

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.02.012

# 大豆 *GmWRKY86* 基因的克隆及表达

## Cloning and expression analysis of *GmWRKY86* in soybean

王 静<sup>1</sup> 付 晶<sup>1</sup> 李晓伟<sup>2</sup>WANG Jing<sup>1</sup> FU Jing<sup>1</sup> LI Xiao-wei<sup>2</sup>

(1. 沧州职业技术学院, 河北 沧州 061001; 2. 河北大学, 河北 保定 071002)

(1. Cangzhou Technical College, Cangzhou, Hebei 061001, China;

2. Hebei University, Baoding, Hebei 071002, China)

**摘要:**为了研究大豆植物中 *GmWRKY86* 基因在植株发育和抵御非生物胁迫中的生物学功能, 利用其开放阅读框(opening reading frame, ORF)的 PCR 产物进行基因克隆, 并运用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 技术检测该基因在不同组织中的表达。序列分析显示: *GmWRKY86* 基因包含 3 个内含子和 4 个外显子, 其开放阅读框长度为 1 572 bp, 编码 523 个氨基酸, 所编码蛋白质的等电点为 8.15, 预测分子量为 56.82 kDa, 并且含有 2 个高度保守的 WRKY 结构域。进化树分析表明, *GmWRKY86* 蛋白与来自草莓的 *FvWRKY42* 和葡萄的 *VvWRKY2* 聚为一支。荧光定量 RT-PCR 分析表明, 在检测的所有组织中 *GmWRKY86* 都有表达, 其中花中表达量最高, 种子中表达量最低, 说明 *GmWRKY86* 基因参与了大豆花器官的发育。

**关键词:** 大豆; *GmWRKY86*; 克隆; 表达分析

**Abstract:** In order to study the biological function of *GmWRKY86* gene in soybean on development and resistance against abiotic stress, PCR products of its opening reading frame, ORF) were used to clone *GmWRKY86* gene, and the gene expressions in different tissues were detected by using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). Sequence analysis showed that the *GmWRKY86* gene can encode 523 amino acids with an isoelectric point of 8.15, a molecular weight predicted to be 56.82 kDa, and an open reading frame of 1 572 bp. *GmWRKY86* protein has two highly conserved domains, and the *GmWRKY86* gene contains three introns and four exons. Phylogenetic tree analysis indicated that the *GmWRKY86* protein belongs to the same branch as the *FvWRKY42* (*Fragaria vesca*) and *VvWRKY2* (*Vitis vinifera*). qRT-PCR analysis showed that *GmWRKY86* gene was expressed in all tissues examined, with the highest expression in flowers and the lowest expression in

seeds, indicating that *GmWRKY86* gene involves in the development of soybean flower organs.

**Keywords:** soybean; *GmWRKY86*; cloning; expression analysis

WRKY 基因家族是高等植物最大的转录因子家族之一。1994 年 Ishiguro 等<sup>[1]</sup> 从甘薯中克隆了第一个 WRKY 蛋白, 近年来随着越来越多植物基因组的公布, 不同物种间大量的 WRKY 成员在相继得到克隆和鉴定<sup>[2]</sup>。WRKY 基因编码的蛋白除了 WRKYGQK 核心序列外, 还存在保守的锌指结构<sup>[2]</sup>。依据 WRKY 蛋白结构域及锌指基序数量和模式的不同, WRKY 蛋白分为 3 个亚类, 其中第 I 类含有两个 WRKY 结构域, 第 II 类和第 III 类虽只含有一个 WRKY 结构域, 但第 II 类的锌指结构模式为 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, 而第 III 类的锌指结构模式为 C<sub>2</sub>HC<sup>[3]</sup>。

作为重要的转录因子成员, 植物 WRKY 蛋白已被证明参与对生物和非生物胁迫的响应以及发育过程<sup>[3]</sup>。有研究表明, WRKY 蛋白不仅在抵抗细菌、真菌和病毒病原体等生物胁迫过程中发挥重要作用<sup>[4-5]</sup>, 还广泛参与了胚发生<sup>[6]</sup>、衰老<sup>[7]</sup>、休眠<sup>[8]</sup>、毛状体发育<sup>[9]</sup>、种子发育<sup>[10]</sup>等过程, 以及由植物激素如赤霉素<sup>[11]</sup>、脱落酸(ABA)<sup>[12]</sup>或水杨酸<sup>[13]</sup>介导的一些信号转导过程。同时, 有证据<sup>[14]</sup>表明 WRKY 蛋白参与了对各种非生物胁迫的响应。在拟南芥中过表达 *AtWRKY28* 蛋白可提高植物对多种非生物胁迫的抵抗力<sup>[15]</sup>; 在水稻中过表达来自玉米的 *ZmWRKY114* 蛋白可提高阳性植株对盐胁迫的耐受性; 在水稻中过表达 *OsWRKY42* 蛋白虽然对生物胁迫无效果, 但显著延缓胼胝质降解并增强对盐胁迫的耐受性<sup>[16-17]</sup>。

虽然植物 WRKY 蛋白的研究已取得了很大的进展, 但对这个重要的转录调节家族的了解仍然有限。大豆是重要的农作物, 是人类植物蛋白质、食用油和其他有益于健康的营养物质的主要来源<sup>[18]</sup>。目前有多个团队<sup>[19-20]</sup> 鉴定了大豆的 WRKY 蛋白家族, 但主要是根据保守结构域的电子鉴定。试验拟利用 PCR 技术克隆 *GmWRKY86*, 并

**基金项目:** 河北省教育厅自然科学基金项目(编号: 17ZA0105)

**作者简介:** 王静, 女, 沧州职业技术学院讲师, 学士。

**通信作者:** 付晶(1982—), 女, 河北大学讲师, 硕士。

E-mail: FUBO@163.com

**收稿日期:** 2019-11-05

利用 qRT-PCR 技术分析其在不同组织及非生物胁迫下的表达模式,为进一步分析该基因的生物学功能提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

大豆(*Glycine max*):富豆 7 号,黑龙江天昊种业有限公司;

总 RNA 快速提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒:北京百泰克生物科技有限公司;

ZT4-Blunt 快速克隆试剂盒、qRT-PCR Mix 试剂盒:北京庄盟生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器

紫外分光光度计:UV-360 型,北京金石生物技术有限公司;

梯度 PCR 仪:MP60201 型,珠海莫纳生物科技有限公司;

荧光定量 PCR 仪:Lightlyder 2.0(RoChe)型,罗氏诊断产品(上海)有限公司;

微孔板离心机:GC60101 型,普洛麦格(北京)生物技术有限公司。

### 1.2 样品采集

正常田间管理,植株生长 30 d 后,收集根、茎和叶组织,待植株开花后,收集花器官,用于 RNA 提取。幼苗生长 30 d 后,用 50% PEG6000 和 200 mmol/L NaCl 溶液进行干旱和盐胁迫处理,处理 1,3,5,7 d 后取上部叶片进行基因表达分析。每个样品取 3 个生物学重复。

### 1.3 大豆总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

1.3.1 大豆总 RNA 提取 采用总 RNA 快速提取试剂盒 Ultrapure RNA 提取。使用 UV-360 紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。

1.3.2 cDNA 第一链合成 采用含 DNase 的 Fast Super RT Kit cDNA 第一链合成试剂盒对总 RNA 进行去除基因组 DNA,再通过反转录合成 cDNA 第一链。

### 1.4 *GmWRKY86* 基因的克隆

设计引物 *GmWRKY86*-F: 5'-ATGTCCTCCACTC-CCAACACCGATTC-3'和 *GmWRKY86*-R: 5'-TTATAC-TATG ATTTGCTCTT CTTTCA-3' 扩增 *GmWRKY86* 的 ORF 序列,以大豆叶片的 cDNA 作为第一链为模板,进行 PCR 链式聚合反应,再使用零背景 ZT4-Blunt 快速克隆试剂盒对 PCR 产物进行连接,将获得的阳性克隆送往上海美吉生物技术有限公司进行测序。

### 1.5 生物信息学分析

利用 DNAMAN7 预测 *GmWRKY86* 蛋白的等电点和分子质量;使用 SMART 在线预测分析保守区,利用 NCBI 中的 BlastP 程序进行氨基酸一致性分析。进化树

的构建采用 iTOL 在线软件操作。

### 1.6 荧光定量 PCR 分析

设计 *GmWRKY86* 基因荧光定量引物,*GmWRKY86*-qF: 5'-TGGAAATGTAAGTTCAGCC-3' 和 *GmWRKY86*-qR: 5'-TCACTTGACCCAGGTAG-TAGTTG-3'。大豆肌动蛋白基因作为内参基因,引物序列为 5'-CTTCCCTCAGCACCTTCCAA-3' 和 5'-GGTC-CAGCTTTCACACTCCAT-3',荧光定量反应体系根据 2×SYBR qPCR Mix 说明书进行操作。试验过程中选用 LightCycler 2.0 (RoChe)型 PCR 进行分析,需要重复 3 次试验操作。目的基因的 mRNA 水平采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法给予分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *GmWRKY86* 克隆及分析

课题组前期从盐胁迫转录组数据中鉴定到多个差异表达的 *GmWRKY* 成员,其中 *GmWRKY86* 变化模式最为显著。利用大豆叶片的 cDNA 对 *GmWRKY86* 基因进行克隆。经测序分析发现 *GmWRKY86* 基因包含 3 个内含子和 4 个外显子,其开放阅读框长度为 1 572 bp,编码 523 个氨基酸,所编码蛋白质的等电点为 8.15,预测分子量为 56.82 kDa。在 Smart 平台对其氨基酸序列分析,结果表明 *GmWRKY86* 蛋白含有 2 个典型的 WRKY 结构域,分别位于第 228~286 个氨基酸和第 409~468 个氨基酸(图 1)。基因组定位分析表明 *GmWRKY86* 定位于大豆基因组 Chr08:20546448~20551296 reverse 位置,含有 3 个内含子组成和 4 个外显子(图 2)。

为了进一步分析该基因功能,从 NCBI 获取陆地棉(*Gossypium hirsutum*, AIE43850)、麻枫树(*Jatropha curcas*, KT935498)、苦荞(*Tartary buckwheat*, MK910374)、玉米(*Zeamay*, AIB05859)、野生棉(*Gossypium aridum*, AIY62459)、水稻(*Oryza Sativa*, AAT84154)、橡胶树(*Hevea brasiliensis*, AEE81757)、草莓(*Fragaria vesca*, APP13924)、葡萄(*Vitis vinifera*, AY596466)、高粱(*Solanum lycopersicum*, ADZ15316.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP\_193551.1) 11 个物种的经功能鉴定的 WRKY 成员,与大豆的 *GmWRKY86* 蛋白构建进化树。结果显示这些成员可分为 3 个亚类,*GmWRKY86* 蛋白与来自草莓的 FvWRKY42 蛋白和葡萄的 VvWRKY2 蛋白聚为一支(图 3)。



图 1 *GmWRKY* 蛋白在大豆中的 WRKY 保守结构域分析

Figure 1 The conserved domain analysis of protein in soybean *GmWRKY4* protein

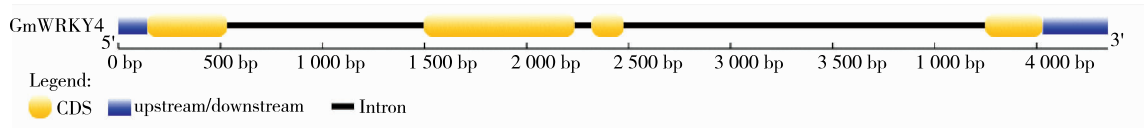


图 2 大豆 *GmWRKY86* 蛋白结构

Figure 2 The structure of soybean *GmWRKY86* protein

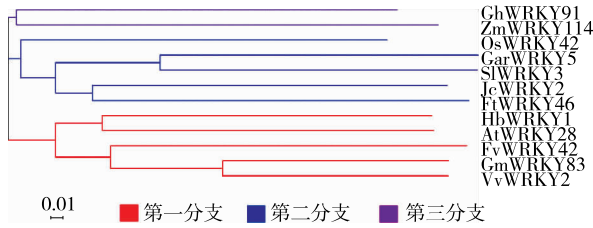


图 3 *GmWRKY86* 蛋白进化树分析

Figure 3 Analysis of the evolution tree of *GmWRKY86* protein

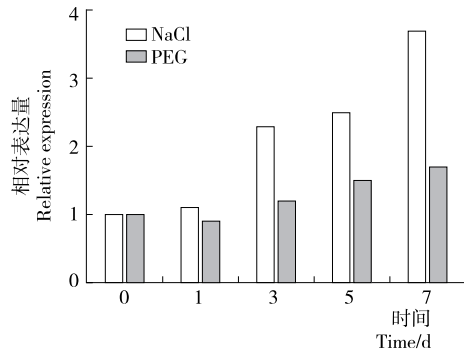


图 5 干旱和盐胁迫下 *GmWRKY86* 基因的表达

Figure 5 Expression of *GmWRKY86* gene under drought and salt stress

### 2.2 *GmWRKY86* 的组织特异性分析

为了进一步分析该基因功能,用荧光定量 PCR 方法分析了该基因的表达模式。结果显示:在所有检测的大豆组织中都存在 *GmWRKY86* 基因表达,其中在花中的表达量最高,种子中的表达量最低,其他组织中的表达量依次为叶>根>茎,提示 *GmWRKY86* 基因可能在大豆根茎叶感知逆境信号和激素信号中发挥重要作用,也说明 *GmWRKY86* 基因在大豆中广泛发挥功能(图 4)。

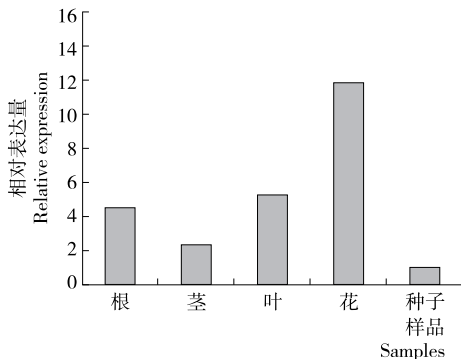


图 4 *GmWRKY86* 基因在大豆不同器官中的表达

Figure 4 Expression of *GmWRKY86* gene in different organs of soybean

### 2.3 非生物胁迫对 *GmWRKY86* 表达的影响

为了进一步分析该基因的功能,利用荧光定量 PCR 技术分析了干旱和盐胁迫前后该基因的相对表达量。结果显示,*GmWRKY86* 均能被干旱和盐胁迫诱导表达,其中在第 7 天时盐胁迫下的表达量为第 0 天的 4 倍左右,而同时期干旱胁迫下的表达量不到第 0 天的 2 倍(图 5),表明该基因对盐胁迫更为敏感。Wei 等<sup>[21]</sup>在拟南芥中过表达草莓的 *FvWRKY42* 基因,发现转基因植株中的 SOD

和 CAT 酶活显著上升,并提高了对盐胁迫和干旱胁迫的耐受力。Mzid 等<sup>[22]</sup>发现在烟草中过表达草莓的 *VvWRKY2* 蛋白也可以提高转基因植株对盐胁迫和干旱胁迫的耐受力。试验结果表明 *GmWRKY86* 蛋白在抵抗盐胁迫和干旱胁迫方面可能具有类似的功能。

## 3 结论

试验采用 PCR 和荧光定量方法,对大豆 *GmWRKY86* 基因进行了克隆和表达分析,发现 *GmWRKY86* 基因含有两个典型的 WRKY 保守结构域。结构保守性决定了功能的特异性,在 *GmWRKY* 蛋白进化树分析基础上,研究显示大豆 *GmWRKY86* 蛋白与来自草莓的 *FvWRKY42* 和葡萄的 *VvWRKY2* 聚为一支,进一步的组织特异性分析及干旱和盐胁迫前后该基因的相对表达量分析,明确了大豆 *GmWRKY86* 蛋白在抵抗盐胁迫和干旱胁迫方面发挥了重要作用。盐胁迫和干旱会严重影响作物生长、渗透调节和光合作用,降低作物产量。因此,了解干旱和盐胁迫的分子机制是生产此类作物的先决条件。但深刻阐述大豆 *GmWRKY86* 基因功能和分子机制,还需使用多种试验方法,包括转基因大豆过表达或 CRISPR-Cas9 缺失表达,以进一步揭示大豆 WRKY 基因家族和 *GmWRKY86* 生物学功能、分子机制和调控通路。

### 参考文献

[1] 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]. *Molecular Genetics and Genomics*, 1994, 244(6): 563-571.
- [2] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(5): 199-206.
- [3] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, et al. WRKY transcription factors[J]. *Trends in Plant Science*, 2010, 15(5): 247-258.
- [4] EULGEM T, SOMSSICH I E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling[J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2007, 10(4): 366-371.
- [5] ISHIHAMA N, YOSHIOKA H. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity[J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2012, 15(4): 431-437.
- [6] LAGACÉ M, MATTON D P. Characterization of a WRKY transcription factor expressed in late torpedo-stage embryos of *Solanum chacoense*[J]. *Planta*, 2004, 219(1): 185-189.
- [7] HINDERHOFER K, ZENTGRAF U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence[J]. *Planta*, 2001, 213(3): 469-473.
- [8] PNUELI L, HALLAK-HERR E, ROZENBERG M, et al. Molecular and biochemical mechanisms associated with dormancy and drought tolerance in the desert legume *Retama raetam*[J]. *Plant Journal*, 2012, 31(3): 319-330.
- [9] JOHNSON C S, KOLEVSKI B, SMYTH D R. *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(6): 1 359-1 375.
- [10] LUO Ming, DENNIS E S, BERGER F, et al. *MINISEED3 (MINI3)*, a WRKY family gene, and *HAIKU2 (IKU2)*, a leucine-rich repeat (LRR) KINASE gene, are regulators of seed size in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(48): 17 531-17 536.
- [11] ZHANG Zhong-lin, XIE Zhen, ZOU Xiao-lu, et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(4): 1 500-1 513.
- [12] RUSHTON D L, TRIPATHI P, RABARA R C, et al. WRKY transcription factors: Key components in abscisic acid signaling[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(1): 2-11.
- [13] DU Li-qun, CHEN Zhi-xiang. 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 Journal*, 2000, 24(6): 837-847.
- [14] CHEN Li-gang, SONG Yu, LI Shu-jia, et al. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses[J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 2012, 1 819(2): 120-128.
- [15] BABITHA K C, RAMU S V, PRUTHVI V, et al. Co-expression of *AtbHLH17* and *AtWRKY28* confers resistance to abiotic stress in *Arabidopsis* [J]. *Transgenic Research*, 2013, 22(2): 327-341.
- [16] BO Chen, CHEN Hao-wei, LUO Guo-wei, et al. Maize *WRKY114* gene negatively regulates salt-stress tolerance in transgenic rice[J]. *Plant Cell Report*, 2019, DOI: 10.1007/s00299-019-02481-3.
- [17] PILLAI S E, KUMAR C, PATEL H K, et al. Overexpression of a cell wall damage induced transcription factor, *OsWRKY42*, leads to enhanced callose deposition and tolerance to salt stress but does not enhance tolerance to bacterial infection [J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 177.
- [18] 沈晓蕾, 李向红, 俞健, 等. 大豆分离蛋白、木薯淀粉与转谷氨酰胺酶组合对鲢鱼鱼糜凝胶品质的影响[J]. *食品与机械*, 2019, 35(9): 26-31.
- [19] SONG Hui, WANG Peng-fei, HOU Lei, et al. Global analysis of WRKY genes and their response to dehydration and salt stress in soybean[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 9.
- [20] YU Yan-chong, WANG Nan, HU Rui-bo, et al. Genome-wide identification of soybean WRKY transcription factors in response to salt stress [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 920.
- [21] WEI Wei, CUI Meng-yuan, HU Yang, et al. Ectopic expression of *FvWRKY42*, a WRKY transcription factor from the diploid woodland strawberry (*Fragaria vesca*), enhances resistance to powdery mildew, improves osmotic stress resistance, and increases abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*[J]. *Plant Science*, 2018, 275: 60-74.
- [22] MZID Rim, ZORRIG Walid, BEN AYED Rayda, et al. The grapevine *VvWRKY2* gene enhances salt and osmotic stress tolerance in transgenic *Nicotiana tabacum*[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(6): 277.

---

(上接第 68 页)

- [27] 袁龙, 郑丰, 谢映松, 等. 不同类型烟草样品的热分析研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(30): 16 842-16 843.
- [28] 戴路, 史春云, 卢昕博, 等. 加热不燃烧制品与传统卷烟再造烟叶物理特性及化学成分差异分析[J]. *中国烟草学报*, 2017, 23(1): 20-26.
- [29] 刘珊, 唐培培, 曾世通, 等. 加热状态下烟叶烟气的释放特征[J]. *烟草科技*, 2015, 48(4): 27-31.
- [30] 刘珊, 崔凯, 曾世通, 等. 加热非燃烧型烟草制品剖析[J]. *烟草科技*, 2016, 49(11): 56-65.
- [31] SEVERSON R F, SNOOK M E, ARRENDALER F, et al. Gas chromatographic quantitation of polynuclear aromatic hydrocarbons in tobacco smoke[J]. *Analytical Chemistry*, 1976, 48(13): 1 866-1 872.
- [32] SCHLOTZHAUER W S, CHORTYK O T. Recent advances in studies on the pyrosynthesis of cigarette smoke constituents[J]. *Journal of Analytical & Applied Pyrolysis*, 1987, 12(3): 193-222.