

‘秦冠’苹果*MdWRKY*基因亚细胞定位及原核表达

高 华^{1,2}, 樊红科¹, 党志国¹, 王 飞¹, 王雷存^{1,2}, 刘振中^{1,2}, 赵政阳^{1,2,*}

(¹西北农林科技大学园艺学院, 陕西杨凌 712100; ²陕西省苹果工程技术研究中心, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 以‘秦冠’苹果为试材, 采用 RT-PCR 方法获得了一个 WRKY 基因, 全长 1 224 bp, 推断其编码 331 个氨基酸, 命名为 *MdWRKY*。亚细胞定位分析 *MdWRKY* 蛋白分布在细胞核内, 属于核蛋白。实时定量分析结果显示, *MdWRKY* 基因受苹果斑点落叶病菌的诱导, 表明其可能参与植物与病原菌的互作。随后进行原核表达分析, SDS/PAGE 电泳结果表明表达蛋白与其蛋白大小一致。

关键词: 苹果; 转录因子; 克隆; 亚细胞定位; 表达

中图分类号: S 661.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 07-1341-08

Studies on Subcellular Localization and Expression in *E.coli* of *MdWRKY* from ‘Qinguan’ Apple

GAO Hua^{1,2}, FAN Hong-ke¹, DANG Zhi-guo¹, WANG Fei¹, WANG Lei-cun^{1,2}, LIU Zhen-zhong^{1,2}, and ZHAO Zheng-yang^{1,2,*}

(¹College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ²Apple E & T Research Centre of Shaanxi Province, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A WRKY gene, designated as *MdWRKY*, was isolated from ‘Qinguan’ apple leaves using reverse transcription PCR approaches. *MdWRKY* was 1 224 bp and encoded a 331 amino-acid protein. Analysis of subcellular localization indicated that *MdWRKY* protein was targeted to the nucleus. Quantitative RT-PCR analysis showed that *MdWRKY* transcription was induced by *Alternaria alternata* f sp. *mali* indicating that *MdWRKY* gene may be involved in the interaction between plant and pathogen. Then expression in *E. coli* was conducted, SDS/PAGE result demonstrated that expression proteins consistent with the size of expected protein, which provided a foundation for further purifying and function study of *MdWRKY*.

Key words: apple; transcription factors; clone; subcellular localization; expression

植物为适应外界环境, 形成一系列的信号转导途径以抵御各种生物和非生物胁迫 (Lagace & Matton., 2004; Sujeeth et al., 2010)。很多研究表明, 在抗病防御反应途径中转录因子基因扮演了重要角色 (Chen & Chen, 2002; Zhang, 2003; Ulker & Somssich., 2004; Zhou et al., 2008; Seo et al.,

收稿日期: 2011-04-07; 修回日期: 2011-06-08

基金项目: 国家苹果产业技术体系项目 (nycyt-08-01-03); 陕西省 ‘13115’ 科技创新工程项目 (2010ZDKG-69)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhaozy@nwsuaf.edu.cn)

2010)。WRKY转录因子是一个大家族,广泛参与植物对生物和非生物胁迫的应答反应、器官发育和衰老等一系列生理活动,尤其在抗病和抗逆反应中起重要作用(Ulker & Somssich, 2004)。WRKY蛋白含有1个或2个WRKY结构域,该保守域为60个氨基酸残基,含有保守的WRKYGQK序列,并且有一个类似C₂H₂型锌指结构。根据WRKY域的数量及其锌指结构的特征,将WRKY蛋白质家族分为3个亚家族(组),第II组根据WRKY域聚集的不同分枝分为IIa、IIb、IIc、IId、IId等5个亚组(Eulgem et al., 2000)。IId亚家族成员AtWRKY7、AtWRKY11和AtWRKY17在抗病防御反应中其负向调控作用(Joumot-Catalino et al., 2006; Kim et al., 2006; Zheng et al., 2007)。

本研究中从抗病的‘秦冠’苹果中克隆到与抗病相关的一个WRKY基因,暂命名为*MdWRKY*(GenBank 登录号为HM859901),并对其进行初步的生物信息学、病原诱导表达和原核表达分析,以其为进一步探讨其在苹果抗病过程中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在西北农林科技大学白水苹果试验站进行。供试材料为4年生‘秦冠’苹果树,选生长势一致的6株树,每株选3~5个一年生枝条(每株共20片幼叶)。接种苹果斑点落叶病(*A. alternata* f. sp. *mali*)菌种。2009年5月底,将浓度为 1×10^4 Cf_u·mL⁻¹的病原菌孢子液喷施苹果幼叶正面,而后用透明塑料袋套严保湿,于接种后0、1、2、3、4、5、6、7 d采收叶片,置液氮中保存备用。

1.2 RNA的提取及*MdWRKY1*基因的克隆与序列分析

接种后0、1、2、3、4、5、6、7 d的苹果叶片按照Gasic(2004)的方法提取RNA。cDNA的合成采用Promega公司的反转录试剂盒,1 μg DNA酶处理的总RNA 70 °C变性5 min,加PrimeScriptTM Rtase反转录,42 °C保温60 min。根据苹果转录因子数据库中登录的WRKY基因设计引物,上游引物:5'-ACCAACAACACTACAGTGCATTA-3';下游引物:5'-TTTTTGTGAAGTAGTAGACC C-3'。以8次取样的苹果叶片cDNA混合物为模板,进行PCR扩增。反应条件:94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 2 min, 29个循环; 72 °C 10 min。PCR产物回收及质粒提取参照天根生化科技有限公司试剂盒说明书进行,检测确定阳性克隆送上海生工生物技术有限公司测序。

利用NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)的BLAST在线工具对GenBank的非冗余蛋白数据库序列进行比对分析;利用InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterproScan/>)预测结构域和功能位点;利用CLUSTALW2软件(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>)进行进化树分析;利用DNAMAN软件进行氨基酸同源性比对。

1.3 亚细胞定位

根据目的基因*MdWRKY*序列及核定位载体pBI221-GFP,设计引物,上游引物:gggta taga (*Kpn* I) a tggcc gttga ttcat g;下游引物:ggggg tacc (*Xba* I) a gaaga ttcta gaata a,扩增*MdWRKY*基因。扩增产物用*Kpn* I和*Xba* I进行双酶切,克隆到核定位载体pBI221-GFP中,构建瞬时表达载体pBI221-GFP-MdWRKY。经过测序鉴定的pBI221-GFP-MdWRKY质粒载体和空载体pBI221-GFP利用PDS-1000/He基因枪在压力1 100 psi轰击洋葱表皮细胞,轰击后的洋葱表皮细胞22 °C暗培养18 h后在荧光显微镜下观察GFP的表达情况。

1.4 定量RT-PCR分析

根据 *MdWRKY* 序列设计半定量 PCR 引物, 上游引物: 5'-CGACGGCTATGGACATGGACTG-3'; 下游引物: 5'-CTTGGCTCTGGTTTTGGGTTTG-3', 苹果 *Actin* 作为内参基因, 上游引物: 5'-CATCCA GGCTGTTCTTTCCCTCT-3'; 下游引物: 5'-GCCACGCTCAGTCAAAATTTTCA-3'。应用 IQ5 进行实时定量 PCR 分析参考 Sambrook 等 (1989) 的方法。

1.5 *MdWRKY*基因原核表达载体的构建及鉴定

根据克隆的 *MdWRKY* 序列以及原核表达载体 pGEX-4T-1 多克隆酶切位点序列设计引物, 其上游引物中引入 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物中引入 *Sal* I 酶切位点, 上游引物: 5'-GGGGGATCCAACA TCTGCGTCATGCCA-3'; 下游引物: 5'-GGGCCATGGGGCCTGTTGTTCTTCTCC-3', 以 8 次取样的叶片 cDNA 混合物为模板进行 PCR 扩增, 获得的 pGEM-MdWRKY 重组质粒进行 PCR、酶切鉴定及 DNA 测序分析 (Hames & Rickwood, 1990)。

1.6 重组 *MdWRKY* 基因在大肠杆菌中的表达

从平板上分别挑取阳性克隆表达菌单菌落和一个含 pGEX-4T-1 空载体的表达菌单菌落, 分别接入含有 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp 的 20 mL LB 液体培养基中。37 °C, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 过夜振荡培养。次日从培养菌液中各取 0.2 mL 加入 20 mL LB 液体培养基中, 37 °C, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 3 h。随后加入异丙基硫代- β -D 半乳糖苷 (IPTG) 诱导剂 (终浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行诱导表达。同时以未加 IPTG 诱导的为负对照。37 °C, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养, 诱导一定时间 (1、2、3、4、5、6 h) 后收集菌体。室温 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 弃上清, $100 \mu\text{L}$ $1 \times$ SDS 凝胶加样缓冲液 [$50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油, 1% DTT] 重悬, 100 °C 水浴 5 min, 室温 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min。取 $20 \mu\text{L}$ 样品上样, 进行 SDS-PAGE (浓缩胶浓度 5% 和分离胶浓度 12%) 电泳, 电压 80 V, 电泳 12 ~ 14 h。凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色并脱色至背景清晰。

2 结果与分析

2.1 *MdWRKY* 基因全长 cDNA 的克隆及分析

以苹果抗病品种 ‘秦冠’ 叶片 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 获得 1 条 1 224 bp 的序列 (图 1)。该序列包含 1 个 993 bp 的开放阅读框, 编码 331 个氨基酸, 分子量为 35.96 kD, 等电点为 9.688, 生物信息学分析如图 1 所示。*MdWRKY* 基因包含 1 个 WRKY 保守区域, 1 个 C2-HC 锌指结构域 (C-X₇-C-X₂₃-H-X₁-C) 和 1 个核定位信号 (KKRK)。此外还包含 1 个钙结合域 GHARFRR, 1 个植物特定的锌指簇。

蛋白同源性分析, *MdWRKY* 蛋白与拟南芥 WRKY 类转录因子具有很高的同源性, 与 AtWRKY17 和 AtWRKY11 氨基酸序列同源性达到 39.50% 和 40.61%, 这表明该蛋白属于 WRKY 家族 (图 2)。根据 WRKY 保守域和锌指结构域的个数, WRKY 蛋白分为 I、II 和 III 3 个亚族。基于额外的短保守性区域, II 族又细分为 5 个亚族 (IIa ~ IIe)。

与来自拟南芥的 20 个 WRKY 蛋白进行进化树分析 (图 3), *MdWRKY* 属于 II d 亚族, 包含 WRKY 亚家族 II d 专有的结构域——钙结合域和锌指簇结构域。钙结合域能够产生作为二级信使的钙离子 (Bouche et al., 2005)。锌指簇区域序列的突变可以导致 AtWRKY11 结合 W 盒能力减弱 (Babu et al., 2006)。因此, 可以推测 *MdWRKY* 在抗病调控中的作用是通过钙结合域结合作为二级信使的钙离子

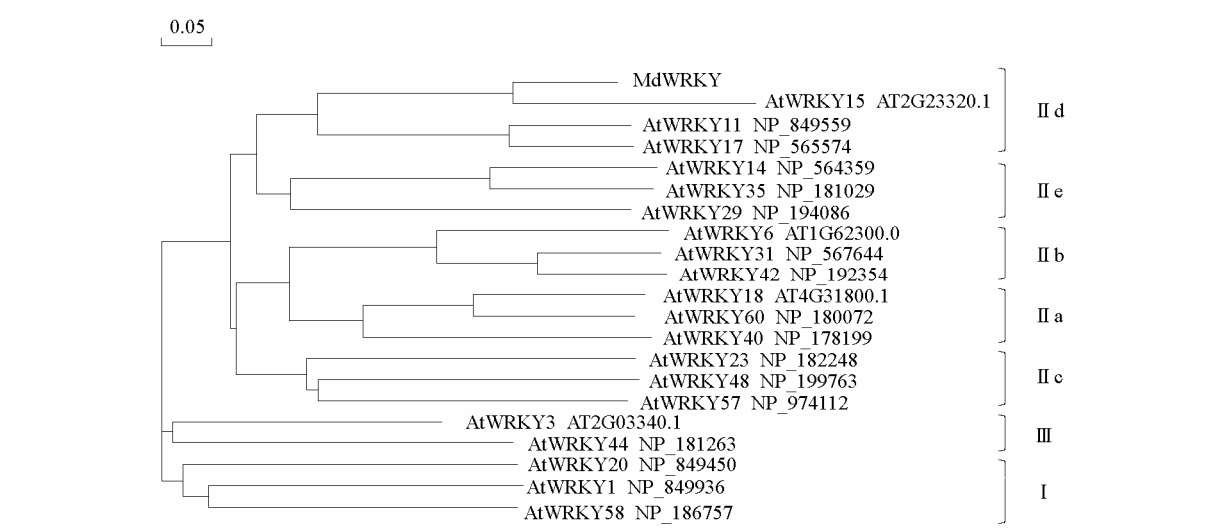


图 3 *MdWRKY* 和其他拟南芥 *WRKY* 蛋白序列的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic relationships of the amino acids among *MdWRKY* and other *Arabidopsis* *WRKY* proteins

2.2 *MdWRKY*亚细胞定位

序列分析发现，*MdWRKY* 基因序列包含一个假定的核定位信号，为了确定 *MdWRKY* 蛋白在植物细胞内的分布，利用基因枪将瞬时表达载体 pBI221-GFP-*MdWRKY* 和空载体 pBI221-GFP 导入到洋葱表皮细胞，结果如图 4 所示。*MdWRKY*-GFP 融合蛋白分布在洋葱表皮细胞的细胞核内，而对照 GFP 蛋白则分布在整个细胞内，说明 *MdWRKY* 蛋白属于核蛋白。



图 4 *MdWRKY* 亚细胞定位

Fig. 4 Subcellular localization of *MdWRKY*

2.3 *MdWRKY*基因在病原菌诱导下的表达分析

WRKY 基因大部分参与植物病原菌的应答反应，其中一些 WRKY 基因的表达被病原菌诱导上升调控，与其病原菌抗性相关（Rushton et al., 1996; Eulgem et al., 1999; Kim et al., 2000; Yoda et al., 2002; Takemoto et al., 2003; Vandenabeele et al., 2003; Guo et al., 2004）。拟南芥中，大部分 WRKY 成员的表达受 SA 或病原菌诱导（Dong et al., 2003; Kalde et al., 2003）。为研究 *MdWRKY* 基因是否参与抗病反应，采用实时定量的方法研究了‘秦冠’苹果受病原菌侵染过程中 *MdWRKY* 基因的表达模式。‘秦冠’苹果叶片未接种病原菌时，*MdWRKY* 基因表达量比较低；接种苹果斑点落叶病菌后，*MdWRKY* 表达量显著升高，第 2 天达到最高值，而后下降，到第 5~7 天基本回复到接种前状态（图 5）。此结果表明 *MdWRKY* 基因参与了斑点落叶病侵染过程中的抗病防御反应。

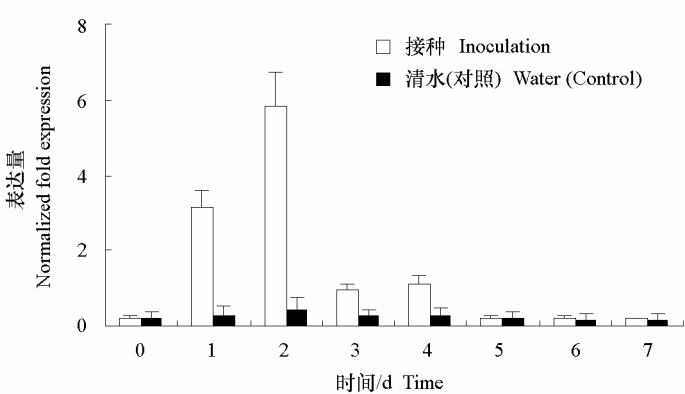


图 5 苹果斑点落叶病菌诱导下 *MdWRKY* 基因的表达模式
MdActin 作为 qRT-PCR 的内参基因。

Fig. 5 Expression profile of *MdWRKY* was induced by *A. alternata* f. sp. *mali* in *Malus domestica* Borkh ‘Qinguan’ apple
MdActin was used as an internal control for qRT-PCR.

2.4 *MdWRKY*基因的原核表达分析

蛋白质是基因功能的执行者，获得基因表达产物是研究基因功能的主要途径。本研究通过 PCR 方法构建 pGEX-MdWRKY 重组表达载体（图 6）。重组质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞，加入

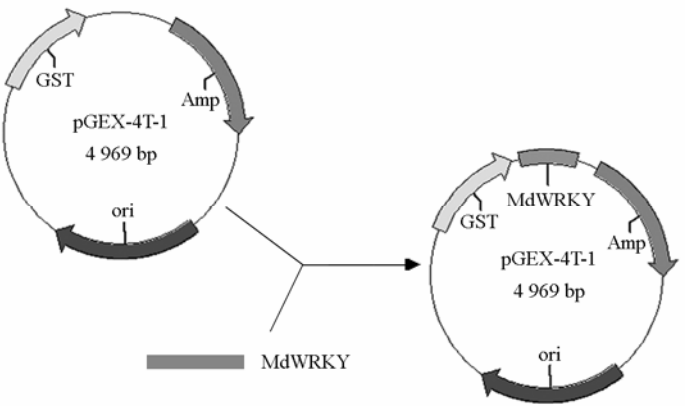


图 6 原核表达载体

Fig. 6 Construction of pGEX-MdWRKY

不同浓度的 IPTG, 在 37 °C 条件下进行不同时间诱导, 获得大肠杆菌总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。以蛋白质分子量标准、转空表达载体的表达菌全蛋白以及未添加诱导剂 IPTG 培养的重组菌全蛋白电泳作对照, 发现转 pGEX-MdWRKY 的 *E. coli* BL21 重组菌经 IPTG 诱导后在约 61.9 kD 左右的位置有一条特异表达带, 与推算的 GST-MdWRKY 融合蛋白大小相符, 说明 *MdWRKY* 基因在表达菌 *E. coli* BL21 中得到表达。

经过不同诱导剂浓度诱导培养后全菌蛋白电泳对照显示, 目的融合蛋白在不同诱导剂浓度下表达量变化没有显著差异 (图 7)。表明 IPTG 浓度对融合表达载体 pGEX-MdWRKY 表达水平影响不大。

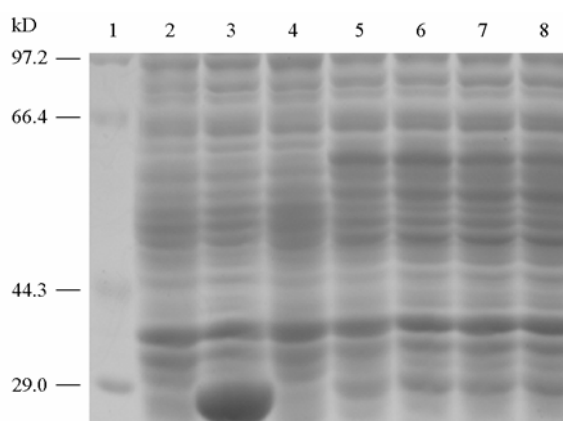


图 7 pGEX-MdWRKY 原核表达产物 SDS/PAGE 分析

1: 蛋白分子量标准; 2: 空载体未加IPTG诱导; 3: 空载体加 0.1 mmol · L⁻¹ IPTG诱导; 4: 融合表达工程菌未加IPTG诱导;
5~8: 融合表达工程菌加 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mmol · L⁻¹ IPTG诱导。

Fig. 7 SDS/PAGE analysis of pGEX-MdWRKY expressed product

1: Protein molecular weight standard; 2: Proteins of engineering bacteria strains (PEBS) harbouring pGEX-4T-1 uninduced;
3: PEBS harbouring pGEX-4T-1 induced by 0.1 mmol · L⁻¹ IPTG; 4: PEBS harbouring pGEX-MdWRKY uninduced;
5~8: PEBS induced by 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 mmol · L⁻¹ IPTG.

References

- Babu M M, Iyer L M, Balaji S, Atavind L. 2006. The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nuci Acids Res*, 34: 6505 - 6520.
- Bouche N, Yellin A, Snedden W A, Fromm H. 2005. Plant-specific calmodulin-binding proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 56: 435 - 466.
- Chen C, Chen Z. 2002. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol*, 129 (2): 706 - 716.
- Dong J, Chen C, Chen Z. 2003. Expression profile of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol*, 51: 21 - 37.
- Eulgem T, Rushton P J, Schlllelzer E, Hhalbroek K, Somssieh I E. 1999. Early nuclear events in plant defense signaling: Rapid gene activation by WRKY transtcription factors. *EMBO J*, 18: 4689 - 4699.
- Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, Somssieh I E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 5: 199 - 206.
- Gasic K, Hernandez A, Korban S S. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol Biol Report*, 22: 437a - 437g.
- Guo Z J, Kan Y C, Chen X J, Li D B, Wang D W. 2004. Characterization a rice WRKY gene whose expression is induced upon pathogen attract and mechanical wounding. *Acta Bot Sin*, 46: 955 - 964.
- Hames B D, Rickwood D. 1990. Gelelectrophoresis of proteins, a practical approach 2nd ed. New York: IRL Press Limited, 152 - 171.

- Joumrot-Catalion N, Somssich I E, Roby D, Kroj T. 2006. The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 3289 – 3302.
- Kalde M, Barth M, Somssich I E, Lippok B. 2003. Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact*, 16: 295 – 305.
- Kim C Y, Lee S H, Park H C, Bae C G, Cheong Y H, Choi Y J, Han C D, Lee S Y, Lim C O, Cho M J. 2000. Identification of rice blast fungal elicitor-responsive genes by differential display analysis. *Mol Plant Microbe Interact*, 13: 470 – 474.
- Kim K C, Fan B, Chen Z. 2006. Pathogen-induced *Arabidopsis* WRKY7 is a transcriptional repressor and enhances plant susceptibility to *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol*, 142: 1180 – 1192.
- Lagace M, Matton D P. 2004. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*. *Planta*, 219: 185 – 189.
- Rushton P J, Torres J T, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich I E. 1996. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *EMBO J*, 15: 5690 – 5700.
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 16 – 69.
- Seo P J, Kim M J, Park J P, Kim S Y, Jeon J, Lee Y H, Kim J M, Park C M. 2010. Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 61: 661 – 671.
- Sujeeth N, deepark S, shailasree S, Kini R K, Shetty S H, Hille J. 2010. Hydroxyproline-rich glycoprotein's accumulate in pearl millet after seed treatment with elicitor of defence responses against *Sclerospora graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74: 230 – 237.
- Takemoto D, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K. 2003. Disease stress-inducible genes of tobacco: Expression profile of elicitor responsive genes isolated by subtractive hybridization. *Physiol Plant*, 118: 545 – 553.
- Ulker B, Somssich I E. 2004. WRKY transcription factors: From DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol*, 7: 491 – 498.
- Vandenabeele S, Van der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slight L, Van Montagu M, Zabeau M. 2003. A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 16113 – 16118.
- Yoda H, Ogawa M, Yamaguchi Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 2002. 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. *Mol Genet Genom*, 267: 154 – 161.
- Zhang J Z. 2003. Over expression analysis of plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol*, 6: 430 – 440.
- Zheng Z Y, Mosher S L, Fan B F, Klessing D F, Chen Z X. 2007. Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC Plant Biol*, 7: 2.
- Zhou Q Y, Tian A G, Zou H F, Xie Z M, Lei G, Huang J, Wang C M, Wang H W, Zhang J S, Chen S Y. 2008. Soybean WRKY-type transcription factor genes, GmWRKY13, GmWRKY21, GmWRKY54, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnol Journal*, 6: 486 – 503.