

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.02.012

# 梨果实花青苷调控因子 PyWRKY26 蛋白表达分析

颜龙飞, 张 华, 肖钰薇, 姚改芳, 胡康棣

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘 要:**花青苷是形成红皮梨的主要色素类物质,其合成受一系列转录因子的调控。PyWRKY26 是参与红皮梨花青苷合成的主要转录因子,但是其蛋白结构特征并不清楚。文章以‘红茄梨’果皮为实验材料,利用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)克隆 PyWRKY26 基因的编码序列(coding sequence,CDS)全长;采用同源重组克隆技术将 PyWRKY26 与带 His 标签的 pCOLD 原核表达载体进行连接,将重组表达载体转化到大肠杆菌 Rosetta(DE3),通过异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)法诱导重组蛋白表达,利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析表达产物。结果表明:在‘红茄梨’果皮中能成功扩增出 PyWRKY26 基因的 CDS 全长,并构建了 PyWRKY26-pCOLD 重组表达载体;将重组质粒的大肠杆菌置于 22 °C 条件下,用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 16 h,与对照相比,该诱导条件下能成功表达蛋白;通过 His 镍柱纯化法并结合 SDS-PAGE 检测技术得到了纯化后含量较高的 PyWRKY26-pCOLD 融合蛋白,为进一步研究转录因子 PyWRKY26 的蛋白结构及功能奠定了重要基础。

**关键词:**红茄梨;PyWRKY26 基因;基因克隆;原核表达;蛋白纯化

**中图分类号:**Q943.2

**文献标志码:**A

**文章编号:**1003-5060(2025)02-0227-05

## Expression analysis of anthocyanin transcription factor PyWRKY26 in pear fruits

YAN Longfei, ZHANG Hua, XIAO Yuwei, YAO Gaifang, HU Kangdi

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

**Abstract:**Anthocyanins are the main pigment of *Pyrus pyrifolia*, and the synthesis of anthocyanins is regulated by a series of transcription factors. PyWRKY26 is the main transcription factor involved in the anthocyanin synthesis. However, the structure of the protein is not clear. In this study, the coding sequence(CDS) full length of PyWRKY26 gene was cloned by polymerase chain reaction(PCR) from the pericarp of Starkrimson pear. PyWRKY26 was ligated with the prokaryotic expression vector pCOLD with His tag using homologous recombination technology, and the recombinant expression vector was transformed into Rosetta(DE3). Then, the recombinant protein was induced by isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside(IPTG) and analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE). The result showed that the CDS full length of PyWRKY26 gene was successfully amplified from the pericarp of Starkrimson pear and the recombinant expression vector of PyWRKY26-pCOLD was constructed. The PyWRKY26-pCOLD fusion protein was successfully expressed by 0.5 mmol/L IPTG for 16 h at 22 °C and purified by His-Ni column combined with SDS-PAGE. This study lays an important foundation for further studying the structure and function of PyWRKY26.

**Key words:**Starkrimson pear; PyWRKY26 gene; gene cloning; prokaryotic expression; protein purification

**收稿日期:**2022-08-29;**修回日期:**2022-12-30

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31901993;32170315);安徽省自然科学基金资助项目(1908085MC72)

**作者简介:**颜龙飞(1997—),男,安徽临泉人,合肥工业大学硕士生;

张 华(1973—),男,江苏徐州人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师。

梨是蔷薇科(Rosaceae)梨属(*Pyrus L.*)多年生果树,在我国具有悠久的栽培历史,分布广泛,是我国第三大水果。梨果皮根据颜色可大致分为红皮、褐皮和绿皮 3 种类型<sup>[1-2]</sup>。其中,红皮梨果皮色泽鲜艳,营养价值丰富,其果实中含有大量的糖类、鞣酸以及维生素 B 类微量元素,具有生津润燥、养护咽喉等功效,受到消费者的青睐。然而目前我国优质的红皮梨品种相对较少。因此,关于红皮梨花青苷调控机制成为国内外学者研究的热点。

梨果皮花青苷代谢在园艺作物中被广泛研究,它是在一系列酶催化作用下完成的<sup>[3]</sup>。目前,大量研究表明,在植物中花青苷生物合成主要受 MYB-bHLH-WD40(MBW) 转录复合体的调控影响<sup>[4-7]</sup>。此外,一些研究表明 WRKYs 蛋白与花青苷生物合成的调控有明显的关系。*Pb-WRKY75* 通过激活 *PbDFR*、*PbUFGT* 和 *Pb-MYB10b* 促进花青苷积累<sup>[8]</sup>;苹果中的 *Md-WRKY71-L* 与草莓中的 *FvWRKY71* 具有很高的同源性,参与调控苹果花青苷合成<sup>[9]</sup>;而葡萄中,*VvWRKY26*(*PhPH3* 的同源基因)诱导黄酮类物质积累<sup>[10]</sup>; *AzWRKY41* 突变造成花青苷含量在拟南芥莲座叶的增加<sup>[11]</sup>;在苹果中,*Md-WRKY40* 在病害诱导花青苷积累中起关键作用,UV-B 诱导的 *MdWRKY72* 增强花青苷的积累,*MdWRKY41* 受 *MdHY5* 靶向转录抑制,而 *Md-WRKY41-MdMYB16* 形成的复合物抑制 *MdANR* 和 *MdUFGT* 的表达<sup>[12]</sup>;在红皮梨中,*PyWRKY26* 与 *PybHLH3* 互作共靶向 *Py-MYB114* 启动子,进而结合到花青苷代谢通路下游结构基因的启动子,激活其表达,促进花青苷合成<sup>[13]</sup>。

本文以 *PyWRKY26* 为研究对象,利用同源重组技术对其进行原核表达载体的构建,使植物蛋白在原核细胞得以有效表达,获得有活性的纯化蛋白,为进一步研究 *PyWRKY26* 蛋白的结构特征和生物功能奠定重要的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与材料

#### 1.1.1 实验材料

本研究所用实验材料为花后 60 d 的‘红茄梨’,采自山东省果树研究所;大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、Rosetta(DE3)购于上海唯地生物技术有限公司。

#### 1.1.2 试剂

HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Phanta<sup>®</sup> Super-Fidelity DNA Polymerase、ClonExpress II One Step Cloning Kit、dNTP mix、Exnase II、10 $\times$ DNA Loading Buffer、Trans 2K Plus DNA Marker、2 $\times$ Taq mix、蛋白 Marker 均购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司;限制性内切酶 *BamH* I、*Xba* I 均购于翌圣生物科技股份有限公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购于北京索莱宝科技有限公司;pCOLD 原核表达载体菌株由本实验室提供;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 引物设计与合成

根据 NCBI 网站提供的 *PyWRKY26* 基因编码序列(coding sequence,CDS),利用引物设计软件 Primer Premier 5 设计聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)引物,其序列如下。

*PyWRKY26*-pCOLD-F:5'-CTCGGTACCC TCGAGGGATCCATGGCCTCTCTTCAGGG AG-3'(*BamH* I 识别位点);

*PyWRKY26*-pCOLD-R:5'-AGCAGAGAT TACCTATCTAGATCAGCACAGCAATGATT CAAAAAATGC-3'(*Xba* I 识别位点)。

#### 1.2.2 基因片段的克隆及纯化

提取红茄梨梨皮的总 RNA,以红茄梨总 RNA 为模板,利用 HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将红茄梨总 RNA 反转录成 cDNA,并以此 cDNA 作为模板进行目的基因的扩增。具体扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。用体积分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析检测,成功得到目的基因片段后,按照 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit 说明书回收扩增所得的目的基因片段。

#### 1.2.3 原核表达载体的构建

将纯化回收的目的片段和原核表达载体 pCOLD 用内切酶 *BamH* I 和 *Xba* I 在 37 $^{\circ}$ C 水浴双酶切 60 min,将产物在 PCR 仪 37 $^{\circ}$ C 连接 45 min 后转化至感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,然后涂布至含有羧苄青霉素抗性的固体 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养后挑取阳性单克隆菌落,进行 PCR 鉴定。将 PCR 检测正确的单克隆菌落,进行过夜摇菌并提取重组质粒、送测序,将测序正确的重组

质粒命名为 PyWRKY26-pCOLD。重新将测序正确的重组质粒转化至感受态细胞 Rosetta (DE3),挑菌,利用 PCR 技术再次进行鉴定,确定正确的菌落进行保菌和进一步实验<sup>[14-15]</sup>。

#### 1.2.4 融合蛋白的诱导与表达

将已经鉴定正确的重组表达载体 PyWRKY26-pCOLD 的 Rosetta (DE3) 菌株接种到 LB 培养基,37 °C、200 r/min 培养,将菌液摇至  $A_{600}=0.6$  时,加入适量 0.5 mmol/L 的 IPTG,然后在 22、28、37 °C 条件下分别诱导 16 h 左右,使融合蛋白充分表达。利用优化的最佳温度和诱导剂浓度进行大量培养 Rosetta (DE3),诱导融合蛋白表达。最后取适量诱导后的菌液,提取其总蛋白,并用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测目标蛋白的表达情况<sup>[16]</sup>。

#### 1.2.5 融合蛋白的纯化

取适量含有表达载体的菌株在 500 mL LB 培养液中扩大培养,在 22 °C 诱导表达 16 h 后,用高速冷冻离心机,4 °C、8 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,去上清,用 20 mL 裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 值 8.0) 重悬沉淀,再进行超声破碎,4 °C、10 000 r/min 离心 20 min,取上清加入 1 mL 50% 的镍柱纯化树脂 Ni-NTA (His),4 °C 轻微振荡 30 min。将结合有目的蛋白的 Ni-NTA 树脂装柱<sup>[17-18]</sup>。用浓度为 25 mmol/L 的咪唑漂洗液漂洗 3 次,通过 SDS-PAGE 分析纯化结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的片段的克隆与鉴定

利用 Plant Total RNA Isolation Kit 提取红茄梨果皮总 RNA,琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示。图 1 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 5 表示果皮总 RNA 提取结果。

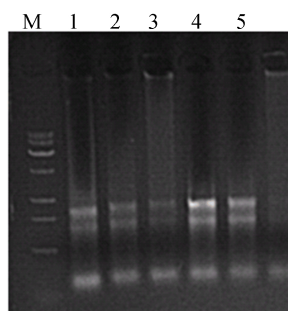


图 1 ‘红茄梨’梨皮 RNA 提取结果

将提取的 RNA 反转录成 cDNA,以此为模

板进行 PyWRKY26 目的片段的扩增,结果如图 2 所示。图 2 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 3 表示 PyWRKY26 基因片段扩增结果。由图 2 可知,特异性目的条带在 1 800 bp 左右处,这与目的片段大小 1 752 bp 基本一致,位置符合。即片段扩增成功,可进行下一步的原核表达载体的构建。

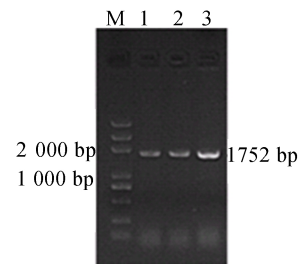


图 2 PyWRKY26 基因片段扩增结果

### 2.2 原核表达载体的构建和鉴定

构建的原核表达载体转化大肠杆菌 Rosetta,经菌落 PCR 检测,结果如图 3 所示。图 3a 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 8 表示原核表达载体转化 DH5 $\alpha$  后菌落 PCR 鉴定结果。图 3b 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 8 表示原核表达载体转化后菌落 PCR 鉴定结果。

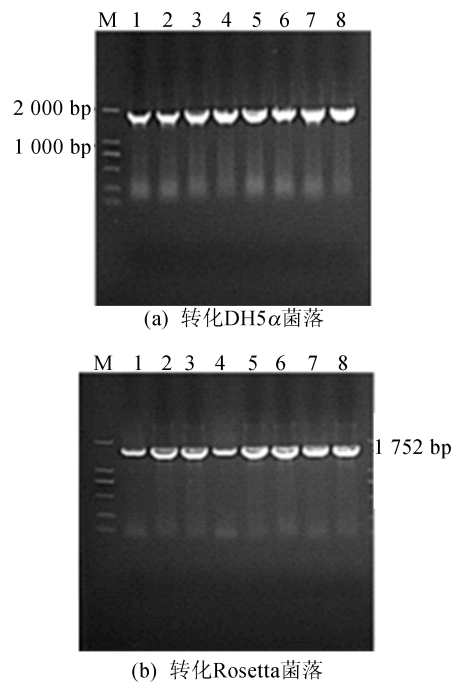


图 3 重组载体 PyWRKY26-pCOLD 菌落 PCR 结果

从图 3 可以看出,泳道 1~泳道 8 有一条明亮的特异性的条带,在 1 800 bp 左右,这与目标条

带 1 752 bp 基本一致,随机选取 3 个单克隆进行摇菌并提取质粒;再利用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xba* I 进行双酶切反应,得到一条目的条带在 1 752 bp 处,如图 4 所示。

图 4 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 3 表示双酶切重组载体结果。从图 4 可以看出,重组质粒测序结果正确,说明原核表达载体 PyWRKY26-pCOLD 构建成功。

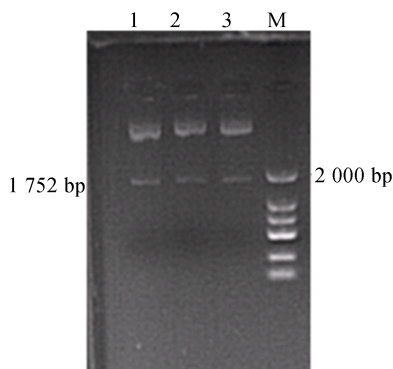


图 4 重组载体 PyWRKY26-pCOLD 双酶切结果

### 2.3 融合蛋白诱导表达分析

将测序正确的重组表达载体的菌株,继续扩大培养,并加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,16 h 诱导后利用 SDS-PAGE 电泳检测目标蛋白表达情况,结果如图 5 所示。图 5 中:M 表示蛋白 Marker;“-”表示未加 IPTG 的菌体对照;“+”表示加入 IPTG 的菌体。在 22 °C 条件下诱导表达 16 h 后,加入 IPTG 的菌体可成功诱导表达 PyWRKY26-pCOLD 融合蛋白,目标蛋白分子量为 80 kDa 左右,与理论推算分子量 (82.80 kDa) 相符,即融合蛋白诱导成功。

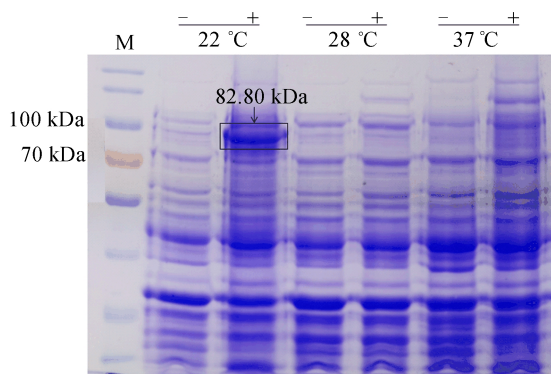


图 5 利用 IPTG 法诱导目标蛋白的表达

### 2.4 PyWRKY26-pCOLD 融合蛋白的纯化结果

取适量含有表达载体的菌株在 500 mL LB

培养液中扩大培养,在 22 °C 诱导表达 16 h 后,高速冷冻离心收集菌体,加入结合缓冲液和溶菌酶后进行超声破碎,而后再次离心得到沉淀和上清液,取上清液利用镍柱纯化树脂 Ni-NTA (His) 纯化目标蛋白,结果如图 6 所示。图 6 中:M 表示蛋白 Marker;泳道 1~泳道 3 表示漂洗得到的纯化蛋白。

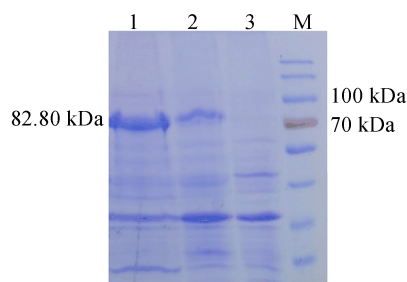


图 6 SDS-PAGE 检测纯化的目标蛋白

## 3 结 论

本研究以‘红茄梨’为研究材料,提取总 RNA,并反转录为 cDNA,对目的基因片段 *Py*-WRKY26 进行克隆,并构建了重组的原核表达载体,成功地诱导出 PyWRKY26-pCOLD 融合蛋白,分离纯化后的融合蛋白经进一步浓缩后可用于 PyWRKY26-pCOLD 蛋白的检测,也为后期对该蛋白的结构和生物学功能的研究奠定了重要基础。

### [参 考 文 献]

- [1] 施露,高庆超,李亚辉,等. 梨果实品质的研究进展与潜在技术应用展望[J]. 江苏农业学报,2022,38(2):567-576.
- [2] 杜昱彤,曲柏宏,李润文. 我国红皮梨资源及果实着色机制研究进展[J]. 延边大学农学学报,2021,43(4):98-107.
- [3] 孟义淳. 苹果梨果皮花青苷合成相关基因的克隆与表达分析[D]. 延吉:延边大学,2020.
- [4] 齐宇. MYB-bHLH-WD40 对牡丹花青苷生物合成的转录调控机制[D]. 北京:中国林业科学研究院,2020.
- [5] 高国应,伍小方,张大为,等. MBW 复合体在植物花青素合成途径中的研究进展[J]. 生物技术通报,2020,36(1):126-134.
- [6] NIE X, ZHAO Y, ZHANG L, et al. Mechanisms of MYB-bHLH-WD40 complex in the regulation of Anthocyanin biosynthesis in plants[J]. Agricultural Biotechnology, 2015, 4(3):5-8,13.
- [7] WALKER A R, DAVISON P A, BOLOGNESI-WINFIELD A C, et al. The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosyn-

- thesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein[J]. Plant Cell, 1999, 11(7):1337-1349.
- [8] CONG L, QU Y, SHA G, et al. *PbWRKY75* promotes anthocyanin synthesis by activating *PbDFR*, *PbUFGT*, and *PbMYB106* in pear [J]. Physiologia Plantarum, 2021, 173(4):1841-1849.
- [9] 苏梦雨. MdWRKY71-L 和 MdJa2 调控苹果花青苷合成的分子机制[D]. 泰安:山东农业大学, 2022.
- [10] AN J P, ZHANG X W, YOU C X, et al. *MdWRKY40* promotes wounding-induced anthocyanin biosynthesis in association with *MdMYB1* and undergoes MdBT2-mediated degradation[J]. New Phytologist, 2019, 224(1):380-395.
- [11] DUAN S W, WANG J J, GAO C H, et al. Functional characterization of a heterologously expressed Brassica napus *WRKY41-1* transcription factor in regulating anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Science, 2018, 268:47-53.
- [12] 毛作霖. *MdHY5-MdWRKY41-MdMYBs* 转录因子级联调节红肉苹果花青苷和原花青素生物合成的机理[D]. 泰安:山东农业大学, 2021.
- [13] LI C, WU J, HU K D, et al. *PyWRKY26* and *PybHLH3* cotargeted the *PyMYB114* promoter to regulate anthocyanin biosynthesis and transport in red-skinned pears[J]. Horticulturae Research, 2020, 7:37.
- [14] 乔慧聪, 任向波, 吴秀丽, 等. 烟草新驱动蛋白基因 *NtTKR* 原核表达载体的构建、诱导表达及蛋白纯化[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14):24-26.
- [15] 李聪, 田培洁, 张宇, 等. 烟草花叶病毒 *P54* 基因的原核表达与蛋白纯化[J]. 福建农业学报, 2021, 36(2):209-214.
- [16] 杨旭颖, 安丽君. 拟南芥细胞周期调控因子 *KRP2* 的原核表达及蛋白纯化[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(12):63-65.
- [17] 邹倩, 赵懿琛, 赵德刚. 杜仲 *Dirigent1* 基因的原核表达及蛋白纯化[J]. 分子植物育种, 2019, 17(1):86-91.
- [18] 陈蒙, 袁赫海, 张宇, 等. 山葡萄 *PAL* 基因原核表达载体的构建及表达蛋白纯化[J]. 安徽农业大学学报, 2019, 46(5):888-893.

(责任编辑 闫杏丽)

## (上接第 202 页)

- [18] LI W, HU Z, NOMOTO K, et al. 2.44 kV Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vertical trench Schottky barrier diodes with very low reverse leakage current [C]//2018 IEEE International Electron Devices Meeting. San Francisco: IEEE, 2018: 8.5.1-8.5.4.
- [19] LI W, NOMOTO K, HU Z, et al. Field-plated Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> trench Schottky barrier diodes with a BV<sup>2</sup>/R<sub>on,sp</sub> of up to 0.95 GW/cm<sup>2</sup> [J]. IEEE Electron Device Letters, 2019, 41(1):107-110.
- [20] OTSUKA F, MIYAMOTO H, TAKATSUKA A, et al. Large-size (1.7 × 1.7 mm<sup>2</sup>) β-Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> field-plated trench MOS-type Schottky barrier diodes with 1.2 kV breakdown voltage and 10<sup>9</sup> high on/off current ratio [J]. Applied Physics Express, 2021, 15(1):016501.
- [21] ZHOU H, ZHANG J, ZHANG C, et al. A review of the most recent progresses of state-of-art gallium oxide power devices [J]. Journal of Semiconductors, 2019, 40(1):011803.
- [22] ZHOU H, ZENG S, ZHANG J, et al. Comprehensive study and optimization of implementing p-NiO in β-Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> based diodes via TCAD simulation [J]. Crystals, 2021, 11(10):1186.
- [23] VERMA J, PANT S, KUMARI S, et al. Trench termination in Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-based power device: a simulation-based study [J]. Applied Nanoscience, 2022, 13:3255-3261.
- [24] LABED M, SENGOUGA N, MEFTAH A, et al. Leakage current modelling and optimization of β-Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Schottky barrier diode with Ni contact under high reverse voltage [J]. ECS Journal of Solid State Science and Technology, 2020, 9(12):125001.
- [25] LI W, SARASWAT D, LONG Y, et al. Near-ideal reverse leakage current and practical maximum electric field in β-Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Schottky barrier diodes [J]. Applied Physics Letters, 2020, 116(19):192101.
- [26] LV Y, WANG Y, FU X, et al. Demonstration of β-Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> junction barrier Schottky diodes with a Baliga's figure of merit of 0.85 GW/cm<sup>2</sup> or a 5 A/700 V handling capabilities [J]. IEEE Transactions on Power Electronics, 2020, 36(6):6179-6182.
- [27] LI W, NOMOTO K, HU Z, et al. Guiding principles for trench Schottky barrier diodes based on ultrawide bandgap semiconductors; a case study in Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [J]. IEEE Transactions on Electron Devices, 2020, 67(10):3938-3947.
- [28] ZHANG Y, SUN M, LIU Z, et al. Novel GaN trench MIS barrier Schottky rectifiers with implanted field rings [C]//2016 IEEE International Electron Devices Meeting. San Francisco: IEEE, 2016: 10.2.1-10.2.4.
- [29] REN N, SHENG K. An analytical model with 2-D effects for 4H-SiC trench junction barrier Schottky diodes [J]. IEEE Transactions on Electron Devices, 2014, 61(12):4158-4165.
- [30] 尚也淳, 刘忠立, 王姝睿. SiC Schottky 结反向特性的研究 [J]. 物理学报, 2003, 52(1):211-216.
- [31] KONG M, HU Z, GAO J, et al. A New Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> trench Schottky barrier diode with improved forward conduction characteristics [C]//2021 IEEE 14th International Conference on ASIC. Kunming: IEEE, 2021: 1-4.
- [32] SUGIURA T, NAKANO N. Hard-and soft-breakdown modeling in (001) oriented β-Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Schottky barrier diode [J]. Journal of Applied Physics, 2022, 132(17):175703.

(责任编辑 胡亚敏)