

王佳琦,王璐,潘玉光,等. 甘草 MYB 转录因子 *GLMYB10* 的克隆与表达分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(17):67-70.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.016

甘草 MYB 转录因子 *GLMYB10* 的克隆与表达分析

王佳琦,王璐,潘玉光,鹿通,李雅丽

(内蒙古科技大学生命科学与技术学院,内蒙古包头 014010)

摘要:根据甘草悬浮细胞经茉莉酸甲酯(MeJA)诱导前后的转录组测序结果,筛选到1个响应MeJA诱导的MYB转录因子基因,通过克隆该基因片段并进行序列分析确定该基因编码1个甘草MYB转录因子,将其命名为*GLMYB10*。该基因开放阅读框全长为1 172 bp,编码产物包含340个氨基酸,对其编码产物的基本理化性质、亲水性和疏水性、保守结构域等方面进行了生物信息学分析和预测,对*GLMYB10*基因编码产物的氨基酸序列进行聚类分析。结果表明,其与木豆中MYB类转录因子的同源性最高。应用qRT-PCR分析该基因的表达水平发现,*GLMYB10*基因在甘草悬浮细胞受MJ诱导后的表达量明显高于未诱导组,并且诱导9 h后表达量最高。通过对*GLMYB10*基因进行克隆与表达分析,为探索该基因在甘草悬浮细胞黄酮类化合物生物合成中的调控作用奠定基础。

关键词:甘草;悬浮细胞;茉莉酸甲酯;MYB转录因子;基因克隆;基因表达

中图分类号: S567.7+10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0067-04

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch),豆科多年生草本植物,主要分布在内蒙古、宁夏、新疆、甘肃等西部地区,具有抗炎、抗病毒、抗癌防癌、保肝解毒、调节免疫功能以及降血脂、抗动脉粥样硬化等心脑血管药理活性,是应用最广的补益类药食兼用的大宗药材^[1]。近年来,由于无节制采挖、过度放牧及不合理工农业占地等,野生甘草资源逐年锐减,栽培品种收获期过长使得靠大面积人工栽培来满足市场需求存在诸多困

难。植物细胞大规模培养技术是目前公认的最有前景的珍贵植物药物资源的替代生产技术之一,可以很好地解决天然植物资源匮乏问题。但由于植物细胞遗传与生理的不稳定性及细胞间的不一致性等各种原因,使得甘草悬浮细胞中主要目标产物——黄酮类化合物的含量很低,阻碍了通过细胞培养工业化生产药用成分的进程。

转录因子作为转录起始过程中RNA聚合酶所需的辅助因子,可激活特定次生代谢产物系列合成酶的协同表达,有效地促进目标次生代谢产物的合成。因而利用转录因子构建高产的转基因细胞系成为提高产量的有效途径之一。MYB类转录因子是植物中数量最多、功能最多样化的一类转录因子^[2],许多研究表明MYB转录因子家族在植物黄酮类化合物合成代谢调控中发挥更主要的作用^[3]。Moyano等发现MYB340和MYB305在金鱼草花中特异表达,MYB305激活了苯丙烷代谢途径的第1个酶苯丙氨酸酶(PAL),MYB340激活了Pal基因启动子的转录,这2种转录因子还能激活黄酮

收稿日期:2019-02-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960688,31460064);内蒙古自然科学基金[编号:2017MS(LH)0304];内蒙古高等学校“青年科技英才计划”(编号:NJYT-15-A08);内蒙古科技大学科研仪器专项(编号:2015KYYQ03)。

作者简介:王佳琦(1994—),女,山西太原人,硕士研究生,主要从事植物生物技术研究。

通信作者:李雅丽,博士,教授,主要从事药用植物次生代谢调控研究。E-mail:btliyal@126.com。

[5] Meng X J. Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system[J]. *Animal Biosciences*, 2013, 1(1): 43-64.

[6] Finsterbusch T, Steinfeldt T, Doberstein K A, et al. Interaction of the replication proteins and the capsid protein of porcine circovirus type 1 and 2 with host proteins[J]. *Virology*, 2009, 386(1): 122-131.

[7] 李雨轩,包勇. 热休克蛋白40在肺癌中的研究进展[J]. *生命的化学*, 2016, 36(4): 487-490.

[8] Knox C, Luke G A, Blatch G L, et al. Heat shock protein 40 (Hsp40) plays a key role in the virus life cycle[J]. *Virus Research*, 2011, 160(1/2): 15-24.

[9] 吕其壮. 猪圆环病毒2型ORF5蛋白功能分析和ORF4蛋白拮抗细胞凋亡机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2016.

[10] 刘伟. 猪Jiv蛋白表达与猪瘟病毒感染相关性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.

[11] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic

interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391(6669): 806-811.

[12] Gunsalus K C, Piano F. RNAi as a tool to study cell biology: building genome-phenome bridge[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2005, 17(1): 3-8.

[13] Kusaba M. RNA interference in crop plants[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, 15(2): 139-143.

[14] Perrimon N, Ni J Q, Perkins L. *In vivo* RNAi: today and tomorrow[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(8): 36-40.

[15] 张瑞杰,苗向阳. 绵羊抑制素shRNA慢病毒干扰载体的构建与鉴定[J]. *华北农学报*, 2011, 26(3): 21-27.

[16] 郭志鸿,张金文,王蒂,等. 用RNA干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(2): 494-501.

[17] 刘晓艳. HPV相关miRNA参与HPV免疫逃逸的分子机制及基于miRNA骨架的RNA干扰载体的效应研究[D]. 杭州:浙江大学,2013.

代谢途径中其他两个基因的表达,因而将植物次生代谢的早期和晚期步骤连接起来^[3]。原花青素(proanthocyanidin)^[3]、黄酮醇(flavonol)^[4-6]、异黄酮(isoflavonoid)^[7]等类黄酮的合成均受到 MYB 类转录因子的调控。

茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)是植物次生代谢途径中最主要的信号分子,它常常作为第二信使参与植物次生代谢物尤其是黄酮类化合物的合成调控^[8]。为进一步探明 MYB 转录因子在甘草黄酮类化合物合成中的作用,本研究利用甘草悬浮细胞受 MeJA 诱导后的转录组测序数据进行分析,得到 1 条响应 MeJA 胁迫的 MYB 转录因子基因 *GIMYB10*,通过 RT-PCR 的方法克隆得到该基因,再通过生物信息学软件分析该基因的特征,同时利用荧光定量 PCR 比较甘草细胞悬浮体系中添加 MeJA 后各时间段 *GIMYB10* 基因的表达水平,为深入研究 MYB 转录因子基因在甘草黄酮类化合物生物合成途径上的分子调控机制提供依据,对进一步构建转基因高产细胞株具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2017 年 10 月在内蒙古科技大学植物细胞培养实验室进行。供试的甘草品种为乌拉尔甘草,种子购自内蒙古鄂尔多斯市达拉特旗。愈伤组织由幼嫩的甘草无菌苗下胚轴和子叶诱导而来,在附加 0.5 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L NAA 与 0.5 mg/L 6-BA 的固体 MS 培养基上培养和继代。悬浮培养系统:取 6 g 分散性强、生长状态良好的固体细胞置于 250 mL 三角瓶中,120 r/min 振荡培养,悬浮培养基为 100 mL 液体 MS 培养基+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA,光照度 36 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,光照时间 16 h/d,培养温度 25 $^{\circ}\text{C}$ ^[7]。

反转录试剂盒购自北京金全生物技术有限公司,质粒 DNA 小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、pUCm-T 载体均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。 T_4 -DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 均购自宝生物工程(大连)有限公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*)Top 10 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 甘草悬浮细胞总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 将悬浮培养的甘草细胞抽滤后迅速转移至研钵中研磨,同时向研钵不间断地添加液氮,研磨成细细的粉末即可。总 RNA 提取步骤严格按照 TaKaRa Total RNA 提取试剂说明书进行操作。以提取的甘草悬浮细胞总 RNA 为模板,利用 Prime ScriptTM Reverse Transcriptase Kit 合成 cDNA 第 1 链。

1.2.2 引物设计 根据对转录组测序结果中目标基因的 ORF 序列使用 Primer 5.0 设计特异引物:*GIMYB10*-F,5'-ACCTCCTCCACTACTCTTCATTA-3';*GIMYB10*-R,5'-TCATAAAGATCCAAATTTGGCA-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.3 *GIMYB10* 基因的克隆 以 cDNA 作为模板,利用合成引物进行快速体外扩增。产物用生工生物工程(上海)股份有限公司 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行纯化。纯化后的 PCR 产物与 pUCm-T 载体在 T_4 -DNA 连接酶作用下于 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜酶连,之后转化到 Top 10 大肠杆菌中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养

箱过夜培养。长出单菌落后,划线培养,菌落 PCR 验证。*EcoR*I、*Hind* III 双酶切过夜电泳再次验证目的基因与 pUCm-T 克隆载体已导入大肠杆菌 Top 10。菌液送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序分析。

1.2.4 序列分析 使用序列分析软件 DNAMAN 将测序结果进行拼接,找出 *GIMYB10* 开放阅读框(ORF),并翻译获得其编码的氨基酸序列;在 GenBank 中下载其他植物的 MYB 转录因子氨基酸序列与 *GIMYB10* 进行 Blast 同源性对比,得出不同植物 MYB 转录因子氨基酸序列;利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育进化树。把甘草 *GIMYB10* 蛋白进行分析(<http://web.expasy.org/protparam/>),推测蛋白的分子量。利用 ProtScale 工具(<http://web.expasy.org/protscale/>)对甘草 *GIMYB10* 蛋白进行亲水性/疏水性分析。通过 PORTER(<http://distill.ucd.ie/porter/>)进行分析,对该蛋白中各个氨基酸残基对应的二级结构进行预测。将 *GIMYB10* 基因编码的氨基酸序列提交至 SWISS-MODEL 在线分析软件,预测蛋白质的三级结构。

1.2.5 甘草细胞 *GIMYB10* 基因在不同 MeJA 诱导处理时间的表达分析 以甘草悬浮细胞系为研究对象,将生长状态良好的种子细胞接种于新鲜培养基培养 48 h 后,添加 100 mol/mL MeJA 进行诱导,以加入无水乙醇(配制 MeJA 的溶剂)为对照组,分别在添加后 1、3、6、9、12 h 取样,提取总 RNA,并反转录成 cDNA,方法同“1.2.1”节,对 *GIMYB10* 基因进行荧光定量 PCR,以 *Actin* 作为内参基因,参照 2 \times SYBR Prime ScriptTM RT-PCR Kit(TaKaPa)荧光定量试剂盒说明书进行荧光定量试验,采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 甘草悬浮细胞总 RNA 的提取

紫外分光光度计测得总 RNA 的 $D_{280\text{ nm}}/D_{260\text{ nm}}$ 、 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 均在 2.0 左右,纯度较好,所提 RNA 浓度均在 1 500 ng/ μL 左右,可用作下一步试验,琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

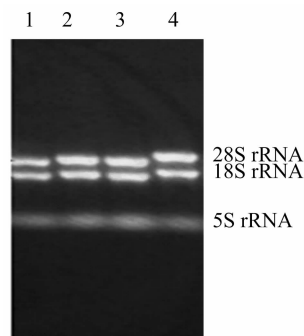


图1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

2.2 甘草 MYB 转录因子 *GIMYB10* 基因的克隆

反转录试剂盒一步法将甘草无菌苗总 RNA 反转录成 cDNA,测其浓度均在 1 800 ng/ μL 左右,利用设计合成的引物对其进行 20 μL 体系快速扩增(图 2)。对 PCR 产物中 1 000 bp 左右处的条带进行回收后与 pUCm-T 载体连接,转化到大肠杆菌 Top 10,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜倒置培养至出现单菌落,划线再培养过夜至长出菌落,依次挑取菌落 1/3 左右按 10 μL 体系进行菌落 PCR 验证,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。由图 3

可见,大肠杆菌 Top 10 菌落中的目的基因已被插入,挑取该菌落摇菌提质粒,用 *EcoR* I、*Hind* III 双酶过夜跑电泳再次验证,送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

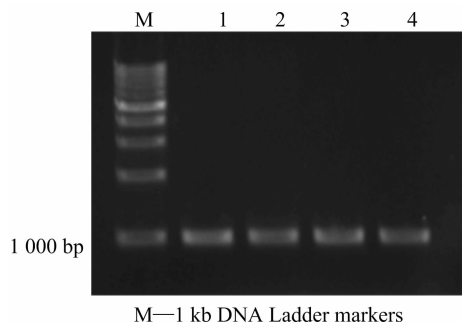


图2 MYB 转录因子 *GIMYB10* 基因的克隆

2.3 甘草 *GIMYB10* 基因的生物信息学分析

克隆到的 *GIMYB10* 转录因子 cDNA 序列包含 1 个 1 172 bp 的 ORF,共编码 340 个氨基酸;用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对 *GIMYB10* 蛋白在线分析,推测

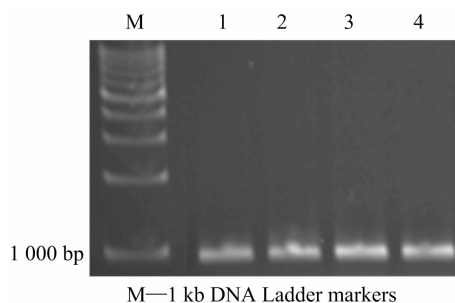


图3 菌落 PCR 筛选阳性克隆

其分子量为 38.718 14 ku,等电点为 8.51。选取甘草 *GIMYB10* 蛋白与其他植物中功能已确定的转录因子蛋白序列,经 MEGA 7.0 软件邻接(neighbour joining,NJ)法构建系统发育树结果见图 4。根据图 4 中所示分枝的长度,计算出乌拉尔甘草与其他物种亲缘关系,其由近及远依次为赤豆、甜橙、大豆、木豆、紫苜蓿、狭叶羽扇豆、蓖麻、鹰嘴豆、四季豆。其中,与豆科植物赤豆亲缘关系较近,相比之下,与豆科亲缘关系较远。

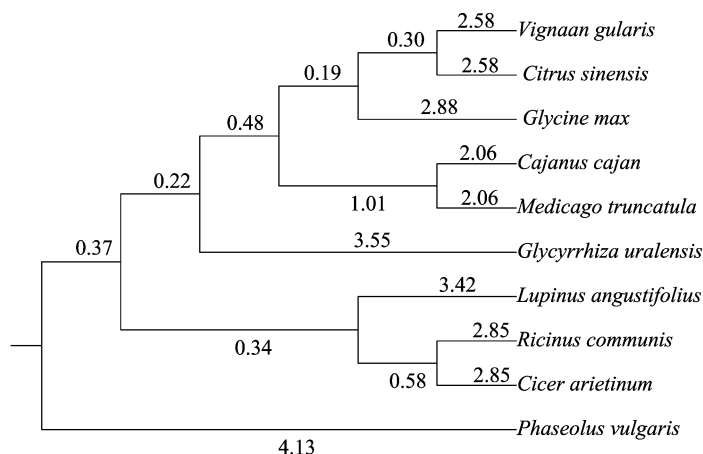


图4 系统发育进化树

利用 ProtScale 工具(<http://web.expasy.org/protscale/>)对 *GIMYB10* 转录因子蛋白进行亲水性/疏水性分析,发现其亲水区域大于疏水区域,所以该蛋白属于亲水蛋白。通过 SOPMA 对 *GIMYB10* 转录因子蛋白的二级结构预测,结果显示,该蛋白中 α -螺旋为 27.73%、 β -折叠为 0、 β -转角为 9.44%、无规卷曲为 40.71%、延伸链为 22.12%, α -螺旋和无规卷曲为主要的结构元件,而 β -转角和延伸链则散布于蛋白中。通过 SWISS-MODEL 对 *GIMYB10* 基因所编码的氨基酸序列在线分析,预测蛋白质的三级结构,从图 5 看出,该蛋白含有大量的 α -螺旋与无规卷曲和 β -转角,与二级结构预测结果相符。

2.4 荧光定量 PCR 表达分析

使用 SYBR Green 化学染料,运用的 qRT-PCR 方法对正常悬浮培养的细胞与添加 MeJA 诱导培养的细胞分别在添加后不同时间点进行取样和 *GIMYB10* 基因的表达分析,数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行分析,即先根据“ $\Delta C_T = C_{T,目的基因} - C_{T,内参基因}$ ”计算,再根据“ $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,试验组} - \Delta C_{T,对照组}$ ”进行计算,最后依

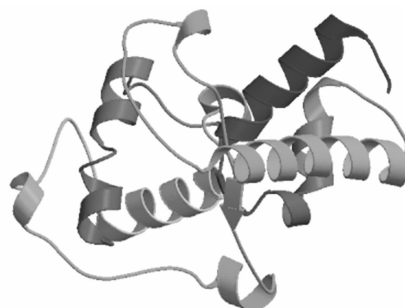


图5 *GIMYB10* 编码蛋白的三级结构

据“相对表达 = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ”计算出相对表达数值。以处理时间为横坐标,相对表达量为纵坐标做图。

由图 6 可以看出,在 1~12 h 期间,*GIMYB10* 基因在添加 MeJA 诱导后的几个时间点相对表达量都大于对照组,并且在 9 h 表达量最高,说明转录因子 *GIMYB10* 基因的表达明显响应信号分子 MeJA 的诱导。

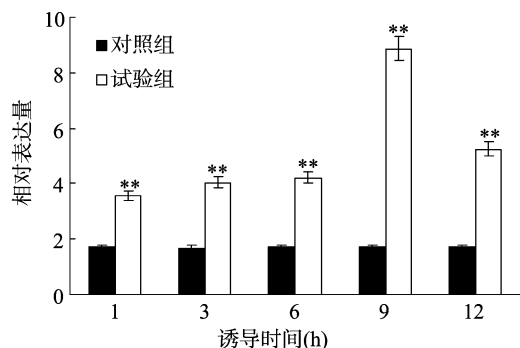


图6 MeJA 诱导后 *GLIMYB10* 基因的表达分析

3 讨论与结论

转录因子是生物体内的一种蛋白因子,它能与结构基因上游特异性 DNA 序列结合,并对基因的转录起调控作用^[9-10]。研究表明,在许多功能基因的启动子中都含有 MYB 结合元件(核心序列为 TAACTG),在逆境胁迫下,MYB 转录因子与该元件的结合能够激活胁迫应答基因的表达。另外,MYB 基因明显受环境因子所诱导,如信号分子脱落酸(ABA)、水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)等^[11-14],Chen 等对 125 个 R2R3-MYB 成员的研究结果表明,约 32% 成员受 JA 诱导,约 4% 下调^[15]。这些初步的结果表明,MYB 转录因子广泛地参与了对调控植物逆境胁迫响应有重要作用的激素应答过程。MeJA 是茉莉素馨花中香精油的有气味化合物,在植物中广泛分布,广泛参与了植物防御信号的转导与放大过程^[12],引起细胞抗逆反应产物的表达,对多种次生代谢产物的合成具有诱导作用,被认为是非常有效的诱导子。MeJA 已在多种药用植物细胞培养中使用,效果显著^[13-15],如外源的 MeJA 对于重要的药用次生代谢产物如紫杉醇、长春碱、东莨若碱、尼古丁、青蒿素等均有显著的诱导合成作用^[16-17]。

本研究将添加 MeJA 诱导后表达差异显著的 MYB 转录因子 *GLIMYB10* 基因克隆出来,该基因具有长度为 1 172 bp 的完整 ORF,编码 340 个氨基酸,该蛋白相对分子量为 38.718 14 ku,理论等电点为 8.51,亲水区域大于疏水区域,属于亲水蛋白。对该基因进行生物信息学分析,序列比对发现其属于典型的 MYB 基因家族。另外以甘草悬浮细胞为研究对象,在种子细胞接种于新鲜培养基 48 h 后加入信号分子 MeJA 诱导,用荧光定量 PCR 技术检测诱导不同时间后 *GLIMYB10* 基因的表达情况,结果表明,添加 MeJA 诱导后明显提高了 *GLIMYB10* 基因的表达,且在诱导后 9 h 表达量最高,MeJA 诱导后不同时间段的差异性表达有利于进一步了解转录因子 *GLIMYB10* 在甘草细胞悬浮培养过程中调控黄酮合成的作用。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010.
- [2] Dubos C, Stracke R, Grotebold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(10): 573-581.

- [3] Moyano E, Maínez - García J F, Martín C. Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in antirrhinum flowers[J]. Plant Cell, 1996, 8(9): 1519-153.
- [4] Nesi N, Claisse J, Debeaujon I, et al. The *Arabidopsis* TT2 gene encodes an R2R3 MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed[J]. Plant Cell, 2001, 13(9): 2099-2114.
- [5] Mehrtens F, Kranz H, Bednarek P, et al. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. Plant Physiol, 2005, 138(2): 1083-1096.
- [6] Stracke R, Ishihara H, Hupé G, et al. Differential regulation of closely related R2R3 - MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling[J]. Plant J, 2007, 50(4): 660-677.
- [7] Czemmel S, Stracke R, Weishaar B, et al. The grapevine R2R3 - MYB transcription factor VvMYB1F regulates flavonol synthesis in developing grape berries[J]. Plant Physiol, 2009, 151(3): 1513-1530.
- [8] Shelton D, Stranne M, Mikkelsen L, et al. Transcription factors of lotus; regulation of isoflavonoid biosynthesis requires coordinated changes in transcription factor activity[J]. Plant Physiol, 2012, 159(2): 531-547.
- [9] 齐中强, 杜艳, 沈乐融, 等. 转录因子 MoOa22 对稻瘟病菌营养生长、细胞壁完整性和胁迫应答的调控[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1242-1248.
- [10] 李元元, 高志强, 曹清河. 甘薯 SPF1 转录因子的生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 760-767.
- [11] 杨英, 郑辉, 何峰, 等. 不同浓度茉莉酸甲酯对悬浮培养的果胶甘草细胞合成甘草总黄酮的影响[J]. 云南植物研究, 2008, 30(5): 586-592.
- [12] 刘新, 张蜀秋. 茉莉酸类在伤信号转导中的作用机制[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 76-81.
- [13] Kang S M, Jung H Y, Kang Y M, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*[J]. Plant Sci, 2004, 166(3): 745-751.
- [14] Wang Y D, Yuan Y J, Wu J C. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension culture of *Taxus chinensis* var. *mairii*[J]. Biochem Eng J, 2004, 19(3): 249-256.
- [15] Chen Y H, Yang X Y, Kun H, et al. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J]. Plant Molecules Biology, 2006, 60(1): 107-24.
- [16] 徐亮胜, 薛晓峰, 付春祥, 等. 茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响[J]. 生物工程学报, 2005, 21(3): 402-406.
- [17] 康亚兰, 裴瑾, 刘薇, 等. 药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因的研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(9): 1336-1341.