R  K  D  P  L  V  P  A  V  K  P  D  P  R  T  S  S  I  G  E  G  P  N  H  R  H
103  gaaaacgacgaaggaggaagcggtggtttggagattggagctccggatctggataaggacctgctctgtccgatttgtatgcaggttata
      E  N  D  E  G  G  S  G  G  L  E  I  G  A  P  D  L  D  K  D  L  L  C  P  I  C  M  Q  V  I
193  aaggacgctttcctcacggcgtgtggacacagcttctgctacatgtgcatcatcacgcaccttaggaacaagagcgattgtccctgttgt
      K  D  A  F  L  T  A  C  G  H  S  F  C  Y  M  C  I  I  T  H  L  R  N  K  S  D  C  P  C  C
283  agccaacacctcacaaataatcagctttaccctaacttcttacttgataagctgttgaagaaaacctcagctcggcatgtgtcgaaaact
      S  Q  H  L  T  N  N  Q  L  Y  P  N  F  L  L  D  K  L  L  K  K  T  S  A  R  H  V  S  K  T
373  gcatcgcctttggatcagtttcgggacgcattacaacggggttgtgatgtgtcaattaaagaggttgataatctcctgacacttcttgcg
      A  S  P  L  D  Q  F  R  D  A  L  Q  R  G  C  D  V  S  I  K  E  V  D  N  L  L  T  L  L  A
463  gaaaagaagaggaaaatggagcaggaagaagctgagaggaacatgcagatactcttggactttttgcattgtctgaggaagcagaaagct
      E  K  K  R  K  M  E  Q  E  E  A  E  R  N  M  Q  I  L  L  D  F  L  H  C  L  R  K  Q  K  A
553  gatgaacttaatgaggtgcaaactgatcttcagtatattaaagaagacataaatgcagttgagagacatagaatagatttgtaccgtgct
      D  E  L  N  E  V  Q  T  D  L  Q  Y  I  K  E  D  I  N  A  V  E  R  H  R  I  D  L  Y  R  A
643  cgggataggtactctgtgaagttacgaatgctcggagatgatccaagcacacgaaatgcatggcccctcgagaagagtcacaccggcttc
      R  D  R  Y  S  V  K  L  R  M  L  G  D  D  P  S  T  R  N  A  W  P  L  E  K  S  H  T  G  F
733  aactccaattctctgagcataagaggagggaatccatcaggcaattttcaaaacaaaaaggtagtagagggaaaggcacaaggaagctct
      N  S  N  S  L  S  I  R  G  G  N  P  S  G  N  F  Q  N  K  K  V  V  E  G  K  A  Q  G  S  S
823  cacgggatatcgaaaaaggatgcacagagtggatcagattcccagagtttgaatcagtcatctgtctcaatggccaggaagaaacggatc
      H  G  I  S  K  K  D  A  Q  S  G  S  D  S  Q  S  L  N  Q  S  S  V  S  M  A  R  K  K  R  I
913  catgctcagttcaacgatctacaagagtgttacctccaaaagcggcgtcagttggtagaccaaccacatactaatcaagaaagtgataat
      H  A  Q  F  N  D  L  Q  E  C  Y  L  Q  K  R  R  Q  L  V  D  Q  P  H  T  N  Q  E  S  D  N
1003 agtgtagtacgtagggaaggatacagccacggccttgcagattttcaatctgtgctcactacctttactcgctacagtcgtctgagagtt
      S  V  V  R  R  E  G  Y  S  H  G  L  A  D  F  Q  S  V  L  T  T  F  T  R  Y  S  R  L  R  V
1093 atagcggagatccggcatggggatatatttcattcagccaacattgtatcaagcatagagtttgatcgtgatgatgagctcttcgccact
      I  A  E  I  R  H  G  D  I  F  H  S  A  N  I  V  S  S  I  E  F  D  R  D  D  E  L  F  A  T
1183 gctggtgtttctagatgtataaaggtttttgacttctcttcggttgtcaacgaaccggcagatatacagtgtccgattgtggagatgtca
      A  G  V  S  R  C  I  K  V  F  D  F  S  S  V  V  N  E  P  A  D  I  Q  C  P  I  V  E  M  S
1273 actcgctccaaacttagttgtttgagttggaataagcatgagaaaaaccatatagcaagcagtgattatgaaggaatagtaactgtgtgg
      T  R  S  K  L  S  C  L  S  W  N  K  H  E  K  N  H  I  A  S  S  D  Y  E  G  I  V  T  V  W
1363 gatgtaaccactagacagagtcttatggagtatgaagagcacgaaaaacgtgcctggagcgttgactttcgcgaacagaaccatctatg
      D  V  T  T  R  Q  S  L  M  E  Y  E  E  H  E  K  R  A  W  S  V  D  F  S  R  T  E  P  S  M
1453 cttgtgtctggtagtgacgattgtaaggttaaagtttggtgcacaaggcaggaagcaagtgtgcttaacattgatatgaaagcaaacatt
      L  V  S  G  S  D  D  C  K  V  K  V  W  C  T  R  Q  E  A  S  V  L  N  I  D  M  K  A  N  I
1543 tgttgtgtcaagtacaatcctggctcaagcaacttcattgcggtcggatcagctgatcatcacatccattactacgatttaagaaacata
      C  C  V  K  Y  N  P  G  S  S  N  F  I  A  V  G  S  A  D  H  H  I  H  Y  Y  D  L  R  N  I
1633 agccaaccacttcatgtcttcagtggacacaagaaagcggtctcctatgtgaagtttttgtccaacaacgagcttgcgtctgcgtctact
      S  Q  P  L  H  V  F  S  G  H  K  K  A  V  S  Y  V  K  F  L  S  N  N  E  L  A  S  A  S  T
1723 gatagcacactacgcttatgggatgtcaaggacaacttgccagttcggacatttagaggacacactaacgagaagaactttgtgggtctc
      D  S  T  L  R  L  W  D  V  K  D  N  L  P  V  R  T  F  R  G  H  T  N  E  K  N  F  V  G  L
1813 acagtgaacagcgagtatctcgcctgcggaagcgagacaaatgaagtatatgtatatcacaaggagatcacgaaacctgtgacatcgcat
      T  V  N  S  E  Y  L  A  C  G  S  E  T  N  E  V  Y  V  Y  H  K  E  I  T  K  P  V  T  S  H
1903 aggtttggatcactagacatggaggaagcagaggaagaggcgggttcatacttcattagtgcggtttgctggaagagcgatagtcccacg
      R  F  G  S  L  D  M  E  E  A  E  E  E  A  G  S  Y  F  I  S  A  V  C  W  K  S  D  S  P  T
1993 atgctgactgcgaatagccaaggaaccatcaaagttttggtactcgctgcttga 2046
      M  L  T  A  N  S  Q  G  T  I  K  V  L  V  L  A  A  *
```

图 1 ‘津田’芜菁 *BrCOP1* 全长 cDNA 核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig. 1 The full-length cDNA sequence of *BrCOP1* and its deduced amino acid sequence

将推导的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast P 分析，发现‘津田’芜菁 *BrCOP1* 编码的 COP1 是一个可溶性核蛋白，二级结构由 3 个特殊的结构域组成，即 N－端的环形锌指结合域（ring finger zinc binding domain，RING）、中间的卷曲螺旋形结构域（coiled-coil domain，COIL），C－端的 WD-40 重复序列（WD-40 repeats，WD-40）（图 2）。

```
津田芜菁 Brassica rapa              MEEIRKD-PLVPAVK-----PDPRTSSIGEGPNHRHENDEGGSGGL-----EIGAPDLD   48
拟南芥 Arabidopsis thaliana         MEEISTD-PVVPAVK-----PDPRTSSVGEGAN-RHENDDGGSGGS-----EIGAPDLD   47
豌豆 Pisum sativum                  MEEHSVG-PLVPAVVK----PEP------SKNFSTDTTAAGTFLL-----VPTMSDLD   42
番茄 Solanum lycoporsicum           MVESSVG-GVVPAVK-------------GEVMRRMGDKEEGGSVTLRDEEVGTVTEWELD   46
水稻 Oryza sativa                   MGDSTVAGALVPSVPKQEQAPSGDASTAALAVAGEGEEDAGARASAG----GNGEAAAD   55
                                    * :        :**:*                        :     ..          *

                                                 Zinc-binding
津田芜菁 Brassica rapa              KDLLCPICMQVIKDAFLTACGHSFCYMCIITHLRNKSDCPCCSQHLTNNQLYPNFLLDKL   108
拟南芥 Arabidopsis thaliana         KDLLCPICMQIIKDAFLTACGHSFCYMCIITHLRNKSDCPCCSQHLTNNQLYPNFLLDKL   107
豌豆 Pisum sativum                  KDFLCPICMQIIKDAFLTACGHSFCYMCIITHLRNKSDCPCCGHYLTNSNLFPNFLLDKL   102
番茄 Solanum lycoporsicum           RELLCPICMQIIKDAFLTACGHSFCYMCIVTHLHNKSDCPCCSHYLTTSQLYPNFLLDKL   106
水稻 Oryza sativa                   RDLLCPICMAVIKDAFLTACGHSFCYMCIVTHLSHKSDCPCCGNYLTKAQLYPNFLLDKV   115
                                    :::****** :*****************:*** :*******.::**. :*:*******:

津田芜菁 Brassica rapa              LKKTSARHVSKTASPLDQFRDALQRGCDVSIKEVDNLLTLLAEKKRKMEQEEAERNMQIL   168
拟南芥 Arabidopsis thaliana         LKKTSARHVSKTASPLDQFREALQRGCDVSIKEVDNLLTLLAERKRKMEQEEAERNMQIL   167
豌豆 Pisum sativum                  LKKTSDRQISKTASPVEHFRQAVQKGCEVTMKELDTLLLLLTEKKRKMEQEEAERNMQIL   162
番茄 Solanum lycoporsicum           LKKTSARQISKTASPVEQFRHSLEQGSEVSIKELDALLLMLSEKKRKLEQEEAERNMQIL   166
水稻 Oryza sativa                   LKKMSARQIAKTASPIDQFRYALQQGNDMAVKELDSLMTLIAEKKRHMEQQESETNMQIL   175
                                    *** * *:::*****:::** ::::* ::::**:* *: :::*:**::**:*:* *****

                                    Coiled-coil
津田芜菁 Brassica rapa              LDFLHCLRKQKADELNEVQTDLQYIKEDINAVERHRIDLYRARDRYSVKLRMLGDDPSTR   228
拟南芥 Arabidopsis thaliana         LDFLHCLRKQKVDELNEVQTDLQYIKEDINAVERHRIDLYRARDRYSVKLRMLGDDPSTR   227
豌豆 Pisum sativum                  LDFLHCLRKQKVDELKEVQTDLQFIKEDIGAVEKHRMDLYRARDRYSVKLRMLDDSGGRK   222
番茄 Solanum lycoporsicum           LDFLQMLRKQKVDELNEVQHDLQYIKEDLNSVERHRIDLYRARDRYSMKLRMLADDPIGK   226
水稻 Oryza sativa                   LVFLHCLRKQKLEELNEIQTDLQYIKEDISAVERHRLELYRTKERYSMKLRMLLDEPAAS   235
                                    * **: ***** :**:*:* ***:****:.:**:**::***:::***:***** *.

津田芜菁 Brassica rapa              NAWP--LEKSHTGFNSNSLSIRGGNPSGNFQNKKVVEGKAQGSSHG--ISKKDA-QSGSD   283
拟南芥 Arabidopsis thaliana         NAWP--HEKNQIGFNSNSLSIRGGNFVGNYQNKK-VEGKAQGSSHG--LPKKDA-LSGSD   281
豌豆 Pisum sativum                  SRHSS-MDLNSSGLASSPLNLRGGLSSGSHTKKN--DGKSQISSHGHGIQRRDP-ITGSD   278
番茄 Solanum lycoporsicum           KPWSSSTDRNFGGLFSTSQNAPGGLPTGNLTFKK-VDSKAQISSPG--PQRKDTSISELN   283
水稻 Oryza sativa                   KMWPSPMDKPSGLFPPNSRGPLSTSNPGGLQNKK-LDLKGQISHQG--FQRRDVLTCSDP   292
                                     .  .   :      : ... .  .     *.    *:  : *.* *  *     ::*

津田芜菁 Brassica rapa              SQSLNQSSVSMARKKRIHAQFNDLQECYLQKRRQLVDQPHTNQESDNSVVRREGYSHGLA   343
拟南芥 Arabidopsis thaliana         SQSLNQSTVSMARKKRIHAQFNDLQECYLQKRRQLADQPNSKQENDKSVVRREGYSNGLA   341
豌豆 Pisum sativum                  SQYINQSGLALVRKKRVHTQFNDLQECYLQKRRQAADKPHGQQERDTNFISREGYSCGLD   338
番茄 Solanum lycoporsicum           SQHMSQSGLAVVRKKRVNAQFNDLQECYLQKRRQLANKSRVKEEKDADVVQREGYSEGLA   343
水稻 Oryza sativa                   PSAPIQSGNVIARKRRVQAQFNELQEYYLQRRRTGAQ-SRRLEERDIVTINKEGYHAGLE   351
                                     ..    **    :.**:*:::***:*** ***:**  .: ..    :* *    : :***   **

津田芜菁 Brassica rapa              DFQSVLTTFTRYSRLRVIAEIRHGDIFHSANIVSSIEFDRDDELFATAGVSRCIKVFDFS   403
拟南芥 Arabidopsis thaliana         DFQSVLTTFTRYSRLRVIAEIRHGDIFHSANIVSSIEFDRDDELFATAGVSRCIKVFDFS   401
豌豆 Pisum sativum                  DFQSVLTTFTRYSRLRVIAEIRHGDIFHSANIVSSIEFDRDDDLFATAGVSRRIKVFDFS   398
番茄 Solanum lycoporsicum           DFQSVLSTFTRYSRLRVIAELRHGDLFHSANIVSSIEFDRDDELFATAGVSRRIKVFDFS   403
水稻 Oryza sativa                   DFQSVLTTFTRYSRLRVIAELRHGDLFHSANIVSSIEFDRDDELFATAGVSKRIKVFEFS   411
                                    ******:*************:****:******************:********: ****:**
```

```
津田芜菁 Brassica rapa            SVVNEPADIQCPIVEMSTRSKLSCLSWNKHEKNHIASSDYEGIVTVWDVTTRQSLMEYEE   463
拟南芥 Arabidopsis thaliana       SVVNEPADMQCPIVEMSTRSKLSCLSWNKHEKNHIASSDYEGIVTVWDVTTRQSLMEYEE   461
豌豆 Pisum sativum                AVVNEPTDAHCPVVEMTTRSKLSCLSWNKYAKNQIASSDYEGIVTVWTMTTRKSLMEYEE   458
番茄 Solanum lycoporsicum         SVVNEPADAHCPVVEMSTRSKLSCLSWNKYTKNHIASSDYDGIVTVWDVTTRQSVMEYEE   463
水稻 Oryza sativa                 TVVNEPSDVHCPVVEMATRSKLSCLSWNKYSKNVIASSDYEGIVTVWDVQTRQSVMEYEE   471
                                  :*****:* :**:***:************: ** ******:****** : **:*:*****

津田芜菁 Brassica rapa            HEKRAWSVDFSRTEPSMLVSGSDDCKVKVWCTRQEASVLNIDMKANICCVKYNPGSSNFI   523
拟南芥 Arabidopsis thaliana       HEKRAWSVDFSRTEPSMLVSGSDDCKVKVWCTRQEASVINIDMKANICCVKYNPGSSNYI   521
豌豆 Pisum sativum                HEKRAWSVDFSRTDPSMLVSGSDDCKVKVWCTNQEASVLNIDMKANICCVKYNPGSGNYI   518
番茄 Solanum lycoporsicum         HEKRAWSVDFSRTEPSMLVSGSDDCKVKVWCTKQEASVLNIDMKANICCVKYNPGSSVHI   523
水稻 Oryza sativa                 HEKRAWSVDFSRTEPSMLVSGSDDCKVKVWCTKQEASAINIDMKANICSVKYNPGSSHYV   531
                                  *************:******************.****.:*********.*******. .:

                                     WD-40 repeats
津田芜菁 Brassica rapa            AVGSADHHIHYYDLRNISQPLHVFSGHKKAVSYVKFLSNNELASASTDSTLRLWDVKDNL   583
拟南芥 Arabidopsis thaliana       AVGSADHHIHYYDLRNISQPLHVFSGHKKAVSYVKFLSNNELASASTDSTLRLWDVKDNL   581
豌豆 Pisum sativum                AVGSADHHIHYYDLRNISRPVHVFTGHKKAVSYVKFLSNDELASASTDSTLRLWDVKQNL   578
番茄 Solanum lycoporsicum         AVGSADHHIHYYDLRNTSQPVHIFSGHRKAVSYVKFLSNNELASASTDSTLRLWDVKDNL   583
水稻 Oryza sativa                 AVGSADHHIHYFDLRNPSAPVHVFGGHKKAVSYVKFLSTNELASASTDSTLRLWDVKENC   591
                                  ***********:**** * *:*:* **:**********.:*****************:*

津田芜菁 Brassica rapa            PVRTFRGHTNEKNFVGLTVNSEYLACGSETNEVYVYHKEITKPVTSHRFGSLDMEEAEEE   643
拟南芥 Arabidopsis thaliana       PVRTFRGHTNEKNFVGLTVNSEYLACGSETNEVYVYHKEITRPVTSHRFGSPDMDDAEEE   641
豌豆 Pisum sativum                PVRTFRGHANEKNFVGLTVRSEYIACGSETNEVFVYHKEISKPLTWHRFGTLDMEDAEDE   638
番茄 Solanum lycoporsicum         PVRTLRGHTNEKNFVGLSVNNEFLSCGSETNEVFVYHKAISKPVTWHRFGSPDIDEADED   643
水稻 Oryza sativa                 PVRTFRGHKNEKNFVGLSVNNEYIACGSETNEVFVYHKAISKPAANHRFVSSDLDDADDD   651
                                  ****:*** ********:*..*:::********:**** *::* : *** : *:::*:::

津田芜菁 Brassica rapa            AGSYFISAVCWKSDSPTMLTANSQGTIKVLVLAA-   677
拟南芥 Arabidopsis thaliana       AGSYFISAVCWKSDSPTMLTANSQGTIKVLVLAA-   675
豌豆 Pisum sativum                AGSYFISAVCWKSDRPTILTANSQGTIKVLVLAA-   672
番茄 Solanum lycoporsicum         AGSYFISAVCWKSDSPTMLAANSQGTIKVLVLAA-   677
水稻 Oryza sativa                 PGSYFISAVCWKSDSPTMLTANSQGTIKVLVLAP-   685
                                  .************* **:*:*************.
```

图 2 5 种植物 COP1 蛋白的一级结构比较

星号代表完全相同的氨基酸残基，冒号代表高度保守的氨基酸残基，

圆点代表不太保守的氨基酸残基。

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of COP1 proteins from five plant species

Asterisk，identical residues；Colon，highly conserved residues；

Dot，weakly conserved residues.

Blast 分析发现 BrCOP1 与多种植物的 COP1 有很高的同源性，与拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）的 COP1 氨基酸同源性高达 94%，与豌豆（*Pisum sativum*）和番茄（*Solanum lycopersicum*）的 COP1 同源性达 76%，与单子叶植物粳稻（*Oryza sativa* ssp. *japonica*，‘日本晴’）的 COP1 同源性达 70%。

为了了解‘津田’芜菁 BrCOP1 蛋白与其他植物的 COP1 蛋白的亲缘关系，利用 MEGA4 软件，将不同植物的 COP1 蛋白构建系统进化树（图 3）。

系统进化关系分析表明 BrCOP1 属于双子叶植物家族，与同在芸薹属的油菜亲缘关系最近，其次是双子叶的豆科、茄科类植物，BrCOP1 与单子叶植物粳稻（*Oryza sativa* ssp. *japonica*，‘日本晴’）进化关系最远（图 3）。

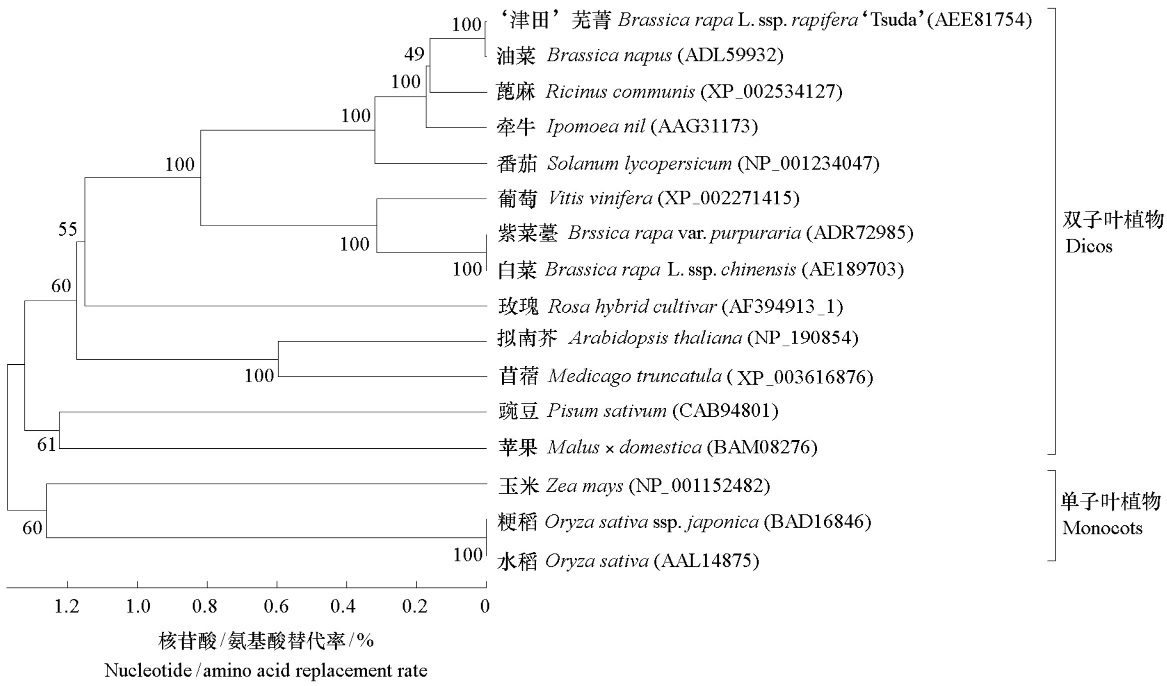

图 3　COP1 蛋白的进化系统图

Fig. 3　Phylogenetic analysis of COP1 from plants

2.2　*BrCOP1* 的表达分析

2.2.1　在不同组织中的表达

分别提取处于开花期的叶（L）、花（F）和暴露于日光变红的肉质根表皮（S）、黑暗中未变红的肉质根表皮（D）的总 RNA 进行 Northern 杂交，检测‘津田’芜菁不同组织中 *BrCOP1* 的表达量（图 4）。结果表明‘津田’芜菁 *BrCOP1* 在叶、花、光下表皮、黑暗中表皮仅有痕量表达，没有明显差异。

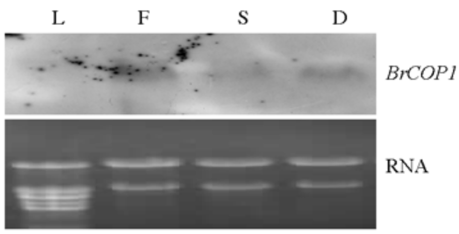

图 4　*COP1* 在不同组织中的表达

L：叶；F：花；S：日光下肉质根表皮；D：黑暗中肉质根表皮。

Fig. 4　Expression of *COP1* in different tissue

L：Leaf；F ：Flower；S：Swollen hypocotyls under sunlight；

D：Swollen hypocotyls under dark.

2.2.2　在 UV-A 处理的肉质根表皮中的表达

提取 UV-A 处理 6、12、18 和 24 h 的一直处于黑暗中的‘津田’芜菁肉质根表皮总 RNA，Northern

分析 *BrCOP1* 的表达（图 5）。

从图 5 中可以看出 UV-A 处理 6 h 时 *BrCOP1* 的表达就已经增多，但随着时间的延长，表达量又有所下降。结果表明 *BrCOP1* 在肉质根表皮中的表达受 UV-A 诱导，在 UV-A 照射后，*BrCOP1* 的表达量在短时间内有所增加。

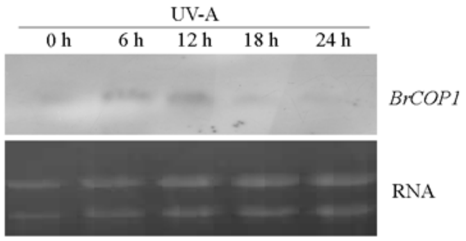

图 5　'津田'芜菁 *COP1* 在 UV-A 诱导下的表达

Fig. 5　Expression of *BrCOP1* in *Brassica rapa* under UV-A induction

2.2.3　在不同单色光处理的幼苗中的表达

播种'津田'芜菁种子使其在黑暗中萌发并生长 48 h，分别用 UV-A（352 nm）、蓝光（470 nm）、红光（660 nm）和远红光（735 nm）分别处理 48 h，分析幼苗在单色光下形态建成过程中 *BrCOP1* 的表达丰度（图 6）。结果表明虽然不同光环境下幼苗的形态建成差异很大，但 *BrCOP1* 的表达丰度在日光、黑暗、红光、远红光及蓝光中差异不明显，只有 UV-A 处理表达量高于与其他处理，*BrCOP1* 的表达受 UV-A 诱导表达。

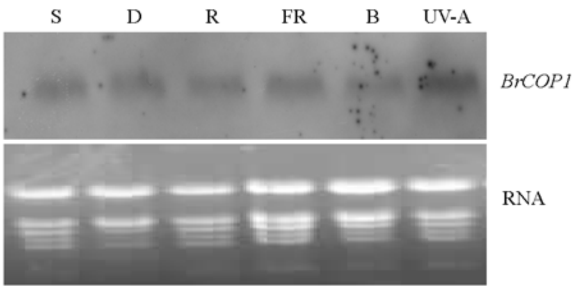

图 6　不同光环境下幼苗中 *BrCOP1* 的表达

S：黑暗 48 h 日光下 48 h 的幼苗；D：一直处于黑暗 96 h 的幼苗；R、FR、B、UV-A：黑暗 48 h 后分别用红光、远红光、蓝光、UV-A 处理 48 h。

Fig. 6　Expression of *BrCOP1* in seedlings under different light environment

S：Seedlings under dark 48 h then under sunlight 48 h；D：Under dark 96 h；R，FR，B，UV-A：Seedlings under dark 48 h then separately exposed to red，far-red，blue，UV-A for 48 h.

3　讨论

虽然 *COP1* 基因已经从拟南芥、水稻、蕃茄等几种植物中克隆出来，但用 BLAST 比较了这几种植物的 *COP1* 核苷酸序列，由于亲缘关系较远，很难找到合适的引物设计位点。考虑到芜菁也是十字花科植物，与拟南芥亲缘关系较近，因此根据拟南芥 *COP1* 全长序列保守区设计了两条引物，

进行 RT-PCR 扩增，获得部分片段，虽然这种基因克隆的方法成功率很低，但对于同源性高，保守性强的基因来说却存在一定的可能性，只是引物部分序列的准确性需要进一步确认。根据部分序列设计 RACE 引物获得基因的全长序列。

‘津田’芜菁是十字花科芸薹属植物，其 cDNA 全长序列同源性检索结果表明，与同科的拟南芥在核苷酸水平上同源性最高，碱基同源性达 94%，同时与豆科、茄科等双子叶植物也有较高的同源性，单子叶植物最低。这也从分子进化的角度上证明了不同科属物种间的亲缘关系。氨基酸序列分析还表明 COP1 蛋白结构具有高度的保守性，‘津田’芜菁中 COP1 由 3 个特殊的保守的结构域组成，即 N－端的环形锌指结合域、中间的卷曲螺旋形结构域、C－端的 WD-40 重复序列。

COP1 蛋白是一个光形态建成的抑制子，是一个光调控植物发育的一个分子开关（molecular switch）。当植物在暗处生长时，核内会积累有丰富的 COP1 蛋白，光形态建成受到抑制。COP1 蛋白是一种核定向蛋白，核内 COP1 蛋白的丰度变化由 COP1 蛋白的亚细胞定位情况所决定，COP1 蛋白的亚细胞定位受多个因素的影响。光信号首先通过植物细胞中的光受体接受，然后通过信号转导形成胞内第二信使系统的级联传递调节光形态建成反应。与此同时，光和光受体也调节了 COP1 蛋白在细胞中的核质分布（nucleocytoplasmic partitioning）（von Arnim et al.，1997；Stacey et al.，1999；陈章权　等，2002）。分析表明光下生长的拟南芥幼苗中 COP1 蛋白的水平与黑暗中生长的拟南芥无明显差异（Stacey et al.，1999），但在 UVR8 介导的 UV-B 信号转导过程中的研究发现，COP1 受 UV-B 光诱导表达（Attila et al.，2006）。

本研究结果也表明在‘津田’芜菁中，*BrCOP1* 的表达没有组织特异性，在开花植株中，花、叶、肉质根表皮中 *BrCOP1* 的丰度很低；在整株幼苗中，不论是黑暗处理还是太阳光、各单色光处理，均有表达，但 UV-A 处理表达量有所增加，其它处理没有明显差别。UV-A 同样诱导成熟植株肉质根表皮中 *BrCOP1* 表达，而在拟南芥中 UV-B 诱导 *COP1* 的表达（Huang et al.，2012），‘津田’芜菁中 *BrCOP1* 的表达是否也与拟南芥类似受 UV-B 的诱导还有待于进一步研究。根据本研究结果 *COP1* 的在 UV-A 诱导的花青素合成及光信号转导中起重要作用。因此克隆和研究 *BrCOP1* 的表达特性，将为研究依光型花青素合成的‘津田’芜菁 *COP1* 的功能打下基础。

References

Ang L H，Chattopadhyay S，Wei N，Oyama T，Okada K，Batschauer A，Deng X W. 1998. Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of *Arabidopsis* development. Mol Cell，1 (2)：213－222.

Ang L H，Deng X W. 1994. Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci：Allele-specific and light-dependent interaction between the HY5 and COP1 loci. Plant Cell，6：613－628.

Attila O，Alexander B，Zoltán M，Agnieszka B，Jean M，Edward J O，Éva Á，Eberhard S，Ferenc N，Roman U. 2006. CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*. Plant Cell，18 (8)：1975－1990.

Brosche M，Strid A. 2003. Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. Physiol Plant，117：1－10.

Chen Zhang-quan，Peng Shi-qing，Chen Shou-cai. 2002. The structure and the function of plant COP1 protein. Chinese Bulletin of Botany，19 (5)：620－628. (in Chinese)

陈章权，彭世清，陈守才. 2002. 植物 COP1 蛋白的结构与功能. 植物学通报，19 (5)：620－628.

Chory J. 1992. A genetic model for light regulated seedling development in *Arabidopsis*. Development，115：337－354.

Deng X W，Matsui M，Wei N，Wanger D，Chu A M，Felmann K A，Quail P H. 1992. COP1，an *Arabidopsis* regulatory gene，encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. Cell，71 (5)：791－801.

Dornan D，Wertz I，Shimizu H，Arnott D，Frantz G D，Dowd P，O'Rourke K，Koeppen H，Dixit V M. 2004. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. Nature，429 (6987)：86－92

Favory J，Stec A，Gruber H，Rizzini L，Oravecz A，Funk M，Albert A，Cloix C，Jenkins G I，Oakeley E J，Seidlitz H K，Nagy F，Ulm R. 2009.

Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. EMBO J，28：591 – 601.

Gyula P，Schäfer E，Nagy F. 2003. Light perception and signalling in higher plants. Curr Opin Plant Biol，6：446 – 452.

Hardtke C S，Deng X W. 2000. The cell biology of the COP/DET/FUS proteins：Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond. Plant Physiol，124：1548 – 1557.

Huang X，Ouyang X H，Yang P，Lau S，Li G，Li J G，Chen H，Deng X W. 2012. *Arabidopsis* FHY3 and HY5 positively mediate induction of COP1 transcription in response to photomorphogenic UV-B light. Plant Cell，24 (11)：4590 – 4606.

Jang I C，Yang J Y，Seo H S，Chua N H. 2005. HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. Genes Dev，19 (5)：593 – 602.

Kaiserli E，Jenkins G. 2007. UV-B promotes rapid nuclear translocation of the *Arabidopsis* UV-B specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. Plant Cell，19：2662 – 2673.

Koornneef M，Rolff E，Spruit C J P. 1980. Genetic control of ligh-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*（L）. Heynh Z Pflanzenphysiol，100：147 – 160.

Magnus H，Ma Li-geng，Qu Li-jia，Deng Xing-wang. 2002. Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. Genes Dev，16 (10)：1247 – 1259.

Mcnellis T W，von Arnim A G，Araki T，Komeda Y，Misera S，Deng X W. 1994a. Genetic and molecular analysis of an allelic series of cop1 mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. Plant Cell，6 (4)：487 – 500.

Mcnellis T W，von Arnim A G，Deng X W. 1994b. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* COP1 results in partial suppression mediated development：Evidence for a light-inactivable repressor of photomorphogenesis. Plant Cell，6 (10)：1391 – 1400.

Osterlund M T，Hardtke C S，Wei N，Deng X W. 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. Nature，405：462 – 466.

Oyama T，Shimura Y，Okada K. 1997. The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. Genes Dev，11：2983 – 2995.

Rizzini L，Favory J J，Cloix C，Faggionato D，O'Hara A，Kaiserli E，Baumeister R，Schäfer E，Nagy F，Jenkins G I，Ulm R. 2011. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. Science，332 (6025)：103 – 106.

Saijo Y，Sullivan J A，Wang H，Yang J，Shen Y，Rubio V，Ma L，Hoecker U，Deng X W.2003. The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. Genes Dev，17 (21)：2642 – 2647.

Seo H S，Yang J Y，Ishikawa M，Bolle C，Ballesteros M L，Chua N H. 2003. LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. Nature，423 (6943)：995 – 999.

Stacey M G，Hicks S N，Von Arnim A G. 1999. Discrete domains mediate the light- responsive nuclear and cytoplasmic localization of *Arabidopsis* COP1. Plant Cell，11 (3)：349 – 363.

Torii K U，McNellis T W，Deng X W. 1998. Functional dissection of *Arabidopsis* COP1 reveals specific roles of its three structural modules in light control of seedling development. EMBO J，17：5577 – 5587.

von Arnim A G.，Deng X W. 1994. Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. Cell，79 (6)：1035 – 1045.

von Arnim A G，Osterlund M T，Kwok S F，Deng X W. 1997. Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1，a repressor of photomorphogesis in *Arabidopsis*. Plant Physiol，114 (3)：779 – 788.

Wu M，Grahn E，Eriksson L A，Strid A. 2011. Computational evidence for the role of *Arabidopsis thaliana* UVR8 as UV-B photoreceptor and identification of its chromophore amino acids. J Chem Inf Model，51 (6)：1287 – 1295.

Zhou Bo，Wang Yu，Sun Mei，Li Yu-hua. 2008. cDNA cloning of bZIP protein HY5 in Tsuda turnip and its transcript expression analysis. Molecular Plant Breeding，6 (1)：59 – 64. (in Chinese）

周　波，王　宇，孙　梅，李玉花. 2008. 津田芜菁 bZIP 蛋白 HY5 cDNA 的克隆及表达特性. 分子植物育种，6 (1)：59 – 64.