

# 枸杞 *WRKY*<sub>3</sub> 基因克隆及组织表达分析

徐惠娟, 郑蕊, 陈任, 王彦才, 王丽娟\*

(宁夏大学 生命科学学院, 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 银川 750021)

**摘要:**以枸杞为材料, 采用 PCR 及 RACE 方法, 克隆了枸杞 *WRKY* 转录因子基因 cDNA 序列, 命名为 *Lb WRKY*<sub>3</sub>, GenBank 登录号为 KX196192。在生物信息学分析的基础上, 进行亚细胞定位、基因表达分析。结果显示: (1) *Lb WRKY*<sub>3</sub> 开放阅读框 ORF 长度为 1 068 bp, 编码 356 个氨基酸。(2) 生物信息学分析显示, *Lb WRKY*<sub>3</sub> 编码蛋白具有一个 *WRKY* 结构域, 二级结构中不规则卷曲结构所占比例最大 (58.67%), 延伸链结构次之 (18.88%),  $\alpha$  螺旋比例为 15.82%,  $\beta$  转角最少, 仅为 6.63%; *Lb WRKY*<sub>3</sub> 蛋白与案头菊 *WRKY* 蛋白、黄花蒿 *WRKY* 蛋白相似性较高。(3) 亚细胞定位显示, *Lb WRKY*<sub>3</sub> 蛋白定位于细胞核。(4) 实时定量 PCR 分析表明, *Lb WRKY*<sub>3</sub> 在根中表达量最高, 在花中表达量最低; 在枸杞果实发育过程中 *Lb WRKY*<sub>3</sub> 均有表达, 表达量随果实成熟逐渐升高, 并于 35 d 达到峰值; *Lb WRKY*<sub>3</sub> 基因在果实中的表达具有组织特异性表达特性(果肉 > 果皮 > 种子)。研究表明, *Lb WRKY*<sub>3</sub> 基因参与了枸杞果实生长发育调控。

**关键词:** 枸杞; *WRKY* 转录因子; 果实发育; 表达模式

**中图分类号:** Q785; Q789 **文献标志码:** A

## Cloning and Tissue Expression Analysis of *WRKY*<sub>3</sub> Gene in *Lycium barbarum* L.

XU Huijuan, ZHENG Rui, CHEN Ren, WANG Yancai, WANG Lijuan\*

(College of Life Science, Ningxia University, WBRPU Lab of National Education Ministry, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** With wolfberry (*Lycium barbarum* L.) as material, polymerase chain reaction (PCR) combined with RACE technology were used to clone a cDNA of *WRKY* from wolfberry, named as *Lb WRKY*<sub>3</sub>. (GenBank accession No. KX196192). Meanwhile, on the basis of bioinformatic analysis, we performed the subcellular localization assays and tissue-specific expression analysis. The results indicated that: (1) *Lb WRKY*<sub>3</sub> has an open reading frame (ORF) of 1 068 bp, which encoded a protein of 356 amino acid residues. (2) Bioinformatic analysis indicated that *Lb WRKY*<sub>3</sub> protein contains the one conserved *WRKY* motifs, the predictive secondary structure showed that *Lb WRKY*<sub>3</sub> protein was made up of 15.82%  $\alpha$ -helix, 6.63%  $\beta$ -turn, 18.88% extended strand and 58.67% random coil. *Lb WRKY*<sub>3</sub> protein showed the highest homology identity with *WRKY* protein from *Chrysanthemum x morifolium* and *Artemisia annua*. (3) Subcellular localization assays showed that the *Lb WRKY*<sub>3</sub> protein was located in the nucleus. (4) Real-time PCR analysis indicated that *Lb WRKY*<sub>3</sub> was expressed in high transcript level in roots, low levels in flower. The *Lb WRKY*<sub>3</sub> gene expression could be detected during the whole period of fruit development. Interestingly, *Lb WRKY*<sub>3</sub> gene showed a high transcription level in 35 days. The expression level in the

收稿日期: 2016-05-30; 修改稿收到日期: 2016-08-23

基金项目: 国家自然科学基金(31260065, 31360363); 2013 年中国科学院西部之光项目

作者简介: 徐惠娟(1979-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事植物分子生理生态研究。E-mail: xu\_hj@nxu.edu.cn

\* 通信作者: 王丽娟, 博士, 副教授, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: mnn717@163.com

pulp was higher than that in the seed and peel. *Lb WRKY<sub>3</sub>* gene takes part in fruit development and sugar accumulation in wolfberry.

**Key words:** wolfberry; WRKY transcription factors; fruit development; expression pattern

WRKY 转录因子是近年来在植物中发现的一类重要转录因子,在拟南芥中有 75 个成员,水稻中有 109 个成员,由于其 N-末端含有高度保守的 WRKYGQK 氨基酸序列而得名。1994 年 Ishiguro 和 Nakamura 在甘薯中发现了第一个 WRKY 转录因子 SPF1,随后其他研究者又相继在野燕麦、欧芹、拟南芥、番茄、棉花、烟草、辣椒等多种植物<sup>[1-2]</sup>中发现该类转录因子。

WRKY 是一种诱导型调节因子,N-端含有 7 个绝对保守的氨基酸序列(WRKYGQK)及锌指结构(CX<sub>4-7</sub>CX<sub>22-23</sub>HXH/C),能够通过其核心序列为(T)(T)TGAC(T/C)的 W-box 顺式元件特异结合而调节基因的表达。根据 WRKY 转录因子结构域的数量和锌指结构的类型可分为 3 类。其中第 I 类与第 II 类都含有相同的锌指结构 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>。第 I 类含 2 个 WRKY 结构域,如最早识别的 WRKY 蛋白 Ib-SPF1、CsSE71<sup>[3]</sup>等。第 II 类只含有 1 个 WRKY 结构域,包括了大多数的 WRKY 转录因子。第 III 类也只含有 1 个 WRKY 结构域,但其锌指结构为 C<sub>2</sub>HC 型,这类转录因子只存在于高等植物中。

最初的研究认为,WRKY 基因参与植物糖信号途径的建立和染色质重塑<sup>[4]</sup>。随后研究表明,WRKY 基因在植物生长发育和各种生理过程中均起到重要的调节作用,包括胚胎发育、种皮和毛状体发育以及植物衰老,生物合成调节和信号转导途径等。此外,各种生物胁迫与非生物胁迫亦能诱导 WRKY 转录因子表达,使其广泛参与植物的各种胁迫应答<sup>[5]</sup>。

枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科,多年生落叶小灌木(2n=24)。其果实被称为枸杞子(*Fructus lycii*),枣核大小,色泽鲜红,味道甜美,果肉柔润,是中国传统名贵中药材,具有补肾养肝、润肺明目之功效。糖是枸杞果实的重要组分,其种类、含量直接影响着枸杞果实的药用价值、风味口感、色泽等品质性状。枸杞果实发育的过程中,糖的含量和组成不断变化,尤其蔗糖、葡萄糖和果糖对果实品质形成起重要作用<sup>[6-7]</sup>。WRKY 转录因子是调控果实发育的重要转录因子,然而其对枸杞果实的调控研究尚未见报道。本研究以‘宁杞 1 号’为研究材料,分离 WRKY 类转录因子,并对其进行序列和表达分

析,为揭示枸杞品质形成的分子调控机制积累研究资料,为提高枸杞果实的产量和质量提供一些新的切入点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为 5 年生‘宁杞 1 号’枸杞,种植于宁夏农林科学院园艺研究所实验田,常规栽培管理。于 2015 年 8 月,果实材料的收集参照王丽娟等<sup>[8]</sup>的方法,同时采集成熟根、成熟茎、成熟叶、成熟花,不同的器官均重复 3 次,取样后于液氮中速冻后,置 -80 ℃ 保存备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取和反转录** 按照植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)说明书要求,分别取 0.01 g 枸杞根、茎、叶、花、果实提取总 RNA,取 0.8 μg 总 RNA,按照 RNA 反转录试剂盒(大连宝生物工程有限公司)说明,将提取 RNA 反转录成 cDNA。

**1.2.2 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 基因全长的克隆** 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。正向引物 FF-*LbWRKY<sub>3</sub>* (5'-CACAGTTGGAGAAAGTATGGAC-3'),反向引物 RF-*LbWRKY<sub>3</sub>* (5'-AAAGGTGGCGAATAGACTTGC-3'),以反转录果实 cDNA 为模板扩增枸杞 WRKY 基因保守片段。反应条件为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s; 58 ℃ 30 s; 72 ℃ 40 s。30 个循环后 72 ℃ 10 min。回收目的片段,连接到 pGM-T Easy 载体上,连接产物转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,经菌落 PCR 检测后,随机选取 3 个独立的阳性克隆进行测序(上海生工生物工程技术有限公司)。

根据基因特异引物 PCR 扩增得到的同源保守序列,依据 RACE 操作手册分别设计 3'-RACE、5'-RACE 引物(表 1),并按要求反转录生成 cDNA 第一链。两轮程序分别为:(1) 94 ℃ 30 s, 71 ℃ 2.5 min,重复 6 个循环; 94 ℃ 30 s, 70 ℃ 40 s, 73 ℃ 3 min,重复 6 个循环; 94 ℃ 30 s, 67 ℃ 30 s, 73 ℃ 2 min, 25 个循环;(2) 95 ℃ 5 min, 95 ℃ 30 s, 68 ℃ 30 s, 72 ℃ 3 min, 30 个循环, 73 ℃ 5 min。分

别对 PCR 扩增条带检测、回收和测序。依据测序结果,设计 1 对全长引物,扩增 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 的 ORF 阅读框,引物分别为 F-*Lb WRKY<sub>3</sub>* 和 R-*Lb WRKY<sub>3</sub>* (表 1)。

**1.2.3 编码蛋白的生物信息相关分析** *Lb WRKY<sub>3</sub>* 编码蛋白理化相关性质的分析采用 ProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/prot-param/>);采用 SOMPA (<http://www.expasy.ch/tools>)和 Phyre2 在线软件 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>)分别对 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 编码蛋白进行二级结构与三维结构分析;分泌蛋白和蛋白定位信号预测分析分别使用 SignalP4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 Protparam v. 9.0 (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)。通过 NCBI 搜索下载 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 氨基酸同源序列,通过 DNAMAN 软件构建系统进化树。

**1.2.4 亚细胞定位** (1) 载体构建 利用得到的枸杞 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 全长 ORF 序列,通过引物引入 2 个酶切位点 *Bam*H I 和 *Kpn* I,并将扩增片段连入 pMD19-T 载体。经过蓝白斑筛选,对阳性克隆进行测序验证。提取正确 T 载体克隆的质粒,双酶切得到目标基因片段,构建 pCAMBIA1301-GFP 载体,将 GFP 与 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 蛋白 C 端融合,得到 *Lb WRKY<sub>3</sub>*-GFP 融合蛋白,并通过 35S 启动子,增强融合蛋白的表达。该载体用于基因枪洋葱表皮轰击试验。

(2) 基因枪洋葱表皮轰击实验方法 利用质粒大抽试剂盒(大连宝生物工程有限公司)提取 4  $\mu$ g pCAMBIA1301-GFP-*Lb WRKY<sub>3</sub>* 质粒。将所得质粒与 50 mg/mL 的金粉悬液混合,加入抽滤灭菌的 4  $\mu$ L 亚精胺(0.1 mol/L)、6  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>(2.5 mol/L)

后混匀,冰上静置 15 min,12 000 r/min 离心 10 s,清水清洗重复 3 次,金粉沉淀通过 12 000 r/min 离心收集,最后的金粉-质粒混合物通过 20  $\mu$ L 无水乙醇重悬。

将洋葱内表皮撕取下来浸入高渗培养液(MS 无机盐、40 g/L 甘露醇)中,室温下处理 4 h;然后转入由 MS 无机盐+40 g/L 甘露醇+0.7% 琼脂组成的高渗固体培养基中备用。同时将基因枪气瓶压力调节为 1 300 psi;用 70%乙醇浸润载体膜、可裂膜、阻拦网 1 min,自然风干;在微粒载体膜中央添加 10  $\mu$ L 微粒悬浮液,晾干后轰击备用的洋葱表皮;材料在轰击结束后转移到 MS 培养基中培养 24 h;最后用激光共聚焦显微镜(德国 Toptica 公司)观察 GFP 的表达,波长设置为 488 nm。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR** 以枸杞持家基因 *Lb Actin* 为内参,引物为 F-Actin(5'-TCACACTTTCTACAATGAGCT-3')和 R-Actin(5'-GATATCCACATCACACTTCAT-3'),分别以稀释 50 倍的反转录(枸杞根、茎、叶、花、果实)cDNA 作为模板,采用 real-time PCR 检测 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 基因在枸杞不同器官、不同发育时期果实、果实不同组织的表达量。采用 Primer Primer 5.0 设计荧光定量引物。PCR 扩增引物为 QF-*Lb WRKY<sub>3</sub>*(5'-ATACCGCAAGGCTGAGAAGT-3')和 QR-*Lb WRKY<sub>3</sub>*(5'-TGTTGGTG-GTGGGTTGTGT-3')。反应体系为:模板 cDNA 1  $\mu$ L(10 ng/ $\mu$ L),上下游引物分别为 0.25  $\mu$ L, SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(大连宝生物工程有限公司)10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。PCR 反应程序为:95  $^{\circ}$ C 3 min,95  $^{\circ}$ C 10 s,57  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 40 s,35 个循环,每个样品 3 个重复。所用仪器为 ABI 7300 Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司),相对表达量的计算采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法<sup>[16]</sup>。采用 SPSS19 软件对表达量进

表 1 引物列表

Table 1 Primers used in this study

引物用途 Description	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence (5'→3')
<i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> 基因片段分离 Isolation of <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> fragments	FF- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> RF- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i>	CACAGTTGGAGAAAGTATGGAC AAAGGTGGCGAATAGACTTGC
5'-RACE Rapid amplification of cDNA 5' ends	5F1- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> 5F2- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i>	CCGAACCACCTTTGCTGAA ACCCACCACCAACAATATCA
3'-RACE Rapid amplification of cDNA 3' ends	3R1- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> 3R2- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i>	CGGATTCGGTTCGTGATAGTTG AGTGTGGTGGTGGGTTGT
<i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> 开放阅读框扩增 Amplification of <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> ORF	F- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> R- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i>	ATGTGCACTGATGATGGGTTAG TTGTTCAAAA TTTGTTATTT G
实时定量 PCR Real-time PCR of <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i>	QF- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i> QR- <i>Lb WRKY<sub>3</sub></i>	ATACCGCAAGGCTGAGAAGT TGTTGGTGGTGGGTTGTGT
内参基因枸杞 <i>Lb Actin</i> Reference gene <i>Lb Actin</i>	F-Actin R-Actin	TCACACTTTCTACAATGAGCT GATATCCACATCACACTTCAT

行显著性分析,每处理重复3次。

## 2 结果分析

### 2.1 枸杞 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 克隆

通过比对已知物种中 WRKY 同源基因保守区域,设计引物以枸杞果实 cDNA 为模板进行扩增,得到1条特异条带,长度约为500 bp。测序结果表明,该片段与烟草、番茄、马铃薯等物种的 WRKY 同源基因具有较高一致性,表明该片段是 WRKY 在枸杞中的同源基因片段。基于得到的枸杞 WRKY 同源基因片段,设计4条特异引物(3'-RACE,5'-RACE),然后进行 RACE 克隆。得到扩增产物并测序后,设计 cDNA 全长引物 F- *Lb WRKY<sub>3</sub>* 和 R- *Lb WRKY<sub>3</sub>*,使用 LA *Taq* DNA 聚合酶扩增全长后测序。

分析测序结果,得到了1068 bp 全长 cDNA 序列(图1)。其中4种碱基含量分别为34.0%(A)、

```

1 ATGGAAGGTTAAAGCTTTGGAGAAAAGAACTGATCAGTCAGTTAACACAAGGGGAAAG
1 M E K V K A L E K K K L I S Q L T Q G K
61 GAACCTGTAATCAGCTGAAAAACAGCTTGGTCCATTGGCTTCCCTGAAGAATGTGAT
21 E L V N Q Q L K K Q L G P L A S P E E C D
121 TTTACTACTGGGAAAATTTGTCTACACTGAAAAATCATTGTCAATTCTGAGTTTGAAG
41 L L L G K I L S T L E K S L S I L S L K
181 GCACCTTCTTGATGGTGAATTAATGCTAATAACTTACATCTTCATGCTCATCAATT
61 A L L L D G G I N A N N S T S S C S I
241 TCATTTCTGGTAATAATCATAGTCCCAAGAGTGAAGTTTTGGATTCTTCAGTGATCAA
81 S F L G N N H S P K S E V L D S S V D Q
301 TTGGATAAAAATTTGTCTCCAAAGAGAAAGAAATCACAACAATGGCAATCAAAATG
101 L D K N I V S K R H S K K S Q Q W T N Q I
361 AGCATTCTGATACATGGACATGAATGTCCACATGAAGATGGATATAGTTGGAGAAAATAT
121 S I S D T G H E C P H E D G Y S W R K Y
421 GGCCAAAAGATATTTAGGGGCTAATCATCCAAGGGCTTATTATTCGGTGCACCTCACAGG
141 G Q K L D I L G A N H P R A Y I R C T H R
481 AATACACAAGGGTGTCTGGCAACAAAACAGTCCAACGATCAGATGAAACTCATCAATC
161 N T Q G C L A T A K Q V Q R S D G N S S I
541 TTTGAGTCCACATCAAAAGAACAGCCAGTTCGCAAAATGCAACAATCAAAATATCTTTCA
181 F E V T Y K G R H S C K V A Q S N I F S
601 CTTGAAAACCAAAAACGCCAAAAACACAACAAAAACAAGAACAAGCCATGGAATATTC
201 L E N Q K R Q K H N K K Q E Q A M E I F
661 AACTCTACACAAACCCATAAAGTTGAAAACCTTGTAGCATCACAACAGAAGAAGTTTTTC
221 N S T P N H K V E N F S I C T T E E E V F
721 ACCCCCTTTTTCATTTCTCCTACACCACTAAACCTTGAARAATGTTGAAGAARCAAAATTA
241 T P F S F P P T P L N L E N V E E T K L
781 TTTTCCGATTCATGGCACCATTTCATCTCCCAATGATGTCAGAAATGCCCCTCGTACTTG
261 F S D S M A P F S S P I M S E L P S Y L
841 TCCATGTTGACGTCCCAAAATGACGAATTTGGAATGGACCAAAATCTCCAGAGCTCGGAT
281 S M L T S Q N D E F G M D Q I L Q S S D
901 TCGGATCTTACTGATTCATCAACACCAACTTCGGATTGGATCTTACTGAATGATC
301 S D L T E L I S T P T S D S D L T E L I
961 TCAACACCAACTTCGATTTCTGATTCACATTTGGTAGAGACTGGGATTTGCTGTGGAT
321 S T P T S I S D S T F G R D W D L S V D
1021 TTTGAACCTAATGTCACATTTGACATTTGAAGAATCTTCAGTAATTAG
341 F E P N V T F D I E E F F S N *

```

下划线部分为 WRKY 保守结构域; \* 为终止密码子

图1 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

The WRKY domain is underlined; \* means stop code of amino acids

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *Lb WRKY<sub>3</sub>* in *Lycium barbarum*

15.7%(G)、30.9%(T)和19.5%(C)。通过 NCBI 数据库进行检索,分析结果发现该序列属于 WRKY 转录因子基因家族的基因。将该序列命名为 *Lb WRKY<sub>3</sub>*,GenBank 登录号为 KX196192。

### 2.2 枸杞 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 编码蛋白特性分析

通过 DNAMAN 软件分析显示 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 具有一个完整开放阅读框,编码356个氨基酸,含有一个 WRKY 保守域,编码蛋白的分子式为  $C_{987}H_{1486}N_{272}O_{309}S_7$ ,分子量为22.33kD,等电点为5.52,包含带正电残基(Arg+Lys)为20个,带负电残基(Asp+Glu)为28个。进一步分析得到,该蛋白不稳定系数为40.57,脂肪系数为59.74,平均亲水性系数为-0.803。

经 CBS 服务器网站的 NetPhos 2.0 (<http://www.Cbs.Dtu.dk/services/NetPhos/>)对 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 蛋白序列进行磷酸化位点分析发现,该序列上有6个 Ser,2个 Thr 和2个 Tyr 可能成为蛋白激酶磷酸化位点。Signal P4.0 Server 软件分析发现,*Lb WRKY<sub>3</sub>* 蛋白不含信号肽,这与 ProtComp Version 9.0 软件预测 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 亚细胞定位在细胞核结果相符合。利用 SOPMA 软件分析,发现 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 蛋白二级结构中,不规则卷曲结构所占比例最大,为58.67%;延伸链结构(extended strand)次之18.88%, $\alpha$ 螺旋比例为15.82%; $\beta$ 转角最少,仅为6.63%。*Lb WRKY<sub>3</sub>* 蛋白三维结构见图2。

### 2.3 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 核酸序列比对与进化分析

Blastp 蛋白比对发现, *Lb WRKY<sub>3</sub>* 与案头菊 WRKY7、黄花蒿 WRKY1、丹参 WRKY11、番茄 WRKY53、木薯 WRKY39 蛋白有较高相似度,均含有一个 WRKY 结构域。

从 NCBI 非冗余蛋白数据库(Nr)中选取与 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 基因编码蛋白相似性较高的12条蛋白序列,采用 DNAMAN 软件,用其内置 Neighbor-joining 法构建进化树。结果表明,枸杞 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 与案头菊 WRKY7(KC615361.1)聚在一起,分子距离最近,其次与黄花蒿 WRKY1(FJ390842.1)、案头菊 WRKY53(KM359566.1)的分子距离也相对较近(图3)。

### 2.4 枸杞 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 蛋白亚细胞定位

蛋白序列分析发现 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 的 N 端具有核定位信号肽,经蛋白亚细胞定位 ProtComp Version 9.0 软件推测 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 位于细胞核内。为验证这一推测,利用洋葱表皮细胞瞬时表达系统对 *Lb WRKY<sub>3</sub>* 进行亚细胞定位研究。构建的植物表达载

体 pCAMBIA1301-Lb WRKY<sub>3</sub>-GFP 中,Lb WRKY<sub>3</sub> 的 C 末端与 GFP 融合(图 4, A)。质粒 DNA 经测序

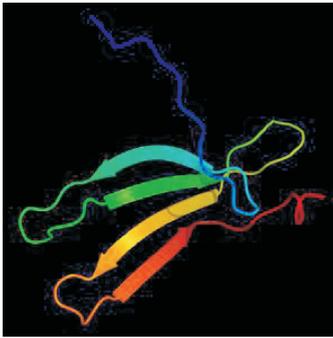


图 2 Lb WRKY<sub>3</sub>蛋白三维结构预测

Fig. 2 Three-dimensional structure of deduced Lb WRKY<sub>3</sub> protein

验证后转入根癌农杆菌中,采用基因枪法转化洋葱表皮细胞。35S CaMV 组成型启动子能够启动基因在细胞中表达,可通过显微镜观察报告基因的绿色荧光信号来确定 Lb WRKY<sub>3</sub> 在细胞中的分布。结果显示:未与 Lb WRKY<sub>3</sub> 融合的 35S : GFP(阴性对照)分布于整个细胞中(图 4, A),而 Lb WRKY<sub>3</sub> : GFP 融合蛋白定位于细胞核中(图 4, B),说明 Lb WRKY<sub>3</sub> 是具有细胞核定位功能的蛋白。

## 2.5 Lb WRKY<sub>3</sub> 的定量表达分析

**2.5.1 Lb WRKY<sub>3</sub> 的器官特异性表达分析** 利用实时定量 PCR 法分析 Lb WRKY<sub>3</sub> 在根、茎、叶、花中的表达情况。结果表明,Lb WRKY<sub>3</sub> 在各器官均有表达,但表达量不同,其在根中的表达量最高,在叶

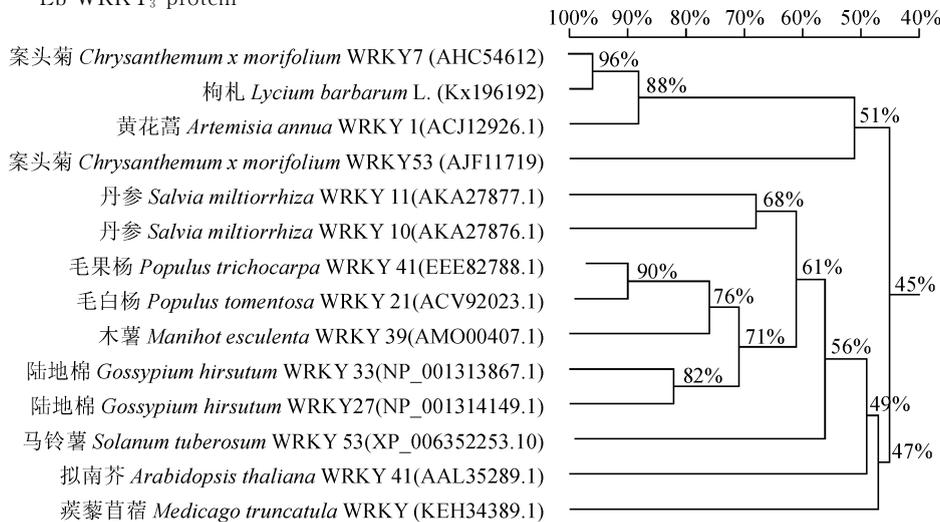
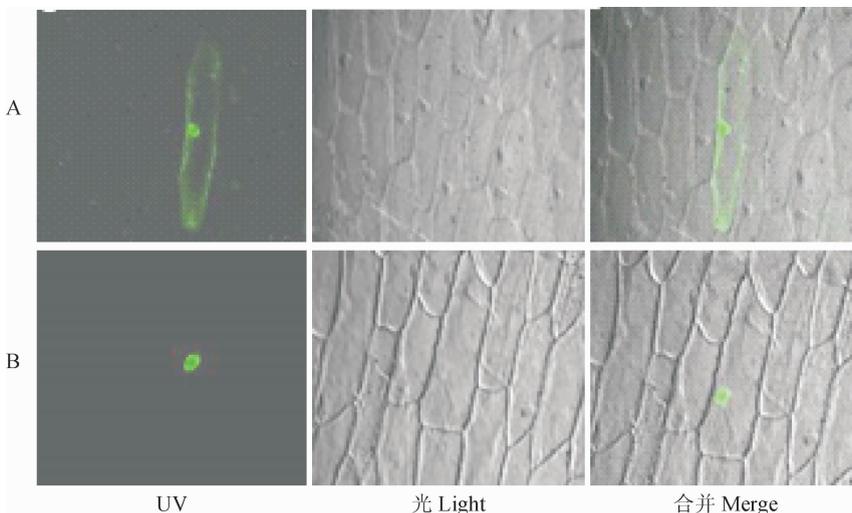


图 3 枸杞 WRKY<sub>3</sub> 与其他物种 WRKY 蛋白的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic evolutionary analyses of WRKY proteins from different plant species

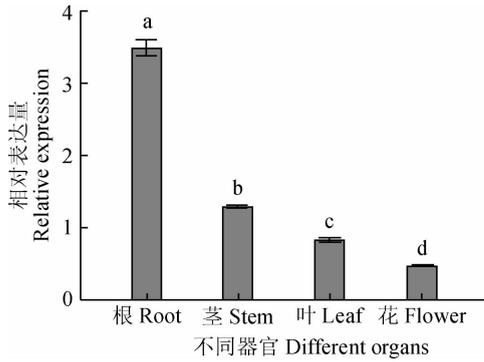


A. 阴性对照; B. 35S : GFP : Lb WRKY<sub>3</sub> 融合蛋白

图 4 枸杞 WRKY<sub>3</sub> 蛋白的亚细胞定位结果

A. Negative control; B. Fusion protein of 35S : GFP : Lb WRKY<sub>3</sub>

Fig. 4 The results of subcellular location of Lb WRKY<sub>3</sub> protein

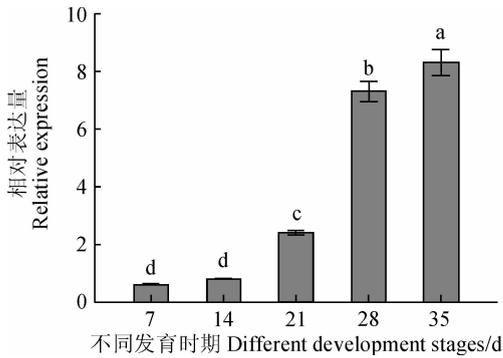


小写字母表示不同器官基因表达差异显著性 ( $P < 0.05$ )

图 5 *Lb WRKY3* 在不同器官中的表达模式分析

The letters indicate significant differences in different organs ( $P < 0.05$ )

Fig. 5 Expression pattern analysis of *Lb WRKY3* in different organs



小写字母表示枸杞果实不同发育阶段基因表达差异的显著性 ( $P < 0.05$ )

图 6 *Lb WRKY3* 在果实不同发育阶段的表达

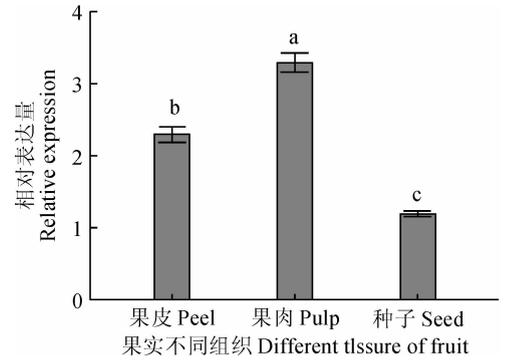
The letters indicate significant differences in different growth stages of fruit ( $P < 0.05$ )

Fig. 6 Expression pattern of *Lb WRKY3* in different growth stages of fruit

和茎中的表达量次之,而在花中的表达量相对最低(图 5),并且不同器官表达量的差异均达到极显著水平,这表明 *Lb WRKY3* 的表达具有器官特异性。

**2.5.2 *Lb WRKY3* 在果实发育不同阶段的表达分析** 利用实时定量 PCR 法分析 *Lb WRKY3* 在枸杞果实发育不同阶段表达量的变化规律(图 6)。结果表明在果实的 5 个发育阶段,其表达量逐渐升高,在果实发育第 1 阶段表达量最低,35 d 时 *Lb WRKY3* 达到峰值,并且果实发育不同阶段表达量的差异均达到极显著水平。

**2.5.3 *Lb WRKY3* 在成熟果实不同组织的表达分析** 通过分析 *Lb WRKY3* 在成熟果实不同组织中的表达量,发现 *Lb WRKY3* 在果肉中的表达量较高,果皮中的表达量次之,而在种子中的表达量则较低(图 7),并且成熟果实不同组织表达量的差异均



小写字母表示果实不同结构基因表达差异的显著性 ( $P < 0.05$ )

图 7 *Lb WRKY3* 在果实的各个结构中表达模式分析

The letters indicate significant differences in different structures of fruit ( $P < 0.05$ )

Fig. 7 Analysis of *Lb WRKY3* gene expression pattern in different structures of fruit

达到极显著水平。

### 3 讨论

本研究利用植物 WRKY 蛋白的保守序列通过同源克隆与 RACE 方法成功获得了一个枸杞 WRKY 转录因子全长 cDNA 序列,命名为 *Lb WRKY3*。*Lb WRKY3* 基因编码蛋白有 1 个典型的 WRKY 结构域,结构域 C 端具有 1 个  $C_2H_2$  的锌指结构,与案头菊 WRKY7 (*Chrysanthemum x morifolium* KC615361.1)、黄花蒿 WRKY1 (*Artemisia annua* FJ390842.1) 蛋白相似度较高,较为保守,属于第二类 WRKY 转录因子。

WRKY 转录因子参与调控植物形态发生,在植物体内并非组成型表达,而是受各种环境因子的诱导表达,其表达具有快速瞬时等特点,同时具有组织特异性。已有研究发现:拟南芥 *AtWRKY1* 基因主要调控植株根和花的形态建成,仅在根和花组织细胞中表达,在茎、叶和长角果组织中未见表达<sup>[9]</sup>。野生马铃薯 *ScWRKY1* 转录因子在叶中的表达水平很高,在茎和根中的表达水平很低,在胚胎形成过程中起着重要的调节作用,发育的种子中几乎不表达,在受精后 16 d 左右的鱼雷期胚胎中有瞬时高表达<sup>[10]</sup>。本研究发现 *Lb WRKY3* 在枸杞根、茎、叶、花和果实中均有表达,且在根中的表达水平相对最高,在花中的表达量最低。

此外,WRKY 基因参与调节植物发育过程。如燕麦 *ABF1* 和 *ABF2* 参与种子萌发及萌发后生长<sup>[11]</sup>; *ScWRKY1* 参与豆科植物种子休眠、茄属植物胚形成<sup>[12]</sup>。拟南芥 *TTG2* 控制表皮毛的早期发育、黏液的产生和鞣质合成,在表皮毛、种子内表皮

以及根和无毛体整个发育时期表达<sup>[13-14]</sup>; *At*-WRKY75 基因受抑制后,导致侧根的数目和长度、根毛的数目变化<sup>[15]</sup>。拟南芥 *At*WRKY6 转录因子在幼叶和成熟叶片几乎不表达,叶片衰老的发生过程中,*At*WRKY6 基因的表达不断增强,调控叶片衰老的信号转导途径建立<sup>[16-17]</sup>。本研究发现 *Lb* WRKY<sub>3</sub> 调控枸杞果实发育。该基因在枸杞果实发育的所有时期均检测出表达,果实发育初期(第 1 阶段)表达量较低,伴随着果实生长 *Lb* WRKY<sub>3</sub> 相对表达量迅速升高,果实成熟期(第 5 阶段)达到峰值,

整个过程 *Lb* WRKY<sub>3</sub> 的表达呈现由低升高,成熟时到达最大值的趋势。在发育成熟枸杞果实不同组织中 *Lb* WRKY<sub>3</sub> 表达量差异显著,果肉中的表达量较高,果皮中的表达量次之,而在种子中表达量则较低。

WRKY 基因是植物生长发育、环境适应过程中的重要调节因子,改良或增强一个关键转录因子的调控能力来提高作物的品质将是一种更为有效的改良作物品质的方法和途径<sup>[18]</sup>。分离调控多种代谢基因表达的 WRKY 转录因子基因,为开展植物分子育种开辟了新的途径。

## 参考文献:

- [1] SUN C X, PALMQVIST S, OLSSON H, *et al.* A novel WRKY transcription factor, SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the isol promoter[J]. *The Plant Cell*, 2003, **15**: 2 076-2 092.
- [2] TAO Z, LIU H B, QIU D Y, *et al.* A pair of allelic WRKY genes play opposite roles in rice-bacteria interactions[J]. *Plant Physiology*, 2009, **151**: 936-948.
- [3] 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]. *Molecular & General Genetics*, 1994, **244**(6): 563-71.
- [4] KIM Y K, LI D, KOLATTUKUDY P E. Induction of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin signaling by hard surface contact primes colletotrichum gloeosporioides conidia to germinate and form appressoria[J]. *J. Bacteriol.*, 1998, **180**: 5 144-5 150.
- [5] JOHNSON C S, KOLEVSKI B, SMYTH D R. Transparent testa GLABRA2, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor[J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(6): 1 359-1 375.
- [6] 白寿宁. 宁夏枸杞研究[M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1998: 29-30.
- [7] MA M, LIU G H, CHEN G, *et al.* Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet *in vivo*[J]. *Food Chem.*, 2009, **113**(4): 872-877.
- [8] LIJUAN WANG, YANCAI WANG, PING ZHOU. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR during Chinese wolfberry fruit development[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, **70**: 304-310.
- [9] DONG J, CHEN C, CHEN Z. Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2003, **51**(1): 21-37.
- [10] ÜLKER B, SOMSSICH I E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function[J]. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2004, **7**: 491-498.
- [11] VAN VERK M C, PAPPALIOANNOU D, NEELEMAN L *et al.* A novel WRKY transcription factor is required for induction of PR-1A gene expression by salicylic acid and bacterial elicitors[J]. *Plant Physiol.*, 2008, **146**: 1 983-1 995.
- [12] 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, **16**(2): 21-26. JIA C L, HOU H S. Structure of plant WRKY transcription factors and their roles in plant defense responses[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2010, **16**(2): 21-26.
- [13] JIANG W B, YU D Q. *Arabidopsis* WRKY<sub>2</sub> transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, **9**: 96-140.
- [14] LUO M, DENNIS E S, BERGER F *et al.*, *MINISEED3* (*MINI3*), a WRKY family gene, and *HAIKU2* (*IKU2*), a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis*[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**: 17 531-17 536.
- [15] 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.
- [16] ROBATZEK S, SOMSSICH I E. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *At*WRKY6, is associated with both senescence and defense-related processes[J]. *The Plant Journal*, 2001, **28**: 123-133.
- [17] MIAO Y, LAUN T, ZIMMERMANN P, *et al.* Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2004, **55**(6): 853-867.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C (T) method[J]. *Methods*, 2001, **25**(4): 402-408.

(编辑: 宋亚珍)