

水稻转录因子 *WRKY42* 的转录、表达 及其与 W-box 的结合特征分析*

缪刘杨^{1)**} 周亮^{2)**} 杨烁¹⁾ 李莉云^{1)***} 李雪姣¹⁾ 范伟¹⁾
兰金苹¹⁾ 史佳楠¹⁾ 刘丽娟¹⁾ 刘国振^{1)***}

(¹⁾河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; (²⁾Quantum 量子科学仪器贸易(北京)有限公司, 北京 100027)

摘要 *WRKY* 是植物中最大的转录因子家族之一。本文对水稻 *WRKY42* 基因的转录分析发现, 该基因在水稻苗期和花药中转录, 其蛋白质可在各时期的叶片中检测到。在 *Xa21* 介导的抗白叶枯病过程中, 接菌后期可检测到明显的诱导表达条带, 比较其在抗、感和对照反应中的表达丰度发现, 在抗、感反应中的表达相似但均明显大于对照反应, 推测 *WRKY42* 蛋白质在水稻-白叶枯病菌互作反应中发挥作用。我们克隆并在细菌中表达了 *WRKY42* 蛋白质, 采用微量热泳动(microscale thermophoresis)技术, 调查了 *WRKY42* 与病程相关基因 *PR1a* 和 *PR1b* 启动子区顺式元件 W-box 的互作, 发现它们之间可发生特异结合, 其解离常数分别为 73.3 $\mu\text{mol/L}$ 和 58.3 $\mu\text{mol/L}$ 。上述数据提供了 *WRKY42* 调控下游基因的直接证据, 支持 *WRKY42* 在水稻抗病过程中发挥作用。文章提出了 *WRKY* 转录因子在水稻与白叶枯病菌互作过程中的作用模式。

关键词 水稻, *WRKY* 转录因子, 白叶枯病, 免疫印迹, 微量热泳动仪, W-box

学科分类号 Q945.8, S511, Q51, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00510

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上最重要的粮食作物之一, 也是基础研究的模式生物。全基因组测序及注释结果表明, 在水稻基因组中有近百个 *WRKY* 转录因子成员^[1], 该转录因子的得名是因为其 N 端氨基酸序列中有保守的 *WRKY* 序列^[2], *WRKY* 转录因子在植物中的广泛存在表明其进化上的保守性和功能上的重要性, 但要具体了解每个 *WRKY* 成员的功能还需要植物分子生物学家的长期努力。

据报道, *WRKY* 转录因子在植物对生物及非生物逆境胁迫、生长发育、物质代谢和氧化衰老调控等过程中都发挥作用^[3-4]。对水稻 *WRKY* 转录因子的研究发现, 超表达 *WRKY13* 能增强水稻对稻瘟病和白叶枯病的抗性, 并可增加水稻中水杨酸的积累, 但会抑制茉莉酸应答基因的表达^[5]。敲除 *WRKY22* 的转基因水稻表现为对稻瘟病菌敏感, 而超表达 *WRKY22* 可增强水稻对稻瘟病的抗性, 暗示 *WRKY22* 作为正调控因子在水稻抗稻瘟病过

程中发挥作用^[6]。*WRKY28* 缺失的水稻表现为对稻瘟病的抗性增强, 说明 *WRKY28* 起负调控作用^[7]。超表达 *WRKY45* 可提高水稻对稻瘟病和白叶枯病的抗性, 但却会降低水稻对纹枯病的抗性^[8-9]。*WRKY62* 在 *Xa21* 介导的水稻抗白叶枯病过程中发挥负调控因子的作用^[10]。超表达 *WRKY71* 的转基因水稻对白叶枯病的抗性增强^[11]。不断累积的证据说明多个 *WRKY* 转录因子与水稻抗病过程相关。

WRKY 转录因子往往通过调控下游基因影响植物对病原物的抗性, 其中病程相关(pathogenesis related, PR)基因是一类重要的元件^[12]。自从在欧芹的病程相关基因 *PR1* 上游启动子区发现 W-box

* 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20131302110006)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。Tel: 0312-7528787

李莉云。E-mail: lilijun@hebau.edu.cn

刘国振。E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

收稿日期: 2013-12-18, 接受日期: 2014-02-21

(TTGACC/T)以来^[12], 目前已经发现 *W-box* 顺式元件广泛存在于植物病程相关基因的上游启动子区^[13-14]. 通过酵母单杂交实验证明, *WRKY13* 蛋白质可以与 *PR1a*、*AOS2* 和 *LOX* 基因上游包含 *W-box* 或类 *W-box* 的序列结合, 用凝胶阻滞试验证明了它们之间的结合是特异的^[5]. 对 *WRKY28* 的表达模式进行分析发现, *WRKY28* 可能在水稻应对稻瘟病菌的先天防御反应中发挥作用, 超表达 *WRKY28* 降低了对稻瘟病的抗性, 凝胶阻滞试验证明了 *WRKY28* 与 *W-box* 特异结合^[15]. *WRKY53* 也具有与 *W-box* 特异结合的能力, 超表达 *WRKY53* 增强了水稻对稻瘟病的抗性^[16]. 有意思的是, 在 *WRKY53* 的启动子区有 3 个串联的 *W-box*, 实验数据表明, *W-box* 的数量与 *WRKY53* 的转录强度相关, 也会间接影响其在抗病反应中的调控能力^[17], 提示 *WRKY* 转录因子也可能通过结合自身的启动子区或其他 *WRKY* 成员的启动子区而调控蛋白质的表达.

白叶枯病是危害最为严重的水稻细菌性病害, *Xa21* 是最早克隆的水稻白叶枯病抗性基因^[18], 该基因编码类受体蛋白激酶, 在水稻抗病育种中有广泛应用. 为了解 *Xa21* 介导的白叶枯病抗性机理, 近年来已鉴别了多个信号传导途径中的元件, 包括 *XB3*^[19]、*XB10 (WRKY62)*^[10]、*XB15*^[20]、*XB24*^[21]、*XB25*^[22]和内质网分子伴侣蛋白 *BIP3*^[23]等. 最近的研究还发现, 在 *Xa21* 介导的免疫应答反应中, *XA21* 蛋白质会被剪切释放出激酶结构域, 该结构域可以转移到细胞核中直接与转录因子 *WRKY62* 互作^[24]. 受体激酶蛋白质 *XA21* 介导的白叶枯病抗病反应为研究水稻抗性机理提供了一个良好的模式系统. 通过检测病程相关基因的转录和表达, 也发现多个病程相关基因在 *Xa21* 介导的抗病过程中受诱导表达或表达量明显提高, 如 *PR1a*、*PR1b* 和 *PR10* 等^[5], 提示这些 *PR* 基因可能在水稻与病原物的抗争中发挥着直接的作用. 但到目前为止, 还没有获得 *Xa21* 途径中转录因子如何调控下游 *PR* 基因的直接证据.

凝胶阻滞实验(electrophoresis mobility shift assay, EMSA)是研究转录因子和顺式元件结合的传统方法, 但该方法一般只能提供定性的结果. 酵母单杂交技术也经常被用来检测转录因子和 DNA 的结合, 该方法需要构建载体并在酵母中表达. 2010年, Wienken 等^[25]基于相互结合的生物分子在热场中泳动发生变化的原理, 建立了微量热泳动技术

(microscale thermophoresis, MST), 该技术具有操作简便、适应范围广、可以获得解离动态曲线等优点, 在不同的生物分子相互作用研究领域都获得了应用, 其中包括蛋白质与 DNA 的相互结合等, 但在水稻转录因子研究方面的应用尚未见报道.

在本实验室的前期工作中, 通过蛋白质印迹技术(Western blotting, WB)鉴定到 7 个在 *Xa21* 介导的水稻抗白叶枯病过程中表达发生变化的 *WRKY* 转录因子^[26-27], 另外还发现 *PR1A*、*PR1B*、*PR10A* 等病程相关蛋白质在水稻与白叶枯病菌互作反应中表达上调^[28-29]. 在此基础上, 本文系统分析了水稻 *WRKY42* 转录因子的转录和表达特征, 发现该基因在多种逆境胁迫条件下发生转录水平的变化, 且在 *Xa21* 介导的白叶枯病抗性反应中受诱导表达. 随后, 我们利用表达纯化的 *WRKY42* 蛋白质, 通过 MST 技术调查了其重要病程相关基因上游调控区顺式元件的结合特征, 为了解 *WRKY42* 转录因子的功能, 尤其是在 *Xa21* 介导的水稻抗白叶枯病过程中的功能提供了重要证据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

水稻(*Oryza sativa* L.)材料种植在河北农业大学西校区水稻实验田内(河北保定). 叶片材料取自 93-11 幼苗株高为 1、2、5、10 和 15 cm 时的地上部及分蘖期、孕穗期、开花期和成熟期的叶片. 4021 是将白叶枯病抗性基因 *Xa21* 转入 TP309 而获得的纯合株系, 由美国加州大学戴维斯分校 Ronald 教授实验室构建^[10]. 水稻 4021 接菌后, 分别取 0h、2h、8h、1d、2d、3d、5d、7d 和 10d 的叶片材料. 所用白叶枯病菌为 Philippine Race 6 (PXO99), 由中国科学院遗传与发育生物学研究所朱立煌研究员提供. Δ raxST 质粒 DNA 由美国加州大学戴维斯分校 Ronald 教授提供, 将该质粒转化 PXO99 菌株后获得了 PXO99 Δ raxST 菌株, 该菌株表现为 *avr* 缺失的表型^[30]. 对照处理(Mock)为水稻 4021 接种蒸馏水. 叶片取材后经液氮速冻, 保存于 -70℃ 冰箱备用. 白叶枯病菌的培养及水稻叶片接种方法详见文献[26].

扩增 *WRKY42* 基因所用的模板为质粒 DNA (Accession number 为 AK110587, Clone name 为 002-168-F03)由日本水稻基因组资源中心(Rice Genome Resource Center)提供. 表达载体 pET30a、大肠杆菌 DH5 α 和 BL21-Codon Plus 由本实验室

保存. 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、T4 DNA Ligase 和 Ex Taq DNA 聚合酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; 纯化所用 His-tag beads 购自 GE Healthcare Life Sciences.

1.2 WRKY42 基因的转录分析

从 Rice Genome Annotation Project 数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 下载 *WRKY42* 基因的 RNA-Seq FPKM 数据, 其数据编号分别为 GSE6893(苗期、成熟叶片、花序和种子发育)、GSE6901(逆境胁迫)、GSE11025(条纹病毒侵染)和 GSE18361(稻瘟病菌侵染). 从水稻 MPSS (Massively parallel signature sequencing) 网站(<http://mpss.udel.edu/rice/>)^[31] 下载 MPSS 数据, 统计目标基因的转录信息.

1.3 多克隆抗体制备

WRKY42 蛋白质序列来自水稻基因组数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>). 利用 BEPITOPE 软件^[32] 预测抗原决定簇, 选择峰值较高的片段, 用 BLASTP 软件对水稻蛋白质库进行唯一性检测, 确定免疫原多肽序列为 LSASASSSPSSVT. 多肽合成及抗体制备由北京华大蛋白质研发中心有限公司完成.

1.4 水稻总蛋白质提取及蛋白质印迹检测

将冻存的水稻叶片在液氮中充分研磨, 加入蛋白质提取液(62.5 mmol/L TRIS-HCl pH 7.4, 10%甘油, 0.1% SDS, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF, 5% β 巯基乙醇), 混匀后冰上放置 10 min, 12 000 r/min 4℃ 离心 20 min, 取上清即为总蛋白质. 蛋白质印迹(WB)实验至少重复 3 次, 使用 HSP (heat shock protein) 蛋白质进行检测作为等量加样的内参^[33]. 蛋白质提取及 WB 试验具体方法可参照文献[19].

1.5 引物设计

利用 Primer CE 软件^[34], 设计了 *WRKY42* 基因全长 cDNA 的特异扩增引物, 上游引物加 *EcoR* I 酶切位点, 下游引物加 *Hind* III 酶切位点, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成. 上游引物序列为 5' GCGAATTCATGGCGGATCCGTTCCG 3', 下游引物序列为 5' GCAAGCTTCTAGAGCAATCTTCCAG 3'.

1.6 基因扩增及蛋白质表达纯化

以带有水稻 *WRKY42* 全长 cDNA 的质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物与 pET30a 载体分别双酶切, 纯化回收 PCR 及酶切产物, 连接

转化大肠杆菌 DH5 α , 重组子送北京六合华大基因科技股份有限公司基因测序验证后, 转化表达菌 BL21-Codon Plus, 按 1:100 的比例将过夜菌转接至 100 ml 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养至 A_{600} 为 0.6~0.8, 按 1:100 比例加入 100 mmol/L 的 IPTG, 37℃ 震荡培养 3 h, 收菌后超声破碎, 用 His-tag beads 进行蛋白质纯化, SDS-PAGE 检测.

1.7 DNA 结合探针的设计与合成

从 Rice Genome Annotation Project 数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 中, 获得 *PR1a* (LOC_Os07g03710) 和 *PR1b* (LOC_Os01g28450) 基因上游 1.5 kb 的 DNA 序列, 利用 PlantCARE 软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[35-36] 分析其启动子区的顺式元件, 选取包含 W-box 在内的 25 bp 长的寡核苷酸序列, 分别命名为 W-1a 和 W-1b, W-1a 位于 *PR1a* 的 -1366~-1342, 序列为: 5' CTTGATGTATTATGACC-CGGTAGT 3', W-1b 位于 *PR1b* 的 -1286~-1262, 序列为 5' GGTATAACATGTTTGACCATGTTTG 3'. 将 W-box 的核心序列 TGAC 突变为 CCTA(如下划线所示)获得相应的突变探针 W-1am 和 W-1bm, W-1am 的序列为 5' CTTGATGTATTATCCTACCGTAGT 3', W-1bm 的序列为 5' GGTATAAC-ATGTTTCTACATGTTTG 3'. 寡核苷酸探针 BS65 包含 2 个 W-box, 可与 WRKY 转录因子特异结合^[16, 37-38]. BS65 和 mBS65 的序列分别为: 5' ATC-GTTGACCGAGTTGACTTT 3' 和 5' ATCGTCCT-ACGAGTCCTATTT 3'. 与上述序列互补的探针也一并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成.

1.8 体外结合试验

用 NT.LabelFree 微量热泳动(MST)分子间相互作用分析仪(德国 Nano Temper 公司生产)对水稻 *WRKY42* 蛋白质与带有 W-box 的寡核苷酸探针 BS65、W-1a 和 W-1b 及其突变探针的结合进行检测. 检测方法参见文献[39], 具体实验过程简要描述如下: 保持 *WRKY42* 蛋白质的浓度不变 (50 μ mol/L), 混合探针的互补链, 使探针的浓度梯度增加, 反应缓冲液为 25 mmol/L HEPES(pH 7.9)、1 mmol/L EDTA、5 mmol/L DTT、50 mmol/L NaCl 和 10%甘油. 混合样品吸入毛细管中, 经红外激光照射毛细管可产生温度梯度, 利用 MST 系统检测 *WRKY42* 蛋白质的自发荧光, 不同浓度的结合物分子会对荧光分子的热泳动平衡态分布产生影

响, 从而可获得两个分子间相互作用关系. 采集的荧光信号经校准后用 OriginPro 8.5(OriginLab)进行分析并采用希尔公式(Hill equation)计算解离常数(K_d), K_d 值是结合 50%靶蛋白质时对应的寡核苷酸浓度.

2 结果与分析

2.1 水稻 *WRKY42* 基因

水稻 *WRKY42* 属于 *WRKY* 转录因子 II 家族的成员, 有报道表明, 该家族成员如 *WRKY62*、*WRKY28*、*WRKY71* 和 *WRKY76* 等都在水稻抗病过程中发挥调节作用^[40]. *WRKY42* 转录因子的 MSU locus 号为 Os02g26430, 其 cds 序列长度为 762 bp, 编码的蛋白质分子质量为 27 ku, 基因组序列显示编码 *WRKY42* 的 cds 序列是不连续的, 其中含有两个内元, 对 *WRKY42* 转录因子上游启动子区分析发现在 -389~ -370 位置有 2 个串联的 *W-box* 顺式元件存在.

2.2 *WRKY42* 基因的转录

为了解 *WRKY42* 基因的转录, 我们从 Rice Genome Annotation Project 数据库下载了基于 RNA-seq 的水稻 *WRKY42* 基因的转录数据, 结果显示, *WRKY42* 主要在花药、幼苗期地上部、20 天幼苗叶片和水稻四叶期时有转录信号, 其中在幼苗期地上部的转录水平相对较高(表 1).

对来自基因芯片的转录数据分析表明, 在水稻正常生长过程中, *WRKY42* 在叶片、花序和授粉

Table 1 Transcription abundance of rice *WRKY42* gene in different tissues detected by RNA-seq

Library description	FPKM
Embryo- 25 DAP	0
Endosperm- 25 DAP	0
Seed- 10 DAP	0
Seed-5 DAP	0
Anther	0.663
Pistil	0
Post-emergence inflorescence	0
Pre-emergence inflorescence	0
Leaves-20 days	0.718
Shoots	3.869
Seedling four-leaf stage	0.326

FPKM: Reads per kilobase of exon model per million mapped reads; DAP: Days after pollination.

后种子中都有转录, 其中在授粉后不同天数的种子中的转录呈现下降趋势(图 1a). *WRKY42* 受干旱和盐胁迫的诱导, 但冷胁迫处理对 *WRKY42* 的转录没有影响(图 1b). 在水稻品种武育粳 3 号(WY3)和 KT95-418(KT95)中, 水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)侵染都会诱导 *WRKY42* 的转录上调(图 1c). 在受到稻瘟病菌侵染后, *WRKY42* 的转录也会上调(图 1d). 此外, 从水稻 MPSS 网站下载的转录数据说明, 在水稻与白叶枯病菌(*Xathomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)互作过程中, 在接种感病材料后 24 h, *WRKY42* 的转录有所升高(数据未附).

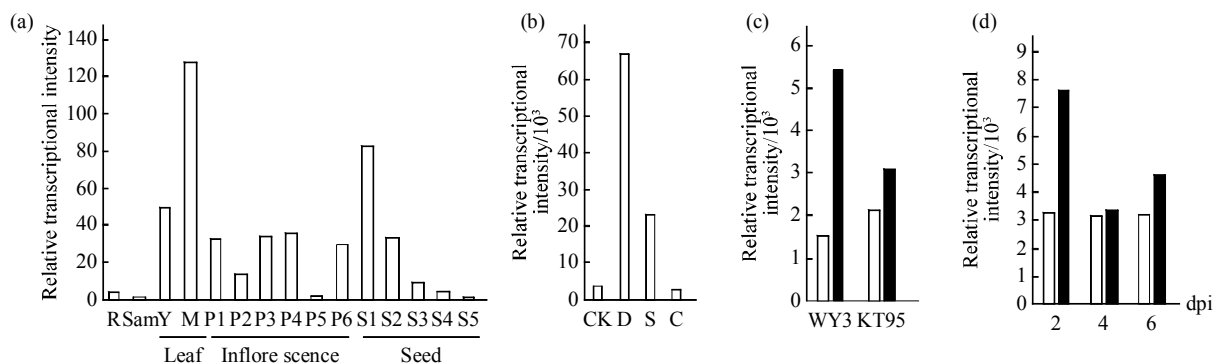


Fig. 1 Relative transcriptional intensity of *WRKY42* at different developmental stages and treatments

(a) Inflorescence and seed developmental stage. R: Root at 7-day-old seedling; Sam: Shoot apical meristem; Y: Young leaf; M: Mature leaf; P1: up to 3 cm; P2: 3~5 cm; P3: 5~10 cm; P4: 10~15 cm; P5: 15~22 cm; P6: 22~30 cm; S1: 0~2 DAP; S2: 3~4 DAP; S3: 5~10 DAP; S4: 11~20 DAP; S5: 21~29 DAP. (b) Abiotic stress treated rice seedlings. CK: 7-day-old seedling; D: Drought stress; S: Salt stress; C: Cold stress. (c) Stripe virus infected rice. WY3: Wuyujing 3; KT95: KT95-418. □: Uninfected; ■: RSV infected. (d) *Magnaporthe oryzae* strain Guy11 inoculated rice root. dpi: Days post inoculation. □: Mock inoculated; ■: Guy11 inoculated.

2.3 WRKY42 蛋白质在水稻叶片中的表达丰度

为了对 WRKY42 蛋白质的丰度有所了解, 我们首先分析了不同时期的水稻叶片, 取水稻苗期 (株高分别为 1、2、5、10 和 15 cm) 地上部和分蘖期、孕穗期、开花期、成熟期的叶片, 提取总蛋白质, 用 WRKY42 蛋白质特异抗体进行 WB 检测 (图 2). 由图 2 可见, WRKY42 蛋白质在水稻苗期的表达量相对较低, 随着水稻生长其表达量逐渐增高, 但值得指出的是, 分蘖期之后的信号条带分子质量略大, 可能此时的 WRKY42 蛋白质发生了修饰, 为了加以区分, 我们将它们分别标注为 WRKY42、WRKY42⁺ 和 WRKY42⁺⁺.

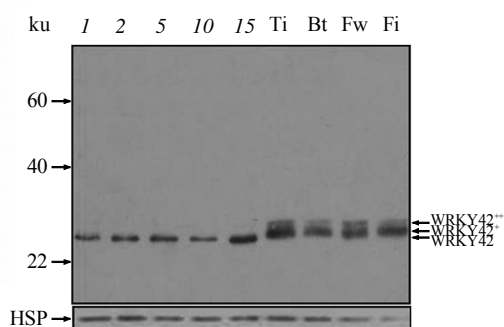


Fig. 2 WRKY42 protein abundance at different developmental stages of rice leaves

Total proteins were isolated from rice leaves at different developmental stages. WB analysis were carried out using anti-WRKY42 antibody. Lane 1~5 are shoots at seedling stage in height of 1, 2, 5, 10 and 15 cm, respectively. Ti: Leaves at tillering stage; Bt: Leaves at booting stage; Fw: Leaves at flowering stage; Fi: Leaves at filling stage. The abundance of HSP protein was used as equal loading marker (Lower panel).

2.4 WRKY42 蛋白质在水稻与 *Xoo* 互作反应中的表达丰度

通过 WB 试验检测了水稻 4021 在接种白叶枯病菌后不同时间点 WRKY42 蛋白质的丰度 (图 3a). 从图 3a 可以看出, WRKY42 蛋白质自接种后第 3 天开始, 就可检测到明显的信号增强, 信号的增强有接种时间的依赖性, 并且出现一条分子质量略大于 50 ku 的条带 (标注为 WRKY42^{*}). 为了比较 WRKY42 蛋白质在不同水稻-*Xoo* 互作反应中的丰度变化, 我们选取了 3 个时间点 (0h、3d 和 5d) 的样品, 比较了其在抗病 (*R*: 4021-PXO99)、感病 (*S*: 4021-PXO99Δ*raxST*) 和对照 (*M*: 4021-H₂O) 反应中的表达量变化 (图 3b). 图 3b 结果显示, WRKY42

蛋白质在抗病、感病反应中的表达情况相似, 均在接种后期出现高分子质量条带 WRKY42^{*}, 但在 Mock 中未检测到该条带. 从条带大小判断, 高分子质量条带 WRKY42^{*} 有可能是 WRKY42 的二聚体形式. 比较 3 个时间点的 Mock 样品, 其 WRKY42 的表达量基本一致, 说明创伤对 WRKY42 蛋白质的表达没有明显影响.

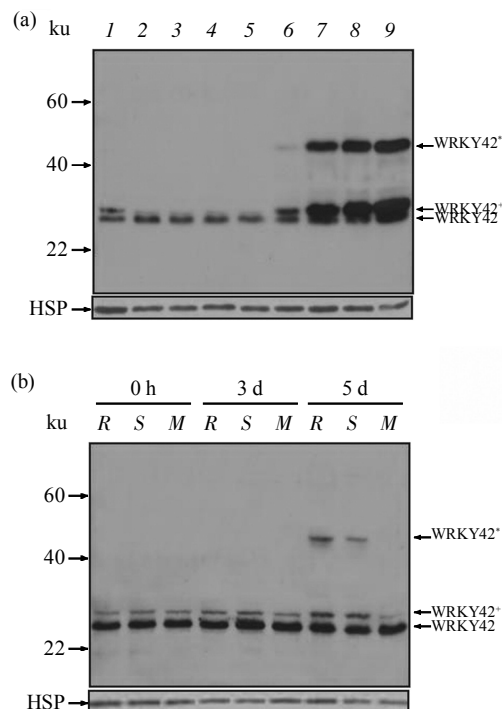


Fig. 3 WRKY42 protein abundance in the interactions between rice and *Xoo*

(a) WRKY42 protein abundance in the incompatible interactions between rice and *Xoo*. Rice leaf samples were collected at different time points after inoculation of *Xoo*. Lane 1~9: 0 h, 2 h, 8 h, 1 d, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d and 10 d, respectively. Total proteins were isolated and separated by SDS-PAGE, WB analysis were carried out using anti-WRKY42 antibody. (b) Comparison analysis of WRKY protein abundance among incompatible, compatible and mock treatments. Samples were collected at 0 h, 3d, and 5d time points post inoculation with *Xoo*; *R*: Incompatible interaction (4021-PXO99); *S*: Compatible interaction (4021-PXO99Δ*raxST*); *M*: Mock control (4021-H₂O). Total proteins were isolated and separated by SDS-PAGE, WB analysis were carried out using anti-WRKY42 antibody. The abundance of HSP protein was used as equal loading marker (Lower panel).

2.5 WRKY42 蛋白质的体表达及纯化

为了进一步调查 WRKY42 的生化特征, 我们克隆并表达了水稻 WRKY42 蛋白质. 以带有水稻 WRKY42 全长 cDNA 的质粒 DNA 为模板进行 PCR

扩增, 将 PCR 产物与 pET30a 载体分别双酶切, 连接后转化大肠杆菌, 用琼脂糖凝胶对 PCR 产物及酶切后重组质粒进行电泳检测(图 4a). 结果表明, 扩增产物的大小符合预期, 重组质粒经测序确认后, 转入大肠杆菌表达菌株, 经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 检测(图 4b). 如图所示, 与对照相比, IPTG 诱导后在上清和沉淀中均有明显的外源蛋白质表达, 分子质量与预期相符, 对上清进行纯化后获得单一条带的蛋白质. 因为表达载体 pET30a 所

表达蛋白质为带有 6×His 标签的融合蛋白, 又用抗 His 标签的抗体进行了 WB 检测(图 4c), 结果显示, 未经诱导的对照中没有信号, 而在上清、沉淀和纯化蛋白质样品中均出现特异信号, 说明获得了表达纯化的 WRKY42 蛋白质. 图 4d 是用 WRKY42 特异抗体检测重组表达蛋白质的结果, 由图可见, 虽然在纯化前样品中有低分子质量的非特异性条带, 但纯化后的 WRKY42 只有单一的条带, 有较高的纯度, 可用于后续实验.

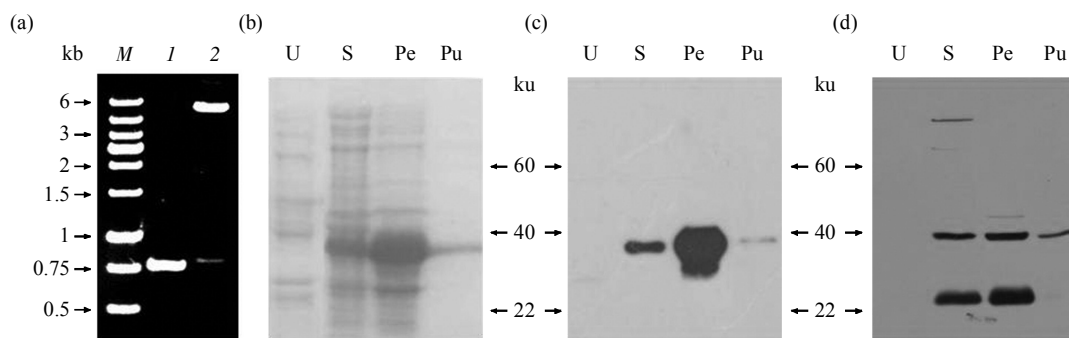


Fig. 4 WRKY42 gene cloning and protein expression

(a) PCR amplification and recombinant plasmid verification by restriction enzyme digestion. M: DNA Marker; I: Amplification product of WRKY42; 2: *EcoR* I and *Hind* III digested WRKY42 recombinant plasmid. (b) WRKY42 protein expression and purification detected by SDS-PAGE. (c) WB detection of expressed WRKY42 recombinant protein using anti-His antibody. (d) WB detection of expressed WRKY42 recombinant protein using anti-WRKY42 antibody. U: Un-induced *E. coli* total protein; S: Supernatant of sonicated *E. coli* protein after induced by IPTG; Pe: Pellet of sonicated *E. coli* protein after induced by IPTG; Pu: Purified WRKY42 recombinant protein.

2.6 WRKY42 蛋白质与病程相关基因启动子区 W-box 的结合特性分析

病程相关(PR)基因在植物抗病过程中发挥着重要的作用, 有许多报道表明, 水稻 *PR1a*、*PR1b* 等是抗病过程的标志基因, 其转录和蛋白质表达水平在 *Xa21* 介导的抗病过程中都有明显的上调. 经过对其上游启动子区的分析发现, *PR1a*、*PR1b* 基因上游都存在顺式调控元件 W-box, 为了检测 WRKY42 与 *PR1a*、*PR1b* 在功能上的关联性, 我们合成了 *PR1a* 和 *PR1b* 启动子区包含 W-box 的一段寡核苷酸, 以文献报道的 BS65 (带有 2 个 W-box) 为对照, 用 MST 技术检测了 WRKY42 蛋白质与 W-box 的结合, 结果见图 5. 图 5a 为 WRKY42 蛋白质与 BS65 的结合试验, 结果显示随野生型 BS65 的浓度增加, 其荧光信号的变化变小, 得到的 S 曲线符合希尔方程式, 说明 WRKY42

蛋白质可以结合 BS65, 依据曲线计算出 WRKY42 蛋白质与 BS65 间的解离常数为 $31.0 \mu\text{mol/L}$, 当把 W-box 的核心序列由 TGAC 突变为 CCTA 后 (mBS65), 其与 WRKY42 蛋白质不结合, 该数据支持了 WRKY42 与 BS65 的结合是 W-box 特异序列所依赖的. 随后, 检测了 WRKY42 与体外合成的 W-1a 和 W-1b 及其相应的突变体的结合(图 5b, c). 由图 5b 可见, WRKY42 蛋白质可以与 W-1a 结合, 解离常数为 $73.3 \mu\text{mol/L}$, 但不能与 W-1am 结合. 相似的情况也发生在 WRKY42 蛋白质与 W-1b 之间, 图 5c 显示了 WRKY42 蛋白质可与 W-1b 结合, 解离常数为 $58.3 \mu\text{mol/L}$, WRKY42 蛋白质也不能结合 W-1bm.

通过比较 WRKY42 与 BS65、W-1a 及 W-1b 的解离常数可以看出, WRKY42 与 BS65 的解离常数最低, 说明它们之间的结合力最大, 考虑到

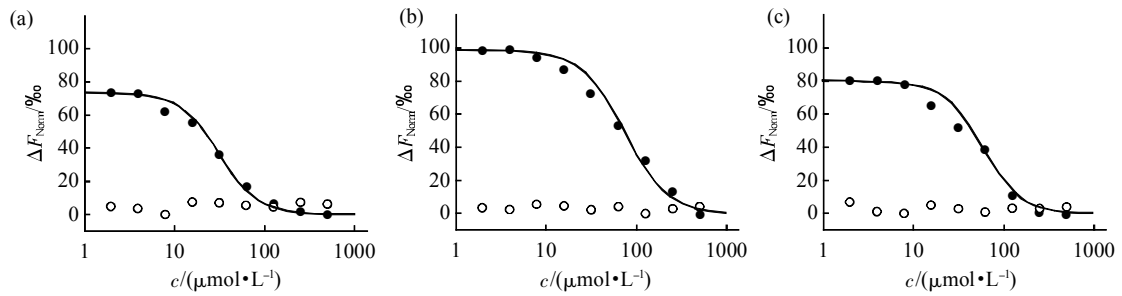


Fig. 5 The binding properties of WRKY42 with W-box containing oligonucleotides

(a) WRKY42 protein interact with BS65 and mBS65. ● : BS65; ○ : mBS65. (b) WRKY42 protein interact with W-1a and W-1am. ● : W-1a; ○ : W-1am. (c) WRKY42 protein interact with W-1b and W-1bm. ● : W-1b; ○ : W-1bm.

BS65 中有 2 个 W-box 序列，其较高的结合力是容易理解的，WRKY42 与 W-1a 的解离常数大于与 W-1b 的解离常数，说明 W-1a 的结合力稍小于 W-1b。基于上述数据我们推测，WRKY42 蛋白质可能通过与 *PR1a* 和 *PR1b* 基因上游调控区中的 W-box 特异结合，从而对 *PR1A* 和 *PR1B* 的转录翻译起调控作用。在 WRKY42 的调控区也存在着 W-box 序列，也许 WRKY42 本身具有自我调节功能或者受其他 WRKY 转录因子的调控。

2.7 WRKY 转录因子在水稻-Xoo 互作过程中的作用模式

通过对 *WRKY42* 的转录和表达特征的了解以及其与病程相关基因启动子区顺式元件的结合分析，本研究积累了 *WRKY42* 在水稻-Xoo 互作过程中发挥作用的线索。为了对 *WRKY42* 可能的作用模式有更全面的了解，我们提出了 WRKY 转录因子在水稻-Xoo 互作过程中作用模式(图 6)，由图 6 可见，通过对 *Xa21* 介导的抗病途径研究鉴定了多

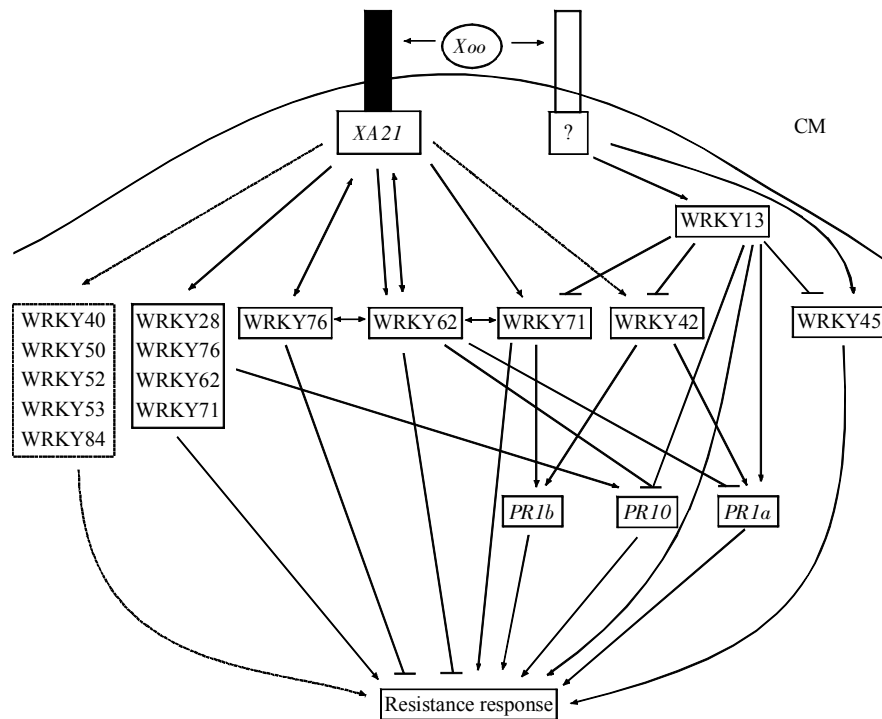


Fig. 6 A working model of WRKY transcription factors in the interactions between rice and Xoo

Data revealed by WB analysis are represented by dashed lines. Y2H interaction results are represented by double-headed arrow. Arrows indicate validated genetic interactions that positively regulate the pathway and blunted lines indicate validated genetic interactions that negatively regulate the pathway. Data revealed in the current research are highlighted by the red arrows.

个参与此过程的 *WRKY* 转录因子, 其中本实验室发现, *WRKY40*、*WRKY45*、*WRKY50*、*WRKY52*、*WRKY53*、*WRKY71* 和 *WRKY84* 蛋白质在抗病过程中表达上调^[26-27]。同时超表达 *WRKY28*、*WRKY62*、*WRKY71* 和 *WRKY76*^[40]以及单独超表达 *WRKY71*^[11]都会增强水稻对 *Xoo* 的抗性。但超表达 *WRKY62*^[10]或 *WRKY76*^[41]的水稻会降低对白叶枯病菌的抗性。*WRKY13* 和 *WRKY45* 则可能通过非 *Xa21* 的途径(如 *NH1*)在水稻-*Xoo* 互作过程中发挥作用。值得指出的是, 芯片数据表明, *WRKY13* 对 *WRKY42* 和 *WRKY45* 的表达有抑制作用^[42]。在多个 *WRKY* 转录因子相关的水稻-*Xoo* 互作过程中都有病程相关基因(如 *PR1a*、*PR1b* 和 *PR10* 等)的参与。由此图可以看出, 本研究获得的关于 *WRKY42* 的证据与已有报道是相符合的, *WRKY42* 可能是调控水稻白叶枯病抗性的转录因子集团中的一员。

3 讨 论

在水稻基因组中有近百个 *WRKY* 转录因子家族成员, 已经发现多个成员在水稻-*Xoo* 互作过程中可能发挥作用。本文对水稻 *WRKY42* 的转录和蛋白质表达特征进行了分析, 发现 *WRKY42* 的转录受逆境胁迫的诱导, 其蛋白质表达也在 *Xoo* 侵染后表达上调, 且出现分子质量较大的条带, 可能是 *WRKY42* 的修饰或二聚体形式, 体外结合实验还证明了 *WRKY42* 与病程相关基因启动子区的顺式元件 *W-box* 具有特异的结合, 由这些数据可以推测, *WRKY42* 很可能也在水稻-*Xoo* 互作过程中发挥作用, *WRKY42* 转录因子可能是调控水稻-*Xoo* 互作过程的转录因子集团中的一员。

遗传实验已经证明, 水稻的 *WRKY76*、*WRKY62*、*WRKY71*、*WRKY13* 及 *WRKY45* 等在水稻-*Xoo* 互作反应中分别发挥正调控或负调控因子的作用, 其往往通过病程相关基因得以发挥, 其中 *WRKY13* 对 *WRKY42* 和 *WRKY45* 都表现负调控作用。*WRKY40*、*WRKY50*、*WRKY52*、*WRKY53* 和 *WRKY84* 等蛋白质的表达在水稻-*Xoo* 互作过程中都会发生改变。这些现象提示我们 *WRKY* 转录因子的集合是在协同发挥作用。从 *WRKY42* 的表达特征来看, 其作用的发挥似乎与翻译后的修饰或二聚化有关, 当然, *WRKY42* 的功能还需要遗传实验的验证。

除在抗病过程中发挥作用外, *WRKY* 转录因子也参与水稻正常生长和发育过程。超表达 *WRKY31* 基因会抑制水稻侧根的形成和伸长^[43]; 超

表达 *WRKY78* 基因的水稻在表型上与野生型无明显变化, 但 *WRKY78* 的 *RNAi* 植株却表现为矮小、稻粒较小^[44]。超表达 *WRKY89* 会使水稻早期生长迟缓、茎节变短^[45]。*WRKY42* 的转录可在苗期地上部、花药等部位检测到, 其蛋白质表达也可在叶片中检测到。据此, 我们推测 *WRKY42* 在水稻正常生长发育过程中也扮演着一定的角色。

W-box 广泛存在于植物抗病相关基因的上游调控区, 如在欧芹 *PR1* 基因上游调控区的 *W1* 序列^[12]、烟草 class I 几丁质酶基因的启动区^[46]等。对 *WRKY52* 的研究发现, 其蛋白质可以与水稻中 *PR1a* 基因上游调控区包含 *W-box* 的序列 *P22* 特异结合, 在水稻抗稻瘟病中发挥作用^[47]。水稻 *WRKY71* 可以与 α 淀粉酶基因 *Amy32b* 启动区带有 *W-box* 的序列结合, 而 *WRKY51* 不能与之结合, 但是可以与 *WRKY71* 相互作用增强 *WRKY71* 对 *Amy32b* 启动区的结合^[48]; 另外, 有报道表明水稻 *WRKY77*^[49]和 *WRKY89*^[50]、大麦 *WRKY38*^[51]、拟南芥 *WRKY6*、*WRKY11*、*WRKY26*、*WRKY38* 和 *WRKY43*^[52]转录因子都具有与 *W-box* 结合的能力。这些结果让我们有理由推测 *W-box* 在 *WRKY* 转录因子发挥其生物学功能中起着重要且广泛的作用。

在本研究中我们采用微量热泳动(MST)技术研究 *WRKY42* 蛋白质与 *W-box* 之间的结合, 该技术最早报道于 2010 年^[25], 其可以在接近天然溶液的环境中工作、无需固定并具有较高的灵敏度。利用 MST 技术对蛋白质-核酸进行相互作用的研究, 发现果蝇的 *Df31* 蛋白质与 RNA 结合的解离常数为 24 $\mu\text{mol/L}$ ^[53]; 拟南芥的 *UAP56* 蛋白质与 ssRNA、dsRNA 及 dsDNA 结合的解离常数分别为 26.58、51.45 和 6.5 $\mu\text{mol/L}$ ^[39]。从解离常数来看, 这些蛋白质与核酸间的结合力与 *WRKY42* 和 *W-box* 间的结合力处于同一数量级范围。

水稻 *WRKY42* 与拟南芥的 *WRKY11* 转录因子具有较高的同源性^[54]。研究表明 *WRKY11* 转录因子作为负调控因子在拟南芥的抗病过程中发挥作用^[55]。EMSA 试验显示拟南芥的 *WRKY11* 转录因子可与 *W-box* 特异结合^[52]。我们对 *WRKY42* 转录因子的研究将为了了解 *WRKY* 转录因子家族的功能及 *Xa21* 介导的水稻抗白叶枯病的机理提供线索。

参 考 文 献

- [1] Ross C A, Liu Y, Shen Q J. The *WRKY* gene family in rice (*Oryza sativa*). *J Integr Plant Biol*, 2007, **49**(6): 827-842
- [2] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The *WRKY* superfamily

- of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**(5): 199–206
- [3] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, *et al.* WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2010, **15**(5): 247–258
- [4] Pandey S P, Somssich I E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol*, 2009, **150**(4): 1648–1655
- [5] Qiu D, Xiao J, Ding X, *et al.* OsWRKY13 mediates rice disease resistance by regulating defense-related genes in salicylate- and jasmonate-dependent signaling. *Mol Plant Microbe Interact*, 2007, **20**(5): 492–499
- [6] Abbruscato P, Nepusz T, Mizzi L, *et al.* OsWRKY22, a monocot WRKY gene, plays a role in the resistance response to blast. *Mol Plant Pathol*, 2012, **13**(8): 828–841
- [7] Delteil A, Blein M, Faiver-Rampant O, *et al.* Building a mutant resource for the study of disease resistance in rice reveals the pivotal role of several genes involved in defence. *Mol Plant Pathol*, 2012, **13**(1): 72–82
- [8] Shimono M, Sugano S, Nakayama A, *et al.* Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell*, 2007, **19**(6): 2064–2076
- [9] Shimono M, Koga H, Akagi A, *et al.* Rice WRKY45 plays important roles in fungal and bacterial disease resistance. *Mol Plant Pathol*, 2012, **13**(1): 83–94
- [10] Peng Y, Bartley L E, Chen X, *et al.* OsWRKY62 is a negative regulator of basal and Xa21-mediated defense against *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* in rice. *Mol Plant*, 2008, **1**(3): 446–458
- [11] Liu X, Bai X, Wang X, *et al.* OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J Plant Physiol*, 2007, **164**(8): 969–979
- [12] Rushton P J, Torres J T, Parniske M, *et al.* Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PRI* genes. *EMBO J*, 1996, **15** (20): 5690–5700
- [13] Rushton P J, Somssich I E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, **1**(4): 311–315
- [14] Maleck K, Levine A, Eulgem T, *et al.* The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, 2000, **26**(4): 403–410
- [15] Chujo T, Miyamoto K, Shimogawa T, *et al.* OsWRKY28, a PAMP-responsive transrepressor, negatively regulates innate immune responses in rice against rice blast fungus. *Plant Mol Biol*, 2013, **82**(1–2): 23–37
- [16] Chujo T, Takai R, Akimoto-Tomiya C, *et al.* Involvement of the elicitor-induced gene *OsWRKY53* in the expression of defense-related genes in rice. *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1769**(7–8): 497–505
- [17] Chujo T, Sugioka N, Masuda Y, *et al.* Promoter analysis of the elicitor-induced *WRKY* gene *OsWRKY53*, which is involved in defense responses in rice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, **73**(8): 1901–1904
- [18] Song W Y, Wang G L, Chen L L, *et al.* A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, 1995, **270**(5243): 1804–1806
- [19] Wang Y-S, Pi L-Y, Chen X, *et al.* Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *The Plant Cell Online*, 2006, **18**(12): 3635–3646
- [20] Park C J, Peng Y, Chen X, *et al.* Rice XB15, a protein phosphatase 2C, negatively regulates cell death and XA21-mediated innate immunity. *PLoS Biol*, 2008, **6**(9): e231
- [21] Chen X, Chern M, Canlas P E, *et al.* An ATPase promotes autophosphorylation of the pattern recognition receptor XA21 and inhibits XA21-mediated immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(17): 8029–8034
- [22] Jiang Y, Chen X, Ding X, *et al.* The XA21 binding protein XB25 is required for maintaining XA21-mediated disease resistance. *Plant J*, 2013, **73**(5): 814–823
- [23] Park C-J, Bart R, Chern M, *et al.* Overexpression of the endoplasmic reticulum chaperone BiP3 regulates XA21-mediated innate immunity in rice. *PLoS One*, 2010, **5**(2): e9262
- [24] Park C-J, Ronald P C. Cleavage and nuclear localization of the rice XA21 immune receptor. *Nat Commun*, 2012, **3**: 920
- [25] Wienken C J, Baaske P, Rothbauer U, *et al.* Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun*, 2010, **1**: 100
- [26] 徐文静, 缪刘杨, 李莉云, 等. 五个 WRKY 转录因子在水稻叶片生长和抗病反应中的表达研究. *生物化学与生物物理进展*, 2013, **40**(4): 356–364
Xu W J, Miao L Y, Li L Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2013, **40**(4): 356–364
- [27] 史佳楠, 徐文静, 李莉云, 等. 八个 WRKY 转录因子在水稻叶片生长和抗病过程中的表达研究. *植物病理学报*, 2014, **44**(1): 54–64
Shi J N, Xu W J, Li L Y, *et al.* *Acta Phytopathologica Sinica*, 2014, **44**(1): 54–64
- [28] Wu Q, Hou M, Li L, *et al.* Induction of pathogenesis-related proteins in rice bacterial blight resistant gene XA21-mediated interactions with *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. *J Plant Pathology*, 2011, **93**(2): 455–459
- [29] Hou M, Xu W, Bai H, *et al.* Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. *Plant Cell Rep*, 2012, **31**(5): 895–904
- [30] da Silva F G, Shen Y, Dardick C, *et al.* Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Mol Plant Microbe Interact*, 2004, **17**(6): 593–601
- [31] Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, *et al.* Plant MPSS databases: signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(suppl 1): D731–D735
- [32] Odorico M, Pellequer J L. BEPITOPE: predicting the location of continuous epitopes and patterns in proteins. *J Mol Recognit*, 2003, **16**(1): 20–22
- [33] Li X, Bai H, Wang X, *et al.* Identification and validation of rice reference proteins for western blotting. *J Exp Bot*, 2011, **62**(14): 4763–4772

- [34] Cao Y H, Sun J, Zhu J H, *et al.* PrimerCE: designing primers for cloning and gene expression. *Mol Biotechnol*, 2010, **46** (2): 113-117
- [35] Rombauts S, Déhais P, Van Montagu M, *et al.* PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**(1): 295-296
- [36] Lescot M, Déhais P, Thijs G, *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30** (1): 325-327
- [37] Hara K, Yagi M, Kusano T, *et al.* Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Molecular and General Genetics MGG*, 2000, **263** (1): 30-37
- [38] Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, *et al.* Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold-and drought-response in barley. *Plant Mol Biol*, 2004, **55**(3): 399-416
- [39] Kammel C, Thomaier M, Sørensen B B, *et al.* Arabidopsis DEAD-box RNA helicase UAP56 interacts with both RNA and DNA as well as with mRNA export factors. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e60644
- [40] Peng Y, Bartley L E, Canlas P, *et al.* OsWRKY Ila transcription factors modulate rice innate immunity. *Rice (N Y)*, 2010, **3**(1): 36-42
- [41] Seo Y S, Chern M, Bartley L E, *et al.* Towards establishment of a rice stress response interactome. *PLoS Genet*, 2011, **7**(4): e1002020
- [42] Qiu D, Xiao J, Xie W, *et al.* Exploring transcriptional signalling mediated by OsWRKY13, a potential regulator of multiple physiological processes in rice. *BMC Plant Biol*, 2009, **9**: 74
- [43] Zhang J, Peng Y, Guo Z. Constitutive expression of pathogen-inducible OsWRKY31 enhances disease resistance and affects root growth and auxin response in transgenic rice plants. *Cell Res*, 2008, **18**(4): 508-521
- [44] Zhang C Q, Xu Y, Lu Y, *et al.* The WRKY transcription factor OsWRKY78 regulates stem elongation and seed development in rice. *Planta*, 2011, **234**(3): 541-554
- [45] Wang H, Hao J, Chen X, *et al.* Overexpression of rice WRKY89 enhances ultraviolet B tolerance and disease resistance in rice plants. *Plant Mol Biol*, 2007, **65**(6): 799-815
- [46] Yang P, Chen C, Wang Z, *et al.* A pathogen-and salicylic acid - induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *The Plant Journal*, 1999, **18**(2): 141-149
- [47] 王海华, 谢科, 吴坤陆, 等. 稻瘟菌诱导的水稻 *WRKY* 基因 *OsWRKY52* 的分离和鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(10): 937-946
- Wang H H, Xie K, Wu K L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(10): 937-946
- [48] Xie Z, Zhang Z L, Zou X, *et al.* Interactions of two abscisic-acid induced *WRKY* genes in repressing gibberellin signaling in aleurone cells. *Plant J*, 2006, **46**(2): 231-242
- [49] Lan A, Huang J, Zhao W, *et al.* A salicylic acid-induced rice (*Oryza sativa* L.) transcription factor OsWRKY77 is involved in disease resistance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)*, 2013, **15**(3): 452-461
- [50] Haihua W, Zhongna H, Ke X, *et al.* Leucine zipper like structure in rice WRKY89 enhances its affinity for binding with W box elements. *Chin Sci Bull*, 2005, **50**(10): 980-989
- [51] Mare C, Mazzucotelli E, Crosatti C, *et al.* Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Mol Biol*, 2004, **55**(3): 399-416
- [52] Ciolkowski I, Wanke D, Birkenbihl R P, *et al.* Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol Biol*, 2008, **68**(1-2): 81-92
- [53] Schubert T, Pusch M C, Diermeier S, *et al.* Df31 protein and snoRNAs maintain accessible higher-order structures of chromatin. *Mol Cell*, 2012, **48**(3): 434-444
- [54] Berri S, Abbruscato P, Faivre-Rampant O, *et al.* Characterization of WRKY co-regulatory networks in rice and *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 2009, **9**: 120
- [55] Journot-Catalino N, Somssich I E, Roby D, *et al.* The transcription factors WRKY11 and WRKY17 act as negative regulators of basal resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, 2006, **18**(11): 3289-3302

Characterization of Transcription, Expression and Binding Properties With W-box of Rice Transcription Factor *WRKY42* Gene*

MIAO Liu-Yang^{1)**}, ZHOU Liang^{2)**}, YANG Shuo¹⁾, LI Li-Yun^{1)***}, LI Xue-Jiao¹⁾, FAN Wei¹⁾,
LAN Jin-Ping¹⁾, SHI Jia-Nan¹⁾, LIU Li-Juan¹⁾, LIU Guo-Zhen^{1)***}

¹⁾ College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; ²⁾ Quantum Design China (Beijing), Beijing 100027, China)

Abstract WRKY is one of the largest families of transcription factors in plants. In this paper, transcriptional analysis revealed that the transcription of rice *WRKY42* gene was occurred at seedling stage and anther, while the expression of WRKY42 protein was detected in the leaf blade at all growth stages. In the process of *Xa21*-mediated resistance to bacterial blight, the induction of WRKY42 protein was apparent in the late stage after inoculation; further comparison among incompatible (*R*), compatible (*S*) and mock control (*M*) reactions revealed similar expression pattern between *R* and *S* interactions, and the abundance of WRKY42 in both *R* and *S* interactions was significantly greater than that in mock control reaction. This evidence suggested that WRKY42 protein may play a role in the interactions between rice and *Xoo*. Next, the WRKY42 protein was expressed in *E. coli*. The purified WRKY42 protein was used to investigate its binding capacity with *cis*-elements in the promoter region of downstream genes using microscale thermophoresis (MST) technique. It was found that the WRKY42 protein binds to W-box-containing oligonucleotide derived from the promoter region of *PR1a* and *PR1b* specifically, and their dissociation constant (K_d) were 73.3 $\mu\text{mol/L}$ and 58.3 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Taken together, the data provide direct evidences for the function of *WRKY42* to regulate downstream pathogenesis-related genes, and further support that *WRKY42* play a role in the process of rice resistance to *Xoo*. In the last, a working model of WRKY transcription factors in rice-*Xoo* interactions was proposed.

Key words rice, WRKY transcription factor, bacterial blight, Western blotting, microscale thermophoresis, W-box

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00510

*This work was supported by a grant from Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20131302110006).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author. Tel: 86-312-7528787

LI Li-Yun. E-mail: liliyun@hebau.edu.cn

LIU Guo-Zhen. E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

Received: December 18, 2013 Accepted: February 21, 2014