

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.04.004

铁皮石斛 *DoWRKY6* 转录因子基因的克隆与分析*张子凤 吕楠 安红强 裴薇 王万军^Δ

(西南交通大学生命科学与工程学院 四川 成都 610031)

摘要 目的:植物生长发育由多种转录因子调控,探索 WRKY 转录因子调控铁皮石斛组织生长发育机理。**方法:**根据铁皮石斛原球茎转录组数据中的 WRKY6 序列设计引物,并利用 RACE 技术克隆该基因;用生信分析软件预测其蛋白结构,并进行系统发育分析;利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术研究该基因在铁皮石斛幼苗根、茎、叶等组织中的表达。**结果:**通过 RACE 技术得到 1 个 1,238bp 的 II 类 WRKY 转录因子基因,命名为 *DoWRKY6*,其 ORF 长 1,017 bp,编码 339 个氨基酸残基,与梅[PrmuWRKY27(XM_008236601.1)]及大豆[GhmaWRKY27(XM_003555347.3)]有较近的亲缘关系,且 *DoWRKY6* 在茎中的相对表达量最大。**结论:**我们预测在铁皮石斛的生长发育过程中 *DoWRKY6* 基因对根、叶、茎的调控作用依次增强,表明 *DoWRKY6* 与已发表的铁皮石斛 WRKY 基因在组织的差异性表达上有较大差别,这对丰富 WRKY 家族对铁皮石斛的生长发育调控机制提供更多依据。

关键词:WRKY 转录因子;qRT-PCR;蛋白结构

中图分类号:Q75;Q78;S567.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)04-615-04

The Cloning and Analysis of the *DoWRKY6* Transcription Factor in *Dendrobium officinale**ZHANG Zi-feng, LV Nan, AN Hong-qiang, PEI Wei, WANG Wan-jun^Δ

(Southwest Jiaotong University College of life science and engineering, Chengdu, Sichuan, 610031, China)

ABSTRACT Objective: Many transcription factors regulate the growth and development of plant, it is very important to explore WRKY transcription regulation function about the tissue of *Dendrobium officinale*. **Methods:** Primers were designed according to the transcriptomic WRKY6 unigene sequence of protocorm in *D. officinale*, then I cloned *DoWRKY6* transcription factors by RACE techniques. Through bioinformatics analysis and phylogenesis analysis we predicted its protein structure, and got its affinity. I analyzed the relative expression of *D.officinale* seedling's root, stem and leaf through Roche Light circle 96 real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) experiment. **Results:** By RACE technique, I obtain a new 1,238 bp long *D. officinale* II kind of WRKY transcription factors named *DoWRKY6*, its ORF (Open reading frame) is 1,017 bp encoding 339 amino acids. The *DoWRKY6* has the close relatives with *Prunus mume* [PrmuWRKY27(XM_008236601.1)] and *Glycine max* [GhmaWRKY27(XM_003555347.3)]. The *DoWRKY6* expression in stem is the biggest. **Conclusions:** We predicted that *DoWRKY6* in *D. officinale*'s growth and development regulate the root, leaf and stem enhanced in turn, and *DoWRKY6* had great different expression on the different organizations with the published *D.officinale* WRKY, which enriched WRKY family to provide more evidence on *D. officinale* growth regulatory mechanism.

Key words: WRKY transcription factors; qRT-PCR; Protein structure

Chinese Library Classification(CLC): Q75; Q78; S567.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)04-615-04

前言

WRKY 是植物基因组十大转录因子超家族之一^[1],在植物生长发育过程中起着非常重要的转录调控作用。WRKY 转录因子超家族都含有由 60 个氨基酸残基所构成的结构域,其 N-端为 WRKYGQK 构成的高度保守的七肽残基^[2],以及结构为 CX₄CX₂₂₋₂₃HXX 或 CX₇CX₂₃HXC 的锌指结构。根据 WRKY 结构域的数量及锌指结构的特征,将 WRKY 转录因子分为 3 类: I 类含有两个 WRKY 结构域且锌指结构为 CX₄CX₂₂₋₂₃HX1H; II 类有一个 WRKY 结构域,锌指结构与 I 类一致; III 类有一个

WRKY 结构域,锌指结构是 CX₇CX₂₃HXC^[3-5]。经核磁共振研究发现,WRKY 结构域由 4 个耦合的 β 链组成,末端含有半胱氨酸/组氨酸残基形成的锌离子结合口袋^[6]。进一步研究证明,WRKY 转录因子会特异性结合靶基因启动子区域的 W 盒[其特异序列为(T)TGACC(A/T)]^[7],以此对靶基因的表达进行调控,并参与介导植物对生物与非生物胁迫等响应,调控植物叶片衰老及组织生长发育等生物学功能^[8-12]。铁皮石斛是兰科石斛属多年生附生草本植物,为确定 WRKY 转录因子在铁皮石斛各组织部位中的转录调控作用,在近年有对铁皮石斛 WRKY 转录因子进行的研究报道,赵俊等发现的 *DoWRKY2*

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31371232)

作者简介:张子凤(1989-),硕士研究生,主要从事植物发育生物学研究,E-mail: 411952925@qq.com

Δ 通讯作者:王万军(1962-),教授,主要从事植物发育生物学研究,E-mail: wanjunwang@home.swjtu.edu.cn

(收稿日期:2016-04-08 接受日期:2016-05-04)

属于 IId 亚族^[13], *DoWRKY1* 为 I 类 WRKY^[14], 这两个基因均在不同组织中有差异表达, 且叶中表达量相对较高; 蒋园等^[15]对 *DoWRKY5* 研究发现其为 II 类 WRKY 转录因子, 在叶中表达量最高, 本研究选择 *DoWRKY6* 基因根据分析发现为 II 类 WRKY 基因, 通过荧光实时定量 PCR 分析其表达特性, 发现该基因在茎中表达量最高, 这将对铁皮石斛生长发育分子机理研究提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 材料

材料源于本实验室的铁皮石斛组培苗, 在 1/2MS 培养基中培养至长到 4 个嫩叶, 分别剪取根、茎(由于植株特别幼嫩, 包含部分叶片髓鞘部分), 叶, 将各组织样液氮保存待用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取和 cDNA 的制备 将铁皮石斛根、茎、叶组织在液氮中研磨成粉末, 用 RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN)分别提取铁皮石斛根、茎、叶的 RNA, 提取过程中用 DNaseI 处理去除 DNA 污染, 用琼脂糖凝胶电泳及 OD_{260/280} 进行总 RNA 质量检测; 用 M-MLV Reverse Transcriptase it(TAKARA)将符合质量要求的总 RNA 逆转录成 cDNA, 并将 cDNA 保存于 -20℃ 冰箱留用。

1.2.2 DoWRKY6 转录因子的克隆 根据铁皮石斛原球茎转录组数据中的 WRKY6 序列, 利用 primer Primer 5.0 设计 PCR 的引物, 5' 端引物 TGTCGTCGCTCTTGGTGGT, 3' 端引物 GGCAACGAGGATACCTTTAGT, 以 cDNA 为模板, 使用 EasyTaq DNA 聚合酶(TAKARA)分别进行 PCR 扩增。扩增体系为 25 μL; EasyTaq 酶 0.25 μL; EasyTaq Buffer 2.5 μL; cDNA 1 μL; 上、下游引物各 1 μL; dNTP Mixture 4 μL; dd H₂O 16.25 μL。扩增条件为 94℃ 3 min; 35 个循环(94℃ 30 s; 58℃ 30 s; 72℃ 1 min); 72℃ 5 min; 4℃ 保存。经 DNA 连接酶连接到 pGEM-T 载体上, 16℃ 10 hr; 4℃ 保存。转化到 DH5α 大肠杆菌后增殖, 涂板后 37℃ 培养 12 h, 在平板上进行蓝白斑挑选, 培养后经过 PCR 扩增, 电泳检测看到单一明亮的条带, 将单克隆抗体的菌液送由生工(中国上海)进行测序。

1.2.3 DoWRKY6 蛋白分析及系统发育分析 使用序列分析软件 BioXM2.6, 找出 *DoWRKY6* 基因的开放阅读框(ORF), 并翻译获得其编码的氨基酸序列; 使用在线软件 ExPasy 分析其编码的蛋白一级结构; 运用 SOPMA 在线软件预测铁皮石斛 *DoWRKY6* 蛋白的二级结构。通过将得到的 *DoWRKY6* 基因序列在 NCBI 数据库进行 Blastn 基因序列比对, 对同一物种同一基因的取高分下载, 共得到 40 种植物的 64 个相似 WRKY 基因序列, 如大豆 4 个, 分别为 *GlmaWRKY22* (XM_003548590.3)、*GlmaWRKY-HN CCL 164* (KT031240.1)、*GlmaWRKY10* (NM_001250579.1)、*GlmaWRKY27* (XM_003555347.3); 梅 2 个, 分别是 *PmuWRKY27* (XM_008236601.1)、*PmuWRKY22* (XM_008234756.1)。用软件 MEGA 5.2^[16]将上述下载的 WRKY 基因序列进行系统发育树分析。

1.2.4 不同组织中 DoWRKY6 基因的表达 根据测序结果自主设计 *DoWRKY6* 基因的实时荧光定量 PCR 引物, 并查阅文献^[17]获得内参基因 *Actin* 与 *GAPDH* 的实时荧光定量 PCR^[18]引物序列, 送由上海生工合成引物。用罗氏 Light circle 96 定量

PCR 仪进行基因表达分析, 反应体系 10 μL; SYBR qPCR Mix 5 μL; 正 / 反向引物各 0.8 μL; cDNA 模板 0.5 μL; dd H₂O 2.9 μL。观察引物扩增曲线、溶解曲线及标准曲线, 校验 qRT-PCR 的反应条件: 95℃ 30 s; 40 个循环 (95℃ 5 s; 60℃ 10 s; 72℃ 25 s)。取铁皮石斛组培苗根、茎、叶组织的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 分析, 每个组织样分别做 3 个生物学重复, 3 个实验技术重复。确定条件后测试不同组织中 *DoWRKY6* 基因的表达量与 *Actin*、*GAPDH* 内参基因的表达量。对获得的 *DoWRKY6*、*Actin*、*GAPDH* 基因表达数据利用 2^{-ΔΔC_T} 法进行 *DoWRKY6* 基因的相对表达量方差分析。

2 结果

2.1 DoWRKY6 的克隆与序列特征分析

利用 RACE 技术, 得到了一条长度 1,238 bp 的基因序列, 经 BioXM2.6 分析比对, 发现该基因的编码氨基酸序列中存在一个 WRKYGQK 的高度保守区与一个锌指结构 CX₂C₂HX1H, 因此可以判定该基因为 II 类 WRKY 转录因子, 将其命名为 *DoWRKY6*。经 Blast 初步分析, 发现该基因与多个其它植物如油棕、小果野芭蕉、海枣、荷花和无油樟等的 WRKY 家族转录因子都有着较高的相似度。

DoWRKY6 的 ORF 为 1,017 bp, 编码 339 个氨基酸, 如图 1 A 方框标识部分, 其中蓝色 WRKY 部分为 128-184 氨基酸序列表示与 DNA 结合域特异性结合位点 (如图 1B 标识出的 WRKY 结构域); 灰色 WRKY 为 128-186 氨基酸序列表示与 DNA 结合域的非特异性结合位点; 灰色 WRKY superfamily 部分与蓝色标识部分一致是 WRKY 转录因子与 DNA 结合域的结合位点。

通过 SOPMA 在线软件预测分析 *DoWRKY6* 蛋白的二级结构(图 1C), 蓝色为 α-螺旋比例为 24.48%, 绿色的 β-转角比例为 7.37%, 粉色无规卷曲比例为 55.75%, 红色延伸链比例为 12.39%。

2.2 DoWRKY6 基因的系统发育树分析

将 *DoWRKY6* 基因序列与通过 NCBI 中的 Blastn 得到与之相似的基因序列通过 MEGA5.2 软件进行基因系统发育分析, 结果如图 2 所示。

由图 2 可知 *DoWRKY6* 转录因子与梅 [*PmuWRKY27* (XM_008236601.1)] 及大豆 [*GlmaWRKY27* (XM_003555347.3)] 在同一个大分支上, 但 *DoWRKY6* 在一个独立的小分支上, 与其他植物物种的亲缘关系要稍远一些。

2.3 DoWRKY6 基因在不同组织中的相对定量表达

以根组织中的 *DoWRKY6* 表达量为校准基础, 茎、叶组织中的 *DoWRKY6* 表达量为对比样本。将 *Actin*、*GAPDH* 内参基因表达量的三次技术重复分别进行算术平均数, 后对两个内参基因做几何平均数, 并以此为最终内参表达量标准。通过各个样本的三个技术重复与三个实验重复分别得到根、茎、叶的表达量, 最后通过数据处理得到图 3。

用 *Actin*、*GAPDH* 做内参基因进行数据分析, 结果显示, 根中 *DoWRKY6* 含量最低, 叶相对表达量其次, 茎的表达量最高。铁皮石斛一年生幼苗中以根部的 *DoWRKY6* 表达量为基数 1, 叶中的相对表达量为根部的 2.9 倍, 而茎的相对表达量高达 16.8 倍。

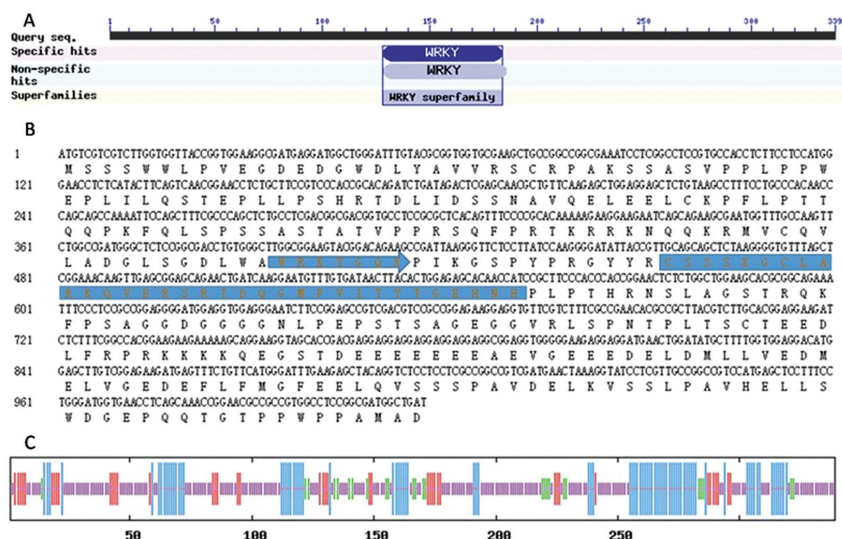


图 1 *D0WRKY6* 蛋白结构的预测

Fig.1 DoWRKY6 protein structure prediction

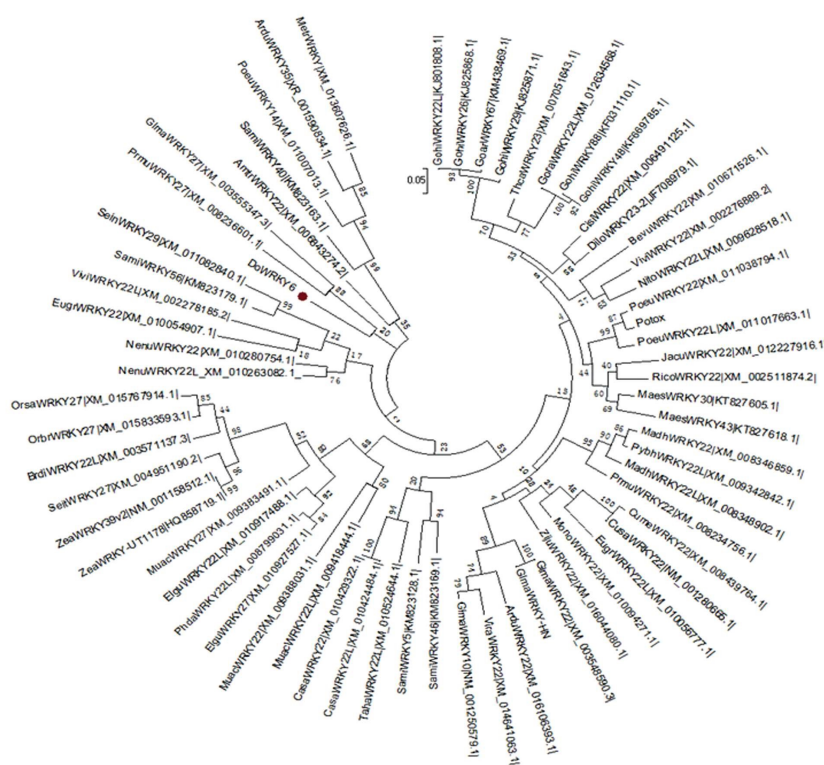


图 2 DoWRKY6 系统发育分析

Fig.2 DoWRKY6 Phylogenetic analysis

3 讨论

WRKY 转录因子可以分为 3 大类, I 类有两个 WRKY 结构域, II 类有一个 WRKY 结构域, 它们的锌指结构都是 C_2H_2 型, III 类有一个 WRKY 结构域, 但其锌指结构为 C_2HC 型。其中 II 类又可以根据锌指结构的区别分为 5 个亚型, 而 I 类则被学者认为是最古老的 WRKY 转录因子类型, 可能起源于 15-20 亿年前的真核生物。WRKY 转录因子参与了植物生长发育的调控, 且对生物及非生物胁迫都有很重要的转录调控作用, 本研究旨在探究 *DoWRKY6* 基因在铁皮石斛生长发育过程中对不同组织的表达差异, 来推测其主要调控部位, 也为铁皮石斛

的 WRKY 基因组数据的丰富提供帮助。

铁皮石斛 *DoWRKY6* 基因具有长度为 1,017 bp 的完整 ORF, 编码 339 个氨基酸, 该蛋白只有一个 WRKY 结构域和一个结构为 CX₂C₂₃HX₁H 的锌指结构, 属于 II 类 WRKY 转录因子, 且 WRKY 结构域与锌指结构会和 DNA 的 W 盒进行特异性结合。通过 ProtParam 在线预测分析 *DoWRKY6* 蛋白的分子式为 C₁₆₄₁H₂₅₅₆N₄₅₄O₅₃₀S₁₃, 相对分子质量为 37541.8, 理论等电点为 4.86, 总平均亲水性 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.756, 判定 *DoWRKY6* 转录因子为疏水性蛋白。在对该基因进行了简要的生物信息学分析后, 得到与之相近的科属关系, 这为后续比对并丰富 WRKY 转录因子超家族的基

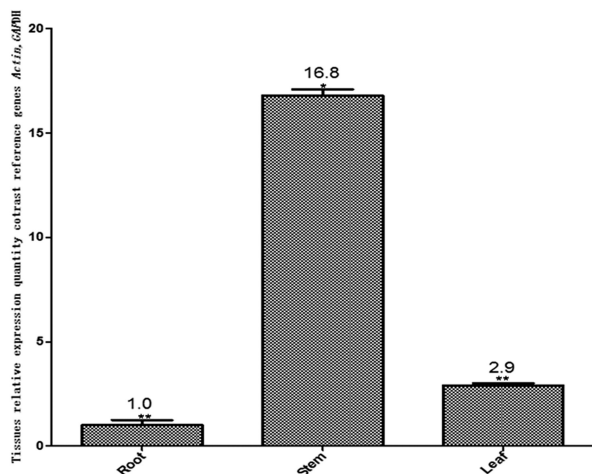


图3 DoWRKY6 相对表达量

Fig.3 DoWRKY6 relative expression

根、茎、叶表达差异特别显著 (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$)

The expression significant different in root, steam and leaf

(* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$)

因库提供帮助。

DoWRKY6 基因的表达量在铁皮石斛幼苗的不同组织中都有着很大的不同。在两种不同的内参的综合对比下,以根为对照组进行数据分析,可以发现在根中 *DoWRKY6* 的表达量最低,在茎中 *DoWRKY6* 的相对表达量最大,为根中表达量的 16.8 倍,在叶组织中 *DoWRKY6* 的相对表达量为根中表达量的 2.9 倍,因此我们推断该基因在铁皮石斛的生长发育过程中会在不同组织中表达差异拉大,在茎中有较强的转录调控作用,在根部的调控作用较低,在幼嫩叶片中表达调控作用也较根部强,推测 *DoWRKY6* 对铁皮石斛生长发育过程中不同组织的调控作用有较大差异,对茎的调控最明显,叶其次,对根部的调控相对来说就小了很多。

4 结论

本研究从铁皮石斛组培幼苗中克隆得到 *DoWRKY6* 基因,其完整开放阅读框为 1,017bp,编码 339 个氨基酸残基,属于 II 类 WRKY 转录因子。对铁皮石斛不同组织分别进行荧光实时定量 PCR 分析,发现 *DoWRKY6* 在根中表达量最低,叶相对表达量约为根部的三倍,茎中可以达到根表达量的 16.8 倍。

参考文献(References)

[1] 赵武帅, 翟琪麟, 安泽伟, 等. 橡胶树转录因子 HbWRKY9 的克隆与特性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(3): 599-606
Zhao Wu-shuai, Zhai Qi-lin, An Ze-wei, et al. Hevea brasiliensis transcription factor HbWRKY9 cloning and feature analysis [J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(3): 599-606

[2] Wang L, Zhu W, Fang L, et al. Genome-wide identification of WRKY family genes and their response to cold stress in Vitis vinifera [J]. BMC Plant Biol, 2014, 14: 103

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

[4] Wen F, Zhu H, Li P, et al. Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of WRKY family genes in Brachypodium distachyon[J]. DNARes, 2014, 21 (3): 327-339

[5] Brand LH, Fischer NM, Harter K, et al. Elucidating the evolutionary

conserved DNA-binding specificities of WRKY transcription factors by molecular dynamics and in vitro binding assays [J]. Nucleic Acids Res, 2013, 41(21): 9764-9778

[6] Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, et al. Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain [J]. Plant Cell, 2005, 17: 944-956

[7] 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

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

[9] 李娟, 黄丹, 李顺祥, 等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报, 2011, 29(18): 74-79
Li Juan, Huang Dan, Li Shun-xiang, et al. Advances in the of Resources, Constituents and Pharmacological Effects of Dendrobium officinale[J]. Science & Technology Review, 2011, 29(18): 74-79

[10] 李玲, 邓晓兰, 赵兴兵, 等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 肿瘤药, 2011, 1(2): 90-94
Li Ling, Deng Xiao-lan, Zhao Xing-bing, et al. Advances in studies on chemical constituents in Dendrobium candidum and their pharmacological effects[J]. Anti-tumor Pharmacy, 2011, 1(2): 90-94

[11] 吕主源, 颜美秋, 陈素红. 铁皮石斛功效相关药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 489-493
Lv Gui-yuan, Yan Mei-qiu, Chen Su-hong. Review of pharmacological activities of Dendrobium officinale based on traditional functions [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(4): 489-493

[12] Pandey S P, Somssich I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. Plant Physiol, 2009, 150(4): 1648-1655

[13] Zhao Jun, Meng Cancan, Zhao Yifan, et al. Cloning and Expression Analysis of Transcription Factor Gene (DoWRKY2) in Dendrobium officinale [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2015, 23 (8): 1049-1057

[14] Zhao Jun, Sun Shiwei, Meng Cancan, et al. Cloning and expression analysis of transcription factor gene DoWRKY1 in Dendrobium officinale[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(14): 2807-2813

[15] Jiang Yuan, Zhu Yuqiu, Gao Yanhui, et al. Cloning and expression analysis of WRKY5 gene in Dendrobium officinale [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(2): 301-308

[16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739

[17] 张岗, 赵明明, 张大为, 等. 铁皮石斛实时定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(19): 1664-1668
Zhang Gang, Zhao Ming-ming, Zhang Da-wei, et al. Reference gene selection for Real-time quantitative PCR analysis of Dendrobium officinale [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2013, 48 (19): 1664-1668

[18] Zhou Liang-yun, Liu Tan, Wang Sheng, et al. Real-Time PCR and Its Application in Study of Traditional Chinese Medicine(TCM)[J]. Mod Chin Med, 2016, 18(2): 246-251+262