

• 药材与资源 •

阳春砂转录因子 AvMYC4b 的克隆及原核表达

王 虹, 马东明, 蒋研风, 罗子俊, 杨锦芬*

广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室(广州中医药大学), 国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州 510006

摘要: 目的 阳春砂是中药砂仁的主要来源植物, 其转录组中已筛选出预测与萜类合成相关的候选转录因子 unigene, 对其进行克隆、序列分析和原核表达, 以进一步认识阳春砂药效物质萜类合成的调控元件。方法 根据阳春砂转录组数据中预测为 AvMYC4b 的 Unigene0074125 序列设计特异引物, 提取阳春砂叶片 RNA 并反转录成 cDNA, 以此为模板经 PCR 扩增得到 AvMYC4b 的核心片段, 再通过 RACE 技术获得全长 cDNA, 然后进行编码区全长的 GATEWAY TOPO 克隆。通过 LR 反应构建原核表达载体, 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 细胞, 以异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和阿拉伯糖在 16 °C 下培养诱导融合蛋白表达, 收集菌体, 经过裂解、超声、纯化, 用 SDS-PAGE 检测蛋白表达结果。结果 克隆获得的 AvMYC4b 全长有 2 579 bp, 包含 195 bp 的 5' UTR, 1 995 bp 的 ORF 和 389 bp 的 3' UTR, 编码 664 个氨基酸, 预测蛋白相对分子质量为 72 211。经过生物信息学分析, AvMYC4b 氨基酸序列与其他植物的 MYC 相似, 含有转录因子 MYC 家族的保守结构域, 预测可定位于细胞核中。成功构建重组表达载体 pDEST17-AvMYC4b 并转化 Rosetta (DE3) 细胞, 经诱导表达得到 AvMYC4b 融合蛋白, SDS-PAGE 结果显示蛋白相对分子质量约 80 000, 与预测相符。结论 从阳春砂中克隆得到 bHLH 家族转录因子 AvMYC4b, 并建立了 AvMYC4b 原核表达系统, 为该转录因子的生物功能研究奠定了基础。

关键词: 阳春砂; AvMYC4b; 转录因子; 序列分析; 原核表达**中图分类号:** R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)06-1390-08**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.024Cloning and prokaryotic expression of transcription factor AvMYC4b in *Amomum villosum*

WANG Hong, MA Dong-ming, JIANG Yan-feng-yang, LUO Zi-jun, YANG Jin-fen

Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine), Ministry of Education, Joint Laboratory of National Engineering Research Center for the Pharmaceuticals of Traditional Chinese Medicines, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective The transcription factor AvMYC4b selected from transcriptome databases, which might be closely related to the terpene biosynthesis, was cloned from *Amomum villosum* for sequence analysis and prokaryotic expression. **Methods** Based on the transcriptome data of *A. villosum*, specific primers were designed to obtain the AvMYC4b core sequence. In this study, the whole cDNA sequence of AvMYC4b was obtained by RACE method, then the GATEWAY TOPO cloning vector, and the express vector pDEST17 were constructed by ligation and LR method, respectively, and prokaryotic protein expression was performed. Induced by IPTG and arabinose, the recombinant protein AvMYC4b was successfully expressed at the temperature of 16 °C. Collected bacteria were processed through lysis, ultrasound and purification, and were used to determine the protein expression by SDS-PAGE. **Results** AvMYC4b cDNA gene had 2 579 bp, including 165 bp 5'UTR, 1 995 bp ORF, and 389 bp 3'UTR, which encoded a deduce protein of 664 amino acid with a calculated molecular weight of 72 211. Bioinformatics analysis indicated that AvMYC4b had the conserved domain of transcription factor MYC family and predicted that AvMYC4b could be located in nucleus. The SDS-PAGE result showed that the AvMYC4b protein was expressed in *Escherichia coli* with a molecular mass of about 80 000, which was consistent with the predicted molecular weight. **Conclusion** AvMYC4b gene of the bHLH family was cloned from *A. villosum* and had the whole ORF.

收稿日期: 2017-09-15

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81303163); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划 (Yq2013042)

作者简介: 王 虹 (1992—), 女, 在读硕士研究生。Tel: 13724082624 E-mail: 519775094@qq.com

*通信作者 杨锦芬 (1978—), 女, 研究员, 研究方向为药用植物萜类化合物生物合成与调控。Tel: (020)39358331 E-mail: yangjif@gzucm.edu.cn

The recombinant AvMYC4b protein also was successful expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3). Therefore, this study could provide fundamental information for the function characterization of AvMYC4b in terpene biosynthesis pathway of *A. villosum*.

Key words: *Amomum villosum* Lour.; AvMYC4b; transcription factor; sequence analysis; prokaryotic expression

转录因子 (transcription factors, TF), 又称为反式作用因子, 是对基因转录进行调控的一类蛋白质, 能够直接或间接地与基因启动子区域顺式作用元件发生特异性的相互作用, 启动和调节基因的表达^[1]。转录因子可以通过响应植物生长发育、逆境胁迫诱导的信号来调节体内的次生代谢, 不仅能调控代谢途径中单个酶基因, 也可以调节多个酶基因协同表达, 从而综合调节次生代谢物的合成^[2]。bHLH (basic helix-loop-helix) 类转录因子是植物中的一个超大转录因子家族, 含有碱性区域 (basic region) 和螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 结构域的转录因子, 其中 MYC 类转录因子是 bHLH 的一个小家族, 其保守结构域通过与目标启动子的 E-Box (CANNTG) 或 G-Box (CACGTG) 等元件结合实现对目标基因的表达调控^[3]。

bHLH 类转录因子参与多种信号转导途径, 大量研究已经证明 bHLH 类转录因子家族参与茉莉酸 (JA) 信号转导途径。在 JA 信号转导途径中, 具有生物活性的 JA 首先被复合体 SCF^{COI} 识别后, 原本与转录因子结合的 JAZs 蛋白质被泛素化标记并转运至蛋白酶体进行降解, 释放后以 MYC2 为主的转录因子启动 JA 信号通路下游的基因表达, 其同源基因 MYC3、MYC4 也能反式作用于 JAZ, 并共同响应 JA 应答, 证实了 MYC 在 JA 信号通路上的作用^[4]。另外在拟南芥中也发现了 MYC2 参与了脱落酸信号、乙烯信号、光响应信号转导途径^[5-7]。同时很多文献也报道了该类转录因子参与了次生代谢, 其中包括对萜类途径靶基因进行表达调控, 通过调节酶基因的表达间接参与萜类合成, 如苜蓿中 bHLH 类转录因子 TSAR1 和 TSAR2 调节三萜皂苷的形成; 丹参中 2 个受 JA 诱导的 SmMYC2a 和 SmMYC2b 参与了丹参酮和酚酸生物合成途径^[8-9]。可见 MYC 类转录因子在植物的生物胁迫、非生物胁迫、次生代谢等生命活动中起重要作用。目前, 已经从拟南芥、烟草、青蒿、丹参和葡萄等植物中分离得到 MYC 类转录因子, 这些基因都参与了植物的各种生命活动, 作为重要的调节子存在植物体内^[5,9-13]。

药用植物作为传统中药在治疗人类疾病与人

类健康方面发挥着重要作用, 其中的有效成分多为次生代谢物。姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥成熟果实, 是中药砂仁主要的来源, 其气味芳香, 主要药效物质挥发油富含萜类化合物, 如乙酸龙脑酯、樟脑、龙脑等^[14]。本课题组前期对阳春砂进行了茉莉酸甲酯诱导及果实不同发育时期的转录组及表达谱测序^[15-16], 经过本地 blast、转录因子保守结构域分析, 以及对茉莉酸甲酯诱导响应和萜类合酶基因表达相关性的分析, 筛选出可能参与萜类合成调控的系列转录因子 unigene, 其中包括 Unigene0074125, 参考拟南芥的相似基因命名为 AvMYC4b^[17]。转录组中的 AvMYC4b 的 cDNA 序列不完整, 本研究将从阳春砂叶片 cDNA 中克隆该基因的核心序列, 并通过 RACE 技术获得 5'RACE 和 3'RACE 序列, 进而获得 AvMYC4b 全长序列, 进行生物信息学分析, 并构建其重组克隆载体和原核表达载体, 通过在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 细胞中诱导表达, 获得纯化的重组蛋白, 为进一步验证其生物功能奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

阳春砂栽培于广州中医药大学时珍山, 经广州中医药大学中药资源与工程研究中心詹若挺研究员鉴定为阳春砂 *Amomum villosum* Lour., 本研究取其嫩叶并保存至 -80 °C 超低温冰箱备用。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购于 Magen 公司, Gateway TOPO Cloning 试剂盒、Clonase II Enzyme Mix、原核表达载体 pDEST17 和蛋白 marker 购于 Invitrogen 公司, NI-NTA 柱子购于 QIAGEN 公司。DH5 α 感受态细胞、高保真酶 PrimerSTAR enzyme、DNA 切胶回收试剂盒购于 Takara 公司。pLB 零背景快速克隆试剂盒, *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞购于天根生化有限公司。引物合成和基因测序由华大基因有限公司完成。

2 方法

2.1 RNA 的提取及反转录

参照植物 RNA 提取试剂盒的方法提取阳春砂嫩叶片总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和微量紫外

分光光度计检测总 RNA 的完整性以及浓度、纯度。

2.2 AvMYC4b 基因的核心片段及其全长序列的获取

利用引物设计软件 Primer premier 5.0 对阳春砂转录组 AvMYC4b 核酸序列 (Unigene007412) 设计上游引物 MYC4b-F 和下游引物 MYC4b-R (表 1)。利用 Takara PrimerSTAR 高保真酶进行 PCR 扩增核心序列, PCR 扩增条件: 98 ℃, 预变性 5 min; 98 ℃、变性 10 s, 62 ℃、退火 30 s, 72 ℃、

延伸 1 min, 35 个循环; 最后再 72 ℃延伸 5 min。基于 PCR 扩增获得的 cDNA 片段和转录组的核酸序列, 设计出 3'RACE 引物 AvMYC4b GSP forward、5'RACE 引物 AvMYC4b GSP reverse (表 1)。根据 Takara SMARTer RACE 试剂盒进行操作。以上核心片段、5'RACE 和 3'RACE 均克隆到 pLB 载体上测序, 将 5'RACE、核心片段和 3'RACE 获得的序列进行拼接, 最终获得 AvMYC4b 的全长 cDNA 序列。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	序列 (5'→3')	用途
MYC4b-F	CCCCCTCTTCTGCCTTATTCTTCA	核心片段扩增
MYC4b-R	GCTTCGATCTGTGTTTGCAATTCCT	
AvMYC4b GSP forward	TGGAGTCCTCAACGACCCCGA	3'-RACE
AvMYC4b GSP reverse	GGCGACCCAATATGGAGCGCCTGTA	5'-RACE
MYC4b-FA	CACCATGAACCTTTGGGCCGACGACA	pENTR/D-TOPO 克隆
MYC4b-RA2	TTGAGTAACCGATGCCTCGACAGC	

2.3 生物信息学分析

通过 NCBI ORF Finder 和 Translator 查找 AvMYC4b 的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 及其编码的氨基酸序列。将 AvMYC4b 在 NCBI 上, 通过 blast 工具与核酸和蛋白序列进行比对, 进行保守结构域分析。使用 ExPASy (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 进行理化性质分析, 使用 MAGA 5.1 构建进化树。使用 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)、DNAMAN 进行序列比对。使用 PSORT (<http://psort.hgc.jp>) 进行亚细胞定位。使用 SWISS-MODEL (<http://swiss.model.expasy.org/>) 进行蛋白三维结构模拟。

2.4 AvMYC4b 基因序列的克隆及重组表达载体的构建

根据获得 AvMYC4b 的全长 cDNA 序列及 Gateway pENTR/D-TOPO 克隆引物设计原则, 设计用于扩增 AvMYC4b 编码区的上游引物 MYC4b-FA 和下游引物 MYC4b-RA2 (表 1)。采用 Takara Primer STAR 高保真酶进行 PCR 扩增, PCR 扩增条件: 98 ℃, 预变性 5 min; 98 ℃、变性 10 s, 62 ℃、退火 15 s, 72 ℃、延伸 10 s, 35 个循环; 最后再 72 ℃延伸 5 min。将扩增的目的片段连接到入门载体 pENTR/D-TOPO, 转化至 *E. coli* DH5 α , 进行菌液 PCR 和测序验证菌液, 保存阳性菌种并按照 Megan 试剂盒提取质粒。将测序

正确的重组入门载体 pENTR-AvMYC4b 通过 Gateway LR 反应, 构建重组表达载体 pDEST17-AvMYC4b。LR 反应体系: 1 μ L pENTR-AvMYC4b (35 ng), 1 μ L pDEST17 (75 ng/ μ L), TE buffer 2 μ L, LR ClonaseII Enzyme Mix 1 μ L, 在 25 ℃ 反应 24 h, 反应结束用 0.5 μ L Proteinase K solution 在 37 ℃下进行 10 min 终止反应, 进一步转化 *E. coli* DH5 α , 进行菌液 PCR 和测序验证, 保存阳性菌种并按照 Megan 试剂盒提取质粒。

2.5 AvMYC4b 原核表达和蛋白纯化

将构建好的原核表达载体质粒转入 Rosetta (DE3) 感受态细胞, 在含有 25 μ g/mL 羧苄青霉素和 17 μ g/mL 氯霉素的 7 mL LB 液体培养基中, 37 ℃ 过夜摇至饱和, 再按照 1:100 稀释, 在 300 mL 含有 25 μ g/mL 羧苄青霉素和 17 μ g/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中 37 ℃ 震荡至 A_{600} 值为 0.4, 加入 0.2% 阿拉伯糖和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 0.1 mmol/L, 16 ℃ 诱导培养 20 h, 4 ℃ 下离心收集菌体。用裂解液 (0.02 mol/L PBS、pH 7.4、10 mmol/L 咪唑) 重悬菌体, 超声波破碎细胞 (工作 5 s, 间歇 5 s, 功率 450 W, 3 min) 4 次, 4 ℃ 离心 (8 000 r/min, 15 min) 收集上清可溶蛋白, 利用 Ni-NTA 柱子进行蛋白纯化: 先用裂解液 (0.02 mol/L PBS、pH 7.4、10 mmol/L 咪唑) 平衡 Ni-NTA 柱子, 再用洗杂蛋白缓冲液 (0.02 mol/L

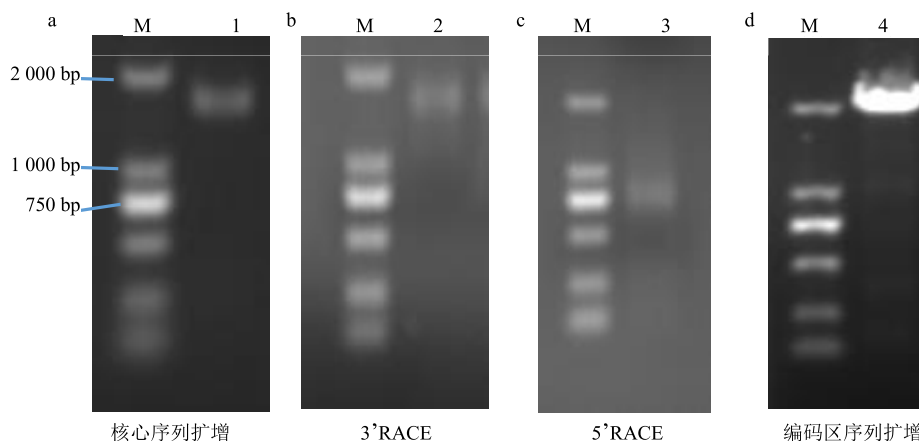
PBS、pH 7.4、20 mmol/L 咪唑)洗柱,最后用洗脱目标蛋白缓冲液(0.02 mol/L PBS、pH 7.4、250 mmol/L 咪唑)洗脱目标蛋白,纯化后的蛋白用 10% 变性胶进行 SDS-PAGE 检测。

3 结果与分析

3.1 AvMYC4b 基因的克隆

根据阳春砂转录组中 AvMYC4b 的序列设计特异引物,从阳春砂叶片 cDNA 中扩增出了 AvMYC4b

接近 1 500 bp 的 cDNA 核心序列(图 1-a),测序后发现获得的核心序列有 1 525 bp。以扩增得到的核心片段,设计特异引物分别进行 3'RACE(图 1-b)和 5'RACE(图 1-c),分别获得了接近 1 500 bp 和 750 bp 的片段,进行测序得到 3'端和 5'端的序列,结合核心序列拼接获得 AvMYC4b 的 cDNA 全长序列,并对其编码区序列进行扩增,获得约 2 000 bp 的片段(图 1-d)。



M-Marker 1-AvMYC4b 核心片段 PCR 产物 2-AvMYC4b 3'RACE 产物 3-AvMYC4b 5'RACE 产物 4-AvMYC4b 编码区序列扩增产物
M-Marker 1-PCR product of AvMYC4b core sequences 2-3'RACE product of AvMYC4b 3-5'RACE product of AvMYC4b 4-PCR product of MYC4b coding region

图 1 AvMYC4b 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of AvMYC4b

3.2 生物信息学分析

利用 NCBI ORF Finder 分析, AvMYC4b 的 cDNA 全长 2 579 bp, 包含 1 个 195 bp 的 5' UTR、1 个 1 995 bp 的 ORF 和 1 个 389 bp 的 3' UTR。利用 ExPASy 预测 AvMYC4b 编码 664 个氨基酸, 相对分子质量(Molecular weight)约为 72 211, 理化相对等电点(pI)为 5.12, AvMYC4b 蛋白的不稳定指数为 51.39%, 根据 Guruprasad 方法预测该蛋白不稳定。同时使用 PSORT 网站预测 AvMYC4b 定位于细胞核, 与转录因子的功能相符。利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 对其蛋白质进行三维立体结构的模拟(图 2), 在网站分析中显示其三维结构与拟南芥 MYC2 相似度为 73.69%。

通过与芭蕉 MaMYC2、菠萝 AcMYC2、凤仙草 PdMYC2 的氨基酸序列进行比对和保守结构域分析, 阳春砂 AvMYC4b 含有 bHLH_MYC_N、HLH 保守结构域以及 E-box 结合位点, 这也是转录因子

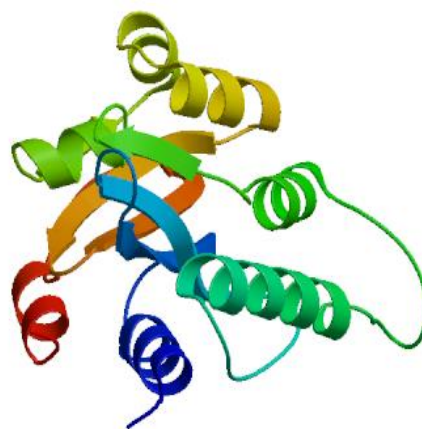


图 2 AvMYC4b 蛋白质预测三维结构

Fig. 2 3D structure of AvMYC4b protein

MYC 家族氨基酸序列的共性(图 3)。

以 AvMYC4b 的氨基酸序列在 NCBI 数据库进行 blastp, 发现与 AvMYC4b 相似度最高的均为 MYC 家族的转录因子, 其中与芭蕉 MaMYC2 相似度最高, 其相似度为 66%。并从 NCBI 数据库中选

AcMYC2	MNFWDDNASMMAPVATS...DLOG...EPWSSAAAFSAFP...IPPAAP...PSPPOPPFNO...KLOCRLOALIGARESWTYAIFWQSSVDVTIGA	89
AvMYC4	MNFWDDNASMMAPVATS...DLOGSSFPVTAATPGPPPS...TPFPSSALFFNOOTLOCRLOALIGARESWTYAIFWQSSVDATIGS	84
MaMYC2	MNFWDDNASMMAPVATS...DLOG...EPWATTPSTPELPTALDGRALIGPPTAPPTATYFNOETLOCRLOALIGARESWTYAIFWQSSVDAASGA	94
PdMYC2	MNFWDDNASMMAPVATTTDLOG...EPWAPPAASAAGGGHVLSSQSAVT...SVAPPPPYFNOETLOCRLOALIGARESWTYAIFWQSSVDASGV	95
AcMYC2	SFLWCGGYGCGEDKRRRGPTAASAEQZHRKRLREINSLISGVGGGGGGGGGGDDWVEEVDTEWFFLVSMQSFVNGAGLPQQAIFSCAPM	189
AvMYC4	SFLWCGGYGCGEDKRRQ...PTVSSDEREHRKRLREINSLIS...GGGADRAVDEEVDTEWFFLVSMQSFVNGAGLPQQAIFSCAPY	171
MaMYC2	SFLWCGGYGCGEDKRRQRAASASAEQZHRKRLREINSLIS...CGGSSACDETVEEVDTEWFFLVSMQSFVNGAGLPQQAIFSCAPS	187
PdMYC2	SFLWCGGYGCGEDKRRKRVTFASAEQZHRKRLREINSLIS...GGAGVSSDETVEEVDTEWFFLVSMQSFVNGAGLPQQAIFSCAPT	189
AcMYC2	WLAGADRIAVAGCQRAQSGVIGLITMACVVGSGVLELGSTDILHSSDVMNKRILNFPSS...LDVESAAASWIGATSAAGAAPPQVAAAFDGE	286
AvMYC4	WLAGADRIAAAGCQRAQAGMIGITVACVVGSGVLELGSTDIPORPELIGKHTLFPNSTDGPPVETTPASWLAESPAN...PAAADGE	265
MaMYC2	WLAGADRIAAAGCQRAQAGLIGITVACVVGSGVLELGSTDILHSPETMGKISVLFNFGS...PDSFSTAGASLIAPCSAAAT...PAAADGE	277
PdMYC2	WLAGADRIAAAGCQRAQAGLITMACVVGSGVLELGSTDILYSSDLMNTRVILNFPSS...LEIPSG...CWLETAATP...AVADGE	275
AcMYC2	DDPSVLWISDPSLIS...KDSVSEAPAAAAAABEISVSEPIRE...NPSSSLTENPSSSIQOTHQNNHPTLHQHQHQHQHQHQPHQS...FFTREINP	383
AvMYC4	ADP...LWITDPSIADKDFSS...LEATPATSLAKSPFPGKNPSSLTENPSSSIQOKIQOTTP...SSKRYTF	338
MaMYC2	DDPSVLWISDPSVMEKDSVSP...APAAADISVTKIPLLESNPSSVTHTENPSSMECKALYGHQQIHHQHQ...SSSKPQSOP...FFSKELN	369
PdMYC2	DDPSVLWISDPSVMEKDSIS...ASATADISVTKIPLQED...NPSSSTVTENPSS...IQORHHNQHQHQHQHQHQENNSNNSNLQTSLEAARENF	368
AcMYC2	SEFALNGSS...SEKPESEGVLEFEDNAGAGAGASRNSEPAFVNGGGGGLFHHAPAMG...DHDKNKSTQTSRISNDEGMSSESSAPAPSSS...	478
AvMYC4	SEFVNGAVHTIS...SEKPESGDILFPSS...GGRNSEVP...AAGNLFHHOADS...ADDKNKSTGTSKASNNDEGMSSESSAPAPSSCNGQ	425
MaMYC2	SGFASNGVALISVSEKPESGDILNAG...GGRNSEVP...VTGVSFHHOAAV...ADDKNKSTGTSKASNNDEGMSSESSAPAPSSNSQ	456
PdMYC2	SEFVNGPAPFSEKPESGDILFSD...SKRNSEVP...GSSIFSHHGIATVPAADKNKSTQTSRISNDEGMSSESSAPAPSSAG...	454
AcMYC2	...TAAGAAPVKSQSDSDLEASVREVESHWVEPEKRPKRGRKPANGREPLNHVEAERQRREKLNQRFYALRAVVPVNSKMDKASLLGDAGS	572
AvMYC4	LKSSSAATAGGVINDESDSDLEASVREVESRVVEPEKRPKRGRKPANGREPLNHVEAERQRREKLNQRFYALRAVVPVNSKMDKASLLGDAGS	524
MaMYC2	LK...SSCGGGVLDGADSDSDLEASVREVESRVVEPEKRPKRGRKPANGREPLNHVEAERQRREKLNQRFYALRAVVPVNSKMDKASLLGDAGS	551
PdMYC2	...Q...AKSGGGILCGADSDSDLEASVREVESRVVEPEKRPKRGRKPANGREPLNHVEAERQRREKLNQRFYALRAVVPVNSKMDKASLLGDAGS	548
AcMYC2	YINELSKLQSDSDKDTLOSHVESLCKBRARFALTASAPFPFPFPPSGVSDAHGFCGABEIVKILGHEAMIRVQCHKNHPAARLMAALKDLDELV	672
AvMYC4	YINELRWKLOAEVKEHELQTEALRRRESFTW...PFGKDDHKIMNAGGSCLSVEIEVKILGHEAMIRVQCHKNHPAARLMAALKDLDELV	618
MaMYC2	YINELSKLQAEVKEHELQSMELIKKRESAPAR...PAPPRTVVKYMKG...CHGVEIVKILGHEAMIRVQCHKNHPAARLMAALKDLDELV	643
PdMYC2	YINELSKLQSDSDKGLCAQIDSLKRDSSPAR...PQLPDDAKYMGKCHGVEIVKILGHEAMIRVQCHKNHPAARLMAALKDLDELV	642
AcMYC2	YYASVSVKDLMIQQTVMSSSVYSEQLNAALCARITDPSP...C	716
AvMYC4	YYASVSVKDLMIQQTVMSSSVYTOEQLAALYERLAVEAS.VT	663
MaMYC2	YYASVSVKDLMIQQTVMSSSVYTOEQLAALYERLVAETPPFS	689
PdMYC2	YYASVSVKDLMIQQTVMSSSVYSEQLAALYERVGEPPS...S	686

下划线表示 bHLH-MYC-N, 方框表示 HLH, *表示 E-box 结合位点; AcMYC2、MaMYC2、PdMYC2 分别来自于菠萝 (OAY65075.1)、芭蕉 (XP_009401251.1)、凤仙草 (XP_008796257.1)

The horizontal line marks bHLH-MYC-N, HLH was marked with frame and E-box binding site was marked with *; AcMYC2, MaMYC2, PdMYC2 were from *Ananas comosus* (OAY65075.1), *Musa acuminata* (XP_009401251.1), and *Phoenix dactylifera* (XP_008796257.1) respectively

图 3 AvMYC4b 多序列比较

Fig. 3 Alignment of deduce amino acid sequence of AvMYC4b

择相似度较高的物种与 AvMYC4b 构建进化树, 其中与芭蕉以较短的遗传距离被聚为一支, 与菠萝、油棕也处于较近的遗传距离, 其中阳春砂、芭蕉、油棕、菠萝都属于单子叶植物纲 (图 4)。

3.3 pDEST17-AvMYC4b 重组表达载体的构建

将 AvMYC4b ORF 连接到 Gateway 入门载体

pENTR/D 中, 构建克隆载体重组质粒 pENTR/D-AvMYC4b, 经过 PCR 筛选 (图 5-A), 获得插入片段大小正确且为正向插入的重组质粒, 测序表明重组质粒 pENTR/D-AvMYC4b 的 AvMYC4b 基因序列与目的基因 AvMYC4b 的 ORF 序列完全一致。

将 pENTR/D-AvMYC4b 与原核表达载体 pDEST17

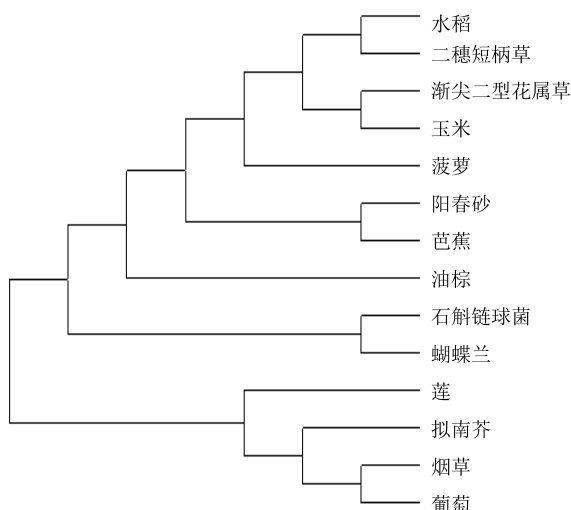


图 4 AvMYC4b 的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of AvMYC4b

进行 Gateway LR 反应, 构建 pDEST17-AvMYC4b, 经过 PCR 验证 (图 5-B), 获得插入片段大小正确且为正向插入的重组质粒, 测序结果显示重组质粒 pDEST17-AvMYC4b 的 AvMYC4b 基因序列与目的基因 AvMYC4b 的 ORF 序列完全一致, 证明表达载体 pDEST17-AvMYC4b 构建成功。

3.4 AvMYC4b 原核表达——蛋白诱导和纯化

将含有 pDEST17-AvMYC4b 重组子的大肠杆菌 Rosetta (DE3) 菌种接种于含有抗生素的 LB 培养基中扩大培养, 待菌液浓度 A_{600} 为 0.4 时, 加入 IPTG 和阿拉伯糖, 在 16 °C 下诱导培养 20 h, 收集菌体。利用 NI-NTA 柱子进行蛋白纯化, 纯化后的蛋白由 SDS-PAGE 电泳检测结果可见, 蛋白条带大小约 80 000, 符合预测大小 (图 6)。由于表达的融合蛋白包含了载体上的部分编码氨基酸序列和 His 标

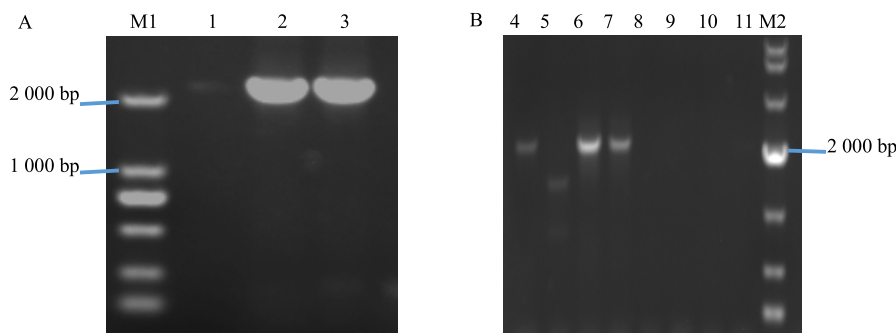


图 5 克隆载体 pENTR/D-AvMYC4b (A) 及表达载体 pDEST17-AvMYC4b (B) 的构建
M1-Marker 1~3-pENTR/D-AvMYC4b 菌液 PCR 检测产物 M2-DL10 000 DNA marker 4~11-pDEST17-AvMYC4b 菌液 PCR 检测产物
M1-Marker 1~3-The PCR product from pENTR/D-AvMYC4b bacteria solution M2-DL10 000 DNA marker 4~11-The PCR product from pDEST17-AvMYC4b bacteria solution

图 5 克隆载体 pENTR/D-AvMYC4b (A) 及表达载体 pDEST17-AvMYC4b (B) 的构建
Fig. 5 Construction of cloning vector pENTR/D-AvMYC4b (A) and expression vector pDEST17-AvMYC4b (B)

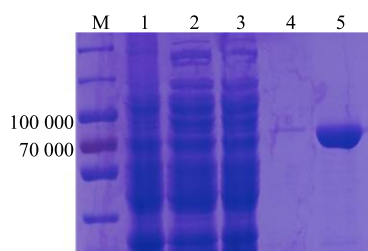


图 6 AvMYC4b 纯化蛋白的 SDS-PAGE 结果
M-Marker 1-IPTG 诱导的含有 pDEST17-AvMYC4b 的 Rosetta (DE3) 菌株的总蛋白 2-上清蛋白 3-穿透蛋白 4-纯化蛋白洗脱第 1 管 5-纯化蛋白洗脱第 2 管
M-Marker 1-total protein after IPTG inducing 2-soluble protein 3-no-binding protein 4-purified AvTPS1 recombinant protein in the 1st collected tube 5-purified AvTPS1 recombinant protein in the 2nd collected tube

图 6 AvMYC4b 纯化蛋白的 SDS-PAGE 结果
Fig. 6 Purification protein of AvMYC4b by SDS-PAGE electrophoresis

签, 因此电泳条带比 AvMYC4b 预测蛋白分子大小 (72 211) 略大。结果证明该体系适合 AvMYC4b 原核蛋白的表达和纯化。

4 讨论

砂仁为传统的中药材之一, 为《中国药典》收载的中药, 为中医临床常用药, 广泛用于治疗湿浊中阻、脘痞不饥、脾胃虚寒、呕吐腹泻、胎动不安等, 其中姜科植物阳春砂是砂仁的重要来源之一^[18]。阳春砂的主要药用成分为挥发性萜类化合物, 包括乙酸龙脑脂、龙脑等^[19], 目前对阳春砂的萜类合成途径相关的调控基因研究较少。

本课题组以阳春砂转录组数据结合代谢组数据筛选出了若干个预测与萜类合成相关的转录因子 unigene, 其中包括 AvMYC4b (Unigene0074125)。

根据候选基因的相对表达量 RPKM 分析, AvMYC4b 在各个部位表达相对较高^[17]。由于考虑实验操作的可行性, 本研究从阳春砂的叶片提取 RNA, 通过 RACE 技术获得 AvMYC4b 的全长序列。通过氨基酸序列分析, AvMYC4b 属于 bHLH 转录因子中的 MYC 家族, 具有 MYC 转录因子典型保守结构域, 包括 bHLH_MYC-N 端、螺旋-环-螺旋 (HLH) 保守结构域以及 E-Box 结合位点, 使用 PSORT 网站预测 AvMYC4b 定位于细胞核, 这些都符合 MYC 类转录因子的共性。MYC 家族参与了生长发育、抵抗环境胁迫等生物学过程, 也参与了 JA、水杨酸等信号转导, 同时也参与了次生代谢途径的调控^[2]。通过生物信息学分析, 发现阳春砂与芭蕉的遗传距离较近, 且 AvMYC4b 与芭蕉的 MYC2 较为相似。其中 MYC2 是 bHLH 家族研究较多的基因之一, 模式植物拟南芥对 MYC2 的研究已经十分透彻, 有文献报道其参与了 JA 途径的信号转导, 同时也与 DELLA 蛋白相互作用调节了倍半萜酶基因 AtTPS21 和 AtTPS11 的表达, 表明了 MYC2 在拟南芥中也参与萜类合成调控^[5]。除了拟南芥、青蒿 *Artemisia annua* L. 由于能产生倍半萜内酯青蒿素, 被广泛用于治疗疟疾, Shen 等^[20]在青蒿中发现了 AaMYC2 基因在 JA 信号通路中正调节青蒿素的生物合成。因此在阳春砂中笔者也推测 AvMYC4b 能够参与阳春砂挥发性萜类次生代谢的调控。

目前, 大肠杆菌系统是异源蛋白表达的首选表达系统, 易培养且费用低, 可利用 IPTG 诱导启动子的质粒表达外源蛋白。表达载体 pDEST17 是 Gateway 系统中的常用表达载体, 带有 His 标签, 即 5 个组氨酸, 多聚组氨酸能与多种过渡金属螯合物结合, 因此带 His 标签的融合蛋白能结合 Ni-NTA 柱子上的 Ni²⁺树脂, 再选择合适的缓冲液和不同浓度的咪唑就可以洗脱杂蛋白和收集目标蛋白^[21]。很多文献都报道了蛋白纯化的技术, 但是不同基因的蛋白表达系统需要进行摸索。本研究在最初摸索最佳蛋白表达体系时, 尝试了 30 °C 诱导 8 h、16 °C 诱导 20 h, 发现 16 °C 诱导 20 h 的可溶蛋白产量大于 30 °C 诱导 8 h, 证明低温对可溶蛋白的产量有促进作用。对于纯化实验中蛋白的纯度, 在多次的实验中, 发现不同缓冲液体系和不同体系的咪唑浓度起到了关键作用, 其中 PBS 缓冲液优于 Tris-HCl 体系, 能明显地减少特异性条带的结合, 再者, 在裂解缓冲液中加入低浓度咪唑也能降低非特异性蛋

白的结合并增加特异性条带结合在镍柱上, 增加后续得到蛋白的纯度。

本研究通过 RACE 技术和 PCR 技术获得 AvMYC4b 全长序列, 成功构建其克隆载体 pENTR/D-AvMYC4b 和表达载体 pDEST17-AvMYC4b, 并通过在 16 °C 下以 IPTG 和阿拉伯糖诱导, 成功分离纯化得到单一的 AvMYC4b 重组蛋白, 为后续对 AvMYC4b 基因的功能鉴定提供了条件。本研究也建立了一套成熟的蛋白纯化体系, 为其他基因包括阳春砂萜类合酶和转录因子的蛋白纯化奠定了基础。

参考文献

- [1] 王传琦, 孔稳稳, 李 晶. 植物转录因子最新研究方法 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(1): 118-123.
- [2] 高 珂, 王 玲, 吴素瑞, 等. 调控药用植物药效成分合成的转录因子研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3100-3108.
- [3] Pires N, Dolan L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants [J]. *Mol Biol Evol*, 2009, 27(4): 862-874.
- [4] Fernandez-Calvo P, Chini A, Fernandez-Barbero G, et al. The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(2): 701-715.
- [5] Hong G J, Xue X Y, Mao Y B, et al. *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2635-2648.
- [6] Anderson J P, Badruzsaufari E, Schenk P M, et al. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(12): 3460-3479.
- [7] Yadav V, Mallappa C, Gangappa S N, et al. A basic helix-loop-helix transcription factor in *Arabidopsis*, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(7): 1953-1966.
- [8] Mertens J, Pollier J, Vanden B R, et al. The bHLH Transcription Factors TSAR1 and TSAR2 regulate triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiol*, 2016, 170(1): 194-210.
- [9] Zhou Y, Sun W, Chen J, et al. SmMYC2a and SmMYC2b played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia*

- multitorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22852.
- [10] Dombrecht B, Xue G P, Sprague S J, *et al.* MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(7): 2225-2245.
- [11] Woldemariam M G, Dinh S T, Oh Y, *et al.* NaMYC2 transcription factor regulates a subset of plant defense responses in *Nicotiana attenuata* [J]. *BMC Plant Biol*, 2013, 13(73): 1-14.
- [12] Shen Q, Lu X, Yan T, *et al.* The jasmonate-responsive AaMYC2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2016, 210(4): 1269-1281.
- [13] Hichri I, Heppel S C, Pillet J, *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor MYC1 is involved in the regulation of the flavonoid biosynthesis pathway in grapevine [J]. *Mol Plant*, 2010, 3(3): 509-523.
- [14] 胡玉兰, 张忠义, 林敬明. 中药砂仁的化学成分和药理活性研究进展 [J]. *中药材*, 2005, 28(1): 72-74.
- [15] 王 焕, 杨锦芬, 邓 可, 等. 茉莉酸甲酯影响阳春砂挥发性萜类代谢和基因转录 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2014(7): 1528-1536.
- [16] 于安民, 张 敏, 杨锦芬, 等. 阳春砂果实发育过程中可溶性糖及蔗糖代谢酶活性变化规律的研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2014(7): 1497-1504.
- [17] 何雪莹. 基于 RNA-Seq 的阳春砂 JA 信号转导及萜类合成相关转录因子的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [18] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [19] 付 琛, 陈 程, 周光雄, 等. 阳春砂仁化学成分研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2410-2412.
- [20] Shen Q, Lu X, Yan T, *et al.* The jasmonate-responsive AaMYC2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytologist*, 2016(210): 1269-1281.
- [21] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. (第三版) 北京: 科学出版社, 2002.