

• 药材与资源 •

白木香转录因子 AsWRKY62 的分子克隆、原核表达及特性分析

孙佩文¹, 唐小琳¹, 吕菲菲², 徐艳红^{1*}, 魏建和^{1,2*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193
2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所 海南省南药资源保护与开发重点实验室 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室, 海南 海口 570311

摘要: 目的 对白木香 *Aquilaria sinensis* AsWRKY62 转录因子进行分子克隆、原核表达, 并对其进行生物信息学分析和表达特性分析, 为深入研究 AsWRKY62 在白木香生长发育、沉香形成等方面的功能奠定基础。方法 以白木香愈伤组织总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 及 PCR 技术克隆基因编码序列 (CDS) 全长; 构建 pET-21a-AsWRKY62 原核表达载体, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态进行原核诱导表达; 并通过生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域和亚细胞定位等特性; 用软件 DNAMAN 和 MEGA 5 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析, 通过组织特异性表达分析不同组织中的基因表达模式。结果 AsWRKY62 (GenBank 注册号 MH925301) 基因 CDS 全长为 1 581 bp, 编码一条由 526 个氨基酸组成的多肽, 结构域分析表明其属于 WRKY group I 类蛋白; 密码子优化后的 pET-21a-AsWRKY62 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功诱导的较适条件为 0.5 mmol/L IPTG 37 °C 连续培养 4 h; AsWRKY62 基因具有组织特异性, 其在根、茎中表达量最高, 其次是沉香层和花中。结论 本研究首次在白木香中克隆 AsWRKY62, 并进行原核表达和生物特性分析, 表明其可能与沉香的形成有关, 也为进一步研究其生物学功能提供了理论依据。

关键词: 白木香; WRKY; 转录因子; 原核表达; 特性分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2675-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.026

Molecular cloning, prokaryotic expression and characterization of a transcription factor AsWRKY62 in *Aquilaria sinensis*

SUN Pei-wen¹, TANG Xiao-lin¹, LV Fei-fei², XU Yan-hong¹, WEI Jian-he^{1,2}

1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
2. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China

Abstract: Objective The molecular cloning and prokaryotic expression of the transcription factor AsWRKY62 of *Aquilaria sinensis* were carried out, at the same time, the bioinformatics analysis and expression pattern analysis were also performed. The purpose of this study was to lay a foundation for further study on the role of AsWRKY62 in the growth and development of *A. sinensis* and the formation of agarwood. **Methods** With the cDNA isolated from *A. sinensis* callus as template, the full-length coding sequence (CDS) of AsWRKY62 was amplified using RT-PCR and PCR method. The recombinant vector pET-21a-AsWRKY62 which was built and verified by gene recombination technique was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for prokaryotic expression and purification. The characteristics of physiochemical properties, conserved domains and subcellular localization of AsWRKY62

收稿日期: 2018-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673549); 国家自然科学基金资助项目 (81573525); 海南省重大科技专项 (ZDKJ2016004); 中组部“万人计划” (99950534)

作者简介: 孙佩文 (1990—), 女, 博士研究生, 研究方向为药用植物次生代谢调控机制研究。E-mail: spwfighting@163.com

*通信作者 徐艳红, 女, 博士, 副研究员, 研究方向为药用植物次生代谢产物调控机制研究。E-mail: xuyan hong99@163.com
魏建和, 男, 博士, 研究员, 研究方向为药用植物遗传育种及栽培学。E-mail: wjianh@263.net

were calculated by a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple sequence alignment of amino acid and phylogenetic tree were performed using DNAMAN and MEGA 5.0, respectively. The gene expression pattern in different tissues was detected by RNA-seq data.

Results The full length CDS of AsWRKY62 (GenBank accession MH925301) was 1581 bp, encoding a 526-aa protein which belongs to WRKY group I. The optimized induction conditions of recombinant pET-21a-AsWRKY62 were 0.5 mmol/L IPTG at 37 °C for 4 h. According to the tissue-specific expression pattern analysis, the AsWRKY62 gene in *A. sinensis* is mainly expressed in roots and stems, followed by agarwood and flowers. **Conclusion** Cloning, expression and characterization of the AsWRKY62 gene for the first time indicated that it may be related to the formation of agarwood, which provided a theoretical basis for further study of its biological function.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour) Gilg; WRKY; transcription factor; prokaryotic expression; characteristic analysis

白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour) Gilg 为瑞香科沉香属植物,是我国名贵芳香理气类药材沉香的唯一正品来源,主要分布在我国海南、广东、广西、福建、云南和台湾等地。健康的白木香树不能产生沉香,只有受到外界伤害后才能在伤口及周围形成沉香^[1-3]。但在野外自然条件下,沉香结香率非常低。由于长期以来的过度开发使用,全世界产沉香的沉香属及拟沉香属物种均列入了《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录 II^[4]。全面解析沉香形成机制,不断创新高效沉香结香技术才是解决沉香资源问题的关键。本课题组前期通过多种实验手段揭示了沉香是伤害诱导白木香防御反应的产物^[5-6],但是伤害信号到倍半萜合成的分子机制仍有很多地方需要明确。

在长期进化过程中,植物形成了复杂且精细的基因表达调控系统来应对不同的环境变化和满足自身生长发育的需要;其中转录因子发挥着重大作用。研究表明,WRKY 家族是一类植物特有的转录因子,通过与靶基因互作,或与靶蛋白互作^[7],激活水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)和乙烯(ethylene, ET)等信号通路来改变相关基因的转录水平,从而参与植物生长发育以及生物与非生物胁迫防御反应等过程^[8-17]。紫穗槐二烯合酶(armorpha-4,11-diene synthase, ADS)是参与青蒿素生物合成分支途径中的关键酶,研究发现 AaWRKY1 能够与 ADS 启动子的 W-BOX 结合并激活 ADS 的启动与表达,说明在黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中 AaWRKY1 转录因子参与了青蒿素合成的调控^[18]。棉花 *Gossypium hirsutum* L. 中以棉酚为代表的倍半萜醛类化合物,是棉花诱导防御反应的重要组分;而(+)- δ -杜松烯合酶(CAD1)是棉酚合成途径的关键酶,研究表明,在转基因拟南芥中, GaWRKY1 的过量表达能激活 CAD1-A 基因启动子的转录活性,提示 GaWRKY1 可能参与棉酚合成途径中 CAD1-A 的转录调控^[19]。此外,水稻 OsWRKY78 能调节茎秆的伸长和种子的发育^[20];过表达的 AtWRKY39 增强了拟

南芥植株的耐热性^[9];辣椒 *Capsicum annuum* L. 中的 CaWRKY27 在烟草 *Nicotiana tabacum* L. 中能通过调节 SA、JA 及乙烯信号通路正调控其对青枯菌 *Ralstonia solanacearum* E. F. Smith 的抗性^[8]; GhWRKY68 能够通过调节脱落酸(ABA)的含量增强 ABA 响应基因的转录水平来调节盐胁迫和干旱胁迫^[10]。总之,WRKY 转录因子在植物的生长发育、胁迫响应、信号传递方面发挥着重要的作用。

目前,白木香中 WRKY 转录因子的克隆和功能研究还未见报道。本课题组前期对不同伤害处理时间的白木香茎段进行了转录组学测定,发现伤害处理导致白木香倍半萜合酶的表达发生显著变化,有些 WRKY 转录因子受伤害诱导与倍半萜合酶基因协同表达,表明 WRKY 转录因子可能参与沉香倍半萜的合成^[3]。本实验首次对白木香 AsWRKY62 基因进行克隆、原核表达,并对其进行了生物信息学和表达特性分析,为进一步揭示其生物学功能奠定基础。

1 材料

原药材经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所魏建和教授鉴定为白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour) Gilg。生长良好且基本一致的白木香愈伤组织,25 °C 黑暗培养,取样后置于液氮中速冻后,-80 °C 冰箱保存备用。

2 方法

2.1 总 RNA 提取

利用植物 RNA 快速提取试剂盒(Aidlab 有限公司,中国)提取健康白木香愈伤组织总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,分光光度计 NanoDrop (Thermo Scientific, 美国)测定 RNA 浓度。

2.2 AsWRKY62 基因扩增

取 1 μ g RNA 利用 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(Takara 公司,日本)进行反转录;根据转录组数据中 AsWRKY62 CDS 全长序列设计特异引物,上游加入 Hind III 酶切位点:-cccAAGCTTATGGCGGATAAGCAGGCAGAG-,下

游加入 Xho I 酶切位点: -ccgCTCGAGCACCCCT TATTTGCTCTTCTTTTAGCC-; 以得到的白木香单链 cDNA 为模板, 用 Premix PrimeStar HS (TAKARA 有限公司, 日本) 进行扩增, 终体系为 50 μ L; 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C、30 s, 59 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、2 min, 34 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物用胶回收试剂盒 (天根有限公司, 中国) 回收, 连接到 Blunt Simple T 载体上 (全式金有限公司, 中国), 转化 *E. coli* Trans1-T1 感受态 (全式金有限公司, 中国) 由北京三博远志生物科技有限公司测序。

2.3 AsWRKY62 生物信息学分析

采用 ExPASy Proteomics Server 提供的在线工具 Protparam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 预测基因编码蛋白的理化性质; 采用 TMHMM 2.0 进行跨膜结构域预测; 在线 InterProScan 对蛋白功能域进行分析。将 AsWRKY62 翻译的氨基酸序列与 NCBI 数据库中的 WRKY 氨基酸序列在线 BLASTP 比对, 通过 MEGA5 软件构建 neighbor-joining (NJ) 系统进化树。进化距离的计算采用泊松校正法, Bootstrap 重复次数为 1 000 次。

2.4 AsWRKY62 表达特性分析

为了明确 AsWRKY62 基因在不同组织 (根、茎、老叶、嫩叶、花、沉香层) 中的表达特性, 利用荧光定量 PCR 进行表达量的检测。仪器采用罗氏 LightCycle 96 实时 PCR 检测系统, 反应体系为 2 $\times$ SYBR Premix ex TaqTM 5 μ L; 正反向引物浓度均为 0.5 μ L; cDNA 模板 0.5 μ L; 加水补足至 10 μ L, 每个反应体系重复 3 次。实时 PCR 扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C、30 s; 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、20 s, 40 个循环。实时 PCR 反应均以三磷酸甘油醛脱氢酶基因 (GADPH) 为内参, 引物序列见表 1。

2.5 原核表达载体的构建

将测序正确的 Blunt Simple-As WRKY62 重组质粒和 pET-28a 载体质粒分别用 Hind III 和 Xho I

进行双酶切, 回收酶切片段后, 利用 T4 连接酶 (NEB, 英国) 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 将连接产物转化 *E. coli* Dh5 α 感受态 (天根有限公司, 中国) 后, 均匀涂布在含有 50 ng/ μ L Kan 的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16 h。经菌液 PCR 和酶切鉴定为阳性的 pET-28a-AsWRKY62 质粒转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态中进行表达。

利用原核表达密码子优化软件对 AsWRKY62 的碱基序列, 并引入 Nde I 和 Xho I 2 个限制性内切酶酶切位点, 在不改变氨基酸序列的前提下进行大肠杆菌密码子偏好性优化, 并由北京擎科生物科技有限公司合成。将合成的优化后基因连接至 pET-21a 载体, 经双酶切鉴定后转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株进行表达。

2.6 AsWRKY62 的原核表达

将含有重组质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 阳性克隆震荡培养过夜, 菌液以 1:100 比例稀释到含有 50 ng/ μ L Kan 的液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 A_{600} 为 0.4~0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 与 0.5 mmol/L, 分别继续培养 4 h 与 6 h, 离心收集菌体, 经 1 $\times$ PBS (pH 7.4) 重悬, 沸水煮沸 5 min 使蛋白变性后, 经 10% SDS-PAGE 电泳检测分析。为了鉴定重组蛋白的表达形式, 在诱导结束后, 将菌液低温条件下 5 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。加入适量 1 $\times$ PBS 缓冲液重悬菌体, 冰水浴超声破碎菌体, 13 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀, 进行 10% SDS-PAGE 电泳检测分析。

2.7 Western blotting 鉴定表达蛋白

按照 Western blotting 方法, 将菌体蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 300 mA 恒流转膜 1 h 到 PVDF 膜上, 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 用 5% 脱脂牛奶封闭 4 h, 然后用抗 HIS 标签鼠单克隆抗体 (全式金有限公司, 中国) 稀释 2 000 倍 4 $^{\circ}$ C 孵育震荡过夜; 次日, 用 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 用兔抗鼠 IgG 抗体 (1:5 000) 孵育 1 h 后, 用 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 显色, 化学发光成像仪 (ImageQuant LAS 4000 mini) 成像, 并保存。

3 结果与分析

3.1 AsWRKY62 基因的克隆

本研究通过 PCR 扩增并经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证, 在 1 581 bp 处出现 1 条特异性条带, 如图 1 所示; 经 BLAST 分析表明其与 Genbank 中已注册的多种植物 WRKY 转录因子有较高的相似性, 提

表 1 RT-PCR 中用到的引物

Table 1 Primers used in RT-PCR assay

RT-PCR 引物	引物序列 (5'→3')
AsWRKY62	正向: ATCAAGCGACAGTGAGGAAGG
	反向: GTGCACTTGTAATAGCTCCTTGG
GADPH	正向: CTGGTATGGCATTCCGTGTA
	反向: AACCACATCCTCTTCGGTGTA

交 Genbank 获得基因注册号为 MH925301。利用 ORF Finder 对获得的该 cDNA 序列分析表明, 其包含完整的开放阅读框 (ORF) 序列为 1 581 bp, 编码 526 个氨基酸; 说明通过克隆已得到 AsWRKY62 基因的 CDS 全长序列。

3.2 AsWRKY62 的生物信息学分析

3.2.1 理化特性分析 在线软件 ProtParam 预测 AsWRKY62 蛋白的分子式为 $C_{2481}H_{3863}N_{762}O_{801}S_{15}$,

相对分子质量为 57 172, 等电点 6.45, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 57, 负电残基 (Asp+Glu) 为 62, 脂肪系数为 56.43, 该蛋白的不稳定系数为 63.03, 为不稳定蛋白, 平均亲水性系数为 -0.821, 预测为亲水蛋白。

3.2.2 结构域、跨膜区及亚定位分析 InterProScan 软件对 AsWRKY62 蛋白分析结果显示, AsWRKY62 蛋白具备高等植物 WRKY 蛋白的保守 WRKY 结构域 (235~296; 405~473); TRMMHMM 跨膜预测 AsWRKY62 编码的蛋白没有跨膜结构域, 非膜蛋白, 为胞外蛋白; SignalP 4.1 Server 预测结果显示 AsWRKY62 蛋白为非分泌蛋白, 不具有信号肽; Plant-mPloc 亚细胞预测定位结果表明该蛋白定位在细胞核中。

3.3 AsWRKY62 氨基酸序列的系统进化树分析

利用 NCBI 在线 BlastP 工具, 将 AsWRKY62 与 GenBank 中其他植物的 WRKY 蛋白进行比对, 结果如图 2 所示, WRKY62 蛋白具有高度保守性, 含有 WRKY 家族保守的 2 个功能结构域 WRKYGQK, 以及 2 个 C_2H_2 锌指结构元件 ($C-X_4-C-$

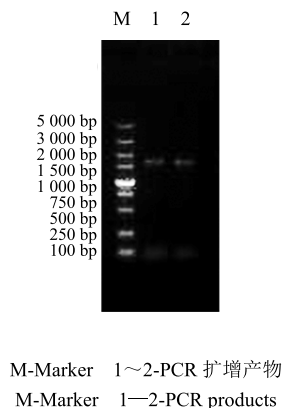
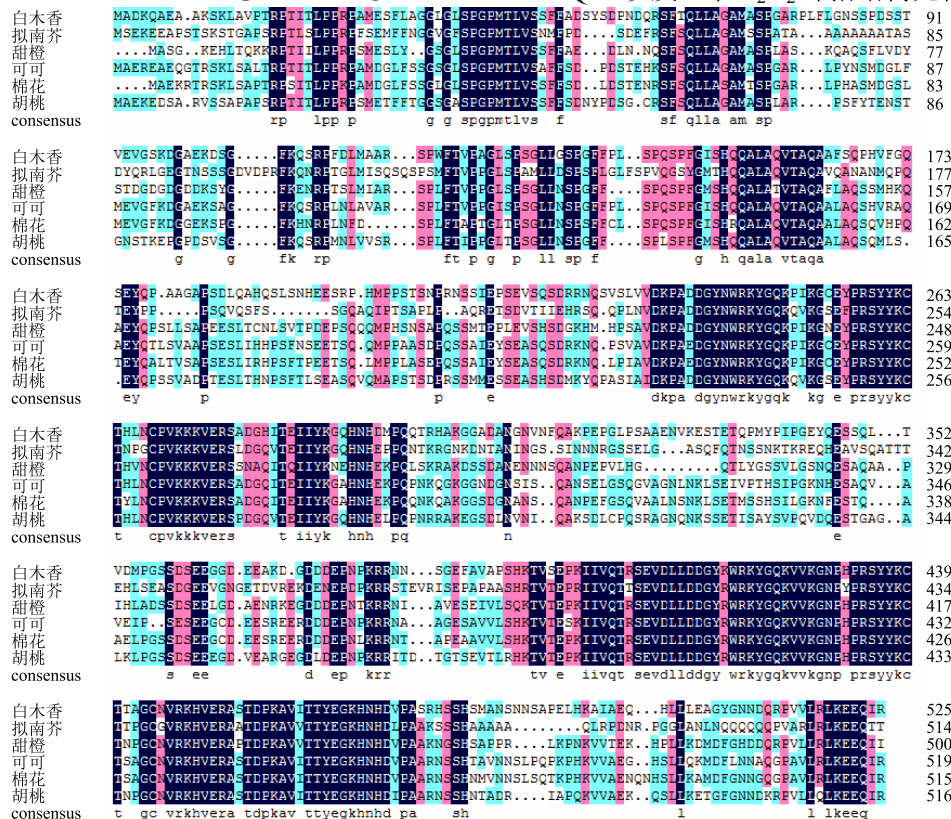


图 1 AsWRKY62 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR results of AsWRKY62 CDS sequence cloning



藏蓝色表示同源级别为 100%, 粉色表示同源级别大于 75%, 浅蓝色表示同源级别大于 50%

Tibetan blue indicates a homology level of 100%, pink indicates a homology level greater than 75%, and light blue indicates a homology level greater than 50%

图 2 AsWRKY62 与其他植物来源的 5 个 WRKY 氨基酸序列比对

Fig. 2 Multiple sequence alignment of AsWRKY62 and five WRKY protein from plants

X₂₂₋₂₃-H-X₁-H), 属于 WRKY group I 家族, 与拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、棉花 *Gossypium hirsutum* Linn.、可可 *Theobroma cacao* L.、甜橙 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck、胡桃 *Juglans regia* L. 的同源性高达 70%。17 个物种的 WRKY 构建的系统发育 NJ 树见图 3, AsWRKY62 与棉花和可可、黄麻 *Corchorus capsularis* L. 聚在同一个分支, 说明选中蛋白与 3 者的亲缘关系最近, 功能上可能也类似。

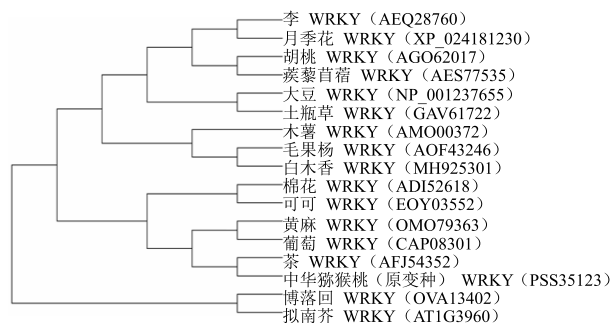


图 3 AsWRKY62 与其他植物来源的 16 个 WRKY 蛋白的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of AsWRKY62 with 16 WRKY protein from other plants.

3.4 AsWRKY62 基因组织表达

如图 4 所示, AsWRKY62 基因在沉香层、根、茎、叶、花中都有表达, 但相对表达量存在差异, 在根、茎及老叶中的相对表达量最高, 其次是沉香和花中, 在嫩叶中的表达量最低; 说明该转录因子可能在白木香的生长发育和沉香形成过程中均能发挥重要作用。

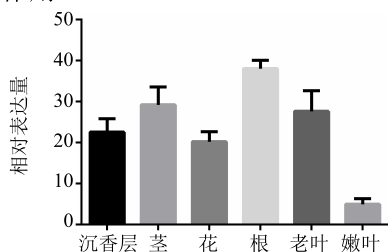


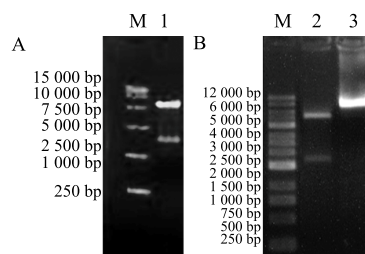
图 4 AsWRKY62 基因在组织中的表达情况

Fig. 4 Expression of AsWRKY62 gene in tissue

3.5 原核表达载体的构建

pET-28a 与 AsWRKY62 的连接产物转入 Dh5α 感受态中, 挑取单克隆菌液 PCR 鉴定, 并对重组质粒进行双酶切验证, 如图 5-A 所示, 重组质粒被切成 2 条片段, 且与目的片段和载体的大小一致, 表明目的片段已成功插入 pET-28a 载体中; 另外, 优化后的

AsWRKY62 与 pET-21a 也成功连接, 双酶切验证结果如图 5-B 所示; 上述结果表明原核表达载体 pET-28a-AsWRKY62 及 pET-21a-AsWRKY62 构建成功。



M-Marker 1-pET-28a-AsWRKY62 双酶切 2-pET-21a-AsWRKY62 双酶切 3-pET-21a-AsWRKY62 质粒
M-Marker 1-identification of pET-28a-AsWRKY62 2-identification of pET-21a-AsWRKY62 3-plasmid of pET-21a-AsWRKY62

图 5 AsWRKY62 原核表达载体的构建及验证结果

Fig. 5 Construction and verification of AsWRKY62 prokaryotic expression vector

3.6 重组蛋白的原核表达

将重组载体 pET-28a-AsWRKY62 转入大肠杆菌表达感受态 BL21 (DE3) 中, 经多次实验条件的调整发现, 目的蛋白没有顺利成功表达; 然后根据大肠杆菌的密码子偏好性进行优化 (图 6), 构建了 AsWRKY62-pET-21a 载体, 其转化 BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态后, AsWRKY62 成功诱导表达, 较为合适的条件是 0.5 mmol/L IPTG 37 °C 200 r/min 连续诱导培养 4 h, 结果见图 7。将 10 mL 重组质粒菌液诱导完成后, 超声破碎低温离心, 将上清和沉淀分别上样以明确目的蛋白 AsWRKY62 的表达形式; 如图 8 所示, 含有重组质粒的菌体经 IPTG 诱导后, 在 57 000 出现 1 条特异蛋白条带, 且在上清和沉淀中都检测到了目标条带, 在沉淀中的浓度略高一点, 但差异不是很大, 说明 AsWRKY62 蛋白可以作为可溶性蛋白的形式得以诱导。

3.7 重组蛋白的鉴定

重组工程菌经诱导表达, 超声破碎后收集上清液, 然后利用 HIS 标签蛋白抗体进行检测, 结果表明该融合蛋白可与 HIS 抗体发生特异性结合, 如图 9 所示, 说明 AsWRKY62 原核蛋白表达成功。

4 讨论

白木香是典型的伤害诱导型药用植物, 沉香是伤害诱导白木香防御反应的产物^[5-6], 本研究首次从白木香中克隆了 AsWRKY62 基因, 初步分析表明,



图 6 AsWRKY62 基因编码序列的优化

Fig. 6 Optimization of AsWRKY62 gene coding sequences

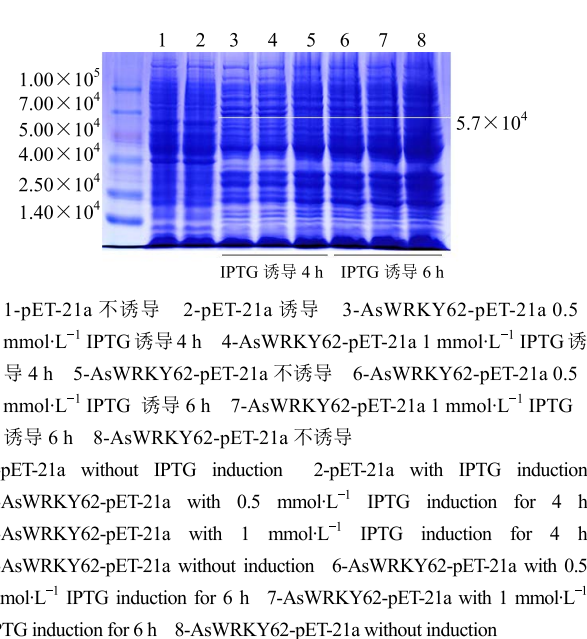


图 7 AsWRKY62-pET-21a 原核表达结果

Fig. 7 Prokaryotic expression of AsWRKY62-pET-21a

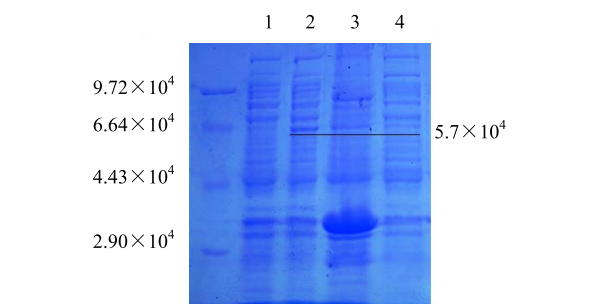


图 8 AsWRKY62-pET-21a 诱导蛋白存在形式确定

Fig. 8 Existence form of induced protein of AsWRKY62-pET-21a

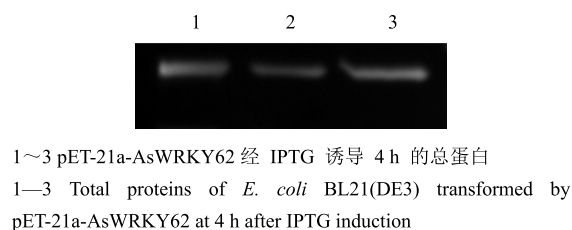


图9 AsWRKY62 的 Western blotting 结果

Fig. 9 Western blotting result of AsWRKY62

AsWRKY62 包含 2 个 WRKY 结构域和 2 个 C₂H₂ 型锌指结构元件, 具有 WRKY group I 家族保守的结构特点; 系统发育树分析其与多物种的 WRKY 蛋白基因一致性较高, 是编码白木香 WRKY 蛋白的新基因。WRKY 家族基因的分子表达特性差异与其所调控的生理代谢过程关系密切。组织特异性研究表明, AsWRKY62 基因在根、茎及老叶中表达丰度最高, 沉香层和花中次之, 在幼嫩的叶中表达量最低, 而根、茎就是沉香形成的主要部位, 说明 AsWRKY62 可能不仅参与了沉香的结香过程, 还可能与调控白木香的正常生长发育特别是衰老有关系。

由于密码子使用频率和偏好性的差异, 用原核表达载体表达真核生物的基因, 通常会出现表达量低甚至不表达的情况, 本实验利用 *E. coli* codon usage analyzer^[21]对 AsWRKY62 基因的密码子进行分析表明: 该基因中含有 22% 的大肠杆菌稀有密码子, 并且有 21 处出现了连续 2~3 个稀有密码子, 这可能就是 AsWRKY62-pET-28a 没有表达成功的原因。为了获得高表达的原核表达重组载体, 实验利用全基因合成的方法, 将白木香 AsWRKY62 基因序列优化为满足大肠杆菌密码子偏好的序列, 并构建了原核表达载体 AsWRKY62-pET-21a。诱导表达结果显示, 新构建的 AsWRKY62-pET-21a 经 IPTG 诱导后, AsWRKY62 蛋白可以以可溶蛋白的形式得到稳定表达。在水稻中, WRKY62 正向调控二萜类抗毒素 (DP, diterpenoid phytoalexin) 的生物合成, 但其同源二聚体却是 1 个 DPF (diterpenoid phytoalexin factor) 抑制子^[22]; 在拟南芥中, AtWRKY62 受茉莉酸甲酯 (MeJA) 和 SA 诱导, 与 AtWRKY38 和组蛋白去乙酰化酶 HDA19 互作, 共同调节植物的基本防御反应^[23-24]。而白木香中, AsWRKY62 是否能与倍半萜合酶基因作用及其调控功能如何尚待进一步研究。染色体免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIp) 等实验可以用来鉴定转录因子的作用位点和直接调控的下游基因, 但这些方法需

要特异性很高的蛋白抗体。本研究通过原核表达实验条件的摸索, 得到了 AsWRKY62 蛋白稳定表达的方法, 为下一步 AsWRKY62 蛋白的纯化和多克隆抗体制备奠定了基础, 也为进一步全面解析 AsWRKY62 在沉香形成过程及白木香发育过程中的作用提供了理论依据。

参考文献

- [1] Ito M, Okimoto K, Yagura T, *et al.* Induction of sesquiterpenoid production by methyl-jasmonate in *Aquilaria sinensis* cell suspension culture [J]. *J Essent Oil Res*, 2005, 17(2): 175-180.
- [2] Kumeta Y, Ito M. Characterization of δ -guaiane synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(4): 1998-2007.
- [3] Xu Y H, Zhang Z, Wang M X, *et al.* Identification of genes related to agarwood formation: Transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 227-243.
- [4] CITES. Amendments to appendix I and II of CITES [A] // in proceedings of thirteenth meeting of the conference of the parties [C]. Thailand: Bangkok, 2004.
- [5] 张 争, 杨 云, 魏建和, 等. 白木香结香机制研究进展及其防御反应诱导结香假说 [J]. *中草药*, 2010, 41(1): 156-159.
- [6] 张兴丽. 白木香中伤害诱导形成的沉香是防御反应的产物 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [7] Jiang J J, Ma S H, Ye N H, *et al.* WRKY transcription factors in plant responses to stresses [J]. *J Integr Plant Biol*, 2017, 59(2): 86-101.
- [8] Dang F, Wang Y, She J, *et al.* Overexpression of CaWRKY27, a subgroup IIc WRKY transcription factor of *Capsicum annuum*, positively regulates tobacco resistance to *Ralstonia solanacearum* infection [J]. *Physiol Plant*, 2014, 150(3): 397-411.
- [9] Li S, Zhou X, Chen L, Huang W, *et al.* Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* WRKY39 in heat stress [J]. *Mol Cells*, 2010, 29(5): 475-483.
- [10] Jia H, Wang C, Wang F, *et al.* GhWRKY68 reduces resistance to salt and drought in transgenic *Nicotiana benthamiana* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120646.
- [11] Xie Z, Zhang Z L, Zou X, *et al.* Interactions of two abscisic acid induced WRKY genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells [J]. *Plant J*, 2006, 46(2): 231-242.
- [12] Wang D, Amornsiripanitch N, Dong X. A genomic

- approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants [J]. *PLoS Pathog*, 2006, 2(11): e123.
- [13] Liu X, Bai X, Wang X, *et al*. OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response [J]. *J Plant Physiol*, 2007, 164(8): 969-979.
- [14] 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): 1359-1375.
- [15] Zhang Z L, Xie Z, Zou X, *et al*. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1500-1513.
- [16] Wei W, Zhang Y, Han L, *et al*. A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(4): 795-803.
- [17] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, *et al*. WRKY transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15: 247-258.
- [18] Ma D M, Pu G B, Lei C Y, *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(12): 2146-2161.
- [19] 许燕华. 棉花转录因子 GaWRKY1 对棉酚合成途径关键酶基因 CAD1-A 转录调控的研究 [D]. 北京: 中国科学院, 2004.
- [20] Zhang C Q, Xu Y, Lu Y, *et al*. The WRKY transcription factor OsWRKY78 regulates stem elongation and seed development in rice [J]. *Planta*, 2011, 234(3): 541-554.
- [21] 黄俊, 张灵霞, 胡松年, 等. LZ-8 蛋白的原核密码子优化表达及免疫调节功能的初步检测 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2008, 34(1): 7-12.
- [22] Fukushima S, Mori M, Sugano S, *et al*. Transcription factor WRKY62 plays a role in pathogen defense and hypoxia-responsive gene expression in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(12): 2541-2551.
- [23] Mao P, Duan M, Wei C, *et al*. WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(6): 833-842.
- [24] Kim K C, Lai Z, Fan B, *et al*. *Arabidopsis* WRKY38 and WRKY62 transcription factors interact with histone deacetylase 19 in basal defense [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(9): 2357-2371.