

三七 *PnMYB1R1* 基因的克隆、亚细胞定位与不同胁迫下的表达分析

石 玥^{1#}, 满金辉^{1#}, 江伟业¹, 张靖晗¹, 张志飞¹, 尹光耀¹, 王 馨¹, 黄钰莹¹,
张 媛^{1,3}, 王晓晖^{1,2*}, 魏胜利^{1,3*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 北京中医药大学中药学院中药现代研究中心, 北京 100029;
3. 中药材规范化生产教育部工程研究中心, 北京 100102)

摘要: MYB 转录因子是植物中最大的转录因子家族之一, 在植物信号转导、生长发育和植物防御反应中起到重要作用。本研究以三七 (*Panax notoginseng*) 为材料, 设计特异引物, 克隆了三七中 1R-MYB 转录因子 *PnMYB1R1* 基因, 并进行氨基酸序列分析、原核表达和纯化、亚细胞定位、转录活性分析、组织特异性分析及非生物胁迫下的诱导表达分析。*PnMYB1R1* 基因开放阅读框 (ORF) 长 738 bp, 编码 245 个氨基酸, 蛋白分子质量 27.0 kD。序列分析及系统进化树结果表明 *PnMYB1R1* 包含 1 个保守的 R3 结构域, 属于 1R-MYB 型转录因子中的 TRF-like 类蛋白。构建原核表达载体 pET28a-*PnMYB1R1* 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中成功表达 *PnMYB1R1* 重组蛋白, 纯化得到可溶性重组蛋白。亚细胞定位实验结果表明 *PnMYB1R1* 定位于植物细胞的细胞核中。转录活性分析显示 *PnMYB1R1* 转录因子具有转录激活活性。实时荧光定量 PCR 结果表明 *PnMYB1R1* 基因在三七主根中表达量最高, 茎、叶次之, 须根中表达量最低。盐、低温及干旱胁迫均能够影响主根、须根、茎、叶中 *PnMYB1R1* 基因的表达水平, 其中盐胁迫能够显著提高主根、须根、茎和叶中 *PnMYB1R1* 基因的表达水平。本研究为进一步揭示 1R-MYB 转录因子在三七中防御反应中作用奠定基础。

关键词: 三七; *PnMYB1R1*; 原核表达; 亚细胞定位; 转录活性; 表达分析

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)05-1506-10

Cloning and subcellular location of the *PnMYB1R1* gene from *Panax notoginseng* and expression analysis with different stresses

SHI Yue^{1#}, MAN Jin-hui^{1#}, JIANG Wei-ye¹, ZHANG Jing-han¹, ZHANG Zhi-fei¹, YIN Guang-yao¹,
Wang Xin¹, HUANG Yu-ying¹, ZHANG Yuan^{1,3}, WANG Xiao-hui^{1,2*}, WEI Sheng-li^{1,3*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. Engineering Research Center of Good Agricultural Practice for Chinese Crude Drugs of Ministry of Education, Beijing 100102, China)

Abstract: MYB transcription factors, one of the largest transcription factor families in plants, play an important role in signal transduction, plant growth and plant resistance. In this study a full-length cDNA of the *PnMYB1R1* gene was cloned from *Panax notoginseng*. Sequence analysis, prokaryotic expression and purification, subcellular location, transcriptional activity analysis, tissue-specific analysis and expression analysis under different abiotic stresses was performed. The open reading frame (ORF) of *PnMYB1R1* gene was 738 bp, encoding a protein of 245

收稿日期: 2021-11-11; 修回日期: 2021-11-22.

基金项目: 北京市科学技术委员会基金资助项目 (Z201100005420005).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: wsl7491@126.com; wangxhui2014@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1617

amino acids with a predicted molecular mass (MW) of 27.0 kD. The sequence analysis and polygenetic analysis indicated that the *PnMYB1R1* protein contains a conserved R3 domain, belonging to TRF-like protein in 1R-MYB-type transcription factors. The recombinant *PnMYB1R1* protein was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells using the prokaryotic expression vector pET28a-*PnMYB1R1* and was purified. Subcellular localization analysis showed that *PnMYB1R1* was localized in the nucleus. Transcriptional activity analysis indicated that the *PnMYB1R1* transcription factor has transcriptional activation activity. Expression analysis indicated that *PnMYB1R1* was primarily expressed in roots, followed by stems and leaves, and then rootlets. The expression level of *PnMYB1R1* in root, stems, leaves and rootlets was influenced by salt, low temperature and drought treatment, while the abundance of *PnMYB1R1* was significantly induced by salt stress in these tissues. These results provide valuable insights into the role of 1R-MYB transcription factors in plant defense.

Key words: *Panax notoginseng*; *PnMYB1R1*; prokaryotic expression; subcellular localization; transcription activity; expression analysis

三七 (*Panax notoginseng*) 是我国特有的药食两用名贵中药^[1]。三七具有显著的活血化瘀、消肿定痛的功效^[2], 并具有防止心脑血管疾病、抗心律失常、防止动脉粥样硬化、降血压、抗休克、抗癌、降血脂等功能^[3], 被称为“参中之王”。云南省是三七道地产区^[4], 云南省位于高原季风气候区, 易形成“焚风效应”^[5]。受全球气候变暖和厄尔尼诺事件影响, 云南省已连续5年以上遭受干旱^[6]。三七在干旱胁迫下生长发育迟缓, 产量降低, 并且连年干旱气候已对三七种植生产及品质造成了严重影响^[7]。三七生长周期长, 生长环境苛刻, 喜温暖稍阴湿的环境, 忌严寒和酷暑, 对高温干旱敏感^[8]。土壤中所含的盐分与植物的生长有直接联系, 当土壤含盐量处于0.2%~0.5%时, 会延缓植物的生长发育^[9]。当土壤含盐量大于0.5%时, 植物生长发育则会受到抑制。当棉花种植土壤含盐量大于0.5%时, 棉花干物质的积累量急剧下降^[10]。如果土壤盐分超出其耐受程度, 也会使三七生长发育延缓。三七种植区内部海拔变化较大, 当换季时, 低温灾害时有发生^[11]。因此通过转录组数据分析、实时荧光定量PCR分析、转基因技术等分子生物学技术寻找与三七干旱胁迫、盐胁迫、低温胁迫的相关基因, 有利于丰富三七防御反应机制的研究, 同时通过基因工程等手段为选育三七抗逆优良品种, 提高三七产量和品质提供有利的科学支撑。

MYB转录因子是含有MYB结构域的一类转录因子, 是植物特有的一大类转录因子家族^[12,13]。MYB转录因子N端含保守的DNA结合结构域—MYB结构域^[14], 它具有特异性, 该结构域一般包括1~4个大约52个氨基酸的序列重复(R), 每个重复形成3个 α 螺旋。其中每个重复的第二和第三个 α 螺旋构成了一个螺旋-转角-螺旋(HTH)结构。根据MYB结构域数目, MYB转录因子家族可分为4个亚类^[15]: 第一亚类

含有一个MYB结构域(1R-MYB亚类); 第二亚类含有两个MYB结构域(R2R3-MYB亚类); 第三亚类是含有3个MYB结构域的R1R2R3-MYB亚类; 第四亚类是包含4个MYB结构域的MYB亚类, 含有4个类似R1/R2的重复结构域。4个亚类中每个MYB结构折叠成螺旋-转角-螺旋(HTH)的形式与DNA结合^[16]。随着基因组测序技术的发展, 逐渐在多种植物中鉴定了1R-MYB亚类转录因子, 如玉米^[17]、山楂^[18]、葡萄^[19]等植物。研究表明1R-MYB转录因子在植物防御中起到重要作用。如大豆的*GmMYB174*基因在脱落酸(abscisic acid, ABA)和干旱处理下其表达量下调, 盐胁迫下其表达量上调, 表明不同胁迫下该基因表达模式不相同^[20]; 重金属镉胁迫及冷、热胁迫均能够显著抑制三叶草中*TrMYB1R1*的表达量^[21]; 除此之外, 低温亦能够显著诱导蒙古沙冬青的*AmMYB1R*的表达^[22]。

Li等^[23]、Ma等^[24]研究表明1R-MYB转录因子在植物防御反应中起到重要的作用。三七主根为三七药材的主要药用部位, 具有“活血化瘀、消肿止痛”的功效, 因此筛选主根中与植物防御反应相关的1R-MYB转录因子对提高三七产量和抗胁迫能力具有重要作用。但是目前在三七中关于1R-MYB转录因子抵御逆境胁迫的研究较少。本研究从三七中扩增得到一个1R-MYB转录因子*PnMYB1R1*, 并对其进行生物信息学分析、原核表达分析、亚细胞定位、转录活性分析及在不同非生物胁迫下的表达分析, 有利于丰富1R-MYB转录因子在植物防御反应中的重要作用研究, 为后续的三七抗胁迫机制研究奠定基础。

材料与方法

材料 两年生三七栽培种苗于2021年4月从云南省文山壮族苗族自治州文山市德厚镇乐龙村移植, 种植于北京中医药大学中药学院温箱, 温箱环境为温度

25 °C, 湿度 40%, 弱光照, 光照时长 14 h。成活后于 2021 年 4 月选取 3 株三七新鲜植株, 用蒸馏水清洗 3 次后, 用 75% 乙醇对其消毒, 分别采集三七的主根、须根、茎、叶新鲜样品提取总 RNA, 检测 *PnMYB1R1* 在不同器官中的特异性表达。并选取长势相同的三七, 采用水培的方法, 对其进行干旱 (2% PEG6000)、盐 (NaCl 150 mmol·L⁻¹)、低温 (4 °C) 3 种非生物胁迫处理, 在处理 0、12、24、36、48 h 提取 RNA 作为样品检测 *PnMYB1R1* 基因在各种处理下的表达差异, 每组 3 个样品, 实验重复 3 次。其中, 每个处理组培养液用量均为 1 L, 干旱胁迫 PEG6000 用量为 20 g, 盐胁迫中 NaCl 用量为 8.76 g。所用的菌种为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 (DE3) 购自北京全式金科技有限公司, pET28a、pGBKT7、pCAMBIA1300-35S-GFP 载体, Y2H Gold 菌株购自武汉生物转导实验室有限公司。pMD19-T、LA-Taq 聚合酶、*Kpn* I、*Bam* H I、*Xho* I、*Eco* R I 和 *Pst* I 限制性内切酶 (TaKaRa, 中国), 琼脂糖 (Biowest Agrose, 西班牙), 核酸 Marker 和核酸染料购自 (北京拜尔迪生物科技有限公司), 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成。

仪器 冷冻高速离心机 (TGL-16, 湘仪离心机仪器有限公司), 电热恒温水浴锅 (HH-S4A, 北京科伟永兴仪器有限公司), 涡旋器 (GL-88B, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司), 电子天平 (PL602E, METTLER TOLEDO), 凝胶成像仪 (WD-9413B, 北京六一生物科技有限公司), 电泳仪 (JY300E, 北京君意东方电泳设备有限公司), 超微量分光光度计 (NanoDrop one, Thermo Fisher), PCR 仪 (T100, Bio-Rad), 激光共聚焦显微镜 (FV10), 实时荧光定量 PCR 仪 (CFX96, Bio-Rad), 恒温震荡培养箱 (HZQ-211C, 上海一恒)。

三七主根、须根、茎及叶中 RNA 的提取和 cDNA 的合成 按照植物 RNA 提取试剂盒 (Tiangen, 中国) 实验操作步骤进行植物总 RNA 提取, 利用 NanoDrop one 检测 RNA 浓度, 同时利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量。利用 GoScript Reverse Transcription System 反转录试剂盒 (Promega, 美国) 将三七总 RNA 反转录为第一链 (cDNA), 反转录条件按照说明书进行。

三七 *PnMYB1R1* 基因序列全长克隆 从三七主根高通量测序结果中, 筛选得到一个表达量较高的由表达序列标签拼接而成的序列, 经注释分析发现为具有完整开放阅读框的 *PnMYB1R1* 基因, 依据两端序列设计特异性引物 PnMYB1R1-F1、PnMYB1R1-R1, 序列见表 1。以三七主根 cDNA 为模板, 按照下列体系对 *PnMYB1R1* 基因进行扩增: cDNA 1 μ L、10 \times LA-Taq

buffer 5 μ L、dNTP Mix (2.5 mmol·L⁻¹) 4 μ L、LA-Taq (2.5 U· μ L⁻¹) 0.5 μ L、10 μ mol·L⁻¹ 正反引物各 1 μ L, 终体积为 50 μ L。反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 然后进行 30 个循环, 94 °C 1 min, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 循环结束后 72 °C 延伸反应 10 min, 4 °C 保存。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 凝胶成像分析系统检测, 目的片段回收和纯化按照产物纯化试剂盒 (Vazyme, 中国) 进行。将回收后的 PCR 产物与 pMD19-T 连接, 转化到 DH5 α 菌株, 在氨苄抗性的平板上进行筛选, 并经过菌落 PCR 检测后送北京六合华大有限公司测序。

三七 *PnMYB1R1* 生物信息学分析 通过在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白结构, 分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质分子质量、理论等电点及稳定性等参数; 通过 ExPASy 中的 SOPMA 工具 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析蛋白质序列的二级结构; 利用软件 TMHMM 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 进行蛋白质跨膜结构分析; 将所获得的 *PnMYB1R1* 基因编码的氨基酸序列在 GenBank 数据库中进行 Blast P 分析, 选取排名前 5 即相似性最高的 5 条序列进行分析。利用 DNAMAN 对 *PnMYB1R1*、茶 (*Camellia sinensis*) *CsMYB41*、河岸葡萄 (*Vitis riparia*) *VtMYB17*、胡桃 (*Juglans regia*) *JrMYB17* 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析; 通过 MEGA 6.0 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, 进化距离的计算采用泊松校正法, Bootstrap 重复次数为 1 000 次。

三七 *PnMYB1R1* 的亚细胞定位 为探究 *PnMYB1R1* 的亚细胞定位情况, 利用引物 PnMYB1R1-F2、PnMYB1R1-R2 (表 1) 扩增 *PnMYB1R1* 基因全长, 利用 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切包含有目的基因 *PnMYB1R1* 的 PCR 产物及双元载体 pCAMBIA1300-35S-GFP, 酶切产物纯化后, 利用 T4 DNA 连接酶, 将酶切 PCR 产物与酶切载体连接, 连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。转化后挑取单克隆菌斑进行菌落 PCR、测序鉴定, 对测序鉴定正确的菌斑进行摇菌扩大培养, 提取质粒 pCAMBIA1300-35S-GFP-PnMYB1R1, 将重组质粒与细胞核标记物 (Osgd7^[25]) 共转化拟南芥原生质体, 弱光下培养 8~10 h, 利用激光共聚焦显微镜检测拟南芥原生质体中融合蛋白的分布。

三七 *PnMYB1R1* 原核表达载体的构建及异源表达 利用引物 PnMYB1R1-F3、PnMYB1R1-R3 扩增 *PnMYB1R1* 基因的全长 (表 1)。利用 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切包含有目的基因的 PCR 产物及表达载体 pET-28a, 酶切产物经过纯化后, 利用 T4 连接酶进行连接, 连接

产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 经菌落 PCR、测序后提取质粒 pET28a-PnMYB1R1, 将质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞。挑取单菌落接种于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 活化过夜, 然后按照 1:100 比例加入新鲜的含有卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6, 调节温度为 16 °C, 加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG) 后振荡培养 24 h。之后 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心收集大肠杆菌, 悬浮于 40 mmol·L⁻¹ KPB 缓冲液 (pH 7.9, 含有 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 5 mmol·L⁻¹ 咪唑) 中。将菌体放置于冰上, 利用超声破碎仪 (Colo Parmer) 破碎细胞, 之后 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 以上。取上清液, 利用镍离子亲和色谱纯化 PnMYB1R1 蛋白, 先以 20 mmol·L⁻¹ KPB 缓冲液 (pH 7.9, 含有 500 mmol·L⁻¹ NaCl 和 40 mmol·L⁻¹ 咪唑) 洗脱目的蛋白, 利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达。

三七 PnMYB1R1 转录活性分析 利用引物 PnMYB1R1-F4、PnMYB1R1-R4 (表 1) 扩增 *PnMYB1R1* 基因全长, 利用 *EcoR I* 和 *Pst I* 双酶切包含有目的基因 *PnMYB1R1* 的 PCR 产物及 pGBKT7 载体, 酶切产物纯化后, 利用 T4 DNA 连接酶, 将酶切 PCR 产物与酶切载体连接, 连接产物转入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 挑取经过菌落 PCR、测序鉴定正确的单克隆, 提取质粒 pGBKT7-PnMYB1R1, 将重组质粒转化酵母菌 Y2H Gold 酵母菌感受态细胞, 同时将阴性对照 pGBKT7 及阳性对照 pGBKT7-53 转入 Y2H Gold 酵母菌感受态细胞中, 30 °C 培养 2~3 天后进行菌落 PCR, 以确定 pGBKT7-PnMYB1R1 成功转入酵母菌中。将含有重组质粒的酵母菌于 SD/-Ade/-His/-Trp/X-α-gal 上划线, 观察其菌斑颜色情况。

三七 PnMYB1R1 基因在不同组织和不同胁迫处理下的表达分析 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 的方法检测三七 *PnMYB1R1* 基因在主根、须根、茎、叶中和干旱胁迫、盐胁迫、低温

胁迫处理下的表达情况, 每组 3 个样品, 重复 3 次。分析使用 SYBR Green I 荧光染料法, 在 qRT-PCR 仪上进行。选取三七 *PnAct2* 基因作为目标基因定量表达的内参基因, 引物序列见表 1。反应体系中含有 10 μL STBR Premix Ex Taq 酶、上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.4 μL、模板 0.5 μL, 总体积为 20 μL。反应程序是: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火/延伸 30 s (每次循环后采集荧光), 40 个循环后, 95 °C 变性 10 s, 65~95 °C 做熔解曲线分析, 每个温度以每步 0.5 °C 上升, 每个温度停留 5 s。根据熔解曲线判断 RT-PCR 产物的特异性, 相对定量分析采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行分析。

结果与分析

1 三七 PnMYB1R1 基因全长 cDNA 的克隆

本研究筛选了一个在主根中表达量最高并包含完整开放阅读框 (ORF) 的 1R-MYB 转录因子序列, 以三七主根的 cDNA 为模板进行扩增, 利用 RT-PCR 方法扩增后得到约 750 bp 片段, 扩增结果见图 1。将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上, 测序结果经过 NCBI 的 BLAST 比对, 确定该扩增产物是 1R-MYB 类转录因子基因的全长, 基因命名为 *PnMYB1R1*, 其序列长度为 738 bp, 编码 245 个氨基酸。

2 PnMYB1R1 的生物信息学分析

2.1 PnMYB1R1 理化性质分析和跨膜区域分析 通过 ProtParam 软件预测 *PnMYB1R1* 基因编码的蛋白

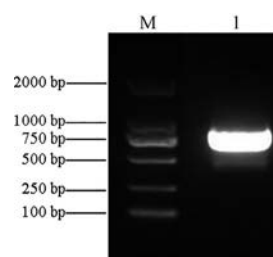


Figure 1 PCR amplification of *PnMYB1R1*. M: DNA marker

Table 1 Primers sequences. The red flag means the restriction enzyme sites, blue marking suggested translation initiation codon ATG

Primer role	Primer name	Primers sequence (5'-3')
Sequence	PnMYB1R1-F1	ATGCTTGGCAACAGGTACACCTCAC
Amplification	PnMYB1R1-R1	TCAGTAAAAATTGCAGGAGCAG
	PnMYB1R1-F2	ACGGGGGACGAGCTC GGTACC ATGCTTGGCAACAGGTAC
	PnMYB1R1-R2	TCGTCGACTCTAGAGGATCCTCAGTTAAAAATTGCAGGAGC
	PnMYB1R1-F3	CCG GAATTC ATGCTTGGCAACAGGTACACCTCAC
	PnMYB1R1-R3	CCGCTCGAGTCAGTTAAAAATTGCAGGAGCAG
	PnMYB1R1-F4	TGGCCATGGAGGCC GAATTC ATGCTTGGCAACAGGTAC
	PnMYB1R1-R4	TAGTTATGCGGCCGCTGCAGTCAGTTAAAAATTGCAGGAGC
	qRT-PCR	PnACT2-F
PnACT2-R		AACCTCTCAAAGAGAATTTCTGAGT
PnMYB1R1-F5		CGATGGAAGAAGTATAACGAC
PnMYB1R1-R5		GCTTGAGAGATTGGACTTTGAC

理化性质。推测 *PnMYB1R1* 编码的蛋白分子式为 $C_{1180}H_{1813}N_{329}O_{381}S_9$, 总原子数为 3 712, 相对分子质量为 26 992.89, 理论等电点为 5.23, 不稳定系数为 58.51, 属于不稳定蛋白, 总亲水性为 -0.490, 为亲水性蛋白。利用 TMHMM2.0 预测三七 *PnMYB1R1* 蛋白含有一个跨膜区域。

2.2 *PnMYB1R1* 蛋白的二级结构分析 采用 ExPASy 中的 SOPMA 工具预测 *PnMYB1R1* 基因编码蛋白的二级结构, 结果显示 *PnMYB1R1* 蛋白的二级结构是由 49.80% 的随机卷曲 (random coil)、39.18% 的 α -螺旋 (α -helices)、8.98% 的延伸链 (extended strand) 和 2.04% 的 β -折叠 (β -turn) 组成 (图 2), 推测随机卷曲是其最多二级结构元件, 而 α -螺旋、延伸链和 β -折叠散布于整个蛋白中。

2.3 三七 *PnMYB1R1* 氨基酸序列分析和系统进化树分析 将三七 *PnMYB1R1* 氨基酸序列在 GenBank 数据库中进行 Blast P 分析, 选取排名前 5 即相似性最高的 5 条序列进行分析 (图 3)。多重序列比对发现三七 *PnMYB1R1* 中含有一个保守的 R3 结构域, 符合第一类转录因子的特征, 属于 1R-MYB 型转录因子; *PnMYB1R1*

与茶 (*Camellia sinensis*) *CsMYB41*、河岸葡萄 (*Vitis riparia*) *VtMYB17*、胡桃 (*Juglans regia*) *JrMYB17* 的相似性分别为 65%、64% 和 63% (图 3)。除此之外, 为进一步了解三七 *PnMYB1R1* 在植物 1R-MYB 家族中的进化位置, 从拟南芥数据库 (<https://www.arabidopsis.org/>) 下载拟南芥中所有的 1R-MYB 氨基酸序列, 利用 MEGA6.0 软件将其与 *PnMYB1R1* 序列构建系统进化树 (图 4), 参考拟南芥 MYB-related 类转录因子的分类依据^[26], *PnMYB1R1* 属于 TRF-like 类蛋白。

3 *PnMYB1R1* 原核表达分析

将原核表达载体 pET28a-*PnMYB1R1* 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 于 $0.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG、 $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 诱导 24 h 后进行蛋白的原核表达诱导。由于重组 *PnMYB1R1* 蛋白的氨基酸序列 N 端带有一个 6 个 His (组氨酸) 的标签, 通过镍离子亲和色谱纯化 *PnMYB1R1* 蛋白, 利用 SDS-PAGE 检测发现在 27 kD 左右出现一条 *PnMYB1R1* 蛋白纯化条带 (图 5)。

4 三七 *PnMYB1R1* 的亚细胞定位分析

为了探究三七 *PnMYB1R1* 的作用位置, 对其进行亚细胞定位的考察。Li 等^[26]研究表明 *Osgd7* 定

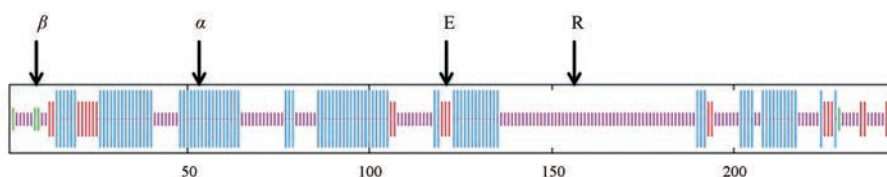


Figure 2 Predicted secondary structure of *PnMYB1R1* protein with SOPMA. α : α -Helices; β : β -Turn; E: Extended strand; R: Random coil

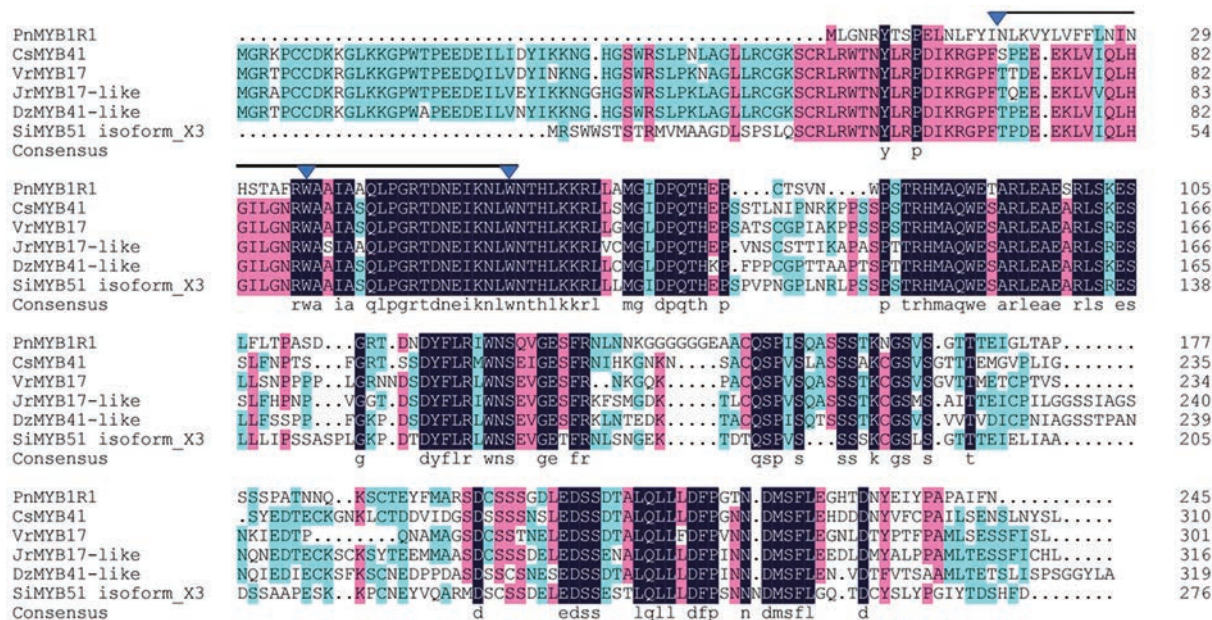


Figure 3 Multiple sequence alignment of *PnMYB1R1* and MYB from other plants. Black shading indicates amino acid identities, red and blue shading indicates amino acid with different similarity. The conserved R3 domain of MYB proteins are shown with black line. *Pn*: *Panax notoginseng*; *Cs*: *Camellia sinensis*; *Vr*: *Vitis riparia*; *Jr*: *Juglans regia*; *Dz*: *Durio zibethinus*; *Si*: *Sesamum indicum*

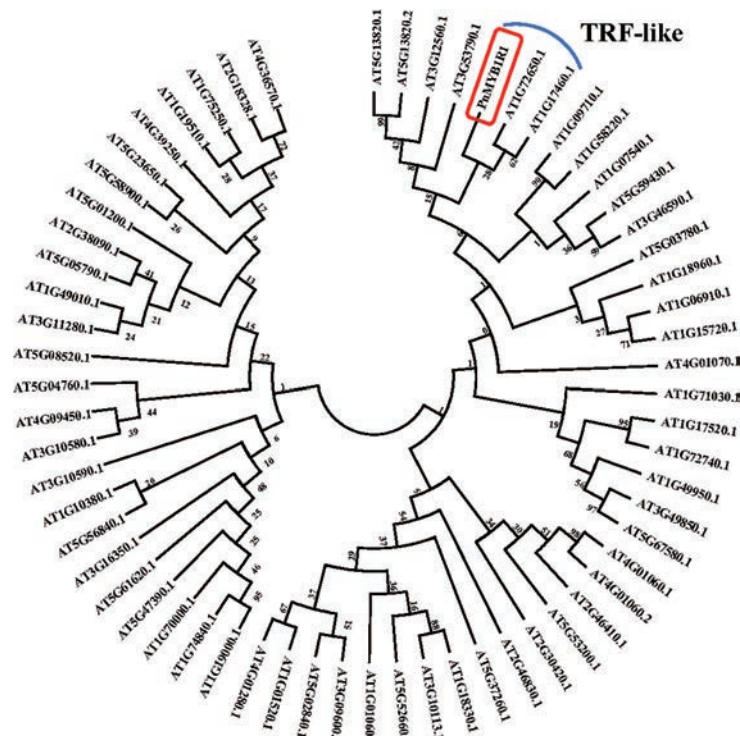


Figure 4 Phylogenetic analysis of PnMYB1R1 and 1R-MYB proteins from *Arabidopsis thaliana*

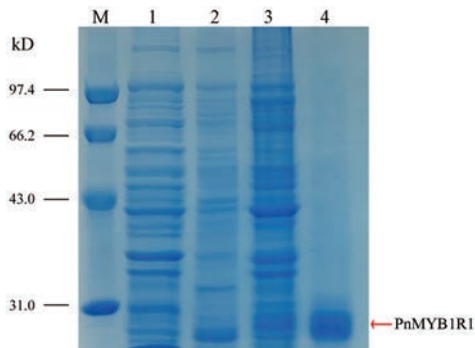


Figure 5 SDS-PAGE analysis of recombinant PnMYB1R1 protein. M: Marker; 1: Uninduced *E. coli* containing pET28a-PnMYB1R1; 2: Soluble protein from induced *E. coli* containing pET28a-PnMYB1R1; 3: Insoluble fraction from the induced *E. coli* containing pET28a-PnMYB1R1; 4: The purified recombinant PnMYB1R1 protein

位在细胞核, 本研究将其作为细胞核标记物, 并将其与红色荧光蛋白序列融合。结果显示 PnMYB1R1-pCambia1300-35S-GFP 融合蛋白主要分布于细胞核中, 能够与 *Oshd7* 共定位于细胞核, 而含有 *gfp* 基因的 pCambia1300-35S-GFP 载体注射后荧光分布在细胞核、细胞质和细胞上 (图6), 这些结果表明 PnMYB1R1 主要定位于植物细胞的细胞核中。

5 三七 PnMYB1R1 转录活性分析

为了研究三七 PnMYB1R1 的转录活性, 构建 PnMYB1R1-pGBKT7 重组质粒。将 pGBKT7-pGBKT7-

53、PnMYB1R1-pGBKT7 质粒成功转入 Y2H Gold 酵母菌中; 之后以 pGBKT7 为阴性对照, pGBKT7-53 为阳性对照, 在 SD/-Trp-His-Ade+X- α -gal 的培养基上进行培养, 实验结果表明, 含有阳性对照 pGBKT7-53 及 PnMYB1R1-pGBKT7 重组质粒酵母菌均可 SD/-Trp-His-Ade+X- α -gal 培养基生长并且变蓝, 含有 pGBKT7 的阴性对照酵母菌不能在该培养基上生长, 这些结果说明 PnMYB1R1 可以激活下游报告基因 *his3* 和 *Laz* 的表达, 即 PnMYB1R1 蛋白具有转录激活活性 (图7)。

6 PnMYB1R1 基因在不同组织中的表达分析

利用荧光定量 PCR 检测 PnMYB1R1 基因的组织特异性表达, 结果显示 PnMYB1R1 基因在三七所有组织中均有表达, 在主根中表达最高, 茎次之, 在须根和叶中表达最低, 分别为主根的 13.61% 和 16.94%, 说明 PnMYB1R1 基因表达具有器官特异性 (图8)。

7 PnMYB1R1 基因在不同非生物胁迫诱导下的表达分析

为验证三七 PnMYB1R1 在植物防御反应中的作用, 对两年生三七分别进行盐、干旱及低温处理。以 0 h 处理的三七样品为对照, 不同时间点取样提取三七主根、须根、茎、叶的 RNA 后进行实时荧光定量 PCR 分析, 检测 PnMYB1R1 的表达水平。盐胁迫能够显著影响 PnMYB1R1 表达, 主根中 PnMYB1R1 的表达水平在 36 h 内显著上升, 36 h 达到最高, 是 0 h 该基因表达量

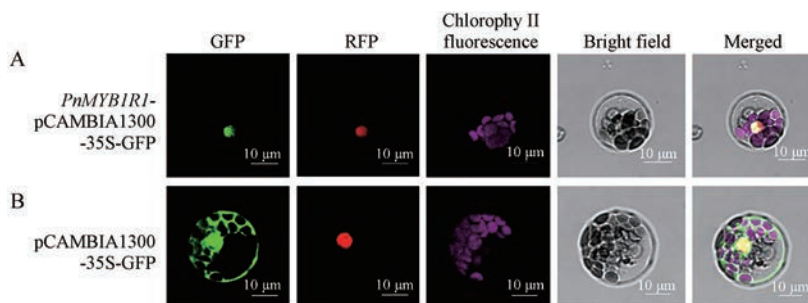


Figure 6 Subcellular localization of pCAMBIA1300-35S-GFP-PnMYB1R1 fusion proteins in *Arabidopsis thaliana* leaves. A: pCAMBIA1300-35S-GFP-PnMYB1R1; B: pCAMBIA1300-35S-GFP. Bars = 10 μm

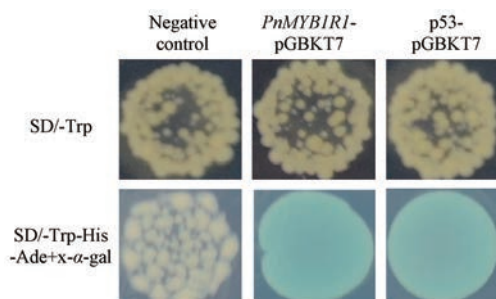


Figure 7 Transcription activity of pGBKT7-PnMYB1R1 fusion proteins in Y2H Gold

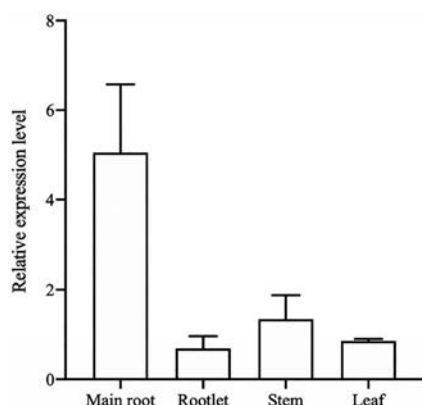


Figure 8 Relative expression level of *PnMYB1R1* gene in different tissue. Repeat 3 samples, each for 3 times

的3.1倍;须根、茎、叶 *PnMYB1R1* 基因的表达量在12 h内显著升高,并在12 h达到最高水平,分别为0 h表达量的4.3倍、9.7倍和4.6倍,随后表达量降低(图9A)。低温胁迫下,主根中 *PnMYB1R1* 基因表达水平在24 h内显著升高,并在24 h表达量达到最高,是0 h表达量的2.3倍;须根 *PnMYB1R1* 基因的表达量在12 h内达到最高,是0 h表达量的5.6倍,之后表达水平逐渐降低;茎中 *PnMYB1R1* 基因的表达量在12 h达到最高,是0 h该基因表达量5.4倍,之后逐渐降低,在48 h时表达量又显著上升,呈现双峰现象;叶片中 *PnMYB1R1* 基因的表达量在24 h内逐渐降低,之后在36 h上升到最

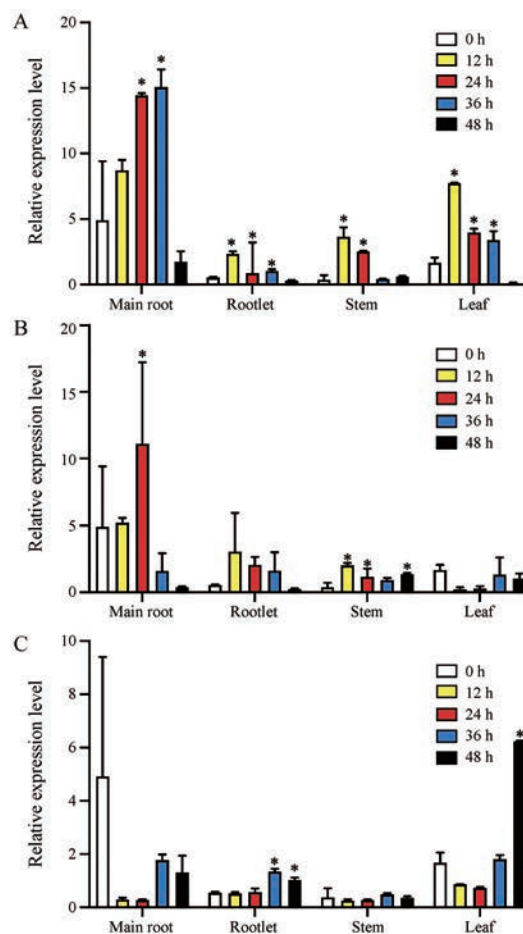


Figure 9 Relative expression level of *PnMYB1R1* gene under different abiotic stresses (A: Salt stress; B: Cold stress; C: Drought stress) in *Panax notoginseng*. Note: Repeat 3 samples, each for 3 times, * indicates the means are significantly different between 0 h and other treatments at $P < 0.05$, which evaluated by one way ANOVA in SPSS

高,然后逐渐降低(图9B)。干旱胁迫下,主根和茎中 *PnMYB1R1* 基因的表达量在24 h内逐渐降低,36 h升高,并达到表达量最高,之后逐渐降低;须根中 *PnMYB1R1* 基因的表达量在12 h内降低,之后逐渐升高,36 h显著升高并达到表达量最高,之后逐渐降低;叶中 *PnMYB1R1*

基因的表达量在 24 h 内逐渐降低, 之后逐渐升高, 并在 48 h 显著升高达到最高, 为 0 h 该基因的表达量 3.1 倍 (图 9C)。这些实验结果表明盐、冷和干旱胁迫均能够影响主根、须根、茎和叶中 *PnMYB1R1* 基因的表达量, 其中盐胁迫能够显著影响主根、须根、茎和叶中 *PnMYB1R1* 基因的表达水平。

讨论

MYB 转录因子家族作为植物中一类重要的转录因子家族^[27], 其在植物生长发育、次生代谢调控及植物防御反应中起到重要的作用。根据 MYB 保守结构域的数目, 将其分为 4 个亚类^[5], 目前研究最多的是 R2R3-MYB 型转录因子, 关于 1R-MYB 转录因子的研究相对比较少。随着基因组学研究的进步, 1R-MYB 转录因子逐渐从多个植物中鉴定出来, 如马缨杜鹃^[28]中鉴定了 85 个 1R-MYB 转录因子, 山楂^[18]中鉴定了 35 个 1R-MYB 转录因子, 葡萄^[19]中鉴定了 109 个 1R-MYB 转录因子。Deng^[12]发现 R2R3-MYB 转录因子在三七皂苷生物合成过程中起到重要作用^[29], 但是关于三七中 1R-MYB 转录因子的研究尚未见报道。本研究根据转录组测序结果, 通过 RT-PCR 从三七主根中克隆到 *PnMYB1R1* 的全长 cDNA 序列。*PnMYB1R1* 含有一个保守的 R3 结构域, 属于 1R-MYB 转录因子, 与茶 (*Camellia sinensis*)、河岸葡萄 (*Vitis riparia*)、胡桃 (*Juglans regia*) 1R-MYB 转录因子具有较高的同源性。首次在大肠杆菌中异源表达了三七 *PnMYB1R1* 蛋白, 重组蛋白以可溶性蛋白存在, 为进一步研究 *PnMYB1R1* 的生物学功能奠定了基础。

大量证据表明 1R-MYB 蛋白定位于植物细胞核。例如漆树 *TvMYB1*^[23]的 *TvMYB1*、掌叶大黄 *RpMYB4*^[30]等都能够定位于植物的细胞核中。本研究中将 *PnMYB1R1* 构建到含有 GFP 的双元表达载体上, 利用拟南芥瞬时表达系统实验证明 *PnMYB1R1* 主要定位于细胞核中。MYB 转录因子具有转录激活活性或者转录抑制活性, 如拟南芥 *AtMYB203* 和白菜 *BcMYB1R203* 均为 1R-MYB 转录因子, 具有转录激活活性^[31]; 大豆 *GmMYBZ2* 对目的蛋白的转录活性具有抑制作用^[32]。将 *PnMYB1R1* 序列构建到载体 pGBKT7 上, 转化酵母菌株, 结果表明 *PnMYB1R1* 具有转录激活活性, 可以与下游基因启动子结合, 调控下游基因的表达。不同植物 MYB 转录因子在不同组织器官中具有不同的表达模式, 基因的表达模式可以预测基因的功能。如小麦中 1R-MYB 转录因子 *TaLHY* 在叶、茎和茎尖中的表达量相似, 但是在根中表达量最低, 说明 *TaLHY* 主要在叶、茎和茎尖中发挥功能^[33]。在本研究中, 三七 *PnMYB1R1* 基因也具

有器官特异性, 在主根中三七表达量最高, 茎、叶次之, 须根中 *PnMYB1R1* 表达量最少, 因此 *PnMYB1R1* 基因主要在主根中发挥作用。

1R-MYB 转录因子在植物防御反应中起到重要作用。如小麦中 1R-MYB 转录因子 *TaLHY* 在抗条锈菌中起到重要作用^[33]; 鹰嘴豆中的 1R-MYB 转录因子 *TUS38128* 在干旱胁迫下表达量显著上升^[34]; 当水稻中 *OsMYB48* 基因过表达时, 植株抗旱性增强, 促进体内内源基因的积累^[35]。近期的研究也表明不同胁迫下 1R-MYB 转录因子的表达具有器官特异性, 如干旱处理可使漆树根中 *TvMYB1* 的表达量先增高后降低, 但茎、叶中的表达量却呈现先下降后升高的趋势^[23]; 核桃 1R-MYB 类转录因子 *JrEFM1* 受到干旱胁迫、低温胁迫等非生物胁迫影响显著; 但不同器官受到影响程度不同, 在低温下, 核桃根中 *JrEFM1* 表达量随处理时间增加, 呈现显著升高的趋势, 但叶中的 *JrEFM1* 表达量却呈现先降低后升高的趋势^[24]。虽然植物中很多 1R-MYB 转录因子在植物防御反应中的功能被研究, 但是三七中 1R-MYB 转录因子的功能还未见报道。盐、干旱和低温胁迫是三七生长过程中最常见的非生物胁迫, 能够影响三七的生长发育和产量。本研究发现非生物胁迫下 *PnMYB1R1* 表达在不同组织和器官中出现了差异性表达, 盐胁迫能够显著提高三七主根、须根、茎、叶 *PnMYB1R1* 基因的表达水平; 低温胁迫能够显著提高三七主根、茎中 *PnMYB1R1* 基因的表达水平; 干旱胁迫, 能够显著提高三七须根中 *PnMYB1R1* 基因的表达量。本研究丰富了 1R-MYB 转录因子在植物防御反应中的功能研究, 为后续三七 1R-MYB 转录因子的功能研究和利用基因工程手段改变不同器官中 1R-MYB 转录因子表达量, 从而选育三七抗逆的优良品种, 提高胁迫下三七产量和品质提供良好的理论支撑。

作者贡献: 石玥负责 *PnMYB1R1* 转录活性验证、亚细胞定位、器官特异性分析及论文初稿撰写; 满金辉负责 *PnMYB1R1* 克隆和生物信息学分析、*PnMYB1R1* 基因不同胁迫下的表达分析及论文的初步撰写; 江伟业、张靖晗、张志飞参与进行 *PnMYB1R1* 生物信息学分析; 尹光耀、王馨、黄钰莹负责 RNA 的提取; 张媛负责三七样品的收集。魏胜利、王晓晖负责论文思路设计, 指导实验, 论文撰写与修改。所有作者参与论文修改。

利益冲突: 无相关利益冲突。

References

- [1] Ma N, Gao MJ, Zeng J, et al. Comparison of the content of saponins in fresh *Panax notoginseng* and dried *Panax notoginseng* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35: 92-93.

- [2] China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [3] Ou XH, Wang L, Guo LP, et al. Soil-plant metal relations in *Panax notoginseng*: an ecosystem health risk assessment [J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13: 1-14.
- [4] Tian M, Li LN, Yang YG, et al. Rapid characterization of saponins in fresh and steamed notoginseng root slices by liquid extraction, surface analysis-mass spectrometry [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 123-130.
- [5] Shi Y, Pu RF, Guo LP, et al. Formula fertilization of nitrogen and potassium fertilizers reduces cadmium accumulation in *Panax notoginseng* [J]. Arch Agron Soil Sci, 2020, 66: 343-357.
- [6] Cao XJ, Shen XY, Shen Q, et al. Responses of forests to pest and drought disturbance in mojiang county, yunnan province [J]. J Cent South Univ Forest Technol (中南林业科技大学学报), 2018, 38: 57-63.
- [7] Zhao SY, Xing HN, Yang QL. Effect of regulated deficit irrigation in the vegetative growth stage on the growth of *Panax notoginseng* and the microenvironment of its root zone [J]. J Hunan Agric Univ Nat Sci (湖南农业大学学报·自然科学版), 2019, 45: 94-98.
- [8] Meng XX, Huang LF, Dong LL, et al. Analysis of global ecology of *Panax notoginseng* in suitability and quality [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 51: 1483-1493.
- [9] Fan R. Several problems that should be hold in saline-alkali land greening construction [J]. J Nouth Agric (北方农业学报), 2006, 7: 225-226.
- [10] Zhang Y, Wang LH, Chen CL, et al. Soil salinity effect on germination rate and seedling growth of cotton [J]. China Cotton (中国棉花), 2009, 36: 13-16.
- [11] Zheng QT, Yang ZQ, Wang MT, et al. Effects of low temperature stress on photosynthetic characteristics of *Panax notoginseng* [J]. North Hort (北方园艺), 2020, 451: 127-134.
- [12] Deng B. Molecular Cloning and Functional Study of PnMYB 1 Transcription Factor Involved in Biosynthetic Regulation of *Panax notoginseng* Saponins (调控三七皂苷生物合成PnMYB1转录因子的克隆与功能研究) [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2017.
- [13] Chen J, Tang XH, Ren CX, et al. Cloning and expression analysis of MYB transcription factor genes in safflower [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 144-149.
- [14] Xie DJ, Ye YJ, Yang DM, et al. Identification and analysis of the R2R3-MYB transcription factor based on a transcriptome database in *Morinda officinalis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 160-167.
- [15] Wang L, Huang Q, Zhang L, et al. Genome-wide characterization and comparative analysis of MYB transcription factors in *Ganoderma* species [J]. G 3-Genes Genomes Genetics, 2020, 10: 2653-2660.
- [16] Liu SJ, Wan HJ, Ye QJ, et al. Progress of studies on MYB transcription factor family in plants [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2011, 9: 1835-1843.
- [17] Jia G, Li B, Zhang DF, et al. Cloning and characterization of a novel R1-MYB transcription factor in maize [J]. Prog Nat Sci-Mater, 2009, 19: 1089-1096.
- [18] Li XY, Yang ZY, Ji W, et al. Excavation and comparative analysis of MYB family based on hawthorn flowers with different colors [J]. J Nucl Agric Sci (核农学报), 2021, 35: 55-65.
- [19] Hou HM, Wang H, Yin XJ, et al. Expression and functional analysis of VpMYBR1 gene resistant to uncinula necator from *Vitis pseudoreticulata* [J]. Chin Agric Sci (中国农业科学), 2013, 46: 1408-1418.
- [20] Wang F, Chen HW, Li QT, et al. GmWRKY27 interacts with GmMYB174 to reduce expression of GmNAC29 for stress tolerance in soybean plants [J]. Plant J, 2015, 83: 224-236.
- [21] Jia T, Sainan MA, Yong B, et al. The clone of TrMYB1R1 from white clover and gene expression analysis [J]. Pratac Sci (草业科学), 2019, 36: 190-199.
- [22] Ren M, Li M, Jia J, et al. Cloning and expression analysis of AmMYB1R in 1R-MYB gene from *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2018, 16: 1468-1474.
- [23] Li MG, Huang XH, Li DP, et al. Identification of the TvMYB1 gene of toxicodendron vernicifluum and analysis of its drought response potential [J]. Acta Bot Boreali-Occid Sin (西北植物学报), 2021, 41: 392-397.
- [24] Ma KH, Li ZY, Li DP, et al. On expression paters of walnut R1-MYB transcription factor JrEFM1 responses to diferent streses and plant hormones [J]. J Southwest China Norm Univ (西南师范大学学报(自然科学版)), 2019,44: 46-53.
- [25] Chen Y, Yang X, He K, 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: 107-124.
- [26] Li L, He Y, Zhang Z, et al. OsNAC109 regulates senescence, growth and development by altering the expression of senescence- and phytohormone-associated genes in rice [J]. Plant Mol Biol, 2021, 105: 637-654.
- [27] Gao JJ, Shen XF, Zhang Z, et al. The myb transcription factor MdMYB6 suppresses anthocyanin biosynthesis in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2011, 106: 235-242.
- [28] Zhang WX, Wang ZB, Qian CJ, et al. Genome-wide identification and bioinformatics analysis of MYB transcriptions in *Rhododendron delavayi franch* [J]. Mol Plant Breed (分子植物育种), 2018, 16: 34-40.
- [29] Gu CM, Zhao CL, Zang LF, et al. Longitudinal changes of transcriptional levels of bHLH, MYB and WD40 and their relationships with total anthocyanin contents in the green-purple aerial stems of *Panax notoginseng* [J]. J Yunnan Agric Univ Nat

- Sci (云南农业大学学报:自然科学版), 2020: 581-590.
- [30] Li YM, Zhang N, Li H, et al. Cloning and expression characteristics of a transcription factor gene RpMYB4 in *Rheum palmatum* L. [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 1190-1177.
- [31] Shen XP. Transcriptome Analysis of Flower Buds and Characterization of Two MYB Transcription Factors Involved in Pollen Development in *Brassica campestris* (白菜花蕾转录组分析及两个花粉发育相关MYB转录因子的功能鉴定) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.
- [32] Zhou ML, Hou HL, Zhu XM, et al. Soybean transcription factor GmMYBZ2 represses catharanthine biosynthesis in hairy roots of *Catharanthus roseus* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 91: 1095-1105.
- [33] Zhang Z, Chen J, Su Y, et al. TaLHY, a 1R-MYB transcription factor, plays an important role in disease resistance against stripe rust fungus and ear heading in wheat [J]. PLoS One, 2015, 10: 1-13.
- [34] Abirami R, Himabindu K, Pazhamala LT, et al. Gene expression and yeast two-hybrid studies of 1R-MYB transcription factor mediating drought stress response in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Front Plant Sci, 2015, 6: 1-10.
- [35] Xiong HY, Li JJ, Liu PL, et al. Overexpression of OsMYB48-1, a novel MYB-related transcription factor, enhances drought and salinity tolerance in rice [J]. PLoS One, 2014, 9: e92913.