园 艺 学 报 2006, 33 (4): 833～835
Acta Horticulturae Sinica

苹果属小金海棠转录因子 MxMYB1基因的克隆及其原核表达

曹冬梅[1,2] 许雪峰[1] 韩振海[1*]
([1]中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094; [2]山西省农业科学院园艺研究所, 山西太原 030031)

摘 要: *MxMYB1*是苹果属小金海棠 MYB类转录因子。MxMYB1含 1个重复序列及 MYB蛋白特有的氨基酸组成。酶切、PCR扩增及测序分析表明构建的原核表达载体结构正确, 未出现碱基突变及移码现象。1 mmol/L IPTG诱导 2 h后, 在预期的蛋白分子量 38 kD处出现 1条表达加强的蛋白条带, 而未经诱导的转化子没有此蛋白条带。为进一步目的蛋白的纯化和鉴定提供试验基础。

关键词: 转录因子 *MxMYB1*; 原核表达; pET30a-MxMYB1
中图分类号: S 661 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-353X (2006) 04-0833-03

Identification and Prokaryotic Expression of Transcription Factor MxMYB1 Gene in *Malus xiaojinensis*

Cao Dongmei[1,2], Xu Xuefeng[1], Han Zhenhai[1*]
([1] *Institute of Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing* 100094, *China*; [2] *Institute of Horticulture, Shanxi Agricultural Academy, Taiyuan, Shanxi* 030031, *China*)

Abstract: *MxMYB1* is a MYB transcription factor from *Malus xiaojinensis*. MxMYB1 contains a highly conserved DNA binding domain and amino acids existed in MYB proteins particularly. Restriction endonuclease analysis, PCR amplifying and sequencing confirmed that construction was correct and had no base mutant and drift. SDS-PAGE of pET-MxMYB1 proteins induced by 1 mmol/L IPTG showed that there was a strengthened protein band in expectant 38 kD protein Marker, but SDS-PAGE of pET-MxMYB1 proteins uninduced by IPTG had not this band. These results will more provide the foundation for purifying and identifying objective protein.

Key words: Transcription factor *MxMYB1*; Prokaryotic expression; pET30a-MxMYB1

1 目的、材料与方法

作者已经成功地克隆到了 1个缺铁诱导加强表达的苹果属小金海棠转录因子 *MxMYB1*, 但目前对该基因的结构和功能还不清楚, 为此, 本试验对其结构进行了分析, 且在体外进行了融合蛋白的表达, 这就为进一步利用融合蛋白为抗原制备抗血清提供了条件, 进而为研究转录因子 *MxMYB1*的生理功能及组织定位提供有用的蛋白探针。本试验是在 pTripleEX-MxMYB1的阅读框两端设计了两个特异引物, 利用 PCR技术扩增了 906 bp片段, 将其构入 pET-30a (+) 原核表达载体, 通过 IPTG诱导了融合蛋白表达。所用的两个引物为 5'引物: 5'-ATAGAATTCATGTCGTCCGGCAC-3'; 3'引物: 5'-CCGTCGACTCAAGCGACACTG-3'。DNA序列由人工测序或自动测序仪测定 (华大中生和大连宝生物), ORF、MYB结构域等分析通过 DNAMAN、SMART和 PROSITE等软件完成。蛋白同源序列比较在 NCBI BLAST和 Genedoc程序中进行。原核表达载体的构建见图 3, 获得的 pET30a - MxMYB1重组质粒进行 PCR、酶切鉴定及 DNA测序分析。酶切、连接、转化、碱裂解法提纯质粒 DNA, 操作见参

收稿日期: 2005 - 06 - 25; 修回日期: 2005 - 09 - 01
基金项目: 北京市重点实验室"果树逆境生理与分子生物学实验室"资助项目; 教育部优秀教师教科奖励基金资助项目
* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: rshan@cau.edu.cn)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

考文献[1]。融合蛋白的诱导表达参考 Hames等的方法[2]。

2 结果分析与讨论

2.1 MxMYB1蛋白的结构分析及同源性比较

在以前的试验中利用探针杂交的方法，从小金海棠缺铁 cDNA文库中筛选到 1个 *MxMYB1*基因（GenBank登录号：AY196776）。对其编码蛋白的结构和氨基酸组成特点进行了分析，结果如下：MxMYB1蛋白仅含有 1个 1R重复序列，并含有对维持 DNA结合域的疏水核起主要作用的色氨酸残基(图 1)。MxMYB1的另一个特点是在其 C-端富含脯氨酸，这样的结构基序在其它的调控蛋白中也发现[3,4]，可能具有转录激活功能[5]。此外，在其 C端还富含丝氨酸，N端和 C端的丝氨酸区可能是磷酸化位点，表明 MxMYB1的细胞内活性受到磷酸化调节。

		* *
小金海棠 *M. xiaojinensis*	MxMYB1	KRGVPWTEEEHKLFLLGLQKAGKGDWRGISRNFVKTRTPTQVASHAQKYYLRR
拟南芥 *Arabidopsis*	AtMYB	KRGVPWTENEHKRFLIGLQKVGKGDWKGISRNFVKSRTPTQVASHAQKYFLRR
马铃薯 Potato	StMYB1	KKGVPWTEEEHRMFLLGLGKLGKGDWRGIARNYVISRTPTQVASHAQKYFIRQ
水稻 Rice	OsMYBS1	RKGIPWTEEEHRLFLLGLDKFGKGDWRSISRNFVISRTPTQVASHAQKYFIRQ
拟南芥 *Arabidopsis*	AtMYBCCA1	KQRERWTEEEHNRFIEALRLYGR. AWQKIEEH. VATKTAVQIRSHAQKFF. SK
芹菜 Parsley	PcMYB1	NHKQKWTAEEEEALKAGVKKHGMGKWKTILVDPDFATALTHRSNIDLKDKWRN
拟南芥 *Arabidopsis*	AtMYB2	VKQRNFSKDEDDLILKLHALLG. NRWSLIAGRLP. GRTDNEVRIHWETYLKRK

图 1 各种不同来源 MYB蛋白的 1R重复序列的同源性分析

*为保守的色氨酸残基。

Fig. 1 Comparison of the amino acid sequence with 1R repeat of DNA binding domain from different MYB-related protein

The regularly spaced Trp residues are labeled with asterisks

2.2 小金海棠转录因子 MxMYB1表达载体的构建及鉴定

利用特异引物从 pTripleEX-MxMYB1中扩增出约 900 bp左右的片段，与试验设计相符 (图 2)。为了方便质粒的构建，PCR扩增时在引物两端引入了酶切位点 *Eco*R 和 *Sal* I，同时去掉了基因3 和

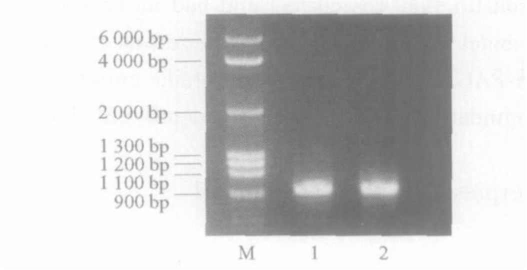

图 2 PCR扩增产物的电泳鉴定

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product

M: Marker; Lane 1, 2: PCR product

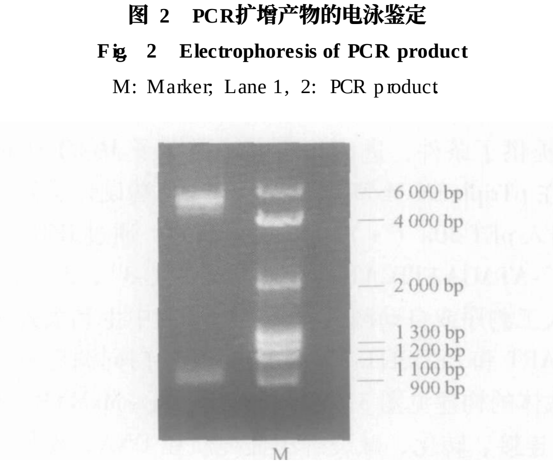

图 4 重组表达质粒 pET30a-MxMYB1的酶切鉴定图

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pET30a-MxMYB1 by restriction digestion

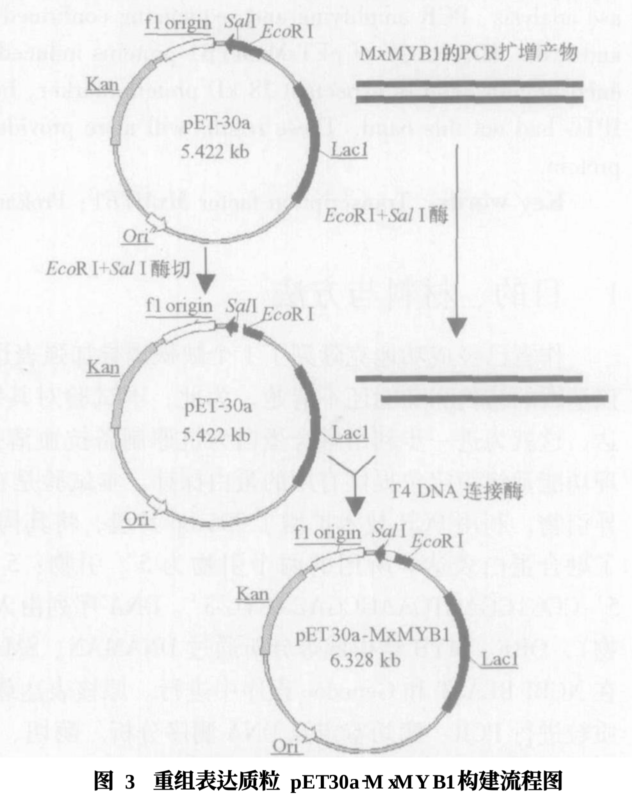

图 3 重组表达质粒 pET30a-MxMYB1构建流程图

Fig. 3 Construction of recombinant expression plasmid pET30a-MxMYB1

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5’端的非翻译区。基因的 5 端直接与原核表达载体进行融合表达，因此基因 5 端与启动子之间的距离不会对表达造成直接影响。

PCR产物回收后，经 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，以粘连的方式构入 pET-30a（+）的 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ位点，得到重组表达质粒 pET-MxMYB1（图 3）。

对重组 pET-MxMYB1质粒的酶切分析表明（图 4），用 *Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，可切出 900 bp左右片段，表明扩增的 *MxMYB1*片段已插入载体质粒中。在此基础上，又进一步以重组表达质粒 pET-MxMYB1为模板，采用 PCR方法扩增出 900 bp左右扩增片段（图 5），进一步证明 pET-MxMYB1重组质粒构建正确。

为了进一步证明重组质粒构建正确，在酶切及 PCR鉴定的基础上，对重组表达质粒 pET30a-MxMYB1进行了序列测定，序列测定结果表明，构建质粒的序列完全正确，未出现碱基突变及移码现象。

2.3　MxMYB1蛋白的原核表达

将重组质粒 pET30a-MxMYB1转化大肠杆菌 BL21，经 IPTG诱导后提取大肠杆菌总蛋白进行 SDS-PAGE分析。结果（图 6）显示，插入有外源片段的重组质粒 pET30a-MxMYB1经 IPTG诱导后，在预计的蛋白分子量 38 kD左右有一条染色较对照（泳道 3～5）深的蛋白条带。表明重组质粒 pET-MxMYB1在大肠杆菌 BL21中诱导表达了 MxMYB1蛋白。

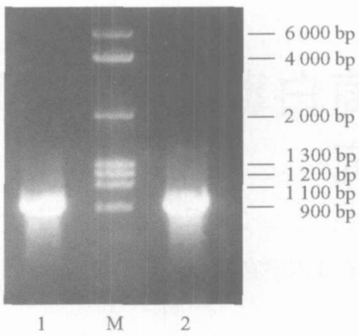

图 5　重组表达质粒 pET30a-MxMYB1的 PCR鉴定

Fig. 5　Identification of recombinant plasmid pET30a-MxMYB1 by PCR

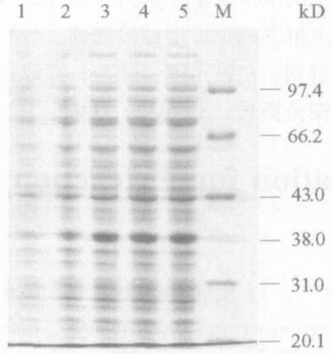

图 6　重组表达质粒 pET30a-MxMYB1表达产物的 SDS-PAGE分析

Fig. 6　SDS-PAGE analysis for the expression product of pET30a-MxMYB1

Lane 1: Total proteins of induced *E.coli* transformed with pET-30a（+）;
Lane 2: Total proteins of uninduced *E.coli* transformed with pET30a-MxMYB1;
Lane 3-5: Total proteins of induced *E.coli* transformed with pET30a-MxMYB1

到目前为止，外源基因的原核表达仍然是大量获得目的蛋白的一条最有效途径[6]，特别是对于那些在组织或细胞中含量少且不易获得的蛋白，原核表达则是一条最佳途径。为了在体外对小金海棠转录因子 *MxMYB1*的性质和功能进行研究，首先必须获得一定数量的、纯度比较高的活性蛋白质，因此本试验构建了原核表达载体。试验构建的 pET30a-MxMYB1结构正确，将构建好的重组质粒转化到 BL21表达菌后得到了正确表达（图 6）。在试验过程中，我们还发现细菌培养的条件对大肠杆菌中 His6-MxMYB1融合蛋白的表达有一定的影响，同样的培养和诱导条件，不同批的菌种，最后得到的融合蛋白的纯度是不同的。

参考文献：

1　Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16～69

2　Hames B D, Rickwood D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. 2nd ed. New York: IRL Press Limited, 1990. 152～171

3　Mermod N, O’Neill E A, Kelly T J, Tjian R. The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. Cell, 1989, 58: 741～753

4　Williams T, Tjian R. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. Genes Dev., 1991, 5: 670～682

5　Ptashne M. How eukaryotic transcriptional activators work. Nature, 1988, 335: 683～689

6　Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10: 411～421

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net