

doi:10.11937/bfyy.20170195

刺五加转录因子基因的挖掘

龙月红, 宋 菊, 国红玉, 尤鹏升, 邢朝斌

(华北理工大学 生命科学学院, 河北 唐山 063000)

摘 要:以刺五加嫩叶为试材,采用二代测序方法 Illumina HiSeq 4000 进行转录组测序和生物信息学方法,找出其转录因子,并随机挑选 4 个不同家族的转录因子,针对 6 个生长时期和 3 个器官的样本,使用实时荧光定量 PCR 确认转录因子的正确性。结果表明:刺五加转录组共计 8.34 Gb,拼接得到 77 087 条 Unigenes,有 485 个转录因子,分类于 36 个家族。通过 qRT-PCR 分析,Unigene 49771、Unigene 22314、Unigene 13139 和 Unigene 18837 在不同生长发育时期和器官中表达差异极显著($P<0.01$)。

关键词:刺五加;转录组;转录因子;皂苷

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)20-0153-04

转录因子(transcription factor, TFs)即反式作用因子,是一种重要的调控蛋白,能与真核生物

基因启动子区域的顺式作用元件发生特异性结合^[1]。其包含有 3 个典型的结构域:核定位信号区、转录激活或抑制区和 DNA 结合区^[2]。目前已经发现的转录因子有 84 个家族,根据 DNA 结合域的不同,可将转录因子分为 MYB、bHLH、bZIP、Zinc-finger、MADS-box 等不同家族^[3]。其中 MYB 家族是植物中最大的转录因子家族,与植物的生长发育,生理代谢、细胞形态等生理过程有关^[4]。MADS-box 则是植物界研究最为广泛的转录因子家族,其最主要的作用是参与调控花的形成^[5]。

第一作者简介:龙月红(1974-),女,本科,实验师,研究方向为分子生药学。E-mail:lyhheuu@126.com.

责任作者:邢朝斌(1975-),男,硕士,教授,研究方向为分子生药学及药用植物细胞工程。E-mail:xzbheuu@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31570683);河北省教育厅资助科研资助项目(QN2014102);华北理工大学培育基金资助项目(SP201508)。

收稿日期:2017-04-05

Determination of Paeoniflorin of Cultivated Peony Root in Mudanjiang by HPLC

LI Yufeng, ZANG Xiaodan, CAO Yang

(Heilongjiang Agriculture Economics Vocational College, Mudanjiang, Heilongjiang 157041)

Abstract: Using the method of HPLC, seedling root of herbaceous peony seedlings were used as test materials in Mudanjiang city, the effect of the different physiological age of seedling cultivation of peony root and different size of peony seedling root on the secondary metabolites of paeoniflorin were studied. The results showed that in Mudanjiang cultivated seedlings of peony root in 7 years before the content of paeoniflorin was increased with the number of years of cultivation. It had the highest content of paeoniflorin in 7-year-old peony seedlings. After 7 years of cultivation the content of paeoniflorin was not increased with the growth of the year. The content of paeoniflorin in the same age was gradually increased with the increase of the content of paeoniflorin.

Keywords: Chinese herbaceous peony; paeoniflorin; HPLC; content

刺五加(*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim) Maxim.)是我国传统的珍贵药用植物,根、茎、叶均可入药,具有多种生理活性及药理作用,三萜皂苷类化合物是其主要的活性成分之一^[6],其具有抗癌、降血糖、预防心脑血管疾病等功效^[7]。目前刺五加在临床上的应用甚为广泛,但野生资源的产量极低,已不能满足临床要求。因此,希望通过生物学手段提高三萜皂苷的产量,弥补市场的不足。而三萜皂苷等次生代谢产物在刺五加体内的生物合成不仅需要各种酶类的催化作用,还需要大量转录因子的调控作用^[8]。现对刺五加转录因子进行研究,分析转录因子的表达模式,为明确转录因子调控刺五加次生代谢的机理奠定基础,以期提高刺五加三萜皂苷的产量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

刺五加采于穆棱,经华北理工大学生命科学学院邢朝斌教授鉴定为五加科植物刺五加(*E. senticosus*);新型植物总 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Premix Ex Taq 购自 TaKaRa 宝生物工程

(大连)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 刺五加转录因子分析

根据已测序完成的刺五加转录组数据库^[9],使用 Blast X 将 Unigene 与 nr、Swiss-Prot、KOG、KEGG 数据库中的转录因子信息进行比较,获取注释信息,找出转录组数据库中的转录因子,并进行转录因子家族分类。

1.2.2 转录因子的 qRT-PCR 验证

随机选取了 4 个不同转录因子家族的 Unigene 进行实时荧光定量分析,使用 Primer premier 5.0 软件设计引物(表 1),以不同生长期和不同组织部位的刺五加作为试材,即萌芽期(4月26日)、叶片完全展开期(5月26日)、盛花期(6月26日)、果实快速生长期(7月26日)、果实成熟期(8月26日)、叶片衰老期(9月26日)、叶柄、茎、根,提取总 RNA,再逆转录而成 cDNA,作为 qRT-PCR 模板,并以 GAPDH 作为内参基因,使用 SYBR Premix Ex Taq 进行扩增。反应条件为 95℃预变性 2 min,95℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 15 s,共 40 个循环。反应结束后,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算出 4 个转录因子的相对表达量。

表 1

Table 1

引物列表

List of primers

基因编号 Gene ID	基因名称 Gene name	上游引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
Unigene 49771	ARR-B	GCCCATCCAACATCTCCAAACA	TTACCATTCTGAGCAGCCACCC
Unigene 13139	HSF	ATTTCTTGGAACACCGATGGGACG	GTTGAGTTGCCTGACGAAGCTGGA
Unigene 22314	MYB	TTGATCCCAATACTCACAAACCC	TCGTATGATTCTTCTTCCGATGC
Unigene 18837	WRKY	GGACGGACATGACTGGGATA	GCGAATGACAAAGAGGTGGG
Unigene 28598	GAPDH	GCAAGGACTGGAGAGGTGGA	AGTGGAACCTCGGAAGGACA

2 结果与分析

2.1 组装与注释结果

测序得到 8.34 Gb 数据,通过去冗余、拼接,最终得到 77 087 条 Unigenes^[9]。通过与 4 个数据库的比对,找出刺五加的转录因子共 485 个,注释到 36 个转录因子家族。其中,MYB、GATA、MDAS-box 等 10 个转录因子家族较为丰富(表 2),其中 MYB 转录因子家族最为丰富,有 70 条 Unigenes,占 14.43%。还有部分与次生代谢相

关的转录因子,分类于 bHLH、bZIP、锌指蛋白等转录因子家族。

2.2 刺五加转录因子的实时荧光定量分析

通过不同生长时期样本的实时荧光定量分析可知,随机选取的 4 个不同家族的转录因子存在于不同生长时期的刺五加中,且呈差异性表达(图 1)。Unigene 49771 在盛花期未表达,但在萌芽期的相对表达量最高,为最低表达量(果实快速生长期)的 252.70 倍。Unigene 18837 在萌芽期、叶片完全展开期和盛花期均未表达,而在果实成

表 2 转录因子分类统计

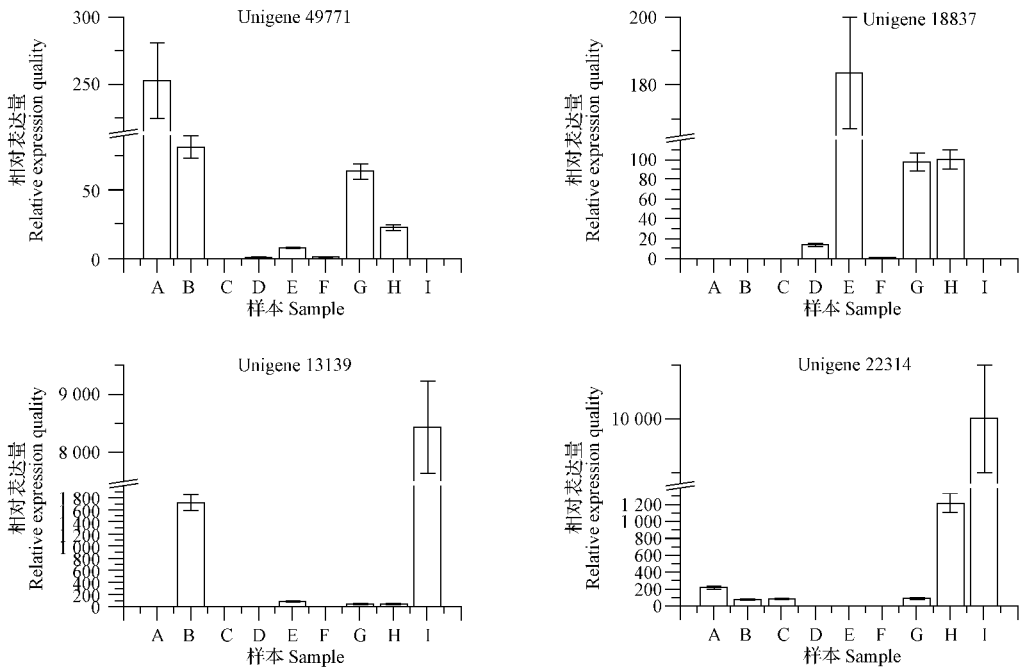
Table 2 Classification of transcription factors

基因家族	数量	占比
Gene family	Number	Percentage/%
MYB	70	14.43
GATA	68	14.02
MADS-box	36	7.42
HD-ZIP	34	7.01
MTERF	33	6.80
HSF	33	6.80
Trihelix	27	5.57
TEAL	23	4.74
C3H	23	4.74
NF-Y	22	4.54

熟期达到最高表达量,是最低表达量(叶片衰老期)的 183.50 倍。Unigene 13139 仅在叶片完全展开期和果实成熟期表达,且叶片完全展开期的

表达量较高,是果实成熟期的 20.11 倍。而 Unigene 22314 是在萌芽期、叶片完全展开期和盛花期表达,且表达量较低,最高表达量(萌芽期)为最低表达量(叶片完全展开期)的 2.93 倍。

对刺五加不同组织的转录因子 qRT-PCR 分析后可知,Unigene 49771 和 Unigene 18837 在根中均未表达,Unigene 49771 是叶柄高于茎,而 Unigene 18837 则是茎高于叶柄。Unigene 13139 和 Unigene 22314 在叶柄、茎和根中均有表达,Unigene 13139 在叶柄和茎中的表达量相同,Unigene 22314 则是茎高于叶,但均在根中达到最高表达量,分别为最低表达量的 170 倍和 105.26 倍(图 1)。



注:A. 萌芽期(4月26日);B. 叶片完全展开期(5月26日);C. 盛花期(6月26日);D. 果实快速生长期(7月26日);E. 果实成熟期(8月26日);F. 叶片衰老期(9月26日);G. 叶柄;H. 茎;I. 根。

Note: A. Bud germinating stage (April 26th); B. Leaves fully expanded stage (May 26th); C. Full-bloom period (June 26th); D. Rapid growth period of fruit (July 26th); E. Fructescence (August 26th); F. Leaves senescence (September 26th); G. Petioles; H. stems; I. roots.

图 1 不同生长时期和组织的刺五加转录因子 qRT-PCR 验证

Fig. 1 Verification of transcription factors in different periods and tissues of *E. senticosus* by qRT-PCR

3 讨论

随着生物技术的发展, RNA-Seq 技术越来越成熟,在动植物的新基因挖掘、基因功能、基因表

达等研究中,已有广泛应用^[10-11]。该研究采用 RNA-Seq 技术中的 Illumina HiSeq 4000 测序平台,获得了其转录组数据库,拼接得到 77 087 条 Unigenes,并挖掘出 485 条转录因子。

通过功能注释,转录因子分类于36个家族中,其中MYB家族最丰富,它也是整个植物界转录因子家族中最丰富的家族,与植物茎和叶片形态的调控、根的形成、花的发育都有着密切联系^[4]。因此,MYB转录因子家族在刺五加中具有时间和组织特异性。目前发现与萜类化合物和合成相关的转录因子主要集中于拟南芥和长春花中^[8],长春花中bZIP^[12]和bHLH^[13]2个类型的转录因子和棉花WRKY转录因子^[14]对萜类化合物生物合成的调控机制已相当明确。该研究通过数据库的比对,找出了刺五加的bZIP、bHLH、WRKY等与次生代谢相关转录因子家族,为后续开展三萜皂苷合成相关基因以及转录因子的表达调控提供了丰富的资源。

参考文献

- [1] 杨致荣,王兴春,李西明,等. 高等植物转录因子的研究进展[J]. 遗传,2004,26(3):403-408.
- [2] MATYS V, KEL-MARGOULIS O V, FRICKE E, et al. TRANSFAC and its module TRANSCOMPLE: Transcriptional gene regulation in eukaryotes [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34: 108-110.
- [3] RIECHMANN J L, HEARD J, MARTIN G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes [J]. Science, 2000, 290: 2105-2110.
- [4] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD B, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(10): 573-581.
- [5] 王传增,余贤美,董庆龙,等. 桃已知MADS-box转录因子的生物信息学及花发育的表达分析[J]. 核农学报, 2015, 29(5): 849-858.
- [6] 涂正伟,周渭渭,单淇,等. 刺五加的研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 213-216.
- [7] 张云峰,魏东,邓雁如,等. 三萜皂苷的生物活性研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(9): 1349-1353.
- [8] 赵恒伟,葛峰,孙颖,等. 植物萜类物质生物合成的相关转录因子及其应用前景[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2512-2519.
- [9] 宋菊,国红玉,李志栋,等. 刺五加转录组和差异性表达分析[J]. 中草药, 2016, 47(22): 4049-4053.
- [10] 兰道亮,熊显荣,位艳丽,等. 基于RNA-Seq高通量测序技术的牦牛卵巢转录组研究:进一步完善牦牛基因结构及挖掘与繁殖相关新基因[J]. 中国科学, 2014, 44(3): 307-317.
- [11] MU Y, DING F, CUI P, et al. Transcriptome and expression profiling analysis revealed changes of multiple signaling pathways involved in immunity in the large yellow croaker during *Aeromonas hydrophila* infection[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 506.
- [12] BYRNE M E, BARLEY R, CURTIS M, et al. Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis* [J]. Nature, 2000, 408(6815): 967-971.
- [13] LEE M M, SCHIEFELBEIN. Cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis determined by lateral inhibition with feedback [J]. Plant Cell, 2002, 14(3): 611-618.
- [14] XU Y H, WANG J W, WANG S, et al. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase-A [J]. Plant Physiol, 2004, 135(1): 507-515.

Exploring Transcription Factors in *Eleutherococcus senticosus*

LONG Yuehong, SONG Ju, GUO Hongyu, YOU Pengsheng, XING Zhaobin

(College of Life Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: The leaves of *Eleutherococcus senticosus* were used as experimental materials, the high-throughput sequencing technology (Illumina HiSeq 4000) was used to sequence the transcriptome, in order to find transcription factors from the transcriptome with the bioinformatic way. And then the qRT-PCR was used to analysis correctness of transcription factors with 6 kinds of stages and 3 kinds of tissues of *E. senticosus*. The results showed that the transcriptome of *E. senticosus* was 8.34 Gb, and it contained 77 087 Unigenes. There were 485 transcription factors in it, which involved in 36 families. By qRT-PCR analysis, the difference of Unigene 49771, Unigene 22314, Unigene 13139 and Unigene 18837 was highly significant in different growth stages and organs ($P < 0.01$).

Keywords: *Eleutherococcus senticosus*; transcriptome; transcription factors; saponins