

玉米 *ZmCIPK31* 基因原核表达及启动子序列分析

张成伟¹, 刘颖慧^{1,2}, 石云素¹, 宋燕春¹, 王天宇¹, 黎裕¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ²河北北方学院, 张家口 075000)

摘要:与钙传感器类钙调磷酸酶 B 蛋白 (calcineurin B-like protein, CBL) 互作的蛋白 CIPK (CBL-interacting protein kinase) 在植物特定的生长发育和应答胁迫过程中起重要作用。对前期研究得到的玉米 *ZmCIPK31* 基因构建原核表达重组载体, 进行原核表达分析, 转化重组质粒的大肠杆菌 BL21 菌株能够诱导出期望的目的蛋白。蛋白可溶性分析表明, 它是可溶性的蛋白, 通过淀粉树脂柱对其进行纯化, 为下一步激酶活性分析提供了有活性的目的蛋白。同时, 克隆了 *ZmCIPK31* 基因起始密码子 ATG 上游包括 2189bp 的启动子区段, 顺式作用元件预测分析表明此区段不仅具有 TATA-box 和 CAAT-box 等启动子共有序列, 还具有光应答、胁迫应答、发育相关、激素相关及其他功能未知的调控结构域。聚乙二醇 (PEG) 胁迫下, *ZmCIPK31* 基因的表达进一步表明其能够应答胁迫, 且在地上部和根中的表达模式不同。

关键词: *ZmCIPK31* 基因; 原核表达; 启动子; 聚乙二醇; 玉米

Prokaryotic Expression and Promoter Region Analysis of *ZmCIPK31* Isolated from Maize

ZHANG Cheng-wei¹, LIU Ying-hui^{1,2}, SHI Yun-su¹, SONG Yan-chun¹, WANG Tian-yu¹, LI Yu¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

²Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract: CIPK (CBL-interacting protein kinase) interacts with calcium sensor CBL (calcineurin B-like protein). It was proved to play important roles in responding to stresses and regulating certain developmental processes in plants. Here, a recombinant plasmid was constructed for prokaryotic expression analysis for *ZmCIPK31* obtained in this study. The results showed that the predicted target protein could be induced in the recombinant plasmid transformed *E. coli* BL21 strain cells. Protein solubility analysis proved the target protein was soluble. Thus, the purified soluble target protein was obtained by being loaded onto an amylose resin column, which could be used for further protein kinase assay. Meanwhile, a 2189 bp DNA fragment, upstream of the putative translation initiation site (ATG) of the gene, was obtained as *ZmCIPK31* promoter region. A promoter motif search of this region showed that there were not only TATA-box and CAAT-box, but also motifs related to light, stress, development, auxin and others. Under polyethylene glycol (PEG) stress, the expression of *ZmCIPK31* was induced. Moreover, the expression pattern of *ZmCIPK31* in shoots was different from that in roots.

Key words: *ZmCIPK31* gene; Prokaryotic expression; Promoter; PEG; Maize

Ca²⁺ 作为生物体内普遍存在的第二信使, 在胞内信号转导途径中发挥重要作用。Ca²⁺ 信号本身的特异性, 包括钙瞬变、钙振荡、钙信号的空间定位和钙波, 使得这看似简单的单一离子变化能够区分不

同的外界刺激, 将信号转导从而调节植物生长、发育、抗逆等下游特异性的生理反应^[1]。特异 Ca²⁺ 信号直接通过 Ca²⁺ 结合蛋白 (也称 Ca²⁺ 传感器) 进一步传递。目前 Ca²⁺ 传感器主要有 3 类蛋白: 钙调素

收稿日期: 2009-04-15

修回日期: 2009-04-30

基金项目: 国家“863”计划项目 (2006AA10Z188)

作者简介: 张成伟, 在读博士, 主要从事玉米抗逆基因相关研究。E-mail: caaschengwei@yahoo.com.cn

通讯作者: 黎裕, 博士, 研究员, 研究方向为玉米种质资源。E-mail: yuli@mail.caas.net.cn

及类钙调素蛋白(calmodulin and calmodulin-like proteins)、钙依赖性蛋白激酶(CDPKs)和植物中所特有的类钙调磷酸酶 B 蛋白(calcineurin B-like protein, CBL)^[2]。前两类蛋白的功能研究已经报道很多,但二者的共同特点是靶蛋白种类较多,具体深入探求其特异转导 Ca^{2+} 信号分子机制比较困难,相比之下,CBLs 只以一类蛋白激酶 CIPKs(CBL-interacting protein kinase)作为靶蛋白,进行深入研究相对容易,因此,CBL 自 1998 年被发现以来,CBL-CIPK 途径的功能和分子机制越来越受到人们的重视^[3-6]。目前,研究已表明 CBL-CIPK 途径通过调节下游基因表达来调节植物部分生长发育过程,响应一系列不同的外界刺激,如盐、冷、旱、ABA 胁迫等^[7-8]。

目前关于 CBL 和 CIPK 的研究主要集中在拟南芥和水稻上,玉米上的研究相对较少^[5],本实验室已通过 RACE 方法扩增得到 *ZmCIPK31* 基因(GenBank 登录号为 EU516320)。本试验通过原核表达方法在大肠杆菌中成功表达了该基因的重组蛋白 MBP-*ZmCIPK31*,可溶性分析证明重组蛋白 MBP-*ZmCIPK31* 是可溶性的,由此可以通过纯化得到有活性的蛋白;克隆得到了 *ZmCIPK31* 基因的启动子序列,并对启动子序列进行分析,预测基因的功能;对 *ZmCIPK31* 基因在玉米苗期 PEG 处理下的表达分析进一步推测基因的功能。这些为下一步蛋白激酶活性分析以及基因功能研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 原核表达载体的构建及 *ZmCIPK31* 蛋白原核表达

用带有酶切位点的引物(正向引物 5'-CGG-GATCCATGATCGGGCTAAGAGG-3'和反向引物 5'-CCCAAGCTTTCATGCTGCCGCGCTGTT-3')扩增 *ZmCIPK31* 的编码区,通过酶切位点将其连接到 pMAL-c2X 原核表达载体(NEB)上,构建 pMAL-*ZmCIPK31* 原核表达重组载体,与作为对照的空载体 pMAL-c2X 分别转化大肠杆菌 BL21 菌株(Transgene),进行原核表达分析。挑取阳性单克隆于含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基,37℃ 过夜培养,将菌液按 1:1000 的比例转接于 15ml 新鲜的氨苄青霉素抗性 LB 培养基中,37℃ 摇菌至 OD600 约为 0.5 时,取出 1ml 菌液于 1.5ml 离心管中,作为未进行 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactoside)诱导的样品,余下菌液加入终浓度为 0.3mmol/L 的 IPTG,37℃ 200rpm 培养 3h,诱导目的蛋白表达,取 1ml 于 1.5ml 离心管中,

作为经 IPTG 诱导的样品。所有的菌液样品室温下 12000rpm 离心 30s(离心机 eppendorf 5417R),弃上清液,沉淀中加入 2 × 蛋白上样 buffer(50mmol/L Tris-HCl pH 6.8,100mmol/L β-mercaptoethanol,2% SDS,0.1% 溴酚蓝,10% 甘油),通过 SDS-PAGE 分析蛋白的表达情况^[9]。

1.2 蛋白可溶性分析

取上述已诱导的菌液 3ml 逐次加于 1.5ml 离心管中,室温下 12000rpm 离心 30s,收集菌体,弃上清液,菌体沉淀用适量 TE(50mmol/L Tris-HCl pH 8.0,0.2mmol/L EDTA)重悬。放入冰水浴超声破碎细胞后,4℃ 下 12000rpm 离心 20min,将上清液吸出至 1.5ml 离心管中,得到的上清液和沉淀物中均加入适量 2 × 蛋白上样 buffer,煮沸 5min,立即放置冰上 1min,室温 12000rpm 离心 1min,取 20μl 分别进行 SDS-PAGE 分析。

1.3 蛋白纯化及浓缩

蛋白的纯化主要参考 pMAL™ 蛋白融合和纯化系统(NEB)里的操作步骤。挑取蛋白原核表达的阳性单克隆于含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基,37℃ 过夜培养,将菌液按 1:1000 的比例转接于 200ml 含有葡萄糖和氨苄青霉素的高效 LB 培养基中,37℃ 摇菌至 OD600 约为 0.5 时,加入终浓度为 0.3mmol/L 的 IPTG,37℃ 200rpm 培养 3h,诱导目的蛋白表达。所有菌液加入 50ml 离心管中 4℃ 下 4000rpm 离心 20min,去除上清液,沉淀重悬于 Column Buffer(20mmol/L Tris-HCl;200mmol/L NaCl;1mmol/L EDTA;10mmol/L β-mercaptoethanol)中,放于 -20℃ 冷冻过夜,然后进行超声破碎,4℃ 下 10000rpm 离心 20min,所得上清液加入淀粉树脂柱(NEB)中进行纯化,最后用含有 10mmol/L 麦芽糖的 Column Buffer 将纯化的蛋白洗脱出来。利用透析袋在 PEG8000 的处理下将纯化的蛋白进行浓缩。最后通过 SDS-PAGE 检查蛋白纯化及浓缩的情况。

1.4 启动子克隆及序列分析

对已知的 *ZmCIPK31* DNA 序列在网站 <http://www.plantgdb.org> 里进行 Blastn 分析,得到了启动子参考序列信息,据此序列设计特异引物(5'-TTCAGCAGAACACTGTCGG-3'和 5'-GCCCTCTTA-GCCCGATACAT-3'),以玉米自交系 CN165 的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,预期的扩增产物大小约为 2000bp。PCR 程序为:94℃ 5min;94℃ 30s,59.9℃ 30s,72℃ 2min,36 个循环;72℃ 10min。将

扩增得到的目的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体 (Takara) 上, 测序得到启动子序列。利用启动子在线预测软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子区可能存在的顺式作用元件。

1.5 试验材料与处理

玉米抗旱自交系 CN165 为本研究所用试验材料。种子经灭菌处理 (75% 乙醇 1 min, 0.5% 次氯酸钠 20 min) 后, 用蒸馏水冲洗 5 遍, 然后播种于装有蛭石的盒子中, 每盒种 4 株。放置光照培养箱中培养, 长日照条件 (16h 光, 28℃ / 8h 暗, 22℃), 每 3d 浇水 1 次。对生长两周的玉米浇灌 20% PEG6000 溶液, 进行 PEG 胁迫处理, 分别取处理 0h、1h、5h、12h、24h 的地上部和根, 立即经液氮冷冻, -76℃ 保存, 供提取 RNA。

1.6 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 分析

对经 PEG 处理的各取样材料进行总 RNA 提取, 操作步骤依据总 RNA 提取试剂盒说明 (the Total RNA Isolation Reagent, TRIzol Reagent, Invitrogen)。然后通过 DNaseI (Takara) 对总 RNA 进行消化处理, 以去除基因组 DNA 污染。利用 M-MLV 反转录试剂盒 (Invitrogen) 将 2μg 纯化的总 RNA 反转录成第一链 cDNA, 作为 RT-qPCR 的模板。据 RT-qPCR 引物设计要求用 DNAMAN 设计 *ZmCIPK31* 特异引物 (5'-CACATCCTCCTCCAAGACTG-3' 和 5'-CCTCTTAGCCGATACATCT-3')。玉米内参基因 *GAPDH* 被用于在数据分析时对不同样品 cDNA 模板的上样量进行均一化校准, 所用引物为 5'-CCCTTCATCACACGGACTAC-3' 和 5'-AACCTTCTTGGCACCACCCT-3'。20μl PCR 扩增体系为: 10μl 2 × SYBR Premix Ex Taq (SYBR® Premix Ex Taq™ Kit, Takara), 200 nmol/L 各引物和 1μl 模板 cDNA。将每一个 PCR 反应所需的组分加样于 96 孔板 (Axygen) 中, 盖好专用高透光率封口膜 (Axygen), 使用 Icyler real-time PCR system (Bio-Rad) 进行 RT-qPCR, 每个样品 3 次重复。PCR 程序为: 95℃ 1.5 min; 95℃ 5s, 58℃ 15s, 72℃ 20s, 共 40 个循环; 起始 60℃, 每 20s 增加 0.5℃, 经过 80 个循环至 100℃ 用于进行融解曲线分析。在 Excel 中, 用 2^{-ΔΔCt} 方法^[10] 分别分析地上部和根中 *ZmCIPK31* 在不同 PEG 胁迫时间下的相对表达情况。以未进行 PEG 胁迫处理的 0h 样品作为相对参照, 其基因表达水平计为 1, 误差线以标准偏差 $s(n=3)$ 显示。在 SAS 中利用新复极差法对结果

进行多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 蛋白原核表达

对本实验室已克隆得到的 *ZmCIPK31* 基因预测其理论平均蛋白分子量为 50.8 kD, 为验证该基因在大肠杆菌体内能否真正表达一个类似大小的蛋白, 故对其进行原核表达分析。因所使用的 pMAL-c2X 原核表达载体内部含有 1 个约 42.5kD 的标签蛋白 (麦芽糖结合蛋白: maltose-binding protein, MBP), 因此预测原核表达系统中 MBP-*ZmCIPK31* 融合蛋白的分子量为 93.9 kD。将 pMAL 空载体 (作为对照) 和构建的 pMAL-*ZmCIPK31* 重组载体分别转化大肠杆菌 BL21 菌株, 经 IPTG 诱导后, 进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 1。可以看出, 经 IPTG 诱导后, 目的基因菌株诱导表达了略小于 94kD 的蛋白, 而对照菌株只诱导表达了标签 MBP。由此得出, 转化重组质粒的 BL21 菌株经 IPTG 诱导后能够成功的表达分子量接近预测值的目的蛋白 MBP-*ZmCIPK31*, 进而说明 *ZmCIPK31* 基因在大肠杆菌体内能够表达一个预测分子量的蛋白, 为进一步的蛋白可溶性分析打下基础。

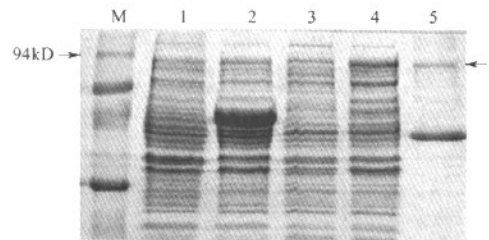


图 1 *ZmCIPK31* 在大肠杆菌中诱导表达及

MBP-*ZmCIPK31* 纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 The expression of *ZmCIPK31* protein in *E. coli* and the purified protein MBP-*ZmCIPK31* by SDS-PAGE analysis M: 蛋白质 Marker, 左侧箭头指向蛋白分子量为 94kD 的条带; 1、3: 分别表示转化 pMAL 质粒、pMAL-*ZmCIPK31* 质粒的大肠杆菌 BL21 菌株未经诱导的蛋白表达情况; 2、4: 分别表示转化 pMAL 质粒、pMAL-*ZmCIPK31* 质粒的大肠杆菌 BL21 菌株经 IPTG 诱导的蛋白表达情况; 5: MBP-*ZmCIPK31* 纯化蛋白, 如右侧箭头所示 M: Protein marker and the band the left arrow pointing to was 94 kD; 1, 3: Showed the expression analysis of proteins in pMAL and pMAL-*ZmCIPK31* transformed BL21 strains without being induced by IPTG, respectively; 2, 4: Showed the expression analysis of proteins in pMAL and pMAL-*ZmCIPK31* transformed BL21 strains being induced by IPTG, respectively; 5: Purified MBP-*ZmCIPK31* fusion protein as shown at the right arrow

2.2 蛋白可溶性分析及纯化

CIPKs 被归为植物类 SNF 激酶的 SnRK3 亚组里,是一类蛋白激酶。因此,为验证其激酶活性,首要的是能够得到纯化的有活性的蛋白。在大肠杆菌表达系统中,表达的目标蛋白主要以可溶性蛋白或不溶性包涵体两种形式存在,菌体细胞破碎后,不溶性包涵体主要存在于沉淀物中,蛋白的结构已发生变化,不能进行激酶活性分析;而可溶性蛋白主要存在于上清液中,是具有活性的蛋白,能够用于激酶活性分析。因此,首先要对上述成功表达的 MBP-ZmCIPK31 融合蛋白进行可溶性分析。收集已诱导表达了 MBP-ZmCIPK31 融合蛋白的大肠杆菌菌体,超声破碎后离心得到上清液和沉淀物,经 SDS-PAGE 分析,结果见图 2。可以看出,上清液和沉淀物中都有同原核表达分析一样的目的蛋白存在。由此得出,大肠杆菌中诱导表达的 MBP-ZmCIPK31 融合蛋白同时以可溶性蛋白和不溶性包涵体形式存在,可以进行进一步的可溶性蛋白纯化工作。将含有可溶性目的蛋白 MBP-ZmCIPK31 的上清液过淀粉树脂柱,得到纯化的蛋白,结果见图 1(泳道 5)。由此为下一步蛋白的激酶活性分析提供了纯化且有活性的目的蛋白。

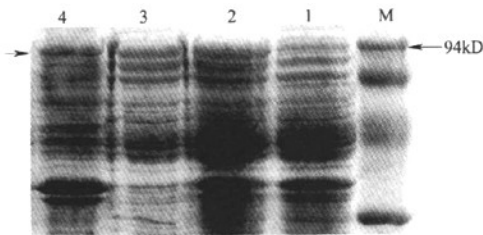


图 2 *ZmCIPK31* 在大肠杆菌中诱导表达蛋白的可溶性分析

Fig. 2 Soluble analysis of *ZmCIPK31* protein obtained in IPTG induced *E. coli* cells

M: 蛋白质 Marker, 右侧箭头指向蛋白质分子量为 94kD 的条带; 1、2: 分别表示转化 pMAL-*ZmCIPK31* 质粒的大肠杆菌 BL21 菌株未经 IPTG 和经 IPTG 诱导的蛋白表达情况; 3、4: 分别表示转化 pMAL-*ZmCIPK31* 质粒的大肠杆菌 BL21 菌株经 IPTG 诱导, 破碎细胞后, 上清液中和沉淀中蛋白表达情况; 左侧箭头为诱导表达的 MBP-ZmCIPK31 蛋白位置

M: Protein marker and the band the right arrow pointing to was 94 kD; 1, 2: Showed the expression analysis of protein in pMAL-*ZmCIPK31* transformed BL21 strain without and with IPTG induction; 3, 4: Showed the expression analysis of proteins in supernatant and precipitate of cracked IPTG induced BL21 cells, which were transformed by pMAL-*ZmCIPK31* fusion plasmid, respectively; The left arrow pointed to the location of MBP-ZmCIPK31 protein

2.3 启动子克隆及序列分析

在已克隆的 *ZmCIPK31* 基因 cDNA 和 DNA 的基础上, 为了深入了解其调控结构, 因此克隆其启动子区, 并进行启动子顺式作用元件预测。图 3 所示为 PCR 扩增启动子所得到的特异条带, 大小约为 2000bp。经测序后, 得到了起始密码子 ATG 上游 2189bp 的启动子区段 (GenBank: EU516320)。经启动子在线预测软件 PlantCARE^[11] 分析其可能存在的顺式作用元件, 结果见表 1。启动子区顺式作用元件按其功能基本归为六大类, 不仅具有 TATA-box 和 CAAT-box 等启动子共有序列, 还具有光应答、胁迫应答、发育相关、激素相关及其他功能未知的调控结构域。由此推断 *ZmCIPK31* 基因可能参与特定的植物发育过程, 应答光、多种胁迫及激素信号等, 参与植物体内一系列复杂的生物学过程。

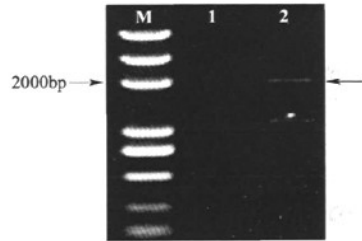


图 3 *ZmCIPK31* 启动子克隆

Fig. 3 Cloning of the promoter region of *ZmCIPK31*

M: DNA marker, 左侧箭头指向 2000bp 的条带; 1: 未加入模板的负对照; 2: *ZmCIPK31* 启动子的扩增, 产物如图中右侧箭头所示

M: DNA marker and the band the left arrow pointing to was 2000 bp; 1: Negative control; 2: Promoter cloning product, as shown at the right arrow

表 1 *ZmCIPK31* 启动子区调控序列预测

Table 1 List of predicted regulatory motifs in *ZmCIPK31* promoter region

顺式作用元件 Cis-acting element	调控序列名称 Name
光相关 Light related	4cl-CMA2b、ATCT-motif、Box 1、chs-CMA2a G-Box、CAG-motif、I-box、L-box、MNF1、MRE、Sp1、TCCC-motif
胁迫相关 Stress related	ARE、GC-motif、HSE、LTR、TC-rich repeats
发育相关 Development related	CAT-box、CCGTCC-box、circadian、GCN4_motif、Skn-1_motif
激素相关 Auxin related	GARE-motif、CGTCA-motif、P-box、TGA-element、TGACG-motif
启动子 Promoter related	CAAT-box、ELI-box3、TATA-box
其他 Others	A-box、CCAAT-box、MBS

2.4 玉米中 *ZmCIPK31* 基因受 PEG 诱导的表达分析

已知 *ZmCIPK31* 基因是基于干旱和盐胁迫处理下的玉米 EST 库中的一条 EST 得到的^[12]。为明确 *ZmCIPK31* 基因是否受干旱胁迫诱导表达,同时进一步证明启动子序列分析所推断的基因受胁迫诱导,用模拟干旱的 PEG 渗透胁迫来处理玉米, *ZmCIPK31* 基因在地上部和根部受 PEG 胁迫的表达情况如图 4。从统计分析结果看,地上部和根部 *ZmCIPK31* 基因都受到 PEG 胁迫诱导表达,但是表达模式不同,表现为地上部 *ZmCIPK31* 基因在处理 12h 时开始上调,而根中则在处理 1h 就开始下调。由此得出, *ZmCIPK31* 基因受 PEG 胁迫诱导表达,且在地上部和根部的诱导表达有差异。

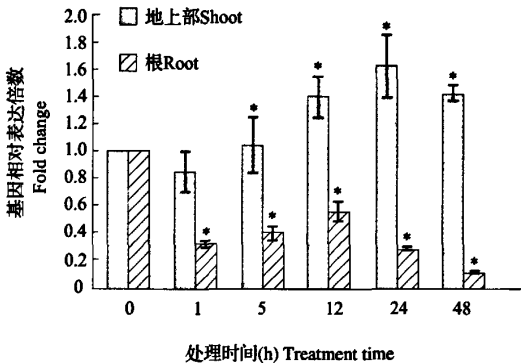


图 4 实时荧光定量 PCR 法分析 PEG 胁迫下 *ZmCIPK31* 基因在地上部和根部的表达情况

Fig. 4 Real-time quantitative PCR analysis of expression level of *ZmCIPK31* gene under PEG stress in shoots and roots 其中 0h 表示未经胁迫处理,其基因的表达水平作为其他处理时间的相对标准,定义为 1。误差线以标准偏差(s)表示,*表示样品与对照在 0.05 水平上达到显著差异

The transcript level at time 0h (untreated) was used as the calibrator and was given as 1. All the values are means $\pm s$ ($n = 3$), and s was shown as error bar. * represented significant difference between each sample and the related control at $P < 0.05$ level

3 讨论

3.1 可溶性 MBP-ZmCIPK31 蛋白的诱导表达

原核表达载体种类有很多,对于特定的基因,并非与所有的原核表达载体构建的重组载体转化大肠杆菌后,都能够诱导表达得到可溶性的目的蛋白,有的表现为不能够诱导表达目的蛋白,有的表现为能够诱导表达蛋白,但只以包涵体的形式存在。本实验初期使用了 pET-30a(+) (Novagen) 原核表达载体,得到了诱导表达的目的蛋白,但可溶性分析后,

目的蛋白只以包涵体的形式存在,不能得到有活性的可溶性蛋白,因此,改换 pMAL-c2X 原核表达载体,结果得到了可溶性 MBP-ZmCIPK31 蛋白,并且能够纯化(图 1,图 2),为进一步的蛋白激酶活性分析提供了有活性的蛋白。另外,研究已表明 *ZmCIPK16* 基因利用同样的原核表达载体,得到纯化且有活性的 MBP-ZmCIPK16 蛋白,通过激酶活性分析,证明了 *ZmCIPK16* 确实可以发生自磷酸化和磷酸化 MyBP (myelin basic protein) 底物^[12],由此进一步明确了对此原核表达系统所得到的可溶性融合蛋白进行激酶活性分析的可行性。

蛋白在体外的原核表达并不能说明在做转基因功能验证时,基因也能够植物体内表达且翻译成有活性的蛋白,但是可以通过原核表达得到的纯化蛋白制作抗体,在蛋白水平上鉴定转基因阳性株系,明确基因是否在转基因植物体内翻译成目的蛋白,有利于进一步明确基因的功能。

3.2 启动子序列信息分析

基因的表达调控是分子生物学研究的热点,而启动子作为在转录水平上调节基因表达的重要因素,对启动子的研究必不可少。通过对启动子序列内的顺式作用元件进行预测分析,不但可以为进一步的基因表达调控研究提供参考,而且可以为进一步的基因功能分析提供参考。*ZmCIPK31* 的启动子序列具有光应答、胁迫应答、发育相关、激素相关及其他功能未知的调控结构域(表 1)。下一步可依据这些重要的顺式作用元件,对启动子序列进行区段缺失的 GUS 表达分析,以期得到具有特定调控功能的区段,为应用于植物遗传工程提供分子理论基础。此外,基因功能分析时,对转基因植株的表型鉴定也可依据启动子区域预测的顺式作用元件功能来设计处理条件,使得表型鉴定更有效。

3.3 PEG 胁迫下 *ZmCIPK31* 基因的诱导表达分析

研究表明,CIPKs 受逆境胁迫诱导表达,在植物应答逆境胁迫过程中起重要的作用^[6]。*ZmCIPK16* 被证明受 PEG、NaCl、ABA、脱水、热及干旱胁迫的诱导表达^[13]。RT-qPCR 分析表明, *ZmCIPK31* 也受 PEG 胁迫诱导表达(图 4)。下一步将依据启动子序列分析结果,对其他逆境胁迫处理下的基因表达情况进行分析,以进一步推测 *ZmCIPK31* 基因的功能。

此外, *ZmCIPK31* 受 PEG 胁迫在地上部和根中的诱导表达模式是不同的。从统计角度上分析,二者的表达模式是相反的,地上部表现为基因的上调

表达,而根中表现为下调表达,且诱导表达的时间根中(1h)远远早于地上部(12h)。由此推断,PEG胁迫下 *ZmCIPK31* 基因在地上部和根中所在的应答途径不同,且 *ZmCIPK31* 优先在根中应答胁迫。

参考文献

- [1] 尚忠林,毛网红,孙大业. 植物细胞内钙信号的特异性[J]. 植物生理学通讯,2003,39(2):93-100
- [2] 李玉菊,李小方. 植物中解密 Ca^{2+} 信号转导特异性的机制[J]. 细胞生物学杂志,2005,27(4):414-416
- [3] Liu J, Zhu J K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance[J]. *Science*,1998,280:1943-1945
- [4] Kudla J, Xu Q, Harter K, et al. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals[J]. *PNAS*,1999,96:4718-4723
- [5] Baticic O, Kudla J. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network[J]. *Planta*,2004,219:915-924
- [6] Luan S. The CBL CIPK network in plant calcium signaling[J]. *Trends Plant Sci*,2009,14:37-42
- [7] Hwang Y S, Bethke P C, Cheong Y H, et al. A gibberellin-regulated calcineurin B in rice localizes to the tonoplast and is implicated in vacuole function [J]. *Plant Physiol*,2005,138:1347-1358
- [8] Cheong Y H, Kim K N, Pandey G K, et al. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*,2003,15:1833-1845
- [9] 王珊,蔡斌华,章镇,等. 果梅完全花与不完全花的差异蛋白分析[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(4):465-468
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*,2001,25:402-408
- [11] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Res*,2002,30:325-327
- [12] Zhang J, Jiao Y H, Lu H F, et al. Construction of EST library of mixed tissues from maize and analysis of sequences of partial ESTs[J]. *J Guangxi Agric Biol Sci*,2004,23:243-248
- [13] 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*,2009,69:661-674

玉米ZmCIPK31基因原核表达及启动子序列分析

作者: [张成伟](#), [刘颖慧](#), [石云素](#), [宋燕春](#), [王天宇](#), [黎裕](#), [ZHANG Cheng-wei](#), [LIU Ying-hui](#), [SHI Yun-su](#), [SONG Yan-chun](#), [WANG Tian-yu](#), [LI Yu](#)
作者单位: [张成伟, 石云素, 宋燕春, 王天宇, 黎裕, ZHANG Cheng-wei, SHI Yun-su, SONG Yan-chun, WANG Tian-yu, LI Yu \(中国农业科学院作物科学研究所, 北京, 100081\)](#), [刘颖慧, LIU Ying-hui \(中国农业科学院作物科学研究所, 北京, 100081; 河北北方学院, 张家口, 075000\)](#)
刊名: [植物遗传资源学报](#) **ISTIC|PKU**
英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)
年, 卷(期): 2010, 11(2)

参考文献(13条)

1. [Luan S](#) [The CBL CIPK network in plant calcium signaling](#)[外文期刊] 2009(1)
2. [Lia J;Zhu J K A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance](#)[外文期刊] 1998(5371)
3. [李玉菊;李小方](#) [植物中解密Ca²⁺信号转导特异性的机制](#)[期刊论文]-[细胞生物学杂志](#) 2005(04)
4. [尚忠林;毛国红;孙大业](#) [植物细胞内钙信号的特异性](#)[期刊论文]-[植物生理学通讯](#) 2003(02)
5. [王珊;蔡斌华;章镇](#) [果梅完全花与不完全花的差异蛋白分析](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2008(04)
6. [Cheong Y H;Kim K N;Pandey G K](#) [CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responds in Arabidopsis](#) 2003
7. [Hwang Y S;Bethke P C;Cheong Y H A gibberellin-regulated calcineurin B in rice localizes to the tonoplast and is implicated in vacuole function](#)[外文期刊] 2005(3)
8. [Zhao J F;Sun Z F;Zheng J](#) [Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize](#) 2009
9. [Zhang J;Jiao Y H;Lu H F](#) [Construction of EST library of mixed tissues from maize and analysis of sequences of partial ESTs](#) 2004
10. [Lescot M;D\(e\)hais P;Thijs G](#) [PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences](#) 2002
11. [Livak K J;Schmittgen T D](#) [Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method](#)[外文期刊] 2001(4)
12. [Batistic O;Kudla J](#) [Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network](#) 2004
13. [Kudla J;Xu Q;Hatter K](#) [Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals](#) 1999

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201002012.aspx