

研究报告

Research Report

美洲南瓜 *WRKY4* 基因克隆与序列分析

徐岭贤[✉], 赵福宽[✉], 孙清鹏[✉], 郝芮[✉]

北京农学院生物技术学院, 北京, 102206

✉ 通讯作者: zhaofukuan@sina.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012年, 第10卷, 第69篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0069

收稿日期: 2012年07月01日

接受日期: 2012年08月17日

发表日期: 2012年12月19日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012年第10卷第6期701-706页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

徐岭贤等, 2012, 美洲南瓜 *WRKY4* 基因克隆与序列分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.69 pp.1505-1510 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0069)

引用格式(英文):

Xu et al., 2012, Cloning and Sequence Analysis of *WRKY4* Gene in Zucchini (*Cucurbita pepo*), Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.69 pp.1505-1510 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0069)

摘要 美洲南瓜(*Cucurbita pepo*)幼叶为材料, 采用 Trizol 方法进行总 RNA 的提取。根据 GenBank 上已提交的黄瓜 *WRKY4* 基因序列保守区域设计特异性引物, 扩增得到 1 条长度为 497 bp 的 *WRKY4* 转录因子基因片段, 利用已知中间序列, 通过 RT-PCR 和 RACE (rapid amplification cDNA ends)等技术, 克隆得到美洲南瓜 *WRKY4* 的 cDNA 全长序列, 长度为 1 722 bp, 5'非翻译区为 185 bp, 3'非翻译区为 118 bp, 开放阅读框为 1 419 bp, 编码 472 个氨基酸, 分子量约为 51.40 kD, 等电点约为 8.36, GenBank 登录号为 JX096811。用 Blast 和 DNAMAN 软件对其核苷酸序列进行分析, 结果显示, 美洲南瓜 *WRKY4* 与黄瓜 *WRKY4* 同源性达到 87%。美洲南瓜 *WRKY4* 基因克隆及序列分析为以后研究此基因的功能奠定了基础。

关键词 美洲南瓜; *WRKY4*; 田间验证; 田间验证; 田间验证

Cloning and Sequence Analysis of *WRKY4* Gene in Zucchini (*Cucurbita pepo*)

Xu Lingxian[✉], Zhao Fukuan[✉], Sun Qingpeng[✉], Hao Rui[✉]

College of Biotechnology, Beijing University of Agriculture, Beijing, 102206, P.R. China

✉ Corresponding author, zhaofukuan@sina.com ✉ Authors

Abstract Total RNA was extracted from leaves of zucchini (*Cucurbita pepo*) by using Trizol method. A cDNA fragment with 497 bp in length was amplified by specific primers designed based on the conserved domains of published *WRKY4* sequences of cucumber in GenBank. Then full length of zucchini *WRKY4* was obtained by RT-PCR and RACE that was deposited in GenBank with Accession No JX096811. The zucchini *WRKY4* cDNA has 1 722 bp in length including 5' untranslated region of 185 bp, 3' untranslated region of 118 bp with poly A, and an open reading frame of 1 419 bp encoding putative protein of 472 amino acids, the molecular weight of putative protein is 51.40 kD and its pI is 8.36. The nucleotide sequences were analyzed by using BLAST and DNAMAN software and the results showed that identity between zucchini *WRKY4* and cucumber *WRKY4* reached 87%. The cloning of *WRKY4* gene from zucchini might provide the basis for further studying the role of *WRKY4*.

Keywords Zucchini (*Cucurbita pepo*); *WRKY4*; Accession No.JX096811; Sequence analysis

WRKY 蛋白是植物特有的超级转录因子家族, 属于锌指型转录调控因子, 其家族成员含有 1~2 个与 DNA 结合的 *WRKY* 域, 该 *WRKY* 域由 60 个氨基酸组成。*WRKY* 在拟南芥、水稻、杨树中分别有 74、109 和 104 个成员(Pandey and Somssich, 2009)。*WRKY* 转录因子的 N 端有一段高度保守的 *WRKY-GQK* 氨基酸序列, 其 C 末端为一段锌指结构, 组成一般为 C₂H₂ (CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃HXH) (Eulgem et al., 2000; Yamasaki et al., 2005)。根据 *WRKY* 域的数量和锌指结构的不同, 可将 *WRKY* 转录因子分为 3 大类:

第一类通常含有 2 个 *WRKY* 域, 其后的锌指结构类型为 C₂H₂ 型; 第二类 and 第三类通常只含有 1 个 *WRKY* 域, 第二类的锌指结构为 C₂H₂ 型, 第三类的锌指结构与其他两类不同, 为 C₂HC 型(CX₇CX₂₃HXC) (Eulgem et al., 2000)。第三类成员在锌指结构上也存在较大差异, 就拟南芥和水稻 *WRKY* 转录因子比较而言, 还可以将第三类分为 2 个亚类, A 亚类为 CX₇CX₂₃HXC, B 亚类为 CX₇CX_nHXC (n≥24) (Wu et al., 2005)。最古老的 *WRKY* 转录调控因子拥有 2 个高度保守的 *WRKY* 结构域, 可能起源于 15~20 亿

年前的真核生物(余迪求等, 2006)。

WRKY 转录因子能够广泛参与植物的生物与非生物的胁迫反应, 对研究植物抗性具有重要价值。*WRKY* 转录因子在转录调控中可作为转录激活子或抑制子发挥作用(Xie et al., 2005; Zhang et al., 2004)。研究表明, *WRKY* 基因属于诱导型基因, 可被多种环境条件诱导(Dong et al., 2003)。如拟南芥中 *WRKY3* 和 *WRKY4* 编码两个结构相似的 *WRKY* 转录因子, 它们可被病菌和水杨酸诱导(Lai et al., 2008); 烟草 *NiWRKY4* 可明显被水杨酸诱导, 但逆境胁迫对其诱导不明显。250 mmol/L NaCl 盐胁迫和 20% PEG6000 干旱胁迫同时诱导 *GhWRKY4* 的基因表达(张娜等, 2012)。利用 RNAi 干扰技术, 研究发现烟草 *WRKY4* 转录因子在叶片生长和生物胁迫方面具有重要作用, 这在 *WRKY* 家族成员中是很少见的(Ren et al., 2010)。

目前, 还没有发现关于南瓜 *WRKY* 基因家族成员的报道, 本文通过克隆美洲南瓜 *WRKY4*, 并对其全序列进行生物信息学分析, 为进一步研究 *WRKY4* 在南瓜中的功能及作用奠定基础。

1 结果与分析

1.1 美洲南瓜总 RNA 的提取及 *WRKY4* 基因中间序列的获得

提取的美洲南瓜总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳检测, 可见 28S、18S 和 5S 三条清晰的 rRNA 条带, 且 28S 条带的亮度约是 18S 条带亮度的 2 倍(图 1), 表明 RNA 样品完整性较好, 未出现降解。经紫外分光光度计测定, A_{260nm}/A_{280nm} 比值在 1.8~2.0 之间, 表明 RNA 纯度较高, 无 DNA 和蛋白污染。

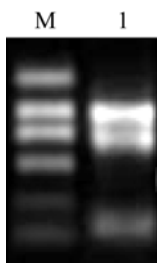


图 1 美洲南瓜总 RNA
注: M: DL2000 marker; 1: 总 RNA
Figure 1 Total RNA from Zucchini
Note: M: DL2000 marker; 1: Total RNA

根据 GenBank 上已提交的黄瓜 *WRKY4* 基因序列保守区域设计特异性引物 P1 和 P2, 以美洲南瓜

cDNA 为模板, 扩增得到一个大约 500 bp 的特异性产物, 对此片段进行回收、克隆、鉴定、测序, 得到一段 497 bp 的 cDNA 序列(图 2)。经 BLAST 分析, 此序列与黄瓜 *WRKY4* 的同源性达到 87%, 为美洲南瓜 *WRKY4* 的一段序列。

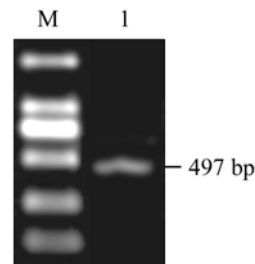


图 2 *WRKY4* 基因扩增产物
注: M: DL2000 marker; 1: RT-PCR 扩增产物
Figure 2 Amplified product of *WRKY4*
Note: M: DL2000 marker; 1: Amplified products of RT-PCR

1.2 *WRKY4* 基因 3'端与 5'端的获得

根据美洲南瓜 *WRKY4* 基因中间序列的测序结果设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物, 分别进行巢氏 PCR, 均在第二轮扩增产物中获得清晰的特异性条带。

对扩增产物进行回收、克隆、鉴定后测序, 3'RACE 试验获得 543 bp 的 cDNA 片段(图 3A), 出现的第一个终止密码子为 TGA, 3'端包含一个 105 bp 的 UTR 结构和 13 bp 的多聚腺苷(polyA)尾。

5'RACE 试验获得 903 的 cDNA 片段(图 3B), 包含一个 185 bp 的 UTR 结构。

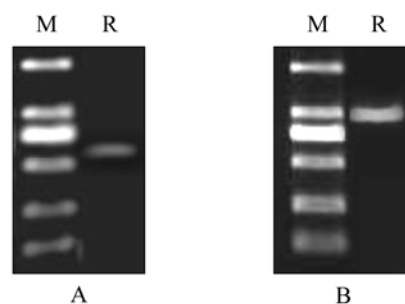


图 3 3'RACE 和 5'RACE 第二轮 PCR 扩增产物
注: M: DL2000 marker; A: 3'RACE 第二轮 PCR 扩增产物; B: 5'RACE 第二轮 PCR 扩增产物
Figure 3 Amplified product of the second round between 3'RACE and 5'RACE
Note: M: DL2000 marker; A: Amplified product of the second round between 3'RACE; B: Amplified product of the second round between 5'RACE



1.3 WRKY4 基因全长序列的获得及分析

根据中间片段序列和 RACE 试验结果, 获得的 3 个 cDNA 片段进行拼接, 最终得到长度为 1 722 bp (图 4) 的美洲南瓜 WRKY4 基因 cDNA 全长序列。根据拼接得到的 WRKY4 序列设计引物, RT-PCR 得到的产物经回收、克隆、鉴定后测序, 得到的序列与

拼接序列完全一致, 证明得到南瓜 WRKY4 基因全长。经 NCBI ORF (开放阅读框) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 查找, 确定最大开放阅读框长 1 419 bp, 编码 472 个氨基酸, 预测分子量约为 51.40 KD, 等电点为 8.36, GenBank 登录号为 JX096811。

```

taaaacggttgcgaatcgcttcgattcggacgattataaaacatagctgtgatcatccgaggactatactctcctctctctcttttagctag
aagtggccatggcggagccgggaagggtttgattctaatcaactcggaaagctcgaaggcttctgcagagcaacaggatgacgaggaagaagaa
ATGGAAGATTCAGAGAATGAATCAGAGGTGGAGTTGGAGGAACATAAACTGAGTGAGTTGAGGACAGCTTCGTCCGGTTAGTGAAGCTGCAGTG
M E D S E N E S E V E L E E H K L S E L R T A S S V S E A A V
AAGGGTCTTGCTCTCAAACCCTAGCGCCGCTTCTGCGAATCAGTCCTCGGAGAACGGTCCGTCTGATGGCTTGCCCTGACAATTCTGCTGCC
K G S C S Q T L A P P S A N Q S S E N G R S D G L P D N S A A
GAGTCACTCGAAGGAGTTGAATTGAAGCATCAAGCTCCACCTGCCAGCAATGTTGAAGCAATCCAGACAGATCAGGTACAAGAACAAAGCCAA
E S L E G V E L K H Q A P P A S N V E A I Q T D Q V Q E Q S Q
CTTCAGATAATAGTATATAAAGGACCTGATTCAGAACAATCACCAACTTCAGTTACTCAGTCTATCTCATCCTCTGCAAGTCCAAGTTTATCC
L Q I I V Y K G P D S E Q S P T S V T Q S I S S S A S P S L S
GAATATAAACTGGCACCCTAAGAAGGTCCATAAAGAATGTAAGCCAGAACCAGCCAGAAGAATTCTCCGACCCTAAAAGTGTGTCTCTGT
E Y K L A P K K V H K E C K P E P S Q K N S S D R K T V F S V
CCCAATGTTAGGACACCTGCTTCTGATGGTTACAATTGGAGGAAATATGGTCAGAAAGCAAGTGAAGAGTCCTAAGGGTTCACGTAGCTATTAC
P N V R T P A S D G Y N W R K Y G Q K Q V K S P K G S R S Y Y
AAGTGTACATATTCTGGATGCGGTGCTAAGAAGATTGAATGTTGTGATCACTCGGCCTTGTAACAGAGGTTGTTTACAAGAGCCAACATAGC
K C T Y S G C G A K K I E C C D H S G P K G S R S Y Y K C T Y
CATGATCCTCTAGGAAGATTAGCAACCCCAAGGAAAGTATGCTTGTGCCTTATGTTGAGCCTGTGGTTAAAAAATCATGGCAGAACATCC
S G C G A K K I E C C D H S G V P Y V E P V V K K I M A E H S
GTAAGAATAATTAACGATTGATTCAGATCCTCCTATGTCTTCAAAGAACCCTTACGGGAAACAGCTTCAGTCTGTTGAAAGAAAACGACAATACTCG
V R I I N D S D P P M S S K E P L R E T A S V V E R K R Q Y S
AATGACTCTGACGNDGATGAATCCAAAATCAAGAATGACAACGAATACGAAACAAAACAAAAGTTAAGAAGAGCAGTGGGGATATTCCG
N D S D G N D E S K I K N D N E Y E T K Q K V K K S S G G Y S
GGCACTCCCTTAAAACCTGAAAGAAGCCCAAGTTTGTGGTACATGCAGCAGGTGATGTGGGAATCTCAGGTGACGGATACAGATGGCGGAAG
G T P L K P G K K P K F V V H A A G D V G I S G D G Y R W R K
TATGGTCAGAAAATGGTGAAGGAAGTCCATCCAGGAAGTACTACCGCTGTACCTCTGCTGGGTGTCAGTCCGTAAGCATATCGAATCA
Y G Q K M V K G S P H P R N Y Y R C T S A G C P V R K H I E S
GCTGTGAAAATCCAAGCGTAGTGATTATAACATACAAGGGAGTTCATGATCACGACATGCCAGTACCAGAAACGACACGGTCCACCTAGT
A V E N P S V V I I T Y K G V H D H D M P V P K K R H G P P S
GCGCCTCTTGAGCTGCTGCAGCTCCTGCCTCCATGGGCAATATGCAACCAAAGAAAACAGACGCGAGTTCAGAGCCAAATTTCTTCAACAAA
A P L V A A A A P A S M G C N M Q P K K T D A V Q S Q I S S T Q
TGGTCTGTGGATGCTGAAGAGAGATTGACTGGTGAGGCTTGGATCTTGGAGGTGAGAAAGCAATGGAATCTGCCCGAACACTTTTGGAGCATT
W S V D A E G E L T G E A L D L G G E K A M E S A R T L L S I
GGATTTGAAATCAAGCCTTGTGTAacgtacgctttcaaggaataactgtgagagactctttatgaacatgtagctgtctctatgtgaaatat
G F E I K P C *
ttgattatTTTTcgagctacttcttttttcttaaaaaaaaaaaaaa
    
```

图 4 美洲南瓜 WRKY4 的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

注: 灰色区域为 WRKY 家族的特征序列 ‘WRKYGQK’

Figure 4 Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of cDNA encoding WRKY4 in Zucchini

Note: The gray area indicates the characteristic sequences of ‘WRKYGQK’ in the WRKY family

1.4 WRKY4 基因的生物信息学分析

利用推导的蛋白序列在 NCBI Conserved Domain Search (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/dd/wrp_b.cgi) 上检索, 发现其第 168 个到 174 个氨基酸和第 339 个到第 345 个氨基酸含有 WRKY 保守结构域。实验克隆到的美洲南瓜 WRKY 含有 2 个 WRKY 结构域, 表明其属于第一类 WRKY 家族成员。

蛋白序列通过 NCBI 中的 BLAST 分析, 发现该基因与黄瓜(*Cucumis sativus*) WRKY 同源性最高, 为 76%, 与葡萄(*Vitis vinifera*) WRKY32、大豆(*Glycine max*) WRKY24、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) WRKY32 的同源性分别为 63%、65%、61%。

为了分析美洲南瓜 WRKY4 与其他植物 WRKY 基因间的亲缘关系, 利用 DNAMAN 软件, 将不同

植物的 WRKY 蛋白构建系统发育树(图 5), 系统进化关系分析表明, 美洲南瓜 WRKY 与黄瓜和毛白杨中的 WRKY 蛋白亲缘关系最近, 与橡胶树等植物中的 WRKY 蛋白亲缘关系较远。

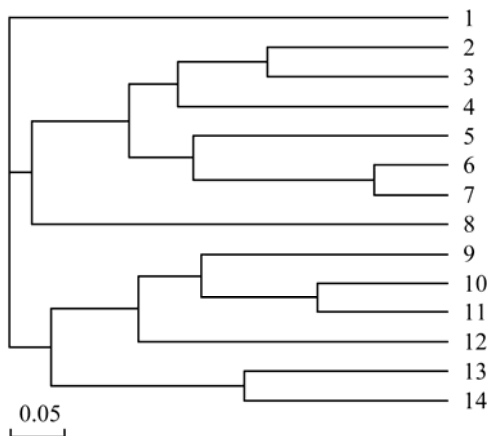


图 5 植物中 WRKY 蛋白的系统发育树

注: 1: 橡胶树(AEE81757); 2: 大豆(ABY84663); 3: 苜蓿(AES77535); 4: 陆地绵(ADI52618); 5: 蓖麻(EEF50803); 6: 泥糊菜(EFH66291); 7: 拟南芥(AAL13048); 8: 小麦(ACD80361); 9: 毛白杨(ACV92032); 10: 美洲南瓜(JXO96811); 11: 黄瓜(ADU52501); 12: 甘蓝型油菜(ACI14396); 13: 水稻(ABC02814); 14: 玉米(ACG42925)

Figure 5 Phylogenetic tree of WRKY protein in plants

Note: 1: *Hevea brasiliensis* (AEE81757); 2: *Glycine max* (ABY84663); 3: *Medicago truncatula* (AES77535); 4: *Gossypium hirsutum* (ADI52618); 5: *Ricinus communis* (EEF50803); 6: *Lyrata* (EFH66291); 7: *Arabidopsis thaliana* (AAL13048); 8: *Triticum aestivum* (ACD80361); 9: *Populus tomentosa* (ACV92032); 10: *Zucchini WRKY4* (JXO96811); 11: *Cucumis sativus* (ADU52501); 12: *Brassica napus* (ACI14396); 13: *Oryza sativa* (ABC02814); 14: *Zea mays* (ACG42925)

2 讨论

植物在长期进化过程中, 形成了一系列防卫机制, 以抵御和适应各种生物及非生物胁迫。WRKY 转录因子在植物的逆境胁迫信号转导过程起着重要作用(李淑敏等, 2008)。WRKY 基因最早在甜薯中被发现, 之后在野燕麦、皱叶欧芹、拟南芥、烟草中相继被发现(Eulgem and Somssich, 2007)。不同植物 WRKY 蛋白序列分析表明, WRKY 蛋白在氨基酸序列上有一定保守性, 进而揭示了它们在生物学功能上也有一定的相似性。随着更多的 WRKY 蛋白在不同物种中的发现, 越来越多的证据表明 WRKY 转录因子对植物的生长发育及胁迫反应有着相当重要的作用。

目前, 在发表的文章中还没有发现有关南瓜 WRKY 家族成员的信息。本文首次从南瓜类植物中克隆到 WRKY 家族成员 WRKY4, 填补了在南瓜 WRKY 家族成员报道上的空白。对南瓜 WRKY4 全序列进行初步分析, 表明南瓜 WRKY4 含有两个 WRKY 保守域, 属于最古老的 WRKY 家族成员之一。南瓜 WRKY4 的获得, 为进一步研究其在南瓜中的作用机制奠定了基础, 同时可以利用其同源性, 研究南瓜与其他植物的进化关系。本实验后续工作, 利用荧光定量 PCR 进一步分析确定其在水杨酸胁迫下, WRKY4 基因在南瓜中的表达。目前 WRKY 转录因子的研究主要集中在基因克隆, 表达及相关功能分析等方面, 而对其参与的植物胁迫应答过程并不清楚, WRKY 转录因子在植物中抗逆信号的转导途径也有待进一步分析研究。随着转录研究的不断深入和分子生物学水平的不断提高, 人们对 WRKY 家族的作用机理及其相关功能将会逐步了解。

3 材料与方法

3.1 试材与主要试剂

美洲南瓜(*Cucurbita pepo*)种子由北京农学院蔬菜育种课题组提供。供试材料于 2011 年种植于北京农学院温室大棚, 选取两片叶子充分展开的植株, 用液氮速冻后于 -80℃ 冰箱保存备用。总 RNA 抽提试剂盒以及 DNA 胶回收试剂盒购于上海生工生物工程有限公司; M-MLV 反转录酶、连接载体 PMD19-T Vector 和 RACE 试剂盒购于大连宝生物工程有限公司; 大肠杆菌 DH5α 购于北京天根生化科技有限公司。

3.2 RNA 提取和 cDNA 合成

采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 利用 DNase I (TaKaRa) 除去总 RNA 中混有的少量 DNA, 用去蛋白液 RW1 (博迈德) 除去总 RNA 中的蛋白, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。cDNA 合成体系体积为 20 μL, 过程为: 总 RNA 与 50 μmol/L Oligo(dT) 18 混合液于 70℃ 水浴 10 min; 再加入 M-MLV 反转录酶(200 U)、dNTP (10 mmol/L)、RNase 抑制剂(40 U)及灭菌的双蒸水, 置于 42℃ 水浴 60 min; 最后置于 70℃ 变性 15 min。

3.3 WRKY4 基因中间片段的克隆

根据已报道的黄瓜 WRKY4 基因序列的保守区域设计一对特异性引物 P1 和 P2 (表 1), 以总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR。20 μL

反应体系: 10×LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 2.5 μL, 模板 1.5 μL, dNTP Mixture (10 mmol/L) 1.5 μL, P1 和 P2 引物各 1 μL, LA *Taq* (5 U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 12 μL; 所用反应程序为: 94°C 5 min, 94°C 30 s, 53°C 40 s, 72°C 1 min, 35 次循环, 最后 72°C 10 min, 产物 4°C 保存。回收 PCR 产物, 连接载体并转化感受态细胞, 通过蓝白斑筛选及 PCR 阳性克隆鉴定后测序。

表 1 *WRKY4* 克隆引物序列

Table 1 Primer sequences for *WRKY4* cloning

引物	引物序列(5'-3')
Primer	Primer sequences (5'-3')
P1	GAGTCCTAAGGGTTACAG
P2	CATACTTCCGCCATCTGT
3'GSP1	GCTTGTGCCTTATGTTGAGCCTGTGG
3'GSP2	TCTCAGGTGACGGATACAGATGGCGG
3'OUT Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT
3'Inner Primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCAC-TATAGG
5'GSP1	TCACCTGAGATTCCCACATCACCTGC
5'GSP2	CCACAGGCTCAACATAAGGCACAAG
5'OUT Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5'Inner Primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATC-AGTCGATG
F1	AGGAAGAAGAAATGGAAGAT
R1	GAAAAACAAAAGGAAGTAGC

3.4 *WRKY4* 基因 3'末端的克隆

根据中间片段的测序结果, 用 Primer 5 软件设计特异性引物 3'GSP1 (表 1), 为了提高产物特异性, 在 3'GSP1 下游设计一个巢氏引物 3'GSP2 (表 1)。通用引物为 3'OUT Primer (表 1), 3'Inner Primer (表 1)。

参考 TAKARA 公司 3'RACE 试剂盒操作流程, 进行第一轮 PCR, 20 μL 反应体系: ddH₂O 5.25 μL, 1×Cdna Dilution Buffer II 8 μL, 10×LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 2.5 μL, 3'GSP1 (10 μm/L) 1 μL, 3'OUT Primer 1 μL, 3'cDNA 2 μL, LA *Taq* (5 U/μL) 0.25 μL。PCR 反应程序中退火温度为 65°C, 其他条件与克隆中间片段所用程序相同。

选取第一轮 PCR 产物 2 μL 为模板, 进行巢氏 PCR, dH₂O 4.25 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 9 μL, 10×LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 2.5 μL, 3'GSP-

2 (10 μm/L) 1 μL, 3'Inner Primer 1 μL, LA *Taq* (5 U/μL) 0.25 μL。反应条件与第一轮 PCR 相同。

巢氏 PCR 扩增产物经回收、克隆以及鉴定后, 进行测序。

3.5 *WRKY4* 基因 5'末端的克隆

根据中间片段的测序结果, 用 Primer 5 软件设计特异性引物 5'GSP1 (表 1), 为提高产物特异性, 在 5'GSP1 上游设计一个巢氏引物 5'GSP2 (表 1)。通用引物为 5'OUT Primer (表 1), 5'Inner Primer (表 1)。实验操作过程参考 TaKaRa 公司 5'-Full RACE 试剂盒说明进行。

第一轮 PCR 为 20 μL 的反应体系: 1×cDNA Dilution Buffer II 8 μL, dH₂O 5.25 μL, 5'OUT Primer (10 μm/L) 1 μL, 5'GSP1 (10 μm/L) 1 μL, 5'cDNA 2 μL, 10×LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 2.5 μL, LA *Taq* (5 U/μL) 0.25 μL。PCR 反应程序中退火温度为 60°C, 其他条件与克隆中间片段所用程序相同。

取第一轮 PCR 产物 2 μL 为模板, 进行第二轮 PCR, dH₂O 4.25 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol/L each) 9 μL, 10×LA PCR Buffer II (Mg²⁺ plus) 2.5 μL, 5'GSP2 (10 μm/L) 1 μL, 5'Inner Primer 1 μL, LA *Taq* (5 U/μL) 0.25 μL。PCR 反应中退火温度为 52°C, 其他条件与第一轮相同。将第二轮 PCR 产物经回收、克隆、鉴定后测序。

3.6 *WRKY4* 基因全长的克隆

根据拼接得到的 *WRKY4* 全长序列设计特异性引物 F1、R1 (表 1), 以总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板进行 RT-PCR, 反应程序与克隆中间片段的 PCR 程序相同, 退火温度为 50°C。将 PCR 产物回收、克隆、鉴定后测序。

作者贡献

徐岭贤是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 徐岭贤及赵福宽完成数据分析; 郝芮及孙清鹏参与实验设计, 试验结果分析; 赵福宽是项目的构思者和负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由北京市属高等学校人才强教计划资助项目 (PHR200907136) 资助。

参考文献

Dong J., Chen C., and Chen Z., 2003, Expression profiles of

- the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response, *Plant Mol. Biol.*, 51(1): 21-37 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020780022549> PMID:12602888
- Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S., and Somssich I.E., 2000, The WRKY superfamily of plant transcription factors, *Trends Plant Sci.*, 5(5): 199-206 [http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01600-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01600-9)
- Eulgem T., and Somssich I.E., 2007, Networks of WRKY transcription factors in defense signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10(4): 336-371 <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.020> PMID:17644023
- Lai Z.B., Vinod K.M., Zheng Z.Y., Fan B.F., and Chen Z.X., 2008, Roles of Arabidopsis WRKY3 and WRKY4 transcription factors in plant response to pathogens, *BMC Plant Biol.*, 8: 68 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-8-68> PMID:18570649 PMCid:2464603
- Li S.M., Mao Z.C., Li L., Feng D.X., Yang Y.H., and Xie B.Y., 2008, Isolation of WRKY genes in the incompatible interaction between *Meloidogyne incognita* and *Capsicum annuum*, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 35(10): 1467-1472 (李淑敏, 茆振川, 李蕾, 冯东昕, 杨宇红, 谢丙炎, 2008, 辣椒抗根结线虫相关WRKY基因的分离, *园艺学报*, 35(10): 1467-1472)
- Pandey S.P., and Somssich I.E., 2009, The role of WRKY transcription factors in plant immunity, *Plant Physiol.*, 150: 1648-1655 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.138990> PMID:19420325 PMCid:2719123
- Ren X.J., Huang W.D., Li W.Z., and Yu D.Q., 2010, Tobacco transcription factor WRKY4 is a modulator of leaf development and disease resistance, *Biologia Plantarum*, 54(4): 684-690 <http://dx.doi.org/10.1007/s10535-010-0121-0>
- Wu K.L., Guo Z.J., Wang H.H., and Li J., 2005, The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins, *DNA Res.*, 12(1): 9-26 <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/12.1.9> PMID:16106749
- Xie Z., Zhang Z.L., Zou X.L., Huang J., Rua S.P., Thompson D., Shen Q.J., 2005, Annotations and functional analyses of the rice WRKY gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells, *Plant Physiol.*, 137(1): 176-189 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.054312> PMID:15618416 PMCid:548-849
- Yu D.Q., Chen L.G., and Zhang L.P., 2006, Transcription factor WRKY superfamily: origin, structure and function, *Yunnan Zhiwu Yanjiu (Acta Botanica Yunnanica)*, 28(1): 69-77 (余迪求, 陈利钢, 张利平, 2006, 转录调控因子WRKY超级家族: 起源、结构和功能, *云南植物研究*, 28(1): 69-77)
- Yamasaki K., Kigawa T., Inoue M., Tateno M., Yamasaki T., Yabuki T., Aoki M., Seki E., Matsuda T., Tomo Y., Hayami N., Terada T., Shirouzu M., Tanaka A., Seki M., Shinozaki K., and Yokoyama S., 2005, Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain, *Plant Cell*, 17(3): 944-956 <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.104.026435> PMID:15705956 PMCid:1069710
- Zhang N., Zhao P., and Shen F.F., 2012, Cloning and expression analysis of 3 WRKY genes from upland cotton, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 10(2): 169-173 (张娜, 赵佩, 沈法富, 2012, 陆地棉三个WRKY基因的克隆与表达分析, *分子植物育种*, 10(2): 169-173)
- Zhang Z.L., Xie Z., Zou X., Casaretto J., Ho T.H., and Shen Q.J., 2004, A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells, *Plant Physiol.*, 134(4): 1500-1513 <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.034967> PMID:15047897 PMCid:419826