

## 中间锦鸡儿 *CiMYB68* 基因克隆及表达分析

冯宗琪<sup>1</sup>, 韩晓敏<sup>1</sup>, 杨 杞<sup>1</sup>, 邢丹丹<sup>1</sup>, 齐力旺<sup>2</sup>, 王瑞刚<sup>1</sup>, 李国婧<sup>1\*</sup>

(1 内蒙古农业大学 生命科学院, 呼和浩特 010018; 2 中国林业科学院林业研究所, 北京 100091)

**摘 要:** 该研究以中间锦鸡儿(*Caragana intermedia*)为材料, 利用 RACE 技术克隆了 *CiMYB68* 基因的全长序列。对 *CiMYB68* 的基因组 DNA 和 cDNA 全长分析显示, *CiMYB68* 基因无内含子, 开放阅读框为 852 bp, 编码 284 个氨基酸。预测 *CiMYB68* 基因编码的蛋白质等电点为 8.95, 分子量约为 31 459.4 Da。序列比对和系统进化分析表明, 该蛋白和大豆的 GmMYB68 一致性最高, 达到 67%。构建了 *CiMYB68* 基因与 *GFP* 融合表达质粒, 激光共聚焦显微镜观察发现, 融合蛋白定位于细胞核。用实时荧光定量 PCR 技术对在不同胁迫条件下 *CiMYB68* 基因的表达检测结果表明, 在干旱和低温处理下 *CiMYB68* 均受到不同程度的诱导, 暗示 *CiMYB68* 基因可能与中间锦鸡儿响应逆境胁迫有关。

**关键词:** 中间锦鸡儿; MYB; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

## Cloning and Expression Analysis of *CiMYB68* from *Caragana intermedia*

FENG Zongqi<sup>1</sup>, HAN Xiaomin<sup>1</sup>, YANG Qi<sup>1</sup>, XING Dandan<sup>1</sup>,  
QI Liwang<sup>2</sup>, WANG Ruigang<sup>1</sup>, LI Guojing<sup>1\*</sup>

(1 College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2 Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** A MYB encoding gene was cloned by RACE (rapid amplification of cDNA ends) technique from *Caragana intermedia*. The gDNA and full-length cDNA sequence analysis revealed that this gene contains no intron. The full length ORF was 852 bp, and the deduced protein comprised 284 amino acids with a calculated molecular weight of 31 459.4 Da, as well as an isoelectric point of 8.95. Sequence alignment showed that this MYB protein is relatively close to GmMYB68, with an identity of 67%, so the gene was named as *CiMYB68*. *CiMYB68* and *GFP* fusion vector was constructed, and GFP fluorescence was observed in the nuclei under confocal laser scanning microscope. Real-time quantitative PCR analysis showed that the transcript of *CiMYB68* was induced strongly under drought and cold treatment. These results indicated that *CiMYB68* might be involved in stress responses of *C. intermedia*.

**Key words:** *Caragana intermedia*; MYB; gene cloning; expression analysis

转录因子 (transcription factor, TF) 又称为反式作用因子, 是指能与基因启动子区域中的顺式作用元件发生特异性结合, 通过它们之间以及与相关蛋白之间的相互作用, 激活或抑制转录<sup>[1]</sup>。转录因

子对动、植物的生长发育以及生理代谢调控都有十分重要的作用。1982 年, 从禽成髓细胞瘤病毒 (avian myeloblastosis virus) 中鉴定出第一个 MYB 基因 (*v-myb*)。随后发现在正常的动物细胞中也存在

收稿日期: 2014-02-28; 修改稿收到日期: 2014-05-19

基金项目: 国家自然科学基金 (31360056); 教育部高校博士学科点基金 (20121515110007); 国家高技术研究发展计划 (2011AA100203)

作者简介: 冯宗琪 (1987—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: fengzongqier@163.com

\* 通信作者: 李国婧, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: liguojing@imau.edu.cn

相应的原癌基因 *c-myb*。1987 年,首次从植物中克隆出 *c-myb* 的同源基因。此后,大量的植物 MYB 基因被发现,成为最大的植物转录因子家族之一<sup>[2-3]</sup>。

MYB 转录因子的 N 端具有一个特殊的 MYB 保守结构域,含 51~52 个氨基酸,由一系列高度保守的氨基酸残基和间隔序列组成。每个 MYB 结构域折叠成螺旋-转角-螺旋空间结构,其中含有 3 个色氨酸残基,这 3 个残基被 18~19 个氨基酸残基隔开,有着疏水核心的作用<sup>[4]</sup>。近年来,人们已从拟南芥、玉米、大豆、番茄等植物中分离克隆了大量的 MYB 基因<sup>[5-7]</sup>,并对这些基因的功能进行了研究。Liao 等<sup>[8]</sup>鉴定了 156 个 *GmMYB* 基因,其中有 43 个基因的表达受高盐、ABA、干旱或低温的影响,*GmMYB76*、*GmMYB92* 和 *GmMYB177* 以不同方式结合在 MBSI (T/CAACG/TGA/C/TA/C/T) 位点,*GmMYB92* 与 *mMRE1* (CCGAAAAAAGGAT) 或 *MRE4* (TCTCACCTA) 结合,不同的结合能力说明这些基因可能调控不同的下游基因<sup>[9]</sup>。拟南芥转录因子 *AtMYB44* 和 *AtMYB15* 在抗旱、盐胁迫等非生物胁迫过程中发挥重要作用。一些 MYB 转录因子也参与植物的抗病虫过程:拟南芥的 *AtMYB46*、*AtMYB72*、*AtMYB73* 和小麦的 *TaPIMP1* 分别能对灰霉病菌、根腐离蠕孢菌、斑病菌的入侵作出应答反应<sup>[10-12]</sup>。但 MYB 数量庞大、功能复杂,若要对其在植物生长发育及生理代谢过程中的调控机理进行深入研究和解析,尚有赖于更多 MYB 基因的克隆和功能分析。

中间锦鸡儿 (*Caragana intermedia* Kuang et H. C. Fu) 是一种重要的饲料和生物质能源原料,主要分布在中国华北和西北的干旱和半干旱地区<sup>[13-14]</sup>。中间锦鸡儿抗旱、防风、耐寒,保水固土能力极强,是中国中西部荒漠化地区广泛种植的人工灌木林树种,在防风固沙、保持水土、改善土壤养分、保护和恢复生态平衡等方面起着非常重要的作用<sup>[15]</sup>。2011 年,中国林业科学院齐力旺研究员课题组建立了一个中间锦鸡儿转录组数据库<sup>[16]</sup>,本课题组从中获得了一条 MYB 基因的中间片段,进一步克隆获得了该 MYB 基因的全长序列,并对其表达情况进行了初步研究,为研究其在中间锦鸡儿对非生物胁迫耐受中的作用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料及其处理方法

中间锦鸡儿种子采自内蒙古自治区乌兰察布市

四子王旗,播种于装有营养土-蛭石(1:1)的培养钵中,置于 25 °C、16 h 光照/8 h 黑暗的条件下培养。

选取 1 个月苗龄并且长势一致的中间锦鸡儿小苗用于实验,分别进行干旱和低温处理。处理方法为:(1)小心地从蛭石中取出中间锦鸡儿小苗,清水冲洗掉小苗上的蛭石(尽量避免损伤小苗)后摆放于滤纸上,进行干旱脱水处理;(2)将中间锦鸡儿小苗置于 4 °C 光照培养箱进行低温处理。以上 2 种处理的取样时间均为 0、1、3、8、12 和 24 h,每个时间点取 3 株中间锦鸡儿幼苗。将采集到的小苗地上部分样品于液氮中速冻,-80 °C 冰箱保存用于 RNA 提取。

### 1.2 基因组 DNA、总 RNA 提取及反转录

采用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305-02) 进行中间锦鸡儿基因组 DNA 的提取,操作按说明书进行。

利用 TRIzol (Invitrogen 公司) 试剂提取中间锦鸡儿小苗总 RNA。用 Quawell 公司的 Q5000 分光光度计对 RNA 进行浓度测定,1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。选用条带完整且清晰的 RNA 进行 cDNA 的合成。

### 1.3 cDNA 末端快速扩增

在中间锦鸡儿转录组数据库(中国林业科学院齐力旺研究员惠赠)中<sup>[16]</sup>,得到一条与大豆 *GmMYB68* 基因同源的 EST 序列,该序列长 1 052 bp。利用该序列直接设计 RACE 扩增引物 *CiMYB68-3'-outer*、*CiMYB68-3'-inter* 和 *CiMYB68-5'-outer*、*CiMYB68-5'-inter*(表 1)。RACE 扩增的具体实验操作根据大连宝生物 RACE 试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书进行。将扩增产物连入 pMD19-T 载体中,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,菌落 PCR 及酶切验证后,菌液送华大测序。

### 1.4 *CiMYB68* 基因 cDNA 和 gDNA 全长克隆

根据 3'-RACE 和 5'-RACE 测序获得的序列与中间片段进行拼接,获得中间锦鸡儿 MYB68 基因全长的 cDNA 序列,设计特异性的全长引物对拼接结果进行验证。以中间锦鸡儿 cDNA 为模板,以 F-*CiMYB68* 和 R-*CiMYB68* 为引物(引物 5' 端分别加 *Xho* I 和 *Sac* I 酶切位点),利用高保真酶 PrimeSTAR (TaKaRa 公司) 进行 PCR 扩增。扩增程序:98 °C 预变性 2 min,98 °C 变性 10 s,58 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min 10 s,72 °C 补充延伸 10 min,35 个循环。1% 浓度的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。以中间锦鸡儿 gDNA 为模板扩增基因组全长。反应条件同 cDNA 扩增,延伸时间改为 2 min。cDNA

表 1 本研究所用的全部引物  
Table 1 All the primers used in this study

引物类型 Primer type	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence( 5'-3' )
3'-RACE 引物 3'-RACE primers	<i>CiMYB68</i> -3'-outer <i>CiMYB68</i> -3'-inter	GAGCCCTGAAGAGGACGAAA GAGCAAATCCATTCCAGGTC
5'-RACE 引物 5'-RACE primers	<i>CiMYB68</i> -5'-outer <i>CiMYB68</i> -5'-inter	GACCTGGAATGGATTTGCTCA GCTTCTTCAATGTTTCGTCTCTC
全长引物 Full-length primers	F- <i>CiMYB68</i>	GCCTCGAGATGGATTTCGGCAAAGAAAGAC Xho I
	R- <i>CiMYB68</i>	GCACTAGTCTACTCATATTTCTCTACTCGACCCT Sac I
内参基因 Internal control primers	F- <i>EF1<math>\alpha</math></i> -rt R- <i>EF1<math>\alpha</math></i> -rt	TGGGTGGGACATTCTCTGATT GCACGGTTCACTTCTTCTTAGC
RT- PCR 引物 RT- PCR primers	F- <i>CiMYB68</i> -rt R- <i>CiMYB68</i> -rt	CAGGTTTCGGTAACAAGTGGGC AGAGTATCCGTGATGGCAGAGCA
GFP 引物 GFP primers	<i>CiMYB68</i> -1	GCAGATCTCATGGATTTCGGCAAAGAAAGAC Bgl II
	<i>CiMYB68</i> -2	GCACTAGTCTCGACCCTGCCAAT TCC Spe I

和 gDNA 扩增产物连入平末端载 pEASY-Blunt-T (全式金公司),转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态,菌落 PCR 及酶切验证后,菌液送测序。

1.5 表达载体的构建

测序鉴定无误的菌液,提取质粒,用特异引物 *CiMYB68*-1 和 *CiMYB68*-2 扩增目的片段,连接到 pEASY-Blunt-T 上。再次测序正确后,提取质粒,与目的质粒 pCambia1302 都用 *Bgl* II 和 *Spe* I 共酶切后,将目的片段依靠酶切位点的粘性末端连接到 pCambia1302 上。载体构建完成后,用质粒原有序列和目的片段上的酶切位点进行酶切验证。

1.6 *CiMYB68* 基因表达分析

利用得到的中间锦鸡儿 *CiMYB68* 基因序列设计荧光定量引物 F-*CiMYB68*-rt 和 R-*CiMYB68*-rt。使用 SYBR<sup>®</sup> Green I 荧光染料法,在 LightCycler480(Roche Diagnostics)实时荧光定量 PCR 仪上对中间锦鸡儿幼苗胁迫处理下基因的转录表达水平进行分析。根据 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex *Taq*<sup>™</sup> (TaKaRa)试剂盒说明书配制反应体系,每个反应 3 个平行。反应体系中含有 10  $\mu$ L SYBR<sup>®</sup> Premix Ex *Taq*<sup>™</sup>,引物各 0.4  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L),稀释的 cDNA 模版 5  $\mu$ L,灭菌水 4.2  $\mu$ L,总体积 20  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95  $^{\circ}$ C 变性 5 s,60  $^{\circ}$ C 退火 15 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,40 个循环。反应结束后做溶解曲线分析。已报道的中间锦鸡儿 *EF1 $\alpha$*  作为内参基因<sup>[17]</sup>,2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法分析数据。

本实验所用引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,测序由华大基因研究中心(BGI)完成。实验所用引物见表 1。

1.7 数据分析

本研究所用引物由软件 Primer 5 设计。利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)进行序列比对分析,使用 NCBI 中的开放阅读框查找工具 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析开放阅读框,并利用 MEGA 5 进行系统进化分析。利用 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>)数据库中的 ProtParam 软件推导氨基酸序列的分子量、理论等电点、氨基酸残基数等理化性质。利用 ExPASy 数据库中的 HNN 工具 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html))分析预测蛋白质的二级结构。利用 ProtScale 软件进行疏水性分析 (<http://web.expasy.org/protscale>)。

2 结果与分析

2.1 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增

利用中间片段设计的引物进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增,电泳检测分别得到 2 条约 900 bp 和 250 bp 的扩增产物(图 1,a,b),测序结果表明,这 2 个片段分别为 874 bp 和 290 bp。将克隆得到的 5'-RACE、3'-RACE 和中间片段拼接得到了中间锦鸡儿 *MYB68* 基因。设计引物对该基因序列的正确性进行克隆验证。以 gDNA 和 cDNA 为模板,以 F-*CiMYB68* 和 R-*CiMYB68* 为引物进行 PCR 扩增。测序结果显示,得到的 cDNA 序列长度为 1 209 bp。图 1,c 为中间锦鸡儿 *CiMYB68* 基因 cDNA 的 ORF 区域的琼脂糖凝胶电泳结果。

## 2.2 *CiMYB68* 基因序列分析

分析 gDNA 全长和 cDNA 全长后发现该基因无内含子。将该基因的 cDNA 序列用 ORF finder 工具分析发现具备完整的开放阅读框,长度为 852 bp(从 215~1 067 bp),编码 284 个氨基酸的蛋白质(图 2)。将序列在 NCBI 上比较发现,该基因和大豆 *GmMYB68* 较相近,故将该基因命名为 *CiMYB68*。数据库检索表明大豆的 *MYB68* 基因也不含有内含子。

## 2.3 *CiMYB68* 基因生物信息学分析

对推导的氨基酸序列进行预测分析发现,该基

因编码蛋白的等电点为 8.95,分子量为 31 459.4 Da。蛋白质的二级结构主要包括无规则卷曲、 $\alpha$  螺旋与  $\beta$  折叠,并且这 3 种结构均匀分布在蛋白质中,分布比例详见表 2。

用 ProtScale 程序对 *CiMYB68* 编码的多肽链进行亲水性分析(图 3)。正值越大表示该区域越疏水,负值越大表示该区域越亲水,介于 +0.5 到 -0.5 之间的主要为两性氨基酸。位于第 241 位的甲硫氨酸(Met)具有最高分值 1.544,疏水性最强;分别位于第 207、208、209 位的甘氨酸(Gly)、脯氨酸

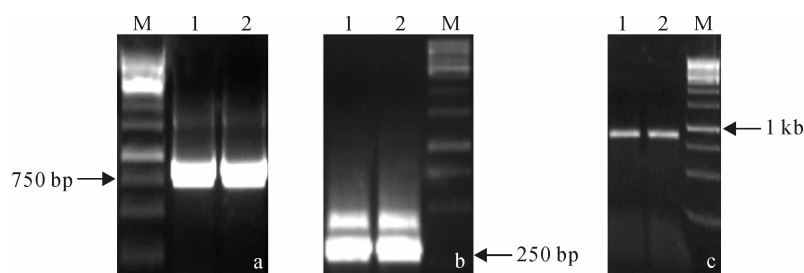


图 1 *CiMYB68* 基因克隆电泳结果

a. 3'-RACE; b. 5'-RACE; c. *CiMYB68* 的 ORF 区域电泳结果; M. 1 kb DNA ladder

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of the cloned *CiMYB68*

a. 3'-RACE; b. 5'-RACE; c. The PCR products of the ORF region of *CiMYB68*; M. 1 kb DNA ladder

1	tcgcggatcc	acagcctact	gatgatcagt	cgatggaaaa	gtctcaaagc	agaggctagg
61	ccccctcagcc	tcctcaacaa	acaccataac	cccctccatc	acaaaactct	accattacaa
121	atattttatc	ttttatattt	agaaaaggag	gagcttagtt	tcacagggtt	tattaccttt
181	tttttgtttt	tttttttacc	tgaacaataa	atccATGGAT	TCGGCAAAGA	AAGACATGGA
				M D	S A K	K D M D
241	TCGCATTAAA	GGGCCATGGA	GCCCTGAAGA	GGACGAAACA	TTGAAGAAGC	TGGTTCAGAC
10	R I K	G P W	S P E E	D E T	L K K	L V Q T
301	TTACGGTCCC	AGAACTGGT	CTCTAATGAG	CAAATCCAT	CCAGGTCCAT	CCGGTAAGTC
30	Y G P	R N W	S L M S	K S I	P G R	S G K S
361	GTGCCGATTG	CGGTGGTGCA	ACCAGCTGTC	TCCGGAGGTG	GAGCACAGGC	CTTTCACCTC
50	C R L	R W C	N Q L S	P E V	E H R	P F T P
421	GGAGGAAGAC	GAAGCCATCA	TCAGAGCGCA	TGCCAGGTTC	GGTAACAAGT	GGGCGCCAT
70	E E D	E A I	I R A H	A R F	G N K	W A T I
481	CTCTCGCCTT	CGCCTTCTCA	ATGGCCGAAC	CGACAACGCC	ATTAAGAACC	ACTGGAATTC
90	S R L	R L L	N G R T	D N A	I K N	H W N S
541	CACCCTCAAG	AGGAAATGCT	CTGCCATCAC	GGATACTCTC	AGTCTACCG	ATCACC GGCC
110	T L K	R K C	S A I T	D T L	S L T	D H R P
601	TTTGAAAAGA	TCCGCCAGTG	TCCGCCCGGA	AACCGTCTCG	GGTTTATACC	TAAACACGAG
130	L K R	S A S	V G A E	T V S	G L Y	L N T S
661	CACCTCATCT	GGATCCGATT	TGAGCGAATC	CGGTTTACCC	GCCACGTCAC	CGACTCCGCT
150	T S S	G S D	L S D S	G L P	A T S	P T P L
721	TGCGAGGAGC	GTAACAGTCG	TGCAAACGGC	GTCGCTGCG	TCTGATCCAG	CCACGTCAC
170	A R S	V T V	V Q T A	S S A	S D P	A T S L
781	CAGTTTATCT	TTGCCTGGAT	CCGATTCTGT	CGAATGCCAT	AATAACGGAT	CCGGCCCGAA
190	S L S	L P G	S D S C	D V H	N N G	S G P N
841	TCAGAAACAG	GAGATCCAGC	CAGCGCATAG	CAGTGAGGGG	AGGGAGGAAG	TTAGTTACGA
210	Q K Q	E I Q	P A H S	S E G	R E E	V S Y E
901	GAAGCAGTTG	TTTAGCAAGG	AGTTTTTGGC	GGTTATGCAA	GAGATGATAC	GAGTGGGAAGT
230	K Q L	F S K	E F L A	V M Q	E M I	R V E V
961	GAGGAATTAC	ATGCTCTGGC	TGGAGCATAA	TGGTCTGTGT	ATGCAAACCG	AAACTATTAG
250	R N Y	M S G	L E H N	G L C	M Q T	E T I R
1 021	AATTAGAAAC	GCTATGGTGA	AGCGTATGGG	AATTGGCAGG	GTCGAGtaga	gaaatatgag
270	I R N	A M V	K R M G	I G R	V E	
1 081	tagtagtatg	aattgtagag	aagagaaaacg	gtccttgtttt	ttccttttaa	tcgcttcagt
1 141	ttaccctttt	cyttacattg	aagaagtaaa	aaaatgataa	tagcttttgt	agcgtacaaa
1 201	aaaaaaaa					

图 2 *CiMYB68* 的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA sequence and its encoding protein sequence of *CiMYB68*

(Pro)、天冬酰胺(Asn)具有最低分值-2.344,亲水性最强。而整个多肽链中亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,预示着该蛋白整体上是亲水的。

从 GenBank 中检索其它植物中报道的 MYB 基因氨基酸序列,利用 MEGA 5 进行系统进化分析(图 4)显示,CiMYB68 与同属豆科的大豆 MYB68 亲缘关系最近,一致性达到 67%,在进化树中被聚类在同一分支上。

2.4 CiMYB68 基因的亚细胞定位

将质粒 pEASY-Blunt-CiMYB68(图 5,a)和质粒 pCambia 1302(图 5,b)分别用 *Bgl*Ⅱ 和 *Spe*Ⅰ 进行双酶切,构建 CiMYB68 基因与 GFP 融合表达载体,利用浸花法获得转基因拟南芥株系。垂直培养 10 d 左右,在荧光显微镜下观察转基因幼苗根中的绿色荧光(图 6)。结果表明,CiMYB68 与 GFP 融合蛋白主要定位到细胞核中。

2.5 CiMYB68 基因的表达分析

利用荧光定量 PCR 技术对 CiMYB68 基因在干旱和低温处理下的表达进行分析,结果显示:*CiMYB68* 的转录水平在干旱处理 1 h 就明显上升,是未处理时的 5 倍左右,并且一直到 24 h 仍保持高水

平的表达。在 4℃ 的低温处理下,CiMYB68 基因表达量随着处理时间延长逐渐升高并在 24 h 达到最高表达水平(图 7),表明 CiMYB68 基因参与植物对干旱和冷的响应。

3 讨 论

中间锦鸡儿植物在漫长的进化过程中适应了各种严酷的生长环境,具有很强的抗逆性<sup>[18]</sup>。所以研

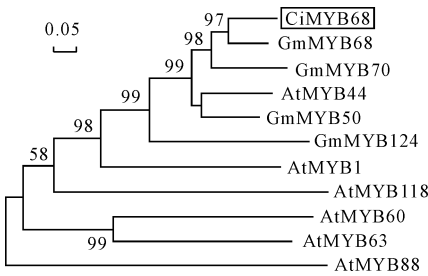


图 4 CiMYB68 与其它植物 MYB 的系统进化分析  
分支上的数字表示 Bootstrap 验证中基于 500 次  
重复该节点的可信度;标尺表示演化距离;  
CiMYB. 中间锦鸡儿;GmMYB. 大豆;AtMYB. 拟南芥  
Fig. 4 Phylogenetic analysis of CiMYB68  
and other known MYBs

The numbers on the branches represent the reliability percent of bootstraps values based on 500 replications;Scaleplate represents the distance of these plants' evolution;CiMYB. *Caragana intermedia* ; GmMYB. *Glycine max* ; AtMYB. *Arabidopsis thaliana*

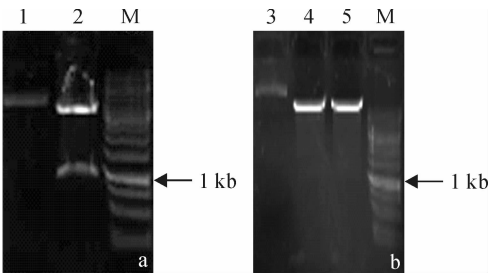


图 5 重组质粒 pEASY- Blunt-CiMYB68 和质粒 pCambia 1302 双酶切(*Bgl*Ⅱ/*Spe*Ⅰ)  
a. 酶切重组质粒 pEASY- Blunt-CiMYB68;b. 酶切质粒 pCambia 1302;M. 1 kb DNA marker;1. pEASY- Blunt-CiMYB68 重组质粒;  
2. pEASY- Blunt-CiMYB68 酶切产物;3. pCambia 1302 质粒;4 和 5. pCambia 1302 酶切产物  
Fig. 5 The recombinant pEASY- Blunt-CiMYB68 plasmid and pCambia 1302 plasmid digested with *Bgl*Ⅱ and *Spe*Ⅰ  
a. Digested recombinant pEASY- Blunt-CiMYB68 plasmid;  
b. Digested pCambia 1302 plasmid;M. 1 kb DNA marker;  
1. The recombinant pEASY- Blunt-CiMYB68 plasmid;2. The recombinant pEASY- Blunt-CiMYB68 plasmid digested with *Bgl*Ⅱ and *Spe*Ⅰ;3. pCambia 1302 plasmid;4,5. The pCambia 1302 plasmid digested with *Bgl*Ⅱ and *Spe*Ⅰ

图 3 CiMYB68 氨基酸序列亲/疏水性分析图

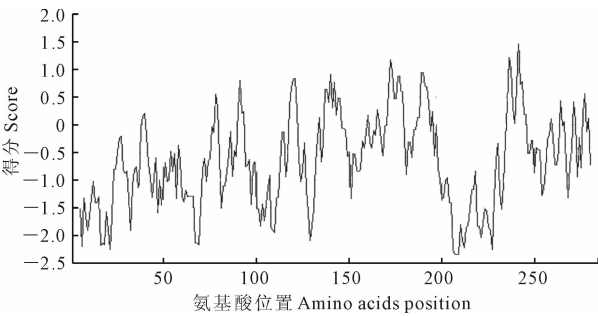
Y 轴 0 值以上表示疏水区域,0 值以下表示亲水区域

Fig. 3 Hydropathy plot of deduced amino acid sequence of CiMYB68

Y regions above a hydropathy score of zero are hydrophobic, regions below a hydropathy score of zero are hydrophilic

Table 2 The secondary structure of CiMYB68 protein

二级结构类型 Secondary structure	CiMYB68	
	氨基酸残基数 The no. of amino acid residues	比例 Proportion/%
α螺旋 α helix	110	38.73
β折叠 β sheet	24	8.45
无规则卷曲 Random coil	150	52.82



究中间锦鸡儿植物的抗逆相关基因并进行功能分

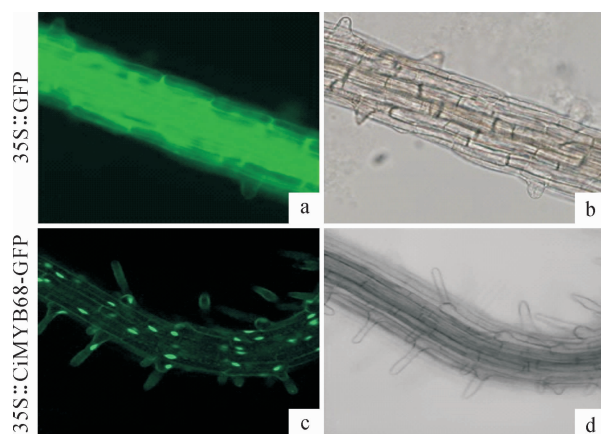


图6 CiMYB68-GFP融合蛋白定位于转基因拟南芥细胞核中

a、b. pCambia1302空载体转基因拟南芥;c、d. CiMYB68-GFP融合载体转基因拟南芥;a、c. 荧光激发光图像;b、d. 明场图像

Fig. 6 CiMYB68-GFP fusion protein localized in the nuclei of the transgenic *Arabidopsis*

a and b. pCambia1302 transgenic line; c and d. CiMYB68-GFP transgenic line; a and c. Fluorescent detection; b and d. Bright field

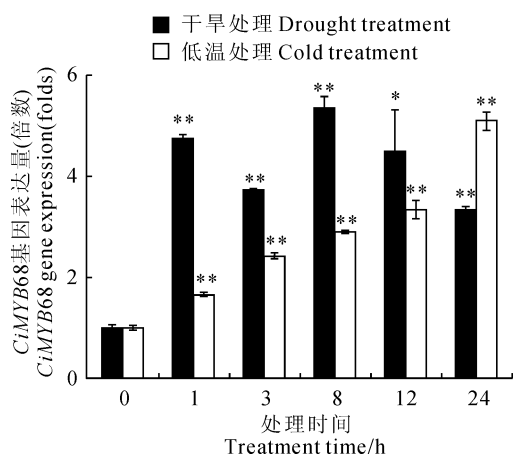


图7 qRT-PCR检测干旱和低温胁迫下CiMYB68基因的表达

把两种处理的1、3、8、12 h和对照0 h的CiMYB68基因的表达水平分别进行“学生t检验”分析显著性,其中\*表示 $P < 0.05$ ; \*\*表示 $P < 0.01$

Fig. 7 The expression of CiMYB68 under drought and cold stress detected by qRT-PCR

Student's *t*-test was used to analyze the significance of CiMYB68 expression level between the control and the treatment.

\* indicates significant difference among samples at 0.05 level;

\*\* indicates significant difference among samples at 0.01 level

析,可以从分子机制上进一步了解中间锦鸡儿的抗逆机理。本研究利用 RACE 技术克隆了中间锦鸡儿 MYB 基因的 cDNA 和 gDNA 的全长序列,其开放阅读框长 852 bp,预测其编码 284 个氨基酸。序列比对和系统进化分析表明该基因和大豆的 Gm-MYB68 一致性最高,将克隆得到的中间锦鸡儿 MYB 基因命名为 CiMYB68。

许多 MYB 转录因子参与植物的抗逆过程。MYB 转录因子参与的干旱胁迫应答大多与 ABA 有关,AtMYB60 和 AtMYB90 通过 ABA 信号级联放大调控气孔运动从而参与干旱胁迫<sup>[19]</sup>。AtMYB13、AtMYB15、AtMYB33 和 AtMYB101 参与 ABA 介导的应答环境信号反应<sup>[20]</sup>。AtMYB62 参与对磷酸盐缺失的应答<sup>[7]</sup>。AtMYB108 参与了生物和非生物胁迫的应答<sup>[21]</sup>。水稻中的 *Osmyb4* 基因过表达能显著提高植物对低温的耐受性<sup>[22]</sup>。序列比对和系统进化分析说明 CiMYB68 与大豆 Gm-MYB68 亲缘关系最近,与拟南芥 AtMYB44 的亲缘关系也较接近,一致性达到 49%。GmMYB68 和 AtMYB44 都属于 R2R3-MYB 的 22 亚族<sup>[23]</sup>。AtMYB44 调节 ABA 介导的气孔关闭来应答生物胁迫,同时还可能调节同亚族的其他基因(AtMYB70、AtMYB73 和 AtMYB77/AtMYB2)的应激反应<sup>[24]</sup>。AtMYB68 在拟南芥根的中柱鞘中负调节木质素的沉积<sup>[25]</sup>。AtMYB68 在高温胁迫下的表达增强,说明参与了高温应答反应<sup>[23]</sup>。而大豆的 MYB68 目前还没有研究报道。通过荧光定量 PCR 技术检测了 CiMYB68 在干旱和低温逆境胁迫下的表达情况,结果显示 CiMYB68 都被不同程度的诱导,表明 CiMYB68 基因在植物对这 2 种逆境的耐受中可能起作用。此外,用 200 mmol/L 的 NaCl 溶液、100 μmol/L 的 JA 溶液、1 mmol/L 的 SA 溶液、200 μmol/L 的 ABA 溶液、10 μmol/L 的 GA<sub>3</sub> 溶液和高温(42 °C)处理了中间锦鸡儿一月龄苗,但在上述处理下 CiMYB68 的表达量没有明显的变化,表明该基因可能特异地参与了对干旱和低温的响应。

CiMYB68 具体的生物学功能还有待进一步验证。为深入揭示该基因在中间锦鸡儿抵抗非生物胁迫中的作用,我们已经构建了该基因的双元表达载体并转化了拟南芥野生型,为后续通过转基因植物验证该基因的功能做准备。



## 参考文献:

- [1] LIU L(刘 蕾), DU H(杜 海), TANG X F(唐晓凤), *et al.* The roles of MYB transcription factors on plant defense responses and its molecular mechanism[J]. *Hereditas(遗传)*, 2008, **30**(10): 1 265—1 271(in Chinese).
- [2] PAZ-ARES J, GHOSAL D, WIENAND U, *et al.* The regulatory c1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators[J]. *The EMBO Journal*, 1987, **6**(12): 3 553—3 558.
- [3] CHEN Y H, YANG X Y, HE K, *et al.* The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, **60**(1): 107—124.
- [4] ZHONG R Q, RICHARDSON E A, HUA Y Z. The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2007, **19**(9): 2 776—2 792.
- [5] LIU SH M(刘守梅), SUN Y Q(孙玉强), WANG H ZH(王慧中). Researches on plant MYB transcription factors[J]. *Journal of Hangzhou Normal University(杭州师范大学学报)*, 2012, **11**(2): 146—150(in Chinese).
- [6] ZHANG L C, ZHAO G Y, XIA C, *et al.* Overexpression of a wheat MYB transcription factor gene, *TaMYB56-B*, enhances tolerances to freezing and salt stresses in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Gene*, 2012, **505**(1): 100—107.
- [7] BALLACHANDA N D, RAMAIAH M, ATHIKKATTUVALASU S K, *et al.* Phosphate starvation responses and gibberellic acid biosynthesis are regulated by the MYB62 transcription factor in *Arabidopsis*[J]. *Molecular Plant*, 2009, **2**: 43—58.
- [8] LIAO Y, ZOU H F, WANG H W, *et al.* Soybean *GmMYB76*, *GmMYB92* and *GmMYB177* genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants[J]. *Cell Research*, 2008, **18**: 1 047—1 060.
- [9] BI Y D(毕影东), LIU Q X(刘清醒), GUO CH H(郭长虹), *et al.* Advances of the ABA and the salt stress tolerance mechanisms in plant signal transduction pathways[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin(中国农学通报)*, 2013, **29**(9): 167—171(in Chinese).
- [10] JIA J, XING J H, DONG J G, *et al.* Functional analysis of MYB73 of *Arabidopsis thaliana* against *Bipolaris oryzae*[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, **10**(5): 721—727.
- [11] RAMIREZ V, AGORIO A, COEGO A, *et al.* MYB46 modulates disease susceptibility to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2011, **155**(4): 1 920—1 935.
- [12] SJOERD V E, BAS W M, RONALD V D, *et al.* MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria induced systemic resistance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2008, **146**(3): 1 293—1 304.
- [13] A L T(阿拉塔), ZHAO SH Y(赵书元), LI J ZH(李敬忠). The research of three kinds of biological characteristics and cultivation and utilization of *Caragana*[J]. *Inner Mongolia Animal Husbandry Science(内蒙古畜牧科学)*, 1997, (4): 8—11(in Chinese).
- [14] JIA L(贾 丽), QU SH Z(曲式曾). The research progress of genus *Caragana* plant[J]. *Bulletin of Botanical Research(植物研究)*, 2001, **21**(4): 515—518(in Chinese).
- [15] NIU Y(牛 勇). The characteristics and development of *Caragana intermedia*[J]. *Journal of Inner Mongolia Forestry(内蒙古林业)*, 2013, (3): 22—23(in Chinese).
- [16] ZHU J F, LI W F, YANG W H, *et al.* Identification of microRNAs in *Caragana intermedia* by high-throughput sequencing and expression analysis of 12 microRNAs and their targets under salt stress[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, **32**(9): 1 339—1 349.
- [17] YANG Q, YIN J J, LI G, *et al.* Reference gene selection for qRT-PCR in *Caragana korshinskii* Kom. under different stress conditions[J]. *Molecular Biology Reports*, 2014, **41**(4): 2 325—2 334.
- [18] YANG Q(杨 杞), YIN J J(尹佳佳), WANG Y(王 颖), *et al.* Cloning and expression analysis of *CkLEA1* gene in *Caragana korshinskii* Kom[J]. *China Biotechnology(中国生物工程杂志)*, 2013, **33**(5): 93—99(in Chinese).
- [19] COMINELLI E, GALBIATI M, VAVASSEUR A, *et al.* A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance[J]. *Current Biology*, 2005, **15**(13): 1 196—1 200.
- [20] REYES J L, CHUA N H. ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during *Arabidopsis* seed germination[J]. *The Plant Journal*, 2007, **49**(4): 592—606.
- [21] MENGISTE T, CHEN X, SALMERON J, *et al.* The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2003, **15**(11): 2 551—2 565.
- [22] VANNINI C, LOCATELLI F, BRACALE M, *et al.* Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants[J]. *The Plant Journal*, 2004, **37**(1): 115—127.
- [23] CHRISTIAN D, RALF S, ERICH G. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, **15**(10): 573—581.
- [24] CHOONKYUN J, JUN S S, SANG W H, *et al.* Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2008, **146**(2): 623—635.
- [25] FENG C P, ANDREASSON E, MASLAK A, *et al.* *Arabidopsis* MYB68 in development and responses to environmental cues[J]. *Plant Science*, 2004, **167**(5): 1 099—1 107.