

枇杷 *EjWRKY15* 基因克隆与蛋白特性分析

李晓颖, 徐红霞, 陈俊伟*

(浙江省农业科学院园艺研究所, 杭州 310021)

摘要:【目的】克隆枇杷 *EjWRKY15* 基因并对其组织表达模式及蛋白特性进行分析。【方法】从枇杷转录组数据库中获得 *EjWRKY15* 基因 ORF 序列, 克隆该基因, 对获得的基因序列进行遗传进化分析, 并通过 qRT-PCR 探究其在不同组织中的表达模式。同时对 *EjWRKY15* 蛋白分子的理化特性、磷酸化位点、跨膜区、信号肽、亲疏水性、二级结构、三级结构和亚细胞定位等蛋白特性进行预测分析。【结果】枇杷 *EjWRKY15* 基因含有开放阅读框 951 bp, 共编码 316 个氨基酸, 具有 WRKY 家族典型结构特征。系统进化结果表明, *EjWRKY15* 序列与苹果 *WRKY61* 序列同源度高达 95%, 说明从进化角度来看, *EjWRKY15* 与苹果 *WRKY61* 的亲缘关系最为密切。实时荧光定量 PCR 分析结果显示, 该基因具有组织表达特异性, 在根中相对表达量较高, 果实次之; 对 *EjWRKY15* 蛋白进行理化性质测定, 其分子质量为 35.79 kDa, 等电点为 5.09, 脂溶指数为 56.45, 不稳定性指数为 69.72, 平均亲水性为 -0.598, 为亲水性蛋白。该蛋白含有 33 个磷酸化位点, 包含丝氨酸 (Ser)、苏氨酸 (Thr) 和酪氨酸 (Try), 数量分别为 25、6、2 个。蛋白质二级结构预测结果表明, *EjWRKY15* 蛋白以 α 螺旋和无规卷曲为主, 分别占 30.70% 和 56.65%, 其次是延伸链 8.27% 和 β 角 4.43%。同时, 三级结构分析表明, 该蛋白的结构域主要由 4 个 β -折叠组成, β -折叠 1 为 WRKYGQK, β -折叠 2 为 RSYYKC, β -折叠 3 为 GVRKHVER, β -折叠 4 为 AVVTY。另外, 预测结果证实了 *EjWRKY15* 蛋白不含信号肽, 也不是同时含有跨膜区的分泌蛋白。亚细胞定位预测和验证结果都显示 *EjWRKY15* 基因定位于细胞核中。【结论】本研究结果为深入探究 *EjWRKY15* 基因在枇杷不同生长发育时期的分子生物学功能及其响应逆境调控机制的研究奠定了良好的基础。

关键词: 枇杷; *EjWRKY15*; 基因克隆; RT-PCR; 蛋白特征预测; 亚细胞定位

中图分类号: S667.3

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)12-1811-10

Gene cloning and protein characterization analysis of *EjWRKY15* in loquat

LI Xiaoying, XU Hongxia, CHEN Junwei*

(Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China)

Abstract: 【Objective】WRKY transcription factor is a plant-specific super-gene family, and the WRKY protein plays an important role in signaling pathways that regulate plant growth and development, biotic and abiotic stress defense, hormone transduction and other biological metabolic processes. In previous study, 33 sequences with a typical WRKY domain have been isolated and identified. It was found from the research basis of fruit sunburn transcriptome that the transcription factor *EjWRKY15* of the *WRKY* gene family was highly up-regulated under sunburn stresses, indicating that the *EjWRKY15* gene was responsible for the resistance to the sunburn reaction and the synthesis of functional genes played an important role in loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]. The main objective of this study was to clone the gene *EjWRKY15* and reveal its tissue expression patterns and protein characteristics in loquat. 【Methods】The full-length ORF sequence of the *EjWRKY15* gene was obtained by sequencing, and the amino acid sequence of the *EjWRKY15* gene was compared based on NCBI database, then the genes with high homology were screened and downloaded. MEGA X software was used to construct phyloge-

收稿日期: 2020-03-27 接受日期: 2020-08-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(31601734); 浙江省农业新品种选育重大科技专项(2016C02052-3); 台州院地合作项目(TZ2018006); 浙江省重点研发计划项目(2018C02011)

作者简介: 李晓颖, 副研究员, 研究方向为果树育种与分子生物学。Tel: 0571-86417302, E-mail: muzixiaohaitun@126.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0571-86417302, E-mail: chenjunwei@mail.zaas.ac.cn

netic tree. The molecular weight, isoelectric point, liposoluble index, instability index, average hydrophilicity and other physical and chemical properties of encoding protein were analyzed by ProtParam software. The potential phosphorylation sites of the *EjWRKY15* protein in loquat were predicted by NetPhos v3.1 online tool. SOPMA and SWISS-MODEL were respectively used to predict secondary structure and tertiary structure online; the transmembrane regions and signal peptide were also analyzed using TMHMM Server v.2.0 and SignalP 4.1 Server. Plant-mPLoc v1.0 was used to predict subcellular localization and then pBWA(V)HS-EjWRKY15-GLOsgfp vector was constructed to verify the subcellular localization.【Results】The cloning and sequencing results showed that the *EjWRKY15* gene contained 951 bp of open reading frame, which encoded 316 amino acids and had typical structural characteristics of WRKY family. Phylogenetic tree analysis results showed that the *EjWRKY15* sequence had 95% homology with apple *WRKY61* sequence, indicating the *EjWRKY15* might have the closest relationship with *Malus domestica* from an evolutionary perspective. The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the *EjWRKY15* gene had tissue expression specificity, with higher abundance expression in the roots than in the fruits, suggesting that this gene was mainly expressed in the roots. The results of physical and chemical properties of the *EjWRKY15* protein showed that the molecular weight, isoelectric point, fat solubility index, instability index and average hydrophilicity were 35.79, 5.09, 56.45, 69.72 and -0.598, respectively, indicating that it was a hydrophilic protein. It was found that the *EjWRKY15* proteins had 33 phosphorylation sites in total, containing serine (Ser), threonine (Thr) and tyrosine (Try), the number of them was 25, 6, 2, respectively. The results of protein secondary structure prediction showed that the *EjWRKY15* protein was mainly α -helix and random curl, with the proportion of 30.70% and 56.65% respectively, followed by 8.27% of extension chain and 4.43% of β corner. At the same time, the tertiary structure analysis showed that the domain of this protein was mainly composed of four β -folds, β -fold 1 was WRKYGQK, β -fold 2 was RSYYKC, β -fold 3 was GVRKHVER and β -fold 4 was AVTTY. In addition, prediction results confirmed that the *EjWRKY15* protein did not contain signal peptide and was not a secretory protein, which did not contain transmembrane region at the same time. The results of subcellular localization prediction showed that the *EjWRKY15* gene was located in the nucleus, the above result also verified the accuracy by tobacco instantaneous expression system, which was consistent with this gene as a transcription factor Control downstream gene expression.【Conclusion】The results of cloning and protein characterization of the *EjWRKY15* gene in loquat will laid a good foundation for further study on the molecular biological function of the *EjWRKY15* gene in different growth and development stages of loquat and the mechanism of response to adversity regulation.

Key words: Loquat; *EjWRKY15*; Gene clone; RT-PCR; Protein characterization predicting; Subcellular localization

枇杷是我国南方特产的常绿果树之一,因其果肉柔软多汁、酸甜适口、风味佳美、且有润肺、润五脏等功效,在全国乃至全球范围广受消费者喜爱,被誉为嘉果珍珠^[1]。枇杷虽在百果中独具先天四时之气,但枇杷在一年四季的生长过程中常常遭受不利环境因素,如低温冻害、高温日灼、旱涝等影响而造成减产或品质下降,制约了枇杷产业的健康稳定发展^[2]。因此,从分子生物学水平解析枇杷逆境胁迫

应答反应,并通过育种手段培育抗逆新品种研究不仅具有重要的现实意义,也成为当前枇杷育种及农业生产中人们关注的热点之一。

作为植物中特异性转录因子,WRKY基因家族因其结构域中包含一个高度保守的WRKYGQK氨基酸基序而命名。WRKY转录因子广泛参与植物生长发育如种子萌发^[3]、植株衰老^[4]、以及生物^[5-6]和非生物胁迫^[7-8]等多种生物学过程。许多研究表明,

非生物胁迫通常会对植物的正常生理生化过程产生严重影响,而WRKY转录因子会激活或抑制非生物胁迫信号级联网络,在植物对逆境响应的过程中发挥重要而独特的作用^[9]。在前期研究中,根据枇杷高温日灼转录组测序的差异表达序列,笔者已经对枇杷现有的WRKY家族基因进行了鉴定、分类和命名,并系统分析了枇杷WRKY基因家族的结构特征。枇杷WRKY基因启动子具有光反应、低温诱导、干旱诱导、厌氧诱导、防御和应激等特异性作用元件,说明WRKY转录因子可能在枇杷干旱、强光等非生物逆境胁迫中起到应激作用^[2]。且在转录组高表达差异基因研究中发现,*EjWRKY15*基因在高温日灼逆境中出现高丰度差异表达,推测其可能参与枇杷果实高温响应的信号级联反应,但是具体作用机制还有待进一步研究。因此,为探索枇杷*EjWRKY15*基因的生物学功能,笔者以枇杷果实为材料,克隆了该基因,并对其蛋白结构特性进行了生物信息学分析,采用荧光定量PCR(qRT-PCR)方法研究该基因在不同组织中的表达情况,同时通过构建GFP和*EjWRKY15*的融合表达载体,转化烟草对该基因编码蛋白进行亚细胞定位分析,为深入探索*EjWRKY15*基因功能及在枇杷高温等抗逆调节中可能的作用机制提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 植物材料

试验材料为10 a生枇杷(*Eriobotrya japonica* Lindl.)品种‘宁海白’,该品种属于白肉品种。2018年12月10日至翌年5月20日采于浙江省农业科学院杨渡创新基地枇杷种质资源圃,收集新生根、茎、嫩叶、花、成熟果实组织,样品采集后液氮速冻,放置于-70℃冰箱保存,用于RNA提取和后续的基因克隆与qRT-PCR。

1.2 RNA提取和第一链合成

组织材料总RNA提取采用天根离心柱型多糖多酚植物总RNA提取试剂盒(RNAprep Pure Plant Plus Kit)进行。用1.2%的琼脂糖凝胶电泳测定总RNA完整性。并利用Thermo N_{ANO} D_{ROP} 1000 Spectrophotometer检测RNA的浓度及OD比值。cDNA第一链合成使用天根Quant cDNA第一链合成试剂盒(Quantscript RT Kit),具体操作步骤如下:将模板RNA在冰上解冻;引物、10×RT mix(其中包含RNA-

sin和DTT)、Super pure dNTP混合液、RNase-Free ddH₂O在室温(15~25℃)解冻,解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀,简短离心以收集残留在管壁的液体。按照总体积20 μL配制逆转录混合液,包括10×RT Mix 2 μL, Super pure dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹ each)2 μL, Oligo-(dT)₁₅ 2 μL, Quant Reverse Transcriptase 1 μL, RNase-Free 水 5 μL,模板RNA 8 μL(1.6 μg),彻底混匀,简短离心,并置于37℃孵育60 min,合成好的各组织cDNA保存于-70℃冰箱备用,用于后续的荧光定量PCR反应。

1.3 *EjWRKY15*基因的克隆、测序

根据实验室已获得的枇杷转录组预测的WRKY15ORF数据(未公布)和NCBI中其他树种WRKY基因保守序列设计特异引物,引物如下:WRKY15(+): 5' - CAGTGGTCTCACAACATGGAGAACTGGGATTTGCA-3'; WRKY15(-): 5' - CAGTGGTCTCATAATCAGCAAGCACCGTTT - ACAG-3'。PCR扩增采用50 μL扩增体系,扩增目的片段。扩增反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,50℃退火45 s,72℃延伸1 min,30个循环,72℃延伸10 min,16℃降温保存30 min。1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,将扩增的目的电泳片段切下,利用Axgen DNA胶回收试剂盒纯化回收,具体步骤参照试剂盒说明书,用总体积30 μL的水溶解回收DNA(回收产物标记为:rDNA1),检测无误后与载体进行连接。将5~10 μL连接产物转化大肠杆菌感受态转化涂(卡纳霉素)抗性平皿,37℃培养12 h。挑取10个菌斑进行PCR鉴定,菌液扩增体系为25 μL,PCR反应程序同上,检测电泳条带后,取1~3个阳性条带对应的菌液,送至北京擎科生物有限公司(杭州测序部)测序。利用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)数据库,对*EjWRKY15*基因进行蛋白结构域预测。

1.4 *EjWRKY15*基因组织表达

以上述单链cDNA为模板,根据*EjWRKY15*测序获得的ORF序列,设计实时荧光定量RT-PCR引物(qPCR F: 5' - ATGTTTCATCCAACCTCGTCCG-3'; qPCR R: 5' - GCAAGATTAGGCATAGGCG-3')用于qRT-PCR的扩增,以*EjACTIN*^[10](JN004223)作为内参基因(F: 5' - GGATTTGCTGGTGTATGATGC-3'; R: 5' - CCGTGCTCAATGGGATACTT-3'),采用ABI 7900实时荧光定量系统进行基因表达分析。

反应体系为 10 μL : 模板 cDNA 0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 上下游引物分别为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SYBR[®] Premix Ex Taq[™](TaKaRa) 5 μL , ddH₂O 4.1 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。每个样品 3 次生物学重复, 用 Excel 软件对所得 C_p 值进行统计, 相对表达量计算公式为 $2^{-(\text{Ct}_{\text{Target}} - \text{Ct}_{\text{Actin}})}$ [11], 用 SPSS 软件进行方差分析。

1.5 *EjWRKY15* 基因同源比对及进化树构建

利用测序获得的 *EjWRKY15* 基因 ORF 序列, 基于美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库对该基因的氨基酸序列进行全数据库同源序列比对, 然后筛选同源性高的基因, 下载同源序列。利用 MEGA X 软件构建该基因的进化树, 系统进化分析采用邻接法 (Neighbor-Joining), Bootstrap 值为 1 000 次。

1.6 *EjWRKY15* 蛋白特性预测分析

利用 ProtParam 软件 (<http://au.expasy.org/tools/ProtParam.html>) 对 *EjWRKY15* 基因编码蛋白的分子质量、等电点、脂溶性指数、不稳定指数、平均亲水性等理化性质指标进行分析。利用 NetPhos v3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 在线工具对枇杷 *EjWRKY15* 蛋白进行潜在的磷酸化位点预测分析。利用在线 SOPMA 程序 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测枇杷 WRKY 蛋白的二级结构; 利用在线 swiss-model 程序对其三级结构进行预测: (<https://swiss-model.expasy.org/>); 通过 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测该蛋白跨膜区域; 利用在线软件 SignalP 4.1 Server^[12] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 对 *EjWRKY15* 蛋白进行信号肽分析。

1.7 *EjWRKY15* 蛋白亚细胞定位预测与验证分析

利用 Plant-mPLoc v1.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>) 在线生物信息学分析工具预测 *EjWRKY15* 蛋白的亚细胞定位情况。pBWA(V)HS-*EjWRKY15*-G_{Lo}sgfp 载体构建步骤如下: 利用引物枇杷 WRKY15(+): 5'-CAGTGGTCTCACAAACATG-GAGAACTGGGATTGCA-3' 和枇杷 WRKY15(-): 5'-CAGTGGTCTCATACAGCAAGCACCGTTTACAGTAT-3', 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 然后进行凝胶电泳, 得到正确条带。将片段切下, 利用胶回收试剂盒回收正确片段, 利用 T4 连接酶的方式连

接已使用内切酶 *Eco*31 I 酶切后的胶回收片段和烟草瞬时表达系统载体 pBWA(V)HS-ccdb-G_{Lo}sgfp 质粒, 再将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态。随机挑取 10 个单菌落接种于含卡那霉素 (Kan) 的 LB 培养基中, 用检测引物 35S-seq: 5'-TTCATTTG-GAGAGAACACGGGGGAC-3' 和 WRKY15(-): 5'-CAGTGGTCTCATACAGCAAGCACCGTTTACA-GTAT-3' 对每个单菌落进行测序鉴定, 并将菌检正确的菌落测序。将测序结果与已获得的 *EjWRKY15* 的 ORF 序列进行比对, 得到 2 个构建成功的单克隆, 命名为 pBWA(V)HS-*EjWRKY15*-G_{Lo}sgfp。将 pBWA(V)HS-*EjWRKY15*-G_{Lo}sgfp 载体转化农杆菌 GV3101, 以 pBWA(V)HS-G_{Lo}sgfp 空载体为实验对照, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ YEB 培养基中摇培, 离心后用农杆菌渗透液重悬菌体, 最终使 OD₆₀₀ 值达到 0.8, 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗放置 2~3 h。选取长势良好的本氏烟草植株, 将上述菌体悬浮液用 2.5 mL 一次性注射器吸取出来, 从烟草叶片下表皮慢慢注射, 让菌液充满整个烟草叶片, 黑暗培养 48 h 后使用激光共聚焦显微镜 Nikon C2-ER 分别观察烟草叶片中绿色荧光蛋白的表达情况。

2 结果与分析

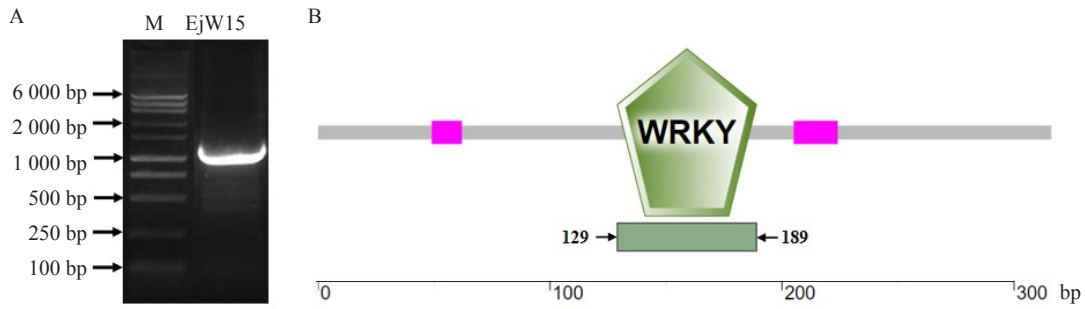
2.1 *EjWRKY15* 基因克隆与同源比对

以枇杷各组织等量混合 cDNA 为模板, 进行 *EjWRKY15* 基因 ORF 的 PCR 扩增 (图 1-A), 测序所得片段为 951 bp。将所得序列与转录组源序列进行同源比对发现, 两者同源度高达 99.97%, 仅有 4 个碱基的 SNP 位点。利用 SMART 其进行结构域分析, 发现该基因具有明显的 WRKY domain 结构域 (图 1-B), 包含 61 个氨基酸。

将测序所得的 *EjWRKY15* 基因序列进行 blastn 比对, 结果显示该序列与苹果 (LOC103426983) 基因序列相似度极高, 达 96.95%, 与白梨 (LOC103935789) 的相似度为 91.9%, 为今后 *EjWRKY15* 进行功能研究提供参考。在 NCBI 数据库选择下载苹果、梨、甜樱桃、草莓等物种的同源 WRKY 氨基酸序列共 9 条, 同所得 *EjWRKY15* 氨基酸序列进行比对分析, 构建系统进化树 (图 2)。

2.2 *EjWRKY15* 基因的表达模式

利用 qRT-PCR 技术对 *EjWRKY15* 基因进行不同组织, 包括根、茎、叶、花和果实的表达模式分析。结果 (图 3) 表明, 该基因在根中相对表达量较高, 果实



A. *EjWRKY15* 基因 ORF 克隆; M. Magic Ruler IV; EjW15. ORF 克隆; B. *EjWRKY15* 基因结构域。
 A. *EjWRKY15* gene ORF clone; M. Magic Ruler IV; EjW15. ORF clone; B. *EjWRKY15* gene domain structure.

图 1 *EjWRKY15* 基因克隆及结构域

Fig. 1 *EjWRKY15* gene clone and domain structure

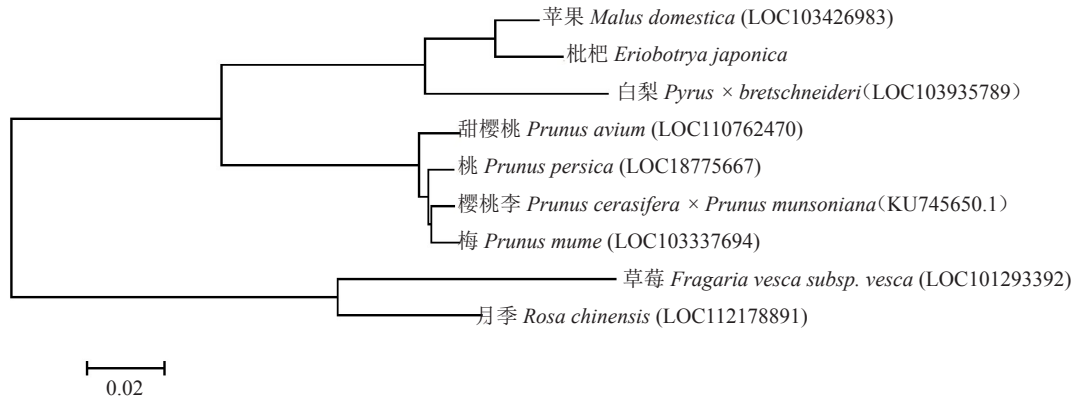


图 2 枇杷 *EjWRKY15* 与其他物种系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of *EjWRKY15* from other species

次之,茎中最低,其表达量由高到低依次为根>果实>花>叶>茎,说明该基因的相对表达水平明显不同,具有组织表达特异性。其中,根中的表达量为茎中的 154 倍,说明 *EjWRKY15* 基因可能参与根组织的

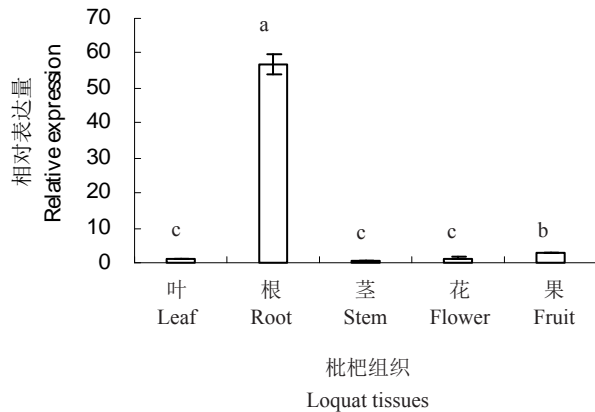


图 3 枇杷 *EjWRKY15* 基因不同组织表达模式

Fig. 3 Expression pattern of *EjWRKY15* gene in different tissues

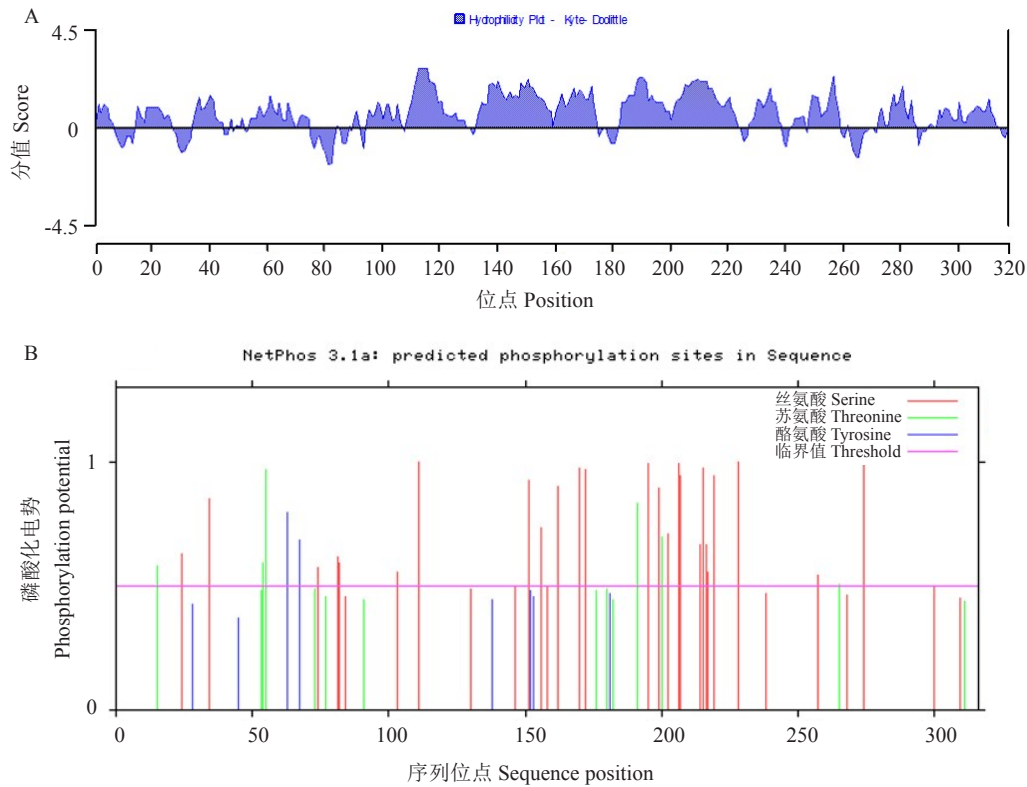
形态建成。

2.3 *EjWRKY15* 蛋白理化性质及磷酸化位点分析

利用 ProtParam 软件对 *EjWRKY15* 蛋白理化性质指标进行分析,其中编码蛋白的分子质量为 35.79 kDa、等电点 5.09、脂溶性指数 56.45、不稳定指数 69.72、平均亲水性-0.598。用 KyteDoolittle 法进行亲疏水性分析发现,该蛋白具有较强的亲水性(图 4-A)。利用 NetPhos 对该蛋白的磷酸化位点进行分析,发现 *WRKY15* 蛋白均具有丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)和酪氨酸(Try)磷酸化位点,且 Ser 的磷酸化位点最多,为 25 个,苏氨酸(Thr)次之(6 个),Try 的磷酸化位点最少,为 2 个(图 4-B)。这些位点对于调控 *EjWRKY15* 蛋白活性可能具有重要作用。

2.4 *EjWRKY15* 蛋白二级结构及三级结构分析

蛋白二级结构预测结果显示,*EjWRKY15* 蛋白的二级结构主要包括 α 螺旋、延伸链、 α 转角和无规则卷曲 4 种类型,主要以 α 螺旋和无规则卷曲为主,比



A. 亲疏水性预测;B. 磷酸化位点预测。

A. Hydrophobic prediction; B. Phosphorylation site prediction.

图 4 EjWRKY15 蛋白亲疏水性及磷酸化位点预测

Fig. 4 Prediction of EjWRKY15 protein hydrophobicity and phosphorylation sites

例分别为 30.70%、56.65%，其次为延伸链 8.27%、 β 转角 4.43%(图 5);EjWRKY15 蛋白的三级结构分析表明,其结构域主要由 4 个 β -折叠组成,依次为 β -折叠 1(WRKYGQK)、 β -折叠 2(RSYYKC)、 β -折叠 3(GVRKHVER)、 β -折叠 4(AVVTTY)(图 6)。

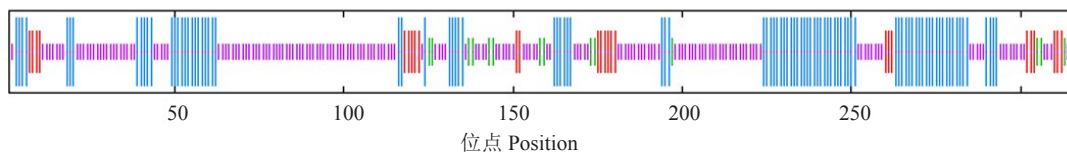
2.5 EjWRKY15 蛋白信号肽及跨膜结构域分析

利用 SignalP 4.1 Server 软件对 EjWRKY15 蛋白的氨基酸序列进行分析,发现 EjWRKY15 蛋白不含信号肽,不属于分泌型蛋白(图 7)。运用 TMHMM 软件对枇杷 EjWRKY15 蛋白跨膜结构进行分析,预

测结果表明该蛋白不含跨膜区域(图 8)。

2.6 EjWRKY15 亚细胞定位预测与验证分析

利用 Plant-mPLoc 网站对 EjWRKY15 进行亚细胞定位预测,结果显示最有可能定位于细胞核中。为了更加准确地定位该蛋白的作用位置,利用烟草瞬时表达系统对其进行亚细胞定位实验验证。将 EjWRKY15 目的基因进行克隆、回收、Eco31 I 酶切后,再利用 T4 连接酶连接烟草瞬时表达系统载体 pBWA(V)HS-ccdb-GLogfp 质粒,获得重组表达载体,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态,进行测

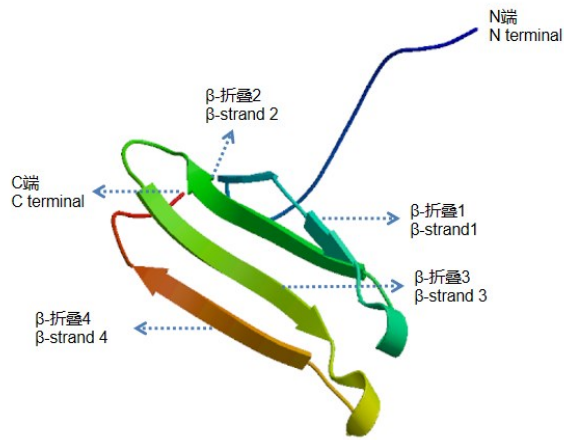


最长竖线 . α -螺旋;第 2 长竖线 . 延伸链;第 3 长竖线 . β -转角;最短竖线 . 无规则卷曲;横向数值 . 氨基酸位置。

The longest vertical bars. α -helix; The second longest vertical bars. Extended strand; The third longest vertical bars. Beta turn; The shortest vertical bars. Random coil; The horizontal numbers. The position of amino acid.

图 5 EjWRKY15 蛋白二级结构预测

Fig. 5 The secondary structure of the EjWRKY15 protein



β-折叠 1. WRKYGQK; β-折叠 2. RSYYKC; β-折叠 3. GVRKHVER; β-折叠 4. AVVTTY。
 β-strand 1. WRKYGQK; β-strand 2. RSYYKC; β-strand 3. GVRKHVER; β-strand 4. AVVTTY.

图 6 *EjWRKY15* 蛋白三维结构预测

Fig. 6 Predicted 3D structure model of the *EjWRKY15* protein

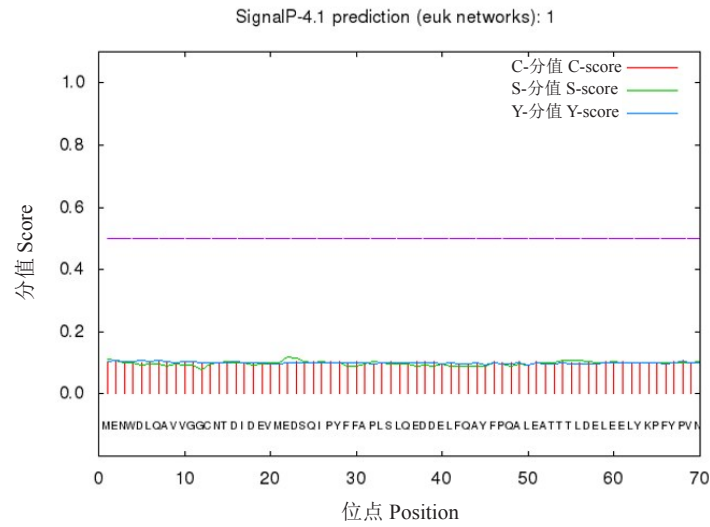


图 7 *EjWRKY15* 蛋白的信号肽预测

Fig. 7 Prediction of *EjWRKY15* protein signal peptide

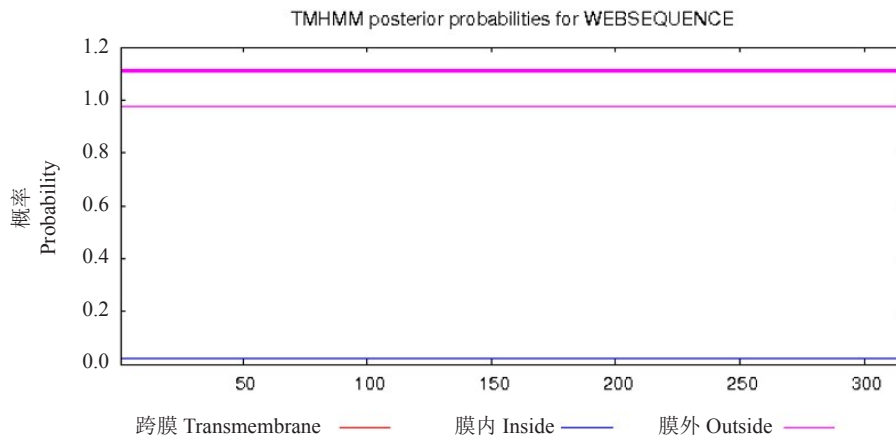
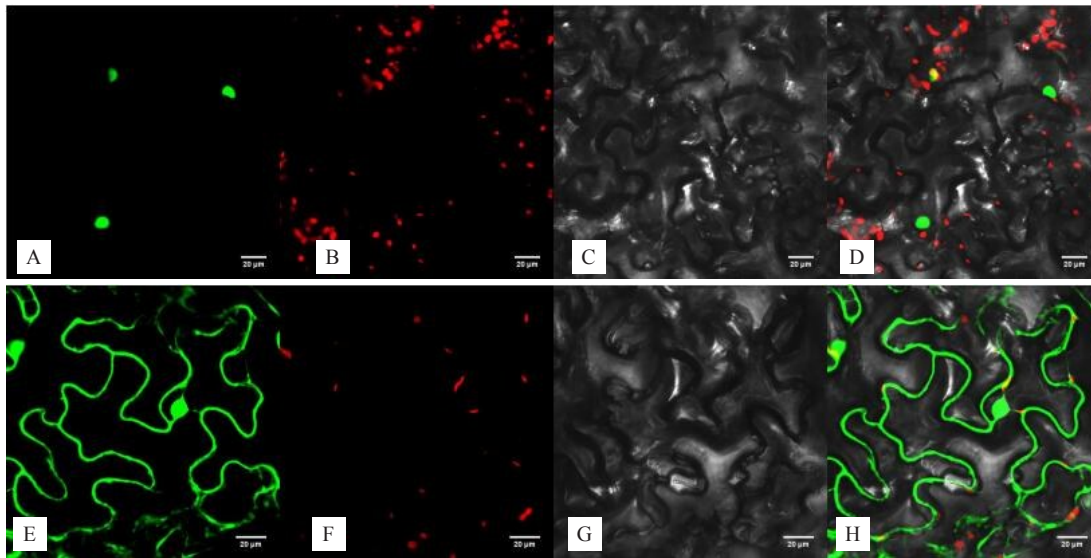


图 8 *EjWRKY15* 蛋白的蛋白跨膜区域分析

Fig. 8 Transmembrane structure of *EjWRKY15* protein in loquat

序鉴定,序列比对后,成功构建 pBWA(V)HS-EjWRKY15-GLosgfp。将 pBWA(V)HS-EjWRKY15-GLosgfp 载体通过电击法转化农杆菌 GV3101,接种本氏烟草叶片中。处理 48 h 后在激光共聚焦显微镜

下观察,结果发现,目的片段融合载体侵染的细胞,只在细胞核上可以观测到绿色荧光信号(图9)。这说明 EjWRKY15 是一个核定位蛋白,这与其作为转录因子的功能特点相符。



A. 目的基因 EjWRKY15 荧光通道; B. 叶绿体荧光通道; C. 明场; D. 叠加图; E. GFP 荧光通道; F. GFP 叶绿体荧光通道; G. GFP 明场; H. GFP 叠加图。

A. Objective gene fluorescence channel of EjWRKY15; B. Chloroplast fluorescence channel; C. White field fluorescence; D. Superposition diagram; E. GFP fluorescence channel; F. GFP chloroplast fluorescence channel; G. GFP bright field; H. GFP superposition diagram.

图9 EjWRKY15 亚细胞定位分析

Fig. 9 Subcellular localization of EjWRKY15

3 讨论

WRKY 转录因子是植物特有的超级基因家族,成员基因数量相对较多^[13]。研究报道指出 WRKY 参与植物生长发育、次生代谢物合成,并通过自身和不同基因的自动调节和交叉调节对生物和非生物胁迫的反应过程进行应激响应^[14-16]。近些年,有关 WRKY 基因参与盐、旱涝、温度等非生物因素的胁迫应答调控功能的研究已在多个物种中得到关注^[17-22]。然而目前针对枇杷 WRKY 基因功能及其在细胞中作用的研究鲜有报道。枇杷是我国南方特有的果树作物之一,其产量和品质在生产中常常受到各种环境因子的影响。前期研究中,笔者对枇杷的 33 个 WRKY 家族基因进行了系统鉴定分析^[2]。研究发现, *EjWRKY15* 基因在日灼逆境中出现高丰度差异表达,说明该基因在调控胁迫响应中起到一定的作用,但是作用机制尚不清楚。因此,笔者对枇杷 *EjWRKY15* 基因克隆及蛋白特性等方面进行了重点研究,为该基因的后续生物学功能研究提供了基础。

3.1 *EjWRKY15* 基因克隆、表达与进化分析

本研究克隆了枇杷 *EjWRKY15* 基因,该基因开放阅读框全长 951 bp,共编码 317 个氨基酸,具有 WRKY 家族典型结构特征,包含 1 个 WRKY 结构域,属于 WRKY 家族成员,这与之前的报道相符^[2]。通过序列比较分析,其与苹果和白梨中的 WRKY 转录因子具有较高的同源度;系统进化树不仅能揭示物种亲缘关系的远近,也能反映基因序列的相似程度,从而推测基因的功能。进化树分析显示, *EjWRKY15* 同蔷薇科植物中的 *MdWRKY* (苹果)、*PbWRKY* (白梨)、*PpWRKY* (桃)、*PaWRKY* (甜樱桃) 等 WRKY 基因表现出较高的相似性,这说明 *EjWRKY15* 可能与这些同源基因发挥类似的功能。虽然目前对以上基因尚未有明确的功能报道,但进一步的具体功能研究将为 *EjWRKY15* 后续研究提供参考。很多研究表明 WRKY 广泛参与植物对逆境的抗性反应,同时调节植物的生长发育过程^[23-25],但是 WRKY 家族中每个基因的功能各异。因此,为了进一步研究其功能,笔者采用荧光定量 PCR 分析了

EjWRKY15 基因的表达特性,结果表明该基因在根中相对表达量较高,果实次之,茎中最低,推测其在根系的形态建成中发挥着重要的作用,也说明该基因在不同组织中的表达具有差异性,这与菊花等植物中的同源 WRKY 的研究结果相一致^[26-29],也说明该基因的功能可能涉及多个方面。

3.2 *EjWRKY15* 蛋白特性分析

通过对 *EjWRKY15* 蛋白序列进行理化特性分析发现,其蛋白分子质量为 35.79 kDa,编码 317 个氨基酸,具有 WRKY 转录因子家族特有的结构域^[2]。*EjWRKY15* 蛋白属于不稳定亲水性蛋白,同时发现该蛋白存在多个丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化修饰位点,说明其可能通过多种位点的磷酸化修饰作用来调控其功能^[30]。有研究表明,三类氨基酸残基磷酸化过程可以改变蛋白的构象和酶的活性,从而影响细胞的生长、发育和凋亡^[31],这可能表明 *EjWRKY15* 翻译后修饰是调控细胞内外信号传导过程的重要方式之一。通过 Plant-mPLOC 软件预测了 *EjWRKY15* 蛋白的亚细胞位置,结果显示其可能位于细胞核中。为了进一步验证预测结果,通过 GFP 荧光定位方法及烟草瞬时表达系统对 *EjWRKY15* 进行亚细胞定位验证,发现其确实位于细胞核中。这与前人研究结果一致^[22,32]。作为一种转录调节因子,*EjWRKY15* 可能在细胞核中通过与启动子区域结合而激活下游目的基因的表达,进而调控枇杷果实的生物和非生物胁迫耐受性。另外,*EjWRKY15* 蛋白不存在跨膜结构,说明其不是跨膜蛋白,同时不存在信号肽序列,表明该蛋白不属于分泌型蛋白,能在细胞内起作用,这与亚细胞定位预测结果一致。

4 结 论

本研究首次克隆了枇杷 *EjWRKY15* 基因,并对其进行了不同物种间同源进化及不同组织表达特性分析,在此基础上分析了 *EjWRKY15* 蛋白的亲/疏水性、磷酸化位点、二级结构及三级结构特征、信号肽和跨膜结构域。同时,进行亚细胞定位预测与验证分析,为更深入研究该基因的功能提供参考依据。

参考文献 References:

- [1] 邱武陵,章恢志. 中国果树志-龙眼枇杷卷[M]. 北京:中国林业出版社,1994: 91-92.

- QIU Wuling, ZHANG Huizhi. China Fruit Records: Longan and loquat [M]. Beijing: China Forestry Press, 1994: 91-92.
- [2] 李晓颖,徐红霞,陈俊伟. 枇杷 WRKY 转录因子鉴定与表达分析[J]. 园艺学报,2019,46(5): 939-954.
- LI Xiaoying, XU Hongxia, CHEN Junwei. Identification and expression analysis of WRKY transcription factors in *Eriobotrya japonica*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(5): 939-954.
- [3] JIANG W, YU D. *Arabidopsis* WRKY2 transcription factor mediates seed germination and postgermination arrest of development by abscisic acid[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9: 96.
- [4] CHEN J, NOLAN T M, YE H, ZHANG M, TONG H, XIN P, CHU J, CHU C, LI Z, YIN Y. *Arabidopsis* WRKY46, WRKY54 and WRKY70 transcription factors are involved in brassinosteroid-regulated plant growth and drought responses[J]. The Plant Cell, 2017, 29(6): 1425-1439.
- [5] ROMERO I, ALEGRIA-CARRASCO E, GONZALEZ DE PRADENA A, VAZQUEZ-HERNANDEZ M, ESCRIBANO M, MERODIO C, SANCHEZ-BALLESTA M T. WRKY transcription factors in the response of table grapes (cv. Autumn Royal) to high CO₂ levels and low temperature[J]. Postharvest Biology and Technology, 2019, 150: 42-51.
- [6] CHAKRABORTY J, GHOSH P, SEN S, NANDI A K, DAS S. CAMPK9 increases the stability of CaWRKY40 transcription factor which triggers defense response in chickpea upon *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* Race1 infection[J]. Plant Molecular Biology, 2019, 100(3): 411-431.
- [7] LUO D L, BA L J, SHAN W, KUANG J F, LU W J, CHEN J Y. Involvement of WRKY transcription factors in abscisic-acid-induced cold tolerance of banana fruit[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(18): 3627-3635.
- [8] OHAMA N, SATO H, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory network of plant heat stress response[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(1): 53-65.
- [9] SCHLUTTENHOFER C, YUAN L. Regulation of specialized-metabolism by WRKY transcription factors[J]. Plant Physiology, 2014, 167(2): 295-306.
- [10] 徐红霞,李晓颖,陈俊伟,冯健君,徐昌杰. 枇杷 7 个脱水素基因表达差异分析[J]. 园艺学报,2014,41(8): 1554-1562.
- XU Hongxia, LI Xiaoying, CHEN Junwei, FENG Jianjun, XU Changjie. Expression analysis of seven dehydrin genes in loquat [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(8): 1554-1562.
- [11] FENG C, CHEN M, XU C J, BAI L, YIN X R, LI X, ALLAN A C, FERGUSON L B, CHEN K S. Transcriptomic analysis of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit development and ripening using RNA-Seq[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 19.
- [12] PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, NIELSEN H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions[J]. Nature Methods, 2011, 8: 785-786.
- [13] AGARWAL P, REDDY M P, CHIKARA J. WRKY: its structure, evolutionary relationship, DNA-binding selectivity, role in stress tolerance and development of plants[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(6): 3883-3896.
- [14] BAKSHI M, OELMÜLLER R. WRKY transcription factors: Jack of many trades in plants[J]. Plant Signaling & Behavior,

- 2014,9(2): e27700.
- [15] PHUKAN U J, JEENA G S, SHUKLA R K. WRKY transcription factors: molecular regulation and stress responses in plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1-14.
- [16] JIANG J, MA S, YE N, JIANG M, CAO J, ZHANG J. WRKY transcription factors in plant responses to stresses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2017, 59(2): 86-101.
- [17] MENG D, LI Y, BAI Y, LI M, CHENG L. Genome-wide identification and characterization of WRKY transcriptional factor family in apple and analysis of their responses to waterlogging and drought stress[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 103: 71-83.
- [18] LIANG Q Y, WU Y H, WANG K, BAI Z Y, LIU Q L, PAN Y Z, ZHANG L, JIANG B. Chrysanthemum WRKY gene Dg-WRKY5 enhances tolerance to salt stress in transgenic chrysanthemum[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4799.
- [19] 张惠媛, 刘永伟, 杨军峰, 张双喜, 于太飞, 陈隽, 陈明, 周永斌, 马有志, 徐兆师, 付金东. 小麦转录因子基因 TaWRKY33 的耐盐性分析[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(24): 4591-4602.
- ZHANG Huiyuan, LIU Yongwei, YANG Junfeng, ZHANG Shuangxi, YU Taifei, CHEN Jun, CHEN Ming, ZHOU Yongbin, MA Youzhi, XU Zhaoshi, FU Jindong. Identification and analysis of salt tolerance of wheat transcription factor TaWRKY33 protein[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(24): 4591-4602.
- [20] BANKAJIA I, SLEIMIA N, VIVES-PERISB V, GÓMEZ-CADENASB A, PÉREZ-CLEMENTEB R M. Identification and expression of the *Cucurbita* WRKY transcription factors in response to water deficit and salt stress[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 256: 108562.
- [21] HAN D, HOU Y, WANG Y, NI B, LI Z, YANG G. Overexpression of a *Malus baccata* WRKY transcription factor gene (MbWRKY5) increases drought and salt tolerance in transgenic tobacco[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2019, 99(2): 173-183.
- [22] 赵杨迪. 园林菊花 CmWRKY13 基因的克隆及表达分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(15): 4922-4927.
- ZHAO Yangdi. Cloning and expression analysis of CmWRKY13 gene in *Chrysanthemum morifolium*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(15): 4922-4927.
- [23] GUO R R, QIAO H B, ZHAO J, WANG X H, TU M X, GUO C L, WAN R, LI Z, WANG X P. The grape VIWRKY3 gene promotes abiotic and biotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 545.
- [24] 耿宏叶, 荆永琳, 李志英, 雷明, 徐立, 邹华文. 菠萝 AcWRKY71-like 基因的分离与克隆分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(5): 1473-1478.
- GENG Hongye, JING Yonglin, LI Zhiying, LEI Ming, XU Li, ZOU Huawen. Isolation and cloning analysis of AcWRKY71-like gene from Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.)[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(5): 1473-1478.
- [25] 杨柳慧, 尹航, 黄沁梅, 张彦妮, 何淼, 周蕴薇. 细叶百合 LpWRKY20 基因对非生物胁迫的响应及抗旱性分析[J]. *草业学报*, 2020, 29(1): 193-202.
- YANG Liuhui, YIN Hang, HUANG Qinmei, ZHANG Yanni, HE Miao, ZHOU Yunwei. An analysis of the response of the Lp-WRKY20 gene to abiotic stress and its role in drought resistance [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2020, 29(1): 193-202.
- [26] 赖瑞联, 冯新, 程春振, 陈瑾, 陈义挺, 吴如健. 橄榄 WRKY 转录因子的克隆及其在低温胁迫下的表达分析[J]. *果树学报* 2018, 35(12): 1455-1466.
- LAI Ruilian, FENG Xin, CHENG Chunzhen, CHEN Jin, CHEN Yiting, WU Rujian. Cloning of WRKY transcription factors and their expression analysis under low temperature stress in *Canarium album* (Lour.) Raeusch[J]. *Journal of Fruit Science*, 2018, 35(12): 1455-1466.
- [27] 肖牧, 何乐, 刘春林, 阮颖. 白菜 WRKY 转录因子家族的聚类及其表达模式分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(23): 7676-7682.
- XIAO Mu, HE Le, LIU Chunlin, RUAN Ying. Phylogenetic analysis of WRKY transcription factor family of *Brassica rapa* and investigation into their expression patterns[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(23): 7676-7682.
- [28] 王鹏杰, 岳川, 陈笛, 郑玉成, 郑知临, 林滢, 杨江帆, 叶乃兴. 茶树 CsWRKY6、CsWRKY31 和 CsWRKY48 基因的分离及表达分析[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2019, 45(1): 30-38.
- WANG Pengjie, YUE Chuan, CHEN Di, ZHENG Yucheng, ZHENG Zhilin, LIN Yi, YANG Jiangfan, YE Naixing. Isolation and expression analysis of CsWRKY6, CsWRKY31 and CsWRKY48 genes in tea plant[J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2019, 45(1): 30-38.
- [29] 居萍, 李丽, 俞莉莉, 李良俊. 菊花 CmWRKY4 基因克隆及表达分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(1): 29-32.
- JU Ping, LI Li, YU Lili, LI Liangjun. Cloning and expression analysis of CmWRKY4 gene in *Chrysanthemum*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(1): 29-32.
- [30] 司爱君, 余渝, 陈红, 田琴. 棉花逆境应答 GhWRKY2 基因的结构与功能预测[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(2): 222-230.
- SI Aijun, YU Yu, CHEN Hong, TIAN Qin. Functional prediction of stress response GhWRKY2 gene in cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(2): 222-230.
- [31] 杨乐, 齐妍, 刘生祥, 张双喜, 李连城, 陈明, 徐兆师, 马有志. 植物抗逆相关蛋白激酶的结构与功能[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4): 659-667.
- YANG Le, QI Yan, LIU Shengxiang, ZHANG Shuangxi, LI Liancheng, CHEN Ming, XU Zhaoshi, MA Youzhi. Structure and function of stress-related protein kinases in plants[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(4): 659-667.
- [32] 苏梦雨, 慈志娟, 王楠, 房鸿成, 姜生辉, 岳璇璇, 陈学森. 苹果 MdWRKY35 基因克隆与表达分析[J]. *植物生理学报*, 2019, 55(3): 319-328.
- SU Mengyu, CI Zhijuan, WANG Nan, FANG Hongcheng, JIANG Shenghui, YUE Xuanxuan, CHEN Xuesen. Cloning and expression analysis of MdWRKY35 gene in apple[J]. *Plant Physiology Journal*, 2019, 55(3): 319-328.