

菜用大豆 CIPK 基因对逆境胁迫及激素的响应特征

冯志娟, 徐盛春, 刘娜, 张古文, 胡齐赞, 龚亚明

(浙江省农业科学院蔬菜研究所, 杭州 310021)

摘要: CIPK (calcineurin B-like-interacting protein kinase) 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在植物响应逆境胁迫和激素信号转导中发挥重要作用。本研究利用大豆基因组数据库, 在全基因组水平鉴定获得 52 个 CIPK 蛋白激酶。蛋白比对分析发现所有 GmCIPK 含有高度保守特征性的 N 端激酶区、连接区和 C 端调控区。系统进化树分析发现大豆 GmCIPK 与拟南芥、水稻 CIPK 分类一致, 分为 4 个亚家族, 且每个亚家族含有 3 个不同物种的成员, 表明 GmCIPK 基因的分化早于物种的分化。启动子分析表明, 多数 GmCIPK 基因的启动子区含有逆境和激素应答元件。组织表达分析发现, GmCIPK 基因呈现多样化的组织表达特性。进一步选取组织表达量相对较高的 14 个 GmCIPK 进行荧光定量 PCR 分析, 结果表明这些菜用大豆 CIPK 基因在不同程度上均受高温、干旱、高盐胁迫以及 ABA、ACC、SA、MeJA 激素的诱导表达。采用蛋白同源比对和蛋白互作在线数据库对拟南芥及大豆同源 CIPK 蛋白激酶与其他蛋白的互作关系进行了预测分析, 发现 17 对同源 CIPK 与其他蛋白(激酶、磷酸酶、转录因子等)存在互作。本研究为菜用大豆 CIPK 基因的功能研究与利用奠定了基础。

关键词: 菜用大豆; CIPK 蛋白激酶; 逆境应答; 激素应答; 蛋白互作

Expression Character of Vegetable Soybean CIPKs in Response to Abiotic Stresses and Hormones

FENG Zhi-juan, XU Sheng-chun, LIU Na, ZHANG Gu-wen, HU Qi-zan, GONG Ya-ming

(Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agriculture, Hangzhou 310021)

Abstract: Calcineurin B-like-interacting protein kinase (CIPKs) was one kind of serine/threonine kinases, playing crucial roles in abiotic stresses and hormones signal transduction pathways. Based on soybean genome database, a total of 52 CIPK genes were identified from soybean. Multiple alignments showed that all soybean CIPK proteins had the conserved regions which were composed of an N-terminal kinase domain, a junction region and a C-terminal regulatory domain. Phylogenetic analysis of CIPKs from soybean, *Arabidopsis* and rice revealed that all CIPKs were classified into four subfamilies and each subfamily was composed of homologous CIPKs from these three species. The classification of CIPKs from soybean was consistent with *Arabidopsis* and rice, which implied that the differentiation of CIPK genes occurred before the evolution of plant species. Promoter sequences analysis suggested that most GmCIPKs had stress and hormone related *cis*-acting elements in their promoter regions. Tissues expression analysis revealed that each GmCIPK had different expression pattern in different tissues. Furthermore, 14 GmCIPKs with relatively higher transcript level in different tissues were selected to investigate their transcriptional response to various stimuli by real-time PCR. The results showed the comprehensive responses of the tested GmCIPKs to heat, drought, salt stressors and ABA, ACC, SA, MeJA signaling. By BLASTP analysis, 17 orthologous GmCIPKs involved in CIPK interaction networks were identified between *Arabidopsis* and soybean based on the online database of protein interaction. These candidate CIPK-interacting proteins included kinase, phosphatase and transcription factor and

收稿日期: 2017-03-01 修回日期: 2017-03-29 网络出版日期: 2017-10-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20171017.1421.024.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31601767、31572138); 浙江省农业科学院青年人才培养项目 (2016R23R08E06); 浙江省公益项目 (2015C32050)

第一作者研究方向为菜用大豆分子育种。E-mail: zhijuanke@163.com

通信作者: 龚亚明, 研究方向为菜用大豆育种、繁种和推广工作。E-mail: gongym07@126.com

so on. The findings of this study will provide a foundation for the functional characterization of the GmCIPK genes in vegetable soybean.

Key words: vegetable soybean; CIPK protein kinase; abiotic stress response; hormone response; protein interaction

Ca^{2+} 是植物中重要的第二信使,由 Ca^{2+} 介导的信号转导途径在植物生长发育及逆境胁迫应答中起关键作用。植物生长发育(如根毛和花粉管的生长)和环境刺激(如高温、干旱、低温)等均能引起细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化,形成具有时空特征的 Ca^{2+} 信号。 Ca^{2+} 信号经由钙传感蛋白进一步向下传递,如钙调素(CaMs, calmodulins)、钙调素结合蛋白(CMLs, calmodulin-like proteins)、钙依赖蛋白激酶(CDPK, calcium-dependent protein kinases)、类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白(CBLs, calcineurin B-like proteins)和 CBL 相互作用蛋白(CIPK, CBL-interacting protein kinase)^[1]。其中,CBLs 本身没有活性,在识别 Ca^{2+} 信号后,必须和 CIPK 互作形成蛋白复合物才能发挥作用。CIPKs 是一类 Ca^{2+} 依赖性丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,具有 N-端的激酶域和 C-端的调节域,前者为催化区,后者为 CBL 特异接合的 NAF 结构域和与磷酸酶 PP2C 相互作用的 PPI 结构域,是 Ca^{2+} 信号传导途径的重要分子开关^[2]。

菜用大豆也称毛豆,属大豆(*Glycine max* L. Merr)的专用型品种,主食嫩荚和鲜子粒,富含氨基酸、维生素、纤维素等,具有极高营养价值,深受消费者喜爱。菜用大豆作为一种新兴的特种蔬菜,已成为国产大豆产业新的经济增长点^[3]。近年频发的高温、干旱和土地的盐碱化等现象,严重制约了菜用大豆产量的提高和品质的提升。因此,挖掘菜用大豆多胁迫应答蛋白以及解析其抗逆分子机制成为菜用大豆抗逆育种的研究重点。已有报道显示,CIPK 基因与植物生长、逆境及激素信号传导密切相关。拟南芥 AtCIPK26 能够与 ABI1、ABI2、ABI5 发生蛋白间互作,在 ABA 介导的种子萌发过程中起关键作用;AtCIPK24(SOS2)能够与 AtCBL4(SOS3)发生蛋白间互作,进而激活细胞膜 Na^+/H^+ 逆向转运体 AtNHX7(SOS1)和液泡膜 H^+ -ATPase,提高植株耐盐性;AtCIPK23 能够与 CBL1 和 CBL9 发生蛋白间互作,调控 ABA 介导的干旱胁迫应答过程^[4]。过表达水稻 *OsCIPK3*、*OsCIPK12* 和 *OsCIPK15* 可分别提高转基因水稻对冷、干旱和盐胁迫的耐受力^[5]。过表达小麦 *TaCIPK24* 能够增加 Na^+ 及抗氧化保护酶的含量,进而提高转基因拟南芥对高盐胁迫的耐受力^[6]。本研究从基因组水平对菜用大豆 CIPK 蛋白

激酶的序列特征、进化规律、组织表达、逆境响应、激素应答以及蛋白互作等方面进行了系统分析,为进一步揭示菜用大豆中 CIPK 蛋白激酶的生物学功能和作用模式提供了依据。

1 材料与方法

1.1 大豆 CIPK 相关蛋白激酶的鉴定

首先利用已知拟南芥和水稻 CIPK 蛋白激酶^[7],使用 Pfam(<http://pfam.xfam.org/>)数据库工具下载 CIPK 蛋白激酶特征结构域的隐马氏模型文件(Pfam 号码:PF03822)^[8];接着利用 HMMER3.0 程序(<http://hmmer.janelia.org/>)以 PF03822 为模型,在植物基因组数据库 Phytozome v11.0(<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中搜索大豆(*Glycine max*)基因组中含有 CIPK 特征结构域的蛋白序列;然后进一步使用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/smart/batch.pl>)和 CDD(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)检测候选蛋白结构域^[9-10],手工去除冗余序列和不含有 CIPK 特征结构域的序列,获得大豆 CIPK 蛋白激酶的蛋白序列。

利用 Clustal X2 软件对所有大豆 CIPK 蛋白激酶进行功能保守域比对分析。利用 YLoc(<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>)对大豆 CIPK 蛋白激酶的亚细胞定位进行分析,利用 NetPhos 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)对其磷酸化位点进行分析^[11]。利用 ClustalX2 软件对拟南芥、水稻和大豆 CIPK 全长蛋白进行多序列比对,比对结果利用 MEGA6.0 的邻接法构建 CIPK 蛋白激酶的系统进化树,bootstrap 值设置为 1000。

1.2 大豆 CIPK 基因的启动子分析

从大豆基因组数据库选取 CIPK 基因起始密码子上游 1500 bp 的核苷酸序列作为启动子区段,利用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行顺式作用元件分析。

1.3 大豆 CIPK 基因的不同组织表达分析

从植物基因组数据库 Phytozome v11.0(<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)中搜索获得

所有大豆 CIPK 基因在根、茎、叶、花、种子、豆荚、发根、根瘤、顶端分生组织等 9 个不同组织中的 GeneAtlas Tissue Sample 表达数据即芯片表达数据,单位采用每百万读段中来自某基因每千碱基长度的读段数即 RPKM(reads per kilo bases per million reads)来表示。利用 Cluster3.0 软件对基因表达数据进行聚类分析,并利用 TreeView 程序显示分析结果。

1.4 菜用大豆中 CIPK 基因对不同逆境及激素的响应分析

选取饱满的菜用大豆种子(种质编号 GMLN012012017),每盆播种 4 粒,置于 22 °C 光照培养箱中培养(16 h 光照/8 h 黑暗)。将长势相近 3 周大的幼苗根部分别用 20% PEG6000、250 mmol/L NaCl、100 μmol/L ABA、100 μmol/L ACC、100 μmol/L SA、100 μmol/L MeJA 浸泡处理及光照培养箱中 42 °C 高温处理,处理时间均为 0.5 h、1.5 h、6 h、12 h。选取相同时间段未处理的样品作为对照组。分别取根和叶两种组织于液氮中速冻,置于 -80 °C 冰箱保存备用。

利用天根的 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒进行菜用大豆根和叶组织的 RNA 提取。利用天根的 FastQuantcDNA 第 1 链合成反转录试剂盒进行 cDNA 合成,均一化后作为实时定量 PCR 模板。利用 KAPA SYBR® Fast qPCR 试剂盒进行荧光定量 PCR,以 *GmActin11* 作为内参基因^[12]。总反应体系为 20 μL,经预实验优化后 PCR 反应程序为:第 1 步,1 个循环,95 °C 预变性 10 min;第 2 步,40 个循

环,95 °C 7 s,55 °C 5 s,72 °C 30 s;绘制溶解曲线,0.2 °C/s,试验设置 3 次生物学重复。采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 CIPK 基因在某种逆境和激素处理下某个时间点相对于对照的转录水平变化^[13],响应结果由 TreeView 程序进行图示。

1.5 大豆 CIPK 蛋白激酶的蛋白互作网络分析

使用蛋白比对 blastp 程序,找出与大豆 CIPK 高度同源的拟南芥 CIPK 蛋白激酶,进一步利用拟南芥蛋白互作数据库 Arabidopsis Interactions Viewer,分析 CIPK 蛋白激酶与其他蛋白的互作情况,结果采用 STRING 软件(<http://string-db.org/>)作图^[14]。

2 结果与分析

2.1 大豆 CIPK 蛋白激酶的全基因组鉴定

在大豆基因组中搜索获得 52 个 CIPK 蛋白激酶基因,经比对与已报道的大豆 CIPK 基因预测的序列^[15]一致。蛋白质生化属性分析发现,最长的序列有 528 个氨基酸残基,最短的序列有 306 个氨基酸残基;其中等电点范围从 6.11 到 9.31,分子量范围从 35.14 kD 到 59.71 kD(表 1)。保守结构域比对分析显示,所有 CIPK 蛋白激酶均含有典型的激酶区(催化区)、连接区(自抑制区)和调控区(类钙调素区)(图 1)。亚细胞定位分析显示,所有 CIPK 蛋白激酶均定位于细胞质;磷酸化位点分析显示,所有 CIPK 蛋白激酶均含有丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸位点(表 1),这些氨基酸可能在维持 GmCIPK 蛋白的空间结构及感应一系列的信号传递中起关键作用。

表 1 大豆 CIPK 蛋白激酶的鉴定及特性

Table 1 Identification and feature of CIPKs in soybean

保守结构域位置								
基因名	基因序列号	Conserved domain location		氨基酸	等电点	分子量(kD)	亚细胞定位	磷酸化位点数目
Gene	Gene ID	激酶区	调控区	Amino	Isoelectric	Molecular	Subcellular	Numbers of
name	number	Kinase	Regulation	acid	point	mass	localization	phosphorylation sites
		domain	domain					
<i>GmCIPK1</i>	Glyma.01G131500	12 ~ 266	310 ~ 368	467	8.69	52.85	Cytoplasm	Ser;11 Thr;3 Tyr;4
<i>GmCIPK2</i>	Glyma.02G202900	21 ~ 275	299 ~ 356	430	9.10	48.36	Cytoplasm	Ser;11 Thr;2 Tyr;2
<i>GmCIPK3</i>	Glyma.02G217300	9 ~ 262	305 ~ 364	444	6.11	50.45	Cytoplasm	Ser;14 Thr;4 Tyr;7
<i>GmCIPK4</i>	Glyma.02G234800	15 ~ 269	316 ~ 374	463	8.85	52.87	Cytoplasm	Ser;11 Thr;4 Tyr;3
<i>GmCIPK5</i>	Glyma.02G235100	21 ~ 276	306 ~ 362	442	7.12	49.25	Cytoplasm	Ser;9 Thr;5 Tyr;2
<i>GmCIPK6</i>	Glyma.02G275900	13 ~ 268	308 ~ 367	472	8.06	53.77	Cytoplasm	Ser;6 Thr;5 Tyr;3
<i>GmCIPK7</i>	Glyma.03G036900	32 ~ 177	256 ~ 314	413	8.63	46.46	Cytoplasm	Ser;11 Thr;4 Tyr;3
<i>GmCIPK8</i>	Glyma.03G260200	16 ~ 268	307 ~ 367	440	8.45	49.93	Cytoplasm	Ser;10 Thr;3 Tyr;4
<i>GmCIPK9</i>	Glyma.04G061500	1 ~ 253	284 ~ 342	434	8.96	48.78	Cytoplasm	Ser;14 Thr;2 Tyr;4
<i>GmCIPK10</i>	Glyma.04G090500	9 ~ 262	305 ~ 364	446	6.65	50.80	Cytoplasm	Ser;14 Thr;1 Tyr;7
<i>GmCIPK11</i>	Glyma.05G158700	19 ~ 273	325 ~ 381	517	7.23	58.42	Cytoplasm	Ser;23 Thr;1 Tyr;2

表 1(续)

基因名	基因序列号	保守结构域位置		氨基酸	等电点	分子量(kD)	亚细胞定位	磷酸化位点数目
		Conserved domain location						
		激酶区	调控区					
		Kinase domain	Regulation domain					
Gene name	Gene ID number			Amino acid	Isoelectric point	Molecular mass	Subcellular localization	Numbers of phosphorylation sites
GmCIPK12	Glyma.06G062100	11 ~ 265	301 ~ 359	453	8.51	50.60	Cytoplasm	Ser;14 Thr;2 Tyr;4
GmCIPK13	Glyma.06G092300	9 ~ 262	305 ~ 364	446	7.16	50.81	Cytoplasm	Ser;15 Thr;1 Tyr;7
GmCIPK14	Glyma.07G023500	19 ~ 273	315 ~ 371	441	9.07	50.46	Cytoplasm	Ser;11 Thr;6 Tyr;5
GmCIPK15	Glyma.07G051000	15 ~ 268	307 ~ 368	438	8.89	49.91	Cytoplasm	Ser;11 Thr;4 Tyr;4
GmCIPK16	Glyma.08G116500	19 ~ 273	333 ~ 390	528	7.24	59.71	Cytoplasm	Ser;19 Thr;1 Tyr;4
GmCIPK17	Glyma.08G218400	19 ~ 273	301 ~ 357	430	9.25	48.77	Cytoplasm	Ser;13 Thr;5 Tyr;4
GmCIPK18	Glyma.08g252100	18 ~ 144	188 ~ 246	467	9.00	53.63	Cytoplasm	Ser;17 Thr;2 Tyr;5
GmCIPK19	Glyma.09G079400	19 ~ 275	314 ~ 374	448	6.26	50.53	Cytoplasm	Ser;27 Thr;10 Tyr;4
GmCIPK20	Glyma.09G089700	22 ~ 277	323 ~ 384	462	8.94	51.70	Cytoplasm	Ser;11 Thr;4 Tyr;1
GmCIPK21	Glyma.09G098000	23 ~ 277	307 ~ 366	440	9.28	49.65	Cytoplasm	Ser;11 Thr;3 Tyr;2
GmCIPK22	Glyma.09G276600	26 ~ 282	310 ~ 369	438	6.15	48.82	Cytoplasm	Ser;10 Thr;5 Tyr;2
GmCIPK23	Glyma.09G277000	12 ~ 266	311 ~ 369	460	8.52	52.36	Cytoplasm	Ser;8Thr;1 Tyr;3
GmCIPK24	Glyma.10G001700	12 ~ 266	311 ~ 369	431	8.90	48.12	Cytoplasm	Ser;13 Thr;4 Tyr;3
GmCIPK25	Glyma.10G179600	23 ~ 279	311 ~ 370	437	9.10	48.53	Cytoplasm	Ser;16 Thr;3 Tyr;2
GmCIPK26	Glyma.01G131500	12 ~ 266	311 ~ 369	462	8.77	52.46	Cytoplasm	Ser;15 Thr;3 Tyr;2
GmCIPK27	Glyma.11G235300	20 ~ 274	321 ~ 379	452	8.73	50.88	Cytoplasm	Ser;12 Thr;4 Tyr;3
GmCIPK28	Glyma.13G069500	22 ~ 276	306 ~ 361	456	6.53	46.88	Cytoplasm	Ser;9 Thr;4 Tyr;5
GmCIPK29	Glyma.13g119500	21 ~ 276	314 ~ 373	446	8.45	50.08	Cytoplasm	Ser;6 Thr;4 Tyr;4
GmCIPK30	Glyma.13G166100	11 ~ 264	307 ~ 367	446	9.01	50.82	Cytoplasm	Ser;20 Thr;10 Tyr;5
GmCIPK31	Glyma.13G228400	31 ~ 285	351 ~ 407	512	6.70	57.53	Cytoplasm	Ser;19 Thr;5 Tyr;4
GmCIPK32	Glyma.13G228500	12 ~ 266	320 ~ 379	451	9.20	51.53	Cytoplasm	Ser;13 Thr;3 Tyr;3
GmCIPK33	Glyma.13G370000	16 ~ 239	294 ~ 350	425	8.87	47.35	Cytoplasm	Ser;22 Thr;4 Tyr;4
GmCIPK34	Glyma.14G040200	13 ~ 289	329 ~ 388	462	7.65	53.00	Cytoplasm	Ser;10 Thr;6 Tyr;3
GmCIPK35	Glyma.14G203000	24 ~ 278	301 ~ 360	439	7.52	48.63	Cytoplasm	Ser;6 Thr;5 Tyr;2
GmCIPK36	Glyma.15G003400	21 ~ 275	330 ~ 386	461	9.05	51.77	Cytoplasm	Ser;21 Thr;5 Tyr;4
GmCIPK37	Glyma.15G084000	17 ~ 122	179 ~ 292	306	8.74	35.14	Cytoplasm	Ser;18 Thr;4 Tyr;4
GmCIPK38	Glyma.15G084100	29 ~ 283	349 ~ 405	510	6.75	57.27	Cytoplasm	Ser;17 Thr;5 Tyr;3
GmCIPK39	Glyma.15G187400	19 ~ 274	313 ~ 372	437	7.58	49.17	Cytoplasm	Ser;16 Thr;3 Tyr;5
GmCIPK40	Glyma.15G203700	21 ~ 275	305 ~ 364	438	9.31	49.51	Cytoplasm	Ser;10 Thr;2 Tyr;2
GmCIPK41	Glyma.16G020200	16 ~ 269	308 ~ 368	438	9.05	49.86	Cytoplasm	Ser;12 Thr;3 Tyr;3
GmCIPK42	Glyma.17G040700	23 ~ 278	316 ~ 375	448	8.75	50.39	Cytoplasm	Ser;9 Thr;4 Tyr;5
GmCIPK43	Glyma.17G066300	10 ~ 262	303 ~ 362	467	8.82	52.82	Cytoplasm	Ser;13 Thr;4 Tyr;7
GmCIPK44	Glyma.17G074800	17 ~ 271	296 ~ 351	422	9.17	47.60	Cytoplasm	Ser;10 Thr;1 Tyr;3
GmCIPK45	Glyma.17G113700	11 ~ 264	307 ~ 367	446	9.06	50.83	Cytoplasm	Ser;7 Thr;3 Tyr;5
GmCIPK46	Glyma.18G021600	12 ~ 266	313 ~ 371	449	8.99	50.31	Cytoplasm	Ser;12 Thr;4 Tyr;4
GmCIPK47	Glyma.18G054600	20 ~ 274	304 ~ 359	450	6.18	50.12	Cytoplasm	Ser;7 Thr;4 Tyr;4
GmCIPK48	Glyma.18G055000	12 ~ 266	311 ~ 369	462	8.80	52.40	Cytoplasm	Ser;14 Thr;3 Tyr;3
GmCIPK49	Glyma.18G212200	12 ~ 266	311 ~ 369	462	8.85	52.65	Cytoplasm	Ser;10 Thr;1 Tyr;3
GmCIPK50	Glyma.18G212700	32 ~ 288	315 ~ 374	443	6.41	49.71	Cytoplasm	Ser;7 Thr;7 Tyr;3
GmCIPK51	Glyma.19G111300	12 ~ 336	280 ~ 339	426	7.99	48.84	Cytoplasm	Ser;8 Thr;1 Tyr;3
GmCIPK52	Glyma.20G210800	23 ~ 279	310 ~ 369	436	9.22	48.62	Cytoplasm	Ser;15 Thr;4 Tyr;1

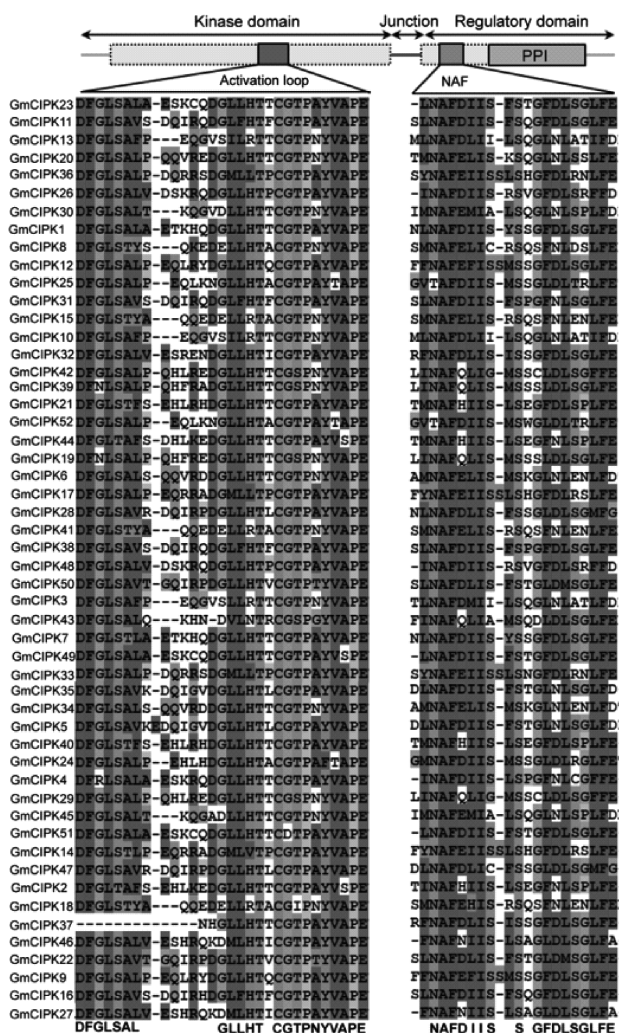


图1 大豆 CIPK 成员的保守结构域比对

Fig. 1 Multiple alignments of soybean CIPK conserved domains

2.2 大豆 CIPK 蛋白激酶的生物进化分析

为了解大豆 GmCIPK 蛋白激酶的生物进化关系,以大豆 GmCIPK 蛋白激酶和其他植物同源蛋白的全长序列构建了系统进化树(图2)。结果显示:大豆 GmCIPK 蛋白激酶分成4个亚家族(I~IV);同样,拟南芥和水稻两个物种的 CIPK 蛋白激酶也分成4个亚家族。大豆 GmCIPK 蛋白激酶并非单独聚类并独立进化,而是每个亚家族都同时含有水稻和拟南芥中的 CIPK 蛋白激酶成员,说明在大豆、水稻和拟南芥3个物种分化之前,这些 CIPK 基因已在同一物种中发生了分化。此外,从每个亚家族的基因分布量上看,IV亚家族(35个)的基因数量远多于其他亚家族基因(I:7个;II:5个;III:5个)数量。

2.3 大豆 CIPK 蛋白激酶基因启动子元件分析

启动子在植物基因表达调控过程中起重要作用,启动子是否存在响应逆境和激素信号的关键元件在一定程度上可以反映基因是否参与应答。52个大豆 GmCIPK 基因启动子分析显示(表2):73.1%的成员在启动子区域含有 HSE (heat stress responsive element) 作用元件(与高温有关);69.2%的成员含有 TC-rich repeat 元件(与逆境胁迫有关);34.6%的成员含有 LTRE (low temperature responsive element) 作用元件(与低温有关);13.5%含有 MBS 作用元件(与干旱有关),这4类元件都与逆境胁迫应答有关。此外,大豆 GmCIPK 基因中57.7%的成员含有 CGTCA (MeJA-responsive element) 作用元件;46.2%的成员在启动子区含有 ABRE (ABA-responsive element) 作用元件;38.5%的成员含有 ERE (ethylene-responsive element) 作用元件;30.8%含有 GARE (gibberellin-responsive element) 作用元件;15.4%含有 TGA (auxin-responsive element) 作用元件;5.8%的成员含有 TCA (salicylic acid-responsive element) 作用元件,这6类元件都与激素应答有关。暗示大豆 GmCIPK 基因与植物的逆境及激素胁迫应答具有很强的关联。其中, GmCIPK12 和 GmCIPK28 含有5~6个 HSE 元件, GmCIPK4 和 GmCIPK40 含有5~6个 ABRE 元件, GmCIPK20、GmCIPK47 和 GmCIPK50 含有3个 GARE 元件, GmCIPK34 含有5个 TCA 元件(图3),说明这8个基因极有可能直接参与高温胁迫、ABA、GA 或 SA 信号应答过程。

2.4 CIPK 基因在大豆不同组织中的表达模式分析

从大豆数据库中收集到51个 GmCIPK 基因表达数据(GmCIPK18 无表达数据),多数基因表达涉及大豆整个生长发育过程,根据其表达情况经聚类后分成4个亚家族(图4)。其中,第I亚家族的 GmCIPK20 在根中表达量较高,在叶和茎中表达量较低; GmCIPK6、GmCIPK34 和 GmCIPK15 在叶和花中表达较高。第II亚家族的 GmCIPK45 在叶、花、分生组织和茎中表达较高。第III亚家族的 GmCIPK19、GmCIPK39、GmCIPK29 和 GmCIPK42 在花中表达较高,提示第III亚家族可能和花发育过程有关。第IV亚家族的 GmCIPK40 在各种组织中(种子和根除外)表达相对较高; GmCIPK2 在豆荚中表达较高; GmCIPK36、GmCIPK33 和 GmCIPK35 在花中表达较高。

表 2(续)

基因 Gene	ABRE	CGTCA	ERE	GARE	HSE	MBS	TC-rich	TCA	TGA	LTR
<i>GmCIPK16</i>	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0
<i>GmCIPK17</i>	0	0	1	1	2	0	1	0	0	0
<i>GmCIPK18</i>	2	0	0	0	1	0	1	0	0	2
<i>GmCIPK19</i>	1	0	1	0	2	0	2	0	0	1
<i>GmCIPK20</i>	1	0	0	3	4	0	1	0	0	0
<i>GmCIPK21</i>	2	0	0	0	1	0	0	1	0	1
<i>GmCIPK22</i>	1	0	1	0	0	0	3	0	0	0
<i>GmCIPK23</i>	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
<i>GmCIPK24</i>	0	0	1	0	0	0	2	2	0	1
<i>GmCIPK25</i>	0	0	1	0	3	0	0	2	0	0
<i>GmCIPK26</i>	0	0	2	0	3	0	3	0	1	0
<i>GmCIPK27</i>	3	0	2	1	1	0	0	1	0	0
<i>GmCIPK28</i>	0	0	1	2	5	0	1	0	0	0
<i>GmCIPK29</i>	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
<i>GmCIPK30</i>	0	0	1	0	2	0	0	1	0	1
<i>GmCIPK31</i>	0	0	0	0	2	0	3	1	1	0
<i>GmCIPK32</i>	1	0	0	0	3	0	1	1	0	0
<i>GmCIPK33</i>	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0
<i>GmCIPK34</i>	0	0	0	0	0	2	1	5	0	0
<i>GmCIPK35</i>	1	0	0	0	1	0	2	1	1	0
<i>GmCIPK36</i>	1	0	0	0	2	1	0	1	1	0
<i>GmCIPK37</i>	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>GmCIPK38</i>	1	0	1	0	1	1	2	1	0	0
<i>GmCIPK39</i>	1	0	0	0	0	1	1	1	0	2
<i>GmCIPK40</i>	5	2	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>GmCIPK41</i>	0	0	0	0	3	2	2	0	3	0
<i>GmCIPK42</i>	0	0	1	1	2	0	0	1	0	1
<i>GmCIPK43</i>	3	0	2	0	0	0	0	1	1	0
<i>GmCIPK44</i>	0	0	0	1	2	1	0	1	0	0
<i>GmCIPK45</i>	0	0	0	2	2	0	4	3	1	1
<i>GmCIPK46</i>	1	0	2	0	1	2	0	1	0	0
<i>GmCIPK47</i>	1	0	0	3	0	1	3	0	0	1
<i>GmCIPK48</i>	1	1	1	2	0	0	1	1	0	1
<i>GmCIPK49</i>	0	2	0	0	2	0	2	0	0	0
<i>GmCIPK50</i>	1	0	0	3	2	2	3	0	0	0
<i>GmCIPK51</i>	2	0	0	0	0	0	2	1	0	0
<i>GmCIPK52</i>	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0



图3 大豆 CIPK 基因启动子中顺式作用元件的分布

Fig. 3 Distribution of *cis*-acting elements in the soybean CIPK gene promoters

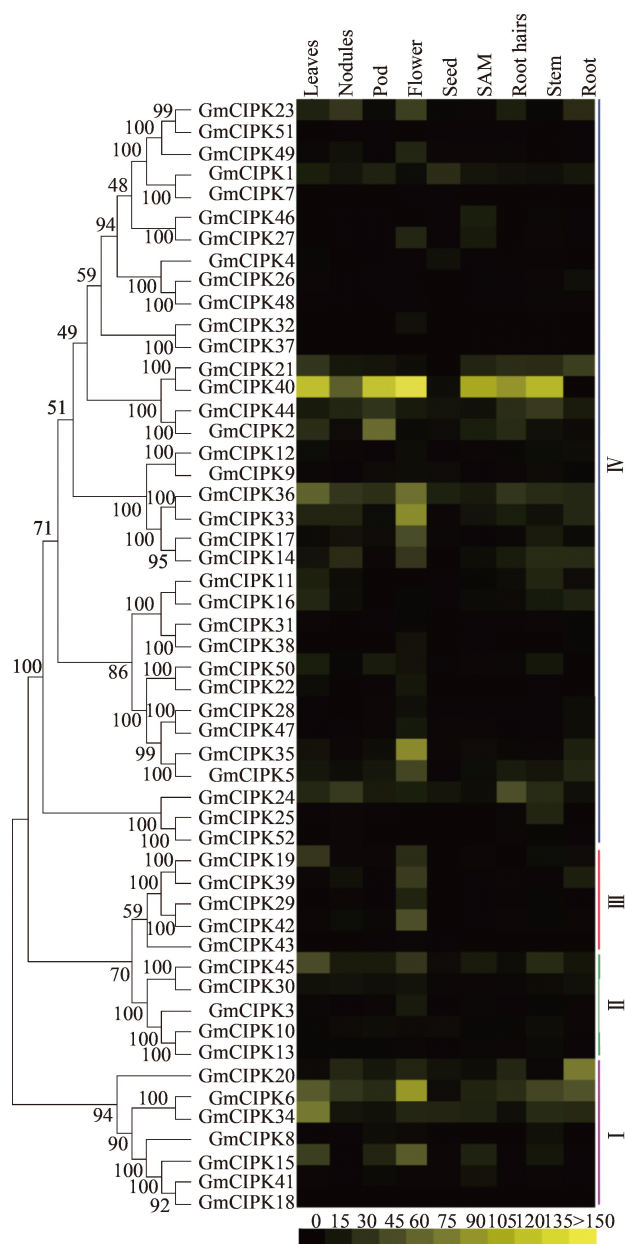
2.5 3 种不同逆境胁迫处理后 CIPK 基因在菜用大豆根与叶中的表达分析

逆境胁迫下,利用荧光定量 PCR 对 14 个 *GmCIPK* 基因在根和叶中的表达量进行分析(图 5),结果显示:在根中,经高温处理之后,仅 *GmCIPK16*、*GmCIPK24* 和 *GmCIPK33* 的表达量上调,而 *GmCIPK5* 和 *GmCIPK6* 的表达量明显下调;经干旱处理之后,几乎所有基因上调表达;经高盐处理之后,仅 *GmCIPK5* 和 *GmCIPK14* 的表达量有上调趋势,其余基因表达量变化不大。同时,对 CIPK 基因在叶中的表达量进行分析,结果显示:经高温处理之后,*GmCIPK16*、*GmCIPK21*、*GmCIPK24*、*GmCIPK33*、*GmCIPK34*、*GmCIPK35* 和 *GmCIPK45* 呈上调表达趋势,而 *GmCIPK6* 的表达量明显下调;经干旱处理之后,除 *GmCIPK6* 外,几乎所有基因上调表达;经高盐处

理之后,除 *GmCIPK5*、*GmCIPK6*、*GmCIPK20* 和 *GmCIPK21* 外,其余基因均呈上调表达趋势。从整体看,大部分 *GmCIPK* 基因主要通过叶片来响应高温、干旱和高盐 3 种胁迫。

2.6 4 种不同激素处理后 CIPK 基因在菜用大豆根与叶中的表达分析

植物激素在调控植物逆境胁迫应答过程中具有重要的调节作用。因此,本研究对激素处理不同时间后,14 个 *GmCIPK* 基因在根和叶中的表达量进行了荧光定量分析(图 6),结果显示:在根中,ABA 处理后,除 *GmCIPK5*、*GmCIPK21*、*GmCIPK35* 和 *GmCIPK36* 外,几乎所有基因上调表达;ACC 处理后,除 *GmCIPK15* 和 *GmCIPK16* 外,几乎所有基因上调表达;SA 处理后,除 *GmCIPK5* 和 *GmCIPK20* 外,几乎所有基因上调表达;MeJA 处理后,除 *GmCIPK15*、



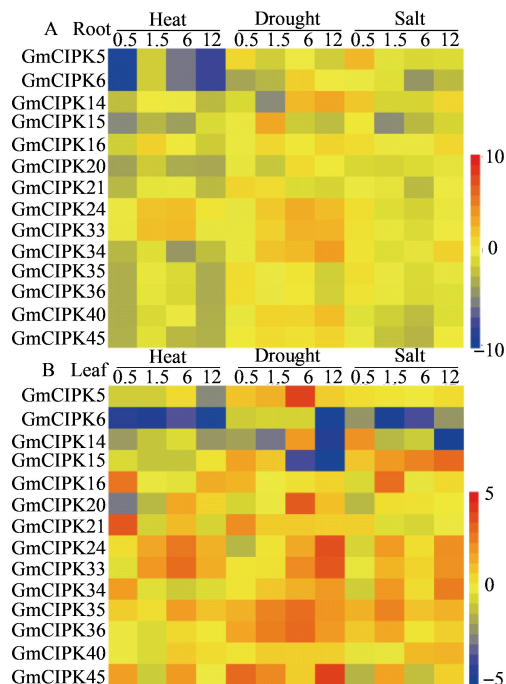
9 种不同组织(叶、根瘤、豆荚、花、种子、
顶端分生组织、根毛、茎、根);
数字代表相对表达量

Nine different tissues(leaves, nodules, pod, flower,
seed, SAM, root hairs, stem and root),
number represented relative expression level

图 4 大豆 CIPK 基因组织表达特性

Fig. 4 Expression analysis of soybean
CIPKs in different tissues

GmCIPK16、*GmCIPK35* 和 *GmCIPK36* 外,几乎所有基因上调表达。同样,在叶中,激素处理后,几乎所有基因上调表达。从整体看,*GmCIPK* 基因在根或叶 2 种不同组织中对 ABA、ACC、SA 和 MeJA 激素信号均有不同程度的响应。



A 代表根组织;B 代表叶组织;0.5、1.5、6、12 代表处理时间段(h);
数字代表基因相对表达量变化,下同

A represented root tissue, B represented leaf tissue,
0.5, 1.5, 6, 12 represented treatment time (h),
number represented relative expression data, the same as below

图 5 菜用大豆中 CIPK 基因不同逆境胁迫
(高温,干旱,高盐)处理的表达分析

Fig. 5 Expression analysis of vegetable soybean CIPKs in
response to different abiotic stresses(heat, drought and salt)

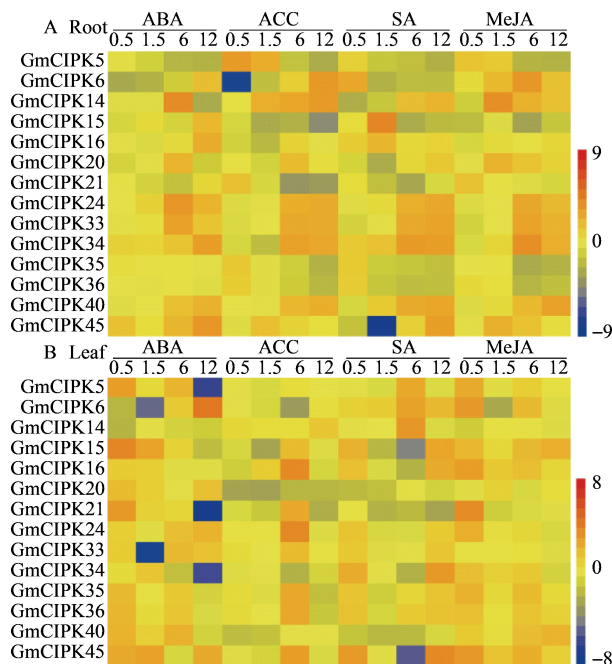
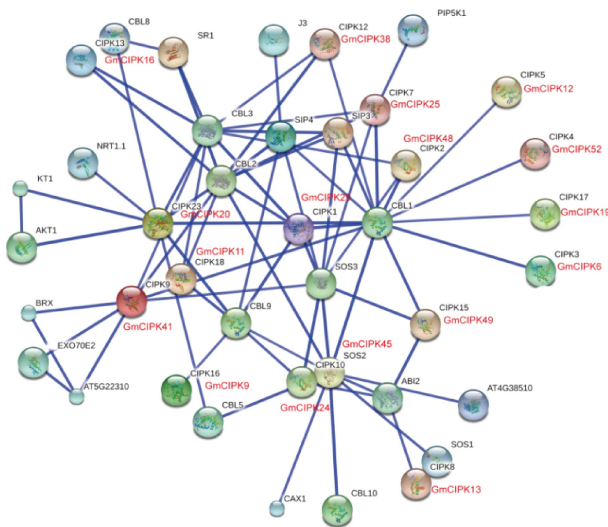


图 6 菜用大豆中 CIPK 基因不同外源激素
(ABA, ACC, SA, MeJA)处理的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of vegetable soybean CIPKs in
response to different hormones(ABA, ACC, SA and MeJA)

2.7 大豆 CIPK 蛋白激酶的蛋白互作关系

蛋白互作分析显示,17 个 AtCIPK 蛋白激酶与拟南芥中其他蛋白存在互作关系(图 7)。这些互作的靶蛋白包括:钙调磷酸酶 B-like 蛋白质(CBL1/2/3/4/5/8/10)、钙转运体(CAX1)、钾转运体(AKT1 和 KT1)、硝酸盐转运体(NRT1.1)、钠/氢转运体(SOS1)、转录因子(BRX)、分子伴侣蛋白(J3)、磷酸酶(ABI2)、激酶(PIP5K1)等。其中同源蛋白对:GmCIPK20 (AtCIPK23) 和 GmCIPK41 (AtCIPK9) 同位于第 I 亚家族,推测其与钾转运体同源蛋白互作;GmCIPK19 (AtCIPK1) 和 GmCIPK29 (AtCIPK17) 同位于第 III 亚家族,推测其与 CBL1 同源蛋白互作,这 2 个 CIPK 同源蛋白对不仅在蛋白序列上具有较高同源性而且属于同一进化分支,提示其可能在同一个蛋白互作网络,功能上具有关联性。



红色代表拟南芥 CIPKs 在大豆中的同源蛋白;

直线代表蛋白间相互作用

Red represented *Arabidopsis* homologous CIPKs in soybean,

line represented protein-protein interaction

图 7 大豆 CIPK 蛋白及拟南芥同源蛋白互作网络分析

Fig. 7 Interaction network analysis of soybean CIPKs and related proteins in *Arabidopsis*

3 讨论

蛋白激酶主要参与体内蛋白质或多肽的磷酸化,催化 ATP 分子的 γ -磷酸基团转移并共价结合到某些蛋白质分子的特定氨基酸的羟基上,磷酸化过程改变蛋白质的构象和酶的活性,参与细胞信号传递,调节植物生长发育及对环境胁迫应答等过程^[16-17],是功能基因组学研究的重点内容。CIPK

蛋白激酶属于第 3 类的 SnRK3 激酶(SnRK3, SNF1-related protein kinase 3),其活化需要结合 CBL 蛋白,不同于第一类 SnRK1 和第二类 SnRK2 蛋白激酶的活化方式^[18]。典型特征是具有高度保守的激酶结构域和与 CBL 互作的 NAF 基序,参与 Ca^{2+} 信号调控途径^[19]。在水稻和模式植物拟南芥中,CIPK 蛋白激酶的作用已得到广泛的关注和研究,然而针对菜用大豆中 GmCIPK 蛋白激酶的研究还鲜有报道。

本研究通过全基因组分析,从大豆基因组中鉴定到 52 个大豆 GmCIPK 基因,而在拟南芥基因组中有 26 个 AtCIPK 基因,在水稻基因组中有 34 个 OsCIPK 基因。从成员数量上看,大豆 GmCIPK 基因的数量大约是拟南芥和水稻的 2 倍,基因的数量显著增加可能与大豆在进化中发生过 2 次全基因组复制有关^[20],这为新基因的产生和功能分化提供了基础。进一步通过构建系统进化树将大豆 GmCIPK 蛋白激酶分为 4 个亚家族,结合水稻和拟南芥中 CIPK 蛋白激酶的序列分析,发现每个亚家族都同时含有大豆、水稻和拟南芥 3 个物种 CIPK 蛋白激酶成员,表明在双子叶植物和单子叶植物分别进化之前,这些 CIPK 旁系基因已在植物中进化形成。

已有报道显示,CIPK 蛋白激酶参与植物种子萌发、花粉管、根、幼苗等生长发育过程^[21]。本研究利用生物芯片数据综合分析了大豆 GmCIPK 基因在 9 种不同组织的表达情况,结果发现大多数基因在各个组织中广泛表达,部分基因表达呈现聚类现象,具有相似的组织表达模式,如第 IV 亚家族的 GmCIPK21、GmCIPK40、GmCIPK44 和第 IV 亚家族的 GmCIPK6、GmCIPK20、GmCIPK34 在各种组织中几乎都有表达,暗示这些基因在植物发育过程中可能发挥相似的功能。然而,本研究发现表达谱的聚类和蛋白进化的聚类结果仅存在部分一致性,GmCIPK 的功能与其蛋白序列相似性的关联似乎不显著,暗示大豆 GmCIPK 的功能在进化过程中可能发生了歧化。进一步的启动子元件分析发现,不同基因所含胁迫及激素应答元件种类和数量各不相同,即使同一亚家族的基因也有明显差别,说明不同 GmCIPK 基因的表达调控方式具有特异性,增加了其功能的复杂性。

CIPK 蛋白激酶除了在植物形态建成方面发挥调控作用之外,还与非生物逆境胁迫的信号密切相关。在拟南芥中,低温、干旱、高盐、氧化、糖、强碱和低钾等胁迫可诱导 AtCIPK9、AtCIPK11、AtCIPK12、

AtCIPK14, *AtCIPK16* 和 *AtCIPK23* 表达,同时 ABA 激素也参与其诱导表达过程^[22]。同样,在水稻和玉米中发现大量 CIPK 基因响应低温、干旱、高盐、高温等胁迫应答过程^[23-24]。本研究利用荧光定量分析了菜用大豆中 *GmCIPK* 基因对 3 种逆境胁迫和 6 种植物激素的响应情况,发现其参与多胁迫及多激素相互交叉形成的调控网络;进一步分析发现,有些基因仅在特定组织(如地上部分叶或地下部分根)中被特定胁迫或激素诱导表达,暗示其在进化过程中可能分化出更精细的调控功能。

CBL-CIPK 信号系统是植物特有的依赖于 Ca^{2+} 信号参与逆境胁迫调控的信号网络,具有特异性^[25]。主要表现在 CBL 和 CIPK 具有的不同的组织及环境胁迫表达模式;不同的 CBL 和 CIPK 蛋白之间的相互作用存在偏好性;特异 CBL-CIPK 复合体能调控下游不同的靶蛋白,从而产生不同的生理生化反应^[26]。新的互作靶蛋白的挖掘对于完善 CIPK 信号转导过程有非常重要的意义。在大豆中, CIPK 蛋白激酶参与的具体的蛋白-蛋白间相互作用尚无报道。本研究利用拟南芥蛋白互作网络,对大豆 *GmCIPK* 蛋白激酶的互作蛋白进行了预测,这些靶蛋白除了 CBL 蛋白还包括激酶、磷酸酶、转录因子等,暗示 CIPK 蛋白激酶并不是孤立的行使功能,而是同其他蛋白协同作用,后续仍需进一步的实验证实。

参考文献

- [1] Zhao J F, Sun Z F, Zheng J, et al. Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize[J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 69(6): 661-674
- [2] Kolukisaoglu U, 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
- [3] 韩天富, 盖钧铭. 世界菜用大豆生产、贸易和研究的进展[J]. *大豆科学*, 2012(11): 278-284
- [4] Mao J, Manik S M, Shi S, et al. Mechanisms and physiological roles of the CBL-CIPK networking system in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genes*, 2016, 7(9): 62-72
- [5] Xiang Y, Huang Y, Xiong L, et al. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement[J]. *Plant Physiol*, 2007, 144(3): 1416-1428
- [6] 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
- [7] Hu W, Xia Z, Yan Y, et al. Genome-wide gene phylogeny of CIPK family in cassava and expression analysis of partial drought-induced genes[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 914-920
- [8] 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
- [9] Schultz J, Milpetz F, Bork P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 5857-5864
- [10] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(1): 200-203
- [11] Feng Z J, Cui X Y, Cui X Y, et al. The soybean GmDil9-5 interacts with GmLEA3.1 and increases sensitivity of transgenic plants to abiotic stresses[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 179-186
- [12] Quach TN, Nguyen H T, Valliyodan B, et al. Genome-wide expression analysis of soybean NF-Y genes reveals potential function in development and drought response[J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290(3): 1095-1115
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [14] Geisler-Lee J, O'Toole N, Ammar R, et al. A predicted interactome for *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(2): 317-329
- [15] Zhu K, Chen F, Liu J, et al. Evolution of an intron-poor cluster of the CIPK gene family and expression in response to drought stress in soybean[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28225-28236
- [16] Sanyal S K, Rao S, Mishra L K, et al. Plant stress responses mediated by CBL-CIPK phosphorylation network[J]. *Enzymes*, 2016, 40: 31-64
- [17] 杨乐, 齐妍, 刘生祥, 等. 植物抗逆相关蛋白激酶的结构与功能[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4): 659-667
- [18] 张秋平, 文李, 王峰, 等. 油菜钙依赖蛋白激酶 *BnCDPK1* 的克隆和表达分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(6): 1320-1326
- [19] Chaves-Sanjuan A, Sanchez-Barrena M J, Gonzalez-Rubio J M, et al. Structural basis of the regulatory mechanism of the plant CIPK family of protein kinases controlling ion homeostasis and abiotic stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(42): 4532-4541
- [20] Schlueter J A, Dixon P, Granger C, et al. Mining EST databases to resolve evolutionary events in major crop species[J]. *Genome*, 2004, 47(5): 868-876
- [21] Sanyal S K, Pandey A, Pandey G K. The CBL-CIPK signaling module in plants: a mechanistic perspective[J]. *Physiol Plant*, 2015, 155(2): 89-108
- [22] Yu Q, An L, Li W. The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants[J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14(2): 8-15
- [23] 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
- [24] Chen X, Gu Z, Xin D, et al. Identification and characterization of putative CIPK genes in maize[J]. *J Genet Genomics*, 2011, 38(2): 77-87
- [25] 张成伟, 王天宇, 黎裕. 植物中 CBL-CIPK 途径转导特异 Ca^{2+} 信号的分子机制[J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(4): 462-468
- [26] 张俊文, 魏建华, 王宏芝, 等. CBL-CIPK 信号系统在植物应答逆境胁迫中的作用与机制[J]. *自然科学进展*, 2008, 18(8): 847-855