

## 西伯利亚蓼钙调蛋白基因的克隆及其在盐胁迫下的表达

刘春, 刘关君\*, 曲春浦, 魏志刚, 刘桂丰, 杨传平

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

**摘要:** 已从西伯利亚蓼叶中 cDNA 文库中获得的钙调蛋白 EST 序列, 采用 cDNA 末端快速扩增(RACE)技术克隆了具有完整编码区的钙调蛋白基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号 GQ988382), 命名为 *PsCaM*。该基因全长 615 bp, 编码区为 450 bp, 编码 149 个氨基酸, 5'非翻译区为 63 bp, 3'非翻译区为 102 bp。同源性分析表明, 该蛋白与其他植物钙调蛋白高度保守, 氨基酸同源性高达 98%。用实时荧光定量 PCR 研究 3% NaHCO<sub>3</sub> 胁迫下西伯利亚蓼基因表达的结果显示, 自然条件下, 该基因在叶中表达量最高, 地下茎次之, 茎中最低; 盐胁迫下 *CaM* 在西伯利亚蓼的地下茎、茎和叶中均有表达, 表达模式不同。

**关键字:** 钙调蛋白; 西伯利亚蓼; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR; 表达分析

## Cloning of *CaM* Gene from *Polygonum sibiricum* Laxm. and Its Expression under Salt Stress

LIU Chun, LIU Guan-Jun\*, QU Chun-Pu, WEI Zhi-Gang, LIU Gui-Feng, YANG Chuan-Ping

Laboratory of Forest Genetics and Breeding and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** *PsCaM* gene (GeneBank accession No. GQ988382) containing a complete ORF was obtained using rapid amplification of cDNA ends (RACE) method based on EST sequence which was obtained from cDNA library of *Polygonum sibiricum* leaves. The full length of cDNA was 615 bp with a 450 bp open reading frame (ORF) which encoded a peptide of 149 amino acids and containing a 63 bp 5' UTR and a 102 bp 3' UTR. The results of homologous sequence analysis indicated that *PsCaM* was highly conserved in plants, which shared 98% homology with other *CaM* in the amino acid sequence. Expression analysis of RT-PCR showed that *PsCaM* was expressed in leaves, stems and rhizomes. The expression level of *PsCaM* gene was higher in leaves than that in rhizomes, and lowest in stems under nature condition. The expression pattern of *PsCaM* gene was different in leaves, stems and rhizomes under NaHCO<sub>3</sub> stress.

**Key words:** *CaM*; *Polygonum sibiricum*; gene cloning; RT-PCR; expression analysis

植物中 Ca<sup>2+</sup> 在一系列生理和代谢过程中起第二信使的作用, 是一种在多种功能调控中刺激应答的媒介物(梁秋芬等 2005; 周江菊和夏快飞 2005), 它通过其在细胞内外浓度差异传递多种信号(顾永清 1994)。植物钙调蛋白是细胞内钙离子的蛋白受体和分布最广、功能最重要的钙依赖性调节蛋白(张君诚等 2005; Feinstein 等 1991), 也是生物细胞内一种结构上保守性很强的调控蛋白, 其在组织、器官和原生质体中的含量不同, 分布也不一样(夏快飞等 2005)。

*CaM* 又称为钙调素, 是由 19 种 148 个氨基酸组成的单链可溶性球蛋白, 分子量 16.7~16.8 kDa (夏快飞等 2005), 对热稳定性好, 酸性, 保守性较强

(张君诚等 2005), 一般认为 *CaM* 有 4 个 EF 臂, 即由一个中央螺旋链接两个球状结构形成的螺旋-线-螺旋结构, 每两个 EF 臂由一条长的可自由伸展的  $\alpha$  螺旋连结成一组, 能结合 4 个 Ca<sup>2+</sup>, 分别称为 I、II、III、IV。N 端的 I、II 区为低亲和力区, C 端的 III、IV 区为高亲和力区(Reddy 等 2002)。

*CaM* 本身无活性, 一旦与 Ca<sup>2+</sup> 结合形成 *CaM*-Ca<sup>2+</sup> 后便发生构象变化, 暴露出疏水区, 该区能与依赖于 *CaM* 的靶酶相互作用而调节酶的活性。该过

收稿 2009-10-15 修定 2009-12-28  
资助 教育部科学技术研究重点项目(109054)。  
\* 通讯作者(E-mail: liuguanjun2003@126.com; Tel: 0451-82190607)。

程可逆,受细胞内钙离子浓度的调节(夏金虹 1997; Patel 等 1997)。细胞内 CaM 的水平最终是由胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度控制的,胞内静息态  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为  $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,胞内浓度高于  $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时,  $\text{Ca}^{2+}$  则结合 CaM (夏快飞等 2005)。

钙调蛋白参与多种生理活动的调节,如调控酶的活性、促进细胞增殖和调节微管解聚,从而进一步实现对有丝分裂的调控(夏金虹 1997)、调节细胞代谢(梁秋芬等 2005)、参与植物发育和激素反应、调节植物离子通道、参与植物病原反应与转录活性调节(毛国红等 2004; 张成和王之 2006)、参与植物对许多逆境信号的转导,钙信号再通过其下游的钙结合蛋白进行感受和转导,进而在细胞内引起一系列的生物化学反应以适应或抵制各种逆境的胁迫(Liu 等 2003)。

人们已经从各种动植物中,如:鸡脑(Putkey 等 1983)、马铃薯匍匐枝尖端(Jena 等 1989)、条斑紫菜(*Porphyra yezoensis* Ueda) (Wang 等 2009)、胡萝卜(Ishigaki 等 2004)、豇豆(张成和王之 2006)、小麦(Yang 等 1998; Mahalakshmi 等 2007)、野甘草(Saitoh 等 2007)分离或克隆得到了 CaM 基因并对其功能进行了初步研究。AtCaM3 表达转基因拟南芥的研究表明, AtCaM3 可以抑制冷诱导基因(cold regulated gene, COR)的表达,说明多种非生物胁迫都与  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 信号系统有关(张和臣等 2007)。最近的研究表明, CaM 能够增强抗氧化胁迫酶类如 SOD4 (superoxide dismutase)、cAPX (cytosolic ascorbate peroxidase)和 GR1 (glutathione reductase) 的表达(Hu 等 2007)。现今,已证实,盐过敏感(salt overly sensitive, SOS)信号途径在植物耐盐中起调控作用,在这一途径中,钙离子作为第二信使与钙离子结合蛋白结合并激活下游一系列蛋白,进而调控植物的耐盐性;已有报道认为,与植物耐盐相关的一些重要蛋白都是在  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 复合物的作用下发挥功能的(Imai 和 Yahara 2000; Botella 等 1996)。

西伯利亚蓼多生于盐碱地。本文从西伯利亚蓼叶 cDNA 文库中克隆了钙调蛋白(*PsCaM*)的完整编码区 cDNA 序列并对其序列进行了生物信息学分析,采用实时荧光定量 PCR 技术分析 3%  $\text{NaHCO}_3$  胁迫下 *CaM* 在西伯利亚蓼不同器官中的表达,为后期进一步研究该基因与耐盐的关系提供基础资料。

## 材料与方法

在黑龙江省肇东县东部盐碱地(东经  $126^{\circ} 01' 01''$ , 北纬  $46^{\circ} 00' 51''$ ),挖取西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum* Laxm.)地下茎段为繁殖材料,温室内扩繁。次年月初培育西伯利亚蓼地下茎扦插苗,用腐殖质和细砂混合物(比例为 3:1)作培养基质,每隔 24 h 用普通自来水浇苗。温室培养 1 个月,西伯利亚蓼苗高达 10~15 cm 时,用 3%  $\text{NaHCO}_3$  进行盐胁迫处理,每个处理 30 棵,重复 3 次,处理时间分别是 0、8、24、48 和 72 h,处理后用自来水反复冲洗后将叶片与茎分开分别取样(地下茎、茎、叶),同一时期统一取样,所取材料用液氮冷冻后立即放入  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存,备用。

PowerScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase、RQ1 RNase-Free DNase 购自 Promega 公司。SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TAKARA 公司。Taq DNA Polymerase 购自 TIANGEN 公司。Tris 饱和酚、 $\beta$ -巯基乙醇、氯仿、DEPC、琼脂糖、CTAB、硼砂、NaCl、LiCl、NaAC、无水乙醇及其他试剂都为分析纯。引物合成及测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

RNA 提取及 *PsCaM* 基因 cDNA 的扩增时将材料按照传统 SDS/苯酚法提取西伯利亚蓼地下茎、茎、叶总 RNA。参照 Smart<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech)说明,反转录合成 cDNA 第一链。根据西伯利亚蓼叶 cDNA 文库中 *PsCaM* 基因的 EST 序列,在 3' 非翻译区设计 5' RACE 引物及相应的巢式引物(只列出基因克隆的部分,其中带有 N 的为巢式引物)引物设计如下: CaM C N: 3' GGA-GAAACATTGAGCAGACAGA 5'; CaM C: 3' CGAATAACAACACTGGACAACCTTAC 5'。利用 Clontech 的 RACE 技术,获得 *PsCaM* 具有完整编码区的 cDNA,扩增所得的特异性片段通过 Promega 公司胶回收试剂盒进行回收,回收片段链接到载体 pMD18-T 中,下一步转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞,在含有 Amp/IPTG/X-Gal 的平板上进行蓝白斑及 Amp<sup>+</sup> 双重选择,挑取白斑,进行 PCR 检测后由上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

*PsCaM* 的序列分析采用 BioEdit 软件的 CAP (contig assembly program)进行电子拼接,NCBI 中

的BLASTX程序对*PsCaM*进行同源性比较,通过NCBI中开放读码区(open reading frame, ORF)程序查找该序列的ORF,软件ClustalX 1.8.1进行多序列比较和分子进化树的绘制。SignalP 3.0预测该蛋白的信号肽及可能的切割位点。通过ProtParam ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html))进行在线预测钙调蛋白基因编码蛋白的分子量及理论等电点。

*PsCaM*在西伯利亚蓼不同组织中荧光定量RT-PCR分析时,提取西伯利亚蓼胁迫前及胁迫后各时段地下茎、茎、叶RNA并反转录成cDNA。根据*PsCaM*基因全长cDNA设计其定量引物(CaM-S: 5' GGAGCAACTCACGGACGA 3'; CaM-A: 5' GAGGAACCCTGGGAAGTCAA 3'),以西伯利亚蓼18S rRNA基因为内参(18S-S: 5' GTATGGTCGCAAGGTGAAAC 3'; 18S-A: 5' TTAGCAGGCTGAGGTCTCGT 3'),对西伯利亚蓼地下茎、茎、叶中*PsCaM*基因在盐胁迫前后的表达量进行实时荧光定量分析。在MJ Research公司的DNA Engine Opticon-2™实时荧光定量PCR仪上进行RT-PCR。反应体系为:3 μL cDNA模板(第一链)、引物各1 μL、SYBR Premix ExTaq™(2×) 10 μL,加去离子水补齐至20 μL,PCR反应条件为:94 °C 30 s, 94 °C 12 s, 58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 45个循环,读板温度81 °C。结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Livak和Schmittgen 2001; Gulietti等2001)。

## 结果与讨论

### 1 西伯利亚蓼*PsCaM*完整读码区的扩增

根据西伯利亚蓼叶cDNA文库中获得的*PsCaM*基因的EST序列,采用5' RACE技术进行扩增*PsCaM*基因的5'端,根据3' RACE所得的产物序列在其翻译区设计引物扩增其cDNA,PCR扩增后,得到一条大小约为600 bp的DNA片段,与预期大小一致,将此条带回收、克隆并测序,测序结果为615 bp,为*PsCaM*具有完整读码区的cDNA序列。

### 2 西伯利亚蓼*PsCaM*基因及其编码蛋白序列分析

根据西伯利亚蓼叶片cDNA文库中获得的钙调蛋白(calmodulin) EST序列,应用cDNA末端快速扩增(RACE)技术克隆了其具有完整读码区的

cDNA序列(GenBank序列号GQ988382),全长615 bp,应用NCBI的ORF finder程序查找可知编码区为450 bp,编码149个氨基酸,5'非翻译区为63 bp,3'非翻译区为102 bp(图1)。通过ProtParam ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html))进行钙调蛋白基因编码蛋白的在线等电点预测,可知其蛋白的理论分子量为16.7 kDa、理论等电点为4.12。经SignalP 3.0预测该蛋白没有任何信号肽,为非分泌蛋白。

### 3 *PsCaM*基因序列的同源性分析和其氨基酸序列的系统进化树

钙调蛋白在生物体生命过程中起很重要的作用,其活性位点的突变常常是致死的,因此其结构和功能非常保守,这也说明其在一些生物和非生物应答过程中发挥相似的作用。将西伯利亚蓼的*PsCaM*基因序列与GenBank中其他植物中的钙调蛋白基因序列比对(图2)发现,*PsCaM*与辣椒(*Capsicum annuum*) CaM (P93087)、小麦(*Triticum aestivum*) TaCaM2-2 (AAC49582)、胡萝卜(*Daucus carota*) CaM-210 (AAT73623)、籼稻(*Oryza sativa* Indica Group) CaM-3 (A2WNH1)、阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*) CaM-7 (NP\_189967)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) CaM-5/6/7/8 (Q7DMN9)、遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*) CaM (ABN79277)、无梗花楸(*Quercus petraea*) CaM (CAH57708)、玉米(*Zea mays*) CaM-2 (NP\_001105547)、甜菜(*Beta vulgaris*) CaM (ACB32228)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) CaM-2 (AAM81203)等具有很高的同源性,核苷酸序列一致性在82%~84%,蛋白同源性高达98%,其中与辣椒(*Capsicum annuum*)的Calmodulin匹配最佳。用ClustalX软件对西伯利亚蓼CaM进行系统进化树分析比较,结果(图3)表明*PsCaM*与小麦、玉米和籼稻在进化关系较近,而与无梗花楸和甜菜进化关系较远。在不同植物的钙调蛋白之间有很高的同源性,因而推测其在进化上是相当保守的。

### 4 *PsCaM*基因的荧光定量RT-PCR分析

由于CaM与植物的耐盐有关并其在植物不同组织、器官中的含量不同,因此我们研究西伯利亚蓼叶、茎、地下茎在正常条件及盐胁迫下*CaM*的表达情况。荧光定量RT-PCR的结果表明,正常生长条件下,*PsCaM*在西伯利亚蓼的叶、茎、地下

```

1   AGA CAG ACG AGT TAC AAA GAG GGA GGA GGA AGA AGA AGA AGA AGG   45
46  GTC AAC AAG GAA GGA TTA ATG GCG GAG CAA CTC ACC GAC GAT CAA   90
1   M   A   E   Q   L   T   D   D   Q   9
91  ATT TCC GAG TTC AAG GAA GCT TTC AGC TTG TTC GAC AAG GAT GGA   135
10  I   S   E   F   K   E   A   F   S   L   F   D   K   D   G   24
136 GAC GGA TGT ATT ACT ACA AAG GAG CTT GGA ACA GTG ATG AGG TCA   180
25  D   G   C   I   T   T   K   E   L   G   T   V   M   R   S   39
181 CTG GGT CAG AAC CCG ACT GAG GCT GAG CTC CAG GAC ATG TTA AAT   225
40  L   G   Q   N   P   T   E   A   E   L   Q   D   M   L   N   54
226 GAA GTA GAT GCC GAT GGC AAT GGA ACC ATT GAC TTC CCA GGG TTC   270
55  E   V   D   A   D   G   N   G   T   I   D   F   P   G   F   69
271 CTC AAC TTA ATG GCT AGG AAG ATG AAG GAT ACC GAT TCT GAG GAG   315
70  L   N   L   M   A   R   K   M   K   D   T   D   S   E   E   84
316 GAG CTC AAG GAA GCA TTT AGA GTC TTT GAC AAG GAT CAG AAC GGT   360
85  E   L   K   E   A   F   R   V   F   D   K   D   Q   N   G   99
361 TTC ATC TCA GCT GCT GAG CTC CGC CAT GTG ATG ACT AAT CTG GGT   405
100 F   I   S   A   A   E   L   R   H   V   M   T   N   L   G   114
406 GAG AAA CTC ACT GAT GAG GAT GTT GAT GAG ATG GTT CGT GAG GCT   450
115 E   K   L   T   D   E   D   V   D   E   M   V   R   E   A   129
451 GAT GTG GAT GGC GAT GGC CAG ATC AAC TAT GAT GAG TTT GTA AAG   495
130 D   V   D   G   D   G   Q   I   N   Y   D   E   F   V   K   144
496 GTG ATG ATG GCC AAG TAA TTG CAC CAA GCT CTT AAT AAA TAA AAG   540
145 V   M   M   A   K   *   149
541 TTT CAC AGA TTG TAA TAT GTT TAG TGA TAT TAT ATG GTA GCT AAA   585
586 TAT GTA CCC CTC TTT GTA ACT CGT CTG TCT   615

```

图1 西伯利亚蓼 *PsCaM* 具有完整编码区 cDNA 序列及其氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and amino acid sequences of *PsCaM* cDNA form *P. sibiricum*

茎中均有表达, 叶中的表达量最高, 地下茎次之, 茎中最低, 与叶中相比茎中表达量在图中几乎没有显示出来(图 4-a)。3% NaHCO<sub>3</sub> 胁迫下不同时期 *PsCaM* 在叶(图 4-b)、茎(图 4-c)、地下茎(图 4-d)中的表达(图 4)显示, 胁迫不同时间的茎中的 *PsCaM* 的表达量波动最大。在盐胁迫条件下, 其对盐胁迫感应, 机制可能是通过钙离子作为第二信使并通过浓度的变化然后与钙调蛋白即钙调素结合, 激活下游一系列钙调素结合蛋白, 进而调控植物的耐盐性。*PsCaM* 在叶中的表达量表现为先降低后升高的趋势, 72 h 时表达最高, 表达量约为 0 h 的 3 倍; 24 h 时表达最低, 与 0 h 相比, 其表达几乎没有显示出来。在茎中的 *PsCaM* 表达量呈现先降

低后升高再降低的趋势, 48 h 时的表达最高, 与 0 h 几乎相同, 而表达最低的出现在胁迫后 8 h, 与 0 h 比的表达量也几乎没有显示出来。在地下茎中, *PsCaM* 表现为随时间的增加依次降低但最后又稍有些升高的趋势, 表达的最高点在 8 h, 与 0 h 几乎相同, 最低点在 48 h, 比 0 h 约高 40 倍。*PsCaM* 在地下茎、叶和茎中的表达形式有不同, 这可能是因为西伯利亚蓼中含有不止一种钙调蛋白, 而是含有许多同种蛋白的异型体, 行使类似的功能, 而这些钙调蛋白对盐胁迫信号做出的反应不同即 *CaM* 基因表达调控并非是一种 *CaM* 基因对应一种信号那样简单(王朝晖和孙大业 1997), 而具体原因有待进一步研究。

<i>Polygonum sibiricum</i> Laxm	MAEQQLTDDQISELKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Capsicum annuum</i>	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Triticum aestivum</i>	MADQLTDDQIAEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Daucus carota</i>	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Oryza sativa indica</i> Group	MADQLTDDQIAEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Solanum tuberosum</i>	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Thlaspi caerulescens</i>	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Quercus petraea</i>	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Zea mays</i>	MADQLTDDQIAEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Beta vulgaris</i>	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Medicago truncatula</i>	MADQLTDDQISEFKEAFSLFDKDGDDGCIITTKELGTVMRSLQQNPTEAELQ	50
<i>Polygonum sibiricum</i> Laxm	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Capsicum annuum</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Triticum aestivum</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Daucus carota</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Oryza sativa indica</i> Group	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Solanum tuberosum</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Thlaspi caerulescens</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Quercus petraea</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Zea mays</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Beta vulgaris</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Medicago truncatula</i>	DMINEVDADGNGTIDFPFNLNLMARKMKDTSSEELKEAFRVFDKDKQNGF	100
<i>Polygonum sibiricum</i> Laxm	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEIVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Capsicum annuum</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Triticum aestivum</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Daucus carota</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Oryza sativa indica</i> Group	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Solanum tuberosum</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Thlaspi caerulescens</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIKREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Quercus petraea</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Zea mays</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Beta vulgaris</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149
<i>Medicago truncatula</i>	ISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDDGGQINYDEFVKVMMMAK	149

图2 西伯利亚蓼 PsCaM 氨基酸序列与其他 11 种植物 CaM 氨基酸序列的比较

Fig.2 Alignment of amino acid sequence of PsCaM and other CaM of eleven plants

西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum*) (GQ988382)、辣椒(*Capsicum annuum*) (P93087)、小麦(*Triticum aestivum*) (AAC49582)、胡萝卜(*Daucus carota*) (AAT73623)、籼稻(*Oryza sativa Indica* Group) (A2WNH1)、阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*) (NP\_189967)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) (Q7DMN9)、遏蓝菜(*Thlaspi caerulescens*) (ABN79277)、无梗花楸(*Quercus petraea*) (CAH57708)、玉米(*Zea mays*) (NP\_001105547)、甜菜(*Beta vulgaris*) (ACB32228)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) (AAM81203)。

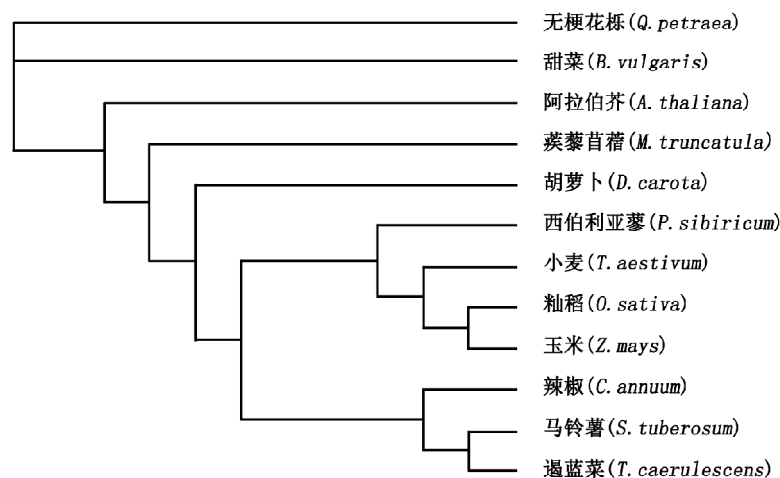


图3 PsCaM 与其它植物钙调蛋白系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of PsCaM and other plants CaM

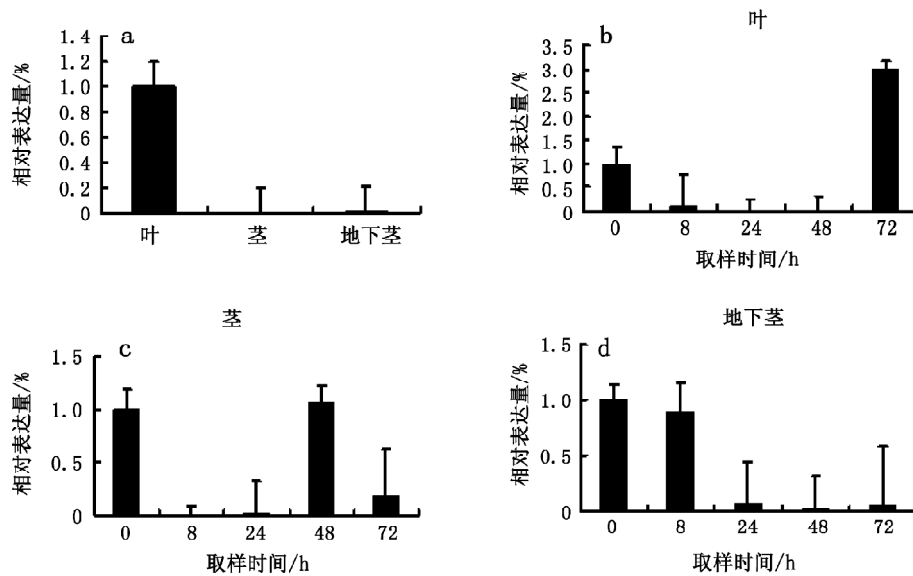


图4 NaHCO<sub>3</sub>胁迫下西伯利亚蓼 *PsCaM* 在叶、茎和地下茎中的表达

Fig.4 Expression of *PsCaM* gene in leaves, stems and rhizomes under NaHCO<sub>3</sub> stress

a: 正常生长条件下叶、茎和地下茎中 *PsCaM* 的表达; b: 3% NaHCO<sub>3</sub> 胁迫后不同时间 *PsCaM* 在叶中的表达; c: 3% NaHCO<sub>3</sub> 胁迫后不同时间 *PsCaM* 在茎中的表达; d: 3% NaHCO<sub>3</sub> 胁迫后不同时间 *PsCaM* 在地下茎中的表达。

## 参考文献

- 顾永清(1994). 钙调素的生理功能. 生物学通报, 29 (10): 12~17
- 梁秋芬, 刘宽灿, 徐碧玉, 金志强(2005). 钙调蛋白在植物发育中的功能. 生命科学研究, 9 (4): 1~5
- 毛国红, 宋林霞, 孙大业(2004). 植物钙调素结合蛋白研究进展. 中国生理与分子生物学报, 30 (5): 481~488
- 王朝晖, 孙大业(1997). 植物钙调素研究进展. 植物学通报, 14 (1): 1~7
- 夏金虹(1997). 钙调蛋白的功能. 自然科学, 18 (3): 41~44
- 夏快飞, 梁承邨, 叶秀森(2005). 钙调素及钙调素相关蛋白在植物细胞中的研究进展. 广西植物, 25 (3): 269~273
- 张成, 王之(2006). 豇豆钙调蛋白 cDNA 的克隆及序列分析. 陕西师范大学学报(自然科学版), 34 (2): 88~91
- 张和臣, 尹伟伦, 夏新(2007). 非生物逆境胁迫下植物钙信号转导的分子机制. 植物学通报, 24 (1): 114~122
- 张君诚, 孟玉环, 宋育红, 刘思衡, 庄伟建(2005). 植物 Ca<sup>2+</sup>-CaM 信号系统及其调控研究进展. 重庆师范大学学报, 22 (4): 49~52
- 周江菊, 夏快飞(2005). 植物体内 Ca<sup>2+</sup> 信号转导过程的研究进展. 广西植物, 25 (4): 386~392
- Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M (1996). Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*). Plant Mol Biol, 30: 1129~1137
- Feinstein PG, Schrader KA, Bakalyar HA, Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG, Reed RR (1991). Molecular cloning and characterization of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain. Biochem, 88: 10173~10177
- Gulietti A, Overbergh L, Valckx D (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods, 25 (4): 386~401
- Hu XL, Jiang MY, Zhang JH, Zhang AY, Lin F, Tan MP (2007). Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in leaves of maize (*Zea mays*). plants New Phytol, 173 (1): 27~38
- Imai J, Yahara I (2000). Role of HSP90 in salt stress tolerance via stabilization and regulation of calcineurin. Mol Cell Biol, 20: 9262~9270
- Ishigaki E, Asamizu T, Arisawa M, Kurosaki F (2004). Cloning and Expression of Calmodulin Genes Regulating Phytoalexin Production in Carrot Cells. Pharmaceutical Soci of Japan, 27 (8): 1308~1311
- Jena PK, Reddy ASN, Poovaiah BW (1989). Molecular cloning and sequencing of a cDNA for plant calmodulin: Signal-induced changes in the expression of calmodulin. Botany, 86: 3644~3648
- Liu HT, Li B, Shang ZL, Li XZ, Mu RL, Sun DY, Zhou RG (2003). Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. Plant Physical, 132: 1186~1195
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. Methods, 25 (4): 402~408
- Mahalakshmi A, Singla B, Khurana JP, Khurana P (2007). Role of calcium-calmodulin in auxin-induced somatic embryogenesis in leaf base cultures of wheat (*Triticum aestivum* var. HD 2329). Plant Cell Tiss Organ Cult, 88: 167~174
- Patel S, Morris SA, Adkins CE, O'Beirne G, Taylor CW (1997).

- Ca<sup>2+</sup>-independent inhibition of inositol trisphosphate receptors by calmodulin: Redistribution of calmodulin as a possible means of regulating Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Neurobiol*, 94: 11627~11632
- Putkey JA, Ts'ui KF, Tanaka T, Lagace L, Stein JP, Lai EC, Means AR (1983). Chicken Calmodulin Genes. *The J Biol Chem*, 258 (19): 11864~11870
- Reddy ASN, Day IS, Narasimhulu SB (2002). Isolation and characterization of a novel calmodulin binding protein from potato. *J Biol Chem*, 277 (6): 4206~4 214
- Saitoh D, Asakura Y, Nkembo MK, Shite M, Sugiyama R, Lee JB, Hayashi T, and Kurosaki F (2007). Cloning and Expression of Calmodulin Gene in *Scoparia dulcis*. *Pharmaceutical Soci of Japan*, 30 (6): 1161~1163
- Wang MQ, Mao YX, Zhuang YY, Kong FN, Sui ZH (2009). Cloning and analysis of calmodulin gene from *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta). *J Ocean University of China (English Edition)*, 8: 247~253
- Yang TB, Simcha LY, Feldman M, Fromm H(1998). Developmentally regulated organ-, tissue-, and cell-specific expression of calmodulin genes in common wheat. *Plant Mol Biol*, 37: 109~120