

• 药材与资源 •

红花转录因子 CtMYB1 基因的克隆及原核表达

官丽莉^{1,2}, 张雪^{1,2#}, 韩怡来², 朱栋², 杨晶^{1,2}, 杜林娜^{1,2}, 王法微^{1,2}, 李海燕^{1,2}, 李校堃^{1*}

1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 从红花 *Carthamus tinctorius* 花瓣中克隆转录因子基因 CtMYB1, 并进行序列分析和原核表达载体的构建。方法 根据红花转录组测序结果中得到的高表达的 Unigene123933 序列, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术从红花花瓣中扩增得到 CtMYB1 基因的全长 cDNA 序列, 并进行生物信息学分析; 以 CtMYB1 基因的全长 cDNA 序列为模板, PCR 扩增得到 CtMYB1 基因的开放阅读框 (ORF) 序列, 构建原核表达载体 pEASY-E1-CtMYB1。转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行诱导表达。结果 成功从红花中克隆 1 个 MYB 基因, 命名为 CtMYB1, GenBank 登录号为 KJ524853。CtMYB1 基因全长 893 bp, ORF 为 750 bp, 编码 249 个氨基酸。同时, 成功构建了该基因的原核表达载体。SDS-PAGE 结果显示该蛋白的大小约 30 000, 与预测的蛋白相对分子质量一致。结论 成功克隆了 CtMYB1 基因, 构建了原核表达载体, 初步证明该基因在大肠杆菌中成功表达。

关键词: 红花; MYB; CtMYB1; 原核表达; 红花黄色素; RT-PCR; RACE

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)17-2603-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.17.017

Cloning and prokaryotic expression of transcription factor CtMYB1 gene in *Carthamus tinctorius*

GUAN Li-li^{1,2}, ZHANG Xue^{1,2}, HAN Yi-lai², ZHU Dong², WU Guan-da², YANG Jing^{1,2}, DU Lin-na^{1,2}, WANG Fa-wei^{1,2}, LI Hai-yan^{1,2}, LI Xiao-kun¹

1. Bioreactor and Drug Development Reseach Center, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To obtain a transcription factor gene MYB, clone a CtMYB1 gene from the safflower petals of *Carthamus tinctorius*, and performe its sequence analysis and prokaryotic expression vector construction. **Methods** According to high expression Unigene123993 sequence in safflower transcriptome, MYB gene was cloned from safflower by RT-PCR and RACE methods. The full-length cDNA sequences CtMYB1 gene as templates, the open reading frame (ORF) of cDNA sequences was obtained by PCR. Prokaryotic expression vector pEASY-E1-CtMYB1 was constructed and the expression in *E. coli* BL21 (DE3) was transformed. **Results** A MYB gene was successfully cloned from the safflower petals of *C. tinctorius*, named CtMYB1 (GenBank accession No. KJ524853). A full length cDNA of CtMYB1 was 893 bp and ORF was 750 bp, encoding a protein of 249 amino acid. The prokaryotic expression vector was obtained. SDS-PAGE results showed that the molecular weight was 30 000, same with the relative molecular weight of predicted protein. **Conclusion** CtMYB1 is cloned from safflower and the prokaryotic expression vector is constructed, which preliminarily proves that the gene is successfully expressed in *E. coli*.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; MYB; CtMYB1; prokaryotic expression; safflor yellow; RT-PCR; RACE

红花黄色素 (safflor yellow, SY) 是红花 *Carthamus tinctorius* L. 的主要有效成分之一, 具有 扩张血管、改善心肌供血、抑制血小板聚集、抑制 血栓形成、修复血管内皮损伤、抗氧化等多种药理

收稿日期: 2015-03-18

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”) 项目 (2011AA100606); 国家自然科学基金资助项目 (31201237, 31101172); 吉林省科技厅中青年领军人才及优秀创新团队项目 (20111815); 教育部博士点基金-青年教师基金项目 (20122223120002); 大学生创新创业项目 (201410193045)

作者简介: 官丽莉 (1982—), 女, 实验师, 主要从事药用植物与生物技术研究。Tel: 13504462608 E-mail: guanll2004@163.com

张雪 (1988—), 女, 吉林长春人, 在读硕士, 主要从事植物生物反应器研究。E-mail: 383237154@qq.com

*通信作者 李校堃 (1964—), 男, 教授, 主要从事生物反应器研究。Tel: 13676701796 E-mail: xiaokunli@163.net

#为并列第一作者

作用, 被广泛应用在冠心病、高血压、脑梗死、抗肿瘤、糖尿病并发症、慢性肾病等疾病^[1-2]。目前, 红花黄色素制剂已经被批准上市广泛应于治疗临床, 红花黄色素需求量较大。因此, 虽然红花的种植面积在我国不断扩大, 但仍未能解决红花黄色素资源匮乏问题。因此, 提高红花自身黄色素量, 培育高产黄色素的红花新品系, 具有重要经济意义。

红花黄色素属于植物次生代谢产物黄酮类化合物。植物黄酮类生物合成途径主要由 2 类基因控制: 结构基因和调节基因。其中, 结构基因直接编码与黄酮类次生代谢生物合成有关的各种酶类, 其中查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 和查耳酮异构酶 (chalcone isomerase, CHI) 基因被认为是黄酮类化合物代谢的关键酶和限速酶^[3], 而调节基因则是控制结构基因表达强度和表达方式的一类基因。通过转录因子作用, 可以直接激活整个代谢通路, 有可能激活类黄酮次生代谢途径中多个结构基因的表达, 达到的效果将比导入某个结构基因的作用更明显。

近年来, 有关植物黄酮类化合物生物合成的研究取得了很大进展, 参与植物类黄酮代谢调控的转录因子 (MYB) 大多为 R2R3 型, 部分基因已被克隆、验证^[4-7]。关于红花黄色素的研究仅报道了几个关键酶基因, 如 CHI、IEO、FLS^[8-11]。而关于 MYB 的研究特别是 MYB 参与黄酮类化合物生物合成过程还未见报道。本研究用新一代测序技术 (Illumina/Solexa sequencing) 对红花花瓣的转录组进行测序^[12], 并以测序文库中高表达的 Uingene-123933 片段为基础, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆红花 CtMYB1 基因的 cDNA 序列并对其进行生物信息学分析; 将基因 CtMYB1 的开放阅读框 (ORF) 序列插入表达载体 pEASY-E1, 构建原核

表达载体 pEASY-E1-CtMYB1, 利用 IPTG 诱导并纯化重组蛋白, 从而获得了 CtMYB1 蛋白, 以期为实现 CtMYB1 蛋白的高水平表达, 进而为研究探索 MYB 在红花中的具体生物化学及分子生物学功能奠定基础, 特别是黄色素生物合成中的调控作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

样品采自吉林农业大学种植基地, 经吉林农业大学胡全德教授鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L.。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 将红花花瓣置于液氮中研碎, 总 RNA 提取方法按照 Trizol 试剂说明书进行; 并于 -80 °C 保存备用。cDNA 合成根据 Biotek 公司反转录试剂盒操作进行, 反转录产物分离纯化后置于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 MYB 基因中间 cDNA 序列的克隆 根据 Illumina 测序 (数据已上传至 NCBI Short Read Archive 数据库, 登录号 SRA047279.2) 获得的红花转录组序列中高表达的 Unigene123933 (660 bp), 按照引物设计原则, 采用引物设计软件 Primer 5.0, 对红花转录组序列中的 MYB 基因序列设计引物 (MYB-F、MYB-R) (引物序列见表 1)。以反转录后的 cDNA 为模板进行中间 cDNA 序列的 PCR 扩增, 反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C、30 s, 58 °C、30 s, 72 °C、30 s, 30 个循环; 72 °C、10 min, 4 °C 终止反应。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。将目的片段进行切胶回收后, PCR 产物与克隆载体 pEASY-T1 连接并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落进行菌液 PCR 鉴定, 并将阳性克隆送交生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

表 1 扩增红花 MYB 基因及 RT-PCR 所用的引物序列

Table 1 Primers used for amplification of MYB gene and RT-PCR

引物用途	引物名称及序列 (5'→3')
中间片段引物	MYB-F: CGAAACCATCATAAATCTCCA MYB-R: CTTAGACTCGACGACGAAGTG
5'RACE 和 3'RACE 引物	5F: GACTTCTTCTTTGACTTGTC 5R: CGGCGGGAGCACTTTGTG 3F: ACAAGTCAAAGAAGAAAGTCAAAG 3R: GGATGTTTCGCCCACTTCG
基因 ORF 引物	M1: ATGGGAAGAGCTCCTTGTTG M2: TCACAAGTTCTCATCTCCATC

1.2.3 CtMYB1 基因 cDNA 3' 和 5' 末端克隆 3'RACE 和 5'RACE 第一链的合成按照公司试剂盒使用说明进行。根据 MYB 基因中间 cDNA 序列设计 3'RACE 和 5'RACE 引物(引物序列见表 1), 进行 PCR 扩增。取 10 μ L PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 对 PCR 扩增得到的特异条带进行克隆鉴定后送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.4 CtMYB1 基因的克隆及序列分析 将目的基因中间片段和 3'RACE 和 5'RACE 扩增片段相拼接, 获得理论上的基因全长序列, 根据基因编码区序列特异引物 M1、M2 (引物序列见表 1), 以红花花瓣 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。将目的条带切胶回收后克隆至 pEASY-T1 载体并进行测序, 分析测序结果与所拼接得到的全长序列的一致性。利用 DNAMAN 软件, 对目的基因与已知其他植物 MYB 基因的氨基酸序列进行生物信息学分析。

1.2.5 CtMYB1 原核表达载体的构建与鉴定 以测序结果正确的、含有目的基因的质粒为模板, 利用引物 M1、M2 进行 PCR 扩增。将扩增得到的 CtMYB1 基因 ORF 片段切胶回收后与 pEASY-E1 载体按照 4:1 混合后, 25 $^{\circ}$ C 连接 10 min, 转化大肠杆菌感受态 Trans-T1, 构建重组质粒 pEASY-E1-CtMYB1。挑取单菌落, 以载体上 T7P 引物和目的基因引物 M2 进行菌液 PCR 验证。将测序正确的重组质粒 pEASY-E1-CtMYB1 转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 表达菌株, 以载体上 T7T 引物和目的基因引物 M1 进行菌液 PCR 验证。

1.2.6 红花 CtMYB1 的原核表达及检测 挑取已鉴定的阳性克隆, 在 10 mL 含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 条件下 180 r/min 震荡培养, 在 600 nm 吸光度 (A_{600}) 达到 1.0 时, 1 mol/L IPTG 分别诱导 4 h, 收集 2 mL 菌液, 将收集的菌体 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 向沉淀中加入 200 μ L PBS 缓冲液, 充分混匀后加入 50 μ L 5 \times SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 冷却。取 15 μ L 蛋白样品上样, 12% SDS-PAGE 电泳检测。

2 结果与分析

2.1 CtMYB1 基因的 cDNA 全长的获得及序列分析

利用 NanoDrop 分析仪进行纯度及浓度测定, RNA 的质量浓度在 1 000 μ g/ μ L 左右, 且 A_{260}/A_{280}

在 1.9 左右, 表明提取的 RNA 质量较好。以红花花瓣 RNA 反转录的 cDNA 为模板, MYB-F 和 MYB-R 为引物, 扩增出一条 250 bp 的单一特异性条带(图 1-A)。回收纯化产物后经测序与预期结果一致。用所设计的 2 条特异引物(3F 和 3R)参照试剂盒说明进行 3'RACE PCR 反应, PCR 得到长度为 500 bp 左右的目的条带(图 1-B), 经克隆、测序结果表明获得了 CtMYB1 基因的 3'末端, 该片段长 318 bp, 包含有终止密码子。用所设计的 2 条特异引物(5F 和 5R)参照试剂盒说明进行 5'RACE PCR 反应, PCR 得到长度为 700 bp 左右的目的条带(图 1-C)。经克隆、测序结果表明获得了 CtMYB1 基因的 5'末端, 该片段长 295 bp, 包含有起始密码子。根据 3'RACE 和 5'RACE 测序结果拼接得到 CtMYB1 基因, 最终获得一条 893 bp 的 cDNA 全长序列(图 2), 利用 ORF Finder 在线软件分析发现, CtMYB1 基因包含一个长度为 750 bp 的开放阅读框(ORF), 5'非翻译区长 93 bp, 3'非翻译区长 50 bp。

根据基因编码区序列特异引物(M1、M2), 以红花花瓣 cDNA 为模板扩增出 1 条 750 bp 的条带(图 3), 命名该基因为 CtMYB1 (GenBank 登录号为 KJ524853)。利用 ExPASy Proteomics Server 的在线软件 ProtParam 预测 MYB 编码蛋白的理化性质。CtMYB1 码蛋白包含 249 个氨基酸, 分子式为 $C_{1220}H_{1930}N_{358}O_{378}S_{13}$, 总原子数为 3 899; 相对分子质量为 28 077.7; 理论等电点(pI): 7.14。

采用 SWISS-MODELSOPMA 进行 MYB 的编码蛋白二级结构分析和结构域预测 MYB 的编码蛋白二级结构中 α -螺旋(alpha helix)占 27.71%、延

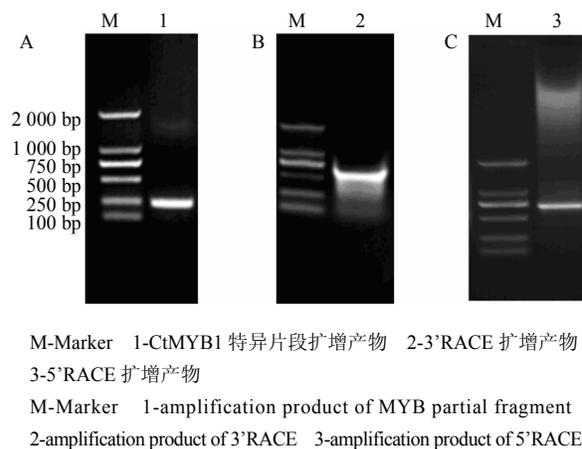


图 1 CtMYB1 基因的 PCR 扩增结果
Fig. 1 PCR amplification of CtMYB1

```

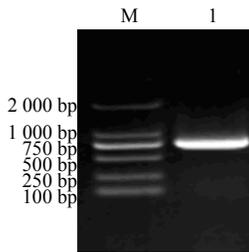
AAAACACACACACAACACTCTCAAGTTCCTTCAACAACAATCAAAAAACACACACACACACATAGT
CGACTGTGTTGTGTGTGCAAAAATCATGGGAAGAGCTCCTTGTGTTCCTCAAGGTGGGTTTACACCGAG
***
GTGCATGGTTCGACCGAAGAAGATAAACTTCTCACGGACCACATTCAAACCCACGGCGAAGGCCAATGG
CGTTCATGCCCTCCAAAGCCGGGTTGCTTAGATGCGGAAAGAGTTGCAGGTTGAGATGGATGAATTAT
CTCCGGCCAGGTATCAAGAGAGGAACTTCACGGCCGATGAGAACGAAACCATCATAAATCTCCATGC
CATCCACGGCAGCCGATGGTTCGTTTCATCGCCACGAACTCGTGGGTGCAACCGACAATGAGATCAAGA
ACCACTGGAACCTCGCACCTTAAACACAAAGTGTCCCGCCGGCCGACGTCCCCAGAAAAACAAAA
ACAAAAAAGGAAAGTATCCGACAAGTCAAAGAAGAAAGTCAAAGTCGCGGCAGAGAAAGCAGTTGA
AATCGTTCATAACGAGCCGGATGTTTCGCCCACTTCGTCTGTCGAGTCTAAGGAAGAATGTGAGTTTTGA
CAACGGAGGTACGACGAGCGGTGCATCGTTCGAGCTGTACATTTGAACCCGACGTCGTAACGGCGGACT
TCCGGTGGCCGGAGGTGTTTCGAGATCGACGGTTCGTCGAGCTTCGATGATCTGAATATGGACGGTCTAG
ATTTAATGATGTTGAAAGATGATGAAAGTGAAGTGTAGAGAAGTTATATGATGAGTGTGGCACTTGAT
CCAGGATGGAGATGAGAAGTGTGAATTTTGCCTCTTAAATTTGTAATTTTATGTGTCAAATTAATT
AGAG
    
```

“***” 标记的碱基序列为 MYB 基因的起始密码子; “_____” 标记的碱基序列为 MYB 基因的终止密码子

“***”-marked base sequence is start codon of MYB and “_____”-marked base sequence is stop codon of MYB

图 2 CtMYB 基因全长序列

Fig. 2 Full length sequence of MYB from *C. tinctorius*



M-Marker 1-CtMYB1 基因 ORF 扩增产物

M-Marker 1-ORF amplification products of CtMYB1 gene

图 3 MYB 基因 ORF 的 PCR 扩增

Fig. 3 ORF Amplification product of MYB gene full length by PCR

伸链 (extended strand) 占 18.88%、无规则卷曲 (random coil) 占 42.97% (图 4)。

跨膜螺旋分析表明该蛋白为膜外蛋白。用 DictyOGlyc 在线工具对蛋白的糖基化位点进行预测。根据 P 值大于 0.5 即为存在糖基化位点为评分标准, CtMYB1 蛋白仅存在 1 糖基化位点, 是位于第 159 位的丝氨酸 (Ser)。在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中, 对 CtMYB 编码蛋白进行三维结构建模 (图 5), 结果显示 CtMYB 编码蛋白是由 6 个 α -螺旋条带简单的缠绕在无规则卷曲上的简单结构。

2.2 CtMYB1 基因编码产物的功能分析与同源性比较

将克隆得到的红花 CtMYB1 基因的氨基酸序列与 NCBI 网站相关序列进行比对分析, 结果表明, 红花 CtMYB1 基因与其他植物有着较高的同源性。

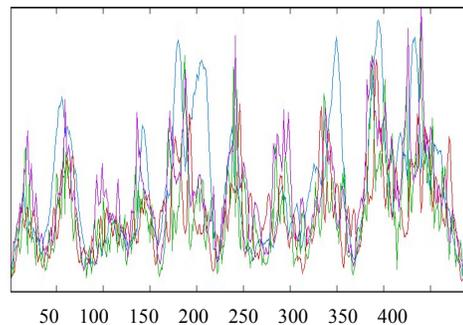
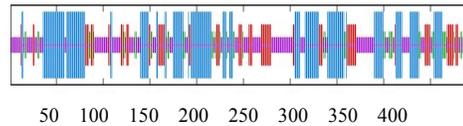


图 4 红花 CtMYB1 蛋白二级结构

Fig. 4 Predicted secondary structure of CtMYB1 protein from *C. tinctorius*

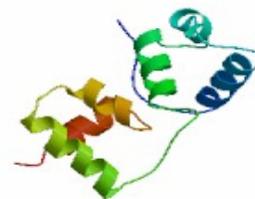


图 5 CtMYB1 蛋白预测的三级结构

Fig. 5 Predicted tertiary structure of CtMYB1 protein from *C. tinctorius*

比较 CtMYB1 蛋白与已报道的 MYB 蛋白氨基酸序列的 R2、R3 区域，发现 CtMYB 蛋白在 N 端具有 2 个典型的 MYB DNA 结合域 cd00167 (DNA-binding domains)，即 R2、R3 结构域，为典型的 R2R3MYB 转录因子，第 17、37、57、89、108 位的色氨酸 (W) 为保守氨基酸 (图 6)。上述结果表明，CtMYB1 符合 R2R3-MYB 类转录因子的特征，表明 CtMYB1 属于 MYB 基因家族。与其他植物的 MYB 序列的比对分析，构建系统发育树 (图 7)。结果表明，CtMYB1 确实属于 MYB 家族，与非洲菊 MYB (CAD87009.1) 具有较高的同源相似性，同源性达到 55%。

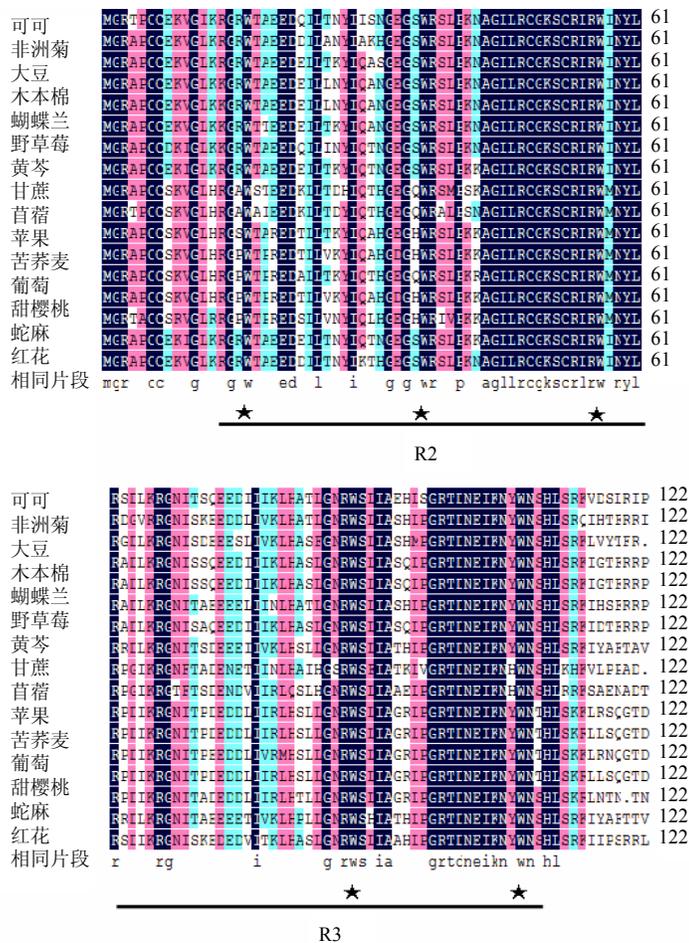
2.3 原核表达载体的构建及重组子的鉴定

菌液 PCR 获得一条 1 000 bp 左右特异性片段 (图 8)，表明扩增的 CtMYB1 片段已插入载体质粒中。同时测序结果表明，连入表达载体 pEASY-E1

中的基因片段与目的序列一致，未出现碱基突变和移码现象。结果表明，已获得正确的 CtMYB1 的原核表达质粒，编码包括 6 个组氨酸 (His) 在内的 267 个氨基酸的重组蛋白。重组质粒转化大肠杆菌感受态 BL21 (DE3) 后，菌液 PCR 鉴定获得大小 1 000 bp 左右的目的条带，表明重组质粒成功转入大肠杆菌感受态 BL21 中 (图 9)。

2.4 E. coli (pEASY-E1-CtMYB1) 的诱导表达

由 12% SDS-PAGE 电泳结果可知 (图 10)，与未诱导的 pEASY-E1-CtMYB1 重组菌相比，IPTG 诱导的 pEASY-E1-CtMYB1 重组菌在 30 000 处出现目的条带。CtMYB1 基因的 ORF 由 249 个氨基酸组成，编码 27 400 的蛋白，而原核表达载体 pEASY-E1 的 His-Tag 标签的大小 1 980，所以重组表达载体编码的蛋白大小约为 30 000。结果初步表明含有 CtMYB1 基因的重组质粒在大肠杆菌中已成功表达。



横线部分为 R2、R3 结构域；“★”表示 R2、R3 结构域中保守的第 17、37、57、89、108 位氨基酸
solid line shows R2 and R3 domains; “★” indicates conservative 17th, 37th, 57th, 89th, and 108th amino acids in R2 and R3 domains

图 6 CtMYB 与其他植物 MYB 蛋白 R2、R3 结构域的同源性比较
Fig. 6 Alignment of R2 and R3 domains in MYB proteins from *C. tinctorius* and other plants

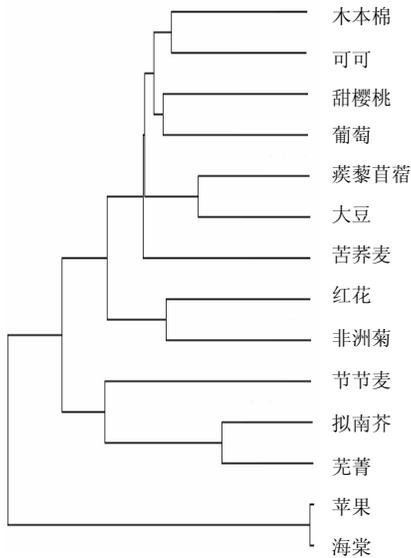
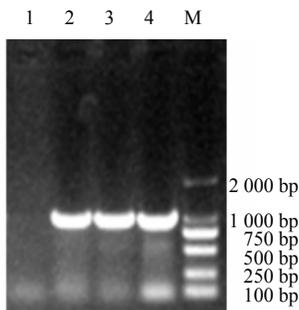


图 7 CtMYB1 与其他物种 MYB 氨基酸序列的系统进化树分析

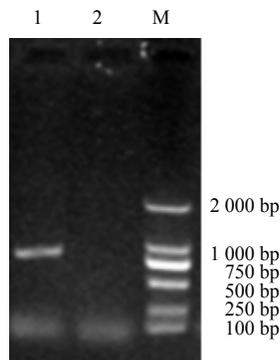
Fig. 7 Phylogenetic tree of CtMYB1 from *C. tinctorius* and MYB amino acid sequence from other plants



1-阴性对照 2~4-pEASY-E1-CtMYB1 菌 M-Marker
1-negative control 2~4-pEASY-E1-CtMYB1 bacteria M-Marker

图 8 pEASY-E1-CtMYB1 菌液 PCR 验证

Fig. 8 PCR verification of pEASY-E1-CtMYB1 bacteria solution



1-pEASY-E1-CtMYB1 BL21 菌 2-阴性对照 M-Marker
1-pEASY-E1-CtMYB1 BL21 bacteria 2-negative control M-Marker

图 9 表达载体 pEASY-E1-CtMYB1 转化 BL21 的 PCR 鉴定
Fig. 9 PCR verification on DNA of *E. coli* BL21 transformed with expression vector pEASY-E1-CtMYB1

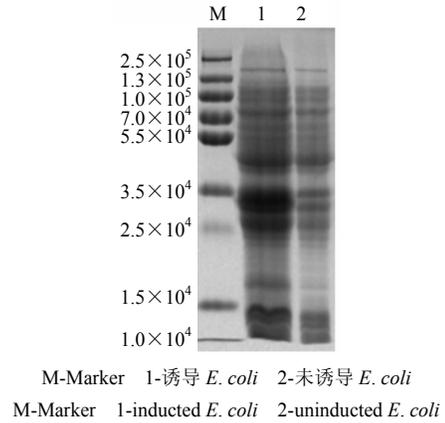


图 10 pEASY-E1-CtMYB1 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 10 Analysis of pEASY-E1-CtMYB1 fusion protein expression by SDS-PAGE

3 讨论

药用植物次生代谢产物是天然药物的主要来源，但其在植物体内量低。通过基因转化、次生代谢工程等技术可实现大规模获得目标次生代谢产物^[13-14]。MYB 蛋白作为调控因子，参与黄酮类化合物生物合成并发挥重要的作用，是目前植物黄酮类化合物代谢分子生物学领域研究的热点之一。目前已得到功能验证的 MYB 基因还是少数，还有很大的空间有待探索，尤其是植物体在不同环境条件下黄酮类化合物在种类和量上的调节，以及调控机制。

基因克隆是研究基因功能的基础，已有报道利用转录组测序筛选参与重要次生代谢产物生物合成 MYB 基因并研究其功能，如杉木^[15]、萝卜^[16]、龙胆^[17]、吊兰^[18]、芫菁^[19]等。本研究在红花转录组测序结果的基础上克隆 1 个新的红花 MYB 基因，为红花在红花黄色素合成代谢调控方面的深入研究奠定理论基础。

研究表明，MYB 转录因子可以与多种顺式作用元件结合，调控下游基因的表达。目前，多采用体外凝胶迁移 (EMSA) 来鉴定蛋白与元件的作用情况^[20-22]。为了获得纯化的转录因子蛋白，最有效的方法就是通过原核表达系统在大肠杆菌中大量表达目的重组蛋白，再通过重组蛋白上的表达序列标签对目的蛋白进行纯化。选择合适的表达载体和表达菌株是外源基因高效表达及纯化的关键。该实验选用 pEASY-E1 作为载体，其含有 6×His Tag 作为纯化标记，成功构建原核表达载体并转化大肠杆菌感受态 BL21 (DE3)。表达的重组蛋白经 Ni 柱即可

一步纯化回收,大大简化了蛋白纯化的操作步骤,并且融合标签蛋白相对分子质量较小,不会改变蛋白的生物活性。本课题初步验证含有 CtMYB1 基因的重组质粒在大肠杆菌中已成功表达约 30 000 的重组蛋白。后续将通过对原核表达条件的优化获得 CtMYB1 蛋白,实现 CtMYB1 蛋白的高水平表达,纯化该蛋白用于 EMSA 来鉴定 CtMYB1 蛋白与元件的作用情况及植物体内 CtMYB1 蛋白表达水平的检测,为后期进一步研究红花转录因子 CtMYB1 的生物化学和分子生物学功能奠定基础。

参考文献

- [1] 周文君,冯晶.红花黄色素治疗不稳定型心绞痛的临床观察[J].药物评价研究,2014,37(6):548-550.
- [2] 石宁宁,程春生,查朱青,等.红花注射液防治游离皮瓣移植术后血管危象的临床研究[J].中国中西医结合杂志,2011,31(10):1322-1327.
- [3] Cheng H, Li L, Cheng S, et al. Molecular cloning and function assay of a chalcone isomerase gene (GbCHI) from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(1): 49-62.
- [4] Bovy A, de Vos R, Kemper M, et al. High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *Cl* [J]. *Plant Cell*, 2002(14): 2509-2526.
- [5] Mehrrens F, Harald K, Pawel B, et al. The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2005(138): 1083-1096.
- [6] Espley R V, Hellens R P, Putterill J, et al. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10 [J]. *Plant J*, 2007, 49(3): 414-427.
- [7] Pattanaik S, Kong Q, Zaitlin D, et al. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 myb regulator from tobacco [J]. *Planta*, 2010, 231(5): 1061-1076.
- [8] 刘秀明,杨文婷,王南,等.红花黄酮化合物合成途径关键酶基因的分离与表达分析[A]//2013全国植物生物学大会论文集[C].南京:中国科技出版社,2013.
- [9] 杨文婷,刘秀明,姚娜,等.红花黄酮醇合成酶基因植物表达载体构建及转化[A]//2013全国植物生物学大会论文集[C].南京:中国科技出版社,2013.
- [10] 康亚兰,裴瑾,刘薇,等.红花查尔酮合成酶基因的克隆、生物信息学分析及表达[J].中草药,2014,45(16):2385-2389.
- [11] 杨文婷,刘秀明,张雪萌,等.红花黄酮醇合成酶基因片段的克隆及表达分析[J].中草药,2015,46(2):250-254.
- [12] Li H Y, Dong Y Y, Yang J, et al. De novo transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 2012, 7: 1-10.
- [13] 生书晶,赵炜,赵树进,等.药用植物次生代谢工程研究概况[J].生命的化学,2010,30(6):968-971.
- [14] 沈忠伟,许昱,夏犇,等.植物类黄酮次生代谢生物合成相关转录因子及其在基因工程中的应用[J].分子植物育种,2008,6(3):542-548.
- [15] Huang H H, Xu L L, Tong Z K, et al. De novo characterization of the Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) transcriptome and analysis of candidate genes involved in cellulose and lignin biosynthesis [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 648-652.
- [16] Wang Y, Pan Y, Liu Z, et al. De novo transcriptome sequencing of radish (*Raphanus sativus* L.) and analysis of major genes involved in glucosinolate metabolism [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 836-846.
- [17] Takashi N, Misa S, Eri Y, et al. Isolation and characterization of GtMYBP3 and GtMYBP4, orthologues of R2R3-MYB transcription factors that regulate early flavonoid biosynthesis, in gentian flowers [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(18): 6505-6517.
- [18] Shikha K, Bhanwar L P, Deepika K, et al. De Novo transcriptome sequencing reveals important molecular networks and metabolic pathways of the plant, *Chlorophytum borivilianum* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83336.
- [19] Jung H J, Dong X S, Park J I, et al. Genome-wide transcriptome analysis of two contrasting brassica rapa doubled haploid lines under cold-stresses using Br135K oligomeric chip [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e106069.
- [20] Sousuke I, Yu K, Mio O, et al. R2R3-type MYB transcription factor, CmMYB1, is a central nitrogen assimilation regulator in *Cyanidioschyzon merolae* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(30): 12548-12553.
- [21] Michael B P, Malcolm M. Campbell. Interactions between the R2R3-MYB transcription factor, *AtMYB61*, and target DNA binding sites [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e65132.
- [22] Tang H H, Erwin G. A-MYB (MYBL1) stimulates murine testis-specific *Ldhc* expression via the cAMP-responsive element (CRE) site [J]. *Biol Reprod*, 2012, 86(2): 30-36.