

茅苍术转录因子 *AIWRKY65* 的克隆与功能初探

管凤雅¹, 刘巍玮¹, 迟凯文¹, 曾凯玲¹, 谢晋^{2*}, 查良平^{1*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽医科大学药学院, 安徽 合肥 230032)

摘要: WRKY 转录因子是植物特有的一类转录因子, 在植物多种生理过程中发挥重要的作用。本研究以茅苍术转录组数据为依据, 对茅苍术 *AIWRKY* 基因与 *AITPS* 基因的 FPKM 值进行相关性分析, 结合分析结果筛选出与 *AITPS1*、*AITPS6* 基因表达量具有显著正相关性且 FPKM 值相对较高的候选基因 *AIWRKY65*, 对该候选基因进行克隆, 获得 *AIWRKY65* 基因的开放阅读框 (ORF), 分析其编码蛋白的相关信息并进行基因表达研究。研究表明, *AIWRKY65* 包含一个 681 bp 的开放阅读框, 编码 226 个氨基酸。*AIWRKY65* 基因编码的氨基酸序列与向日葵 *HaWRKY65*、莴苣 *LsWRKY65* 等植物基因编码的氨基酸序列具有较高同源性; 该蛋白具有 1 个 WRKYGQK 保守结构域, 属于 WRKY 基因家族的第 IIe 组; 系统进化树分析显示, 茅苍术 *AIWRKY65* 与洋蓟 *CcWRKY65* 蛋白亲缘关系较近; 运用实时荧光定量 PCR 检测 *AIWRKY65* 基因在 2 个产地不同组织中的表达水平, 结果表明, 不同产地的茅苍术 *AIWRKY65* 基因具有组织表达差异性, 均在叶片中表达量较高; 在茉莉酸甲酯 (MeJA) 诱导处理 48 h 内, *AIWRKY65* 基因的表达量下调; 亚细胞定位和转录自激活活性分析显示, *AIWRKY65* 定位于细胞核, 不具有自激活活性。这些结果为进一步研究 *AIWRKY65* 在茅苍术中的生物学功能提供参考。

关键词: 茅苍术; WRKY 转录因子; 基因克隆; 表达分析; 亚细胞定位

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)05-1494-09

Cloning and preliminary inquiry of *AIWRKY65* from *Atractylodes lancea*

GUAN Feng-ya¹, LIU Wei-wei¹, CHI Kai-wen¹, ZENG Kai-ling¹, XIE Jin^{2*}, ZHA Liang-ping^{1*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: WRKY transcription factor is a type of transcription factor unique to plants and plays an important role in various physiological processes of plants. This study is based on the transcriptome data of *Atractylodes lancea*, the correlation between the FPKM values of the *AIWRKY* gene and the *AITPS* gene of *Atractylodes lancea* was analyzed. Combined with the analysis results, the candidate gene *AIWRKY65* with a significant positive correlation with the expression levels of *AITPS1* and *AITPS6* genes and a relatively high FPKM value was screened. The candidate gene was cloned to obtain the open reading frame ORF of the *AIWRKY65* gene, and the related information of its encoded protein was analyzed and the gene expression was studied. The results showed that *AIWRKY65* contains a 681 bp open reading frame and encoding 226 amino acids. Through amino acid sequence homology analysis, it was found that *AIWRKY65* amino acid sequence had high homology with several plants such as *HaWRKY65* and *LsWRKY65*; *AIWRKY65* protein had a typical WRKYGQK domain, belonging to

收稿日期: 2023-09-17; 修回日期: 2023-10-30.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82073957); 安徽省自然科学基金优青项目 (2208085Y30); 安徽省高校杰出青年科研项目 (2023AH020036); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目 (gxyqZD2022051); 安徽高校自然科学研究重点项目 (2023AH050634); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (CACM-2023-QNRC2-B23).

*通讯作者 E-mail: zlp_ahtcm@126.com; xiejin159@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1077

Ile subgroup of WRKY transcription factor family; phylogenetic analysis indicated that *AIWRKY65* protein had the higher homology with *CcWRKY65* protein; the expression of *AIWRKY65* gene in different tissues of two producing areas of *Atractylodes lancea* were assayed via real-time fluorescence quantitative PCR, and the results showed that all of them were highly expressed in leaves and also has tissue differences. The expression level of *AIWRKY65* gene was down-regulated within 48 h of methyl jasmonate (MeJA) induction; subcellular localization and transcriptional activation assay suggested that *AIWRKY65* was located in the nucleus and had no transcriptional activation activity. This study provides a reference for further elucidating the biological function of *AIWRKY65* in *Atractylodes lancea*.

Key words: *Atractylodes lancea*; WRKY transcription factor; gene cloning; expression analysis; subcellular localization

WRKY 转录因子是植物中特有的转录因子家族, 因其结构域中包含 1 个或 2 个高度保守的 WRKY (WRKYGQK) 氨基酸基序而命名^[1]。自 1994 年从甘薯中鉴定出第一个 WRKY 转录因子 SPF1 后^[2], 越来越多的药用植物 WRKY 转录因子得到了广泛的研究, 如北柴胡^[3]、铁皮石斛^[4]、马蓝^[5]等药用植物。许多研究表明, WRKY 转录因子参与调节植物多种生理过程, 如促进种子萌发, 调控植物的生长发育^[6-8]以及对抗生物和非生物胁迫^[9]等。根据 WRKY 保守结构域的数目和锌指结构的种类, 通常将 WRKY 转录因子家族分为 3 组 (I、II、III), 其中 I 家族成员包含 2 个 WRKY 结构域, 锌指结构域类型为 C2H2 型; II 家族成员仅包含 1 个 WRKY 结构域, 锌指结构域类型为 C2H2 型, 其中根据氨基酸序列的不同, 又被细分为 5 个亚组 (IIa、IIb、IIc、IId、IIe); III 家族成员包含 1 个 WRKY 结构域, 锌指结构域类型为 C2HC 型^[10]。近年来, 转录因子通过调控代谢途径关键酶基因的转录来启动或限制次生代谢物合成的作用引起了广泛关注^[11], 例如, 青蒿素是从药用植物黄花蒿 *Artemisia annua* 中分离的一种倍半萜内酯, 青蒿 *AaWRKY1* 转录因子能够与青蒿素生物合成过程中的关键酶基因 *ADS* 启动子区域中的顺式作用元件 W-box 结合, 从而激活其表达, 研究发现青蒿 *AaWRKY1* 参与调控青蒿素的生物合成^[12]; 短小蛇根草 *OpWRKY2* 是抗癌化合物喜树碱生物合成的直接正调控因子^[13]; 紫杉醇是红豆杉中的一种天然抗癌药物, 红豆杉 *TcWRKY33* 可与紫杉醇生物合成途径基因 *TcDBAT* 启动子中的 2 个 W-box 结合, 上调其表达水平, 研究得出红豆杉 *TcWRKY33* 正向调节紫杉醇的生物合成^[14]。综上所述, WRKY 转录因子在调控植物次生代谢物合成过程中发挥着重要作用。

茅苍术为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的干燥根状茎, 具有燥湿健脾、祛风散寒、明目等功效^[15], 临床应用广泛。茅苍术为多年生草本, 主要分布于江苏、湖北、安徽、河南等地^[16], 茅苍术喜凉

爽干燥的气候, 适宜生长于丘陵山区半阴半阳的荒坡地^[17]。茅苍术的根状茎中含有主要的药效成分挥发油类, 有学者对挥发油进行了系统的研究, 挥发油类主要由倍半萜类和聚乙炔炔类等成分组成, 在药理方面, 苍术具有抗癌、抗炎、抑菌、降血糖、保护心血管和神经系统等作用^[18-21]。关于茅苍术萜类合成与调控的研究有助于提高茅苍术挥发油成分, 保证苍术药材质量。

目前, 本课题组已经对茅苍术萜类合成途径中的 4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶基因 *AICMK*^[22]、鲨烯合酶基因 *ALSQS*^[23]、萜类合酶基因 *AITPS*^[24] 等进行研究报道, 为茅苍术中萜类化合物的生物合成提供基础, 然而关于茅苍术萜类合成的转录调控鲜有报道, 尤其关于茅苍术 WRKY 转录因子的功能尚不清楚。本研究基于茅苍术转录组数据, 从茅苍术中克隆得到 WRKY 转录因子, 进行生物信息学分析、亚细胞定位分析、转录自激活检测、利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术探究茅苍术 2 个产地、不同组织及外源性激素茉莉酸甲酯诱导的基因表达情况, 以期为进一步解析其生物学功能提供参考。

材料与方法

样品 茅苍术来源于湖北十堰、江苏南京, 经安徽中医药大学查良平副研究员鉴定为菊科植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.。经鉴定后收集茅苍术根状茎、茎、叶进行后续实验。

茅苍术种子来源于湖北十堰, 培养于 1/2 MS 液体培养基中, 光照周期为 16 h 光照和 8 h 黑暗, 温度为 25 °C。取长势一致的 5 个月茅苍术无菌苗样品, 于液体培养基加入 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯进行诱导处理, 处理后分别于 0、3、6、9、12、24、48 h 收取茅苍术根。所有样品均于液氮中速冻后保存于 -80 °C 冰箱。

试剂 大肠杆菌 *Trans1-T1* 感受态细胞 (Lot: Q4611209)、pEASY-Blunt Zero Cloning Kit 载体 (Lot: R20512)、EasyPure[®] Quick Gel Extraction Kit 切胶回收

试剂盒 (Lot: R10507)、pEASY Uni Seamless Cloning and Assembly Kit 无缝拼接试剂盒 (Lot: Q30915) 购于北京全式金生物技术有限公司; 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 (Lot: 2112#31220307A)、超快速植物 RNA 提取试剂盒 (Lot: 2207#12)、营养缺陷型基础培养基 SD/-Trp (Lot: 2204#18P)、金担子素 A (AbA) (Lot: 2205#17K) 购于北京华越洋生物科技有限公司; 2×Realab Green PCR Fast mixture 荧光定量试剂盒 (Lot: 0202111621)、反转录试剂盒 (Lot: 0202010531)、5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-半乳糖苷 (X- α -Gal) (Lot: 0200120411) 购于北京兰博利德商贸有限公司; 酵母 Y2H 菌株 (Lot: 20210415) 购于上海欧易生物医学科技有限公司。

仪器与设备 ETC821 型 PCR 扩增仪 (北京东胜创新生物科技有限公司); DYCP-31DN 型琼脂糖水平电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); G500312-0001 蓝光切胶仪 (上海生工生物工程股份有限公司); Alphamager HP 型凝胶色谱成像仪 (美国 ProteinSimple 公司); BHP-75 恒温培养箱 (合肥右科仪器设备有限公司); CFX96 Optics Module 实时荧光定量 PCR 仪 (美国伯乐公司); Olympus FV3000 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)。

AIWRKY 基因与 AITPS 基因 FPKM 值相关性分析 为了进一步推测 AIWRKY 基因与茅苍术萜类合酶基因的相关性, 根据筛选出的茅苍术转录组中 3 个 WRKY IIe 家族成员 (AIWRKY1、AIWRKY22、AIWRKY65) 结合课题组前期筛选出的茅苍术 9 个萜类合酶基因 AITPS^[24], 选取湖北十堰茅苍术根状茎、茎、叶中的 FPKM (fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments) 值, 分别计算出基因间的皮尔森相关性系数, 运用 Chiplot (<https://www.chiplot.online/>) 在线网站进行作图和美化。

总 RNA 提取与 cDNA 合成 使用 RNA 提取试剂盒提取湖北十堰、江苏南京茅苍术根状茎、茎、叶中总 RNA 及经 MeJA 处理后湖北十堰茅苍术根中总 RNA。使用反转录试剂盒进行反转录, 得到茅苍术样品的 cDNA。

基因克隆 以反转录后的茅苍术叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 使用 Primer Premier 5.0 软件设计基因特异性引物, 上游引物 AIWRKY65-F: 5'-ATGGAAGAAGGCTCCCAGTCTCCAC-3', 下游引物 AIWRKY65-R: 5'-TTAAGAAGGTTGAACAAGAAGTCTC-3', PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶回收, 切胶回收产物与 T 载 pEASY-Blunt Zero 连接, 转化至大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中, 菌液 PCR, 取阳性克

隆菌液进行测序。

生物信息学分析 利用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 获取基因的开放阅读框 (ORF); 使用 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 在线工具进行氨基酸序列的相似性比对分析; 利用 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测该基因编码的蛋白理化性质; 利用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白的二级结构; 利用 SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 及 PyMOL 软件进行三级结构的预测; 使用 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行蛋白质结构域分析; 应用 Clustal W 及 Espript (<http://espript.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>) 进行同源氨基酸序列比对; 以拟南芥 AtWRKY65 转录因子为参考, 采用 STRING 11.5 (<https://version-11-5.string-db.org/>) 在线网站进行互作蛋白网络分析, 置信度设置为 0.40; 应用 MEGA 6.06 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, bootstrap 重复次数为 1 000 次。

基因表达分析 采用实时荧光定量 PCR 法对经茉莉酸甲酯处理不同时间点的茅苍术根及湖北十堰茅苍术 (根状茎、茎、叶) 和江苏南京茅苍术 (根状茎、茎、叶) 中 AIWRKY65 基因表达模式进行分析。每个样品 3 株, 分别提取 RNA 并反转录获得 cDNA。以茅苍术 UBQ2 基因作为内参基因, 上游引物 UBQ2-F: 5'-GGTTGAGGGGAGGAATGC-3', 下游引物 UBQ2-R: 5'-AGACGAAGGACAAGGTGA-3', 荧光定量引物使用 Primer Premier 5.0 软件设计, 分别为上游引物 qAIWRKY65-F: 5'-AGACCCCAAGGAATCAAAAACAAC-3', 下游引物 qAIWRKY65-R: 5'-GGCTCGGATGTAGCGAAAGT TAT-3'。根据荧光定量试剂盒的说明书配制 20 μ L 的反应体系, 放置于 CFX96 Optics Module 实时荧光定量 PCR 仪中进行 PCR 扩增, 每个样品进行 3 个重复。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。

转录自激活验证 以 pGBKT7 载体为酵母表达载体, 根据克隆成功的基因序列, 设计含有 BamH I 酶切位点的引物, 上游引物 AIWRKY65-pGBKT7-F: 5'-GGAGGCCGAATTCCTCCGGGAATGGAAGAAGGCTCC CAGTCTCCAC-3'; 下游引物 AIWRKY65-pGBKT7-R: 5'-GGCCGCTGCAGGTCGACGGATTAAGAAGGTTG AACAAGAAGTCTC-3'。使用 BamH I 限制性内切酶对载体 pGBKT7 线性化并与目的基因切胶回收产物进行重组, 转化至大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中, 菌液 PCR, 经测序分析正确后提取质粒, 成功构建 pGBKT7-AIWRKY65 重组载体。将 pGBKT7 空载体

与 pGBKT7-*AIWRKY65* 分别转化到 Y2HGOLD 酵母菌中, 取转化后的菌液 5 μ L 分别在 SD/-Trp, SD/-Trp/X- α -Gal, SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板上点样, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 天。观察酵母菌落生长状态与菌落颜色。

亚细胞定位 以 pRI101-eGFP 载体为亚细胞定位载体, 根据克隆成功的基因序列, 设计含有 *Bam*H I 酶切位点的引物, 上游引物 *AIWRKY65*-eGFP-F: 5'-TCGACCCCGGGGTACCGGAATGGAAGAAGGCTCCAGTCTCCAC-3'; 下游引物 *AIWRKY65*-eGFP-R: 5'-TCGCCCTTGCTACCATGGAAGAAGGTTGAACAAGAACTCTCTCC-3'。使用 *Bam*H I 限制性内切酶对载体 pRI101-eGFP 线性化并与目的基因切胶回收产物进行重组, 转化至大肠杆菌 *Trans1-T1* 感受态细胞中, 菌液 PCR, 经测序分析正确后提取质粒, 构建植物表达载体 pRI101-*AIWRKY65*-eGFP。将 pRI101-*AIWRKY65*-eGFP 重组载体质粒和 pRI101-eGFP 空载体质粒分别转入根癌农杆菌 GV3101 中, 取阳性菌液于 YEB 液体培养基 28 $^{\circ}$ C, 180 $r \cdot min^{-1}$ 培养过夜, 离心重悬, 调整 OD₆₀₀ 至 0.6~0.8, 室温静置 3 h 后吸取菌液注射于烟草叶片下表皮, 弱光条件下培养 48 h 后于激光共聚焦显微镜下观察亚细胞定位结果。

统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件统计分析和作图, 实验结果以均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

结果与分析

1 *AIWRKY* 基因与 *AITPS* 基因 FPKM 值相关性分析

相关性分析结果表明 (图 1A), 3 个 WRKY IIc 家族成员基因表达量均与 *AITPS1*、*AITPS6* 基因表达量具有显著正相关性, 其中 *AIWRKY22*、*AIWRKY65* 基因表达量与 *AITPS8* 基因表达量呈现较弱的正相关性, 本研

究选取 FPKM 值相对较高的 *AIWRKY65* 基因作为候选基因, 进行进一步的研究 (图 1B)。

2 *AIWRKY65* 基因的克隆及序列分析

茅苍术 *AIWRKY65* 基因来源于本实验室茅苍术转录组数据库 [美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 登录号为 PRJNA854065], 使用 NCBI ORF Finder 对基因序列进行预测分析, 结果显示, *AIWRKY65* 基因含有 1 个 681 bp 完整的开放阅读框。以反转录得到的茅苍术叶片 cDNA 为模板使用特异性引物进行 RT-PCR 扩增, PCR 产物连接至 T 载体, 所得测序结果与预测结果相符。

应用 NCBI BLAST 对其编码的氨基酸序列进行比对, 结果显示 *AIWRKY65* 氨基酸序列与 GenBank 中已注册植物 WRKY 氨基酸序列有较高的同源性, 其中茅苍术 *AIWRKY65* 与向日葵 *HaWRKY65* (XP_021987700.1) 相似度为 72.04%, 与小飞蓬 *EcWRKY65* (XP_043635398.1) 相似度为 71.82%, 将该基因命名为 *AIWRKY65* (GenBank 注册号: OR343917)。

3 生物信息学分析

3.1 蛋白理化性质分析 利用在线工具 ExPASy 对 *AIWRKY65* 基因编码蛋白进行理化性质分析。结果显示, *AIWRKY65* 编码 226 个氨基酸, 相对分子质量为 26 144.98, 蛋白理论等电点为 5.29, 不稳定系数为 50.26, 脂肪指数为 47.43, 可初步判断 *AIWRKY65* 为不稳定的酸性蛋白。

3.2 结构功能域与二级、三级结构预测 分析茅苍术 *AIWRKY65* 转录因子的蛋白结构域 (图 2B), 结果显示 *AIWRKY65* 在 53~109 aa 含有 1 个 WRKYGQK 保守结构域, 属于 WRKY super family 家族。二级结构预测结果显示 (图 2A), 该转录因子编码蛋白的二级结构主要由无规则卷曲 (random coil)、 α 螺旋 (alpha helix)、延伸链 (extended strand) 和 β -转角 (β -turn) 构成, 其中无规

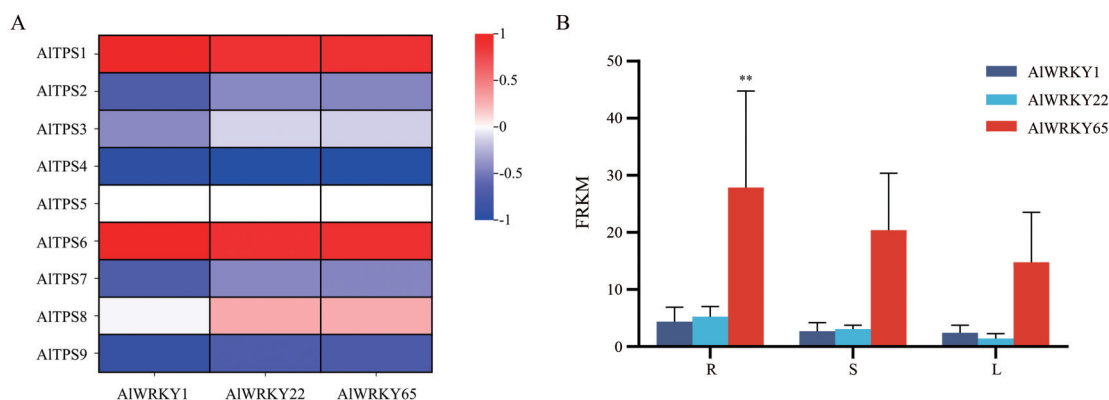


Figure 1 Correlation analysis. A: Correlation analysis of *AIWRKY* gene and *AITPS*s gene; B: Expression levels of *AIWRKY1*, *AIWRKY22*, *AIWRKY65* in different tissues. FPKM: Fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments. R: Rhizome; S: Stem; L: Leaf.

** $P < 0.01$ vs *AIWRKY1*-R. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

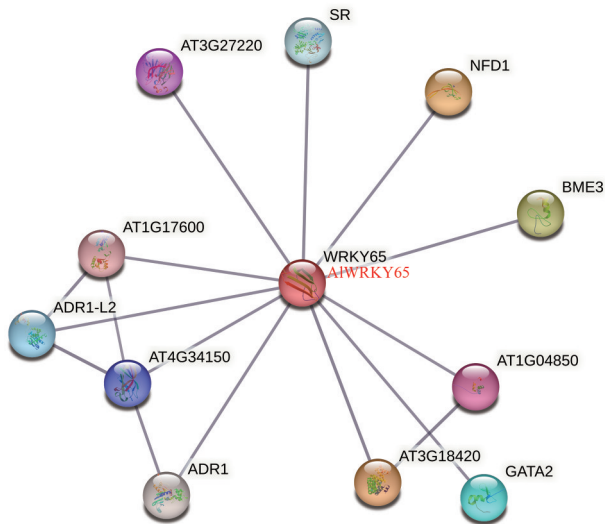


Figure 4 Protein-protein interaction network of *AIWRKY65* protein. Black and red color characters represent *Arabidopsis thaliana* and *Atractylodes lancea*, and the thick lines represent the strength of interaction

指结构域的结构特征, 基于不同物种 WRKY 基因的氨基酸序列, 采用邻接法构建系统进化树 (图 5)。来源于不同物种的 WRKY 蛋白被分为 3 个主要类群 (I、II 和 III), 其中茅苍术 *AIWRKY65* 与洋蓟 *CcWRKY65* 聚为一支, 都属于进一步细分的 IIe 亚类家族成员, 推测两者亲缘关系较近。

4 qRT-PCR 分析 2 个产地、不同组织茅苍术 *AIWRKY65* 基因表达模式

对江苏南京、湖北十堰两地茅苍术 *AIWRKY65* 基因不同组织表达量进行分析 (图 6)。结果显示, 在南京茅

苍术中 *AIWRKY65* 基因在叶中相对表达量较高, 茎中次之, 在根状茎中的相对表达量较低; 在十堰茅苍术中 *AIWRKY65* 基因在叶中相对表达量较高, 根状茎中次之, 在茎中的相对表达量较低, 两个产地中 *AIWRKY65* 基因均在叶中表达量最高, 这表明 *AIWRKY65* 基因的表达呈现一定的组织特异性, 表达模式在不同生长环境下存在差异。

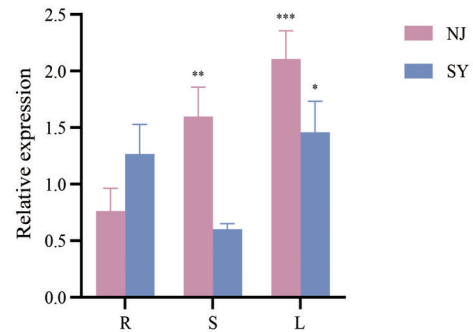


Figure 6 Expression levels of *AIWRKY65* in different origins and different tissues. R: Rhizome; S: Stem; L: Leaf; NJ: *A. lancea* in Nanjing; SY: *A. lancea* in Shiyuan. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ vs NJ-R. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

5 qRT-PCR 分析 MeJA 诱导下茅苍术 *AIWRKY65* 的表达模式

为分析茉莉酸甲酯胁迫下茅苍术 *AIWRKY65* 基因的表达特征, 采用茉莉酸甲酯溶液处理茅苍术组培苗, 进行 qRT-PCR 分析 (图 7)。结果显示, 在外源激素茉莉酸甲酯处理的 48 h 内, 与 CK (0 h) 对照相比, *AIWRKY65* 基因表达量出现显著下调。

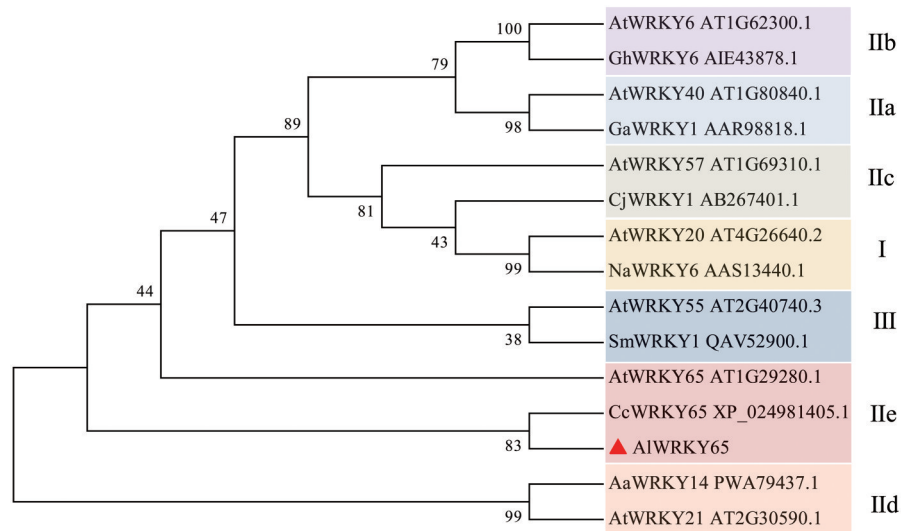


Figure 5 Phylogenetic tree of the amino acid sequences of *AIWRKY65* with some other WRKYs. Aa: *Artemisia annua*; Al: *Atractylodes lancea*; At: *Arabidopsis thaliana*; Cc: *Cynara cardunculus* var. *Scolymus*; Cj: *Coptis japonica* var. *Dissecta*; Ga: *Gossypium arboreum*; Gh: *Gossypium hirsutum*; Na: *Nicotiana attenuata*; Sm: *Salvia miltiorrhiza*

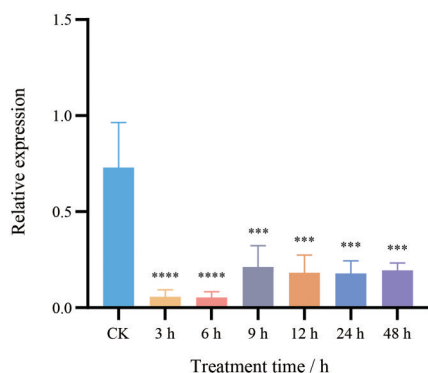


Figure 7 Expression analysis of *AIWRKY65* induced by MeJA. *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs CK. $n = 3, \bar{x} \pm s$

6 转录自激活检测

如图8所示,与阴性对照(pGBKT7)一致,转入pGBKT7-*AIWRKY65*的酵母菌株在SD/-Trp单缺培养基上有酵母菌落正常生长,SD/-Trp/X- α -Gal培养基上有酵母菌落正常生长但没有显示蓝色,SD/-Trp/X- α -Gal/AbA培养基上未见明显生长且无颜色变化(图8)。由此推测,pGBKT7-*AIWRKY65*诱饵表达载体不能激活酵母菌株营养缺陷型报告基因的表达,无转录自激活活性。

7 亚细胞定位分析

采用烟草瞬时表达体系,使用Olympus FV3000激光共聚焦显微镜分别在波长488和633 nm的激发波长

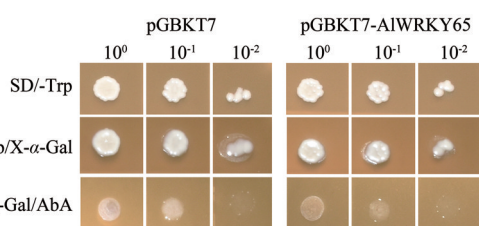


Figure 8 Autonomous transcriptional activation testing

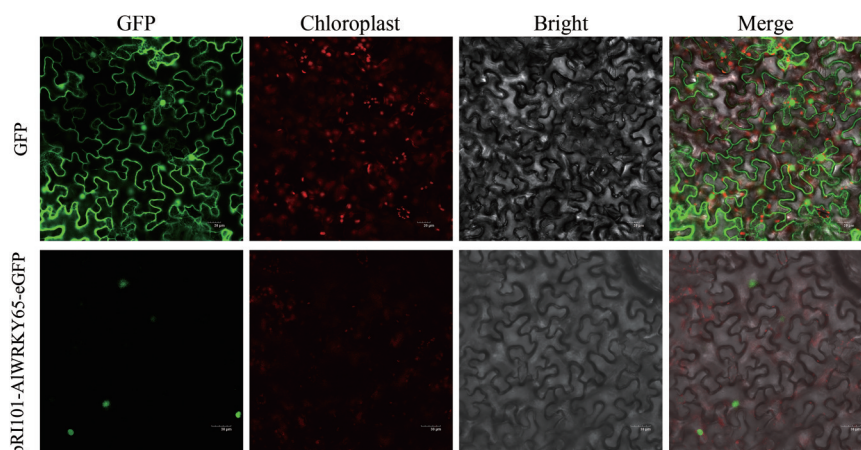


Figure 9 Subcellular localization of *AIWRKY65*. GFP: Channel of green fluorescent; Chloroplast: Channel of chloroplast spontaneous fluorescence; Bright: Channel of brief field; Merge: A combination of GFP, chloroplast and bright channels

下观察绿色荧光蛋白GFP和叶绿体自发红色荧光信号(图9)。结果显示,对照空载体在细胞膜、细胞核中都可以观察到清晰的GFP绿色荧光信号,pRII01-*AIWRKY65*-eGFP融合蛋白仅在细胞核中出现绿色荧光信号,推测*AIWRKY65*蛋白定位在细胞核中,属于核定位蛋白。

讨论

WRKY转录因子作为目前研究广泛的转录因子家族之一,在植物生长发育过程中发挥着不可或缺的作用,随着基因组测序技术的不断进步与完善,越来越多植物的WRKY转录因子家族成员的作用与机制得到深入的研究^[25]。目前已发现的WRKY蛋白大多属于WRKY家族的II家族^[26]。有研究表明,在番茄中过表达WRKY IIe家族成员*SIWRKY35*能提高MEP途径中相关基因的表达,从而提高番茄果实中类胡萝卜素类化合物与叶片中叶绿素的合成^[27];有学者通过研究发现,橡胶树中WRKY IIe家族成员*HbWRKY27*可以正向调控天然橡胶关键生物合成基因*HbFPS1*的表达^[28]。本课题组在分析茅苍术转录组数据时,发现一条WRKY IIe家族成员*AIWRKY65*,对其与萜类合酶基因进行相关性分析,结果表明,它与部分萜类合酶基因有明显的正相关性,为了进一步研究该基因的功能,本研究对茅苍术*AIWRKY65*转录因子进行克隆,得到长为681 bp、编码226个氨基酸的基因序列,为后续深入基因功能提供依据。

WRKY基因的表达通常具有组织特异性,这与其所调控的生命活动有关,例如:茶树*CsWRKY17*在茶树的根、茎、叶、花中均有表达,在根部表达量最高,具有明显的组织特异性^[29];葡萄*VvWRKY26*在葡萄的花、茎、芽、卷须、幼叶、成熟叶和果实组织中均有表达,此

外, 在幼果期和转色期表达量相对较高^[30]。荷花 *NnWRKY22* 在荷花的根、茎、叶、花中均有表达, 但在根中表达量最高, 推测 *NnWRKY22* 主要通过荷花根部发挥该基因功能^[31]。本研究结果表明在南京与十堰两个产地的茅苍术中, *AIWRKY65* 基因在根状茎, 茎, 叶中均有表达, 具有组织特异性, 且表达量均在叶片中相对较高, 说明其可能主要在叶片中发挥作用。茉莉酸甲酯是茉莉酸类化合物的一种重要衍生物, 在植物界中广泛分布, 在植物体营养发育、植物防御和代谢调节中发挥重要作用^[32], 许多转录因子受到茉莉酸甲酯诱导, 并参与特定代谢过程的调节, 有学者研究表明经茉莉酸甲酯处理的薄荷, 部分薄荷 WRKY 基因表达出现上调, 部分 WRKY 基因表达下调^[33]; 在药用植物青蒿中, *AaWRKY1* 受到茉莉酸甲酯的强烈诱导, 并调节青蒿素生物合成的关键基因 *ADS* 的表达^[12]; 甘蔗 *ScWRKY3* 在茉莉酸甲酯处理下, 表达水平逐渐降低, 受到抑制^[34]。进一步的 qRT-PCR 结果显示, 茉莉酸甲酯影响茅苍术 *AIWRKY65* 基因的表达, 在茉莉酸甲酯处理 48 h 内, 显著降低了 *AIWRKY65* 基因的表达量, 但具体的响应机制仍需要后续实验的验证。

大量研究表明 WRKY 蛋白定位于植物细胞核, 例如枇杷 *EjWRKY15*^[35]、茶树 *CsWRKY17*^[29]、人参 *PgWRKY22*^[36] 等都定位于植物的细胞核中, 本研究构建植物表达载体 pRI101-*AIWRKY65*-cGFP, 利用烟草瞬时表达系统实验证明 *AIWRKY65* 蛋白主要定位于细胞核中, 推测 *AIWRKY65* 可能作为核蛋白发挥作用。作为转录因子, 转录激活相关基因表达是其行使功能的主要形式, 但亦有部分转录因子通过结合其他基因的启动子或形成同源二聚体发挥其功能^[37], 转录因子无转录自激活活性的情况也有报道, 如甘蔗 *ScWRKY4*^[38]、桂花 *OjWRKY120*^[39] 等。本研究构建 pGBKT7-*AIWRKY65* 酵母诱饵载体, 通过对比不同培养基上的酵母单菌落生长情况, 发现 *AIWRKY65* 基因无转录自激活活性, 因此推测 *AIWRKY65* 基因可能通过与其他具有自激活作用的转录因子互作来调控下游靶基因表达, 可用于后续酵母双杂交试验, 筛选与其编码蛋白相互作用的相关蛋白。

WRKY 转录因子参与多种与植物胁迫应答、生长发育等有关的重要生理过程, 调控过程较为复杂。植物中萜类代谢的过程也是极其复杂, 萜类代谢相关的酶与转录因子之间可能存在相互作用, 它们相互配合, 共同促进某个特定的萜类代谢途径。本研究从茅苍术中克隆获得 1 个 WRKY 转录因子, 命名为 *AIWRKY65*, 对其进行生物信息学分析及基因表达分析, 为后续可进一步研究该转录因子与萜类合成关键酶基因之间的

调控作用奠定基础。但茅苍术在生长发育及次生代谢过程中受到多个转录因子家族的共同调控, 还需要更进一步的研究来阐明其生物学功能。

作者贡献: 查良平和谢晋设计实验并提供资金; 管凤雅和刘巍玮参与实验及撰写论文; 迟凯文和曾凯玲参与数据分析及提供实验技术支持。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 2000, 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 beta-amylase from sweet potato [J]. Mol Gen Genet, 1994, 244: 563-571.
- [3] Feng FX, Lü RH, Li YM, et al. Characterization and expression analysis of the transcription factor *BcWRKY70* in *Bupleurum chinense* DC. [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2021, 56: 3184-3189.
- [4] Sun PW, Tang XL, Lü FF, et al. Molecular cloning and expression analysis of the transcription factor *AsWRKY25* in *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg [J]. Chin Pharm J (中国药理学杂志), 2019, 54: 1919-1925.
- [5] Guo ZY, Li Q, Wu XX, et al. Bioinformatics and expression analysis of WRKY transcription factor family in *Baphicacanthus cusia* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 2864-2875.
- [6] Devaiah BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG. *WRKY75* transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2007, 143: 1789-1801.
- [7] Yang Y, Chi Y, Wang Z, et al. Functional analysis of structurally related soybean *GmWRKY58* and *GmWRKY76* in plant growth and development [J]. J Exp Bot, 2016, 67: 4727-4742.
- [8] Guan YF, Meng XZ, Khanna R, et al. Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis* [J]. PLoS Genet, 2014, 10: e1004384.
- [9] Chen SQ, Weng QQ, Cao HR, et al. The functions and regulation mechanisms of WRKY transcription factors in response to biotic and abiotic stresses [J]. J Agric Biotechnol (农业生物技术学报), 2017, 25: 668-682.
- [10] Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, et al. WRKY transcription factors [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15: 247-258.
- [11] Zheng HJ, Hang Y, Wang XH, et al. Research progress of WRKY transcription factor family in medicinal plants [J]. Plant Physiol J (植物生理学报), 2022, 58: 1055-1067.

- [12] Ma DM, Pu GB, Lei CY, et al. Isolation and characterization of AaWRKY1, an *Artemisia annua* transcription factor that regulates the amorpha-4,11-diene synthase gene, a key gene of artemisinin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50: 2146-2161.
- [13] Hao XL, Xie CH, Ruan QY, et al. The transcription factor *OpWRKY2* positively regulates the biosynthesis of the anticancer drug camptothecin in *Ophiorrhiza pumila* [J]. *Hortic Res*, 2021, 8: 7.
- [14] Chen Y, Zhang H, Zhang M, et al. Salicylic acid-responsive factor *TeWRKY33* positively regulates taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* in direct and indirect ways [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 697476.
- [15] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: Vol 1 (中华人民共和国药典: 一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 168.
- [16] Hou FJ. Studies on Reasource Investigating and Quality Evaluating of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. (茅苍术的种质资源调查及品质评价) [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2008.
- [17] Li MY, Chao JG, Gu W, et al. Physiological-biochemical response of *Atractylodes lancea* from different habitats to waterlogging stress and comprehensive evaluation of their waterlogging tolerance with TOPSIS approach [J]. *Chin J Ecol (生态学杂志)*, 2016, 35: 407-414.
- [18] Chen YM, Chen J, Chou GX. Research review on chemical constituent and pharmacological action of rhizoma atractylodis [J]. *Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med (上海中医药大学学报)*, 2006, 20: 95-98.
- [19] Deng AP, Li Y, Wu ZT, et al. Advances in studies on chemical compositions of *Atractylodes lancea* and their biological activities [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2016, 41: 3904-3913.
- [20] Cheng Y, Chen T, Yang X, et al. Atractylon induces apoptosis and suppresses metastasis in hepatic cancer cells and inhibits growth *in vivo* [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 5883-5894.
- [21] Ouyang Z, Yang L, Su SL, et al. Fingerprint of volatile oil of *Atractylodes lancea* by GC-MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 968-972.
- [22] LU JM, XU R, WU JX, et al. Cloning and prokaryotic expression analysis of *AICMK* from *Atractylodes lancea* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2876-2884.
- [23] Wu JX, Xu R, Lu JM, et al. Molecular cloning and functional characterization of two squalene synthase genes in *Atractylodes lancea* [J]. *Planta*, 2021, 255: 8.
- [24] Wu JX, Hu JP, Yu HW, et al. Full-length transcriptome analysis of two chemotype and functional characterization of genes related to sesquiterpene biosynthesis in *Atractylodes lancea* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 225: 1543-1554.
- [25] Li WX, Pang SY, Lu ZG, et al. Function and mechanism of WRKY transcription factors in abiotic stress responses of plants [J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9: 1515.
- [26] Xie ZW, Wang LJ, Chen JY, et al. Studies on WRKY transcription factors and their biological functions in plants [J]. *J Agri Sci Technol (中国农业科技导报)*, 2016, 18: 46-54.
- [27] Yuan Y, Ren SY, Liu XF, et al. SIWRKY35 positively regulates carotenoid biosynthesis by activating the MEP pathway in tomato fruit [J]. *New Phytol*, 2022, 234: 164-178.
- [28] Qu L, Li HL, Guo D, et al. *HbWRKY27*, a group IIe WRKY transcription factor, positively regulates *HbFPS1* expression in *Hevea brasiliensis* [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 20639.
- [29] Liu MM, Zang LS, Sun XL, et al. Cloning and expression analysis of *CsWRKY17* transcription factor in tea plants [J]. *J Tea Sci (茶叶科学)*, 2021, 41: 631-642.
- [30] Zhang GR, Liang CM, Guo JY, et al. Clone and expression analysis of *VvWRKY26* gene in grape (*Vitis vinifera*) [J]. *J Agric Biotechnol (农业生物技术学报)*, 2023, 31: 475-487.
- [31] Wang WR, Liu Y, Liu HL, et al. Cloning and expression of *NnWRKY22* in lotus [J]. *Fujian J Agric Sci (福建农业学报)*, 2022, 37: 486-491.
- [32] Creelman RA, Mullet JE. Biosynthesis and action of jasmonates in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 355-381.
- [33] Qi, XW, Fang, HL, Yu X, et al. Transcriptome analysis of JA signal transduction, transcription factors, and monoterpene biosynthesis pathway in response to methyl jasmonate elicitation in *Mentha canadensis* L. [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 2364.
- [34] Wang L, Liu F, Zhang X, et al. Expression characteristics and functional analysis of the *ScWRKY3* gene from Sugarcane [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 4059.
- [35] Li XY, Xu HX, Chen JW. Gene cloning and protein characterization analysis of *EjWRKY15* in loquat [J]. *J Fruit Sci (果树学报)*, 2020, 37: 1811-1820.
- [36] Liang H, Sun H, Shao C, et al. Molecular cloning of *PgWRKY22* from *Panax ginseng* and its expression in response to external phosphorus supply [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2023, 54: 4286-4294.
- [37] Guo JH, Wang WD, Gu X, et al. Cloning and expression analysis of WRKY transcription factor gene *CsWRKY57* in tea plant (*Camellia sinensis*) [J]. *J Tea Sci (茶叶科学)*, 2017, 37: 411-419.
- [38] Wang L, Liu F, Dai MJ, et al. Cloning and expression characteristic analysis of *ScWRKY4* gene in sugarcane [J]. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2018, 44: 1367-1379.
- [39] Zai ZY, Wang L, Ding HF, et al. Identification and salt stress response of *OjWRKY120* gene in *Osmanthus fragrans* [J]. *J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed) (西北农林科技大学学报 自然科学版)*, 2024. DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2024.05.014.