

灯盏花 MYB 基因克隆及其荧光表达载体的构建

应宇翔¹, 何凤明¹, 张云峰^{1,2*}, 张培书¹, 严胜柒¹

1. 云南师范大学生命科学学院, 云南 昆明 650500

2. 生物能源持续开发利用教育部工程中心, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 克隆灯盏花 MYB 基因的全长序列, 为解析灯盏花 MYB 基因的功能奠定基础。方法 根据灯盏花转录组的相关信息, 利用 RACE 方法从灯盏花中克隆到一个可能参与灯盏花乙素合成的 MYB 基因, 在对其 cDNA 序列、核苷酸序列的相似性、理化性质、疏水性、跨膜结构、二级结构及三级结构进行分析预测的基础上, 对其进行多序列比对并构建系统树。同时, 还构建了该基因与绿色荧光蛋白的融合表达载体, 并进行了初步转化研究。结果 克隆获得灯盏花 MYB 基因, 命名为 ebMYB06, 其开放阅读框为 783 bp, 编码 260 个氨基酸残基, 相对分子质量为 63 800, 理论等电点 (pI) 为 5.18, 属稳定蛋白。其蛋白二级结构主要由无规卷曲、 α -螺旋和 β -折叠构成。根据灯盏花 MYB 与拟南芥 MYB (AtMYB) 的系统树比对分析结果, 发现 ebMYB 基因与拟南芥中的 AtMYB4、7、32、6、8 和 AtMYB11、12、111 2 亚群的基因聚类, 推测所克隆基因在结构或功能上, 可能与这两组具有共同性。实验还表明所构建的表达可用于灯盏花的高效转化。结论 首次从灯盏花中克隆到可能参与其苯丙烷代谢或环境响应调控的 MYB 基因。

关键词: 灯盏花; MYB; 克隆; 苯丙烷代谢; 生物信息学

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)20-4306-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.20.027

Cloning of MYB gene and construction of greenfluorescent protein expression vector in *Erigeron breviscapus*

YING Yu-xiang¹, HE Feng-ming¹, ZHANG Yun-feng^{1,2}, ZHANG Pei-shu¹, YAN Sheng-qi¹

1. School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

2. Engineering Research Center of Bio-Energy Development and Utilization, Ministry of Education, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To study the role of MYB transcription factor in phenylpropane biosynthesis pathway and the response to biotic or abiotic stress, a full length sequence of putative MYB gene was cloned in *Erigeron breviscapus*. **Methods** Based on a partial sequence of putative MYB gene from transcriptome we have previous reported, the full length cDNA was cloned by RACE method in *E. breviscapus*. According to the sequence of cloning cDNA, the nucleotide sequence similarity, physicochemical properties, hydrophobicity, transmembrane structure, secondary structure and tertiary structure were predicted and analyzed by various softwares. Meanwhile, multiple sequence alignment of cloned MYB gene was performed, and the phylogenetic tree was constructed. In addition, the fusion expression vector of this gene and green fluorescent protein was constructed. **Results** The MYB gene was cloned and named ebMYB06. The open reading frame was 783 bp, encoding 260 amino acid residues with a relative molecular mass of 63.80 kDa and a theoretical pI of 5.18 which proved to be a stable protein. The secondary structure of the protein is mainly composed of irregular coil, α helix and β fold. According to the result of phylogenetic tree alignment of *E. breviscapus* with R₂R₃MYBs from *Arabidopsis thaliana*, the cloned MYB gene was clustered to two subsets of R₂R₃-MYB genes from *A. thaliana*, which suggested that the cloned MYB gene would be similar with the two groups in structure and function, which would be involved in response to biotic and abiotic stress or phenylpropane biosynthesis pathway, respectively. Further experimental results show that the constructed expression can be used for the efficient transformation in *E. breviscapus*. **Conclusion** For the first time, a MYB gene was cloned may be involved in the phenylpropanoid metabolism or gene metabolism or gene regulation in response to the

收稿日期: 2017-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30660075, 31360263); 云南省科技厅社会发展科技计划基础研究面上资助项目 (2009CD052); 云南省基础研究计划资助项目 (2011FA016)

作者简介: 应宇翔 (1991—), 男, 硕士研究生, 主要从事植物资源与植物遗传方面研究。E-mail: 459805958@qq.com

***通信作者** 张云峰, 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事植物资源与植物遗传方面研究。E-mail: zhyunfen001@163.com

environment in *E. breviscapus*.

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz.; MYB; clone; phenylpropanoid metabolism; bioinformatics

灯盏花 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz., 又名灯盏细辛, 为菊科 (Compositae) 飞蓬属的植物短葶飞蓬。在传统民族药中, 主要用于散寒解表、祛风除湿、活血舒筋、消食积和解热止痛^[1]。现代医学中, 灯盏花提取物广泛用于心血管疾病及其所致后遗症治疗^[2]。自 20 世纪 70 年代, 已从灯盏花中分离到黄酮、吡喃酮、倍半萜、咖啡酸酯、酚酸类等 50 余种化合物^[3-4], 其中灯盏花乙素、灯盏甲素、咖啡酸、咖啡酰喹啉酸为灯盏花中的有效组分^[5]。这些主要药用组分为均由以草莽酸为起始物, 通过苯丙烷代谢途径而合成^[6]。以羟基芳香环为共同特征的苯丙烷代谢, 不仅是植物界代谢产物最多的代谢途径^[7], 同时也是植物的重要代谢途径。其代谢产物在植物的生长发育, 对生物、非生物环境胁迫响应的信号传递及防御中具有重要作用^[8-9], 同时也是人类膳食的有益成分及许多植物药的主要组分^[10]。

目前在对拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.、苜蓿 *Medicago sativa* Linn.、百脉草 *Lotus conniculatus* Linn.、葡萄 *Vitis vinifera* Linn.、苹果 *Malus pumila* Mill.、烟草 *Nicotiana tabacum* Linn. 等植物的研究基础上, 许多与苯丙烷代谢网络合成相关的结构基因被克隆^[11-12], 使该途径成为研究最为透彻的次生代谢途径之一^[13-14]。苯丙烷代谢网络途径为何能在不同的物种合成大量、特定的次生产物, 一方面与代谢途径的相关酶在空间上所形成的高度特化的代谢 (metabolon) 有关, 从而形成不同的代谢物通路 (metabolic channeling)^[15]。另一方面, 与其精细的调控机制具有密切的关系。其中由 MYB 或与其 bHLH (basic-helix-loop-helix) 和 WDR 重复所形成的 MBW 蛋白复合体是激活、抑制途径中相关基因表达的关键^[16-18], 且特定产物的形成、分布及其物种特异性主要由 WDM 中的 R_2R_3 的特性所决定, 而 bHLH 和 WDR 在不同物种中往往具有共同性^[19]。为此, 了解灯盏花中参与苯丙烷代谢途径调控相关 R_2R_3 MYB 的调控机制, 对深入阐释灯盏花有效组分的合成调控机制具有重要的作用。项目组前期利用 RNA-Seq 技术对不同氮水平下的灯盏花转录组进行了研究, 发掘了多条 R_2R_3 序列^[20]。本研究基于前期分析结果, 通过 RACE 方法克隆了一条灯盏花中可能参与苯丙烷代谢调控或环境响应

的全长 R_2R_3 基因, 并对其 GFP 融合蛋白载体进行构建及转化, 为下一步研究灯盏花中苯丙烷类代谢途径的调控及其与环境的互作奠定基础。

1 材料

样品采于云南文山丘北, 取自云南师范大学生物能源持续开发利用教育部工程中心温室。采集生长健壮的灯盏花 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz. 全植株及其相应根、茎、叶、花部分, 所取材料由云南师范大学生命科学学院崔明昆教授鉴定, 保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

对照品灯盏花乙素 (批号 BP1772-10)、3,5-二咖啡酰基奎宁酸 (批号 A0025)、4,5-二咖啡酰基奎宁酸 (批号 A0026) 及绿原酸 (批号 A0022) 均购于成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。

2 方法

2.1 总 RNA 提取

取冷冻的灯盏花组织, 放入干净的研钵, 加入适量液氮, 快速研磨样品。研磨成粉末后, 用称量纸取出适量样品粉末, 放入液氮预冷的 EP 管内, 每管装入的样品量 100 mg。采用 Plant RNA Isolation Kid (Promega 公司) 提取灯盏花 RNA, 提取的总 RNA 进行电泳检验。

2.2 MYB 候选基因的确定及其克隆

筛选出注释为 MYB 的 unigene, 并利用 Gene web server 对注释为 MYB 的 unigene 进行 ORF 预测, 获得其相应的蛋白质序列。其次, 为确定这些是否含有 MYB 保守序列, 利用 NCBI 中的在线软件 Batch CD-search tool 对筛选序列进行分析, 确保其含有 MYB 的保守区段, 如满足其中之一的分析, 就确定为灯盏花中 MYB 的候选基因成员, 并对其命名, 格式为 ebMYBXXX。第三, 利用 MAFFT program 对候选序列编码蛋白质及 126 条拟南芥 R_2R_3 MYB 基因编码蛋白质进行比对, 用 MEGA 6.06 软件采用邻接法构建无根系统树。最后, 根据聚类状况, 选择可能参与灯盏花苯丙烷代谢调控的 MYB 候选基因。

2.2.1 MYB 基因 5'末端克隆 根据已验证的灯盏花候选 MYB 基因片段序列, 设计了 5'RACE 的特异引物及扩增 MYB 全长序列引物 (表 1)。实验采用 Invitrogen 公司的 5'RACE system for Rapid

表 1 PCR 所用引物

Table 1 The primers list used in the experiment

类型	引物	序列 (5'→3')
序列验证	A240F	ATGGTGAGATCACCTTGTGTG
	A240R	ATGTGTGTGTTCCAATAGTTC
5'RACE	A240-1 (GSP1)	AACTTTTACCGCAACG
	A240-2 (GSP2)	CGGCTGATTTGGGTAAAGAT
	A240-3 (GSP3)	GAACCTTCACCATGAGCATT
3'RACE	3'834-1	AACGTGGAATTTTACCCTCAAGAAGA
	3'834-1	CCATGCAGTTCTTGGAACAAGTGGTCA
	UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC
全长扩增	MYB-fullF	ACGCGTCGACATGGTGAGATCACCTTG
	MYB-fullR	GGACTAGTTCTCCATCTACTTGACAAA
酶切位点扩增	Sall-MYBF	GCGTCGACATGGTGAGATCACCT
	NheI-MYBR	CTAGCTAGCACTCTCCATCTACTTGA
GFP 验证	PG1	TAGTGATGGTGAGCAAGG
	PG2	GTTGTGGCTGTTGTA

下划线为酶切位点序列

Underscores were the sequence for restriction digest

Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 试剂盒获得该基因的 5' 段序列。首先用 SUPERScrip II RT 酶和引物 A240-1 (GSP1) 对总 RNA 进行目的基因第一链 cDNA 的合成, 用 RNase Mix 对合成的 cDNA 进行去 RNA 处理。使用 DNA Purification System: GLASSMAX DNA isolation spin cartridges 对 RNAase 处理过的 cDNA 进行纯化。用 TdT 酶处理和 dCTP 对纯化后的 cDNA 进行末端加上多聚 C。用引物 A240-2 (GSP2) 和试剂盒中带的桥连铆钉引物 AAP 对已经加 dC 尾的 cDNA 进行第一轮扩增 (94 °C 预变 2 min; 30 个循环。每个循环包括: 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min; 结束循环后 72 °C 延伸 7 min)。将第一轮 PCR 产物稀释 100 倍作为模板, 使用引物 A240-3 (GSP3) 和试剂盒中带有桥连通用扩增引物 AUAP 进行巢式 PCR 第二轮扩增 (PCR 扩增条件同第一轮)。将 PCR 产物进行电泳, 回收纯化, 链接到 pMD18T 载体上, 进行 DNA 测序。

2.2.2 MYB 基因 3' 末端克隆 使用 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 获得该基因的 3' 序列。使用逆转录酶 SMARTScribe™ Reverse Transcriptase 和引物 3'CDS primer A 对总 RNA 进行逆转录合成 cDNA。使用引物 3'834-1 和 UPM, 以上面合成的 cDNA 为模板进行第一轮扩

增。(94 °C 预变性 5 min, 5 次循环, 循环包括: 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min; 循环结束按同样条件再次循环 25 次, 72 °C 延伸 7 min)。将第一轮扩增产物稀释 50 倍, 然后用引物 3'834-2 和 UPM 进行第二轮扩增 (PCR 反应条件与第一轮相同)。将第二轮 PCR 产物进行电泳, 回收纯化, 连接至 pMD18T 载体上, 进行 DNA 测序。

2.2.3 全长拼接及测序 对 2 个基因的 3'RACE 及 5'RACE 获得的 DNA 片段进行全长拼接, 设计 MYB 基因特异性引物 MYB-fullF、MYBI-fullR, 以 cDNA 链为模板扩增 MYB 全基因。PCR 反应体系: 10×PCR buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, Forward primer (10 μmol/L) 1 μL, Reverse primer (10 μmol/L) 1 μL, 第一链 cDNA 1.5 μL, Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 17 μL, 总体积 25 μL; PCR 反应条件: 94 °C、2 min; 94 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C。)然后将 MYB 基因的 PCR 产物分别经电泳检验后回收纯化。

2.3 灯盏花 MYB 基因的生物信息学分析

将测序结果在 NCBI 的 BLAST 中进行检索, 利用 DNAMAN 和 MEGA 4.0 进行多序列比对并构建系统树。利用在线软件 ProtParam 预测该酶蛋白质的理化性质; 利用 ProtScale 预测蛋白质的疏水性; 根据 TMHMM 预测蛋白质的跨膜结构; 利用 SOPMA 预测蛋白质的二级结构; 利用 SWISS-MODE 预测蛋白质的三级结构。

2.4 PBI21-MYB-EGFP 融合表达载体的构建及验证

提取大肠杆菌 DH5a 的 pMD 18 ebMYB 质粒, 根据载体 pBI21-EGFP 的图谱设计 Sall-NheI 为插入位点, 并合成引物 Sall-MYBF、NheI-MYBR (表 1)。使用高保真酶扩增得到 MYB 目的片段, 将酶切的目的基因与 pBI21-EGFP 用 T4 连接酶进行连接。构建植物表达载体 PBI2-EGFP-ebMYB。利用引物 PG1 和 PG2 (表 1) 对重组载体的 GFP 基因进行验证, 利用引物 MYB-fullF、MYB-fullR 对 MYB 基因进行扩增。

2.5 植物表达载体的转化及基因检验

采用电击转化法将植物表达载体 pBI21-EGFP-ebMYB 转化至根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞中。利用根癌农杆菌介导的叶盘法转化将 EGFP-ebMYB 重组基因导入灯盏花叶片。选择抗性愈伤分化成幼苗, 幼苗经 FluorCam 开放式多

光谱荧光成像系统 (PS 公司, 捷克) 下初步鉴定后, 提取其 DNA, 用 GPF 基因为引物进行验证。

2.6 转基因灯盏花类黄酮总量、总酚及灯盏花乙素的测定

实验共获得 20 株转化后的灯盏花苗, 选择其中 5 株对其类黄酮总量、木脂素及灯盏花乙素进行测定。同时以未转化的 2 株野生型为对照。分别取其叶片液氮冷冻后存于 -70°C 备用。实验时将储存材料从冰箱中取出, 按相应的测定方法进行测定。

2.6.1 提取流程 取新鲜叶片样品 20 mg 置入 2 mL 的塑料离心管, 加入 1.5 mL 的提取液, 加碾磨珠后盖塞, 用全自动样品快速研磨仪 (上海净信科技有限公司) 研磨 3 min, 随后用超声波震荡仪 (Sonics & materials Inc, 美国) 处理 5 min, 滤液移至 2.0 mL 的离心管 (滤过时, 滤纸先用提取液湿润), 用提取液冲洗定容至 2.0 mL, 由此得到物质粗提液。类黄酮、总酚及灯盏花乙素的提取液分别为 60%、95%、70% 甲醇。

2.6.2 类黄酮总量和总酚的测定 类黄酮采用亚硝酸钠-硝酸铝法测定^[21], 总酚测定采用福林酚法测定^[22]。

2.6.3 HPLC 法测定灯盏花乙素 灯盏花有效组份量的测定根据周玲等^[23]、刘鹏等^[24]的方法。

(1) 色谱条件: 流动相为甲醇 (A) -0.4% 的磷酸水 (B) 溶液, 体积流量 0.2 mL/min, 梯度洗脱: 0~20 min, 35%~45%A; 20~50 min, 45%~75%A; 50~60 min, 75%~95%A。

(2) 对照品溶液的制备: 精确称取灯盏花乙素、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-二咖啡酰基奎宁酸和绿原酸各对照品, 分别溶于 10 mL 量瓶, 加入甲醇至刻度, 摇匀, 为各对照品储备液, 备用。另取各储备液适量至同一 5 mL 量瓶, 用 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀即为质量浓度分别为 28.026、2.361、6.382、5.073 mg/L 的混合对照品溶液。用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过。上柱前用 0.45 微米微孔滤膜滤过。

(3) 供试品溶液的制备: 灯盏花提取液用滤纸滤过后经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 滤液待用。

(4) 线性曲线的绘制: 吸取各对照品混合液稀释为 6 个不同质量浓度, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 各取 20 μL 进行 HPLC 测定。以各成分峰面积 (A) 为纵坐标, 质量浓度 (C) 为横坐标, 利用 Sigmaplot 进行线性曲线绘制, 并得标准曲线回归方程 $A_{\text{灯盏花乙素}} = 63 C - 1.94$, $r = 0.999 8$; $A_{\text{绿原酸}} = 57.2 C - 0.92$, $r = 0.999 8$; $A_{3,5\text{-二咖啡酰基奎宁酸}} = 99.6 C - 0.62$,

$r = 0.999 8$; $A_{4,5\text{-二咖啡酰基奎宁酸}} = 43.9 C - 3.84$, $r = 0.999 8$ 。

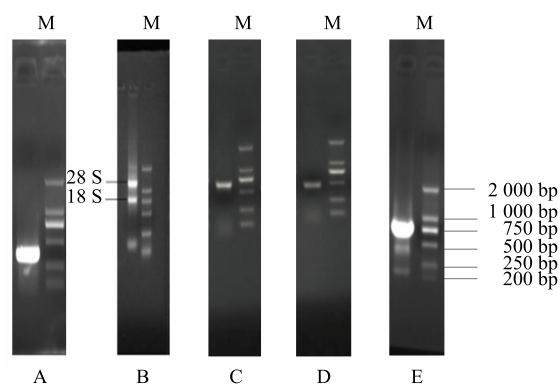
3 结果与分析

3.1 MYB 候选基因的筛选及其验证

通过转录组数据的 KOG 功能注释文件中分析 KOG 功能描述, 确定 MYB 家族转录因子的 unigene 候选片段。登录拟南芥数据库 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 获取拟南芥的 126 条 R_2R_3 类型的 MYB 序列, 选取灯盏花转录组中注释为 MYB 的 unigene, 利用 ClustalX 对拟南芥的 MYB 条序列进行多重比对, 结果显示有多条 unigene 与拟南芥 R_2R_3 -MYB 因子具有较高同源性, 实验选择序列较长的 unigene comp18609_c0 (1 045 bp) 作为 R_2R_3 -MYB 基因克隆的母链作为模板进行克隆。根据灯盏花转录组中所候选的 R_2R_3 -MYB unigene 序列, 设计了 MYB 特异性引物 A240F、A240R 对灯盏花中是否含有该序列进行验证。从灯盏花 cDNA 中扩增得到一条约 335 bp 的条带 (图 1-A), 与预期目的片段 (348 bp) 相似, 表明所候选 unigene 片段存在于灯盏花基因组中。

3.2 灯盏花总 RNA 提取及候选灯盏花 MYB 的克隆

采用 Trizol 法提取灯盏花叶片的总 RNA, 经电泳检测可以清晰的观察到 28 S 和 18 S 条带, 28 S 条带的亮度大约是 18 S 条带亮度的 2 倍, 说明 RNA 质量良好, 可用于下一步 cDNA 的合成 (图 1-B)。根据已有的灯盏花转录组数据库, 设计 MYB 基因特异性引物, 利用末端克隆技术扩增获得 MYB 基因



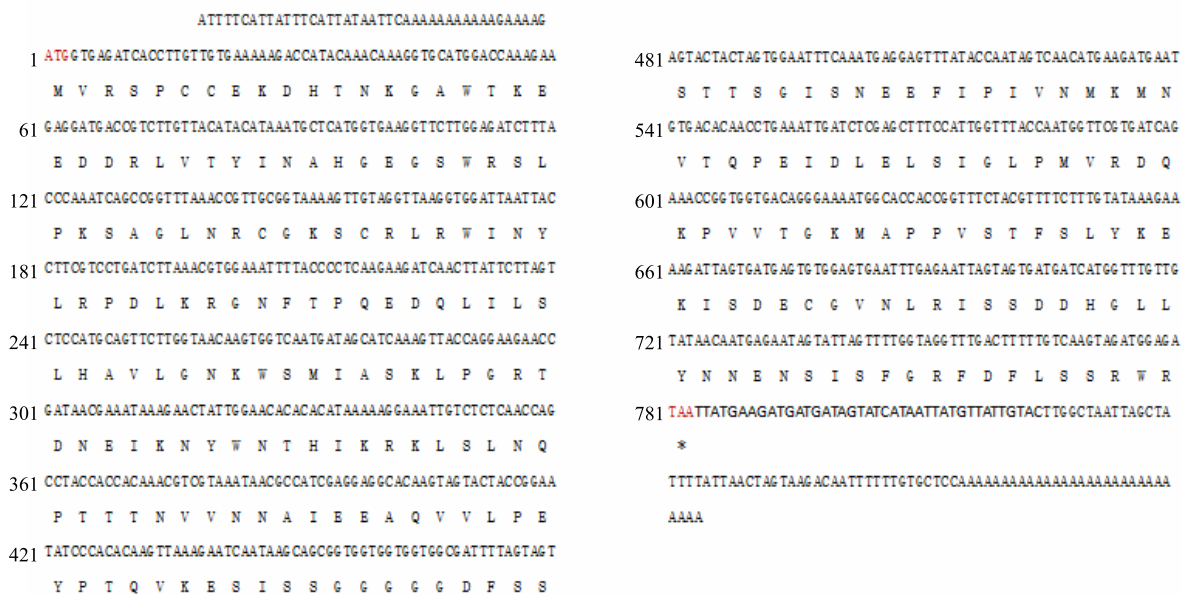
A-候选 MYB 的验证 B-提取总 RNA C-5'端产物 D-3'端产物 E-拼接后全长 ORF 扩增产物 M-Marker

A-verification of candidate MYB B-total RNA extracted C-PCR result of 5' RACE D-PCR result of 3' RACE E-PCR result of full length ORF of MYB of *Erigeron breviscapus* M-Marker

图 1 灯盏花 MYB 克隆电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis show the cloned process of MYB gene in *Erigeron breviscapus*

利用 MEGA 6.0 对 ebMYB06 的编码蛋白和拟南芥的 126 个 MYB 基因 (AtMYB) 的氨基酸序列进行多重比对, 绘制系统发育树 (图 3)。从图中可看出,



ebMYB06 蛋白与拟南芥中的 AtMYB4、AtMYB7、AtMYB32、AtMYB6、AtMYB8 聚为一支，同时与 AtMYB111、AtMYB11、AtMYB12 共同构成一个更大的分枝，表明 ebMYB06 蛋白与 AtMYB4、AtMYB7、AtMYB32、AtMYB6、AtMYB8 这组蛋白亲缘关系较

近。根据灯盏花 MYB 与拟南芥 AtMYB 的系统树比对分析结果，选取与 ebMYB06 亲缘性较近的两组 AtMYB 蛋白，通过 DNAMAN 将 2 组 MYB 蛋白序列进行多重比对（图 4），发现 ebMYB06 与拟南芥 AtMYB 均有一段高度保守区域。

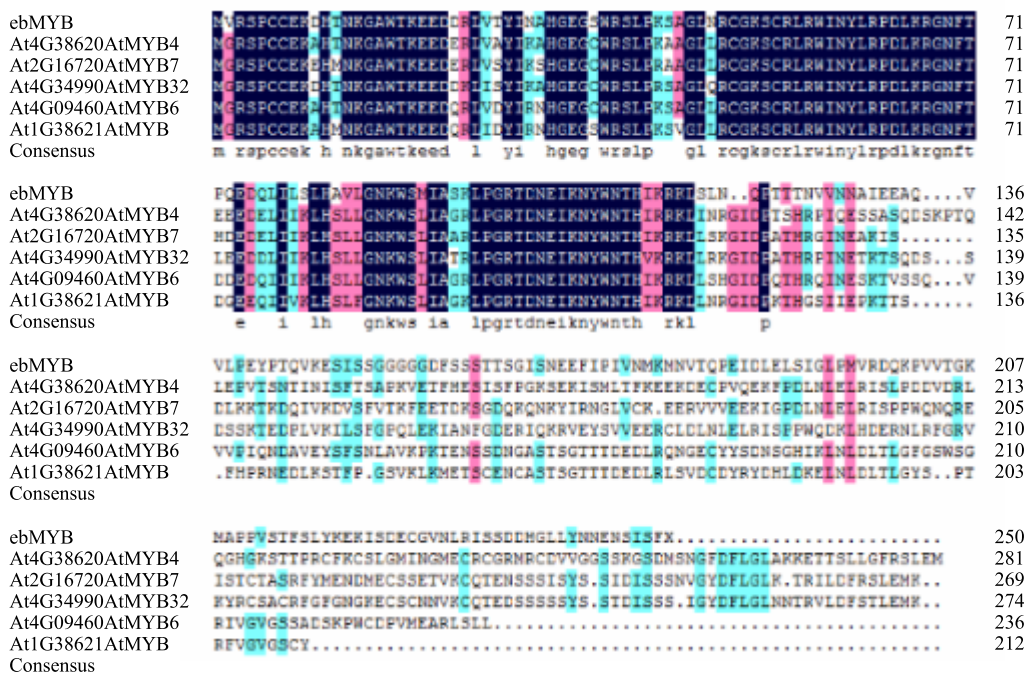


图 4 灯盏花 MYB 和拟南芥 AtMYB 蛋白的多重比对

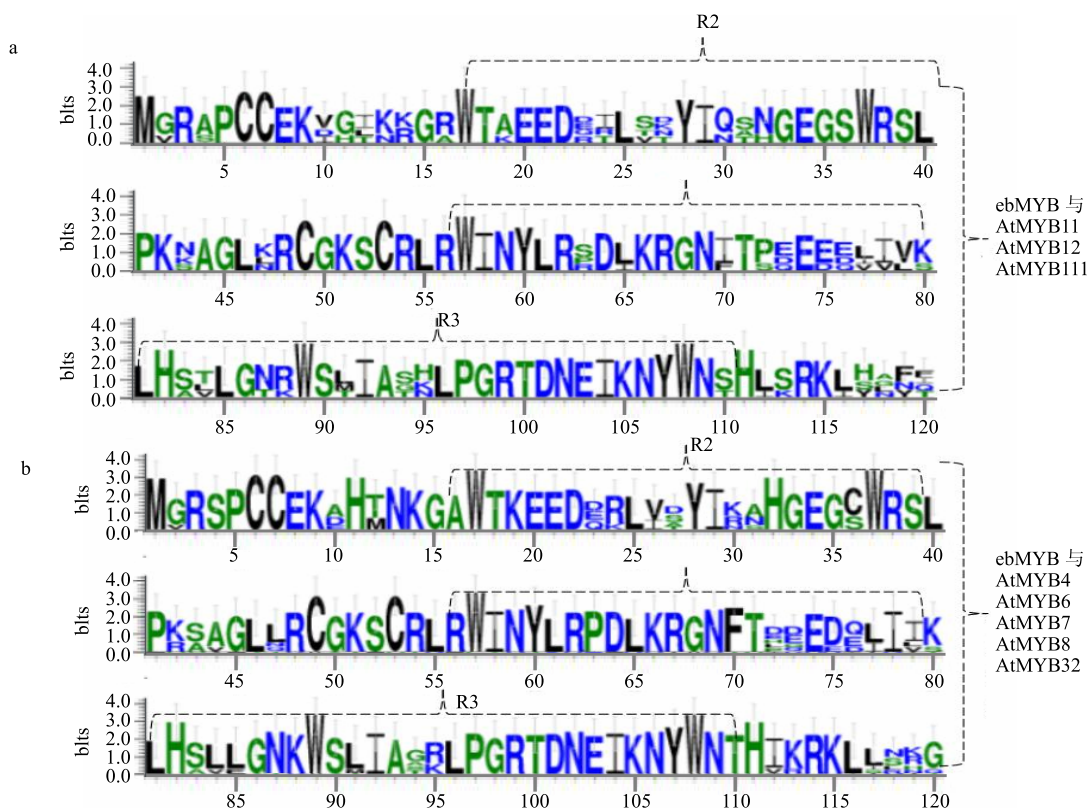
Fig. 4 Multiple alignment of *E. breviscapus* and *Arabidopsis thaliana* MYB

同时利用 Weblogo 绘制两组保守区域 N 端结构域的氨基酸残基保守图谱（图 5），结果显示灯盏花与拟南芥 R₂R₃-MYB 蛋白在 N 端结构域共同具有 [W]-x(20)-[W]-x(20)[W]-x(32)[W]-x(19)-[W] 的保守结构，其中 R₂ 中有 3 个高度保守的色氨酸残基，每 2 个色氨酸残基之间相隔 20 个氨基酸残基，R₃ 中有 2 个高度保守的色氨酸残基，这 2 个色氨酸残基被 19 个氨基酸残基分隔，表明 ebMYB06 属于 R₂R₃-MYB 家族类型。

3.3 MYB 编码蛋白的理化性质、疏水性及跨膜结构预测结果

利用 ProtParam 对 ebMYB06 编码的蛋白质进行理化性质分析，结果表明，蛋白相对分子质量为 63 800，理论等电点为 5.18，MYB 编码多肽的原子组成为 C₂₃₇₇H₃₉₇₆N₇₈₀O₉₉₆S₁₂₉。不稳定系数为 35.45，由此说明该蛋白是一个稳定蛋白。脂溶指数（Aliphatic inde）为 33.21，总平均亲水性

（GRAVY）为 0.721，表明该蛋白是一个疏水蛋白。利用 ProScale 分析和预测蛋白质疏水性，第 369 位和 428 位分别为 Thr 和 Pro，疏水性最强，为 2.189；第 715、717 位为 Gly、Leu，亲水性最强，为 -0.600。利用 TMpred 分析蛋白质的跨膜性，结果未发现跨膜结构或者膜结合区域。用在线工具 NetPhos 2.0 Server 对氨基酸序列进行潜在磷酸化位点分析，表明该序列只在 1 处丝氨酸上，1 处苏氨酸以及 2 处酪氨酸存在潜在磷酸化位点。用 SignalP 4.1Server 预测 MYB 基因编码蛋白信号肽，图中所示 30~31 位存在一个潜在的信号肽断裂位点。利用在线网站 SOPMA 对 MYB 编码的蛋白进行二级结构预测分析，结果表明，其中以无规卷曲最多，约占 46.15%，α-螺旋约占 21.54%，β-转角（折叠）约占 22.31%（图 6）。通过 SWISS-MODEL 在线软件对 MYB 基因编码蛋白的三级结构进行预测，可以看出该蛋白主要由无规则卷曲和螺旋组成（图 7）。



a-ebMYB and AtMYB11/12/111 蛋白 N 端 DNA 结合域的保守氨基酸残基 b-ebMYB and AtMYB4/7/32/6/8 蛋白 N 端 DNA 结合域的保守氨基酸残基
a-conserved DNA-binding domain of ebMYB and AtMYB11/12/111 b-conserved DNA-binding domain of ebMYB and AtMYB4/7/32/6/8

图 5 灯盏花 MYB 和拟南芥 AtMYB 蛋白的保守 N 端结构

Fig. 5 Conserved DNA-binding domain of N-terminal in *E. breviscapus* and *A. thaliana*

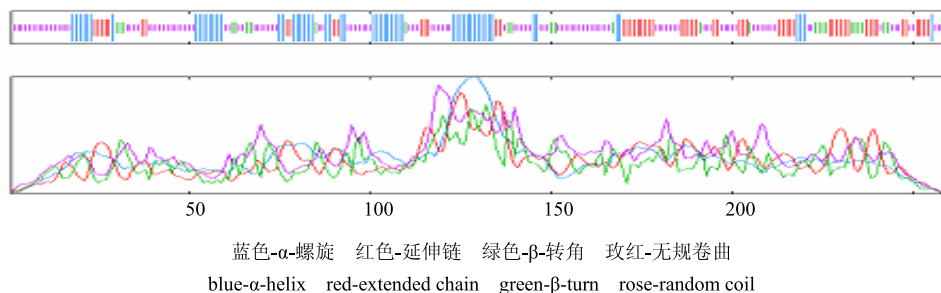


图 6 MYB 基因编码蛋白氨基酸序列的二级结构预测

Fig. 6 Secondary structure prediction of *E. breviscapus* MYB

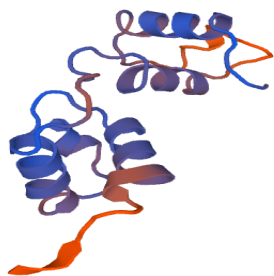
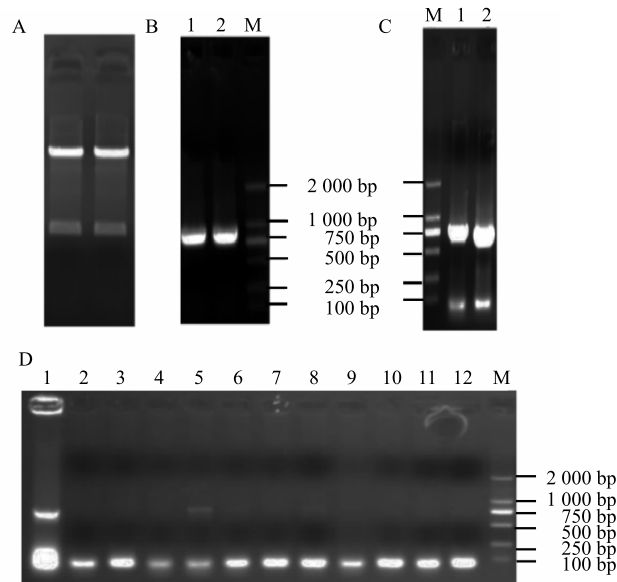


图 7 MYB 基因编码蛋白的三级结构预测

Fig. 7 Tertiary structure prediction of *E. breviscapus* MYB

3.4 重组载体的构建及其对灯盏花的转化

对含有 ebMYB06 的大肠杆菌重组 pMD18-T 质粒 DNA 分别进行小量提取 (图 8-A)。根据载体 pBI121-EGFP 的图谱设计以 SalI-SpeI 为插入位点的引物, 使用高保真酶分别扩增 CHI 及 MYB 目的基因片段 (图 8-B)。将双酶切后的 PBI121-EGFP 与目的基因片段分别进行体外连接, 电击转化到农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 对菌落进行 PCR 鉴定 (图 8-C)。对阳性菌落的 EGFP 片段和目的片段分别



A-pMD18-T-MYB 质粒 DNA 提取 B-MYB 的 PCR 扩增产物 C-重组质粒 EGFP 及目的片段 PCR 扩增产物 D-PBI121-EGFP-MYB 菌液 PCR 扩增产物 M-Marker 1~12-样品

A-plasmid DNA of pMD18-T-MYB B-PCR products of MYB C-PCR gel electrophoresis showed the process of PBI121-EGFP-MYB D-PCR products of PBI121-EGFP-MYB M-Marker 1—12-samples

图 8 表达载体构建电泳图

Fig. 8 Expression vector construction of electrophoresis chart

进行 PCR 扩增鉴定 (图 8-D), 表明所构建的表达载体中含有所克隆的 ebMYB06 基因, 该表达载体命名为 pBI12-EGFP-MYB06。以根癌农杆菌 GV3101 介导, 通过叶盘法将表达载体 pBI12-EGFP-MYB06 导入到灯盏花叶盘, 经过含 Cef 的延迟筛选培养基 (Cef 200 mg/L) 和含 Kan 和 Cef 的抗性培养基 (Kan 5 mg/L+Cef 200 mg/L) 筛选培养 (图 9-A), 观察到转化后大约 25 d, 可观察到部分叶盘长出愈伤组织 (图 9-B)。以后, 每 3~5 天对愈伤在无激素的筛选培养基中进行继代培养 (培养基中添加 Cef 200 mg/L), 15~20 d 后愈伤会分化出丛状幼苗 (图 9-C、D), 对幼苗 DNA 进行扩增, 发现部分幼苗中含有 GFP 片段 (图 9-E), 表明所克隆基因已导入灯盏花基因组中。

3.5 转基因灯盏花类黄酮、总酚、灯盏花乙素的测定

对 5 株 MYB 转基因植株 ($T_1 \sim T_5$) 及 2 株未转化野生型植株 ($W_1 \sim W_2$) 的总类黄酮、灯盏花乙素及咖啡酰喹啉酸类物质进行测定 (图 10)。结果表明, 在转基因植株中总类黄酮、总酚及灯盏花乙素均明显提高, 与野生未转化的比较, 存在显著

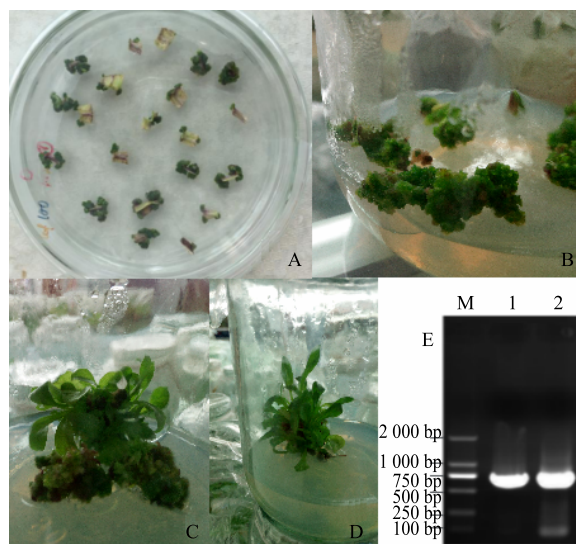


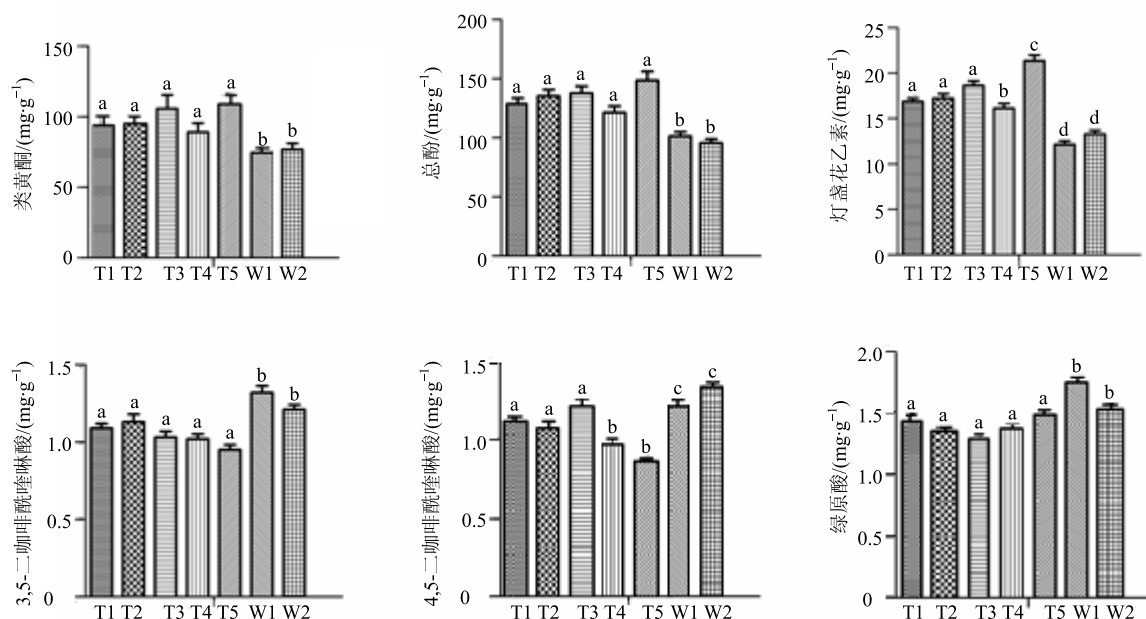
图 9 筛选培养基中的培养灯盏花叶盘 (A)、灯盏花愈伤组织 (B)、继代培养、愈伤分化出丛状幼苗 (C, D) 和 GFP 的验证 (E)

Fig. 9 Leaf disc cultured in selective medium (A), subculture (B), plants differentiation from callus (C, D), PCR of GFP of regeneration plant (E)

性差异 ($P < 0.05$); 而 3,5-二咖啡酰喹啉酸、4,5-二咖啡酰喹啉酸及绿原酸均明显下降, 与野生未转化的相比, 存在显著性差异 ($P < 0.05$)。表明所克隆的 MYB 基因对羟基肉桂酸代谢旁路具有一定的抑制, 但对黄烷酮代谢旁路是否具有促进作用还需进一步的实验证明。

4 讨论

本研究克隆得到了灯盏花 MYB 基因全长 cDNA 序列, 其 ORF 为 780 bp, 编码 260 个氨基酸, 蛋白相对分子质量 63 800, 理论等电点为 5.18。MYB 氨基酸序列的多肽链 81 位亮氨酸疏水性最强, 20 位谷氨酸亲水性最强; MYB 蛋白主要由 α -螺旋和延伸链构成; 没有跨膜结构或者膜结合区域。对灯盏花 MYB 蛋白 (ebMYB) 和拟南芥的 126 个 MYB 蛋白 (AtMYB) 多重比对和绘制系统发育树, 结果表明, ebMYB 基因与拟南芥中的 AtMYB4/7/32/6/8 和 AtMYB11/12/111 两组基因在结构或功能上均可能具有共同的起源。将 2 组 MYB 基因进行多重比对, 对 MYB 保守区域 N 端结构域的氨基酸残基保守图谱分析, 结果表明灯盏花与拟南芥 R_2R_3 -MYB 蛋白在 N 端结构域共同具有 [W]-x(20)-[W]-x(20)[W]-x(32)[W]-x(19)-[W] 的保守结构, 说明该 ebMYB 基因属于 R_2R_3 -MYB 家族类型。



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$

Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$

图 10 转基因灯盏花及其对照的代谢产物变化

Fig. 10 Change of secondary metabolites in transgenic plants and its control plants

拟南芥 AtMYB4、AtMYB7、AtMYB32、AtMYB6、AtMYB8 基因与植物的水杨酸刺激、赤霉素刺激、脱落酸刺激、茉莉酸刺激和乙烯刺激等生化过程相关。其中, AtMYB8 基因还具有抗渗透压、耐盐性和低温驯化功能, AtMYB4 基因具有抗 UV 功能。由于乙烯、赤霉素、水杨酸、脱落酸、茉莉酸等为植物体内天然激素, 能够促进或抑制植物的生长发育, 并影响植物的抗病性、抗逆性, 推测该 *cbMYB* 基因参与植物对逆境胁迫的应答和激素水平的调节, 并对细胞组织分化生长、信号转导, 以及抗病虫害能力等方面有着重要作用。而 AtMYB4、AtMYB11 基因具有参与黄酮醇生物合成调节的功能, AtMYB12 基因属于 R_2R_3 -MYB 家族的第 7 亚族, 它能够有效地激活查耳酮合成酶 (CHS)、黄酮-3-羟化酶 (F3H)、黄酮醇合成酶 (FLS) 的启动子来开启相应的基因表达, 同时对查耳酮异构酶 (CHI) 也具有一定的效应, 但不能激活类黄酮-3'-羟化酶和黄酮醇-4'-还原酶。AtMYB12 的基因敲除和超表达植株在表型上没有差别, 但 AtMYB12 基因敲除的植株幼苗中的槲皮素和山柰酚量降低, 而超表达的植株中类黄酮量增加, 且两者的花青素量无改变。在 AtMYB12 超表达植株中发现 CHI 和 F3H 的转录水平明显提高,

而在基因敲除植株中并无明显变化。这表明了参与类黄酮合成调节的 MYB 存在功能冗余性^[25-27]。通过对转基因灯盏花类黄酮总量及灯盏花乙素的测量发现, 转基因灯盏花的类黄酮及灯盏花乙素量较野生型灯盏花都有略微的提高, 而 3,5-二咖啡酰喹啉酸、4,5-二咖啡酰喹啉酸及绿原酸均明显下降, 至于究竟是通过何种途径来促进类黄酮的生物合成还有待进一步的研究。本研究所克隆的 MYB 同时与参与调控苯丙烷代谢合成的途径调控的拟南芥 MYB 亚族及环境胁迫响应亚族聚类, 对于是否参与了 2 个方面的调控还有待于实验验证。

参考文献

- [1] 刘宏, 杨祥良, 徐辉碧. 灯盏花的研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33(6): 566-568.
- [2] 周建中, 雷寒, 陈运贞, 等. 灯盏细辛注射液对自发性大鼠心室及血管重构的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(2): 122-125.
- [3] 张卫东, 陈万生, 王永红, 等. 灯盏花黄酮化学成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2000, 25(9): 536-547.
- [4] 岳建民, 赵勤实, 林中文, 等. 灯盏细辛中酚类化合物的化学研究 [J]. 植物学报, 2000, 42(3): 311-315.
- [5] 孙汉董, 赵勤实. 防治心脑血管疾病药物—灯盏细辛酚的研究与开发 [J]. 化学进展, 2009, 21(1): 77-83.
- [6] 刘春霞, 王玥, 崔明昆, 等. 灯盏花 chi 的克隆及其生物

- 信息学分析 [J]. 武汉植物学研究, 2010, 28(6): 682-690.
- [7] Boudet A M. Evolution and current status of research in phenolic compounds [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(22/24): 2722-2735.
- [8] Reuben S, Rai A, Bhinu V S P, *et al.* A bacterial quercetin oxidoreductase QuoA-mediated perturbation in the phenylpropanoid metabolic network increases lignification with a concomitant decrease in phenolamides in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(16): 5183-5194.
- [9] Albert N W, Davies K M, Lewis D H, *et al.* A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(3): 962-980.
- [10] Qiu J, Gao F H, Shen G, *et al.* Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway enhances the antioxidant capacity of *Saussurea involucreata* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70665.
- [11] Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, *et al.* Genetics and biochemistry of seed flavonoids [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57(1): 405-430.
- [12] Shamila W A, Stephen P, Ross C, *et al.* Biosynthesis of proanthocyanidins in white clover flowers: Cross talk within the flavonoid pathway [J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(2): 666-678.
- [13] Feller A, Machemer K, Braun E. L, *et al.* Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors [J]. *Plant J*, 2011, 66(1): 94-116.
- [14] Hichri I, Barrieu F, Bogs J, *et al.* Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(8): 2465-2483.
- [15] Grotewold E. The genetics and biochemistry of floral pigments [J]. *Annual Rev Plant Biol*, 2006, 57(1): 761-780.
- [16] Xie X B, Li S, Zhang R F, *et al.* The bHLH transcription factor MdbHLH3 promotes anthocyanin accumulation and fruit colouration in response to low temperature in apples [J]. *Plant Cell Environ*, 2012, 35(11): 1884-1897.
- [17] Ye H, Li L, Guo H, *et al.* MYBL2 is a substrate of GSK3-like kinase BIN2 and acts as a corepressor of BES1 in brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis* Proc. Natl [J]. *Acad Sci USA*, 2012, 109(49): 20142-20147.
- [18] Maier A, Schrader A, Kokkelink L, *et al.* Light and the E3 ubiquitin ligase COP1/SPA control the protein stability of the MYB transcription factors PAP1 and PAP2 involved in anthocyanin accumulation in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2013, 74(4): 638-651.
- [19] Patra B, Pattanaik S, Yuan L. Ubiquitin protein ligase 3 mediates the proteasomal degradation of GLABROUS 3 and enhancer of GLABROUS 3, regulators of trichome development and flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2013, 74(3): 435-447.
- [20] 田宝强, 李 玥, 赖思晨, 等. 低氮胁迫灯盏花全植株的转录文库构建及其测序 [J]. 中草药, 2015, 46(21): 3235-3241.
- [21] 毕和平, 韩长日, 廖家旺, 等. 穿心莲中总黄酮含量的测定 [J]. 光谱实验室, 2006, 23(2): 356-359.
- [22] 王华磊, 冯建荣, 樊新民, 等. 新疆17个杏品种的抗氧化指标与总酚含量的测定 [J]. 果树学报, 2008(6): 828-831.
- [23] 周 玲, 谢丽艳, 徐 洁, 等. HPLC 同时测定灯盏细辛注射液中的6种主要成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 78-81.
- [24] 刘 鹏, 周 军, 秦向阳, 等. HPLC 法测定不同产地灯盏细辛中灯盏花乙素的含量 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(9): 781-783.
- [25] Stracke R, Werber M, Weissshaar B. The R₂R₃-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Biol*, 2001, 4(5): 447-456.
- [26] Yamada K. Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome [J]. *Science*, 2003, 302(5646): 842-846.
- [27] Yanhui C. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: Expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(1): 107-124.