



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107523573 A

(43)申请公布日 2017. 12. 29

(21)申请号 201710804551.7

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2017.09.08

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

(71)申请人 中国农业科学院烟草研究所

地址 266100 山东省青岛市崂山区科苑经四路11号

(72)发明人 孔英珍 石大川

(74)专利代理机构 青岛华慧泽专利代理事务所
(普通合伙) 37247

代理人 刘娜 李新欣

(51) Int. Cl.

C12N 15/29(2006.01)

C07K 14/415(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

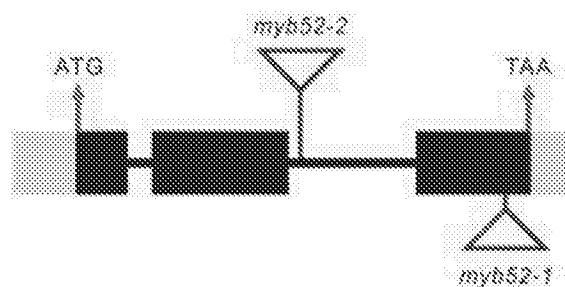
权利要求书1页 说明书6页
序列表8页 附图5页

(54)发明名称

拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52基因及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52基因在拟南芥种子粘液质形成过程中的作用及其应用,具体包括基因AtMYB52的克隆,含有该基因的表达载体构建,基因AtMYB52基因器官表达模式,AtMYB52基因突变引起的拟南芥种子粘液质的表型变化和结构改变。本发明还公开了基因AtMYB52基因突变在提高植株生物量上的应用。



1. 一种拟南芥MYB家族转录因子,其特征在于,为从拟南芥中克隆得到的基因,记为AtMYB52,其CDS序列全长750bp,其CDS序列为SEQ ID NO.1,其蛋白序列为SEQ ID NO.2。

2. AtMYB52的候选下游基因,其特征在于,包括AT5G51490, AT1G56100, SBT1.7和AT5G67360,其CDS序列分别为SEQ ID NO.3-6所示。

3. AtMYB52基因克隆的方法,其特征在于,以拟南芥基因组DNA为模板,进行基因全长的PCR扩增,所用引物序列如SEQ ID NO.7-8所示。

4. 一种检测AtMYB52基因在种子中表达模式的方法,其特征在于,使用半定量RT-PCR检测野生型、突变体、转基因植株中基因表达水平,提取相同时期总RNA反转录为cDNA作为模板进行RT-PCR, GAPC为内参基因,所用引物序列如SEQ ID NO.9-12所示。

5. 一种AtMYB52基因表达水平的检测方法,其特征在于,提取AtMYB52插入突变拟南芥发育不同时期的种子并提取其RNA,利用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,并使用不同基因的特异引物进行定量PCR检测,所用引物序列如SEQ ID NO.13-16所示。

6. 候选下游基因在AtMYB52基因突变体中的表达量分析方法,其特征在于,收集AtMYB52基因突变体的果荚,采用Trizol法提取总RNA,以提取的总RNA为模板,使用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行反转录并获取cDNA,然后进行实时荧光定量PCR检测,所用引物序列如SEQ ID NO.17-24所示。

7. 检测AtMYB52基因突变体中糖结构变化的方法,其特征在于,使用酶联免疫分析法进行检测,具体为通过提取种子表层的多糖,结合ELISA对其中所含有的糖结构进行分析,从而解析多糖组成。

8. AtMYB52基因突变体种子粘液质中甲酯化程度的测量方法,其特征在于,使用醇氧化酶氧化法以甲醇的形式释放果胶中甲酯化基团,通过鉴定甲醇含量的方法测量不同果胶的甲酯化程度的不同。

9. AtMYB52基因突变体种子粘液质中甲酯化酶活性的测量方法,其特征在于,首先提取果胶层中的蛋白,然后配置含有高甲酯化HG的琼脂糖凝胶,并在胶孔中加入提取的蛋白,使其中的甲酯化酶作用于高甲酯化的HG,最后使用钨红对凝胶进行染色,根据着色环的面积判断甲酯化酶的活性。

10. AtMYB52基因在提高植株生物量上的应用。

拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及于基因工程领域,具体为拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52基因在拟南芥种子粘液质形成过程中的作用及其应用。具体包括基因AtMYB52的克隆,含有该基因的表达载体构建,基因AtMYB52基因器官表达模式,AtMYB52基因突变引起的拟南芥种子粘液质的表型变化和结构改变。本发明还公开了基因AtMYB52基因突变和过量表达对细胞壁多糖结构的影响及相关作用可用于植物品种改良的前景。

背景技术

[0002] 陆生植物的细胞壁是在植物细胞在生长发育过程中形成的。虽然不同组织细胞的细胞壁形态各异,功能多样,但从生化组成上看,植物细胞壁主要是由多糖,蛋白质组成的坚实结构。植物细胞的细胞壁形成随着形成时间的前后以及组成结构的不同,可以分为出生细胞壁与次生细胞壁两种。所有植物细胞均会形成初生细胞壁,简单来说,初生细胞壁是半纤维素,果胶,一些糖蛋白包裹着起支撑作用的纤维素的结构。随着植物细胞的不断成熟和分化,某些植物细胞的初生细胞壁内侧会不断沉积纤维素、木质素等多糖,导致细胞壁的机械强度增加,同时失去韧性,最终形成了比初生细胞壁更加坚硬的次生细胞壁结构。虽然初生细胞壁与次生细胞壁在结构与功能上出现了显著的差异,但从本质上来说,都是由不同多糖与部分糖蛋白组成的一个完整的有机骨架,对细胞壁结构与功能的研究,从根本上来讲,就是对组成细胞壁的多糖,即纤维素,半纤维素,果胶的相互作用的细致研究。

[0003] 果胶存在于植物细胞的胞间层以及初生和次生细胞壁中,它是植物中一大类主要以半乳糖醛酸组成骨架结构的酸性多糖的所形成的复合体的统称,果胶可能是植物中迄今为止发现的成分最复杂的多糖,果胶组成可能涉及17种不同的单糖及20种各异的糖苷键。在双子叶植物和除玉米之外的单子叶植物中,果胶约占细胞壁组成的30~40%。果胶在植物中的作用也是多种多样的。首先,细胞壁中果胶的存在,使得细胞壁除了具有由纤维素和木质素产生的支撑能力,还具有一定的韧性,从而增加了植物细胞壁的抗压能力,同时影响了胞间黏着的过程;其次,果胶是植物应对病原体侵害的重要屏障,对植物的抗病机制具有重要的影响;最后,果胶自身是带有负电荷的酸性多糖,这也决定了其在金属离子的运输中起着重要的作用,影响着细胞内外的离子浓度,PH值等对植物至关重要的因素。可以说,果胶参与了植物细胞的诸多生理生化作用和过程,是植物不可缺少的重要的结构多糖。

[0004] 在果胶的组成单糖中,含量最多的是半乳糖醛酸(Galacturonic Acid, GaIA),半乳糖醛酸构成了果胶多糖的主要部分。因此,半乳糖醛酸的亲水性和酸性也使得果胶多糖具有相同的性质。除此之外,一些果胶多糖的组成中,还有一部分中性糖,如参与RG-I主链构成的鼠李糖(rhamnose),参与侧链构成的半乳糖(galactose)和阿拉伯糖(arabinose)等。根据果胶多糖大分子的成分与构成的不同,主要可以分为以下三类:同聚半乳糖醛酸聚糖(homogalacturonan, HG), I型鼠李糖半乳糖醛酸聚糖(rhamnogalacturonan I, RG-I)和II型鼠李糖半乳糖醛酸聚糖(rhamnogalacturonan II, RG-II),这三类聚糖是果胶多糖组成的主要多糖。除此之外,还有一些其他类型的多糖同样在果胶构成中起着不可忽视的作

用,如在果实和种子中含量较高的木糖半乳糖醛酸聚糖(Xylogalacturonan),以及经常与蛋白质组合在一起的阿拉伯半乳糖(Arabinogalactan)。HG是由D-半乳糖醛酸以 α -1,4糖苷键连接构成的长链大分子多糖,约占果胶多糖的65%,单一HG大分子大约是由72-100个半乳糖醛酸构成的。在HG中,约有70~80%的羧基会发生酯化作用,其中,0-6位会发生甲酯化,甲酯化作用对于HG的结构与功能,乃至果胶的构成与生理功能,均能够产生重要的影响,最近的研究表明,HG主链上连续10个未酯化的GalA残基会通过钙离子形成非共价键而使得两个HG多糖相互交联,从而形成一个更复杂、更稳定的结构,并进而影响果胶结构的稳定性。RG-I约占果胶多糖分子的20~35%,与HG和RG-II的结构不同,RG-I分子的主链是由 $[\rightarrow 2)-\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 4)-\alpha\text{-D-GalpA}-(1\rightarrow)]$ 的重复单元组成的,其半乳糖醛酸与鼠李糖残基的比例接近1:1。目前有研究认为,RG-I在果胶结构中起着骨架的作用,而HG则穿插其中,形成网状结构,维持果胶正常的形态结构。

[0005] MYB转录因子家族是植物中存在的最大的转录因子家族之一,以含有MYB结构域为共同特征。MYB结构域是一段含有约51-52个氨基酸组成的肽段,根据这个结构域的重复个数,可将MYB转录因子分为包括只含有一个R结构域的,R2R3结构域的,R1R2R3结构域的,四个类似R1/R2结构域的四亚类。这其中,R2R3-MYB转录因子是植物中数目最多的一类MYB蛋白。

[0006] 目前,在模式植物拟南芥中,总共发现了126个R2R3-MYB转录因子,广泛参与拟南芥的各种生理生化过程,如植物初生和次生代谢的调控;控制细胞的成长和分化;调控植物体对生物和非生物胁迫反应;参与植物生长过程的信号转导。大多数MYB转录因子是基因表达的正调控因子,但是也有一部分是负调控因子。目前,对于MYB转录因子在拟南芥中,乃至在苹果,棉花,烟草等经济作物中的研究,仍在不断深入。通过对MYB转录因子的调控,以达到调节植物各种生物物质的合成,进而达到改造农作物性状的目的,这在能源危机日益严重的今天,具有重要的实用和战略意义。

发明内容

[0007] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52及其编码基因,并提供该编码基因的蛋白编码序列,以及该拟南芥基因的应用。

[0008] 为达到上述目的,本发明的技术方案如下:

[0009] 本发明所提供的拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52,其CDS序列为750bp。本发明对其时空表达模式进行了细致分析,发现该基因主要在拟南芥种子中表达。对不同发育时期的拟南芥种子进行表达模式分析发现,AtMYB52在种子发育第八天时表达量最高,说明AtMYB52在拟南芥种皮发育与形态构建中起作用。通过对AtMYB52的共表达数据进行分析,发现AtMYB52与一系列参与果胶甲酯化过程的基因相关,暗示AtMYB52可能与种皮果胶质的甲酯化过程相关。通过对AtMYB52T-DNA插入突变株系的获取,本发明发现此突变体株系会导致拟南芥种皮果胶质层发生结构变化。本发明对该突变体果胶的单糖组成,甲酯化程度进行了细致分析,发现突变体中果胶的甲酯化程度出现了显著地降低,通过对甲酯化酶的活性进行检测发现,突变体中甲酯化酶的活性升高,预示AtMYB52转录因子抑制甲酯化酶的活性。这些结果表明,甲酯化作用会对种皮果胶质,进而对植物次生细胞壁,造成影响,通过控制单个转录因子的表达对植物细胞壁结构进行改造是完全可行的。

[0010] 本发明首先从拟南芥中克隆得到一个MYB转录因子家族基因AtMYB52,其CDS序列

为SEQ ID NO.1所示,其蛋白序列为SEQ ID NO.2所示。

[0011] 本发明提供了利用实时定量PCR对基因在种子中表达模式的定量分析方式,以及利用原位杂交技术对基因在种子中的原位表达进行展示。

[0012] 本发明还提供了与AtMYB52可能的候选下游基因,分别为AT5G51490,AT1G56100,SBT1.7,以及AT5G67360,其CDS序列分别为SEQ ID NO.3-6所示。

[0013] 本发明还提供了AtMYB52基因克隆的方法,以拟南芥基因组DNA为模板,进行基因全长的PCR扩增,所用引物序列如SEQ ID NO.7-8所示。

[0014] 本发明还提供了一种检测AtMYB52基因在种子中表达模式的方法,使用半定量RT-PCR检测野生型、突变体、转基因植株中基因表达水平,提取相同时期总RNA反转录为cDNA作为模板进行RT-PCR,GAPC为内参基因,所用引物序列如SEQ ID NO.9-12所示。

[0015] 本发明还提供了一种AtMYB52基因表达水平的检测方法,提取AtMYB52插入突变拟南芥发育不同时期的种子并提取其RNA,利用反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA,并使用不同基因的特异引物进行定量PCR检测,所用引物序列如SEQ ID NO.13-16所示。

[0016] 本发明还提供了候选下游基因在AtMYB52基因突变体中的表达量分析方法,收集AtMYB52基因突变体的果荚,采用Trizol法提取总RNA,以提取的总RNA为模板,使用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行反转录并获取cDNA,然后进行实时荧光定量PCR检测,所用引物序列如SEQ ID NO.17-24所示。

[0017] 本发明还提供了检测AtMYB52基因突变体中糖结构变化的方法,使用酶联免疫分析法进行检测,具体为通过提取种子表层的多糖,结合ELISA对其中所含有的糖结构进行分析,从而解析多糖组成。

[0018] 本发明还提供了AtMYB52基因突变体种子粘液质中甲酯化程度的测量方法,使用醇氧化酶氧化法以甲醇的形式释放果胶中甲酯化基团,通过鉴定甲醇含量的方法测量不同果胶的甲酯化程度的不同。

[0019] 本发明还提供了AtMYB52基因突变体种子粘液质中甲酯化酶活性的测量方法,首先提取果胶层中的蛋白,然后配置含有高甲酯化HG的琼脂糖凝胶,并在胶孔中加入提取的蛋白,使其中的甲酯化酶作用于高甲酯化的HG,最后使用钨红对凝胶进行染色,根据着色环的面积判断甲酯化酶的活性。

[0020] 本发明还包括上述基因的表达载体和细胞系。

[0021] 本发明的基因可用于提高植株生物量,对于人为干预并控制经济作物的生物量具有重要应用价值。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0023] 图1为AtMYB52基因结构图;

[0024] 图2为AtMYB52基因两个T-DNA插入突变体的种子粘液质表型分析结果图;

[0025] 图3为AtMYB52基因两个T-DNA插入突变体中基因表达量的半定量分析结果图;

[0026] 图4为拟南芥种子发育不同时期中AtMYB52的表达水平变化图;

[0027] 图5为原位杂交显示AtMYB52在种子中的表达部位显示图;

- [0028] 图6为ELISA法检测AtMYB52基因突变体中糖结构的变化图；
[0029] 图7为候选基因在AtMYB52突变体中表达量分析结果图；
[0030] 图8为各种植株种子粘液质中甲酯化程度的分析结果图；
[0031] 图9为各种植株种子粘液质中甲酯化酶活性的分析结果图；
[0032] 图10为生物量的增长量分析结果图。

具体实施方式

[0033] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0034] 下面结合具体实施例进一步阐释本发明。应理解,这些实例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实例中未注明具体的实验方法,均可按照常规方法进行。如 Sambrook等分子克隆:实验手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述条件,或按照制造生产厂商的使用说明。

[0035] 一、拟南芥AtMYB52基因的克隆

[0036] 1. 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Col0作为野生型植株,在光周期16h/8h(L/D)的长日照条件下生长,室温控制为22℃。

[0037] 2. 基因组DNA提取。取100mg左右新鲜的拟南芥植物组织材料,液氮充分研磨。加600μl CTAB提取液,65℃放置25min。加等体积氯仿异戊醇,去蛋白,12000rpm离心10min后上清转移至新的离心管,加等体积异丙醇,充分混匀,-20℃放置30min,12000rpm离心10min,弃上清,用75%乙醇1mL洗涤沉淀,重复一次。室温干燥5-10min,溶于50μL去离子水中。

[0038] 3. 基因的克隆。根据NCBI数据库中拟南芥的AtMYB52基因序列设计引物,以拟南芥基因组DNA为模板,进行基因全长的PCR扩增,序列信息参见SEQ ID NO.1。所用引物序列如SEQ ID NO.7-8所示。基因结构图见图1。

[0039] 二、AtMYB52基因两个T-DNA插入突变体的种子粘液质表型鉴定

[0040] AtMYB52基因两个T-DNA插入突变体订购自ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*),突变体号分别为saIk_138624 (AtMYB52-1) 和saIk_118938 (AtMYB52-2),鉴定突变体并获取纯合株系后获取相应种子,各取约20-30粒种子于2.0mL离心管中,加入1mL 0.01%钌红溶液(w/v),轻弹管底,使种子彻底浸于染液中,置于水平摇床上,振荡染色1h后,移去染液,加蒸馏水洗涤2次,体式显微镜下观察,结果如图2所示。

[0041] 三、AtMYB52基因两个T-DNA插入突变体中基因表达量的半定量分析

[0042] 使用半定量RT-PCR检测野生型、突变体、转基因植株中基因表达水平,提取相同时期总RNA反转录为cDNA作为模板进行RT-PCR,GAPC为内参基因,所用引物序列如SEQ ID NO.9-12所示,分析结果如图3所示。

[0043] 四、拟南芥种子发育不同时期中AtMYB52的表达水平

[0044] 1. 不同发育时期种子标记

[0045] 野生型拟南芥植株进入生殖发育阶段后,将开花时标记为0DPA (days post anthesis),依次用不同颜色丝线标记4DPA,7DPA,10DPA,13DPA发育时期果荚并收集。

[0046] 2. 拟南芥果荚总RNA提取及cDNA的合成

[0047] 拟南芥各个时期果荚总RNA提取采用Trizol法进行提取,以提取的总RNA为模板,使用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 试剂盒进行反转录并获取cDNA。

[0048] 3. 实时荧光定量PCR

[0049] 引物设计使用Beacon Designer v7.0 (Premier Biosoft International, California, USA) 软件,退火温度设置58-60℃,引物序列长度设置20-25bp,扩增序列长度设置50-200bp,拟南芥ACTIN2基因作为内参,每个反应3个技术重复,实时荧光定量PCR仪 (Roche, LightCycler480) 进行荧光定量PCR,结果分析使用程序自带软件完成。所用引物序列如SEQ ID NO.13-16所示,结果如图4所示。

[0050] 五、AtMYB52的原位表达分析

[0051] 1. 切片制备

[0052] 取标记好的4DPA、7DPA、10DPA、13DPA时期的果荚,切成8μm厚度的连续薄片,全程防止RNA酶的污染,蜡片经过展片后粘附在载玻片上并烘片。

[0053] 2. 原位杂交

[0054] 切片使用特异基因探针标记并使用地高辛抗体进行显色,加拿大树胶封片并使用体视显微镜观察结果,见图5。

[0055] 六、候选下游基因在AtMYB52突变体中的表达量分析

[0056] 1. AtMYB52突变体果荚总RNA提取及cDNA的合成

[0057] 收集AtMYB52-2突变体7DAP的果荚,采用Trizol法提取总RNA,以提取的总RNA为模板,使用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 试剂盒进行反转录并获取cDNA。

[0058] 2. 实时荧光定量PCR

[0059] 荧光定量PCR所需条件和引物设计方式参见上文,所用引物序列如SEQ ID NO.17-24所示,分析结果见图7。

[0060] 七、酶联免疫分析 (ELISA)

[0061] 1. 将拟南芥种子提取的果胶溶于水,配制成100μg/mL浓度,各取100μL铺于Costa359996孔吸附板上,4℃过夜;

[0062] 2. 移去上清,每孔加入200μL 3% (W/V) MP/PBS溶液,4℃过夜;

[0063] 3. 移去PBS溶液,洗涤3次,每孔加入100μL用MP/PBS稀释20倍的一抗溶液,37℃孵育2h;

[0064] 4. 移去一抗,洗涤3次后,每孔加入100μL稀释1000倍的偶联辣根过氧化物酶 (HRP) 抗大鼠/抗小鼠IgG二抗,37℃孵育2h;

[0065] 5. 移去上清,每孔加入150μL HRP底物 (12mL 0.1M pH5.5NaAc, 200μL TMB, 18μL 6% (V/V) H2O2), 反应5min,加入50μL 2M H2SO4终止反应;

[0066] 6. 测定OD450吸光值,分析结果见图6。

[0067] 八、果胶甲酯化测定及甲酯化酶活性分析

[0068] 1. 果胶甲酯化测定

[0069] 取10mg种子于1.5mL离心管中,加入300μL 0.05M EDTA,使用组织研磨仪高速振荡1h使果胶完全溶解于溶液中,静止5min,取100μL上清于一新的离心管中,加入2M NaOH100μ

L皂化1h,加入100 μ L 2M HCL中和,10000g,离心5min,上清用于甲酯化含量测定。

[0070] 甲醇含量测定:50 μ L上清加入96孔板中,加入1 μ L醇氧化酶(0.5U),混匀,25 $^{\circ}$ C孵育15min,加入50 μ L0.02M 2,4-乙酰丙酮,混匀,60 $^{\circ}$ C孵育15min,冷却至室温后测定412nm吸光值。采用不同浓度的甲醇(标准液792 μ g/mL)制作标准曲线,见图8。

[0071] 2.甲酯化酶活性测定

[0072] 取野生型和突变体种子约10mg使用组织研磨仪研成粉末状,使用一步法植物活性蛋白提取试剂盒(Takara)提取总蛋白,使用考马斯亮蓝法测定蛋白。

[0073] 依照如表1所示配方配置甲酯化酶检测胶,并打直径为6mm的胶空,取8 μ g总蛋白点入孔中,28 $^{\circ}$ C静置过夜,使用500 μ g/mL的钨红染液对胶进行染色45min,用去离子水对胶脱色至背景透明,计算使用ImageJ对着色面积进行测定,野生型甲酯化酶活性标定为1,甲酯化酶活性与着色面积正相关,结果见图9。

[0074] 表1甲酯化酶检测胶配方

	高甲酯化果胶	0.1%
[0075]	柠檬酸	12.5mM
	Na ₂ HPO ₄	50 mM
[0076]	PH	5

[0077] 九、生物量测定

[0078] 选择生长30天的基因突变植株AtMYB52-1和AtMYB52-2,跟野生拟南芥完整植株,首先清洗根部的泥土,吸水纸吸干后,使用80 $^{\circ}$ C烘箱对植物材料烘干两天,直接称重,获得植株的生物量。为保证数据准确,实验重复三次。结果表明,当AtMYB52基因突变后,突变体植株的生物量发生显著增长,与野生型拟南芥植株相比,其生物量增加了约30%,具体见图10。

[0079] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

序列表

<110> 中国农业科学院烟草研究所

<120> 拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52基因及其应用

<141> 2017-09-08

<160> 24

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 750

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

atgatgtgta gtcgaggcca ttggagacct gcagaagacg agaagctaag agaactcgtc 60
gaacaatttg gtccataa ttggaacgcc atagctcaga agctctctgg tcgatctggt 120
aagagttgta gattgagatg gtttaatcaa ttggatceta ggattaaccg aaacccttcc 180
acggagggaag aagaagaaag gcttttagcg tctcatcgga tccatgggaa cagatggtct 240
gtgatcgcta gatttttcc cggtcgaact gataacgctg ttaaaaacca ttggcacgtc 300
atcatggctc gtcgtggccg agaacggtcc aagctccgct cagaggcct tggccatgat 360
ggcacggtgg ctgcgactgg gatgattggt aattataaag actgcgataa ggagagaaga 420
ttggcaacca caaccgctat caattttcct tatcaattct ctcatattaa tcattttcaa 480
gtcctcaaag agttcttgac cggaaagatc gggttcagaa atagtactac tccaatacaa 540
gaaggagcaa tagaccaaac taaacgaccg atggagtctt acaattttct tcaagtaaac 600
acggattcga agatacacga attgatagat aattcaagaa aagacgaaga agaagatgtc 660
gatcaaaaca accgaattcc taacgagaat tgtgttccat ttttcgactt tttgtctggt 720
ggaaactctg cctctcaggg tttatgttaa 750

```

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```

Met Met Cys Ser Arg GIy His Trp Arg Pro AIa GIu Asp GIu Lys Leu
1           5           10           15
Arg GIu Leu Val GIu GIn Phe GIy Pro His Asn Trp Asn AIa IIe AIa
           20           25           30
GIn Lys Leu Ser GIy Arg Ser GIy Lys Ser Cys Arg Leu Arg Trp Phe
           35           40           45
Asn GIn Leu Asp Pro Arg IIe Asn Arg Asn Pro Phe Thr GIu GIu GIu
           50           55           60
GIu GIu Arg Leu Leu AIa Ser His Arg IIe His GIy Asn Arg Trp Ser

```

65	70	75	80
Val Ile Ala Arg Phe Phe Pro Gly Arg Thr Asp Asn Ala Val Lys Asn			
	85	90	95
His Trp His Val Ile Met Ala Arg Arg Gly Arg Glu Arg Ser Lys Leu			
	100	105	110
Arg Pro Arg Gly Leu Gly His Asp Gly Thr Val Ala Ala Thr Gly Met			
	115	120	125
Ile Gly Asn Tyr Lys Asp Cys Asp Lys Glu Arg Arg Leu Ala Thr Thr			
	130	135	140
Thr Ala Ile Asn Phe Pro Tyr Gln Phe Ser His Ile Asn His Phe Gln			
	145	150	155
Val Leu Lys Glu Phe Leu Thr Gly Lys Ile Gly Phe Arg Asn Ser Thr			
	165	170	175
Thr Pro Ile Gln Glu Gly Ala Ile Asp Gln Thr Lys Arg Pro Met Glu			
	180	185	190
Phe Tyr Asn Phe Leu Gln Val Asn Thr Asp Ser Lys Ile His Glu Leu			
	195	200	205
Ile Asp Asn Ser Arg Lys Asp Glu Glu Glu Asp Val Asp Gln Asn Asn			
	210	215	220
Arg Ile Pro Asn Glu Asn Cys Val Pro Phe Phe Asp Phe Leu Ser Val			
	225	230	235
Gly Asn Ser Ala Ser Gln Gly Leu Cys			240
	245		

<210> 3

<211> 1611

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

atgaatatga tgatgcaaaa actctctatt ctatttctac atttaatat actagtacta 60
ctctgcgtcc atcctctcac caccgtagcc gaccgcaatt ccaccgattg gtgcgacaaa 120
actccatacc ctgatccatg caaatgetac ttcaagaacc acaacggatt tcaacagccg 180
acacaattat ccgagttccg agtaatgctg gtggaagcag ccatggatcg ggccatatec 240
gcccgtgccg agttgactaa ttccggcaag aactgcacgg atagcaagaa acaagcagtt 300
ttggcggatt gcattgacct ctatggagac acgatcatgc agttaaaccg gacattgcat 360
ggcgtgtctc ctaaagccgg tgccgcgaaa agttgcaactg acttcgacgc tcaaactggg 420
ctgagcaccg cgttacaaa caccgagacc tgccgacgtg gctcatccga tttaaactgc 480
acagacttca tcacacccat cgtttcaaac accaaaatct cccacctcat tagcaactgc 540
ttagccgtca acggagccct cttgaccget ggaaacaaag gcaacaccac tgctaatcaa 600
aagggtttc cgacgtgget ttcccgtaaa gataagagac tcttgcgtgc cgttcgagcc 660

aacctcgtgg tggccaagga cggatcagga catttcaaca cgttacaagc ggctattgac 720
 gtggcgggac ggagaaaggt gacgtcaggg aggttcgta tatacgtaa aagaggtata 780
 tatcaagaaa acattaacgt acgtctaaat aatgatgaca taatgttggt cggagatgga 840
 atgagatcca ccattatcac cggcggtcga agtgtccaag gaggttacac cacgtacaat 900
 tccgctactg ccggtatcga gggacttcac ttattgcca aaggcataac gtttagaac 960
 acagctggtc cagccaaggg ccaggccgtg gcacttcgtt catcgtctga cctctcaatc 1020
 ttctacaaat gctcaatcga aggataccaa gataactga tgggccattc tcaacgccag 1080
 ttttaccgtg agtgttacat ctatggaacc gtcgattca tttcggtaa cgcggctgct 1140
 gttttccaaa actgtctcat cctcctcgc cggcactca aaggtaagc caatgtaatt 1200
 accgcacaag gtcgtgctga tccgtttcag aacacagga tctctatcca taactcaaga 1260
 atcctaccgg ctctgatct aaaaccagtg gtcggtaccg ttaagacgta catgggccgg 1320
 ccttggatga agttctcag aaccgtggtt cttcagacgt atttggataa tgttgtgagt 1380
 ccagtcgggt ggtctccgtg gattgaaggt tcggtgttg gtctggacac tctctctat 1440
 gcagaatata agaatactgg accagettca tccacaggt ggcgtgtcag ttgaaaggg 1500
 tttcatgtg tgggtagage ttccgatgca tetgtttca ctgttgaaa gtttatcgt 1560
 ggtacagcat ggctcccacg caccggcata cccttcaatt ctggactcta a 1611

<210> 4

<211> 699

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

atgacgataa tgatcaagtt tctcctgta gctctgctcg tgatctctcc gatttgcgcc 60
 gagaaggacc tgatgaaaga ggaatgccat aatgcacaag ttccgaccat ttgcatgcaa 120
 tgtcttgaat ccgaccaac ctccgttcat gcagaccgtg ttggcatcgc cgagatcatc 180
 atacactgtc tcgactctcg tctcgatata atcacaagc aaaagggtga gctgcagatt 240
 ggtgaagtag ttgagaagaa aacgagaaag agaaaatcga aaagtgacaa caagatcaga 300
 aagaaaccct ccgtagagac tccaacagaa gcgaaagctt taaaagttgt agataatctt 360
 ctactgtaat taaaccaaac aactgatgat gctgagaaag aaggatcat agatgttgtt 420
 aatgctactt ctgaagctat tgaaaacgaa actgaagtcg atctcaagga aaaagatggt 480
 gatgaggagg ctaaactctga gaagcctaaa aagaaaaagg agcaaagaaa gtcaagattc 540
 aagaagatgg aatctctgtc atcgattaca atgaaaagtg aggatgttaa ccatgatcag 600
 ttaccttcta agcaatctgg gcttgaaacg gttcgtgatg ttgagaacgc gagtagcagc 660
 aaaaaggcca ttgtcgatgt aacttcatct gaggcatag 699

<210> 5

<211> 2274

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 5

atgtcttctt cgtttctctc ctccactgct ttcttctctc tctttgtct aggattctgc 60

cacgtgtcct cttcctcctc cgaccaagga acttacatcg tteacatggc taaatctcag 120
 atgccgtcgt ctttcgacct ccactctaac tggtagcatt catctctcag atctatctcc 180
 gactcagccg aattgctcta cacttacgag aacgcgattc atggattctc aacacggcta 240
 actcaagaag aagccgactc gctcatgact caacctgggt ttatctccgt tttaccggag 300
 caccgttacg agctacacac cactcgtact cctctcttcc tcggtctcga cgaacacacc 360
 gcagatctgt tccctgaagc cggtctttac agcgacgtcg tcgtcggagt tctcgatacc 420
 ggagtttggc ccgagagtaa aagctactcc gacgaaggat tcggtcctat tccttctctc 480
 tggaaaggcg gatgcgaggc cggaaccaat ttaccgctt ctctctgtaa ccgtaaacta 540
 atcggagcaa gattcttctc tcgtggttac gaatcaacga tgggaccaat cgatgaatct 600
 aaagaatcaa gatctcctag agacgacgac ggteacggaa ctacacctc atcgaccgcc 660
 gctggatccg tcgttgaagg agctagetta ttaggctacg cttcaggaac agctcgtggg 720
 atggctccac gcgtcgtgt cgtgttttac aaagtctgtt ggctcgggtg ttgtttcagc 780
 tcagatattt tagctgcaat cgataaagcc atcgccgata acgtcaatgt cctgtcagtg 840
 tcaactcggcg gtggaatgtc ggattattat agagacgggt ttgcgatcgg agcattcgcc 900
 gccatggaaa gagggatttt agtatcttgc tcagctggta atgctggtec gagtagttct 960
 agtttatcaa acgtagctcc atggatcaca actgttgggt ctggtacttt agatcgtgat 1020
 tttccggcgc ttgcgattct cggtaacggc aagaatttca ccggagtctc tttgtttaaa 1080
 ggagaagctt taccggataa attgttgcg tttatttacg ctgggaatgc tagtaatgct 1140
 actaatggta atctctgtat gaccggaact ttgatcccg agaaagtaa ggggaagatt 1200
 gtgatgtgtg atagaggaat taatgctaga gttcagaaag gtgatgtggt taaagcagca 1260
 ggtggagtgt gaatgattct ggctaacact gcggcgaatg gtgaagagct tgttgcggat 1320
 gctcatttgt taccggcgc caccgttggg gaaaaagccg gtgatataat ccggcattac 1380
 gtgactactg atcctaatec caccgcttcg atttcaatct taggaacagt cgtcgggtgtt 1440
 aaaccatctc cggttgtcgc agcgtttagc tcacgtggac cgaattcagat tacaccgaat 1500
 attcttaaac cggatctgat cgctcctgga gtaaacatcc tcgccgcgtg gaccggtgct 1560
 gctggaccaa ccgactcgc ttccgattct cgccgcgtgg agttcaatat catctctggg 1620
 acgtcagatg cttgccctca cgttagtggg ttagcggcgc ttctcaagtc ggtgcatcct 1680
 gaatggagcc cggcggcgat tagatcggcg cttatgacca ccgcttaca aacctacaaa 1740
 gacggtaaac cgttactcga catcgcgaca gggaagcctt cgacgccgtt cgatcacggg 1800
 gcaggacacg tgcaccaac aactgccact aatccaggac teatctacga tctaacgacg 1860
 gaggattact taggcttctt ctgcgcattg aattacacat cgccgcaaat tcgaagtgtc 1920
 tcgagacgta attacacttg cgatccgagt aaatcgtact cggtegtctga tttgaactac 1980
 ccgtcgttcg ccgttaacgt tgatggagtc ggtgcgtata agtacacgcg cacggtgacg 2040
 agcgtgggag gagctgggac ttactcgggt aaagtaactt cggagacgac aggagtcaag 2100
 atttcggttg aaccggcggg tttgaatttc aaggaagcta acgagaaaa atcgtatacg 2160
 gtgacgttta ctgtagactc gtcgaagccg tetggatcta acagctttgg gagtattgaa 2220
 tggtcggatg ggaaacacgt ggtgggaagt cccgtggcga ttagctggac atag 2274

<210> 6

<211> 627

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

atgacttcgt cttcttcttc tctatcacg ttactcttc ttctgcttct ctctcttctt 60
 gtggcactaa acccaaatcc gtcgttagcc tccaccggta gcaacatcaa cacaaacgac 120
 atcgtgacgc agtacagcac atacgttaga aacgcgtgca acgtaacgcg atacaaccgc 180
 ctctgcgtcc gaacgctatg gccgtttgca atcgtcgtc gaaacaacac cagcaagtgg 240
 gctcgagcta gcgtcgcggt taccataacc gacaccaaac ggggtgctgag gctcttgctc 300
 aaaacgcagc gttcagcagt tggcgaagc gagegaatcg cgttgctgga ttgccgagag 360
 ctcttcgtgg actctctcga caacctatac aagtcgtcgc cgttctgctg gacactgaac 420
 gcggatgagt tccagcggca gataagcgat ctgccacgt ggctaagegc agcactcacg 480
 gatgatgaca cgtgtctaga tggatttgaa gagacgtcga gtagaacacg gacggtcagg 540
 atgggtccgga ggaaggccac caagtgtatg cgaactatgca gcaatgctct ggctctctc 600
 aagaagcttg cttttgatgg cttgtaa 627

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

atgatgtgta gtcgaggcca t 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

acataaaccc tgagaggcag a 21

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9

tcagactcga gaaagctgct ac 22

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

gatcaagtcg accacacgg 19

<210> 11

<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 11
agctctctgg tcgatctggt 20
<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 12
accaatcatt ccagtcgag 20
<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 13
ccagaaggat gcatatgttg gtga 24
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 14
gaggaccctc ggtaagaaga 20
<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 15
ccggtcgaac tgataacgct 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 16
accaatcatt ccagtcgag 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 17
tactgccggt atcgaggac 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 18
cagacgatga acgaagtgcc 20
<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 19
gtcttgaatc cgacceaac t 21
<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 20
agctcaccct tttgcttgg 20
<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 21
tgcagtctgt taagacttgc ct 22
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 22
aacacctaga gagaccage 20
<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana
<400> 23
tggttgtaa tctacgtat ga 22
<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 24

ccaggacaac aatcaacaat ca 22

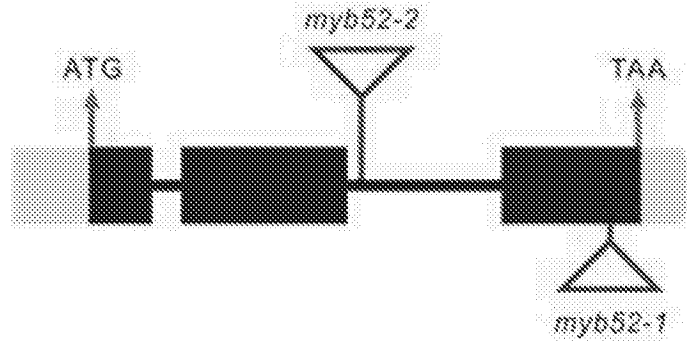


图1

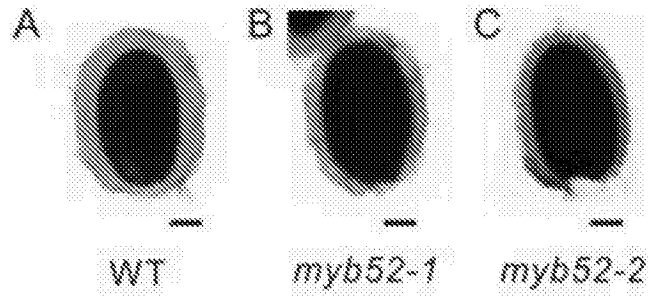


图2

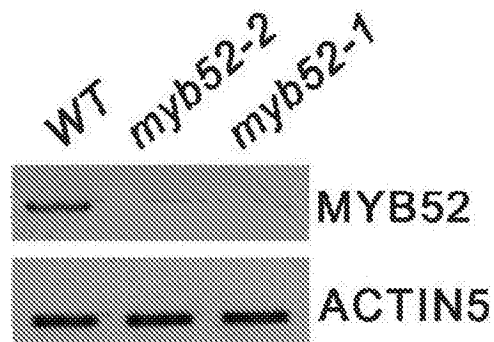


图3

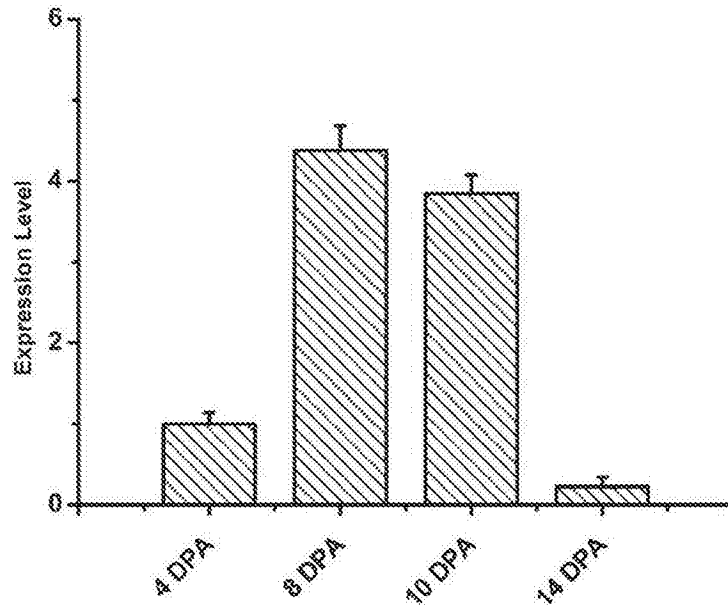


图4

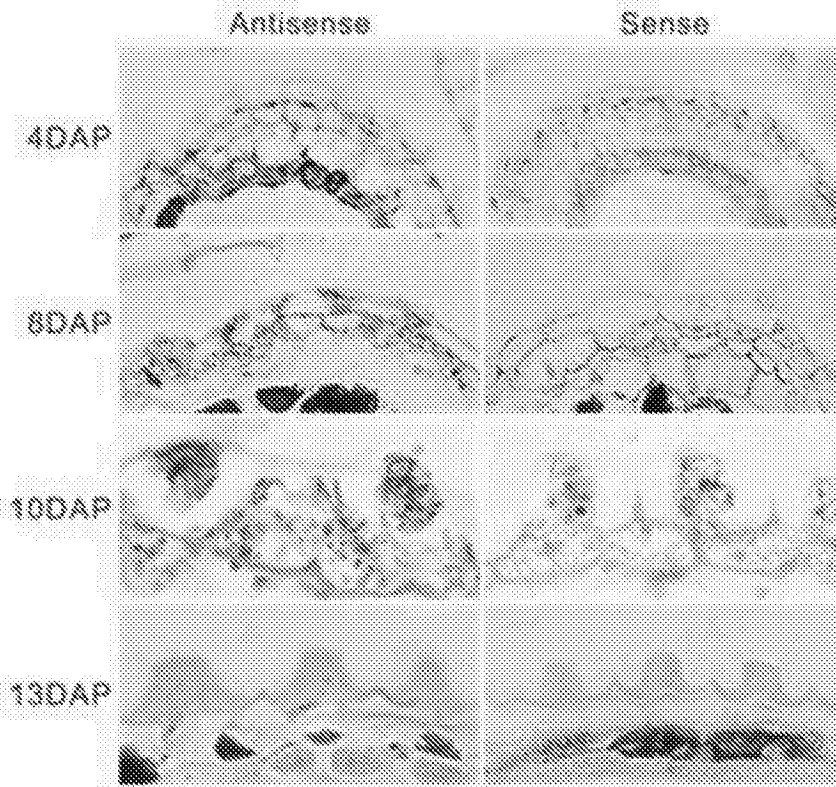


图5

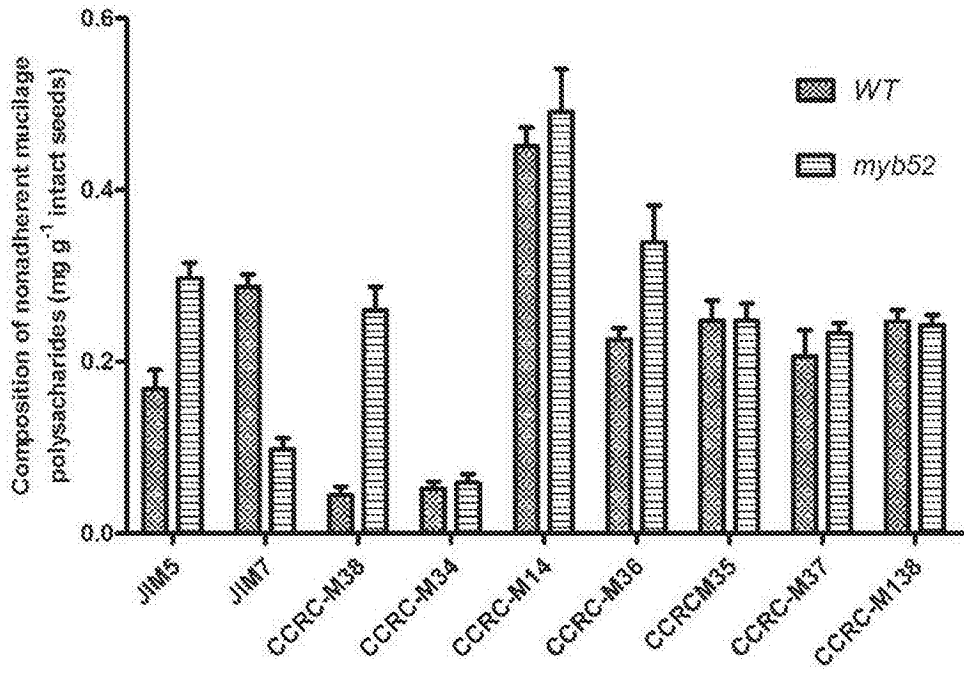


图6

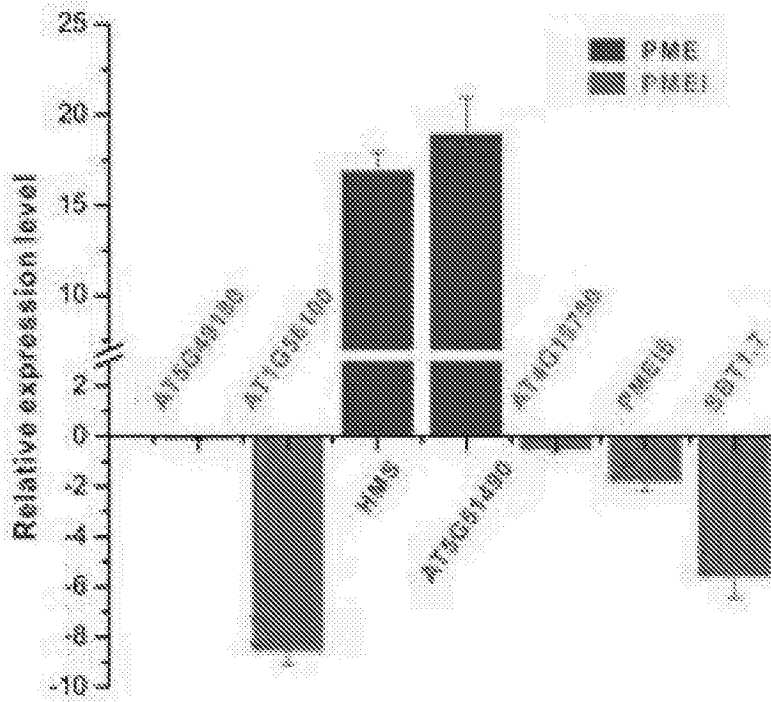


图7

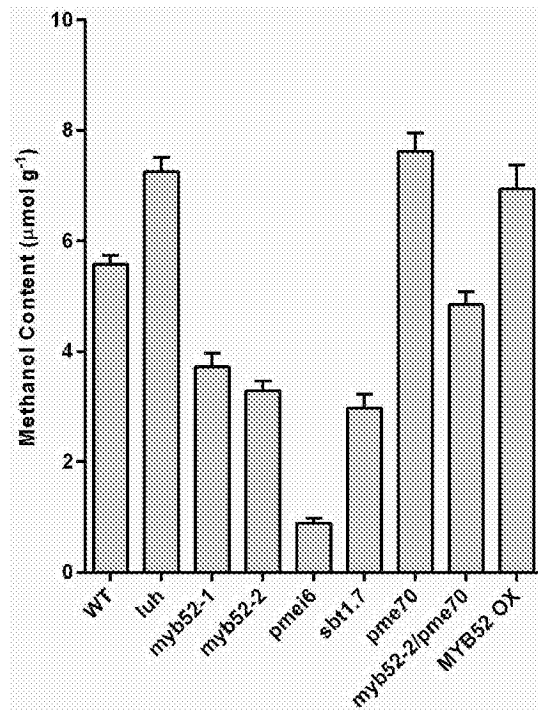


图8

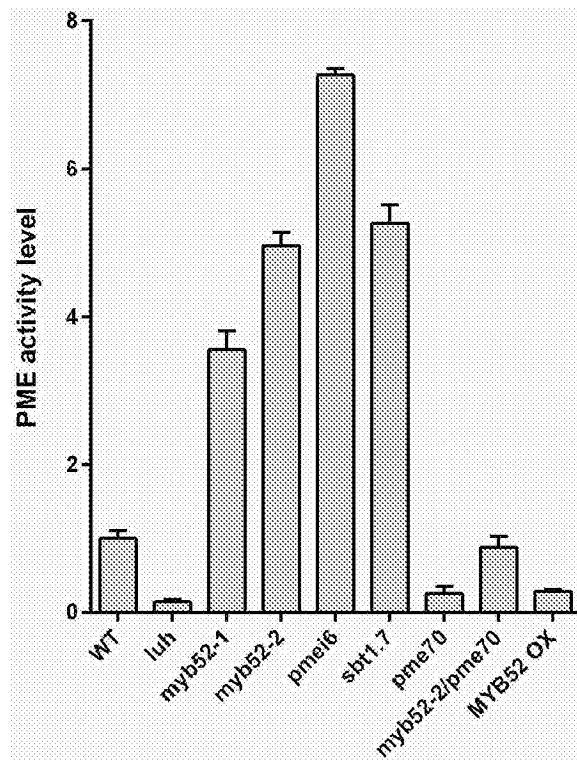


图9

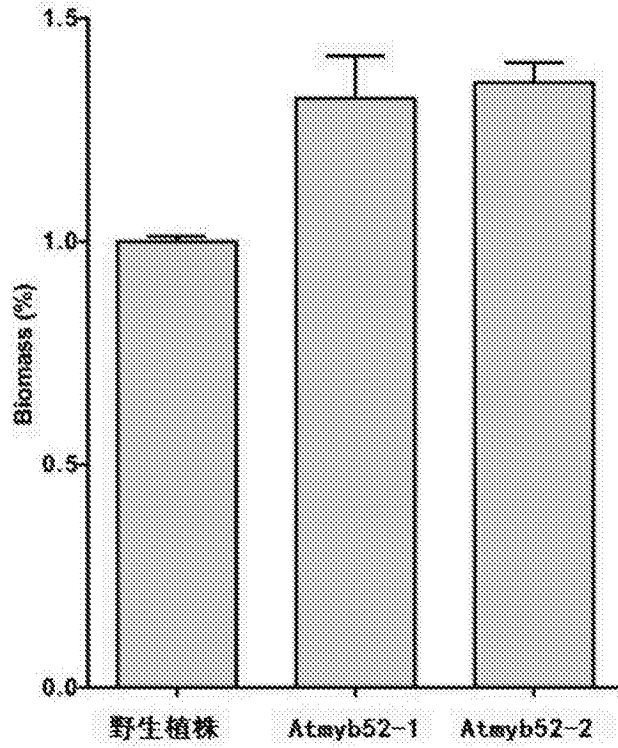


图10

专利名称(译)	拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52基因及其应用		
公开(公告)号	CN107523573A	公开(公告)日	2017-12-29
申请号	CN2017110804551.7	申请日	2017-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院烟草研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院烟草研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院烟草研究所		
[标]发明人	孔英珍 石大川		
发明人	孔英珍 石大川		
IPC分类号	C12N15/29 C07K14/415 C12Q1/68 C12N15/82 A01H5/00 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/573		
CPC分类号	C07K14/415 C12N15/8261 C12Q1/6851 G01N33/5308 G01N33/573 G01N33/68 C12Q2531/113 C12Q2521/107 C12Q2561/113 C12Q2563/107		
代理人(译)	刘娜 李新欣		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种拟南芥MYB家族转录因子AtMYB52基因在拟南芥种子粘液质形成过程中的作用及其应用，具体包括基因AtMYB52的克隆，含有该基因的表达载体构建，基因AtMYB52基因器官表达模式，AtMYB52基因突变引起的拟南芥种子粘液质的表型变化和结构改变。本发明还公开了基因AtMYB52基因突变在提高植株生物量上的应用。

