

陆地棉转录因子 *GhWRKY91* 基因的原核表达及鉴定

顾丽姣^{1,2}, 魏恒玲¹, 喻树迅^{1*}

(1. 中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室, 安阳 455000; 2. 河北农业大学林学院, 保定 071000)

摘要: 为了筛选出高表达棉花 *GhWRKY91* 可溶性蛋白的原核表达载体。以中棉所 10 号叶片的 cDNA 为模板 PCR 扩增 *GhWRKY91* 基因, 扩增产物分别构建到 4 个不同的原核表达载体 pET-22b(+), pET-32a(+), pMAL-c5x 和 pGEX-4T-1。将重组载体 pET-22b(+)-*GhWRKY91*、pET-32a(+)-*GhWRKY91*、pMAL-c5x-*GhWRKY91* 和 pGEX-4T-1-*GhWRKY91* 转化到大肠杆菌菌株 BL21(DE3)或 Arctic-Express™(DE3)RP 中, IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 电泳分析不同原核表达载体的蛋白表达情况。结果显示, pET-22b(+)-*GhWRKY91* 和 pET-32a(+)-*GhWRKY91* 在 BL21(DE3)中以及 pMAL-c5x-*GhWRKY91* 在 Arctic-Express™(DE3)RP 中均未见明显蛋白表达, 而 pGEX-4T-1-*GhWRKY91* 在 Arctic-Express™(DE3)RP 中表达的蛋白基本存在于上清中, 可获得可溶性蛋白。因此, 将 *GhWRKY91* 基因构建到 pGEX-4T-1 原核表达载体上可成功获得可溶性蛋白。

关键词: 棉花; *GhWRKY91* 基因; SDS-PAGE; 原核表达; 表达分析

中图分类号: S562

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2021)06-0878-05

Prokaryotic expression and identification analysis of transcription factor *GhWRKY91* gene in cotton (*Gossypium hirsutum*)

GU Lijiao^{1,2}, WEI Hengling¹, YU Shuxun¹

(1. State Key Laboratory of Cotton Biology, Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000;

2. College of Forestry, Hebei Agricultural University, Baoding 071000)

Abstract: The study was aimed at screening out the prokaryotic expression vector with high expression of cotton *GhWRKY91* soluble protein. The *GhWRKY91* gene was amplified by PCR using cDNA of CCR110 leaves as template, and the amplified products were constructed into four different prokaryotic expression vectors, pET-22b(+), pET-32a(+), pMAL-c5x and pGEX-4T-1, respectively. The recombinant vectors, pET-22b(+)-*GhWRKY91*, pET-32a(+)-*GhWRKY91*, pMAL-c5x-*GhWRKY91* and pGEX-4T-1-*GhWRKY91* were transformed into *Escherichia coli* strains BL21(DE3) or Arctic-Express™(DE3)RP. The fusion protein expression was induced by IPTG, and SDS-PAGE electrophoresis was used to analyze the protein expression by different prokaryotic expression vectors. The results showed that no obvious protein expression was observed in pET-22b(+)-*GhWRKY91* and pET-32a(+)-*GhWRKY91* in BL21(DE3) and pMAL-c5x-*GhWRKY91* in Arctic-Express™(DE3)RP. However, the protein expressed by pGEX-4T-1-*GhWRKY91* in Arctic-Express™(DE3)RP was presented in the supernatant, and a soluble protein could be obtained. Therefore, *GhWRKY91* soluble protein can be successfully obtained by constructing *GhWRKY91* gene into the prokaryotic expression vector of pGEX-4T-1.

Key words: cotton; *GhWRKY91* gene; SDS-PAGE; prokaryotic expression; expression analysis

WRKY 转录因子是植物中最大的转录调控因子家族之一^[1]。WRKY 转录因子的典型特征是包含 1~2 个由 60 个氨基酸残基构成的 WRKY 结构域,

该结构域的 N 末端含有保守的 WRKYGQK 序列, C 末端含有一个锌指结构域 (Cx4-5Cx22-23HxH 或 Cx7Cx23HxC)。根据 WRKY 结构域的数目和锌

收稿日期: 2019-09-06

基金项目: 国家棉花产业体系 (CARS-15-06) 和河北农业大学引进人才科研专项 (YJ2021011) 共同资助。

作者简介: 顾丽姣, 博士。E-mail: gulijiao1990@126.com

* 通信作者: 喻树迅, 研究员, 博士生导师。E-mail: Ysx195311@163.com

指结构的特征, WRKY 转录因子家族可以分为 3 个亚家族^[1-2]。1994 年 Ishiguro 等^[3]从甘薯中克隆了第一个 WRKY 基因 *SPF1*。随着测序成本的降低, 越来越多物种的基因组数据被释放出来, 这为鉴定更多的 WRKY 转录因子提供了基础。例如, 目前分别在拟南芥中鉴定了 74 个^[2]、水稻 101 个^[4]、油菜 145 个^[5]、陆地棉 239 个^[6]和雷蒙德式棉 120 个^[7]WRKY 转录因子, 并初步鉴定了它们在进化、植物发育和非生物胁迫中的功能。WRKY 转录因子具有丰富的生物学功能, 如拟南芥 *AtWRKY27* 参与雄性不育^[8], 棉花 *GhWRKY68* 参与盐和干旱胁迫^[9], 黄瓜 *CsWRKY50* 参与病菌抵抗^[10], 日本黄连 *CjWRKY1* 参与次生代谢物苯基异喹啉生物碱的合成^[11], 锦鸡儿 *CiWRKY40-4* 参与调控叶片衰老^[12]等过程。

高华等^[13]通过原核表达苹果 MdWRKY 蛋白鉴定了其蛋白大小; 刘蕾等^[14]构建了银杏抗菌肽 *GBA* 基因原核表达载体表达重组蛋白, 鉴定了其抗菌活性; 孙威^[15]和刘裕峰^[16]等分别构建了日本蛇根草 *OjCHS* 基因和板栗 *CmWRKY* 基因的原核表达载体, 鉴定了其重组蛋白的最佳诱导条件, 为制备大量可溶性蛋白并进行功能研究奠定了基础; 洪克前等^[17]构建香蕉 *MaWRKY1* 原核表达载体表达重组蛋白用于免疫新西兰兔获得多克隆抗体; 程先坤等构建了水稻 *OsWRKY45* 基因的全长和截断的原核表达载体表达重组蛋白, 通过凝胶组织电泳和晶体生长解释 W-box 侧翼序列对 WRKY 蛋白核酸位点的偏好性的影响^[18]。这些研究结果表明原核蛋白表达在研究蛋白质大小、蛋白纯化以及功能分析等方面具有重要的应用价值。

WRKY 基因在生物胁迫、非生物胁迫、次生物质代谢和生长发育中发挥着重要作用, 对 WRKY 转录因子进行原核表达有助于进一步研究蛋白的功能。棉花是世界上重要的纤维作物, 为纺织工业提供了大量的天然纤维, 研究 *WRKY* 基因在棉花中的功能具有重要的意义。本研究以中棉所 10 号为材料克隆 *GhWRKY91* 基因, 构建不同的原核表达载体表达 *GhWRKY91* 重组蛋白来获得可溶性蛋白, 以期进一步阐明 *GhWRKY91* 蛋白的功能, 为棉花育种提供理论基础和基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

棉花品种中棉所 10 号; 大肠杆菌感受态 BL21(DE3) 购自天根生化科技有限公司, Arctic-Express™(DE3)RP 感受态细胞来自南京钟鼎

生物技术有限公司; 原核表达载体 pET-22b(+)和 pET-32a(+)购自北京华越洋生物科技有限公司, pMAL-c5x 和 pGEX-4T-1 来自南京钟鼎生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *GhWRKY91* 基因的克隆 使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(天根)提取中棉所 10 号叶片总 RNA, 用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA) 进行反转录。根据 Dou 等^[19]提交到 NCBI GeneBank 中的 *GhWRKY91* (KF669793) 序列设计原核表达引物, 分别为: pET-22b(+)-*WRKY91* 上游引物: 5'-GAATTAATTCG GATCCATG GACAGCGGTGGTAG-3', pET-22b(+)-*WRKY91* 下游引物: 5'-GTGCGGCCGCAAGCTTGCAGATCCC AACCTGTGG-3'; pET-32a(+)-*WRKY91* 上游引物: 5'-GGCTGATATCGGATCCATGGACAGCGGTGG TAG-3', pET-32a(+)-*WRKY91* 下游引物: 5'-GTGCGGCCGCAAGCTTTCAGCAGATCCCAACCT-3'; pMAL-c5x-*WRKY91* 上游引物: 5'-GAAGGATTTACATAT GATGGACAGCGGTGGTAG-3', pMAL-c5x-*WRKY91* 下游引物: 5'-CAGG GAATTCGGATCCTCAGCAG ATCCCAACCT-3'; pGEX-4T-1-*WRKY91* 上游引物: 5'-CGCGGATCCATGGACAGCGGTGGTAG-3', pGEX-4T-1-*WRKY91* 下游引物: 5'-CCGCTCGAGTCAGCA GATCCCAACCT-3'。用高保真酶 PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (TaKaRa) 从 cDNA 中 PCR 扩增 *GhWRKY91* 基因并进行片段纯化。PCR 的扩增条件为: 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 1 min, 30 个循环。

1.2.2 原核表达载体的构建 原核表达载体 pET-22b(+)和 pET-32a(+)分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, pMAL-c5x 用 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切, pGEX-4T-1 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切, 载体酶切后进行片段纯化。用 ClonExpress® Entry One Step Cloning Kit (C114)试剂盒将 1.2.1 中纯化的 *GhWRKY91* 目的片段无缝连接到 pET-22b(+)-*GhWRKY91*、pET-32a(+)-*GhWRKY91* 和 pMAL-c5x-*GhWRKY91* 载体构建。同时, 将用 pGEX-4T-1-*WRKY91* 上游引物和 pGEX-4T-1-*WRKY91* 下游引物 PCR 扩增的 *GhWRKY91* 片段用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 用 T4 连接酶连接到双酶切后的 pGEX-4T-1 载体上, 完成 pGEX-4T-1-*GhWRKY91* 载体构建^[20]。

1.2.3 原核表达载体转化大肠杆菌感受态 将构建好的载体 pET-22b(+)-*GhWRKY91* 和 pET-32a(+)-

GhWRKY91 转化至大肠杆菌感受态 BL21(DE3)菌株, pMAL-c5x-*GhWRKY91* 和 pGEX-4T-1-*GhWRKY91* 转化 Arctic - Express™(DE3)RP 菌株, 涂布在含有氨苄抗生素的 LB 固体平板上, 挑取单克隆测序, 选取测序正确的单克隆用于原核蛋白表达。

1.2.4 原核蛋白表达和检测 目的菌株接种于 30 mL 含有氨苄抗生素的 LB 培养基中, 37 °C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8。取出 1 mL 的培养物 12 000 r·min⁻¹ 室温离心 2 min, 弃上清后用 100 μL 的 1×上样缓冲液重悬菌体。向剩余培养物中加入终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG), 20 °C 条件下 220 r·min⁻¹ 震荡培养 4 h (含 pMAL-c5x-*GhWRKY91* 载体的菌株为 37 °C 条件震荡培养), 诱导融合蛋白表达^[20]。取出 1 mL 的培养物 12 000 r·min⁻¹ 室温离心 2 min, 弃上清后用 100 μL 的 1×上样缓冲液重悬菌体。剩余培养物 5 000 r·min⁻¹ 室温离心 10 min, 弃上清, 用 PBS 缓冲液重悬菌体。重悬液超声波破碎细胞, 分别取上清液与沉淀液加入上样缓冲液重悬, 进行 12% SDS-PAGE 检测分析, 考马斯亮蓝染色显带。

2 结果与分析

2.1 pET-22b(+)-*GhWRKY91* 融合蛋白在 BL21(DE3) 中的表达鉴定

GhWRKY91 基因的编码蛋白, 预测的蛋白质的分子量为 29.82 kDa。pET-22b(+)-*GhWRKY91* 融合蛋白在 C-端含有 His 标签, 包含标签的蛋白的分子量约为 33 kDa。以未加入 IPTG 诱导剂的重组菌落做对照, 在加入 IPTG 诱导剂 20 °C 条件下诱导的重组菌和诱导破碎后的上清中均未检测到明显条带 (图 1)。在 IPTG 诱导破碎后的沉淀中检测到了条带, 以蛋白包涵体表达 (图 1)。

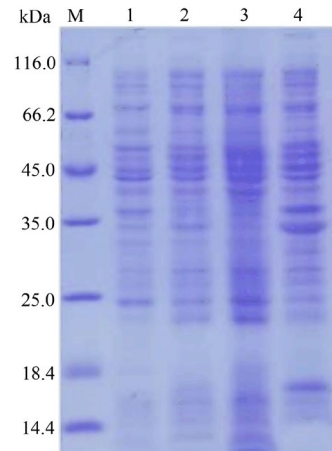
2.2 pET-32a(+)-*GhWRKY91* 融合蛋白在 BL21(DE3) 中的表达鉴定

pET-22b(+)-*GhWRKY91* 融合蛋白未见明显表达, 将 *GhWRKY91* 构建到另一载体含 His 标签的载体 pET-32a(+)上, 鉴定融合蛋白表达情况。在融合蛋白的 N-端含有 His 标签, 融合蛋白的分子量约为 47 kDa。用 IPTG 诱导剂 20 °C 条件下诱导融合蛋白表达。从 SDS-PAGE 结果可以看出, 目标蛋白在对照, 经 IPTG 诱导的菌体, IPTG 诱导超声破碎后的上清和 IPTG 诱导超声破碎后的沉淀中均未见明显表达 (图 2)。

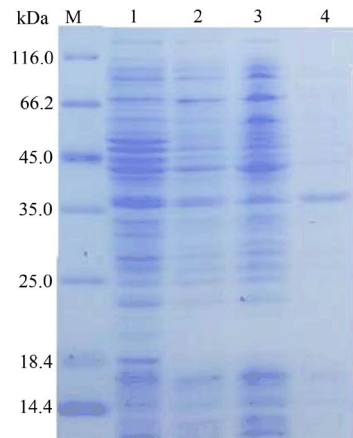
2.3 pMAL-c5x-*GhWRKY91* 融合蛋白在 Arctic-Express™(DE3)RP 中的表达鉴定

上述含有 His 标签的 pET-22b(+)和 pET-32a(+)

均未得到可溶性蛋白, 因此将 *GhWRKY91* 构建到了含有麦芽糖结合标签 (MBP-Tag) pMAL-c5x 载体上。MBP 可以减少目的蛋白的降解, 提高目的蛋白的水溶性。融合蛋白的分子量约为 74 kDa。结果显示, 37 °C 条件 IPTG 诱导后, 目标蛋白在对照、IPTG 诱导的菌体、IPTG 诱导超声破碎后的上清和 IPTG 诱导超声破碎后的沉淀中均未见明显表达 (图 3)。



M, 蛋白质分子质量标准; 1. 未经 IPTG 诱导的 pET-22b(+)-*GhWRKY91*; 2. IPTG 诱导 pET-22b(+)-*GhWRKY91*; 3. IPTG 诱导 pET-22b(+)-*GhWRKY91* 超声波破碎后的上清; 4. IPTG 诱导 pET-22b(+)-*GhWRKY91* 超声波破碎后的沉淀。
图 1 pET-22b(+)-*GhWRKY91* 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Figure 1 SDS-PAGE analysis of pET-22b(+)-*GhWRKY91* expression products



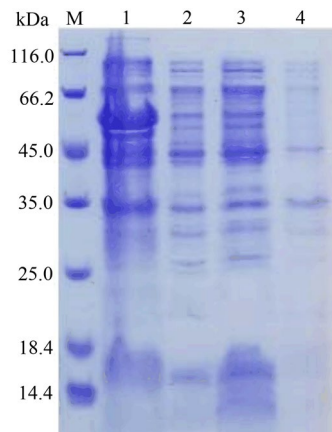
M, 蛋白质分子质量标准; 1. 未经 IPTG 诱导 pET-32a(+)-*GhWRKY91*; 2. IPTG 诱导 pET-32a(+)-*GhWRKY91*; 3. IPTG 诱导 pET-32a(+)-*GhWRKY91* 超声波破碎后的上清; 4. IPTG 诱导 pET-32a(+)-*GhWRKY91* 超声波破碎后的沉淀。

图 2 pET-32a(+)-*GhWRKY91* 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Figure 2 SDS-PAGE analysis of pET-32a(+)-*GhWRKY91* expression products

2.4 pGEX-4T-1-*GhWRKY91* 融合蛋白在 Arctic-Express™(DE3)RP 中的表达鉴定

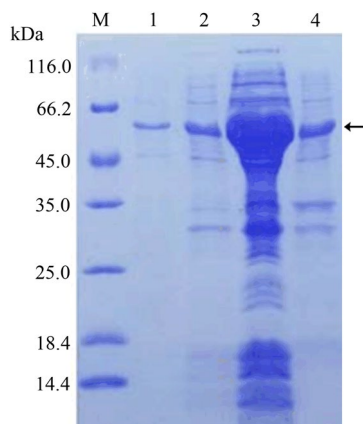
为了能够得到可溶性蛋白, 我们将 *GhWRKY91*

构建到了含有谷胱甘肽巯基转移酶标签 (GST-Tag) 的 pGEX-4T-1 载体上。GST 也可以提高目的蛋白的水溶性。融合蛋白的分子量约为 57 kDa。结果显示, 20 °C 条件 IPTG 诱导后, 融合蛋白在对照, IPTG 诱导的菌体和 IPTG 诱导破碎后的沉淀中有少量表达, 在 IPTG 诱导破碎后的上清中有相对较多的重组蛋白表达 (图 4), 表明用 pGEX-4T-1 载体表达可以获得可溶性蛋白。



M, 蛋白质分子质量标准; 1. 未经 IPTG 诱导的 pMAL-c5x-*GhWRKY91*; 2. IPTG 诱导 pMAL-c5x-*GhWRKY91*; 3. IPTG 诱导 pMAL-c5x-*GhWRKY91* 超声波破碎后的上清; 4. IPTG 诱导 pMAL-c5x-*GhWRKY91* 超声波破碎后的沉淀。

图 3 pMAL-c5x-*GhWRKY91* 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Figure 3 SDS-PAGE analysis of pMAL-c5x-*GhWRKY91* expression products



M, 蛋白质分子质量标准; 1. 未经 IPTG 诱导的 pGEX-4T-1-*GhWRKY91*; 2. IPTG 诱导 pGEX-4T-1-*GhWRKY91*; 3. IPTG 诱导 pGEX-4T-1-*GhWRKY91* 超声波破碎后的上清; 4. IPTG 诱导 pGEX-4T-1-*GhWRKY91* 超声波破碎后的沉淀。

图 4 pGEX-4T-1-*GhWRKY91* 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Figure 4 SDS-PAGE analysis of pGEX-4T-1-*GhWRKY91* expression products

3 讨论与结论

前人在研究 WRKY 转录因子的功能过程中,

通过构建 *WRKY* 基因的原核表达载体表达重组蛋白, 利用凝胶阻滞电泳或制备免疫抗体进行染色质免疫共沉淀, 进而鉴定和验证下游调控靶基因。例如在研究 *AtWRKY53* 基因调控叶片衰老机制过程中, Miao 等构建 pQE30-*AtWRKY53* 原核表达载体表达重组蛋白, 利用凝胶阻滞电泳验证了蛋白质体外结合实验获得的下游靶基因^[21]。Gu 等在研究 *GhWRKY27* 调控叶片衰老通路过程中, 将 *GhWRKY27* 基因构建到 pET-32a(+)原核表达载体表达重组蛋白免疫小鼠获得单克隆抗体, 通过染色质免疫共沉淀测序技术获得了 98 个潜在靶基因, 通过凝胶阻滞电泳验证到 *GhCYP94C1* 和 *GhRipen2-2* 是 *GhWRKY27* 的下游靶基因^[22]。本研究的目的是构建 *GhWRKY91* 基因的原核表达载体并成功表达可溶性蛋白, 为后续研究 *GhWRKY91* 的功能奠定基础。

甘玉迪等将多酚氧化酶基因 (*CsPPO*) 分别构建到含 His 标签的 pET-32a(+)和含 MBP 标签的 pMAL-c5x 载体上, pET-32a(+)载体表达的蛋白出现在沉淀中, 而 pMAL-c5x 载体可以在上清中表达可溶性蛋白^[23]。胡威等研究了含有不同标签的原核表达载体对 PR-1 融合蛋白表达的影响, pET-30a 和 pET-P16P 载体为包涵体表达, 而 pET-ELP 载体为可溶性表达^[24]。李赛赛等构建了 7 个含有不同标签的原核表达载体, 其中含 MBP 标签的载体可以表达出高可溶性的 VP2-LS3 重组蛋白^[25]。这些研究结果表明, 对于一些包涵体表达或沉淀表达, 可以通过更换具有不同标签的原核表达载体获得可溶性蛋白。本研究构建了 *GhWRKY91* 基因的 4 个原核表达载体, 包括含有 His 标签的载体 pET-22b(+)和 pET-32a(+), 含有 MBP 标签的 pMAL-c5x 以及含有 GST 标签的 pGEX-4T-1。结果显示 pGEX-4T-1 载体可以使 *GhWRKY91* 蛋白在上清中成功表达, 表明通过更换不同标签载体可以获得 *GhWRKY91* 的可溶性蛋白。MBP (麦芽糖结合蛋白标签) 和 GST (谷胱甘肽巯基转移酶标签) 与 His (组氨酸标签) 标签相比, 均属于高度可溶的标签蛋白, 但是只有 GST 标签获得了可溶性蛋白, 表明并不是所有的高度可溶标签蛋白都可以使重组蛋白进行可溶性表达^[25-26]。

综上所述, 本研究构建了 *GhWRKY91* 基因的不同原核表达载体, 经过诱导表达和 SDS-PAGE 检测, 成功表达了 *GhWRKY91*-GST 可溶性融合蛋白, 为进一步进行 *GhWRKY91* 的蛋白纯化和功能研究提供了基础。

参考文献:

- [1] RUSHTON P J, SOMSSICH I E, RINGLER P, et al. WRKY transcription factors[J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(5): 247-258.
- [2] EULGEM T, RUSHTON P J, ROBATZEK S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. Trends Plant Sci, 2000, 5(5): 199-206.
- [3] 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]. Mol Gen Genet, 1994, 244(6): 563-571.
- [4] ROSS C A, LIU Y, SHEN Q J. The WRKY gene family in rice (*Oryza sativa*)[J]. J Integr Plant Biol, 2007, 49(6): 827-842.
- [5] KAYUM M A, JUNG H J, PARK J I, et al. Identification and expression analysis of WRKY family genes under biotic and abiotic stresses in *Brassica rapa*[J]. Mol Genet Genom, 2015, 290(1): 79-95.
- [6] MCKOWN A D, KLÁPŠTĚ J, GUY R D, et al. Ecological genomics of variation in bud-break phenology and mechanisms of response to climate warming in *Populus trichocarpa*[J]. New Phytol, 2018, 220(1): 300-316.
- [7] CAI C P, NIU E L, DU H, et al. Genome-wide analysis of the WRKY transcription factor gene family in *Gossypium raimondii* and the expression of orthologs in cultivated tetraploid cotton[J]. Crop J, 2014, 2(2/3): 87-101.
- [8] MUKHTAR M S, LIU X, SOMSSICH I E. Elucidating the role of WRKY27 in male sterility in Arabidopsis[J]. Plant Signal Behav, 2017, 12(9): e1363945.
- [9] 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.
- [10] LUAN Q, CHEN C, LIU M, et al. CsWRKY50 mediates defense responses to *Pseudoperonospora cubensis* infection in *Cucumis sativus*[J]. Plant Sci, 2019, 279: 59-69.
- [11] YAMADA Y, SHIMADA T, MOTOMURA Y, et al. Modulation of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis by heterologous expression of CjWRKY1 in *Eschscholzia californica* cells[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186953.
- [12] WAN Y, MAO M, WAN D, et al. Identification of the WRKY gene family and functional analysis of two genes in *Caragana intermedia*[J]. BMC Plant Biol, 2018, 18(1): 31.
- [13] 高华, 樊红科, 党志国, 等. '秦冠' 苹果 MdWRKY 基因亚细胞定位及原核表达[J]. 园艺学报, 2011, 38(7): 1341-1348.
- [14] 刘蕾, 何光志, 王文佳. 银杏抗菌肽蛋白基因原核表达及其重组蛋白的体内外抑菌作用研究[J]. 中国药房, 2019, 30(18): 2513-2518.
- [15] 孙威, 林建, 申欢, 等. OjCHS 原核表达载体的构建及重组蛋白的纯化[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(6): 1102-1106.
- [16] 刘裕峰, 朱天辉, 刘应高, 等. 板栗 *CmWRKY* 基因的克隆、序列分析与原核表达[J]. 华北农学报, 2019, 34(4): 37-45.
- [17] 洪克前, 邝健飞, 陆旺金, 等. 香蕉果实转录因子 *MaWRKY1* 基因的原核表达和多克隆抗体制备[J]. 园艺学报, 2010, 37(12): 1929-1936.
- [18] 程先坤, 赵彦翔, 蒋青山, 等. 水稻转录因子 WRKY45 的重组表达、纯化和晶体生长[C]//中国植物病理学会 2017 年学术年会论文集. 泰安, 2017: 375.
- [19] DOU L, ZHANG X, PANG C, et al. Genome-wide analysis of the WRKY gene family in cotton[J]. Mol Genet Genomics, 2014, 289(6): 1103-1121.
- [20] GU L, MA Q, ZHANG C, et al. The cotton GhWRKY91 transcription factor mediates leaf senescence and responses to drought stress in transgenic *Arabidopsis thaliana*[J]. Front Plant Sci, 2019, 10: 1352.
- [21] MIAO Y, LAUN T, ZIMMERMANN P, et al. Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis[J]. Plant Mol Biol, 2004, 55(6): 853-867.
- [22] GU L, DOU L, GUO Y, et al. The WRKY transcription factor GhWRKY27 coordinates the senescence regulatory pathway in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. BMC Plant Biol, 2019, 19(1): 116.
- [23] 甘玉迪, 孙康, 李会娟, 等. 两种原核表达载体对 CsPPO 蛋白表达活性的影响[J]. 茶叶科学, 2018, 38(4): 396-405.
- [24] 胡威, 卢会鹏, 张晓凯, 等. 盘尾丝虫 ASP1 蛋白佐剂活性区不同标签融合表达与佐剂活性比较[J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(3): 44-50.
- [25] 李赛赛, 郭玉莹, 舒静超, 等. 鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白可溶性原核表达及免疫原性分析[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(12): 2281-2287.
- [26] 吴珊珊, 朱芸, 陈珊珊, 等. 融合标签在蛋白质可溶性表达中的应用进展[J]. 化工进展, 2014, 33(4): 993-998.