

研究报告

Research Report

调控蓝色大麦花青素合成代谢的 MYC 基因克隆及序列分析

丁艳慧¹ 席杏媛³ 宗渊^{2,3} 刘明慧¹ 李国明¹ 魏乐^{1*} 刘宝龙^{3*}

1 青海师范大学生命科学院, 西宁, 810008; 2 青海大学农牧学院, 西宁, 810016; 3 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁, 810001

* 共同通信作者, 1312491103@qq.com; blliu@nwipb.cas.cn

摘要 本研究的目的是利用 PCR 方法克隆了大麦中 MYC 转录因子 *HvMYC1*。研究结果表明: 该基因全长 1 668 bp, 编码氨基酸 555 个, 分子量为 61 333.71, 等电点为 8.47, 有两个属于 bHLH 超级因家族的保守区, 该蛋白具有亲水性, 二级结构以 α -螺旋(40.90%)和无规则卷曲(41.44%)为主要部分, *HvMYC1* 蛋白质不通过跨膜区, 在膜外进行作用。蛋白系统进化分析表明, *HvMYC1* 基因与小麦、矮牵牛、水稻等物种中调控花青素合成 MYC 转录因子同源。本研究为解析蓝粒大麦中调控花青素合成代谢基因分子遗传机理提供科学依据, 为大麦花青素的继续深入研究提供参考。

关键词 大麦(*Hordeum vulgare* L.), MYC, 基因克隆, 生物信息学分析

Cloning and Sequence Analysis of MYC Gene Regulating Anthocyanin Biosynthesis in the *Hordeum vulgare* L.

Ding Yanhui¹ Xi Xingyuan³ Zong Yuan^{2,3} Liu Minghui¹ Li Guoming¹ Wei Le^{1*} Liu Baolong^{3*}

1 College of Life Sciences, Qinghai Normal University, Xining, 810008; 2 College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, 810016; 3 Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001

* Co-corresponding authors, 1312491103@qq.com; blliu@nwipb.cas.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.018.000025

Abstract The aim of this study is to clone the transcription factor *HvMYC1* of MYC gene in Barley by PCR. The results showed this gene is 1 668 bp long, encoding 555 amino acids, with a molecular mass of 61 333.71 and isoelectric point of 8.47, have two conserved regions belonging to the bHLH super-gene family, protein has certain hydrophilicity, the second-level structure is mainly composed of alpha helix and irregularly coiled as the most large structure of protein, transmembrane region analysis suggested that the protein might not have a trans-membrane region, but mainly acted outside the membrane. Evolutionary analysis shows: the *HvMYC1* gene is closely related to the regulatory genes of maize, rice and *Arabidopsis thaliana*. This study provides a theoretical basis for the analysis of molecular genetic mechanism of anthocyanin biosynthesis genes in *Hordeum vulgare* L. and for the better utilization of anthocyanin.

Keywords Barley (*Hordeum vulgare* L.), MYC, Gene cloning, Bioinformatics analysis

大麦(*Hordeum vulgare* L.)在世界上最古老作物之一, 其对环境的广泛适应性能使它在艰苦的环境下生长。大麦营养成分丰富, 具有抗氧化抗衰老、预防糖尿病、抗癌、预防心血管疾病等功效(Nirupama et al., 2015)。而有色大麦相较于普通大麦来说, 所含有的花色苷、酚类化合物、蛋白质、人体必需氨基酸

基金项目: 本研究由青海省科技厅创新服务平台项目(2018-ZJ-T08)、青海省重点研发计划(2018-NK-133)和中科院科技服务网络计划(STS 计划)共同资助

引用格式: Ding Y.H., Xi X.Y., Zong Y., Liu M.H., Li G.M., Wei L., and Liu B.L., 2020, Cloning and sequence analysis of MYC gene regulating anthocyanin biosynthesis in the *Hordeum vulgare* L., Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 18(1): 25-30 (丁艳慧, 席杏媛, 宗渊, 刘明慧, 李国明, 魏乐, 刘宝龙, 2020, 调控蓝色大麦花青素合成代谢的 MYC 基因克隆及序列分析, 分子植物育种, 18(1): 25-30)

和微量元素等营养成分更高(张明生等, 2001; 张想平等, 2011; 李润喜等, 2012, 甘肃科技, 28(18): 169-171; 申晓蓉等, 2012), 因而近年各界关于有色大麦的研究也越来越注重。蓝粒大麦作为有色大麦的一类, 则是由花青素大量沉积于大麦糊粉层所形成的。

花青素又称花色素, 是植物中普遍存在的一种天然性水溶色素, 是一种类黄酮化合物。花瓣中花青素的积聚能够作为媒介进行传粉, 而且花青素在提高植物耐逆境胁迫能力等方面扮演重要角色(Ballare, 2003)。同时由于花青素具有预防心血管疾病、调节免疫活性、抗肿瘤及突变等功能(王辉等, 2009, 茶叶, 35(4): 203-206), 使其在食品、保健及医药等方面的作用越来越受到重视。同时花青素还是一种简单、安全和肉眼直接可辨转基因筛选标记(畅姣等, 2016)。花青素的生物合成是由一个复杂的次生代谢途径实现的。

参与花青素合成相关的转录因子主要有三类: MYB 类、bHLH 类和 WD40 类, 它们组成而成的蛋白复合体与结构基因的启动子相结合, 起到了调控大部分植物的花青素的作用。bHLH 转录因子在多种植物中广泛存在, 是构成真核生物蛋白的一个大家族(姚攀锋等, 2016), 植物 bHLH 转录因子在植物体内具有重要作用, 如花器官发育(Heisler et al., 2001)、光形态建成(Leivar et al., 2008)等, 而其最重要的功能之一就是调节类黄酮以及花青素的合成。1989 年发现的调控玉米花青素合成的 ZmR1 蛋白是第一个被发现的 bHLH 转录因子(Feller et al., 2011)。bHLH 蛋白一般通过形成 MBW 复合(TT2-TT8-TTG1 复合物)来调控拟南芥中营养器官中花青素和种子原花青素的合成(Baudry et al., 2004)。对水稻的研究表明, 水稻的紫色果皮特征是由 *Ra* 基因外显子缺失引起的(Wang and Shu, 2007)。小麦中具有较高转录水平的一类 bHLH 转录因子 ThMYC4E 作为控制蓝粒性状的 Ba1 的候选基因, 其功能也已得到验证(Li et al., 2017)。本研究则是通过对蓝粒大麦和白粒大麦进行转录组分析比较, 在蓝粒大麦的花青素合成途径中选取具有较高转录水平的一类 bHLH 转录因子 *HvMYC1*, 将其作为候选基因进行分离克隆以及生物信息学分析, 为 大麦花青素合成代谢的继续深入研究提供依据。

1 结果与分析

1.1 *HvMYC1* 基因的序列分析

通过 BLAST 程序在 NCBI 上将获得的的目的基因片段进行同源搜索比对发现了 *HvMYC1* 基因的全

长片段。使用 ExPASy-Protparam 软件分析出该基因全长 1 668 bp。推测该基因的开放阅读框编码为 555 个氨基酸, 起始密码子是 ATG, 终止密码子是 TAG。分子量为 61 333.71, 等电点为 8.47, 不稳定指数(Instability index)为 51.11, 脂肪指数(Aliphatic index) 79.91。正电荷残基数是 67 个, 负电荷残基数是 63 个。

1.2 *HvMYC1* 蛋白能域及亲水性的分析

利用 NCBI 的 BlastP 在线比对软件, 在蛋白质保守区数据库进行蛋白质保守区预测。结果显示, 该基因具有两个属于 bHLH 超基因家族的保守区, 分别为 bHLH-MYC 和 HLH 保守区, 第一个保守区是从第 21 个氨基酸到第 201 个氨基酸, 为 180 个氨基酸长度, 第二个保守区是从第 373 个氨基酸到 425 个氨基酸, 为 52 个氨基酸长度(图 1)。用 ProtScale 在线软件进行亲疏水性预测, 预测结果显示蛋白质疏水性的平均值为 -0.371 (图 2), 说明这些蛋白质具有一定的亲水性。

1.3 *HvMYC1* 二级结构及蛋白质跨膜分析

使用 SOPMA 工具分析其二级结构, 发现主要以 α -螺旋(40.90%)和无规则卷曲(41.44%)为主, 其次还有延伸链(13.51%)、 β -转角(4.14%) (图 3)。用 TMHMM-2.0 在线软件分析跨膜区, 结果显示该蛋白质不具有跨膜区, 在膜外进行作用(图 4)。

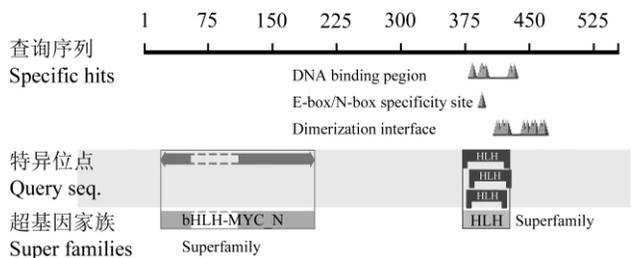


图 1 *HvMYC1* 保守结构域分析

Figure 1 *HvMYC1* conserved domains analysis

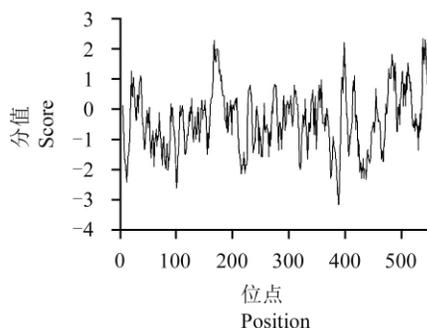
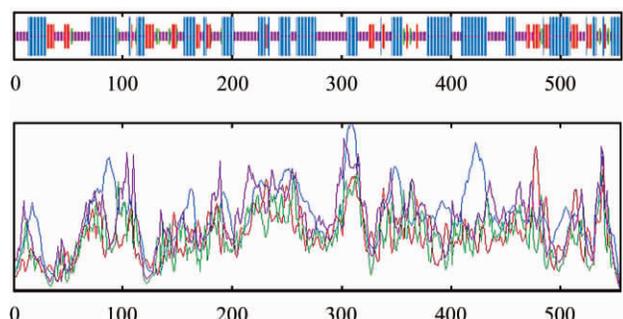


图 2 *HvMYC1* 的疏水性, 亲水性分析

Figure 2 Hydrophobic, hydrophilic analysis of *HvMYC1*

图 3 *HvMYC1* 的二级结构的预测分析

注: 蓝色: α -螺旋; 紫色: 无规则卷曲; 红色: 延伸链; 绿色: β -转角

Figure 3 The predicted analysis secondary structure of *HvMYC1*
Note: Blue: Alpha helix; Purple: Random coil; Red: Extended strand; Green: Beta turn

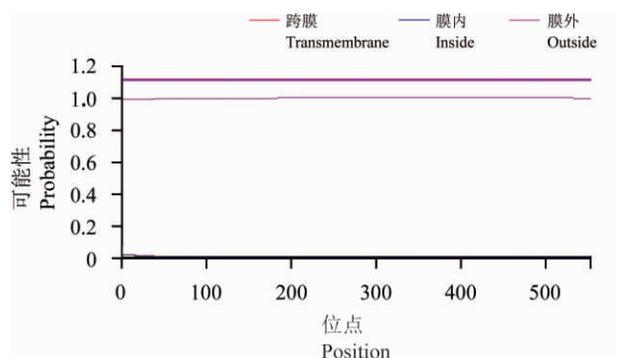


图 4 蛋白质序列跨膜区分析

Figure 4 Transmembrane domain analysis of protein

1.4 SIAN2 亲缘性分析与多序列比对

利用 MEGA4 软件对该基因与其它植物的氨基酸序列进行对比并构建系统进化树(图 5), 结果显示, 大麦中 MYC 转录因子调控的 *HvMYC1* 基因与玉米、水稻、拟南芥等物种的调节基因具有很近的亲缘关系。在蛋白质数据库中用大麦 *HvMYC1* 的氨基酸序列与亲缘关系近的几种物种的氨基酸序列进行同源性比对, 结果显示大麦 *HvMYC1* 基因与小麦的 *ThMYC4E* 基因的氨基酸序列相似度为 88%, 与小麦 *TaMYC1* 基因的氨基酸序列相似度为 58% (图 6)。

2 讨论

本研究从大麦中克隆得到 *HvMYC1* 基因, 并通过核苷酸和氨基酸序列结构分析, 证明 *HvMYC1* 基因是花青素转录因子基因。而前人对于水稻有色基因的研究已经更加深入, 包括可以使用不同的遗传群体对水稻的有色基因进行遗传分析以及分子标记定位, 甚至还可以克隆出控制水稻颜色的基因。但目前

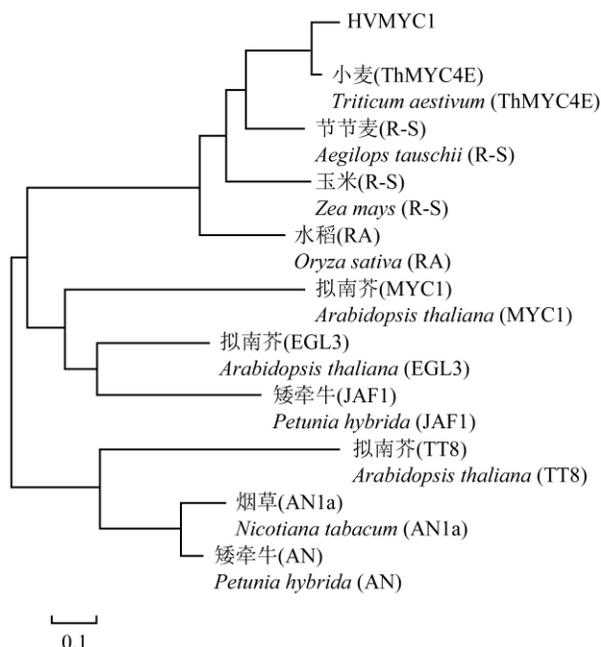


图 5 蛋白系统的进化树

Figure 5 The protein phylogenetic tree

关于蓝色大麦相关基因的遗传学研究尚不足, 关于蓝色大麦相关基因的遗传机理也还有待于进一步的深入研究。蓝色大麦具有很大的利用前景, 例如其所含丰富的营养成分、强大的保健功能及其天然色素可以作为食品加工及保健等行业的食品添加剂使用, 同时也可作为特殊的种质资源来培育新型杂交优良品种等。

作为调控花青素代谢的重要转录因子, 对于 bHLH 类转录因子的研究还主要集中在拟南芥、矮牵牛、玉米等模式生物, 而对于大麦的研究则较少, 因此本实验主要是进行大麦 bHLH 转录因子的克隆及序列分析。目前 bHLH 类转录因子在其它植物花青素合成代谢中有相应的研究。

第一个 bHLH 转录因子是 1989 年在玉米中发现的, 玉米 ZmR1 蛋白通过形成二聚体, 使 MYB 蛋白 ZmC1 和 WD40 蛋白 WDR 与它结合, 继而调控花青素的合成(Feller et al., 2011)。在小麦中, 具有较高转录水平的一类 bHLH 转录因子 ThMYC4E 作为控制蓝粒性状的 Ba1 的候选基因, 其功能已得到验证(Li et al., 2017)。刘迪等(2017, 热带作物学报, 38(7): 1295-1032)依照玉米花青素转录因子基因 RS 序列设计引物, 运用同源克隆技术获得甘蔗花青转录因子基因 *ScRS* 的全长序列, 通过基因枪转化对其进行了初步的功能验证。甘蔗 *ScRS* 基因的开放读码框长为 1722 bp, 共编码 573 个氨基酸, 理论分子量为

62 550.90, 这些均与大麦 *HvMYC1* 基因相似, 并且甘蔗 ScRS 蛋白含有 bHLH-MYC (第 11~203 氨基酸) 和 HLH (第 382~432 氨基酸) 结构, 大麦 *HvMYC1* 蛋白中也含有 bHLH-MYC (第 21~201 氨基酸) 和 HLH (第 373~425 氨基酸) 结构, 这是花青素调控因子的共有特征, 进一步证明大麦 *HvMYC1* 基因确实为花青素调控因子基因。

3 材料与方法

3.1 材料

供试材料蓝粒大麦‘肚里黄’和白粒大麦‘昆仑 10’是来自于中国科学院西北高原生物研究所培育保存的大麦品种(图 7), 选取颗粒饱满的种子放入培养皿, 在恒温箱中培养, 于开花后 28 d 剥取籽粒的蓝色糊粉层, 所有样品液氮冻存后保存于 -80°C 。

3.2 植物基因组 RNA 及 cDNA 准备

采用 MininBEST Universal RNA Extraction (Takara) 快速提取‘肚里黄’籽粒蓝色糊粉层的总 RNA (图 8)。利用 NANODROP 2000C (Thermo) 检测样品蓝粒大麦‘肚里黄’和白粒大麦‘昆仑 10’的 RNA 浓度。取 $3\ \mu\text{g}$ 提取的大麦 RNA, 使用 cDNA 反转录试剂盒 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Ther-



图 7 实验材料蓝粒大麦‘肚里黄’(A)和白粒大麦‘昆仑 10’(B)
Figure 7 Experimental material blue barley 'Yellow belly' (A) and white barley 'Kunlun10' (B)

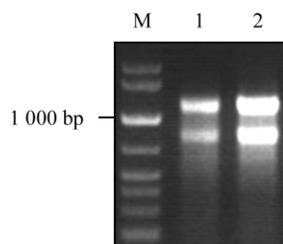


图 8 蓝粒大麦和白粒大麦 RNA 提取检测

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 肚里黄; 2: 昆仑 10

Figure 8 Extraction of RNA from blue barley and white barley

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Yellow belly; 2: Kunlun10

moFisher Scientific) 将大麦 RNA 反转录为 cDNA 备用。

3.3 *HvMYC1* 基因的分离

基于 bHLH 转录因子编码区序列转录本分析, 利用 Primer Premier 5.0 软件 (Premier Biosoft, Palo Alto, 加拿大) 设计特异性引物 *HvMYC1*-F (ATGGCGC TATCAGCTCCTC) 和 *HvMYC1*-R (CTATAGAGCTC TCTGAAGCGC) 扩增 *HvMYC1* 编码区(图 9)。选取其它各个物种 MYC 转录因子, 通过对核苷酸序列的生物学信息分析, 预测 *HvMYC1* 基因的功能。

PCR 扩增利用 PCR 仪 Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems), 所用的酶为高保真酶 high-fidelity Phusion DNA polymerase (中国上海), 经过以下步骤完成: 第一步预变性 98°C , 时间 2 min; 第二步 32 个循环: 98°C 时间 10 s, 59°C 时间 30 s, 72°C 时间 2 min; 第三步延伸 72°C , 时间 10 min。所得到的 PCR 产物经过 1% 的琼脂糖凝胶电泳用 Tiangen TIANgel Midi 纯化试剂盒 (Tiangen) 得到胶回收产物。产物中加入 $0.2\ \mu\text{L}$ 的 *Taq* DNA polymerase (Tiangen) 72°C 10 min 加 A, 利用 pGEM-T Easy 克隆载体进行 T 连接, 将连接后的产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 涂在氨苄抗性的 LB 培养基上, 放于暗培养 12 h, 温度为 37°C , 并从中筛选出 5 个阳性克隆进行穿刺, 最后送至华大公司进行基因序列测序。

3.4 基因序列及其编码蛋白的分析

本研究通过使用 Vector NTI Suite 9.0 软件去除载体序列, 得到目的基因片段, 使用 NCBI 在线数据库进行同源比对, 之后利用 ExPaSy-ProtParam 在线软件分析大麦 *HvMYC1* 基因的 cDNA 序列开放阅读框并且推测其相应的氨基酸序列。使用 NCBI 的 BlastP (<https://acronyms.thefreedictionary.com/BLASTP>) 在线比对软件在蛋白质保守区数据库中, 利用目的基因的氨基酸序列推测蛋白质保守区; 使用 ProScale 在

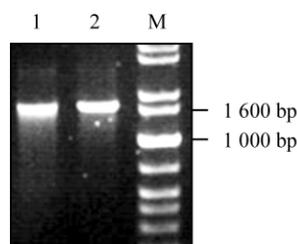


图 9 蓝粒大麦和白粒大麦 cDNA PCR 扩增产物的电泳检测

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 肚里黄; 2: 昆仑 10

Figure 9 Electrophoresis plot of amplified products of cDNA PCR of blue barley and white barley

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Yellow belly; 2: Kunlun10

线软件预测其氨基酸序列的蛋白质疏水性。使用 TMHMM-2.0 软件分析蛋白质序列的跨膜区。使用 MEGA4 在线软件将大麦 *HvMYC1* 基因与其它植物调节基因的氨基酸序列进行多序列对比, 用得到的氨基酸序列在蛋白质数据库中与亲缘关系较近的几种物种的氨基酸序列进行同源性比较。

作者贡献

丁艳慧是本研究的实验设计者和实验研究和的执行人, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 席杏媛, 李国明, 刘明慧参与实验设计, 试验结果分析; 刘宝龙是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析; 魏乐和宗渊指导论文写作和修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由青海省科技厅创新服务平台项目(2018-ZJ-T08)、青海省重点研发计划(2018-NK-133)和中科院科技服务网络计划(STS 计划)共同资助。

参考文献

- Ballare C.L., 2003, Stress under the sun: spotlight on ultraviolet-B responses, *Plant Physiol.*, 132(4): 1725-1727
- Baudry A., Heim M.A., Dubreucq B., Caboche M., Weisshaar B., and Lepiniec L., 2004, TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, 39(3): 366-380
- Chang J., Chen T., Huang T.D., Huang H.S., and Hua Y.W., 2016, Anthocyanin accumulation induced by MeJA in somatic embryo of rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(11): 3115-3121 (畅姣, 陈涛, 黄天带, 黄华孙, 华玉伟, 2016, 茉莉酸诱导橡胶树体细胞胚花青素的累积, *基因组学与应用生物学*, 35(11): 3115-3121)
- Feller A., Machemer K., Braun E.L., and Grotewold E., 2011, Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors, *Plant J.*, 66(1): 94-116
- Heisler M.G.B., Atkinson A., Bylstra Y.H., Walsh R., and Smyth D.R., 2001, SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein, *Development*, 128(7): 1089-1098
- Leivar P., Monte E., Oka Y., Liu T., Carle C., Castillon A., Huq E., and Quail P.H., 2008, Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness, *Curr. Biol.*, 18(23): 1815-1823
- Li N., Li S.M., Zhang K.P., Chen W.J., Zhang B., Wang D.W., Liu D.C., Liu B.L., and Zhang H.G., 2017, *Thmyc4e*, candidate *blue aleurone 1* gene controlling the associated trait in *Triticum aestivum*, *PLoS One*, 12(7): e0181116
- Nirupama G., Hossain M.B., Rai D.K., and Brunton N.P., 2015, A review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies, *Molecules*, 20(6): 10884-10909
- Shen X.R., Fan M.Y., Chen L., Li F.M., Reng L., Ye Y.L., and Wei Z.Y., 2012, Comparative analysis of nutritional composition between black barley and white barley, *Xinan Minzu Daxue Xuebao (Journal of Northwest University for Nationalities (Natural Science))*, 33(1): 30-34 (申晓蓉, 樊梦原, 陈莉, 李方敏, 任丽, 叶永丽, 韦紫玉, 2012, 黑大麦与白大麦营养成分对比分析, *西北民族大学学报(自然科学版)*, 33(1): 30-34)
- Wang C.X., and Shu Q.Y., 2007, Fine mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene *Pb* in rice (*Oryza sativa* L.), *Chinese Science Bulletin*, 52(22): 3097-3104
- Yao P.F., Zhao X.R., Li M.F., Wang A.H., and Wu Q., 2016, Cloning and expression analysis of transcription factor gene *FibHLLH3* from *Fagopyrum tataricum* under abiotic stress, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(2): 429-435 (姚攀锋, 赵学荣, 李茂菲, 王安虎, 吴琦, 2016, 苦荞转录因子基因 *FibHLLH3* 的克隆及其非生物胁迫下的表达分析, *基因组学与应用生物学*, 35(2): 429-435)
- Zhang M.S., Zhou J.C., Wu C., and Guo J., 2001, The utilization value of black barley and its development strategy, *Damai Kexue (Barley Science)*, 41(1): 9-10 (张明生, 周加春, 吴春, 郭军, 2001, 黑色大麦的利用价值及其发展对策, *大麦科学*, 41(1): 9-10)
- Zhang X.P., Lei Y.H., He Q.X., and Wu L.L., 2011, Analysis on characteristic and nutrition quality of black and waxy barley, *Zhongzi (Seed)*, 30(9): 85-86 (张想平, 雷耀湖, 何庆祥, 毋玲玲, 2011, 黑糯大麦的品种特性及营养品质分析, *种子*, 30(9): 85-86)