

研究报告

Research Report

小黑麦中调控花青素合成代谢的 MYC 基因克隆及序列分析

李国明¹ 宗渊^{2,3} 席杏媛³ 刘明慧¹ 丁艳慧¹ 郭李智¹ 曹东^{2,3} 毛成志³ 李建民^{1*} 刘宝龙^{3*}

1 青海师范大学生命与地理科学学院, 西宁, 810008; 2 青海大学, 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 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, beyond_3862740@163.com; blliu@nwipb.cas.cn

摘要 为了研究蓝粒小黑麦糊粉层中控制花青素合成的关键基因 *BcMYC1*。本研究使用 PCR 方法克隆小黑麦中 MYC 转录因子 *BcMYC1*。结果表明, 小黑麦 *BcMYC1* 基因全长 1 683 bp, 编码的氨基酸 560 个, 分子量 61 870 Da, 等电点 4.71, 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(39.64%)和不规则盘绕(43.93%)为主要的部分, *BcMYC1* 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, 小黑麦的 *BcMYC1* 基因与小麦、矮牵牛、水稻等物种 MYC 调节基因的亲缘关系很高。本研究关于小黑麦中调控花青素合成代谢 *BcMYC1* 基因分子遗传机理, 为小黑麦的花青素的研究提供参考作用。

关键词 小黑麦, MYC, 基因克隆, 生物信息学分析

Cloning and Sequence Analysis of MYC Gene Regulating Anthocyanin Biosynthesis in Triticale

Li Guoming¹ Zong Yuan^{2,3} Xi Xingyuan³ Liu Minghui¹ Ding Yanhui¹ Guo Lizhi¹ Cao Dong^{2,3} Mao Chengzhi³ Li Jianmin^{1*} Liu Baolong^{3*}

1 College of Life and Geographical Sciences, Qinghai Normal University, Xining, 810008; 2 State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, 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, beyond_3862740@163.com; blliu@nwipb.cas.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.018.000031

Abstract In order to study the key gene *BcMYC1* of anthocyanin synthesis in the aleurone layer of small blue triticale. In this paper, MYC transcription factor *BcMYC1* in triticale was cloned by PCR. The results showed that the length of *BcMYC1* gene in triticale was 1 683 bp, the encoding amino acid was 560, and the molecular weight was 61 870 Da, isoelectric point 4.71. there are two conserved regions of bHLH superfamily. The protein is hydrophilic. The secondary structure is mainly composed of α -helix (39.64%) and irregular coiling (43.93%) as the main part of *BcMYC1* protein acting outside the membrane without passing through the transmembrane region. The phylogenetic analysis showed that the *BcMYC1* gene of triticale is closely related to the MYC regulatory gene of wheat, petunia, rice and other species. The molecular genetic mechanism of *BcMYC1* gene regulating anthocyanin biosynthesis in triticale was studied in this paper, which provides a reference for the study of anthocyanins in triticale.

Keywords Triticale, MYC, Gene cloning, Bioinformatics analysis

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)、中科院科技服务网络计划(STS 计划)、中国科学院“西部青年学者”B 类项目和青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室开放课题(2018-KF-06)共同资助

引用格式: Li G.M., Zong Y., Xi X.Y., Liu M.H., Ding Y.H., Guo L.Z., Cao D., Mao C.Z., Li J.M., and Liu B.L., 2020, Cloning and sequence analysis of MYC gene regulating anthocyanin biosynthesis in triticale, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 18 (1): 31-36 (李国明, 宗渊, 席杏媛, 刘明慧, 丁艳慧, 郭李智, 曹东, 毛成志, 李建民, 刘宝龙, 2020, 小黑麦中调控花青素合成代谢的 MYC 基因克隆及序列分析, 分子植物育种, 18(1): 31-36)

小黑麦是结合小麦的高产和黑麦抗逆性强的优点,经人工杂交培育的一个新品种,其可作饲料,也可用于生态修复(王白羽, 2010)。小黑麦籽粒的颜色有多种,如蓝色、白色和紫色,有色小黑麦种子是植物色素的天然来源,用作食品添加剂和稳定剂(Giusti and Wrolstad, 2003)。与无色种子相比,有色种子含有较高水平的花青素,其提取物具有较强的抗氧化能力(Liu et al., 2010)。籽粒颜色的表达随色素在籽粒不同部位的积累而变化,小黑麦籽粒分为种皮、胚、胚乳和果皮四个部分,由于糊粉层属于胚乳的一部分,蓝色糊粉层颜色的表达取决基因的剂量,白色种子性状有隐形基因决定。而控制小黑麦蓝色籽粒性状主效基因尚不清楚。

花青素(Anthocyanidin)是一种水溶性天然色素,属于植物次生代谢产生的类黄酮化合物。植物花青素的合成受到很多因素的影响,如光照(Albert et al., 2009)、温度(Islam et al., 2005)等。花青素的合成由多个结构基因来调控,这些结构基因的表达直接受控 MYB、bHLH 和 WD40 三类转录因子形成的 MBW 复合体(朱小亚等, 2015)。MYC 基因家族的转录因子是激活植物类黄酮生物合成所需的组成部分(Shoeva, 2018)。小麦 *TaMyc1* 基因编码的转录因子属于 bHLH 结构域,该基因在紫色小麦中表达并激活花青素生物合成结构基因的转录(Shoeva, 2018)。蓝粒小麦性状只分布于六倍体中,控制蓝粒糊粉层花青素合成主效基因 *ThMYC4E* 已被分离并验证(Li et al., 2017)。*ThMYC4E* 具有 bHLH 转录因子的结构域,通过构建系统发育树发现 *ThMYC4E*,其属于调节花青素生物合成的分支(Li et al., 2017)。矮牵牛中花青素合成的调控基因 *JAF13* 编码 bHLH 转录因子,其编码的 bHLH 蛋白 *JAF13* 与玉米的 *Lc* 具有高度同源性(刘仕芸, 2007)。本研究通过分离白粒和蓝粒小黑麦中控制花青素合成候选基因 *BcMYC1*, 鉴定该基因是否与花青素合成相关。

1 结果与分析

1.1 *BcMYC1* 基因的序列分析

在 NCBI (www.Ncbi.Nlm.Nih.gov) 中使用 BLAST 软件将目的片段进行同源比对找到了 *BcMYC1* 基因。用 ExPaSy-ProtParam 软件进行分析,小黑麦 *BcMYC1* 基因全长 1 683 bp,推测出该基因的开放阅读框编码 560 个氨基酸。分子量 61 870 Da,等电点 4.71,不稳定指数 (Instability) 为 50.58,脂肪指数 (Aliphatic in-

dix) 为 78.71。正电荷残基数是 61 个,负电荷残基数是 66 个,结果表明蓝粒小黑麦的 *BcMYC1* 基因成功分离。

1.2 *BcMYC1* 蛋白能域及亲水性的分析

使用 NCBI 中的 BlastP 在线比对,在蛋白质保守区数据库中进行预测蛋白质保守区。结果表明, *BcMYC1* 基因具有两个属于 bHLH 超级基因家族的保守区,含有 bHLH-MYC (第 19~ 第 187 氨基酸)和 HLH (第 382~ 第 444 氨基酸)保守区(图 1),根据 ProtScale 软件进行亲疏水性预测,结果显示亲水性系数为 -0.400,说明该蛋白具有亲水性(图 2)。

1.3 *BcMYC1* 二级结构和蛋白质跨膜分析

蛋白质的活性和功能与其结构有关(李旭娟等, 2015),利用 SOPMA 软件在线分析 *BcMYC1* 基因的二级结构,以 α -螺旋(39.64%)和无规则卷曲(43.93%)为主要的部分,延伸链(11.96%)、 β -转角(4.46%)为补充的部分(图 3)。使用 TMHMM 2.0 软件分析小黑麦 *BcMYC1* 基因的跨膜情况,结果表明 *BcMYC1* 蛋白质不通过跨膜区,在膜外进行作用(图 4)。

1.4 *BcMYC1* 亲缘性分析和多序列比对

使用 MEGA 4 在线软件对 *BcMYC1* 基因与其它植物的氨基酸序列进行比对构建系统进化树(图 5)。结果表明,小黑麦的 *BcMYC1* 基因与小麦、矮牵牛、水稻等物种 MYC 调节基因的亲缘关系很高。根据在蛋白质数据库中得到的该氨基酸序列与亲缘关系近的植物的氨基酸系列同源性比对,结果显示,小黑麦的 *BcMYC1* 基因与小麦的 *ThMYC4E* 基因的氨基酸系列相似度为 85%,与小麦 *TaMYC1* 基因的氨基酸系列相似度为 62%(图 6)。小黑麦的 *BcMYC1* 基因与小麦的 *ThMYC4E* 基因的亲缘关系最近,与小麦 *TaMYC1* 基因的亲缘关系较近。

2 讨论

本研究从小黑麦中克隆得到 *BcMYC1* 基因,并通过生物信息学分析,验证 *BcMYC1* 基因属于 bHLH 转录因子。目前对于小麦中的有色基因的研究有所突破,通过 PCR 技术可以成功分离得到小麦中控制颜色的基因。关于蓝色小黑麦基因的遗传机制尚不明确,而蓝色小黑麦应用前景很广。其富含花青素不仅可以生产天然的色素食品,还可以作为高质量的饲料用于养殖。目前关于 bHLH 转录因子在其它相关的领域也有所研究。在植物中,丁长文(2011)从大

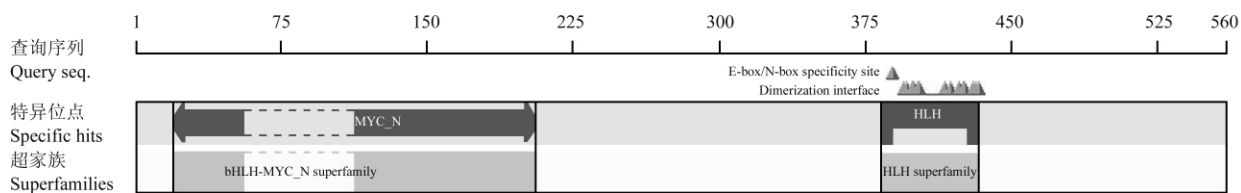


图 1 BcMYC1 保守结构域分析

Figure 1 BcMYC1 conserved domains analysis

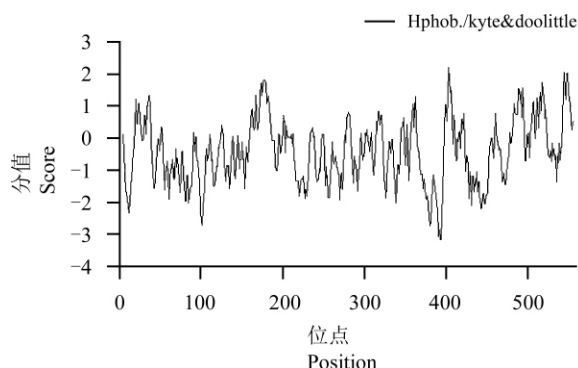


图 2 BcMYC1 亲, 疏水性分析

Figure 2 BcMYC1 affinity, hydrophobic analysis

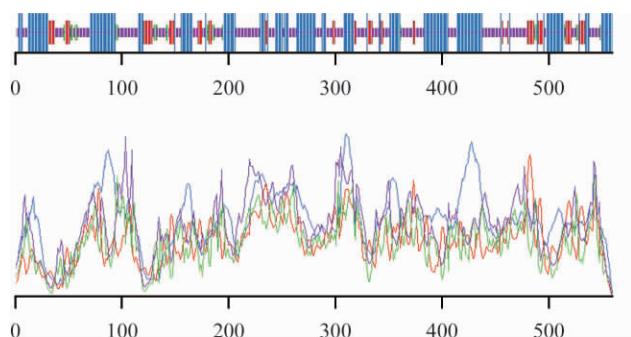


图 3 BcMYC1 的二级结构预测分析

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 Prediction and analysis of secondary structure of BcMYC1

Note: Blue: Alpha helix; Purple: Random coil; Red: Extended strand; Green: Beta turn

豆叶片的 cDNA 中克隆了 7 个大豆 *GmMYCs* 转录因子。使用荧光定量 PCR 检测 *GmMYCs* 在不同器官中的表达, 在大豆叶表达量最高的是 *GmMYC1*、*GmMYC3*、*GmMYC4* 和 *GmMYC5*; 花表达量最高的是 *GmMYC2*; 根表达量最高的是 *GmMYC6*; 茎中表达量最高的是 *GmMYC7*。在植物茉莉酸信号转导途径中 bHLH 转录因子起到主要的调控作用, 根据已知的 bHLH 基因中, 如 *AtMYC2*、*JAMYC2*、*JAMYC10* 等, 在茉莉酸植物的次生代谢中发挥着重要的作用(Botter et al., 2004)。赵胡(2013)从硬紫草中克隆到了 *Le-*

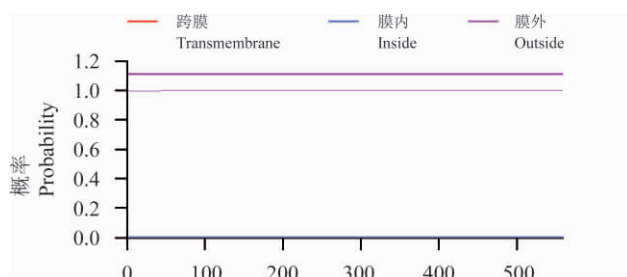


图 4 BcMYC1 蛋白质跨膜分析

Figure 4 Transmembrane analysis of BcMYC1 protein

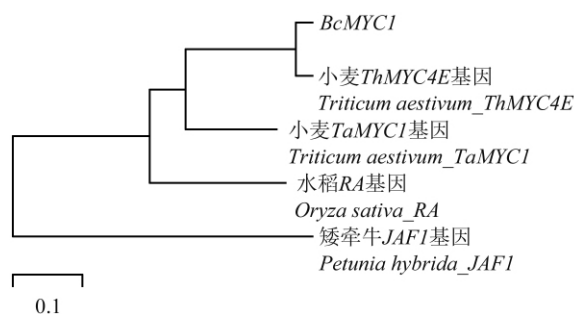


图 5 BcMYC1 蛋白系统进化树

Figure 5 BcMYC1 protein phylogenetic tree

MYC 基因。高丽华等(2017)从陆地棉中分离了一个 *GhMYC4* 基因(GenBank 登录号: KF751654)、黄艳岚(2006)首次从马铃薯紫皮中获得马铃薯 *Stmyc* 基因 cDNA 序列, 这些基因蛋白质功能预测具有 bHLH 结构域, 对该植物的花青素合成代谢起着重要的作用。在动物中, 马倩(2015)从家蚕中克隆了 *BmMyc* 基因序列全长为 1 970 bp, 编码 376 个氨基酸, 分子量为 42.7 kD, 等电点为 6.69, 不稳定指数为 70.44, 脂肪族指数为 69.97; 疏水性系数为 -0.888, 表现出明显的亲水性; 该基因在丝腺组织中表达量较高, 性腺中表达量较低, 其它组织中差别不大。

研究证明 MYC 基因参与植物抗逆胁迫生理反应, 朱作峰等(2005)在水稻克隆了一个水稻 *OsMYC* 基因(GenBank 登录号: AY398581), 在营养器官中表达, 茎秆、根和叶片中表达量逐渐降低。小黑麦主要分布在中国北方, 这种特质是否与 MYC 基因有关, 目前没有研究, 以后研究小黑麦可以作为一个方向。小

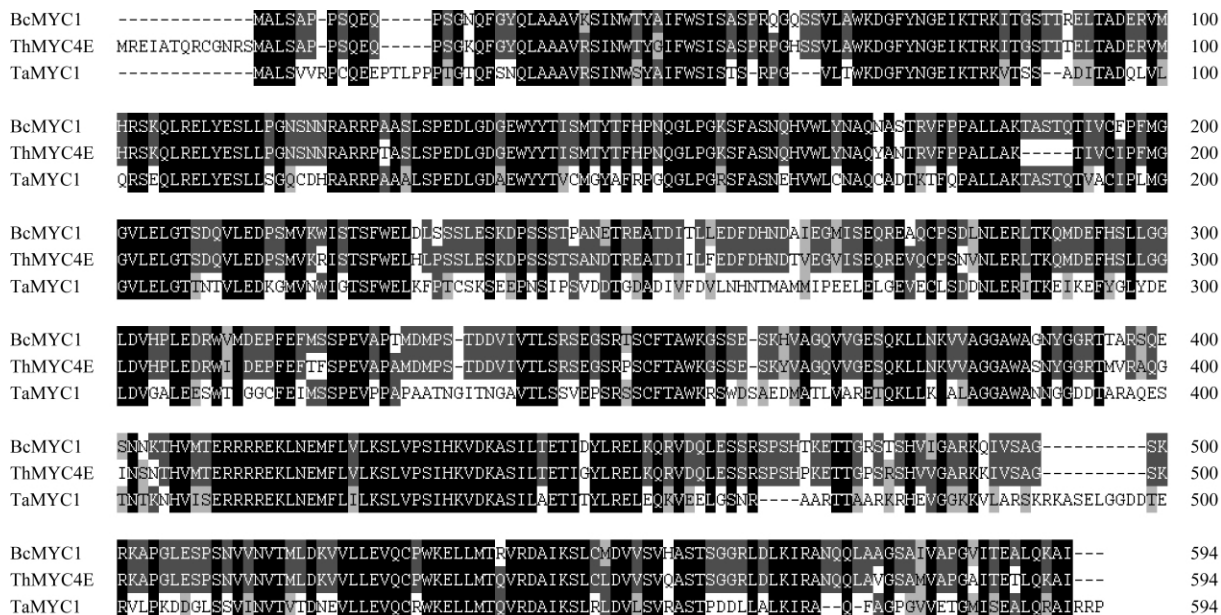


图 6 BcMYC1 与小麦 ThMYC4E, TaMYC1 蛋白的序列比对

Figure 6 Sequence alignment of BcMYC1 and wheat ThMYC4E, TaMYC1 protein

黑麦 *BcMYC1* 的分离有助于更好地理解蓝色糊粉性状的遗传机制以及在小黑麦育种中的有效利用。

3 材料与方法

3.1 试验材料

实验材料来源四川农业大学小麦研究所赠送的‘黑饲麦 1 号’(蓝粒)和‘SHW31’(白粒)(图 7),将种子放入加有适量水的培养皿中,放置 25°C 的光照培养箱中,开花后 28 d 剥取籽粒的糊粉层,放入 -80°C 冰箱,以便后续提取 RNA。

3.2 小黑麦 *BcMYC1* 基因克隆

利用多糖多酚植物总 RNA 快速提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 提取‘黑饲麦 1 号’(蓝粒)和‘SHW31’(白粒)糊粉层的 RNA,取 2 μL RNA (图 8),用 1% 琼脂糖凝胶检测,



图 7 小黑麦样品
Figure 7 Triticale sample

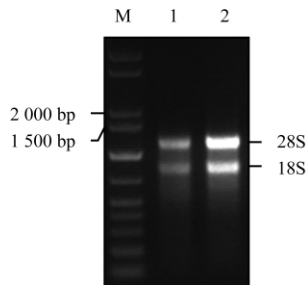


图 8 小黑麦 RNA 检测

注: M: DL2000 DNA Marker; 1: 黑饲麦 1 号; 2: SHW31

Figure 8 RNA detection map of triticale

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: Black feed mai 1; 2: SHW31

使用微量紫外检测仪 NANODROP 2000C (Thermo) 检测 RNA 样品浓度。利用反转录试剂盒 Prime Script RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 将 5 μg 植物总 RNA 反转录为 cDNA。利用 Primer Premier 5.0 软件(Premier Biosoft, Palo Alto, 加拿大)设计特异性引物正向引物: 5'-ATGGCGCTAT CAGCTCCTCC-3', 反向引物: 5'-CTATATAGCTTT CTGAAGCG-3', 片段长度都为 1 683 bp。扩增 *BcMYC1* 基因编码区。使用高保真 DNA 聚合酶(Thermo-Fisher Scientific)在 GeneAmp PCR System 9700 PCR 扩增仪器上扩增该基因组序列及 CDS 序列, PCR 产物点样 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳分离(图 9)。使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒得到胶回收产物。回收产物连接至 pGEM-T Easy (Promega Corporation) 克隆载体, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态, 涂

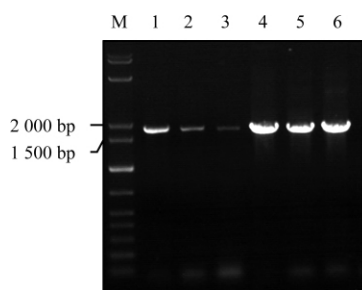


图9 小黑麦 cDNA 的扩增

注: M: DL2000 DNA Marker; 1,2,3: 黑饲麦 1 号的扩增; 4,5,6: SHW31 cDNA 的扩增

Figure 9 Amplification of triticale cDNA

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1,2,3: Amplification of Black feed mai 1 cDNA; 4,5,6: Amplification of SHW31 cDNA

布于氨苄抗性的 LB 培养基, 37°C 恒温培养 12~15 h, 筛选阳性克隆穿刺送至北京华大基因股份有限公司进行测序。使用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取阳性质粒备用。

3.3 小黑麦 *BcMYC1* 基因序列及该编码蛋白分析

使用 Vector NTI Suite 9.0 软件得到去除载体序列的目的基因片段, 使用 NCBI 里的在线数据库进行同源比对, 利用 ExPaSy-Protparam 在线软件分析 *BcMYC1* 基因的 cDNA 序列开放阅读框及推测其氨基酸序列。在 NCBI 的蛋白质保守区数据库中使用 BlastP 在线比对软件, 推测小黑麦 *BcMYC1* 基因的氨基酸序列用来进行蛋白质保守区预测; 对其氨基酸序列进行蛋白质疏水性预测使用 ProScale 在线软件; 对其蛋白质序列的跨膜区分析, 使用 TMHMM 2.0 软件; 小黑麦 *BcMYC1* 基因编码的氨基酸序列码与相关植物 MYC 氨基酸序列的比对, 使用的是 MEGA 4 在线软件; 根据在蛋白质数据库中用得到的小黑麦 *BcMYC1* 基因氨基酸序列同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

李国明是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 完成数据分析、论文初稿的写作; 毛成志、郭李智、丁艳慧和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; 曹东、李建民、宗渊和席杏媛完成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)、中科院科技服务网络计划(STS 计划)、中国科学院“西部青年学者”B 类项目和青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室开放课题(2018-KF-06)共同资助。

参考文献

- Albert N.W., Lewis D.H., Zhang H.B., Irving L.J., Jameson P.E., and Davies K.M., 2009, Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*, *J. Exp. Bot.*, 60(7): 2191-2202
- Boter M., Ruiz-Rivero O., Abdeen A., and Prat S., 2004, Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis, *Genes Dev.*, 18(13): 1577-1591
- Ding C.W., 2011, Cloning and functional analysis of soybean MYC transcription factor, Thesis for M.S., Nanjing Agricultural University, Supervisor: Yu D.Y., pp.62-63 (丁长文, 2011, 大豆转录因子基因 *GmMYC* 的克隆与功能初步分析, 硕士学位论文, 南京农业大学, 导师: 喻德跃, pp.62-63)
- Gao L.H., Liu B.X., Li J.B., Wu Y.M., and Tang Y.X., 2016, Cloning and functional analysis of bHLH transcription factor gene *GhMYC4* from *Gossypium hirsutum* L., *Zhongguo Nongye Keji Daobao (China Agricultural Science and Technology Bulletin)*, 18(5): 33-41 (高丽华, 刘博欣, 李金博, 吴燕民, 唐益雄, 2016, 陆地棉 bHLH 转录因子 *GhMYC4* 基因的克隆及功能分析, 中国农业科技导报, 18(5): 33-41)
- Giusti M.M., and Wrolstad R.E., 2003, Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems, *Biochem. Eng. J.*, 14(3): 217-225
- Huang Y.L., 2006, Cloning and sequence analysis for anthocyanin transcriptional activator genes of potato, Thesis for M.S., South China University of Tropical Agriculture, Supervisor: Zhang S.Z., pp.50-51 (黄艳岚, 2006, 马铃薯花青素转录激活基因的克隆与序列分析, 硕士学位论文, 华南热带农业大学, 导师: 张树珍, pp.50-51)
- Islam M.S., Jalaluddin M., and Garner J.O., 2005, Artificial shading and temperature influence on antyocyanin composition in sweetpotato leaves, *Hortscience*, 40(1): 176-180
- 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
- Li X.J., Liu H.B., Lin X.Q., Wu Z.D., Xu C.H., and Liu X.L., 2015, In silico cloning and bioinformatics analysis of *KNOX* gene in sugarcane (*Sckn1*), *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(1): 136-142 (李旭娟, 刘洪博, 林秀琴, 吴转娣, 徐超华, 刘新龙, 2015,

- 甘蔗 *KNOX* 基因(*Sekn1*)的电子克隆及生物信息学分析, 基因组学与应用生物学, 34(1): 136-142)
- Liu Q., Qiu Y., and Beta T., 2010, Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 58(16): 9235-9241
- Liu S.Y., 2007, Cloning and analysis of candidate anthocyanin transcriptional activation genes of potato, Thesis for M.S., South China University of Tropical Agriculture, Supervisor: Zhang S.Z., pp.12-14 (刘仕芸, 2007, 马铃薯花青素候选转录激活基因的克隆与分析, 硕士学位论文, 华南热带农业大学, 导师: 张树珍, pp.12-14)
- Ma Q., 2015, Transcriptional regulation of 20E signal pathway by *BmMyc* in *Bombyx mori* posterior silk gland, Thesis for M.S., East China Normal University, Supervisors: Li K., and Li S., pp.1-2 (马倩, 2015, 家蚕 *BmMyc* 基因在后部丝腺对蜕皮激素信号通路的转录调控, 硕士学位论文, 华东师范大学, 导师: 李恺, 李胜, pp.1-2)
- Shoeva O.Y., 2018, Complex regulation of the *TaMyc1* gene expression in wheat grain synthesizing anthocyanin pigments, *Mol. Biol. Rep.*, 45(3): 327-334
- Wang B.Y., 2010, Cloning of salinity stress-related gene in triticale and its function verification, Thesis for M.S., Shihezi University, Supervisors: Cao L.P., and Kong G.C., pp.3-4 (王白羽, 2010, 小黑麦耐盐碱相关基因克隆及其功能验证, 硕士学位论文, 石河子大学, 导师: 曹连莆, 孔广超, pp.3-4)
- Zhao H., 2013, Cloning, expression analysis and preliminary transgenic function study of *MYB*, *MYC* type genes in *Lithospermum erythrorhizon*, Dissertation for Ph.D., Nanjing University, Supervisor: Yang Y.H., pp.1-2 (赵胡, 2013, 硬紫草 *MYB*, *MYC* 类基因的克隆, 表达分析及转基因功能初步研究, 博士学位论文, 南京大学生命科学学院, 导师: 杨永华, pp.1-2)
- Zhu X.Y., Cui C., Zhou H.J., Wu Y.C., and Wang Z.Z., 2015, Cloning and expression analysis of the transcription factor *SmMYB7* from *Salvia miltiorrhiza* bunge, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 34(2): 365-372 (朱小亚, 崔瑾, 周宏骏, 武玉翠, 王喆之, 2015, 丹参转录因子 *SmMYB7* 的克隆及表达模式分析, 基因组学与应用生物学, 34(2): 365-372)
- Zhu Z.F., Sun C.Q., Fu Y.C., Qian X.Y., Yang J.S., and Wang X.K., 2005, Isolation and analysis of a novel *MYC* gene from rice, *Yichaun Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 32(4): 393-398 (朱作峰, 孙传清, 付永彩, 钱晓茵, 杨金水, 王象坤, 2005, 水稻中一个新的 *MYC* 基因的克隆及其分析, 遗传学报, 32(4): 393-398)