

红根甘肃桃根系 *MYB* 基因片段的克隆及序列分析

魏 潇, 曹 珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超, 陈昌文

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要:为了明确 *MYB* 转录因子在红根甘肃桃抗性分子机制中的作用, 通过 RT-PCR 从红根甘肃桃根系 cDNA 中克隆了 14 个 *MYB* 基因片段, 序列分析表明这些片段与苹果、葡萄、拟南芥、番茄等植物的 *MYB* 转录因子高度同源; 系统进化分析显示红根甘肃桃的 11 个 PkMYB 分别与拟南芥、番茄、杨树、柿等植物中已知功能的 *MYB* 转录因子聚在不同的亚类, 据此推测它们可能有相似的功能。试验结果为进一步研究 *MYB* 基因在红根甘肃桃抗性机制中的作用奠定了基础。

关键词:红根甘肃桃; 根系; *MYB* 基因; 克隆; 序列分析

Cloning and Characterization of *MYB* Genes from Root System of Honggengansutao Peach (*Prunus kansuensis* L.)

WEI Xiao, CAO Ke, WANG Li-rong, ZHU Geng-rui, FANG Wei-chao, CHEN Chang-wen

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009)

Abstract: In order to identify the molecular resistance mechanism of Honggengansutao peach (*Prunus kansuensis* L.), 14 fragments in *MYB* genes family were isolated from cDNA in root system of Honggengansutao peach by RT-PCR. By comparison, we found that their inferred amino acid sequences have high identity with their counterparts from apple, grape, *Arabidopsis*, tomato and other plants in GenBank. The result of phylogenetic analysis showed that 11 PkMYBs are clustered with known functions MYBs from *Arabidopsis*, tomato, poplar and persimmon in different subgroups. According to above results, we predicted that PkMYBs have similar functions with other MYB proteins. These consequences will provide a foundation of coming research about *MYB* gene function in resistant mechanism of Honggengansutao peach.

Key words: Honggengansutao peach (*Prunus kansuensis* L.); Root system; *MYB* genes; Cloning; Sequence analysis

甘肃桃 (*Prunus kansuensis* L.) 是桃 (*Prunus persica* L.) 的近缘种, 原产于我国西北地区, 为我国特有的野生种质。甘肃桃抗旱、抗寒, 是一种抗逆性很强的桃砧木。红根甘肃桃 1 号是甘肃桃的一种类型, 因其根表皮、韧皮部和木质部均为红色而得名。朱更瑞等^[1] 经过多年对桃不同砧木接种南方根结线虫并鉴定, 认为红根甘肃桃对南方根结线虫免疫。

转录因子 (transcription factor, TF) 是能够与真核基因启动子区顺式作用元件特异性结合的 DNA 结合蛋白, 通过与靶基因及其他相关蛋白的相互作

用, 来调节靶基因表达的强度, 或控制基因的时空特异性表达。*MYB* 类转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, 以含有 *MYB* 结构域为共同特征, 广泛参与植物发育和代谢调控, 如调控苯丙烷类次生代谢途径、参与植物生长信号传导、应答生物和非生物胁迫、控制植物细胞的形态和模式建成、参与细胞分化和发育调控等^[2-4]。

目前, 从多种果树如葡萄、苹果、柑橘、桃、李、杏、櫻桃、扁桃等中已经分离出多个 *MYB* 基因 (NCBI 检索)。在桃研究中, 也曾从桃果肉中分离出参

收稿日期: 2010-01-15 修回日期: 2010-11-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771480); 国家“863”计划项目 (2006AA100108-4-12)

作者简介: 魏潇, 在读硕士, 研究方向为果树遗传育种。E-mail: weixiao6769@163.com

通讯作者: 王力荣, 研究员, 主要从事果树种质资源研究。E-mail: wlrong2009@sina.com

与调控花色素苷合成的 *MYB* 基因 *MYB10*^[5] (检索号: EU155160), 而与抗逆相关的 *MYB* 基因鲜有报道。为了探明红根甘肃桃对南方根结线虫和多种逆境的抗性分子机制及其与花色素苷含量的关系, 本文根据植物中 *MYB* 基因的保守结构域设计引物, 从红根甘肃桃幼苗根系 cDNA 中克隆 *MYB* 基因片段, 并推测其功能, 为红根甘肃桃优异抗逆基因资源的发掘与利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 试材红根甘肃桃 1 号取自中国农业科学院郑州果树研究所国家果树种质桃圃。采集红根甘肃桃种子, 砂藏 3 个月后播于营养基质中, 光周期为光照 16h、黑暗 8 h, 25℃ 下培养。取苗龄为 1 个月的植株根系提取总 RNA。

1.1.2 试剂、菌株和载体 RNA 提取试剂 TRNzol A⁺、cDNA 第一链合成试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、大肠杆菌 DH-5 α 感受态均购自北京天根生化科技有限公司; pGEM-T Easy 载体、T₄ DNA 连接酶均购自 Promega 公司。其他生化试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 根系总 RNA 提取 在 Trizol 法 (参照 TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取试剂说明书)、CTAB 法^[6] 和

热酚法^[7] 的基础上建立了 Trizol-CTAB-SDS 联合裂解法, 具体如下: 在 15ml 离心管中加入 3ml TRNzol-A⁺ 试剂、3ml CTAB 提取液^[6] (2% CTAB (W/V)、2% 聚乙烯吡咯烷酮 PVP (W/V)、0.1mol/L Tris-HCl (pH 8.0)、25mmol/L EDTA (pH 8.0)、0.5g/L 亚精胺、2.0mol/L NaCl)、2ml SDS 缓冲液^[7]、2ml 水饱和酚 (pH 4.7~5.5)、200 μ l 巯基乙醇, 颠倒混匀。取 1g 新鲜的根放入液氮中研磨, 将粉末迅速转入盛有裂解液的离心管中, 涡旋振荡 60 s, 65℃ 水浴 10min, 中间颠倒混匀 3~4 次。从水浴中取出后置于冰水浴中, 冷却后于 4℃、12000r/min 离心 20min, 将上清液转入 2 个离心管中, 加等体积氯仿, 颠倒混匀 10min, 静置 5min, 于 4℃、12000r/min 离心 15min, 将 2 管上清液转入 1 个离心管中, 加入 1/3 体积 10mol/L LiCl, 4℃ 过夜沉淀。4℃、12000r/min 离心 20min, 弃上清液, 加 1ml 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 置于超净工作台中干燥 5min, 加 20 μ l 无 RNase 的水溶解, 溶解后转入 1.5ml 离心管中, -80℃ 保存。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 核酸蛋白测定仪 (ependorf) 测定其浓度和吸光值。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中登录的拟南芥、番茄、苹果、小麦、水稻等植物 *MYB* 转录因子的氨基酸保守区序列, 参考曹冬梅等^[8]、Romero 等^[9]、陈荣敏^[10] 的序列设计 3 对简并引物 (表 1), 由 Invitrogen 生物技术有限公司合成。

表 1 克隆 *MYB* 基因中所用的简并引物

Table 1 Degenerate primers used in isolating *MYB* genes

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 (°C) Annealing temperature	预计扩增片段长度 (bp) Size of amplified fragments	获得片段数量 No. of fragments	参考文献 Reference
MYB ₁	F: ATAGAATTCATGTCCTCCGGCAC R: CCGTCGACTCAAGCGCACTC	60	200	2	[8]
MYB ₂	F: CGGAATTCCTDATYTCRITRRCNGT R: CGGAATTCDSNAARAGYTYCG	48	180	3	[9]
MYB ₃	F: GGGCCCCGTCTGYCARAARRT R: GGTGGAGTTCAGTACTTCTDA TYTCRTT	57	300	9	[10]

1.2.3 RT-PCR 克隆目的基因片段 以 1 μ g RNA 为模板, Oligo (dT)₁₅ 为引物, 按照 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒说明书反转录合成 cDNA 第一链。以 1 μ l cDNA 第一链产物为模板, 用设计的 3 对引物分别扩增目的片段。PCR 反应体系总体积为 20 μ l, 其中含 10 \times PCR Buffer 2 μ l, dNTP (10mmol/L) 0.5 μ l, MgCl₂ (25mmol/L) 1.5 μ l, Taq DNA polymer-

ase (5U/ μ L) 0.2 μ l, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l, 加双蒸水至总体积 20 μ l。反应条件为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 45s, 退火 45s, 退火温度见表 1, 72℃ 延伸 60s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min, 置 4℃ 保温。取 5 μ l PCR 扩增产物, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明回收目

的片段,连接到 pGEM-T Easy 载体中,转化感受态大肠杆菌 DH-5 α , 蓝白斑筛选阳性克隆,经菌落 PCR 鉴定后送 Invitrogen 生物技术有限公司测序。

1.2.4 序列分析和系统进化树的构建 用 NCBI 的 VecScreen 程序去除所测序列中的载体序列,通过 BLASTN 进行同源性分析。用 DNAMAN 6.0 软件分析 DNA 序列,翻译出氨基酸序列后在 BLASTP 中搜索相似性高的蛋白质序列,用 Bioedit 软件进行多序列比对,用 MEGA 4.0 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 不同 RNA 提取方法的对比以及 RNA 纯度和完整性检测

试验采用 Trizol 法、CTAB 法^[6]和热酚法^[7]提取红根甘肃桃根系总 RNA,效果均不理想,进而在此三者基础上建立了适于红根甘肃桃根系总 RNA 提取的 Trizol-CTAB-SDS 联合裂解法,得到了高质量的总 RNA。电泳检测结果如图 1 所示,用 Trizol 法和 CTAB 法提取的 RNA 电泳条带模糊,表明降解严重且产率不高;而用热酚法提取检测不到 RNA;只有用联合裂解法提取的总 RNA 显示有 3 条带,分别为 28S、18S 和 5S,电泳带型整齐,基本无拖尾,且 28S rRNA 条带的亮度约为 18S rRNA 的 2 倍,说明 RNA 未发生降解,完整性较好。用核酸蛋白测定仪检测联合裂解法提取的总 RNA 的纯度和浓度,A260/280 为 1.87,A260/230 为 2.56,表明 RNA 无蛋白质、DNA 和其他杂质污染,可以用于下一步试验,RNA 产率为 13.4 $\mu\text{g/g}$ 。

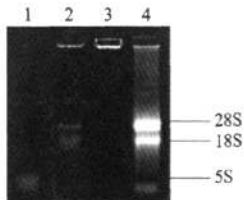


图 1 不同 RNA 提取方法对比

Fig.1 Contrast of RNA extracted with different methods

1: Trizol 法; 2: CTAB 法; 3: 热酚法; 4: Trizol-CTAB-SDS 联合裂解法

1: Trizol method; 2: CTAB method; 3: Hot phenol method; 4: Trizol-CTAB-SDS method

2.2 MYB 基因片段的克隆和序列分析

以红根甘肃桃根系 cDNA 为模板,利用表 1 中的 3 对简并引物进行 PCR 扩增,结果得到了与预计片段大小一致的片段(图 2),转化测序,得到 22 条万方数据

不同的序列。将这 22 条序列通过 BLASTN 与 GenBank 中登录的不同 MYB 基因序列进行同源性比对,结果发现这些序列与苹果、葡萄、拟南芥、草莓、柿、烟草、番茄、小麦、大麦、水稻、金鱼草、白菜、黄瓜、豌豆、花生、辣椒、蓖麻等物种的 MYB 基因同源性达到 75% ~ 90%。

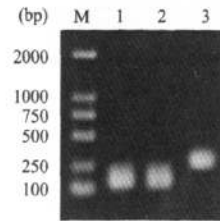


图 2 红根甘肃桃根系 MYB 基因的 RT-PCR 产物

Fig.2 Conservative MYB genes fragments in root system of Honggengansutao peach amplified by RT-PCR with different primers

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1: MYB1 扩增产物; 2: MYB2 扩增产物; 3: MYB3 扩增产物

M: DL2000 marker; 1: PCR products amplified by MYB1; 2: PCR products amplified by MYB2; 3: PCR products amplified by MYB3

用 DNAMAN 6.0 软件分析得到的 22 个序列,其中有 14 个能推导出完整的氨基酸序列。分别命名为 PkMYB1-14。将这 14 个氨基酸序列在 BLASTP 中搜索蛋白质序列,结果显示 PkMYB1-14 与苹果、葡萄、拟南芥、大豆、棉花等多个物种的 MYB 转录因子的保守结构域高度同源,表明所得到的片段均为 MYB 基因家族成员的保守区。将本试验所得的 PkMYB1-14 和与之同源性高的苹果、葡萄、拟南芥、大豆和棉花的 MYB 蛋白序列进行多序列比对,结果如图 3 所示, PkMYB1-7 含有典型的 R2R3-MYB 结构域,而 PkMYB8-14 只含有 1 个 MYB 结构域,分析其原因可能是由于设计引物时选择的保守区域长度不同所致。

2.3 系统进化分析

蛋白质结构域的分组对功能分析很重要,系统进化树中聚在同一组的蛋白亲缘关系较近,表明它们具有共同的起源,存在功能相似的可能^[11]。为了对本试验中所得的序列进行功能预测,用 MEGA 4.0 软件对来自不同物种已知功能的 MYB 蛋白序列和本试验获得的 14 条序列一起构建系统进化树。聚类结果如图 4 所示,当演化距离为 0.15 时聚类结果可分为 7 组,第 1 组包含 PkMYB5、PkMYB6 和拟南芥的 AtMYB87(NP_195492.2),其功能与病原胁迫有关^[12];第 2 组只包含桃的 PpMYB10(ABX79945.1),

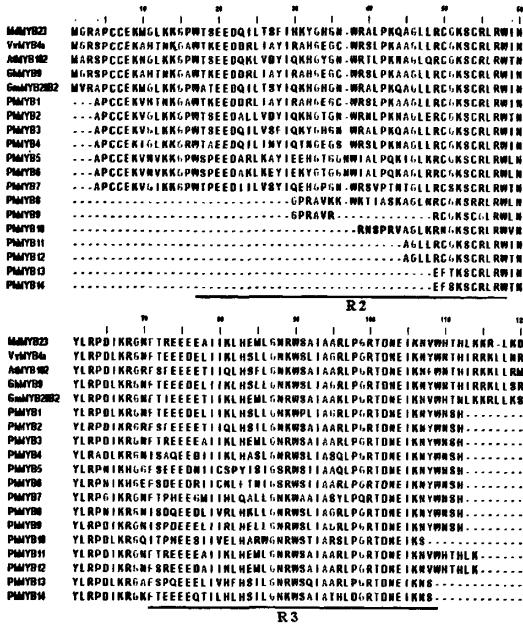


图3 红根甘肃桃(推导的MYB氨基酸序列)与其他几种植物中MYB结构域氨基酸序列比对
 Fig.3 Alignment of amino acid sequences of MYB domains of Honggengansutao peach (predicted) and other plants

MdMYB23(DQ074471.1)来自苹果;VvMYB4a(EF113078.1)来自葡萄;AtMYB102(NM_118264.2)来自拟南芥;ChMYB9(AF336286.1)来自棉花;GmMYB29B2(BAA81736.1)来自大豆;PkMYB1-14来自红根甘肃桃

MdMYB23(DQ074471.1) come from apple; VvMYB4a(EF113078.1) come from grape; AtMYB102(NM_118264.2) come from Arabidopsis; ChMYB9(AF336286.1) come from cotton; GmMYB29B2(BAA81736.1) come from soybean; PkMYB1-14 come from Honggengansutao peach

其功能为调控花色苷的合成^[5];第3组包含 PkMYB7 以及拟南芥的 AtMYB30(NP_189533.1)、AtMYB60(NP_172358.1)、AtMYB96(NP_201053.2),其功能与抗干旱、病原胁迫有关^[12];第4组为 PkMYB10;第5组为 PkMYB14;第6组为 PkMYB13;其余的 MYB 蛋白聚为一大类,为第7组。当演化距离为 0.10 时,第7组的 MYB 蛋白又可分为 4 亚类,其中 PkMYB8、PkMYB9 与杨树的 PtMYB134(ACR83705.1)、柿的 DkMYB(BAI49721.1)聚为第1亚类;PkMYB1 与拟南芥的 AtMYB6(NP_192684.1)聚为第2亚类;PkMYB2、PkMYB3、PkMYB11、PkMYB12 与拟南芥的 AtMYB13(NP_172108.1)、AtMYB102(NP_567626.1)聚为第3亚类;PkMYB4 与拟南芥的 AtMYB12(ABB03913.1)、番茄的 SIMYB12(ACB46530.1)聚为第4亚类。由于第1和第4亚类

中的已知功能的蛋白与调控类黄酮和原花色素的合成有关^[13-16],因此这些亚类中的 PkMYB 可能也具有相似的功能;第2和第3亚类中的 PkMYB 的功能可能与高盐、冷害、干旱、伤害和病原胁迫有关^[12]。

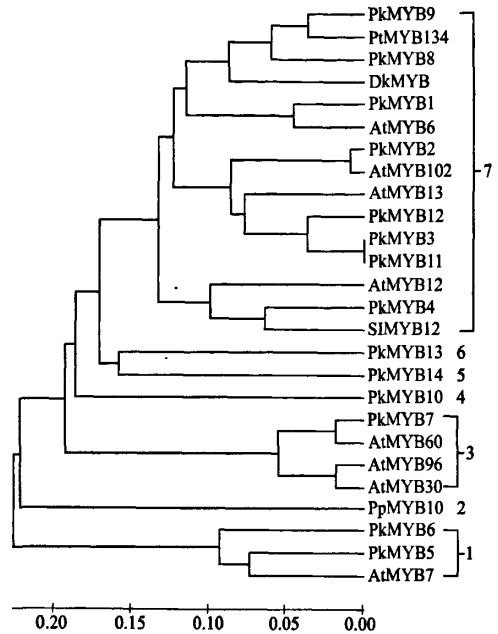


图4 红根甘肃桃(推导的MYB氨基酸序列)与其他物种MYB蛋白的系统进化树
 Fig.4 Phylogenetic tree of MYB proteins in Honggengansutao peach (predicted) and other species

3 讨论

3.1 红根甘肃桃根系 RNA 提取

联合裂解法的优点在于提高了裂解效率和产率。单独用 CTAB 或 SDS 裂解,裂解时间相对于 Trizol 较长,增加了 RNA 降解的风险;单独用 Trizol 裂解,虽然裂解能力较强、时间短,但容易引起褐化现象,而采用三者联合裂解缩短了裂解时间,减少了 RNA 被内源 RNase 降解的机会。根系 RNA 含量低于叶片,如用联合裂解法提取红根甘肃桃叶片 RNA,产率为 116 μg/g,而提取根系 RNA,产率仅为 13.4 μg/g。Trizol 法、CTAB 法^[6]和热酚法^[7]中使用的离心管容积为 1.5 ml,而本研究使用了 15 ml 离心管,同时加大样本量和裂解液量,提高了 RNA 产率。

3.2 MYB 基因片段的序列分析

通常,MYB 结构域约含 51~52 个氨基酸,形成螺旋-转角-螺旋的构型,一般有 3 个保守的色氨酸

酸残基(W),间隔 18~19 个氨基酸排列,参与空间中疏水核心的形成^[12]。R2R3-MYB 类转录因子含有 2 个串联 MYB 结构域,R2 和 R3 中均含有 3 个保守的色氨酸残基,其中 R3 中第一个色氨酸残基通常为苯丙氨酸(F)或异亮氨酸(I)所代替。PkMYB1-7 含有 R2R3-MYB 结构域,属于 R2R3-MYB 类转录因子;PkMYB8-14 序列较短,含有 1 个 MYB 结构域,属于哪个亚类还有待于进一步研究。

系统进化的聚类结果(图 4)与 Kranz 等^[17]报道的拟南芥中 MYB 蛋白分类结果一致,证实进化树构建结果可信。本研究利用同源克隆法从红根甘肃桃的根 cDNA 中得到了 14 个 MYB 基因家族成员的保守区片段,它们与苹果、葡萄、拟南芥、大豆、棉花等多个物种的 MYB 转录因子的保守结构域高度同源,其中 11 个 PkMYB 分别与拟南芥、番茄、杨树、柿等植物中已知功能的 MYB 转录因子聚在不同的亚类,据此推测它们与该类基因具有相似的功能。

3.3 MYB 转录因子的功能

MYB 转录因子广泛参与植物次生代谢调控、激素和环境胁迫的应答,不同的 MYB 转录因子在基因的结构、表达特性及功能方面存在明显的差异。克隆 MYB 基因,明确其功能对于阐明这类转录因子在转录水平对植物生理代谢调控及逆境胁迫的应答机制具有重要意义。

MYB 转录因子通过调控苯丙烷类代谢途径中结构基因的表达来调控类黄酮和花色苷的合成。如拟南芥的 AtMYB12 和番茄的 SlMYB12 可特异调控类黄酮的合成^[14-15],柿果实中的 DkMYB4 和杨树的 PtMYB134 能够增加原花色苷的合成^[13-16]。原花色苷(Proanthocyanidins, PA)是一种无色的类黄酮物质,参与植物对生物和非生物胁迫的防卫反应。机械伤害、叶锈菌侵染和紫外线-B 照射诱导杨树叶片产生大量原花色苷来抵御伤害,而原花色苷合成途径的激活有赖于转录因子 PtMYB134。凝胶迁移实验(EMSA)表明,PtMYB134 能够与原花色苷合成途径基因 *PAL1*、*DFR1*、*ANR2* 的启动子区结合^[13]。无色花色苷(Leucoanthocyanidins)是花色苷和原花色苷共同的前体物质。本试验所用的试材红根甘肃桃的根中富含花色苷和其他类黄酮化合物,而杨树叶片中也含有花色苷^[13],由此推测红根甘肃桃根中也含有原花色苷,而从其根系 cDNA 中分离的 PkMYB4、PkMYB8、PkMYB9 又与调控苯丙烷代谢途径的 MYB 蛋白聚为 1 类,因此可能参与调控原花色苷合成途径,通过增加原花色苷含量来

抵御根结线虫的侵染。然而,从桃果肉中分离参与调控花色苷合成的 PpMYB10(ABX79945.1)^[5]与本试验红根甘肃桃根中的 PkMYB4、PkMYB8、PkMYB9 关系较远,可能与调控不同的酶有关。

在逆境胁迫下,MYB 转录因子可与许多功能基因启动子区中的 MYB 结合元件结合,从而激活胁迫应答基因的表达。MYB 转录因子受到各种环境因子诱导,如干旱、低温、机械伤害、病原等。拟南芥的 AtMYB6 对低温和 NaCl 胁迫比较敏感,其表达还受到外源 ABA 和水分胁迫调节^[18];AtMYB13 的表达受到干旱、外源 ABA、光、机械伤害调节^[19];AtMYB30 则能够加快和强化过敏性坏死反应的出现,从而使植株表现抗性^[20]。红根甘肃桃具有抗旱、抗寒、抗根结线虫等特性,从其根系 cDNA 中分离的多个 PkMYB 与拟南芥中应答生物与非生物胁迫的 MYB 蛋白序列聚在不同的亚类,可能与其具有相似的功能。

植物对生物和非生物胁迫的应答反应是一个涉及多基因、多信号途径、多基因产物的复杂过程,本文从红根甘肃桃幼苗根系 cDNA 中得到了 14 个不同的 MYB 基因片段,根据序列同源性和系统进化分析预测了部分基因的功能,然而对于不同 MYB 转录因子之间的调控网络尚缺乏深入研究。因此,开展这些 MYB 基因在次生代谢过程以及逆境、病原诱导下的表达研究,从而揭示 MYB 基因在红根甘肃桃抗性机制中的作用将是下一步研究的重要内容。

参考文献

- [1] 朱更端,王力荣,左覃元,等.桃砧木资源对南方根结线虫的抗性[J].果树学报,2000(增):36-39
- [2] Martin C, Paz-ares J. MYB transcription factors in plants[J]. Trends Gene, 1997, 13: 67-73
- [3] 刘宝业,张增艳,梁国鲁.作物抗病基因工程研究进展[J].植物遗传资源学报,2008,9(2):253-257
- [4] 刘蕾,杜海,唐晓凤,等. MYB 转录因子在植物抗逆境胁迫中的作用及其分子机理[J].遗传,2008,30(10):1265-1271
- [5] Lin W K, Bolitho K, Crafton K, et al. An R2R3MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 50
- [6] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees[J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 113-116
- [7] 王友华,卢孟柱,段留生.棉花幼苗根总 RNA 提取的改进热酚法[J].西北植物学报,2005,25(4):723-726
- [8] 曹冬梅,许雪峰,韩振海.苹果属小金海棠转录因子 MxMYB1 基因的克隆及其原核表达[J].园艺学报,2006,33(4):833-835
- [9] Romero I, Fuentes A, Benito M J, et al. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant J, 1998, 14(3):273-284

行了提取。结果用第 1 种方法提取的部分样品(尤其夏季嫩叶)总 RNA 沉淀呈透明浅黄色凝胶状,虽然沉淀量较多但水溶性较差,导致 RNA 得率不高且在电泳图谱中可见明显的基因组 DNA 污染(如图 1 泳道 4)。推测可能与夏季嫩叶生长旺盛,多糖和次生代谢物质含量高而不易去除有关。第 2 种方法是在经典热酚法的 RNA 提取液中增加了 KAc 以去除多糖,用此方法得到的 RNA 提取液及其沉淀呈浅褐色且得率低(如图 1 泳道 2),表明有酚类物质干扰^[6,13]。这 2 种方法都不适用于蒙古沙冬青嫩叶,尤其是夏季嫩叶总 RNA 的提取。

Trizol 法因操作简单而得到广泛应用。本研究通过在 Trizol 试剂中增加 β -巯基乙醇而抑制了酚类物质的干扰^[6,13],但可能因为多糖等物质未能有效去除,使得 RNA 提取量依然不高(如图 1 泳道 3),故该方法也不能满足对高质量蒙古沙冬青总 RNA 提取的要求。

热酚法的优点是适用于大量提取且 RNA 纯度较高,可在乙醇中长期保存而不降解。本研究针对蒙古沙冬青的特点对其主要加以 2 点改进:一是在提取液中增加了 2% 的 β -巯基乙醇,以抑制多酚氧化酶的活性而排除酚类物质干扰^[6,13];二是在提取液中加入 1.25 mol/L KAc,以去除多糖污染^[6,13-14]。对于 β -巯基乙醇的用量和 KAc 的浓度及 pH 值无需十分精确,如果是冬季嫩叶和低温驯化的幼苗,二者浓度均可减少,KAc 母液的 pH 值可调在 4.8 ~ 6.5。此方法适用于蒙古沙冬青不同季节嫩叶和不同胁迫处理幼苗总 RNA 的提取,不仅得率高、完整性好,而且多糖、酚类和蛋白质等基本去除干净,已成功应用于蒙古沙冬青 SMART 全长 cDNA 文库的

构建(另有全文发表)和基因扩增。

在构建全长 cDNA 文库时需要高质量的 mRNA 作模板。本试验所用 Promega 公司的 mRNA 分离试剂盒(磁珠法)比 QIAGEN 公司的 mRNA 分离试剂盒(纤维素柱)更能有效地去除 rRNA,使 mRNA 纯度更高。另外,前者价格也较便宜,至少在分离沙冬青 mRNA 时不失为一种较理想的选择。

参考文献

- [1] Cheng S H. *Ammopiptanthus* Cheng f. A new genus of Leguminosae from central Asia [J]. *J Bot, USSR*, 1959, 44: 1381-1386
- [2] 李慧卿, 马文元, 李慧勇. 沙冬青抗逆性及开发利用前景分析研究[J]. *世界林业研究*, 2000, 13: 67-71
- [3] 王华, 贾桂霞, 丁琼. 沙冬青抗逆性研究进展与应用前景[J]. *中国农学通报*, 2005, 21: 121-125
- [4] 周春娥, 段红英, 齐力旺. 木本植物老根老叶总 RNA 的提取方法[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(22): 1831-1832
- [5] 王丹丹, 尹伟伦, 夏新莉. 沙冬青 cDNA-AFLP 体系的建立及引物筛选[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(24): 446-449
- [6] 李宏, 王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. *生物技术通报*, 1999(1): 36-39
- [7] 杜中军, 徐兵强, 黄俊生, 等. 一种改进的富含多糖的芒果组织中完整总 RNA 提取方法[J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2): 202-205
- [8] 朱昫, 王猛, 贾志伟, 等. 一种从富含多糖的玉米幼穗中提取 RNA 的方法[J]. *植物学通报*, 2007, 24(5): 624-628
- [9] 王茅雁. 玉米类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 ZmCBL1 与 ZmCBL4 基因的克隆与功能分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2007
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *分子克隆实验指南(第三版)*[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [11] Selenge D, Batsuren D, Batriov E Kh, et al. Chemistry study of the flora of mongolic isoflavones of *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. *Khim Prirodn Soedin*, 1986, 2: 242
- [12] 田晓明, 陈世忠, 屠鹏飞, 等. 沙冬青地上部分的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(19): 10
- [13] 王玉成, 杨传平, 姜静. 木本植物组织总 RNA 提取的要点与原理[J]. *东北林业大学学报*, 2002, 30(2): 1-4
- [14] Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1994, 12: 198-203, 212-215
- [15] (上接第 459 页)
- [10] 陈荣敏. 普通小麦 Myb 和 Dof 转录因子家族基因的克隆和表达研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004
- [11] 向琦, 曹家树, 叶纹芝, 等. 白菜 OguCMS 相关 MYB 家族新基因 BcMYBogu 的克隆与特征分析[J]. *遗传*, 2007, 29(5): 621-628
- [12] 乔孟, 于延冲, 向凤宁. 拟南芥 R2R3-MYB 类转录因子在环境胁迫中的作用[J]. *生命科学*, 2009, 21(1): 145-150
- [13] Robin D M, Lan T T, Michael B P, et al. The Wound-, Pathogen-, and Ultraviolet B-Responsive MYB134 Gene Encodes an R2R3 MYB Transcription Factor That Regulates Proanthocyanidin Synthesis in Poplar [J]. *Plant Physiol*, 2009, 150(2): 924-941
- [14] Mehrrens F, Kranz H, Bednarek P, et al. The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(2): 1083-1096
- [15] Butelli E, Hill L, Parr A, et al. AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol [J]. *Plant J*, 2008, 56(2): 316-326
- [16] Akagi T, Ikegami A, Tsujimoto T, et al. DkMyb4 is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151(4): 2028-2045
- [17] Kranz H D, Denekamp M, Greco R, et al. Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(2): 263-276
- [18] Zhu J K, Verma P E, Zheng X W, et al. HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(28): 9966-9971
- [19] Kirik V, Kölle K, Wohlfarth T, et al. Ectopic expression of a novel MYB gene modifies the architecture of the Arabidopsis inflorescence [J]. *Plant J*, 1998, 13(6): 729-742
- [20] Vaillau F, Daniel X, Tronchet M, et al. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(15): 10179-10184

红根甘肃桃根系MYB基因片段的克隆及序列分析

作者: 魏潇, 曹珂, 王力荣, 朱更瑞, 方伟超, 陈昌文, WEI Xiao, CAO Ke, WANG Li-rong, ZHU Geng-ru, FANG Wei-chao, CHEN Chang-wen
作者单位: 中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州, 450009
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES
年, 卷(期): 2011, 12(3)

参考文献(20条)

1. Vailliau F;Daniel X;Tranchet M A R2R3-MYB gene, At-MYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack[外文期刊] 2002(15)
2. Kirik V;K(olle K;Wohlfarth T Ectopic expression of a novel MYB gene modifies the architecture of the Arabidopsis inflores-cence 1998(06)
3. Zhu J K;Verslues P E;Zheng X W HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants 2005(28)
4. Kranz H D;Denekamp M;Greco R Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from Arabidopsis thaliana[外文期刊] 1998(02)
5. Akagi T;Ikegami A;Tsujiimoto T DkMyb4 is a Myb transcription factor involved in proanthocyanidin biosynthesis in persimmon fruit[外文期刊] 2009(04)
6. Butelli E;Hill L;Parr A AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato:expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol 2008(02)
7. Mehrtens F;Kranz H;Bednarek P The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenyl-propanoid biosynthesis[外文期刊] 2005(02)
8. Robin D M;Lan T T;Michael B P The Wound-, Pathogen-, and Ultraviolet B-Responsive MYB134 Gene Encodes an R2R3 MYB Transcription Factor That Regulates Proanthocyanidin Synthesis in Poplar 2009(02)
9. 乔孟;于延冲;向凤宁 拟南芥R2R3. MYB类转录因子在环境胁迫中的作用 2009(01)
10. 向殉;曹家树;叶灵芝 白菜OguCMS相关MYB家族新基因BcMYBogu的克隆与特征分析 2007(05)
11. 陈荣敏 普通小麦Myb和Dof转录因子家族基因的克隆和表达研究 2004
12. Romero I;Fuertee A;Benito M J More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of Arabidopsis thaliana[外文期刊] 1998(03)
13. 曹冬梅;许雪峰;韩振海 苹果属小金海棠转录因子MxMYB1基因的克隆及其原核表达 2006(04)
14. 王友华;卢孟柱;段留生 棉花幼苗根总RNA提取的改进热酚法 2005(04)
15. Chang S;Puryear J;Cairney J A simple and efficient method for isolation RNA from pine trees 1993
16. Lin W K;Bolitho K;Grafton K An R2R3MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Resaceae 2010
17. 刘蕾;杜海;唐晓凤 MYB转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理 2008(10)
18. 刘宝业;张增艳;梁国鲁 作物抗病基因工程研究进展 2008(02)
19. Martin C;Paz-ales J MYB transcription factors in plants[外文期刊] 1997(2)
20. 朱更瑞;王力荣;左覃元 桃砧木资源对南方根结线虫的抗性 2000(增)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201103020.aspx