

烟草 *WRKY8* 基因的克隆与表达分析

梅花^{1,2}, 杨辉^{1,2}, 田云^{1*}, 卢向阳^{1,2*}

(1.湖南省农业生物工程研究所, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 利用数据库资源和 RT-PCR 技术获得烟草 *WRKY8* 基因, 序列分析表明, 该基因包含 1 551 bp 的开放阅读框, 编码 516 个氨基酸。基因编码的蛋白含有 2 个 WRKY 结构域, 其锌指结构类型为 $C_2H_2(C-X_{4-5}-C-X_{22-23}-H-X_1-H)$ 。推测其可能定位于细胞核并具有复制转录及调控的功能, 从而参与对植物生长发育和胁迫应答的调节。RT-PCR 结果表明, *NtWRKY8* 基因受低温诱导表达。

关 键 词: 烟草; *WRKY8* 基因; 克隆; 序列分析; 低温处理

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)03-0256-06

Cloning and expression analysis of *WRKY8* gene in *Nicotiana tabacum*

MEI Hua^{1,2}, YANG Hui^{1,2}, TIAN Yun^{1*}, LU Xiang-yang^{1,2*}

(1.Hunan Agricultural Bioengineering Research Institute, Changsha 410128, China; 2.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In this paper, the *NtWRKY8* gene was cloned from *Nicotiana tabacum* L. based on the database resources and RT-PCR technology. Sequence analysis showed that *NtWRKY8* gene contained a complete ORF, which was 1 551 bp and encoded a protein of 516 amino acid residues. The *WRKY8* protein had two conserved *WRKY* domains, and the zinc-finger structure was $C_2H_2(C-X_{4-5}-C-X_{22-23}-H-X_1-H)$. Functional analysis indicated that this protein was probably located in the nucleus and had functions in replication, transcription and regulatory, and consequently could regulate the growth, development and response to stress in plants. The RT-PCR experiment showed that the relative expression of *NtWRKY8* gene was induced under low-temperature treatment.

Key words: *Nicotiana tabacum* L.; *WRKY8* gene; cloning; sequence analysis; low-temperature treatment

植物转录调节因子 WRKY 基因家族因其在 N-端含有由 WRKYGQK 组成的高度保守的氨基酸序列而得名。根据 WRKY 结构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^[1]: 第 I 类包含 2 个 WRKY 结构域, 锌指结构为 $C_2H_2(C-X_{4-5}-C-X_{22-23}-H-X_1-H)$; 第 II 类含有 1 个 WRKY 结构域, 其锌指结构也为 C_2H_2 ; 第 III 类含有 2 个 WRKY 结构域, 但锌指结构为 $C_2HC(C-X_7-C-X_{23}-H-X_1-C)$ 。首个 WRKY 转录因子由 Ishiguro 等^[2]于 1994 年从白薯中克隆得到, 随后从拟南芥、

水稻、大麦、大豆、黄瓜和香蕉等植物中被相继分离^[3-6]。研究表明, WRKY 转录因子能够与 TTGACC/T 序列(W 盒)发生特异性结合, 调节启动子中含 W 盒元件的调节基因的表达, 从而参与多种生物及非生物逆境激发的应激反应^[7], 其中, Zn^{2+} 等金属离子的参与和磷酸化作用等利于 WRKY 转录因子与 W 盒的结合^[8]。有关烟草中 WRKY 转录因子的研究表明, 烟草 WRKY 也不同程度地参与虫害、TMV 等^[9-10]生物胁迫与创伤、干旱、SA 等^[11-14]非生物胁迫应答反应。笔者采用电子克隆的方法,

收稿日期: 2012-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871336, 31000536); 中国博士后科学基金项目(2011M500963); 湖南省自然科学基金重点项目(09JJ3043); 湖南省博士后科研专项(2011RS4009); 湖南省教育厅重点项目(09A038); 湖南省优秀博士学位论文获奖作者科研项目

作者简介: 梅花(1987—), 女, 四川资阳人, 硕士研究生, 主要从事植物生物化学与分子生物学研究, meihua920@163.com; *通信作者, tianyun79616@163.com, xiangyangcn@163.com

获得烟草 *WRKY8* 的全长序列,利用生物信息学软件对其所编码的蛋白质的性质、结构及功能进行了预测,并对其在低温诱导下的基因表达进行了研究,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

烟草品种 NC89、大肠杆菌 DH5 α 等为湖南省农业生物工程研究所保存;LA *Taq* HS DNA 聚合酶、dNTP、DNA marker、pMD18-T 载体等购自 TaKaRa 公司;DNA 纯化回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;TRIZOL 试剂、M-MLV 反转录酶等购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 烟草 *WRKY8* 基因的电子克隆

以马铃薯 *StWRKY8* 序列(NCBI 登录号:AB445390)为靶序列,BLAST 比对烟草的 EST 序列数据库,获得高同源性的 EST 序列,利用 DNAMAN 软件进行序列的拼接组装。以拼接好的序列为靶序列,进行烟草 EST 序列数据库的比对、拼接、组装,不断重复以上过程,直至没有更多的重叠 EST 序列被 BLAST 比对出来。

1.2.2 烟草 RNA 的提取和 cDNA 的合成

烟草种子置于人工气候培养箱(27℃,光照 14 h,黑暗 10 h)培养约 30 d。按照 TRIZOL 试剂说明书提取烟草叶片 RNA,用 DNase 在 37℃ 条件下消化 30 min,反转录为 cDNA。反转录的反应体系为 20 μ L:RNA 8 μ L, Oligo dT(0.5 μ g/mL) 1 μ L, dNTPs(10 mmol/L) 1 μ L, DEPC 水 3 μ L, 65℃ 变性 5 min,迅速在冰上冷却 1 min,稍微离心,加入 5 \times First-Strand Buffer 4 μ L, DTT(0.1 mol/L) 1 μ L, RNaSin 1 μ L, M-MLV(200 U/ μ L) 1 μ L。反应条件:37℃ 反应 50 min, 70℃ 处理 15 min。反转录产物在-20℃ 保存备用。

1.2.3 目的基因的克隆及测序

利用 DNAMAN 设计引物 WRKY8-F:TCATCC ACTCCCACAAAG 和 WRKY8-R:TCAGCAGAGC AATGTCTCCATA,利用 LA *Taq* HS DNA 聚合酶进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μ L:10 \times LA *Taq*

PCR Buffer 2 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 4 μ L, LA *Taq* HS (5 U/ μ L) 0.2 μ L, cDNA 1 μ L, WRKY12-F(10 μ mol/L) 0.5 μ L, WRKY12-R(10 μ mol/L) 0.5 μ L, ddH₂O 11.8 μ L。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 15 min, 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物利用回收试剂盒回收,回收产物与 pMD18-T 载体进行连接,获得的阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.4 序列分析

运用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLAST 比对和基因编码区的预测;利用 DNAMAN 构建进化树;利用 ProtParam 工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析 NtWRKY8 的理化性质;使用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对 NtWRKY8 蛋白进行跨膜区分析;使用 PROSITE 数据库(<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>)进行结构域及翻译后修饰位点的预测;使用 PORTER 服务器(<http://distill.ucd.ie/porter/>)和 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)分别预测 NtWRKY8 蛋白的二级结构和三级结构;利用 PSORT II(<http://psort.hgc.jp/form2.html>)对亚细胞定位进行预测;利用 ProtFun2.2(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)进行蛋白质生物学功能的预测。

1.2.5 NtWRKY8 的低温表达特异性分析

将生长 30 d 左右的烟草置于 4℃ 低温冰箱中处理 0、4、6、8 h 后,取样,并液氮速冻,-80℃ 保存备用。提取 RNA,并反转录成 cDNA。以 *Actin* (EU938079)作为内参,引物为 NtActin-F:GCAGAC GGTGAGGATATTC 和 NtActin-R:GCGACATACA TAGCAGGAG,对 NtWRKY8 低温诱导后的表达特异性进行分析。

2 结果与分析

2.1 NtWRKY8 基因的克隆

通过 BLAST 比对烟草 EST 数据库,获得 16 条 EST 序列,经序列拼接、组装,获得 *WRKY8* 基因的电子克隆序列,并进一步利用 RT-PCR 进行验

证。经测序并 BLAST 比对后, 确定获得 *NtWRKY8* 的全长基因, 开放阅读框的预测表明其编码区含 1 551 bp, 编码 516 个氨基酸, 其 mRNA 序列已提交 GenBank 数据库, 登录号为 JN997404。利用 PROSITE 对其编码的蛋白质进行保守结构域搜索,

结果如图 1 所示, *NtWRKY8* 含有 2 个保守 WRKY 结构域, 分别位于 201~265、360~425 位氨基酸, 且其锌指结构为 $C_2H_2(C-X_{4-5}-C-X_{22-23}-H-X_1-H)$, 属于第 I 类 WRKY 转录因子。

```

1  ATGGCAGCTTCTTCAACAATCATAGACACCTCCTCTATGCAGAATCAAGTTTCTCTTTTCCAACATCTTCT
1  M A A S S T I I D T S S M Q N S S F S F P T S S
73  TCTTCATTCATGACTTCTTCACTGATCTTCTGCTTGATGATTATCCAACAAAGAGCAAAGGACTT
25  S S F M T S S F T D L L A C D D Y P T K S K G L
145  GGTGATAGGATTGCAGAGAGGAGTGGTGTGGAGTTCCCAAGTTTAAGTCACTTCCACCACCTTCACTACCC
49  G D R I A E R S G C G V P K F K S L P P P S L P
217  CTTTCTCCTCCTCTTTTCTCCTCTTACTTTGCTATTCTCCTGGCTTAAGCCCTACTGAECTCTTG
73  L S P P P F S P S S Y F A I P P G L S P T E L L
289  GACTCCCTGTTCTTTGTCTGCTTCCAACATTCTCCATCTCCAACAACAGGGACATTCCAGCTCAGGCT
97  D S P V L L S A S N I L P S P T T G T F P A Q A
361  TTAACTGGAAGAGCAGTACCAATAGCCGCCATCAGGGTGTCAAACAGGAAGACAAAACTACTCTGATTTC
121  F N W K S S T N S R H Q G V K Q E D K N Y S D F
433  TCTTCCAGCCTCAATTGTCATCAGTCTCTCCGTCCCAAACTAATCCTGTCCATTGGGGAAACAATCATGG
145  S F Q P Q F A S V S P S Q T N P V P L G K Q S W
505  AATTATCAAGAATCAAGAAAGCAGAATGATGAAAATGCTAATGGAACAAGTGAATTGCAGAGCTTAAAAAT
169  N Y Q E S R K Q N D E N A N G T S E L Q S L K N
577  AATGCCAGAGCAACCAATATAACAAGCAATCATCAAGATCAGAAGATGGGTACAATTGGAGGAAATATGGG
193  N G Q S N Q Y N K Q S S R S E D G Y N W R K Y G
649  CAGAAACAAGTGAAGGTAGTGAATAACAAGAAGTTACTATAAATGTACTTTCCCAAATTGTCCCAAAAG
217  Q K Q V K G S E N P R S Y Y K C T F P N C P T K
721  AAAAAAGTAGAGAGGTGTTAGATGGGCAAATTACTGAAATGTGTACAAGGGTAATCACACCATCCAAAG
241  K K V E R C L D G Q I T E I V Y K G N H N H P K
793  CCGACTCAGTCTACTAGGAGATCCTCCTTTAGCCATCCAACCTTACAATACAAAATAATGAAATCCCA
265  P T Q S T R R S S S L A I Q P Y N T Q T N E I P
865  GATCATCAGTCAACACCTGAGAATTCGTCCATTTCATTGGGGATGATGATCATGAGAAGAGTAGTCAAGA
289  D H Q S T P E N S S I S F G D D D H E K S R S R
937  GGAGATGATTTCGATGAAGAAGAAGAACAGACTCAAAAGAACCAGACCCAAAAAGATGGAAAAGAGAAAGC
313  G D D F D E E E E P D S K E P D P K R W K R E S
1009  GAAAGTGAAGGTTATCAGCACCAGGAAGCAGAACAGTAAGAGAACCTAGAGTTGTAGTTCAAACACTACAAGT
337  E S E G L S A P G S R T V R E P R V V V Q T T S
1081  GATATTGATATTCTAGATGATGATATAGATGGAGGAAGTATGGTCAAAGAGTAGTCAAAGGAGATCCTAAT
361  D I D I L D D G Y R W R K Y G Q R V V K G D P N
1153  CCAAGGAGCTACTACAAATGCACAAGTCCAGGATGTCCAGTAAGAAAACATGTGGAACGAGCATCACAAGAC
385  P R S Y Y K C T S P G C P V R K H V E R A S Q D
1225  ATAAGATCAGTGATAACAACCTATGAAGGAAAACACAACCAGATGTTCCAGCAGCTAGGGGAGTGCCATC
409  I R S V I T T Y E G K H N H D V P A A R G S A I
1297  AACCACCTGTGCGACCAACCATTACTTACAACAATGCCATCCCATAAGGCCTTCTGTCACATCTCAAATT
433  N R P V A P T I T Y N N A I P I R P S V T S Q I
1369  CCATTGCCACAACAATCTCCCTTTACACTAGAGATGTTACACAAGCCTAGTAATTATAATGGTTTCTCAGGA
457  P L P Q Q S P F T L E M L H K P S N Y N G F S G
1441  TATGCAACTTCAGAGGATTCATATGAAAACCAACTTCAGGACAATAATGTGTTTCCCGAGCAAAGGACGAG
481  Y A T S E D S Y E N Q L Q D N N V F S R A K D E
1513  CCTCGAGATGACATGTTTATGGAGACATTGCTCTGCTGA
505  P R D D M F M E T L L C *

```

下划线为 WRKY 结构域; 阴影为保守序列(WRKYGQK)及锌指结构。

图 1 *NtWRKY8* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequences and coded amino acid sequences of *NtWRKY8* gene

2.2 NtWRKY8 与同源蛋白的进化分析

借助 DNAMAN 软件，将 NtWRKY8 蛋白分别与水稻、小麦、玉米、大豆、拟南芥、烟草、黄瓜、甜椒和甘蓝型油菜等植物的 WRKY 蛋白构建进化树，结果如图 2 所示。发现 NtWRKY8 与 NtWRKY1 (BAA82107.1)、NtWRKY2 (BAA77383.1)一样，与甜椒的亲缘性较高，其次是大豆、黄瓜、拟南芥和

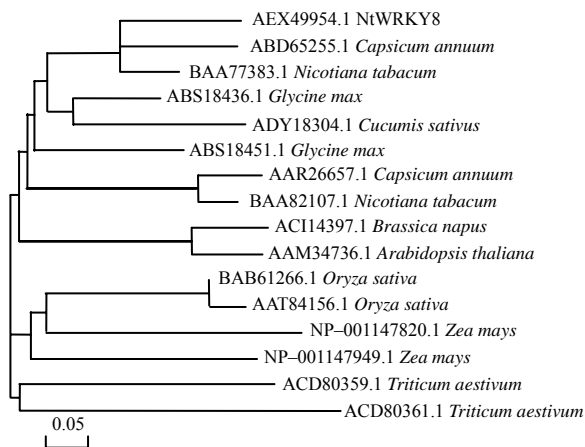


图 2 植物中 WRKY 蛋白的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic analysis of WRKY in plants

甘蓝型油菜，与单子叶植物中的水稻、小麦和玉米的 WRKY 蛋白的亲缘性较低。

2.3 NtWRKY8 的理化性质

利用 ProtParam 对 NtWRKY8 的理化性质进行分析，NtWRKY8 的相对分子质量约为 57 600，理论等电点 *pI* 为 6.77，总共包括 7 917 个原子，分子式为 C₂₄₉₉H₃₈₆₀N₇₁₈O₈₂₆S₁₄；在组成 NtWRKY8 的 20 种氨基酸中，丝氨酸(Ser)所占比例最高，达 14.1%，而色氨酸(Trp)所占比例最低，为 1.0%；NtWRKY8 的不稳定指数为 70.80，脂肪指数为 48.93，属于不稳定蛋白。

利用 PROSITE 数据库对 NtWRKY8 潜在的修饰位点的保守序列进行预测，结果如表 1 所示。NtWRKY8 中含有潜在的 N-糖基化位点 4 个，酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 13 个，蛋白激酶 C 磷酸化位点 7 个，依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点 2 个，N-豆蔻酰化位点 3 个。说明 NtWRKY8 可能存在多种蛋白质翻译后修饰作用，从而实现对自身转录激活及信号传导等的调控。

表 1 NtWRKY8 蛋白潜在修饰位点的预测结果

Table 1 The prediction of modified sites of NtWRKY8

修饰位点	保守序列	氨基酸位置	氨基酸序列
N-糖基化位点	N-{P}-[ST]-{P}	15~18	NSSF
		140~143	NYSD
		182~185	NGTS
		296~299	NSSI
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点	[ST]-X(2)-[DE]	6~9	TIID
		31~34	SFTD
		91~94	SPTE
		204~207	SRSE
		292~295	STPE
		300~303	SFGD
		311~314	SRGD
		336~339	SESE
		348~351	TVRE
		358~361	TTSD
		360~363	SDID
		414~417	TTYE
		483~486	TSED
蛋白激酶 C 磷酸化位点	[ST]-X-[RK]	173~175	SRK
		189~191	SLK
		203~205	SSR
		239~241	TKK
		268~270	STR
		269~271	TRR
		348~350	TVR
		333~336	KRES
依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点	[RK](2)-X-[ST]	270~273	RRSS
		333~336	KRES
N-豆蔻酰化位点	G-{EDRKHPFYW}-X(2)-[STAGCN]-{P}	89~94	GLSPTE
		114~119	GTFFAQ
		429~434	GSAINR

2.4 NtWRKY8 的疏水性及跨膜区分析

利用 ProtScale 程序进行 NtWRKY8 的疏水性分析, 结果如图 3 所示。分值越高, 其疏水性越强, 分值越低, 其亲水性越强。就整体来看, 大部分氨基酸均表现为极强的亲水性, 分值整体偏向负值,

表明 NtWRKY8 为亲水性蛋白。使用 TMHMM 进行跨膜结构的预测, 结果表明, NtWRKY8 的 1~516 位氨基酸均位于细胞膜表面, 无跨膜结构域, 与疏水性分析结果一致。

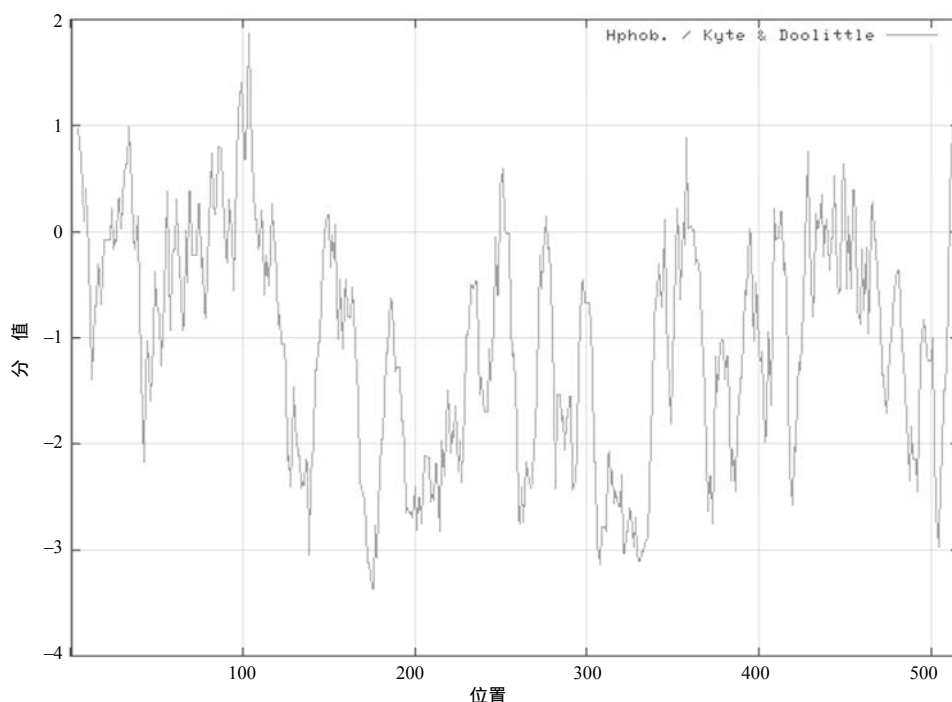


图 3 NtWRKY8 蛋白的疏水性

Fig.3 The analysis of ehydrophobicity of NtWRKY8

2.5 NtWRKY8 蛋白的结构预测

利用 PORTER 对 NtWRKY8 的二级结构进行分析, 结果表明, 其二级结构组分中主要为无规则卷曲结构, H(螺旋)约占 3.29%, E(β 折叠)约占 11.24%。通过基于同源建模的分析工具 SWISS-MODEL 对 NtWRKY8 的三级结构进行预测, 由于 NtWRKY8 中的 204~265、364~426 位氨基酸与 WRKY 超家族有较高的同源性, 软件自动选择 PDB 数据库中的 1wj2A(Solution structure of the C-terminal WRKY domain of AtWRKY)(53.97%)和 2lexA(Complex of the C-terminal WRKY domain of AtWRKY4 and a W-B)(79.37%)为模板, 对 NtWRKY8 的 204~265、364~426 位氨基酸进行建模, 结果如图 4 所示, 表明 NtWRKY8 结构简单, 仅含少量 折叠结构, 与二级结构预测结果相符。



图 4 NtWRKY8 蛋白三级结构的预测结果

Fig.4 The prediction of the third structure of NtWRKY8

2.6 NtWRKY8 蛋白的功能预测

运用 PSORT II 对 NtWRKY8 的亚细胞定位进

行预测, 结果发现, NtWRKY8 在细胞中的定位可能性依次为: 细胞核 56.5%、线粒体 21.7%、细胞质 13.0%、分泌系统 4.3%和细胞骨架 4.3%, 因此推测该蛋白定位于细胞核内。进一步利用 ProtFun 2.2 对其生物学功能进行预测, 显示 NtWRKY8 具有复制与转录, 调控功能的可能性比较大, 分别为 35.6% 和 23.8%, 符合转录调节因子的特点。

2.7 NtWRKY8 的低温表达特异性分析

利用 RT-PCR 分析 NtWRKY8 在低温诱导下的表达情况, 结果如图 5 所示。处理 4 h 时其表达量明显增加, 在处理 6、8 h 后, 其表达量没有明显变化, 说明 NtWRKY8 在低温诱导的早期响应这一生理过程。

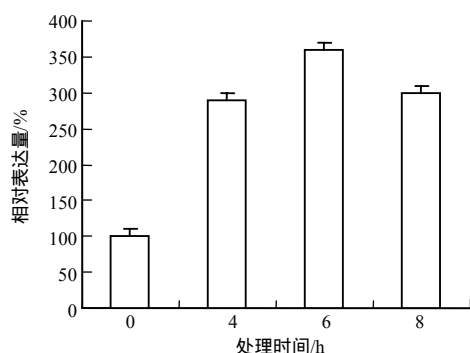


图 5 NtWRKY8 在低温诱导下的表达

Fig.5 The expression of NtWRKY8 under the low-temperature treatment

参考文献:

- [1] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcriptional factors[J]. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 199–206.
- [2] 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 β -amylase from sweet potato[J]. Mol Gen Genet, 1994, 244(6): 563–571.
- [3] 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 Research, 2005, 12(1): 9–26.
- [4] Ling J, Jiang W J, Zhang Y, et al. Genome-wide analysis of WRKY gene family in *Cucumis sativus*[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 471.
- [5] Shekhawat U K S, Ganapathi T R, Srinivas L. Cloning and characterization of a novel stress-responsive WRKY transcription factor gene (MusaWRKY71) from *Musa* spp. cv. Karibale Monthan (ABB group) using transformed banana cells[J]. Mol Biol Rep, 2011, 38: 4023–4035.
- [6] Proietti S, Bertini L, Tucci M, et al. Cross activity of orthologous WRKY transcription factors in wheat and *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(6): 1975–1990.
- [7] Rushton P J, Bokowiec M T, Han S, et al. Tobacco transcription factors: Novel insights into transcriptional regulation in the *Solanaceae*[J]. Plant Physiol, 2008, 147(1): 280–295.
- [8] Duan M R, Nan J, Liang Y H, et al. DNA binding mechanism revealed by high resolution crystal structure of *Arabidopsis thaliana* WRKY1 protein[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(4): 1145–1154.
- [9] Skibbe M, Qu N, Galis I, et al. Induced plant defenses in the natural environment: *Nicotiana attenuata* WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory[J]. Plant Cell, 2008, 20(7): 1984–2000.
- [10] Yoda H, Ogawa M, Yamaguchi Y, et al. 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[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 267(2): 154–161.
- [11] 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(1): 30–37.
- [12] Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(53): 55355–55361.
- [13] Rizhsky L, Liang H, Mittler R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco[J]. Plant Physiology, 2002, 130(3): 1143–1151.
- [14] Chen C H, Chen Z X. Isolation and characterization of two pathogen and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco[J]. Plant Mol Biol, 2000, 42: 387–396.

责任编辑: 罗慧敏