

茄子花青素合成中*SmTTG1*、*SmGL3* 和*SmTT8* 的表达及其蛋白质间的相互作用

刘新宇, 韩洪强, 葛海燕, 蒋明敏, 陈火英*

(上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

摘要: 采用同源克隆方法从茄子(*Solanum melongena* L.)中分离得到3个基因, 分别命名为*SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8*。序列分析表明, *SmTTG1* 的 cDNA 全长 1 220 bp, 开放阅读框为 1 029 bp, 编码 342 个氨基酸, 与马铃薯(*S. tuberosum* L.) *TTG1* 基因序列同源性达到 94%, 成熟蛋白等电点为 4.90, 具有典型的 WD 结构域; *SmGL3* 的 cDNA 全长 2 329 bp, 开放阅读框为 1 887 bp, 编码 628 个氨基酸, 与马铃薯 *GL3* 基因序列相似性达到 94%, 蛋白等电点为 5.61, 有典型的 HLH 结构域; *SmTT8* 的 cDNA 全长 2 242 bp, 开放阅读框为 1 896 bp, 编码 631 个氨基酸, 与马铃薯 *TT8* 基因序列同源性为 85%, 蛋白等电点为 5.18, 有典型的 HLH 结构域。荧光定量检测结果表明, *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 在茄子根、茎、叶、花、果皮和果肉中均有表达, 但表达水平具有组织特异性。酵母双杂交结果表明, *SmTTG1* 与 *SmTT8*、*SmGL3* 之间有相互作用, 并且 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 都与 *SmMYB* 之间发生作用。推测 *SmTTG1* 为 WD40 转录因子, *SmGL3* 和 *SmTT8* 为 bHLH 转录因子, 它们都参与调控茄子花青素的合成。

关键词: 茄子; 花青素; *SmTTG1*; *SmGL3*; *SmTT8*; 酵母双杂交

中图分类号: S 641.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 11-2241-09

Cloning, Expression and Interaction of Anthocyanin-related Transcription Factors *SmTTG1*, *SmGL3* and *SmTT8* in Eggplant

LIU Xin-yu, HAN Hong-qiang, GE Hai-yan, JIANG Ming-min, and CHEN Huo-ying*

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: Three genes, respectively named *SmTTG1*, *SmGL3* and *SmTT8* were isolated from eggplant (*Solanum melongena* L.) using homology-based cloning method. Sequence analysis shows that the open reading frame (ORF) of *SmTTG1* is 1 029 bp long, encoding 342 amino acids and sequence alignment reveals 94% identity with *TTG1* in potato (*S. tuberosum* L.). *SmTTG1* protein contains four typical WD domains and protein isoelectric point is at pI 4.90. The ORF of *SmGL3* is 1 887 bp long, encoding 628 amino acids and sequence alignment reveals 94% identity with *GL3* in potato. *SmGL3* protein contains typical HLH domain and protein isoelectric point is at pI 5.61. While the ORF of *SmTT8* gene is 1 896 bp long, encoding 631 amino acids and the multiple alignment of *SmTT8* gene sequence with those of other

收稿日期: 2014-08-19; 修回日期: 2014-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471870); 上海市科技兴农项目 [31471870 沪农科种子 (2013) 第 5 号]; 国家星火计划项目 (2012GA680003)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: chhy@sjtu.edu.cn)

homologues showed that it had high identity with homologous gene in potato. *SmTT8* protein contains typical HLH domain and protein isoelectric point is at pI 5.18. QPCR analysis indicates that *SmTTG1*, *SmGL3* and *SmTT8* are expressed in all organs of eggplants, including roots, stems, leaves, petals, peels and sarcocarp. However, the expression level of *SmTTG1*, *SmGL3* and *SmTT8* are tissue-specific. Yeast two-hybrid shows that *SmTTG1* can interact with *SmGL3* and *SmTT8*. Meanwhile, *SmTTG1*, *SmGL3* and *SmTT8* can interact with *SmMYB*. Therefore, it is speculated that *SmTTG1* is a WD40 transcription factor and *SmGL3* and *SmTT8* are bHLH transcription factors, which are involved in the biosynthesis of anthocyanin in eggplant.

Key words: eggplant; anthocyanin; *SmTTG1*; *SmGL3*; *SmTT8*; yeast two-hybrid

花青素在园艺、食品、保健等方面具有广泛的应用,对人类健康具有巨大的潜在价值,因此花青素的生物合成一直是研究的热点 (Holton & Cornish, 1995; 李娟娟, 2007; 胡可 等, 2010)。目前已分离和鉴定了 3 类花青素合成的转录因子: R2R3-MYB 蛋白、MYC 家族的 bHLH (basic helix loop helix) 蛋白和 WD40 蛋白 (Ramsay & Glover, 2005)。这些转录因子通过与结构基因启动子中相应的顺式作用元件结合,从而调节花色素苷生物合成途径中基因的表达。在这个过程中一般是由 MYB 转录因子、bHLH 转录因子和 WD40 转录因子构成一个蛋白复合体 (简称 MBW 蛋白复合体),直接调控结构基因转录的 (Tanaka & Ohmiya, 2008)。

目前已经从拟南芥、矮牵牛、紫苏、玉米、葡萄、金鱼草和苹果等植物中分离克隆了大量与花青素生物合成代谢相关的结构基因和调控基因 (Koes et al., 2005; Lepiniec et al., 2006; Tanaka & Ohmiya, 2008; 张宁 等, 2008),但是对于茄子,仅有邵文婷 (2013) 克隆了 MYB 基因家族 R2R3 亚类中的 *SmMYB* 基因。本研究中分离克隆了茄子花青素合成相关的 WD40 转录因子基因 *SmTTG1*, bHLH 转录因子基因 *SmGL3* 和 *SmTT8*,并对它们进行了生物信息学分析,研究了其在茄子不同组织的表达特异性,并且利用酵母双杂交系统,检测这几个翻译的蛋白与 MYB 转录因子基因 *SmMYB* 形成的蛋白两两之间的互作情况。结果将有助于进一步了解这 3 个蛋白的功能,并为进一步探究茄子花青素生物合成调控机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

茄子材料为本课题组保存的优良种质资源 ‘YZ14’ 紫茄,表型为无刺,紫茎,紫花,紫色果实。2013 年 3 月 21 日将材料播种于营养钵中,置于光照培养箱中育苗,2013 年 5 月 2 日将四叶一心或五叶一心的苗移栽到上海浦江航天育种基地。于 2013 年 6—7 月间取样,每次分别选取长势基本一致的 3 株植株的根、茎表皮、嫩叶、花瓣和成熟果实,每个样品 1~5 g,重复 3 次。样品采后立即用液氮速冻后存于 -70 °C 冰箱备用。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 由本实验室保存。酵母菌株 AH109、质粒 pGBKT7 和 pGADT7 由上海交通大学杨洪全教授课题组惠赠。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

采用 trizol (Invitrogen) 法分别提取 ‘YZ14’ 紫茄根、茎、叶、花、果皮和果肉样品总 RNA,

以 Thermo Fisher Scientific 公司 NanoDrop 2000 超微量分光光度计和 1% 琼脂糖电泳检测 RNA 质量与浓度, 存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。以宝生物 (大连) 公司反转录试剂盒 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 生成 cDNA 作为基因扩增的模板。

1.2.2 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 基因 cDNA 全长的克隆与 *SmMYB* 基因的扩增

根据拟南芥中与花青素合成相关基因 *TTG1*、*GL3* 和 *TT8* 的序列信息, 在 NCBI 中进行 BLAST 比对后, 挑选其中与茄子亲缘关系近的植物同源蛋白序列, 并获得其相应的编码序列 (CDS), 针对两端的保守区设计能够扩增出全长的简并引物 (表 1), 并以茄子 cDNA 为模板, 采用 LA 酶扩增中间序列, 产物纯化后连接到 T 载体上, 经多次测序, 得到完整的编码序列。参照邵文婷 (2013) 设计特异引物 (表 1), 扩增得到 *SmMYB* 的编码序列。PCR 反应条件为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min (或 2 min), 32 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 8 min。

1.2.3 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

基因的测序结果利用 ORFfinder 软件寻找开放阅读框和翻译; 用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析氨基酸基本理化特性; 用 CholorP version 1.1 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/CholorP>) 分析蛋白的信号肽情况; 利用在线分析工具 SOMPA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白的二级结构; 分析蛋白的亲水性和疏水性, 利用 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 分析蛋白的跨膜情况; 亚细胞定位的预测采用在线软件 ProtComp 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)。不同物种间同源基因的氨基酸序列利用 ClustalW2 软件进行比对, 结果输入到 MEGA5 软件构建系统进化树, bootstrap 值设为 1 000, 采用 NJ 距离构建基因的进化树。

1.2.4 基因表达模式分析

分别提取 ‘YZ14’ 紫茄的黄色根、紫色茎表皮、绿色嫩叶、紫色花瓣 (呈 90° 开放)、紫色果皮和白色果肉的总 RNA, 每个样品取 500 ng 反转录成 cDNA 后稀释 1 000 倍, 取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 按照 TaKaRa 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex TaqTM (Tli RnaseH Plus) 步骤进行荧光定量 PCR 反应。以茄子 Actin 作为内参 (Astell et al., 1981), 设计特异引物 SmAction-F 和 SmAction-R (表 1), 对茄子各器官进行荧光定量 PCR 检测。利用 Funglyn 公司 FTC-3000 型荧光定量 PCR 仪进行反应, 程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 8 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 34 s, 共 40 个循环, 检测 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 基因在茄子不同组织器官中的表达情况。试验进行 3 次重复, 计算基因与 Actin 基因拷贝数的比值采用相对定量分析中 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行。

1.2.5 酵母双杂交重组表达载体的构建

分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 对扩增产物 *SmTTG1*、*SmGL3*、*SmTT8* 与 *SmMYB* 和酵母表达质粒 pGBKT7 (bait) 进行双酶切; 同时用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对扩增产物 *SmTTG1*、*SmGL3*、*SmTT8* 与 *SmMYB* 和酵母表达载体 pGADT7 (prey) 进行双酶切; 得到的基因片段分别与 pGBKT7 和 pGADT7 连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂于 LB 抗性平板上。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜, 筛选阳性重组子, 并进行菌液 PCR 和酶切鉴定, 将插入目的片段的阳性克隆送生工生物公司进行测序, 鉴定插入片段是否与目的基因一致。将序列正确的重组质粒分别命名为 pGBKT7-*SmTTG1*、pGBKT7-*SmGL3*、pGBKT7-*SmTT8*、pGADT7-*SmTTG1*、pGADT7-*SmTT8* 和 pGADT7-*SmMYB*。

1.2.6 酵母细胞的转化

将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存的酵母菌株 AH109, 在含有 2% 葡萄糖的 YPDA 固体平板上划线, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2 ~ 3 d。挑取单菌落于 5 mL 含有 2% 葡萄糖的 YPDA 液体培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h。将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌液转接到 50 mL 含有 20% 葡萄糖的 YPDA 液体培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h。取 1.5 mL 菌液 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 弃上清液后加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 一步转化缓冲液重悬菌体, 加入

bait、prey 载体和 carrierDNA 各 100 ng，充分混匀。45 ℃水浴 30 min 后涂板于 SD/-Trp/-Leu 培养基，30 ℃培养大约 3 d。

1.2.7 酵母双杂交检测 SmTTG1、SmGL3、SmTT8 和 SmMYB 蛋白之间的相互作用

将重组质粒与两个对照组分别共转化到 AH109 感受态细胞，转化方法如上。转化产物分别涂布于 SD/-Trp/-Leu 培养基，于 30 ℃倒置培养 3 ~ 4 d，观察菌落生长情况，用无菌牙签挑取平板上生长的菌落转接于 SD/-Trp/-Leu/-His 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上，通过观察其是否生长，判断它们是否互作。

表 1 引物名称及序列
Table 1 List of primers and sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction enzyme cutting site
SmTTG1-F	ATGGADAATTCAAGTCAAGAATC	
SmTTG1-R	TTATACTTTAAGCAGCTGCAACTTG	
SmGL3-F	ATGGCTATGGGACACCAAGACCAAG	
SmGL3-R	AGATTTCAAACTGCTCTCTGAAGTGCTTC	
SmTT8-F	ATGGAGATTATACAGCCTAATAGC	
SmTT8-R	TTAATWADCTCTAGGGATTATCTG	
SmTTG1-RT-F	CGAACACCCTTATCCACCTACG	
SmTTG1-RT-R	GAGAGTGAAAAGGGGTTCAATAG	
SmGL3-RT-F	TGATGGGTACTATAATGGGGATATC	
SmGL3-RT-R	CCTTTTGGCCTGTGGTTGTATGT	
SmTT8-RT-F	CTCATGTGTGTTTCTTCTCTTTTC	
SmTT8-RT-R	CACTACACCGTCCAATAGAGGAAT	
SmAction-F	CACTTAGCACCTCCAGCAGATGT	
SmAction-R	CTACAACAGCAGACCTGAGTTCACT	
SmTTG1-BD-F	cgcGAATTCATGGATAATTCAAGTCAAGAATCGC	EcoR I
SmTTG1-BD-R	cgcGTCGACTACTTTAAGCAGCTGCAACTTGTTAG	Sal I
SmGL3-BD-F	cgcGAATTCATGGCTATGGGACACCAAGA	EcoR I
SmGL3-BD-R	cgcGTCGACAGATTTCAAACTGCTCTCTG	Sal I
SmTT8-BD-F	cgcGAATTCATGGAGATTATACAGCCTAATAGCCTG	EcoR I
SmTT8-BD-R	cgcGTCGACATTAACTCTAGGGATTATCTGATGTATTG	Sal I
SmMYB-BD-F	cgcGAATTCATGAATACTGCTACTGTTGCTAA	EcoR I
SmMYB-BD-R	cgcGTCGACATTAAATAGATTCCATAGGTCAAT	Sal I
SmTTG1-AD-F	cgcGAATTCATGGATAATTCAAGTCAAGAATCGC	EcoR I
SmTTG1-AD-R	ccgCTCGAGTACTTTAAGCAGCTGCAACTTGTTAG	Xho I
SmGL3-AD-F	cgcGAATTCATGGCTATGGGACACCAAGA	EcoR I
SmGL3-AD-R	ccgCTCGAGAGATTTCAAACTGCTCTCTG	Xho I
SmTT8-AD-F	cgcGAATTCATGGAGATTATACAGCCTAATAGCCTG	EcoR I
SmTT8-AD-R	ccgCTCGAGATTAACTCTAGGGATTATCTGATGTATTG	Xho I
SmMYB-AD-F	cgcGAATTCATGAATACTGCTACTGTTGCTAA	EcoR I
SmMYB-AD-R	ccgCTCGAGATTAAATAGATTCCATAGGTCAAT	Xho I

2 结果与分析

2.1 SmTTG1、SmGL3 和SmTT8 基因的克隆与SmMYB基因的扩增

以茄子 cDNA 为模板，利用设计的简并引物进行 PCR，琼脂糖凝胶电泳检测得到符合预测长度的片段，将 PCR 产物纯化、连接到 T 载体上测序，分别得到 SmTTG1、SmGL3 和 SmTT8 的完整 cDNA 序列。同时分别将这几个序列用 BLAST 进行多序列比对，SmTTG1 与马铃薯 TTG1 基因序列同源性达到 94%，与番茄 TTG1 基因同源性为 92%，SmGL3 与马铃薯 GL3 基因序列同源性达到 94%，番茄 GL3 基因同源性为 93%，SmTT8 与马铃薯 TT8 基因序列同源性达到 85%，番茄 TT8 基因同源性为 83%。特异引物扩增得到的片段大小与 SmMYB 的大小一致。

2.2 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 基因的生物信息学分析

2.2.1 核酸及氨基酸序列分析

利用 NCBI 的 ORF Finder 工具, 找到 *SmTTG1* 基因序列的开放阅读框为 1 029 bp, 编码个 342 氨基酸, *SmGL3* 的开放阅读框为 1 887 bp, 编码 628 个氨基酸, *SmTT8* 的开放阅读框为 1 896 bp, 编码 631 个氨基酸。*SmTTG1* 蛋白的分子量 (Mw) 为 38.18 kDa, 等电点为 4.90, *SmGL3* 蛋白的分子量为 70.89 kD, 等电点为 5.61, *SmTT8* 蛋白的分子量为 70.14 kD, 等电点为 5.18。TMHMM 软件分析显示, *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 蛋白都没有跨膜结构, 不含信号肽序列, 表明这些蛋白都不是分泌蛋白。

分别将 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 推导的氨基酸序列与其它植物转录因子氨基酸序列进行比对, 并分别构建进化树。*SmTTG1* 与马铃薯、番茄的 *TTG1* 处于同一分支, 而与不同科的棉花、草莓、苜蓿等进化距离较远 (图 1, A); *SmGL3* 与马铃薯、番茄、本氏烟和矮牵牛进化距离较近 (图 1, B); *SmTT8* 也是与马铃薯、番茄的 *TT8* 基因进化距离最近 (图 1, C)。

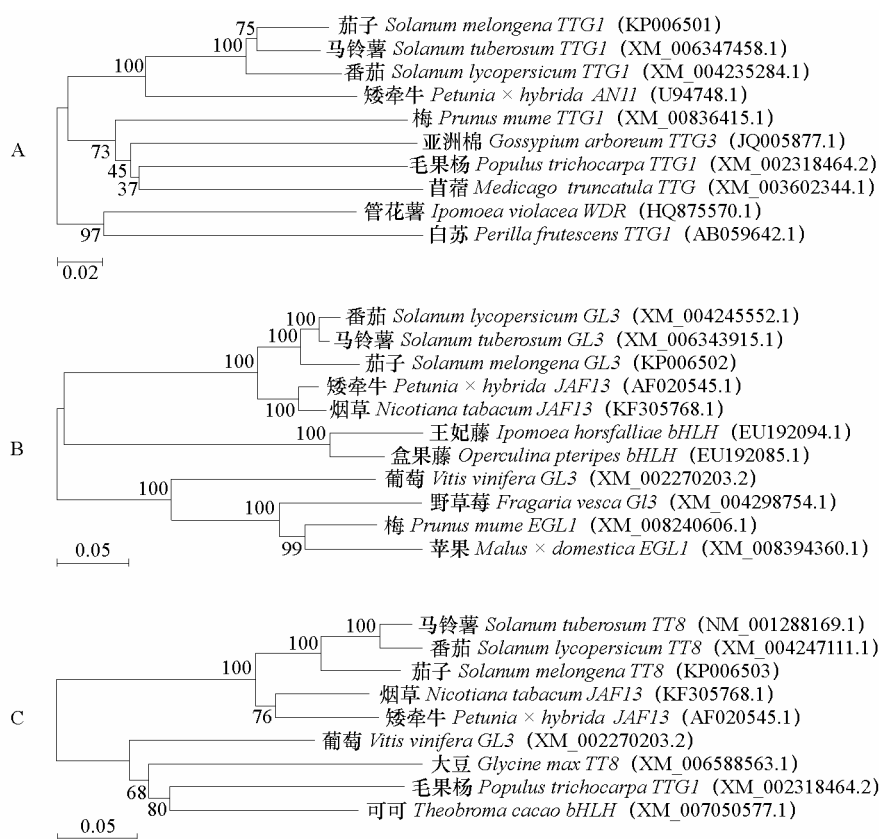


图 1 不同物种 *SmTTG1* (A)、*SmGL3* (B) 和 *SmTT8* (C) 的进化树

Fig. 1 Phylogenetic trees of *SmTTG1* (A), *SmGL3* (B) and *SmTT8* (C) from various species

2.2.2 蛋白二级结构及功能预测

InterPro 数据库鉴定结果显示 *SmTTG1* 有 4 个典型的 WD40 结构域, *SmGL3* 和 *SmTT8* 在 C 端都有一个典型的 HLH 结构域 (图 2)。SOPMA 软件分析蛋白的二级结构显示, 这些蛋白有 α 螺旋 (Alpha helix), “ β ” 转角 (Beta turn), 不规则卷曲 (Random coil) 和延伸链结构 (Extended strand)。其中, *SmTTG1* 蛋白的不规则卷曲结构和延伸链结构和所占比例最大, 分别为 52.63% 和 33.63%, α 螺旋和 β 转角最少为 9.65% 和 4.09%; *SmGL3* 蛋白的不规则卷曲结构和 α 螺旋和所占比例最大, 分

别为 53.34%和 33.60%，延伸链结构和 β 转角很少为 10.63%和 3.03%；SmTT8 蛋白的不规则卷曲结构和 α 螺旋和所占比例最大，分别为 51.51%和 35.34%，延伸链结构和 β 转角很少为 9.83%和 3.33%。通过 ProtComp Version 9.0 软件预测蛋白的亚细胞定位，SmGL3 和 SmTT8 蛋白都定位于细胞核，SmTTG1 定位在细胞质，这与这些基因不含有信号肽或分泌蛋白的预测结果是符合的。

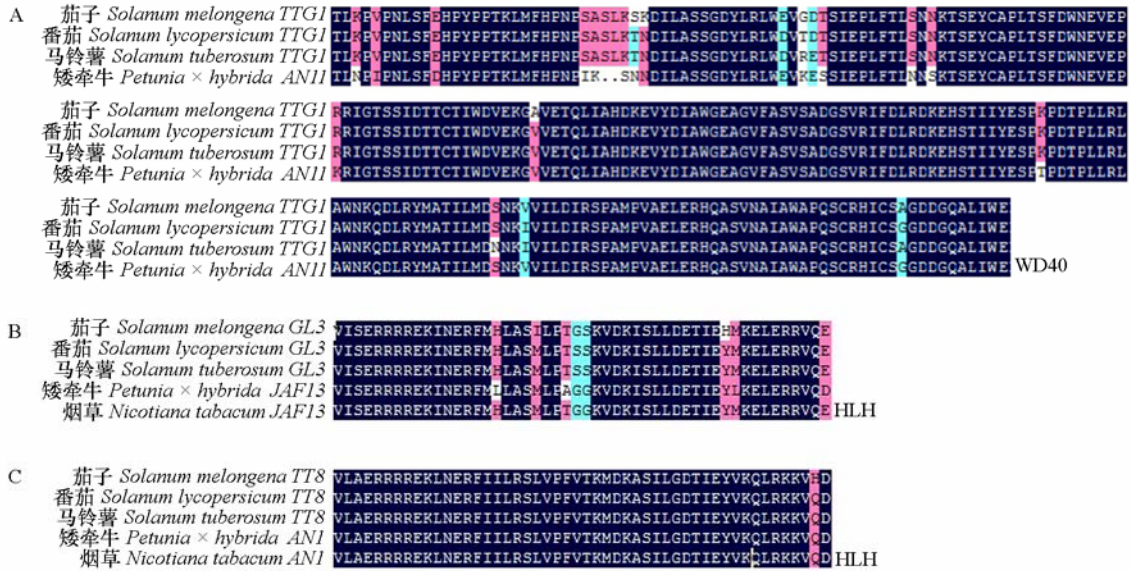


图 2 SmTTG1 (A) 蛋白 WD 结构域序列比对和 SmGL3 (B) 与 SmTT8 (C) 蛋白 HLH 结构域序列比对

Fig. 2 Comparison of the deduced TTG1 (A) amino acid sequences of the WD structural domain and the deduced GL3 (B) and TT8 (C) amino acid sequences of the HLH structural domain

2.3 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 基因在不同部位的表达分析

SmTTG1、*SmGL3* 和 *SmTT8* 在根、茎、叶、花、果皮和果肉中均有表达。*SmTTG1* 在叶片中表达水平最高，在其他组织中表达量无显著性差异。*SmGL3* 在茎中表达量最高，其次是花和果肉，在根和果皮中表达量较低，而在叶中表达量最低。*SmTT8* 在果皮中的表达量最高，在茎中次之，在根、叶、花、果肉中表达量低（图 6）。

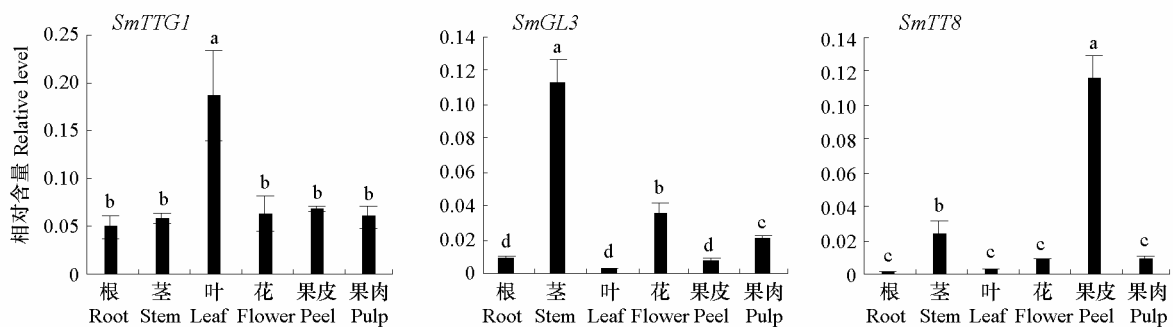


图 3 茄子不同组织中的 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 相对表达量

不同字母 (a, b, c) 表示差异的显著性 ($P \leq 0.05$)。

Fig. 3 The relative expression of *SmTTG1*, *SmGL3* and *SmTT8* in different tissues of *S. melongena*

Different letters (a, b, c) show significant difference ($P \leq 0.05$).

2.4 *SmTTG1*、*SmGL3*、*SmTT8* 与 *SmMYB* 蛋白之间的相互作用检测

以茄子的 cDNA 为模板, 用合成的引物扩增相应片段, 经电泳检测, 目的片段大小与引物的理论扩增值相符。提取筛选的阳性克隆质粒 DNA, 分别经 *EcoR* I 与 *Sal* I 双酶切, *EcoR* I 与 *Xho* I 双酶切, 电泳后初步表明载体构建正确。经测序比对, 与目的基因序列完全一致, 证明载体构建成功。

重组质粒的共转化产物与对照的共转化产物都能在 SD/-Trp/-Leu 培养基上正常生长, 但是在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上, 只有重组质粒组 pGBKT7-*SmTT8*/pGADT7-*SmTTG1* 能正常生长 (图 7, A), pGBKT7-*SmTTG1*/pGADT7-*SmGL3* 能长出菌落 (图 7, B), 还有 pGBKT7-*SmTTG1*/pGADT7-*SmMYB*、pGBKT7-*SmGL3*/pGADT7-*SmMYB*、pGBKT7-*SmTT8*/pGADT7-*SmMYB* 能正常生长 (图 7, C)。相反, 诱饵组对照 pGBKT7-*SmTTG1*/pGADT7、pGBKT7-*SmGL3*/pGADT7、pGBKT7-*SmTT8*/pGADT7 和猎物组对照 pGBKT7/pGADT7-*SmTTG1*、pGBKT7/pGADT7-*SmGL3* 和 pGBKT7/pGADT7-*SmMYB* 都没有生长。

酵母双杂交试验结果表明, *SmMYB* 分别与 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 之间存在相互作用, 且 *SmTTG1* 与 *SmTT8*、*SmGL3* 之间也存在着相互作用。所有的共转化产物都能在 SD/-Trp/-Leu 平板上正常生长且长势很好, 同时诱饵组 pGBKT7-*SmTTG1*、pGBKT7-*SmGL3*、pGBKT7-*SmTT8* 和猎物组 pGADT7-*SmTTG1*、pGADT7-*SmTT8*、pGADT7-*SmMYB* 都不存在自激活反应。

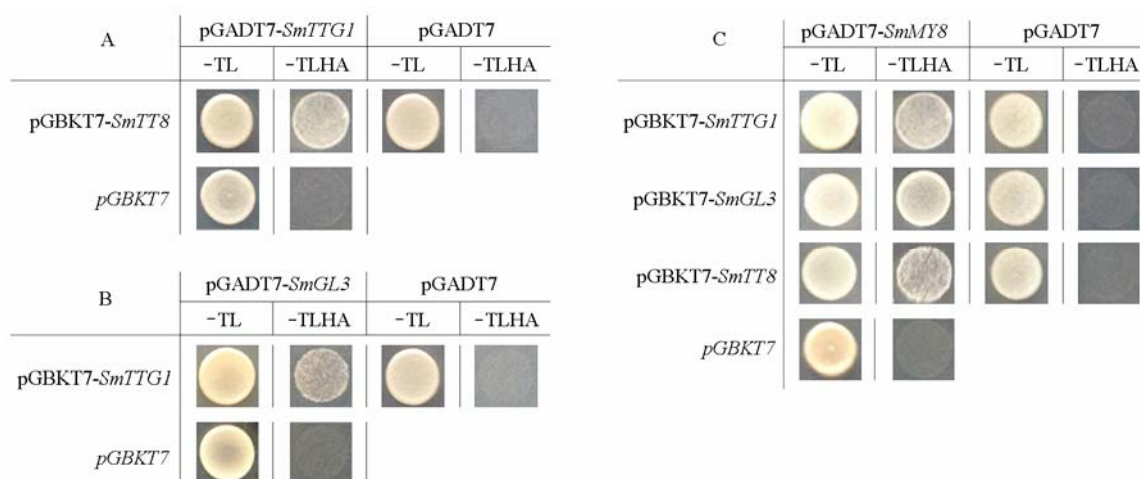


图 4 利用酵母双杂交检测 *SmTTG1*、*SmGL3*、*SmTT8* 和 *SmMYB* 蛋白之间的相互作用

- TL: 缺乏色氨酸和亮氨酸; - TLHA: 缺乏色氨酸、亮氨酸、组氨酸和腺嘌呤。

Fig. 4 Analysis of the interactions between *SmTTG1*, *SmGL3*, *SmTT8* and *SmMYB* in yeast two-hybrid assays

- TL: Lack of tryptophan and leucine; - TLHA: Lack of tryptophan, leucine, histidine and adenine.

3 讨论

花色苷生物合成途径在被子植物中是很保守的, 其相关基因在亲缘关系相近的物种间同样具有相当的保守性 (卢其能 等, 2008)。用简并引物, 通过 RT-PCR 的方法从茄子中克隆到了 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 基因的全长 cDNA, 这再次表明在茄科中控制花色苷生物合成的 BWM 三元复合体中的 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 转录因子基因在其 3' 和 5' 端是相当保守的。

WD40 重复蛋白是在植物细胞质中发现的, 具有 β 螺旋蛋白组结构, 一般含有 4 ~ 16 个串联重复的 WD 基元, 其核心区域由 40 个氨基酸残基组成的保守序列 (刘仕芸 等, 2006)。在植物花色素合成中克隆出的 WD40 转录因子较少, 仅在苜蓿、拟南芥、矮牵牛和大花牵牛中克隆出 *MtWID* (Pang et al., 2009)、*AtTTG1* (Walker et al., 1999)、*PhAN11* (de Vetten et al., 1997) 和 *InWDR1*

(Morita et al., 2006) 基因。本研究中克隆得到的 *SmTTG1* 转录因子含有 4 个重复的典型 WD 单元, 定位于细胞质中, 与其最初在细胞质中被发现相符合, 因此认为其是一种典型的 WD40 转录因子。

bHLH 类转录因子有两个功能区域, 一个是 N 端, 约由 18 个亲水碱性氨基酸组成的 DNA 结合区; 另一个是 C 端, 主要由疏水氨基酸组成的 HLH 区, 负责与其它 bHLH 类转录因子形成二聚体 (郭凤丹 等, 2011)。已克隆的花青素合成调控相关的 bHLH 蛋白序列高度保守。本研究中克隆得到的 *SmGL3* 和 *SmTT8*, 在 C 端都含有 1 个由 50 个氨基酸组成的 HLH 结构, 预测其蛋白定位于细胞核中, 符合其发挥转录调控作用的要求。因此认为 *SmGL3* 和 *SmTT8* 都是典型的 bHLH 类转录因子。

本研究中取不同部位的 ‘YZ14’ 紫茄组织进行荧光定量分析, 对研究基因的作用方式具有一定的积极意义。RT-qPCR 的相对表达量分析结果表明, *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 在茄子各个组织中均有表达, 但表达量不同, 不同基因的不同组织间表达量存在显著差异, 具有组织特异性。*SmTTG1* 在叶中表达量最高, 而 *SmGL3* 和 *SmTT8* 分别在茎和果皮中最高, 这可能与基因在不同组织所参与的生物学功能重要程度有关, 也可能是基因在表达量较低的组织中的功能被其他蛋白所替代或补充。

酵母双杂交系统是研究蛋白质相互作用的有效方法, 操作简单, 灵敏度高, 自从 Fields 和 Song (1989) 首先创立了酵母双杂交技术, 为检测相互作用的蛋白及蛋白功能的研究提供了有效的途径。本研究通过酵母双杂交试验表明茄子中的 SmMYB (邵文婷, 2013) 分别与 *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 发生相互作用, 且 *SmTTG1* 与 *SmTT8*、*SmGL3* 之间也存在着相互作用。目前已有研究表明, 大部分物种的花青素的生物合成都是由 WD40、bHLH 和 MYB 这 3 类转录因子形成蛋白复合体结合结构基因的启动子进行调控的 (Tanaka & Ohmiya, 2008)。从非洲菊中分离得到的 MYB 转录因子 GMYB10 与叶片、花茎和花的花青素形成相关, 它需要与 bHLH 转录因子 GMYC1 相互作用调控花青素的合成 (Elomaa et al., 2003)。矮牵牛的花瓣和花粉囊中的花青素是由两个不同的 MBW 蛋白复合物调控, WD40 AN11、bHLH AN1 和 R2R3-MYB AN2 复合蛋白调控花瓣内的花青素合成, WD40 AN11、bHLH AN1 和 R2R3 AN4 则调控花粉囊 (Gerats & Strommer, 2008)。在拟南芥中的 MBW 复合体 TT2/TT8/TTG1 能够调控种皮原花青素生物合成 (Baudry et al., 2004), 而 GL1/GL3-EGL3-TT8/TTG1 复合体可以控制毛状体的分化 (Payne et al., 2000; Maes et al., 2008)。TTG1 转录因子参与了很多生理反应, 而 bHLH 蛋白 TT8、GL3 和 EGL3 在功能上部分相似 (Zhang et al., 2003), 且有研究表明 MBW 蛋白复合体对于 DNA 的特异结合位点是由 MYB 蛋白决定的 (邢文 等, 2012)。

综上所述, *SmTTG1*、*SmGL3* 和 *SmTT8* 之间有复杂的相互作用并且形成复合体共同调控茄子花青素的合成。今后还可以用免疫共沉淀, 双分子荧光互补技术, GST Pull down 和亲和印记等方法对其蛋白之间的相互作用进一步验证, 为研究茄子花青素合成调控机制及提高茄子品质提供理论基础。

References

- Astell C R, Ahlstrom-Jonasson L, Smith M, Tatchell K, Nasmyth K A, Hall B D. 1981. The sequence of the DNAs coding for the mating-type loci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 27 (1): 15 - 23.
- Baudry A, Heim M A, Dubreucq B, Caboche M, Weisshaar B, Lepiniec L. 2004. TT2, TT8 and TTG1 synergistically specify the expression of BANYULS and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 39 (3): 366 - 380.
- de Vetten N, Quattrocchio F, Mol J, Koes R. 1997. The an11 locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes & Development*, 11 (11): 1422 - 1434.
- Elomaa P, Uimari A, Mehto M, Albert V A, Laitinen R A, Teeri T H. 2003. Activation of anthocyanin biosynthesis in *Gerbera hybrida* (Asteraceae) suggests conserved protein-protein and protein-promoter interactions between the anciently diverged monocots and eudicots. *Plant Physiology*, 133 (4): 1831 - 1842.
- Fields S, Song O K. 1989. A novel genetic system to detect protein protein interactions. *Nature*, 340: 245 - 246
- Gerats T, Strommer J. 2008. *Petunia* evolutionary, developmental and physiological genetics. New York: Springer: 450.

- Guo Feng-dan, Wang Xiao-zhong, Liu Xue-ying, Xia Han, Wang Xing-jun. 2011. Metabolic regulation of plants anthocyanin. Chinese Bulletin of Life Sciences, 23 (10): 938 - 944. (in Chinese)
- 郭凤丹, 王效忠, 刘学英, 夏 晗, 王兴军. 2011. 植物花青素生物代谢调控. 生命科学, 23 (10): 938 - 944.
- Holton T A, Cornish E C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell, 7 (7): 1071.
- Hu Ke, Han Ke-ting, Dai Si-lan. 2010. Regulation of plant anthocyanin synthesis and pigmentation by environmental factors. Bulletin of Botany, (3): 307 - 317. (in Chinese)
- 胡 可, 韩科厅, 戴思兰. 2010. 环境因子调控植物花青素合成及呈色的机理. 植物学报, (3): 307 - 317.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. 2005. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. Trends in Plant Science, 10 (5): 236 - 242.
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. Annu Rev Plant Biol, 57: 405 - 430.
- Li Juan-juan. 2007. Advances in anthocyanin. Journal of the Graduates Sun Yat-sen University: Natural Sciences, Medicine, 28 (2): 1 - 5. (in Chinese)
- 李娟娟. 2007. 花青素研究进展. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, 28 (2): 1 - 5.
- Liu Shi-yun, Huang Yan-lan, Zhang Shu-zhen. 2006. Regulatory gene of anthocyanin biosynthesis in plant. Plant Physiology Communications, 42 (4): 747 - 754. (in Chinese)
- 刘仕芸, 黄艳岚, 张树珍. 2006. 植物花青素生物合成中的调控基因. 植物生理学通讯, 42 (4): 747 - 754.
- Lu Qi-neng, Yang Qing, Que Zhi-qun, Huang You-ming. 2008. cDNA cloning and expression analysis of CHS gene from wild potato. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 23 (5): 17 - 22. (in Chinese)
- 卢其能, 杨 清, 却志群, 黄友明. 2008. 马铃薯野生种 CHS 基因 cDNA 的克隆与表达分析. 华北农学报, 23 (5): 17 - 22.
- Maes L, Inzé D, Goossens A. 2008. Functional specialization of the TRANSPARENT TESTA GLABRA1 network allows differential hormonal control of laminal and marginal trichome initiation in *Arabidopsis rosette* leaves. Plant Physiology, 148 (3): 1453 - 1464.
- Morita Y, Saitoh M, Hoshino A, Nitasaka E, Iida S. 2006. Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of c and ca mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. Plant and Cell Physiology, 47 (4): 457 - 470.
- Pang Y, Wenger J P, Saathoff K, Peel G J, Wen J, Huhman D, Allen S N, Tang Y, Cheng X, Tadege M. 2009. A WD40 repeat protein from *Medicago truncatula* is necessary for tissue-specific anthocyanin and proanthocyanidin biosynthesis but not for trichome development. Plant Physiology, 151 (3): 1114 - 1129.
- Payne C T, Zhang F, Lloyd A M. 2000. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1. Genetics, 156 (3): 1349 - 1362.
- Ramsay N A, Glover B J. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. Trends in Plant Science, 10 (2): 63 - 70.
- Shao Wen-ting, Liu Yang, Han Hong-qiang, Chen Huo-ying. 2013. Cloning and expression analysis of an anthocyanin-related transcription factor gene *SmMYB* in eggplant. Acta Horticulturae Sinica, 40 (3): 467 - 478. (in Chinese)
- 邵文婷, 刘 杨, 韩洪强, 陈火英. 2013. 茄子花青素合成相关基因 *SmMYB* 的克隆与功能研究. 园艺学报, 40 (3): 467 - 478.
- Tanaka Y, Ohmiya A. 2008. Seeing is believing: Engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. Current Opinion in Biotechnology, 19 (2): 190 - 197.
- Walker A R, Davison P A, Bolognesi-Winfield A C, James C M, Srinivasan N, Blundell T L, Esch J J, Marks M D, Gray J C. 1999. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. The Plant Cell Online, 11 (7): 1337 - 1349.
- Xing Wen, Zhang Wei, Bao Ying, Ning Guo-gui, Bao Man-zhu. 2012. Recent advances of MYB transcription factors involved in the regulation of flavonoid biosynthesis. Sciencepaper Online, 201201-789. (in Chinese)
- 邢 文, 张 蔚, 包 颖, 宁国贵, 包满珠. 2012. 调控植物类黄酮生物合成的 MYB 转录因子研究进展. 中国科技论文在线, 201201-789.
- Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne C T, Lloyd A. 2003. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. Development, 130 (20): 4859 - 4869.
- Zhang Ning, Hu Zong-li, Chen Xu-qing, Hou Xiao-shu, Li Yong, Chen Guo-ping. 2008. Plant anthocyanin metabolic pathway analysis and regulatory model. China Biotechnology, 28 (1): 97 - 105. (in Chinese)
- 张 宁, 胡宗利, 陈绪清, 侯晓殊, 李 勇, 陈国平. 2008. 植物花青素代谢途径分析及调控模型建立. 中国生物工程杂志, 28 (1): 97 - 105.