

## 人参 PgMYB4 基因表达载体构建及其对拟南芥的抗旱性分析

孟祥宇, 谢红梅, 才可新, 王思明, 张丽轩, 宋 岩, 张 惠\*

长春中医药大学 中医药与生物工程研究开发中心, 吉林 长春 130117

**摘要:** 目的 构建人参 PgMYB4 基因表达载体, 并研究该基因对拟南芥的抗旱功能。方法 采用 RT-PCR 技术克隆人参 PgMYB4 基因, 构建表达载体, 通过农杆菌介导的花序浸蘸法将其转化到拟南芥中, 获得转基因拟南芥, 以野生型拟南芥作对照, 检测植株与抗旱相关的生理指标。结果 获得的人参 PgMYB4 基因全长为 735 bp, 编码 245 个氨基酸, 预测其相对分子质量为 27 914; 在干旱胁迫条件下, 转基因拟南芥的生长状态明显优于野生型拟南芥, 与野生型相比, 转基因拟南芥叶片相对叶绿素量降低幅度小、脯氨酸量显著升高、水丢失率较低。结论 人参 PgMYB4 基因具有抗干旱胁迫的能力。

**关键词:** 人参; PgMYB4 基因; 表达载体构建; 转基因拟南芥; 干旱胁迫

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)17-3094-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.17.022

## Construction of expression vector of PgMYB4 gene in *Panax ginseng* and analysis on drought resisting

MENG Xiang-yu, XIE Hong-mei, CAI Ke-xin, WANG Si-ming, ZHANG Li-xuan, SONG Yan, ZHANG Hui

Traditional Chinese Medicine and Biotechnology Research and Development Center, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

**Abstract: Objective** To construct the expression vector of PgMYB4 gene in *Panax ginseng* and study its function of the drought resisting in *Arabidopsis thaliana*. **Methods** A *P. ginseng* gene PgMYB4 was cloned by RT-PCR analysis, further, recombinant plasmid vector with PgMYB4 was transformed into wild-type plants of *A. thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Floral Dip method. Transgenic *A. thaliana* with the expression of PgMYB4 was obtained, further compared with wild-type plants of *A. thaliana*, their determination of physiologic index related to drought stress was detected. **Results** The cDNA (named a PgMYB4) contained a 735 bp open reading frame, encoded 245 amino acids and the predicted molecular weight was 27.914 KDa; Under the condition of drought stress, the growth of transgenic *A. thaliana* was obviously better than wild-type *A. thaliana*. Compared with wild-type *A. thaliana*, the decreased range of relative chlorophyll content in the leaves of transgenic plants of *A. thaliana* was smaller and the proline content of transgenic plants of *A. thaliana* increased significantly. The water loss of transgenic plants of *A. thaliana* was less than that of Wild-type transgenic plants of *A. thaliana*. **Conclusion** Ginseng PgMYB4 gene has the ability of resistance to drought stress.

**Key words:** *Panax ginseng* C. A Mey.; PgMYB4 gene; expression vector construction; transgenic *Arabidopsis thaliana*; drought stress

人参 *Panax ginseng* C. A Mey. 是多年生草本植物, 在我国有“百草之王”的美誉。近年来随着其在多种行业中的广泛应用, 市场需求量与日俱增, 然而人参的生长条件苛刻, 在漫长的生长周期中极易受到各种环境因素影响, 尤其是在干旱条件下会导致一系列病害发生, 进而影响其产量和质量, 因此提高人参抗旱能力对人参增产增质至关重要。

大量研究表明植物中许多转录因子都参与植物

对激素和环境因子的应答, 并对细胞分化、器官形成、植物叶片形态建成及抗病等具有重要的调节作用<sup>[1-6]</sup>。MYB 转录因子是植物转录因子家族中的最大家族之一, 几乎在所有真核生物中都有发现。MYB 转录因子在其 N 端都具有高度保守的 DNA 结合结构域, 通常由 1~4 个不完全重复序列 (R) 组成<sup>[7-8]</sup>。根据含有 R 片段的个数不同, MYB 转录因子家族又分为 4 个亚类<sup>[9]</sup>。MYB4 属于 R2R3-MYB

收稿日期: 2016-01-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81503212); 吉林省省级经济结构战略调整引导资金专项项目 (2014N155)

作者简介: 孟祥宇 (1990—), 女, 在读硕士, 研究方向为中药学。Tel/Fax: (0431)86172300 E-mail: 794451770@qq.com

\*通信作者 张 惠, 女, 助理研究员, 博士研究生, 研究方向为中药学。Tel/Fax: (0431)86172300 E-mail: 114193536@qq.com

亚类,是调控非生物胁迫应答反应的关键转录因子之一。2005年,Monica等<sup>[10]</sup>研究表明,水稻 Osmyb4 过表达能够诱导转基因拟南芥体内 P5CS 基因表达量升高,导致脯氨酸量增多,从而提高转基因植物抵抗干旱胁迫的能力,同时在该基因过表达的植物体内积累了大量糖类能量物质,更加增强了该植物抵御干旱胁迫的能力。2008年,Gemma等<sup>[11]</sup>将水稻 Osmyb4 转化到苹果植物中,由于该基因的过表达改善了植物在干旱及低温环境下生理和生化的适应能力,并积累大量代谢产物,提高了对干旱及低温的耐受性。

前期实验通过对人参进行转录组测序,建立了人参转录组数据库,从而得到人参 MYB4 基因 (PgMYB4) 序列,本实验在此基础上构建表达载体并将其转入到拟南芥中,对转基因拟南芥的抗旱性进行检测,以期为人参 PgMYB4 基因的开发与利用提供科学依据。

## 1 材料

样品采自吉林省抚松县人参种植产业基地,经笔者鉴定为 5 年生人参 *Panax ginseng* L.; 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 种子由本实验室保存。植物表达载体 pCAMBIA1303、二抗 (AP 标记的羊抗兔 IgG) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; PgMYB4 多克隆抗体定制于吉尔生化有限公司; 琼脂糖胶回收试剂盒购自天根公司; T<sub>4</sub> DNA 连接酶、PCR 试剂盒、反转录试剂盒、克隆载体 pMD18-T、各种限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司。

## 2 方法

### 2.1 PgMYB4 基因表达载体的构建

采用改良的 Trizol 法提取人参总 RNA。参考 TaKaRa 反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA。设计特异性引物 MYB4-F: TGCTCTAGAATGGTGA-GAGCTCCTTGCTGTG, MYB4-R: CGCGGATCCGAATTCAGGTAAGTCCCCAGCT, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。构建克隆载体 pMD18-T-PgMYB4, 并转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 筛选阳性克隆进行测序鉴定, 用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*HI 酶切重组质粒 pMD18-T-PgMYB4 和载体 pCAMBIA1303, 分别回收目的基因片段和表达载体片段, 经 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 16 °C 过夜连接, 转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 并通过 PCR、酶切和测序进行鉴定。

### 2.2 转基因拟南芥的获得及分子鉴定

#### 2.2.1 转基因拟南芥的获得 通过冻融法将重组质

粒转化到农杆菌 Agl0 感受态中, 利用花序浸蘸法对处于花蕾期的野生型拟南芥进行侵染。将收获的 T<sub>0</sub> 代种子进行消毒, 均匀播种于 MS 培养基 (含 60 mg/L 潮霉素) 中培养, 待抗性植株生长至 4 叶期后转至营养土中培养, 收取 T<sub>3</sub> 代进行分子鉴定。

#### 2.2.2 转基因拟南芥 RNA 检测

采用 CTAB-LiCl 法提取转基因拟南芥及野生型拟南芥总 RNA, 反转录成 cDNA。以 cDNA 作为模板, 对 PgMYB4 基因进行 PCR 检测。

#### 2.2.3 转基因拟南芥 Western-blotting 检测

用蛋白提取液 (含 10 mmol/L Tris pH 8.0、0.05 mmol/L SDS、10 mmol/L DTT、5 mmol/L EDTA) 提取转基因拟南芥及野生型拟南芥总蛋白。总蛋白经 SDS-PAGE 电泳进行分离, 转至硝酸纤维素膜, 再用 3% 奶粉封闭 1 h, 一抗 (以人参 PgMYB4 蛋白部分肽段 CDNSGDTTDFNRGA 免疫家兔获得多克隆抗体) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (AP 标记的羊抗兔 IgG, 1 : 1 000 稀释) 室温培养 1 h, BCIP/NBT 避光显色 15 min, 检测 PgMYB4 蛋白表达。

### 2.3 转基因拟南芥抗旱性检测

#### 2.3.1 干旱胁迫处理

4 周的转基因拟南芥在正常光照下不给水 14 d, 观察其表型变化, 再正常给水恢复 1 周观察其表型变化。

#### 2.3.2 生理指标检测

在干旱胁迫第 5 天时, 测量植物莲座叶片叶绿素量及植物体内游离脯氨酸量, 叶绿素量用叶绿素测定仪测定, 游离脯氨酸量参照 Bates 等<sup>[12]</sup>方法测定。

#### 2.3.3 水丢失检测

将植物的地上部分放在培养皿中, 并置于人工气雾箱中培养 (25 °C, 相对湿度 60%), 每隔 20 min 测其质量, 共监测 3 h。

## 3 结果与分析

### 3.1 PgMYB4 基因表达载体的构建

琼脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 扩增片段在约 735 bp 处出现与预期大小一致的单一条带 (图 1-a), 该片段与 pCAMBIA1303 表达载体连接后经 PCR 检测, 在约 735 bp 处有明显条带, 与图 1-a 一致; 双酶切结果显示, 在约 735 bp 和 13 002 bp 处出现预期大小的 2 条清晰条带 (图 1-b); 测序结果显示, PgMYB4 基因序列完全正确, 未发生突变等变化。上述结果表明载体构建成功。经测序得到 PgMYB4 基因的全长为 735 bp, 其含有 1 个完整的编码区, 编码 1 条长度为 245 个氨基酸的多肽链, 预测其相对分子质量为 27 914。

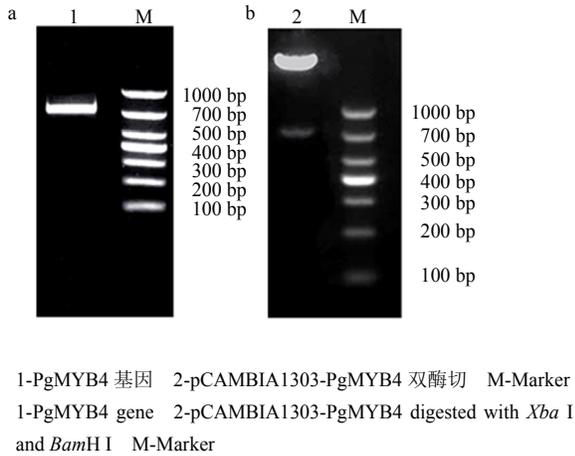


图 1 PgMYB4 基因 PCR 扩增 (a) 和 pCAMBIA1303-PgMYB4 酶切鉴定 (b)

Fig. 1 *P. ginseng* PCR amplification of PgMYB4 gene (a) and enzyme analysis on pCAMBIA1303-PgMYB4 (b)

### 3.2 转基因拟南芥的获得及分子鉴定

PCR 产物经凝胶电泳检测, 结果显示转基因拟南芥能扩增出目的基因条带, 而野生型拟南芥不能扩增出该条带 (图 2-a)。Western-blotting 检测结果显示, 转基因拟南芥在 25 000~37 000 出现清晰条带, 而野生型拟南芥未见该条带 (图 2-b)。以上结果表明导入拟南芥的 PgMYB4 基因能够成功进行蛋白表达。

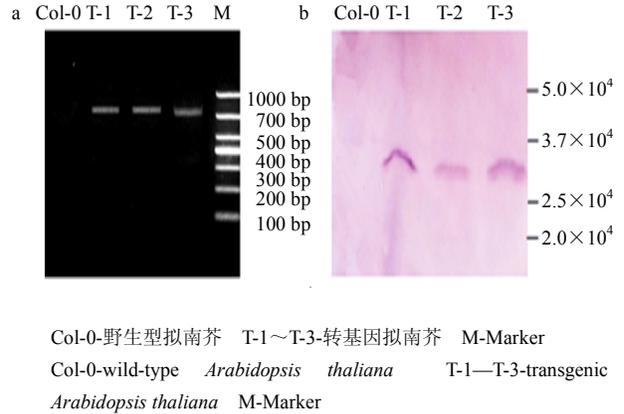


图 2 转基因拟南芥 PCR 检测 (a) 和 Western-blotting 检测 (b)  
Fig. 2 PCR analysis (a) and Western blotting analysis (b) on transgenic plants of *A. thaliana*

### 3.3 转基因拟南芥抗旱性分析

**3.3.1 干旱胁迫下植株表观分析** 持续不浇水 5 d, 转基因拟南芥和野生型拟南芥表型差异不明显, 持续不浇水 14 d, 野生型拟南芥出现严重枯萎现象, 而转基因拟南芥仅出现黄叶现象 (图 3), 再正常给水恢复 1 周, 野生型拟南芥因严重缺水而没有恢复, 而转基因拟南芥则恢复正常。

**3.3.2 生理指标检测** 叶绿素量检测结果显示, 在正常条件下, 转基因拟南芥与野生型拟南芥叶片相对叶绿素量相似, 二者无明显差异, 干旱胁迫 5 d



图 3 干旱胁迫下拟南芥表型分析

Fig. 3 Phenotypic analysis on *A. thaliana* under drought stress

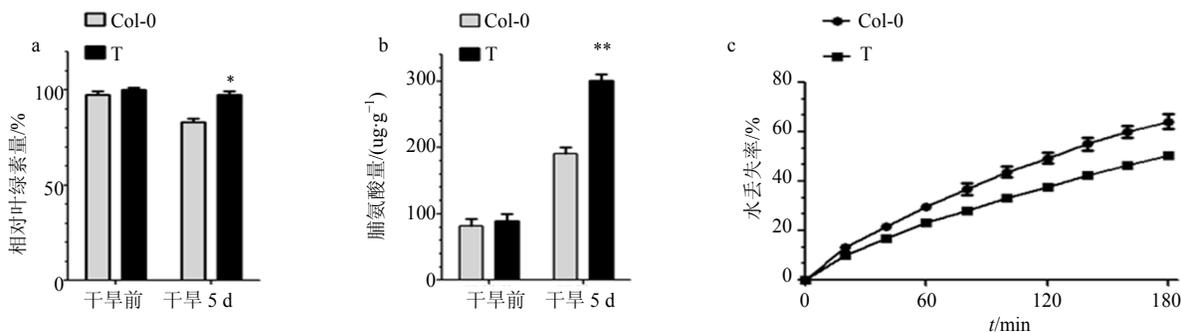
后, 与胁迫前相比转基因拟南芥叶绿素量仅下降 2.62%, 而野生型拟南芥则下降了 14.25% (图 4-a)。脯氨酸量检测结果显示, 在正常条件下, 转基因拟南芥与野生型拟南芥体内游离脯氨酸量相似, 二者无明显差异, 干旱胁迫 5 d 后, 二者脯氨酸量明显增加, 野生型拟南芥脯氨酸量增加了 1.33 倍, 而转基因拟南芥脯氨酸量则增加了 2.38 倍 (图 4-b)。水丢失检测结果显示: 经 3 h 监测转基因拟南芥地上部分水丢失率为 50.63%, 而野生型拟南芥地上部分

水丢失率达到 64.23% (图 4-c)。

### 4 讨论

拟南芥是基因功能鉴定的模式植物, 通过转基因技术将基因转入拟南芥中进行相关检测, 是鉴定未知功能基因的一种常用方法<sup>[13]</sup>。本研究在前期工作基础上成功构建了 PgMYB4 基因表达载体, 并将其转化到模式植物拟南芥中进行基因功能研究, 大大缩减了研究周期。

叶绿素是植物进行光合作用的重要功能物质,



与 Col-0-野生拟南芥比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
 \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs Col-0-wild-type *Arabidopsis thaliana*

图 4 干旱胁迫下拟南芥叶片相对叶绿素量 (a)、脯氨酸量 (b) 和水丢失率 (c)

Fig. 4 Relative chlorophyll content (a), proline content (b), and water loss rate (c) of *A. thaliana* under drought stress

其量的高低直接影响植物光合作用的强弱，叶绿素量变化在一定程度上可以反映植物的生产性能和抵抗逆境胁迫的能力，当植物叶片严重缺水时，叶绿体片层结构受损，从而使叶绿素量降低，因此叶绿素量变化可以指示植物对干旱胁迫的敏感程度<sup>[14]</sup>。本研究显示，在干旱胁迫条件下，野生型拟南芥叶绿素量明显降低，而转基因拟南芥叶绿素量降低幅度较小，说明转基因植株耐旱能力更强。

脯氨酸是植物蛋白质的组分之一，在逆境条件下，植物体内脯氨酸的量显著增加，当受到干旱胁迫时，抗旱性强的植物往往积累较多的脯氨酸，因此脯氨酸量可以作为检测植物抗旱性的生理指标。本研究显示，在干旱胁迫条件下，相比野生型，转基因拟南芥中积累了更多的脯氨酸，说明转基因植株能更好地对抗干旱胁迫。通过比较野生型和转基因拟南芥地上部分的水丢失率，发现转基因拟南芥的水丢失率明显低于野生型，由此推测可能是由于PgMYB4基因的导入促使叶片更多的气孔关闭，从而减少水分流失，以提高干旱耐受性。综上，本研究证明了PgMYB4基因能显著提高植株的耐旱能力，可为人参抗旱育种提供候选基因。

参考文献

[1] Pattanaik S, Kong Q, Zaitlin D. Isolation and functional characterization of a floral tissue-specific R2R3 MYB regulator from tobacco [J]. *Planta*, 2010, 231(5): 1061-1076.  
 [2] Abe H, Urao T, Ito T, et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 63-78.  
 [3] Lea U S, Slimestad R, Smedvig P, et al. Nitrogen deficiency enhances expression of specific MYB and Bhlh transcription factors and accumulation of end

products in the flavonoid pathway [J]. *Planta*, 2007, 225(5): 1245-1253.  
 [4] Lee M M, Schiefelbein J. Cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis determined by lateral inhibition with feedback [J]. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 611-618.  
 [5] Li L, Yu X, Thompson A, et al. *Arabidopsis* MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression [J]. *Plant J*, 2009, 58(2): 275-286.  
 [6] Plett J M, Wilkins O, Campbell M M, et al. Endogenous overexpression of populus MYB186 increases trichome density, improves insect pest resistance, and impacts plant growth [J]. *Plant J*, 2010, 64(3): 419-432.  
 [7] Du H, Yang S S, Liang Z, et al. Genome-wide analysis of the MYB transcription factor superfamily in soybean [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 106-109.  
 [8] Yan H C, Xiao Y Y, Kun H, et al. The MYB transcription factor superfamily of *Arabidopsis*: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60(1): 107-124.  
 [9] Dubos C, Stracke R, Grotewold E, et al. MYB transcription factors in *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15(10): 573-581.  
 [10] Monica M, Elisa B, Roberto C, et al. Overexpression of Osmyb4 enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Physiol Planta*, 2005, 1259(2): 212-223.  
 [11] Gemma P, Stefano B, Franca L, et al. Osmyb4 expression improves adaptive responses to drought and cold stress in transgenic apples [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(10): 1677-1686.  
 [12] Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water stress studies [J]. *Plant Soil*, 1973, 39(1): 205-207.  
 [13] 冯子蓉, 孙彦, 晁跃辉, 等. 紫花苜蓿 MsMYB2 基因的克隆及转化 [J]. *草地学报*, 2015, 23(3): 580-585.  
 [14] 陆新华, 叶春海, 孙光明. 干旱胁迫下菠萝苗期叶绿素含量变化研究 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(8): 3972-3973.