

王影,李慧,蔺经,等. 杜梨响应盐胁迫 *CIPK01* 的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(21):115-119.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.21.026

杜梨响应盐胁迫 *CIPK01* 的克隆及表达分析

王影^{1,2}, 李慧¹, 蔺经¹, 杨青松¹, 常有宏¹

(1. 江苏省农业科学院果树研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏南京 210014;

2. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

摘要: CBL 互作蛋白激酶 (CIPK, CBL-interacting protein kinases) 是与钙调磷酸酶 B 类蛋白 (CBL, calcineurin B-like protein) 特异结合的蛋白激酶, 广泛参与植物的生长发育以及生物和非生物胁迫响应。克隆和鉴定杜梨响应盐胁迫的 *CIPK* 基因, 对杜梨抗逆分子机制和抗逆性研究具有重要意义。选取了一个特殊的基因 *PbCIPK01* 做进一步的研究, 通过生物信息学和实时荧光定量 PCR 技术分析该基因的序列特征以及在盐胁迫下的表达模式。该基因全长为 1 368 bp, 含有 1 365 bp 的开放阅读框, 编码 455 个氨基酸, DNA 序列为 5 051 bp, 包含 12 个外显子和 11 个内含子。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, 该基因在杜梨的叶片中表达量最高, 且受盐胁迫诱导下调表达。

关键词: 杜梨; 盐胁迫; *CIPK* 基因; 序列分析; 基因表达; 抗逆基因; 抗逆机制

中图分类号: S661.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)21-0115-05

Ca^{2+} 是植物中普遍存在的第二信使, 与 Ca^{2+} 传感器结合进行信号传递, 在植物抗低温、抗旱、抗盐等胁迫中发挥重要作用。钙调磷酸酶 B 类蛋白 (CBLs, calcineurin B-like proteins) 作为植物体内特异的 Ca^{2+} 传感器必须与下游的靶蛋白 CBL 互作蛋白激酶 (CIPK, CBL-interacting protein kinases) 相互结合才能共同发挥作用^[1]。CIPK 是植物特有的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 该蛋白在植物响应逆境胁迫中发挥重要作用, 尤其与非生物胁迫 (高盐、ABA、干旱等) 的信号传导密切相关^[2]。在模式植物拟南芥中, 所有的 CIPK 蛋白含有 C-端的调节域和 N-端的激酶蛋白域, CIPK 蛋白 C-端的调节区有 2 个明显功能域, 是 NAF 结构域和 PPI 结构域, NAF 结构域能与 CBL 特异结合^[3], PPI 结构域^[4] 是 CIPK 与蛋白磷酸酶的作用位点, 这 2 个结构域的特性使得 CIPK 成为一个连接 CBL 传导信号途径的重要分子开关, 使其能更好地发挥信号调控作用^[5]。

截至目前, 已有越来越多的 *CIPK* 基因被克隆, 在模式植物拟南芥中发现有 25 个^[6], 玉米中有 43 个^[7], 葡萄^[8] 和油菜^[9] 中分别有 23 个。关于 *CIPK* 基因的研究目前主要集中在拟南芥^[6]、玉米^[7]、水稻^[10] 和甘蔗^[11] 上, 水稻 *OsCIPKs* 基因受不同程度的生物胁迫和非生物胁迫诱导表达; 甘蔗 *ScCIPKs* 基因在应对非生物胁迫逆境中协同发挥作用, 同时在生物胁迫 (接种花叶病毒) 下表现出差异表达水平。由此推测, 杜梨 *CIPK* 基因可能也受非生物胁迫的诱导表达。

杜梨作为中国梨树栽培中普遍应用的一种砧木, 具备耐

涝、抗寒、耐盐碱、抗旱等综合抗性, 是梨属植物中重要的抗性种质资源^[12]。本研究首先采用同源克隆技术从杜梨中克隆 *CIPK* 基因, 然后利用实时定量 PCR 技术分析该基因在盐胁迫下不同组织和不同时间 (0、12、24、48、72 h) 的表达模式, 以期对杜梨抗逆基因的发掘和抗逆机制的解析提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与胁迫处理

单株来源的杜梨组培苗保存于江苏省农业科学院果树研究所仁果研究室。经分生根培养 30 d 后, 选择生长一致的植株, 移栽到温室营养土穴盘中继续培养, 待幼苗长至 10 cm 左右, 选取生长良好、发育一致的杜梨苗流水冲洗干净, 用纸浸干, 然后分别置于去离子水和 NaCl 溶液中处理, 于 0、12、24、48、72 h 分别取根、茎和叶片, 用液氮速冻后保存于 -80 ℃ 冰箱中备用。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采用 RNA Simple Total RNA Kit [天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取杜梨总 RNA, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性, 采用 PrimeScript RT-PCR Kit 试剂盒 (TaKaRa) 合成第一链 cDNA。

1.3 杜梨 *CIPK* 基因的 cDNA 和基因组 DNA 全长序列的克隆

以中国白梨 (*Pyrus × bretschneideri*) 基因组数据库中的 CBL-interacting serine/threonine-protein kinases 5 这个基因 (XM_018648989.1) 作为电子探针, 搜索杜梨盐胁迫转录组数据库^[13], 获得候选基因, 设计特异引物 (P_1 : 5'-ATGGTGATC GTGAGAAAAG-3', P_2 : 5'-ACTAGTCAGCAACTCTTGG-3'), 以未处理和经过 NaCl 处理的杜梨叶片的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: cDNA 1.0 μL , 引物各 1.0 μL , 10 \times PCR Buffer 2.0 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 3.2 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 2.0 μL , LA *Taq* (5 U/ μL) 0.2 μL , ddH_2O 9.6 μL 。反应条件为: 95 ℃ 4 min; 95 ℃ 30 s, 58 ℃ 30 s,

收稿日期: 2018-08-03

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31372051, 31772287); 江苏省自然科学基金 (编号: BK20151361)。

作者简介: 王影 (1993—), 女, 安徽宿州人, 硕士研究生, 主要从事果树种质资源与分子育种研究。E-mail: 1759068060@qq.com。

通信作者: 常有宏, 研究员, 博士生导师, 主要从事果树种质资源和栽培技术等研究。E-mail: cyh@jaas.ac.cn。

72 ℃ 2 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收;同时,提取杜梨植株总 DNA (TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit,TaKaRa) 和设计引物(P_1 :5'-AAATACAAGACTCTCCAATTA-3', P_2 :5'-TTTCTTGCATTCTGAATCATA-3'),以杜梨总 DNA 为模板扩增该基因的基因组序列。分别连接 pMD18-T 载体并转化大肠杆菌 DH5 α ,提取质粒经菌液 PCR 鉴定后测序。引物合成和测序都委托上海皓嘉生物技术有限公司完成。

1.4 杜梨 *CIPK01* 基因序列分析

利用 DNAMAN 软件对 *PbCIPK01* 基因进行氨基酸的多序列比对;用 MEGA5 软件构建蛋白分子进化树;在线基因结构分析系统 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 分析 *PbCIPK01* 内含子和外显子的组成;利用 SMART 进行保守结构域分析。

1.5 杜梨 *CIPK01* 基因表达分析

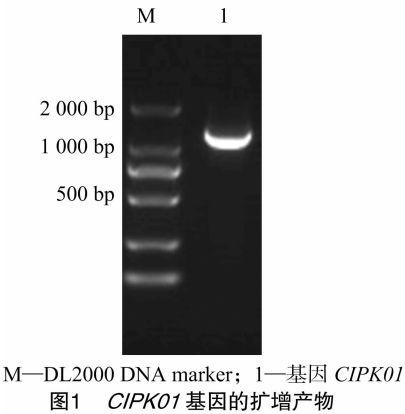
以第一链 cDNA 为模板,*PbCIPK01* 基因的定量特殊扩增上游引物 P_1 为:5'-CCTGATGAAGAAGAAG-3',扩增下游引物 P_2 为:5'-TTGATATGCGTGTATGGAT-3'。按照 SYBR Primix Ex *Taq* Kit 试剂盒的有关说明进行操作,qRT-PCR 的反应体系为 20 μ L,反应条件如下:95 ℃ 2 min;95 ℃ 20 s、60 ℃ 30 s、40 个循环。每个样品有 3 个重复,该试验的内参基因为 *actin* 基因,*actin* 基因的表达量在不同组织中的变化量较小,表达量高且适合 NaCl 处理下用作内参基因^[14]。采用 ABI7900HT 实时定量 PCR 仪和 Excel 2010 软件进行相对定量分析。

2 结果与分析

2.1 *CIPK01* 基因的克隆

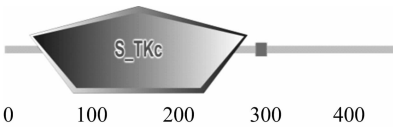
提取经 NaCl 处理 24 h 后的杜梨幼苗的 RNA,经反转录

得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增(图 1),同时以其 DNA 为模板扩增该基因的编码区。经克隆测序发现该基因的 cDNA、DNA 序列长度分别为 1 368、5 051 bp,推测其编码 455 个氨基酸,理论等电点为 5.96,相对分子质量约为 50 908,测序后将该序列命名为杜梨 *CIPK01*。



2.2 *CIPK01* 基因的序列分析

通过 SMART 对 *PbCIPK01* 氨基酸序列的基序 (motif) 进行分析,得出 *PbCIPK01* 的基序模式构型(图 2),离子富集区在 294~305 位氨基酸之间,S_TKc 结构域在 29~284 位氨基酸残基之间。基因组 DNA 序列全长 5 051 bp(图 3),包括 12 个外显子(1~219、418~481、2 977~3 049、3 177~3 285、3 398~3 479、3 571~3 751、3 853~4 066、4 110~4 224、4 345~4 428、4 570~4 633、4 786~4 861、4 988~5 051)和 11 个内含子(220~417、482~2 976、3 050~3 176、3 286~3 397、3 480~3 570、3 752~3 852、4 067~4 109、4 225~4 344、4 429~4 569、4 634~4 785、4 862~4 987)。



结构名称	开始位置(位)	结束位置(位)	E值
S_TKc	29	284	8.64×10 ⁻¹⁰¹
离子富集区	294	305	N/A

图2 *CIPK01* 基因基序结构模式

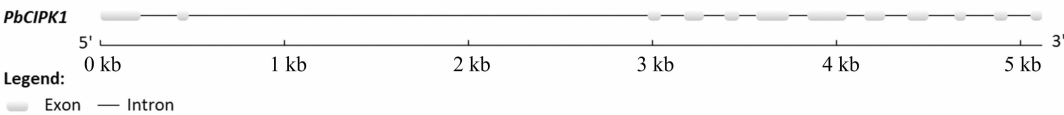


图3 *CIPK01* 基因结构

2.3 *CIPK* 基因的多序列比对以及 *PbCIPK01* 系统进化分析

利用 DNAMAN 软件进行多重序列比对,结果表明,*PbCIPK01* 与玉米 *CIPK01* (ZEAMMB73_Zm00001d006944)、水稻 *CIPK08* (OSNPB_010536000)、卷柏 *CIPK05* (SELMODRAF_T267186) 蛋白间具有较高的一致性(图 4)。用 MEGA5 软件构建蛋白分子进化树(图 5),结果显示本研究克隆到的 *PbCIPK01* 与禾本科作物在同一支,与玉米的 *ZmCIPK01* 遗传距离最近。

2.4 *PbCIPK01* 在 NaCl 处理下的表达分析

分别将长势一致、健壮的杜梨苗进行盐胁迫处理,通过实

时荧光定量 PCR 方法检测其在不同器官组织中处理 12、24、48、72 h 时基因表达变化情况,结果显示,盐胁迫下该基因在不同器官组织中的表达均会发生改变,且在不同器官组织中基因表达变化存在差异(图 6)。在叶片中,该基因在处理 12 h 后出现上调,24 h 相对表达量达到峰值且是对照的 0.2 倍,而且每个时间点的相对表达量都低于对照;在根中,该基因在 12 h 出现上调,在 24、48 h 相对表达量下降,在 24 h 的相对表达量达到峰值且是对照的 9.4 倍;在茎中,该基因在 12、48 h 相对表达量上调,在 24 h 相对表达量下降且相对表达量达到最高,在 24 h 的相对表达量是对照的 2.1 倍。

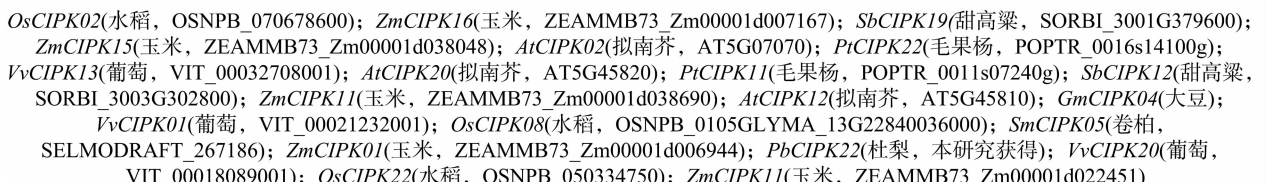


图4 *PbCIPK01* 推测的氨基酸序列与其他植物 CIPKs 蛋白比对

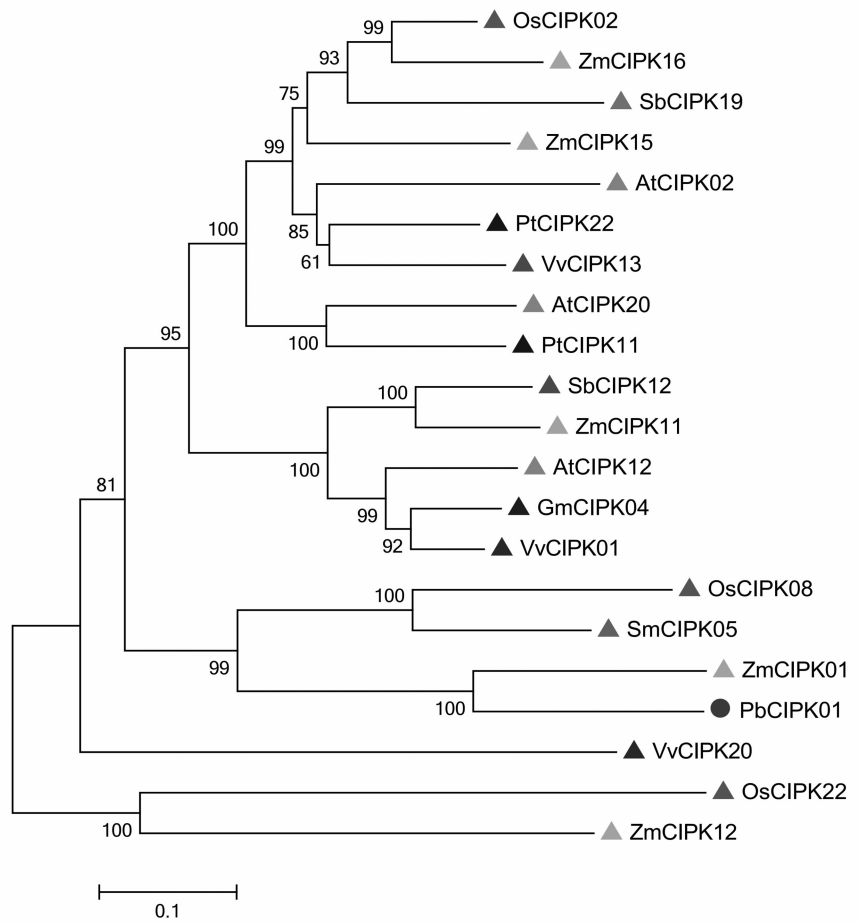
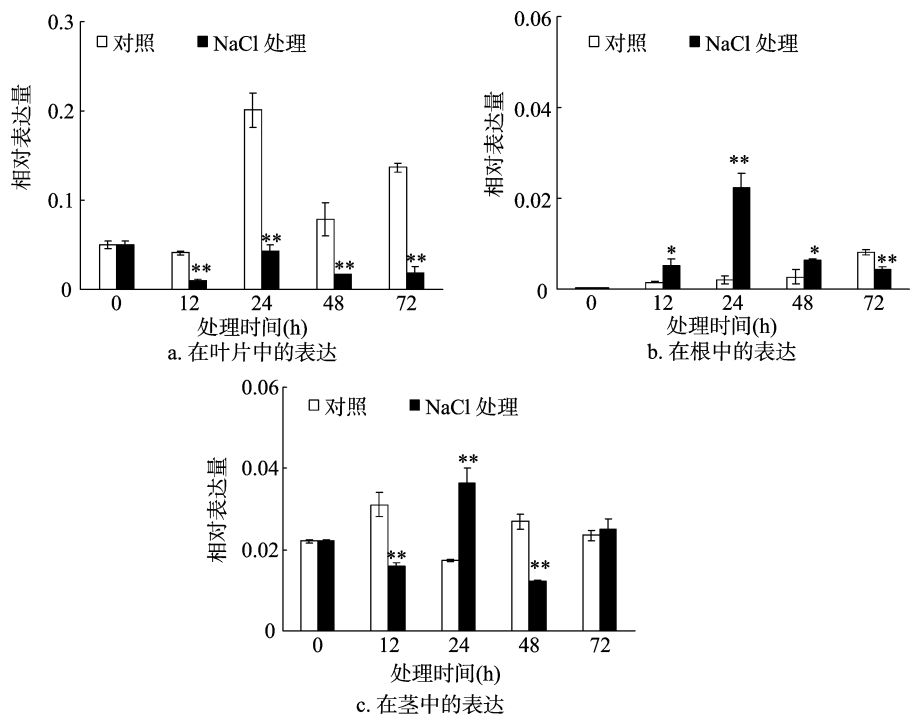


图5 部分植物来源的 CIPKs 蛋白分子进化树



*表示差异显著 ($P < 0.05$) ; **表示差异极显著 ($P < 0.01$)

图6 盐胁迫处理下 CIPK01 基因的表达模式

3 讨论与结论

大多数信号传导过程都伴随着植物细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化, Ca^{2+} 作为细胞中极其重要的第二信使, 在生物与非生物胁迫中均发挥重要作用^[15-16]。当植物受到盐胁迫时, 植物细胞内 Ca^{2+} 浓度发生变化^[17-19]。原始信号经过一系列的信号转导系统最终使植物对外界刺激作出应答^[20]。其中, CIPK 是 CBL/CIPK 系统中必不可少的重要成分。

本研究通过生物信息学方法得到一个杜梨 CIPK 基因, 该基因存在内含子, 编码 455 个氨基酸。在 NCBI 数据库中进行序列比对发现, 该基因与植物中的 CIPK 基因有较高的同源性, 同时含有结构域 S₂TKc-基序, 证明 *PbCIPK01* 基因是杜梨 CIPK 家族的一个成员。通过盐胁迫下 *PbCIPK01* 基因在杜梨根、茎、叶片中的表达分析发现, *PbCIPK01* 基因在杜梨根、茎、叶片中均有表达, 其中在叶中的表达量最高, 在根中的表达量最低, 推测 *PbCIPK01* 参与了杜梨叶片生长发育或对外部环境的响应过程。

目前已在多种植物中报道 CIPK 基因能响应盐胁迫。已有研究发现, 过表达拟南芥 *AtCIPK16*^[21]、小麦 *TaCIPK29*^[22]、盐生大麦 *HbCIPK2*^[23]、油菜^[24]和苹果^[25]的 CIPK6 均能明显提高转基因植株的耐盐性。本研究从杜梨中克隆到 1 个 *PbCIPK01* 基因, 通过盐胁迫下 *PbCIPK01* 基因在杜梨根、茎、叶片中的表达结果说明 *PbCIPK01* 参与杜梨盐胁迫响应过程。

参考文献:

- [1] 凌秋平, 曾巧英, 胡斐, 等. 甘蔗 *CIPK23* 基因克隆及对低钾、干旱、盐胁迫的响应[J]. 分子植物育种, 2015, 13(6): 1329-1335.
- [2] 黄珑, 苏炜华, 张玉叶, 等. 甘蔗 CIPK 基因的同源克隆与表达[J]. 作物学报, 2015, 41(3): 499-506.
- [3] Albrecht V, Ritz O, Linder S, et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module in Ca^{2+} -regulated kinases[J]. EMBO Journal, 2001, 20: 1051-1063.
- [4] Lee S C, Lan W Z, Kim B G, et al. A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 15959-15964.
- [5] Sanchez-Barrena M J, Fujii H, Angulo I A, et al. The structure of the C-terminal domain of the protein kinase AtSOS2 bound to the calcium sensor AtSOS3[J]. Molecular Cell, 2007, 26(3): 427-435.
- [6] Yu Y H, Xia X L, Yin W L, et al. Comparative genomic analysis of CIPK gene family in *Arabidopsis* and *Populus*[J]. Plant Growth Regulation, 2007, 52(2): 101-110.
- [7] Zhao J, Sun Z, Zheng J, et al. Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize[J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(6): 661-674.
- [8] Diane M M, Sebastien A, Marina B S, et al. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLe DNA

- cloning and enzyme assays[J]. BMC Plant Biology, 2010, 10: 226.
- [9] 张翰风. 油菜与拟南芥中钙相关蛋白激酶基因调控非生物逆境响应的机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014: 56-89.
- [10] 陈析丰, 顾志敏, 刘峰, 等. 生物与非生物胁迫下水稻 CIPK 基因的鉴定分析[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(6): 567-574.
- [11] 黄珑. 甘蔗 *ScCBLs* 和 *ScCIPKs* 基因家族的克隆与鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2016: 53-65.
- [12] 李慧, 丛郁, 常有宏, 等. 杜梨 *CPI* 基因的克隆、序列分析及表达[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(5): 1070-1077.
- [13] Li H, Lin J, Yang Q S, et al. Comprehensive analysis of differentially expressed genes under salt stress in pear (*Pyrus betulaefolia*) using RNA-Seq[J]. Plant Growth Regulation, 2017, 82(3): 409-420.
- [14] Xu Y Y, Li H, Li X G, et al. Systematic selection and validation of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time PCR in pear[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2015, 37(2): 40-48.
- [15] Chung E, Park J M, Oh S K, et al. Molecular and biochemical characterization of the capsicum annum calcium-dependent protein kinase 3 (*Ca CDPK3*) gene induced by abiotic and biotic stresses[J]. Planta, 2014, 220(2): 286-295.
- [16] 沈金秋, 郑仲仲, 潘伟槐, 等. 植物 CBL-CIPK 信号系统的功能及其作用机理[J]. 植物生理学报, 2014, 50(5): 641-650.
- [17] Mahajan S, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview[J]. Arch, Biochem, Biophys, 2005, 444: 139-158.
- [18] 李红, 李波, 杨翌. 盐胁迫下外源钙对苜蓿幼苗叶片离子含量的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(4): 131-133.
- [19] 董静, 邢锦城, 王茂文, 等. 3 种外源物质浸种对 NaCl 胁迫下马齿苋种子萌发的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14): 103-106.
- [20] Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, et al. Calmodulin-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants[J]. Plant Cell, 2002, 14(Suppl): 389-400.
- [21] Roy S J, Huang W, Wang X J, et al. A novel protein kinase involved in Na⁺ exclusion revealed from positional cloning[J]. Plant Cell and Environment, 2013, 36(3): 553-568.
- [22] Deng X M, Hu W, Wei S Y, et al. *TaCIPK29*, a CBL-interacting protein kinase gene from wheat, confers salt stress tolerance in transgenic tobacco[J]. PLoS One, 2013, 8(7): 69-81.
- [23] Li R F, Zhang J W, Wu G Y, et al. *HbCIPK2*, a novel CBL-interacting protein kinase from halophyte *Hordeum brevisubulatum*, confers salt and osmotic stress tolerance[J]. Plant Cell and Environment, 2012, 35(9): 1582-1600.
- [24] Tripathi V, Parasuraman B, Laxmi A, et al. CIPK6, a CBL-interacting protein kinase is required for development and salt tolerance in plants[J]. Plant Journal, 2009, 58(5): 778-790.
- [25] Wang R K, Li L L, Cao Z H, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel apple *MdCIPK6L* gene reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants[J]. Plant Molecular Biology, 2012, 79(1/2): 123-135.