

## 南方红豆杉 *bHLH* 基因克隆与序列分析

周 华<sup>1</sup> 朱 祺<sup>1</sup> 杨艳芳<sup>2\*</sup> 刘洪伟<sup>2</sup> 余发新<sup>1</sup> 邱德有<sup>2</sup>

(1. 江西省观赏植物遗传改良重点实验室, 江西省科学院生物资源研究所, 南昌 330029; 2. 林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091)

**摘 要** 以南方红豆杉为试材, 利用 RT-PCR 方法从南方红豆杉 cDNA 中克隆了一个 bHLH 转录因子——TcMYC, GenBank 注册号为 KC878013。通过生物信息学分析, 发现该基因全长 1 959 bp, 编码一个 650 个氨基酸残基的亲水蛋白; TcMYC 相对分子量为 71.4 kD, 等电点 pI 为 4.87。推测所克隆 TcMYC 基因编码的蛋白定位于细胞核中, 含有一个螺旋-环-螺旋结构, 与东北红豆杉、葡萄和烟草的 MYC 基因编码的蛋白序列一致性分别为 98%、45% 和 44%。进化树分析表明同科属植物的 MYC 转录因子归为一类, 红豆杉的 MYC 与其他草本被子植物的 MYC 转录因子亲缘关系都较远。在茉莉酸甲酯诱导的红豆杉细胞中, TcMYC 基因表达呈现略微下降趋势, 推测 TcMYC 可能负向调控紫杉醇生物合成, 为利用分子手段调控紫杉醇的生物合成提供了理论基础。

**关键词** 红豆杉属; bHLH; 基因克隆; 序列分析; 紫杉醇

中图分类号: Q781 文献标志码: A doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2015.01.010

## Cloning and Sequence Analysis of *bHLH* Gene from *Taxus chinensis* var. *mairii*

ZHOU Hua<sup>1</sup> ZHU Qi<sup>1</sup> YANG Yan-Fang<sup>2\*</sup> LIU Hong-Wei<sup>2</sup> YU Fa-Xin<sup>1</sup> QIU De-You<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Horticultural Plant Genetic and Improvement of Jiangxi, Institute of Biological Resources, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096; 2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, The Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

**Abstract** We cloned a new bHLH transcription factor named TcMYC by RT-PCR technology from *Taxus chinensis* var. *mairii*, with GenBank accession number KC878013. By the Blast analysis, it belongs to MYC subgroup. By the bioinformatic analysis, the sequences length of TcMYC is 1 959 bp encoding one opening reading frame with 650 amino acid residues with hydrophilic property. The molecular weight of TcMYC is 71.4 kD, and the theoretical pI is 4.87. The predicated protein TcMYC is localized to cell nucleus, as well as contained one helix-loop-helix structure. By Blast and multiple sequences alignment analysis, TcMYC shares 98%, 45% and 44% identity with *Taxus cuspidata*, *Vitis vinifera* and *Nicotiana tabacum*, respectively. The constructed tree shows that the MYC transcription factors of the plants belonging to the same family clustered together, and as *Taxus* is a gymnosperms plant, TcMYC and TaMYC are not clustered with other angiosperms plants. The expression of TcMYC is a little declined in Methyl jasmonate induced *Taxus* cell culture. TcMYC may regulate Taxol biosynthesis in negative.

**Key words** *Taxus*; bHLH; gene cloning; bioinformatics; taxol

植物的次生代谢是植物在长期进化中与环境相互作用的结果, 其受到生物和非生物因子的调控<sup>[1-2]</sup>。次生代谢产物能够提高植物自身生存竞争能力, 同时, 也是中药的主要有效成分, 对很多人类疾病具有治疗作用。这些药用植物次生代谢

产物主要有萜类、生物碱类、黄酮类和甾醇等。紫杉醇(Taxol)是从红豆杉中提取的一种二萜类化合物, 是经美国 FDA 认证的目前最有效的天然抗癌药物之一, 尤其对乳腺癌、卵巢癌等具有显著疗效<sup>[3]</sup>。目前, 红豆杉资源遭到严重破坏, 紫杉醇供

基金项目: 江西省观赏植物遗传改良重点实验室开放课题基金(2011-KLB-02) 和国家自然科学基金资助项目(31300567, 31170628) 资助  
第一作者简介: 周华(1980—), 女, 博士研究生, 副研究员, 主要从事植物遗传育种研究。

\* 通信作者: E-mail: echoyyf@caf.ac.cn  
收稿日期: 2014-04-29

需矛盾日益激化。因此,研究紫杉醇合成、调控不仅有重要的科研意义,而且还有极大的应用价值,而该领域也一直是国际上的研究的热点。

*bHLH* (basic Helix-Loop-Helix, *bHLH*) 在多种植物中广泛存在,是构成真核生物蛋白的一个大家族。研究证明 *bHLH* 基序含有 60 个氨基酸,由一个能与 DNA 结合的碱性区域 (Basic region) 和  $\alpha$  螺旋 1-环- $\alpha$ -螺旋 2 (Helix 1-Loop-Helix 2) 组成。*bHLH* 通常与 MYB 家族蛋白形成复合体,从而调节下游目的基因的表达。目前已经从拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、水稻 (*Oryza sativa*) 等多种植物中分离、克隆出 *bHLH* 基因<sup>[4-7]</sup>,并对其调控功能进行了研究,发现 *bHLH* 在植物生长发育和形态建成、胁迫响应以及植物次生代谢中发挥着重要作用<sup>[4,8-12]</sup>。然而,迄今为止,并无有关红豆杉 *bHLH* 调控紫杉醇生物合成的相关研究尚未见报道。

鉴于 *bHLH* 转录因子在植物次生代谢以及胁迫应答中具有重要作用,课题组前期利用高通量测序技术对中国红豆杉 (*Taxus chinensis*) 的枝条进行了转录组测序,发现了 13 个 *bHLH* 转录因子的 Scaffolds<sup>[13]</sup>。本研究利用上述转录组数据,从中国红豆杉的变种南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei*) 中克隆得到了一个 *bHLH* 基因,编码一个 650 个氨基酸的 ORF,初步分析表明其属于 *bHLH* 家族的 MYC 亚家族,研究利用生物信息学手段对其进行了核苷酸以及蛋白质水平的预测,并对其在茉莉酸甲酯 (Methyl jasmonate, MeJA) 诱导曼地亚红豆杉 (*Taxus × media*) 细胞中的表达进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

南方红豆杉 1 年生小苗种植于中国林业科学研究院温室中。采集嫩叶、嫩枝,液氮速冻后,置于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存备用。曼地亚红豆杉细胞系由中国医学科学院药物研究所戴均贵老师馈赠。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 南方红豆杉枝叶总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

南方红豆杉种植于中国林业科学研究院温室中,采取嫩叶、嫩枝,液氮速冻之后,采用柱式植物 RNAout 试剂盒 (购自北京天恩泽基因科技有限公司) 提取总 RNA。混合两种器官的总 RNA,然后按照 M\_MLV 逆转录酶 (购自 Promega 公司) 说明书进行反转录合成单链 cDNA,放置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱

保存备用。

#### 1.2.2 *bHLH* 基因特异性引物的设计和基因的克隆

根据 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的 GenBank 核酸库 (数据截止到 2012 年 11 月 5 日) 中搜索关键词 “*bHLH*” 和 “*Taxus*”,获得了一个 hit,登录号为 FJ608574,以此序列为 query,利用本地化 Blast 比对搜索课题组之前测序的红豆杉枝条转录组数据,获得了一个一致性达到 98.59% 的 Scaffold 序列,据此序列作为模板,设计特异性引物,引物序列信息见表 1。以 1.2.1 中南方红豆杉嫩叶和嫩枝提取的总 RNA 混合反转录得到的 cDNA 为模板,按照天根生化科技有限公司的  $2 \times$  PCR reagent 说明书进行 PCR 扩增,采用  $25 \mu\text{L}$  体系,略有改动。PCR 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  3 min,  $95^{\circ}\text{C}$  30 s,  $57^{\circ}\text{C}$  60 s,  $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 30 times。PCR 产物经过 1.0% 的琼脂糖电泳之后,检测到一条大小在 1.8 kB 大小的条带。利用通用型 DNA 纯化回收试剂盒 (购自天根生化科技有限公司) 将此 PCR 产物特异条带进行纯化和回收,并与 pMD19-T vector (购自 Takara 公司) 进行连接,转化大肠杆菌,PCR 扩增筛选阳性菌株送去 Invitrogen 公司进行测序。将所获得的 PCR 产物序列测序、拼接后,与 GenBank 数据库进行 Blast 比对分析。

表 1 实验所用引物列表

Table 1 The primers list

引物名称	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
TcMYC 全长	ATGATGGGAACGA-GGGGAC	TCACCTAAGGCCA-GAATCTG
TcMYC 表达引物	GACCTAGGGTTGG-GGTAGA	GCAGAAGCCACTA-AGCTCTG
<i>actin</i>	AAGAGAAGCTTGCT-TATGTAGC	TCTGATATCCACAT-CACACTTC

#### 1.2.3 *TcMYC* 基因的生物信息学分析

分别利用 ExPaSy、WOLF PSORT 等生物信息学软件对 *TcMYC* 的理化性质、结构域、高级结构及其生物学功能进行预测与分析 (表 2),利用 CLUSTAL X 1.81 和 MEGA5.0 软件进行进化树分析,采用邻接算法 (neighbor joining, NJ) 进行。

#### 1.2.4 MeJA 处理曼地亚红豆杉细胞

将生长状态良好的红豆杉细胞转移至含有茉莉酸甲酯 MeJA 的培养基 ( $6,7-V$  固体培养基) 中, MeJA 购自 Sigma 公司,终浓度为  $200 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ ,进行诱导处理,同时以未添加 MeJA 的细胞系为对

照 3 个重复。培养 7 d 后,分别收集 MeJA 诱导后的细胞和对照细胞,液氮速冻, -80℃ 保存。

表 2 实验所用生物信息在线分析工具  
Table 2 The softwares of informatics analysis

检索内容 Items	软件名称 Softwares	在线网址 Online webs
理化性质 Physical and chemical properties	ExPaSy-Protparam	http://www.expasy.org/protparam/
结构域分析 Conserved domains search	CD Search	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi
二级结构分析 Secondary structure prediction	SOPMA	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html
亲水性/疏水性分析 Hydrophilic/hydrophobic analysis	ProtScale	http://web.expasy.org/protscale/
亚细胞定位 Subcellular localization	WOLF PSORT Cell-PLoc 2.0	http://wolfsort.org/ http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/
模体分析 Motif analysis	ProScan	http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_proscan.html
三维结构模拟 Tertiary structure prediction	Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/

### 1.2.5 *TcMYC* 基因的表达分析

分别提取 MeJA 处理下曼地亚红豆杉细胞和对照细胞的总 RNA,反转录合成 cDNA,利用 *TcMYC* 全长序列设计特异性引物(表 1),以 *actin* 为看家基因,进行实时荧光定量 PCR 实验。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 10  $\mu$ L 2  $\times$  SYBR Premix Ex Taq (购自 Takara 公司), 1  $\mu$ L 特异性引物, 1  $\mu$ L cDNA 模板。PCR 方法采用两步法: 95℃ 预变性 30 s, 95℃ 变性 5 s, 55℃ 退火延伸 34 s, 40 个循环。每个 PCR 反应复孔 3 次,数据采用软件 REST2009 进行分析<sup>[14]</sup>。

## 2 结果分析

### 2.1 基因克隆

利用本地化 Blast 程序在中国红豆杉枝条转录组数据中筛查获得了一个 bHLH 基因的序列,以此序列为模板在南方红豆杉枝叶中进行了 RT-PCR 扩增,结果获得了一个 1 979 bp 长度的序列,并发现该序列编码一个 650 个氨基酸的开放阅读框。在 NCBI 中进行 BlastX 比对,发现与东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)的 MYC 转录因子具有 98% 的一致性,与葡萄(*Vitis vinifera*)、大豆(*Glycine max*)的 MYC2 转录因子分别具有 45% 和 44% 一致性。

因此,本研究所克隆基因被命名为 *TcMYC* (GenBank accession number KC878013)。

### 2.2 保守结构域分析

图 1 为利用 DNAMAN 对南方红豆杉、东北红豆杉、拟南芥、烟草(*Nicotiana tabacum*)、长春花(*Catharanthus roseus*)、葡萄的 MYC 基因编码的蛋白进行多序列比对分析,发现 *TcMYC* 与拟南芥等其他植物的 MYC 类型的 bHLH 转录因子在 N 端和 C 端存在着明显的保守区域。利用 NCBI 在线工具 Conserved Domains Search Service (CD Search) 对 *TcMYC* 进行保守结构域的分析,结果如图 2 所示, N 端包含有一个 MYB/MYC 类转录因子特有的保守域,下游 C 端有一个 HLH 结构域。

### 2.3 *TcMYC* 蛋白质的理化性质分析

运用 ExPaSy-Protparam 工具对 *TcMYC* 编码蛋白的理化性质进行了预测,其分子量为 71.4 kD,等电点 pI 为 4.87,不稳定指数 (instability index) 为 44.12,脂肪指数 (Aliphatic index) 为 77.62,亲水性 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.458,表明此蛋白为亲水性蛋白,脂溶性较差。

### 2.4 蛋白亲水性/疏水性预测

疏水/亲水的平衡是蛋白质结构的特征,影响着蛋白质结构与功能的诸多方面。因此,本研究中利用 ProtScale 对 *TcMYC* 进行了亲水性/疏水性分析(图 3),发现 *TcMYC* 编码的氨基酸序列中,具有多个明显的亲水区域,大部分氨基酸属于亲水性氨基酸。因此, *TcMYC* 属于亲水性蛋白。

### 2.5 *TcMYC* 二级结构分析

利用 SOPMA 对 *TcMYC* 编码的二级结构进行分析发现,其主要由 3 种形式组成,其中  $\alpha$ -螺旋 (Alpha helix) 占 35.23%, 无规则卷曲 (Random coil) 占 52.15%, 延伸链 (Extended strand) 占 10.15%。 $\alpha$ -螺旋和延伸链主要分布于蛋白的 C 端和 N 端, N 末端以延伸链的形式存在, C-末端以无规则卷曲形式存在(图 4)。

### 2.6 亚细胞定位

采用 WOLF PSORT 对 *TcMYC* 的亚细胞定位进行预测,结果发现 *TcMYC* 在细胞中定位的可能性是细胞核 > 细胞质。因此,推测 *TcMYC* 可能定位于细胞核内。再次使用 Cell-PLoc2.0 软件进行了验证,预测结果表明 *TcMYC* 极有可能存在于植物细胞核中。这也进一步证明 *TcMYC* 编码一个转录因子蛋白的结论。

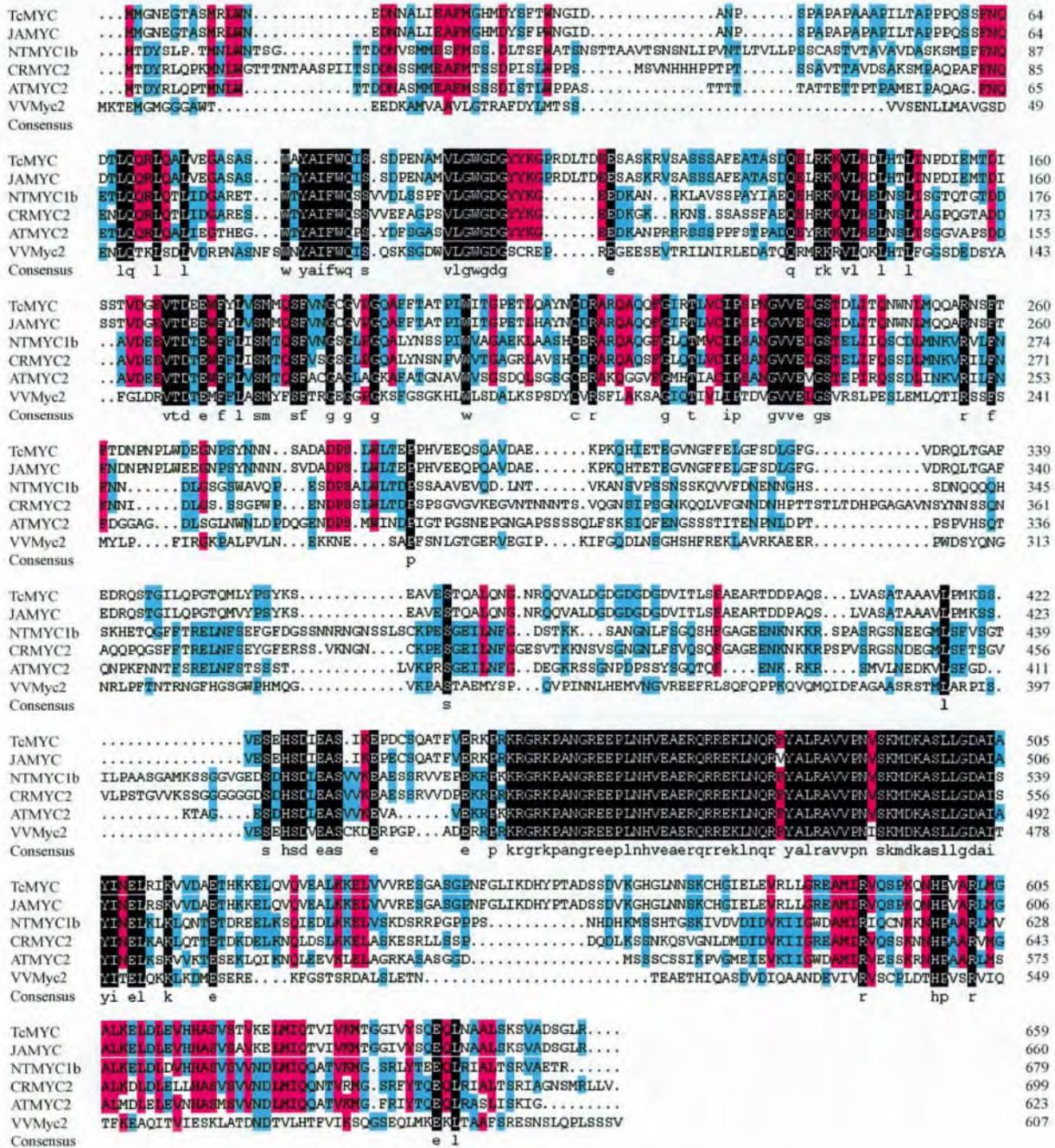


图1 TcMYC 与其他植物 MYC 蛋白的多序列比对分析 TcMYC. 南方红豆杉; JAMYC. 东北红豆杉; NTMYC1b. 烟草; CRMYC2. 长春花; ATMYC2. 拟南芥; VVMyc2. 葡萄

Fig.1 Multiple alignment result of TcMYC and other plant MYC proteins TcMYC. *T. chinensis* var. *mairei*; JAMYC. *T. cuspidata*; NTMYC1b. *N. tabacum*; CRMYC2. *C. roseus*; ATMYC2. *A. thaliana*; VVMyc2. *V. vinifera*

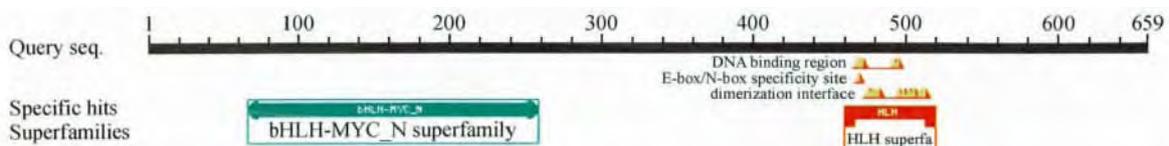


图2 TcMYC 保守结构域分析

Fig.2 TcMYC conserved domains search

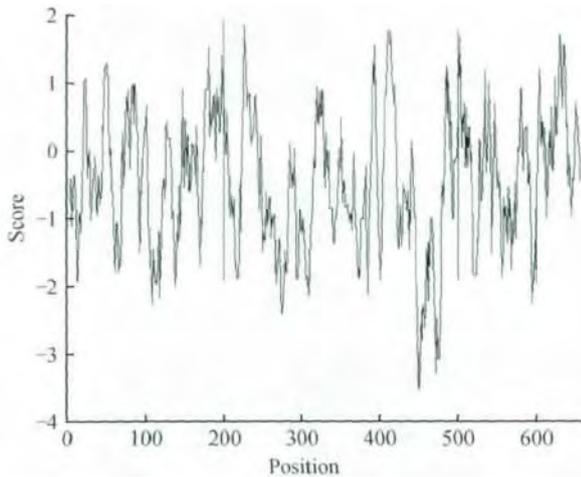


图 3 TcMYC 亲水性/疏水性分析

Fig. 3 Distributing curve of hydropathy of the TcMYC amino acid

2.7 模体分析

利用 NPS( Network Protein Sequence Analysis) 提供的 ProScan 对 TcMYC 进行蛋白质模体位置进行分析 结果发现 TcMYC 可能在翻译后发生了多种修饰。分析结果发现其具有 3 个潜在的 N 糖基化位点( N-glycosylation site) ,1 个潜在的 cAMP-和 cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点( cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site) 6 个潜在的蛋白激酶 C 磷酸化位点( Protein kinase C phosphorylation site) ,17 个潜在的酪蛋白激酶 II 磷酸化位点( Casein kinase II phosphorylation site) 3 个潜在的 N-豆蔻酰化位点( N-myristoylation site) ,1 个潜在的酰胺化位点( Amidation site) ( 表 3) 。

表 3 TcMYC 蛋白序列在 NPS 中的模体预测分析  
Table 3 Scanning of TcMYC protein for site/signatures with ProScan software

名称 Format name	序列号 No.	模体类型 Motif model	氨基酸序列 Motif model	概率值 Randomized probability
N 糖基化位点 N-glycosylation site	PS00004	N-{ P }-[ST]-{ P }	269 to 272 NNSA 481 to 484 NVSK 560 to 563 NNSK	5.138e-03
cAMP-和 cGMP 依赖的 蛋白激酶磷酸化位点 cAMP-and cGMP- dependent protein kinase phosphorylation site	PS00004	[RK ](2) -x-[ST]	111 to 113 SKR 349 to 351 SYK 424 to 426 SIK 510 to 512 THK 584 to 586 SPK 612 to 614 TVK	1.572e-03
蛋白激酶 C 磷酸 化位点 Protein kinase C phosphorylation site	PS00005	[ST]-x-[RK]	83 to 86 SDPE 105 to 108 TDEE 119 to 122 SAFE 124 to 127 TASD 126 to 129 SDQE 153 to 156 STVD 160 to 163 TDEE 194 to 197 TGPE	1.423e-02
酪蛋白激酶 II 磷酸 化位点 Casein kinase II phosphorylation site	PS00006	[ST]-x(2)-[DE]	251 to 254 TFTD 385 to 388 SFAE 412 to 415 SSVE 419 to 422 SDIE 424 to 427 SIKE 434 to 437 TFVE 483 to 486 SKMD 612 to 615 TVKE 643 to 646 SVAD	1.482e-02
N-豆蔻酰化位点 N-myristoylation site	PS00008	G-{EDRKHPFYW}- x(2)-[STAGCN]-{P}	68 to 73 GASASW 558 to 563 GLNNSK 628 to 633 GIVYSQ	1.397e-02
酰胺化位点 Amidation site	PS00009	x-G-[RK]-[RK]	443 to 446 RGRK	8.636e-04

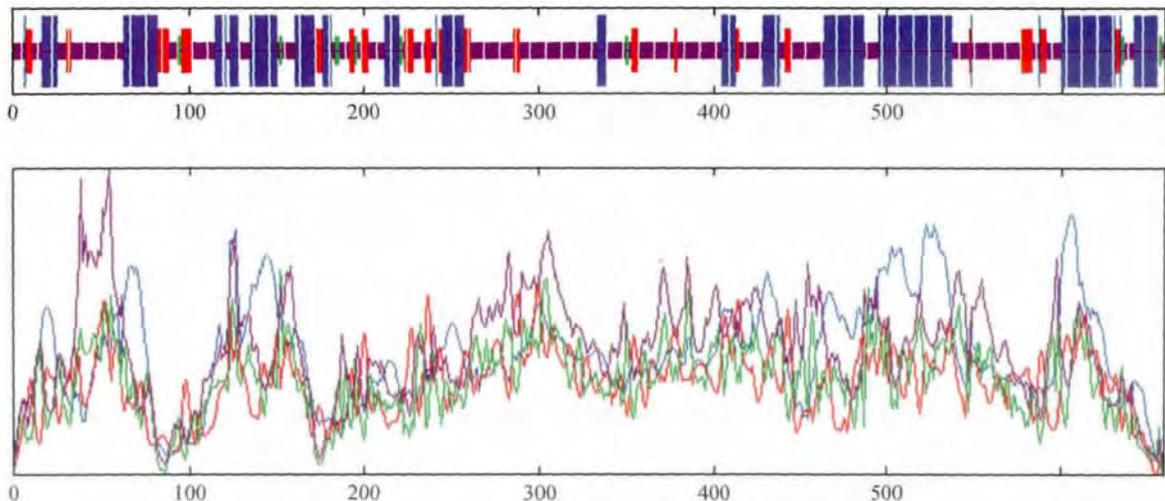


图 4 TcMYC 编码蛋白的二级结构预测分析 蓝色: α螺旋; 红色: 延伸链; 紫色: 无规则卷曲

Fig. 4 The predicated secondary structure of TcMYC Blue: Alpha helix; Red: Extended strand; Purple: Random coil

### 2.8 MYC 基因编码氨基酸的三维结构分析

利用 phyre2 在线预测 TcMYC 转录因子的三维结构, 可以看到该蛋白含有一个螺旋—环—螺旋结构(图 5)。

### 2.9 进化树分析

将 TcMYC 编码的蛋白序列与 Blast 结果中相似性较高的已知其他植物的 bHLH 进行进化树分析。结果如图 6 所示, 科属亲缘关系相近的植物归为一类, 如茄科的烟草和番茄(*Solanum lycopersicum*) 聚在一起, 十字花科的拟南芥和野甘蓝(*Brassica oleracea*) 聚在一起, 豆科的大豆和蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) 聚在一起。红豆杉是一种木本裸子植物, 而其他植物大多为草本被子植物, 因此, 红豆杉的 MYC 转录因子与其他植物的 MYC 转录因子距离都比较远。

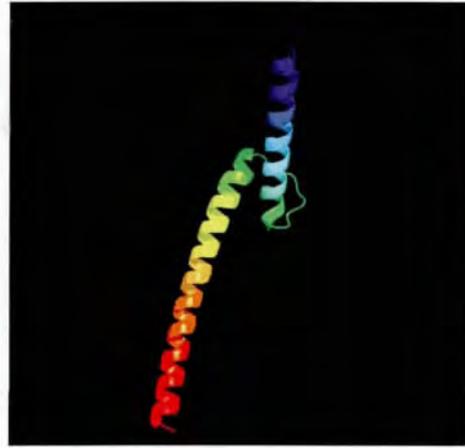


图 5 TcMYC 蛋白三维结构分析  
Fig. 5 3D structure of TcMYC

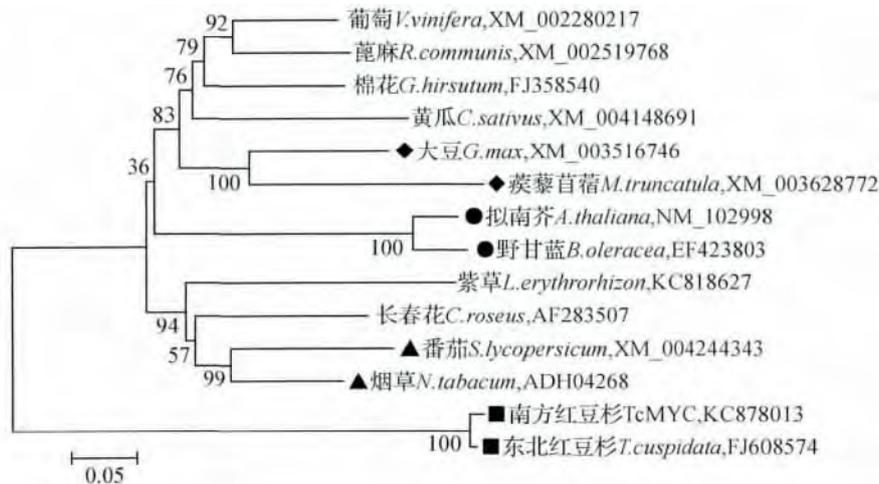


图 6 植物中部分 MYC 转录因子的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of TcMYC and other plant bHLH transcription factors

### 2.10 TcMYC 基因在茉莉酸甲酯处理曼地亚红豆杉细胞中的表达分析

利用荧光定量 PCR 方法和 REST2009 荧光定量 PCR 数据分析软件, 以 *actin* 为看家基因, 分析 MeJA 诱导 7 d 后红豆杉细胞中 TcMYC 的表达变化。结果表明在受到 MeJA 诱导 7 d 后, TcMYC 的表达出现些许下降的趋势(图 7), 推测其可能在紫杉醇的生物合成过程中起到了负向调控作用。

### 3 讨论

植物转录因子响应环境胁迫, 同时刺激次生代谢物质产生, 参与萜类等多种化合物次生代谢过程。近年来, 也有一些关于转录因子调控紫杉醇生物合成的报道。例如, 姚瑞枫等<sup>[15]</sup>利用酵母

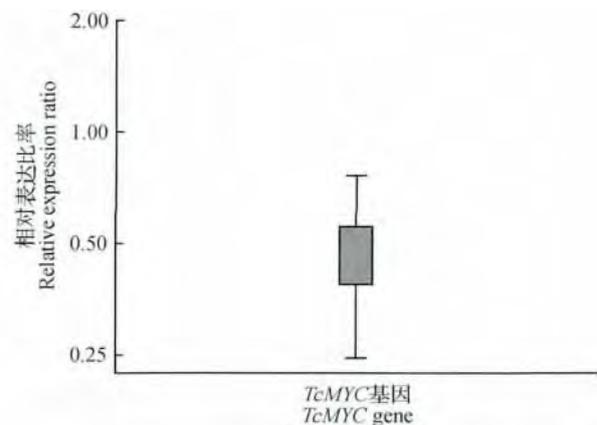


图 7 TcMYC 在 MeJA 诱导后曼地亚红豆杉细胞中的表达

Fig. 7 The expression of TcMYC in *Taxus × media* cell cultures under MeJA induced

单杂交文库对与紫杉醇生物合成途径中的 *dbat* 基因启动子的顺式元件结合的转录因子进行了筛选探索工作,得到了 6 个可编码结合蛋白的基因。戴怡龄<sup>[16]</sup>从东北红豆杉中分离克隆出两个 AP2 类转录因子,其中 TcDREB 还能与紫杉醇合成途径中的 TS(Taxadiene synthase, TS) 等 4 个关键酶基因的启动子相结合。但是,有关 bHLH 转录因子对红豆杉响应环境胁迫以及调控紫杉醇生物合成的研究尚鲜见报道。本研究利用同源序列搜索方法,在中国红豆杉转录组数据中获得了推测的 MYC 转录因子基因序列,并利用 RT-PCR 技术成功从南方红豆杉中克隆获得了该转录因子编码基因。通过 TcMYC 与其他植物 MYC 类似 bHLH 蛋白的多序列比对以及蛋白结构分析,发现该基因编码蛋白含有 MYB/MYC 类转录因子特有的保守域,含有一个螺旋—环—螺旋结构,并且分析表明其很可能在细胞核内行使功能,初步确定该基因是 bHLH 转录因子家族中 MYC2 的同源基因。转录因子在植物次生代谢途径中起到多步调控作用,本研究获得的 *TcMYC* 基因为揭示 bHLH 转录因子对红豆杉中紫杉醇等次生代谢物生物合成的调控作用和分子机制奠定了分子基础,并有利于今后利用基因工程手段获得高紫杉醇产量的细胞系,缓解红豆杉资源利用与开发矛盾尖锐的现状。

MYC 转录因子是 bHLH 转录因子家族中的一种,是一类含有螺旋串的转录因子家族,两个基本亚区相连。该家族成员都具有螺旋—环—螺旋基序(bHLH, basic helix-loop-helix),位于蛋白质的 C-端,此区域为碱性,MYC 转录因子与顺式作用元件上 DNA 结合,同时与 bHLH 类蛋白之间形成同同源二聚体有密切关系<sup>[17]</sup>。研究表明,隶属于 bHLH 家族的 MYC2 转录因子受到赤霉素 GA 和茉莉酸 JA 信号的协同调控,能够影响植物挥发性萜类的生物合成<sup>[18]</sup>。也有研究表明外源应用茉莉酸 JA 或茉莉酸甲酯 MeJA 能够诱导紫杉醇的合成<sup>[19~20]</sup>。本研究获得的 *TcMYC* 基因在 MeJA 处理曼地亚红豆杉细胞 7 d 后的表达并没有出现预期的升高,而是出现略微下降的趋势,可能对紫杉醇的生物合成起到了负调控作用。课题组前期进行了 MeJA 诱导红豆杉曼地亚细胞系的转录组测序研究。结果发现在 MeJA 诱导的曼地亚红豆杉细胞转录组中预测出 6 条与 *TcMYC* 具有较高同源性的 contig 序列(E < -10),其中 3 条 MeJA

诱导后表达没有变化,3 条在 MeJA 诱导后表达升高<sup>[21]</sup>。分析原因,可能是为了维持植物体内的生理平衡,一些 bHLH 转录因子家族成员对植物具有正调控作用,还有一些成员对植物的生理过程具有负调控作用。例如,张子佳等<sup>[22]</sup>也发现了多个响应 PEG 模拟干旱胁迫的 bHLH 转录因子的基因呈现干旱抑制表达的模式,表明 bHLH 家族成员可能负调控植物响应干旱胁迫过程。本研究获得的南方红豆杉 *TcMYC* 基因可能负向参与调控紫杉醇的次生代谢,其是否参与红豆杉发育以及抗逆等其他方面的功能还有待进一步实验验证。

## 参 考 文 献

1. 王春丽,梁宗锁. 外源刺激对植物次生代谢的调节及其信号转导途径研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(5): 0867-0873.
2. 段传人,王伯初,徐世荣. 环境应力对植物次生代谢产物形成的作用[J]. 重庆大学学报, 2003, 26(10): 67-71.
3. Cragg G M, Schepartz S A, Suffness M, et al. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents[J]. J Nat Prod, 1993, 56: 1657-1668.
4. Ding W N, Yu Z M, Tong Y L, et al. A transcription factor with a bHLH domain regulates root hair development in rice[J]. Cell Res, 2009, 19(11): 1309-1311.
5. Kong Q, Pattanaik S, Feller A, et al. Regulatory switch enforced by basic helix-loop-helix and ACT-domain mediated dimerizations of the maize transcription factor R[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(30): E2091-2097.
6. Schaart J G, Dubos C, Fuente I R D L, et al. Identification and characterization of MYB-bHLH-WD40 regulatory complexes controlling proanthocyanidin biosynthesis in strawberry (*Fragaria × ananassa*) fruits[J]. New Phytol, 2013, 197(2): 454-467.
7. Osorio M B, Bucker-Neto L, Castilhos G, et al. Identification and in silico characterization of soybean trihelix-GT and bHLH transcription factors involved in stress responses[J]. Genet Mol Biol, 2012, 35(1): 233-246.
8. 宋垚,李晖,石其龙,等. 拟南芥 bHLH 家族转录子 DYT1 在花药发育过程中调控胼胝质降解[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2009, 38: 74-182.
9. Zhang Y, Mayba O, Pfeiffer A, et al. A quartet of PIF bHLH factors provides a transcriptionally centered signaling hub that regulates seedling morphogenesis through differential expression-patterning of shared target genes in *Arabidopsis*[J]. PLoS Genet, 2013, 9(1): e1003244.

10. Leivar P ,Monte E ,Oka Y ,et al. Multiple phytochrome-in-teracting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness [J]. *Curr Biol* , 2008 ,18( 23) : 1815 - 1823.
11. 张珉 ,文彦丽 ,赵小磊 ,等. 小麦 bHLH 型转录因子 TaHLH1 的分子特征和表达特性研究 [J]. *河北农业大学学报* 2013 ,36( 1) : 1 - 5.
12. Matus J T ,Poupin M J ,Cañón P ,et al. Isolation of WDR and *bHLH* genes related to flavonoid synthesis in grapevine ( *Vitis vinifera* L.) [J]. *Plant Mol Biol* 2010 ,72( 6) : 607 - 620.
13. 邱德有 ,许德荣 ,唐其. 利用高通量测序技术研究中国红豆杉枝条转录组 [C]. 广州: 传统医药国际科技大会 , 2011.
14. Pfaffl M W ,Horgan G W ,Dempfle L. Relative expression software tool( REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [J]. *Nucleic Acids Res* 2002 ,30( 9) : e36.
15. 姚瑞枫 ,张蒙 ,张鹏 ,等. 筛选 *dbat* 启动子顺式元件蛋白的酵母单杂交文库的构建 [J]. *生物技术通报* ,2009 , 117 - 120.
16. 戴怡龄. 红豆杉中与异戊二烯代谢途径相关的 AP2 类转录调控因子的克隆与功能研究 [D]. 上海: 复旦大学遗传研究所 2008.
17. Murre C ,McCaw P S ,Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding ,daughterless ,MyoD ,and myc proteins [J]. *Cell* ,1989 , 56( 5) : 777 - 783.
18. Hong G J ,Xue X Y ,Mao Y B ,et al. *Arabidopsis* MYC2 in-teracts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression [J]. *Plant cell* ,2012 ,24 ( 6) : 2635 - 2648.
19. Ketchum R E ,Rithner C D ,Qiu D ,et al. Taxus metabolo-mics: methyl jasmonate preferentially induces production of taxoids oxygenated at C-13 in *Taxus* × media cell cultures [J]. *Phytochemistry* 2003 ,62( 6) : 901 - 909.
20. 兰文智 ,余龙江 ,吴元喜. 水杨酸对真菌诱导子诱导红豆杉悬浮细胞膜脂过氧化和紫杉醇生物合成的影响 [J]. *西北植物学报* 2002 ,22( 1) : 78 - 83.
21. Sun G L ,Yang Y F ,Xie F L ,et al. Deep sequencing re-veals transcriptome re-programming of *Taxus* × media cells to the elicitation with methyl jasmonate [J]. *PLoS One* , 2013 ,8( 4) : e62865.
22. 张子佳 ,王迪 ,傅彬英. 水稻转录因子 bHLH 家族基因响应环境胁迫表达谱分析 [J]. *分子植物育种* ,2008 ,6 ( 3) : 425 - 431.



## 《植物研究》荣获“第五届中国高校优秀科技期刊奖”

中国高校科技期刊研究会受教育部科技司委托开展了“第五届中国高校精品·优秀·特色科技期刊奖”评比活动。共有 1 500 多种全国高校科技期刊( 自然科学类) 参评, 经专家评审, 本届共评出精品科技期刊 49 种, 优秀科技期刊 108 种, 特色科技期刊 30 种。《植物研究》在评比中荣获“第五届中国高校优秀科技期刊奖”。

《植物研究》编辑部