

小麦 *TaCIPK8* 基因的表达分析及其与 TaCBLs 的互作

毕惠惠, 贺亚伟, 毛伟伟, 翟俊鹏, 罗肖艳, 陈树林, 程西永, 许海霞

(河南农业大学农学院/河南省粮食作物协同创新中心/小麦玉米作物学国家重点实验室, 郑州 450046)

摘要: CIPK 是植物钙感受器钙调磷酸酶 B 类似蛋白特定靶向的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。根据拟南芥 *AtCIPK8* 基因序列, 利用同源克隆的方法从抗逆性较强的小麦品种石 4185 中克隆了一个编码序列全长为 1350 bp 的蛋白激酶基因 *TaCIPK8* (GenBank 号: KJ561804.1)。序列分析表明该基因编码的蛋白含有 449 个氨基酸, 分子量为 52.24 kD, 理论等电点为 7.16, 具有 CIPKs 家族蛋白所特有的 N 端激酶域和 C 端 NAF/FISL 结构域; 与拟南芥 *AtCIPK8* 蛋白序列相似度达 83.5%。为进一步研究其功能, 采用 Real-time PCR 方法检测该基因在胁迫条件下的响应情况, 发现 *TaCIPK8* 基因受高盐、外源 ABA 和低温 (4 °C) 胁迫诱导表达。利用植物启动子数据库 PlantCARE 和 PLACE 对 *TaCIPK8* 基因启动子序列进行分析, 结果显示 *TaCIPK8* 基因启动子存在大量应答脱水胁迫、干旱、低温和 ABA 的顺式作用元件, 也存在一些响应激素 GA 和茉莉酸甲酯的元件。利用酵母双杂交方法研究 *TaCIPK8* 和 TaCBL 家族蛋白的互作, 结果显示, 共转化含有 *TaCIPK8* 和 *TaCBL3* 基因载体的酵母菌能够在 SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/AbA 和 SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -Gal/AbA 三种培养基上生长, 且在后两种培养基上长出蓝色菌落。结果说明 *TaCIPK8* 与 *TaCBL3* 发生了互作, 进而引起了报告基因 *MEL1*、*AURI-C*、*HIS3* 和 *ADE2* 的表达。该研究结果对于研究 *TaCIPK8* 基因的功能以及与 CBL 蛋白的互作调控网络具有一定的参考作用。

关键词: *TaCIPK8*; TaCBLs; 基因克隆; 表达分析; 酵母双杂交

Expression Analysis of *TaCIPK8* and Its Interaction with TaCBLs in Wheat

BI Hui-hui, HE Ya-wei, MAO Wei-wei, ZHAI Jun-peng, LUO Xiao-yan,
CHEN Shu-lin, CHENG Xi-yong, XU Hai-xia

(Agronomy College of Henan Agricultural University/Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops/
National Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science, Zhengzhou 450046)

Abstract: CIPKs, Calcineurin B-like (CBL) interacting protein kinases, belong to a group of serine/threonine protein kinases in plants. We cloned *TaCIPK8* gene (GenBank number: KJ561804) from wheat variety Shi4185 based on the sequence homology of *Arabidopsis AtCIPK8*. The length of *TaCIPK8* coding sequence is 1350 bp. Sequence analysis indicated that *TaCIPK8* protein contains 449 amino acids, with its molecular mass and theoretical isoelectric point 52.24 kD and 7.16, respectively. The protein contains an N-terminal kinase domain and a C-terminal NAF/FISL motif specifically possessed by the CIPK family proteins. The similarity between *TaCIPK8* and *AtCIPK8* protein is 83.5%. In order to investigate the function of *TaCIPK8* gene, we detected the transcriptional levels of *TaCIPK8* under different stress conditions using Real-time PCR. The expression of *TaCIPK8* gene was induced by high salinity, ABA and low temperature (4 °C). We analysed the promoter of *TaCIPK8* gene using plant promoter databases PlantCARE and PLACE. The results indicated that the promoter harbors not only many *cis*-acting

收稿日期: 2017-09-03 修回日期: 2017-10-29 网络出版日期: 2018-02-09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180209.0858.010.html>

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2016ZX08002003-004); 国家重点基础研究计划 (973 计划) (2014CB138105); 国家重点研发计划课题 (2017YFD0100706)

第一作者研究方向为小麦抗逆分子生物学。E-mail: bihuihui826@126.com

通信作者: 许海霞, 研究方向为小麦抗逆分子生物学。E-mail: hauxhx@163.com

程西永, 研究方向为小麦遗传育种。E-mail: xyc634@163.com

elements responsive to dehydration, drought, low temperature and ABA, but also DNA elements responsive to GA and jasmonic acid methyl ester. Yeast two hybrid was used to study the interaction between *TaCIPK8* and TaCBLs proteins, and we found that the yeast transformed with both *TaCIPK8* containing vector and *TaCBL3* containing vector could grow on SD/-Trp/-Leu, SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal/AbA and SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His/X- α -Gal/AbA media, with blue colonies on the latter two media. The results indicate that the *TaCIPK8* protein interacted with TaCBL3, which activated the expression of the reporter genes *MEL1*, *AUR1-C*, *HIS3* and *ADE2*. Our results provide useful information for revealing the functions of *TaCIPK8* gene and the interaction regulatory network between the protein of *TaCIPK8* and TaCBLs in wheat.

Key words: *TaCIPK8*; TaCBLs; gene cloning; expression analysis; yeast two hybrid

小麦是全球最重要的粮食作物之一,在其生长发育阶段会面临诸多逆境胁迫因素,比如干旱、盐渍、低温、低 K^+ 等,这些逆境胁迫严重影响小麦产量和质量。CBLs-CIPKs 信号系统是植物解码、调控胞内 Ca^{2+} 信号的重要途径之一^[1],其可以将胞外逆境胁迫引起的 Ca^{2+} 信号通过自身网络的调控传递到下游效应器,引起植物相应的生理生化反应,因此在植物应对冷害、高盐、ABA 等多种刺激信号的应答反应中起重要作用^[2]。CBLs-CIPKs 参与钙信号系统的机制是由 CBLs 和 CIPKs 蛋白的分子结构和功能决定的。CBLs 蛋白含有 4 个 EF-hands 手型结构域,每个 EF-hand 由 12 个氨基酸残基组成,其中的 loop 环能够和钙离子结合发生空间构型变化携带钙信号,但是没有任何 CBL 同时具有 4 个典型的 EF-hands 手型结构域^[3]。不同的 CBL 对钙离子的亲和性和对钙离子结合的数量是不同的。这是 CBLs 传递不同钙信号的分子基础。而 CIPKs 蛋白在结构上各有一个 N 端激酶域和 C 端调节域。N 端激酶域的活化环是该蛋白的功能结构,而 C 端调节域的 NAF/FISL 结构通过自抑制作用和活化作用,调节 CIPKs 的激酶活性。CBLs 虽然能和钙离子结合形成 Ca^{2+} -CBLs 复合物,但自身无激酶活性,必须和 CIPKs 的 NAF/FISL 结构结合,激活 CIPKs 激酶活性^[4]。CIPKs 不具有细胞定位的结构域,比如 CBLs 蛋白所具有的 N 端肉豆蔻酰化位点等,因此其在细胞内的位置不定,在细胞膜、细胞质、质粒膜和液泡膜等都有分布^[5-7]。拟南芥 AtCBL2 和 AtCBL3 与 AtCIPK14 结合后能够定位在液泡膜上,而 AtCBL8-AtCIPK14 复合物却分布在细胞膜上,说明了 CIPKs 的定位是由与之互作的 CBLs 蛋白决定的,由 CBLs 引导 CBLs-CIPKs 复合物在特定的位置发挥激酶活性^[8]。CBLs-CIPKs 复合体参与了多种逆境胁迫诱导的信号传导过程。拟南芥 AtSOS3/AtCBL4-AtSOS2/AtCIPK24 复合体激活靶蛋白 At-

SOS1,引起胞内过多的 Na^+ 外排至胞外,使植物产生耐盐性^[9]。拟南芥 CBL9 能够激活 CIPK3 的激酶活性,进而参与对 ABA 信号途径的调控^[10]。研究发现,AtCBL1 和 AtCBL9 能与 AtCIPK23 互作,共同完成低钾信号传导过程^[11]。拟南芥中过表达 *AtCBL1* 基因使植株对低温更加敏感,耐受力更弱,说明了 *AtCBL1* 基因赋予了植株对低温信号的负调控作用^[12]。研究发现,AtCIPK7 能够和 AtCBL1 互作,AtCIPK3 能够和 AtCBL9 互作,共同完成对低温胁迫的调控作用^[13-14]。

本研究克隆了小麦 *TaCIPK8* 基因,研究了其在逆境胁迫下的表达模式及其与 TaCBLs 蛋白的互作关系,以期为 CBLs-CIPKs 信号系统参与小麦抗逆性的机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料的处理

普通六倍体小麦品种石 4185 种子由河南农业大学小麦育种实验室提供。种子消毒处理:用浓度为 0.1% 次氯酸钠溶液浸种 30 min,用超蒸水洗涤 3 次。种子培养:将种子摆放于灭菌发芽盒内,置于 24 $^{\circ}C$ 光照培养箱中培养,设定 16 h 光照 8 h 黑暗。幼苗培养 2 周至两叶一心时,将一部分幼苗分别转移到 200 mmol/L NaCl 和 100 μ mol/L ABA 溶液中进行胁迫处理,将另外一部分幼苗转移到 4 $^{\circ}C$ 培养箱进行低温处理。分别在胁迫处理的 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h 取小麦的根和叶,用无菌水冲洗 3 次,冲洗干净后用吸水纸吸干表面的水分,立刻用液氮速冻,置于 -80 $^{\circ}C$ 冰箱中备用。另外,为了研究基因的组织表达模式,孕穗期的根、茎、叶、幼穗和开花后 10 d 的种子等组织被液氮速冻,保存于 -80 $^{\circ}C$ 备用。

1.2 *TaCIPK8* 基因的克隆

用 Trizol 法提取小麦不同组织的 RNA,用 TaKaRa 公司生产的反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cD-

NA。利用 Primer 5.0 软件设计的引物(表 1),以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系 50 μ L: ddH₂O 30 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 5 μ L, 2 mmol/L dNTPs 5 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 3 μ L, 上游引物 F 和下游引物 R 各 1.5 μ L, KOD-Plus-Neo 高保真酶 1 μ L, cDNA 3 μ L。反应程序为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 66 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳并胶回收目的条带, 回收后的目的产物与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌感受态, 涂板倒置培养 12 h 左右至菌落长出。用表 1 中引物进行菌液 PCR 检测阳性单克隆, 提取质粒 DNA 酶切鉴定, 鉴定无误的阳性单克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

用途 Purposes	引物 Primers	碱基序列 Base sequence (5'-3')
基因克隆 Gene cloning	TaCIPK8-F1	ATGATTGGGGAGGAGGGGG
	TaCIPK8-R1	TTAGCGCTTCGATAGCCGGG
荧光定量 Real-Time PCR	TaCIPK8-F2	GATCCTGAGGAGGACAATGA
	TaCIPK8-R2	CGATCAAATAGGGCCGAAAG
	β -actin-F	GTTCCAATCTATGAGGGATACACGC
	β -actin-R	GAACCTCCACTGAGAACAACATTACC
表达载体构建 Plasmid construction	TaCIPK8-F3	CCCGGGATGATTGGGGAGGAGGGGG
	TaCIPK8-R3	ATCGATTTCAGCGCTTCGATAGCCGGG
	AD-F	ACCAGATTACGCTCATATGGC
	AD-R	CTTGCGGGGTTTTTCAGTATC
	BD-F	CAGAAGCTGATCTCAGAGGAG
	BD-R	CCAAGGGGTTATGCTAGTTAT

酶切位点用下划线标示

Enzyme cutting sites are underlined

1.3 TaCIPK8 的生物信息学分析

利用在线软件 ExPASy-ProtParam、ExPASy-ProtScale 和 TMHMM 2.0 Server, 对 TaCIPK8 基因编码蛋白的理化性质、疏水性/亲水性和跨膜结构域进行预测, 使用 DNAMAN 6.0 软件对 TaCIPK8 基因编码的蛋白序列与其他物种 CIPK8 家族基因所编码的蛋白序列进行序列比对。

1.4 TaCIPK8 基因的表达分析

根据克隆得到的 TaCIPK8 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件在基因的非保守区设计基因特异性引物, 引物序列见表 1, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。使用 Promega 公司

的荧光定量专用反转录试剂盒, 将从上述胁迫处理的根和叶中提取的 RNA 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 使用 Promega 公司的 GoTaq[®] qPCR Master Mix 试剂盒在 Bio-Rad CFX96[™] Real-Time PCR Detection System 中进行荧光定量 PCR。试验程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环, 72 $^{\circ}$ C 读取荧光值。扩增结束后, 进行熔解曲线分析。目的基因和内标基因 β -Actin 均设置 3 个重复。

荧光定量试验数据采用相对定量 $2^{-\Delta Ct}$ 公式进行计算。根据设置的荧光域值, 获得在该荧光域值下的特定循环数 Ct 值, 计算其平均值, 根据公式 $C = 2^{-\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct_{\text{目标基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ 计算不同处理模板的 C 值。

1.5 TaCIPK8 和 TaCBLs 的酵母双杂交互作分析

1.5.1 酵母表达载体的构建 以含有目的基因的 pMD19-T 载体为模板, 用分别添加 Sma I 和 Cla I 酶切位点的引物 PCR 扩增 TaCIPK8 基因, 反应体系和程序同 1.2。PCR 扩增引物序列见表 1。用限制性内切酶 Sma I 和 Cla I 对 TaCIPK8 基因的 PCR 产物和 AD 载体分别进行双酶切, 酶切产物经胶回收后, 过夜连接, 构建酵母表达载体。将构建的表达载体转化大肠杆菌, 提取质粒, 内切酶双酶切电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 筛选阳性克隆。

1.5.2 重组质粒的转化和鉴定 根据 Clontech 公司 Gold Yeast Two-Hybrid System 酵母转化手册, 将克隆得到的 TaCIPK8-AD 和空载体 AD 分别转入 Y187 酵母菌株, 将实验室保存的 TaCBL1-BD、TaCBL2-BD、TaCBL3-BD、TaCBL4-BD、TaCBL6-BD、TaCBL7-BD、TaCBL9-BD 和空载体 BD 分别转入 Y2HGold 酵母菌株。Y187 和 Y2HGold 酵母分别在 SD/-Leu 和 SD/-Trp 培养基上 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 ~ 5 d。用无菌接种环挑取 2 ~ 3 mm 直径的单克隆菌落在 500 μ L 的 YPDA 溶液里, 30 $^{\circ}$ C 恒温箱 200 r/min 培养 6 h。以酵母菌液为模板, 用 AD、BD 通用引物进行 PCR 检测筛选阳性单克隆, PCR 反应体系和反应条件同 1.2。

1.5.3 融合蛋白毒性和自激活活性检测 根据 Clontech 公司 Gold yeast two-hybrid system 的试验手册, 将含有 TaCIPK8-AD 和空载体 AD 的 Y187 酵母菌分别涂布在 SD/-Leu、SD/-Leu/X- α -Gal 和 SD/-Leu/X- α -Gal/AbA (Aureobasidin A) 固体培养基上; 将含有 TaCBL1-BD、TaCBL2-BD、TaCBL3-BD、

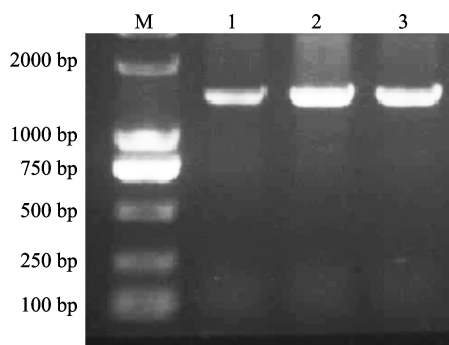
TaCBL4-BD、*TaCBL6*-BD、*TaCBL7*-BD、*TaCBL9*-BD 和空载体 BD 的 Y2HGold 酵母菌分别涂布在 SD/-Trp、SD/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 固体培养基上。30 ℃ 恒温箱倒置培养 3 ~ 5 d, 根据酵母菌落生长情况, 判断融合蛋白是否存在毒性和自激活活性。

1.5.4 酵母双杂交及其蛋白相互作用的鉴定 将含 AD 和 BD 载体的酵母菌液进行两两杂交, 分别是 *TaCIPK8*-AD $\times$ *TaCBL1*-BD、*TaCIPK8*-AD $\times$ *TaCBL2*-BD、*TaCIPK8*-AD $\times$ *TaCBL3*-BD、*TaCIPK8*-AD $\times$ *TaCBL4*-BD、*TaCIPK8*-AD $\times$ *TaCBL6*-BD、*TaCIPK8*-AD $\times$ *TaCBL7*-BD、*TaCIPK8*-AD $\times$ *TaCBL9*-BD 和阳性对照 pGBKT7-53 $\times$ pGADT7-T、阴性对照 pGBKT7-Lam $\times$ pGADT7-T, 杂交后分别涂布在 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/X-a-Gal/AbA 固体培养基上。30 ℃ 恒温箱倒置培养 3 ~ 5 d。将在 SD/-Trp/-Leu/X-a-Gal/AbA 固体培养基上显蓝色的菌落用 YPDA 溶液悬浮稀释后, 涂布在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-a-Gal/AbA 固体培养基上。如果仍然能够长出蓝色菌落, 则说明两两蛋白之间存在互作。

2 结果与分析

2.1 *TaCIPK8* 基因的克隆和生物信息学分析

以小麦石 4185 幼苗为材料, 提取总 RNA 并逆转录为 cDNA。以该 cDNA 为模板, PCR 扩增 *TaCIPK8* 基因, 目标条带如图 1 所示。测序显示, 基因编码区全长为 1350 bp。通过 ExPASy 在线蛋白预测软件对小麦 *TaCIPK8* 基因编码的蛋白序列进行预测, 结果显示: 其分子式是 $C_{2255}H_{3582}N_{624}O_{670}S_{13}$, 编码 449 个氨基酸, 分子量 52.24 kD, 理论等电点为 7.16, 不稳定系数是 40.26, 属于不稳定蛋白。



M; DL2000 Marker, 1, 2 和 3: *TaCIPK8* 扩增条带

M; DL2000 Marker, 1, 2 and 3; amplification bands of *TaCIPK8* gene

图 1 *TaCIPK8* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *TaCIPK8*

利用 ExPASy-ProtScale 在线分析软件对小麦 *TaCIPK8* 蛋白疏水性/亲水性进行预测。*TaCIPK8* 中亲水氨基酸多于疏水氨基酸且亲水氨基酸在蛋白序列中分布比较均匀, 总平均疏水指数 < 0 , 因此是亲水性蛋白。利用 TMHMM 2.0 Server 在线软件对 *TaCIPK8* 蛋白序列进行跨膜结构域分析, 结果显示 *TaCIPK8* 蛋白没有跨膜结构域。

利用 DNAMAN 软件, 对小麦 *TaCIPK8* 氨基酸序列与拟南芥 *AtCIPK8*、粗山羊草 *AetCIPK8*、大麦 *HvCIPK8*、二穗短柄草 *BdCIPK8*、水稻 *OsCIPK8*、高粱 *SbCIPK8*、粟 *SiCIPK8* 和玉米 *ZmCIPK8* 氨基酸序列进行多序列比对(图 2)。发现 CIPK 蛋白序列在不同物种中具有很高的相似性。其中和 *AtCIPK8* 蛋白序列相似性达 83.5%。另外, *TaCIPK8* 序列中包含 Activation loop 激活环和 NAF/FISL 结构域(图 2)。

2.2 *TaCIPK8* 基因在小麦不同组织中的表达分析

在正常生长条件下, *TaCIPK8* 基因在所选取的小麦不同组织中均检测到表达, 其中在根、茎、幼穗中的表达水平高于在叶和种子中的表达水平(图 3)。

2.3 *TaCIPK8* 基因在各种逆境胁迫下的表达模式

小麦幼苗在 200 mmol/L NaCl 溶液、100 μ mol/L ABA 溶液和 4 ℃ 低温胁迫处理一定时间后, *TaCIPK8* 基因的表达水平如图 4 所示。在不同的胁迫处理下, *TaCIPK8* 基因被诱导表达的规律不同。200 mmol/L NaCl 溶液处理后, *TaCIPK8* 基因表达模式在叶和根中基本相同, 均是先升高后降低, 然后再升高趋于处理前表达水平。100 μ mol/L ABA 溶液处理后, *TaCIPK8* 基因在叶中下调表达, 且在 4 h 时表达量最低; 而在根中 *TaCIPK8* 基因表达量是先降低后升高, 在 8 h 时表达量最低, 在 24 h 时表达量最高。4 ℃ 低温胁迫处理后, 小麦 *TaCIPK8* 基因在叶中表达量减少, 且在 8 h 时达到最低值; 而在根中 *TaCIPK8* 基因在 12 h 时被诱导上调表达。

2.4 *TaCIPK8* 基因启动子克隆及顺式作用元件分析

利用 PCR 方法克隆 *TaCIPK8* 基因启动子, 获得一段长 1500 bp 的启动子序列(图 5)。利用植物启动子数据库 PlantCARE 和 PLACE 对这一启动子序列进行分析, 结果显示, *TaCIPK8* 基因启动子存在典型的 TATA-box 元件, 还有大量应答脱水胁迫、干旱、低温和 ABA 的顺式作用元件, 例如 DRE、GCC-box、LTRE 和 ABRE 等(图 5)。另外, 还发现了响应激素 GA 的 GARE-motif 和响应茉莉酸甲酯的 MeJA 元件。

	Activation loop	
TaCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPAQGAALFTTCGT	177
AetCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPAQGAALFTTCGT	177
HvCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPAQGAALFTTCGT	177
BdCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPAQGAALFTTCGT	178
OsCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPAQGAALFTTCGT	174
SbCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPAQGSSTLFTTCGT	180
SiCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPAQGSSTLFTTCGT	178
ZmCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPAQGSSTLFTTCGT	177
AtCIPK8	RYFQQLIDGVDCHEKGVYHRDLKPENLLDSQGNLKISDFGLSATPECGVTILFTTCGT	170
TaCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	237
AetCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	237
HvCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	237
BdCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	238
OsCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	234
SbCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	240
SiCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	238
ZmCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	237
AtCIPK8	PNYVAPEVLSHKGYNGAADTWSCGVILYVLAAGYLPFDEVDLTLYCKIESAEYSFAV	230
TaCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	297
AetCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	297
HvCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	297
BdCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	298
OsCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	294
SbCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	300
SiCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	298
ZmCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	297
AtCIPK8	FFSGAKSLIRILDESHTRIIDTEIRKDEWEFKKYEFEAREVENDEVNLDVVAAFDDE	290
TaCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	356
AetCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	356
HvCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	356
BdCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	357
OsCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	353
SbCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	359
SiCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	357
ZmCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	356
AtCIPK8	EDNEHTFDEEA.GPLTLNAFDLIILSQGLNLSLFDRRCQDYKLNRFISRPANVILSS	350

NAF/FISL

AetCIPK8 (*Aegilops tauschii* Coss, XP_020199121.1), TaCIPK8 (*Triticum aestivum* L., AJR22392.1), HvCIPK8 (*Hordeum vulgare* L., BAK07603.1),
 BdCIPK8 (*Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv., XP_003569165.1), OsCIPK8 (*Oryza sativa* L., XP_015621427.1),
 SbCIPK8 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, XP_002455752.2), SiCIPK8 (*Setaria italica* (L.) P. Beauv., XP_004971907.2),
 ZmCIPK8 (*Zea mays* L., NP_001168497.1), AtCIPK8 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Hevnh, NP_194171.1)

图2 植物 CIPKs 氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of CIPKs in plants

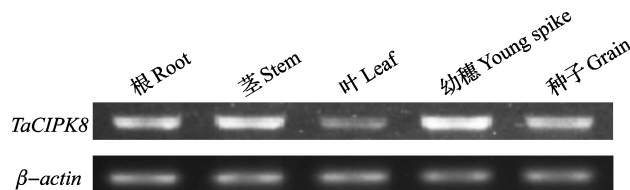
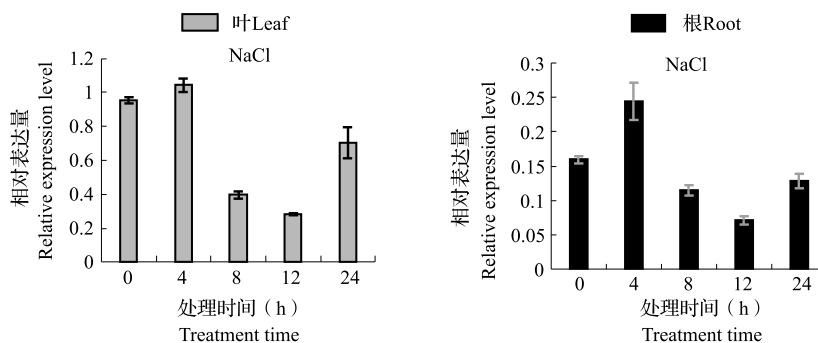
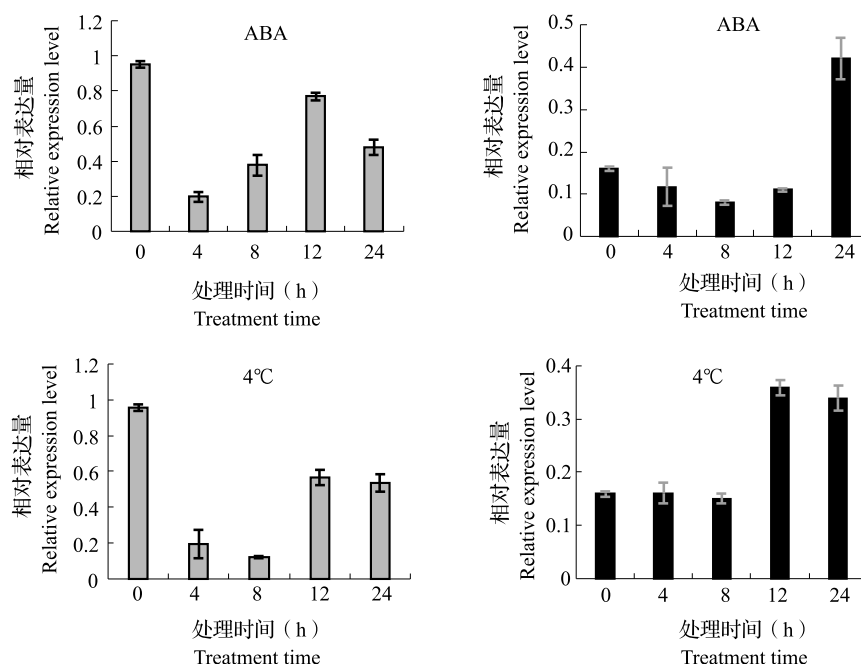
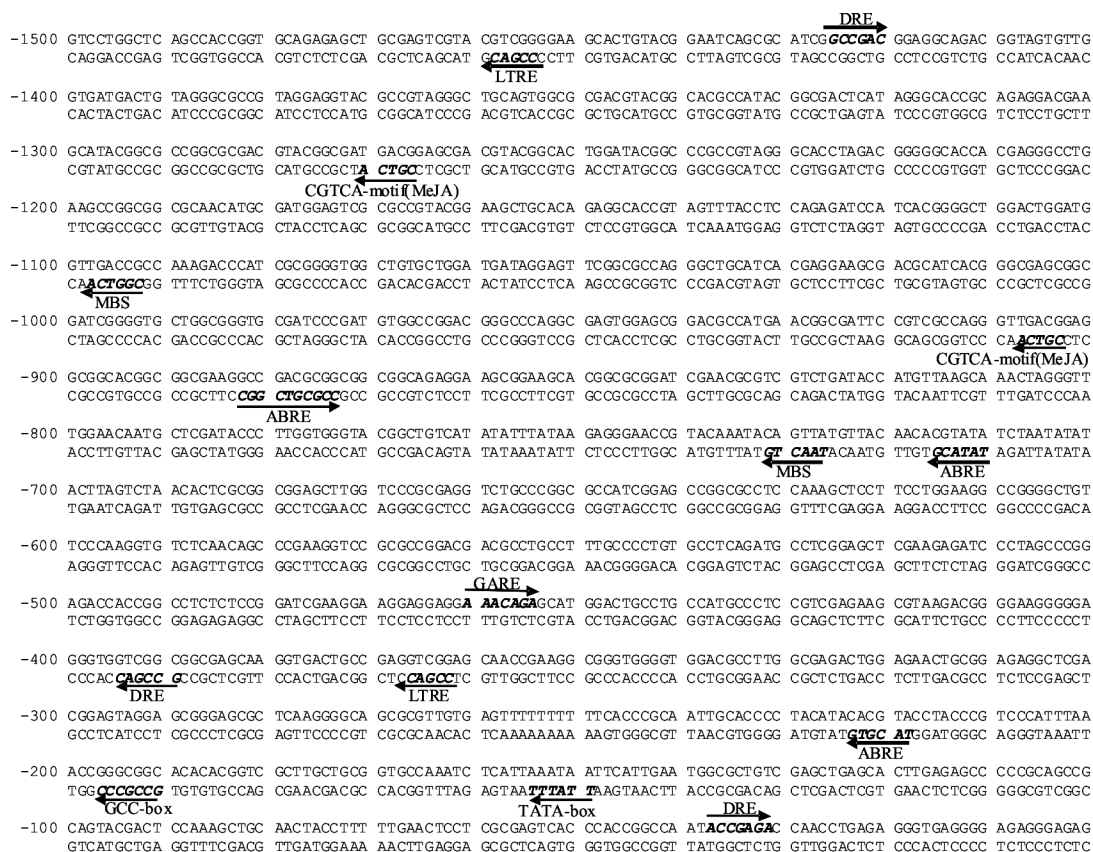


图3 TaCIPK8 基因在小麦不同组织中的表达

Fig. 3 The expression level of TaCIPK8 gene in different wheat tissues



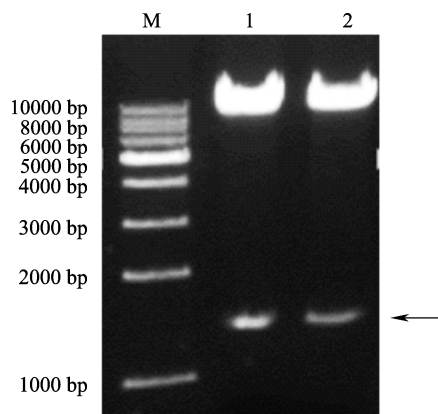
图 4 *TaCIPK8* 基因在不同胁迫下的表达情况Fig. 4 The expression level of *TaCIPK8* gene in diverse stress treatments

0 ATG

图 5 *TaCIPK8* 基因启动子顺式作用元件分析Fig. 5 Cis-elements analysis in *TaCIPK8* promoter

2.5 小麦 TaCIPK8 与 TaCBLs 互作分析

2.5.1 TaCIPK8 基因的酵母表达载体构建 将分别经 *Sma* I 和 *Cla* I 双酶切后的 TaCIPK8 片段和 AD 载体进行过夜连接,成功构建酵母表达载体 TaCIPK8-AD。构建的载体经双酶切鉴定,显示酶切后条带和预期一致(图 6)。载体送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果正确。



M:1 kb marker;1 和 2:TaCIPK8-AD 载体酶切条带, TaCIPK8 片段用箭头标示

M:1 kb marker,1 和 2: Digestion results of TaCIPK8-AD, TaCIPK8 fragments are indicated by an arrow

图 6 TaCIPK8-AD 酶切结果

Fig. 6 The result of restriction enzyme digestion of TaCIPK8-AD

2.5.2 TaCIPK8 和 TaCBLs 的毒性和自激活活性检测 为了利用酵母双杂交方法研究 TaCIPK8 和 TaCBLs 的互作关系,首先对 TaCIPK8 和 TaCBLs 进行了毒性和自激活活性检测。结果如图 7 所示,含有 TaCIPK8-AD 表达载体的 Y187 酵母菌落和转空载体 AD 的 Y187 酵母在 SD/-Leu 培养基上长势一致,说明 TaCIPK8 对 Y187 酵母菌没有毒性。含有 TaCBL1-BD、TaCBL2-BD、TaCBL3-BD、TaCBL4-BD、TaCBL6-BD、TaCBL7-BD、TaCBL9-BD 表达载体的 Y2HGold 酵母和转空载体 BD 的 Y2HGold 酵母在 SD/-Trp 培养基上菌落长势一致,说明上述 CBL 蛋白对 Y2HGold 酵母菌没有毒性。

含有 TaCIPK8-AD 表达载体的 Y187 酵母菌能够在 SD/-Leu 和 SD/-Leu/X- α -Gal 上长出白色菌落,但在 SD/-Leu/X- α -Gal/AbA 培养基上无法生长;含有 TaCBL1-BD、TaCBL2-BD、TaCBL3-BD、TaCBL4-BD、TaCBL6-BD、TaCBL7-BD 和 TaCBL9-BD 表达载体的 Y2HGold 酵母菌能够在 SD/-Trp 和 SD/-Trp/X- α -Gal 上长出白色菌落,而在 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 培养基上无法生长。结果说明

TaCIPK8、TaCBL1、TaCBL2、TaCBL3、TaCBL4、TaCBL6、TaCBL7 和 TaCBL9 都不能激活报告基因 *MEL1* 和 *AURI-C* 的表达,因此表明自身没有激活转录活性。

2.5.3 TaCIPK8 与 TaCBLs 蛋白酵母双杂交互作鉴定 将含有诱饵蛋白重组载体 TaCBLs-BD 的 Y2HGold 酵母菌与含有靶蛋白重组载体 TaCIPK8-AD 的 Y187 酵母菌两两组合进行杂交形成二倍体酵母,形成的 7 组二倍体酵母 TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL1-BD、TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL2-BD、TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL3-BD、TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL4-BD、TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL6-BD、TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL7-BD、TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL9-BD,以及阳性对照和阴性对照菌液分别涂布在 DDO (SD/-Leu/-Trp) 和 DDO/X/A (SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA) 培养基上。30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3~5 d。结果如图 8 所示,只有含有 TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL3-BD 的二倍体酵母和阳性对照酵母能在 DDO 和 DDO/X/A 培养基上生长,且在后者培养基上菌落为蓝色。由此可知,TaCIPK8 和 TaCBL3 发生了互作,从而激活了报告基因 *MEL1* 和 *AURI-C* 的表达。

为了验证上述互作结果是否假阳性,将 DDO/X/A 培养基上显蓝色的菌落挑至 QDO/X/A (SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal/AbA) 培养基,结果如图 8 所示,含有 TaCIPK8-AD $\times$ TaCBL3-BD 的二倍体酵母和阳性对照酵母在此培养基上同样长出蓝色菌落。因此表明,下游报告基因 *HIS3* 和 *ADE2* 被激活,上述结果非假阳性,TaCIPK8 和 TaCBL3 基因编码蛋白存在互作。

3 讨论

本研究克隆得到 TaCIPK8 基因编码一个由 449 个氨基酸残基组成的蛋白,相对分子量 52.24 kD,理论等电点 7.16,属于不稳定亲水性蛋白,没有跨膜结构域。TaCIPK8 蛋白有一个 N 端激酶域和一个 C 端结构域,前者是与下游靶蛋白作用的激活环(Activation loop),在第 135~147 位氨基酸处,后者是与 CBLs 结合的 NAF/FISL 结构域,在第 308~332 位氨基酸处。

TaCIPK8 表达分析结果显示,TaCIPK8 在小麦的不同时期和不同组织均有表达,其中在幼穗中表达最高,根和茎次之,叶与种子最低,说明该基因具有组织时空表达的特性。许多研究表明,CIPK 蛋白参与高盐、低温等非生物胁迫信号转导。例如拟南芥 *AtCIPK1* 和 *AtCIPK6* 基因参与植物响应非生物胁迫和 ABA 信号^[15-16]。因此本研究利用 Real-time PCR

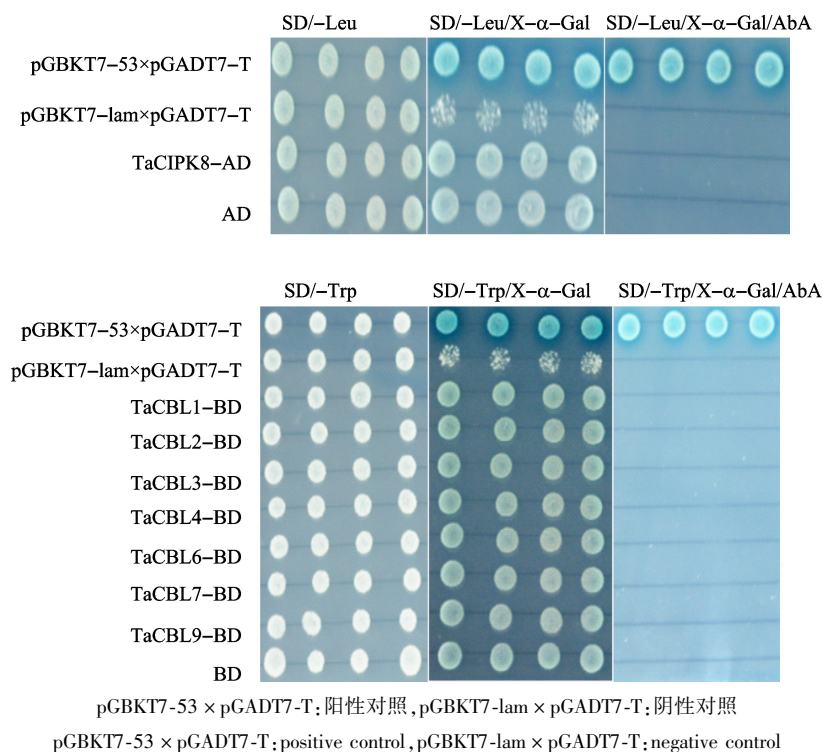
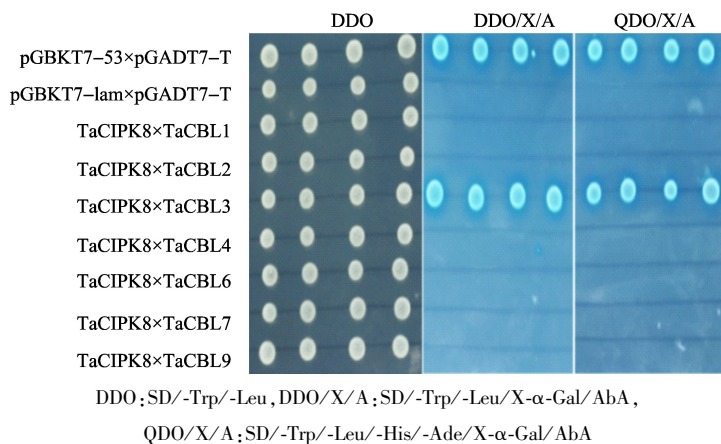


图 7 表达载体的毒性和自激活活性检测

Fig. 7 The toxicity and self-activation detection of expression vectors

图 8 *TaCIPK8* 和 *TaCBLs* 编码蛋白互作鉴定Fig. 8 The interaction of *TaCIPK8* and *TaCBLs* protein

方法,研究了小麦 *TaCIPK8* 基因在高盐、低温及信号分子 ABA 等 3 种胁迫处理下的表达模式。结果发现 *TaCIPK8* 基因受低温、高盐和 ABA 诱导表达,且在根和叶中表现出了不同的表达模式。基因在不同组织中受胁迫诱导表达模式的不一致先前已有报道。S. Okay 等^[17]研究小麦 WRKY 家族基因的表达时发现该家族许多基因在根和叶中受胁迫诱导表达是有差异的,例如,*TaWRKY17* 基因在叶中被旱诱导上调表达,而在根中则下调表达。这种在不同组织中受诱导表达情况的不同暗示 *TaCIPK8* 基因可能在叶和根中参与不同的信号传导途径来响应环境胁迫。

本研究利用酵母双杂交试验研究了 *TaCIPK8* 与 *TaCBL1*、*TaCBL2*、*TaCBL3*、*TaCBL4*、*TaCBL6*、*TaCBL7* 和 *TaCBL9* 的互作,结果发现 *TaCIPK8* 与 *TaCBL3* 存在互作。前人研究发现,每一个 CBL 蛋白能够和一些特定的 CIPKs 蛋白相互作用,同时每一个 CIPK 蛋白能够和一些特定的 CBLs 蛋白相互作用^[18]。CBLs 和 CIPKs 的交叉相互结合扩大了 CBLs-CIPKs 网络对钙信号传导的多样性和复杂性,CBLs 和 CIPKs 的结合以及 CBLs-CIPKs 复合体对靶蛋白的特异选择,共同决定钙信号传导的特异性和多样性^[19]。拟南芥 *AtSOS3/CBL4-AtSOS2/AtCIPK24-*

SOS1 途径响应盐胁迫,通过 Na^+/H^+ 反转运体将胞内多余的 Na^+ 排出体外,增强植物对盐胁迫的抗性^[9]。AtCBL9 能够激活 AtCIPK3 的激酶活性,通过调控 AtCIPK3 而参与对 ABA 信号途径的调控^[10]。拟南芥 AtCIPK14 和 AtCIPK15 也参与对 ABA 诱导的逆境胁迫的调节过程^[20-21]。AtCBL9 和 AtCIPK1 能够参与不依赖 ABA 调控的逆境胁迫响应过程,而 AtCBL1 和 AtCIPK1 参与依赖 ABA 的胁迫响应过程^[15]。这说明 AtCIPK3、AtCIPK14、AtCIPK15 和 AtCIPK1 基因在 ABA 胁迫过程中扮演着重要角色。拟南芥 AtCIPK7 能够和 AtCBL1 互作,AtCIPK3 能够和 AtCBL9 互作,共同完成对低温胁迫的调控作用。小麦 TaCIPK14、水稻 OsCIPK3 和 OsCIPK12 基因都能提高植株对低温胁迫的忍耐力^[22-23]。

植物在生长发育过程中会遇到各种各样的环境胁迫,例如盐碱、极端温度和干旱等。作为对不良环境的应答,植物会在转录水平上精确调控相关基因的表达。转录因子通过与启动子中顺式作用元件的特异结合可以在转录水平上调控下游基因的表达。本研究中,TaCIPK8 基因可能通过上游转录因子与其启动子序列中的顺式作用元件结合来响应高盐、低温等外界环境胁迫。进一步 TaCIPK8 基因转录翻译形成 TaCIPK8 蛋白,并与 TaCBL3 互作形成 TaCBL3-TaCIPK8 复合体而参与小麦响应胁迫的信号传导过程(图9)。这一结果,为进一步研究 TaCIPK8 功能及小麦抗逆性改良研究提供了理论依据。

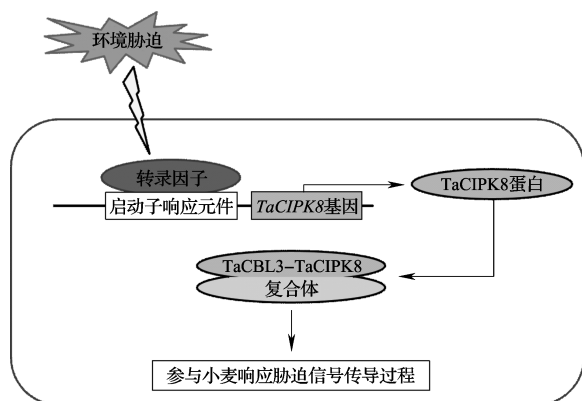


图9 TaCIPK8 基因参与小麦胁迫响应的可能途径

Fig. 9 A working model of TaCIPK8 gene involved in the response to abiotic stresses

参考文献

- [1] Batistic O, Kudla J. Analysis of calcium signaling pathways in plants [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1820(8): 1283-1293
- [2] Liu H T, Li B, Shang Z L, et al. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat [J]. Plant Physiol, 2003, 132(3): 1186-1195

- [3] Lewit-Bentley A, Rety S. EF-hand calcium-binding proteins [J]. Curr Opin Struct Biol, 2000, 10(6): 637-643
- [4] Albrecht V, Ritz O, Linder S, et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca^{2+} -regulated kinases [J]. EMBO J, 2001, 20(5): 1051-1063
- [5] Batistic O, Waadt R, Steinhorst L, et al. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores [J]. Plant J, 2010, 61(2): 211-222
- [6] Liu L L, Ren H M, Chen L Q, et al. A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein Kinase 9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like Protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in Arabidopsis [J]. Plant Physiol, 2013, 161(1): 266-277
- [7] Drerup M M, Schlücking K, Hashimoto K, et al. The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the Arabidopsis NADPH oxidase RBOHF [J]. Mol Plant, 2013, 6(2): 559-569
- [8] Waadt R, Schmidt L K, Lohse M, et al. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta [J]. Plant J, 2008, 56(3): 505-516
- [9] Qiu Q S, Guo Y, Dietrich M A, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in Arabidopsis thaliana by SOS2 and SOS3 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(12): 8436-8441
- [10] Pandey G K, Grant J J, Cheong Y H, et al. Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination [J]. Mol Plant, 2008, 1(2): 238-248
- [11] Xu J, Li H D, Chen L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^+ transporter AKT1 in Arabidopsis [J]. Cell, 2006, 125(7): 1347-1360
- [12] Albrecht V, Weinl S, Blazevic D, et al. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses [J]. Plant J, 2003, 36(4): 457-470
- [13] Kim K N, Cheong Y H, Grant J J, et al. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 2003, 15(2): 411-423
- [14] Huang C, Ding S, Zhang H, et al. CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in Arabidopsis thaliana [J]. Plant Sci, 2011, 181(1): 57-64
- [15] D'Angelo C, Wein S, Batistic O, et al. Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis [J]. Plant J, 2006, 48(6): 857-872
- [16] Chen L, Wang Q Q, Zhou L, et al. Arabidopsis CBL-interacting protein kinase (CIPK6) is involved in plant response to salt/osmotic stress and ABA [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(8): 4759-4767
- [17] Okay S, Derelli E, Unver T. Transcriptome-wide identification of bread wheat WRKY transcription factors in response to drought stress [J]. Mol Genet Genomics, 2014, 289(5): 765-781
- [18] Albrecht V, Ritz O, Linder S, et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca^{2+} -regulated kinases [J]. EMBO J, 2001, 20(5): 1051-1063
- [19] Batistic O, Kudla J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases [J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1793(6): 985-992
- [20] Guo Y, Xiong L, Song C P, et al. A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in Arabidopsis [J]. Dev Cell, 2002, 3(2): 233-244
- [21] Qin Y, Li X, Guo M, et al. Regulation of salt and ABA responses by CIPK14, a calcium sensor interacting protein kinase in Arabidopsis [J]. Sci China C Life Sci, 2008, 51(5): 391-401
- [22] Deng X, Zhou S, Hu W, et al. Ectopic expression of wheat TaCIPK14, encoding a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, confers salinity and cold tolerance in tobacco [J]. Physiol Plant, 2013, 149(3): 367-377
- [23] Xiang Y, Huang P M, Xiong L Z. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement [J]. Plant Physiol, 2007, 144(3): 1416-1428