

高颖, 杨亚苓, 李慕紫, 等. 青花菜 *WRI4* 基因的克隆、生物信息学分析及表达载体的构建[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(3): 710-717.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.03.021

# 青花菜 *WRI4* 基因的克隆、生物信息学分析及表达载体的构建

高颖<sup>1</sup>, 杨亚苓<sup>1</sup>, 李慕紫<sup>1</sup>, 贺丽霞<sup>2</sup>, 李慧<sup>1</sup>

(1. 天津农学院园艺园林学院, 天津 300384; 2. 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

**摘要:** AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive factor) 是一个庞大的转录因子超家族, 其蛋白质中均含有 1 段或 2 段由 60~70 个氨基酸残基组成的结构域, 该家族基因广泛存在于植物体内, 在植物生长发育、生物及非生物胁迫响应、植物次级代谢中均发挥着重要的作用。本试验利用前期的青花菜转录组数据, 采用 RT-PCR 技术从青花菜中分离克隆 *WRI4* 基因, 利用生物信息学分析软件对其进行基因结构及特征分析。结果表明, 青花菜 *WRI4* 转录因子基因共编码 308 个氨基酸, *WRI4* 具有 2 个 AP2/ERF 结构域, 属于 AP2/ERF 家族成员。*WRI4* 蛋白为亲水性蛋白, 无跨膜结构, 二级结构以无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角为主。氨基酸序列比对及进化树分析结果表明, 青花菜 *WRI4* 转录因子与白菜、油菜相应的转录因子有较高的相似性。采用同源重组技术构建了 *WRI4* 过表达载体, 为进一步深入探究该转录因子的功能, 培育青花菜新品种奠定了基础。

**关键词:** 青花菜; *WRI4*; AP2/ERF; 同源重组克隆

**中图分类号:** S635.3; Q785

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-4440(2021)03-0710-08

## Cloning, bioinformatic analysis and expression vector construction of broccoli *WRI4* gene

GAO Ying<sup>1</sup>, YANG Ya-ling<sup>1</sup>, LI Mu-zi<sup>1</sup>, HE Li-xia<sup>2</sup>, LI Hui<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China; 2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive factor) is a large superfamily of transcription factors, there is one or two domains composed of 60–70 amino acid residues in its proteins. The family genes widely exist in plants and play important roles in plant growth and development, responses to biological and abiotic stresses and botanic secondary metabolism. *WRI4* gene was isolated and cloned from broccoli by RT-PCR technique based on the previous data of transcriptome in broccoli, then the structure and characteristics of *WRI4* gene were analyzed by bioinformatic analysis software. The results showed that, 308 amino acids were encoded by *WRI4* transcription factor gene in broccoli, and there were two AP2/ERF domains in *WRI4* transcription factor, which belonged to AP2/ERF family member. The *WRI4* protein was hydrophilic and had no transmembrane structure, its main secondary structures were random coil,  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -rotation angle. Results of amino acid sequence alignment and evolutionary tree analysis showed that, *WRI4* transcription factors in broccoli had high similarity with the corresponding transcription factors in cabbage and rape. Overexpression vector of *WRI4* was constructed by homologous recombination technique, which provided basis for further exploring on its functions and cultivating new varieties of broccoli.

收稿日期: 2020-10-13

基金项目: 天津市科技计划种业科技重大专项(18ZXZYN00160)

作者简介: 高颖(1992-), 女, 天津人, 硕士研究生, 主要从事园艺学研究。(E-mail) 1203067543@qq.com

通讯作者: 李慧, (E-mail) lihui@tjau.edu.cn

constructed by homologous recombination technique, which provided basis for further exploring on its functions and cultivating new varieties of broccoli.

**Key words:** broccoli; *WRI4*; AP2/ERF; homologous recombination cloning

高盐、干旱、极端温度等不利因素对大多数植物的生长均有抑制作用。面对逆境胁迫,植物已经进化出复杂的系统来调节对压力信号的适应<sup>[1]</sup>。AP2/ERF (APETALA2/ethylene-responsive factor) 属于植物中特有的一类转录因子超家族。其广泛参与植物的生物与非生物胁迫,并在一些信号交叉途径中作为中间因子参与调节<sup>[2]</sup>。目前已有研究结果表明,AP2/ERF 转录因子家族对植物适应非生物逆境、植物生长发育、花器官形态建成以及种子发育有重要影响<sup>[3]</sup>。

AP2/ERF 家族均含有 1 个或 2 个 DNA 结合域,其保守域由 60~70 个氨基酸组成<sup>[4]</sup>。根据含有结构域数量的不同,AP2/ERF 超家族可以分为 5 类亚族:DREB (Dehydration-responsive element binding protein)、ERF (Ethylene-responsive factors)、AP2 (APETALA 2)、RAV (Related to ABI3/VP1),以及 Soloist 亚族,其中 ERF 亚族和 DREB 亚族含有 1 个 AP2/ERF 结构域,Soloist 亚族具有单一的保守型结构域,AP2 亚族大多数含有 2 个 AP2/ERF 结构域,RAV 亚族包括 1 个 AP2/ERF 结构域及 1 个 B3 结构域<sup>[5]</sup>。

DREB 亚族能够特异性结合干旱胁迫响应元件 (DRE/CRT) 和冷诱导响应元件 (A/GCCGAC)<sup>[5-6]</sup>,在调节植物对干旱和低温等非生物胁迫及生物胁迫响应中发挥功能<sup>[7]</sup>。ERF 亚族参与植物激素的信号调节,具有调控乙烯应答以及抗病相关基因表达的功能<sup>[8-9]</sup>。RAV 亚族主要在生物和非生物胁迫响应、乙烯响应过程中起重要作用<sup>[10]</sup>。Soloist 亚族与生物胁迫响应相关<sup>[6]</sup>。AP2 亚族基因最初被分离时,在花分生组织的建立中发挥着核心作用,AP2 亚族基因主要影响植物的花器官发育、分化以及侧根生长、脂肪酸代谢、角质合成等过程<sup>[11]</sup>。其对花原基的形成、胚珠的发育<sup>[12]</sup>、种子的形成以及发育也起关键作用<sup>[8]</sup>。有研究结果表明,AP2 突变体的拟南芥花瓣减少,雄蕊缺失,出现未融和萼片状心皮结构<sup>[13]</sup>。

已有研究结果证明,WRI 类转录因子属于 AP2 亚族<sup>[14]</sup>。WRI 类转录因子诱导合成的脂肪酸是所有植物细胞的基本组成成分,用于膜生物合成和修复,其覆盖在表皮细胞角质层脂质(角质层蜡和角质),是防止水分流失、病原微生物进入和器官粘连的重要保护屏障<sup>[15-16]</sup>。WRI1-like 组群中,WRI1、

WRI3 和 WRI4 这 3 个转录因子能够有效调控酰基链合成比率,参与花发育过程中脂肪酸生物合成的激活,并通过为角质生物合成提供酰基前体来防止花器官粘附和半不育<sup>[17]</sup>。同时 WRI1 在植物油脂合成的调控中起着至关重要的作用<sup>[15]</sup>,它诱导了糖酵解生物合成相关基因的转录,影响植物种子特异性三酰甘油 (TAGs) 的合成和贮藏<sup>[16]</sup>,有利于花器官角质合成<sup>[18-19]</sup>。该转录因子通常被认为是胚胎形成和种子成熟过程中的主要调控因子<sup>[17]</sup>。目前已经在多种植物中成功克隆到 *WRI1* 基因<sup>[20-22]</sup>,但国内外关于 *WRI4* 基因的报道较少。

中国青花菜的主要栽培品种均由国外引进,中国地域辽阔种植环境差异大,对青花菜生长发育有一定的限制,当务之急是要加快选育出适合中国种植,综合表现优良的品种<sup>[23]</sup>。

WRI 类转录因子能影响植物的生长发育,调节贮藏代谢机制,影响油脂的合成与贮藏。本试验对青花菜 *WRI4* 基因进行克隆及生物信息学分析,并利用同源重组技术构建其表达载体,揭示该转录因子的功能,为青花菜育种提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验所用的青花菜品种是高代自交纯系 KJ-18,天津科润蔬菜研究所江汉民博士惠赠。

RNA 提取试剂盒购于上海普洛麦格生物制品有限公司,质粒 DNA 小量纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、ClonEXPress II One Step Cloning Kit 试剂盒均购自从北京庄盟国际生物基因科技有限公司,高保真酶 *KOD FX DNA* 聚合酶,限制性核酸内切酶 *NcoI*-HF、*BstEII*-HF 购自 New England Biolabs 公司。

克隆载体 pCAMBIA-3301 购于北京擎科生物科技有限公司,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 $\alpha$ 、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105 购于北京庄盟国际生物基因科技有限公司;引物合成与测序由上海生工生物工程有限公司完成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取及反转录 根据 RNA 提取试剂盒的说明书提取 RNA。使用前用灭菌冷冻后的剪刀和镊子取青花菜真叶放入液氮速冻,将冻好的材料放在提前冷冻过的研钵中快速研

磨成粉末,迅速将其置于 2.0 ml 的离心管中,同时向该管中加入裂解液按说明书提取青花菜总 RNA。

**1.2.2 *WRI4* 全长 cDNA 引物设计及扩增** 利用软件 Primer Premier 5.0 设计青花菜 *WRI4* 基因全长引物,根据同源重组反应引物设计原则,选择 *NcoI*-HF、*BstE* II-HF 2 个限制性内切酶,引物设计如下:正向引物:5'-ACGGGGGACTCTTGACCATGGATGCGCAAACTCTCTCAACGGAAC-3';反向引物:5'-GGGGAAATTCGAGCTGGTCACCTCAAGACCAATAATCAAACCTCGTTACATA-3'。PCR 程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 15 s,58 ℃ 退火 30 s,68 ℃ 延伸 1 min,33 个循环;68 ℃ 延伸 7 min,运行结束后将扩增产物置于 4 ℃ 进行保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物鉴定。

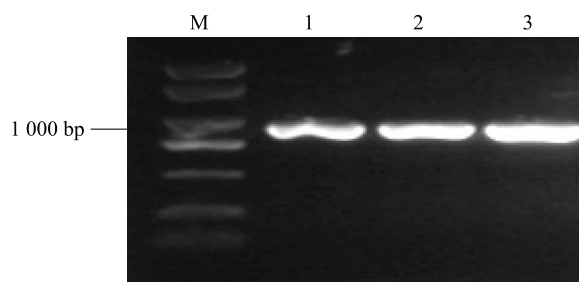
**1.2.3 同源重组技术构建青花菜 *WRI4* 基因表达载体** 按照 ClonEXPress II One Step Cloning Kit 试剂盒说明书的操作流程进行 *WRI4* 基因过表达载体的构建。利用 *NcoI*-HF、*BstE* II-HF 内切酶对 pCAMBIA3301 载体进行双酶切,获得线性化的载体,胶回收线性化载体与目的基因条带进行连接,采用冻融法将连接产物转入农杆菌感受态细胞,培养过夜,挑选单菌落进行 PCR 鉴定。

**1.2.4 青花菜 *WRI4* 基因生物信息学分析** 利用以下生物信息分析软件及在线网站对 *WRI4* 基因进行分析:利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对 *WRI4* 蛋白保守功能结构域预测,使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对 *WRI4* 基因一级结构进行分析,利用 PRABI ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred\\_sopma.pl](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl)) 分析 *WRI4* 氨基酸、蛋白质基本理化性质,利用 ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 预测 *WRI4* 蛋白的亲(疏)水性,使用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜结构分析,使用 NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行磷酸化位点预测、分析,利用 SWISS-MODEL: (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 对 *WRI4* 蛋白三级结构进行分析,利用 MEME 软件对青花菜及其他物种中的 *WRI4* 蛋白进行保守 motifs 分析,使用 DNAMAN 软件对 *WRI4* 蛋白氨基酸序列进行同源比对,使用 MEGA 软件对不同物种 *WRI4* 蛋白进行进化树分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *WRI4* 基因的克隆

提取青花菜 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测到 RNA 清晰条带,采用 NanoDrop-1000 仪器测定提取的总 RNA 质量, $A_{260}/A_{280}$  在 2.0 左右,RNA 无降解,纯度较高,反转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板利用高保真酶对 *WRI4* 进行 PCR 扩增,得到长约 900 bp 的 cDNA 条带(图 1),经测序证明该条带是目的基因 *WRI4*,可用于后续试验。



M:DL2000 DNA marker;1~3: *WRI4* 基因。

图 1 青花菜 *WRI4* 基因全长编码序列的 PCR 扩增

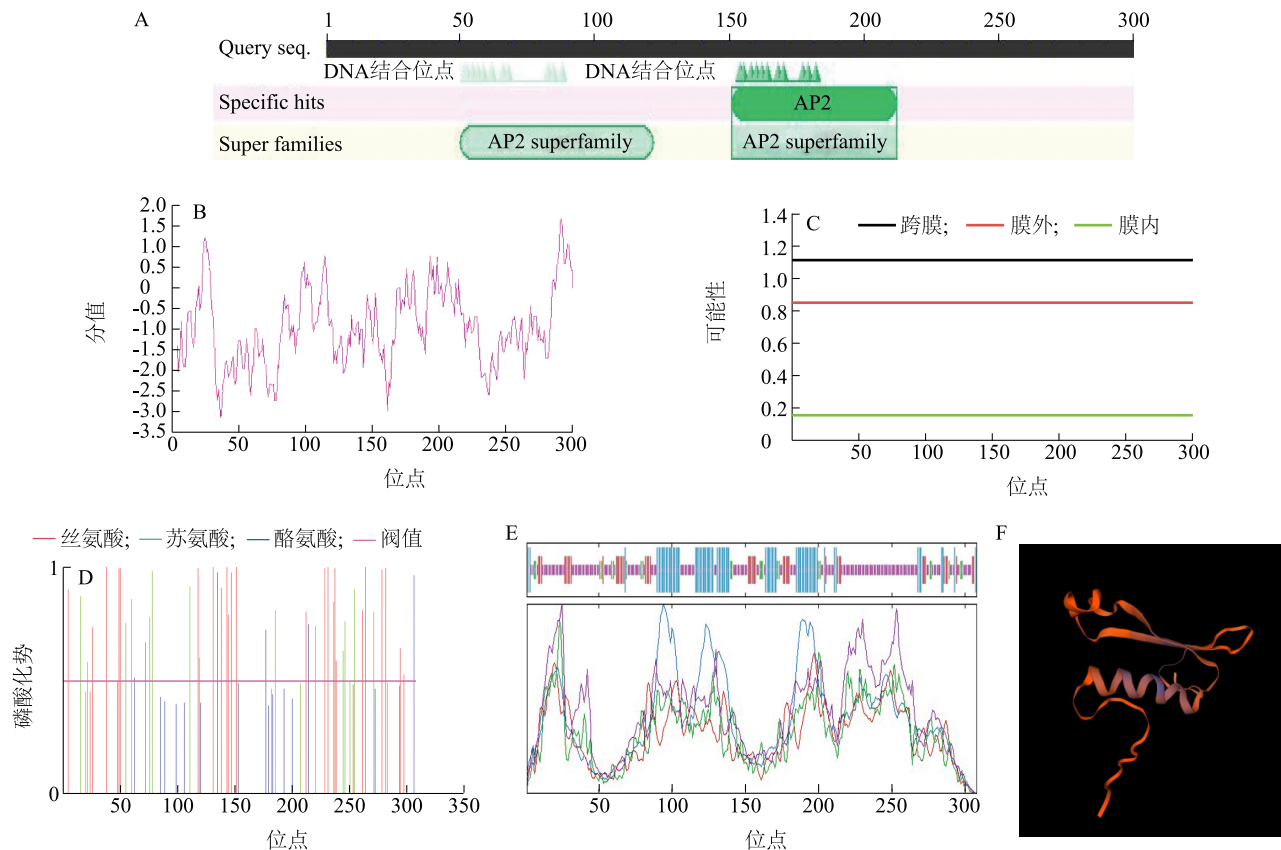
Fig.1 Amplification of the full-length coding sequence of *WRI4* gene in broccoli

### 2.2 青花菜 *WRI4* 转录因子分子特征

对 *WRI4* 转录因子进行结构分析,发现其有 2 个 AP2/ERF 保守结构域,证明 *WRI4* 转录因子属于 AP2/ERF 家族中 AP2 亚族(图 2A)。利用软件 ProtParam 对青花菜中 *WRI4* 转录因子一级结构进行预测分析,结果显示 *WRI4* 共编码 308 个氨基酸,相对分子质量为 35 020,理论 *PI* 值(蛋白质等电点)为 7.69。原子总数为 4 829,脂肪指数为 53.64,亲水性平均值(*GRAVY*)为 -0.944,青花菜 *WRI4* 可能是一种亲水性蛋白质。进一步的亲水性分析发现,亲水性最小分值为 -3.133,最大分值为 1.667,表明此蛋白质为亲水性蛋白质(图 2B);TMHMM,PRABI 软件分析结果表明,*WRI4* 蛋白没有跨膜区域,不是膜蛋白(图 2C)。蛋白质磷酸化位点分析结果(图 2D)表明,*WRI4* 蛋白有 15 个苏氨酸,24 个丝氨酸,5 个酪氨酸,*WRI4* 蛋白内存在无规则卷曲(53.9%), $\alpha$ -螺旋(24.68%), $\beta$ -转角(7.47%),伸展链(13.96%),不存在  $\beta$ -折叠(图 2E、图 2F)。

### 2.3 青花菜 *WRI4* 系统进化分析

通过 DNAMAN 软件对青花 *WRI4* 转录因子、芥



A: 青花菜 *WRI4* 蛋白保守功能域分析; B: 青花菜 *WRI4* 氨基酸的亲疏水性分析, “+”为疏水; “-”为亲水; C: 青花菜 *WRI4* 跨膜分析; D: 青花菜 *WRI4* 磷酸化位点分析; E: 青花菜 *WRI4* 氨基酸二级结构预测, 蓝色:  $\alpha$ -螺旋; 红色:  $\beta$ -折叠; 绿色:  $\beta$ -转角; 紫色: 无规则卷曲; F: 青花菜 *WRI4* 氨基酸三级结构预测。

图2 青花菜 *WRI4* 氨基酸序列特征分析

Fig.2 Characteristics analysis of broccoli *WRI4* amino acid sequence

菜 (*Capsella rubella*, XP\_023642912.1)、白菜 (*Brassica rapa*, XP\_009106692.1)、萝卜 (*Raphanus sativus*, XP\_018457265.1)、亚麻荠 (*Camelina sativa*, XP\_010472844.1)、油菜 (*Brassica napus*, XP\_013650299.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, NP\_001077849.1)、烟草 (*Nicotiana attenuata*, XP\_019248140.1)、甜樱桃 (*Prunus avium*, XP\_021830086.1) 物种的相应转录因子氨基酸序列进行比对。比对结果 (如图3) 显示, 青花菜 *WRI4* 转录因子与白菜、油菜的相似度高。

#### 2.4 青花菜 *WRI4* 保守 motifs 及分子进化分析

利用 MEME、MEGA 软件分析不同物种结构域以及亲缘性。利用 MEME 对青花菜及其他物种中 *WRI4* 进行 motifs 分析, 分析结果 (图4) 显示, *WRI4* 转录因子具有 2 个 AP2 保守结构域且均含有 YRG 和 RAYD 2 个保守结构域。motifs 越相近, 亲缘性越

高。进一步采用 MEGA 软件对其进行进化树及结构域分析, 结果如图5所示, 更进一步证实青花菜 *WRI4* 与白菜和油菜相对应的转录因子有较高亲缘性。

#### 2.5 同源重组克隆技术构建青花菜 *WRI4* 表达载体

根据 ClonEXpress II One Step Cloning Kit 试剂盒说明书获得线性化目的基因与载体, 胶回收线性化载体, 与目的基因条带进行连接, 将产物涂布在含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平的 LB 筛选培养皿上培养, 挑取单克隆菌落于相同抗性的 LB 液体培养基中培养并进行 PCR 鉴定 (图6), 条带大小正确, 青花菜 *WRI4* 表达载体构建成功。

### 3 讨论

已有研究结果表明, AP2/ERF 家族中 *WRI* 类转录因子对植物生长发育、脂肪酸产生、蜡质的形成



WR14	MAKISCRNKKIIEE..ETICKTATAS...ASPVVFKCKRKRKSPF.CNAFEORSSSRGCVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	74
XP_023642912.1	MAKVSRRSKKTM...EEIGCKTASESE..TASTAFKSKRKRKSPF.CNTEFEORSSSRGCVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	74
XP_009106692.1	MAKISCRNKKIIEE..CTICKTATAS...ASPVVFKCKRKRKSPF.CNAFEORSSSRGCVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	74
XP_018457265.1	MAKISCRNKKIIEE..ETIENTATAS...ASSVVFCKRKRKSPF.CNAFEORSSSRGCVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	74
XP_010472844.1	MAKVSRRSKKTMVCLYEIGCKTASAS...ESTIVIKSKRKRKSPF.CNTEFEORSSSRGCVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	75
XP_013650299.1	MAKISCRNKKIIEE..CTICKTATAS...ASPVVFKCKRKRKSPF.CNAFEORSSSRGCVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	74
NP_001077849.1	MAKVSRRSKKTMVCLYEIGCKTASAS...SASTATSKRKRKSPF.RNAPLORSSPYRGVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	76
XP_019248140.1	MARTSKANQNTSY.SNNSEKNNSNGGSGCHATSCKRKRRAVVPRLSFEORSSSYRGVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	79
XP_021830086.1	MAKISQCNQNTIAS.SNNSSTNNINS.....TATTKVKRTRKSVR.RLSEFEORSSSYRGVTRHRWTGRYFAHLWCKNSWN	73
WR14	ETOTKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	154
XP_023642912.1	ETOTKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	154
XP_009106692.1	ETOTKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	154
XP_018457265.1	ETOTKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	154
XP_010472844.1	ETOTKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	155
XP_013650299.1	ETOTKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	154
NP_001077849.1	ETOTKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	156
XP_019248140.1	ETOSKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	159
XP_021830086.1	ESONKKGRCVYI.GAYDEFAAARAYCIAALKYWGRCTIINFPLSTYEEDVKEMBAHSKEEYIGSLRRKSSGFSRGVSKYR	153
WR14	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYID.....LF.ATKKFN	224
XP_023642912.1	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYIN.....PS.AAANH	224
XP_009106692.1	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYID.....LF.ATKKFN	224
XP_018457265.1	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYID.....LF.ATKKFN	224
XP_010472844.1	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYIN.....SS.AAVANP	225
XP_013650299.1	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYID.....LF.ATKKFN	223
NP_001077849.1	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYIN.....PN.AAACK	225
XP_019248140.1	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYIK.....CN.....FC.FKFNFN	231
XP_021830086.1	GVARHHHNGRWEARIGRVFGNKYI.YLGTATCEFAAARAYDIAATEYRGINAVTNFDSRYIKSLCFNNQNVFNNAQNFN	233
WR14	A.AASFES.....FN..ECTSSDNNFTKTEVTEPSTP.....FAIGSR	262
XP_023642912.1	I.FCKFDS.....ESKPI.RKPCHEPDNGSPTSEIEPSTP.....EATFPR	268
XP_009106692.1	A.AASFES.....FN..ECTSSDNNFTKTEVTEPSTP.....FAIGSR	262
XP_018457265.1	A.AASFES.....FN..ECTSSDNNFTKTEVTEPSTP.....FAIGSR	262
XP_010472844.1	C.KIDFSK.....IRNPNHPESSDNEPKSEIEPSTP.....EAMCTR	270
XP_013650299.1	A.AASFES.....FN..ECTSSDNNFTKTEVTEPSTP.....EATFPR	261
NP_001077849.1	...ACLSK.....IRSPS.REPSSDNNFTKTEVTEPSTP.....EATFPR	267
XP_019248140.1	STCINPTENTKEEINFSTINCHECCSSNSAGTVPFPHFVGTAASSAVCFETPF.....FPCRPR	295
XP_021830086.1	G.DLSPTQNFNSKIGLGFIPNYHSS...SSASCTIALQFENGASASSALGLILQSEKFKEMLEPSTASSTLSEENIPR	310
WR14	RSFPDDICTYFECDSGKS.ATEELVIEGGNSFISFGLC	301
XP_023642912.1	RSFPDDICTYFECDSGKF.ATEELVIEGGNSFPMNFSFY	307
XP_009106692.1	RSFPDDICTYFECDSGKL.ATEELVIEGGNSFISFGLC	301
XP_018457265.1	RSFPDDICTYFECDSGKL.ATEELVIEGGNSFISFGLC	301
XP_010472844.1	RSFPDDICTYFECDSGKVGAEEDLVIEGGNSFINFGFY	310
XP_013650299.1	RSFPDDICTYFECDSGKL.ATEL.VIEGGNSFISFGLC	299
NP_001077849.1	RSFPDDICTYFECDSGKL.ATEELVIECFNSYINFGFY	306
XP_019248140.1	RSFPDDICTYFECDSSSF.VEEHCLIEGDLISFLIMFA	334
XP_021830086.1	RSFPDDICTYFECDSLSY.AEGDCLIEGDLISFASVFEH	349

图3 青花菜 WR14 与其他物种 WR14 氨基酸序列比对

Fig.3 Comparison of amino acid sequence of WR14 in broccoli with other species

与贮藏以及植物开花有一定的调控作用,并对植物抵抗生物与非生物胁迫有重要影响<sup>[24-25]</sup>。拟南芥中过表达 *Brassica napus* 的 *WR11* 同源基因会使转基因种子以及叶片中油脂含量上升,过表达 *BnWR11* 促使花期提前,在单子叶植物的叶片中异位表达 *BdWR11* 后会使叶片中 TAG 和游离 FA 含量提高<sup>[25]</sup>。导入 *WR11* 基因的转基因玉米,过表达该基因对种子萌发、植株生长以及产量并未出现明显影响,但转基因玉米籽粒含油量比野生型提高了 48%<sup>[19]</sup>。另有研究结果表明,烟草原生质体中

*WR14* 基因通过直接结合启动子激活 *LACS1*、*KCR1*、*PAS2*、*ECR* 和 *WSD1* 的表达,参与蜡前体的脂肪酸延伸和蜡质的产生与贮藏<sup>[17]</sup>。

本试验分离克隆了青花菜 *WR14* 基因,利用生物信息学分析软件对 *WR14* 进行分析,其编码 308 个氨基酸,编码的蛋白质相对分子质量为 3 520,有 2 个 AP2/ERF 结构域,无跨膜结构,亲水性平均值 (*GRAVY*) 为 -0.944,由此推断其可能是一种亲水性蛋白质。由 *WR14* 二级(三级)结构分析结果可知,其含有无规则卷曲 (53.9%), $\alpha$ -螺旋 (24.68%), $\beta$ -

图 4 不同物种 *WRI4* 转录因子 motifs 分析Fig.4 Motifs analysis on *WRI4* transcription factor of different species

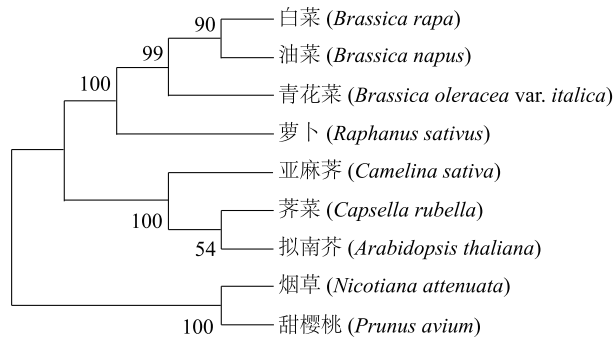
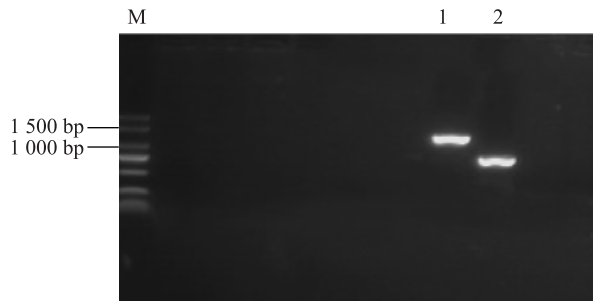


图5 不同物种 WR14 基因的系统进化分析

Fig.5 Phylogenetic analysis on WR14 genes in different species



M: DL2000 marker; 1: 阳性克隆; 2: WR14 目的基因。

图6 农杆菌重组质粒阳性克隆 PCR 检测

Fig.6 PCR detection of positive clones of Agrobacterium recombinant plasmid

转角 (7.47%), 伸展链 (13.96%), 不含  $\beta$ -折叠。Motifs 分析结果显示青花菜 WR14 与白菜和油菜 WR14 同源性高。虽然 WR11 转录因子在拟南芥、油菜、玉米、棉花等作物中已有报道,但 WR14 转录因子的报道较少,因此探究该转录因子对青花菜生长发育影响,及其对外界胁迫的响应显得尤为迫切。本研究利用同源重组技术构建了青花菜 WR14 基因表达载体,为探究 WR14 转录因子在青花菜生长发育中的作用,进一步培育青花菜优良品种奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] JUNYA M, KAZUO S, KAZYKO Y. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses[J]. BBA Gene Regulatory Mechanisms, 2012, 1819(2): 86-96.
- [2] 梁玲鸽. 矮牵牛 *PhWR11* 基因功能的分析[D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [3] KAZUKO Y, KAZUO S. Transcriptional regulatory networks in

cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses [J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57(11): 23-34.

- [4] 邵文靖, 敖特根白音, 郎明林. AP2/ERF 转录因子对植物非生物胁迫的应答机制研究进展[J]. 分子植物育种, 2020, 18(15): 4981-4988.
- [5] 崔喜艳, 陈众峰, 陈展宇. AP2/ERF 转录因子对植物非生物胁迫应答的研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2015, 37(4): 417-423.
- [6] 孙 滨, 占小登, 曹立勇, 等. 水稻 AP2/ERF 转录因子的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(11): 1860-1869.
- [7] 崔 波, 郝平安, 梁 芳, 等. 蝴蝶兰 AP2/ERF 家族基因的克隆及在低温下表达特性分析[J]. 园艺学报, 2020, 47(1): 85-97.
- [8] SAKUMA Y, LIU Q, DUBOUZET J G, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression.[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2002, 290(3): 998-1009.
- [9] 高春艳, 吴 芮, 袁 玉, 等. 植物 AP2/ERF 转录因子及其在非生物胁迫应答中的作用[J]. 江汉大学学报(自然科学版), 2017, 45(3): 236-240.
- [10] 苟艳丽, 张 乐, 郭 欢, 等. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展[J]. 草业科学, 2020, 37(6): 1150-1159.
- [11] ASAPH A, SHITAL D, REINHARD J, et al. The shine clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters uticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2004, 16(9): 2463-2480.
- [12] 闻可心, 刘雪梅. AP2 功能基因在植物花发育中的重要作用[J]. 生物技术通报, 2010(2): 1-7.
- [13] 李魁鹏. 杂种落叶松组培不定根诱导及生根相关 AP2-like 基因的克隆与表达研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [14] 王莉莉. 甘蓝型油菜 AP2 亚家族转录因子及植物中 WR11 的基因组学分析[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2016.
- [15] TO A, JOUBES J, BARTHOLE G, et al. WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in arabidopsis[J]. The Plant Cell, 2012, 24(12): 5007-5023.
- [16] TAJIMA D, KANEKO A, SAKAMOTO M, et al. WRINKLED 1 (WR11) homologs, AP2-Type transcription factors involving master regulation of seed storage oil synthesis in castor bean (*Ricinus communis* L.) [J]. American Journal of Plant Sciences, 2013, 4(2): 333-339.
- [17] PARK C S, GO Y S, SUH M C. Uricular wax biosynthesis is positively regulated by WRINKLED4, an AP2/ERF-type transcription factor, in Arabidopsis stem [J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2016, 88(6): 257-270.
- [18] CEMAC A, BENNING C. WRINKLED1 encodes an AP2/ERF domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in arabidopsis[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 2016, 88(6): 257-270.

- gy, 2010, 40(4):575-585.
- [19] KONG Q, YANG Y, GUO L, et al. Molecular basis of plant oil biosynthesis: insights gained from studying the WRINKLED1 transcription factor [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11(24):1-6.
- [20] 丁 霄,杨淑巧,许 琦,等. 转录因子 WRI1 在主要作物中的研究进展[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(3):697-701.
- [21] VANHERCKE T, TAHCKY A E, SHRESTHA P, et al. Synergistic effect of WRI1 and DGAT1 coexpression on triacylglycerol biosynthesis in plants[J]. *FEBS Letters*, 2013, 587(4):364-369.
- [22] BENIAMIN P, SEBASTIEN B, VANESSAV, et al. Duplicate maize Wrinkled1 transcription factors activate target genes involved in seed oil biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2):674-686.
- [23] 王建升,虞慧芳,赵振卿,等. 早熟青花菜新品种浙青 60 的选育[J]. *长江蔬菜*, 2020(6):66-69.
- [24] 张计育,王庆菊,郭忠仁. 植物 AP2/ERF 类转录因子研究进展[J]. *遗传*, 2012, 34(7):44-56.
- [25] 李玉兰,孙勤富,王幼平. 植物油脂合成的转录调控研究进展[J]. *分子植物育种*, 2016, 14(9):2509-2518.

(责任编辑:陈海霞)