

丹参中转录因子 SmMYB87 基因的克隆、亚细胞定位和表达分析

张顺仓¹, 冯思念¹, 顾 雯¹, 冯立国³, 王幼平¹, 梁宗锁^{2*}

1. 扬州大学生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

2. 浙江理工大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018

3. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009

摘要: 目的 克隆丹参 *Salvia miltiorrhiza* 中第 14 亚群 R2R3 MYB 转录因子基因 SmMYB87 的全长序列, 并对其进行生物信息学和表达分析。方法 以丹参总 RNA 为模板, 利用同源克隆和 cDNA 快速扩增 (RACE) 技术获得 SmMYB87 cDNA 全长序列。运用生物信息学软件对该基因及其编码蛋白进行结构和理化性质分析, 利用 qRT-PCR 测定 SmMYB87 在各器官中的表达并构建融合表达载体 pTF-486-SmMYB87 分析 SmMYB87 蛋白的亚细胞定位。结果 SmMYB87 基因含有 2 个内含子和 1 个 732 bp 的开放阅读框 (ORF), 编码 243 个氨基酸。该基因在根、茎、叶和花中均有表达, 且 4 个器官中的表达量没有显著差异。SmMYB87 蛋白在细胞核和细胞膜上均有分布。结论 SmMYB87 的序列结构和表达分析为进一步研究其在丹参中的生物学作用奠定了理论基础。

关键词: 丹参; R2R3 MYB; SmMYB87 基因; 基因克隆; 亚细胞定位; 组织特异性表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)17-3597-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.023

Cloning, subcellular localization and expression analysis of a transcription factor gene SmMYB87 in *Salvia miltiorrhiza*

ZHANG Shun-cang¹, FENG Si-nian¹, GU Wen¹, FENG Li-guo³, WANG You-ping¹, LIANG Zong-suo²

1. College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

2. College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China

3. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: Objective To clone the R2R3 MYB transcription factor gene SmMYB87 in subgroup 14 from *Salvia miltiorrhiza*, and analyze the bioinformatics and expression of this gene. **Methods** Total RNA extracted from *S. miltiorrhiza* was used as cDNA synthesis template and the full length cDNA sequence was obtained through homology-based cloning and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology. The structure and physicochemical properties of SmMYB87 gene and its coded protein were analyzed with bioinformatics softwares. The expression of SmMYB87 in different organs was determined with qRT-PCR, and a GFP fusion expression vector was constructed to investigate the subcellular localization of SmMYB87 protein. **Results** SmMYB87 gene contained two introns and an open reading frame (ORF) of 732 bp, encoding 243 amino acid polypeptides. It expressed in roots, stems, leaves and flowers with similar expression levels and the SmMYB87 protein located in nucleus and cytomembrane. **Conclusion** The analysis of sequence structure and expression pattern of SmMYB87 will be helpful to study the regulating roles of this gene in *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; R2R3 MYB; SmMYB87 gene; gene cloning; subcellular localization; tissue-specific expression

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根和根茎, 始载于《神农本草经》, 归心、肝经, 目前已有近 2 000 年的药用历史。其有效成分主要为水溶性的酚酸类和脂溶性的丹参酮类, 水溶性成分包括丹参素、咖啡酸、迷迭香酸和

丹酚酸 B 等, 脂溶性成分包括丹参酮 I、丹参酮 II_A、隐丹参酮和二氢丹参酮 I 等。丹参被用于多种心脑血管疾病的治疗, 对脑血栓、冠心病、动脉粥样硬化、高血压、高血脂等均有较好的疗效^[1-4]。此外, 该药材在多种神经性疾病的治疗方面也具有广阔的前

收稿日期: 2016-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31700257, 81373908); 江苏省高校自然科学研究面上项目 (16KJB180032); 中国博士后科学基金面上项目 (2015M571826)

作者简介: 张顺仓 (1984—), 男, 讲师, 主要从事药用植物次生代谢研究。E-mail: zhangsc@yzu.edu.cn

*通信作者 梁宗锁 (1965—), 男, 教授, 主要从事中药资源相关研究。E-mail: liangzs@ms.iswc.ac.cn

景,对包括阿尔茨海默病、帕金森病及亨廷顿舞蹈症在内的多种疾病具有防治效果^[5-6]。

有效成分是丹参药用价值的基础,随着分子生物学技术的不断发展,丹参有效成分的生物合成调控研究近年来取得了实质性的突破。2 类成分的生源途径被阐明,在生源途径上起调节作用各类转录因子如 MYC^[7]、WRKY^[8]及 bHLH^[9]等也逐渐被挖掘。R2R3 MYB 转录因子是植物中数量较多的转录因子之一,在拟南芥中分为 25 个亚群,第 4、6 和 14 亚群的成员均与植物苯丙烷代谢的调控相关。丹参中第 4、6 亚群的 R2R3 MYB 转录因子已被证实参与酚酸类成分生源合成的调控^[10-11],但第 14 亚群 R2R3 MYB 基因的功能目前尚不清楚。本研究克隆得到了丹参中 1 条第 14 亚群的 R2R3 MYB 基因 SmMYB87,并对其进行了生物信息学和表达分析,为进一步研究其生物学功能提供理论基础。

1 材料、试剂及仪器

丹参样品采自西北农林科技大学药用植物园,经西北农林科技大学生命科学院张跃进教授鉴定为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge。将 2 年生植株的根、茎、叶和花分别用流水冲洗干净表面的杂物,蒸馏水冲洗 3 次,吸水纸吸干表面水分后用于 Total RNA 的提取。

RNA 提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒和大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司;反转录试剂盒、Taq 酶、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒和克隆载体 pMD19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司;Pfu DNA Polymerase 购自 Fermentas 公司;SMARTer[™]RACE cDNA Amplification Kit 和 Advantage[®] 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司;DNA 提取试剂盒和无内毒素质粒大提试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;T4 连接酶购自美国 NEB (New England Biolabs) 公司;绿色荧光蛋白表达载体 pTF-486 由西北农林科技大学生命科学院郁飞教授惠赠。

3-18K 高速冷冻离心机,德国 Sigma 公司;YXQ-LS-50SII 型高压灭菌锅,上海博迅实业有限公司;DYY-10C 型电泳仪,北京六一仪器厂;9700 型 PCR 仪,美国 ABI 公司;Gel Doc XR⁺型凝胶成像系统、CFX96 型荧光定量 PCR 仪,美国伯乐公司;Premium U410 型超低温(-80 °C)冰箱,德国 Eppendorf 公司;PDS 1000 型基因枪,美国伯乐公

司;A1 型激光共聚焦显微镜,日本尼康公司。

2 方法

2.1 RNA 提取与 cDNA 合成

取丹参新鲜叶片 50~100 mg 于液氮中迅速研磨成粉末,按照试剂盒说明书进行总 RNA 的提取,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的纯度和完整性,用核酸定量仪检测 RNA 的浓度,反转录和切胶回收后获得丹参 cDNA。

2.2 丹参 SmMYB87 cDNA 全长序列的克隆

对 NCBI 上已经公布的第 14 亚群 R2R3 MYB 转录因子的核酸和氨基酸序列进行分析,在 MYB 结构域的保守区域设计简并引物(表 1),以丹参 cDNA 为模板进行 PCR 获得同源片段。以同源片段为模板,按照试剂盒说明书进行 5'-和 3'-RACE, RACE 片段连入克隆载体 pMD19-T,转化大肠杆菌 DH5 α 进行测序。将 5'-和 3'-RACE 片段进行拼接后获得 SmMYB87 的 cDNA 全长序列,在该序列的两端设计基因特异性引物进行 PCR 验证。

2.3 SmMYB87 基因 DNA 序列的克隆

提取丹参基因组 DNA 作为模板,利用特异性引物(MYB87f 和 MYB87r,表 1)进行 PCR 扩增,PCR 条件为 95 °C、5 min;95 °C、50 s,48 °C、30 s,72 °C、2 min,40 个循环;72 °C、10 min。PCR 产物连入克隆载体 pMD19-T,转化大肠杆菌 DH5 α 后送上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

2.4 SmMYB87 基因的生物信息学分析

利用 DNASTar 软件查找目的基因的开放阅读框(ORF),分析其翻译出来的蛋白质的等电点、氨基酸分布等理化性质;利用在线软件 SMART 对 MYB 结构域进行分析;利用在线软件 Phylogeny.fr 对获得的氨基酸序列进行进化树分析;利用 SOPMA 软件对目的氨基酸序列的二级结构进行预测;利用 SWISS-MODEL 对目的蛋白的三级结构进行预测。

2.5 SmMYB87 亚细胞定位表达载体的构建及转化

在 SmMYB87 基因 ORF 序列两端分别添加 *Sal*I 和 *Bam*HI 酶切位点,用 T4 连接酶连入 pTF-486 质粒 GFP 基因的上游构建融合表达载体 pTF-486-SmMYB87。融合表达载体用金粉包被后利用基因枪轰击洋葱表皮细胞,细胞于 25 °C 暗培养 24 h 后在激光共聚焦显微镜下观察融合蛋白的表达。将 pTF-486 空质粒包被后轰击洋葱表皮细胞作为对照。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

用途	名称	序列 (5'→3')
同源克隆	MYBf	AGC(A/T)CC(A/G)TG(C/T)GA(C/T)AA(A/G)GC(A/C)AACG
	MYBr	TATC(A/G)TTGTC(A/G/T)GT(C/T)C(G/T)TCC(A/C)GG(A/C)A
5'-RACE	GSP1	CTCCATGCTTGAGGTTGGGGCGGAGATA
3'-RACE	GSP2	TCAAGTCCTACATCGAAAACCGGCACC
PCR 验证	MYB87f	ATGGGGAGAGCGCCTTGCT
	MYB87r	CTACTCTGAGTATCCTAACAACCCCC
亚细胞定位	GFP87f	ACGCGTCGACATGGGGAGAGCGCCTTGCT
	GFP87r	CGCGGATCCACCACCACCACCACCCTCTGAGTATCCTAACAACCCCCAA
qRT-PCR	Sm87f	GCCGGAAGAAGACAGATAACGAC
	Sm87r	TGGCTGCATCATCAAGTATAGGC
	Actinf	GGTGCCCTGAGGTCCTGTT
	Actinr	AGGAACCAACGATCCAGACA

2.6 qRT-PCR 定量检测

从 2 年生丹参的根、茎、叶和花中提取 Total RNA, 反转录后获得 cDNA。设计特异性引物(表 1), 利用 Takara 公司的 SYBR[®] Premix EX Taq[™] II (Perfect Real Time) 试剂盒进行 qRT-PCR, 测定目的基因在各器官中的表达。PCR 反应条件如下: 95 ℃、30 s; 95 ℃、5 s, 60 ℃、30 s, 40 个循环。熔解曲线条件设置为 65~95 ℃ 5 s, 每升高 0.5 ℃时收集 1 次荧光。PCR 结果采用比较 C_t法进行计算。

3 结果与分析

3.1 丹参 SmMYB87 基因 cDNA 全长序列的克隆

利用简并引物进行 PCR, PCR 产物经电泳获得 1 条 300 bp 左右的亮带(图 1-A), 测序后得到了 6 条 302 bp 的高度同源序列, 以其中 1 条为模板设计基因特异性引物进行 5'-RACE 和

3'-RACE, 分别得到 1 条 304 bp 和 904 bp 的序列(图 1-B、C)。2 条序列有一段 134 bp 的重叠区域, 拼接后得到 1 条 979 bp 的 cDNA 序列。以丹参 cDNA 为模板, 在拼接序列两端分别设计特异性引物进行 PCR 验证。验证产物测序后与拼接序列进行 DNAMAN 比对, 发现二者一致性为 100%。新序列与多种植物中第 14 亚群 R2R3 MYB 转录因子基因高度同源, 可能为丹参中同亚群的 MYB 成员, 将该基因命名为 SmMYB87, 并提交至 NCBI (GenBank 登录号 KC213794)。

3.2 丹参 SmMYB87 基因 DNA 序列内含子分析

提取丹参基因组 DNA, 在 SmMYB87 cDNA 序列两端设计特异性引物进行 PCR 扩增获得 SmMYB87 的 DNA 序列。利用 NCBI BLAST 中子模块 Align two (or more) sequences using BLAST (bl2seq) 对 DNA 序列和相应的 cDNA 序列进行比

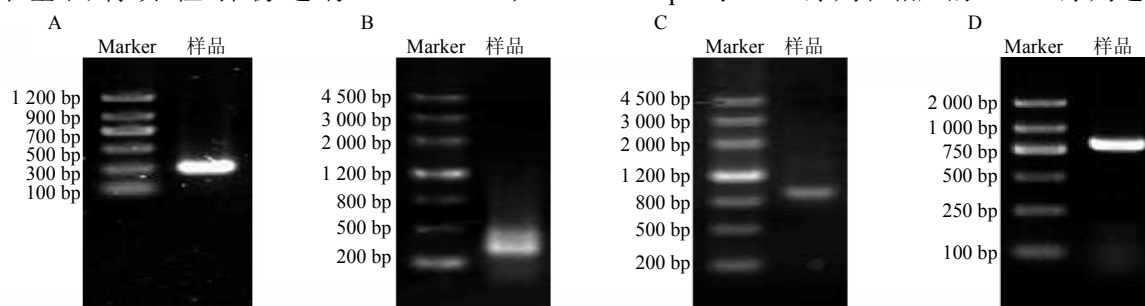


图 1 简并 PCR (A)、5'-RACE (B)、3'-RACE (C) 和全长 cDNA 扩增产物 (D) 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of products of degenerated PCR (A), 5'-RACE (B), 3'-RACE (C), and full-length cDNA cloning (D)

对, 查找 DNA 序列中的内含子。结果表明 SmMYB87 含有 2 个长度分别为 125 和 106 bp 的内含子, 分别处于起始密码子后 136 和 391 bp 处, 2 个内含子分别阻断了编码 R2 repeat 和 R3 repeat 的核苷酸序列 (图 2)。

3.3 SmMYB87 氨基酸序列的理化性质分析

用 DNASTar 软件和 SMART 在线软件对 cDNA

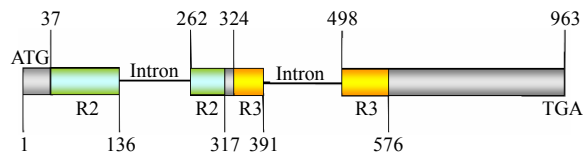


图 2 SmMYB87 的基因结构

Fig. 2 Gene structure of SmMYB87

序列和推测的氨基酸序列进行分析。结果表明 SmMYB87 的 cDNA 序列含有 1 个 732 bp 的 ORF, 编码 243 个氨基酸。氨基酸中包含强碱性氨基酸 (赖氨酸、精氨酸) 31 个, 强酸性氨基酸 (天冬氨酸、谷氨酸) 24 个, 疏水性氨基酸 (丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸) 72 个, 极性氨基酸 (天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸) 71 个。预测其相对分子质量为 27 690, 等电点为 8.73。编码的蛋白含有 2 个分别由 52 和 49 个氨基酸残基组成的 MYB 重复序列, 且每个 MYB 重复序列中包含 3 个保守的氨基酸残基 (图 3)。

```

1 ATGGGGAGCCAAAAGTGAATTAGTAGAAGAAGATATACTGTATATAAGATGGGGAGAGC
1 M G R A
61 GCCTTGCTGTGACAAAGCCAACGTCAAGAGAGGGCCATGGTCGCCTGAAGAAGATGCCAA
5 P C C D K A N V K R G P W S P E E D A K
121 GCTCAAGTCCTACATCGAAAACCGGCACCGGTGGCAACTGGATTGCCCTACCTCCTAA
25 L K S Y I E N H G T G G N W I A L P P K
181 AATAGGCCTCAAGAGATGTGGGAAGAGTTGCCGTCTGAGATGGCTCAACTATCTCCGCC
45 I G L K R C G K S C R L R W L N Y L R P
241 CAACCTCAAGCATGGAGGCTTCACCGAGGATGAAGATAACCTTATCTGCAGCCTCTACAT
65 N L K H G G F T E D E D N L I C S L Y I
301 CAGCATCGGCAGCAGATGGTCTATCATCGCCGCCAATTGCCGGAAGAACAGATAACGA
85 S I G S R W S I I A A Q L P G R T D N D
361 CATAAAAACTACTGGAACACGAGGCTGAAGAAGAAGCTCCTCGTGAGGCAGCGCGGCG
105 I K N Y W N T R L K K K L L V R Q R R R
421 CCAATCGCAGCCCAAGAAACAAGTTCAAAATTATTCAATCATTAAATGGATACAACCAGCT
125 Q S Q P K K Q V Q N Y S I I N G Y N Q L
481 GCCTATACTTGATGATGCAGCCACGATGCAGCTGCCTGCTCTCGGGCCGCTTTTCTTG
145 P I L D D A A T M Q L P A L G P P F S C
541 CAACACTACTCCCTTTCATCACTATGCTTGTGTGAAGATCAACATCTCTACGAAATCC
165 N T T P F H H Y A C V E D Q H L Y A N P
601 ATTGCTGATGAATCCTTCAGCGTCCACGAGCTTTGTGGATGCCGGTTTTCGAGCATTTGA
185 L L M N P S A S T S F V D A G F R A F D
661 TCGTATGCCGCAAGAGATGTTGGATGGATTTGACATGAGTTGTGTTGTTGATCAGGCTCC
205 R M P Q E M L D G F D M S C V V D Q A P
721 TGAGATCTCCAGTTATGAAGTTTATCGGAGGAATTGGGGGTTGTTAGGATACTCAGAGTA
225 E I S S Y E V Y R R N W G L L G Y S E *
781 GACATTACCACTTCTACATCAATGGTGCATGTGTACATTTTCTTGGGGTTTCACTGCA
841 GTGATCTGTACTTGTTTTATTTATTTATCTTGTGTTTGTGTTTCTGAAGAGGGTTGTTT
901 GTTCTGTACTATCACTTTCATCATTTAAGATGCCTCTCTCTCTCTCCCAAAAAAAAAA
961 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

深灰色阴影序列-R2 重复序列; 浅灰色阴影序列-R3 重复序列; 边框氨基酸-保守氨基酸 K-赖氨酸 R-精氨酸 D-天冬氨酸 E-谷氨酸 A-丙氨酸 I-异亮氨酸 L-亮氨酸 F-苯丙氨酸 W-色氨酸 V-缬氨酸 N-天冬酰胺 C-半胱氨酸 Q-谷氨酰胺 S-丝氨酸 T-苏氨酸 Y-酪氨酸
Sequence highlighted in dark gray-R2 repeat; Sequence highlighted in light gray-R3 repeat; Amino acid with border-conservative amino acid K-Lys R-Arg D-Asp E-Glu A-Ala I-Ile L-Leu F-Phe W-Tep V-Val N-Asn C-Cys Q-Gln S-Ser T-Thr Y-Tyr

图 3 SmMYB87 的 cDNA 序列和预测的氨基酸序列

Fig. 3 cDNA and predicted amino acid sequence of SmMYB87

3.4 SmMYB87 氨基酸序列的多序列比对和进化树分析

SmMYB87 氨基酸序列与蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. (Mtnyb)、西班牙栓皮栎 *Quercus suber* L. (QsMYB1.2)、花生 *Arachis ipaensis* Krapov. & W. C. Greg. (AiMYB36)、苹果 *Malus domestica* Mill. (SiMYB6-like) 及大豆 *Glycine max* (L.) Merr. (GmMYB71) R2R3 MYB 氨基酸序列的多序列比对结果表明, 6 个氨基酸序列 N 端的 MYB 保守结构域有很高的同源性, 且 R2 Repeat 和 R3 Repeat 的位置一致 (图 4)。对 SmMYB87 氨基酸序列进行 blast 比对, 发现其与西班牙栓皮栎、巨桉 *Eucalyptus*

grandis W. Mill. ex Maiden 及醉蝶花 *Tarenaya hassleriana* (Chodat) Iltis 等具有较高的一致性 (表 2)。利用在线软件 Phylogeny.fr 对包括丹参 SmMYB87 在内的 18 种植物 MYB 氨基酸序列构建系统进化树, 进行聚类分析。结果显示 SmMYB87 与西班牙栓皮栎、醉蝶花、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、亚麻荠 *Camelina sativa* (L.) Crantz 及巨桉中 MYB 氨基酸序列亲缘关系较近, 聚为一类; 与二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv.、粟 *Setaria italica* (L.) Beauv. 及大叶藻 *Zostera marina* L. 等单子叶植物中 MYB 氨基酸序列的亲缘关系较远 (图 5)。

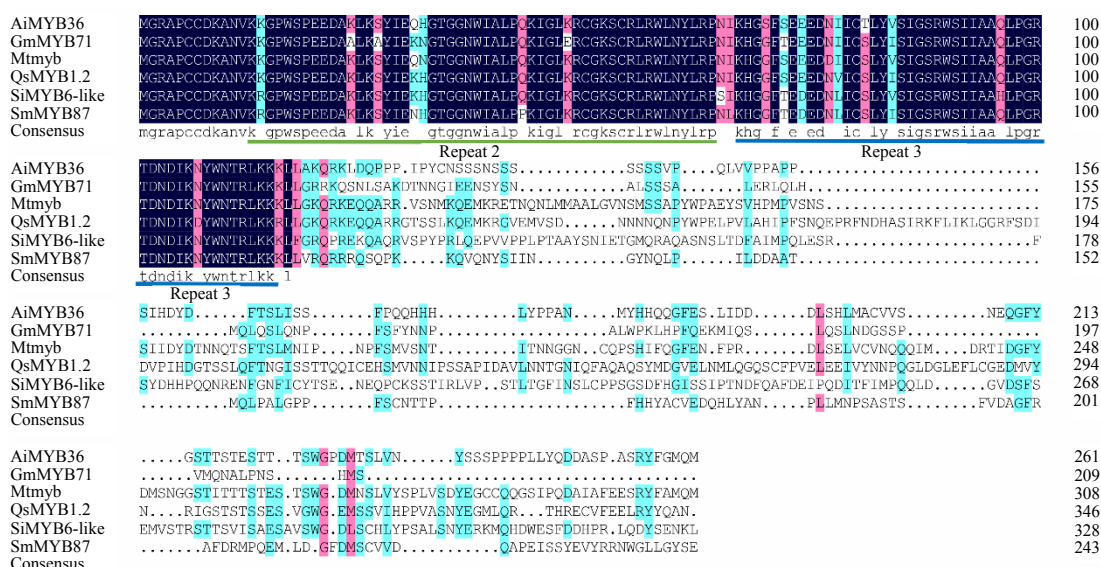


图 4 SmMYB87 与部分植物 R2R3 MYB 氨基酸序列的多重比较

Fig. 4 Amino acid alignment of SmMYB87 with R2R3 MYB amino acid sequences from other plant species

表 2 SmMYB87 与其他植物中 R2R3 MYB 蛋白氨基酸序列的同源比对

Table 2 Homology comparison on SmMYB87 and R2R3 MYB amino acid sequences from other plant species

物种	登录号	匹配分值	与 SmMYB87 匹配一致性/%
二穗短柄草 <i>Brachypodium distachyon</i>	XP_003573606.1	229	74
粟 <i>Setaria italica</i>	XP_004973097.1	234	80
大叶藻 <i>Zostera marina</i>	KMZ69301.1	242	81
红豆 <i>Vigna angularis</i>	XP_017421381.1	249	90
胡桃 <i>Juglans regia</i>	XP_018833816.1	248	86
胡杨 <i>Populus euphratica</i>	XP_011017060.1	250	69
蔓花生 <i>Arachis duranensis</i>	XP_015972391.1	249	83
蒺藜状苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	XP_013465937.1	251	84
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	XP_010664473.1	249	83
梅 <i>Prunus mume</i>	XP_008220419.1	250	88
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_190538.1	245	88
亚麻荠 <i>Camelina sativa</i>	XP_010426492.1	245	79
巨桉 <i>Eucalyptus grandis</i>	XP_010061604.1	247	92
苹果 <i>Malus domestica</i>	XP_008393677.1	253	89
芝麻 <i>Sesamum indicum</i>	XP_011078514.1	250	90
西班牙栓皮栎 <i>Quercus suber</i>	AFI80887.1	248	90
醉蝶花 <i>Tarenaya hassleriana</i>	XP_010550324.1	248	90

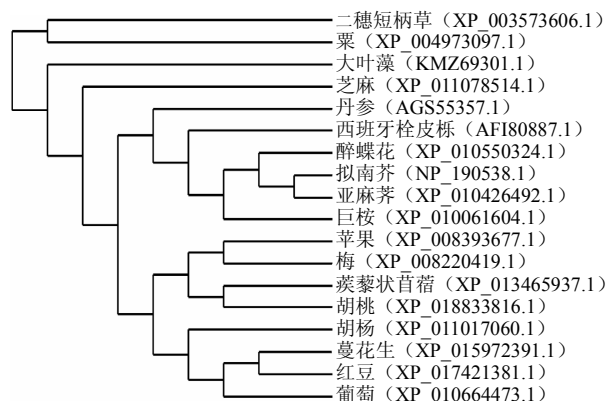


图 5 SmMYB87 系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of SmMYB87

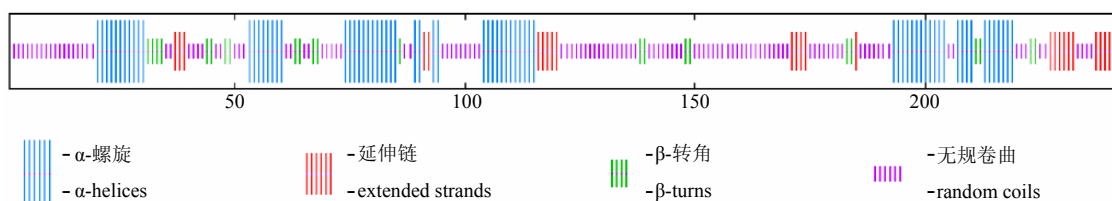


图 6 SmMYB87 的二级结构预测

Fig. 6 Predicted secondary structure of SmMYB87

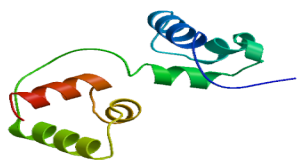


图 7 SmMYB87 的三维空间结构预测

Fig. 7 Predicted 3-D structure model of SmMYB87

3.6 SmMYB87 蛋白的亚细胞定位

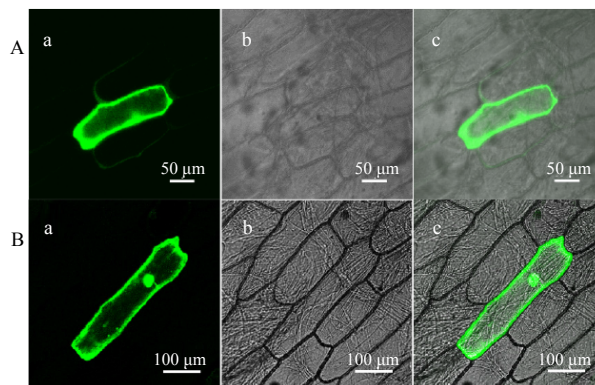
融合表达载体 pTF-486-SmMYB87 和空载体 pTF-486 经金粉包被后, 分别利用基因枪转化进入洋葱表皮细胞, 于激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光蛋白 (GFP) 的表达。结果如图 8 所示, 在转化 pTF-486 空载体的洋葱表皮细胞中, GFP 散布于整个细胞中 (图 8-A)。在转化 pTF-486-SmMYB87 的洋葱表皮细胞中, 细胞核和细胞膜部位均观察到了绿色荧光, 说明 SmMYB87 在细胞核和细胞膜上均有分布 (图 8-B)。

3.7 丹参 SmMYB87 基因的组织特异性表达

分别从 2 年生丹参的根、茎、叶和花中提取 Total RNA, 反转录后以 cDNA 为模板, 利用 qRT-PCR 分析 SmMYB87 在各器官中的表达。结果表明

3.5 SmMYB87 蛋白的二级结构和三级结构预测

利用在线软件 SOPMA 对 SmMYB87 蛋白的二级结构进行预测, 结果显示 SmMYB87 由 28.81% 的 α -螺旋、10.70% 的延伸链、9.88% 的 β -转角和 50.62% 的无规卷曲构成。 α -螺旋散布于整个氨基酸序列, 但在 N 端的 MYB 结构域和 C 端的功能结构域比较集中, 与预期结果一致 (图 6)。利用在线软件 SWISS-MODEL 对目的蛋白 MYB 结构域的三维空间结构进行预测, 发现 R2 和 R3 repeat 均包含 3 个 α -螺旋构象单元, 且 α -螺旋之间通过“螺旋-转角-螺旋”的形式进行连接, 与预期的结果一致 (图 7) [12]。



A-转化 pTF-486 空载体的洋葱表皮细胞 B-转化融合表达载体的洋葱表皮细胞 a-聚焦显微图像 b-透射光下的图像 c-a 和 b 的整合图

A-confocal images of onion epidermis cells transformed with pTF-486 vector B-confocal images of onion epidermis cells transformed with fusion expression vector pTF-486-SmMYB87 a-focusing on the microscopic b-same cells in image a with transmitted light c-merged image of images a and b

图 8 SmMYB87 蛋白的亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of SmMYB87

SmMYB87 在 4 个器官中均有表达, 且 4 个器官中的表达量之间均未达到 2 倍的差异水平, 推测该基因在 4 个器官中发挥相似的作用 (图 9)。

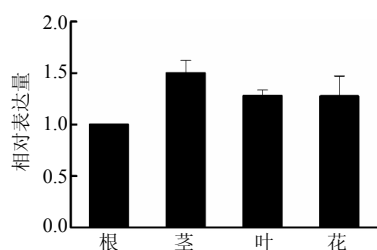


图9 SmMYB87 基因在丹参各器官中的表达 (n = 3)

Fig. 9 Relative expression levels of SmMYB87 in different organs of *S. miltiorrhiza* (n = 3)

4 讨论

R2R3 MYB 转录因子是指在氨基酸序列 N 端保守结构域含有 2 个 MYB 重复序列的调控蛋白。重复序列由约 52 个氨基酸残基组成, 形成 3 个 α -螺旋构象, 第 2 个和第 3 个 α -螺旋形成“螺旋-转角-螺旋 (HTH)”结构^[12]。每个重复序列包括 3 个规则间隔的色氨酸残基, 这 3 个色氨酸残基形成疏水核心, 对于维持 HTH 结构的稳定性具有重要意义。每个重复序列的第 3 个 α -螺旋被认为是“识别性螺旋结构”, 负责与 DNA 序列的识别, 直接插入 DNA 的大沟中调控基因的转录^[13]。SmMYB87 含有 2 个 MYB 重复序列, 分别由 52 个和 49 个氨基酸残基组成, 每个重复序列含有 3 个保守的疏水性氨基酸和 3 个 α -螺旋结构, 符合 R2R3 MYB 转录因子的基本特征。生物信息学分析结果显示, SmMYB87 为第 14 亚群的 R2R3 MYB 成员, 该亚群成员在植物中的调控作用目前知道的并不多。Yu 等^[14]研究表明拟南芥中第 14 亚群 R2R3 MYB 转录因子基因 AtMYB37 参与 ABA 信号转导从而提高拟南芥的抗旱性。杨文杰^[15]发现大豆中第 14 亚群 R2R3 MYB 基因 GmMYBJ6 显著提高烟草中总黄酮的量并增强了转基因烟草对 UV-B、高盐及干旱等非生物胁迫的耐受性。丹参中多种有效成分的合成积累受非生物或生物胁迫的诱导, 如干旱胁迫显著提高丹参根中丹酚酸 B 的量^[16], UV-B 辐射可以促进丹参叶中酚酸类成分的积累^[17], 密旋链霉菌 Act12 可以增加丹参毛状根中丹参酮类成分的量^[18]。SmMYB87 是否通过介导丹参对生物或非生物胁迫的响应来调控其有效成分的积累, 值得深入研究。

植物大多数基因的表达具有时空特异性, 其表达模式与该基因生物学功能密切相关, 如无籽葡萄中与胚珠败育相关的基因 Vv β VP6 虽在根、花、芽和胚珠中均有表达, 但在胚珠中的表达量远远高于

其他 3 个组织^[19]。草莓中花色甙色素合成的关键酶基因 FaPAL6 只在红色的果实中表达, 且表达量随着果实成熟度的增加逐渐增高^[20]。SmMYB87 在根、茎、叶和花中均有表达, 且表达量没有显著差异, 推测该基因在 4 个器官中可能发挥相似的生物学功能。转录因子是一类调控蛋白, 一般在细胞核中调节靶基因的转录, 但也有一些转录因子同时定位于细胞核和其他亚细胞区域, 参与多个生理过程, 如水稻中的 ASR 蛋白既可作为伴侣分子定位于细胞质, 同时还定位细胞核中作为转录因子调控水稻对铝胁迫的应答反应^[21]。SmMYB87 蛋白在细胞核和细胞膜上均有分布, 暗示其可能具有多重的生理功能。综上所述, 本研究初步揭示了 SmMYB87 基因的序列结构和表达特征, 为深入研究该基因在丹参中具体的调控作用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 赵向驰, 韩艳红. 丹参川芎嗪注射液治疗脑血栓临床观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(53): 115-118.
- [2] Liu B Y, Du Y H, Cong L X, et al. Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) compounds improve the biochemical indices of the patients with coronary heart disease [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2016, 26: 9781715.
- [3] Su C Y, Ming Q L, Rahman K, et al. *Salvia miltiorrhiza*: Traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 163-182.
- [4] 王冰瑶, 吴晓燕, 樊官伟. 丹参素保护心血管系统的药理作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2571-2575.
- [5] Zhang X Z, Qian S S, Zhang Y J, et al. *Salvia miltiorrhiza*: A source for anti-Alzheimer's disease drugs [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(1): 18-24.
- [6] Bonaccini L, Karioti A, Bergonzi M C, et al. Effects of *Salvia miltiorrhiza* on CNS neuronal injury and degeneration: A plausible complementary role of tanshinones and depsides [J]. *Planta Med*, 2015, 81(12/13): 1003-1016.
- [7] Zhao S J, Zhang J J, Tan R H, et al. Enhancing diterpenoid concentration in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots through pathway engineering with maize C1 transcription factor [J]. *J Exp Bot*, 2015, 66(22): 7211-7226.
- [8] Li C L, Li D Q, Shao F J, et al. Molecular cloning and expression analysis of WRKY transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 200.
- [9] Zhang X, Luo H M, Xu Z C, et al. Genome-wide

- characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11244.
- [10] Hao G P, Jiang X Y, Feng L, *et al.* Cloning, molecular characterization and functional analysis of a putative R2R3-MYB transcription factor of the phenolic acid biosynthetic pathway in *S. miltiorrhiza* Bge. f. *alba* [J]. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2016, 124(1): 151-168.
- [11] Zhang S C, Ma P D, Yang D F, *et al.* Cloning and characterization of a putative R2R3 MYB transcriptional repressor of the rosmarinic acid biosynthetic pathway from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73259.
- [12] Ogata K, Kanei-Ishii C, Sasaki M, *et al.* The cavity in the hydrophobic core of Myb DNA-binding domain is reserved for DNA recognition and trans-activation [J]. *Nat Struct Biol*, 1996, 3(2): 178-187.
- [13] Jia L, Clegg M T, Jiang T. Evolutionary dynamics of the DNA-binding domains in putative R2R3-MYB genes identified from rice subspecies *indica* and *japonica* genomes [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(2): 575-585.
- [14] Yu Y T, Wu Z, Lu K, *et al.* Overexpression of the MYB37 transcription factor enhances abscisic acid sensitivity, and improves both drought tolerance and seed productivity in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2016, 90(3): 267-279.
- [15] 杨文杰. 大豆MYB转录因子基因的克隆及其表达研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [16] Liu H Y, Wang X D, Wang D H, *et al.* Effect of drought stress on growth and accumulation of active constituents in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Ind Crop Prod*, 2011, 33(1): 84-88.
- [17] Liu J, Shu Z, Liang Z, *et al.* UV-B radiation effects on phenolic changes and antioxidant activity in *Salvia miltiorrhiza* Bunge leaf [J]. *J Food Agric Environ*, 2013, 11(3/4): 2788-2791.
- [18] Yan Y, Zhang S C, Yang D F, *et al.* Effects of *Streptomyces pactum* Act12 on *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone synthesis and its mechanisms [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(4): 883-893.
- [19] Tang Y J, Wang R P, Gong P J, *et al.* Gene cloning, expression and enzyme activity of *Vitis vinifera* vacuolar processing enzymes (*VvVPEs*) [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160945.
- [20] Pombo M A, Martinez G A, Civello P M. Cloning of *FaPAL6* gene from strawberry fruit and characterization of its expression and enzymatic activity in two cultivars with different anthocyanin accumulation [J]. *Plant Sci*, 2011, 181(2): 111-118.
- [21] Arenhart R A, Schunemann M, Neto L B, *et al.* Rice *ASR1* and *ASR5* are complementary transcription factors regulating aluminium responsive genes [J]. *Plant Cell Environ*, 2016, 39(3): 645-651.