东北农业科学　2020,45(2):60-63
Journal of Northeast Agricultural Sciences　DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2020.02.015

苹果梨*MYB108*基因的克隆与序列分析

孟义淳,曲柏宏*,王甜元,白金月,杜昱彤,王　玥
(延边大学农学院,吉林 延吉 133000)

摘　要:MYB家族是调节花青素合成最为关键的转录因子成员,通过前期转录组测序发现,影响花青素的MYB转录因子中*MYB108*基因在不同时期表达具有差异,其对花青素生物合成调节作用未见报道。本研究成功克隆了*MYB108*基因,鉴定其ORF为891 bp,含有296个氨基酸,理论等电点(pI)为6.30,属不稳定蛋白,具有SANT/Myb结构域,鉴定是MYB转录因子家族基因。红皮梨色泽受到花青素含量的影响,本研究意在为今后验证其基因与花青素之间的关系提供先决条件。

关键词:苹果梨;*PbMYB108*;克隆;序列分析
中图分类号:S661.2　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:2096-5877(2020)02-0060-04

Cloning and Sequence Analysis of *MYB108* Gene from 'Pingguoli'

MENG Yichun, QU Baihong*, WANG Tianyuan, BAI Jinyue, DU Yutong, WANG Yue
(*College of Agriculture, Yanbian University, Yanji* 133000, China)

Abstract: The MYB family is the most important member of transcription factors that regulate anthocyanins synthesis. Through early transcriptome sequencing, it was found that *MYB108* gene in the MYB transcription factors affecting anthocyanins had different expression in different periods, and its regulation effect on anthocyanin biosynthesis was not reported. The MYB gene was successfully cloned and identified as a *MYB108* transcription factor family gene with an ORF of 891 bp, pI of 6.30, containing 296 amino acids, and it's an unstable protein with a SANT/Myb domain. The color of red pear was affected by the anthocyanin content. The purpose of the study was to provide a prerequisite for further verification of the relationship between the gene and the anthocyanin.

Key words: 'Pingguoli'; *PbMYB108*; Cloning; Sequence analysis

果实着色归因于花青素的积累,其中MYB是调节花青素合成最为重要的转录因子之一,许多MYB家族基因参与果实着色过程,并且该类基因大多具有DNA binding结构域。红色砂梨去袋后,*PpMYB10*与结构基因协同作用共同促进花青素的产生,然而*PpMYB1*无此现象[1]。同样对于'奥冠'采用套袋与McJA处理后,*PyMYBa*和*PyMYB10*的含量波动与花青素含量波动趋势相类似[2]。在'早红考密斯'和'早酥'梨上发现,*PcMYB10*和*PpMYB10*的含量变化与花青素含量变化相关。且*PpMYB10*启动子甲基化水平高低会影响花青素的产量多少[3-4]。有研究发现,Ⅱ型梨品种内*MYB10*表达水平与花青素积累水平呈现正相关性,然而在Ⅰ型或Ⅲ型品种中花青素积累量与*MYB10*的表达量不相关[5]。*PbMYB9*是花青素形成途径的调节剂,为一种TT2型MYB,不仅可以通过激活*PbANR*启动子激活原花青素途径,还可通过结合*PbUFGT1*启动子诱导花青素的产生。*PbMYB10b*可以作为特异性调节剂促进*PbDFR*的表达,诱导原花青素和花青素的生物合成[6]。*MYB10*和*bHLH33*的表达在西方梨中显著相关,但是在东方梨中*MYB10*和*bHLH33*之间没有共表达[7]。果实肉质颜色由于*MYB10*的表达量变化从而具有差异性,其中红色肉果中*MYB10*表达量较高[8]。将*MdMYB10*过表达会导致苹果果皮中花青素累积增加,同样将*MdMYB10*沉默处理后,*MdMYB10*的表达量及花青素累积显著下降,同时各个结构基因的表达也有不同程度的降低,进而造成果皮着色不明显[9]。对'澳洲青苹'解除果袋后,果皮中*MdMYB10*、*MdMYB1*转录水平相比于未套袋中的转录水平显著提高,表明其对澳洲青苹果实着色的关键作用[10-11],并且套袋情况下,*MdMYB10*与*MdMYB1*的表达量明显减少[12]。

收稿日期:2019-06-28
基金项目:国家自然科学基金(31160389)
作者简介:孟义淳(1994-),男,在读硕士,从事果树栽培与生理研究。
通讯作者:曲柏宏,男,博士,教授,E-mail: bhqu211@ybu.edu.cn

1　材料与方法

1.1　材料

将采收的成熟期的苹果梨削取果皮,立刻放入液氮内速冻后放入-75℃冰柜中储存。

1.2　试剂

Total RNA Kit（OMEGA）、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit（Roche）、Ex Taq、Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0、pMD™18-T Vector Cloning Kit、*E. coli* DH5α、Competent Cells、X-gal、IPTG、Marker(DL2000)等购置于TaKaRa,TAE、EB、Amp、Tryptone、Yeast Extract等购置于索莱宝。

1.3　总RNA提取以及cDNA合成

取100 mg果皮,在液氮中迅速研磨后,利用RNA提取试剂盒回收其总RNA,将获得的RNA利用反转录试剂盒进行反转录以形成cDNA。

1.4　引物设计及目的基因PCR扩增

依据转录组测序以及NCBI已登录的梨属*MYB108*基因,使用NCBI与Oligo7软件设计克隆*MYB108*基因的一对特异引物,引物序列如下:

F(5′-3′):ATGGCTGCTCCTAGAAACCCT

R(5′-3′):TCACATCCCGTCCATGTTCCA

PCR扩增体系:25μL,其中cDNA模板1μL,dNTP 2μL,MYB108F 1μL,MYB108R 1μL,Taq酶0.2μL,10×ExTaqBuffer 2.5μL,无菌水17.3μL。PCR反应程序:94℃ 4 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min,(35个循环);72℃ 7 min。

1.5　目的基因的回收及连接转化测序

*MYB108*基因使用胶回收试剂盒纯化,然后与PMD-18T载体10μL体系过夜连接,转化到感受态DH5α细胞中,均匀涂抹在含有Amp的LB固体培养基上,于37℃条件下,倒置培养12~16 h,挑取单一菌落,浸入加有Amp的液体LB培养基中,37℃、190 r培养4 h,经菌液PCR验证成功后,邮给英维捷基公司测序。

2　结果与分析

2.1　苹果梨果皮总RNA提取

RNA进行1%琼脂糖凝胶电泳(图1),RNA降解程度较低。利用核酸微量分光光度计检测提取出RNA的质量,OD值为1.86,在1.8~2.1之间,说明RNA纯度较高没有其他污染,且RNA浓度为369 ng/μL。

2.2　目的基因的克隆

将提取的RNA进行反转录,以形成cDNA,用于PCR扩增,并将扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,获得一条1000 bp附近条带。其参考*MYB108*编码区长度为891 bp,推测扩增得到目的基因(图2)。将PCR产物纯化,连接转化并进行菌液PCR检测,再送去测序。测序结果表明,目的基因全长序列为891 bp,将基因编码区序列进行比对,确定成功克隆获得了*MYB108*基因,命名为*PbMYB108*。

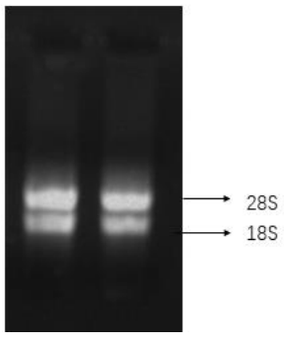
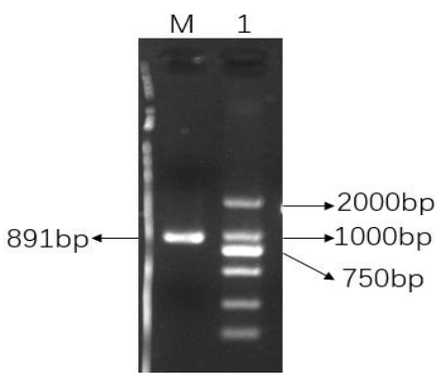


图1　总RNA检测图



M:PCR Product 1:DL 2000Marker

图2　*PbMYB108*的PCR扩增电泳检测图

2.3　*PbMYB108*序列分析

2.3.1　氨基酸序列与系统发育树构建

为了深入探究PbMYB108蛋白较与其他植物氨基酸之间的亲缘关系远近,运用DANMAN进行序列比对,并运用MEGA软件将PbMYB108蛋白与其他植物MYB蛋白构建发育树(图3)。

对比氨基酸序列发现,PbMYB108与白梨MYB108蛋白(XP_009356251.1)的一致性最高为98.31%,与MYB305蛋白(XP_008389270.2)的一致性为95.27%。

系统发育树显示(图3):苹果梨PbMYB108蛋白与苹果属MYB305蛋白亲缘关系较近,枇杷属MYB5蛋白次之。与模式植物拟南芥MYB108蛋白亲缘关系较远。

2.3.2　目的基因的理化特性及信号肽

ProtParam对*PbMYB108*进行理化特性分析发现,*PbMYB108*的ORF为891 bp,包含296个氨基

图3 苹果梨与其他植物 *MYB* 基因氨基酸序列进化树

酸，蛋白相对分子质量33219.28，理论等电点（pI）为6.30，正电荷残基数28，负电荷残基数25，分子式为 $C_{1458}H_{2250}N_{410}O_{451}S_{15}$，具有4584个原子，不稳定系数68.96（>40），推测其是不稳定蛋白，总平均亲水性：-0.608。SignalP分析PbMYB108蛋白不具有信号肽。

2.3.3 目的基因的结构域分析

InterPro结果表明，PbMYB108蛋白具有SANT/Myb结构域，鉴定为MYB家族基因。

SMART分析PbMYB108氨基酸序列发现（图4），PbMYB108于14-64 aa和67-115 aa存在两个SANT结构域，属于R2R3- MYB转录因子，此外，还存在三个低复杂性区域、STAT蛋白相互作用域、Primase C terminal 1域、CARD、HOX、FYRC域。

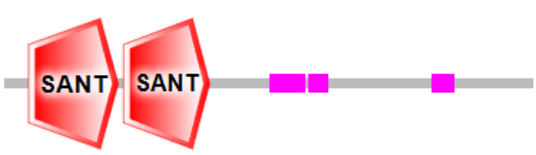


图4 PbMYB108结构域

2.3.4 蛋白疏水性和亲水性的分析

采用ProtScale软件预测PbMYB108蛋白亲/疏水性，其疏水性最大值为1.278，最小值为-2.567，均值为-0.608。数值小于零的为亲水区域，数值大于零的是疏水区域，对于PbMYB108氨基酸来看，亲水区的氨基酸占绝大部分，因此PbMYB108蛋白属于亲水性蛋白。

2.3.5 目的基因磷酸化分析

利用Net Phos 2.0 Server程序对PbMYB108蛋白进行磷酸化分析。存在24个Ser，12个Thr，4个Tyr可能成为蛋白激酶磷酸化位点。

2.3.6 目的基因跨膜结构分析与亚细胞定位

采用TMHMM Server v. 2.0分析蛋白序列跨膜结构发现，无明显跨膜区，其受体不在膜上，并定位于细胞核中。

2.3.7 目的基因二级结构预测

SOPMA软件对氨基酸序列进行二级结构预测发现：*PbMYB108*的二级结构主要以α-螺旋（30.07%），β-转角（6.42%）及不规则盘绕结构（53.72%）和延伸链（9.80%）为结构元件组成。

2.3.8 目的基因的三级结构预测

Swiss-ModelWorkspace对目的基因自动建模，构建PbMYB108蛋白的三级结构（图5）。三级结构预测可以看到其蛋白含有多个α-螺旋。

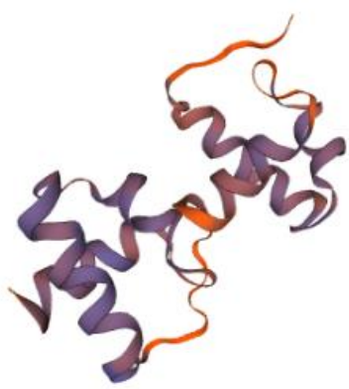


图5 PbMYB108三级结构预测

3　讨　论

本试验成功克隆苹果梨果皮中MYB转录因子家族中*PbMYB108*,此基因ORF全长为891 bp,氨基酸数目296,理论等电点6.30,为不稳定的亲水蛋白,定位于细胞核中,不具有信号肽。受MYB结构域数目导致,MYB转录因子可分为以下4种类型:1R-MYB、R2R3-MYB、R1R23R-MYB、4R-MYB[13],由于*PbMYB108*含有2个SANT/Myb结构域,故*PbMYB108*属于R2R3型。同样,从'新疆1号'苹果克隆获得的*Ms-xj1MYB10*也具有R2R3-MYB结构域,研究表明影响花青素合成调控的大多鉴定为R2R3型MYB[14]。云南红皮梨在果实成熟期,果实着色逐渐加深,*MYB*的含量变化与花青素含量变化具有相关性[15]。有研究表明,DELLA可以调控*MYB*的表达[16]。'红早酥'中鉴定了4个R2R3型MYB转录因子,发现*PbMYB10*、*PbMYB10b*、*PbMYB9*、*PbMYB3*的表达水平与花青素合成结构基因的表达水平具有很高相关性[17]。'金冠'苹果低温诱导后,*MdMYB88*和*MdMYB124*可以促进结构基因*MdF3H*和*MdCHS*的表达,从而促进花青素的生成[18]。'美早'甜樱桃果实中发现,随着果实成熟,*PaMYB10*的表达显著提高[19]。

近年来也发现有负调节花青素合成的MYB家族基因,苹果中*MdMYB111*可以降低*MdANS*与*MdUFGT*的表达,进而降低花青素积累[20]。同样将*MdMYB32*过表达处理后,*ANS*基因的启动被减缓,从而减弱花青素的生成[21]。同时也存在由其他基因导致影响*MYB*的转录,如:研究发现MdHB1蛋白可以与MdMYB10、MdbHLH3、MdTTG1蛋白于细胞质中结合,不能激活存在于细胞核中的*MdDFR*与*MdUFGT*,从而导致花青素的积累减少[22]。

参考文献:

[1] 俞　波.红色砂梨花青苷生物合成相关基因分离及表达研究[D].杭州:浙江大学,2012.

[2] 孙莎莎,王　楠,冀晓昊,等.红皮梨花青苷调控基因*PyMYBa*的克隆与表达分析[J].园艺学报,2014,41(6):1183-1190.

[3] 黄文江,张绍铃,肖长城,等.早红考密斯及其芽变果实中花青素含量与相关酶活性变化的研究[J].西北植物学报,2011,31(7):1428-1433.

[4] 钱敏杰.DNA甲基化和microRNA调控红梨果皮着色的机制研究[D].杭州:浙江大学,2017.

[5] Zhu Y F, Su J, Yao G F, et al. Different light-response patterns of coloration and related gene expression in red pears (*Pyrus* L.)[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 229:240-251.

[6] Zhai R, Wang Z, Zhang S, et al. Two MYB transcription factors regulate flavonoid biosynthesis in pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.)[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(5): 1275-1284.

[7] Yang Y N, Yao G F, Zheng D, et al. Expression differences of anthocyanin biosynthesis genes reveal regulation patterns for red pear coloration[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(2): 189-198.

[8] 孙晓红,刘源霞,孙　欣,等.红肉苹果果实发育过程中花青苷含量变化及其合成相关基因表达分析[J].植物生理学报,2017,53(8):1507-1514.

[9] 张　波,曲　东,杨惠娟,等.*MdMYB10*对苹果果皮苯丙氨酸代谢的影响[J].园艺学报,2018,45(8):1429-1440.

[10] 王立新."澳洲青苹"苹果解袋后果实中花青苷的合成及相关基因的表达调控分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2013.

[11] 张小军.'澳洲青苹'苹果套袋处理后果实着色相关基因的克隆及表达分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2013.

[12] 景晨娟.套袋对苹果果皮着色的影响及其相关基因表达分析[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.

[13] 冉　昆,王少敏,董　放,等.杜梨2个MYB转录因子基因的克隆及序列分析[J].果树学报,2016,33(S1):52-58.

[14] 孙晓红.红肉苹果MYB10及其启动子对花青苷合成相关基因的调控作用[D].长沙:湖南农业大学,2017.

[15] Zhang X, Allan A C, Yi Q, et al. Differential Gene Expression Analysis of Yunnan Red Pear, *Pyrus pyrifolia*, During Fruit Skin Coloration[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2011, 29(2): 305-314.

[16] 应　震,周　庄.植物花青苷代谢调控机理研究进展[J].中国野生植物资源,2019,38(3):75-79,85.

[17] 翟　锐.芽变'红早酥'梨的花青苷与类黄酮合成机理解析[D].杨凌:西北农林科技大学,2019.

[18] 谢银鹏.苹果MdMYB88和MdMYB124转录因子在低温和干旱胁迫中的作用机理研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2018.

[19] 魏海蓉,宗晓娟,朱东姿,等.甜樱桃MYB转录因子基因的克隆与表达分析[J].山东农业科学,2018,50(3):6-11.

[20] 杨官显,许海峰,张　静,等.苹果花青苷调控基因MdMYB111的功能鉴定[J].园艺学报,2019,46(5):832-840.

[21] 许海峰,杨官显,王意程,等.苹果MdMYB32通过自身EAR抑制序列抑制花青苷的生物合成[J].中国农业科学,2018,51(24):4690-4699.

[22] 姜永华.转录因子MdHB1调控'澳洲青苹'苹果花青苷合成的分子机制研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.

(责任编辑:刘洪霞)