

巴西橡胶树*HbTFIIB*的克隆与表达分析

晁金泉, 陈月异, 杨署光, 田维敏*

中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地-海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南儋州571737

摘要: 本研究采用RACE和RT-PCR方法, 从巴西橡胶树无性系热研7-33-97的乳管细胞中克隆到转录复合体关键成员*TFIIB*的同源基因, 命名为*HbTFIIB*。该基因全长1 472 bp, 其中开放阅读框810 bp, 编码一个由270个氨基酸残基组成的蛋白质。该蛋白质分子量为29.48 kDa, 理论等电点为8.3。实时荧光定量PCR结果表明, *HbTFIIB*基因受割胶上调表达, 而且在后期排出的胶乳中表达量显著高于前期排出的胶乳。Western blot分析表明, 开割树胶乳中的*HbTFIIB*蛋白含量高于未开割树, 而且在早期排出的胶乳中的含量明显高于后期排出的胶乳中的含量。本研究表明, 割胶促进转录复合体蛋白基因表达和转录蛋白质合成, 而且排胶会流失转录复合体蛋白。

关键词: 橡胶树; 乳管细胞; 胶乳; 转录复合体; *HbTFIIB*

转录是遗传信息由DNA传递到RNA的过程, 其中依赖于DNA的RNA聚合酶是实现该过程的重要环节(Hager等2009; Dahan和Choder 2013; Jin等2015)。真核生物有3种RNA聚合酶Pol I、Pol II和Pol III (Venters和Pugh 2013)。Pol I主要合成5.8S、18S和28S的rRNA (Kopp等2007)。Pol III主要合成tRNA和5S rRNA (Hoffmann等2015)。Pol II主要催化mRNA的转录, 是目前生命科学研究领域的热点之一(Xu等2015; Jonkers和Lis 2015; Arndt和Reines 2015; Liu等2015)。真核生物的Pol II由12个亚基组成, 在转录过程中与其它六种通用型转录因子(TFII-A、-B、-D、-E、-F和-H)结合, 共同组装成有功能的转录复合体(Hahn 2004)。作为通用型转录因子, TFIIB是构成真核转录复合体的关键成员之一(Qureshi和Jackson 1998)。结构生物学研究表明TFIIB蛋白的C端具有引导DNA作用, 而N端可以同时与RNA聚合酶和TBP-启动子的复合物互作, 对于稳定转录复合体的结构有着重要意义(Chen和Hahn 2003; Lagrange等1998)。

橡胶树是全球所需天然橡胶的主要来源。橡胶树的乳管是合成和贮存天然橡胶的一种特化组织(Hao和Wu 2000)。在天然橡胶生产中, 通过切割橡胶树的树干树皮(割胶), 切断树皮中的乳管, 收集流出的胶乳, 作为提炼天然橡胶的原料。胶乳本质上是乳管细胞的细胞质, 其中大量的橡胶粒子是合成天然橡胶的细胞器。在胶乳中, 天然橡胶含量占27.0%~41.3%, 蛋白质含量占0.2%~4.5% (Wang等2013)。割胶不仅是从橡胶树中获取胶乳所必需的生产环节, 而且普遍上调橡胶生物合成

关键酶的基因表达(Chye等1991)。此外, 在2次割胶间的胶乳再生过程中, 涉及大量蛋白质的重新合成。这些过程都需要转录复合体参与。本研究发现割胶可促进*HbTFIIB*基因表达和蛋白合成, 此外早期排出胶乳中的*HbTFIIB*蛋白含量明显高于后期胶乳, 而其基因表达模式则相反。*HbTFIIB*基因的克隆为生产上不同橡胶树品种割胶制度的优化提供了一定的分子依据。

材料与方法

1 植物材料

从定植在中国热带农业科学院实验场(海南省儋州市)的10龄橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg)无性系热研7-33-97中, 选取径围和长势较一致的未开割树和割龄为3年的开割树各3株。常规割胶树采用3d一刀, 1/2树围割制(S/2, d/3)割胶。割胶后分别在排胶1 min (排胶前期)和60 min (排胶后期)各收集10滴胶乳(约200 μ L)于500 μ L裂解液中(来自植物总RNA提取试剂盒), 用于RNA提取; 以及收集相应时间点的1 mL胶乳于等体积的等渗缓冲液(0.1 mol Tris-HCl+0.4 mol甘露醇+1 mmol·L⁻¹ DTT, pH7.2)中, 用于蛋白质分析。同时, 在未开割树割胶后, 收集排胶后1 min流出的胶乳10滴胶乳(约200 μ L)于500 μ L裂解液中(来自植物

收稿 2016-12-14 修定 2017-07-03

资助 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-34-GW1)和中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费(1630022014004)。

* 通讯作者(E-mail: wmtian@163.com)。

总RNA提取试剂盒), 用于RNA提取; 以及1 mL胶乳于等体积的等渗缓冲液(0.1 mol Tris-HCl+0.4 mol甘露醇+1 mmol·L⁻¹ DTT, pH7.2)中, 用于蛋白质分析。单独收集每株树不同时间段的胶乳样品。

2 菌株及试剂

Escherichia coli DH10B菌株由本实验室保存。植物总RNA提取试剂盒(DP437)和普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(DP209)均购自天根生化科技(北京)有限公司。Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (K1652)购自Fermentas公司。SmarterTM RACE cDNA Amplification Kit试剂盒(63493)购自Clontech公司。克隆载体pEASY-Blunt Cloning Kit (CB101-02)购自北京全式金生物技术有限公司。荧光定量试剂SYBR[®] Premix Ex Taq (RR420A)购自Takara公司。人源TFIIB单克隆抗体(ab154049)购自Abcam公司。引物合成和序列测定由Invitrogen公司(上海)完成。其它常规生化试剂均为进口或国产分析纯。

3 *HbTFIIB*基因的RACE扩增和全长cDNA扩增

从课题组前期的胶乳转录组数据库中得到一段与TFIIB高度同源的Unigene9347片段(Chao等2015a)。利用Primer Premier 5软件设计3'-RACE引物(3'-RACE-F和3'-RACE-R, 表1)和5'-RACE引物(5'-RACE-F和5'-RACE-R, 表1), 采用Clontech公司SmarterTM RACE cDNA Amplification Kit试剂盒进行目标序列的RACE扩增并测序验证。经DNAMAN 5.22软件对RACE测序片段与Unigene9347序列进行拼接获取*HbTFIIB*的基因全长(GenBank登录号KU301749)。以全长序列的PCR引物进行扩增验证。引物序列为*HbTFIIB*-F和*HbTFIIB*-R (表1)。

表1 本研究中所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in the study

引物名称	引物序列(5'→3')
3'-RACE-F	AGCTCAGGAAGCTGTACAGA
3'-RACE-R	TACGTTTTTTTTTTTTT
5'-RACE-F	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
5'-RACE-R	TGCTTCACAATATACTCC
<i>HbTFIIB</i> -F	ACCCAAATAGATAATGATCAGAA
<i>HbTFIIB</i> -R	ATAATTATTGTCTCAGGCTT
QPCR- <i>HbTFIIB</i> -F	GGACCACCAACACGAAC
QPCR- <i>HbTFIIB</i> -R	GGCTGACACCTACTGCC
QPCR- <i>HbUBC2b</i> -F	CGACCAAGTTTTTCATTTCCGGGTG
QPCR- <i>HbUBC2b</i> -R	AGTCTCTCTTTTGCTGGGGTTG

50 μL扩增体系中含cDNA 1 μL、2×Takara PrimeS-TAR Max Premix缓冲液25 μL、上下游引物(25 μmol·L⁻¹)各2 μL及ddH₂O 20 μL。PCR程序为: 94°C预变性5 min; 94°C变性30 s, 60°C复性30 s, 72°C延伸1.5 min, 共35个循环; 72°C延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶分离后经天根胶回收试剂盒纯化目的条带, 克隆到全式金公司的pEASY-Blunt Simple Cloning Vector载体上, 送Invitrogen公司测序。

4 生物信息学分析

利用NCBI在线软件ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行开放阅读框(ORF)预测; 采用 DNAMAN 5.2.4软件对*HbTFIIB*基因翻译及多序列比对; 利用WoLF PSORT在线软件(<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)进行推导蛋白的亚细胞定位预测; 利用ProtParam在线软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行推导蛋白的分子量与等电点预测; 从NCBI数据库下载其他生物的TFIIB蛋白序列, 利用软件MEGA 4.0以Neighbor Joining (NJ)模型进行1 000次boot-strap统计学检验构建TFIIB蛋白系统进化树。

5 实时荧光定量PCR分析

采用Bio-Rad公司的CFX96实时荧光定量PCR系统进行*HbTFIIB*基因的相对定量表达分析。以合成好的cDNA第一链稀释10倍后作为荧光定量PCR分析的模板。*HbTFIIB*荧光定量引物为QPCR-*HbTFIIB*-F和QPCR-*HbTFIIB*-R (表1)。内参基因选取课题组前期优化的橡胶树稳定内参*HbUBC2b* (Chao等2016), 引物序列为QPCR-*HbUBC2b*-F和QPCR-*HbUBC2b*-R (表1)。20 μL扩增体系中含cDNA 1 μL、2×Takara SYBR Premix Ex TaqTM II 10 μL、上下游引物(25 μmol·L⁻¹)各1 μL及ddH₂O 7 μL。荧光定量PCR程序为: 94°C预变性2 min; 94°C变性10 s, 60°C复性20 s, 72°C延伸20 s, 共40个循环。利用CFX manager 3.0软件自动进行基线和C_q值分析。以*HbUBC2b*作为内参基因, 采用2^{-ΔΔC_q}算法分析相对表达量(Chao等2016)。每株树的样品独立实验, 每个样品设置3个技术重复。取3株树样品的C_q平均值用于基因表达量分析。

6 Western blot分析

收集于等渗缓冲液中的胶乳于4°C经20 000×g离心60 min获取C-乳清(Chow等2012), 取C-乳清10 μL与等体积上样缓冲液混匀, 于水浴锅中98°C

变性10 min后用于SDS-PAGE。C-乳清采用等体积上样。蛋白经SDS-PAGE电泳后,使用转印槽(北京六一仪器厂生产)通过湿转移法将蛋白转移到PVDF膜上,转移条件是:90 mA, 12 h。最后用人源TFIIB的单克隆抗体进行western blot分析,参照Chao等(2015b)方法。

7 数据统计分析

利用SPSS 17.0软件对数据进行方差分析,通过 t -test方法对不同处理组之间的数据进行比较,***表示极显著差异($P < 0.001$)。

实验结果

1 *HbTFIIB*全长cDNA克隆及生物信息学分析

在橡胶树胶乳转录组数据中,通过BlastX发现

一条752 bp的Unigene9347序列与其他植物中的*TFIIB*基因有一定同源性(Chao等2015a)。通过3'-RACE扩增到一条长336 bp的序列,通过5'-RACE扩增到一条长652 bp的序列,将其与Unigene9347序列经DNAMAN拼接,并通过测序验证,获得全长cDNA序列,命名为*HbTFIIB* (GenBank登录号KU301749)。*HbTFIIB*长度为1 472 bp,含有一个810 bp的开放阅读框,42 bp的5'端非翻译区和620 bp的3'端非翻译区(图1)。该基因编码一个由270个氨基酸残基组成的蛋白,分子量29.48 kDa,理论等电点为8.3,属于弱碱性蛋白。二级结构分析表明,该蛋白由33.05% α -螺旋、21.19%延伸链、10.73% β -转角和35.03%无规则卷曲组成。亚细胞定位预测*HbTFIIB*蛋白定位于细胞核中,无跨膜结构域。

```

acccaaatagataatgatcagaaccaccactcaacatctcct
ATGGCTGACACCTACTGCCCGACTGTAAGCGTCTACCGAAGTCGTCTTCGACCACTCCGCCGGTGACACCGTCTGCTGAGTGTGGC
M A D T Y C P D C K R P T E V V F D H S A G D T V C S E C G
CTCGTCTGGAGGCCATTCCATTGATGAGACCTCCGAGTGGCGAACCTTTGCCAACGAGTCTACTGATAATGACCCTGTTCGTGTGGT
L V L E A H S I D E T S E W R T F A N E S T D N D P V R V G
GGTCCCTCTAATCCTCTTCTTGCCGACGGTGGCCTTTCTACCGTCAATTTCTAAACCAGTTGGGGCTTCTGGGGATTCTTGACCACTCT
G P S N P L L A D G G L S T V I S K P V G A S G D F L T T S
TTGGCCCGCTGGCAGAACCCTGGCTCCAACCCCGATCGTTCTCTTATCCAAGCGTTAAGACCATTGCTACCATGCTGACAGGTTGGGC
L G R W Q N R G S N P D R S L I Q A F K T I A T M S D R L G
CTTGTGCAACCCATAAAGGATAGCTAATGAAATTTATAAGAAAGTAAAGATCAAAAACCTCTCAGAGGACGAAATCAGGATGCAATT
L V A T I K D R A N E I Y K K V E D Q K P L R G R N Q D A I
TTGGTGCCTGCCTTTACATTGCTGTAGACAAGAAGCAAAACCCCGACCGTAAAAGAAATTTGTTTCAGTAGCTAATGGAGCCACAAAG
L A A C L Y I A C R Q E D K P R T V K E I C S V A N G A T K
AAGGAGATTGGCCGTGCAAAGGAGTATATTGTGAAGCACTGGAGGTGGAGCTGGGTCCAGTCCATGGAAATGGGAACAATACATGCTGGA
K E I G R A K E Y I V K Q L E V E L G Q S M E M G T I H A G
GACTTCTGAGACGTTTTTTGTTCTCATCTTGGGATGAACAATCAAGCGTTAAAGCAGCTCAGGAAGCTGTACAGAATCTGAAGAGCTC
D F L R R F C S H L G M N N Q A V K A A Q E A V Q K S E E L
GATATAAGGCGAAGCCCATATCAATAGCAGCAGCCATTATTACATGATAACTCAGCTCTCCGAGGACAAGAAACTTCTCAAAGGTTAG
D I R R S P I S I A A A I I Y M I T Q L S E D K K L L K G *
aaacatagttctctcctctagttttgttctctttctttttttttttttagtaggctatggcagaacctgctgtgtgtagcagatatacactg
tctacaggagtagcagaaggaccatttaggaattcctacaaaggacctatccctatgctgcaaggattataccaagctgtgatgcaaaag
gaggatgacctcaagaacctatgcagtccttgaataaacaaggacattggtagggtaggctgcatgcagcatttcttttaagttagatg
ctgctctctgttcaatttccactcttgacatttgacaaggctctaaactttgcaccactgaactcctaattatagtgcaattatgtgcca
atctgtgactgataaaacttgccaacacacatttctccaatttttttcatcaaaaggccaacacttaattttttatcatgagaaggcaag
gtcaaatgtgtaatacaggactgagagtgaactccttatttgcagatagtgcttaaacagctggtgcaattgtcccaaggactctttttg
caatataaaaagtgaaatttccatttgcacttatctgtaagtgtaccaattaagcctgagacaataattat

```

图1 *HbTFIIB*基因cDNA全长及推测的氨基酸序列

Fig.1 Complete cDNA and deduced amino acid sequences of *HbTFIIB*

2 *HbTFIIB*推导的氨基酸序列比对及进化树构建

*HbTFIIB*含有TFIIB蛋白所特有的Zn结构域和2个Cycln结构域(图2)。该蛋白与蓖麻的RcTFIIB (XP_002513521.1)、拟南芥的AtTFIIB (NP_187644.1)、玉米的ZmTFIIB (NP_001149721.1)和水稻的OsTFIIB (NP_001063775.1)蛋白的序列同源性分别为93.82%、91.13%、90.86%和86.02% (图2)。

为进一步分析橡胶树*HbTFIIB*与其他TFIIB蛋白在进化上的关系,选取蓖麻、杨树、苹果树、拟南芥、玉米、水稻、酿酒酵母、果蝇、蟾蜍、

鸡、小鼠和人等12个物种,搜索其TFIIB蛋白序列,利用MEGA 4.0软件,采用Neighbor-Joining,进行1 000次bootstrap统计学检验构建进化树(图3)。聚类结果显示TFIIB蛋白在不同生物间有较高的保守性,其中橡胶树的*HbTFIIB*与其他植物的TFIIB蛋白明显归为一类,并且与同样是大戟科的蓖麻的同源蛋白亲缘关系最近。

3 割胶对*HbTFIIB*基因表达和蛋白含量的影响

荧光定量PCR分析表明,常规割胶树胶乳中的*HbTFIIB*基因表达量显著高于未开割树(图4-A)。虽然在SDS-PAGE图谱上难于分辨分子量为30 kDa

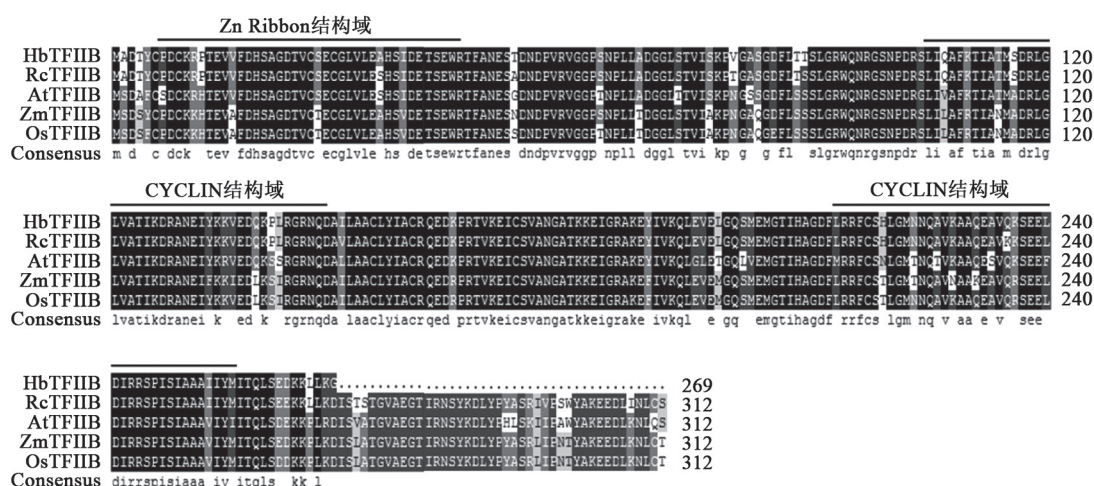


图2 *HbTFIIB*推导的氨基酸序列与其他植物的比对

Fig.2 Amino acid sequence alignment of TFIIB from *H. brasiliensis* and other plants

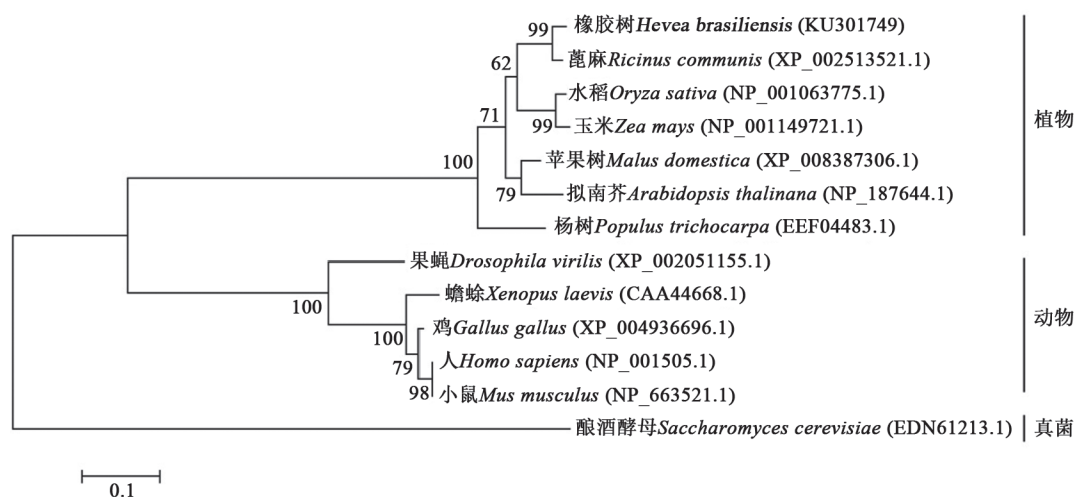


图3 *HbTFIIB*与其他同源蛋白的进化分析

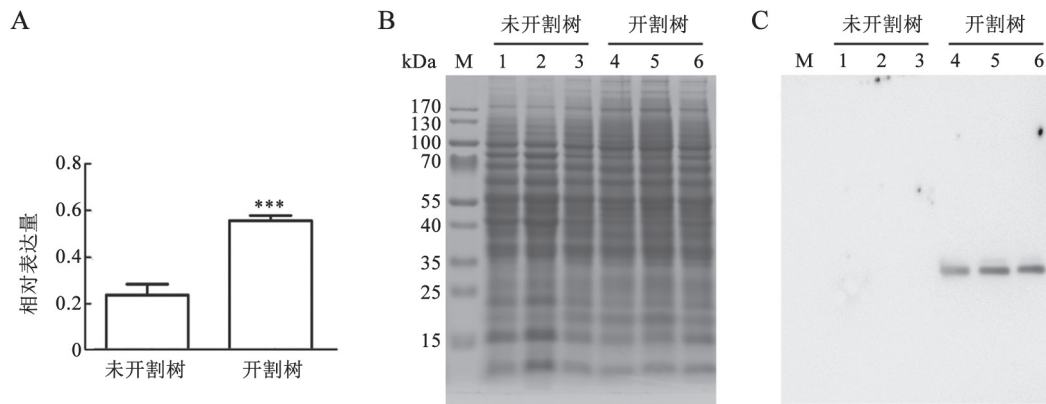
Fig.3 Phylogenetic analysis of *HbTFIIB* and other homologs

分支线的长度代表遗传分化距离, 数字代表遗传距离的置信度。

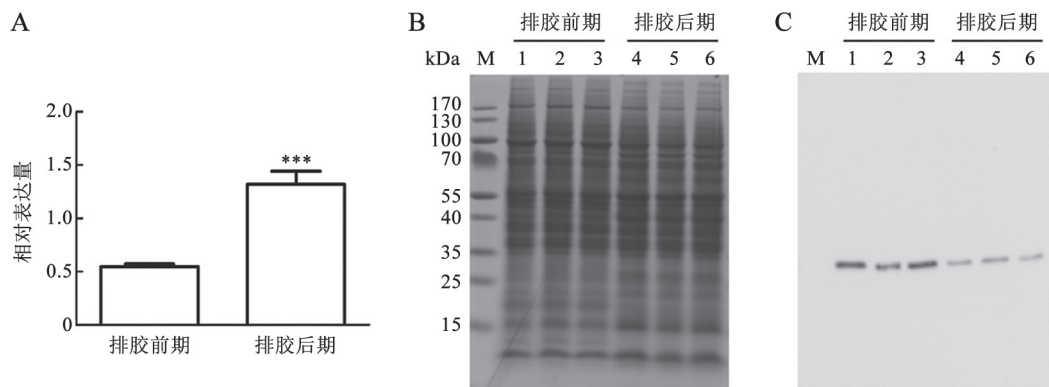
左右的蛋白谱带(图4-B), 但是在使用人源TFIIB的多克隆抗体的免疫印迹图谱上, 割胶树胶乳中均可检测到一条特异谱带, 分子量在30 kDa左右(图4-C), 这条谱带应该是*HbTFIIB*蛋白。在割胶树排胶的不同阶段, *HbTFIIB*基因表达和蛋白含量存在明显差异(图5)。在排胶后1 min收集的胶乳中*HbTFIIB*基因表达量显著低于在排胶后60 min收集的(图5-A)。但是, *HbTFIIB*蛋白含量在排胶后1 min收集的胶乳中显著高于在排胶后60 min收集的胶乳(图5-B和C)。

讨论

在真核生物中, 功能性的转录复合体由Pol II核心聚合酶和多个通用型转录因子有机组成。其中Pol II聚合酶由12个亚基(RPB1~RPB12)构成, 是执行转录功能的核心部位, 而通用型转录因子(TFIIA-TFIIF)在转录复合体组装过程中起着辅助组装以及识别并结合转录起始位点等功能, 对于最终功能性转录复合体的形成有着决定性意义(Hahn 2004)。在本研究中, 我们从橡胶树乳管细胞中克隆了一个*TFIIB*的同源基因*HbTFIIB*, 该基

图4 割胶对*HbTFIIB*基因表达及蛋白含量的影响Fig.4 Effect of tapping on *HbTFIIB* expression and HbTFIIB content

A: 未开割树和开割树胶乳*HbTFIIB*基因表达量; B: 未开割树和开割树C-乳清蛋白SDS-PAGE图; C: 未开割树和开割树C-乳清蛋白western-blot图。

图5 排胶对*HbTFIIB*基因表达及蛋白含量的影响Fig.5 Effect of latex flow on *HbTFIIB* expression and HbTFIIB content

A: 开割树排胶前期和排胶后期胶乳*HbTFIIB*基因表达量; B: 开割树排胶前期和排胶后期C-乳清SDS-PAGE图; C: 开割树排胶前期和排胶后期C-乳清western-blot图。

因编码的蛋白含有TFIIB蛋白所特有的Zn结构域和2个Cycln结构域, 与来自动物、植物、真菌中的TFIIB蛋白具有较高同源性。模式生物研究表明TFIIB蛋白的第一个Cycln结构域与启动子元件TATA box结合, 而第二个Cycln结构域则与Pol II聚合酶的Rpb2和Rpb12亚基结合, 从而保证转录复合体结构的稳定性(Chen和Hahn 2004; Chen等2007)。

TFIIB作为转录复合体关键成员, 应当在细胞核中发挥作用(Hahn 2004)。Zhou等(2013)用*At-TFIIB*自身启动子启动*AtTFIIB-GFP*融合蛋白在拟南芥中表达, 荧光共聚焦结果显示转基因植株中融合蛋白在小孢子发育三核期的营养核中大量积累, 并对花粉管的生长和伸长有着重要调控作用。

在天然橡胶生产中, 割胶后流出的胶乳是乳管细胞的细胞质部分, 细胞核被保留在乳管细胞中(de Fay等1989)。在本研究中, 来自常规割胶树的胶乳C-乳清中可以检测到HbTFIIB蛋白, 说明该蛋白在乳管细胞的细胞质中合成后, 可以高水平保持在细胞质中。但是, 在来自未开割树的胶乳C-乳清中检测不到HbTFIIB蛋白, 这可能是该蛋白丰度较低所致。在割胶前, 树干树皮乳管中的膨压在7~12个大气压之间(An等2014)。在割胶后, 由于膨压的作用, 使乳管中的胶乳从被切割的乳管伤口末端排出来。在排胶过程中, 由于乳管伤口末端不断形成和积累堵塞物质, 导致排胶在一定时间后停止。在排出的胶乳中含有大量的橡胶粒子、

黄色体、F-W复合体和核糖体等细胞器和蛋白质等物质(de Fay等1989)。为维持乳管细胞生物学功能的可持续性,这些流失的物质需要在2次割胶间隔期得到更新,这一过程称为胶乳再生,涉及大量蛋白质的重新合成。而转录复合体作为行使翻译功能的重要分子机器,应当在此过程起着重要作用(Chao等2015a)。本研究表明,功能性转录复合体组分之一的TFIIB蛋白也会随着排胶流失。值得注意的是,*HbTFIIB*基因在排胶前期收集的胶乳中的表达量显著低于在排胶后期阶段收集的胶乳中的表达量,而HbTFIIB蛋白含量变化刚好相反,说明HbTFIIB蛋白流失会激活*HbTFIIB*基因表达,进而促进HbTFIIB蛋白的合成。

参考文献

- An F, Cahill D, Rookes J, Lin WF, Kong LX (2014). Real-time measurement of phloem turgor pressure in *Hevea brasiliensis* with a modified cell pressure probe. *Bot Stud*, 55: 19
- Arndt KM, Reines D (2015). Termination of transcription of short noncoding RNAs by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem*, 84: 381–404
- Chao J, Chen Y, Wu S, Tian WM (2015a). Comparative transcriptome analysis of latex from rubber tree clone CATAS8-79 and PR107 reveals new cues for the regulation of latex regeneration and duration of latex flow. *BMC Plant Biol*, 15: 104
- Chao J, Zhang S, Chen Y, Tian WM (2015b). Cloning, heterologous expression and characterization of ascorbate peroxidase (APX) gene in laticifer cells of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Plant Physiol Biochem*, 97: 331–338
- Chao J, Yang S, Chen Y, Tian WM (2016). Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis of the gene expression in laticifers on the basis of latex flow in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Front Plant Sci*, 7: 1149
- Chen HT, Hahn S (2003). Binding of TFIIB to RNA polymerase II: mapping the binding site for the TFIIB zinc ribbon domain within the preinitiation complex. *Mol Cell*, 12: 437–447
- Chen HT, Hahn S (2004). Mapping the location of TFIIB within the RNA polymerase II transcription preinitiation complex: a model for the structure of the PIC. *Cell*, 119 (2): 169–180
- Chen HT, Warfield L, Hahn S (2007). The positions of TFIIF and TFIIE in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Nat Struct Mol Biol*, 14 (8): 696–703
- Chow KS, Mat-Isa MN, Bahari A, Ghazali AK, Alias H, Mohd-Zainuddin Z, Hoh CC, Wan KL (2012). Metabolic routes affecting rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis* latex. *J Exp Bot*, 63 (5): 1863–1871
- Chye ML, Kush A, Tan CT, Chua N (1991). Characterization of cDNA and genomic clones encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol*, 16 (4): 567–577
- Dahan N, Choder M (2013). The eukaryotic transcriptional machinery regulates mRNA translation and decay in the cytoplasm. *Biochim Biophys Acta*, 1829 (1): 169–173
- de Fay E, Hebant Ch, Jacob JL (1989). Cytology and Cytochemistry of the Laticiferous System. In: Auzac JD, Jacob JL, Chrestin H (eds). *Physiology of Rubber Tree Latex*. BocaRaton, FL: CRC Press, 15–29
- Hager GL, McNally JG, Misteli T (2009). Transcription dynamics. *Mol Cell*, 35 (6): 741–753
- Hahn S (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol*, 11 (5): 394–403
- Hao BZ, Wu JL (2000). Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid. *Ann Bot*, 85: 37–43
- Hoffmann NA, Jakobi AJ, Moreno-Morcillo M, Glatt S, Kosinski J, Hagen WJ, Sachse C, Müller CW (2015). Molecular structures of unbound and transcribing RNA polymerase III. *Nature*, 528 (7581): 231–236
- Jin DJ, Cagliero C, Martin CM, Izard J, Zhou YN (2015). The dynamic nature and territory of transcriptional machinery in the bacterial chromosome. *Front Microbiol*, 6: 497
- Jonkers I, Lis JT (2015). Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16 (3): 167–177
- Kopp K, Gasiorowski JZ, Chen D, Gilmore R, Norton JT, Wang C, Leary DJ, Chan EK, Dean DA, Huang S (2007). Pol I transcription and pre-rRNA processing are coordinated in a transcription-dependent manner in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 18 (2): 394–403
- Lagrange T, Kapanidis AN, Tang H, Reinberg D, Ebright RH (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev*, 12: 34–44
- Liu X, Kraus WL, Bai X (2015). Ready, pause, go: regulation of RNA polymerase II pausing and release by cellular signaling pathways. *Trends Biochem Sci*, 40 (9): 516–525
- Qureshi SA, Jackson SP (1998). Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength. *Mol Cell*, 1: 389–400
- Venters BJ, Pugh BF (2013). Genomic organization of human transcription initiation complexes. *Nature*, 502 (7469): 53–58
- Wang X, Shi M, Wang D, Chen Y, Cai F, Zhang S, Wang L, Tong Z, Tian WM (2013). Comparative proteomics of primary and secondary laticifers reveals that chitinase and glucanase play a crucial combined role in rubber particle aggregation in *Hevea brasiliensis*. *J Proteome Res*, 12: 5146–5159
- Xu L, Wang W, Chong J, Shin JH, Xu J, Wang D (2015). RNA polymerase II transcriptional fidelity control and its functional interplay with DNA modifications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 50 (6): 503–519
- Zhou JJ, Liang Y, Niu QK, Chen LQ, Zhang XQ, Ye D (2013). The Arabidopsis general transcription factor TFIIB1 (*AtTFIIB1*) is required for pollen tube growth and endosperm development. *J Exp Bot*, 64 (8): 2205–2218

Cloning and expression analysis of *HbTFIIB* in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)

CHAO Jin-Quan, CHEN Yue-Yi, YANG Shu-Guang, TIAN Wei-Min*

Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Ministry of Agriculture Key Laboratory of Rubber Biology/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: In the present study, a homologue of *TFIIB* was cloned from the latex of rubber tree clone CATAS7-33-97 by the rapid amplification of cDNA ends (RACE) and RT-PCR techniques. The cDNA was named as *HbTFIIB*. *HbTFIIB* was 1 472 bp in length, and contained a 810 bp open reading frame (ORF) encoding a putative protein of 270 amino acids. The predicted molecular mass of HbTFIIB was 29.48 kDa with a pI of 8.3. Real-time RT-PCR analysis showed that *HbTFIIB* expression was up-regulated by tapping. Its expression level in the latex collected at the early stage of latex flow was significantly higher than that collected at the late stage of latex flow. Although the content of HbTFIIB protein increased upon tapping, it significantly decreased in the latex collected at the late stage of latex flow. The results suggested that the transcription and translation of transcriptional complex may be enhanced by tapping and the transcriptional complex could be lost during latex flow.

Key words: *Hevea brasiliensis*; laticifer cells; latex; transcriptional complex; *HbTFIIB*

Received 2016-12-14 Accepted 2017-07-03

This work was supported by the Earmarked Fund for Modern Agro-Industry Technology Research System (Grant No. CARS-34-GW1) and the Fundamental Research Funds for Rubber Research Institute, CATAS (Grant No. 1630022014004).

*Corresponding author (E-mail: wmtian@163.com).