

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.10.011

拟南芥 WRKY13 基因表达载体构建及鉴定分析

胡敏, 宋慧, 叶敏, 陈逸凡, 于鑫, 樊婷婷

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:铁是植物生长所必需的微量元素,目前植物受到缺铁胁迫的现象广泛存在,严重影响了植物的生长,减少了作物的产量。因此筛选和克隆植物缺铁胁迫耐受基因对解决农业生产问题具有极大的科学价值和现实意义。文章以拟南芥为实验材料,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术克隆 WRKY13 基因的启动子区域,成功构建了 *ProWRKY13 : GUS* 融合表达载体;利用浸花法将 *ProWRKY13 : GUS* 载体转化拟南芥,经鉴定分析后可知,获得了阳性转基因植株。对转基因植株进行缺铁诱导的 GUS 组织染色,实验结果为研究缺铁胁迫下 WRKY13 基因的功能及转录水平变化提供了重要依据。

关键词:拟南芥;逆境胁迫;WRKY13 基因;载体构建;GUS 染色

中图分类号:Q943.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2024)10-1368-04

Construction and identification of *Arabidopsis* WRKY13 gene expression vector

HU Min, SONG Hui, YE Min, CHEN Yifan, YU Xin, FAN Tingting

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: Iron(Fe) is an essential micronutrient for plant growth. Nowadays plants are widely affected by Fe deficiency stress, which seriously affects plant growth and reduces crop yield. Therefore, screening and cloning of Fe deficiency stress tolerance genes are of great scientific value and practical significance to solve agricultural production problems. In this study, *Arabidopsis thaliana* was used as experimental material and the promoter region of the WRKY13 gene was cloned by polymerase chain reaction(PCR). The *ProWRKY13 : GUS* fusion expression vector was successfully constructed. The *ProWRKY13 : GUS* vector was transformed into *Arabidopsis* by the floral dip method, and positive transgenic plants were obtained after identification and analysis. The transgenic plants were subjected to GUS tissue staining induced by Fe deficiency. The results provide an important basis for studying the function and transcriptional changes of WRKY13 gene under Fe deficiency stress.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; stresses; WRKY13 gene; vector construction; GUS staining

全球气候的剧烈变化使得植物面临着各种环境胁迫,植物的生长受到重大挑战,极大地限制了农作物的产量^[1]。植物面临的环境胁迫分为生物胁迫和非生物胁迫。生物胁迫包括各种病原体支原体对植物的感染侵害和食草类动物对植物的入侵^[2]。非生物胁迫主要为干旱、土地盐碱化、重金属污染、低温和营养物质的缺乏等。其中我国农

作物面临缺铁胁迫的问题尤为突出,因此对于植物缺铁抗逆的研究十分重要。

土壤养分中金属铁离子的获取对植物的生存至关重要^[3]。铁作为植物生长发育所必需的矿质营养元素,在植物体的光合作用、呼吸作用、氮的固定、蛋白质和核酸的合成等生理代谢过程的电子传递链或酶促反应中发挥着极为重要的作

收稿日期:2022-04-28;修回日期:2022-05-26

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31872803)

作者简介:胡敏(1998—),女,安徽淮南人,合肥工业大学硕士生;

樊婷婷(1984—),女,内蒙古包头人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: fantting@hfut.edu.cn.

用^[4]。虽然铁在土壤中的丰度很高,但大多以生物有效性低的氧化态形式存在,特别是在石灰性土壤中,高 pH 值和高重碳酸盐含量严重降低了土壤中铁的有效性^[5]。缺铁会导致植物生长迟缓、光合作用减弱,从而农作物的产量和品质下降^[6]。植物面对缺铁胁迫时,会通过复杂的调控网络维持体内的铁稳态,从而适应缺铁的环境。因此研究植物对于缺铁胁迫耐受的机制具有重要意义。

研究表明,植物 WRKY 转录因子家族 WRKY13 基因在植物发育和逆境应答过程中发挥着重要作用^[7]。本文以植物 WRKY13 基因为研究对象,构建拟南芥 *ProWRKY13:GUS* 植株材料,为探究该基因在植物缺铁胁迫中的响应机制提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用植物材料为模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 哥伦比亚生态型 (Columbia, col), 购于美国拟南芥种质资源中心,由本实验室自行繁殖培育。大肠杆菌 DH5 α , 农杆菌 GV3101, 植物表达载体 pART27-GUS。

Prime STAR HS DNA Polymerase、T4-DNA Ligase (TaKaRa); San Taq mix、壮观霉素、庆大霉素、琼脂糖 蛋白胨 (Sangon); 胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒 (TansGen); Gold View、SilwetL-77 (Solarbio); 限制性内切酶 *Kpn* I、*Xho* I (NEB)。

1.2 实验方法

1.2.1 大肠杆菌的转化

取 50 μ L 大肠杆菌感受态放置冰上融化,加入 5 μ L 的连接产物,轻轻混匀,冰上放置 30 min。再将 EP 管快速放入 42 $^{\circ}$ C 水浴锅中热激 60 s,热激后迅速放置冰上冷却 2 min。管中加入 700 μ L 的无抗性液体 LB,37 $^{\circ}$ C 下 150 r/min 摇床培养 1 h。待培养完成后,涂布于壮观霉素抗性筛选 LB 固体板上,直至菌液被完全吸收。倒置平板,37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

1.2.2 重组载体构建

在 TAIR 网站查询到拟南芥 WRKY13 基因的启动子序列,通过 Primer premier 5.0 软件设计该目的片段的引物如下。

ProWRKY13-F: CGGGGTACCGTCTTCTAAATGGATAATGAAAGTACTAATGC;

ProWRKY13-R: CCGCTCGAGCTCGCAAAAGCTTGACGAAGG。

该引物酶切位点为 *Kpn* I / *Xho* I, 由上海生工生物工程有限公司合成。以拟南芥全基因组 DNA 为模板,用高保真酶 Prime STAR HS DNA Polymerase 扩增片段。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 反应体系为 50 μ L, 条件为: 95 $^{\circ}$ C 预热 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 36 个循环。扩增的产物通过琼脂糖凝胶电泳进行回收纯化。纯化后的目的片段和 GUS 质粒进行双酶切 37 $^{\circ}$ C、2 h。酶切后的目的片段与质粒通过 T4 连接酶过夜连接。将连接产物通过热激法转化到大肠杆菌 DH5 α 中,挑取单克隆菌落进行 PCR 鉴定。阳性菌落送测序,序列结果比对正确,重组载体构建成功。

1.2.3 电击转化农杆菌

电击杯冰上预冷,取 5 μ L 重组载体质粒加入农杆菌感受态中。将感受态细胞加入电击杯中,迅速放入电击仪中,调节电转仪参数为电压 1 800 V,电脉冲 25 μ F,启动电脉冲。电击结束,向电击杯中加入无抗性液体 LB,并将其转移到 EP 管中,28 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 4 h。将转化后菌液涂布于壮观霉素和庆大霉素抗性筛选 LB 固体培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 48 h,挑选单菌落 PCR 鉴定,获得阳性菌落进行甘油保菌。

1.2.4 浸花法侵染拟南芥

取阳性菌液转接到 100 mL 抗性液体 LB 培养基中,28 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至菌液 A_{600} 为 0.5~0.8,5 000 r/min 离心 10 min,弃上清。加入终质量浓度为 50 g/L 的蔗糖、2.18 g/L 的 1/2 MS、5 g/L 的 MES 和 0.02% 的 SilwetL-77 配置侵染缓冲液重悬沉淀,将菌液稀释至 A_{600} 为 0.5~0.8。用剪刀去除野生型拟南芥中已授粉的花和果荚,将其余花浸泡在侵染缓冲液中浸泡 20 s,使植物表面有一层水膜即可。用保鲜膜包裹植株并黑暗处理,12 h 后在正常光照环境中继续培养。1 周后再次侵染,待成熟后收种。

1.2.5 阳性转基因株系的筛选

种子进行烘干和春化后撒在含有卡纳霉素的 1/2 MS 固体培养基上,光照培养 14 d,选取叶片嫩绿且根系较长的植株进行移栽。2 周后提取植株的基因组 DNA 进行 PCR 鉴定,除去阴性植株。对植株进行单株收种,将子代种子点在含有卡纳霉素的 1/2 MS 固体培养基上进行抗性分离,筛选出纯合的阳性植株。

1.2.6 GUS 染色

将筛选获得的 *ProWRKY13 : GUS* 纯合体植株种子点在 MS 固体培养基上, 恒温光照培养 7 d。7 d 后把 1/2 的幼苗移到缺铁的固体培养基上进行缺铁胁迫处理 3 d。全部幼苗放置于 GUS 染色液中, 37 °C 避光处理 6 h, 用 75% 的乙醇进行脱色观察。

2 结果与分析

2.1 目的启动子区域片段克隆

提取野生型拟南芥的基因组 DNA, 并以此为模板克隆出目的基因的启动子区域片段 *ProWRKY13*。将克隆片段进行琼脂糖电泳检测, 结果如图 1 所示。目的条带大小在 2 000 bp 左右与所选取的启动子区域的片段大小相符。

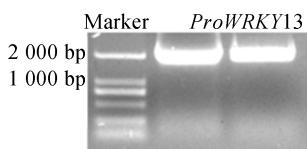


图 1 拟南芥 WRKY13 基因启动子片段的克隆

2.2 目的片段与 pART27-GUS 质粒双酶切

目的片段扩增引物设计时添加了限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xho* I 及其保护碱基。分别对克隆的目的片段和 GUS 质粒进行酶切, 电泳结果如图 2 所示。由图 2 可知, 酶切后条带清晰, 未见拖带和弥散, 且条带大小均与预期大小相符。

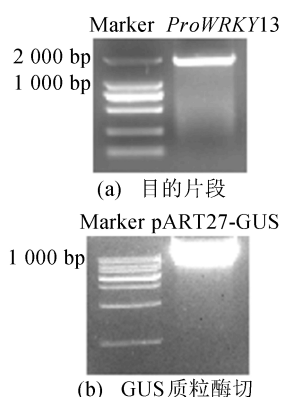


图 2 目的片段与质粒酶切

2.3 重组载体的连接与转化

通过回收纯化酶切后的目的片段和质粒, 并通过 T4-DNA 连接酶进行连接, 从而获得了连接产物。取出 5 μ L 的连接产物通过热激法转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。从固体 LB 的壮观

霉素抗性筛选板上随机挑取 12 个单克隆菌落, 过夜摇混后进行 PCR 鉴定, 电泳结果如图 3 所示。图 3 中, 1、2、3、5、6、7、9 号泳道有明亮的条带且大小正确。选择 1 和 2 号菌进行测序, 测序结果比对后显示, 均为阳性菌落。

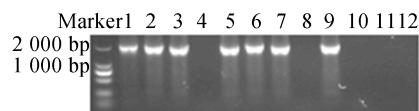


图 3 大肠杆菌菌落 PCR 验证

2.4 *ProWRKY13 : GUS* 转基因阳性植株的构建

将测序正确的重组质粒通过电击法转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中。从庆大霉素和壮观霉素抗性筛选板上随机挑取 12 个单克隆菌落, 过夜摇混后进行 PCR 鉴定, 电泳结果如图 4 所示。图 4 中, 1~6 号泳道有明亮的条带且大小正确, 均为阳性菌落。

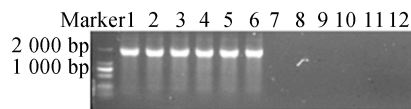


图 4 农杆菌菌落 PCR 验证

选取阳性菌落通过浸花法侵染野生型拟南芥, 收取侵染后的拟南芥种子。将种子撒在含有卡纳霉素抗性的 1/2 MS 固体培养基上, 放在恒温光照培养箱中培养 2 周左右, 结果如图 5 所示。

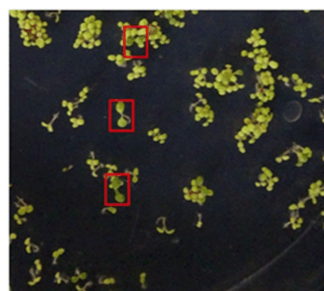


图 5 *ProWRKY13 : GUS* 转基因阳性植株抗性筛选结果

观察苗的状态, 将叶片嫩绿且具有长根的植株进行移栽。2 周后提取植株的 DNA 进行 PCR 鉴定。鉴定的阳性植株单株收取子代种子, 将子代种子每种取 20~25 颗点播在卡纳霉素抗性的 1/2 MS 固体培养基上, 恒温光照培养箱中培养 2 周左右, 种子生长发育情况如图 6 所示。图 6 中, 1、2、4 组部分幼苗发黄。根据遗传分离定律, 第 3 组为纯合的转基因植株。

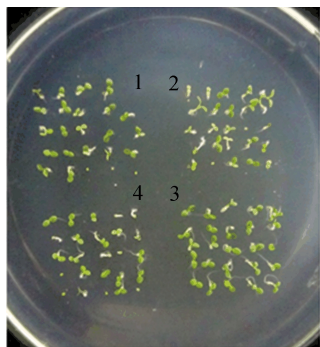


图 6 *ProWRKY13:GUS* 转基因植株纯合体筛选结果

2.5 转基因植株 GUS 染色分析

为了探究 *WRKY13* 基因在植物应对缺铁胁迫响应中发挥的作用。将获得的纯合体 *ProWRKY13:GUS* 种子点在 MS 固体培养基上垂直生长 7 d。7 d 后将 1/2 数量的幼苗移到缺铁的 MS 固体培养基上继续生长 3 d。将未经缺铁胁迫处理的及处理过的幼苗都进行 GUS 染色,结果如图 7 所示。由图 7 可知,在缺铁诱导下,*ProWRKY13:GUS* 植株在根和叶中的染色程度都比对照组的浅,说明 *WRKY13* 基因在缺铁胁迫下表达水平下调。这将为 *WRKY13* 基因响应植物缺铁胁迫的应答提供了有力的证据。

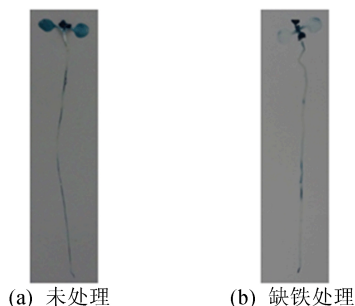


图 7 *ProWRKY13:GUS* 转基因植株 GUS 染色

3 讨 论

铁是植物生长过程中不可缺少的微量元素,在植物呼吸作用和光合作用的电子传递链以及各种正常生理代谢中发挥重要作用。而土壤中的铁元素主要以不溶性的形式存在,植物很难吸收并利用,因此植物出现普遍的铁缺乏现象。缺铁会导致植物的生长发育受到影响,植物的品质下降从而产量下降^[8]。植食性食物是人类主要的食物来源之一,因此研究植物抗逆途径中的相关基因,通过转基因技术构建缺铁耐受的转基因植株具有重大的实际意义和应用价值。

GUS 是一种水解酶,具有活性稳定和植物低背景性。目前检测植物中融合表达基因 GUS 活性的最适底物为 X-Gluc。GUS 可将 X-Gluc 水解为蓝色物质,从而植物中 GUS 活性的部位呈现蓝色^[9]。通过观察 GUS 染色情况分析 *WRKY13* 基因在植株中的表达位置及表达量的变化。

本文构建了拟南芥 *ProWRKY13:GUS* 转基因材料,并通过 GUS 染色研究 *WRKY13* 基因在缺铁胁迫诱导下基因的表达情况。结果发现,在缺铁处理下 *WRKY13* 基因表达水平被明显抑制,说明该基因参与植物应对缺铁胁迫的响应,这将为 *WRKY13* 基因响应缺铁胁迫完整信号通路的探究提供理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] TORABIAN S, FARHANGI-ABRIZ S, ALAEE T. Hydrochar mitigates salt toxicity and oxidative stress in maize plants[J]. Archives of Agronomy and Soil Science, 2021, 67(8):1104-1118.
- [2] 刘治民,杨芷怡,冀凤丹,等.非生物胁迫下植物 DNA 甲基化研究进展[J].生物技术通报,2020,36(11):122-132.
- [3] BRUMBAROVA T, BAUER P, IVANOV R. Molecular mechanisms governing *Arabidopsis* iron uptake[J]. Trends in Plant Science, 2015, 20(2):124-133.
- [4] 张进,吴良欢,孔向军,等.铁锌混合肥喷施对豌豆子粒铁、锌、可溶性糖和维生素 C 含量的影响[J].植物营养与肥料学报,2006(2):2245-2249.
- [5] SCHMIDT W. Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants[J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(4):188-193.
- [6] YAO Z, HAO W, WANG Y, et al. Loss-of-function mutations in the *ERF96* gene enhance iron-deficient tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2022, 175:1-11.
- [7] SHENG Y B, YAN X X, HUANG Y, et al. The *WRKY* transcription factor, *WRKY13*, activates *PDR8* expression to positively regulate cadmium tolerance in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell and Environment, 2019, 42(3):891-903.
- [8] LI L, GAO W, PENG Q, et al. Two soybean bHLH factors regulate response to iron deficiency[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2018, 60(7):608-622.
- [9] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4):387-405.

(责任编辑 闫杏丽)