

烟草转录因子 NtWRKY – R1 的转录激活域鉴定

杨金森<sup>1</sup>,宋丹丹<sup>1</sup>,周 祁<sup>1</sup>,宋海龙<sup>2</sup>,赵钰泽<sup>1</sup>,刘卫群<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南农业大学 生命科学学院,河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 国家烟草栽培重点实验室,河南 郑州 450002)

**摘要:** 为确定烟草转录因子 NtWRKY – R1 的转录激活域,本研究将 NtWRKY – R1 的编码区分为 7 个不同片段,分别构建到酵母表达载体 pGBKT7 中与 GAL4 的 DNA 结合域融合,通过酵母双杂交试验确定,NtWRKY – R1 本身具有能够激活 GAL4 BD 转录起始的激活结构域,并将转录激活区定位于该转录因子蛋白肽链的 N 端 75 个氨基酸残基和 C 端 80 个氨基酸残基中。

**关键词:** 烟草; NtWRKY – R1; 转录激活域; 酵母双杂交

**中图分类号:** S572;TS41<sup>+</sup>3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004 – 3268(2015)06 – 0034 – 04

Identification of Activation Domain of Tobacco  
Transcription Factor NtWRKY-R1

YANG Jinmiao<sup>1</sup>, SONG Dandan<sup>1</sup>, ZHOU Qi<sup>1</sup>, SONG Hailong<sup>2</sup>, ZHAO Yuze<sup>1</sup>, LIU Wei-qun<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Key Laboratory of National Tobacco Cultivation, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** To identify the activation domain of tobacco transcription factor NtWRKY-R1, coding region of NtWRKY-R1 was separated to seven fragments and then were fused with GAL4 BD (DNA binding domain) on pGBKT7 vector in this work. The yeast two hybridization assay showed that NtWRKY-R1 could activate the transcription initiation of GAL4 BD, and the activation domain of NtWRKY-R1 was localized in 75 residues at N-terminus and 80 residues at C-terminus of NtWRKY-R1.

**Key words:** tobacco; NtWRKY-R1; transcriptional activation domain; yeast two hybridization

WRKY 转录因子是植物特有的最大的转录因子家族之一,在植物生长活动过程中起着重要的调控作用。该类转录因子含有一个大约 60 bp 的高度保守的 WRKY 结构域,此结构可与 W – box 结合,调控启动子中含 W – box 元件的调控基因或功能基因的表达,从而参与植物的生长发育、生物与非生物胁迫应答反应及次生代谢等一系列生理活动<sup>[1-4]</sup>。Rushton 等<sup>[5]</sup>首次证明 WRKY 转录因子在调控植物对病原菌免疫反应过程中发挥作用,且首次发现并命名了 WRKY1、WRKY2 和 WRKY3。随后的研究发现,WRKY 转录因子通过抑制和去抑制基因转录调控相关基因的表达,进而参与植物体内的多种信号通路,如在谷类淀粉酶研究中,在糊粉层细胞中大量表达的 OsWRKY71 可作为转录抑制因子与 GA

诱导的 α – 淀粉酶基因 *AMY32b* 启动子区域的 W – box 结合,抑制基因转录<sup>[6]</sup>。伤害条件下, *Nicotiana attenuata* 中参与 MAPK 途径的 WRKY3、WRKY36 可以调控 JA 合成,进而介导下游反应来应对伤害响应<sup>[7]</sup>。

转录因子,也称反式作用因子,是一类能结合真核基因启动子区域中的顺式作用元件并调节下游基因表达的蛋白质,它可以激活或抑制下游基因的转录<sup>[8]</sup>。目前研究发现,一般转录因子具有 4 个典型的功能区域,即 DNA 结合区、转录调控区、核定位信号区以及寡聚化位点,这些功能区域决定转录因子的功能特性及分类<sup>[9]</sup>。胡曼等<sup>[10]</sup>从前期建立的烟草打顶前后 SSH cDNA 文库中筛选出一条 wrky – like 的 EST(HO059652) 序列,成功克隆得到该基因

收稿日期:2015 – 02 – 10  
基金项目:国家自然科学基金项目(30971704)  
作者简介:杨金森(1992 – ),男,河南光山人,在读硕士研究生,研究方向:逆境分子生物学。E – mail:liusong0725@126.com  
\* 通信作者:刘卫群(1956 – ),女,河北临城人,教授,博士,主要从事逆境分子生物学研究。E – mail:liuweiqun2004@126.com

并命名为 *NtWRKY - R1*, 但该转录因子的激活结构域并不明确, 本研究拟通过酵母双杂交的策略寻找该区域。酵母双杂交是一种验证或寻找蛋白间相互作用的技术, 诱饵基因与酵母转录因子 GAL4 的 DNA 结合区融合表达后进行文库筛选。前期预试验中将 *NtWRKY - R1* 全长 cDNA 序列构建于 pGBKT7 载体进行酵母双杂交试验, 发现即使是在无 pGADT7 载体存在的情况下, 含有全长 cDNA 的诱饵蛋白仍可在营养缺陷型培养基 SD/- Trp - Ade - His 上正常生长, 这表明 NtWRKY - R1 本身具有完整的能够激活 GAL4 BD 转录起始的结构。为了筛选可能的转录因子 NtWRKY - R1 互作蛋白, 故而需要确定该转录因子的激活区域, 以避免文库筛选时产生的假阳性。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I、*ExTaq* DNA 聚合酶、PCR 产物回收试剂盒等常用分子生物学试剂购自大连宝生物工程有限公司; Cloneexpress™ II One

Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 引物购自上海生工生物工程有限公司; pMD18 - T - NtWRKY - R1 质粒、大肠杆菌 DH5α、酵母 AH109 均由国家烟草栽培重点实验室保存。

1.2 分段克隆试验设计

前期试验结果表明, NtWRKY - R1 本身具有激活 GAL4 BD 转录起始的结构域, 为了确定该结构所在区域, 进行如下的设计: 由于 WRKY 家族蛋白的 DNA 结合区高度保守, 且通过 pfam (<http://pfam.janelia.org/>) 在线软件分析显示 WRKY 保守结构域位于第 76—136 氨基酸残基区域, 故将 NtWRKY - R1 的 WRKY 结构域之前的 N 端 75 个氨基酸残基作为 1 区, 然后以 75 个氨基酸残基片段长度为基准将随后的蛋白质序列分为 3 段, 分别为 2 区、3 区、4 区, 其中 4 区含有 80 个氨基酸残基; 此外 2 区和 3 区合并片段为 5 区; 3 区和 4 区合并片段为 6 区; 2 区、3 区和 4 区合并片段为 7 区 (图 1)。以此 7 种不同的组合方式来确定激活结构域在该转录因子中的位置。

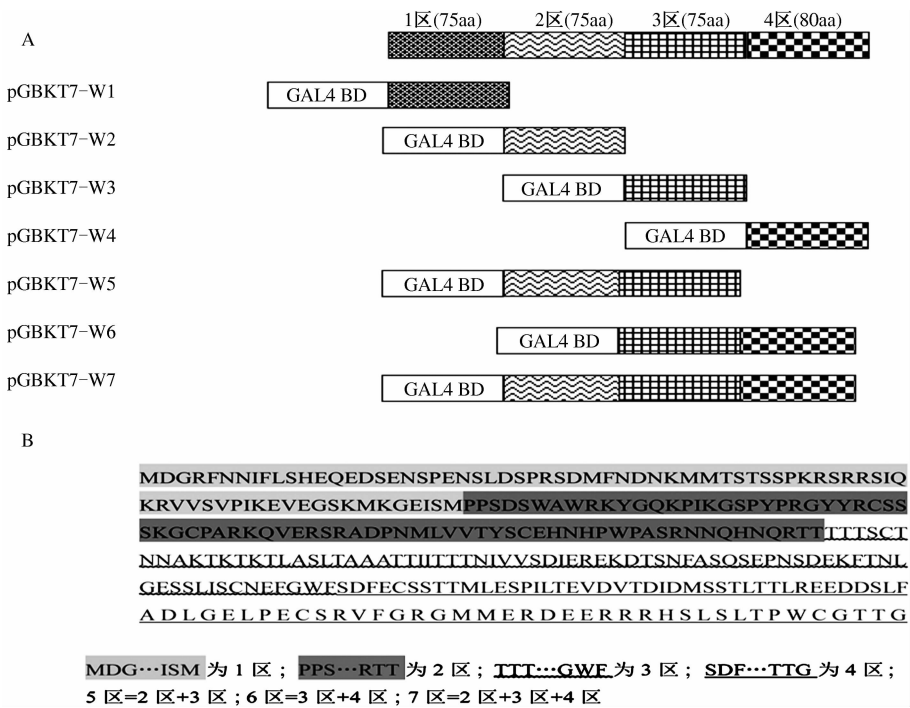


图 1 NtWRKY - R1 蛋白序列分段

1.3 酵母表达重组质粒 pGBKT7 - NtWRKY - R1 的构建及鉴定

利用 Primer Premier 5.0 设计扩增 NtWRKY - R1 编码区的分段引物, 引物序列见表 1, 以 pMD18 - T - NtWRKY - R1 质粒为模板。PCR 反应体系为: 10 × Buffer 5 μL, dNTP Mixture (10 mmol/L) 5 μL,

上、下游引物 (10 mmol/L) 各 2 μL, 模板 2 μL, *ExTaq* DNA 聚合酶 1 μL, 去离子水 33 μL。PCR 反应程序如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 40 s, 65 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。参照 ClonExpress™ II One Step Cloning Kit 说明, 将回收的 NtWRKY - R1 扩增片段和双酶切的

pGBKT7 酵母表达载体混合,重组连接转化至 DH5 $\alpha$  琼脂培养基上,挑取单菌落,进行 PCR 和双酶切鉴定,保存重组质粒。

感受态细胞中,涂布于含卡那霉素(50 ng/ $\mu$ L)的 LB

表 1 分段克隆引物

引物名称	引物序列(5'—3')
W1 - F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCATGGATGGAAGATTCAATAA
W1 - R	TAGTTATGCGGCCGCTGCAGGCATGCTTATTTCAACCCTTC
W2 - F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCCTCCGCCATCTGATTCTTG
W2 - R	TAGTTATGCGGCCGCTGCAGGAGTTGTACGTTGATTGTGTTG
W3 - F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCACCACTACATCATGTACCAATAATG
W3 - R	TAGTTATGCGGCCGCTGCAGGAAACCATCCAAATTCGTTGC
W4 - F	ATGGCCATGGAGGCCGAATTCGCGATTTCGAGTGTCTTCTACT
W4 - R	TAGTTATGCGGCCGCTGCAGGGCCCGTGGTCCCACAC

注:GAATTC 为 *Eco*R I 酶切位点; CGCTGC 为 *Pst* I 酶切位点

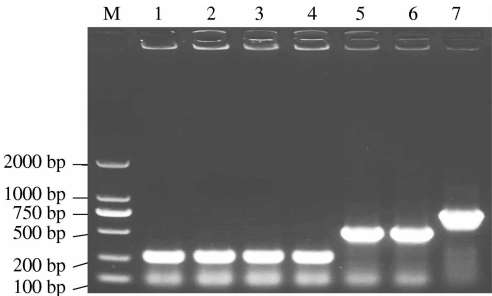
1.4 酵母感受态细胞的制备与转化

酵母感受态细胞制备及转化步骤参见 Yeast Protocols Handbook 手册 (Clontech, USA)。将酵母 AH109 菌株划线于 YPDA 平板上,30 ℃ 培养 3 d。挑取单克隆接种于 10 mL 液体 YPDA 培养基中,30 ℃ 220 r/min 振荡培养 12 ~ 16 h,至 OD<sub>600</sub> 大于 1.5。加入足够量培养物于 100 mL YPDA 中,使 OD<sub>600</sub> 约达 0.2 ~ 0.3,30 ℃ 220 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 约 0.5。转移培养物至 50 mL 离心管中,室温 1 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。弃上清,用灭菌的 1 × TE 重悬菌体,室温 5 000 r/min 离心 5 min。弃上清后,用提前准备的 1 × TE/LiAc 悬浮菌体后分装。将 pGBKT7 空载体质粒与连有 NtWRKY - R1 不同编码区段的 pGBKT7 重组载体质粒分别转入酵母 AH109 感受态细胞中,之后涂于 SD/ - Trp - Ade - His 培养基上,30 ℃ 倒置放置 3 ~ 5 d,观察酵母的生长状况,验证自激活活性。

2 结果与分析

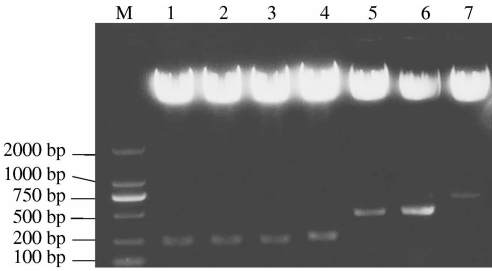
2.1 NtWRKY - R1 编码区的分段克隆及 pGBKT7 - NtWRKY - R1 的构建结果

以 pMD18 - T - NtWRKY - R1 质粒为模板,扩增 NtWRKY - R1 编码区段。用上述引物将 7 个片段分别扩增,得到 7 个长度不同的不同编码区片段,其中 W1、W2、W3 为 225 bp,W4 为 240 bp,W5 为 450 bp,W6 为 465 bp,W7 为 690 bp,回收后与酵母 BD 表达载体 pGBKT7 的 *Eco*R I、*Pst* I 双酶切回收产物进行同源重组连接,转化大肠杆菌后提取质粒进行 PCR 检测。如图 2 所示,PCR 产物大小与已知片段大小一致。同时进一步的双酶切检测结果亦证明,7 个目的片段成功构建到 pGBKT7 载体上,7 个重组载体构建成功(图 3)。



M. DL 2000; 1—7 分别对应 NtWRKY - R1 编码区的第 1—7 片段

图 2 NtWRKY - R1 不同编码区段构建到 pGBKT7 后 PCR 检测结果

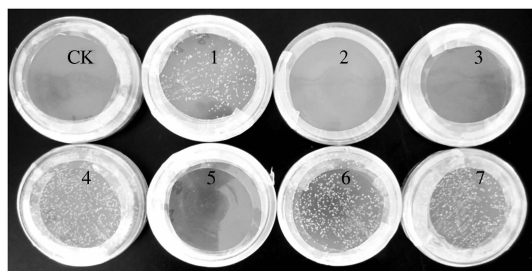


M. DL 2000; 1—7 分别对应 NtWRKY - R1 编码区的第 1—7 片段

图 3 NtWRKY - R1 不同编码区段构建到 pGBKT7 后酶切检测结果

2.2 NtWRKY - R1 转录激活结构域鉴定结果

将 7 个含有 NtWRKY - R1 不同编码区片段的 pGBKT7 重组质粒与 pGBKT7 空载体质粒分别转入酵母菌株 AH109。涂布在含卡那霉素(50 ng/ $\mu$ L)的营养缺陷型培养基 SD/ - Trp - Ade - His 上 30 ℃ 培养 3 d。结果显示,含第 1、第 4、第 6 及第 7 个片段的重组质粒的转化菌株都能正常生长(图 4),而这些片段包含位于 NtWRKY - R1 蛋白 N 端第 1 区和 C 端的第 4 区,由此可以确定,NtWRKY - R1 的转录激活区位于 N 端 75 个氨基酸残基和 C 端 80 个氨基酸残基的区域里。



CK. 含 pGBKT7 空载体的 AH109 菌株; 1—7 分别对应含 NtWRKY - R1 编码区的第 1—7 片段的 AH109 菌株

图 4 NtWRKY - R1 不同区段激活报告基因表达情况

### 3 结论与讨论

转录因子作为植物适应生物及非生物逆境胁迫的重要调控因子,其蛋白质结构上至少应该包括 2 个相对独立的结构域,即 DNA 结合结构域与转录调控(转录激活或抑制)结构域,2 个结构域共同作用于下游调控基因的顺式作用元件(启动子),以激活或抑制相关基因的转录<sup>[11]</sup>。另有研究发现,真核生物转录因子的 DNA 结合结构域一般位于蛋白的保守区域,而转录调控结构域一般位于 N 端的丝氨酸 - 苏氨酸富集区、谷氨酸富集区、脯氨酸富集区和 C 端酸性氨基酸区<sup>[12]</sup>。因此,分析转录因子的 DNA 结合结构域与转录调控结构域对于研究转录因子功能、揭示其调控机制具有重要作用。Yi 等<sup>[13]</sup>分析水稻 OsPTF1 转录因子激活活性发现,激活活性位点位于转录因子的 N 端;而关于 OsPHR1 与 OsPHR2 的转录激活活性研究表明,激活活性位点也位于该转录因子的 N 端。本研究采用酵母双杂交试验分析发现,转录因子 NtWRKY - R1 的转录激活结构域位于蛋白质肽链的 N 端与 C 端,并将其转录激活区成功定位于蛋白质肽链的 N 端 75 个氨基酸残基和 C 端 80 个氨基酸残基内。可见,NtWRKY - R1 蛋白包含 2 个转录激活区,提示:如果利用酵母双杂交筛选、鉴定与转录因子 NtWRKY - R1 相互作用的蛋白质时,构建的诱饵载体需将鉴定出的 N 端的 75 个氨基酸和 C 端的 80 个氨基酸去除,以免在酵母双杂交试验中大量假阳性的出现。

#### 参考文献:

[1] Miao Y, Smykowski Y, Zentgraf U. A novel upstream regulator of WRKY53 transcription during leaf senescence in

*Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Biol, 2008, 10: 110-120.

[2] Chen L, Song Y, Li S, et al. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2012, 1819(2): 120-128.

[3] Wu X, Shiroto Y, Kishitani S, et al. Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28(1): 21-30.

[4] Howe G A, Jander G. Plant immunity to insect herbivores [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 41-66.

[5] 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(20): 5690-5700.

[6] Zhang Z L, Xie Z, Zou X, et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. Plant Physiol, 2004, 134(4): 1500-1513.

[7] 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.

[8] Liu Q, Zhang G Y, Chen S Y. Structure and regulatory function of plant transcription factor [J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(4): 271-278.

[9] Liu L, White M J, MacRae T H. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation [J]. Eur J Biochem, 1999, 262(2): 247-257.

[10] 胡曼, 宋丹丹, 杨金森, 等. 烟草 WRKY - R1 基因的克隆及瞬时表达分析 [J]. 山东农业科学, 2014, 46(9): 12-16.

[11] Heim M A, Jakoby M, Werber M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. Molecular Biology and Evolution, 2003, 20: 735-747.

[12] Riechman J L, Heard J, Martin G, et al. *Arabidopsis* transcription factors: Genome wide comparative analysis eukaryotes [J]. Science, 2000, 290: 2105-2110.

[13] Yi K, Wu Z, Zhou J, et al. OsPTF1, a novel transcription factor involved in tolerance to phosphate starvation in rice [J]. Plant Physiol, 2005, 138: 2087-2096.