

拟南芥 *AtWRKY33* 基因启动子的克隆及表达分析

童晨晨, 张 乘, 樊婷婷, 曹树青*

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 合肥 230009)

摘 要:以野生型拟南芥为材料,采用 PCR 技术克隆得到了拟南芥 *AtWRKY33* 基因起始密码子 ATG 上游 1 629 bp 启动子序列,并利用该启动子驱动 GUS 基因在野生型拟南芥中表达,对获得的转基因拟南芥采用重金属 Cd 处理不同时间,进行 GUS 染色及定量分析。结果表明:*AtWRKY33* 基因启动子与 GUS 融合表达载体成功构建并正常启动 GUS 基因表达;拟南芥植株中的 *AtWRKY33* 基因在根中大量表达;定性与定量实验均显示经重金属 Cd 处理后的拟南芥幼苗中 *AtWRKY33* 基因随着时间增加而被显著诱导表达。说明该基因响应重金属 Cd 胁迫。

关键词: *AtWRKY33* 基因; 启动子; GUS 染色; Cd 处理; 组织特异性表达

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2020)05-0784-05

Cloning and expression analysis of *AtWRKY33* gene promoter from *Arabidopsis thaliana*

TONG Chenchen, ZHANG Cheng, FAN Tingting, CAO Shuqing

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009)

Abstract: In this study, taken a wild-type *Arabidopsis* as the experimental material, the promoter fragment in the upstream of the start codon of the *AtWRKY33* gene from *Arabidopsis thaliana* was isolated by PCR cloning method, which was 1 629 bp in length. The promoter was used to drive GUS gene expression in wild *Arabidopsis thaliana*. The obtained transgenic plants were analyzed by using GUS staining and quantitative assay after different hours of heavy metal Cd stress. The results showed that: the *AtWRKY33* gene promoter and GUS fusion expression vector were successfully constructed, and GUS gene expression was normally activated; the *AtWRKY33* gene was highly expressed in roots; heavy metal Cd treatment significantly induced the expression of gene *AtWRKY33* in a time-rely manner by qualitative and quantitative experiments. In conclusion, the *AtWRKY33* gene in *Arabidopsis thaliana* is response to heavy metal Cd stress.

Key words: *AtWRKY33* gene; promoter; GUS staining; Cd treatment; tissue specific expression

随着工业化的快速发展,我国受到重金属污染的耕地面积日益增加,其中镉是一种最重要的重金属污染物,它会对作为初级生产者的植物造成很大的毒害作用,不但影响其在食物链中提供能量的能力,甚至对食物安全的品质和人类身体健康产生严重的危害^[1-2]。当植物受环境胁迫时,其体内会发生相应的变化来应对,一些抗逆相关基因会被诱导表达,一些重要的转录因子蛋白也会随之大量表达,以感应传导逆境胁迫的信号和适应胁迫,通过自身复杂的调控网络来维持代谢平衡从而使其受到的毒害降至最低水平^[3],因此,植物修复技术与相关功

能基因的发现对于重金属污染治理以及农业食品安全十分重要^[4]。在实验室前期的探究工作中,我们已经发现 *AtWRKY33* 基因突变体植株在镉胁迫下生长状况比野生型更为敏感,这一现象引发笔者思考 *AtWRKY33* 基因是否作为响应重金属镉胁迫的功能基因。故笔者以拟南芥为研究对象,通过构建 *ProWRKY33-GUS* 重组载体获得 *ProWRKY33-GUS* 转基因植株,分析 *AtWRKY33* 基因在拟南芥中的组织特异性表达情况及其对重金属镉胁迫的响应,为进一步研究 *AtWRKY33* 基因在调控拟南芥抗重金属镉胁迫中的功能机制提供参考。

收稿日期: 2020-02-20

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31872803)资助。

作者简介: 童晨晨, 硕士研究生。E-mail: 784133770@qq.com

* 通信作者: 曹树青, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: shuqing.cao@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)材料的遗传背景是哥伦比亚(Columbia, col), 购买自美国拟南芥种质资源中心, 后期再由本实验室自行繁殖。构建重组载体所用的质粒为 pART27-GUS, 感受态所用菌种为 DH5 α 大肠杆菌和 GV3101 农杆菌。

1.1.2 试剂 酶类试剂为 PrimeSTAR Max Premix (TaKaRa)、限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I (NEB)、T4 DNA Ligase (NEB)、EasyTaq DNA Polymerase (TransGen)、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa), 试剂盒有 TIANprep Mini Plasmid Kit 和 TIANgel Midi Purification Kit (TIANGEN)、GUS Blue KIT(华越洋), 其余试剂包括 dNTP Mixture Solution (Sangon Biotech)、DNA marker (TransGen)、Loading buffer、Murashige Skoog (Sangon Biotech)、氯仿、异戊醇、无水乙醇及苯酚等。

1.2 方法

1.2.1 野生型拟南芥的种植 将高温高压灭菌后的黑土、蛭石与珍珠岩按照 3:9:1 的比例混合后分装花盆里, 花盆放于托盘里吸收营养液至土完全浸湿; 将野生型拟南芥种子播种于花盆里, 每盆 5 颗, 封上保鲜膜, 待后期发芽便揭去。期间保持拟南芥水分充足, 种植环境为 22 $^{\circ}$ C, 16 h 光照/8 h 黑暗。

1.2.2 拟南芥全基因组 DNA 的提取 取种植两周后的野生型拟南芥叶片放于 1.5 mL EP 管中, 加入 600 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB 充分研磨, 65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 每 15 min 摇晃 1 次, 取出冷却至室温, 加入 600 μ L 酚氯仿剧烈混匀, 12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min, 取 500 μ L 上清液, 加入 1 mL 无水乙醇, 上下颠倒混匀, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 2 h。离心弃上清后, 加入 1 mL 75%乙醇, 离心机内 12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 3 min, 弃上清。将样品放在超净台内吹风使乙醇得以更快挥发, 再加入约 40 μ L 的无菌双蒸水使 DNA 溶解, 最终获得 DNA 溶液, 储存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.3 *AtWRKY33* 启动子基因的克隆 以提取的 DNA 为模板, 利用 Primer Premier 5 软件设计以下引物进行 *AtWRKY33* 启动子区域基因克隆:

FP: 5'-GGGGTAC \wedge CATATCTCACTTTCTTGTG CCAATGA-3';

RP: 5'-CCGC \wedge TCGAGAAGAAAAGAAGCAG CCATACGAA-3'。

1.2.4 大肠杆菌的热激转化 从低温冰箱取出大肠杆菌 DH5 α 感受态, 放在冰上使其融化。用移液枪

吸取 10 μ L 连接产物轻柔地加进感受态中并用手指轻敲管壁使二者混匀, 继续放在冰上 30 min, 到时间后, 置于 42 $^{\circ}$ C 水浴锅进行热激转化, 时长 15 min, 结束后立即冰浴 5 min。加入无任何抗性的液体 LB 培养基后, 在 37 $^{\circ}$ C、200 r \cdot min $^{-1}$ 条件下振荡培养约 1 h 直至菌液变浑, 最后将扩培的菌液全部涂布在含有 GUS 载体壮观霉素抗性的 LB 固体培养基上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养。约 24 h 后挑取单克隆菌体接种于 500 μ L 含有壮观霉素抗性的液体 LB 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床中振荡培养至浑浊, PCR 鉴定、提取质粒及测序。

1.2.5 农杆菌的电击转化 从低温冰箱取出农杆菌 GV3101 感受态, 放在冰上使其融化。吸取测序正确的质粒 2 μ L 缓缓加进感受态细胞中, 用手指轻敲管壁使二者混匀, 接着将混合物转移至预冷的电击杯中, 放入电转仪进行电击转化。加入 600 μ L 不含抗性的液体 LB 培养基, 在 28 $^{\circ}$ C、220 r \cdot min $^{-1}$ 条件下振荡培养约 5 h 直至菌液变浑, 最后将扩培的菌液全部涂布在含有 GUS 载体壮观霉素抗性和农杆菌庆大霉素抗性的 LB 固体培养基上, 于 28 $^{\circ}$ C 培养。约 2 d 后挑取单克隆菌体接种于 500 μ L 含有壮观霉素和庆大霉素抗性的液体 LB 培养基中, 28 $^{\circ}$ C 摇床中振荡培养至浑浊, PCR 鉴定。

1.2.6 转基因拟南芥植株的获得 为提高后期筛选效率, 需在侵染前一天剪去待侵染野生型拟南芥植株已长出的长角果并保持植株水分充足。将含有重组载体的 GV3101 农杆菌扩大培养至 $OD_{600} = 1.3 \sim 1.4$, 收集菌体沉淀, 使用侵染缓冲液将菌液稀释至 $OD_{600} = 0.8 \sim 1.2$, 再加入适量 SilwettL-77, 混匀后即可对花序进行侵染。侵染后将植株保湿, 黑暗处理 12 h 后置于培养室中正常生长。隔 1 周后进行二次侵染。

1.2.7 转基因植株的鉴定 在 1/2 MS 固体培养基上播撒消毒后的种子, 并在培养基中添加卡那霉素。生长 14 d 后, 移栽根长且叶绿的幼苗到营养土里, 提取 DNA, 经 PCR 鉴定正确后, 即获得转基因阳性植株, 再经后续纯化得到纯合体种子。

1.2.8 *ProWRKY33-GUS* 植株组织特异性染色 将土培 4 周的阳性拟南芥植株清洗干净, 完全浸泡在 GUS 染液里, 37 $^{\circ}$ C 避光染色 10 h 后, 用 75%乙醇脱去叶绿素, 观察染色情况。

1.2.9 *AtWRKY33* 基因表达定量分析 将在 1/2 MS 培养基上生长 2 周后的野生型植株幼苗浸泡在 50 μ mol \cdot L $^{-1}$ CdCl $_2$ 溶液中分别处理 0、1、3 和 5 h, 再提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 利用 Primer Premier 5

软件设计以下引物用于 *AtWRKY33* 基因实时荧光定量 PCR 扩增:

FP: 5'-CTATTGCTGGTCACTCCAACCTA-3';

RP: 5'-CGAATCGAAAAATGAGGTCTCC-3'.

以 *AtACTIN8* 为内参基因, 其扩增引物序列为:

FP: 5'-TCAGCACTTTCCAGCAGATG-3';

RP: 5'-CTGTGGACAATGCCTGGAC-3'.

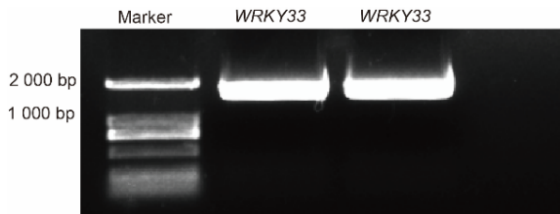
荧光定量 PCR 反应程序: 第一步 95 °C 预变性 30 s; 第二步 95 °C 变性 5 s、60 °C 退火 30 s (40 个循环); 最后 95 °C, 15 s; 60 °C, 30 s; 95 °C, 15 s.

1.2.10 Cd 处理下 *ProWRKY33-GUS* 植株 GUS 染色 将种子点于 1/2 MS 培养基上, 春化 3 d 后, 再在培养室培养 2 周得到幼苗, 接着将幼苗放在 50 μmol·L⁻¹ CdCl₂ 溶液中, 分别处理 0、3 和 5 h, 处理之后放在 37 °C 培养箱避光染色。染色 2 h 后, 用 75% 乙醇脱去叶绿素, 观察染色情况。

2 结果与分析

2.1 *AtWRKY33* 启动子基因的克隆

为获得拟南芥 *ProWRKY33-GUS* 转基因植株, 首先, 以野生型拟南芥 Col-0 总 DNA 为模板, 进行 *AtWRKY33* 基因启动子片段的 PCR 扩增, 电泳检测结果显示片段大小与实际选取的启动子区域大小 1 629 bp 基本一致 (图 1)。



Marker, DL2000; *WRKY33* 启动子序列
Marker, DL2000; *WRKY33* promoter sequence

图 1 *AtWRKY33* 启动子基因克隆

Figure 1 Gene cloning of the *AtWRKY33* promoter

2.2 *ProWRKY33-GUS* 载体的构建

目的基因扩增的上下游引物中分别包含限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 的酶切位点, 故使用 *Kpn* I 和 *Xho* I 分别对 pART27-GUS 载体和 PCR 扩增获得的 *AtWRKY33* 启动子基因片段进行双酶切。回收、纯化酶切后的目的基因片段和载体, 用 T4 连接酶连接后得到连接产物, 通过热激转化法转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 再经挑菌、PCR 鉴定, 选取电泳条带清晰且大小正确的菌液进行质粒的提取与测序, 结果与 *AtWRKY33* 启动子基因序列完全吻合, 表明 *ProWRKY33-GUS* 载体构建成功。

2.3 农杆菌的转化及侵染

选取测序正确的质粒通过电击转化法导入农杆菌 GV3101 感受态细胞, 涂布培养 2 d 后挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 选取鉴定正确的阳性菌侵染野生型拟南芥花序, 并于 1 周后用同样步骤进行二次侵染。

2.4 转基因纯合体植株的获得

利用含有卡那霉素的 1/2 MS 培养基对种子进行筛选, 结果如图 2 所示。黑色箭头所指的具有长根、绿色叶子的幼苗, 可能是阳性转基因苗。

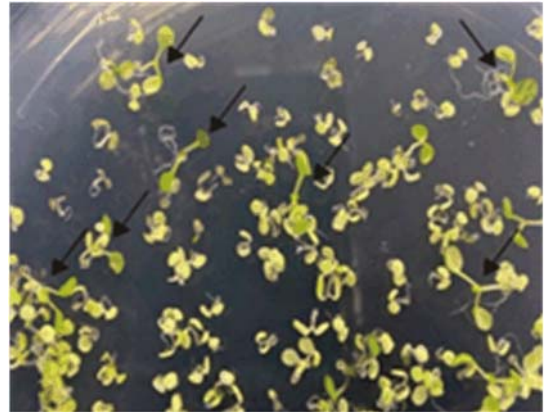
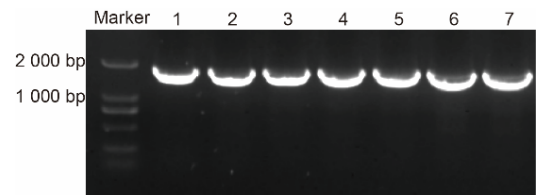


图 2 转基因植株的抗性筛选

Figure 2 Antibiotic resistance screening of transgenic plants expressing

将这些苗转移到营养土中培养, 待幼苗的生长状态良好时进行 DNA 的提取与鉴定。电泳结果 (图 3) 说明我们初步获得了转基因阳性植株。

对阳性植株进行后代抗性分离比实验, 最终得到纯合体植株种子 (图 4), 用于后续实验。



Marker DL2000; 1-7. 植株 DNA PCR 鉴定产物。
Marker DL2000; 1-7. PCR products of plants DNA.

图 3 转基因植株的 PCR 鉴定

Figure 3 PCR identification of transgenic plants

2.5 *AtWRKY33* 在拟南芥中的表达分析

2.5.1 *ProWRKY33-GUS* 植株组织特异性染色 将 *ProWRKY33-GUS* 转基因纯合体种子播种在营养土里, 培养 4 周时从土里整株取出并洗掉泥土, 完全浸泡在 GUS 染液中, 37 °C 避光染色 10 h 后, 用 75% 乙醇脱色, 结果如图 5 所示。

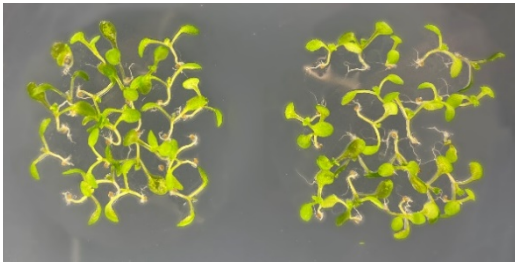
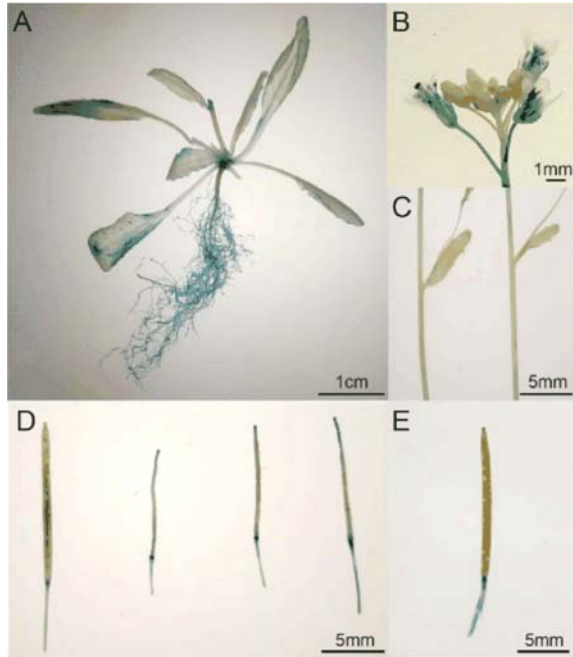


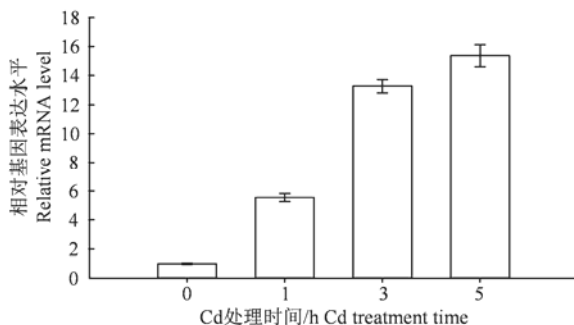
图 4 纯合体的获得

Figure 4 The acquisition of homozygous plants



A. 根与莲座叶; B. 花序; C. 茎; D. 幼嫩期长角果; E. 成熟长角果。

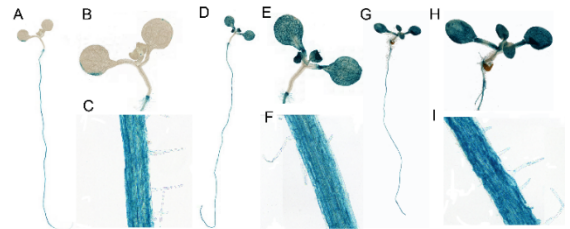
A. Root and rosette leaves; B. Inflorescence; C. Stems; D. Young siliques; E. Mature silique.

图 5 *ProWRKY33-GUS* 植株组织特异性染色Figure 5 Specific staining of *ProWRKY33-GUS* transgenic plant tissues图 6 Cd 处理下 *AtWRKY33* 基因表达(内参: *ACTIN8* 基因)
Figure 6 *AtWRKY33* gene expression level under Cd treatment (Reference gene: *ACTIN8*)

AtWRKY33 基因在拟南芥各个组织中的表达具有特异性。从图 5A 可见, *AtWRKY33* 基因在根中表

达量丰富, 在莲座叶中表达较少; 由图 5B 可知, 基因在成熟的花的雄蕊、雌蕊、萼片较多表达, 在花瓣不表达; 图 5C、5D 及 5E 中显示基因在茎、茎叶、成熟的长角果和种子里表达量极低, 而在未发育成熟的长角果中有少量表达。

2.5.2 Cd 处理下 *AtWRKY33* 基因表达水平 为验证 *AtWRKY33* 基因是一个响应重金属 Cd 胁迫的重要基因, 笔者对 Cd 处理下野生型 WT 植株中 *AtWRKY33* 基因表达水平进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定, 野生型 WT 植株在 1/2 MS 培养基上培养 2 周后, 将幼苗浸泡在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 溶液中分别处理 0、1、3 和 5 h, 再提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 并以此作为模板进行 qRT-PCR 实验。结果 (图 6) 显示, 随着 Cd 处理时间的增加, *AtWRKY33* 基因的相对表达水平持续升高, 说明外源 Cd 诱导了 *AtWRKY33* 基因的表达, *AtWRKY33* 基因可响应 Cd 胁迫。



A-C. 对照; D-F. Cd 处理 3 h; G-I. Cd 处理 5 h。

A-C. Control; D-F. Cd treatment for 3 h; G-I. Cd treatment for 5 h.

图 7 *ProWRKY33-GUS* 植株 Cd 处理染色Figure 7 Staining of *ProWRKY33-GUS* transgenic plants with Cd treatment

2.5.3 Cd 处理下转基因植株 GUS 染色 为进一步验证 Cd 胁迫对 *AtWRKY33* 基因表达的影响, 将 *ProWRKY33-GUS* 转基因材料种子点在 1/2 MS 培养基上培养 2 周后得到幼苗, 接着将幼苗放在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 溶液中, 分别处理 0、3 和 5 h, 处理之后吸去表面 CdCl_2 溶液, 完全浸泡在 GUS 染液里进行染色。染色 2 h 后, 用 75% 乙醇脱去叶绿素, 观察染色情况, 结果如图 7 所示。图 7A 是未经 Cd 处理的 *ProWRKY33-GUS* 植株, 图 7B 和 7C 是局部放大图, 可见在根中表现出蓝色, 叶片边缘极少量被染色, 说明 *AtWRKY33* 基因在根中大量表达, 在叶片中很少表达; 图 D-F 为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 处理 3 h 后染色; 图 G-I 为 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CdCl_2 处理 5 h 后染色。

由图 7 D-I 可见, 随着 Cd 处理时间的增加, 转基因植株尤其是叶片部位呈现出蓝色逐渐加深的趋

势,说明 GUS 染色程度不断加深,GUS 信号逐渐增强,这表明 *AtWRKY33* 基因在拟南芥中响应重金属镉胁迫,并且在一定时期内,随着 Cd 诱导时间的增长,*AtWRKY33* 基因表达量上升。

3 讨论与结论

WRKY 转录因子家族是响应非生物胁迫、生物应激反应和参与一些生理过程的重要组成部分,例如参与胚胎发生、种皮和表皮毛发育、调控衰老、调节生物合成途径和激素信号^[5-7],在植物抵抗病毒侵染过程中,*WRKY33* 转录因子已经被证明可以通过丝裂原激活蛋白激酶途径积极调节植物对坏死性病原体的防御^[8],*WRKY70* 也是对微生物感染反应的关键调控因子^[9];拟南芥 *WRKY33* 和 *WRKY25* 响应 NaCl 胁迫;*WRKY4* 和 *WRKY34* 参与糖代谢^[10];在响应低磷胁迫上,拟南芥转录因子 *WRKY6* 受 E3 泛素化连接酶 *PRU1* 的调控,在低磷时调节磷酸盐稳态^[11],但关于响应重金属胁迫的 *WRKY* 基因研究还比较少。笔者前期的研究已初步证明 *AtWRKY33* 基因功能缺失拟南芥对于镉胁迫具有敏感性,故通过构建重组载体,进而获得 *ProWRKY33-GUS* 转基因拟南芥材料,并利用 GUS 染色,证实 *AtWRKY33* 基因在拟南芥的花药、柱头、花丝、根和发育中的果荚内均有表达,说明该基因是参与植物生殖和发育过程中的重要基因,且在不同组织存在表达差异,在根中表达量最强;在莲座叶被挤压或折断部位,*GUS* 基因被局部增强表达,这些结果也与前人研究基本一致^[12]。通过 qRT-PCR 证明,*AtWRKY33* 基因可以被重金属 Cd 诱导表达;同时,通过对转基因植株的 GUS 染色结果分析可知,*AtWRKY33* 基因在叶片和下胚轴中很少表达,在根中大量表达。在重金属镉处理情况下,*AtWRKY33* 基因在叶片中的表达随时间增加而明显增强,说明 *AtWRKY33* 基因显著地响应 Cd 胁迫。这些结果可以为进一步研究 *AtWRKY33* 基因的抗重金属胁迫生物学功能和阐明其在抗逆过程中的调控机制提供基础。试验结果也表明,*AtWRKY33* 基因启动子属于响应外源 Cd 刺激的诱导型启动子,这启发笔者后期将从启动子序列入手,探究具体响应重金属 Cd 以及其他非生物胁迫的逆境响应元件,明确启动子区域的核心响应部位,从分子水平上进一步探索功能基因表达的机制,为利用 Cd 胁迫诱导型启动子对植物进行遗传改良

提供新策略。

参考文献:

- [1] 陈晓亚,薛红卫.植物生理与分子生物学[M].北京:高等教育出版社,2012:679-680.
- [2] TAMÁS L, MISTRÍK I, ALEMAYEHU A. Low Cd concentration-activated morphogenic defence responses are inhibited by high Cd concentration-induced toxic superoxide generation in barley root tip[J]. *Planta*, 2014, 239(5): 1003-1013.
- [3] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57(1): 781-803.
- [4] CLEMENS S, PALMGREN M G, KRÄMER U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(7): 309-315.
- [5] JIANG Y J, LIANG G, YU D Q. Activated expression of *WRKY57* confers drought tolerance in *Arabidopsis*[J]. *Mol Plant*, 2012, 5(6): 1375-1388.
- [6] BERNSDORFF F, DÖRING A C, GRUNER K, et al. Pipecolic acid orchestrates plant systemic acquired resistance and defense priming via salicylic acid-dependent and - independent pathways[J]. *Plant Cell*, 2016, 28(1): 102-129.
- [7] BIRKENBIHL R P, DIEZEL C, SOMSSICH I E. *Arabidopsis WRKY33* is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection[J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(1): 266-285.
- [8] WANG Y M, SCHUCK S, WU J N, et al. A MPK3/6-WRKY33-ALD1-pipecolic acid regulatory loop contributes to systemic acquired resistance[J]. *Plant Cell*, 2018, 30(10): 2480-2494.
- [9] LIU S, KRACHER B, ZIEGLER J, et al. Negative regulation of ABA signaling by *WRKY33* is critical for *Arabidopsis* immunity towards *Botrytis cinerea* 2100[J]. *eLife*, 2015, 4: 300-307.
- [10] CHEN L G, SONG Y, LI S J, et al. The role of *WRKY* transcription factors in plant abiotic stresses[J]. *Biochim Et Biophys Acta BBA-Gene Regul Mech*, 2012, 1819(2): 120-128.
- [11] YE Q, WANG H, SU T, et al. The ubiquitin E3 ligase *PRU1* regulates *WRKY6* degradation to modulate phosphate homeostasis in response to low-pi stress in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2018, 30(5): 1062-1076.
- [12] LIPPOK B, BIRKENBIHL R P, RIVORY G, et al. Expression of *AtWRKY33* encoding a pathogen-or PAMP-responsive *WRKY* transcription factor is regulated by a composite DNA motif containing W box elements[J]. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2007, 20(4): 420-429.