

浒苔光照和盐度胁迫响应基因 *UpMYB44* 的 克隆与表达分析*

何 渊 杨娟娟 沈颂东

(苏州大学基础医学与生物科学学院 苏州 215000)

摘要 为证明 R2R3-MYB 转录因子在浒苔响应非生物胁迫例如盐度和光照的过程中发挥的重要调控作用, 利用实时荧光定量 PCR、酵母双杂交系统、亚细胞定位等技术, 研究获得了浒苔 *UpMYB44* 基因 1 437 bp 的开放阅读框(ORF)全长序列, 编码 478 个氨基酸, 属于典型的 R2R3-MYB 转录因子并通过烟草叶片转化确定其定位于细胞核, *UpMYB44* 参与浒苔响应光照和盐度的胁迫过程, 其中在低光和高盐胁迫下 *UpMYB44* 基因的相对表达量升高。筛选出了与 *UpMYB44* 互作的 UpCPP5 蛋白, 该蛋白与浒苔的生长和细胞分裂有关, 推测 *UpMYB44* 可能通过与 UpCPP5 互作, 形成蛋白复合体参与浒苔的增殖过程。研究为日后深入探究 MYB 类转录因子家族调控藻类生长发育的过程奠定了基础, 同时为研究浒苔快速繁殖的机制提供了思路。

关键词 浒苔; *UpMYB44*; 转录因子; 光照; 盐度; 快速繁殖

中图分类号 Q943.2 doi: 10.11693/hyh20210200038

非生物胁迫严重影响了植物的生长和发育, 面对不利的环境, 植物可以通过引发一系列的生理生化反应去适应这种不良影响(Huang *et al*, 2012)。MYB 转录因子可以作为植物响应非生物胁迫的重要调控因子, 已被广泛研究(Ambawat *et al*, 2013), MYB (V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, 存在于真核生物中, 广泛参与植物细胞分化、信号转导和次级代谢调控等多种生命活动, 特别在植物的转录调节中发挥着重要的作用(Mikami *et al*, 2013)。根据 MYB 蛋白含有的不同数量的结构域, MYB 基因可以分为 1R、R2R3、3R、4R 这四种类型(杜静静等, 2019)。尤其是 R2R3-MYB 类转录因子, 该类转录因子含有 2 个 MYB 结构域, 参与调节植物在面对环境胁迫时的初级和次级代谢活动(Chen *et al*, 2019)。植物中最早发现 MYB

基因的是玉米体内的 *C-MYB*, 该基因参与玉米的花青素合成过程(Marocco *et al*, 1989), 在后续的研究中又陆续在多种植物中发现了 MYB 基因, 在棉花中发现了 219 个基因(Baldoni *et al*, 2015), 在水稻中鉴定出 183 个 MYB 基因(Chen *et al*, 2006), *GmMYB010* 参与了大豆抗虫的过程(陆捡花等, 2017)。

在环境胁迫响应方面, 对 MYB 基因也进行了相应的研究。比如在刚毛柽柳(*Tamarix hispida*)中对 MYB 基因家族在环境胁迫下的表达进行了差异分析(Zhang *et al*, 2018), *TaMYB* 参与了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)对干旱环境胁迫的响应过程(Zhao *et al*, 2018), 植物中大部分的 R2R3-MYB 能够响应植物的盐胁迫从而提高其耐盐能力(张遵强等, 1998)。在诸多的环境因素中, 光照和盐度是影响藻类生命活动的重要环境因子(He *et al*, 2017)。在光照方面, 高光照条件下

* 国家重点研发计划资助项目, 2016YFC1402102 号; 自然资源部海洋生态环境科学与技术重点实验室开放基金资助项目, MEEST-2020-2 号; 中国博士后科学基金资助项目, 2020M681698 号; 江苏省自然科学基金资助项目, BK20200882 号; 江苏省博士后科研资助计划, 2020Z300 号; 江苏省高等学校自然科学研究项目, 20KJD170004 号。何 渊, 博士后, E-mail: yhe123@suda.edu.cn

通信作者: 沈颂东, 博士生导师, 教授, E-mail: shensongdong@suda.edu.cn

收稿日期: 2021-02-06, 收修改稿日期: 2021-06-02

会影响杜氏盐藻和雨生红球藻类胡萝卜素合成途径中关键基因的表达水平(Pick *et al.*, 2019), 光照强度同样对浒苔的生长状态有关键的影响(Li *et al.*, 2012); 在盐度方面, 高盐度的培养会促进杜氏盐藻类胡萝卜素的合成(Shang *et al.*, 2018), 盐度同样会影响浒苔的氮元素富集从而影响其增殖(Zheng *et al.*, 2019)。

浒苔(*Ulva prolifera*)是一种常见的大型海洋绿藻, 具有单层细胞围绕成的管状结构, 广泛分布于低潮区的滩涂、礁石和底泥之中(Fan *et al.*, 2014)。浒苔具有细丝状易于漂浮的外观, 多样的繁殖方式以及能够抵御多种环境因子胁迫等生物学特征可以帮助浒苔承受多种环境压力, 例如高盐、干旱和强光照条件, 且可以在较广的温度范围内存活, 是一种生命力很强的海藻(Xiao *et al.*, 2016)。从 2007 年起, 我国的黄海海域每年都会暴发以浒苔为主的“绿潮”灾害, 据统计每年“绿潮”灾害所引发的生物量达到了数百万吨(Liu *et al.*, 2015), 给沿海地区造成了巨大的经济损失和严重社会影响(Zhang *et al.*, 2017; 王宗灵等, 2018; Zhao *et al.*, 2019a)。相对于 MYB 家族在高等植物中的生长发育、生理代谢、生物胁迫与非生物胁迫功能研究的大量研究成果, 人们对 MYB 家族转录因子在浒苔中的结构和功能研究较少。浒苔能够引发“绿潮”灾害和浒苔具有抵御夏季海面的极端环境的能力密切相关, 研究表明 MYB 家族的转录因子具有应答外界环境胁迫的能力(Dubos *et al.*, 2010), 因此我们推测 MYB 类转录因子在浒苔夏季抵御海面严酷的环境胁迫大量增殖的过程中起到了一定的作用。

本研究依据前期已经完成的浒苔光照和盐度胁迫下的转录组测序结果, 筛选出具有表达水平显著变化的 MYB 类基因 MYB44, 将其命名为 *UpMYB44*, 进一步对其进行序列扩增、生物信息学分析、实时荧光定量 PCR 分析等实验初步探究了该基因的表达模式和分子功能, 证明其在非生物胁迫例如盐度和光照的响应过程中发挥了重要的调控作用, 为今后深入研究 *UpMYB44* 基因的功能奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于 2020 年 7 月在山东省青岛市市南区栈桥潮间带(37.46°N, 121.71°E)采集浒苔配子体样品, 放入容器中带回苏州大学藻类实验室。用无菌水清洗藻体, 除去表面的泥沙和其他杂物, 放置于光照培养箱培养。培养条件为 f/2 培养基, 温度为 20 °C, 光照强度

为 90 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 盐度为 24, 光周期为: L:D=12 h : 12 h。每 3 d 换一次过滤海水, 预培养 7 d。

1.2 光照和盐度胁迫处理

用三种不同光照培养浒苔 5 d, 18 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 设置为低光照组(l), 90 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 设置为中光照组(m), 216 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 设置为高光照组(h); 用三种不同盐度海水培养浒苔 5 d, 低盐度组(L)设置为 12, 中盐度组(M)设置为 24, 高盐度组(H)设置为 40, 培养密度为 20 g/L, 温度为 20 °C, 光周期为: L:D=12 h : 12 h, 1 d 换一次过滤海水, 以上处理的每种样品均设置 3 个生物学重复。

1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

参照(He *et al.*, 2018)的方法使用 Takara 的总 RNA 提取试剂盒对三种不同光照和盐度处理的浒苔进行总 RNA 的提取, 同时通过 Thermo Fisher NanoDrop 2000 和琼脂糖凝胶电泳对所提取的 RNA 的浓度和纯度进行检测, 使用 Takara Reverse Transcription kit 将 2 μg 检测合格的 RNA 合成为 cDNA 第 1 链。

1.4 *UpMYB44* 基因的 cDNA 全长克隆

根据实验室获得的浒苔光照和盐度胁迫下的转录组数据(GenBank: SRX4552126, SRX5502767)设计一对特异性引物 *UpMYB44F/R*, *UpMYB44F*: ATGAC TTCCGAGGGGATGGAG, *UpMYB44R*: GACGAGCT GCTCGCGTTAAA。以之前获得的 cDNA 为模板, 使用 2 \times HieffTM PCR Master Mix (Yeasten) 扩增 *UpMYB44* 的 ORF 全长序列, 50 μL PCR 反应体系如下: 2 \times HieffTM PCR Master Mix 25 μL , 上游引物和下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , cDNA 模板 2 μL , 加 19 μL 的 ddH₂O 补至 50 μL 。PCR 反应程序如下: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。取上述 PCR 产物 10 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 使用 Gel Extraction Kit (康为世纪)切取符合目的基因片段大小的条带进行回收。使用 Hieff Clone[®] Zero TOPO-Blunt Cloning Kit (Yeasten)进行目的片段平末端扩增, 将构建好的质粒接种于 LB 固体培养基上过夜培养, 第二天挑取阳性克隆测序, 获得 *UpMYB44* 基因 ORF 区全长序列。

1.5 *UpMYB44* 生物信息学分析

使用 DNAMAN 软件对 *UpMYB44* 进行氨基酸保守序列分析; 利用 Expasy (<https://web.Expasy.Org/protparam/>)在线软件分析编码蛋白的大小、氨基酸数

量和等电点; 使用 NCBI 的 CDD 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对蛋白结构域进行预测; 利用 ProtScale 工具 (<http://web.Expasy.org/protscale/>) 对 UpMYB44 蛋白进行亲水性/疏水性分析; 采用 ExPaSy-SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 在线软件预测蛋白质的二级结构; 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对 UpMYB44 蛋白 3D 结构进行分析。

1.6 表达载体的构建及转化

参照 Al-Muhanna 等(2018)的方法采用 T4 连接酶将 UpMYB44 目的片段与 pET-32a 载体(反应体系包含 0.1 pmol 目的片段, 0.03 pmol 载体片段, 3 U T4 DNA 连接酶, 1×T4 DNA 连接酶缓冲液)在 16 °C 反应 12 h。采用热激法将连接产物转入大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞。用双酶切进行(Nde I, Xba I)鉴定, 将阳性质粒送去苏州金唯智公司进行测序鉴定。

1.7 UpMYB44 的蛋白表达

参照 Baneyx(1999)的方法将 pET-32a+UpMYB44(+)₁ μL 加入 100 μL BL21(DE3)感受态细菌中, 置冰上 20 min, 37 °C, 220 r/min 振荡 1 h, 离心后全部涂布于含 50 μg/mL Amp 的 LB 平板, 37 °C 倒置培养过夜。挑取转化平板上的单克隆接种在含 50 μg/mL Amp 的 3 mL LB 液体培养基的培养管中, 在 220 r/min, 37 °C, 4 h 摇床里进行培养, 当分光光度计测量值显示其 OD₆₀₀(600 nm 处的吸光值)≈0.6—0.8 时, 滴入浓度为 1.0 mmol/L IPTG, 37 °C 220 r/min 经过振荡 4 h 诱导蛋白表达后取 2 mL, 然后 14 000 r/min 离心, 弃去上清液, 采用 PBS 来重悬沉淀, 加 2×十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate loading buffer, SDS)上样缓冲液混合均匀之后, 沸水煮沸 10 min。然后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)超声破碎后收集上清, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 用 3 倍体积的平衡液[25 mmol/L Tris(pH 值 8.0), 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑]平衡 His 纯化基质, 将过滤后的上清与 His 纯化基质于 50 mL 离心管中 4 °C 混匀 1 h。用洗涤缓冲液[25 mmol/L Tris(pH 值 8.0), 300 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑]冲洗 4 次, 用洗脱缓冲液[25 mmol/L Tris(pH 值 8.0), 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑]洗脱 3 次, SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白纯化效果。

1.8 UpMYB44 亚细胞定位

参照 Xiong 等(2019)的方法设计亚细胞定位引物

YFP-UpMYB44F/R, YFP-UpMYB44F: AAGAGA CAGGATCCGAATTCATGACTTCCGAGGGGATGGAG, YFP-UpMYB44R: ACCTCCGACCGGTGCACTA GTGACGAGCTGCTCGCGGTTAAA。将酶切位点 BamH I 和 Sac I 加入目的基因 ORF 两端, 将测序成功的阳性质粒 T-blunt-UpMYB44 为模板进行扩增和切胶回收。使用 BamH I 和 Sac I 对质粒 pC131-YFP 进行双酶切, 产物纯化。将目的基因片段和载体 pC131-YFP 进行连接转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 获得重组质粒 pC131-UpMYB44-YFP。将空载质粒 pC131-YFP 和重组质粒 pC131-UpMYB44-YFP 分别转入农杆菌 GV3101 菌株中, 将阳性克隆放入含有 50 μg/mL 卡那霉素和 35 μg/mL 利福平的 LB 培养基中进行培养, 放置于 28 °C 摇床中以 250 r/min 速度培养过夜, 收集并重悬菌体, 当菌体浓度的 OD₆₀₀ 值在 0.5—1.0 之间, 静置 3 h 后注射入烟草叶片中, 注射后的烟草放置于 28 °C 培养箱中培养 2 d。用激光共聚焦显微镜观察侵染的烟草叶片, 进行 UpMYB44 蛋白亚细胞观察。

1.9 实时荧光定量 PCR

参照 He 等(2019)的方法设计实时荧光定量 PCR 并以不同光照和盐度处理的浒苔 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 实验, 荧光定量 PCR 采用 Hieff® qRT-PCR SYBR Green Master Mix (Yeasen)试剂, 使用 ASA-4800 Real-Time PCR 仪器(百源基因)进行反应, 以 *18S rDNA* 为内参基因, 具体引物序列如表 1 所示, 上述实验重复 3 次。结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对定量, 采用软件 Origin 8.0 对表达结果进行单因素方差统计(ANOVA)。数据使用 SPSS 21.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 设定为显著性差异, $P < 0.01$ 设定为极显著性差异。

1.10 UpMYB44 和 UpCPP5 互作验证

参照 Cai 等(2016)的方法制备 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 将 UpCPP5 作为诱饵构建 PGBKT7-CPP5 重组质粒进行毒性检测和自激活检测: 于 100 °C 沸水煮沸 carrier DNA 5 min, 立即置于冰上 2 min, 如此重复一次, 取 1.5 mL 无菌 EP 管, 配制转化体系, 50 μL 感受态细胞+5 μL carrier DNA+100 ng 诱饵质粒+100 ng 猎物空载, 加入 500 μL PEG/LiAc (8 mL 50% PEG+1 mL LiAc+1 mL TE), 30 °C 水浴 30 min, 加入 20 μL DMSO, 42 °C 水浴 15 min, 800 ×g 离心 1 min, 去上清, 加入 800 μL YPDA 重悬, 30 °C, 150 r/min, 振荡培养 1.5 h, 800 ×g 离心 5 min, 弃上清, 加入

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物
Tab.1 Primers used for quantitative real-time PCR

基因名称	引物名称	序列信息
<i>UpMYB44</i>	qUpMYB44F	ATAACCAGCTTTGCCCCGACATCA
	qUpMYB44R	GGGAGCGGGACAGGGATGTTGA
<i>18S rRNA</i>	18SF	ACCACATCCAAGGAAGGCAGCAG
	18SR	TGCGTCCCACCCGAAATCCAAC

1 mL 0.9% NaCl 重悬, 取 150 μ L 涂平板, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 4 d, 观察菌落直径及颜色; 构建 PGADT7-MYB44 重组质粒作为猎物进行诱饵和猎物的共转化, 依次从自激活、共转化实验组和共转化阴阳性对照组涂布的平板 DDO 上挑单菌落, 分别接种于 5 mL DDO 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C 250 r/min 培养 16 h, 取 300 μ L 菌液于 50 mL DDO 中, 30 $^{\circ}$ C 250 r/min 培养 8—12 h 至 OD₆₀₀ 值为 0.4—0.6; 各取 10 μ L 菌液点种到平板 DDO、TDO/3AT (15 mmol/L)、QDO 上, 30 $^{\circ}$ C 培养箱培养 3 d, 观察菌斑生长情况, 若涂布在平板 DDO 上长菌则共转化成功, 在平板 TDO/3AT (15 mmol/L) 上长菌而在 QDO 上不长菌为阳性结果, 在平板 TDO/3AT (15mmol/L) 上不长菌为阴性结果。

2 结果

2.1 *UpMYB44* ORF 区全长序列的克隆与序列分析

利用 RT-PCR 以浒苔 cDNA 为模板, PCR 扩增相应片段, 测序得到 *UpMYB44* 的 ORF 区全长序列, 序列全长为 1 437 bp, 共编码 478 个氨基酸。序列上传至 Genbank 数据库, 登录号为 MW174238。

2.2 *UpMYB44* 生物信息学分析结果

通过 NCBI 与其他物种的 MYB 蛋白进行 BLASTn 比对, 结果显示 *UpMYB44* 蛋白与另一种绿藻小球藻的 MYB44 蛋白有较高的同源性, 氨基酸的一致性为 50.00%, 与高等植物番木瓜、荷花、木槿、牵牛花、柿树和向日葵的氨基酸相似率也在 45.00%—50.00% 之间, 用 DNAMAN 将 *UpMYB44* 氨基酸序列与上述物种进行比对, 发现了较为保守的序列区域(图 1), 推测与这些 MYB 类转录因子有相似的生物学功能。利用 Expasy 在线网站预测结果显示 *UpMYB44* 蛋白含有 478 个氨基酸, 分子量为 52.49 kDa, 等电点为 6.15; 利用 CDD 数据库分析显示 *UpMYB44* 含有两个 SANT 结构域, 是典型的 R2R3-MYB(图 2); 利用 ProtScale 工具对 *UpMYB44* 蛋白进行亲水性/疏水性分析, 结果显示 *UpMYB44* 为亲水性蛋白; 在 SOPMA 在线网站预测蛋白二级结

构, *UpMYB44* 蛋白二级结构中含有 42.68% 的 α -螺旋结构、8.16% 的延伸连结构、9.62% 的 β -转角结构、39.54% 的无规则卷曲结构(图 3)。利用 Swiss-model 网站对 *UpMYB44* 蛋白进行 3D 结构预测, 发现与其蛋白二级结构结果类似, 具有较多的 α -螺旋结构和无规则卷曲结构(图 4)。

2.3 pET-32a+*UpMYB44* 融合蛋白的可溶性分析和纯化

结果表明, *UpMYB44* 融合蛋白主要以可溶性蛋白的形式存在于上清中, 但是在包涵体沉淀中也有一定的表达(图 5)。选择上清中可溶性蛋白进行后续蛋白纯化实验, 通过 4 次洗涤和 3 次洗脱, 获得了大小约为 65 kD (含标签) 的纯度较好的 *UpMYB44* 融合蛋白(图 6)。

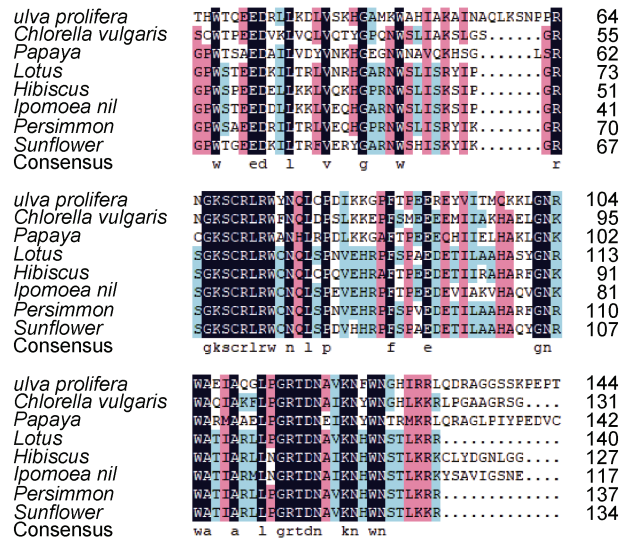


图 1 *UpMYB44* 与其他物种 MYB 类转录因子氨基酸序列的多重比对

Fig.1 Multiple alignment of the amino acid sequence of *UpMYB44* and MYB transcription factors from other species
注: 浒苔 *Ulva prolifera* (Genbank 序列号: MW174238); 小球藻 *Chlorella vulgaris* (PRW44975.1); 番木瓜 *Papaya* (XP_021900987.1); 荷花 *Lotus* (XP_010268609.1); 木槿 *Hibiscus* (KAE8672586.1); 牵牛花 *Ipomoea nil* (XP_019168759.1); 柿树 *Persimmon* (XP_011030579.1); 向日葵 *Sunflower* (XP_021983625.1)

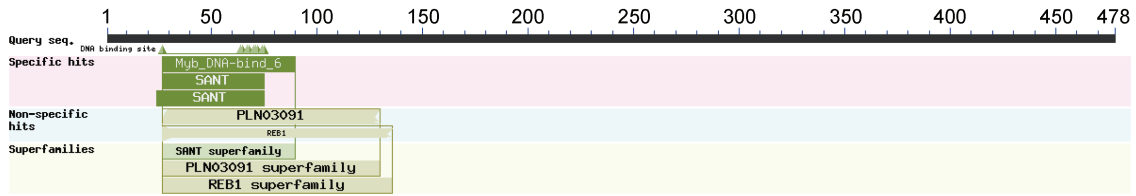


图 2 *UpMYB44* 蛋白保守结构域预测
Fig.2 Prediction of conservative domain of *UpMYB44* protein

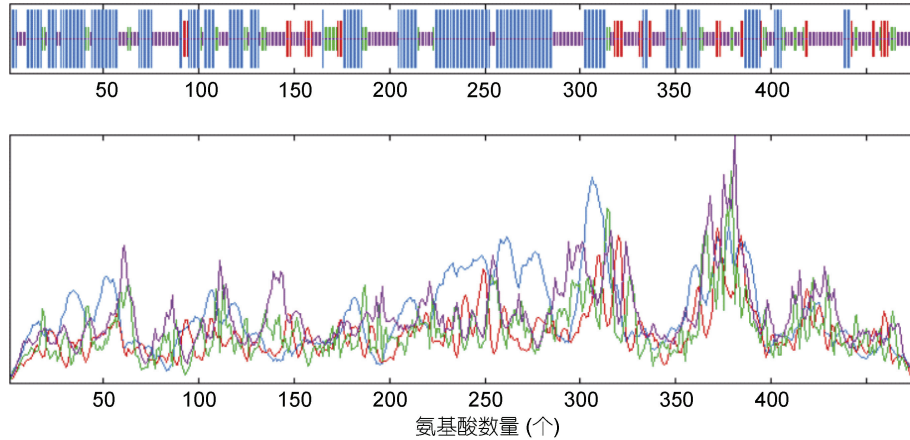


图 3 *UpMYB44* 二级结构预测
Fig.3 Prediction of secondary structure of *UpMYB44*
注: 红色: 延伸链结构; 紫色: 无规则卷曲结构; 蓝色: α -螺旋结构; 绿色: β -转角结构



图 4 *UpMYB44* 蛋白三维结构预测模型
Fig.4 Predicted 3D structure model of *UpMYB44* protein

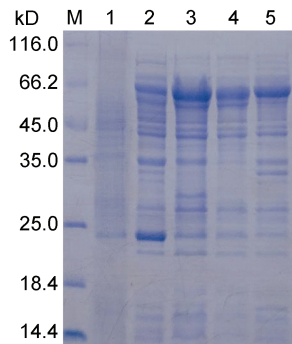


图 5 *UpMYB44* 蛋白表达鉴定 SDS-PAGE 分析
Fig.5 Identification of *UpMYB44* protein expression by SDS-PAGE analysis
注: M: 蛋白质分子质量标准(14.4—116 kD); 1: pET-32a 诱导; 2: 诱导前; 3: 诱导后; 4: 诱导破碎后上清; 5: 诱导破碎后沉淀

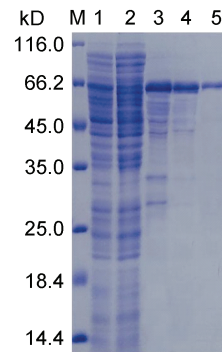


图 6 *UpMYB44* 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析
Fig.6 Purification of *UpMYB44* protein by SDS-PAGE analysis
注: M: 蛋白质分子质量标准(14.4—116 kD); 1: 破碎后处理样品; 2: 流穿; 3, 4: 30 mmol/L 咪唑洗脱; 5: 250 mmol/L 咪唑洗脱

2.4 *UpMYB44* 蛋白的定位

在对照组空载 pC131-YFP 中, 黄色荧光在细胞膜、细胞核和细胞质中都有分布, 而融合表达载体 pC131-*UpMYB44*-YFP 的细胞中, 黄色荧光仅在细胞核中被发现, 而在细胞膜和细胞质中都没有荧光发现, 并且黄色荧光和核定位的 marker 蛋白的红色荧光发生重合。结果显示 *UpMYB44* 蛋白仅定位在细胞核上, 这一点符合 MYB 类转录因子的特点(图 7)。

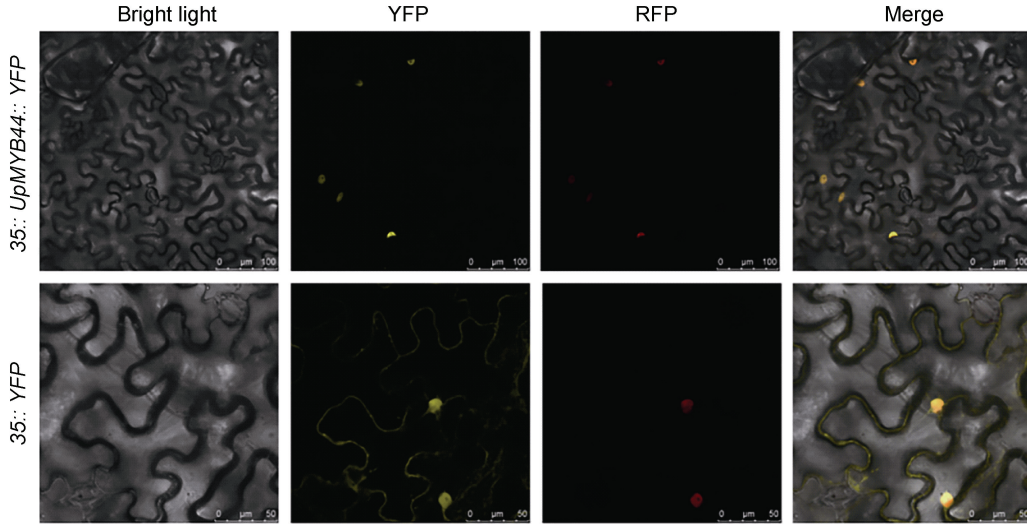


图 7 UpMYB44 蛋白的亚细胞定位

Fig.7 Subcellular localization of the UpMYB44 protein

注: 35:: *UpMYB44:: YFP*: 融合表达载体 pC131-*UpMYB44*-YFP; 35:: *YFP*: 对照组空载 pC131-YFP 在烟草叶片中转入了融合表达载体 (*UpMYB44*- YFP)和核标记 NLS-RFP (NLS, 核定位序列)。图中依次显示了明场(Bright light)、黄色荧光蛋白(YFP)、红色荧光蛋白(RFP)和合并(Merge)的图像

2.5 *UpMYB44* 在不同光照和盐度处理下的表达模式分析

UpMYB44 在三种不同光照和盐度处理下的表达量发生了显著变化, 在光照组中, 18 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 处理的低光组中 *UpMYB44* 的表达量最高, 随着光照强度的增加, *UpMYB44* 的表达量逐渐降低 (图 8), *UpMYB44* 的表达量在 216 $\mu\text{mol photons}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 处理的高光组中最低; 在盐度组中, 随着盐度的增加, *UpMYB44* 的表达量逐渐升高, *UpMYB44* 的表达量在盐度 40 处理的高盐组中最高, 在盐度 12 处理的低盐组中最低(图 9)。

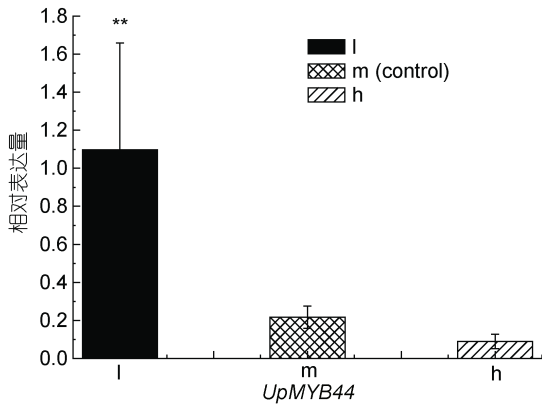


图 8 *UpMYB44* 在三种光照强度条件下的表达分析

Fig.8 Expression analysis of *UpMYB44* under three lights stresses

注: l: 低光照; m: 中光照; h: 高光照

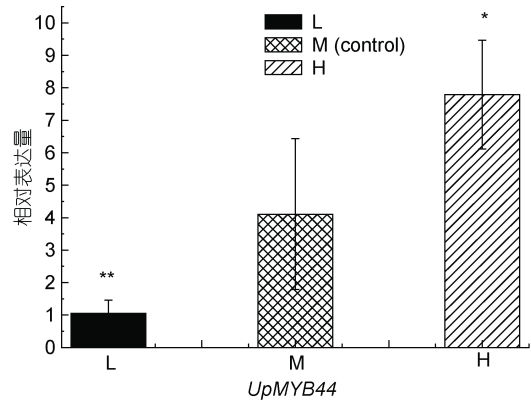


图 9 *UpMYB44* 在三种盐度强度条件下的表达分析

Fig.9 Expression analysis of *UpMYB44* under three salinities stresses

注: L: 低盐度; M: 中盐度; H: 高盐度

2.6 *UpMYB44* 和 *UpCPP5* 蛋白存在互作关系

MYB 类转录因子通常需要与其他蛋白互作进行发挥其功能。利用 STRING 在线网站预测 *UpMYB44* 的互作蛋白, 根据生物信息学预测结果发现 *UpMYB44* 和另一种调控植物生长发育和响应非生物胁迫中起重要作用的转录因子 *UpCPP* 存在互作关系, 以缺失蛋白 *UpCPP5* 为诱饵, 通过酵母双杂点对点验证, 结果表明重组诱饵质粒 PGBKT7-CPP5 对酵母细胞无毒且 3-氨基-1,2,4 三唑(3AT, 15mmol/L)能抑制激活 Y2H Gold 酵母报告基因, 酵母双杂交的结果显示, 将猎物质粒 PGADT7-MYB44 与诱饵质粒

PGBKT7-CPP5 共转化酵母细胞: 对照结果符合预期, 说明该系统可用于双杂交验证; 实验组涂布 DDO 平板能生长说明诱饵和猎物共转化成功, 涂布

TDO/3AT (15mmol/L)板能生长, QDO 平板不长, 说明激活报告基因 HIS3 的表达, 说明 *UpMYB44* 蛋白和 *UpCPP5* 蛋白之间存在相互作用(图 10)。

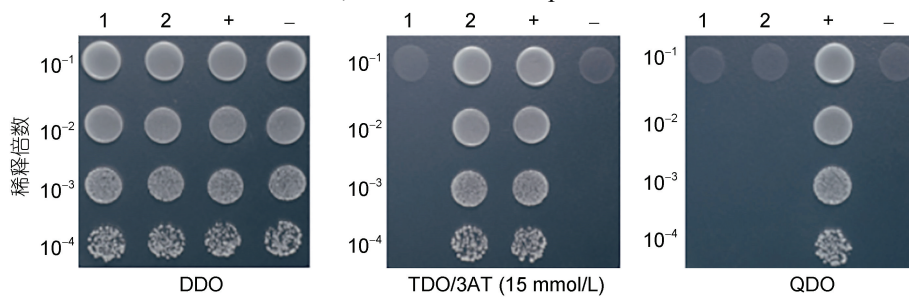


图 10 *UpMYB44* 与 *UpCPP5* 互作蛋白验证

Fig.10 Verification of *UpMYB44* interacting with *UpCPP5*

注: 1: Y2H [PGBKT7-CPP+ PGADT7]; 2: Y2H [PGBKT7-CPP + PGADT7-MYB44]; +: Y2H [pGBKT7-53 + pGADT7-T]; -: Y2H [pGBKT7-lam + pGADT7-T]

3 讨论

研究发现在植物中 *MYB* 类转录因子参与了多种生物和非生物胁迫的响应过程(Lea *et al*, 2007)。超表达玉米中的 *ZmMYB3R* 可以增加其对干旱和盐度的耐受性(Yin *et al*, 2017), 过量表达烟草的 *NtMYB15* 可以促进其适应低温胁迫(Wu *et al*, 2019), 在模式生物拟南芥中超表达 *AtMYB74* 同样具有增强其盐耐受性的功能(Xu *et al*, 2015), 而且 *MYB* 类转录因子常常需要与其他蛋白互作来发挥功能(Kaspar *et al*, 1999)。

本研究以受关注度较高的引发“绿潮”灾害的浒苔为研究对象, 初步分析了 *MYB* 类家族成员 *UpMYB44* 的生物学功能。结果表明 *UpMYB44* 有两个 *MYB* 结构域, 属于典型的 R2R3-MYB 转录因子, 研究表明该类转录因子参与了棉花和月季对高盐胁迫的响应(Zhao *et al*, 2019b, 包颖等, 2020)。盐度和光照是影响藻类正常生长和生理生化指标的两个环境因子(Arai *et al*, 1991), 特别是对浒苔而言, 盐度和光照的改变会引起其氧化应激反应(Luo *et al*, 2011), 以及影响其体内的总类胡萝卜素含量(He *et al*, 2020)。在本研究中, *UpMYB44* 在高盐条件下的表达量发生了显著提高, 说明该转录因子参与了浒苔的对高盐胁迫的响应过程, 可能对提高浒苔适应恶劣的外界环境的能力有一定帮助, 最终有利于其快速增殖。*R2R3-MYB* 转录因子也会对光照的改变作出响应, 在早期的研究中发现红色紫苏中存在一种光诱导的 *Myb-pl* 基因, 其在花青素的形成过程中起到了决定性作用(Gong *et al*, 1999), 在马铃薯中发现的 *StR2R3-MYB1* 就是一种光响应 *MYB* 类转录因子, 基

于对光处理后基因表达特性分析的结果表明该转录因子可能受到光信号和环境胁迫的诱导(秦玉芝等, 2015)。在浒苔中 *UpMYB44* 的表达量同样受到了不同光照强度的影响, 且随着光照的逐渐增强其表达量呈下降趋势, 这和一般应激反应的表现有差异, 推测夏季浒苔在漂浮状态下的高光照强度胁迫会影响其正常的生长状态, 导致部分基因的表达出现下调, 说明过高的光强对其增殖反而不利。*UpMYB44* 基因在浒苔受到光照和盐度胁迫时会发生响应, 对夏季抵御海面严酷的环境胁迫起到一定作用。对 *MYB* 类转录因子互作模式的研究也已经开展, 比如在苹果中 *MdMYB23* 蛋白通过结合 *MdBT2* 蛋白来抑制原花色素的积累(An *et al*, 2018), 通过鉴定与 *AtMAPK3P* 相互作用的 *MYB* 转录因子成员, 增强了我们对拟南芥中 *MAPK* 相互作用蛋白网络的认识, 也证实了蛋白质与蛋白质的相互作用对于生物过程至关重要(Giri *et al*, 2014)。

在本研究中, 通过酵母双杂交系统证明了 *UpMYB44* 蛋白和一种 *CPP* 蛋白具有互作, 通过和 Genbank 中的序列进行比对, 我们将其命名为 *UpCPP5*。*CPP* 蛋白又称为 *tesmin/TSO1-like* 蛋白, 在植物中广泛分布, 该家族在植物生长发育和细胞分裂控制中起重要作用(Yang *et al*, 2008), *TSO1* 参与了拟南芥花发育的细胞分裂过程(Liu *et al*, 1997), 如果该基因轻度的突变会影响拟南芥胚珠发育, 而强突变对所有花卉组织都有影响(Andersen *et al*, 2007), 因此, 猜测这两类转录因子的相互作用影响了浒苔的细胞分裂过程, 这个研究方向正好和目前浒苔如何引发“绿潮”灾害的研究热点相互关联。本实验的研

究材料浒苔是一种能够快速生长的灾害绿藻, 只要外界条件合适, 其生长速率相当惊人(Hiraoka *et al.*, 2008), 每年夏季由于其爆发性生长对我国沿海城市造成了巨大的环境污染(Yu *et al.*, 2017; He *et al.*, 2019), 对近海的生态系统也造成了严重的破坏(Qu *et al.*, 2020)。根据之前浒苔基因组的研究, 我们推测浒苔的快速生长和细胞的快速分裂密切相关, 但是浒苔增殖最终重要的是营养增殖, 因此后续可以通过深入研究浒苔中 MYB 家族和 CPP 家族的互作是否会影响浒苔的生长发育和细胞分裂, 并结合浒苔营养增殖方面的研究为进一步了解环境胁迫调控网络提供依据, 更重要的是为研究浒苔的快速繁殖机制提供了全新的思路。

4 结论

本研究在本实验室已有的研究基础上, 克隆了 1 个 *R2R3-MYB* 转录因子基因——*UpMYB44* 的 ORF 区全长序列, 其氨基酸序列与 GenBank 中已有的小球藻 MYB 蛋白具有相似性, 我们对其进行了生物学功能验证, 在异于浒苔最适环境的光照和盐度的培养条件下, *UpMYB44* 的表达量会发生显著变化, 证明其参与了浒苔响应光照和盐度压力的过程, 可能在盐度和光照压力应答中具有关键作用。实验证明 *UpMYB44* 与 CPP 类转录因子 *UpCPP5* 存在较强的互作, 推测二者的结合可能参与了浒苔的生长发育和细胞分裂过程, 但其具体的作用机制还需要进一步研究。

参 考 文 献

- 王宗灵, 傅明珠, 肖洁等, 2018. 黄海浒苔绿潮研究进展. 海洋学报, 40(2): 1—13
- 包颖, 李泽卿, 魏琳燕等, 2020. 月季 MYB 转录因子基因 *RcWER-like* 的克隆及表达分析. 核农学报, 34(6): 1144—1151
- 杜静静, 田岳, 冯昊等, 2019. 陆地棉基因 *GhMYB52* 的克隆及特征分析. 棉花学报, 31(6): 505—514
- 张遵强, 何希诚, 胡超宗等, 1998. 紫竹鞭段繁殖研究. 竹子研究汇刊, 17(2): 40—43
- 陆捡花, 李祥, 赵为等, 2017. 大豆 MYB 转录因子 *GmMYB010* 与其拟南芥同源基因的功能差异. 中国油料作物学报, 39(3): 281—293
- 秦玉芝, 邢铮, 潘妃等, 2015. 马铃薯光响应 *StR2R3-MYB1* 基因的克隆与表达分析. 湖南农业大学学报(自然科学版), 41(4): 378—384
- Al-Muhanna S G, Al-Muhanna S A, 2018. Construction and transformation of recombinant pET28a expression vector in BL21 (DE3) cells with basic bioinformatics analysis. Biochemical and Cellular Archives, 18(1): 147—151
- Ambawat S, Sharma P, Yadav N R *et al.*, 2013. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. Physiology and Molecular Biology of Plants, 19(3): 307—321
- An J P, Li R, Qu F J *et al.*, 2018. R2R3-MYB transcription factor MdMYB23 is involved in the cold tolerance and proanthocyanidin accumulation in apple. The Plant Journal, 96(3): 562—577
- Andersen S U, Algreen-Petersen R G, Hoedl M *et al.*, 2007. The conserved cysteine-rich domain of a tesmin/TSO1-like protein binds zinc *in vitro* and TSO1 is required for both male and female fertility in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Experimental Botany, 58(13): 3657—3670
- Arai A, Miura A, 1991. Effects of salinity and light intensity on the growth of brown algae, *Sargassum ringgoldianum*. Aquaculture Science, 39(3): 315—319
- Baldoni E, Genga A, Cominelli E, 2015. Plant MYB transcription factors: their role in drought response mechanisms. International Journal of Molecular Sciences, 16(7): 15811—15851
- Baneyx F, 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 10(5): 411—421
- Cai Y F, Pan L Q, Miao J J *et al.*, 2016. Identification of interacting proteins with aryl hydrocarbon receptor in scallop *Chlamys farreri* by yeast two hybrid screening. Ecotoxicology and Environmental Safety, 133: 381—389
- Chen Y H, Yang X Y, He K *et al.*, 2006. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. Plant Molecular Biology, 60(1): 107—124
- Chen C, Zhang K X, Khurshid M *et al.*, 2019. MYB transcription repressors regulate plant secondary metabolism. Critical Reviews in Plant Sciences, 38(3): 159—170
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E *et al.*, 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. Trends in Plant Science, 15(10): 573—581
- Fan X, Xu D, Wang Y T *et al.*, 2014. The effect of nutrient concentrations, nutrient ratios and temperature on photosynthesis and nutrient uptake by *Ulva prolifera*: implications for the explosion in green tides. Journal of Applied Phycology, 26(1): 537—544
- Giri P, Kumar A, Taj G, 2014. *In silico*-prediction of downstream MYB interacting partners of MAPK3 in *Arabidopsis*. Bioinformatics, 10(12): 721—725
- Gong Z Z, Yamazaki M, Saito K, 1999. A light-inducible Myb-like gene that is specifically expressed in red *Perilla frutescens* and presumably acts as a determining factor of the anthocyanin forma. Molecular and General Genetics MGG, 262(1): 65—72
- He Y, Ao Y, Yin Y *et al.*, 2019. Comparative transcriptome analysis between floating and attached *Ulva prolifera* in studying green tides in the Yellow Sea. Algal Research, 44: 101712
- He Y, Ma Y F, Du Y *et al.*, 2018. Differential gene expression for carotenoid biosynthesis in a green alga *Ulva prolifera* based

- on transcriptome analysis. *BMC Genomics*, 19(1): 916
- He Y, Yan Z H, Du Y *et al*, 2017. Molecular cloning and expression analysis of two key genes, HDS and HDR, in the MEP pathway in *Pyropia haitanensis*. *Scientific Reports*, 7(1): 17499
- He Y, Ye Y T, Shen S D, 2020. Effects of light and salinity on carotenoid biosynthesis in *Ulva prolifera*. *Acta Oceanologica Sinica*, 39(10): 50—57
- Hiraoka M, Oka N, 2008. Tank cultivation of *Ulva prolifera* in deep seawater using a new “Germling cluster” method. *Journal of Applied Phycology*, 20(1): 97—102
- Huang G T, Ma S L, Bai L P *et al*, 2012. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*, 39(2): 969—987
- Kaspar P, Dvoráková M, Králová J *et al*, 1999. Myb-interacting protein, ATBF1, represses transcriptional activity of Myb oncoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20): 14422—14428
- Lea U S, Slimestad R, Smedvig P *et al*, 2007. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and bHLH transcription factors and accumulation of end products in the flavonoid pathway. *Planta*, 225(5): 1245—1253
- Li Y X, Zhang X W, Xu D *et al*, 2012. Differential gene expression in *Ulva prolifera* under low light and low temperature conditions. *Current Genetics*, 58(4): 235—244
- Liu X Q, Li Y, Wang Z L *et al*, 2015. Cruise observation of *Ulva prolifera* bloom in the southern Yellow Sea, China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 163: 17—22
- Liu Z C, Running M P, Meyerowitz E M, 1997. *TSO1* functions in cell division during *Arabidopsis* flower development. *Development*, 124(3): 665—672
- Luo M B, Liu F, 2011. Salinity-induced oxidative stress and regulation of antioxidant defense system in the marine macroalga *Ulva prolifera*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 409(1—2): 223—228
- Marocco A, Wissenbach M, Becker D *et al*, 1989. Multiple genes are transcribed in *Hordeum vulgare* and *Zea mays* that carry the DNA binding domain of the *myb* oncoproteins. *Molecular and General Genetics MGG*, 216(2—3): 183—187
- Mikami K, Hosokawa M, 2013. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7): 13763—13781
- Pick U, Zarka A, Boussiba S *et al*, 2019. A hypothesis about the origin of carotenoid lipid droplets in the green algae *Dunaliella* and *Haematococcus*. *Planta*, 249(1): 31—47
- Qu T F, Zhao X Y, Hao Y *et al*, 2020. Ecological effects of *Ulva prolifera* green tide on bacterial community structure in Qingdao offshore environment. *Chemosphere*, 244: 125477
- Shang C H, Wang W, Zhu S N *et al*, 2018. The responses of two genes encoding phytoene synthase (Psy) and phytoene desaturase (Pds) to nitrogen limitation and salinity up-shock with special emphasis on carotenogenesis in *Dunaliella parva*. *Algal Research*, 32: 1—10
- Wu J D, Jiang Y L, Liang Y N *et al*, 2019. Expression of the maize MYB transcription factor ZmMYB3R enhances drought and salt stress tolerance in transgenic plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 137: 179—188
- Xiao J, Zhang X H, Gao C L *et al*, 2016. Effect of temperature, salinity and irradiance on growth and photosynthesis of *Ulva prolifera*. *Acta Oceanologica Sinica*, 35(10): 114—121
- Xiong C, Luo D, Lin A H *et al*, 2019. A tomato B box protein *SIBBX20* modulates carotenoid biosynthesis by directly activating *PHYTOENE SYNTHASE 1*, and is targeted for 26S proteasome mediated degradation. *New Phytologist*, 221(1): 279—294
- Xu R, Wang Y H, Zheng H *et al*, 2015. Salt-induced transcription factor *MYB74* is regulated by the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 66(19): 5997—6008
- Yang Z F, Gu S L, Wang X F *et al*, 2008. Molecular evolution of the *CPP-like* gene family in plants: insights from comparative genomics of *Arabidopsis* and Rice. *Journal of Molecular Evolution*, 67(3): 266—277
- Yin X M, Cui Y C, Wang M L *et al*, 2017. Overexpression of a novel MYB-related transcription factor, *OsMYBR1*, confers improved drought tolerance and decreased ABA sensitivity in rice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(4): 1355—1361
- Yu D F, Gai Z G, Kong X F *et al*, 2017. Monitoring *Ulva prolifera* in the Yellow Sea and East China Sea derived from multi-source remote sensing images. In: Proceedings of SPIE 10605, LIDAR Imaging Detection and Target Recognition 2017. Changchun: SPIE, 1060535
- Zhang C, Lu J, Wu J *et al*, 2017. Removal of phenanthrene from coastal waters by green tide algae *Ulva prolifera*. *Science of the Total Environment*, 609: 1322—1328
- Zhang T Q, Zhao Y L, Wang Y C *et al*, 2018. Comprehensive analysis of MYB gene family and their expressions under abiotic stresses and hormone treatments in *Tamarix hispida*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1303—1315
- Zhao Y, Cheng X Y, Liu X D *et al*, 2018. The wheat MYB transcription factor TaMYB³¹ is involved in drought stress responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1426
- Zhao X Y, Tang X X, Hu S X *et al*, 2019a. Photosynthetic response of floating *Ulva prolifera* to diurnal changes of in-situ environments on the sea surface. *Journal of Oceanology and Limnology*, 37(2): 589—599
- Zhao Y Y, Yang Z E, Ding Y P *et al*, 2019b. Over-expression of an R2R3 MYB Gene, *GhMYB73*, increases tolerance to salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science*, 286: 28—36
- Zheng M S, Lin J J, Zhou S D *et al*, 2019. Salinity mediates the effects of nitrogen enrichment on the growth, photosynthesis, and biochemical composition of *Ulva prolifera*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(19): 19982—19990

CLONING AND EXPRESSION OF THE *UPMYB44* GENE IN RESPONSE TO LIGHT AND SALINITY STRESS IN *ULVA PROLIFERA*

HE Yuan, YANG Juan-Juan, SHEN Song-Dong

(College of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215000, China)

Abstract To prove that the R2R3-MYB transcription factor plays an important regulatory role in the process of *Ulva prolifera* responding to abiotic stresses such as salinity and light, quantitative real-time PCR, yeast two-hybrid system, subcellular localization, and other technologies were used. A 1 437 bp full-length sequence of open reading frame (ORF) of *UpMYB44* in *Ulva prolifera* was obtained, encoding 478 amino acids. The amino acid sequence was analyzed using bioinformatics methods. Results show that there was a typical R2R3-MYB transcription factor and it was found located in the nucleus through transformation of *Tobacco* leaf. The *UpMYB44* gene responded to the low light and high salinity stresses of *U. prolifera* by increasing its relative expression. Meanwhile, the UpCPP5 protein interactive with UpMYB44 was found, and this protein was related to the growth and cell division of *U. prolifera*. We speculated that UpMYB44 might interact with UpCPP5 and form a protein complex with which the proliferation of *U. prolifera* was promoted. This study enhanced our understanding of the MYB transcription factors in regulation, growth, and development of the algae, and provided an insightful idea for studying the rapid growth mechanism of *U. prolifera*.

Key words *Ulva prolifera*; *UpMYB44*; transcription factor; light; salinity; rapid growth