

森林草莓转录因子 *MYB 12* 基因克隆及蛋白特性分析

陈 静, 胡亚会, 张享享, 左登攀, 江 彤*

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘 要: 采集森林草莓 (*Fragaria vesca*) 植株叶片, TRIzol 法提取样本总 RNA, 设计特异性引物 RT-PCR 扩增转录因子 *MYB 12* 基因, 获得 1 条约 1 kb 大小的特异性片段, 克隆并测序。序列分析表明, 该片段序列全长 988 nts, 含有完整的 *MYB 12* 基因开放阅读框 (ORF), ORF 长度为 855 nts, 编码 285 个氨基酸。序列比对发现, 森林草莓 *MYB 12* 基因与来源于 5 种蔷薇科植物 *MYB* 基因的序列相似性较高, 为 75%~76%, 而与其他 7 种非蔷薇科植物 *MYB* 基因的序列相似性相对较低, 为 47%~68%。构建 *MYB* 基因系统关系树, 发现森林草莓与其他 5 种蔷薇科植物的 *MYB* 基因聚成一个分支, 说明森林草莓与蔷薇科植物亲缘关系较近。生物信息学分析表明, *MYB 12* 蛋白具有一定的亲水性, 其 N-端有 2 个 *MYB* 结构域, 属于 R2R3-*MYB* 亚族。*MYB 12* 蛋白二级结构主要以 α -螺旋为主, 并含有一些不规则的卷曲 (Random coil) 结构。这为研究该基因在植物生长发育及生理代谢过程中的调控机制奠定了基础。

关键词: 森林草莓; *MYB 12* 基因; 克隆; 蛋白特性分析

中图分类号: S432.22

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)02-0268-04

Cloning and protein property analysis of the transcription factor *MYB 12* gene in woodland strawberry (*Fragaria vesca*)

CHEN Jing, HU Yahui, ZHANG Xiangxiang, ZUO Dengpan, JIANG Tong

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Total RNA was extracted from leaves of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) using TRIzol method. A specific primer pair was designed to amplify the *MYB 12* gene encoding a transcription factor by RT-PCR. A specific fragment about 1 kb was amplified and then cloned and sequenced. Sequence analysis showed that the fragment consisted of 988 nucleotides (nts), including a complete 855 nts ORF encoding 285 amino acids. Sequence comparison revealed that *MYB 12* of woodland strawberry shared a relatively high sequence similarity (75%-76%) with that of five other *Rosaceae* plants and a relatively low sequence similarity (47%-68%) with that of seven non-*Rosaceae* plants. A phylogenetic tree based on the nucleotide sequence alignment of the *MYB* genes was constructed. The *MYB* gene of woodland strawberry and five other *Rosaceae* plants were clustered into the same branch, which indicated that woodland strawberry had a close relationship with *Rosaceae* plants. Bioinformatics analyses demonstrated that *MYB 12* protein was hydrophobic. Its N-terminal contained two *MYB* structural domains belonging to subtribe R2R3-*MYB*. The secondary structure of *MYB 12* protein was dominated by α -helix and some random coils were included. This research will provide a basis for identifying the role of the *MYB* gene in regulating plant growth and development, as well as physiological and metabolic processes.

Key words: woodland strawberry (*Fragaria vesca*); *MYB 12* gene; cloning; protein property analysis

转录因子 (transcription factor, TF) 又称为反式作用因子, 能特异性结合顺式作用元件, 从而在转录水平上调控基因表达, 在植物生长发育、逆境胁迫、次生生理代谢等方面都发挥重要作用^[1]。研究

表明, *MYB* 类转录因子在植物体内大量存在, 是植物转录因子中最大家族之一, 其在调控植物的细胞分化、花器发育、环境与生物胁迫等方面发挥重要作用^[2-4]。

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303028) 资助。

作者简介: 陈 静, 硕士研究生。

* 通信作者: 江 彤, 博士, 副教授。E-mail: jiangtong4650@sina.com

森林草莓 (*Fragaria vesca*) 是一个野生草莓种, 属于蔷薇科 (*Rosaceae*) 草莓属 (*Fragaria*) [5], 是一种多年生草本植物, 欧美和日本北部最为常见, 中国主要分布在西北、西南丛林和山地 [6]。森林草莓是草莓镶脉病毒 (*Strawberry vein banding virus*, SVBV) 的指示植物, 受到 SVBV 侵染后表现的主要症状是叶脉间褪绿 [7]。森林草莓是一种研究蔷薇科植物基因功能以及植物病毒与草莓寄主基因互动的重要实验材料, 其全基因组测序已在 2011 年完成 [8-9], 这为克隆分析森林草莓相关抗病基因提供了方便。目前, 已从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 和小麦 (*Triticum aestivum*) 等多种植物中分离鉴定了 *MYB* 基因 [10]。研究发现, 拟南芥 *MYB 26* 基因可以调节 *NST 1* 和 *NST 2* 基因的表达水平, 从而调控花药次生细胞壁的合成 [11]。凤梨草莓 (*Fragaria × ananassa*) *MYB* 转录因子可以与 bHLH 蛋白和 WD 40 蛋白结合形成蛋白复合物, 调节草莓果实原花青素的生物合成, 在草莓果实成熟的生理过程中起关键作用 [12]。

更多的研究发现, *MYB* 转录因子与寄主抗病性密切相关。*MYB* 基因超表达小麦能够显著提高小麦对禾顶囊壳属 (*Gaeumannomyces*) 病菌的抗性 [13]。小麦纹枯菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 可诱导抗病小麦中 *MYB* 基因的上调表达, 参与小麦对纹枯菌的防御反应 [14]。烟草 *MYB 1* 转录因子可以充当水杨酸诱导抗性信号元件, 参与抗病毒过敏反应 (HR) [15]。因此, 可以推测 *MYB 12* 基因在森林草莓中也可能参与抗病等重要生理代谢过程。本研究拟从草莓镶脉病毒 (SVBV) 侵染的森林草莓植株中分离出转录因子 *MYB 12* 基因, 采用生物信息学方法分析其基因序列及其编码蛋白特性, 为进一步揭示森林草莓的抗病毒机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本来源 从安徽农业大学植保学院温室采集感染 SVBV 的森林草莓新鲜叶片, 样本保存于一 80℃ 冰箱备用。

1.1.2 质粒、菌株 克隆载体 pMD18-T simple Vector 购自大连宝生物公司, 大肠杆菌 *DH5α* 菌株由安徽农业大学病毒实验室保存。

1.1.3 试剂 *Taq* DNA 聚合酶购自大连宝生物公司, TRIzol 购自 Invitrogen 公司, 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物公司, HiFi-MMLV cDNA 反转录试剂盒购自 Promega

生物公司, 其他试剂均为国药生物公司分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 选择 1 个森林草莓样本提取总 RNA。取冻存森林草莓叶片 0.1 g, 液氮条件下充分研磨, 然后用 TRIzol® Plus RNA Purification Kit 提取叶片总 RNA, 具体方法参照试剂盒说明书。

1.2.2 引物设计与合成 从 GenBank 下载 5 种蔷薇科植物 *MYB* 基因序列, 根据 *MYB* 基因两侧的保守序列设计 1 对特异性引物。*MYB 12 /F*: 5'-AGAGC ATCGGTCCTCTTC-3', *MYB 12 /R*: 5'-CTATTAGCTT GCAGACAG-3'。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。

表 1 *MYB* 基因 GenBank 登录号

植物种	GenBank 登录号
苹果 <i>Malus domestica</i>	KJ909759
甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	GU938690
桃子 <i>Prunus persica</i>	XM007218698
白梨 <i>Pyrus x bretschneideri</i>	XM009336088
乌梅 <i>Prunus mume</i>	XM008234893
毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	XM002320840
葡萄 <i>Vitis bellula</i>	JQ308623
山油柿 <i>Diospyros kaki</i>	HQ880576
可可树 <i>Theobroma cacao</i>	XM007051442
克莱门柚 <i>Citrus clementina</i>	XM006444743
荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	XM010269220
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	AJ608992

1.2.3 森林草莓 *MYB 12* 全长基因的克隆和测序 cDNA 第一链的合成参考 Promega 逆转录试剂盒说明 (GoScript™ Reverse Transcription System), 在 M-MLV 逆转录酶作用下, 以 *MYB 12 /R* 为下游引物合成 cDNA 第一链。再以 cDNA 第一链为模板, 用引物 *MYB 12 /F*、*MYB 12 /R* 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件为: 94℃ 45 s, 45℃ 54 s, 72℃ 80 s, 30 个循环。利用回收试剂盒回收目的片段, 与 pMD18-T simple Vector 连接, 转化大肠杆菌 *DH5α*, 菌液 PCR 筛选阳性克隆。阳性克隆送上海英潍捷基生物公司测序。

1.2.4 森林草莓 *MYB 12* 全长基因的序列及蛋白特性分析 利用软件 DNASTar 和 DNAMAN Version 5.22 进行序列分析。多序列比较采用 DNASTar Clustal V 方法, 系统关系树构建采用 DNAMAN 的邻近相连法 (Neighbor-joining)。用于序列比较和系统关系树构建的各物种 *MYB 12* 基因 GenBank 登录号见表 1。

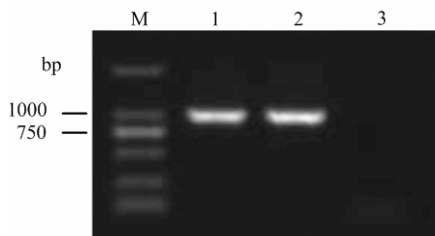
采用 Protparam 软件 (<http://au.ex-pasy.org/tools/>)

protparam.html) 预测 *MYB 12* 基因编码蛋白的分子量、等电点等基本特性。在 <http://us.Expasy.org/cgi-bin/protscale> 网站上分析蛋白的疏水性, 利用 NCBI 在线比对软件预测蛋白序列保守区^[16]。利用 DNASTar 蛋白软件分析 *MYB* 蛋白二级结构。

2 结果与分析

2.1 森林草莓 *MYB 12* 基因的 RT-PCR 扩增

以森林草莓样本的 cDNA 第一链为模板, 用引物 *MYB 12* /F、*MYB 12* /R 进行 PCR 扩增, 可扩增出 1 条约为 1000 bp 的特异性条带, 片段大小与预期结果相符 (图 1)。



M. DNA marker; 1-2, *MYB 12* 基因; 3. 阴性对照
M. DNA marker; 1-2, *MYB 12* gene; 3. Negative control

图 1 森林草莓 *MYB 12* 基因的 RT-PCR 产物

Figure 1 RT-PCR products of *MYB 12* gene of *F. vesca*

表 2 森林草莓 *MYB 12* 基因与其他 12 种植物 *MYB* 基因核苷酸序列的相似性

Table 2 Nucleotide sequence similarity of *MYB* genes between *F. vesca* and other 12 plants %

植物种	序列相似性
苹果 <i>M. domestica</i>	75.9
甜樱桃 <i>P. avium</i>	75.6
桃子 <i>P. persica</i>	75.4
白梨 <i>P. bretschneideri</i>	75.3
乌梅 <i>P. mume</i>	75.0
毛果杨 <i>P. trichocarpa</i>	67.6
葡萄 <i>V. bellula</i>	67.1
山油柿 <i>D. kaki</i>	66.9
可可树 <i>T. cacao</i>	65.4
克莱门柚 <i>C. clementina</i>	64.9
荷花 <i>N. nucifera</i>	62.2
辣椒 <i>C. annuum</i>	47.4

2.2 森林草莓 *MYB 12* 基因的克隆和序列分析

将森林草莓 *MYB 12* 基因克隆并测序, 序列全长 988 nts, 含有完整的 *MYB 12* 基因 ORF, ORF 长度为 855 nts, 编码 285 个氨基酸。序列的 GenBank 登录号为 LN681546。

利用 DNASTar 软件将本研究获得的森林草莓 *MYB 12* 基因与 GenBank 已登录的其他植物的 *MYB* 基因进行核苷酸序列相似性比较。结果发现, 森林

草莓 *MYB 12* 基因与来源于 5 种蔷薇科植物 *MYB* 基因的序列相似性较高, 为 75%~76%, 其中与苹果 *MYB* 基因的序列相似性最高, 达 75.9%, 而其他 7 种非蔷薇科植物 *MYB* 基因的序列相似性相对较低, 为 47%~68% (表 2)。

构建森林草莓 *MYB 12* 基因与 12 种其他植物 *MYB* 基因系统关系树。结果发现, 所有 *MYB* 基因聚成 2 个分支, 辣椒 *MYB* 基因单独聚成 1 个分支, 其他 12 个植物 *MYB* 基因聚成另外一个分支。其中森林草莓与来源于蔷薇科白梨、苹果、桃子、甜樱桃和乌梅的 *MYB* 基因单独聚成一个亚分支 (图 2)。

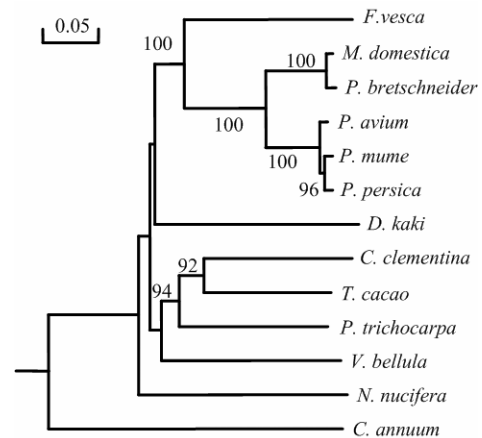


图 2 森林草莓与其他 12 种植物 *MYB* 基因核苷酸序列构建的系统关系树

Figure 2 Phylogenetic trees based on *MYB* genes nucleotide sequences of *F. vesca* and other 12 plants

2.3 森林草莓 *MYB 12* 基因蛋白特性分析

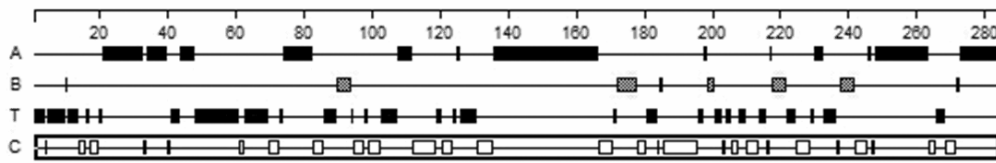
Protparam 软件预测发现, *MYB 12* 蛋白分子量为 32.32 kDa, 等电点为 9.18, 正电荷 (Asp + Glu) 数为 35 个, 负电荷残基 (Arg + Lys) 数为 43 个。利用 ProScale 软件预测 *MYB 12* 基因编码蛋白质的疏水性, 结果显示, 蛋白质疏水性最大值为 1.744, 最小值为 -3.833, 是亲水性蛋白。通过 NCBI 在线软件预测 *MYB 12* 蛋白的保守区, 发现此蛋白 N-端有 2 个 *MYB* 结构域, 位于 16-61 aa 和 71-112 aa, 属于 SANT 超基因家族的 R2R3-*MYB* 亚族^[17]。DNASTar 软件分析结果表明, *MYB 12* 蛋白的二级结构主要以 α -螺旋为主, 并含有一些不规则的卷曲 (Random coil) 结构 (图 3)。

3 小结与讨论

本研究从森林草莓植株中克隆了 *MYB 12* 基因。序列分析表明, 森林草莓 *MYB 12* 基因与蔷薇科植物的序列相似性较高, 为 75%~76%, 而与其他 7 种非蔷薇科植物 *MYB* 基因间的序列相似性相对较

低, 为 47%~68%。这表明由于植物种类不同, *MYB* 基因存在着一定程度的分子差异, 但同科植物 *MYB* 基因的分子变异较小。从 *MYB* 基因系统关系树可以

看出, 森林草莓与来源于蔷薇科植物的 *MYB* 基因聚成一个分支, 说明森林草莓与蔷薇科植物的亲缘关系较近, 而与其他科植物的亲缘关系较远。



A. α -螺旋; B. β -片层; T. β -转角区; C. 卷曲区 A. α -helix; B. β -sheet; T. β -turn; C. Random coil

图 3 预测的 *MYB 12* 蛋白二级结构

Figure 3 Secondary structure prediction of *MYB 12* protein

生物信息学分析表明, *MYB 12* 蛋白具有一定的亲水性, 亲水性可增加蛋白质的溶解性, 保护细胞不受水分胁迫影响, 增强植物的抗逆境能力^[18]。拟南芥 *COR* 基因编码的多肽具有 α -螺旋结构域, 低温诱导下, α -螺旋结构域可导致磷脂双分子层向内弯曲, 能抵抗低温引起的细胞膜损伤^[19]。*MYB 12* 蛋白二级结构同样以 α -螺旋为主, 并含有一些不规则的卷曲结构, 也可能跟抵抗膜损伤的抗逆性相关。*MYB* 类转录因子一般含有 1~3 个保守的 *MYB* 结构域^[20]。*MYB 12* 蛋白 N-端即含有 2 个 *MYB* 结构域, 属于 R2R3-*MYB* 亚族, 往往参与植物分生组织形成、细胞周期控制以及生物胁迫等次生代谢调控过程^[21-22]。本研究从森林草莓植株中成功分离了 *MYB 12* 基因, 并对该基因及其编码的蛋白进行了相关生物信息学分析, 为进一步研究森林草莓 *MYB 12* 基因的抗病相关功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 等. *MYB* 转录因子在植物抗逆境胁迫中的作用及其分子机理[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1265-1271.
- [2] Higginson T, Li S F, Parish R W. *AtMYB103* regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 2003, 35: 177-192.
- [3] Shin B, Choi G, Yi H, et al. *AtMYB21*, a gene encoding a flower-specific transcription factor is regulated by COP1 [J]. Plant J, 2002, 30: 23-32.
- [4] Vannini C, Iriti M, Bracale M, et al. The ectopic expression of the rice *Osmyb4* gene in *Arabidopsis* increases tolerance to abiotic, environmental and biotic stresses [J]. Phys Mol Plant Pathol, 2006, 69: 26-42.
- [5] 王静, 赵密珍, 王壮伟, 等. 森林草莓精氨酸脱羧酶基因的电子克隆与序列分析[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(3): 628-633.
- [6] 王桂霞, 张运涛, 董静, 等. 中国草莓育种的回顾与展望[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(2): 272-276.
- [7] Vařková D H, Špak J, Petrzik K. Variability in sequence of strawberry vein banding virus [J]. Biol Plantarum, 2006, 50(4): 660-666.
- [8] Vladimir S, Sargent D J, Crowhurst R N. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*) [J]. Nat Genet, 2011, 43: 109-116.
- [9] Darwish O, Slovin J P, Kang C Y, et al. SGR: an online genomic resource for the woodland strawberry [J]. BMC Plant Biol, 2013, 13: 223.
- [10] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in Arabidopsis [J]. Trends in Plant Sci, 2010, 15(10): 573-581.
- [11] Yang C, Xu Z, Song J, et al. Arabidopsis *MYB26/MALE STERILE35* regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence [J]. Plant Cell, 2007, 19: 534-548.
- [12] Schaart J G, Dubos C, De La Fuente I R, et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits [J]. New Phytol, 2013, 197(2): 454-467.
- [13] Liu X, Yang L H, Zhou X Y, et al. Transgenic wheat expressing *Thinopyrum intermedium* MYB transcription factor TiMYB2R-1 shows enhanced resistance to the take-all disease [J]. J Exp Bot, 2013, 64(8): 2243-2253.
- [14] 周贤尧, 董娜, 刘红霞, 等. 小麦 *TaPIM 1* 基因的克隆及其转基因烟草的抗病性分析[J]. 作物学报, 2010, 36(6): 911-917.
- [15] Yang Y N, Klessig D F. Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible *myb* oncogene homolog from tobacco [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 14972-14977.
- [16] 杨天天, 王晓平, 杨成君, 等. 山葡萄转色果皮转录因子 *MYB* 基因的克隆与分析[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(5): 1136-1142.
- [17] Katiyar A, Smita S, Lenka S K, et al. Genome-wide classification and expression analysis of MYB transcription factor families in rice and Arabidopsis [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 544.
- [18] 刘强, 赵南明, Shinozaki K Y, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 11-17.
- [19] 张丽丽, 李景富, 王傲雪. 转录激活因子 CBF 基因在植物抗冷分子机制中的作用[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 765-771.
- [20] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Curr Opin Plant Biol, 2001, 4(5): 447-456.
- [21] 薛英喜, 魏建华, 姜廷波, 等. 植物次生长相关 MYB 转录因子研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(13): 7650-7655.
- [22] Martin C, Paz-Ares J. MYB transcription factors in plants [J]. Trends Genet, 1997, 13: 67-73.