

枸杞 WRKY 基因片段克隆与表达分析

王丽娟, 高蔚锋, 管翠萍, 王彦才

(宁夏大学, 宁夏 银川 750021)

摘要:以枸杞为试材,根据已知物种 WRKY 转录因子保守片段设计引物,采用 RT-PCR 方法,克隆枸杞 WRKY 基因片段,并对所得片段进行序列分析,同时利用 Real-time PCR 鉴定该基因在枸杞各器官的表达,以了解 WRKY 转录因子在枸杞中的功能。结果表明:从枸杞果实中获得了 467 bp 的 cDNA 片段,命名为 *LbWRKY* (GenBank:KF181204)。序列分析表明,该序列含有 WRKYGQK 保守结构域,与番茄 WRKY 序列相似性是 95%,与烟草 wizz 相似性是 91%,表明已经成功克隆了枸杞 WRKY 基因片段。Real-time PCR 表达分析显示,*LbWRKY* 基因在枸杞果实中表达量最高,在叶中表达水平较低,在根中未检测到其表达。

关键词:枸杞;WRKY 转录因子;克隆;表达分析

中图分类号:Q 785 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)20-0089-06

WRKY 蛋白是近年来发现的植物特有的一类重要转录因子,起源较真核生物早,伴随着植物的进化 WRKY 获得了较大的发展。第 1 个 WRKY 转录因子是 Ishiguro 等^[1]从甘薯中克隆获得的,近年来在烟草、大麦、小麦、野生马铃薯、水稻、棉花、甘蔗、甘菊及沙漠豆类等物种中均分离出 WRKY 基因^[2-8]。WRKY 结构域能与 W-box 序列((T)(T)TGAC(C/T))专一性结合,从而参与植物的多种逆境胁迫反应^[9]。此外,在植物生长的种子发育、植物形态建成、赤霉素信号传导活动中亦有 WRKY 基因的表达^[10]。

WRKY 转录因子是一个庞大的超基因家族,虽然不同家族的 WRKY 转录因子结构上具有一定的保守性,但它们在生物活性和作用目标上表现出很大差异,WRKY

转录因子在哪种信号途径发挥作用,主要由其结合的启动子附近序列的特异性决定^[11]。能够与 WRKY 转录因子发生特异性结合的 W-box 序列存在于一些与发育、生长、抗病相关基因的启动子中,WRKY 转录因子可能通过与 W-box 的特异性相互结合实现其对信号途径的调控^[3]。

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科枸杞属多年生落叶灌木,果实称为枸杞子,枣核小,鲜红色,是我国传统的名贵中药材,具有补肾养肝、润肺明目之效^[12],因而受到人们的重视。我国枸杞品种资源丰富,但品质好的优良资源相对匮乏。为弥补枸杞品种的不足,科研人员努力培育枸杞新品种,目前表现较好的有“宁杞 1 号”,但在品质上表现出明显的差异^[13],其差异究竟是由哪些原因导致尚不清楚。研究表明,WRKY 转录因子参与果实、根、种皮、毛状体等发育,为了揭示枸杞果实发育过程中决定品质的主要转录因子的调控机理,现以宁夏枸杞为研究材料,根据 WRKY 保守序列设计特异引物,利用 RT-PCR 技术克隆得到 WRKY 基因片段,并

第一作者简介:王丽娟(1974-),女,博士,副教授,现主要从事植物基因工程研究工作。E-mail:Lijuanwang279@hotmail.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260065)。

收稿日期:2013-07-24

Application of Ground Cover Plants in Roof Greening

YIN Juan¹, CHEN Li-wen¹, XU Yun-long²

(1. Xinyang College of Forestry, Xinyang, Henan 464000; 2. Jiangxi Province Double Gold Citrus Experiment Station, Zhangshu, Jiangxi 331213)

Abstract: Based on the brief introduction of the characters of roof greening, the types of roof greening, planting requirements of roof greening, ecological benefits of roof greening, the excellent properties of ground cover plants in the application of roof greening were mainly described, in order to provide a reference for plant selection and configuration.

Key words: ground cover plants; roof greening; application value

对其进行序列和表达分析,以期克隆基因全长和进一步研究 WRKY 对枸杞品质形成的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为种植于宁夏农林科学院园艺研究所试验田的“宁杞1号”,于2012年8月选取生长5a枸杞幼树,从植株树冠的各方向采取无病虫害的果实,取样后于液氮中速冻后,−70℃保存用于RNA提取。

TOP-10 感受态细胞,琼脂糖凝胶回收试剂盒, pGM-T 克隆试剂盒均购于天根生化科技(北京)有限公司。RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购于 Fermentas 公司; Taq DNA 聚合酶、dNTP、植物 RNA 提取试剂盒购于 Takara 公司;质粒小提试剂盒,PCR 产物纯化试剂盒购于 Biomiga 公司;其它试剂均为国产分析纯。引物委托上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 枸杞总 RNA 的提取与反转录 按照植物 RNA 提取试剂盒说明书的要求,称取 0.01 g 枸杞果实提取总 RNA,取总 RNA 0.8 μg,按照 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明,以 Oligo-dT 为引物通过 RT-PCR 逆转录制备 cDNA 第 1 链。

1.2.2 扩增目的基因 利用 Dnaman 6.0 软件分析已知物种 WRKY 基因的核苷酸序列,在保守区域设计引物。上游引物 W-1F:5'-TTGGATGGAAGTGTGGACG-3',下游引物 W-1R:5'-GTAAGATCGAGAGTGATGGTT-3'。以反转录的 cDNA 为模板,利用 W-1F 和 W-1R 引物采用 PCR 技术扩增枸杞 WRKY 基因的保守片段。反应条件为:预变性 94℃ 3 min;变性 94℃ 30 s;退火 58℃ 30 s;延伸 72℃ 40 s。35 个循环,72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 基因克隆与测序 PCR 扩增产物电泳检测后回收目的片段,16℃ 与 pGM-T Easy 载体连接,后转化 TOP-10 感受态细胞,在涂布有 X-gal/IPTG、氨苄青霉素及的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,挑取阳性克隆,进行菌落 PCR 检测。随机选取 3 个独立的阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

1.2.4 序列分析 基因 DNA 序列翻译、比对用 Dnaman 6.0 进行,核苷酸、氨基酸序列的同源序列搜索采用在线 BLAST 进行(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>,NCBI 提供);系统演化树用 MEGA 5.0 进行。

1.2.5 组织表达分析 取 5 a 生枸杞的根、茎、叶、花、果柄、果实为材料,提取总 RNA,并进行反转录。以持家基因 β-actin 为内参(引物:Actin1:5'-TCACACTTTC-TACAATGAGCT-3'; Actin R:5'-GATATCCACATCA-CACTTCAT-3'),以合成的样品 cDNA 稀释 50 倍为模板,采用 real-time PCR 检测 WRKY 基因在枸杞不同组织中的表达量。使用 Primer Primer 5.0 设计荧光定量引物。荧光定量引物(W2F:5'-GGAGAACATAAC-

CATCCACGA-3'; W2R:5'-GAGCAAGGCACTGAAG-TAGTA-3')。反应体系为:模板 cDNA 1 μL(10 ng/μL),上下游引物分别为 0.25 μL,SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa) 10 μL, ddH₂O 8.5 μL。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 10 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,35 个循环,每个样品 3 个重复。数据分析用 ABI 7300 system 软件和 2^{−ΔΔCT} 方法,每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 枸杞总 RNA 完整性分析

纯度高、完整性好的 RNA 是基因克隆成功的前提条件。提取的枸杞总 RNA,经紫外分光光度计测定其 OD_{260/280} 在 1.8~2.0 之间,说明获得的枸杞果实总 RNA 纯度好。由图 1 可知,经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后出现 18S 和 28S 2 条带,带明亮、边缘完整、清晰,且 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的 2 倍,说明提取的 RNA 较完整。

2.2 枸杞 WRKY 基因片段克隆

以枸杞果实总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,RT-PCR 扩增 WRKY 基因 cDNA 序列。由图 2 可知,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带大小约 450 bp。纯化目的条带连接 pGM-T Easy 载体,重组质粒 PCR 鉴定阳性克隆。将 PCR 产物测序验证发现, LbWRKY 基因片段 467 bp,编码 155 个氨基酸,将序列递交 GeneBank 数据库注册,注册号为:KF181204。

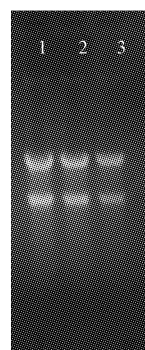


图 1 枸杞 RNA 电泳

注:1~3:不同“宁杞1号”植株。

Fig. 1 Electrophoresis of RNA

Note: 1 ~ 3: Different 'Ningqi No. 1' plants.

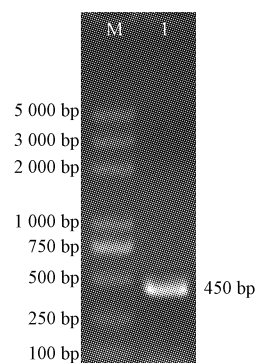


图 2 LbWRKY 基因片段克隆

注: M: Trans 2K™ plus

DNA Marker; 1: PCR 产物。

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product of LbWRKY gene partial

Note: M: Trans 2K™ plus DNA Marker; 1: PCR products.

2.3 LbWRKY 基因序列分析

图 3 为 LbWRKY 核苷酸与推导氨基酸的序列,黑色边框区域(WRKYGQK)为该基因的高度保守区-WRKY 域(图 4)。在 NCBI 网上使用 BLAST 对测序的结果进行同源性分析,由图 5 可知, LbWRKY 的 cDNA 与番茄 WRKY、番茄 WRKY2、烟草 wizz、辣椒 WRKY、茶 WRKY 的同源性分别为 95%、93%、91%、86%、78%,多重比较结果见图 6。

```

      10      20      30      40      50      60
1      TTGGATGGAAGTCTGGGACGTTTATCAGAAAGTAGCTCGAGTGATGAAGAGTCTTGTGTC
1      L D G T C G R L S E S S S S D E E S C C

      70      80      90      100     110     120
61     AAGAACTGAGGAAGAACACATAAAAACTAAGTTTCTGTCGTTTCTATGAGAACTGAA
21     K K L R E E H I K T K F S V V S H R T E

      130     140     150     160     170     180
121    GCATCTGATACAAGTCTTATAGTGAAGGATGTTATCAATGGAGGAAATATGGGCAGAAG
41     A S D T S L I V K D G Y Q W R K Y G Q K

      190     200     210     220     230     240
181    GTAACAGAGACAACCCTTGTCCAAGAGCTTACTTCAGATGCTATTGACCTGGTTGC
61     V T R D N P C P R A Y F R C S F A P G C

      250     260     270     280     290     300
241    CCTGTCAAGAAAAAGTTCAAAGAAGCATTGAAGATCAGTCTATTGGTAGCAACATAT
81     P V K K K V Q R S I E D Q S I V V A T Y

      310     320     330     340     350     360
301    GAAGGAGAACATAACCATCCACGAACCTCAAGACTTGAATCAGGTCCAAGTACAATACT
101    E G E H N H P R T S R L E S G P S T N T

      370     380     390     400     410     420
361    TCCACAGCCGCGATTAAATGTGACAACATATCGCGGGCACTACTTCAAGTGCCTTGC
121    S T A S R L N V T T I A G T T T S V P C

      430     440     450     460
421    TCTACCACTCTCAATTCCTCAGGACCAACCATCACTCTCGATCTTAC
141    S T T L N S S G P T I T L D L
```

图 3 *LbWRKY* 的核苷酸序列与推导的氨基酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *LbWRKY*

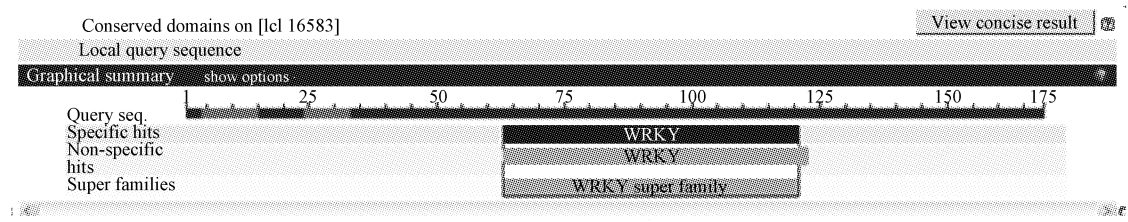


图 4 预测的 *LbWRKY* 保守区

Fig. 4 Conserved region prediction of *LbWRKY*

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Solanum lycopersicum WRKY (LOC100191122). mRNA >[EU755370.2] Solanum lycopersicum isolat WRKY1000.3 WRKY mRNA, complete cds	710	710	97%	0.0	95%	NM_001247468.1
<input type="checkbox"/>	Solanum lycopersicum WRKY transcription factor 2 (LOC100301937). mRNA >[FJ654264.1] Solanum lycopersicum WRKY transcription factor 2 mRNA, comp	677	677	97%	0.0	93%	NM_001247335.1
<input type="checkbox"/>	Solanum lycopersicum WRKY transcription factor 1 (LOC100301944). mRNA >[FJ654265.1] Solanum lycopersicum WRKY transcription factor 1 mRNA, comp	655	655	97%	0.0	92%	NM_001247372.1
<input type="checkbox"/>	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL1013AE10, HTC in leaf	641	641	97%	2e-180	91%	AK320773.1
<input type="checkbox"/>	Solanum lycopersicum JA-induced WRKY protein (LOC100736443). mRNA >[FJ654291.1] Solanum lycopersicum JA-induced WRKY protein mRNA, complete	619	619	94%	6e-174	91%	NM_001247597.1
<input type="checkbox"/>	Nicotiana tabacum wizz mRNA, complete cds	547	547	97%	3e-152	86%	AB028022.1
<input type="checkbox"/>	Capsicum annuum WRKY family transcription factor mRNA, complete cds	545	545	97%	1e-151	86%	AY789641.1
<input type="checkbox"/>	Capsicum sinensis WRKY transcription factor 40 mRNA, complete cds	363	363	99%	7e-97	78%	JQ820201.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Solanum lycopersicum probable WRKY transcription factor 40-like (LOC101246812). mRNA	291	291	62%	4e-75	82%	XM_004235893.1
<input type="checkbox"/>	Solanum lycopersicum cDNA, clone: LEFL2006J14, HTC in fruit	291	291	62%	4e-75	82%	AK326408.1
<input type="checkbox"/>	Boea hygrometrica transcription factor WRKY [(WRKY1) mRNA, complete cds	289	289	65%	1e-74	82%	FJ222453.1
<input type="checkbox"/>	Ricinus communis WRKY transcription factor, putative, mRNA	279	279	63%	2e-71	81%	XM_004253945.1
<input type="checkbox"/>	Jatropha curcas CL4908. Contig2 JC-CK 1A transcribed RNA sequence	273	273	63%	1e-69	80%	GAHK01011818.1
<input type="checkbox"/>	Capsicum annuum WRKYd transcription factor mRNA, complete cds	269	269	62%	1e-68	80%	GQ249255.1
<input type="checkbox"/>	Populus trichocarpa predicted protein, mRNA	268	268	65%	4e-68	80%	XM_002332040.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Glycine max probable WRKY transcription factor 40-like, transcript variant 2 (LOC100807966). mRNA	253	253	63%	9e-64	79%	XM_003530218.1
<input type="checkbox"/>	PREDICTED: Glycine max probable WRKY transcription factor 40-like, transcript variant 1 (LOC100807966). mRNA	253	253	63%	9e-64	79%	XM_003530217.1

图 5 枸杞 *LbWRKY* 的比对结果

Fig. 5 The result of *LbWRKY* by Blast

KF181204TGGATGGAAC	12
JQ820201ATGGTAACAATGATGGAATTTCATGGAAC	133
AY789641	TCAACATCAACAAACAACAAC..AACTGGATCTGTG	474
AB028022ACAAGAAAACAAC..AACTGGATATGTT	447
NM_001247597ATAATAATAATGAAATGCTGAAACGTC	456
NM_001247468ACAAGAAAACAAC..AACTGGATATGTT	426
Consensus	t	
KF181204	EGT..GGAGCTTAA..TCAGAAAGTACGTGACATGAA	48
JQ820201	CGCA..CGAAATTCG...GAGAGTACGTGACCCAGAA	167
AY789641	CCT..GGAGCTTCA..TCAGAAAGTACGTGACATGAA	510
AB028022	EGT..GGAGCTTAA..TCAGAAAGTACGTGACATGAA	483
NM_001247597	AGTTCAAGTGTTCATTCAGAGACAGTGTCTTATGAA	496
NM_001247468	EGT..GGAGCTTAA..TCAGAAAGTACGTGACATGAA	462
Consensus	tt ga ag ag tc g a gaa	
KF181204	GATCTCTTTCGAAGAAAGTACGCAAGAACATATAAAA	88
JQ820201	GATTCCTT...GCAAGAAAGTACGCAAGAACATGTCAGG	204
AY789641	GATCTCTTTCGAAGAAAGTACGCAAGAACATATAAAG	550
AB028022	GATCTCTTTCGAAGAAAGTACGCAAGAACATATAAAA	523
NM_001247597	GATTCATCTACAAAGAAACAGCAAGAACATATAAAA	536
NM_001247468	GATCTCTTTCGAAGAAAGTACGCAAGAACATATAAAA	502
Consensus	ga tc t aagaaac ag gaaga ca t aa	
KF181204	CAAAGTTTCTCTCTTTTATGAAAGTGAACATCTGA	128
JQ820201	CAAAGATTTCACGTTTGTGTGAGAACTGAATCCTCTGA	244
AY789641	CAAAGTTTACAGTTTGTGTGAGAACTGATCCTCTGA	590
AB028022	CAAAGTTTCTCTCTTTTATGAGGACAGAACATCTGA	563
NM_001247597	CAAAGATTTCACGTTTATATGAAAGTGAACATCTGA	576
NM_001247468	CAAAGTTTCTCTCTTTTATGAGGACAGAACATCTGA	542
Consensus	c aag t c t t t tga ac ga c tctga	
KF181204	TACAAGTCTTATAGTCAAGGATGGTATCAATGGAGGAA	168
JQ820201	TACAAGTCTTATAGTCAAGATGGATATCAATGGAGGAA	284
AY789641	TACCTCTCTTATTTGTAAGGATGGTATCAATGGAGGAA	630
AB028022	TACCTCTCTTATTTGTAAGGATGGTATCAATGGAGGAA	603
NM_001247597	TACTCTCTTATAGTCAAGATGGATACCAATGGAGGAA	616
NM_001247468	TACCTCTCTTATTTGTAAGGATGGTATCAATGGAGGAA	582
Consensus	tac tcttat gt aa gatgg ta ca tggaggaa	
KF181204	TATGGCCAGAAAGGTACAGAGACAAACCTTTGCCAAGAG	208
JQ820201	TATGGCCAAAGGTACAGAGACAAACCTTTGCCAAGAG	324
AY789641	TATGGCCAGAAAGTACAGAGACAAACCTTTGCCAAGAG	670
AB028022	TATGGTCAGAAAGTACAGAGACAAACCTTTGCCAAGAG	643
NM_001247597	TATGGCCAGAAAGTACAGAGACAAACCTTTGCCAAGAG	656
NM_001247468	TATGGCCAGAAAGTACAGAGACAAACCTTTGCCAAGAG	622
Consensus	ta tgg ca aa gt ac agagacaa cctt tccaagag	
KF181204	CTTACTTCAATGCTCTTTTGCACCTGGTTCCTGTCAA	248
JQ820201	CTTACTTCAATGCTCTTTTGCACCTAGGTGCTGTCAA	364
AY789641	CTTACTTCAATGCTCTTTTGCACCTAGGTGCTGTCAA	710
AB028022	CTTACTTCAATGCTCTTTTGCACCTGGTTCCTGTCAA	683
NM_001247597	CTTACTTCAATGCTCTTTTGCACCTGGTTCCTGTCAA	696
NM_001247468	CTTACTTCAATGCTCTTTTGCACCTGGTTCCTGTCAA	662
Consensus	cttactt a tgcctc tttgc cct tg cc gtc aa	
KF181204	GAAAGAGGTCAAGAAGCATGAAGATCAGTCTATTGTG	288
JQ820201	GAAGAAGGTGCAAGAAGCTGAAGATCAATCTATTGTG	404
AY789641	GAAGAAGGTTCAGAGAAGCATGAAGATCAGTCTATTGTG	750
AB028022	GAAAGAGGTGCAAGAAGCATGAAGATCAGTCTATTGTG	723
NM_001247597	GAAAGAGGTTCAGAGAAGCATGAAGATCAGTCTATTGTG	736
NM_001247468	GAAAGAGGTTCAGAGAAGCATGAAGATCAGTCTATTGTG	702
Consensus	gaa aaggt ca agaag t gaagatca t tt tg	
KF181204	GTAGCAACATATGAAGGAGACATAAACCATCCAGAACCT	328
JQ820201	GTAGCAACATATGAAGGAGACATAAACCATCCAGAGGCTT	444
AY789641	GTAGCAACATATGAAGGAGACATAAACCATCCAGAACCT	790
AB028022	GTAGCAACATATGAAGGAGACATAAACCATCCAGTAAACC	763
NM_001247597	GTAGCAACATATGAAGGAGACATAAACCATCCAGAACCT	776
NM_001247468	GTAGCAACATATGAAGGAGACATAAACCATCCAGAACCT	742
Consensus	gt gcaacat atgaaggaga ca aaccatcca	
KF181204	GAGAGCTTCAATCAGG.....TCCAAGTACAAATAGTC	362
JQ820201	GAGAGCTTCAAGCAAC.....AAGATC	466
AY789641	GAAAGCTCAAGCAAGAGGTGCAAAATCTACTCTAGTC	830
AB028022	GT...TCAAGCAAGAGGTGCTCTCTACTCTAGTC	800
NM_001247597	GAAAGCTCAATCAGG.....TCCAAGTACAAATAGTC	810
NM_001247468	GAAAGCTCAATCAGG.....TCCAAGTACAAATAGTC	776
Consensus	c a ca ac te	
KF181204	CACAGCCACCCGTTAAATGTACACTATCGCGGGCACT	402
JQ820201	AAGCTTAACCG...AGGCATGACACTA.....	491
AY789641	CAGTGGCAGCCGTTAAATGTACACTATCGCGGGTACT	870
AB028022	CAGCGGCAGCCGTTAAATGTACACTATCGCGGGTACT	840
NM_001247597	CACAGCCACCCGATTAAATGTACACTATCGCGGGCACT	850
NM_001247468	CACAGCCACCCGATTAAATGTACACTATCGCGGGCACT	816
Consensus	a a ccg a tga acta	
KF181204	ACTAGTTCAAGTCCCTTGCTCTACCACTCTCAATTCTCAG	442
JQ820201	...GGTTCAGTCCCTTGCTCTGCTCTCTCAGCTCATCTG	528
AY789641	ACTAGTTCAAGTCCCTTGCTCTACCACTCTCAATTCTCAG	910
AB028022	ACAGGTTCAAGTCCCTTGCTCTACCACTCTCAATTCTCAG	880
NM_001247597	ACTAGTTCAAGTCCCTTGCTCTACCACTCTCAATTCTCAG	890
NM_001247468	ACTAGTTCAAGTCCCTTGCTCTACCACTCTCAATTCTCAG	856
Consensus	ttcagt ccttgctct c ctctca c tc g	
KF181204	GACCAACCATCACTCTGATCTTAC.....	467
JQ820201	GACCAACCATCACTCTGATCTTACAAAACCTAAGACC..	566
AY789641	GACCAACCATCACTCTGATCTTACTGGACCCAAAACAGT	950
AB028022	GACCAACCATCACTCTGATCTTACTGAACCTACAACAGT	920
NM_001247597	GACCAACCATCACTCTGATCTTACTGGACCCAAAACAGT	930
NM_001247468	GACCAACCATCACTCTGATCTTACTGGACCCAAAACAGT	896
Consensus	gaccaaccat actct gatct ac	

图6 枸杞 *LbWRKY* 的比对结果Fig.6 *LbWRKY* after alignment

2.4 枸杞与其它物种 WRKY 的同源性

选取相似性高的 13 种植物的 WRKY 核酸序列,经多序列联配程序 MEGA 5.0 的比对,构建了 15 种植物

的系统发育树。从图 7 可以看出,枸杞 WRKY 与番茄、烟草的 WRKY 亲缘关系最近,与其它非茄科材料的相对较远。

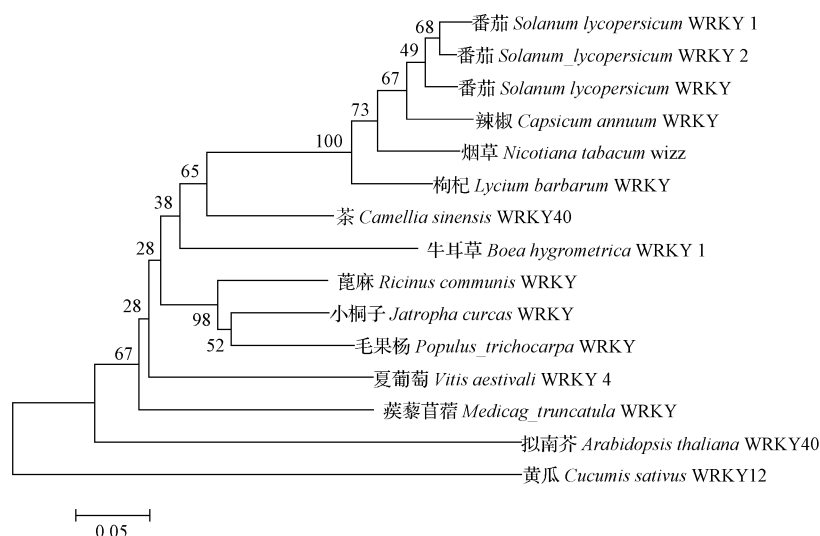


图 7 利用 MEGA 5.0 对不同物种来源的 WRKY 基因核酸序列系统树

Fig. 7 Phylogenetic tree of *LbWRKY* from various organisms by MEGA 5.0

2.5 枸杞 WRKY 基因在不同组织中的表达分析

WRKY 转录因子通常以超家族的形式存在,虽然家族成员间具有相似性,但其基因表达存在很大差异。由图 8 可知,*LbWRKY* 在枸杞果实中表达高,在叶中表达较少,在根中未检测到其表达,说明 *LbWRKY* 在枸杞形态建成过程中起着重要的作用,可能主要参与枸杞发育与物质代谢过程。

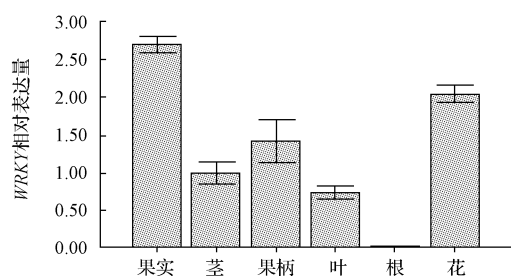


图 8 *LbWRKY* 基因在枸杞不同器官中的表达

Fig. 8 *LbWRKY* gene expression in different organs of *Lycium barbarum* L.

3 讨论

WRKY 是一类在植物中发挥特殊作用的转录调控因子,研究发现其参与植物的生长和发育,同时影响植物的衰老、抗胁迫和抗病反应^[14-15]。WRKY 家族的显著特点是:至少含有一段大约 60 个氨基酸的 WRKY 保守结构域,其 N-端几乎均 WRKYGQK 样的一个保守的 7 肽;在这个结构域的 C-端具有一个新型的锌指结构: C2-H2 或者 C2-HC^[16]。此外,WRKY 还有 NLS(核定位

序列),LZs(亮氨酸拉链)以及富含丝氨酸、苏氨酸、谷氨酰胺域和富含脯氨酸域等结构特点^[17]。

WRKY 在多种组织中广泛存在,参与众多代谢过程的调节。WRKY 基因的表达为非组成型表达,具有组织特异性、快速、瞬时等特点。该试验发现,枸杞中 WRKY 基因在果实中表达最高,而在叶中表达量较低,在根中未检测到表达。Aoki 等^[18]研究表明,番茄中有 2 个含 WRKY 结构域的片段(TC89462 和 TC95361),随着果实的成熟其表达量表现出逐渐增加的趋势。Turck 等^[9]研究发现,WRKY 转录因子能与自身启动子中 W 盒结合参与自身的表达调控。拟南芥控制表皮毛发育的基因产物 TTG2 中发现了含有 WRKY 结构的区域^[14];大麦中具有典型的 WRKY 结构的 *SUSIBA2* 转录因子,能够特异性结合 *ISO1*(异淀粉酶基因)启动子区的 W-box,随后与 SURE(蔗糖信号反应因子)结合,以促进 *ISO1* 基因的转录,实现对淀粉合成的调节,由此推测 WRKY 因子与植物碳水化合物的合成代谢调控相关^[19]。在水稻基因组序列中搜索到了 77 个含 WRKY 结构的序列,其中 OsWRKY71 是一种转录抑制因子,与 GA 诱导的 α -淀粉酶基因 *AMY32b* 启动子区域的 W-box 结合,抑制基因转录,其在糊粉层细胞中大量表达^[20]。Xu 等^[21]在棉花中证实 GaWRKY1 能激活杜松烯合成酶基因的启动子,促进基因的表达。目前有关 WRKY 的研究还仅限于几种模式植物或重要农作物,随着研究的不断广泛深入,WRKY 因子的更多功能将会被揭示出来。

该研究首次成功分离了枸杞 *LbWRKY5* 基因片段, 并对其序列结构和表达特点进行了初步分析, 为进一步研究该基因的功能, 特异地改变枸杞的生长和发育模式, 从而探明枸杞品质形成机理等方面都具有一定意义。

参考文献

- [1] Ishiguro S, Nakamura K. Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5', upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato[J]. Mol Gen Genet, 1994, 244(6): 563-571.
- [2] Rushton P J, Macdonald H, Huttly A K, et al. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of *a-Amy2* genes[J]. Plant Mol Biol, 1995, 29(4): 691-702.
- [3] Rushton P J, Torres J T, Parniske M, et al. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes[J]. EMBO J, 1996, 15(20): 5690-5700.
- [4] dePater S, Greco V, Pham K, et al. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*[J]. Nucleic Acid Res, 1996, 24(3): 4624-4631.
- [5] Yoda H, Ogawa M, Yamaguchi Y, et al. Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 267(2): 154-161.
- [6] Dong J X, Chen C H, Chen Z X. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene super family during plant defense response[J]. Plant Mol Biol, 2003, 51(1): 21-37.
- [7] Qiu Y P, Jing S J, Fu J, et al. Cloning and analysis of expression profile of 13 WRKY genes in rice[J]. Chin Sci Bull, 2004, 49(20): 1860-1869.
- [8] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY super family of plant transcription factors[J]. Trends Plant Science, 2000(5): 199-206.
- [9] Turck F, Zhou A, Somssich I E. Stimulus-dependent, promoter specific binding of transcription factor WRKY1 to its native promoter and the defense-related gene *PcPR1-1* in parsley[J]. Plant Cell, 2004, 16(10): 2573-2585.
- [10] Zhang Y J, Wang L J. The WRKY transcription factor super family its origin in eukaryotes and expansion in plants[J]. BMC Evol Biol, 2005, 5(1): 1-12.
- [11] Kalde M, Barth M, Somssich I E, et al. Members of the *Arabidopsis* WRKY Group III transcriptional factors are part of different plant defense signaling pathways[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2003, 16(4): 295-305.
- [12] 白寿宁. 宁夏枸杞研究[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1999: 29-30.
- [13] 郑国琦, 罗霄, 买立芸, 等. 不同品种宁夏枸杞果实糖积累差异的生理原因[J]. 农业科学研究, 2009, 30(1): 1-4.
- [14] Johnson C S, Kolevski B, Smyth D R. Transparent test a *GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor[J]. Plant Cell, 2002, 14(6): 1359-1375.
- [15] Zhang Z L, Xie Z, Zou X, et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells[J]. Plant Physiol, 2004, 134(4): 150-1513.
- [16] Wu K L, Guo Z J, Wang H H, et al. The WRKY family of transcription factors in rice and *Arabidopsis* and their origins[J]. DNA Res, 2005, 12(1): 9-26.
- [17] 贾翠玲, 侯和胜. 植物 WRKY 转录因子的结构特点及其在植物防卫反应中的作用[J]. 天津农业科学, 2010(2): 21-26.
- [18] Aoki K, Yano K, Suzuki A, et al. Large-scale analysis of full length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom a reference system for the *Solanaceae* genomics[J]. BMC Genomics, 2010, 11(3): 1471-2164.
- [19] Sun C, Palmqvist S, Olsson H, et al. A novel WRKY transcription factor, *SUSIBA2*, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-reponsive elements of the *isol* promoter[J]. Plant Cell, 2003, 15(9): 2076-2092.
- [20] Shree P P, Imre E S. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. Plant Physiol, 2009, 150(4): 1648-1655.
- [21] Xu Y H, Wang J W, Wang S, et al. Characterization of *GaWRKY1*, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A[J]. Plant Physiol, 2004, 135(1): 507-515.

Cloning and Expression Analysis of WRKY Gene Segment in *Lycium barbarum* L.

WANG Li-juan, GAO Wei-feng, GUAN Cui-ping, WANG Yan-cai
(Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking *Lycium barbarum* L. as material, primers were designed according to WRKY conserved transcription factor fragment from known species. *Lycium barbarum* L. WRKY gene fragments were cloned by RT-PCR method. Sequence of the fragments obtained was analyzed. The expression of *Lycium barbarum* L. in various organs was identified by Real-time PCR. They all contributed to research the function of WRKY transcription factor of *Lycium barbarum* L. The results showed that the cDNA fragment was 467 bp and named *LbWRKY* (GenBank: KF181204). Sequential analysis indicated that the sequence contained WRKYGQK conservative domain, and the similarity with *Solanum lycopersicum* WRKY and *Nicotiana tabacum* wizz were 95% and 91%, respectively. The results showed that WRKY gene sequence in *Lycium barbarum* L. was cloned successfully. Real time PCR analysis showed that the *LbWRKY* gene was highly expressed in fruit. The expression level reached the lowest level in leaf. *LbWRKY* didn't express in root.

Key words: *Lycium barbarum* L.; WRKY transcription factor; gene cloning; expression analysis