

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.22239

陈思梦, 王锦鑫, 党明静, 王政道, 李静. '白花建' 莲酵母双杂文库构建及 NnWRKY40 互作蛋白筛选 [J]. 植物科学学报, 2023, 41(4): 447-457

Chen SM, Wang JX, Dang MJ, Wang ZD, Li J. Construction of two-hybrid library of yeast and screening of NnWRKY40 interacting proteins in *Nelumbo nucifera* Gaertn. 'Baihuajian' [J]. *Plant Science Journal*, 2023, 41(4): 447-457

'白花建' 莲酵母双杂文库构建及 NnWRKY40 互作蛋白筛选

陈思梦[#], 王锦鑫[#], 党明静, 王政道, 李静^{*}

(武汉理工大学化学化工与生命科学学院生物技术系, 武汉 430070)

摘要: 通过构建莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 品种 '白花建' 不同组织的混合 cDNA 文库, 筛选与莲转录因子 NnWRKY40 互作的蛋白, 探究 NnWRKY40 参与调控次级代谢物生物碱合成的可能机制。结果显示, 混合 cDNA 文库的库容为 1.2×10^7 CFU, 重组率为 100%, 插入片段平均长度大于 1 000 bp。NnWRKY40 包含两个同源基因 *NnWRKY40a* 和 *NnWRKY40b*, 利用 *NnWRKY40b* 构建诱饵载体 pGBKT7-NnWRKY40b, 通过共转化方法, 从文库中筛选到 27 个与 NnWRKY40b 互作的蛋白。这些互作蛋白可分为生长发育及抗逆、激素调控和次级代谢、未知蛋白 3 类。选取 6 个代表性互作蛋白 (NnUBC、NnPEBP、NnPPOA、NnCHS、NnJAZ1 和 Unknown protein 3) 进行一对一验证, 发现其中 JAZ 蛋白与次级代谢物生物碱合成相关, 提示 NnWRKY40b 转录因子可能与茉莉酸 (JA) 介导的生物碱合成调控密切相关。

关键词: 莲; 酵母双杂交; NnWRKY40; 蛋白互作

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2023)04-0447-11

Construction of two-hybrid library of yeast and screening of NnWRKY40 interacting proteins in *Nelumbo nucifera* Gaertn. 'Baihuajian'

Chen Si-Meng[#], Wang Jin-Xin[#], Dang Ming-Jing, Wang Zheng-Dao, Li Jing^{*}

(School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China)

Abstract: To explore the potential mechanism of the NnWRKY40 transcription factor in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) for regulating the synthesis of secondary metabolite alkaloids, a mixed cDNA library from different lotus tissues was constructed, and the proteins interacting with NnWRKY40 were screened. Total RNA of different tissues was extracted from 'Baihuajian', and a mixed cDNA library was established. The library capacity was 1.2×10^7 CFU, recombinant rate was 100%, and average length of the inserted fragments was >1 000 bp. NnWRKY40 contains two homologous genes, *NnWRKY40a* and *NnWRKY40b*. As NnWRKY40b is reported to play a leading role in transcriptional activation of alkaloid synthesis genes, we used *NnWRKY40b* to construct the bait vector PGBKT7-NnWRKY40b. In total, 27 proteins interacting with NnWRKY40b were screened from the library using the co-transformation method. These interacting proteins could be divided into three categories: i.e., growth and development and stress response, hormone regulation and secondary metabolism, and unknown proteins. Six representative proteins, including NnUBC, NnPEBP, NnPPOA,

收稿日期: 2022-09-01, 修回日期: 2022-09-26。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31700262); 山东省自然科学基金项目 (ZR2021MC163)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (31700262) and Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021MC163).

作者简介: 陈思梦 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为莲分子生物学 (E-mail: csm1049@whut.edu.cn); 王锦鑫 (2001-), 女, 本科生, 研究方向为莲分子生物学 (E-mail: morgane_w@163.com)。

[#] 共同第一作者。

^{*} 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: celery_wh@126.com)。

NnCHS, NnJAZ1, and unknown protein 3, were selected for one-to-one verification, among which the JAZ protein was associated with alkaloid synthesis, suggesting that the NnWRKY40b transcription factor may be closely related to jasmonic acid (JA)-mediated regulation of alkaloid synthesis in *N. nucifera*.

Key words: *Nelumbo nucifera*; Yeast two-hybrid; NnWRKY40; Protein interaction

莲 (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) 是一种莲属多年生水生草本植物, 在我国广泛种植。除了观赏及食用价值外, 莲还富含珍贵的药用成分生物碱, 包括荷叶碱、*N*-去甲基荷叶碱 (*N*-nornuciferine)、*O*-去甲基荷叶碱 (*O*-nornuciferine)、莲心碱等^[1]。研究表明, 莲生物碱具有降脂减肥^[2]、抗菌^[3]、抗癌^[4]等药理作用。然而, 莲生长周期较长, 目标生物碱含量低, 且易受环境影响, 这些因素极大地限制了生物碱的获取和应用。近年来, 研究发现转录因子 (包括 AP2/ERFs、bHLH、MYB、WRKY) 在植物次生代谢过程中具有显著的调控作用^[5-11], 说明转录因子调控植物药用活性成分合成的重要性及利用转录因子增加目标产物的可行性。

植物转录因子种类繁多, 其中 WRKY 家族近年来研究较为广泛, 是存在于高等植物中的一类转录因子^[12]。该家族成员的结构特点是含有保守的 WRKYGQK 序列以及特定的锌指结构, 并且能特异地结合到目标基因启动子的 W-box ((T)(T)TGAC(C/T)) 位点从而启动该基因的转录^[12]。植物中第一个 WRKY 转录因子是由 Ishiguro 和 Nakamura^[13] 在甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 中发现。随着研究的深入, 科学家相继在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、欧芹 (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、长春花 (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don)、罂粟 (*Papaver somniferum* L.)、大麻 (*Cannabis sativa* L.) 等植物中发现了 WRKY 转录因子, 而 WRKY 转录因子的调节功能也逐步成为研究热点^[12, 14-19]。

前人研究最多、最广的是 WRKY 转录因子在调节植物生长发育、衰老以及抗生物及非生物胁迫中的作用。然而, WRKY 在植物次生代谢中的调控作用研究相对较少。Suttipanta 等^[7] 发现长春花中萜类吲哚生物碱 (Terpene indole alkaloid, TIA) 合成关键基因色氨酸脱羧酶基因 (TDC) 受

到 CrWRKY1 转录因子的调控, 进而影响 TIA 的生物合成。黄连 (*Coptis japonica* (Thunb.) Makino) 中 CjWRKY1 是苜基异喹啉生物碱 (Benzylisoquinoline alkaloid, BIA) 合成途径中第一个被发现的 WRKY 转录因子, 该转录因子能调控黄连素合成途径中 8 个合成酶基因 (NCS、6OMT、CNMT、CYP80B2、4' OMT、BBE、SMT、CYP719A1) 的表达^[6]。另外, WRKY 转录因子是调节罂粟中 BIA 合成最具代表性的一类转录因子, PsWRKY 转录因子可以结合到酪氨酸脱羧酶基因 (TYDC) 的启动子区域, 从而调节 BIA 的积累^[8,20]。值得注意的是, WRKY 转录因子调控次生代谢物的合成和积累时, 通常与植物激素相关^[21,22]。如长春花 CrWRKY1 和黄连 CjWRKY1 均能响应茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 信号分子并通过 JA 介导的信号途径来调控 TIA 与 BIA 的合成^[6,7]。外源茉莉酸甲酯 (Methyl-jasmonate, MeJA) 可诱导罂粟中 PsWRKY 基因的表达, 并参与调控 BIA 的合成^[20]。另外, 在黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 中, JA 可上调关键转录因子 WRKY 基因表达量, 增加萜类葫芦素的含量^[21]。除 JA 及其衍生物外, 水杨酸 (Salicylic acid, SA)、脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 等激素均能通过调控转录因子如 MYB、AP2/ERFs、bHLH、MYC、WRKY 的表达, 进而影响植物次级代谢物合成酶的活性, 且这 3 种激素能协同调控植物的次生代谢过程^[22-24]。

水生植物莲, 因其基因组信息出现较晚, 转录因子调控莲中生物碱合成的研究也相对滞后。2013 年, 国内外科学家初步完成了中国古代莲的基因组测序工作^[25]; 2020 年, 研究者又进一步完善了该成果^[26]。这些数据为我们进行荷叶碱合成相关调控因子的筛选提供了契机。本课题组前期的工作发现莲 NnWRKY40 转录因子与荷叶碱的合成显著相关, NnWRKY40 包含的两个同源基因 NnWRKY40a、NnWRKY40b, 对荷叶碱合成酶基因均有转录激活作用, 其中 NnWRKY40b 基因起主导作用^[27]。因此, 本研究以 NnWRKY40b 为研

研究对象, 通过构建 ‘白花建’ 莲不同组织部位的 cDNA 文库, 筛选与 NnWRKY40b 转录因子互作的蛋白, 以期为揭示 NnWRKY40b 参与调控生物碱合成的分子机制研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 植物 RNA 提取

实验所用植物材料 ‘白花建’ 莲来源于武汉理工大学荷花种植基地。收集莲不同组织 (卷叶、大叶、未膨大的地下茎、膨大的地下茎、叶柄、花蕊) 样品, 采用 CTAB 抽提法提取总 RNA, 用于后续文库构建。

1.2 cDNA 初级文库构建

按照 CloneMiner 说明书, 取上述步骤得到的 mRNA 合成双链 cDNA, 将双链 cDNA 与三框 attB1 重组接头连接, 收集再次分级分离的 cDNA, 用 BP Clonase® II enzyme 连接纯化后的 cDNA 与 pDONR222 载体。连接产物电转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 涂布平板用于库容量鉴定。取转化后细菌原液 10 uL 稀释 100 倍后, 从中取出 50 uL 涂布 LB 平板 (含卡那霉素), 第 2 d 计数并鉴定库容量。计数方法为: $CFU/mL = \text{平板上的克隆数} /$

$50 \text{ uL} \times 1000 \text{ 倍} \times 1 \times 10^3 \text{ uL}$, 文库总 $CFU = CFU / mL \times \text{文库菌液总体积 (mL)}$ 。随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR, 鉴定其插入片段长度和重组率。

1.3 次级文库构建

将上步验证合格的初级文库, 采用肉汤培养基, 摇菌, 30 °C 过夜培养。从菌液中抽提质粒并电泳检测。取检测过的质粒稀释到 300 ng/uL, 与 pGADT7-DEST 载体用 LR 反应进行连接, 连接产物电转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞, 即可获得次级文库菌液。稀释菌液鉴定库容量, 挑取单菌落鉴定重组率和插入片段长度。检测合格的次级文库提取质粒, 用于后续酵母双杂共转化。

1.4 诱饵载体 pGBKT7-NnWRKY40b 的构建

设计引物扩增 NnWRKY40b 基因 CDS 序列 (表 1), 并交由上海生工生物工程公司合成。以 Synthesis SuperMix 试剂盒反转录合成的 cDNA 为模板扩增 NnWRKY40b 基因, 用 DNA 产物纯化试剂盒回收、纯化 PCR 产物。利用同源重组克隆法将 NnWRKY40b 基因无缝连接至诱饵载体 pGBKT7 中, 连接产物转化大肠杆菌, 均匀涂布在含有卡那霉素的 LB 固体培养基, 倒置过夜培养, 挑取阳性单克隆, 经菌落 PCR 验证正确后送公司测序。

表 1 互作蛋白点对点验证所用引物
Table 1 Primers used in one-to-one verification of interacting proteins

引物名 Primer name	正向序列 (5'-3') Sequence of forward primer	反向序列 (5'-3') Sequence of reverse primer
pGBKT7-NnWRKY40b	CATGGAGGCCGAATTCATGGAGTC GACTTGGTTGGATAC	GCAGGTCGACGGATCCTCACCA TTTCTGCACTGTTGAATG
pGADT7-NnJAZ1	CAGATTACGCTCATATGATGTCAA GAGCGCCGGACAT	TGCTTGGGTGGAATTCCTACTGT GGAGATCGAGCTTGT
pGADT7-NnUBC	CAGATTACGCTCATATGATGGCGA ACAGCAATCTACCC	TGCTTGGGTGGAATTCCTCAGGCA CCACTTGCATATAG
pGADT7-NnCHS	CAGATTACGCTCATATGATGGTGA CCGTGGAAGACATC	TGCTTGGGTGGAATTCCTAGGCA GCGATACTGTGAAG
pGADT7-NnPEBP	CAGATTACGCTCATATGATGGCGA GTGACGAGTTTAGGT	TGCTTGGGTGGAATTCCTTAGGCT GGGAAAAGTCGGATC
pGADT7-NnPPOA	CAGATTACGCTCATATGATGGCA TCGCTTTCTCCCTTGA	TGCTTGGGTGGAATTCCTCACGAA GCGAACACTATCTTG
pGADT7-Unknown protein3	CAGATTACGCTCATATGATGCAT TCCCTGAGCTTAAACT	TGCTTGGGTGGAATTCCTTAGACG ATATCCGTATCATCTC

1.5 诱饵重组质粒毒性检测和自激活检测

制备 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 将诱饵载体 pGBKT7-NnWRKY40b 与空白猎物载体 pGADT7 共转化到感受态细胞。加入 1 mL 0.9% NaCl 重悬菌体, 取 150 μL 涂布于 DDO (SD/-Leu/-Trp)、TDO (SD/-Leu/-Trp/-His)、QDO (SD/-Leu/-Trp/-

His/-Ade) 平板上, 30 °C 培养箱培养 4 ~ 5 d, 观察菌斑生长情况。

1.6 转录因子 NnWRKY40b 互作蛋白筛选

将 cDNA 文库质粒和诱饵质粒 pGBKT7-NnWRKY40b 共转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 将菌液按 200 μL /板涂布 50 个 150 mm TDO/X

(SD/-Leu/-Trp/-His/X- α -gal) 平板, 30 °C 倒置培养 3 ~ 5 d。将直径大于 2 mm 的菌落全部转接至新的 QDO/X (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal) 平板上增大筛选压力, 30 °C 倒置培养 3 d。阳性克隆菌株分别接入 QDO 液体培养基, 振荡培养过夜后采用酵母小量抽提试剂盒抽提酵母质粒。以猎物质粒 PGADT7 的通用引物, 进行 PCR 扩增鉴定。鉴定的克隆送上海生工测序并对返回序列进行生物信息学分析。

1.7 互作蛋白的激素响应分析

在莲叶生长的第 4 阶段 (S4 时期: 叶片未完全展开, 叶边缘呈卷曲状), 于叶片表面喷洒 0.1 mmol/L 茉莉酸甲酯 (MeJA) 或 5 mmol/L 水杨酸 (SA) (均含 0.02% Silwet L77)。分别于处理 0、3、6 及 24 h 后收集样品, 每个时间点的样品设置 3 个生物学重复。样品进行转录组测序, 分析互作蛋白对激素的响应。

1.8 代表性互作蛋白点对点验证

制备新鲜的酵母感受态细胞, 将代表性互作

蛋白的编码基因全长 CDS 作为猎物克隆到 pGADT7 载体中, 与 pGBKT7-*NnWRKY40b* 共转化。同时, 将 BD-53 + AD-T 和 BD-Lam + AD-T 组合分别作为阳性及阴性对照进行共转化。共转化酵母涂布于 DDO (SD/-Leu/-Trp) 培养基上进行转化选择。对于互作分析, 酵母涂布于 TDO (SD/-Leu/-Trp/-His) 培养基上, 30 °C 倒置培养 3 ~ 5 d, 分析结果。引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 莲组织总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

本研究提取‘白花建’莲卷叶、大叶、地下茎 (未膨大)、地下茎 (膨大)、叶柄和花芯 6 种组织的总 RNA, 电泳检测其质量 (图 1: A)。结果显示, 各组织总 RNA 完整性好, 质量满足实验要求, 可进行后续分离纯化得到 mRNA (图 1: B)。如图 1: B 所示, 无明显 28S 和 18S rRNA 条带, 该 mRNA 可用于后续合成双链 cDNA。

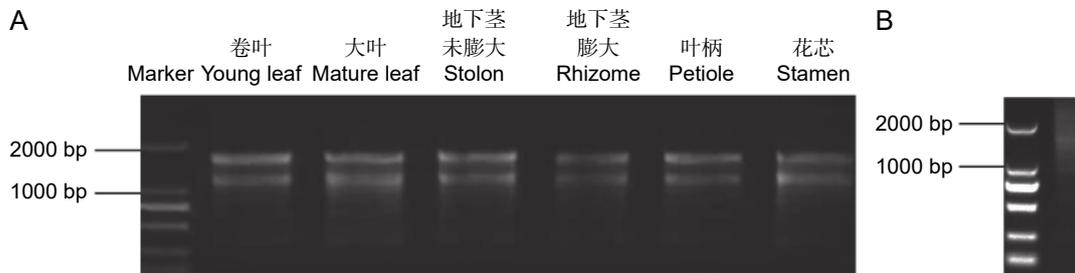


图 1 ‘白花建’莲 6 个不同组织样品总 RNA 质检 (A) 和 mRNA 分离结果 (B)

Fig. 1 Total RNA quality testing of six different tissue samples of 'Baihuajian' (A) and mRNA isolation (B)

2.2 初级文库的构建与鉴定

加接头的双链‘白花建’cDNA 与 pDONR222 载体连接后, 转入大肠杆菌感受态细胞中。取 10 uL 转化后的细菌原液稀释 100 倍, 从中取出 50 uL 涂布 LB 平板 (含卡那霉素)。结果显示, 平板中生长单菌落大于 1500 个, 初级文库库容量为 1.2×10^7 CFU (图 2: A)。随机挑取 24 个单菌落进行 PCR 扩增, 电泳结果表明重组率为 100%, 平均插入片段长度大于 1000 bp (图 2: B), 推断所构建初级文库成功, 可用于后续实验。

2.3 次级文库构建与鉴定

抽提初级文库质粒, 与 pGADT7-DEST 载体用 LR 反应进行连接并电转化大肠杆菌 DH10B 感

受态细胞, 得到次级文库菌液。取 10 uL 转化后菌液稀释 100 倍后取出 50 uL 涂布 LB 平板 (含氨苄青霉素)。结果显示, 平均单菌落数大于 1700 个, 次级文库容量为 1.36×10^7 CFU (图 3: A)。随机挑取 24 个单菌落进行 PCR 扩增, 重组率为 100% (图 3: B), 平均插入片段长度大于 1000 bp。结果表明次级文库构建成功。

2.4 诱饵质粒毒性检测与自激活检测

将诱饵质粒 PGBKT7-*NnWRKY40b* 和猎物空载 PGADT7 共转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞, 涂布于 DDO (SD/-Trp/-Leu)、TDO (SD/-Trp/-Leu/-His)、QDO (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) 缺陷型培养基上, 30 °C 培养箱培养 3 d。结果发现,

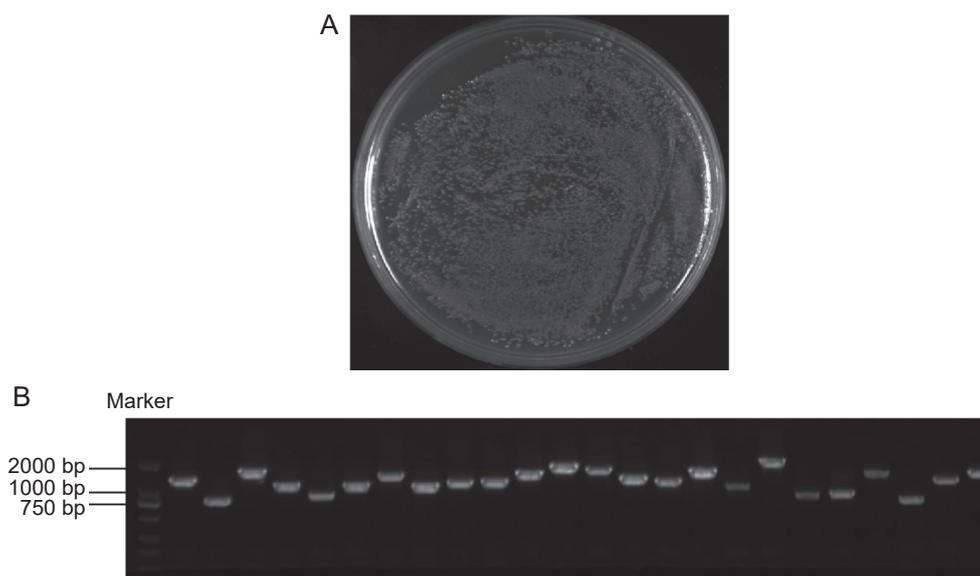


图 2 初级文库库容鉴定 (A) 和 24 个克隆中插入片段的 PCR 鉴定 (B)
Fig. 2 Identification of primary library capacity (A) and PCR identification of inserts (B)

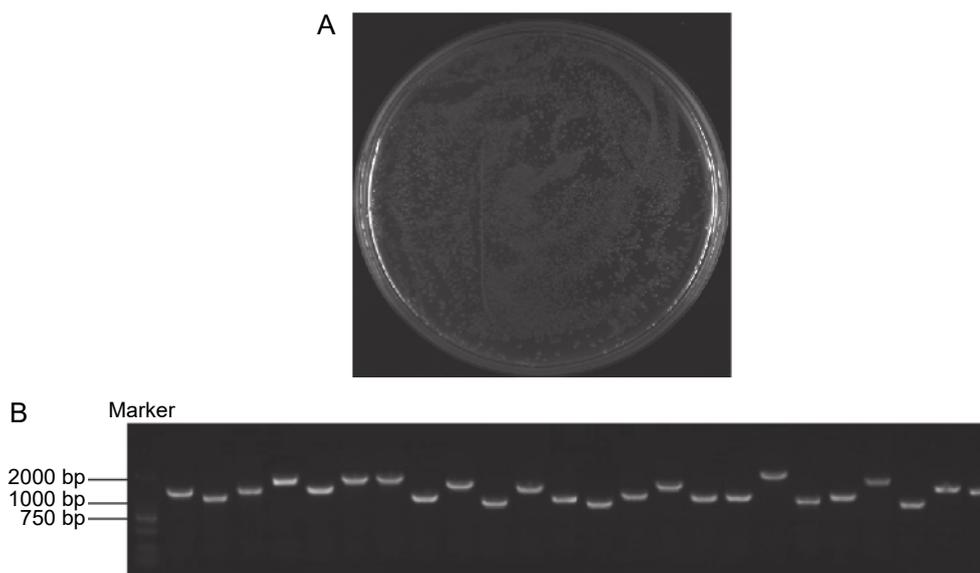


图 3 次级文库库容鉴定 (A) 和 24 个克隆中插入片段的 PCR 鉴定 (B)
Fig. 3 Identification of secondary library capacity (A) and PCR identification of inserts (B)

只有 DDO 平板上有转化酵母生长, 说明重组诱饵质粒成功转入宿主菌且对宿主菌无毒性 (图 4: A)。另外, 在 TDO 和 QDO 平板未发现转化酵母生长 (图 4: B、C), 说明没有激活报告基因 *HIS3* 和 *ADE2*, 诱饵 NnWRKY40b 转录因子无自激活活性, 可进行后续双杂交筛选。

2.5 NnWRKY40b 转录因子互作蛋白筛选

将 cDNA 文库质粒和诱饵质粒 pGBKT7-*NnWRKY40b* 共转化 Y2H Gold 酵母感受态细胞,

菌液按 200 μ L/板涂布于 TDO/X (SD/-Leu/-Trp/-His/X- α -gal) 平板, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 ~ 5 d, 得到蓝色菌落 (图 5: A)。将直径大于 2 mm 的菌落全部转接至新的 QDO/X (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -gal) 平板上增大筛选压力, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 d, 得到 44 个候选互作蛋白 (图 5: B)。测序后删除重复序列, 最终获得 27 个互作蛋白 (表 2)。

利用 NnWRKY40b 转录因子作为诱饵初步筛选出 27 个候选互作蛋白 (表 2)。通过功能注释

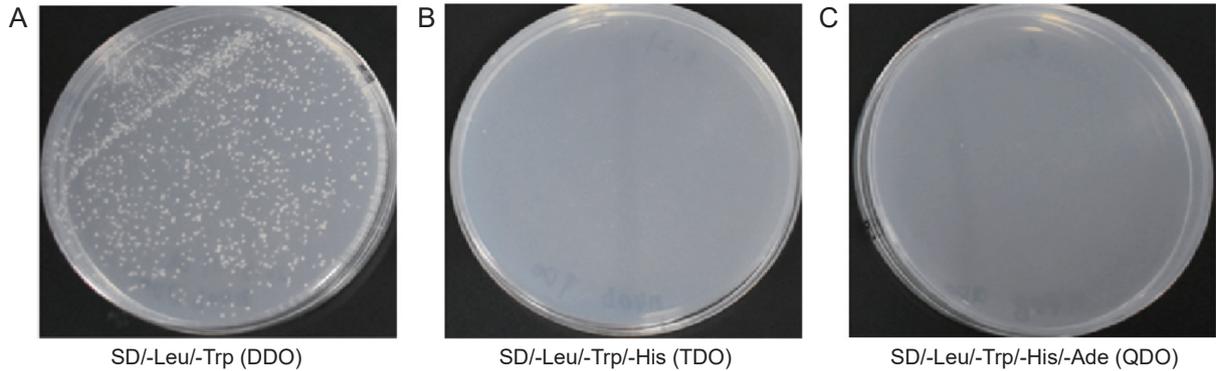


图 4 pGBKT7-*NnWRKY40b* 诱饵蛋白自激活检测

Fig. 4 Self-activation test of pGBKT7-*NnWRKY40b* bait protein

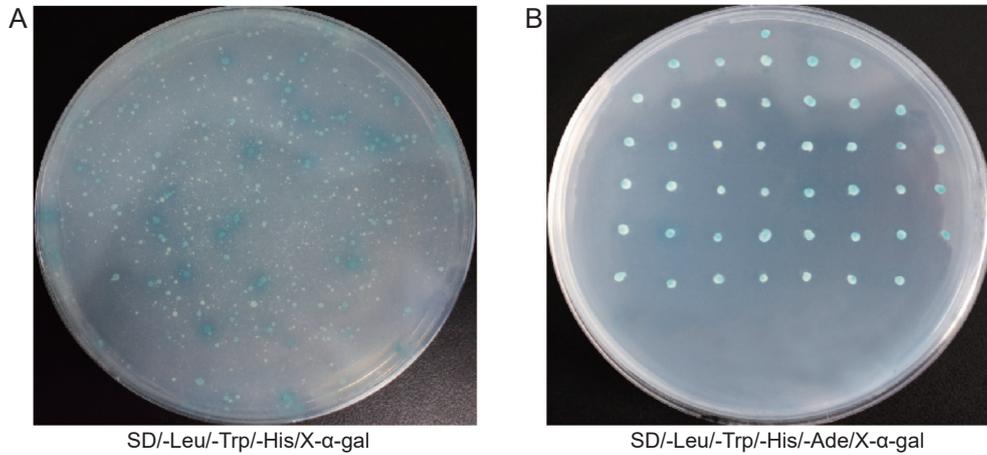


图 5 TDO/X (A) 和 QDO/X (B) 选择性培养基筛选的 *NnWRKY40b* 互作蛋白

Fig. 5 *NnWRKY40b* interacting proteins screened by TDO/X (A) and QDO/X (B) selection medium

和分类, 27 个候选互作蛋白可分为 3 大类, 包括 17 个生长发育及抗逆相关蛋白、6 个激素调控和次级代谢相关蛋白以及 4 个未命名蛋白。

2.6 互作蛋白编码基因响应激素 JA、SA 的表达分析

由于 WRKY 转录因子调控植物次级代谢物积累通常与激素相关, 因此, 我们检测了 *NnWRKY40b* 基因以及互作蛋白编码基因响应激素 JA 和 SA 的表达谱。根据转录组数据得到 *NnWRKY40b* 基因和 27 个互作蛋白编码基因表达热图 (图 6)。其中, *NnWRKY40b* 能快速响应激素处理, 说明 *NnWRKY40b* 可能参与与激素介导的莲各种生理过程。JA 处理 3 h 时, 27 个候选互作蛋白编码基因中有 6 个基因显著上调 ($\log_2FC \geq 1$), 6 个基因显著下调 ($\log_2FC \leq -1$), 说明这 12 个基因能快速响应激素 JA, 可能参与 JA 介导的信号通路。另外, 分别有 8 个和 10 个基因在

JA 处理 6 h 和 24 h 时被显著诱导 (图 6: A)。与 JA 处理相比, 激素 SA 处理后, 27 个候选互作蛋白编码基因中有 10 个基因表达量呈先上升后下降的趋势, 且在处理 24 h 时回到本底或者下调表达。另外, 有 8 个基因在 SA 处理 24 h 后显著上调, 说明这些基因可能位于 SA 介导的信号通路下游。除此以外, 激素 SA 对 10 个候选基因有一定抑制作用, 特别是处理 6 h 时较为显著 (图 6: B)。

2.7 代表性互作蛋白与 *NnWRKY40b* 点对点验证

为了进一步验证候选蛋白与 *NnWRKY40b* 互作的准确性, 本研究选取了 6 个代表性候选蛋白进行点对点验证 (图 7)。6 个代表性候选蛋白包括激素调控和次级代谢相关蛋白 NnPPOA、NnCHS、NnJAZ1; 生长发育及抗逆相关蛋白 NnUBC、NnPEBP 以及 1 个未知功能蛋白 Unknown protein3 (UNK pro3)。结果显示, *NnWRKY40b* 转录因子能与 NnPPOA、NnCHS、

表 2 NnWRKY40b 互作蛋白筛选及其功能预测
Table 2 Screening and functional prediction of NnWRKY40b interacting proteins

分类 Classification	蛋白号 Protein ID	基因号 Gene ID	蛋白名称 Protein name	相关蛋白功能预测 Protein function prediction	
生长发育及 抗逆	XP_010271938.1	LOC104607876	枯草杆菌蛋白酶, NnSBT1.7	种皮发育相关	
	XP_010266914.1	LOC104604316	质体蓝素, NnPC2B	参与光合作用	
	XP_010279114.1	LOC104613113	泛素结合酶, NnUBC	DNA 修复, 光周期, 抗逆胁迫响应, 降解生长素, 延缓植物衰老, 调控 ABA 信号途径	
	YP_009093956.1	LOC20834983	ATP 合成酶 CF1 亚基, NnatpE	光合作用, 细胞代谢	
	XP_010265991.1	LOC104603626	类似谷胱甘肽 S-转移酶 U17, NnGST	抗逆反应, 植物修复	
	XP_010269750.1	LOC104606314	铜转运蛋白 5.1, NnCTR5.1	光合作用, 呼吸作用, 细胞壁代谢, 氧化应激反应	
	XP_010255313.1	LOC104596029	非依赖性蛋白转位酶蛋白, NnTATB	细胞内运输、分泌和囊泡转运	
	XP_010248208.1	LOC104591115	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶激活酶, NnRCA	光合作用, 叶片衰老, 响应非生物胁迫	
	XP_010270928.1	LOC104607108	半胱氨酸过氧化物氧化蛋白, NnPER1	细胞氧化还原稳态, 细胞氧化剂解毒	
	XP_010269352.1	LOC104606034	60S 核糖体蛋白 L13e, NnRPL13	翻译、核糖体结构与生物发生	
	XP_010270872	LOC104607076	ADP-核糖基化因子, NnBLH8	细胞内运输、分泌和囊泡转运	
	XP_010275748.1	LOC104610704	核糖核酸酶, NnCAF 1	RNA 降解	
	XP_010241640.1	LOC104586181	液泡蛋白分选相关蛋白, NnVPS37-1	盐胁迫响应	
	XP_010264580.1	LOC104602549	磷脂酰乙醇胺结合蛋白, NnPEBP	植物生长发育, 几种信号通路的调节, 如 MAP 激酶通路	
	XP_010251283.1	LOC104593218	类似 Fcf2 蛋白, NnFcf	胚成熟, 花瓣分化, 叶片衰老	
	XP_010263125.1	LOC104601478	ATP 合成酶, NnatpH	光合作用, 细胞代谢	
	XP_010244725.1	LOC104588480	类 ACR12 蛋白, NnACR12	光合电子传递, 冷响应, 光响应	
	激素调控和 次级代谢	XP_010258950.1	LOC104598530	泛素蛋白, NnUBQ	蛋白降解, 茉莉酸信号途径, 细胞周期
		XP_010251469.1	LOC104593386	类似 TIFY 10A 蛋白, NnJAZ1	抑制 JA 信号传导, 响应盐胁迫, 花的发育, 茎叶的发育
		NP_001305084.1	LOC104602160	查尔酮合成酶, NnCHS	类黄酮的生物合成, 生长素运输的调节, 根系向重力性的调节
XP_010273014.1		LOC104608661	DAHP 合成酶, NnDAHP	分支酸合成	
ADC92563.1		LOC104588895	多酚氧化酶, NnPPOA	类黄酮、木质素、原花青素生物合成过程	
XP_010270953.1		LOC104607120	S-腺苷甲硫氨酸合酶 5, NnSAMS	木质素生物合成过程, 蛋氨酸代谢过程, 冷反应	
未知		XP_010261469.1	LOC104600297	未表征蛋白 1	未知
	XP_010260316.1	LOC104599465	未表征蛋白 2	未知	
	XP_010248518.1	LOC104591415	未表征蛋白 3	未知	
	XP_010276554.1	LOC104611264	未表征蛋白 4	未知	

NnJAZ1 蛋白互作 (图 7: A), NnPPOA 与 NnCHS 蛋白是植物合成类黄酮过程中的重要酶类^[28-30], NnWRKY40b 能与二者互作, 说明 NnWRKY40b 可能参与调控植物类黄酮的合成。另外, NnJAZ1 是 JA 信号通路中重要调控因子, 能参与介导植物次生代谢物合成^[31]。NnWRKY40b 与 NnJAZ1 互

作, 说明 NnWRKY40b 转录因子可能与 JA 介导的调控植物次级代谢过程显著相关。除了次级代谢和激素相关蛋白, NnWRKY40b 还能与 NnUBC (泛素结合酶) 和 NnPEBP (磷脂酰乙醇胺结合蛋白) 互作 (图 7: B), 表明 NnWRKY40b 可能参与植物生长发育过程的调控。

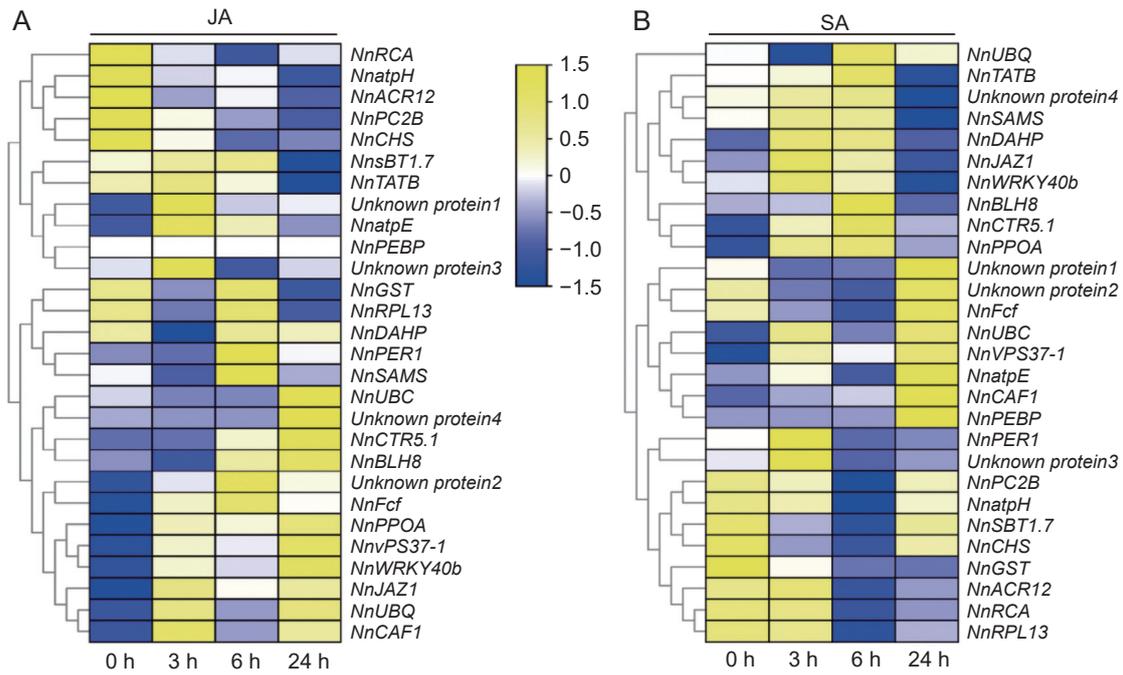


图 6 NnWRKY40b 和互作蛋白编码基因在激素 JA (A)、SA (B) 处理下的表达谱

Fig. 6 Expression profiles of genes encoding NnWRKY40b and interacting proteins under JA (A) and SA (B) treatments

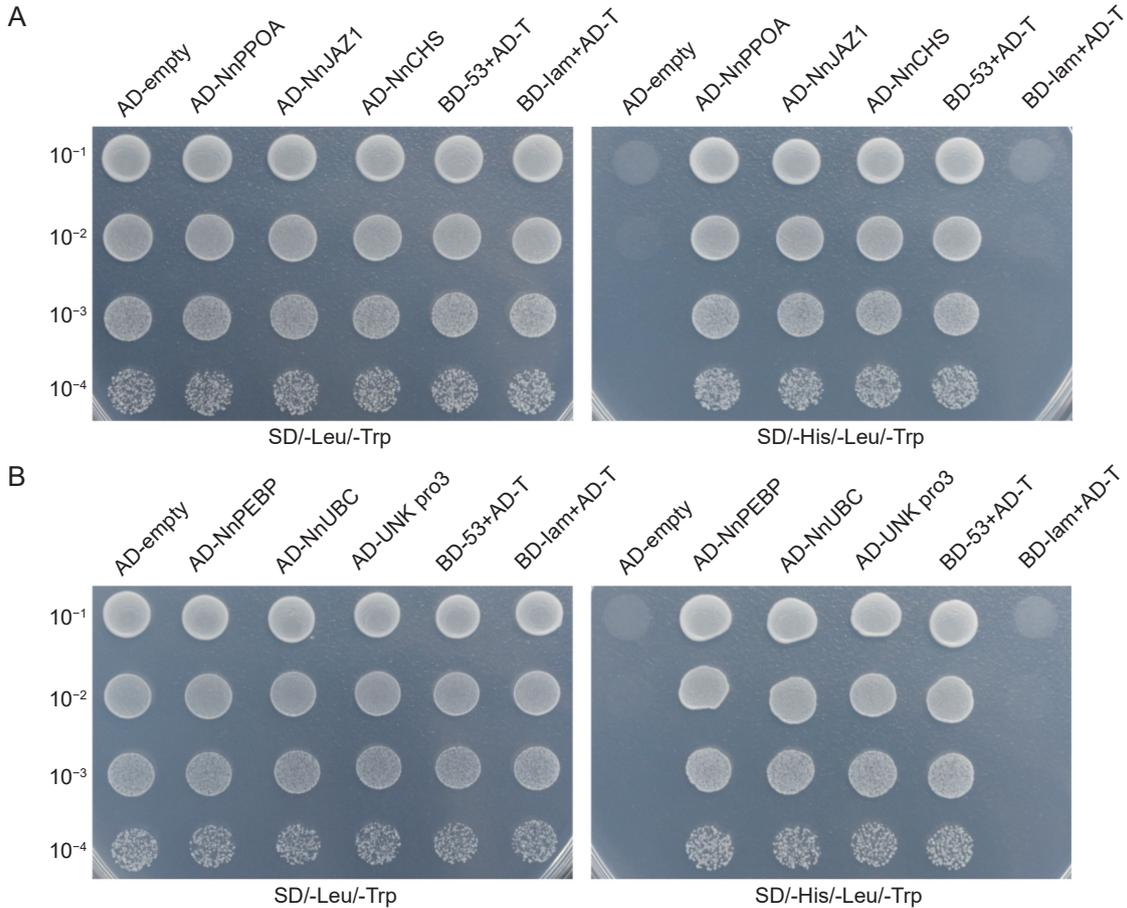


图 7 NnWRKY40b 和次级代谢相关蛋白 (A) 以及生长发育相关蛋白和未知功能蛋白的互作 (B)

Fig. 7 NnWRKY40b interactions with secondary metabolism-related proteins (A) and growth and development-related and unknown proteins (B)

3 讨论

莲是一种药食两用的水生植物,其药理作用的活性成分主要来源于莲次级代谢物——生物碱。通过前期转录组数据分析发现,NnWRKY40 转录因子与莲生物碱合成密切相关。NnWRKY40 基因包含的两个同源基因 *NnWRKY40a* 和 *NnWRKY40b* 对荷叶碱合成酶基因均有转录激活作用,但 *NnWRKY40b* 的激活作用更显著^[27]。因此,本研究以 NnWRKY40b 转录因子为研究对象,构建诱饵重组质粒,从‘白花建’莲不同组织部位的 cDNA 文库中筛选与其互作的蛋白,试图揭示 NnWRKY40b 转录因子调控莲次级代谢物合成的可能机制。

本研究成功构建了莲不同组织混合物的 cDNA 文库,其库容为 1.2×10^7 CFU,重组率为 100%,插入片段平均长度大于 1 000 bp。筛库结果显示 27 个蛋白能与 NnWRKY40b 相互作用。这 27 个候选蛋白可分为 3 大类,包括生长发育及抗逆、激素调控和次级代谢以及未知功能蛋白。其中,生长发育及抗逆相关候选蛋白包含 17 个,主要涉及植物种子发育、花分化、衰老、光合和呼吸作用、氧化应激以及非生物胁迫响应过程。点对点验证结果进一步表明,NnWRKY40b 能与代表性候选蛋白 NnUBC、NnPEBP 互作,NnUBC、NnPEBP 蛋白在植物细胞 DNA 修复、光周期以及抗逆过程中发挥重要功能^[32-34]。此外,拟南芥 *AtWRKY40* 是莲 *NnWRKY40b* 的同源基因,研究表明,干旱胁迫下,*AtWRKY40* 基因突变体植株种子萌发率下降,且叶片抗氧化酶活力及脯氨酸含量显著降低^[35]。*AtWRKY40* 基因还参与调控叶绿体和线粒体功能,激活抗胁迫基因表达^[36]。以上发现充分表明莲 NnWRKY40b 转录因子可能参与莲生长发育及抗逆过程。

除了生长发育及抗逆相关蛋白,另一类激素调控和次级代谢相关候选蛋白包含 6 个成员,主要涉及 JA 信号转导以及次级代谢物合成过程。点对点验证进一步证明 NnWRKY40b 与 NnPPOA、NnCHS 和 NnJAZ1 蛋白互作。其中 NnPPOA 和 NnCHS 蛋白与植物合成次级代谢物如类黄酮、木质素及花青素有关^[28-30]。另外,NnJAZ1 蛋白与

JA 介导的信号通路有关,研究表明,JA 作为一种植物激素,能诱导植物次级代谢物如生物碱的合成^[31,37]。植物体内存在一系列 JA 信号途径抑制因子,包括 NiNJA (Novel interactor of JAZ)、TPL (Topless)、TPR (Topless-related) 和 JAZ 等,能与 JA 信号通路相关转录因子结合,抑制其发挥转录激活功能。当外源施加 JA 时,植物细胞中 E3 泛素连接酶复合物 SCF^{COI1} 与 JAZ 蛋白结合力增加,导致 JAZ 蛋白泛素化,通过 26S 蛋白酶体途径降解,最终释放转录因子,使其与下游的次级代谢物合成基因的顺式作用元件结合,激活其表达^[38,39]。本研究中,NnWRKY40b 与 NnJAZ1 能相互作用,且 *NnWRKY40b* 基因能响应 JA 处理^[27],因此推测 JA 响应的 *NnWRKY40* 可能通过 JA 信号通路调节莲生物碱合成。与此类似的研究在广藿香 (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) 中也有报道,JA 响应的 MYB 类转录因子 PatSWC4 能与 PatJAZ4 因子相互作用,且 PatSWC4 转录因子能与广藿香醇合成基因 *PatPTS* 启动子区域结合,增强其转录活性。当过表达 *PatSWC4* 基因时能显著增加广藿香中广藿香醇的积累,说明 PatSWC4 转录因子能在 JA 介导的通路中正调控广藿香的合成^[40]。

值得注意的是,NnWRKY40b 转录因子还能与 4 个未知蛋白相互作用,其可能的功能还需进一步探究。目前的研究结果可以证明 NnWRKY40b 转录因子在 JA 介导的调控莲生物碱合成通路中可能发挥积极作用,后续将利用酵母单杂、瞬时表达等技术深入探讨 NnWRKY40b 转录因子调控生物碱合成的分子机制。

参考文献:

- [1] 陈强,张华,沙玫,刘永静.一测多评法同时测定荷叶中4种生物碱含量[J].福建中医药,2020,51(6):29-32.
Chen Q, Zhang H, Sha M, Liu YJ. Simultaneous determination of four alkaloids in nelumbinis folium by quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. *Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2020, 51(6): 29-32.
- [2] Wan Y, Xia J, Xu JF, Chen L, Yang Y, et al. Nuciferine, an active ingredient derived from lotus leaf, lights up the way for the potential treatment of obesity and obesity-related diseases[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 106002.
- [3] Abdallah BM, Ali EM. Green synthesis of silver nanoparti-

- cles using the *Lotus lalambensis* aqueous leaf extract and their anti-candidal activity against oral candidiasis[J]. *ACS Omega*, 2021, 6 (12): 8151-8162.
- [4] Tong YL, Li ZW, Wu YK, Zhu SL, Lu KK, He Z. Lotus leaf extract inhibits ER breast cancer cell migration and metastasis[J]. *Nutr Metab*, 2021, 18 (1): 20.
- [5] Van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism[J]. *Science*, 2000, 289 (5477): 295-297.
- [6] Kato N, Dubouzet E, Kokabu Y, Yoshida S, Taniguchi Y, et al. Identification of a WRKY protein as a transcriptional regulator of benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*[J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48 (1): 8-18.
- [7] Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, Patra B, Singh SK, Yuan L. The transcription factor CrWRKY1 positively regulates the terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*[J]. *Plant Physiol*, 2011, 157 (4): 2081-2093.
- [8] Agarwal P, Pathak S, Lakhwani D, Gupta P, Asif MH, Trivedi PK. Comparative analysis of transcription factor gene families from *Papaver somniferum*: identification of regulatory factors involved in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis[J]. *Protoplasma*, 2016, 253 (3): 857-871.
- [9] Zhou ML, Memelink J. Jasmonate-responsive transcription factors regulating plant secondary metabolism[J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34 (4): 441-449.
- [10] Tripathi S, Sangwan RS, Mishra B, Jadaun JS, Sangwan NS. Berry transcriptome: insights into a novel resource to understand development dependent secondary metabolism in *Withania somnifera*(Ashwagandha)[J]. *Physiol Plant*, 2020, 168 (1): 148-173.
- [11] Hao XL, Xie CH, Ruan QY, Zhang XC, Wu C, et al. The transcription factor *OpWRKY2* positively regulates the biosynthesis of the anticancer drug camptothecin in *Ophiorrhiza pumila*[J]. *Hortic Res*, 2021, 8 (1): 7.
- [12] Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. The WRKY superfamily of plant transcription factors[J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5 (5): 199-206.
- [13] 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 β -amylase from sweet potato[J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 244 (6): 563-571.
- [14] 向小华, 吴新儒, 晁江涛, 杨明磊, 杨帆, 等. 普通烟草WRKY基因家族的鉴定及表达分析[J]. *遗传*, 2016, 38(9): 840-856.
- Xiang XH, Wu XR, Chao JT, Yang ML, Yang F, et al. Genome-wide identification and expression analysis of the WRKY gene family in common tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)[J]. *Hereditas*, 2016, 38 (9): 840-856.
- [15] Cormack RS, Eulgem T, Rushton PJ, Köchner P, Hahlbrock K, Somssich IE. Leucine zipper-containing WRKY proteins widen the spectrum of immediate early elicitor-induced WRKY transcription factors in parsley[J]. *BBA-Gene Struct Expr*, 2002, 1576 (1-2): 92-100.
- [16] 郑超, 郑二松, 王翎鸣, 李冬月, 杨勇, 等. 水稻WRKY转录调控因子研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2018, 29(2): 286-294.
- Zheng C, Zheng ES, Wang XM, Li DY, Yang Y, et al. Research progress on rice WRKY transcription factors[J]. *Letters in Biotechnology*, 2018, 29 (2): 286-294.
- [17] 杨致荣, 王兴春, 薛金爱, 孟令芝, 李润植. 药用植物长春花WRKY转录因子的鉴定及表达谱分析[J]. *生物工程学报*, 2013, 29(6): 785-802.
- Yang ZR, Wang XC, Xue JA, Meng LZ, Li RZ. Identification and expression analysis of WRKY transcription factors in medicinal plant *Catharanthus roseus*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2013, 29 (6): 785-802.
- [18] Yamada Y, Nishida S, Shitan N, Sato F. Genome-wide profiling of WRKY genes involved in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis in California Poppy (*Eschscholzia californica*) [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 2: 699326.
- [19] Wei HW, Chen SY, Niyitanga S, Liu T, Qi JM, Zhang LW. Genome-wide identification and expression analysis response to GA₃ stresses of WRKY gene family in seed hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. *Gene*, 2022, 822: 146290.
- [20] Mishra S, Triptahi V, Singh S, Phukan UJ, Gupta MM, et al. Wound induced transcriptional regulation of benzyloisoquinoline pathway and characterization of wound inducible PsWRKY transcription factor from *Papaver somniferum*[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (1): e52784.
- [21] He J, Bouwmeester HJ, Dicke M, Kappers IF. Transcriptional and metabolite analysis reveal a shift in direct and indirect defences in response to spider-mite infestation in cucumber (*Cucumis sativus*) [J]. *Plant Mol Biol*, 2020, 103 (4-5): 489-505.
- [22] 代红洋, 柏旭, 李晓岗, 张兴开, 罗霖, 等. 植物激素在三萜类化合物生物合成中的作用及调控机制研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(20): 6391-6402.
- Dai HY, Bai X, Li XG, Zhang XK, Luo L, et al. Research progress on roles of phytohormone in biosynthesis of triterpenoids and their regulatory mechanisms[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, 52 (20): 6391-6402.
- [23] Wasternack C, Song SS. Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription[J]. *J Exp Bot*, 2017, 68 (6): 1303-1321.
- [24] Yang J, Duan GH, Li CQ, Liu L, Han GY, et al. The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic

- stresses[J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1349.
- [25] Ming R, VanBuren R, Liu YL, Yang M, Han YP, et al. Genome of the long-living sacred lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) [J]. *Genome Biol*, 2013, 14 (5): R41.
- [26] Zhang Y, Rahmani RS, Yang XY, Chen JM, Shi T. Integrative expression network analysis of microRNA and gene isoforms in sacred lotus[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21 (1): 429.
- [27] Li J, Xiong YC, Li Y, Ye SQ, Yin Q, et al. Comprehensive analysis and functional studies of WRKY transcription factors in *Nelumbo nucifera* [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (20): 5006.
- [28] Ferrer JL, Austin MB, Stewart C Jr, Noel JP. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2008, 46 (3): 356-370.
- [29] Ren GH, Wang BJ, Zhu XD, Mu Q, Wang C, et al. Cloning, expression, and characterization of miR058 and its target PPO during the development of grapevine berry stone[J]. *Gene*, 2014, 548 (2): 166-173.
- [30] 王馨雨, 杨绿竹, 王婷, 王蓉蓉, 刘洁, 等. 植物多酚氧化酶的生理功能、分离纯化及酶促褐变控制的研究进展[J]. *食品科学*, 2020, 41(9): 222-237.
- Wang XY, Yang LZ, Wang T, Wang RR, Liu J, et al. Recent progress toward understanding the physiological function, purification, and enzymatic browning control of plant polyphenol oxidases[J]. *Food Science*, 2020, 41 (9): 222-237.
- [31] 田娇, 刘园, 房敏峰. 外源茉莉酸类激素对药用植物次生代谢的影响研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2015, 27(1): 185-190.
- Tian J, Liu Y, Fang MF. Review on the influence of exogenous jasmonates on medicinal plant secondary metabolism[J]. *Natural Product Research and Development*, 2015, 27 (1): 185-190.
- [32] 王金利, 史胜青, 贾利强, 江泽平. 植物泛素结合酶E2功能研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010(4): 7-10.
- Wang JL, Shi SQ, Jia LQ, Jiang ZP. Progress on functions of ubiquitin-conjugating enzyme (E2) in plants[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010 (4): 7-10.
- [33] 李兴芬, 苗雅慧, 孙永江, 张孟娟, 张凌云. 青杆PwPEBP基因及其启动子序列的克隆与表达分析[J]. *北京林业大学学报*, 2019, 41(4): 8-20.
- Li XF, Miao YH, Sun YJ, Zhang MJ, Zhang LY. Cloning and expression analysis of PwPEBP gene and promoter sequence in *Picea wilsonii* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2019, 41 (4): 8-20.
- [34] 王寻, 高凝, 张富军, 韩月彭, 王小非, 等. 苹果磷脂酰乙醇胺结合蛋白PEBP家族基因的鉴定与比较分析[J]. *植物生理学报*, 2021, 57(10): 1996-2010.
- Wang X, Gao N, Zhang FJ, Han YP, Wang XF, et al. Identification and comparative analysis of phosphatidyl ethanolamine binding protein (PEBP) family gene in apple[J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57 (10): 1996-2010.
- [35] 祝一文, 车永梅, 赵方贵, 朱丹, 刘新. 碱胁迫下H₂S参与活性氧代谢和水稻幼苗生长的调控[J]. *农业生物技术学报*, 2018, 26(7): 1124-1131.
- Zhu YW, Che YM, Zhao FG, Zhu D, Liu X. H₂S functions in growth regulation in rice (*Oryza sativa*) seedling and metabolism modulating of reactive oxygen under alkaline stress[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, 26 (7): 1124-1131.
- [36] 张金梅, 白雪, 李玥莹, 张颖. WRKY响应植物逆境的“角色”[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(12): 5-8.
- Zhang JM, Bai X, Li YY, Zhang Y. WRKY's "Role" in response to plant adversity[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48 (12): 5-8.
- [37] 魏昕, 刘雨恒, 刘宇阳, 殷晓浦, 谢恬, 等. 植物JAZ蛋白家族研究进展[J]. *植物生理学报*, 2021, 57(5): 1039-1046.
- Wei X, Liu YH, Liu YY, Yin XP, Xie T, et al. Advances of JAZ family in plants[J]. *Plant Physiology Journal*, 2021, 57 (5): 1039-1046.
- [38] Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling[J]. *Nature*, 2007, 448 (7154): 666-671.
- [39] Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu YJ, Mandaokar A, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling[J]. *Nature*, 2007, 448 (7154): 661-665.
- [40] Chen XZ, Li JR, Liu YT, Wu DD, Huang HL, et al. PatSWC4, a methyl jasmonate-responsive MYB (v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog)-related transcription factor, positively regulates patchouli biosynthesis in *Pogostemon cablin* [J]. *Ind Crops Prod*, 2020, 154: 112672.

(责任编辑: 周媛)