

hmyb, 一个 *GAm_{yb}* 同源 cDNA 的克隆、 序列分析和表达行为*

凌世昀 祁 放 朱玉贤**

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 利用已发表的 *GAm_{yb}* 序列作探针, 筛选大麦糊粉层 cDNA 文库, 得到 2 个序列完全相同的阳性克隆. 序列分析发现这 2 个 cDNA 的 5' 端与 *GAm_{yb}* 基因的 3' 端有 97% 的同源性, 其 3' 端与任何 *myb* 基因都没有同源性, 所以其开放读码框编码的产物事实上拥有完整的 *GAm_{yb}* 转录激活区, 但没有常规的 DNA 结合区, 它很可能是一个新的基因, 被命名为 *hmyb* (*Hordeum vulgare*, *myb*-homologous). Northern blot 分析表明, 在大麦糊粉层中, *hmyb* 受赤霉素(GA)诱导后大量表达, 并且受脱落酸(ABA)的抑制. 研究还发现 *hmyb* 的表达具有时空特异性, 它只在大麦糊粉层中得到表达, 种子发芽后该基因就不再表达, 幼苗中检测不到 *hmyb* 基因活性.

关键词 大麦 糊粉层 *GAm_{yb}* GA ABA 表达调控

myb 相关基因作为一类转录调节因子, 一直是生物学研究中的热点课题. 已经发现的所有 *myb* 相关基因都有一个相当保守的 DNA 结合区, 使得 MYB 蛋白能有效地与所调控基因 5' 启动区相关序列相结合. 近年来, 不仅对动物中作为原癌基因的 *myb* 研究日益活跃, 在植物中也发现了不少与 *myb* 相似的转录调节因子. *myb* 相关基因在植物中组成了一个很大的基因家族, 它们调节着植物生命活动中的许多重要环节, 如种子发育、光形态建成、抗逆性状的表达及植物次生代谢等^[1-4].

GAm_{yb} 是 *myb* 相关基因的一种, 最早在大麦中被发现, 它是一类受 GA 调节的基因. 在大麦糊粉层中, *GAm_{yb}* 可能是 α -淀粉酶基因表达的正调控因子, 它具备 *myb* 相关基因所共有的保守序列 R2, R3 及一个可能的转录激活区, 其作用可能受另外两个调控因子 GAB1 和 VP1 的竞争性抑制^[5,6]. 用玉米的 C1 *myb* 作探针, 发现大麦糊粉层存在 3 组不同分子量且均与 GA 有关的 *myb* 基因, 其中 2 组被 GA 负调控, 另外 1 组受 GA 正调控^[6]. 为了充分研究 *GAm_{yb}* 的存在形式和作用方式, 进一步阐明其生理功能, 我们用全长的 *GAm_{yb}* 基因作探针, 筛选大麦糊粉层 cDNA 文库并得到一个可能是转录因子的新基因, 它也受 GA 的强烈诱导, 并被 ABA 所抑制.

1997-10-22 收稿, 1998-03-11 收修改稿

* EMBL 文库接收号 Y14658

** 联系人

1 材料和方法

1.1 材料

大麦及糊粉层的制备:大麦(*Hordeum vulgare* L.)品种 Himalaya 种子来自美国华盛顿大学农学和土壤学系。将切去胚和尖端的饱满种子在无菌条件下培养 4 d,按照 Belanger 等人的方法将糊粉层剥离胚乳^[7]。

1.2 方法

1.2.1 大麦总 RNA 的提取及 cDNA 文库的构建 按照 Qiagen 公司 RNeasy Plant Total RNA kit 方法提取糊粉层总 RNA,按照 Promega 公司 PolyATtract kit 方法纯化得到优质 mRNA,按照 Gibco BRL 公司 SuperScript Choice System for cDNA Synthesis kit 方法构建 cDNA 文库,滴度为 2.3×10^6 。

1.2.2 基因文库的筛选和序列测定 对大麦糊粉层 cDNA 文库的筛选和序列测定按文献[8]所述的方法进行,用 Stratagen 公司 Prime-it- II 随机引物法标记全长 *GAmlyb* 基因作探针。

1.2.3 Northern blot 分析 取发芽 5 d 的大麦幼苗或经不同处理的大麦糊粉层细胞,按 Qiagen 公司的方法提取总 RNA,每泳道上样 $20 \mu\text{g}$ RNA,在含 2.2 mol/L 甲醛的 1% 琼脂糖凝胶电泳 $200 \text{ V} \cdot \text{h}$ 后,用 Turboblotter(美国 S & S 公司)转移至硝酸纤维素膜上, 80°C 烘干 1 h,低能量 UV 交联 3 min。按随机引物标记法制备 ^{32}P 探针,标记片段在 Pst I 和 Xho I 之间(图 1(a)),在 42°C 下杂交 16 h(杂交液组成: $6 \times \text{SSC}$, $5 \times \text{Denhartz}$ 溶液, 1% SDS, 50% 甲酰胺)。杂交完毕后, 65°C 下洗膜 3 次,每次 30 min,洗涤液组成: 0.1% SDS, $0.1 \times \text{SSC}$ 。

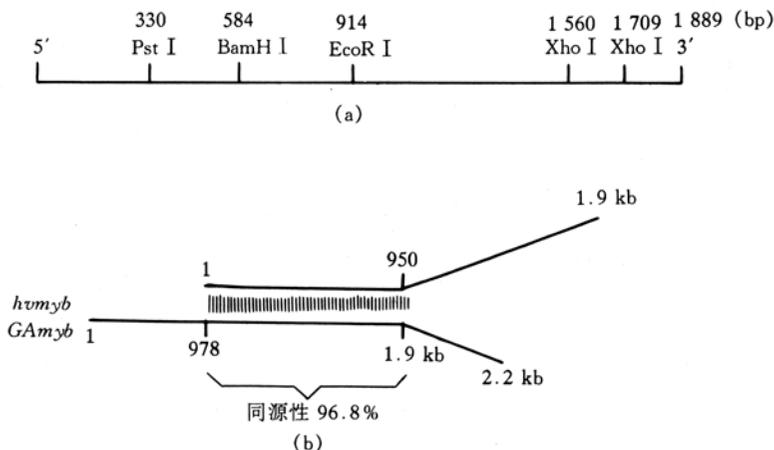


图 1 *hvmlyb* cDNA 的限制性内切酶物理图谱(a)及与 *GAmlyb* cDNA 序列的同源性比较(b)

2 结果

2.1 基因的克隆和序列分析

经过筛选,共得到 19 个阳性克隆,序列分析发现,其中第 12 号和第 18 号克隆完全一样,全长 1889 bp,其 5'端 1 kb 左右与 *GAmlyb* 3'端有 96.8% 的同源性(图 1(b)),其开放读码框编

码 233 个氨基酸, 蛋白质理论分子量为 25ku(图 2). Northern 分析表明, 我们得到的可能是全长的 cDNA(图 3). 为了进一步弄清它的结构和功能, 我们对推测的蛋白质序列进行了氨基酸

1	TTA CTC CCT GGA TTG AGC GAC ACC ATC AAT GGC GCG CTC TCC TCG GTC	48
49	GAT CAA TTC TCA AAT GAC TCT GAG AAG CTC AAG CAG GCT CTT GGT TTT	96
97	GAC TAT CTC CAC GAA GCC AAC TCT AGC AGC AAG ATT ATT CCA CCA TTT	144
145	GGG GGT GCG CTT ACT GGC AGC CAT GCC TTT TTA AAT GGC ACC TTC TCT	192
193	ACT TCT AGG ACC ATC AAT GGT CCT TTG AAG ATG GAG CTC CCT TCA CTC	240
1		
241	CAA GAT ACC GAA TCT GAT CCG AAT AGC TGG CTC AAG TAT ACC GTG GCT	6
7	Q D T E S D P N S W L K Y T V A	288
289	CCT GCG ATG CAG CCT ACG GAG TTG GTT GAT CCG TAC CTG CAG TCC CCG	22
23	P A M Q P T E L V D P Y L Q S P	336
337	ACA GCA ACT CCG TCA GTG AAA TCG GAG TGT GCT TCG CCG AGG AAC AGC	38
39	T A T P S V K S E C A S P R N S	384
385	GGC CTC TTG GAA GAG CTG CTT CAT GAA GCT CAG GGA CTA AGA TCT GGG	54
55	G L L E E L L H E A Q G L R S G	432
433	AAG AAT CAG CAG CTC TCC GTG AGA AGT TCA AGT TCC TCT GTC AGC ACG	70
71	K N Q Q L S V R S S S S T V S T	480
481	CCG TGT GAT ACC ACG GTG GTT AGC CCG GAG TTT GAT CTC TG CAT GAA	86
87	P C D T T V V S P E F D L C Q E	528
529	TAT TGG GAA GAA CGT CTG AAT GAA TAT GCC CCA TTC AGT GGC AAT TCA	102
103	Y W E E R L N E Y A P F S G N S	576
577	CTC ACT GGA TCC ACC GCT CCT ATG AGT GCT GCG TCG CCT GAT GTT TTT	118
119	L T G S T A P M S A A S P D V F	624
625	CAG CTC TCC AAA ATT TCT CCT GCA CAA AGC CCT TCA CTG GGA TCT GGA	134
135	Q L S K I S P A Q S P S L G S G	672
673	GAG CAG GCA ATG GAG CCT GCA TAT GAG CCC GGG GCA GGG GAC ACT TCG	150
151	E Q A M E P A Y E P G A G D T S	720
721	TCT CAT CCT GAA AAC TTG AGG CCA GAC GCG TTC TTC TCC GGG AAC ACG	166
167	S H P E N L R P D A F F S G N T	768
769	GCC GAC TCG TCC GTC TTC AAC AAC GCC ATA GCC ATG CTC CTG GGC AAC	182
183	A D S S V F N N A I A M L L G N	816
817	GAC ATG AAC ACG GAG TGC AAG CCT GTT TTC GGC CAG GGT ATC ATG TTT	198
199	D M N T E C K P V F G D G I M F	864
865	GAT ACT TCG GTG TGG AGC AAC TTG CCT CAT GCT TGT CAA ATG TCG GAG	214
215	D T S V W S N L P H A C Q M S E	912
913	GAA TTC AAA TGA GTT CCT CAC CGA ACC TCC AGC GGA GTC GAA AGA GAT	230
231	E F K *	960
961	TCT TGG TAT CCC TCA CCC TGA TTG TTT TGA GGA AAA ATT CAG AGA AAG	1 008
1 009	CCT CAT CGA TTG TAT ACG CTG CTG CGT GCG TAC GCG GCT GCT ACC AAA	1 056
1 057	TGC GCT CTC CGT TCA ACT AAG CCC CTT TTC CCA ATA AAA TTG GCG GAA	1 104
1 105	ATA AAC CCG TTA TCT AAT TTT TGT TTG TTT CAA ACT TGA ACA TCA ACT	1 152
1 153	TCC CGC CGG CAC AAC AAA CCG GCC CTT TTG GGC CCC CAC GGG GTG CAG	1 200
1 201	CTT TCG ACG GCG CCG GCA ACG GGG CGG TGC CAG ACG GGG ACT GCG GCG	1 248
1 249	GGA AGC TGC GGT GCA CGC AGT ACG GGC AGG CGC CCA CAA CGC TGG CGG	1 296
1 297	AGT TCG GGC TCA ACA AGT ACA TGG GGC AGG ACT TCT TCG ACA TCT CCC	1 344
1 345	TGA TCG ACG GGT ACA ACG TGC CCA TGT CGT TCG TCC CCG CCC CCG GCT	1 392
1 393	CCA CCG GGT GCC CCA AGG GCG GGC GGT GCC CGA AGG TGA TCA CGC	1 440
1 441	CGG CGT GCC CCA ACG AGC TGC GGG CGG CGG GAG GGT GCA ACA ACG CGT	1 488
1 489	GCA CGG TGT TCA AGG AGG ACA GGT ACT GCT GCA CGG GGT CGG CGG CCA	1 536
1 537	ACA GCT CCG GGC CGA CCG ACT ACT CGA GGT TCT TCA AGG GGC AGT GCT	1 584
1 585	CGG ACG GCT ACA GTT ACC CCA AGG ACG ACG CCA CCA CCA TCT TCA CTT	1 632
1 633	GCC CCG GCG GCA CAA ACT ACC AGG TCA TCT TCT GCC CAT GAG CGG CCA	1 680
1 681	TAG TAA GCG GCC ATG CAT GGA AGA GGT CTC GAG CAC ACG GAC AAG AAT	1 728
1 729	AAG TCT ATG CCT ATC CGA TGT TAT ATG TAT CAA AAT AAG TGC GCT TGG	1 776
1 777	ATG CAT ACA TTC GTA TGC ACA TGT AAG CCG GAA ATG GAT ATA CTC GAT	1 824
1 825	CGA CGT GAG CAA TAA ACT CGT GCA TGA ATA AAA TGC TCT TGC GTA ATA	1 872
1 873	AAA AAA AAA AAA AAA AA	1 889

图 2 *hvmv* 的核苷酸序列及按开放读码框所编码的氨基酸序列

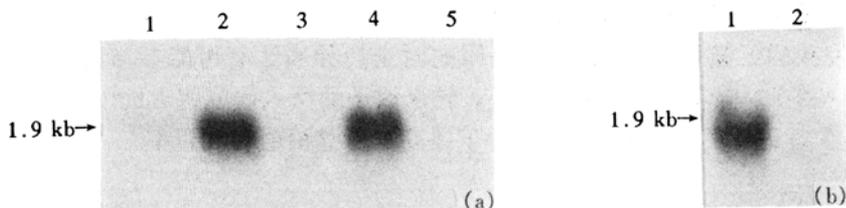


图3 *hvmyb* 表达行为的研究

(a) *hvmyb* 在大麦糊粉层中表达的 Northern 分析. 1 为无胚种子吸胀 48 h 后的总 RNA, 2 为有胚种子胚芽萌发吸胀 48 h 后的总 RNA, 3 为未经 GA_3 处理的大麦糊粉层总 RNA, 4, 5 分别为经 $30 \mu\text{mol/L}$ GA_3 处理或用 $30 \mu\text{mol/L}$ GA_3 同时加 $5 \mu\text{mol/L}$ ABA 处理 6 h 后的糊粉层总 RNA. (b) *hvmyb* 在不同发育阶段表达的 Northern 分析. 1 为
大麦糊粉层总 RNA, 2 为发芽第 5 天后大麦幼苗总 RNA

组成分析, 并根据 Chou 等人^[9]的方法进行了二级结构预测, 发现该蛋白不仅富含 Ser 和 Thr, 总含量高达 21%, 而且其 N 端(Pro²³到 Pro⁴³)有一富含脯氨酸区, 可能形成富含脯氨酸的转录激活结构域. 此外, Glu⁹⁶到 Glu¹¹⁰区不仅含有 40% 的酸性氨基酸, 而且易于形成 α -螺旋, 具备作为常规转录激活因子的特征^[10], 我们将其命名为 *hvmyb*.

2.2 植物激素对 *hvmyb* 基因表达的影响

为了弄清 *hvmyb* 基因在植物细胞内的表达调控规律, 我们进行了一系列 Northern blot 分析, 发现在无胚种子吸胀的整个过程中, 该基因都不表达(图 3(a), 第 1 泳道); 有胚种子胚芽萌发之初(吸胀 48 h 后), 该基因即获得大量表达(第 2 泳道). 外源 GA 处理能强烈诱导糊粉层细胞中 *hvmyb* 基因的表达. 用 $30 \mu\text{mol/L}$ GA_3 处理大麦糊粉层细胞 6 h, 该基因表达量比未经处理的对照组增加 100 倍以上(第 3, 4 泳道). $5 \mu\text{mol/L}$ ABA 即可彻底抑制 GA 的这一激活作用, ABA 与 GA 共同处理大麦糊粉层 6 h, *hvmyb* 基因表达完全被抑制(第 5 泳道).

2.3 *hvmyb* 基因表达的时空特异性

研究 *hvmyb* 基因在不同大麦组织中的表达特性发现, 该基因只在糊粉层中表达, 大麦种子发芽后不久其活性迅速消失, Northern 检测呈阴性, 说明该基因的表达具有严格的时空特异性(图 3(b)).

3 讨论

本文克隆了一个其表达受赤霉素诱导并受脱落酸抑制的 *GAMyb* 同源基因 *hvmyb*. 序列分析表明, 它很可能编码一个转录激活因子, 但由于其编码的蛋白缺少 DNA 结合结构域, 因此只是功能型 GAMYB 的一部分, 通常情形下, 该蛋白所需的 DNA 结合功能必须由另一个蛋白提供. 这种二元调控现象在转录激活因子中并不少见^[11, 12]. 此外, 研究还发现没有 DNA 结合结构域的 MYB 蛋白可以激活 *hsp70* 基因启动子, 而只有 DNA 结合区的 PcMYB1 也能调控光诱导基因的表达^[13, 14].

蛋白质磷酸化是糊粉层中 GA 调节的重要方式^[9], 目前已发现两种植物 *myb* 相关基因在体内可能受到磷酸化作用的调控^[3, 15]. HVMYB 蛋白中丝氨酸含量较高, 特别在推测的富含脯氨酸区和酸性区两侧, Ser 和 Thr 含量高于 30%, 第 79 至第 83 位有 5 个丝氨酸相连, 暗示 Hvmyb 蛋白可能有磷酸化调控位点. 由于 *hvmyb* 基因在结构、调控方式、表达时间和位置等

方面均与 *GAm₁yb* 有相似性, 我们猜测它可能辅助 *GAMYB* 或单独起调控作用. 禾谷类种子 *GA* 含量一般在发芽后即显著下降, *hvm₁yb* 基因的时空特异表达有可能参与决定了这类细胞中淀粉水解酶活性的时间和空间关系. 对 *myb* 转录因子的深入研究将有助于阐明种子发芽、淀粉水解等重要生理过程的分子机制, 并有助于提高其营养价值和利用率.

参 考 文 献

- 1 Lin Q, Hamilton W D O, Merryweather A. Cloning and initial characterization of 14 *myb*-related cDNAs from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Alisa Craig). *Plant Molecular Biology*, 1996, 30(5): 1 009~1 020
- 2 Quadevlig N, Dockx J, Keultjies G, et al. Identification of a light-regulated MYB gene from an Arabidopsis transcription factor gene collection. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32(5): 987~993
- 3 Martin C, Paz-Ares J. Myb transcription factors in plants. *Trends in Genetics*, 1997, 13(2): 67~73
- 4 Sainz M B, Grotewold E, Chandler V L. Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related *myb* domain proteins. *The Plant Cell*, 1997, 9: 611~625
- 5 Bethke P C, Schuurink R, Jones R L. Hormonal signalling in cereal aleurone. *Journal of Experimental Botany*, 1997, 48: 1 337~1 356
- 6 Gubler F, Kalla R, Roberts J K, et al. Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for *myb* transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter. *The Plant Cell*, 1995, 7: 1 879~1 891
- 7 Belanger F C, Brodl M R, Ho T H D. Heat shock causes destabilization of specific mRNAs and destruction of endoplasmic reticulum in barley aleurone cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 1 354~1 358
- 8 Zhu Y X, Zhang Y F, Luo J C, et al. PPF-1, a post-floral-specific gene expressed in short-day grown G2 pea may be important for its never-senescing phenotype. *Gene*, 1998, 208: 1~6
- 9 Chou P Y, Fasman G D. Empirical prediction of protein conformations. *Annu Rev Biochem*, 1978, 47: 251~276
- 10 Mitchell P J, Tjian R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*, 1989, 245: 371~378
- 11 Stern S, Tanaka M, Herr W. The Oct-1 homoeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP-16. *Nature*, 1989, 341: 624~630
- 12 朱玉贤, 李 毅. 现代分子生物学, 北京: 高等教育出版社, 1997. 479
- 13 Luscher B, Eisenman R N. New light on Myc and Myb. Part II, Myb. *Gene & Development*, 1990, 4(18): 2 235~2 241
- 14 Feldbrugge M, Sprenger M, Hahlbrock K, et al. PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts *in vivo* with a light-regulatory promoter unit. *The Plant Journal*, 1997, 11(5): 1 079~1 093
- 15 Wang Z Y, Kenigsbuch D, Sun L, et al. A *myb*-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene. *The Plant Cell*, 1997, 9: 491~507