

研究论文

Research Article

参与杉木次生壁合成调控的转录因子 *CIMYB4* 的克隆及在大肠杆菌中表达

吕运舟[✉], 郑佳[✉], 陈金慧[✉], 施季森[✉]

南京林业大学林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京, 210037

✉ 通讯作者: jshsi@njfu.edu.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 38 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0038

收稿日期: 2012 年 06 月 02 日

接受日期: 2012 年 06 月 14 日

发表日期: 2012 年 08 月 07 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

吕运舟等, 2012, 参与杉木次生壁合成调控的转录因子 *CIMYB4* 的克隆及在大肠杆菌中表达, 分子植物育种(online) Vol.10 No.38 pp.1278-1286 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0038)

引用格式(英文):

Lv et al., 2012, Cloning Transcription Factor *CIMYB4* Involving in Secondary Cell Wall Biosynthesis from *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook and expressing in *E. Coli*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.38 pp.1278-1286 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0038)

摘要 植物次生壁及木质素生物合成过程在转录水平上受到某些 R2R3-MYB 基因家族成员的调控, 如 *AtMYB46* 和 *PtMYB4*。本研究在杉木发育木质部中克隆了一个全长为 1 453 bp 的 R2R3-MYB 基因 cDNA 序列, 编码 413 个氨基酸残基的预测蛋白。生物信息学分析发现它与火炬松 *PtMYB4* 的序列相似性最高, 且与 *AtMYB46*、*PtMYB4* 和 *EgMYB2* 次生壁合成调控基因在系统进化上聚为一类。因此, 命名为 *CIMYB4*。本实验构建了 *CIMYB4* 基因的原核表达载体 pET-30b-*CIMYB4*, 并在大肠杆菌 Rosetta 中实现了高效表达和纯化, 为进一步研究转录因子 *CIMYB4* 在调控杉木次生壁发育过程的下游靶基因及相关顺式作用元件提供基础。

关键词 杉木; 次生壁; 木质素合成; MYB 转录因子; 原核表达

Cloning Transcription Factor *CIMYB4* Involving in Secondary Cell Wall Biosynthesis from *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook and expressing in *E. Coli*

Lv Yunzhou[✉], Zheng Jia[✉], Chen Jinhui[✉], Shi Jisen[✉]

Key Lab of Forest Genetics and Biotechnology, Ministry of Education, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037

✉ Corresponding author, jshsi@njfu.edu.cn; ✉ Authors

Abstract Biosynthesis of Plant secondary cell wall and lignin are regulated by some members of the R2R3-MYB gene family at the transcriptional level, such as *AtMYB46* and *PtMYB4* of. In this study, a full-length 1 453 bp cDNA sequence of the R2R3-MYB encoding a predicted protein with 413 amino acid residues was cloned from the developing xylem of fir. Bioinformatics analysis revealed that the sequence had the highest similarity with the sequence of *PtMYB4* of loblolly pine, which were clustered into one phylogenetic group with *AtMYB46*, *PtMYB4*, and *EgMYB2* that are the genes regulating secondary wall biosynthesis, therefore the cloned gene was named *CIMYB4*. In this experiment we constructed *CIMYB4* prokaryotic expression vector named pET-30b-*CIMYB4* that efficiently expressed in Rosetta strain of *E. coli*, and the the expressed protein was purified *in vitro*. We believed that this research would provide the basis of downstream target genes and cis-acting elements for further studies of the transcription factor *CIMYB4* in the process of regulation of fir secondary cell wall development.

Keywords *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) HOOK; MYB transcript factor; Secondary cell wall; Lignin biosynthesis; Prokaryotic expression

研究背景

研究木材发育过程是了解木材的品质和产量形成机制的重要途径。木材发育过程是一个高度有序的过程, 在生物学上可以分为形成层细胞分裂, 细胞伸展增大, 次生壁加厚, 木质化及细胞程序化

死亡 5 个事件(Hertzberg et al., 2001)。这些生物学事件是在很多转录因子的交互调控下完成的。根据已有的研究报道, 主要有以下几类转录因子参与了木质部的发育: 生长素应答因子(ARF), 同源亮氨酸拉链 III (HD-ZIP III), MYB (MYB domain gene),

NAC (NAC domain gene)和 WOX (WUS homeobox gene) (Ohashi-Ito and Fukuda, 2010)。模式植物拟南芥中鉴定的转录因子 *AtMYB46* 被证明是次生细胞壁化学组分纤维素、木质素和木酮糖生物合成的共有调控基因(Zhong et al., 2007), 而 *AtMYB58/AtMYB63* 是木质素合成通路的直接调控转录因子(Zhou et al., 2009)。在林木的木材发育过程中也发现一些 MYB 类转录因子参与调控次生壁生物合成及木质素的生物合成, 如火炬松中的 *PtMYB1*、*PtMYB4* 和 *PtMYB8* (Patzlaff et al., 2003a; 2003b; Bomal et al., 2008), 桉树中的 *EgMYB2* (Goicoechea et al., 2005), 杨树中的 *PttMYB3*、*PttMYB20* (McCarthy et al., 2010)和 *PttMYB28* (Zhong and Ye, 2009)。它们可以与木质素生物合成基因的顺势调控元件 AC 序列相结合, 正向调节木质素单体的生物合成过程。火炬松 *PtMYB1*、*PtMYB4*、*PtMYB8* 和桉树 *EgMYB2* 基因都在植株次生壁发生加厚的发育木质部中表达, 这些基因的过量表达都可以激活转基因植株次生壁生物合成过程, 造成相关基因的异位表达和木质素的沉积(Patzlaff et al., 2003a; 2003b; Bomal et al., 2008; Goicoechea et al., 2005)。

杉木是我国南方最重要的造林树种, 以生长迅速、材质优良而著称, 尤其是心材棕红色的木材尤为珍贵。但是对杉木优质木材形成过程, 如次生壁加厚及木质素生物合成的分子机理研究未见报道。编号为“6421”的杉木优树无性系, 于 1964 年选自福建省洋口国有林场的一片约 30 年生的人工林。不同时期的遗传测定表明, 杉木无性系“6421”不同性状的一般配合力和特殊配合力, 均具有突出的表现。围绕着从分子水平上解析该无性系优良特性的形成机理这一目标, 在前期常规育种的基础上, 项目组用该无性系进行了转录组分析。本文首次报道, 在杉木发育木质部中克隆了一个 MYB 基因, 其序列及编码蛋白预测显示 *CtMYB4* 属于典型的植物 R2R3-MYB 转录因子, 推测其可能与杉木次生壁加厚和木质素合成的调控过程相关。此外, 本文通过构建原核表达载体 pE-30b-*CtMYB4*, 转化大肠杆菌菌株 Rosetta, SDS-PAGE 电泳观察不同浓度 IPTG (异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷)对重组蛋白表达的诱导效果, 利用 His-tag 亲和技术成功纯化了 *CtMYB4* 重组蛋白。*CtMYB4* 及其重组蛋白的成功表达, 为下一步研究杉木木材发育次生壁加厚过程的转录调控机理奠定了基础。

1 结果与分析

1.1 *CtMYB4* 全长 cDNA 的获得

通过本地 Blast 分析, 我们获得了一条 1 200 bp 左右的 contig, 与火炬松 *PtMYB4* 同源。分析发现其 5'序列不完整。经过 5'RACE PCR 扩增, 我们获得了一条约 600 bp 的特异条带(图 1A)。克隆后分析测序结果, 得到与以上 contig 部分重叠的 400 bp 长的 DNA 片段, 并含有起始密码子 ATG, 表明该片段为目的基因的 5'端序列。以杉木发育木质部 cDNA 第一链为模板, 采用特异引物 MYB4-F/MYB4-R 扩增目的基因全长, 回收特异条带(图 1B, 1 500 bp 左右)。测序结果表明, 该 cDNA 全长 1 453 bp, 编码 413 个氨基酸残基的多肽。在 NCBI 上 Blast 比对分析, 与火炬松等植物 R2R3-MYB 基因有较高的相似性, 命名为 *CtMYB4*。

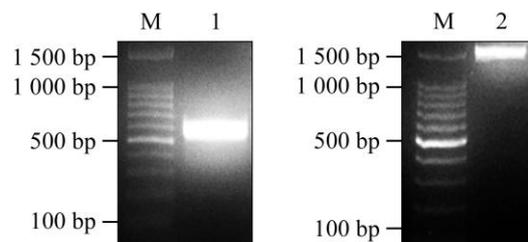


图 1 *CtMYB4* 基因的 PCR 产物

注: M: DNA marker (100 bp); 1: Smarter RACE 扩增 *CtMYB4* 的 5'端产物; 2: RT-PCR 扩增的 *CtMYB4* 全长产物

Figure 1 PCR products of *CtMYB4*

Note: M: DNA marker (100 bp); 1: 5'-RACE PCR products of *CtMYB4*; 2: Full length products of *CtMYB4*

1.2 *CtMYB4* 基因的生物信息学分析

CtMYB4 基因编码一条 392 个氨基酸残基的多肽, 理论分子量为 44.5 KDa, 等电点为 5.72。基于 BioEdit 软件的 Pairwise alignment (ClustalW BLOSUM62)功能分析表明, *CtMYB4* 蛋白与 *PtMYB4* 蛋白序列的一致性为 40.5%, 相似性为 47.66%。但在 MYB 蛋白的 DNA 结合结构域(DNA Binding Domain, DBD)序列上, 它们的一致性和相似性均为 88.03%, *CtMYB4* 与被子植物拟南芥 *MYB46* 的序列相似性也高达 79.66%。利用 ClustalX 比对分析 *CtMYB4* 与火炬松 *PtMYB1*、*PtMYB4*, 白云杉 *PgMYB1*、*PgMYB2*、*PgMYB4* 和拟南芥 *AtMYB46*、*AtMYB58*、*AtMYB63* 蛋白发现, 它们在蛋白 N 端的 MYB-DBD 序列上高度保守, 均具有典型的【W-(X19)-W(X19)-W...F/I-(X18)-W-(X19)-W】

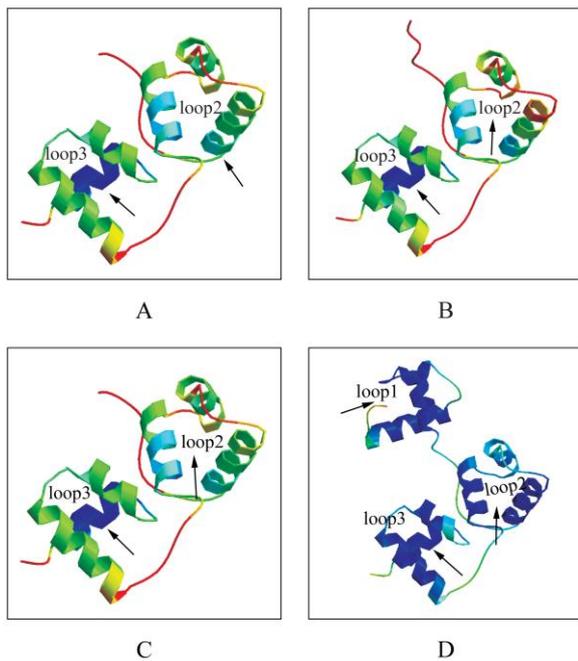


图 3 *C/ MYB4* 蛋白的三维空间结构预测及与 *AtMYB46* 和 *PtMYB46* 蛋白构象比较

注: A, B, C: 分别代表 *C/ MYB4*, *AtMYB46* 和 *PtMYB4* 蛋白 R2R3 结构域预测的空间结构; D: 是已知空间结构蛋白 (1H8CC) 的 R1R2R3 结构域, 为同源建模的模板空间结构

Figure 3 Predicted three-D structure of *C/ MYB4* protein and compared with *AtMYB46* and *PtMYB4* proteins

Note: A, B, C: Predicted three-D structures of R2R3-domain in *C/ MYB4*, *AtMYB46* and *PtMYB4* proteins; D: Three-D structure of 1H8CC as the template

利用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法, 构建了基于蛋白氨基酸序列的系统进化树, 如图 4。所研究的蛋白序列一部分为裸子植物火炬松和白云杉的 R2R3-MYB 基因, 一部分为桉树和拟南芥中与次生壁和木质素合成转录调控相关的 MYB 基因。结果显示, *C/ MYB4* 与白云杉 *PgMYB4*, 火炬松 *PtMYB4*, 桉树 *EgMYB2* 和拟南芥 *AtMYB46* 聚为一个亚组, 拟南芥 *AtMYB46* 已被证实是维管发育决定基因 *SND1* (Secondary cell wall related NAC Domain1) 的直接下游靶基因(Zhong et al., 2007), 负责次生壁合成过程的转录调控。其他裸子植物 MYB 基因中, *PgMYB2* 与 *PtMYB2*、*PtMYB3* 与 *PtMYB7*、*PtMYB1*、*PtMYB8* 和 *PgMYB1* 各自聚为一个小类, 说明 *C/ MYB4* 与白云杉 *PgMYB4*, 火炬松 *PtMYB4* 的亲缘关系最近。此外, 拟南芥 *AtMYB58* 和 *AtMYB63* 单独聚为一类, 而桉树 *EgMYB2* 和火炬松 *PtMYB14* 聚为一类。

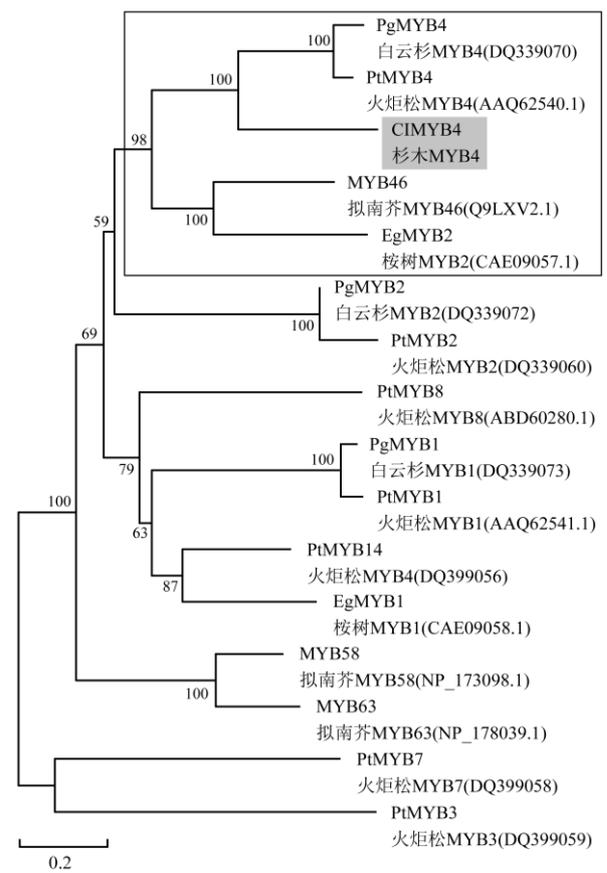


图 4 基于氨基酸序列构建的 *C/ MYB4* 系统发育树

注: 方框内为参与次生壁合成调控的 R2R3-MYB 基因蛋白亚族

Figure 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of *C/ MYB4*

Note: The box indicated the R2R3-MYB protein subgroup related to secondary cell wall biosynthesis

1.3 杉木 MYB 基因的原核表达条件优化

将构建正确的原核表达载体质粒 pET-30b-*C/ MYB4* 转化大肠杆菌 Rosetta 菌株。挑选阳性克隆子在 37℃ 条件下采用 IPTG 浓度 0.01 mmol/L, 0.1 mmol/L, 1 mmol/L 诱导后, SDS-PAGE 电泳显示目的蛋白 *C/ MYB4* 均可以表达, 但是 *C/ MYB4* 蛋白(70 kD, 如图 5)的大小与预测蛋白分子量大小(54 kD)不太一致。不同的 IPTG 对重组蛋白表达的诱导影响不明显, 0.1 mmol/L, 1 mmol/L IPTG 诱导的效果较好, 因此, 我们选择 0.1 mmol/L IPTG 作为大量诱导重组蛋白表达的使用浓度。

1.4 杉木 MYB 基因原核表达蛋白的纯化

分析发现 *C/ MYB4* 重组蛋白不是以可溶性蛋白形式存在, 而是主要存在于大肠杆菌的包涵体

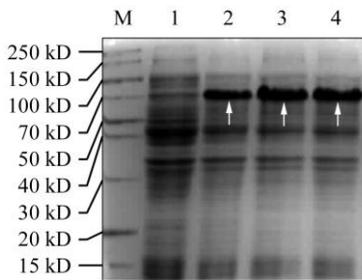


图 5 pET-30b-*C/MYB4* (Rosetta)诱导条件优化电泳图
注: M: Protein Ladder; 1~4: 0, 0.01, 0.1, 1 mmol/L IPTG 分别诱导的 pET-30b-*C/MYB4* (Rosetta); 白色箭头标出诱导表达 *C/MYB4* 重组蛋白的位置

Figure 5 SDS-PAGE analysis of the fusion protein *C/MYB4* expression in different IPTG concentration

Note: M: Protein Ladder; 1~4: pET-30b-*C/MYB4* (Rosetta) with 0, 0.01, 0.1, 1 mmol/L IPTG induction; *C/MYB4* recombinant protein band showed by white arrows

中, 包涵体蛋白不溶于水, 从包涵体中纯化重组蛋白, 需要先将沉淀蛋白溶解。重组蛋白 *C/MYB4* 的包涵体沉淀分别用 5%的 Triton 和不同浓度的尿素溶液洗涤, 洗涤液经 SDS-PAGE 电泳检测溶解效果。结果如图 6 所示, 0.5%的 Triton 不能溶解包涵体蛋白, 包涵体蛋白在 4 mol/L 或 8 mol/L 的尿素溶液中溶解度较高, 可以得到较多的 *C/MYB4* 重组蛋白, 我们选用 8 mol/L 尿素溶液为 Rosetta-*C/MYB4* 菌株包涵体的最佳溶解洗涤溶液。

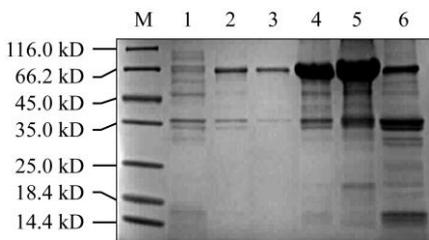


图 6 *C/MYB4* 蛋白包涵体尿素洗涤 SDS-PAGE 电泳图
注: M: Protein Marker; 1~5: 分别为 0.5% Triton, 1 mol/L, 2 mol/L, 4 mol/L, 8 mol/L 尿素洗涤液, 6: 未溶的沉淀

Figure 6 SDS PAGE assay of the inclusion bodies of *C/MYB4* protein washed by different urea concentration

Note: M: Protein Marker; 1~5: *C/MYB4* protein washed by 0.5%Triton, 1 mol/L, 2 mol/L, 4 mol/L, 8 mol/L urea; 6: Insoluble protein Precipitation

使用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒纯化经过 8 mol/L 尿素溶液溶解的 *C/MYB4* 重组蛋白, 该镍柱纯化系统对 6×His-tag 蛋白具有显著特异吸

附能力, 能够高效一步纯化带有 6 个组氨酸亲和标签的蛋白。本实验所得重组蛋白在两端都标记有 6×His-tag, 所以可以直接利用此方法纯化。将 8 mol/L 尿素洗涤液过 Ni 柱吸附 *C/MYB4* 重组蛋白, 再用不同浓度的咪唑缓冲液洗脱纯化, SDS-PAGE 电泳检测回收液。电泳结果显示(如图 7), 咪唑缓冲液浓度越高, 得到的重组蛋白 *C/MYB4* 浓度和纯度越好, 其中 500 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱纯化的重组蛋白的纯度最高。

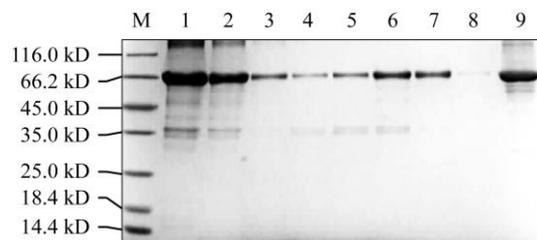


图 7 *C/MYB4* 纯化过程 SDS-PAGE 电泳图
注: M: Protein Marker; 1: 流穿液; 2~7: 分别为 5, 20, 50, 100, 250, 500 mmol/L 咪唑洗脱液(第一管); 8: 500 mmol/L (第三管)咪唑洗脱液; 9: 1 mg/ml BSA 标准品

Figure 7 Purified Product of *C/MYB4* detected by SDS-PAGE assay

Note: M: Protein Marker; 1: Flowed liquid; 2~7: Purified *C/MYB4* protein in 5, 20, 50, 100, 250, 500mmol/L imidazole elution (the first tube); 8: Purified *C/MYB4* protein in 500 mmol/L imidazole elution (the third tube); 9: 1 mg/ml BSA standard substance

2 讨论

MYB 类转录因子家族是一类含有一个或多个 MYB 结构域(MYB-repeat)的转录因子(Bedon et al., 2007), 其高度保守的 DNA 结合结构域基序为我们分离克隆和鉴别 MYB 家族成员提供理论基础。本实验克隆的杉木 *C/MYB4* 蛋白具有两个保守的 MYB 结构域, 序列及蛋白结构分析发现它们分别属于典型的 R2 和 R3 结构域, 可以独立形成螺旋-转角-螺旋二级结构, 构成两个与 DNA 结合的三维空间构象。同时在氨基酸水平上, 这段保守序列中每隔约 18 个氨基酸残基便规则的出现色氨酸残基(W), 它们构成 MYB 蛋白的疏水中心。比较杉木 *C/MYB4* 蛋白与松科植物和被子植物 R2R3-MYB 蛋白的 DBD 结构域发现, 它们在氨基酸序列上保守性均为 80%左右, 而且在核心氨基酸(如色氨酸)的数量和位置上也高度保守, 说明 MYB 基因的

DNA 结构域在物种之间是高度保守的。

虽然 R2R3-MYB 在 N 端的 DNA 结合结构域的氨基酸基序高度保守, 但是与 MYB 基因的转录激活作用相关的 C 端氨基酸基序的变异率很高, 保守性极低(Stracke et al., 2001; Wilkins et al., 2009), 这些特点与 MYB 基因家族在真核生物发挥着重要且广泛的调节作用相关(Bedon et al., 2007)。植物中的 R2R3-MYB 参与了植物初生和次生代谢过程, 细胞形态建成, 发育过程及各种应激反应(Stracke et al., 2001)。所以, 分析杉木 *CtMYB4* 蛋白与其它蛋白的进化关系有助于我们了解其生物学功能。根据编码蛋白全长序列的聚类分析, 我们发现 *CtMYB4* 蛋白与其它参与植物次生壁加厚过程转录调控的 R2R3-MYB 蛋白聚为一个亚族。2003 年, Patzlaff 等首次发现火炬松 *PtMYB4* 的异源表达会导致木质素在转基因烟草植株的异位沉积, 证明 *PtMYB4* 基因在火炬松木材发育过程发挥重要作用。拟南芥 *AtMYB46* 被证实是其次生壁加厚过程的重要调控基因, 不但木质素会在过量表达植株中发生异位沉积, 同时导致某些细胞发生不正常的次生壁加厚现象(Zhong et al., 2007)。*AtMYB46* 和 *PtMYB4* 在桉树中的同源基因 *EgMYB2* 也具有相似的生物学功能(Goicoechea et al., 2005)。本研究发现 *CtMYB4* 与以上基因的系统发生关系最近, 杉木中的 *CtMYB4* 是与他们一类的同源基因。因此笔者认为 *CtMYB4* 基因同样可能在杉木木材发育过程中发挥重要的调控作用。

以往的研究还发现, 一些次生壁合成基因和木质素合成功能酶基因的顺式调控元件 AC 序列(AC I: ACCTACC)是其转录调控的分子基础(Hatton et al., 1995; Lacombe et al., 2000; Zhong et al., 2010)。参与次生壁合成调控的 *AtMYB46*, *PtMYB4* 和 *EgMYB2* 蛋白, 以及木质素合成调控转录因子 *AtMYB58/AtMYB63*, *PtMYB1* 等蛋白均可以在体外与 AC 序列结合。本实验在原核表达菌株 Rosetta 中系统优化表达了杉木 *CtMYB4* 蛋白, 进一步根据重组蛋白的 His 标签纯化获得了 *CtMYB4* 重组蛋白。一方面, 可以通过 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay, 电泳迁移率实验)分析 *CtMYB4* 重组蛋白是否可以通过与 AC 序列相互作用来调控杉木木质素合成基因的转录; 另一方面可以结合其它分子生物学方法如染色质免疫共沉淀等方法(O'Neill et al., 2006)研究 *CtMYB4* 基因如何调控木质素之外的

其它次生壁组分生物合成的分子机理。迄今为止, 木质素合成过程的功能酶遗传改良已在多种林木品种中开展了研究(章霄云等, 2006; 李桢等, 2009), 但是在转录调控水平上改良木质素和次生壁合成过程的研究没有报道, 本研究克隆的 *CtMYB4* 基因为杉木在转录调控水平遗传改良木材品质奠定了理论基础。

3 材料与方法

3.1 材料

3.1.1 实验材料及 RNA 提取

由福建洋口林场引进的杉木 6421 无性系的嫁接植株, 于 2008 年春定植于南京林业大学苗圃。实验剪取两年生枝条的茎段, 液氮速冻用于 RNA 提取。CTAB 法提取总 RNA, 具体方法参考 Chang 等(1993), 杉木发育木质部转录组数据库由本项目组保存。

3.1.2 菌株及质粒

大肠杆菌菌株(*E. coli*) JM109 由本实验室保存; Rosetta 购自康为世纪生物公司; 克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司; 质粒 pET-30b (+)由中国林科院生物所馈赠。

3.1.3 工具酶及试剂

限制性内切酶 Hind III, BamH I、Taq DNA 聚合酶, 高保真酶, T4 DNA 连接酶、100 bp 和 DL2000 DNA ladder Marker 购买于 TaKaRa 公司; RACE 实验使用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司); DNA 纯化回收试剂盒和质粒 DNA 提取试剂盒购于爱思进生物技术有限公司; Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒(Cat. No. CW0893, 康为世纪); 其它生化试剂均为国产分析纯。

3.2 方法

3.2.1 *CtMYB4* 全长 cDNA 的克隆

根据 *AtMYB4* 蛋白序列在杉木发育木质部转录组数据库中(本项目组保存)做本地 Blast 分析, 查找相似性最高的 contigs。根据得分最高的序列设计引物, 以杉木“6421”无性系两年生茎段总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板做 RACE 反应, 获取 5' 未知序列。经拼接后重新设计引物获得 *CtMYB4* 基因的全长 cDNA, 克隆至载体 pMD19-T, 转化大肠杆菌 JM109 感受态, 挑选阳性克隆子测序鉴定。

引物序列: MYB4-5R: 5'-GAACGAGCAGGC-

GTGGCAGT-3' (RACE); MYB4-F: 5'-GCCACCC-TCTTGTGAGGAAACG-3'; MYB4-R: 5'-AATAA-CTTGTCACGCAGAAAACTA-3'

3.2.2 *C/MYB4* 预测蛋白的生物信息学分析

利用 DNAMAN 分析 *C/MYB4* 基因的 cDNA 序列, 分析完全开放阅读框。利用 ClustalX 进行基于氨基酸序列的多重序列比对, BioEdit 软件分析与其它物种 MYB 蛋白在氨基酸序列上的一致性和相似性。MEME 在线分析 *C/MYB4* 的 MYB 结构域保守氨基酸特点。SWISS-MODEL 在线构建 *C/MYB4* 的三级空间结构(Arnold et al., 2006), 并与 *PtMYB4* 和 *AtMYB46* 蛋白的进空间结构分析比较。MEGA 5.0 构建基于蛋白序列的基因进化树。

3.2.3 *C/MYB4* 蛋白原核表达载体的构建

根据原核表达载体 pET-30b (+) 的 MCS 位点及翻译起始位点特征, 设计带有限制性内切酶 Hind III, BamH I 酶切位点的引物, 扩增 *C/MYB4* 的蛋白编码序列, 不包含内含子以保证与 His6-tag 的正常衔接而获得 His 标签的重组蛋白。经双酶切连接反应后转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆子测序鉴定重组质粒的正确性。

引物序列: MYB4-YF: 5'-CGGGATCCATGAGCTCCACAGATCAACC-3'; MYB4-YR: 5'-CCC-AAGCTTGGTGAATAACATTTGATCGA-3'

3.2.4 *C/MYB4* 重组蛋白的原核表达与优化

提取构建正确的 pET-30b-*C/MYB4* 质粒, 转化原核表达宿主菌 Rosetta。将鉴定后的表达菌株接种于 LB 培养基(含有 100 ug/ml Km)中, 37°C 振荡培养、过夜活化。次日, 按 1% 的比例转接于新鲜 LB 培养基(含有 100 ug/ml Km)中, 37°C、250 rpm 振荡培养至 OD600 约为 0.6 h, 加入终浓度分别为 0 mmol/L、0.01 mmol/L、0.1 mmol/L 和 1 mmol/L 的 IPTG, 37°C、250 rpm 诱导 4 h。8 000 rpm 离心收集 1 ml 菌液, 弃上清, 加入 40 u1 1×PBS 振荡悬浮菌体, 加入 10 u1 的 5×SDS 上样缓冲液, 混匀后 100°C 煮沸 10 min, 12 000 rpm 离心 5 min, 取其上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测(李晓薇等, 2011)。

3.2.5 *C/MYB4* 重组蛋白的纯化

将检测阳性表达的菌株 Rosetta (pET-30b-*C/MYB4*) 接种于 1.2 L 含有 100 ug/ml 卡那霉素的新鲜 LB 培养基中, 37°C、250 rpm 振荡培养; 至

OD600 约为 0.6 h, 加入一定量的 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 37°C、250 rpm 诱导培养 4 h。离心收集诱导后菌体, 用 100 ml 1×PBS 重悬, 超声破碎, 分别收集上清与沉淀, 用 0.5% Triton 和 1 mol/L、2 mol/L、4 mol/L、8 mol/L 尿素(pH8.0)洗涤包涵体沉淀, SDS-PAGE 电泳分别检测上清与沉淀中是否包含 *C/MYB4* 重组蛋白。

重组蛋白的纯化过程: 根据优化的条件大量表达 *C/MYB4* 重组蛋白, 然后根据以上电泳检测的结果将最优的尿素洗涤液, 过 Ni 柱进行 *C/MYB4* 重组蛋白纯化。结合完毕后, 分别用 5, 20, 50, 100, 250, 500 mmol/L 咪唑进行洗脱, 收集洗脱液, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 详细步骤按 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒使用说明(康为世纪)。

作者贡献

吕运舟, 郑佳是本研究的实验设计和实验研究的执行人并完成数据分析, 论文初稿的写作; 陈金慧参与实验设计, 试验结果分析; 施季森是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究是在国家自然科学基金重点项目(30930077)资助下完成; 原核表达载体 pET-30b (+) 由中国林科院生物所馈赠, 在此一并表示感谢。

参考文献

- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T., 2006, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling, *Bioinformatics*, 22(2): 195-201 <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti770> PMID:16301204
- Bedon F., Grima-Pettenati J., and Mackay J., 2007, Conifer R2R3-MYB transcription factors: sequence analyses and gene expression in wood-forming tissues of white spruce (*Picea glauca*), *BMC plant biol.*, 7: 17 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-7-17> PMID:17397551 PMCid:1851958
- Bomal C., Bedon F., Caron S., Mansfield S.D., Levasseur C., Cooke E.K.J., Blais S., Tremblay L., Morency M.-J., Pavy N., Grima-Pettenati J., Séguin A., and MacKay J., 2008, Involvement of *Pinus taeda* MYB1 and MYB8 in phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biogenesis: a comparative in planta analysis, *J. Exp. Bot.*, 59(14): 925-939 <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern234>

- PMid:18805909 PMCID:2576632
- Chang S., Puryear J., and Cairney J., 1993, A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 11(2): 113-116 <http://dx.doi.org/10.1007/BF02670468>
- Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., and Lepiniec L., 2010, MYB transcription factors in *Arabidopsis*, *Trends Plant Sci.*, 15(10): 573-581 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005> PMid:20674465
- Goicoechea M., Lacombe E., Legay S., Mihaljevic S., Rech P., Jauneau A., Lapierre C., Pollet B., Verhaegen D., Chaubet-Gigot N., and Grima-Pettenati J., 2005, EgMYB2, a new transcriptional activator from *Eucalyptus* xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis, *Plant J.*, 43(3): 553-567 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02480.x> PMid:16098109
- Hatton D, Sablowski R., Yung M-H., Simth C., Schuch W., and Bevan M., 1995, Two classes of cis sequences contribute to tissue-specific expression of a *PAL2* promoter in transgenic tobacco, *Plant J.*, 7(8): 859-876 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1995.07060859.x> PMid:7599647
- Hertzberg M., Aspeborg H., Schrader J., Andersson A., Erlandsson R., Blomqvist K., Bhalerao R., Uhlén M., Teeri T.T., Lundeberg J., Sundberg B., Nilsson P., and Sandberg G., 2001, A transcriptional roadmap to wood formation, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 98(25): 14732-14737 <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.261293398> PMid:11724959 PMCID:64750
- Lacombe E., Doorselaere J.V., Boerjan W., Boudet A.M., and Grima-Pettenati J., 2000, Characterization of cis-elements required for vascular expression of the *Cinnamoyl CoA Reductase* gene and for protein-DNA complex formation, *Plant J.*, 23(5): 663-760 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2000.00838.x> PMid:10972892
- Li X.W., Su L.T., Zhao X., Zhai Y., Zhang H.J., Zhang Q.L., Li J.W., and Wang Q.Y., 2011, High expression of two soybean MYB transcription factor in *Escherichia coli*, *Shengwu Jishu Tongbao* (Biotechnology Bulletin), 8: 99-114 (李晓薇, 苏连泰, 赵旭, 翟莹, 张海军, 张庆林, 李景文, 王庆钰, 2011, 两个大豆 MYB 转录因子在原核细胞中的高效表达, *生物技术通报*, 8: 99-114)
- Li Z., Wang H.Z., Li R.F., and Wei J.H., 2009, Lignin biosynthesis and manipulation in plants and utilization of biomass energy, *Zhiwu Xubao* (Chinese Bulletin of Botany), 44(3): 262-272 (李桢, 王宏芝, 李瑞芬, 魏建华, 2009, 植物木质素合成调控与生物质能源利用, *植物学报*, 44(3): 262-272)
- McCarthy R.L., Zhong R., Fowler S., Lyskowski D., Piyasena H., Carleton K., Spicer C., and Ye Z.H., 2010, The poplar MYB transcription factors, *PtMYB3* and *PtMYB20*, are involved in the regulation of secondary wall biosynthesis, *Plant cell phsiol.*, 51(6): 1084-1089
- Ohashi-Ito K., and Fukuda H., 2010, Transcriptional regulation of vascular cell fates, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13(6): 1-7 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.011> PMid:20869293
- O'Neill L.P., VerMilyea M.D., and Turner B.M., 2006, Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations, *Nature genetics*, 38(7): 835-841 <http://dx.doi.org/10.1038/ng1820> PMid:16767102
- Patzlaff A., Newman L.J., Dubos C., Whetten R.W., Newman L.J., McInnis S., Bevan M.W., Sederoff R.R., and Campbell M.M., 2003a, Characterization of *PtMYB1*, an R2R3-MYB from pine xylem, *Plant Mol. Biol.*, 53(4): 597-608 <http://dx.doi.org/10.1023/B:PLAN.0000019066.07933.d6> PMid:15010621
- Patzlaff A., McInnis S., Courtenay A., Surman C., Newman L.J., Smith C., Bevan M.W., Mansfield S., Whetten R.W., Sederoff R.R., and Campbell M.M., 2003b, Characterization of a pine MYB that regulates lignification, *Plant J.*, 36(6): 743-754 <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3113X.2003.01916.x> PMid:14675440
- Stracke R., Mand W., and Weisshaar B., 2001, The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4(5): 447-456 [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00199-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00199-0)
- Wilkins O., Nahal H., Foong J., Provart N.J., and Campbell M.M., 2009, Expansion and diversification of the *populus* R2R3-MYB family of transcription factors, *Plant Physiol.*, 149(2): 981-993 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.132795> PMid:19091872 PMCID:2633813
- Zhang X.Y., Guo A.P., He L.K., and Kong H., 2006, Advances in study of lignin biosynthesis and genetic engineering manipulation, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 4(3): 431-437 (章霄云, 郭安平, 贺立卡, 孔华, 2006, 木质素生物合成及其基因调控的研究进展, *分子植物育种*, 4(3): 431-437)

- Zhong R., Richardson E.A., and Ye Z.H., 2007, The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 19(9): 2776-2792 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.053678> PMID:17890373 PMCID:2048704
- Zhong R., and Ye Z.H., 2009, Transcriptional regulation of lignin biosynthesis, *Plant Signal. Behav.*, 4(11): 1028-1034 <http://dx.doi.org/10.4161/psb.4.11.9875>
- Zhong R., Lee C., and Ye Z.H., 2010, Evolutionary conservation of the transcriptional network regulating secondary cell wall biosynthesis, *Trends Plant Sci.*, 15(11): 625-632 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.007> PMID:20833576
- Zhou J., Lee C, Zhong R., and Ye Z.H., 2009, MYB58 and MYB63 are transcriptional activators of the lignin biosynthetic pathway during secondary cell wall formation in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 21(1): 248-266 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.108.063321> PMID:19122102 PMCID:2648072