

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201312034

王彩云,李富生,李涛,等. 滇龙胆 *GrWRKY5* 基因的克隆和植物表达载体构建[J]. 广西植物,2015,35(5):741-747Wang CY, Li FS, Li T, et al. Cloning and construction of plant expression vector of *GrWRKY5* gene in *Gentiana rigescens*[J]. *Guihaia*, 2015, 35(5): 741-747

滇龙胆 *GrWRKY5* 基因的克隆和植物表达载体构建

王彩云^{1,4}, 李富生¹, 李涛², 李彩霞², 张晓东^{2*}, 王元忠³

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 昆明 650201; 2. 玉溪师范学院 资源环境学院, 云南 玉溪 653100; 3. 云南省农业科学院 药用植物研究所, 昆明 650223; 4. 贵州省毕节市中药研究所, 贵州 毕节 551700)

摘要: WRKY 蛋白是目前被广泛研究的一类 DNA 特异结合转录因子, 在植物次生代谢物生物合成、植物生长和发育及衰老等生理过程以及生物、非生物防御反应中起重要的调控作用。该研究从滇龙胆幼叶中克隆萜类合成的关键转录因子基因 *GrWRKY5*, 并利用生物信息学方法对基因功能进行预测, 构建植物过表达载体。结果表明: 根据三年生滇龙胆转录组 *GrWRKY5* 基因序列, 设计特异性引物, 通过 RT-PCR 扩增 *GrWRKY5* ORF 序列, 并进行 TA 克隆、测序和序列分析; 构建入门载体 pENTR™2B-*GrWRKY5*, 经 LR 反应后构建植物过表达载体。 *GrWRKY5* ORF 全长 591 bp, 编码 196 个氨基酸, GenBank 登录号为 KF922375, 其中第 167 与 170 之间的色氨酸(W)、精氨酸(R)、赖氨酸(K)、酪氨酸(Y)组成 WRKY 蛋白所特有的“WRKY”结构。序列分析表明 *GrWRKY5* 是 WRKY 超家族的成员。经生物信息学在线软件分析发现, *GrWRKY5* 的等电点为 6.29, 脂肪族指数为 61.37, 不稳定指数为 57.80。总平均疏水性为 -0.708, 为亲水蛋白; 含有 20 种氨基酸, 其中天冬氨酸(Asp)和脯氨酸(Pro)含量最高, 为 8.1%; 半胱氨酸(Cys)含量最低, 仅为 1.0%。氨基酸序列系统发育分析表明, *GrWRKY5* 与拟南芥中 WRKY 家族中遗传距离最接近的是 WRKY27, 属于 II e 类成员; 与 CrWRKY22 和 VvWRKY22 蛋白的亲缘关系较近; 与 JcWRKY47 和 TcWRKY27 亲缘关系较远; BLASTp 结果显示, *GrWRKY5* 与欧洲油菜 BnWRKY27-1 的同源性最高(为 69%); 与拟南芥 AaWRKY22 的一致性最低(仅为 31%)。以 Gateway 入门载体 pENTR2B 和目的载体 pK₂GW7 为基础, 成功构建了植物过表达载体 pK₂-35S-*GrWRKY5*, 该载体的成功构建为该基因在拟南芥、滇龙胆等植物中的遗传转化奠定了基础, 同时为 WRKY 基因功能的深入研究提供依据。

关键词: 滇龙胆; *GrWRKY5*; 基因克隆; 序列分析; 植物表达载体构建**中图分类号:** Q943.2, Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)05-0741-07

Cloning and construction of plant expression vector of *GrWRKY5* gene in *Gentiana rigescens*

WANG Cai-Yun^{1,4}, LI Fu-Sheng¹, LI Tao², LI Cai-Xia²,
ZHANG Xiao-Dong^{2*}, WANG Yuan-Zhong³

(1. College of Agriculture and Biological Technology, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China; 2. College of Resources and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China; 3. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; 4. Bijie Institute of Traditional Chinese Medicine, Bijie 551700, China)

Abstract: WRKY protein is a class of specific DNA-binding transcription factor widely studied at present, which plays key regulating roles in the biosynthesis of plant secondary metabolites, the physiological processes of plant growth,

收稿日期: 2014-08-23 修回日期: 2014-10-21

基金项目: 国家自然科学基金(81260608); 云南省教育厅科学研究基金重点项目(2013Z075); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI13B02-04)。

作者简介: 王彩云(1989-), 女, 云南宣威人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源评价与利用, (E-mail) wangcaiyun0716@126.com。

*通讯作者: 张晓东, 博士, 讲师, 主要研究方向为植物代谢基因工程, (E-mail) zxd95@126.com。

development, senescence and the defense reactions of both biotic and abiotic stresses. To obtain the key transcription factors involved in the terpenoid biosynthesis, a gene *GrWRKY5* was cloned from the spire of *Gentiana rigescens*. Its bioinformatic analysis was performed to predict its functions and its plant overexpression vector was also constructed. The gene specific primers were designed according to the transcript sequence of *GrWRKY5* from the transcriptome of triennial *G. rigescens*. The open reading frame (ORF) of *GrWRKY5* was obtained by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Then TA cloning, sequencing, and sequence analysis were performed. Entry vector pENTR™2B-*GrWRKY5* was constructed, and the plant overexpression vector of pK₂-35S-*GrWRKY5* was obtained after LR reaction. The ORF of *GrWRKY5* has a length of 591 bp and encodes a predicated protein of 196 amino acids. The GenBank accession number for *GrWRKY5* is KF922375. The tryptophan(W), arginine(R), lysine(K), tyrosine(Y) between 167 and 170 in WRKY protein consist of the "WRKY" symbolic structure. Sequence analysis showed that *GrWRKY5* was a member of "WRKY" superfamily. Results of bioinformatics software on line analysis showed that the theoretical isoelectric point (pI), the aliphatic index and the instability index of *GrWRKY5* protein were 6.29, 61.37 and 57.80, separately. The GRAVY (grand average of hydropathicity) of *GrWRKY5* protein was -0.708, which indicated that it belonged to hydrophilic protein. *GrWRKY5* protein contained more than 20 kinds of amino acids, and the aspartic acid (Asp) and proline (Pro) accounted for the highest content (8.1%), while Cysteine (Cys) content was the lowest accounting for only 1.0%. Results of phylogenetic analysis showed that *GrWRKY5* was at the same evolutionary branch with AtWRKY27, a member of class IIe, and that *GrWRKY5* was close to the CrWRKY22 protein of *Catharanthus roseus* and the VvWRKY22 protein of *Vitis vinifera* and was far from the JcWRKY47 protein in *Jatropha curcas* and the TcWRKY27 protein in *Theobroma cacao*. Results of BLASTp showed that *GrWRKY5* protein had the highest identity (69%) with the BnWRKY27-1 protein in *Brassica napus*, while it had the lowest identity (31%) with the AaWRKY22 protein in *Arabidopsis thaliana*. The plant overexpression vector pK₂-35S-*GrWRKY5* which was suitable for agrobacterium tumefaciens and gene gun-mediated transformation was successfully constructed base on entry vector pENTR2B and destination vector pK₂GW7 of Gateway system. The successful construction of plant overexpression vector pK₂-35S-*GrWRKY5* will provide a foundation for its genetic transformation into *Arabidopsis thaliana* and *Gentiana rigescens* and provide a basis for the further study of gene function.

Key words: *Gentiana rigescens*; *GrWRKY5*; gene cloning; sequence analysis; construction of plant expression vector

WRKY 转录因子是近年来在植物中新发现的转录调控因子,最早由 Ishiguro *et al.* (1994) 在番薯 (*Ipomoea batatas*) 中发现,随后在烟草 (*Nicotiana tabacum*)、野生燕麦 (*Avena fatha*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、玉米 (*Zea mays*)、水稻 (*Oryza sativa*) 等植物中相继克隆了该家族的成员 (Wei *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012)。WRKY 基因在原生生物蓝氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*) (Pan *et al.*, 2009) 和粘液菌盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*) (Ülker *et al.*, 2004) 中的成功克隆,打破人们对该基因是植物中特有基因的误解,也证实了该基因的起源,即大约 15.4 亿年前,原生生物与植物分化之前。(张娟, 2009)。

WRKY 转录因子是一类含高度保守的、由约 60 个氨基酸残基组成的 WRKY 结构域的锌指蛋白,靠近氨基 (N) 末端的 7 个保守氨基酸 WRKYGQK 是该保守结构域的核心序列,而该序

列的变异将会导致 DNA 的结合活性的减弱或者丧失 (王彩云等, 2013); 而羧基 (C) 末端的类似锌指结构在植物进化中起重要作用 (Xie *et al.*, 2005)。根据锌指结构的特征及 WRKY 结构域的数量,将 WRKY 蛋白家族分为 3 类: 含有 2 个 WRKY 构结域及 C2-H2 (C-X4-5-CX22-23-H-X-H) 锌指结构的为第 I 类; 含有 1 个 WRKY 构结域及 C2-H2 (C-X4-5-CX22-23-H-X-H) 锌指结构的为第 II 类; 含有 1 个 WRKY 构结域及 C2-HC (C-X7-C-X23-H-X-C) 锌指结构的为第 III 类。(Eulgem *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010; 王彩云等, 2013)。

WRKY 转录因子在植物生物和非生物防御调控、生长发育和信号应答中起着重要作用 (Mingyu *et al.*, 2012; Rushton *et al.*, 2010; Robatzek *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2010)。Xu *et al.* (2004) 从陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) 中克隆到的 GaWRKY1 转录因子在棉子酚的生物合成调控中起重要作用,

而在该途径中 *GaWRKY1* 主要参与了陆地棉(+)-1- δ -杜松烯合酶-A-(+)-1- δ -cadinene synthase-A, CAD1-A)活性的调节; Ma *et al.* (2009)从黄花蒿 (*Artemisia annua*)中克隆到 *AaWRKY1* 基因,并证明该基因通过调节青蒿素生物合成途径中的关键酶基因 *amorpha-4, 11-dienes* (ADS)的活性进而参与青蒿素生物合成的调控。

滇龙胆 (*Gentiana rigescens*)是云南道地药材之一,其主要药效成分龙胆苦苷属萜类化合物(沈涛等,2011)。但其生物合成途径及调控机理尚不清楚,赵恒伟等(2012)的研究表明 *WRKY* 转录因子在萜类生物合成调控中起重要作用(赵恒伟等,2012)。目前,国内外对 *WRKY* 的研究主要集中在拟南芥、水稻等植物中,而有关滇龙胆等龙胆科植物 *WRKY* 基因功能的研究未见有报道。本研究将为龙胆苦苷等萜类化合物生物合成途径的研究及其调控机理的阐明奠定基础,同时为 *WRKY* 转录因子的深入研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

选取种植于云南省农业科学院药用植物研究所种质资源圃(25°08'04.50"N, 102°46'15.05"E)长势良好的滇龙胆 (*Gentiana rigescens*) 幼叶为材料。种植地海拔 1942 m, 年平均降水量 980~1 050 mm, 年平均气温 14.7 °C, 极端高温 30.4 °C, 极端低温-0.2 °C(王彩云等,2014a; 王彩云等,2014b)。大肠杆菌(*Escherichia coli*)Trans 5 α 感受态细胞购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 试剂

RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue Reagent、反转录试剂盒、限制性内切酶及 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷)等均购买于宝生物工程(大连)有限公司;高纯质粒小量制备试剂盒、多功能 DNA 纯化回收试剂盒购买于北京百泰克生物技术有限公司;入门载体 pENTRTM 2B 和植物过表达载体 pK₂GW7 由玉溪师范学院分子实验室保存;由上海捷瑞生物工程有限公司合成引物,生工生物工程(上海)有限公司完成测序工作(王彩云等,2014a; 王彩云等,2014b)。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取及 *GrWRKY5* 的 PCR 扩增 滇龙胆幼叶总 RNA 的提取按照多糖植物组织提取(RNAiso for Polysaccharide-rich Plant Tissue)试剂盒说明进行;cDNA 的合成根据 Reverse Transcriptase M-MLV(RNase H-)试剂盒说明书完成。根据三年生滇龙胆转录组 *GrWRKY5* 基因序列和入门载体 pENTRTM 2B, 设计 1 对特异引物 *GrWRKY5EcoRI-F*: GAATTCATGGCTGATTT-TGAAGATAATTG; *GrWRKY5XhoI-R*: CTC-GAGTTAAAAATGGAGCAATTTAATTTGA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 3 min;94 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 40 s,30 个循环;72 °C 延伸 7 min。

1.3.2 *GrWRKY5* 基因的克隆与测序 *GrWRKY5* 基因 PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测、分离后,按照说明书用胶回收试剂盒回收目的片段,纯化后连接到 pMD19-T 载体上,转化 *E. coli* Trans 5 α 感受态细胞,涂布于添加氨苄青霉素(100 mg · L⁻¹)、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板,37 °C 培养 12~16 h 后随机挑选阳性克隆摇菌并提取质粒,经 PCR 检测和酶切验证正确后测序,获得 pMD19T-*GrWRKY5* 重组载体(王彩云等,2014a, b)(图 1)。

1.3.3 *GrWRKY5* 的生物信息学分析 利用 NCBI 网站上的 BLAST 程序对 *GrWRKY5* 进行序列比对;利用在线软件预测蛋白质相对分子量、等电点、功能、结构域、二级结构和三级结构等;应用 DNAMAN 软件进行多序列比对;应用 Mega 5.1 软件内置的 NJ 法构建系统进化树,设置 bootstrap=1 000(王彩云等,2014a, b)。

1.3.4 植物过表达载体构建 pMD19T-*GrWRKY5* 重组质粒和 pENTRTM 2B 载体分别用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切,回收目的基因和载体片段,按 1:4 物质的量比混合后经 Ligation Solution I 连接过夜、转化 *E. coli* Trans 5 α 感受态细胞,涂布于含卡那霉素(100 mg · L⁻¹)的 LB 平板,次日随机挑选阳性克隆摇菌并提取质粒,经 PCR 检测和酶切验证正确后测序(王彩云等,2014a, b),即可获得入门克隆载体 pENTRTM 2B-*GrWRKY5*(图 1)。使用 Gateway LR 反应试剂盒(Invitrogen),将入门载体与目的载体 pK₂GW7 进行 LR 反应,25 °C 过夜反应后转化大肠杆菌 Trans 5 α 感受态细胞,并涂布于 LB 平板(含 100 mg · L⁻¹ 壮观霉素),37 °C 培养过夜。次日,挑

单菌落、摇菌后用试剂盒提取质粒,经 PCR 和酶切检测载体的正确性。

2 结果与分析

2.1 滇龙胆 *GrWRKY5* cDNA 的克隆

经琼脂糖凝胶电泳检测以滇龙胆 cDNA 为模板扩增出的 PCR 产物,得到 600 bp 左右的扩增片段,与预期片段大小一致(图 2)。测序结果表明克隆到 *GrWRKY5*(登录号为 KF922375),其 ORF 全长 591 bp。

2.2 *GrWRKY5* 序列分析

2.2.1 氨基酸序列同源性分析 利用 Genetyx 以及 DNAMAN 软件分析 *GrWRKY5* 基因序列,结果表明 *GrWRKY5* 基因的开放阅读框(ORF)全长 591 bp,编码 196 个氨基酸,其中由 167~170 之间的色氨酸(W)、精氨酸(R)、赖氨酸(K)和酪氨酸(Y)组成 WRKY 基因所特有的标志性的“WRKY”结构。

用 DNAMAN 对 *GrWRKY5* 和选自 NCBI 中的 87 条拟南芥 WRKY 蛋白进行多序列比对,并用 MEGA 5.1 构建系统进化树(图 3)。图 3 结果显示 *GrWRKY5* 与拟南芥中 WRKY27 的亲缘关系最近,属于 II e 类成员。AtWRKY27 蛋白与 GA 信号调控有关,因此 *GrWRKY5* 蛋白可能具有类似功能。

用 DNAMAN 将 *GrWRKY5* 氨基酸序列与拟南芥中 WRKY 蛋白序列的保守结构域进行多序列比对,结果表明 *GrWRKY5* 蛋白与已知蛋白序列的 WRKY 结构域高度保守,进一步表明其为 WRKY 超家族成员。用 GenBank 数据库中的 BLASTp 程序分析 *GrWRKY5* 氨基酸序列的同源性,结果显示在所选的 WRKY 序列中,*GrWRKY5* 与欧洲油菜 BnWRKY27-1 的同源性最高,为 69%;与拟南芥 AaWRKY22 的一致性最低,仅为 31%(表 1)。

将 *GrWRKY5* 蛋白与 NCBI 中一致性较高的序列进行系统进化分析,结果发现 *GrWRKY5* 与 CrWRKY22 和 VvWRKY22 蛋白的亲缘关系较近;与 JcWRKY47 和 TcWRKY27 亲缘关系较远(图 4)。

将 *GrWRKY5* 蛋白与 NCBI 中已知 WRKY 序列进行多序列比对,结果显示 *GrWRKY5* 与已知 WRKY 蛋白在 WRKY 保守结构域具有较高相似性外,其余部分同源性较低(图 5)。

2.2.2 理化性质分析 用 ExPASy ProtParam tool

表 1 *GrWRKY5* 蛋白与 NCBI 中已知植物

WRKY 序列比对结果

Table 1 BLASTp results of *GrWRKY5* protein with other known WRKY proteins of NCBI in plants

物种 Species	基因 Gene	相似性 Identity (%)	登录号 Accession No.
长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	CrWRKY22	37	AFK88675.1
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	VvWRKY22	36	XP_002278221.1
欧洲油菜 <i>Brassica napus</i>	BnWRKY22	35	ACQ76802.1
番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	SlWRKY22	33	XP_004229932.1
野草莓 <i>Fragaria vesca</i>	FvWRKY29	34	XP_004298837.1
麻疯树 <i>Jatropha curcas</i>	JcWRKY47	34	AGQ04238.1
可可 <i>Theobroma cacao</i>	TcWRKY23	32	EOX95862.1
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	AaWRKY22	31	NP_192034.1
麻疯树 <i>Jatropha curcas</i>	JcWRKY45	53	AGQ04236.1
欧洲油菜 <i>Brassica napus</i>	BnWRKY22-1	31	ACI14389.1
大豆 <i>Glycine max</i>	GmWRKY22	59	XP_003555395.1
可可 <i>Theobroma cacao</i>	TcWRKY27	65	EOY20308.1
欧洲油菜 <i>Brassica napus</i>	BnWRKY27-1	69	ACI14392.1

软件分析,*GrWRKY5* 蛋白分子量为 22.28 KD,理论等电点为 6.29,化学式为 C₉₉₀H₁₅₀₈N₂₇₈O₂₉₅S₈。脂族指数为 61.37,不稳定指数为 57.80,半衰期为 30 h。总平均疏水性为-0.708,该值位于-2 至 0 之间,表明该蛋白。*GrWRKY5* 蛋白含有 20 种氨基酸,其中天冬氨酸(Asp)和脯氨酸(Pro)含量最高,为 8.1%;半胱氨酸(Cys)含量最低,仅为 1.0%。

2.2.3 蛋白质二级结构和三维建模 用 Sspro 在线工具对 *GrWRKY5* 蛋白进行二级结构分析。结果显示在该蛋白的二级结构中,无规则卷曲(C)占 77.66%, α -螺旋(H)占 14.21%, β -折叠(E)占 8.12%。用 CPHmodels 3.2 Server 在线工具对 *GrWRKY5* 蛋白的三级结构进行预测(图 6)。从图 6 中可以看出 *GrWRKY5* 的三级结构形成了多个无规则卷曲,这些无规则卷曲由 α -螺旋与 β -折叠连接。

2.2.4 结构域预测 采用 InterProScan 在线软件对 *GrWRKY5* 蛋白的保守结构域进行预测,结果表明 *GrWRKY5* 蛋白 DNA 结合结构域(DNA-binding WRKY) (IPR003657) 可能位于 161~181 位 WRKY 结构域(PF03106),或 160~191 位 DNA 结

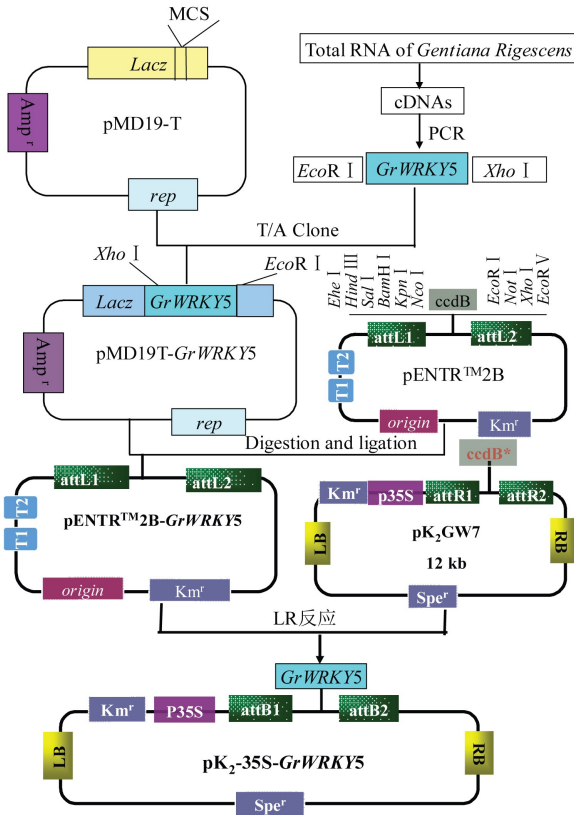


图 1 植物表达载体 pK₂-35S-*GrWRKY5* 的构建策略
Fig.1 Construction of pK₂-35S-*GrWRKY5* plant expression vector

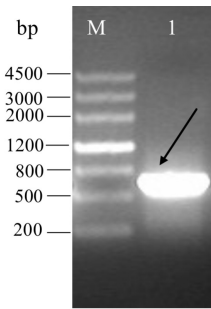


图 2 *GrWRKY5* 基因的 RT-PCR 扩增 M. DNA Marker III; 泳道 1. *GrWRKY5* 扩增产物。
Fig. 2 Amplification of *GrWRKY5* gene by RT-PCR M. DNA Marker III; Lane 1. PCR product of *GrWRKY5*.

合结构域(SM00774),或 155~181 位 WRKY 结构域(PS50811),或 151~181 位 WRKY DNA 结合结构域(SSF118290),还有未明确定义的 146~181 位(2.20.25.80)结构域。另外还有一个在 IPR 中没有明确分类的保守结构域,位于 141~181 位(PTHR31282)。利用推测的蛋白序列检索 NCBI 的 CDD(Conserved Domain Database)数据库,发现

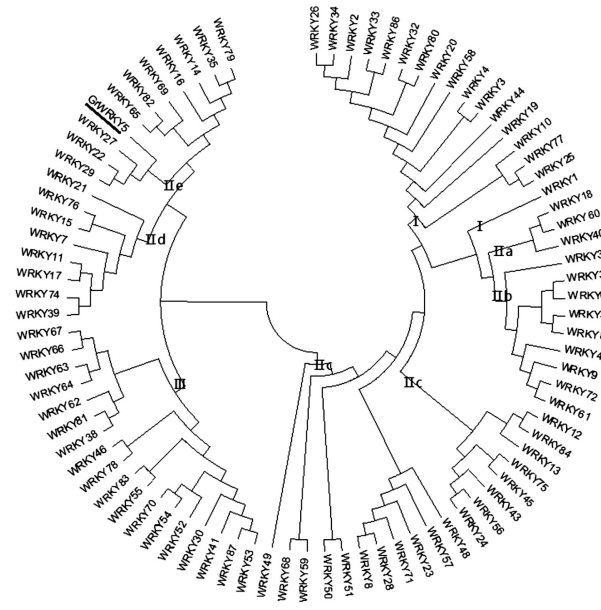


图 3 *GrWRKY5* 与拟南芥 WRKY 蛋白的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic relationship of *GrWRKY5* with WRKY proteins in *Arabidopsis thaliana*

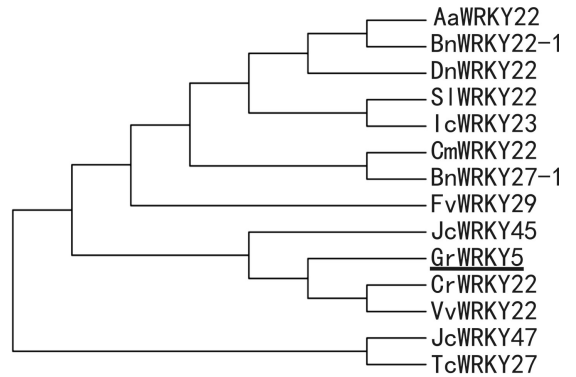


图 4 *GrWRKY5* 与其他植物中 WRKY 蛋白的系统发育分析
Fig. 4 Phylogenetic relationship of *GrWRKY5* and WRKY proteins in other plants

WRKY 蛋白含有 WRKY 保守结构域,进一步表明 *GrWRKY5* 属于 WRKY 家族。

2.2.5 信号肽、跨膜区、亚细胞定位以及功能预测分析 利用 ExPASy SignalP 4.0 Server 在线工具对 *GrWRKY5* 蛋白进行信号肽分析,结果显示该蛋白为非分泌型蛋白。应用在线软件 ExPASy 中的 TM-HMM 工具预测 *GrWRKY5* 蛋白的跨膜螺旋区,未发现跨膜螺旋区,表明该蛋白为非膜蛋白。对 *GrWRKY5* 蛋白进行亚细胞定位情况预测,结果表明该蛋白的定位系数为 6.6(chlo: 6.6),可能定位于叶绿体。使用 ProtFun 软件预测 *GrWRKY5* 蛋白

AaWRKY22.seq	AAEALNSDVAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSTSKGCLARKQVERNRS	50
BnWRKY22.seq	AAEALNSDVAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSTSKGCLARKQVERNRS	50
BnWRKY22-1.seq	AAEALNNDVAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSTSKGCLARKQVERNRS	50
BnWRKY27-1.seq	TQENLSSDMVAWRKYGQKPIKGSFYPRNYRCSSTSKGCLARKQVERSNLD	50
CrWRKY22.seq	TAEDLSSDKVAWRKYGQKPIKGSFYPRSYRCSSTSKGCLARKQVEQSCDK	50
FvWRKY29.seq	KEQDLFSDVAWRKYGQKPIKGSFYPRSYRCSSTSKGCSARKQVERSNNS	50
GmWRKY22.seq	TADNLSDVVAWRKYGQKPIKGSFYPRNYRCSSTSKGCMARKQVERSNTE	50
GrWRKY5.seq	GTEGLPSSDMVAWRKYGQKPIKGSFYPR...FAILLFLQIKLLHFQ...	43
JcWRKY45.seq	TEDGLSSDMVAWRKYGQKPIKGSFYPRSYRCSSTSKGCLARKQVERSSSD	50
JcWRKY47.seq	PAEALSSDVAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSTSKGCLARKQVERNRS	50
SlWRKY22.seq	PAEGLSSDMVAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSTSKGCLARKQVERNRS	50
TcWRKY23.seq	PAEGLSADVAWRKYGQKPIKGSFYPRGYRCSSTSKGCLARKQVERNRS	50
TcWRKY27.seq	AVDNLSSDVAWRKYGQKPIKGSFYPRNYRCSSTSKGCAARKQVERSNFD	50
VvWRKY22.seq	TAEGLSSDVAWRKYGQKPIKGSFYPRSYRCSSTSKGCLARKQVERSRD	50
Consensus	1 d w wrkygqkpikgsp pr k	

图 5 GrWRKY5 与其他植物中 WRKY5 氨基酸序列的保守区比对结果

Fig. 5 Conservative region alignment of GrWRKY5 amino acids with WRKY proteins in other plants

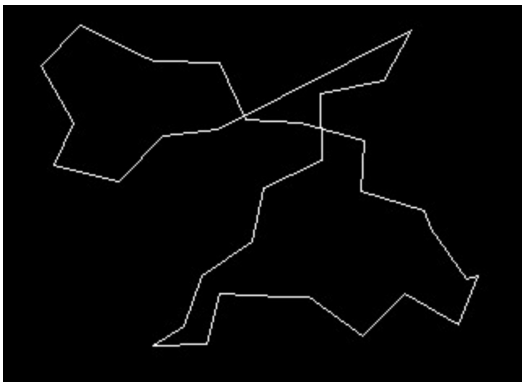


图 6 GrWRKY5 的三维结构预测

Fig. 6 Predicted three dimensional structure of GrWRKY5 protein

的功能,结果显示 GrWRKY5 蛋白参与转录、复制与转录、转录调控功能的可能性分别为 0.283、0.335、0.299,远高于其他功能;另外其信号转导功能的可能性为 0.064,这些数据能为 GrWRKY5 的后续研究提供参考。

2.2.6 植物过表达载体的构建 将检测正确的入门载体 pENTR™ 2B-GrWRKY5 和目的载体 pK₂-GW7 进行 LR 反应,获得植物表达载体 pK₂-35S-GrWRKY5。使用 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切 pK₂-35S-GrWRKY5 重组质粒,可以切出约 591 bp 的片段(图 7),表明 LR 反应成功;该重组质粒的测序结果显示,GrWRKY5 未发生突变现象,且与原序列保持一致,表明该植物表达载体连接正确。

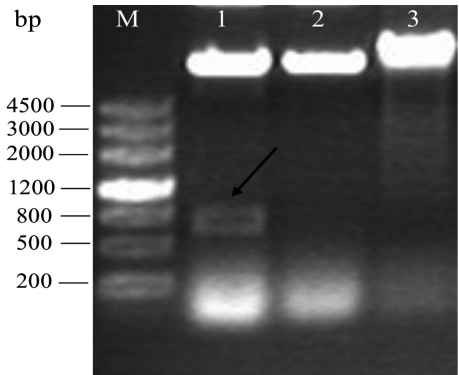


图 7 pK₂-35S-GrWRKY5 的酶切检测 M. DNA Marker III;泳道 1-3. 重组质粒 pK₂-35S-GrWRKY5 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切、*Xho*I 单酶切产物和质粒对照。

Fig. 7 Detection of pK₂-35S-GrWRKY5 by digestions M. DNA Marker III; Lane 1-3. Products of recombinant plasmid pK₂-35S-GrWRKY5 digested by *Eco*RI and *Xho*I, *Xho*I and plasmid control, separately.

3 讨论与结论

WRKY 在生物和非生物防御、植物生长发育以及次生代谢物合成中起到重要作用,也是萜类合成中的重要转录因子。克隆 WRKY 基因的方法有 cDNA 差异显示法、同源克隆法以及分析 EST 数据库。根据基因预测设计特异性引物,直接从基因组文库或 cDNA 文库中扩增 WRKY 基因,例如 Tail-PCR、RACE 等。本研究采用 RT-PCR 技术成功扩增到滇龙胆 *GrWRKY5* 基因完整的 cDNA 序列,并

对其进行分析。序列分析表明 *GrWRKY5* 全长 591 bp, 编码 196 个氨基酸, 含有一个 WRKY 保守结构域, 属于 WRKY 家族的 II e 类。BLASTn 分析显示, *GrWRKY5* 的同源蛋白很多, 但相似性不是很高, 多重比对分析结果显示 *GrWRKY5* 蛋白与其他植物 WRKY 蛋白在 WRKYGQK 区域高度保守。系统进化分析显示 *GrWRKY5* 与 *AtWRKY27* 亲缘关系较近, 但 *GrWRKY5* 是否与 *AtWRKY27* 具有类似的功能仍需通过遗传转化等试验进一步验证。

目前最常用的两种植物遗传转化方法是基因枪法和农杆菌介导的遗传转化法。提高植物遗传转化效率的重要基础是高效载体的优化和开发, 而 RNA 干扰载体和植物过表达载体是目前通过遗传转化研究植物基因功能的主要工具。Gateway 技术是由 Invitrogen 公司开发的一项基于 λ -噬菌体特异位点重组特性的通用克隆技术, 该技术借助特异性重组位点, 在将目的基因批量连接到受体载体的同时, 有效地将传统载体构建过程中需多次酶切、连接等繁琐操作以及受酶切位点限制等缺点成功克服, 现已被广泛应用于基因克隆和植物表达载体构建(毕惠惠等, 2013)。目前, 国内外学者在玉米、水稻、小麦等植物中已经建立较成熟的基因枪和农杆菌介导的遗传转化体系, 但在滇龙胆中仍未涉及。本研究利用 Gateway 技术并结合传统酶切、连接方法, 构建了适用于植物农杆菌介导和基因枪法的植物过表达载体 pK₂-35S-*GrWRKY5*, 该载体的成功构建为滇龙胆 *GrWRKY5* 基因功能的进一步研究奠定基础, 也为 WRKY 的深入研究提供参考。

参考文献:

Bi HH(毕惠惠), Wang GP(王根平), Wang CS(王成社), et al. 2013. Construction of RNAi and overexpression vectors for genetic transformation of monocotyledonous plants based on gateway technology(单子叶植物 RNA 干扰和过表达 Gateway 载体的构建)[J]. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), **14**(1): 115-123

Dong P, Chen GY, Liu YX, et al. 2012. Molecular cloning of WRKY transcription factor sequences in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*)[J]. *Afr J Agr Res*, **7**(47): 6 343-6 349

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, et al. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trends Plant Sci*, **5**(5): 199-206

Huang SX, Gao YF, Liu JK, et al. 2012. Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*[J]. *Mol Genet Genom*, **287**(6): 495-513

Ishiguro S, Nakamura K. 1994. 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 β -amylase from sweet potato[J]. *Mol Gen Genet*, **244**(6): 563-571

Li H, Xu Y, Xiao Y, et al. 2010. Expression and functional analysis of two genes encoding transcription factors, *VpWRKY1* and *VpWRKY2*, isolated from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [J]. *Planta*, **232**(6): 1 325-1 337

Ma DM, Pu GB, Lei CQ, et al. 2009. Isolation and characterization of *AaWRKY1*, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis[J]. *Plant Cell Physiol*, **50**(12): 2 146-2 161

Mingyu Z, Zhengbin Z, Shouyi C, et al. 2012. WRKY transcription factor superfamily: structure, origin and functions[J]. *Afr J Biotechnol*, **11**: 8 051-8 059

Pan YJ, Cho CC, Kao YY, et al. 2009. A novel WRKY-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*[J]. *J Biol Chem*, **284**(27): 17 975-17 988

Ren X, Chen Z, Liu Y, et al. 2010. ABO3, a WRKY transcription factor, mediates plant responses to abscisic acid and drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, **63**(3): 417-429

Robatzek S, Somssich IE. 2002. Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense[J]. *Gen Dev*, **16**: 1 139-1 149

Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, et al. 2010. WRKY transcription factors[J]. *Trends Plant Sci*, **15**(5): 247-258

Shen T(沈涛), Yang MQ(杨美权), Zhao ZL(赵振玲), et al. 2011. Dynamic changes in terpenoid contents in *Gentiana rigescens* (滇龙胆中萜类物质积累的动态变化)[J]. *Bull Bot* (植物学报), **46**(6): 652-657

Ülker B, Somssich IE. 2004. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function[J]. *Curr Opin Plant Biol*, **7**(5): 491-498

Wang CY(王彩云), Li FS(李富生), Li T(李涛), et al. 2014a. Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of GrGPPS gene in *Gentiana rigescens* (滇龙胆 GrGPPS 基因的克隆及其序列分析与原核表达)[J]. *Chin Tradit Herb Durgs* (中草药), **45**(14): 2 060-2 068

Wang CY(王彩云), Li FS(李富生), Li T(李涛), et al. 2014b. Cloning and prokaryotic expression of *GrHMA* gene in *Gentiana rigescens* (滇龙胆 *GrHMA* 基因的克隆和原核表达)[J]. *Life Sci Res* (生命科学研究), **18**(3): 211-217

Wang CY(王彩云), Zhang XD(张晓东), Shen T(沈涛), et al. 2013. Research advance and role of WRKY in the biosynthesis of plant secondary metabolites(WRKY 在植物次生代谢物合成中的作用及研究进展)[J]. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), **40**(20): 137-144

Wei KF, Chen J, Chen YF, et al. 2012. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY Transcription factor family in maize[J]. *DNA Res*, **19**(2): 153-164

Xie Z, Zhang ZL, Zou X, et al. 2005. Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells [J]. *Plant Physiol*, **137**(1): 176-189

Xu YH, Wang JW, Wang S, et al. 2004. Characterization of GaWRKY1, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)- δ -cadinene synthase-A[J]. *Plant Physiol*, **135**(1): 507-515

Zhang J(张娟). 2009. Review on the function of WRKY transcription factor family (WRKY 转录因子功能研究进展)[J]. *Acat Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), **29**(10): 2 137-2 145

Zhao HW(赵恒伟), Ge F(葛锋), Sun Y(孙颖), et al. 2012. Transcription factors involved in plant terpenoid biosynthesis and their application prospect(植物萜类物质生物合成的相关转录因子及其应用前景)[J]. *Chin Trad Herb Durgs* (中草药), **43**(12): 2 512-2 519