

# 水稻转录因子 WRKY39 的克隆表达及 DNA 结合活性分析

## Cloning and Expression of a Rice WRKY39 Gene and DNA-binding Analysis

郑元涛, 欧娜, 韦星明

ZHENG Yuan-tao, OU Na, WEI Xing-ming

(广西科学院生物研究所, 广西南宁 530007)

(Biology Institute of Guangxi Academy of Science, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**根据水稻转录因子 WRKY39 的 cDNA 基因序列设计引物, 克隆水稻日本晴 (*Oryza sativa* L.) WRKY 类转录因子的 cDNA 基因并进行原核表达, 通过凝胶阻滞实验分析融合蛋白与 DNA 的结合活性。结果克隆了 1 个新的 WRKY 基因 OsWRKY39, 其编码的蛋白 OsWRKY39 能够与顺式元件 W 盒特异结合, OsWRKY39 具有转录因子的最基本特征。

**关键词:**转录因子 WRKY 水稻 原核表达 DNA 结合活性

**中图分类号:** Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2012)03-0197-04

**Abstract:** A new rice WRKY gene (*OsWRKY39*) was cloned from cDNA of young rice leaves employing a PCR strategy and was expressed in *E. coli* (BL 21 strain). The DNA-binding activity of the recombinant WRKY39 protein was analyzed using electrophoretic mobility shift assay. It was found that the recombinant WRKY39 protein bound specifically to W-box, which indicated WRKY39 was a transcriptional factor.

**Key words:** transcriptional factor, WRKY, *Oryza sativa*, prokaryotic expression, DNA-binding activity

转录因子是指能够与真核基因启动子区顺式作用元件特异性结合的 DNA 结合蛋白。WRKY 蛋白是一类主要存在于植物的转录调节因子, 参与植物的发育、衰老和抗病等过程, 其共同结构特征是, 都含有一个保守的、约 60 个氨基酸的 DNA 结合域, 其中 N 端为高度保守的 WRKYGQK 序列, C 端为锌指结构。在拟南芥和水稻 2 种模式植物中分别发现 74 个和 102 个 WRKY 基因<sup>[1,2]</sup>, 在玉米中发现 136 个 WRKY 蛋白<sup>[3]</sup>。

在已经研究过的可能受 WRKY 蛋白调节的基因启动子中, 都有 (T)TGAC(C/T) 这样的保守序

列, 称为 W 盒<sup>[4,5]</sup>。W 盒是 WRKY 蛋白特异的 DNA 结合区, 其中 TGAC 是核心, 固定不变。WRKY 蛋白通过与目标基因启动子的 W 盒结合, 调控下游基因的表达。W 盒存在于许多防卫反应和生长发育相关基因以及 WRKY 基因的启动子中。这也预示着 WRKY 基因在胁迫反应、生长发育和代谢过程中起调控作用。搜寻基因启动子上的 W 盒元件, 有利于找到 WRKY 可能调控的目的基因。本研究根据 GenBank 数据库的信息设计引物, 克隆水稻 WRKY 类转录因子 OsWRKY39 的 cDNA 基因, 对其进行原核表达, 并对融合蛋白与 DNA 的结合特性进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试水稻为粳稻品种日本晴 (*Oryza sativa*)

收稿日期: 2012-03-12

修回日期: 2012-06-06

作者简介: 郑元涛(1977-), 男, 助理研究员, 主要从事生物学及光谱学研究。

*L. Japonica nipponbare*)。pGEX-4T-3 质粒为本实验室保存。RNA 抽提试剂 TRIzol 和反转录酶 SuperScript™ III 均为 Invitrogen 公司的产品。LA-Taq DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 连接酶和 T 载体 pMD20-T 均购自大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司。引物由上海生工生物工程有限公司合成。双链 DNA 末端标记试剂盒购自 Promega 公司。

## 1.2 水稻 cDNA 合成及 WRKY39 基因克隆

参照 TRIzol 试剂说明书,提取在自然光周期的温室中培养的水稻幼苗的 RNA。按照 SuperScript™ III 反转录试剂盒操作程序将水稻总 RNA 反转录为第一链 cDNA。

以 Genbank 数据库中水稻转录因子 WRKY39 对应的 cDNA 基因序列(AK109795)合成引物 P1 (5'-AATCGAGCTGGTAGTAGCCGG-3') 和 P2 (5'-AGAGGGATATGGATATTTTATTTATC-3')。用 LA-Taq DNA 聚合酶对水稻 cDNA 模板进行扩增。扩增条件为:94℃ 预变性 3 min,(94℃ 30 sec,58℃ 30 sec,72℃ 2 min)×35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经胶回收纯化后连接到 T 载体 pMD20-T,克隆载体 pMD-WRKY39 经测序验证。

## 1.3 原核表达载体的构建

选用 pGEX-4T-3 为原核表达载体。根据 WRKY39 的 ORF 序列设计合成上游引物 P3 (5'-GCGGATCCATGGATATGATGGAGGAGGAGG-3') 和下游引物 P4 (5'-CCGCTCGAGT-TAGAACTTGTGCCACTGATGATC-3')。以引物 P3 和 P4 扩增 pMD-WRKY39,PCR 产物和 pGEX-4T-3 质粒用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行酶切。将酶切产物进行胶回收,然后在 T4 连接酶作用下连接。连接产物转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,通过 PCR、酶切筛选阳性克隆,并对可能的阳性克隆进行测序验证。

## 1.4 融合蛋白的诱导表达

将构建正确的表达载体 pGEX-WRKY39 和 pGEX-4T-3 空质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 菌株,然后接种到 5 ml 含 100 mg·L<sup>-1</sup> Amp 的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养过夜,转速为 200 r/min。取 1 ml 菌液接种到 100 ml 新鲜 LB 培养基(含 100 mg·L<sup>-1</sup> Amp)中进一步培养,待培养物的 OD<sub>600</sub> 达到 0.5~0.7,加入终浓度为 0.5 mM 的 IPTG 进行诱导。经 37℃ 继续培养 2~6 h,4℃ 离心收集菌体,用

STE 溶液(100 mM NaCl,10 mM Tris·HCl,1 mM EDTA,pH 值 8.0)洗涤 1 次,然后悬浮于 100 mM 磷酸缓冲液(含 1 mM DTT,1 mM PMSF,1% Triton X-100)中。加入溶菌酶至终浓度 1 mg/ml,冰上放置 30 min。裂解液在 12000r/min,4℃ 下离心 10 min,分别收集上清和沉淀,进行凝胶浓度 12% 的 SDS-PAGE 电泳,用考马斯亮蓝染色。

## 1.5 寡核苷酸探针的制备和凝胶阻滞实验

含有 2 个 W 盒核心序列(5'-TTGACC/T-3') 的寡核苷酸探针 Pib 来源于水稻抗稻瘟病菌的抗病基因 *Pib* (GenBank 登录号:AB013448)启动子的一段序列,Pib: AATCTATTGACCTTGACTTAC-CACATG;突变探针 mPi 为 W 盒核心序列,用 5'-TTGGCC/T-3' 代替,mPib: AATCTATTGGCCT-TGGCTTACCACATG。根据以上序列双链合成 2 对引物,每对引物混合后在 100℃ 变性 10 min,逐渐冷却至室温可合成双链 DNA 探针,按照双链 DNA 末端标记试剂盒提供的方法用 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP 末端标记。

凝胶阻滞实验参照 Zhang 等<sup>[6]</sup>的方法并稍作改进:反应液为 20 $\mu$ l 体系,包含:0.2 pmol [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]末端标记的寡核苷酸探针、1 mM DTT、50 mM KCl、1 $\mu$ g 非特异性封闭探针 poly(dI-dC)、10 mM Tris-HCl (pH 值 7.6)、0.5 mM EDTA 及 10% 甘油。在进行结合反应时加入含 100 ng GST-WRKY39 重组蛋白或 GST 蛋白的细菌裂解上清液。进行竞争结合实验时,将一定量未标记的竞争探针先加入到反应体系中,之后加入含蛋白的细菌裂解上清液,25℃ 保温 30 min 后进行 6% 非变性 PAGE 电泳,电泳缓冲液为 0.5×TBE 缓冲液(45 mM Tris,45 mM 硼酸,1 mM EDTA)。电泳结束后将 PAGE 胶剥离,放入磷屏曝光 3~12 h。使用 Typhoon 9000 激光扫描成像系统 (Amersham Biosciences) 进行扫描分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 OsWRKY39 基因的克隆和表达载体构建

用引物 P1 和 P2 扩增水稻 cDNA,PCR 产物大小约为 1600 bp,与预期大小一致。将产物胶回收后连接到 T 载体,得到克隆载体 pMD-WRKY39。测序结果表明,扩增得到的 cDNA 序列全长 1623 bp,编码 1 个含 387 个氨基酸的基因。根据 Wu 等<sup>[2]</sup>的水稻 WRKY 基因家族分类及命名原则,该基因命名为 OsWRKY39,属于 IId 亚组,含 1 个

WRKY 保守域, 锌指模式 CX<sub>5</sub>CX<sub>23</sub>HXH。

将 OsWRKY39 的 ORF 片段连接到 pGEX-4T-3, 构建得到重组载体 pGEX-WRKY39, 用 BamHI 和 XhoI 进行酶切, 重组质粒能切出 1200 bp 条带 (图 1)。将重组质粒进行测序, 结果表明序列正确, OsWRKY39 的读码框和 GST 的也是一致的。

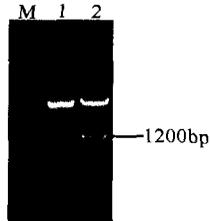


图 1 重组质粒 pGEX-WRKY39 的酶切分析

1: pGEX-WRKY39 质粒; 2: pGEX-WRKY39 用 BamHI/XhoI 酶切; M: DNA 分子量标准 DL2000 plus。

### 2.2 OsWRKY39 基因的原核表达

将重组质粒 pGEX-WRKY39 和空载体转化到 E. coli BL21(DE3) 菌株, 用 IPTG 诱导表达并进行 SDS-PAGE 分析。发现诱导 3 h 后, 可以看到比较明显的 GST (26 kDa) 和融合蛋白 GST-OsWRKY39 (68 kDa) 的表达, 与预期的蛋白质分子量大小一致 (图 2)。

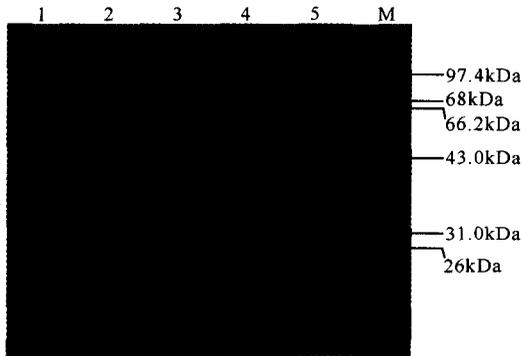


图 2 OsWRKY39 基因的原核表达

1: pGEX-4T-3 诱导后; 2: pGEX-4T-3 诱导前; 3: pGEX-WRKY39 诱导前; 4: pGEX-WRKY39 诱导后产物; 5: pGEX-WRKY39 诱导后裂解液上清; M: 蛋白分子量标准。

### 2.3 OsWRKY39 蛋白与 DNA 的结合活性

转录因子与特定的顺式元件结合是转录因子的典型特征。为了研究 OsWRKY39 蛋白是否也有 WRKY 类转录因子与 W 盒元件特异性结合的特性, 通过表达与 GST 融合的 WRKY39 重组蛋白和含有 2 个 W 盒的 Pib 探针进行凝胶阻滞实验进行分析。

Pib 基因是水稻中第 1 个被克隆的抗稻瘟病基因<sup>[7]</sup>, 编码 1 个具有核苷酸结合位点-富含亮氨酸重复保守结构域的蛋白。本文所用 DNA 探针 Pib 来

源于 Pib 基因启动子中含 W 盒的片段。凝胶阻滞实验结果 (图 3) 如下: 重组蛋白 GST-OsWRKY39 能与 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP 标记的 Pib 探针 (<sup>32</sup>P-Pib) 强烈结合 (泳道 3), 而作为对照的空载体表达的 GST 蛋白与 <sup>32</sup>P-Pib 无结合活性 (泳道 2); 未标记的 Pib 与标记的 Pib 探针 <sup>32</sup>P-Pib 竞争性结合 OsWRKY39, 加入 100 倍未标记的 Pib 完全阻止了 OsWRKY39 与 <sup>32</sup>P-Pib 探针之间的相互作用 (泳道 4); 突变的探针 mPib 不能与 OsWRKY39 发生相互作用 (泳道 5), 也不能有效地竞争 Pib 探针与 OsWRKY39 之间的结合, 加入 100 倍未标记的突变探针 mPib 不能阻止 <sup>32</sup>P-Pib 与 OsWRKY39 的结合 (泳道 6)。这表明 OsWRKY39 能结合具有正常核心序列的 W 盒, 而不结合 W 盒核心序列被突变的 DNA, 说明 OsWRKY39 与 W 盒的结合具有特异性。

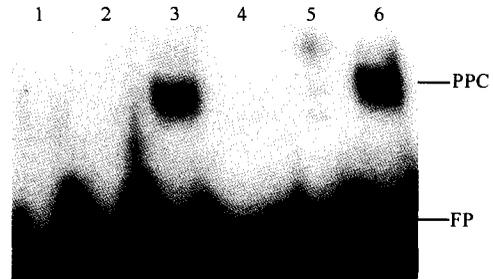


图 3 融合蛋白 WRKY39 与 W 盒探针的结合

1: <sup>32</sup>P-Pib; 2: GST + <sup>32</sup>P-Pib; 3: GST-WRKY39 + <sup>32</sup>P-Pib; 4: GST-WRKY39 + <sup>32</sup>P-Pib + 100x Pib; 5: GST-WRKY39 + <sup>32</sup>P-mPib; 6: GST-WRKY39 + <sup>32</sup>P-Pib + 100x mPib; PPC: 探针和蛋白复合物; FP: 游离探针。

### 3 讨论

转录因子在特定时间进入细胞核内, 与特定基因启动子区域中的顺式作用元件互作, 实现对基因表达的调控。因此, DNA 结合活性是转录因子的特征, 探讨 WRKY 蛋白的 DNA 结合活性有利于阐明它们的生化功能。

研究表明, WRKY 类转录因子中的 WRKY 保守域是 DNA 结合域, 而绝大多数 WRKY 蛋白与含有核心序列 TTGACC/T 的 W 盒元件结合。W 盒广泛存在于防卫相关基因和 WRKY 基因的启动子序列中<sup>[8,9]</sup>, 在植物中介导 WRKY 基因对这些基因的表达调控。在本实验中, 选择水稻抗稻瘟病基因 Pib 启动子中含 W 盒的一段核苷酸片段作为探针, 用凝胶阻滞的方法在体外证明表达的 OsWRKY39 重组蛋白具有与 W 盒元件特异结合的活性, 说明分离的 OsWRKY39 基因编码的蛋白具有绝大多数

WRKY类转录因子所具备的与W盒元件特异结合的特征。本文所采用的核苷酸片段仅为*Pib*启动子的一小部分序列(27 bp),*Pib*启动子是否为WRKY39的真实靶标还需要进一步的实验证明。

另外,启动子中的W盒数量及其排列方式与WRKY蛋白的结合、目的基因表达模式有一定的关系。一些目的基因的启动子常常有多个W盒,而且位置靠近,串联重复或呈回纹排列<sup>[10,11]</sup>。核心序列TGAC合适的间隔区长度影响蛋白与W盒元件的结合或特异性<sup>[12]</sup>。本实验中,*Pib*中的2个正向排列的W盒间隔2个核苷酸,OsWRKY39同样能与之结合。核心序列TGAC第3位的A变成同样为嘌呤核苷酸的G就能完全阻止WRKY39与W盒的结合,提示核心序列中任一核苷酸的变化就可能决定这种结合。

#### 参考文献:

- [1] Kalde M, Barth M, Somssich I E, et al. Members of the *Arabidopsis* WRKY group II transcription factors are part of different plant defense signaling pathways[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16: 295-305.
- [2] 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: 9-26.
- [3] Wei K F, Chen J, Chen Y F, et al. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in Maize[J]. *DNA Res*, 2012: dsr048v1-dsr048.
- [4] Rushton P J, Macdonald H, Hutly A K, et al. Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of  $\bar{a}$ -*Amy 2* genes [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 691-702.
- [5] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 199-206.
- [6] Zhang Z L, Shin M, Zou X, et al. A negative regulator encoded by a rice WRKY gene represses both abscisic acid and gibberellins signaling in aleurone cells[J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 70: 139-151.
- [7] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J]. *The Plant Journal*, 1999, 19: 55-64.
- [8] 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: 5690-5700.
- [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: 21-37.
- [10] Eulgem T, Rushton P J, Schmelzer E, et al. Early nuclear events in plant defence signaling; rapid gene activation by WRKY transcription factors[J]. *EMBO J*, 1999, 18: 4689-4699.
- [11] Du L, Chen Z. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2000, 24: 837-847.
- [12] Hara K, Yagi M, Kusano T, et al. Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding[J]. *Mol Gen Genet*, 2000, 263: 30-37.

(责任编辑:陈小玲)

### 可测量单分子质量纳米秤问世

传统质谱学利用一个磁场来弯曲带电分子的路径。它们的路径弯曲的程度揭示了它们的质量。但是这项技术对于巨大的生物分子(质量大约是一个质子的100万倍)并不理想,例如,这些巨大的分子移动得异常缓慢,并不会触发位于磁场另一端的传统粒子探测器。因此科学家一直在探索其他的替代方法。10多年来,美国帕萨迪纳市加利福尼亚理工学院的研究人员尝试了能够切割出物质(例如硅)的微小振动梁。测量约一万亿分之一克的重量,可以使振动梁在每秒周期内产生数以百万计的从一侧到另一侧的振动。原则上,这样一种装置能够测量一个分子的质量。当一个分子黏附在这样一个振动梁上时(这一过程被称为物理吸附),其额外的质量促使振动梁以一种低频产生振动。因此如果想要测量分子的质量,研究人员只须测量频移便可。然而这里也有一个问题。这种频移同时还取决于分子在振动梁上落脚的位置,因为一个较轻的分子停留在振动梁中间所产生的频移,同一个较重的分子落在振动梁一端所产生的频移是相同的。如今,他们终于找到了一种解决办法:同时以2个不同的频率摇晃振动梁。就这样,一个摇摆的小发明已经能够测量单个分子的质量。新的装置为质谱学敞开了一扇新的大门,这是一种通过测量分子质量从而确定它们是什么的科学。然而,对于这项技术的最终效用依然是众说纷纭,如何将其运用到广义质谱学中去,还有待于进一步检验。

(据科学网)