

番茄 *LeCIPK3* 的克隆及非生物胁迫诱导的表达分析

李莉, 李毅, 王长春, 王锋青, 杨玲*

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004

摘要: CIPK是植物钙感受器蛋白钙调磷酸酶B类似蛋白特定靶向的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。采用同源基因克隆法, 在番茄叶中克隆了一个与 *AtCIPK3* 处于同一亚组的基因, 命名为 *LeCIPK3*。表达分析表明, *LeCIPK3* 主要在根和花中表达, 在叶中的表达受脱落酸、聚乙二醇及低温的诱导, 可能在番茄多种胁迫抗性中起重要作用。

关键词: 番茄; CIPK; 克隆; 表达; 非生物胁迫

Cloning and Expression Analysis of *LeCIPK3* in Tomato Seedlings under Abiotic Stress

LI Li, LI Yi, WANG Chang-Chun, WANG Feng-Qing, YANG Ling*

College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004, China

Abstract: CIPK (calcineurin B-like proteins-interacting protein kinase), a plant-specific family of serine-threonine protein kinase, is specifically targeted by calcineurin B-like proteins. The degenerate primers were designed on the basis of a highly conserved region in N terminal of CIPK family. A *CIPK* gene, which was assigned into the same sub-group as *AtCIPK3*, was cloned from tomato leaves and named as *LeCIPK3*. The expression analysis showed *LeCIPK3* had highest expression level in flowers and roots under the normal condition, while it could be induced in leaves by abscisic acid, polyethylene glycol and cold. These results suggested that *LeCIPK3* might be involved in many types of abiotic stresses.

Key words: *Lycopersicon esculentum*; CIPK; clone; expression; abiotic stress

为适应干旱、高盐、低温等各种非生物胁迫, 植物激活了包括信号识别、转导及特异性胁迫相关基因的表达等分子网络级联反应, 发生一系列分子、细胞和生理的变化, 从而提高对逆境的适应性。这种诱导型的环境适应过程在植物中普遍存在, 且对于植物的生存适应非常重要(Xiong等2002; Kolukisaoglu 等 2004)。

大量证据表明 Ca^{2+} 是参与植物环境适应普遍的第二信使, 通过与钙感受器蛋白结合, 传递、放大特异性的钙信号, 从而引起一系列的生理反应(Batistic 和 Kudla 2009; Luan 2009)。钙调磷酸酶B类似蛋白(calcineurin B-like protein, CBL)是近年来发现的植物所特有的一类新型EF手型钙感受器蛋白, 结构非常保守, 当其识别钙信号后, 需与下游的CIPK (CBL interacting protein kinase, 也称SnRK3或PKS)结合发挥效能(Batistic 和 Kudla 2004; Luan 2009)。CIPK 是一类具有生物活性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 通常具有N端激酶域和C端调节域。

C端调节域内有一保守的21~24个氨基酸结构, 能有效结合CBL, 由于功能上的重要性和具有保守的氨基酸结构 Asn-Ala-Phe, 该区域被定义为NAF结构域(Albrecht 等 2001)。在拟南芥、水稻和银杨中相继发现分别有26、30和27个CIPK基因, 各有10个CBL基因(Kolukisaoglu 等 2004; Yu 等 2007; Batistic 和 Kudla 2009)。

虽然CBL和CIPK各自家族内成员间结构非常保守, 但这些相似蛋白的功能却并非相同。由于CBL与CIPK互作才能将信号向下游传递, 理论上它们的组合将会产生数以百计的信号通路来充分应对各种胁迫及生长发育的要求, 这预示存在着复杂多样、信号间交叉传导的网络系统。目前已部分解析了CBL/CIPK信号途径在植物盐害、低钾、

收稿 2010-01-22 修定 2010-05-07

资助 国家自然科学基金(30700519)、浙江省自然科学基金(Y3090645)和浙江省大学生科技创新项目。

* 通讯作者(E-mail: yangl@zjnu.cn; Tel: 0579-82282396)。

硝酸盐等胁迫抗性中的生物学功能(Xu等2006; Cheong等2007; Mahajan等2008; 张俊文等2008; Hu等2009; Luan2009)。CIPK序列保守, 在同一植物中序列高度相似的CIPK间存在一定的功能冗余, 但不同个体CIPK可能介导特殊的抗逆反应; 在不同的植物中, 高度相似的CIPK其功能可能相同, 也可能不同(Mahajan等2006; Martinez-Atienza等2007), 这就要求必须对不同物种CIPK功能进行详细的研究, 从而揭示CIPK介导的复杂网络机制, 为通过基因工程手段改良作物抗逆性提供可能。

番茄是研究基因功能的模式植物之一。虽然CBL-CIPK部分信号途径研究在拟南芥和水稻中获得重大突破, 但番茄中的相关研究尚未见报道。本研究根据拟南芥CIPK的保守区设计简并引物, 以低温处理的番茄叶片cDNA为模板, 克隆得到一个CIPK基因, 并分析了其在非生物胁迫下的表达。

材料与方 法

番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.) ‘中蔬四号’种子用1%次氯酸钠溶液消毒5 min, 水清洗干净, 均匀播种于铺有湿滤纸的培养皿内, 置28 °C培养箱培养。当胚根萌发后, 移至营养土中培养, 昼夜温差为28 °C/22 °C, 相对湿度约70%, 光照时间14 h·d⁻¹, 光照强度300 μmol·m⁻²·s⁻¹。当植株长至三叶期时用Hoagland营养液培养, 四叶一心期时分别转移至15%聚乙二醇(PEG-6000)、20 μmol·L⁻¹ ABA溶液和4 °C冷室中处理, 分别于处理0、2、6、12和24 h时取样; 剪取番茄四叶期的根、茎、叶及成熟期的花、果实。快速液氮冷冻, 保存于-80 °C中备用。

根据已报道的多个拟南芥CIPK基因保守区序列, 设计简并引物1, 1-F为: 5' CA(A/G)ATAA(A/G)-GCGGGAGAT 3', 1-R为: 5' ATG(C/T)TT(A/G)AA-(C/T/A)CCTTTCTT(G/A)AAC 3'。TRIzol试剂法提取冷处理的番茄叶片总RNA, 逆转录为cDNA, PCR扩增基因片段。反应条件为: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性30 s, 53 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环; 然后72 °C延伸10 min。在推测的ORF序列两侧设计特异引物2, 2-F为: 5' ATGAATC-

AGGCAAAAATCAAGC 3', 2-R为: 5' CTACCTAGCTTGCATGTCCTC 3'。以冷处理番茄叶片cDNA为模板, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸2 min, 其余步骤同上, 扩增得到该基因的ORF序列。扩增产物用H.Q.&Q凝胶回收试剂盒割胶回收后连接pMD18-T载体上, 测序。

在NCBI数据库进行番茄CIPK序列的BLASTx检索, 将其氨基酸序列与同源性较高的CIPK和功能明确的AtCIPK3通过Clustalx1软件比对, 用GeneDoc软件输出结果。运用MEGA 4.1软件进行进化树分析。在拟南芥基因组网站(<http://mips.gsf.de/proj/thal/db/Index.html>)得到拟南芥CIPK的氨基酸序列, 在网站(<http://www.expasy.org/prosite>)进行番茄CIPK氨基酸序列的结构分析。

半定量RT-PCR分析基因转录水平时, 以不同逆境处理和不同组织的cDNA为模板, 根据所得序列非保守区设计特异引物3, 3-F为: 5' TCAGTTAT-ACGAGGTGTTGGC 3', 3-R为: 5' ACATCATCC-AGGTTGGCATCTC 3', PCR循环数为28。以番茄Actin为内参, Actin-F为: 5' GAACTGGAATGGT-GAAGGCTG 3', Actin-R为: 5' ACACGAAGCTC-ATTGTAGAAA 3'。重复3次。

结果与讨论

1 番茄CIPK基因的克隆

根据已知的拟南芥CIPK基因保守区序列, 设计简并引物1, 在冷处理的番茄叶片cDNA中PCR扩增出约654 bp的片段, 经BLASTn比对发现该片段位于已注册的1 987 bp的番茄cDNA(登录号AK327356.1)内部538~1 191 bp序列之间。DNASTar分析预测该cDNA序列包含一个1 314 bp的开放阅读框。按材料与方法所述, 设计特异性引物2, 克隆得到了LeCIPK基因1 314 bp的开放阅读框序列, 与AK327356.1内部370~1 683 bp间序列完全一致。BLASTx比对结果表明, 该序列与蓖麻(*Ricinus communis*) CIPK(ACG56676.1)有93%相似性, 与葡萄(*Vitis vinifera*) CIPK18(ACQ83534)有91%相似性, 与胡杨(*Populus trichocarpa*) CIPK3(ABJ91211)有86%相似性, 与豇豆(*Vigna unguiculata*) CIPK1

(BAF74756.1)有85%相似性,与*AtCIPK3* (At2g26980)相似性达82%。

2 生物信息学分析

CIPK是一类保守的蛋白激酶, N端激酶域高度类似于酵母 SNF1 (sucrose non-fermenting), C端的NAF结构域高度保守。通过蛋白质分析系统推断LeCIPK蛋白的分子量49.73 kDa, 等电点6.72。用PROSITE数据库分析表明: 氨基酸第13~268位为蛋白激酶结构域, 第19~42位IGEGTFKVKF-ARNSETGEAVAIK为蛋白激酶ATP结合区, 第

132~144位VYHRDLKPENLLL为Ser/Thr蛋白激酶活性位点, 第154~183位DFGLSALSQQVRRDGLLHTTCGTPNYVAPE为激活环; 在调节域中, 第306~330位EQPTPMNAFELISMSKGLNLGNLFD为CIPKs蛋白家族保守的NAF结构域(图1)。将预测的蛋白序列与已知的多个CIPK进行比较, 激酶域中的功能位点和NAF域与其他CIPK一样非常保守, 进一步证实该基因为LeCIPK家族中的一员, 推测的开放阅读框可能为实际的阅读框。

拟南芥CIPK家族、LeCIPK及其同源性较高

LeCIPK	: MNQ AKIKRRVVKYEMGRTIGEGTFKVKFARNSETGEAVAIKILDKDKVLKHKMAEQIKREIATMMLIRHPHVQLYEV	79
VvCIPK18	: --P P-V-----P-----E-----K--N--R---	79
VuCIPK1	: -SQ P-----I-----P-----E-----K--N--R---	79
AtCIPK3	: --RRQQV-----P--L-----E-----N-----	80
LeCIPK	: LASKTKIFIVLEFVTGGELFDKIVNHGRMHEKEARKYFQQLINAVDYCHSRGVYHRDLKPENLLLVDVNGNLKVSDFGLSA	159
VvCIPK18	: MG-----R-D--R-----AY-----	159
VuCIPK1	: MG-----YV-----S-N--R-----TY-----	159
AtCIPK3	: MA-----I--Y-----D--K-D--R-----H-----SY---I-----	160
LeCIPK	: LSQQVRRDGLLHTTCGTPNYVAPEVLNDHGYDGTATDLWSCGVILFVLLAGYLPFDDSNLINLYKKISAAEFTCPPWMSF	239
VvCIPK18	: -----R--A-----MI-----L--	239
VuCIPK1	: -----R--A-----P--M-----L--	239
AtCIPK3	: -----S-----R--A--M--V-Y-L-----M-----SG--N--L-L	240
LeCIPK	: GAMKLITRILDPNMTRITISEILEDEWFKKDYKSDIFNEKGDANLDDVEAVFKDSEHHVTEKKEEQPTPMNAFELISM	319
VvCIPK18	: -----P-----G--P-V-E-----T---AA-----	319
VuCIPK1	: S-----T---P--D-----P-V-E-N-EI-----S-----	319
AtCIPK3	: -----V-PQ--FE-----P-V-E-RD-S-M--ID-----L---R---AAI-----	320
LeCIPK	: SKGLNLGNLFD EQEFKRETRFTSKCSANEIISKIEEAAKPLGFDVHKKNYKMRLENVKAGRKGNLNVATEVVFQVAPSLH	398
VvCIPK18	: -R-----I--G-----P--H--V-----M-----	399
VuCIPK1	: -----E--T--G-----SP-D--N-----Q-----I-----	399
AtCIPK3	: -R--E--P-----I-LRGG-----E-----Q-----YIT	375aa
LeCIPK	: MVEVRKAKGDTLEFHKFYKNLSTSLLEDVWVKTEEDMQAR	437 aa
VvCIPK18	: -----D---ETK	439 aa
VuCIPK1	: -----K---D-----D---MRETN	441 aa

图1 番茄CIPK与其他植物CIPK氨基酸序列的同源性比较

Fig.1 Homology comparison of CIPK amino acid sequences in tomato (Le) and other plants

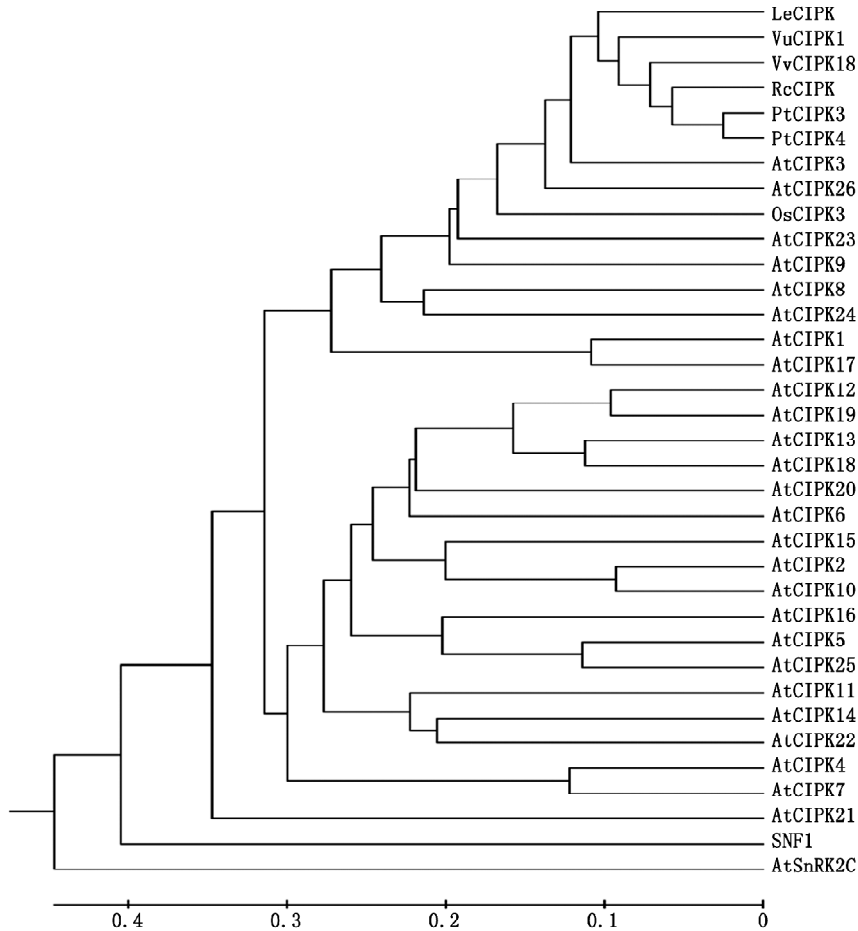
方框内为ATP结合区; 下划线为蛋白激酶活性位点; 黑色背景为激活环; 灰色背景为NAF结构域; 虚线部分为相同的氨基酸; 空格为缺失氨基酸。GenBank登录号分别为葡萄VvCIPK18 (ACQ83534)、豇豆VuCIPK1 (BAF74756.1)和拟南芥AtCIPK3 (At2g26980)。

的其他物种的CIPK蛋白间的进化关系见图2。LeCIPK属于CIPK激酶组, 与AtCIPK3处于同一亚组, 因此将此基因命名为LeCIPK3。

3 LeCIPK3基因的表达分析

采用RT-PCR技术分析了LeCIPK3在番茄不同组织中的转录水平, 发现该基因在番茄的花与根中具有较高的表达水平, 在茎、叶、果实中的表达量很低(图3-A), 说明该基因的表达存在组织特异性。

CIPK在植物对多种胁迫抵御中起着重要作用(Xu等2006; Cheong等2007; Mahajan等2008; Hu等2009; Luan2009)。进化树分析显示LeCIPK3与AtCIPK3属同一亚组。这一亚组成员中, AtCIPK3参与了ABA和冷胁迫的信号传导途径(Kim等2003), VuCIPK1受冷、干旱胁迫诱导表达(Imamura等2008)。这暗示LeCIPK3可能也具有相似的功能。为了明确LeCIPK3在番茄抗逆性中的作用, 进一步分析了该基因在PEG、ABA、低

图2 *LeCIPK* 与相关蛋白激酶的进化分析Fig.2 Phylogenetic analysis of *LeCIPK* and related protein kinases

VuCIPK1 (BAF74756.1)来源于豇豆; *VvCIPK18* (ACQ83534)来源于葡萄; *RcCIPK* (ACG56676.1)来源于蓖麻; *PtCIPK3* (ABJ91211)和 *PtCIPK4* (ABJ91212)来源于银杨; *OsCIPK3* (AP003818)来源于水稻; *SNF1* (AAA35058)来源于酵母; *AtCIPK1* (At3g17510)、*AtCIPK2* (At5g07070)、*AtCIPK3* (At2g26980)、*AtCIPK4* (At4g14580)、*AtCIPK5* (At5g10930)、*AtCIPK6* (At4g30960)、*AtCIPK7* (At3g23000)、*AtCIPK8* (At4g24400)、*AtCIPK9* (At1g01140)、*AtCIPK10* (At5g58380)、*AtCIPK11* (At2g30360)、*AtCIPK12* (At4g18700)、*AtCIPK13* (At2g34180)、*AtCIPK14* (At5g01820)、*AtCIPK15* (At5g01810)、*AtCIPK16* (At2g25090)、*AtCIPK17* (At1g48260)、*AtCIPK18* (At1g29230)、*AtCIPK19* (At5g45810)、*AtCIPK20* (At5g45820)、*AtCIPK21* (At5g57630)、*AtCIPK22* (At2g38490)、*AtCIPK23* (At1g30270)、*AtCIPK24/SOS2* (At5g35410)、*AtCIPK25* (At5g25110)和 *AtCIPK26* (At5g21326)来源于拟南芥。

温胁迫下的表达。结果表明, 3种处理均显著诱导了 *LeCIPK3* 在番茄叶中的表达。 *LeCIPK3* 表达量在 ABA 处理 6 h 后急剧增加, 直到 24 h 均保持了较高的表达水平(图 3-B)。PEG 处理后, *LeCIPK3* 表达虽然也显著增强, 但诱导的速度明显滞后于 ABA 的诱导, 到 24 h 时才有显著提高(图 3-C), 这表明 *LeCIPK3* 的表达对 ABA 可能更敏感。低温处理后, *LeCIPK3* 的表达逐渐增强, 在 24 h 达到最大(图 3-D)。

ABA 是广谱的胁迫激素, 干旱胁迫也涉及 ABA 的信号转导途径(Zhu 2002), 因此 PEG 可能与 ABA 具有相似的诱导作用。实验结果表明, *LeCIPK3* 均可被 PEG 与 ABA 诱导, 并具有相似的表达模式(图 3-B、C), 说明 *LeCIPK3* 可能确实在抵御干旱胁迫中发挥作用。二者相比, ABA 能更加快速的诱导 *LeCIPK3* 的表达, 这间接说明 PEG 诱导 *LeCIPK3* 的表达可能是通过 ABA 来实现的。此外, *LeCIPK3* 在冷处理胁迫下随着时间的延长, 表达量逐渐增高,

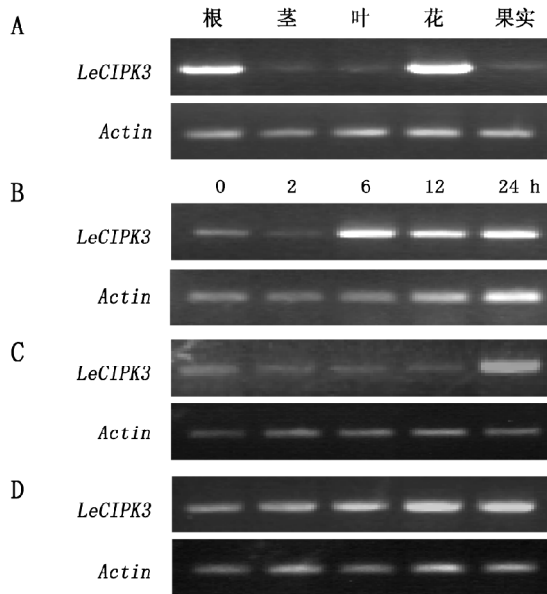


图3 半定量RT-PCR分析 *LeCIPK3* 基因在番茄组织部位及逆境处理下的表达

Fig.3 Expression pattern of *LeCIPK3* gene in different tissues and under abiotic stresses by semi-quantitative RT-PCR

A: 不同组织中的表达; B: $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 处理; C: 15% PEG-6000 处理; D: $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 处理。

表明 *LeCIPK3* 在番茄抗冷胁迫中也起着重要作用, 这说明不同基因个体可能具有独特的作用。综上所述, 我们认为 *LeCIPK3* 可能在番茄的抗旱与抗冷胁迫中起着重要作用。

参考文献

- 张俊文, 魏建华, 王宏芝, 王彦珍, 马荣才, 李瑞芬(2008). CBL-CIPK 信号系统在植物应答逆境胁迫中的作用与机制. 自然科学进展, 18: 847~856
- Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K, Kudla J (2001). The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca^{2+} -regulated kinases. EMBO J, 20: 1051~1063
- Batistic O, Kudla J (2004). Intergration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. Planta, 219: 915~924
- Batistic O, Kudla J (2009). Plant calcineurin B-like proteins and

- their interacting protein kinases. Biochim Biophys Acta, 1793: 985~992
- Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, Batistic O, Li L, Kim BG, Lee SC, Kudla J, Luan S (2007). Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. Plant J, 52: 223~239
- Hu HC, Wang YY, Tsay YF (2009). AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. Plant J, 57: 264~278
- Imamura M, Yuasa T, Takahashi T, Nakamura N, Htwe NMPS, Zheng SH, Shimazaki KI, Iwaya-Inoue M (2008). Isolation and characterization of a cDNA coding cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, *VuCIPK1*. Plant Biotechnol, 25: 437~445
- Kim KN, Lee JS, Han H, Choi SA, Go SJ, Yoon IS (2003). Isolation and characterization of a novel rice Ca^{2+} regulated protein kinase gene involved in responses to diverse signals including cold, light, cytokinins, sugars and salts. Plant Mol Biol, 52: 1191~1202
- Kolukisaoglu U, Weinl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. Plant Physiol, 134: 43~58
- Luan S (2009). The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. Trends Plant Sci, 14: 37~42
- Mahajan S, Pandey GK, Tuteja N (2008). Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. Arch Biochem Biophys, 471: 146~158
- Mahajan S, Sopory S, Tuteja N (2006). Cloning and characterization of CBL-CIPK signaling components from a legume (*Pisum sativum*). FEBS J, 273: 907~925
- Martinez-Atienza J, Jiang X, Garciadablas B, Mendoza I, Zhu JK, Pardo JM, Quintero FJ (2007). Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice. Plant Physiol, 143: 1001~1012
- Xiong L, Schumaker KS, Zhu JK (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell, 14: 165~183
- Xu J, Li HD, Chen LQ, Wang Y, Liu LL, He L, Wu WH (2006). A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K^{+} transporter AKT1 in *Arabidopsis*. Cell, 125: 1347~1360
- Yu Y, Xia X, Yin W, Zhang H (2007). Comparative genomic analysis of CIPK gene family in *Arabidopsis* and *Populus*. Plant Growth Regul, 52: 101~110
- Zhu JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol, 53: 247~273