

大花杓兰钙依赖蛋白激酶基因克隆及植物表达载体构建

付亚娟^{1,2}, 侯荟玲¹, 乔洁^{1,2}, 耿晓进¹, 王聪艳¹, 侯晓强^{1,2}

(¹廊坊师范学院生命科学学院, 河北 廊坊 065000; ²河北省食药食用菌资源高值利用技术创新中心, 廊坊 065000)

摘要: RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆到 1 个全长 2079 bp 的大花杓兰钙依赖蛋白激酶基因 *CmCDPK*, cDNA 为 1491 bp, 编码 496 个氨基酸。*CmCDPK* 是 1 个具有 CDPKs 典型的 Ser/Thr 蛋白激酶保守结构域、含 1 个跨膜结构域、无信号肽、稳定的亲水性蛋白。*CmCDPK* 二级结构主要由 α -螺旋和无规卷曲构成。相对于其他植物 CDPKs, *CmCDPK* 与小兰屿蝴蝶兰和铁皮石斛的亲缘关系更近。通过 DNA 重组技术将 *CmCDPK* 片段克隆到 pBI121 质粒上。PCR、酶切及 DNA 测序的结果表明, 重组质粒 pBI-*CmCDPK* 包含 1 个 1491 bp 的 *CmCDPK* 片段, 且核苷酸序列及插入方向完全正确。本研究首次克隆了大花杓兰 *CmCDPK* 基因, 并成功构建了植物过表达载体 pBI-*CmCDPK*, 为 *CmCDPK* 基因在烟草中实现遗传转化和功能研究奠定基础。

关键词: 大花杓兰; 钙依赖蛋白激酶; RT-PCR; RACE; 植物表达载体

Cloning and Expressing Vector Construction of Calcium-Dependent Protein Kinase Gene in *Cypripedium macranthum*

FU Ya-juan^{1,2}, HOU Hui-ling¹, QIAO Jie^{1,2}, GENG Xiao-jin¹,
WANG Cong-yan¹, HOU Xiao-qiang^{1,2}

(¹College of Life Science, Langfang Normal University, Langfang Hebei 065000; ²Technical Innovation Center for Utilization of Edible and Medicinal Fungi Resources in Hebei Province, Langfang 065000)

Abstract: A calcium-dependent protein kinase gene (*CDPK*) was isolated from the *Cypripedium macranthum* Sw. roots using reverse transcription-PCR (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. The full-length fragment of *CmCDPK* gene was 2079 bp, with a complete open reading frame of 1491 bp, which encodes for 496 amino acids. *CmCDPK* was predicted to be a stable hydrophilic protein, possessing a typical and conserved serine/threonine protein kinase domain and a transmembrane structure domain. Secondary structure of *CmCDPK* is abundant in α -helices and random coils. By phylogenetic tree analysis, *CmCDPK* were clustered with CDPKs from Orchidaceae, such as *Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb.f. and *Dendrobium catenatum* Lindl. The fragment of interest was subsequently cloned into the pBI121 vector, which was verified by colony PCR, restriction enzyme digestion and Sanger sequencing. Taken together, this work isolated a *CDPK* gene from *C. macranthum* Sw. and generated the plant binary expression vector, which might provide the possibility for making transformation in tobacco and further illustrating the biological function of *CmCDPK*.

Key words: *Cypripedium macranthum*; calcium-dependent protein kinase; RT-PCR; RACE; plant expression vector

收稿日期: 2019-03-29 修回日期: 2019-04-27 网络出版日期: 2019-05-14

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190329002>

第一作者研究方向为分子生物学, E-mail: fuyajuan@lfnu.edu.cn

通信作者: 侯晓强, 研究方向为菌根生理生态学研究, E-mail: houxiaoliang@lfnu.edu.cn

基金项目: 河北省教育厅青年拔尖人才项目 (BJ2016045); 国家自然科学基金 (31100314); 廊坊师范学院博士基金项目 (LSLB201405); 河北省高等学校遗传学重点发展学科项目 (201221)

Foundation project: Talented Youth Project of Hebei Education Department (BJ2016045), National Science Foundation of China (31100314), Doctoral Foundation of Langfang Normal University (LSLB201405), Key Development Project of Genetics in Hebei Province (201221)

钙依赖蛋白激酶(CDPK, calcium-dependent protein kinase)是一类具有典型 Ser/Thr 蛋白激酶活性的多功能蛋白质,在植物、细菌和原生动物中普遍存在^[1]。CDPKs 作为第二信使 Ca²⁺ 的受体蛋白之一,在调控植物生长发育^[2-3]和响应逆境胁迫^[4-7]等生理活动中发挥重要作用。在众多植物 CDPKs 的研究中,兰科植物 CDPKs 的生物学功能却鲜有报道。Tsai 等^[8]研究发现,低温、机械损伤和病原菌侵染均能激活蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis* Linn.)钙依赖蛋白激酶 *PaCDPK1* 的表达。小菇真菌感染铁皮石斛 30 d 后, qPCR 分析发现根中 *DoCDPK1* 显著上调^[9]。盛况等^[10]从铁皮石斛中分离出 3 个钙依赖蛋白激酶基因(*DoCDPK1*、*DoCDPK2*、*DoCDPK6*),并证实这 3 个基因在低温和高盐胁迫条件下,其表达量均呈现不同程度的上调。上述研究结果表明,CDPKs 基因可能参与兰科植物菌根共生、生物和非生物胁迫响应等生理活动。

大花杓兰(*Cypripedium macranthum* Sw.)为兰科杓兰属,珍稀名贵的多年生草本植物。大花杓兰在北京百花山、承德云雾山、吉林长白山、河北小五台山及陕西铜川等地均有分布。大花杓兰种子非常微小且缺乏提供营养的胚乳,干膜质的内种皮结构紧贴于胚,使其在自然情况下很难萌发^[11],再加上生态环境破坏、人为过度采挖,大花杓兰目前已濒危。鉴于大花杓兰兼具较好的观赏价值和药用价值,国内外学者就大花杓兰种子的非共生萌发、共生萌发和快速繁殖技术等方面进行探索研究,取得了一定的进展,但仍处于少量微繁殖阶段^[12-15]。本课题组前期研究中发现,大花杓兰组培苗生长极其缓慢、褐化率高、抗逆性差。大花杓兰作为高山兰科植物,其温室幼苗在室外如何越冬?野外驯化如何适应低温和更大的昼夜温差?这对大花杓兰的保育至关重要。基于前人的研究结果,CDPK 基因参与兰科植物逆境胁迫的响应^[8,10],推测大花杓兰 CDPK 可能有相似的生物学功能。因此,本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆了大花杓兰 *CmCDPK*,并构建了植物过表达载体 pBI-*CmCDPK*,不仅为下一步阐明 *CmCDPK* 基因的生物学功能奠定基础,同时也为将来提高大花杓兰抗逆性进行遗传改良提供潜在的基因资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生大花杓兰须根采自北京百花山自然保护区(2017年6月)。采集的样本保存在 RNA 样本保存

液(华越洋,北京)中,当天带回实验室。48 h 内完成 RNA 的提取。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 第一条链的合成 RNA 提取试剂盒(Omega, USA)分离大花杓兰须根总 RNA。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性、超微量分光光度计(DeNovix DS-11, USA)测定其浓度和纯度。以高质量 RNA 为模板, BeyoRT™ cDNA 第一链合成试剂盒(碧云天,上海),反转录合成 cDNA 第一条链, -20 °C 保存。

1.2.2 *CmCDPK* 基因核心片段的分离 以大花杓兰根 cDNA 第一条链为模板, CDPK-coreF 和 CDPK-coreR 为引物(表 1)。对 *CmCDPK* 的核心序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL): 10×buffer with (NH₄)₂SO₄ 2.5 μL, dNTPs 0.5 μL, CDPK-coreF 和 CDPK-coreR 各 1 μL, MgCl₂ 1.5 μL, cDNA 1 μL, DNA polymerase 0.5 μL。PCR 程序为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 最后延伸 7 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,并切胶纯化目标条带,而后将其克隆到 pGM-T vector(天根,北京),转化 *Escherichia coli* TOP10 感受态细胞。随机选取菌落 PCR 鉴定阳性的转化子 5 个,送上海生工进行测序,测序引物为载体通用引物 T7。

表 1 本研究使用的引物及序列

Table 1 Primers used in the study

引物 Primers	序列(5'-3') Sequences
CDPK-coreF	5' -GGWGGTGARTTYTTYGA-3'
CDPK-coreR	5' -TCTGCCARAADGGTGG-3'
<i>CmCDPK3-R1</i>	5' -GACTCGAGTCGACATCGACTTTTTTTTTTTT TTTTTTT-3'
<i>CmCDPK3-R2</i>	5' -GACTCGAGTCGACATCGAC-3'
<i>CmCDPK3-F1</i>	5' -GGAAGCGCGCAGCTACCAAGAC-3'
<i>CmCDPK3-F2</i>	5' -GCCCTACTATGTTGTCCAGAAG-3'
<i>CmCDPK5-R1</i>	5' -CAAGATCACTCCGCACTCCATACAT-3'
<i>CmCDPK5-R2</i>	5' -AGTGGCGCATCCTCATCA GTGTTGG-3'
<i>CmCDPK5-R3</i>	5' -GCCAACAATGGTCTTGGTGAGCTGC-3'
<i>CmCDPK-F</i>	5' -ATGAAGCAATCTTCTCCCTACC-3'
<i>CmCDPK-R</i>	5' -CTACTGTTGTGCAGCCCTCAGAG-3'
<i>XbaI-CmCDPK-F</i>	5' - <u>CTTCT</u> TAGA ATGAAGCAATCTTCTC-3'
<i>SacI-CmCDPK-R</i>	5' - <u>CTGAG</u> CTC TACTGTTGTGCAGCC-3'

加粗部分为相应的酶切位点,下划线部分为保护碱基

The bolded letters represent two restriction sites *XbaI* and *SacI*, underlined letters represent protected bases

1.2.3 *CmCDPK* 基因的 RACE PCR 扩增 以 RNA 为模板, *CmCDPK3-R1* 为特异引物(表 1), 通过 BeyoRT™ cDNA 第一链合成试剂盒(碧云天,上海)

反转录合成 cDNA 第一条链。根据获得的 *CmCDPK* 基因核心序列,设计 2 个特异正向引物 CmCDPK3-F1 和 CmCDPK3-F2(表 1),与 CmCDPK3-R2 引物组合进行 2 次巢式 PCR 扩增,获得 *CmCDPK* 基因 3' 端序列。PCR 体系和扩增程序基本同核心片段分离,区别在于不同的退火温度(第 1 轮 PCR, 65 °C 30 s; 第 2 轮 PCR, 60 °C 30 s)和延伸时间(第 1 轮 PCR, 72 °C 90 s; 第 2 轮 PCR, 72 °C 60 s)。

根据获得的 *CmCDPK* 基因核心序列,设计 3 个特异反向引物 CmCDPK5-R1、CmCDPK5-R2 和 CmCDPK5-R3(表 1),分别与 SMARTer RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech, Japan)中的 UPM 引物组合进行 3 次巢式 PCR 扩增,获得 *CmCDPK* 基因 5' 端序列,其操作按照试剂盒说明书进行。3' -RACE 和 5' -RACE PCR 产物的电泳检测、切胶纯化及克隆测序等同上述 *CmCDPK* 核心片段的分离。

表 2 *CmCDPK* 的预测项目及在线分析工具

Table 2 Items predicted and online tools

预测项目 Items predicted	在线工具及网站 Online tools and websites
理化性质 Physicochemical properties	ProtParam http://web.expasy.org/protparam/
信号肽 Signal peptide	SignalP 4.1 Server http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
跨膜结构域 Transmembrane domain	TMpred https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html
亲疏水性 Hydrophilicity/Hydrophobicity	ProtScale http://web.expasy.org/protscale/
磷酸化位点 Phosphorylation site	NetPhos 3.1 http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/
糖基化位 Glycosylation sites	NetOGlyc 4.0 http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/
蛋白无序特征 Disordered characteristics	FoldIndex http://bioportal.weizmann.ac.il/fldbin/findex
保守结构域 Conserved domain	SMART http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1
二级结构 Secondary structure	SOPMA https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.htm
三级结构 Tertiary structure	SWISS-MODEL http://swissmodel.expasy.org/

1.2.6 植物表达载体的构建 pGM-CmCDPK 质粒为模板, *Xba*I-CmCDPK-F 和 *Sac*I-CmCDPK-R 为引物(表 1), PCR 扩增 *CmCDPK* 基因片段。反应体系为 50 μ L, 质粒 DNA 1 μ L, 引物各 2 μ L, 5X Fast HiFidelity-PCR Buffer 10 μ L, Fast HiFidelity Polymerase 1 μ L, 20 X Fast PCR Enhance 2.5 μ L。PCR 程序基本按照分离核心片段进行,并做适当调整, 65 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s。1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物检测后, *Xba*I 和 *Sac*I 酶切 *CmCDPK* 基因片段,并将其克隆到相同酶切的植物表达载体 pBI121 上。PCR、酶切及 DNA 测序鉴定正确的阳性转化子,命名为 pBI-CmCDPK。

2 结果与分析

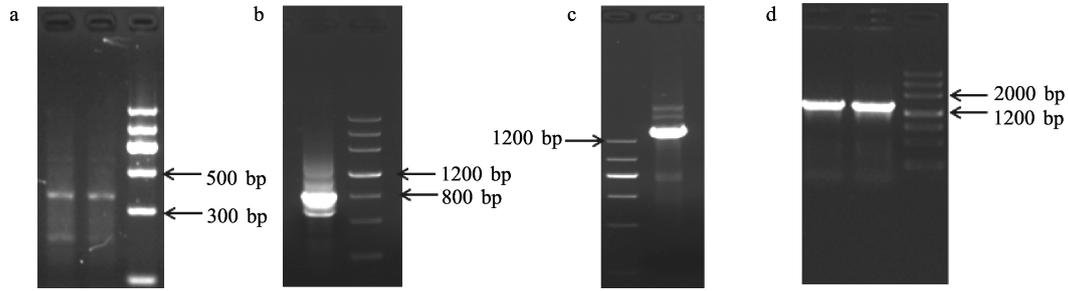
2.1 *CmCDPK* 基因的克隆

采用简并引物 CDPK-coreF/R 进行 RT-PCR 扩增,

1.2.4 *CmCDPK* 基因跨 ORF 的 PCR 验证 采用 Lasergene 中的 SeqMan 程序对 5' -RACE 序列、核心序列和 3' -RACE 序列进行片段组装,获得大花杓兰 *CDPK* 全长序列。ORF finder 和 Blastx 分析后,获得 *CmCDPK* 基因的 cDNA 序列。以大花杓兰 cDNA 为模板,跨 ORF 的 CmCDPK-F 和 CmCDPK-R 为引物(表 1), PCR 扩增 *CmCDPK* 片段。纯化的 *CmCDPK* 片段克隆到 pGM-T vector,送至上海生工测序。含 *CDPK* 片段,且序列完全正确的重组质粒,命名为 pGM-CmCDPK。

1.2.5 *CmCDPK* 的生物信息学分析 基于一系列在线生物信息学软件对大花杓兰 *CmCDPK* 的基本理化性质、信号肽、跨膜结构域、亲疏水性、结构功能域等进行预测分析。*CmCDPK* 预测分析项目及在线分析工具见表 2。采用 Mega 5.1 构建 *CmCDPK* 蛋白系统发育树(NJ 法)。

获得 1 个大小约 360 bp 的核心序列(图 1a)。Blastx 分析,发现其编码的氨基酸与很多植物 CDPKs 均具有较高的同源性(83%~93%)。由此可见,本研究分离到的 cDNA 片段为大花杓兰 *CDPK* 基因核心序列。根据 *CDPK* 核心序列,分别进行 5' 和 3' -RACE 扩增,分别获得长度约为 800 bp 和 1200 bp 的明亮条带(图 1b、c)。5' 和 3' -RACE PCR 产物与核心片段进行拼接,获得 1 条长度为 2079 bp 的 DNA 片段。ORF Finder 分析可知, *CmCDPK* 基因 cDNA 为 1491 bp。采用跨 ORF 的引物 CmCDPK-F 和 CmCDPK-R 进行 RT-PCR 扩增验证,获得 1 条明亮、大小约 1500 bp 的目标条带(图 1d)。克隆测序结果显示,该片段包含完整 ORF,表明成功获得了大花杓兰 *CDPK* 基因的全长 cDNA,命名为 *CmCDPK*(GenBank Accession No.MK643404)。



a: *CmCDPK* 基因的核心片段; b: *CmCDPK* 基因 5' -RACE 片段; c: *CmCDPK* 基因 3' -RACE 片段; d: 跨 ORF 的 *CmCDPK* 基因的 cDNA 片段
 a: Core fragment of *CmCDPK*, b: 5' -RACE fragment of *CmCDPK*, c: 3' -RACE fragment of *CmCDPK*,
 d: cDNA fragment of *CmCDPK* containing complete ORF sequence

图 1 *CmCDPK* 基因的克隆
 Fig.1 Cloning of *CmCDPK* gene

2.2 *CmCDPK* 结构域及活性位点分析

图 2 展示了 *CmCDPK* 序列, 全长 2079 bp; cDNA 为 1491 bp, 编码 496 个氨基酸; 5' -UTR 长

217 bp; 3' -UTR 长 371 bp, 具有 polyA 结构(图 2)。SMART 分析结果显示, *CmCDPK* 具有 CDPKs 典型的保守结构域, 分别为 N 端的 S_TKs domain(Ser/Thr

```

1      ACATGGGGCCTCCCATCTTCTACTACTACCAATTCCTAATGACTTCTCTTTCTGAAACCCATCTCCGCTCAAGATCTGGCTCTATAAAAAGATATCGGGCTCGCCATTACCGGATGC
121    AACCTTCGAACCCCTAATCTCCAAACCTTCGAAACCTTAATCCAACCAAGTAACCCATCTTTTCTTGAAGTAAACCAAAATAGTTTCTTTTCTCCAAATGAAGCAATCTTCTCCCTACCA
1      I                                     M K Q S S P Y Q
241    ACCCCCTTCTCTCATCCAAAACCTCTCCGTTCTCCCGTACAAGACCTCTAACCTCCGTCGACCCTACAAGATCGGCCGGAAGCTCGGCCAGGGCCAGTTCGGCACAACCTTACCTCTG
249    P P S S S S K P S S V L P Y K T S N L R D H Y K I G R K L G Q G Q F G T T Y L C
361    CGTGGATAAGTCCGATGGCAAGGAGTATGCTTGCAGTCCATTCGAAAGCGGAGCTCCTCTGAGAGAGGATTATGAGGACGTATGGCGCGAGATCCAGATCATGCACCATCTATCGGG
49     V D K S D G K E Y A C K S I P K R K L L C R E D Y E D V W R E I Q I M H H L S G
481    GCATCCCAATGTTGGTAGGATCAAAGACACGTACGAGGACCTGCTCTTTGTCATTGGTCATGGAGTTGCGCAGGTGGAGAGTTTGTATAGGATCATACAGAAGGGGCATTACAG
89     H P N V V R I K D T Y E D L L F V H L V M E L C A G G E L F D R I I Q K G H Y S
601    CGAGCGGAAGGGCGGCAGCTACCAAGACCAITGTTGGCTGTCGAGGCTGCCAATCTCTGGGGTGATGCATCGGGACCTCAAGCCGGAATAATTTTGTGTTGCCAACCTGATGA
129    E R K A A Q L T K T I V G V V E A C H S L G V M H R D L K P E N F L L S N T D E
721    GGATGCCCACTCAAAGCCAGGATTTCCGGCTCTCTGCTTTTTACAAGCCAGGTAAATGCTCTCTGATGTAGTGGAAAGCCCTACTATGTGCTCCAGAAGTATTGGCTAAATATTA
169    D A P L K A T D F G L S V F Y K P G E M L S D V V G S P Y Y V A P E V L R K Y Y
841    TGGTCTTAGGCAGATGTATGGAGTGGGGAGTGATCTGTATATTTTACTGAGTGGTTCACCTTTTTTGGCAGAAAAGTAAAGCCGGATCTTACAGACAGATTTTACAAGGCATCT
209    G L E A D V W S A G V I L Y I L L S G V P P F W A E T E A G I F R Q I L Q G H L
961    GGATTTTGAATCAGAACCTAGCCCTAGCATTTCTGACAGTCTAAAGACCTGATTGTAATATGCTGAATCGAGATCCAAAAGGGCGATTACCGCTCACCAAGTCTTTTGTATCCATG
249    D F E S E P W P S I S D S A K D L I R N M L N R D P K G R F T A H Q V L C H P W
1081   GATTGTGATGACAGAGTAGCAOCTGACCGACCAATTAGAITCTGCTGTTTTATCACGCTTGAAGCAGTTTTCTGCAATGGACAAGCCTTAAGAAGATGGCTTTACGAGTTATAGCAGATCA
289    I V D D R V A P D R P L D S A V L S R L K Q F S A M D K L K K M A L R V I A D Q
1201   ATGTCAGAAGAAAGATAGTGGGCTTAAAGAGTTGTTCAAGATGATTGACACAGATAACAGTGGGACAATAACATTTGATGAAGTAAAGATGGCTTAGAGAAAGTGGGCTCTGAATT
329    L S E E E I G G L K E L F K M I D T D N S G T I T F D E L K D G L R K V G S E L
1321   GACTGAACATGAGATCAGGCTCTTATGAAATGCTGATATAGACAACAGTGGCAGATAGACTACGGTGAATTTCTTGTCTACTGTGCCTTGAATAAGTTGGAGGGAGGAGAAJ
369    T E H E I Q A L M N A A D I D N S G T I D Y G E F L A A T V H L N K L E R E E N
1441   CCTAATATCTGCTTTTGGCTACTTTGACAAAGACGGAAGTGGATATATCACCATCGATGAACCTCTCTGAAGCCCTGCAGAGATTTTGGACTCCATGATGGCCATCTTGATGAAATGATCAA
409    L I S A F A Y F D K D G S G Y I T I D E L S E A C R D F G L H D G H L D E M I K
1561   AGAGATAGATCAAAAACAGATGGGCAAAATAGATTACAGTGAATTTGTCGATGATGAGAAAGGGCAATGGAGCAGTTGGTAGGAGGACCATGACAAGCAGTTTGTGTGAACTTGGG
449    E I D Q N N D G Q I D Y S E F V A M M R K G N G A V G R R I M T S S L C V N L G
1681   TGATCTCTGAGGGCTGCACAACAGTAGAAGAAACTGCCAGACTTGTTTTTTCATGTCTCAATCAGCAACCAAGCAACACTGAAAAGAAATCTCCATCAGTAATATGGGTCTGCAATG
489    D A L R A A Q Q *
1801   TCCGGTGCCTGTGGCTTTTTAAACAAGAGAGGATGCTGATTTTTCGAATAACACCATGGAGATCTGTAGTTTTGAGTGTGGATCAGGTAGTCAATGTAATCCAGGCCAATTTGCAGAAGAA
1921   TTCTAGGTTGGTTTGAAGTACTGCTCTAATGCTTAAATGTGATGATTTTAAATTAAGCATCTCTTATTATTTGCTAAATGAGGCCAAAACATTGCATGCCTGTACCTTGTAT
2041   TTAATCAAGATAACCAATTAGCCAAAAA
  
```

图 2 *CmCDPK* 基因的 cDNA 序列及编码的氨基酸序列
 Fig.2 Nucleotide sequence of *CmCDPK* gene and encoded amino acid sequence

蛋白激酶, position 31~289) 和 C 端的 EF-hand domain (position 336~364, 372~400, 408~436, 442~470)(图 3)。采用 InterProScan 预测 CmCDPK 活性位点,发现它含有 1 个 ATP 结合位点(position 37~60)、1 个 Ser/Thr 蛋白激酶活性位点(position 151~163) 和 4 个 Ca^{2+} 结合位点(position 345~357, 389~393, 417~429, 451~463)。CmCDPK 含有 44 个潜在的磷酸化位点、11 个潜在的糖基化位点。

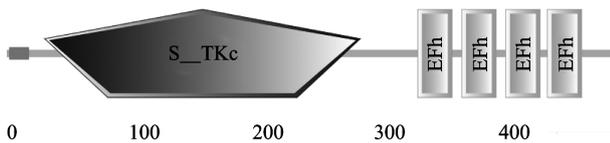


图 3 CmCDPK 的保守结构域分析

Fig.3 Conserved domain prediction of CmCDPK

2.3 CmCDPK 的理化性质、信号肽分析

ProtParam 预测结果显示, CmCDPK 相对分子量约为 55.7 kD, 理论 pI 为 5.30。不稳定指数 (instability index) 为 38.42, 表明 CmCDPK 为稳定蛋白。SignalP4.1 分析 CmCDPK 不含信号肽序列, 为非分泌蛋白。

采用在线软件 ProtScale 分析 CmCDPK 的亲疏水性, 发现整条肽链的亲水性氨基酸明显多于疏水性氨基酸(图 4), 推测 CmCDPK 为亲水蛋白。TMpred 预测结果显示 CmCDPK 存在 1 个包含 19 个氨基酸(position 214~232) 的跨膜结构域(图 5)。

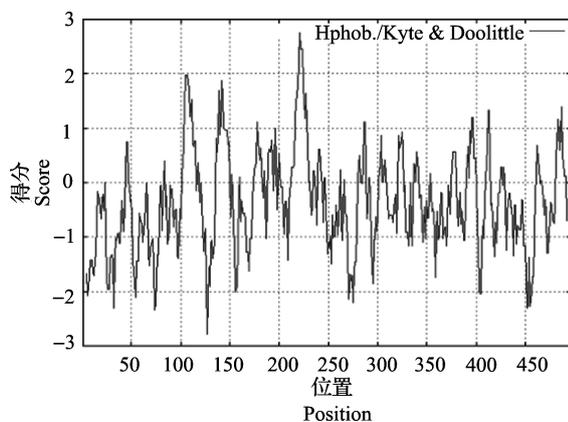


图 4 CmCDPK 的亲疏水性预测

Fig.4 Hydrophilicity and Hydrophobicity prediction of CmCDPK

2.4 CmCDPK 蛋白的无序化特征分析

FoldIndex 对大花杓兰 CmCDPK 蛋白的无序化特征进行预测分析(图 6), 发现该蛋白含有 7 处无序区, 最长无序残基为 60 个连续氨基酸残基。

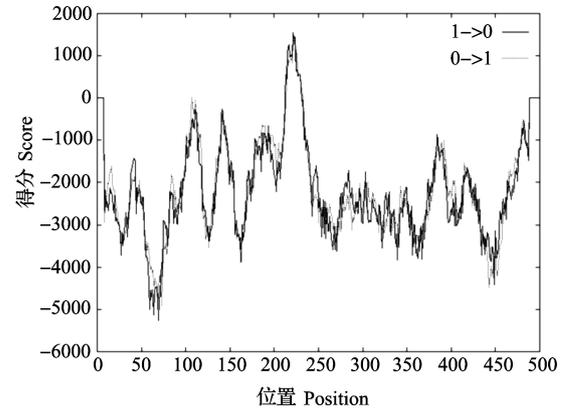


图 5 CmCDPK 的跨膜结构域预测

Fig.5 Transmembrane domain prediction of CmCDPK

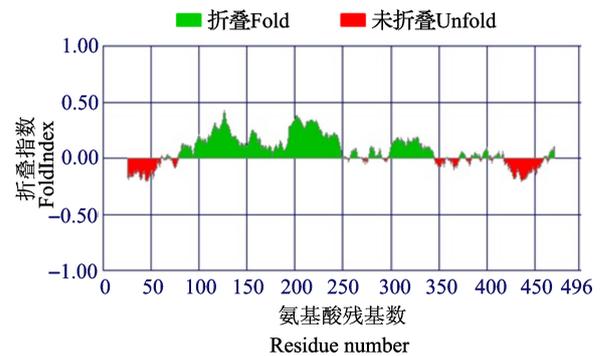


图 6 CmCDPK 蛋白的无序化特征分析

Fig.6 Predicted disordered segment of CmCDPK

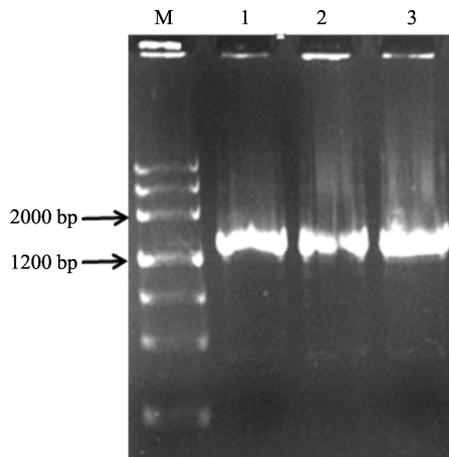
CmCDPK 共含有 145 个无序氨基酸残基, 占氨基酸总数 31.12%。对 CmCDPK 无序氨基酸组成进一步分析, 发现丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、赖氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺在蛋白无序区含量较为丰富, 特别是丝氨酸和苏氨酸。

2.5 CmCDPK 的结构分析

SOPMA 预测大花杓兰 CmCDPK 二级结构, α -螺旋(48.79%) 和无规卷曲(28.02%) 在 CmCDPK 中较为丰富, 而延伸链(12.50%) 和 β -转角(10.69%) 相对较少(图 7)。采用 SWISS-MODEL 在线工具, 在 20~479 位氨基酸对大花杓兰 CmCDPK 进行同源建模, 预测其三级结构。从图 8 可以看出, CmCDPK 蛋白主要由 α -螺旋构成, 在氨基酸 175~192 位点由无规则卷曲、 β -转角和延伸链形成 1 个 A-Loop 结构, 但具体生物学功能尚不明确。

2.6 CmCDPK 系统进化分析

Blast 分析发现, CmCDPK 与多种植物 CDPKs 均具有较高同源性(78%~96%), 表明植物 CDPKs 基因是高度保守的, 其中与小兰屿蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*



M: DNA Marker; 泳道 1, 2, 3: *CmCDPK* 的 PCR 扩增产物
M: DNA Marker, Lanes 1, 2, 3: PCR products of *CmCDPK* gene

图 11 重组质粒 pBI-CmCDPK 的 PCR 鉴定

Fig.11 Verification of recombinant plasmid pBI-CmCDPK by PCR

3 讨论

CDPKs 是一个多基因家族,其功能涉及植物生物和非生物胁迫各种信号转导途径^[16-19]。这些研究结果主要是对一些模式植物的系统分析^[20-22]。迄今为止,兰科植物钙依赖蛋白激酶功能的研究鲜有报道,仅限于蝴蝶兰^[8]和铁皮石斛^[9-10]。本研究采用 RT-PCR 结合 RACE 技术,从大花杓兰须根中克隆到 1 个编码 496 个氨基酸的 *CmCDPK* 基因。*CmCDPK* 蛋白具有植物 *CDPKs* 典型的 Ser/Thr 蛋白激酶 domain 和 4 个 EF-hand domain。*CmCDPK* 含有 44 个潜在的磷酸化位点,占氨基酸残基总数的 9.44%。高比例的磷酸化位点,从某种程度上体现出 *CDPK* 特异磷酸化对启动不同信号转导途径的重要性。FoldIndex 对大花杓兰 *CmCDPK* 蛋白的无序化特征进行分析,发现 *CmCDPK* 存在 7 处无序区,总共 145 个无序氨基酸残基,最长无序区由 60 个连续的氨基酸残基构成。对 *CmCDPK* 无序氨基酸组成进一步分析,发现该蛋白无序区的氨基酸组成相对较简单,种类偏少,富含丝氨酸和苏氨酸。这与 Romero 等^[23]和 Dyson 等^[24]的研究结果较一致。60 个连续氨基酸残基无序区,是否对 *CmCDPK* 功能的发挥起到辅助作用? 是否赋予 *CmCDPK* 某些新的未知功能? 这些基本问题有待研究。系统进化分析显示,大花杓兰 *CmCDPK* 与小兰屿蝴蝶兰和铁皮石斛 *CDPK* 聚在同一进化枝上,亲缘关系较近,这与它们同属兰科植物的进化及分类地位相一致。

已有研究发现 *CDPK* 在 AM 菌根、根瘤菌-

宿主植物共生体系中也起着重要的作用。蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.) 中的 *CDPK* 同功体 MtCPK3 参与根瘤数目的调控^[25]。结合生物信息学数据和分析技术,龚记熠等^[26]鉴定出 7 个与蒺藜苜蓿根瘤生长相关的 *CDPK* 基因,但具体的生物学功能未作出阐述。Yu 等^[27]研究发现,苜蓿 *CDPK5-RBOH* 复合物介导的免疫信号途径调控根瘤菌定殖和类菌体的发育。水稻 (*Oryza sativa* L.) OsCPK18 参与 AM 菌根真菌与水稻的早期共生^[28]。铁皮石斛 *DoCPK1* 参与小菇真菌与铁皮石斛的早期互作^[9]。*CmCDPK* 参与菌根真菌与大花杓兰建立共生关系的早期信号识别吗? 铁皮石斛 *DoCDPK1* 和 *DoCDPK2* 参与低温和高盐胁迫的响应^[10],大花杓兰 *CDPK* 也是逆境胁迫相关蛋白吗? 基于生物信息学分析,一些拟南芥钙依赖蛋白激酶 (*CPK7*, *CPK14*, *CPK32*, *CPK17*, *CPK34*, *CPK20*, *CPK27*, *CPK16*, *CPK18*, *CPK28*, *CPK7*) 被鉴定作为植物微管和微丝骨架潜在的调控蛋白^[29]。Jin 等^[30]研究发现, *CPK28* 直接使甲硫氨酸腺苷基转移酶 (*MAT1*, *MAT2* 和 *MAT3*) 磷酸化,磷酸化的 *MATs* 通过 26S 蛋白酶体降解途径影响拟南芥中的乙烯生物合成和木质素积累。大花杓兰 *CDPK* 与植物骨架、乙烯生物合成和木质素积累有关吗? 这些基本的科学问题目前尚不明确。因此,大花杓兰钙依赖蛋白激酶基因 *CmCDPK* 的鉴定及植物表达载体 pBI-CmCDPK 构建,为后续开展 *CmCDPK* 基因功能研究奠定了基础,同时也为将来选育抗逆性强的大花杓兰新品种提供潜在基因资源。

参考文献

- [1] 费小钰,李红丽,王俊皓. 植物钙依赖蛋白激酶 *CDPK* 基因功能综述. 吉林农业, 2017(9): 104-105
Fei X Y, Li H L, Wang J H. Roles of calcium-dependent protein kinase (*CDPK*) in plants. Jilin Agriculture, 2017(9): 104-105
- [2] Asano T, Kunieda N, Omura Y, Ibe H, Kawasaki T, Takano M, Sati M, Furuhashi H, Mujin T, Wu C Y, Tada Y, Satozawa T, Sakamoto M, Shimada H. Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 619-628
- [3] Fedosejevs E T, Gerdis S A, Ying S, Pyc M. The calcium-dependent protein kinase *RcCDPK2* phosphorylates sucrose synthase at Ser11 in developing castor oil seeds. *Biochemical Journal*, 2016, 473(20): 3667-3682
- [4] Wei S, Hu W, Deng X M, Zhang Y Y. A rice calcium-dependent protein kinase *OsCPK9* positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 133

- [5] Yu T F, Zhao W Y, Fu J D, Liu Y W, Chen M, Zhou B Z, Ma Y Z, Xu Z S, Xi Y J. Genome-wide analysis of CDPK family in *Foxtail Millet* and determination of SiCDPK24 functions in drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 651
- [6] Weckwerth P, Ehlert B, Romeis T. ZmCPK1, a calcium-independent kinase member of the *Zea mays* CDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress signaling. *Plant, Cell and Environment*, 2015, 38: 544-558
- [7] Xu J, Tian Y S, Peng R H, Xiong A S, Zhu B, Jin X F, Gao F, Fu X Y, Hou X L. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt, drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta*, 2010, 231 (6): 1251-1260
- [8] Tsai T M, Chen Y R, Kao T W, Tsay W S, Wu C P, Huang D D, Chen W H, Chang C C, Huang H J. PaCDPK1, a gene encoding calcium-dependent protein kinase from orchid, *Phalaenopsis amabilis*, is induced by cold, wounding, and pathogen challenge. *Plant Cell Reports*, 2007, 26 (10): 1899-1908
- [9] 张岗, 赵明明, 李标, 宋超, 张大为, 郭顺星. 一个受菌根真菌诱导的铁皮石斛钙依赖蛋白激酶基因的克隆及表达分析. *药学学报*, 2012, 47 (11): 1548-1554
Zhang G, Zhao M M, Li B, Song C, Zhang D W, Guo S X. Cloning and expression analysis of a calcium-dependent protein kinase gene in *Dendrobium officinale* in response to mycorrhizal fungal infection. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47 (11): 1548-1554
- [10] 盛况, 高燕会, 斯金平, 朱玉球, 刘京晶. 铁皮石斛 DoCDPK 基因的克隆与表达分析. *园艺学报*, 2016, 43 (12): 2412-2422
Sheng K, Gao Y H, Si J P, Zhu Y Q, Liu J J. Cloning and expression analysis of *DoCDPK* in *Dendrobium officinale*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, 43 (12): 2412-2422
- [11] 张毓, 张启翔, 赵世伟, 凌春英. 濒危植物大花杓兰胚与珠被发育的研究. *园艺学报*, 2010, 37 (1): 72-76
Zhang Y, Zhang Q X, Zhao S W, Ling C Y. Embryo and integument development of the endangered species *Cypripedium macranthos* Sw. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37 (1): 72-76
- [12] Shimura H, Koda Y. Enhanced symbiotic seed germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* following inoculation after cold treatment. *Physiologia Plantarum*, 2005, 123 (3): 281-287
- [13] Taniguchi H, Katsumi M, Yamamoto Y, Tatsumi Y. In vitro proliferation and genetic diversity of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense*. *Plant Biotechnology*, 2008, 25: 341-346
- [14] Zhang Y, Lee Y I, Deng L, Zhao S W. Asymbiotic germination of immature seeds and the seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw., an endangered lady's slipper orchid. *Scientia Horticulturae*, 2013, 164: 130-136
- [15] 付亚娟, 乔洁, 侯晓强. 珍稀濒危药用植物大花杓兰的研究现状. *江苏农业科学*, 2015, 43 (10): 328-331
Fu Y J, Qiao J, Hou X Q. Research status of rare and endangered medicinal plant *Cypripedium macranthos*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2015, 43 (10): 328-331
- [16] Boudsocq M, Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in Plant Science*, 2013, 18 (1): 30-40
- [17] Kardile H B, Gautam V, Sharma N K, Sharma A, Kaur B, Changan S, Bhardwaj V, Singh B. Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPK) in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Science Research*, 2018, 34 (2): 253-259
- [18] Seybold H, Boudsocq M, Romeis T. CDPK activation in PRR signaling. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1578: 173-183
- [19] 张秋平, 文李, 王峰, 廖志强, 李慧, 刘睿洋, 官春云. 油菜钙依赖蛋白激酶 BnCDPK1 的克隆和表达分析. *植物遗传资源学报*, 2014, 15 (6): 1320-1326
Zhang Q P, Wen L, Wang F, Liao Z Q, Li H, Liu R Y, Guan C Y. Molecular cloning and expression analysis of calcium-dependent kinase *BuCDPK1* in *Brassica uapus*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15 (6): 1320-1326
- [20] Shi S J, Li S G, Asim M, Mao J J, Xu D Z, Liu G S, Wang Q, Liu H B. The arabidopsis calcium-dependent protein kinases (CDPKs) and their roles in plant growth regulation and abiotic stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (7): 1900
- [21] Bundó M, Coca M. Enhancing blast disease resistance by overexpression of the calcium-dependent protein kinase OsCPK4 in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, 14 (6): 1357-1367
- [22] Almadani M C, Gonçalves N M, Rosa M T G. The rice cold-responsive calcium-dependent protein kinase OsCPK17 is regulated by alternative splicing and post-translational modifications. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2018, 1865 (2): 231-246
- [23] Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner E C, Brown C J, Dunker A K. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2001, 42 (1): 38-48
- [24] Dyson H J, Wright P E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 2005, 6 (3): 197-208
- [25] Gargantini P R, Gonzalez-Rizzo S, Chinchilla D, Raices M, Giammaria V, Ulloa R M, Frugier F, Crespi M D. A CDPK isoform participates in the regulation of nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, 2006, 48 (6): 843-856
- [26] 龚记熠, 张宇斌, 李菲, 何小红, 张习敏, 乙引. 苜蓿钙依赖蛋白激酶家族的生物信息学分析. *分子植物育种*, 2017, 15 (9): 3454-3462
Gong J Y, Zhang Y B, Li F, He X H, Zhang X M, Yi Y. Bioinformatics analysis of calcium-dependent protein kinase genes of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15 (9): 3454-3462
- [27] Yu H X, Xiao A F, Dong R, Fan Y Q, Zhang X P, Liu C, Wang C, Zhu H, Duanmu D Q, Cao Y G, Zhang Z M. Suppression of innate immunity mediated by the CDPK-Rboh complex is required for rhizobial colonization in *Medicago truncatula* nodules. *New Phytologist*, 2018, 220 (2): 425-434
- [28] Campos-Soriano L, Gómez-Ariza J, Bonfante P, San Segundo B. A rice calcium-dependent protein kinase is expressed in cortical root cells during the presymbiotic phase of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 90
- [29] Novozhylov D O, Karpov P A, Blume Y B. Bioinformatic search for Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinases potentially associated with the regulation of plant cytoskeleton. *Cytology and Genetics*, 2017, 51 (4): 239-246
- [30] Jin Y, Ye N H, Zhu F Y. Calcium-dependent protein kinase CPK28 targets the methionine adenosyltransferases for degradation by the 26S proteasome and affects ethylene biosynthesis and lignin deposition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 2017, 90: 304-318