中国农业科学 2010,43(13):2735-2743
Scientia Agricultura Sinica doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2010.13.013

新疆红肉苹果转录因子 MsMYB10 基因的克隆、序列分析及原核表达

王延玲[1,2]，张艳敏[1,3]，冯守千[1]，田长平[1]，王海波[1]，刘遵春[1,4]，宋 杨[1]，陈学森[1]

（[1]山东农业大学园艺科学与工程学院/作物生物学国家重点实验室，山东泰安 271018；[2]山东农业大学林学院，山东泰安 271018；[3]山东农业大学生命科学学院，山东泰安 271018；[4]河南科技学院，河南新乡 453003）

摘要：【目的】克隆新疆红肉苹果[*Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana*（Dieck）Langenf]MYB10 转录因子基因，进行序列分析和原核表达研究，为进一步探索红色发育机理及选育新的栽培红肉苹果奠定理论基础。【方法】根据 MdMYB10 基因编码区设计 1 对特异引物，以新疆红肉苹果叶片总 RNA 为模板，通过 RT-PCR 获得 1 个约 700 bp 的 cDNA 片段，T/A 克隆后进行序列测定，并对该序列进行分析。随后将该基因片段连接到原核表达载体 pET-30a（+）中，构建融合表达质粒，转化到 *E. coli* BL21（DE3）中进行表达。【结果】测序结果显示，RT-PCR 获得的 cDNA 全长包含完整的 cDNA 开放读码框 732 bp，编码 244 个氨基酸，命名为 *MsMYB10*。*MsMYB10*分子量为 28.56 kD，等电点为 8.41，GenBank 登录号为 GQ500894。该蛋白具有 R2R3MYB 结构域，结构域中有保守的色氨酸残基，在 C 端有 1 个富含酸性氨基酸的转录激活区。与已知 *MdMYB10*的氨基酸序列的同源性为 98%。另外，MsMYB10 没有信号肽，具有核定位信号。进化树分析表明，MsMYB10 与调控花青苷合成的转录因子 MdMYB10 亲缘关系最近，处在同一进化枝。SDS-PAGE 电泳检测结果表明，表达蛋白与预期蛋白大小一致。【结论】克隆了新疆红肉苹果转录因子 MsMYB10 基因，并可在大肠杆菌中转化表达。为进一步纯化和鉴定目的蛋白及研究其功能奠定了试验基础。

关键词：新疆红肉苹果；MsMYB10 转录因子；序列分析；原核表达

Cloning, Sequence Analysis and Expression *in E.coli* of MsMYB10 Gene from *Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana*

WANG Yan-ling[1,2], ZHANG Yan-min[1,3], FENG Shou-qian[1], TIAN Chang-ping[1], WANG Hai-bo[1], LIU Zun-chun[1,4], SONG Yang[1], CHEN Xue-sen[1]

([1]*College of Horticulture Science and Engineering/State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong*; [2]*College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong*; [3]*College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong*; [4]*He'nan Institution of Science and Technology, Xinxiang 453003, He'nan*)

Abstract: 【Objective】 Cloning, sequence analysis and expression in *E. coli* of MsMYB10 gene from *Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana* was conducted to further explore the red development mechanism and breed cultivars of red-flesh apple. 【Method】 A cDNA fragment about 700 bp was amplified from the total RNA of leaves of *Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana* by reverse transcription PCR(RT-PCR) with a pair of specific primers based on the sequences of *MdMYB10*. The recombinant prokaryotic expression vector pET30a-MsMYB10 was constructed by inserting the cDNA fragment into the prokaryotic expression vector pET-30a, and then transformed into *E. coli* BL21(DE3). 【Results】 Sequence analysis showed that the fragment contains a full coding region of 732 bp encoding 244 amino acid residues with a molecular mass of 28.56 kD. Its GenBank accession number is GQ500894. This deduced protein has a pI of 8.41. Results of the study showed that *MsMYB10* exhibited typical features of the R2R3-MYB domain. Tryptophan residues are conserved in R2R3 domain. There is one transcriptional activation domain rich in

收稿日期：2010-01-26；接受日期：2010-04-30
基金项目：国家自然科学基金项目（30871679）、国家“863”计划重点项目（2006AA100108）、山东省农业良种工程项目
作者简介：王延玲，博士研究生。E-mail：wangyl@sdau.edu.cn。通信作者陈学森，教授。Tel：0538-8249338；E-mail：chenxs@sdau.edu.cn

acidic amino acids in the C-terminal. *MsMYB10* exhibits a homology of 99% and 98% with *MdMYB10* in nucleotide and amino acid levels, respectively. MsMYB10 has no signal peptide, but a nuclear localization signal. The homology tree showed that MsMYB10 is at the same evolutionary branch with MdMYB10. The SDS-PAGE displays that the expressed proteins consistent with the size of expected protein. 【Conclusion】 *MsMYB10* was cloned from *Malus* and expressed in *E. coli*. These results have provided a foundation for further purifying and identifying target protein and function study of *MsMYB10*.

Key words: *Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana*; MsMYB10; sequence analysis; prokaryotic expression

0 引言

【研究意义】新疆野苹果（或塞威士苹果，*Malus sieversii* Roem1）属第三纪孑遗物种，是现代栽培苹果（*Malus domestica* Borkh1）的祖先种[1-3]，遗传多样性丰富。但由于农田开垦、过度放牧以及苹果小吉丁虫的传播与蔓延等因子，新疆野苹果正遭到严重破坏，群落面积急剧减少，切实保护这一宝贵种质资源迫在眉睫。新疆红肉苹果[*Malus sieversii* f. n*eidzwetzkyana*（Dieck）Langenf]，是新疆野苹果的变型，本研究选取其中的‘夏红肉’变异类型，通过 MYB10 转录因子基因的克隆、序列分析和原核表达研究，为研究新疆红肉苹果 MYB10 转录因子（MsMYB10）的生物学活性及功能奠定基础，并为 MsMYB10 在植物基因工程及生物化学上的应用提供科学依据。因此，本研究对新疆野苹果资源的保护与利用具有重要意义。【前人研究进展】已有的研究表明，植物器官的红色发育及花青苷代谢与 MYB 转录因子有关，而 MYB 转录因子以保守的 DNA 结合域（DNA-binding domain）为共同特征，是植物最大的转录因子基因家族之一，广泛参与植物次生代谢调控、激素和环境因子的应答，并对细胞分化、细胞周期、器官的形成以及植物叶片的形态建成具有重要的调节作用[4-5]。根据所含 MYB 结构域的数目，将 MYB 类转录因子分为单一 MYB 结构域蛋白、2 个重复 MYB 结构域蛋白和 3 个重复 MYB 结构域蛋白等 3 类，植物中主要为 2 个重复 MYB 结构域蛋白（R2R3MYB）。最早的 MYB 转录因子（v-MYB）是从鸟类的原癌病毒 AMV 中发现的[6]，自 Paz-Ares 等从玉米中克隆出第一个植物转录因子 ZmMYBC1 基因[7]以来，已有上百种功能各异的 MYB 基因从拟南芥、玉米、矮牵牛、金鱼草、葡萄等多种中植物被克隆分离[8-13]。仅拟南芥中就有 133 个 R2R3MYB 基因，约占拟南芥基因组编码基因的 0.2%—0.6%，可划分为 24 个亚类，其中第 10 亚类主要参与花青苷的代谢调节[8]，是近几年的研究热点。苹果方面，MYB10 类转录因子的研究取得了很大进展，目前已有 MdMYB1、MdMYBA 和 MdMYB10 等 3 个 MYB10 类转录因子 [14-17]被克隆鉴定，进一步研究发现，这 3 个转录因子通过调控 DFR 和 UFGT 基因的转录进而调控花青苷的合成，其中 MdMYB10 具有与 bHLH 互作的结构功能域，两者形成转录蛋白复合体共同调控花青苷的代谢；近年来，本课题组先后从形态学、挥发性物质、糖酸及酚类物质组分、矿质元素、分子系统学以及核心种质构建等多个层面对新疆野苹果群体遗传结构进行了研究[18-22]。结果表明，新疆野苹果存在广泛的遗传多样性，挖掘利用的潜力很大；同时在调查过程中发现，新疆红肉苹果类型多样，其枝、叶、花、果皮及果肉均为红色，富含花青苷，具有较高的观赏价值和医疗保健价值，但其果肉容易变面，有待进一步改良。为此，本课题组 2006 年构建了‘红富士’等苹果品种×新疆红肉苹果的杂种分离群体，2009 年该群体部分杂种后代株系已经结果，初步观察结果表明，后代群体出现了明显的红肉/白肉及脆肉/面肉等性状的分离，其中红肉株系间在着色程度亦存在明显差异，这不仅为选育具有观赏、鲜食与保健功能的苹果新品种（系）、实现新疆野苹果“利用保存”的目的提供了种质，而且为有关分子生物学的研究提供了试材。【本研究切入点】在前人研究工作的基础上，针对包括红肉苹果在内的新疆野苹果资源正遭到严重破坏、在国内尚未见有关新疆红肉苹果着色差异机理研究报道的背景情况下，本文开展新疆红肉苹果‘夏红肉’MYB10 转录因子基因的克隆、序列分析和原核表达研究。【拟解决的关键问题】通过上述研究，期望分离克隆出调控花青苷合成的 MsMYB10 基因，对其进行序列分析，构建该基因的原核表达质粒，在大肠杆菌中进行表达，为进一步探索 MsMYB10 在红肉苹果中具体的生物化学与分子生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

试验于 2008—2009 年在山东农业大学作物生物

学国家重点实验室及山东农业大学泰安横岭果树育种基地进行，供试材料为新疆红肉苹果（*Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana*）‘夏红肉’二年生嫁接苗，砧木为新疆野苹果非红肉类型，取新鲜叶片带回实验室，-70℃冰箱保存备用。

1.2　菌株、载体、酶等主要试剂

工程菌 *E.coli* DH5α、T/A 克隆载体 pMD18-T vector、胶回收多功能试剂盒以及 RNA 提取试剂盒均购自百泰克生物有限公司，反转录试剂盒、限制性内切酶、DNA 聚合酶及 IPTG 等均为大连宝生物工程(大连）有限公司产品，DNA 质粒小提试剂盒为北京索来宝科技有限公司产品，BL21（DE3）及质粒 pET-30a（+）由果树实验室保存。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3　引物设计

根据 GenBank 中登录的苹果 *MdMYB10*（EU518248）编码框和原核表达载体 pET-30a（+）多克隆酶切位点，设计 1 对特异引物 MYB10F：5′-*GG*GGTACCATGGAGGGATATAACGAAACTG-3′，MYB10R：5′- *GC*GTCGACCTATTCTTCTTTTGAATGATTCC-3′，在上下游引物的 5′端分别加入 *Kpn* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ酶切位点及保护碱基（下划线部分为酶切位点，斜体部分为保护碱基）。

1.4　RNA 的提取以及 *MsMYB10* 的克隆

采用改良的 CTAB 法[23]提取红肉苹果叶片的总 RNA，根据 TaKaRa 公司生产的 Reverse Transcriptase M-MLV（RNase H⁻）试剂盒说明书合成 cDNA，-20℃保存备用。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件：94℃，2 min；94℃，30 s，64℃，40 s，72℃，2 min，35 个循环；72℃ 10 min。参照百泰克多功能胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物。回收产物与 pMD18-T 载体连接，转化 *E.coli* DH5α 感受态细胞，筛选阳性克隆，PCR 确认后送至上海生工生物技术有限公司测序。重组质粒命名为 pMD-MsMYB10。

1.5　MsMYB10 生物信息学分析

利用 NCBI 网站上的 BLASTn 程序进行同源序列比对，DNAMAN 软件分析 MsMYB10 ORF，推导氨基酸序列，预测蛋白质分子量、等电点、亲水性与疏水性；Mega4 软件构建系统进化树；SignalP 3.0 Server[24]预测信号肽；预测核定位信号。

1.6　MsMYB10 基因原核表达载体的构建及鉴定

根据克隆的 MYB 序列以及原核表达载体 pET-30a（+）多克隆酶切位点序列，用 *Kpn* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切重组质粒 pMD-MsMYB10 和原核表达载体 pET-30a（+），分别回收插入的目的片段和表达载体，将两者按照摩尔比 1∶3 混合后，经 T_4 DNA 连接酶连接后转化 *E.coli* DH5α 感受态细胞，随机挑取阳性克隆测序，同时，依照北京索来宝科技有限公司的 DNA 质粒小提试剂盒说明书提取质粒 DNA 后进行酶切鉴定。融合表达载体命名为 pET30a-MsMYB10（图 1）。

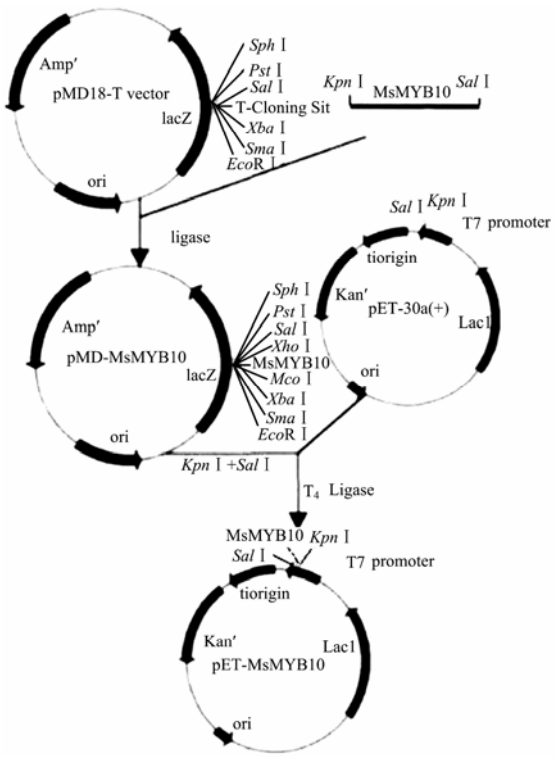


图 1　pET-MsMYB10 的构建策略

Fig. 1　Construction of pET-MsMYB10

1.7　重组 *MsMYB10* 在大肠杆菌中的表达

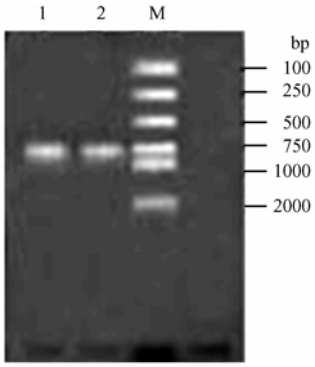
重组质粒转化 BL21（DE3）感受态细胞，挑取抗性单菌落接种于 2 mL 液体 LB 培养基(含 100 μg·mL^{-1} 卡那霉素）37℃振荡培养过夜。次日以 1∶100 的比例转接到新的液体 LB 培养基中（含 100 μg·mL^{-1} 卡那霉素）37℃振荡培养至 OD_{600}≈0.5，随后加入 IPTG（终浓度分别为 0.2、0.5、0.8、1.0、2.0 mmol·L^{-1}）进行诱导表达。同时以 pET-30a（+）质粒转化菌加 IPTG（终浓度 1 mmol·L^{-1}）诱导为正对照，以未加 IPTG 诱导的为负对照。诱导一定时间（2、3、4、5、6 h）后收集菌体。菌体中加入菌液体积 10%的 2×SDS-PAGE 上样缓冲液（50 mmol·L^{-1} Tris-HCl（pH 6.8），2% SDS，

0.1%溴酚蓝，10%甘油，1% DDT），100℃煮沸 5 min，立即冰浴 2 min，最大转速离心 5 min，取 20 μL 样品（即为总蛋白）上样，进行 SDS-PAGE（4%浓缩胶和 12%分离胶）电泳分析。凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色并脱色至背景清晰。

2 结果

2.1 红肉苹果 MsMYB10 基因全长 cDNA 的克隆与分析

以红肉苹果叶片 cDNA 为模板进行 RT-PCR，扩增出单一的 PCR 条带（图 2）。与预期大小一致。将该片段连接到 pMD18-T 载体后测序，结果表明，该基因的读码框（ORF）为 732 bp，命名为 *MsMYB10*，GenBank 登录号为 GQ500894。该基因编码 244 个氨基酸，分子量为 28.56 kD，等电点为 8.41。氨基酸没有信号肽，具有核定位信号。BLAST 比对结果表明，MsMYB10 与其它的 MYB 类转录因子具有很高的同源性，如与拟南芥中 AtPAP1 的同源性为 64%，金鱼草 AmROSEA 1 的同源性为 63%，葡萄 VvMYBA1 的同源性为 54%，与苹果中 MdMYB10 的同源性高达 98%。



M：DNA 分子量标准 DL2000；1—2：MsMYB10 扩增产物
M: DNA DL2000; 1-2: MsMYB10 PCR product

图 2 RT-PCR 扩增 MsMYB10 基因

Fig. 2 RT-PCR amplified fragment of *MsMYB10*

生物信息学分析表明, MsMYB10 基因的编码区含两个 MYB 结构域，分别由 52 和 49 个氨基酸构成（图 3）；该结构域与其它植物中已克隆到的 MYB 转录因子的保守结构域具有很高的同源性（图 3）；在它的 R2、R3 结构域中含有保守的色氨酸残基 W。除了具有典型的 R2R3MYB 保守结构域外，在它的 C-端还存在 1 个富含酸性氨基酸的转录激活区，推测该基因为典型的 R2 R3MYB 转录因子基因（图 3）。根据推测的氨基酸序列，进行系统进化树分析。结果表明，MsMYB10 与 MdMYB10 在同一进化枝上，与 AtPAP1、AtPAP2、VvMYBA1、VvMYBA2 和 PhAN2 亲缘关系较近，这些蛋白都已证实调控花青苷的合成。与调控鞣质的 AtTT2 和抑制花青苷合成的 FaMYB1 亲缘关系较远（图 4）。这些结果表明 MsMYB10 可能具有与 MdMYB10、AtPAP1 等基因相似的功能，调控花青苷的合成。

2.2 原核表达质粒的构建及重组子的鉴定

提取 pMD-MsMYB10 和 pET-30a（+）质粒，同时用 *Kpn* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切，回收插入片段和表达载体，将两者按照摩尔比 1∶3 混合后，用 T_4 连接酶进行连接，构建重组质粒 pET30a-MsMYB10（图 1）。

用 *Kpn* 和 *Sal* Ⅰ双酶切重组质粒 pET30a-MsMYB10，可切出 700 bp 左右片段（图 5），表明扩增的 *MsMYB10* 片段已插入载体质粒中。在此基础上，又以重组表达质粒 pET30a-MsMYB10 为模板，采用 PCR 方法扩增出 700 bp 左右扩增片段（图 5），进一步证明 pET30a-MsMYB10 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-MsMYB10 进行了序列测定。序列测定结果表明，连入表达载体 pET-30a（+）中的基因片段与目的序列一致，并且酶切位点连接处序列也正确，未出现碱基突变及移码现象。表明已获得了正确的 MsMYB10 的原核表达重组质粒。

2.3 SDS-PAGE 分析

将重组质粒 pET30a-MsMYB10 转化大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞，加入不同浓度的 IPTG，在 37℃下分别以不同时间进行诱导后，提取大肠杆菌总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。结果显示，插入有外源片段的重组质粒 pET30a-MsMYB10 经 IPTG 诱导后，在预期的蛋白分子量 28 kD 左右有 1 条蛋白条带，而未诱导的转化重组质粒和空载体转化子以及诱导的转化空载体均未出现这条蛋白带。表明重组质粒 pET30a-MsMYB10 在大肠杆菌 BL21 中诱导表达了 MsMYB10 蛋白。试验中通过调整 IPTG 终浓度（0.2、0.5、0.8、1.0、2.0 $mmol \cdot L^{-1}$）及诱导时间（2、3、4、5、6 h）发现，预期分子量 28 kD 左右的蛋白条带深度有所变化，IPTG 浓度过大或过小，诱导时间过长或过短，都会影响蛋白的表达量，当 IPTG 终浓度为

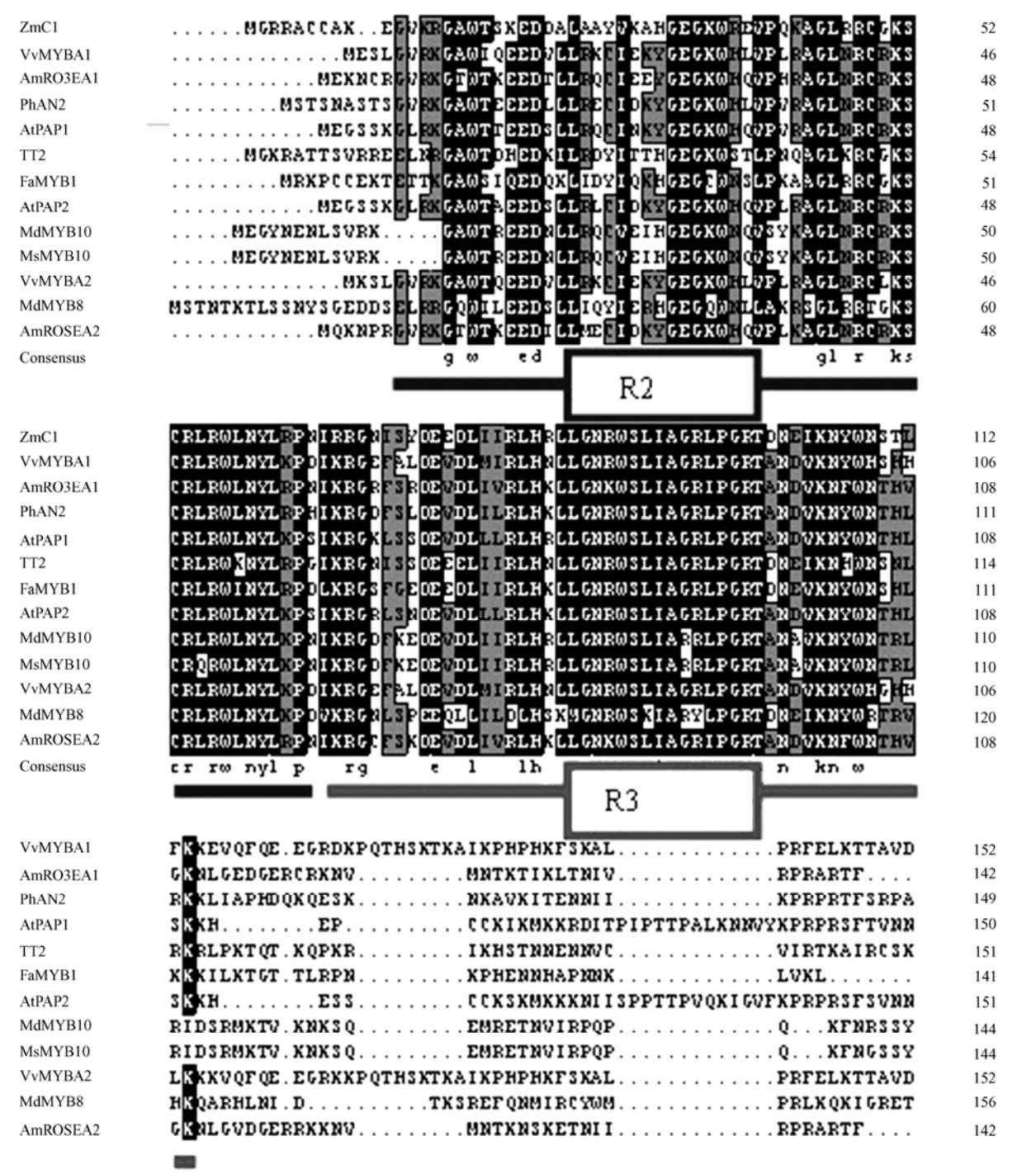


图 3　MsMYB10 与其它 MYB 蛋白 MYB 结合域的氨基酸序列的比对

Fig. 3　MYB domain alignments of MsMYB10 with other MYB protein

1.0 mmol·L^{-1}、诱导时间为 6 h 时，蛋白表达量最多（图 6）。

3　讨论

MYB 类转录因子是植物中最大的转录因子家族之一，虽然在序列上有一定的保守性，在结构上有一定的相似性，但不同物种、不同个体、甚至同一个体不同的组织器官之间，MYB 蛋白的功能也存在着重大差异。目前，许多 MYB 类转录因子的功能还不清楚，因此克隆 MYB 基因，明确其在与植物次生代谢

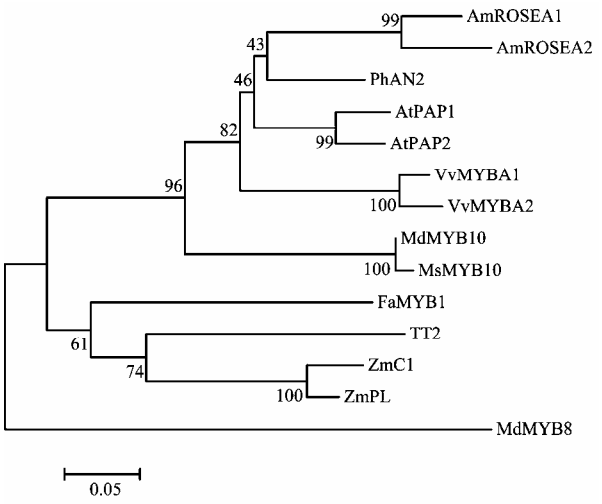


图 4 MsMYB10 与其它 MYB 蛋白的系统发生分析

Fig. 4 Phylogentic relationship of MsMYB10 and some other MYB proteins

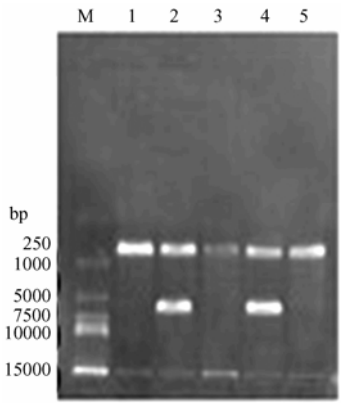
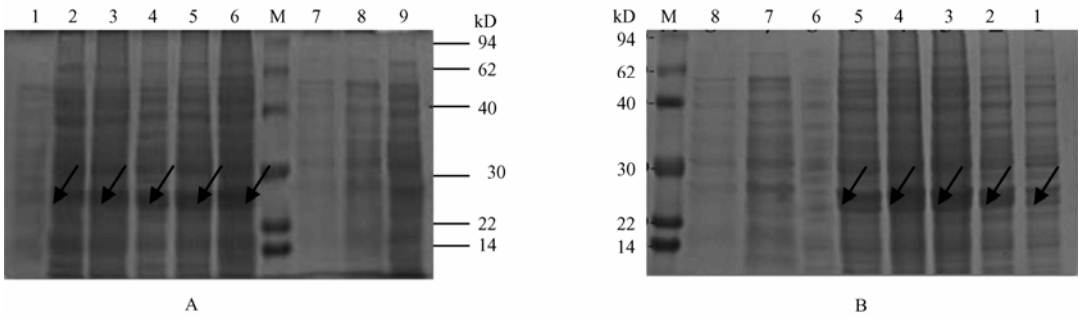


图 5 重组质粒 pET30a-MsMYB10 的酶切及 PCR 鉴定图

Fig. 5 PCR and retriction enzyme identification of pET30a-MsMYB10

调控、激素和环境胁迫的应答方面的功能具有很重要的意义。



M：蛋白质分子量标准；箭头所指为目标产物条带；A：37℃下，IPTG 终浓度为 1.0 mmol·L^{-1} 时，融合表达工程菌诱导 2、3、4、5、6 h（第 2、3、4、5 和 6 泳道）和未诱导 0、6 h（第 1、9 泳道）以及 pET-30a（+）空载体转化子未诱导（第 7 泳道）、诱导 6 h（第 8 泳道）的总蛋白；B：37℃下，IPTG 终浓度为 0、0.2、0.5、0.8、1.0、2.0 mmol·L^{-1}（第 6、1、2、3、4、5 泳道）时融合表达工程菌诱导 6 h 以及 pET-30a（+）空载体转化子 IPTG 终浓度为 0、1.0 mmol·L^{-1} 诱导 6 h（第 8、7 泳道）

M: Protein molecular weight standard; Arrows indicate the target protein bands; A: Total proteins of engineering bacteria strains after induced (lane 2, 3, 4, 5 and 6) for 2, 3, 4, 5, 6 h and uninduced (lane 1, 9) for 0, 6 h as well as strains harbouring pET-30a(+)after induced (lane 7) for 0, 6 h; B: Total proteins of engineering bacteria strains after induced for 6h by 0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0 mmol·L^{-1}IPTG (lane 6, 1, 2, 3, 4, 5) and strains harbouring pET-30a(+)after induced (lane 8, 7) for 6 h by 0, 1.0 mmol·L^{-1} IPTG

图 6 pET30a-MsMYB10 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expressed product of pET30a-MsMYB10

研究认为，绝大多数 MYB 转录因子在植物代谢调控中起转录激活作用。但不是所有的 MYB 转录因子都起转录激活作用，近年来也有少数报道起转录抑制作用的 MYB 基因存在。如拟南芥的 AtMYB4 [25] 和 At-MYB32[26]抑制下游靶基因的表达；FaMYB1 负调控草莓中类黄铜合成基因的表达等[27]。植物中 MYB 类转录因子主要以 R2R3MYB 的形式存在，仅拟南芥中就有 130 多个 R2R3MYB 基因，Stracke 等[8]将拟南芥中 133 个 R2R3MYB 基因划分为 24 个亚类。其中第 10 亚类 MYB10 主要参与花青苷的代谢调节。近年来在玉米[9]、矮牵牛[10]、葡萄[13]、苹果[14-17]中也克隆鉴定了调控花青苷合成的 R2R3MYB 转录因子。本研究利用 RT-PCR 技术，从新疆红肉苹果中分离得到了 MsMYB10 基因。结构分析表明，该基因分别由 52 和

49 个氨基酸组成的两个 MYB 结构域, 该结构域含有典型的 R2R3MYB 转录因子所特有的保守的色氨酸残基 W。此外，在其 C 端还存在 1 个富含酸性氨基酸的转录激活区。因此该基因为典型的 R2R3MYB 转录因子基因。系统进化树分析显示，MsMYB10 与 MdMYB10 同源性最高，处在同一进化枝上，与调控花青苷的合成的 AtPAP1、AtPAP2、VvMYBA1、VvMYBA2 和 PhAN2 亲缘关系较近，而与调控鞣质的 AtTT2 和抑制花青苷合成的 FaMYB1 亲缘关系较远。因此推测，MsMYB10 可能具有与 MdMYB10、AtPAP1 等基因相似的功能，调控花青苷结构基因的转录。但要想了解 MsMYB10 蛋白在红肉苹果中具体的生物化学与分子生物学功能，必须从蛋白质水平上进行深入研究。而原核表达体系是研究蛋白质结构和功能的基础。本研究首次克隆了新疆红肉苹果 MsMYB10 基因全长，将其克隆至原核表达载体 pET30a（+）中，并在大肠杆菌 BL21（DE3）中成功表达。

外源目的基因在大肠杆菌中能否表达及高表达受很多因子影响，如大肠杆菌菌株、原核表达质粒、诱导时间和温度以及诱导剂浓度等。曹冬梅等[28]发现，细菌培养的条件对大肠杆菌中 His62MxMYB1 融合蛋白的表达有一定影响，同样的培养和诱导条件，不同批次的菌种，最后得到的融合蛋白的纯度是不同的。杜海等[29]分别将目的基因 GmMYBZ2 在大肠杆菌 Rosetta2（DE3）pLysS 和 BL21（DE3）pLysS 中进行了表达。结果显示，目的基因在含有补充稀有密码子的大肠杆菌菌株中的表达量很高，而在普通菌株中表达量很低，几乎不能正常表达。本研究发现，IPTG 的浓度和诱导时间对融合表达载体 pET30a-MsMYB10 表达水平影响非常大，通过调整 IPTG 浓度及诱导时间，成功诱导了预期分子量 28.56 kD 的蛋白条带。试验设立了不同诱导时间和不同浓度的 IPTG 诱导融合蛋白的表达，SDS-PAGE 电泳结果显示在一定诱导温度 37℃下，低浓度（如 0.1—0.2 mmol·L^{-1}）的 IPTG 诱导前后蛋白质差异不大（图 6-B），中等浓度（如 0.5—2.0 mmol·L^{-1}）的 IPTG 诱导前后蛋白质差异显著，出现 1 条明显的蛋白质差异带（图 6-B）。诱导时间过长或过短，也会影响蛋白的表达量，诱导时间在 6 h 内，随着时间的延长，蛋白表达量越来越多（图 6-A），但是超过 6 h，蛋白表达量增加不明显，过夜后，表达量反而减少（图未显示）。根据本试验初步优化结果认为诱导融合表达载体 pET30a-MsMYB10 转化的大肠杆菌 BL21（DE3）细胞表达融合蛋白的最佳 IPTG 浓度为 1.0 mmol·L^{-1}，最佳诱导时间为 6 h。由于大肠杆菌菌株、原核表达质粒、诱导温度等因子都能影响外源目的基因在大肠杆菌中的表达，因此试验中可进一步优化 MsMYB10 的原核表达体系，获取一定数量的、纯度比较高的活性蛋白质，从而利于后续纯化及在体外研究 MsMYB10 转录因子的性质和功能。

4　结论

本研究从新疆红肉苹果叶片中成功克隆了含完整编码区的 MsMYB10 基因，GenBank 登录号为 GQ500894，序列分析表明，MsMYB10 具有两个 MYB 结构域，为典型的 R2R3MYB 转录因子。进化树分析表明，MsMYB10 与调控花青苷合成的转录因子 MdMYB10 亲缘关系最近，处在同一进化枝。构建了 pET- MsMYB10 重组质粒，在大肠杆菌中成功表达了 MsMYB10，获得了融合蛋白，为 MsMYB10 进一步的功能鉴定奠定了基础。

References

[1] Zhou Z Q, Li Y N. The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2000, 47: 353-357.

[2] Robinson J P, Harris S A, Juniper B E. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. *Plant System Evolution*, 2001, 226: 35-58.

[3] Harris S A, Robinson J P, Juniper B E. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*, 2002, 18(8): 426-430.

[4] Martin C, Paz-Ares J. MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics*, 1997, 13: 67-73.

[5] 王　栋, 李利红, 陈志玲, 夏桂先. 拟南芥根特异表达转录因子 AtMYB305 的鉴定及功能研究. 科学通报, 2001, 46(21): 1804-1808.
Wang D, Li L H, Chen Z L, Xia G X. Characterization and pilot functional study of a root specific MYB transcription factor of *Arabidopsis*. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(21): 1804-1808. (in Chinese)

[6] Klempnauer K H, Gonda T J, Bishop J M. Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor c-myb: The architecture of a transduced oncogene. *Cell*, 1982, 31: 453-463.

[7] Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, Peterson P A, Saedler H. The regulatory *C1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to

myb oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1987, 6: 3553-3558.

[8] Stracke R, Werber M, Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4: 447-456.

[9] Rabinowicz P D, Braun E L, Wolfe A D, Bowen B, Grotewold E. Maize R2R3 Myb genes: Sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics*, 1999, 153(3): 427-444.

[10] Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol J, Koes R. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of petunia and its role in the evolution of flower color. *The Plant Cell*, 1999, 11(6): 1433-1444.

[11] Moyano E, Martinez-Garcia J F, Martin C. Apparent redundancy in *myb* gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in *Antirrhinum* flowers. *The Plant Cell*, 1996, 8(4): 1519-1532.

[12] Deluc L, Barrieu F, Marchive C, Lauvergreat V, Decendit A, Richard T, Carde J-P, Mérillon J-M, Hamdi S. Characterization of a grapenine R2R3-MYB transcription factor that regulates the phenypropanoid pathway. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 499-511.

[13] Walker A R, Lee E, Bogs J, McDavid D A J, Thomas M R, Robinson S P. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*, 2007, 49: 772-785.

[14] Takos A M, Jaffe´ F W, Jacob S R, Bogs J, Robinson S P, Walker A R. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. *Plant Physiology*, 2006, 142(3): 1216-1232.

[15] Ban Y, Honda C, Hatsuyama Y, Igarashi M, Bessho H, Moriguchi T. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. *Plant and Cell Physiology*, 2007, 48: 958-970.

[16] Espley R V, Brendolise C, Chagné D, Kutty-Amma S, Green S, Volz R, Putterill J, Schouten H J, Gardiner S E, Hellens R P, Allan A C. Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. *The Plant Cell*, 2009, 21: 168-183.

[17] Espley R V, Hellens R P, Putterill J, Stevenson D E, Kutty-Amma S, Allan A C. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. *The Plant Journal,* 2007, 49: 414-427.

[18] Chen X S, Feng T, Zhang Y M, He T M, Feng J R, Zhang C Y. Genetic diversity of volatile components in Xinjiang wild app le (*Malus sieversii*). *Journal of Genetic and Genomics*, 2007, 34 (2): 171-179.

[19] 张小燕, 陈学森, 彭 勇, 王海波, 石 俊, 张 红. 新疆野苹果矿质元素与糖酸组分的遗传多样性, 园艺学报, 2008, 35(2): 277-280.
Zhang X Y, Chen X S, Peng Y, Wang H B, Shi J, Zhang H. Genetic diversity of mineral elements, sugar and acid compents in *Malus sieversii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35 (2): 277-280. (in Chinese)

[20] Zhang C Y, Chen X S, He T M, Liu X L, Feng T, Yuan Z H. Genetic diversity in *Malus sieversii* (Lebed.) Ro2 em. Ⅱ. Population genetic structure in *Malus sieversii* revealed by SSR markers in Xinjiang, China. *Journal of Genetic and Genomics*, 2007, 34 (10): 947-955.

[21] 张春雨, 陈学森, 林 群, 苑兆和, 张 红, 张小燕, 刘崇祺, 吴传金. 新疆野苹果群体遗传结构和遗传多样性的SRAP分析. 园艺学报, 2009, 36 (1): 7 - 14.
Zhang C Y, Chen X S, Lin Q, Yuan Z H, Zhang H, Zhang X Y, Liu C Q, Wu C J. SRAP markers for population genetic structure and genetic diversity in *Malus sieversii* from Xinjiang, China. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36 (1): 7 - 14. (in Chinese)

[22] 张春雨, 陈学森, 张艳敏, 苑兆和, 刘遵春, 王延玲, 林 群. 采用分子标记构建新疆野苹果核心种质的方法. 中国农业科学, 2009, 42(2): 597-604.
Zhang C Y, Chen X S, Zhang Y M, Yuan Z H, Liu Z C, Wang Y L, Lin Q. A method for constructing core collection of *Malus sieversii* using molecular markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(2): 597-604. (in Chinese)

[23] Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and sufficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993, 11: 113-116.

[24] Bendtsen J D, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: *SignalP 3. 0. Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(4): 783-795.

[25] Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrtens F, Jones J, Tonelli C, Weisshaar B, Martin C. Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 2000, 19: 6150-6161.

[26] Preston J, Wheeler J, Heazlewood J, Li S F and Parish R W. AtMYB32 is required for normal pollen development in *Arabidopsis thaliana. Plant Journal*, 2004, 40(6): 979-995.

[27] Aharoni A, de Vos R C H, Wein M, Sun Z, Greco R, Kroon A, Mol J N, O'Connell A P. The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant Journal*, 2001, 28(3): 319-332.

[28] 曹冬梅, 许雪峰, 韩振海. 苹果属小金海棠转录因子 M xMYB1 基因的克隆及其原核表达. 园艺学报, 2006, 33 (4): 833-835.
Cao D M, Xu X F, Han Z H. Identification and prokaryotic expression of transcription factor MxMYB1 gene in *Malus xiaojinensis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2006, 33 (4): 833-835. (in Chinese)

[29] 杜　海, 刘　蕾, 唐晓凤, 赵艳丽, 高　杰, 吴燕民, 黄玉碧, 唐益雄. 大豆 MYB 转录因子 GmMYBZ2 的鉴定、突变分析及原核表达. 农业生物技术学报, 2009, 17 (2): 301-306.
Du H, Liu L, Tang X F, Zhao Y L, Gao J, Wu Y M, Huang Y B, Tang Y X. Characterization and mutation of soybean MYB transcription factor GmMYBZ2 and its prokaryotic expression. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2009, 17 (2): 301-306. (in Chinese)

（责任编辑　曲来娥）