

## 拟南芥 *CKL3* 基因表达对非生物胁迫的响应

郭新红, 王婕, 秦玉芝, 喻达时, 刘选明\*

湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 长沙 410082

**摘要:** 以拟南芥为材料, 采用 PCR 和 RT-PCR 技术在 DNA 和 RNA 水平上鉴定出了与 *CKL3* 基因对应的 T-DNA 插入纯合突变体, 并对其表型变化进行了观察。半定量 RT-PCR 检测 *CKL3* 基因在拟南芥不同器官和非生物胁迫响应中表达的结果表明, *CKL3* 基因在根、花、叶中表达较高, 在茎、叶柄中表达较弱; 盐胁迫下 *CKL3* 基因表达下降, 蓝光下 *CKL3* 基因表达升高, 但热激和红光对此基因表达量的影响不大。

**关键词:** 拟南芥; *CKL3* 基因; 基因克隆; 非生物胁迫; 表达分析

## Responses of *CKL3* Gene Expression to Abiotic Stresses in *Arabidopsis*

GUO Xin-Hong, WANG Jie, QIN Yu-Zhi, YU Da-Shi, LIU Xuan-Ming\*

Bioenergy and Biomaterial Research Center, Institute of Life Science and Technology, Hunan University, Changsha 410082, China

**Abstract:** The homozygous T-DNA mutants of the *CKL3* gene in *Arabidopsis* were identified at DNA and RNA levels, and its phenotypic changes were observed. The Semi-Quantitative RT-PCR was used for the analysis of the expression levels of *CKL3* gene in the different tissues and under abiotic stresses. The expression profiling showed that *CKL3* was highly expressed in roots, flowers and leaves, and less in stems and leafstalks. It was found that *CKL3* gene was induced by blue light and inhibited by salt stress, but not regulated by heat shock at 37 °C and red light.

**Key words:** *Arabidopsis*; *CKL3* gene; gene cloning; abiotic stress; expression analysis

酪蛋白激酶(casein kinase, CK)是广泛存在于真核生物的丝/苏氨酸蛋白激酶, 包括 CK1 和 CK2 两大亚类。后者是一种多效的能利用 ATP 或 GTP 作为磷酸基团供体的蛋白激酶, 由 4 个亚基  $\alpha\alpha'\beta\beta'$  组成。有报道认为 160 种蛋白可在体外被 CK2 修饰, CK2 与转录调控、细胞增殖、信号转导、发育和肿瘤发生等有关(Johnson 等 1998)。前者是以单体形式在体内各组织以及在细胞各种膜区室分布广泛的激酶, 与 DNA 修复、代谢调控、有丝分裂和信号转导的调节等过程有关(Gross 和 Anderson 1998; Bioukar 等 1999; Kemp 和 Pearson 1990; Gietzen 和 Virshup 1999)。植物如黄豆(Murray 等 1978a)、*Brassica cauliflora* (Murray 等 1978b)、小麦胚(Rychlik 和 Zagorski 1980)、烟草(Erdmann 等 1982)、玉米幼苗(Dobrowolska 等 1987)、青花菜(Klimczak 和 Cashmore 1993)、拟南芥(Klimczak 等 1995; Lee 等 2005)、四棱豆(Mukhopadhyay 1997)和玉米胚乳(Babatsikos和Yupsanis 2000)中均已分离纯化得到 CK1。同源比较表明在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组中可搜索到 21 个可能的 CK1 同工酶的 cDNA 序列。到目前为止, 除了

Liu 等(2003)报道了水稻 *OsCK1* 基因的生理功能以外, 其他植物中 CK1 的生理功能研究尚不多见。

迄今, 拟南芥 CK2 类蛋白中 CKB3 和 CKB4 的植物体内功能研究已有报道。Daniel 等(2004)报道, CK2 的调节亚基 CKB3 过表达可以影响拟南芥生物钟的调节, 他们进一步的实验证明, CKB3 通过调节 CCA1 的磷酸化调控植株的生物钟, 因此认为 CK2 对维持拟南芥生物钟的正常功能非常重要。近年来, Perales 等(2006)认为 CK2 的调节亚基 CKB4 是一个核定位蛋白, 在生物体内以同分异构体存在, 其磷酸化异构体是蛋白质的泛素/蛋白酶体降解途径中的首选底物, CKB4 蛋白酶体降解受拟南芥生物钟的调节。CKB3 和 CKB4 是迄今发现与光信号转导途径有关的 2 个酪蛋白激酶基因。但拟南芥 CK1 类蛋白功能的分析尚未见报道。拟南芥 *CKL3* 基因属于 CK1 类蛋白, 全长 1 769 bp cDNA 序列

收稿 2008-04-09 修定 2008-06-23

资助 国家自然科学基金(30600368、30770200)和 2006 年湖南省高校青年骨干教师资助项目(521298185)。

致谢 美国加州大学洛杉矶分校林辰涛先生曾给予指导。  
\* 通讯作者(E-mail: sw\_xml@hnu.cn; Tel: 0731-8821721)。

(AGI 编号: AY547391), CDS 长度为 1248 bp, 编码 415 个氨基酸。本文对拟南芥 CK1 类蛋白中的 *CKL3* 基因表达和 T-DNA 插入突变体做了鉴定分析, 以期为进一步采用此基因改良农作物产量和品质时参考。

## 材料与amp;方法

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *CKL3* (At4g28880) 基因的 T-DNA 插入突变体 Salk\_110494 购自美国 Salk 研究院遗传分析实验室 (Salk Institute Genomic Analysis Laboratory), 野生型拟南芥为 Columbia 生态型。拟南芥种子用 70% 酒精溶液浸泡, 吸出酒精溶液后用无菌水清洗 4~6 次, 然后用 0.1%  $\text{HgCl}_2$  浸泡 7 min, 吸出后用无菌水清洗 4~6 次, 放入 4℃ 冰箱中 4 d。播种时, 种子用 0.1% 琼脂悬液悬浮后均匀点播在含 0.8% 琼脂的固体培养基表面, 置于 22℃ 光照培养箱中培养。移栽的植株则放在培养室中于长日照条件下 (光照  $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ , 光照强度为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) 生长。取 2 周龄拟南芥幼苗在液氮中速冻后, 储存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中供抽提 RNA 和 RT-PCR 分析用。另外, 分别收取 5 周龄植株的根、茎、叶、叶柄、花放在液氮中速冻后储存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中供目标基因的组织表达分析用。取 T-DNA 插入突变体和野生型植株的新生叶 3~4 片, 用 DNA Plant Mini Kit (Ambiogen 生物技术有限公司) 方法提取总 DNA。

非生物胁迫处理均以生长 2 周龄的拟南芥进行热激和盐胁迫处理。(1) 幼苗放在  $37^\circ\text{C}$  恒温箱中处理 0、1、2、3、6、8、10 h。(2) 根放在含  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 的液体培养基中处理 0、1/4、1/2、1、2、4 h。(3) 22℃ 条件下暗培养 6 d 的拟南芥幼苗放在蓝光和红光下分别处理 0、1、6、12、24 h。蓝光和红光光源分别为 LED-B (波长为 470 nm, 半幅宽为 30 nm) 和 LED-R (波长为 660 nm, 半幅宽为 20 nm), 光照强度均为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。各种处理材料分时收获, 并以液氮速冻后储存于  $-80^\circ\text{C}$  冰箱中供目标基因的非生物胁迫诱导表达分析用。

总 RNA 的抽提采用 RNAeasy Mini Kit (Ambiogen 生物技术有限公司) 按照说明进行, 反转录按照 Invitrogen M-MLV Reverse Transcriptase Instruction 操作, 取  $2 \mu\text{g}$  经 DNaseI 处理的总 RNA

用于 cDNA 第一链的合成, 产物作为 RT-PCR 模板。

以提取的总 DNA 为模板, 用 T-DNA 的特异引物  $R_0$  (5' TGGTTCACGTAGTGGCCATC 3') 及基因 5' 与 3' 端引物进行 PCR 反应。鉴定突变体 Salk\_110494 的 5' 与 3' 端引物分别为 Salk\_110494 (+) (5' CTAAACAACAACCCTAAATCCTT 3') 和 Salk\_110494 (-) (5' ATGTCCAACAACACTGAGAAAAGAG 3')。在相同 PCR 反应体系中, 分别加入不同引物组合: 基因 5' 与 3' 端引物各  $1 \mu\text{L}$ , 基因 3' 引物及 T-DNA 的特异引物  $R_0$  各  $1 \mu\text{L}$ 。PCR 程序为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $52^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 40 s, 30 个循环后延伸 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

用于 *CKL3* 组织表达和非生物胁迫诱导表达的引物为 5' GGCAGTTCCTGGGTCTAGCAATC-3' 和 5' AATTAAGGGCACGGAGTCACATTA 3'。内参肌动蛋白 2 引物为 5' GCAAGTCATCACGAT-TGGTG 3' 和 5' ACAGTGTCTGGATCGGTGGTTC 3'。PCR 程序为:  $95^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $95^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $55^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 30 s, 28 个循环后延伸 10 min。每个 RT-PCR 分析重复 3 遍。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

## 结果与amp;讨论

### 1 T-DNA 插入突变体的鉴定

根据 ATIDB (*Arabidopsis thaliana* Integrated Database) 提供的信息, 得知 Salk\_110494 突变体为正向插入, 插入位点在 *CKL3* 基因外显子 154 bp 处。对 Salk\_110494 T-DNA 插入突变体进行 DNA 分子水平的鉴定, 图 1 为 Salk\_110494 突变体 1~6 号株系的鉴定结果, 株系 5 鉴定为突变纯合子。

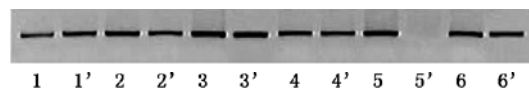


图 1 Salk\_110494 T-DNA 插入突变体的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of Salk\_110494 T-DNA mutants 1~6 的引物为  $R_0$ /Salk\_110494 (-); 1'~6' 的引物为 Salk\_110494(+)/Salk\_110494(-)。

### 2 纯合子株系的 RT-PCR 鉴定

从 DNA 水平上鉴定为纯合子的株系 5 进行

*CKL3* 基因转录水平分析的结果表明, 野生型植株中可检测到 *CKL3* 基因的表达, 而突变体植株中则检测不到。T-DNA 插入突变导致该基因 DNA 不能转录成 RNA, 所以突变体的 RNA 反转录后形成的总 cDNA 中缺少这种基因的 cDNA (图 2), 表明所鉴定的突变体是 *CKL3* 基因的沉默突变体。

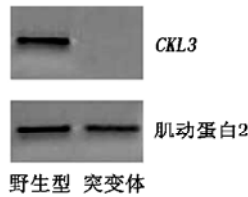


图2 拟南芥野生型和突变体中 *CKL3* 基因的 RT-PCR 分析  
Fig.2 RT-PCR analysis of *CKL3* gene of the wild type and mutant of *Arabidopsis thaliana*

### 3 不同组织中 *CKL3* 基因的表达

采用半定量 RT-PCR 分析检测 *CKL3* 基因在拟南芥的茎、根、叶、叶柄、花等不同器官中表达的结果(图 3)表明, *CKL3* 基因在根、叶、花中表达较高, 而在茎、叶柄中则较弱。暗示 *CKL3* 基因在拟南芥的根、花和叶的生长发育过程中可能起作用。

### 4 非生物胁迫下 *CKL3* 基因的表达

图 4 表明, (1)在 22 和 37 中生长的拟南芥的 *CKL3* 基因表达水平差异不明显。(2)盐胁迫 1/4

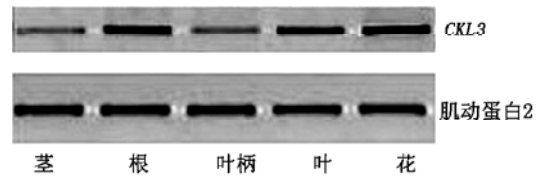


图3 *CKL3* 基因在拟南芥各器官中的表达  
Fig.3 *CKL3* gene expression in different organs of *Arabidopsis thaliana*

h 后的拟南芥中 *CKL3* 基因表达开始下降, 1 h 时表达量明显下降。(3)拟南芥从暗培养转移到蓝光下 1 h 后, *CKL3* 基因表达开始增加, 6 h 时表达量明显增加。(4)拟南芥从暗培养转移到红光下 0~24 h 后, *CKL3* 基因表达水平变化均不明显。

### 5 突变体的表型

收取突变体 Salk\_110494 的纯合子植株的种子, 在同等条件下直接将野生型和纯合突变体的种子播在土中观察表型的结果表明, 在不同的生长时期, 野生型和纯合插入突变体的表型变化不明显, 均能正常生长。同时, 观察非生物胁迫处理的野生型和纯合插入突变体的表型, 结果表明, 在不同时间的热激、盐胁迫、蓝光和红光处理过程中, 没有观察到野生型和沉默突变体之间生长有明显的表型差异。

目前, 我们构建了 *CKL3* 基因的过表达载体和 RNA 干扰载体, 已转入拟南芥中, 期望通过过量表达和抑制表达进一步研究 *CKL3* 的生物学功能。

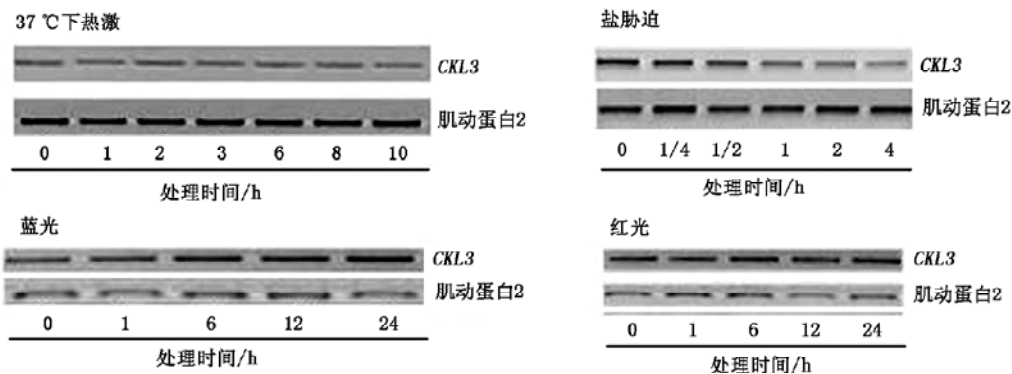


图4 热激、盐胁迫和蓝、红光下的 *CKL3* 基因表达  
Fig.4 Expressions of *CKL3* gene under heat shock, salt stress, blue light and red light

### 参考文献

Babatsikos C, Yupsanis T (2000). Separation and purification of both CK-I and CK-II casein kinases in developing maize endosperm-Phosphorylation of native HMG-proteins. *J Plant Physiol*, 156: 492~503

Bioukar EB, Marricco NC, Zuo D, Larose L (1999). Serine phosphorylation of the ligand-activated beta-platelet-derived

- growth factor receptor by casein kinase I-gamma2 inhibits the receptor's autophosphorylating activity. *J Biol Chem*, 274: 21457~21463
- Daniel X, Shoji Sugano S, Tobin EM (2004). CK2 phosphorylation of CCA1 is necessary for circadian oscillator function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 3292~3297
- Dobrowolska G, Meggio F, Pinna LA (1987). Characterization of multiple forms of maize seedling kinases reminiscent of animal casein kinases S (type 1) and TS (type 2). *Biochim Biophys Acta*, 931: 188~195
- Erdmann H, Bocher M, Wagner KG (1985). The acidic peptide-specific protein kinases from suspension-cultured tobacco cells: a comparison of the enzymes from whole cells and isolated nuclei. *Plant Sci*, 41: 81~89
- Gietzen KF, Virshup DM (1999). Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase I epsilon. *J Biol Chem*, 274: 32063~32070
- Gross SD, Anderson RA (1998). Casein kinase I: Spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal*, 10: 699~711
- Johnson LN, Lowe ED, Noble ME, Owen DJ (1998). The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett*, 430: 1~11
- Kemp BE, Pearson RB (1990). Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci*, 15: 342~346
- Klimczak LJ, Cashmore AR (1993). Purification and characterization of casein kinase I from broccoli. *Biochem J*, 293: 283~288
- Klimczak LJ, Farini D, Lin C, Pond D, Cashmore AR, Giuliano G (1995). Multiple isoforms of *Arabidopsis* casein kinase I combine conserved catalytic domains with variable carboxyl-terminal extensions. *Plant Physiol*, 109: 687~696
- Lee JY, Taoka K, Yoo BC, Ben-Nissan G, Kim DJ, Lucas WJ (2005). Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and *Arabidopsis* recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell*, 17: 2817~2831
- Liu W, Xu ZH, Luo D, Xue HW (2003). Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *Plant J*, 36: 189~202
- Mukhopadhyay K (1997). Purification and characterization of a protein kinase from winged bean. *Phytochemistry*, 46: 461~467
- Murray MG, Guilfoyle TJ, Key JL (1978a). Isolation and characterization of a chromatin-associated protein kinase from soybean. *Plant Physiol*, 61: 1023~1030
- Murray MG, Guilfoyle TJ, Key JL (1978b). Isolation and preliminary characterization of a casein kinase from cauliflower nuclei. *Plant Physiol*, 62: 434~437
- Perales M, Portolés S, Más P (2006). The proteasome-dependent degradation of CKB4 is regulated by the *Arabidopsis* biological clock. *Plant J*, 46: 849~860
- Rychlik W, Zagorski W (1980). Purification and characterization of adenosine-3',5'-phosphate-independent protein kinase from wheat germ. *Eur J Biochem*, 106: 653~659