

# 林烟草蛋白激酶 *NsylCIPK3* 基因的克隆与功能分析

董连红<sup>1,2</sup>, 史素娟<sup>1,3</sup>, S M Nuruzzaman Manik<sup>1,2</sup>, 苏玉龙<sup>1,2</sup>,  
毛静静<sup>1,2</sup>, 王傲弘<sup>4</sup>, 周开燕<sup>4</sup>, 刘 林<sup>4</sup>, 王 倩<sup>1</sup>, 刘好宝<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院烟草研究所/农业部烟草生物学与加工重点实验室, 青岛 266101; <sup>2</sup>中国农业科学院研究生院, 北京 100081;

<sup>3</sup>青岛农业大学农学与植物保护学院, 青岛 266109; <sup>4</sup>川渝中烟工业公司, 成都 610000)

**摘要:** CIPK 蛋白激酶家族 (CBL-interacting protein kinase) 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族, 与类钙调磷酸酶 B 亚基 CBL (calcineurin B-like protein) 蛋白共同形成 CBL-CIPK 网络, 在植物的生长发育和逆境胁迫响应过程中发挥重要作用。烟草中该家族的研究还比较少, 本研究从林烟草 (*Nicotiana glauca*) 中获得一个 CIPK 家族基因, 该基因与拟南芥和杨树中的 CIPK3 同源性分别为 68.4% 和 87.5%, 将其命名为 *NsylCIPK3*。氨基酸序列分析表明, *NsylCIPK3* 具有 CIPK 蛋白家族的典型结构特征, 在 N 端和 C 端分别具有典型的激活环结构域和 NAF 结构域。进化树分析显示, *NsylCIPK3* 属于 CIPK 蛋白亚家族 II。表达模式研究表明, 该基因在林烟草的叶和腋芽中的表达量相对较高, 在主根中的表达量次之, 在侧根、茎、花瓣和萼片中的表达量相对较低, 并且在烟草成熟期的叶中表达量明显升高。在高盐、紫外光和低钾胁迫下该基因的表达发生不同程度的上调。酵母双杂交结果显示, *NsylCIPK3* 可与 *NsylCBL9* 互作。推测 *NsylCIPK3* 可能通过与 *NsylCBL9* 互作形成信号通路, 激活下游靶蛋白, 参与烟草响应非生物逆境胁迫的信号转导过程。

**关键词:** 林烟草; CIPK3; 非生物逆境; 信号转导; 蛋白互作

## Cloning and Functional Analysis of *NsylCIPK3* Gene from *Nicotiana glauca*

DONG Lian-hong<sup>1,2</sup>, SHI Su-juan<sup>1,3</sup>, S M Nuruzzaman Manik<sup>1,2</sup>, SU Yu-long<sup>1,2</sup>, MAO Jing-jing<sup>1,2</sup>,

WANG Xiao-hong<sup>4</sup>, ZHOU Kai-yan<sup>4</sup>, LIU Lin<sup>4</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>, LIU Hao-bao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Tobacco Research Institute of CAAS/Key Laboratory of Tobacco Biology and Processing, Ministry of Agriculture, Qingdao 266101;

<sup>2</sup>Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

<sup>3</sup>College of Agriculture and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109;

<sup>4</sup>Chuan-yu Branch of China Tobacco Industrial Corporation, Chengdu 610000)

**Abstract:** CBL-interacting protein kinase (CIPK) is a kind of serine/threonine protein kinase. By interacting with different calcineurin B-like protein (CBLs), CIPKs play important roles in response to various abiotic stresses and the regulation pathway of plant growth and development. Although a lot of work of CBL-CIPK network is finished in *Arabidopsis* and some other plants, little is known in tobacco model plant. In this study, a CIPK gene *NsylCIPK3* was cloned from *Nicotiana glauca*. Sequence analysis indicated that *NsylCIPK3* showed higher identity with *PtCIPK3* and *AtCIPK3*. *NsylCIPK3* contained a typical activation loop domain and a highly conserved NAF domain at its N- and C-terminus. The phylogenetic tree indicated that *NsylCIPK3* belonged to Group II of CIPK family. Expression analysis demonstrated that the expression level of *NsylCIPK3* was higher in leaves and axillary buds at the vigorous stage and the level in leaves increased evidently in the mature stage of tobacco plants. Real-time quantitative PCR results showed that the expression level of *NsylCIPK3* increased after high-salt, UV, and low-potassium

收稿日期: 2014-11-11 修回日期: 2014-12-29 网络出版日期: 2015-04-22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150422.0820.003.html>

基金项目: 四川省烟草专卖局重点项目 (201202006); 国家自然科学基金青年基金 (31201489)

第一作者研究方向为烟草钾营养高效基因的克隆与功能解析。E-mail: donglianhong1990@163.com

通信作者: 刘好宝, 研究方向为作物栽培学与耕作学。E-mail: liuhaobao@caas.cn

王倩, 研究方向为植物基因功能组学。E-mail: wangqian01@caas.cn

treatments. Yeast two-hybrid assay indicated that NsylCIPK3 interacted with NsylCBL9. The results demonstrated that NsylCIPK3 might be modulated by NsylCBL9 and involved in abiotic stress signal transductions pathways in *N. sylvestris*.

**Key words:** *Nicotiana sylvestris*; CIPK3; abiotic stress; signaling pathway; protein-protein interaction

在长期的进化过程中,植物逐渐形成了复杂的信号调控网络以适应多变的外部环境。 $\text{Ca}^{2+}$  作为植物中普遍存在的第二信使,在信号转导过程中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。植物感受外界刺激如非生物逆境、光、病原菌侵染以及激素等时,胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度会产生时空变化,这种变化被植物的钙感受器 (calci-neurin sensor) 感知,并将信号传递给下游靶蛋白,从而引起一系列生理生化反应,以适应外界环境。类钙调磷酸酶 B 亚基 CBL (calcineurin B-like protein) 是近年来发现的植物所特有的一类钙感受器蛋白,结构保守,当其感知钙信号后,与  $\text{Ca}^{2+}$  结合并激活下游 CIPK (CBL-interacting protein kinase) 的活性,即通过 CBL-CIPK 信号通路,调节特异的生物进程<sup>[2]</sup>。

CIPK 家族是一类具有生物活性的丝/苏氨酸蛋白激酶家族,其蛋白结构与酵母中的 SNF1 (sucrose non-fermenting 1) 及动物中的 AMPK (AMP-activated protein kinase) 相似<sup>[3-4]</sup>。该家族蛋白结构非常保守,通常具有 2 个典型的结构域: N 端激活环结构域和 C 端 NAF 结构域 (又称 FISH 结构域)<sup>[5]</sup>。已有研究表明,绿藻中只有 1 个 CIPK 基因,苔藓中有 7 个 CIPK 基因,蕨类植物百叶卷柏中有 5 个 CIPK 成员,而拟南芥、水稻和杨树中分别有 26、27 和 33 个成员<sup>[6-8]</sup>。在拟南芥、杨树和水稻等的研究中发现, CIPK 基因在植物响应高盐、低温、高温和低钾信号转导过程中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。其中,拟南芥 *AtCIPK6/9/23*<sup>[10-12]</sup>、*AtCIPK24*<sup>[7,13]</sup> 分别参与植物响应低钾和高盐胁迫信号转导过程。杨树 *PtCIPK24* 参与植物响应盐胁迫信号通路<sup>[7]</sup>。水稻中 *OsCIPK1/2/10/11/12* 在白叶枯病菌侵染后表达量上调, *OsCIPK2/10/11/14* 参与水稻响应盐胁迫和 ABA 信号转导过程<sup>[14]</sup>。

关于 CIPK3 基因在植物中的功能目前了解还不深入。仅有研究证明 *AtCIPK3* 在种子萌发阶段响应 ABA 胁迫<sup>[15]</sup>, 另外, 半定量 RT-PCR 试验显示, 干旱、低温、高盐和施加 ABA 可诱导拟南芥 *AtCIPK3* 和玉米 *ZmCIPK3* 上调表达<sup>[15-16]</sup>, *LeCIPK3* 也在番茄的冷害和干旱胁迫下上调表达<sup>[17]</sup>。CIPK3 是如何响应干旱、低温和高盐等逆境胁迫的, 目前尚

未有报道, 而烟草的 CIPK3 还未有研究。本研究从林烟草 (*Nicotiana sylvestris*) 中获得一个 CIPK3 基因, 并对其进行了生物信息学分析、表达模式分析和功能分析。该结果为解析烟草 CIPK3 的功能提供了一定的试验证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试植物材料为林烟草 (*N. sylvestris*), 在中国农业科学院烟草研究所人工气候培养室中种植培养。

试验中所用的 Ex Taq DNA 聚合酶、DNA marker、pMD19-T、T4 ligase、PrimeScript RT-PCR Kit、Agarose Gel DNA Purification Kit、MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit、荧光定量试剂盒 (SYBR Premix Ex Taq™) 等购自宝生物工程 (大连) 有限公司。本试验中所用引物均由北京六合华大科技股份有限公司合成。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 NsylCIPK3 基因的获得** 本研究以拟南芥 *AtCIPK3*、杨树 *PtCIPK3* 和番茄 *LeCIPK3* 的蛋白序列为模板, 在 NCBI 网站 (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 的林烟草数据库 (Organism optional: *Nicotiana sylvestris* (taxid: 4096)) 中进行 tBLASTn 比对, 并通过基因预测及结构筛选等生物信息学的方法<sup>[18]</sup> 获得预测的同源 DNA 序列 (NCBI Reference Sequence: XM\_009774690.1)。根据所获序列设计特异性引物 NsylCIPK3 - 1F/1R (表 1)。采用热酚法提取林烟草叶片总 RNA, 参照 PrimeScript RT-PCR Kit 操作说明进行 RT-PCR 反应。以 cDNA 为模板, 扩增开放阅读框 ORF (open reading frame) 区。采用 CTAB 法提取林烟草基因组 DNA, 以基因组 DNA 为模板克隆获得预测基因的基因组序列。PCR 产物分别经胶回收后连入 pMD19-T, 转化后获得阳性质粒 pMD19-T-NsylCIPK3 和 pMD19-T-gNsylCIPK3 并测序。

**1.2.2 非生物逆境胁迫处理** 本试验中的烟苗种植均采用漂浮育苗的方法, 漂浮盘中土壤基质为黑土: 蛭石 = 7: 1。将正常生长至 4 ~ 5 片真叶期的林

烟草分别进行高盐、紫外光、低钾、干旱、高温和低温 6 组胁迫处理。所有处理均设置处理组与对照组两部分。高盐处理:300 mmol/L NaCl 的水溶液。干旱处理:20% PEG 水溶液。紫外光、高温(40 ℃)和低温(4 ℃)处理在人工气候培养箱中进行。对照组在正常的水溶液中培养。低钾处理:K<sup>+</sup> 浓度为 75 μmol/L 的低钾培养液。对照组为 1/10 的 MS 培养液。高盐、低钾、干旱、高温、低温以及对照组培养条件设定为 16 h 光照、8 h 黑暗,空气湿度为 75%。分别在处理 0 h、0.5 h、1 h、3 h、6 h、9 h、12 h 和 24 h 时取样,采用热酚法提取植物叶片总 RNA,存于 -80 ℃ 备用。本试验共设置 3 次生物学重复。

**1.2.3 *NsylCIPK3* 基因的实时荧光定量 PCR 分析** 根据烟草 *L25* 基因<sup>[19]</sup> 和 *NsylCIPK3* 的序列,分别设计实时荧光定量 PCR (qPCR) 引物对 L25-F/L25-R、*NsylCIPK3*-qF/*NsylCIPK3*-qR (表 1)。参照

Takara SYBR Premix Ex *Taq* (Perfect Real Time) 的操作说明书,进行相对荧光定量 PCR 反应,每个样品设 3 次重复。PCR 反应体系为:cDNA 2 μL、上下游引物各 0.4 μL、SYBR Premix Ex *Taq* 10 μL、Rox Dye II 0.4 μL 和 ddH<sub>2</sub>O 6.8 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 30 s; 95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,40 个循环。采用标准曲线法进行相对定量分析,试验所用仪器为 ABI PRISM 7500 realtime PCR system (Applied Biosystems)。

**1.2.4 酵母双杂交试验** 根据酵母载体 (pGADT7 和 pGBKT7) 和 *NsylCIPK3* 核酸序列设计含有酶切位点引物对 *NsylCIPK3*-2F/2R。将 *NsylCIPK3* 连入 pGBKT7,并转化至 Y187 酵母菌株。本实验室已有的 *NsylCBL* 基因连入 pGADT7,并转化至 AH109 酵母菌株。将两菌株进行酵母小量结合后涂布至 SD/-Leu-Trp 和 SD/-Leu-Trp-Ade-His 平板上,放置 30 ℃ 恒温培养箱中倒置培养 3~5 d,观察互作结果。

表 1 引物目录

Table 1 Sequences of the primers

引物名称 Name of primers	引物序列 Sequences of primers	引物用途 Amplification
<i>NsylCIPK3</i> -1F	5'-ATGAATCGGGCAAAAATCAAGCG-3'	扩增 <i>NsylCIPK3</i> 完整开放阅读框 ORF
<i>NsylCIPK3</i> -1R	5'-TCACTTTTCTTTTCCATGTTCTCTTC-3'	Amplify the open reading frame of <i>NsylCIPK3</i>
<i>NsylCIPK3</i> -qF	5'-GGATATGATGGAGCAACGGCAGAC-3'	扩增 137 bp 的 <i>NsylCIPK3</i> 中间片段,用于荧光定量
<i>NsylCIPK3</i> -qR	5'-TGGGCAAGTAAATTCAGCAGCAGAT-3'	The middle fragment of <i>NsylCIPK3</i> with a length of 137 bp for quantitative real-time PCR
<i>NsylCIPK3</i> -2F	5'-CCATGGAGATGAATCGGGCAAAAATCAAGCG-3'	扩增 <i>NsylCIPK3</i> 用于酵母双杂交载体的构建
<i>NsylCIPK3</i> -2R	5'- <u>CCCGGGTCACTTTTCTTTTCCATGTTCTCTTC</u> -3'	The whole open fragment of <i>NsylCIPK3</i> for over expression
L25-F	5'-CAAAAGTTACATTCACCG-3'	荧光定量内参基因核糖体蛋白基因 <i>NsylL25</i>
L25-R	5'-TTTCTTCGTCCCATCAGGC-3'	Internal reference gene <i>NsylL25</i> , a ribosomal protein gene

下划线序列为限制性酶切位点

The underlined nucleotides represent the introduced restriction endonuclease sites

## 2 结果与分析

### 2.1 *NsylCIPK3* 基因的获得

本研究利用特异性引物 *NsylCIPK3*-1F/1R (表 1) 从林烟草中获得一个 ORF 全长为 1317 bp 的 *CIPK* 新基因,该基因编码一个由 438 个氨基酸组成的蛋白。序列分析发现,获得的 *CIPK* 基因与番茄 *LeCIPK3* 和胡杨 *PtCIPK3* 同源性为 87.7% 和 87.5%,与拟南芥、水稻的 *CIPK3* 基因同源性分别是 68.4% 和 70.1%,因此将其命名为 *NsylCIPK3*。氨基酸序列分析表明,*NsylCIPK3* 蛋白具有 *CIPK* 家族的典型结构特征,N 端具有典型的激活环结构域,C 端具有高度保守的 NAF 结构域 (图 1)。

利用特异性引物 *NsylCIPK3*-1F/1R (表 1) 从林烟草基因组中获得全长为 5475 bp 的基因组序列,利用在线网站 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 将 *NsylCIPK3* 的 CDS 区与基因组序列进行比对分析。分析表明,林烟草 *NsylCIPK3* 共有 13 个内含子和 14 个外显子 (图 2)。

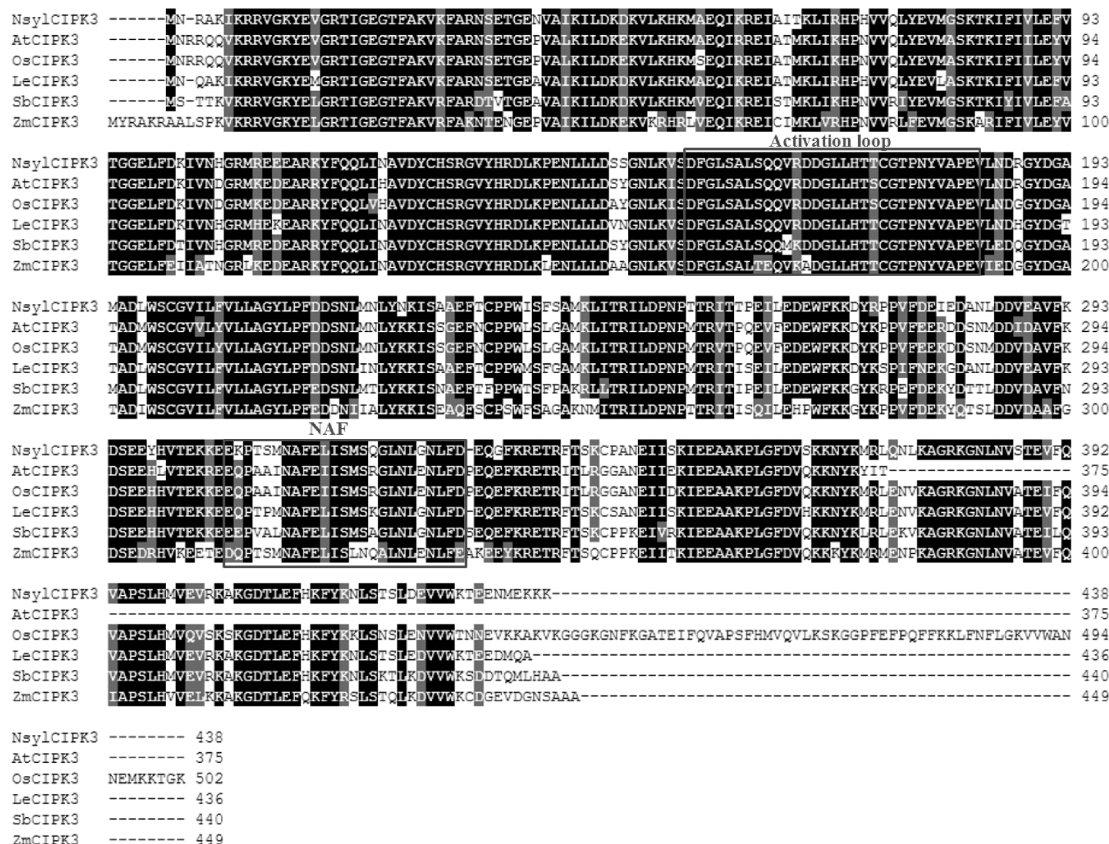
### 2.2 *NsylCIPK3* 基因的系统进化分析

拟南芥 *CIPK* 家族在长期的进化过程中逐渐分化成 2 个分支:无/少内含子的亚家族 I (≤ 4 个内含子) 和富含内含子的亚家族 II (≥ 11 个内含子)<sup>[14,20]</sup>。为研究 *NsylCIPK3* 与其他物种中 *CIPK* 的关系,将 *NsylCIPK3* 与其他物种中的部分 *CIPK* 家族成员构建系统发育进化树。进化树显示 *NsylCIPK3*、*PtCIPK3*、*ZmCIPK3* 和 *AtCIPK3* 均属于亚家



族 II (图 3)。已有报道证明 *PtCIPK3*、*ZmCIPK3* 和 *AtCIPK3* 基因组序列均富含内含子<sup>[14,20]</sup>, *NsylCIPK3*

基因含有 14 个内含子(图 2), 其具有亚家族 II 共有的特性, 此结果与前人研究结果相同。



各物种通过以下代码表示: 林烟草, Nsyl; 拟南芥, At; 水稻, Os; 番茄, Le; 高粱, Sb; 玉米, Zm, 下同

The species are indicated by the following codes; *Nicotiana sylvestris*, Nsyl; *Arabidopsis thaliana*, At; *Oryza sativa*, Os;

*Lycopersicon esculentum*, Le; *Sorghum bicolor*, Sb; *Zea mays*, Zm, the same as below

图 1 NsylCIPK3 与其他植物 CIPK 氨基酸序列的同源性比较

Fig. 1 Amino acid alignment of NsylCIPK3 with other CIPKs in other plants

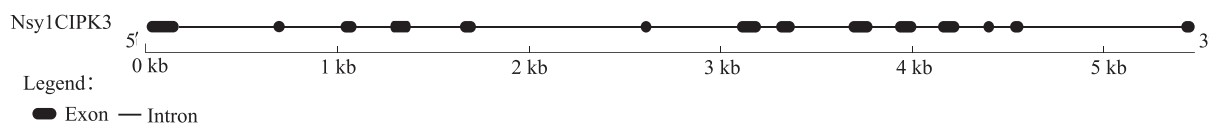


图 2 NsylCIPK3 基因的内含子和外显子的分布

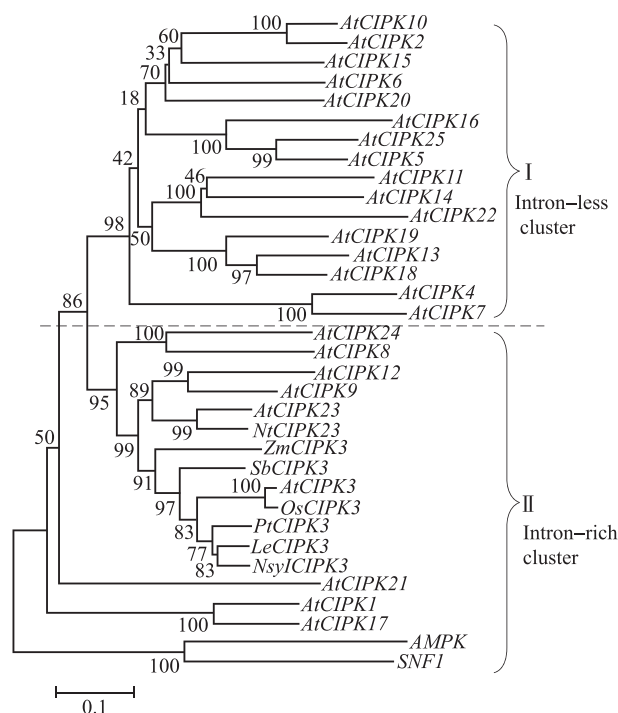
Fig. 2 Exon-intron distribution of NsylCIPK3 gene

### 2.3 NsylCIPK3 的表达模式分析

分别提取林烟草盛花期各组织的 RNA 以及幼苗期、旺长期和成熟期的根和叶部 RNA, 进行 qPCR 分析。结果显示, 在林烟草盛花期的各组织中, *NsylCIPK3* 在叶和腋芽中的表达量相对较高, 在主根中的表达量次之, 在侧根、茎、花瓣和萼片中的表达量相对较低(图 4A)。在不同时期, 叶中 *NsylCIPK3* 的表达量均高于根中。在烟草生长发育的 3 个时期中(图 4B), 根中 *NsylCIPK3* 的表达量无明显变化, 叶中 *NsylCIPK3* 的含量在成熟期时迅速升高, 为幼苗期和旺长期的 2 倍(图 4B)。推测 *NsylCIPK3*

可能在林烟草现蕾后的叶片后期发挥重要的作用。

对林烟草幼苗进行了 6 种不同的非生物逆境胁迫处理, 对叶部 *NsylCIPK3* 的转录水平的变化进行 qPCR 检测。结果显示, 在盐胁迫 (300 mmol/L) 处理下, *NsylCIPK3* 在处理 3 h 时表达量上调至对照的 4.9 倍, 随后随处理时间的延长表达量呈下降趋势(图 5A); 紫外光胁迫处理结果显示, *NsylCIPK3* 在处理 1 h 时上调至对照的 2.5 倍, 之后随处理时间的增加表达量逐渐下降(图 5B); 低钾处理 1 h 时, *NsylCIPK3* 的表达量呈上调趋势, 之后随处理时间的增加, 表达量呈下降趋势(图 5C); 干旱胁迫下,



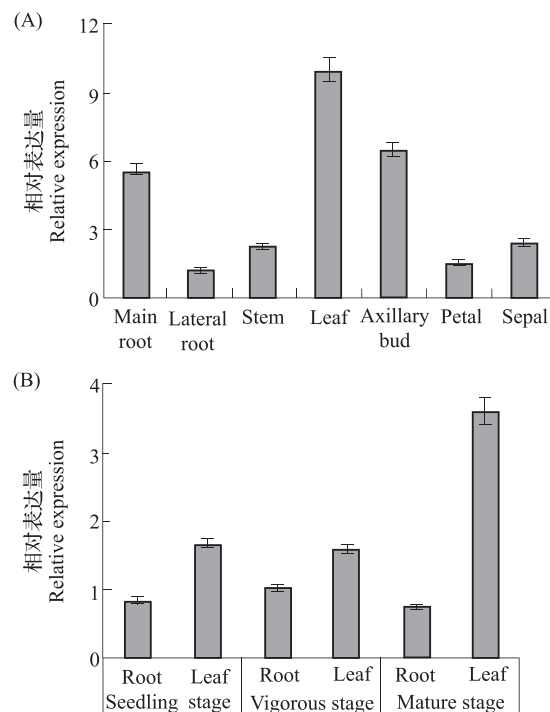
系统发育树用 neighbor-joining 方法构建,自展 1000 次,树节点的数值代表自展值

Neighbor-joining method was performed to draw the phylogeny tree. Bootstrap value was 1000, node of the tree to represents numerical bootstrap values

图 3 *NsylCIPK3* 与其他物种部分 CIPK 基因的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *NsylCIPK3* with CIPKs from other species

*NsylCIPK3* 的表达量整体上呈现下降趋势(图 5D);高温处理下,*NsylCIPK3* 的表达量呈波动变化趋势(图 5E);低温胁迫处理显示,*NsylCIPK3* 的表达量在处理 12 h 之内总体上呈现上升趋势,在处理 12 h



(A): *NsylCIPK3* 在盛花期林烟草不同组织中的表达分析; (B): *NsylCIPK3* 在林烟草不同发育阶段根和叶中的表达分析

(A): Relative expression analysis of *NsylCIPK3* in different tobacco tissues, (B): Relative expression analysis of *NsylCIPK3* in roots and leaves during different tobacco growth stages

图 4 林烟草 *NsylCIPK3* 的表达模式分析

Fig. 4 Relative expression analysis of *NsylCIPK3* in *N. sylvestris*

时表达量上调至对照的 2.0 倍(图 5F),之后随时间的增加表达量下降。表达模式分析表明,*NsylCIPK3* 可能在植物响应高盐、紫外光、低钾胁迫的生物学过程中发挥重要作用。

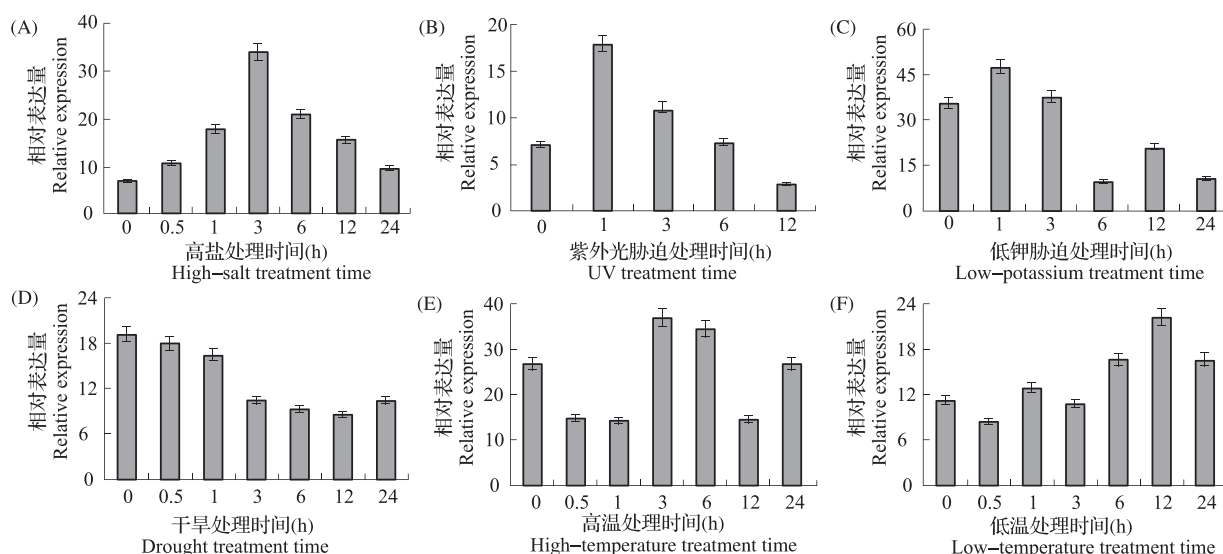


图 5 *NsylCIPK3* 在不同逆境胁迫条件下表达水平的变化

Fig. 5 Relative expression of *NsylCIPK3* under different stress treatments

## 2.4 与 *NsylCIPK3* 互作的 CBLs 的筛选

为了筛选与 *NsylCIPK3* 互作的 CBL 基因,将林烟草 *NsylCBL1* (GenBank ID: KM396650)、*NsylCBL2* (GenBank ID: KM396653)、*NsylCBL3* (GenBank ID: KM396654)、*NsylCBL6* (GenBank ID: KM658160)、*NsylCBL9* (GenBank ID: KM396651) 和 *NsylCBL10* (GenBank ID: KF667488) 基因分别克隆至酵母诱饵

载体 pGADT7 上,将 *NsylCIPK3* 基因连入酵母捕获载体 pGBKT7。转化酵母,检测互作情况。经鉴定,所获 CBL 基因均无自激活现象。酵母双杂交结果表明,*NsylCIPK3* 可与 *NsylCBL9* 互作,菌落可在缺陷型培养基上正常生长(图 6)。推测两者可能通过互作形成信号通路,共同参与烟草响应非生物逆境胁迫的信号转导过程。

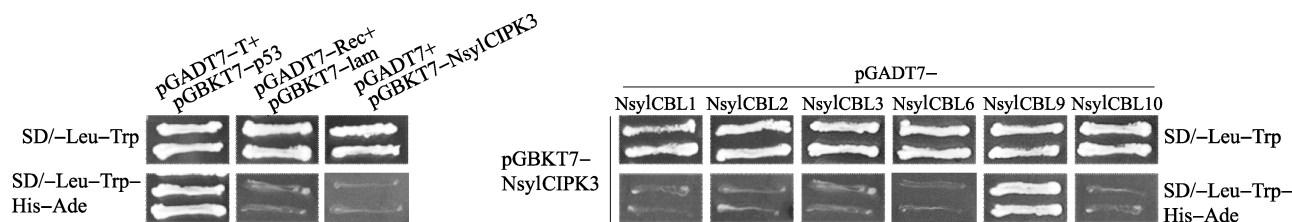


图 6 酵母双杂交试验中 *NsylCIPK3* 与 *NsylCBL* 蛋白的互作

Fig. 6 The interaction analysis between *NsylCIPK3* and *NsylCBLs* in yeast two hybrid assay

## 3 讨论

作为一种植物中特异的 Ser/Thr 蛋白激酶和 CBL 的重要效应蛋白,CIPK 蛋白家族在胞内钙信号的放大及级联传递过程中发挥重要作用,该蛋白的功能鉴定逐渐成为近年来国内外的研究热点,并在拟南芥、水稻和杨树等植物中取得了重大进展。研究发现该家族参与了植物的生长发育、离子通道调节和环境胁迫响应等众多过程。尽管如此,人们对 CIPK 家族在烟草中的功能了解却十分有限。本文对林烟草的 CIPK 家族成员 *NsylCIPK3* 进行了表达分析和蛋白互作研究。

### 3.1 *NsylCIPK3* 在植物响应非生物逆境过程中的功能分析

实时荧光定量 PCR 表明,多种非生物逆境胁迫均使 *NsylCIPK3* 的表达发生规律性变化。其中,该基因在盐胁迫条件下,表达水平在短时间内呈现明显的上调,说明该基因很可能参与烟草对上述逆境的响应过程。前人通过半定量 RT-PCR 试验发现,拟南芥 *AtCIPK3* 和玉米 *ZmCIPK3* 在高盐条件下表达水平上升<sup>[16,21]</sup>,但后续该基因如何参与植物响应高盐胁迫上下游信号通路的机理还不清楚。CBL-CIPK 网络通路中,最早报道的参与盐胁迫信号转导过程的通路是 SOS1 (*AtCBL4*)-SOS2 (*AtCIPK24*)-SOS3<sup>[22-23]</sup>。*CIPK3* 与 *CIPK24* 是否存在功能交叉,是否参与烟草响应盐胁迫,还需通过 *CIPK3* 的过表达或敲除材料的表型鉴定加以证明。目前本课题组已经初步获得林烟草 *NsylCIPK3* 的过表达材料,探究 *NsylCIPK3* 与盐胁迫的关系还需进一步的试验,

这也是本课题组后续的研究重点。同时本试验发现 *NsylCIPK3* 在干旱胁迫下表达量呈下调趋势,与其在高盐下的表达相反。高盐和干旱等逆境胁迫均会引起细胞的渗透胁迫从而导致细胞失水、离子失衡等,预示着植物的某些基因在响应高盐和干旱胁迫过程中均发挥作用<sup>[24]</sup>。而高盐胁迫往往是由渗透胁迫或离子毒害引起的<sup>[25]</sup>。本试验初步表明 *NsylCIPK3* 只参与盐胁迫而未参与干旱胁迫,排除渗透胁迫影响的可能,初步推测其在盐胁迫时表达量上调可能是源于离子毒害作用。

在拟南芥中,*AtCBL9* 可与 *AtCIPK6*、*AtCIPK16* 和 *AtCIPK23* 互作,*AtCBL1/9* 通过激活 *AtCIPK23*,提高下游钾离子通道 *AKT1* 对钾的吸收能力<sup>[11]</sup>。最近在水稻中也鉴定这一调控通路的存在<sup>[26]</sup>。本研究发现 *NsylCIPK3* 在低钾胁迫下表达水平上调,同时 *NsylCBL9* 和 *NsylCIPK3* 可在酵母中互作。两蛋白是否通过互作,共同参与烟草响应低钾胁迫信号通路还有待更多的蛋白互作和电生理学试验证据。对烟草进行紫外光照射发现 *NsylCIPK3* 表达上调。目前还未有 *CIPK* 基因响应紫外光胁迫的报道。拟南芥中仅报道了 *AtSR1* (*CIPK7*) 受细胞分裂素和光的调节,并与 *AtCBL2* 共同参与光信号途径<sup>[27]</sup>。低温胁迫下,*NsylCIPK3* 同 *AtCIPK3*、*LeCIPK3*、*OsCIPK3* 和 *ZmCIPK3* 一样呈上调趋势<sup>[16-17,21,28]</sup>,但 *CIPK3* 响应低温胁迫时的上下游蛋白仍未知。探究 *CIPK3* 参与冷害胁迫和光胁迫的信号通路,为解析植物抗寒和光响应机制提供试验证据。

### 3.2 *NsYLIPK3* 上下游互作蛋白的研究

在复杂的 CBL-CIPK 网络信号通路中,一个 CBL 可以与多个 CIPK 组合,一个 CIPK 也可以被不同 CBL 激活,形成多样的 CBL-CIPK 通路参与不同的信号转导过程<sup>[9]</sup>。本研究中将 *NsYLIPK3* 与目前获得的 6 个 *NsYL* 蛋白在酵母中进行了互作筛选,但由于林烟草中 CBL 家族基因还未全部获得,*NsYLIPK3* 上游与其他 *NsYL* 蛋白的互作情况还不不确定。另外,目前对于 CIPK3 下游靶蛋白的研究还不够深入,仅有研究显示 *AtCIPK3* 可激活相应转录因子从而调控目的靶基因的转录<sup>[29]</sup>,但在不同的逆境下 CIPK3 激活何种转录因子还需试验验证。因此,通过酵母单、双杂交或转录组测序等手段,发掘与 *NsYLIPK3* 互作的 *NsYL* 蛋白和 CIPK3 下游的靶蛋白基因,对解析 *CIPK3* 的功能机理具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress [J]. *Plant Cell Online*, 2002, 14 (S1): 165-183
- [2] Luan S. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, 14 (1): 37-42
- [3] Albrecht V, Ritz O, Linder S, et al. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in  $\text{Ca}^{2+}$  regulated kinase [J]. *EMBO J*, 2001, 20 (5): 1051-1063
- [4] Liu R, Shi H, Wang Y, et al. Comparative physiological analysis of lotus (*Nelumbo nucifera*) cultivars in response to salt stress and cloning of *NnCIPK* genes [J]. *Sci Hort*, 2014, 173: 29-36
- [5] Kleist T J, Spenceley A L, Luan S. Comparative phylogenomics of the CBL-CIPK calcium-decoding network in the moss *Physcomitrella*, *Arabidopsis*, and other green lineages [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5 (187): 1-17
- [6] Batistić O, Kudla J. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases [J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2009, 1793 (6): 985-992
- [7] Tang R J, Yang Y, Yang L, et al. Poplar calcineurin B-like proteins PtCBL10A and PtCBL10B regulate shoot salt tolerance through interaction with PtSOS2 in the vacuolar membrane [J]. *Plant Cell Environ*, 2014, (37): 573-588
- [8] Kolukisaoglu Ü, Weinl S, Blazevic D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134 (1): 43-58
- [9] Yu Q Y, An L J, Li W L. The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33 (2): 203-214
- [10] Held K, Pascaud F, Eckert C, et al. Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the AKT2 potassium channel by the CBL4/CIPK6 calcium sensor/protein kinase complex [J]. *Cell Res*, 2011, 21 (7): 1116-1130
- [11] Lee S C, Lan W Z, Kim B G, et al. A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (40): 15959-15964
- [12] 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 protein 3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2013, 161 (1): 266-277
- [13] Kim B G, Waadt R, Cheong Y H, et al. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2007, 52 (3): 473-484
- [14] Chen X F, Gu Z M, Liu F, et al. Molecular analysis of rice *CIPKs* involved in both biotic and abiotic stress responses [J]. *Rice Sci*, 2011, 18 (1): 1-9
- [15] 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
- [16] 袁志恒, 申腾飞, 王琦, 等. 玉米 CIPK3 蛋白激酶的克隆及表达分析 [J]. *河南农业大学学报*, 2012, 46 (4): 359-369
- [17] 李莉, 李毅, 王长春, 等. 番茄 *LeCIPK3* 的克隆及非生物胁迫诱导的表达分析 [J]. *植物生理学通讯*, 2010, 46 (7): 659-663
- [18] 宋毓峰, 董连红, 靳义荣, 等. 林烟草 *KUP/HAK/KT* 钾转运体基因 *NsHAK11* 的亚细胞定位与表达 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47 (6): 1058-1071
- [19] Schmidt G W, Delaney S K. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress [J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, 283 (3): 233-241
- [20] Li R F, Zhang J W, Wei J H, et al. Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stress [J]. *Prog Nat Sci*, 2009, 19 (6): 667-676
- [21] 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 Online*, 2003, 15 (2): 411-423
- [22] Liu J P, Ishitani M, Halfter U, et al. The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (7): 3730-3734
- [23] Halfter U, Ishitani M, Zhu J K. The *Arabidopsis* *SOS2* protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein *SOS3* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (7): 3735-3740
- [24] Yu Q Y, An L J, Li W L. The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants [J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 33 (2): 203-214
- [25] 徐猛, 马巧荣, 张继涛, 等. 盐胁迫下不同基因型冬小麦渗透及离子的毒害效应 [J]. *生态学报*, 2011, 31 (3): 784-792
- [26] Li J, Long Y, Qi G N, et al. The Os-AKT1 channel is critical for  $\text{K}^+$  uptake in rice roots and is modulated by the rice CBL1-CIPK23 complex [J]. *Plant Cell*, 2014, 26 (8): 3387-3402
- [27] Nozawa A, Koizumi N, Sano H. An *Arabidopsis* SNF1-related protein kinase, AtSR1, interacts with a calcium-binding protein, AtCBL2, of which transcripts respond to light [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42 (9): 976-981
- [28] Kanwar P, Sanyal S K, Tokas I, et al. Comprehensive structural, interaction and expression analysis of CBL and CIPK complement during abiotic stresses and development in rice [J]. *Cell Calcium*, 2014, 56 (2): 81-95
- [29] Li R, Zhang J, Wei J, et al. Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stress [J]. *Prog Nat Sci*, 2009, 19 (6): 667-676