

油菜钙依赖蛋白激酶 *BnCDPK1* 的克隆和表达分析

张秋平^{1,2}, 文 李^{1,3}, 王 峰¹, 廖志强^{1,2}, 李 慧^{1,2}, 刘睿洋^{1,2}, 官春云^{1,2}

(¹湖南农业大学农学院, 长沙 410128; ²国家油料改良中心湖南分中心, 长沙 410128;

³长沙理工大学食品工程技术学院, 长沙 410114)

摘要:根据转录组测序获得的钙依赖蛋白激酶基因的 EST 序列设计特异引物, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术从油菜中克隆获得 *BnCDPK1* 基因全长序列, NCBI 登录号为 KF740477, 其 cDNA 和 gDNA 全长分别为 2115 bp 和 2857 bp, 含有 11 个内含子和 12 个外显子。生物信息学分析表明其开放阅读框为 1581 bp, 编码 527 个氨基酸, 具有 CDPKs 家族典型的特征, 含有 1 个激酶区域和 4 个钙离子手型结构域, 与拟南芥 *AtCDPK28* 同源性最高, 属于第 IV 亚家族。*BnCDPK1* 在油菜的根、茎、叶、花、种子中均有表达, 但表达丰度存在差异, 叶片中表达量最高, 其次为茎、根和种子, 花中的表达量最低; 在高抗和高感油菜品种中, 菌核菌胁迫均能够诱导 *BnCDPK1* 上调表达, 但是高抗品种比高感品种反应更迅速, 表达量更高。接种前、接种后 12 h、接种后 24 h, 高抗品种的表达量相比高感品种分别提高 1.4 倍、4 倍和 3 倍, 推测其可能参与油菜的生长发育以及油菜对菌核菌侵染的应答和防御反应。

关键词: 油菜; 钙依赖蛋白激酶; 基因克隆; 基因表达; 抗病

Molecular Cloning and Expression Analysis of Calcium-dependent Protein Kinase *BnCDPK1* in *Brassica napus*

ZHANG Qiu-ping¹, WEN Li^{1,3}, WANG Feng¹, LIAO Zhi-qiang^{1,2},
LI Hui^{1,2}, LIU Rui-yang^{1,2}, GUAN Chun-yun^{1,2}

(¹Department of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128; ²The Branch Center of Hunan, The National Improvement Center of Oilcrop, Changsha 410128; ³Department of Food & Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha 410114)

Abstract: The full length sequence of *BnCDPK1* was cloned from *Brassica napus* using RNA-Seq and rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques. Its cDNA was 2115 bp, and gDNA was 2857 bp which contained 11 introns and 12 exons. Bioinformatic analysis showed that *BnCDPK1* contained an entire opening reading frame of 1581 bp, which encoded a polypeptide of 527 amino acid residues possessing a serine/threonine protein kinase catalytic domain (S_TKc) and four EF-hand calcium-binding domains, and it shared high identity with *AtCPK28* and belonged to the CDPKs subgroup IV. Fluorescent quantitative PCR analysis displayed that it was constitutively expressed in all tested organs, but the transcript abundance was relatively higher in leaves and stems than in roots and seeds, with the lowest in flowers. The expression of *BnCDPK1* was induced by *Sclerotinia sclerotiorum* infection in both high resistant and susceptible cultivars. However, the relative transcript level was higher in the former cultivars at all time points, 1.4 folds before the pathogen inoculation, 4 folds for 12 hours after the inoculation and 3 folds for 24 hours after the inoculation. Thus, it was deduced that *BnCDPK1* was involved in growth and development of rapeseed, and played an important role in the defense reaction to *Sclerotinia sclerotiorum*.

Key words: oil seeds; calcium-dependent protein kinase; gene cloning; gene expression; resistant to fungal

收稿日期: 2014-01-02 修回日期: 2014-02-08 网络出版日期: 2014-03-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jpgr.20140312.002.html>

基金项目: 强优势油菜杂交种的创制与应用 (2010BAD01B01); 油菜丰产高效栽培技术研究 (2010BAD01B01)

第一作者研究方向为作物遗传及分子育种。E-mail: zqp_815@hotmail.com

通信作者: 官春云, 研究方向为油菜遗传育种与栽培。E-mail: guancyun2011@aliyun.com

钙离子作为第二信使,在植物的生长、发育、抗逆、抗病等生理反应中有着非常重要的作用^[1]。CDPKs 同时具有 Ca^{2+} 受体蛋白和 Ser/Thr 蛋白激酶的功能,广泛分布于植物、藻类和原生生物中^[2]。目前,已经从多种植物中克隆和鉴定了一系列的 CDPKs 基因,包括拟南芥^[3]、水稻^[4]、小麦^[5]、马铃薯^[6]、草莓^[7]、苹果^[8]和芒果^[9]等,这些基因分属于 4 个亚家族(I ~ IV)。对 CDPKs 基因的定位和表达分析发现,在亚细胞定位水平上,细胞膜、细胞骨架、细胞质、叶绿体、线粒体、微粒体膜、细胞核和染色体等细胞器中均有表达,在植物的各组织器官也广泛分布,包括根、茎、叶、花、果实、种子等^[3],并且其表达受激素、环境胁迫等因素的诱导,如赤霉素、生长素、低温、干旱、盐、伤害等^[10]。随着对 CDPKs 研究的深入,发现其通过参与细胞 Ca^{2+} 信号转导行使多种多样的生物学功能,包括参与调控植物生长发育^[11-12]、植物激素的信号转导和激素的合成与代谢、逆境胁迫应答、细胞分化与凋亡^[13-14]等,同时在植物抗病防御反应中起重要作用^[15]。研究发现,很多 CDPKs 基因受病原菌的诱导表达,如水稻 *OsCPK2*、*OsCPK15*、*OsCPK17*、*OsCPK9*^[16]和 *OsCPK20*、*OsCPK24*^[17]受稻瘟病菌的诱导上调表达,烟草 *NtCPK1*、*NtCPK12*、*NtCPK13*^[18],玉米 *ZmCPK10*^[19]也受真菌诱导表达。另外的试验证明了相关基因在植物抗病方面的功能,如通过 VIGS 技术将烟草中的 *NtCDPK2* 沉默,转基因植株表现出过敏性反应的延迟和降低^[20];G. Freymark 等^[21]发现大麦 *NbCPK3*、*NbCPK4* 能够抑制小麦白粉病菌的侵染。

油菜菌核病是油菜三大病害之首,从油菜苗期到成熟期都造成危害,以中、后期发病最为普遍,一般发病率 10% ~ 20%,严重时达 80% 以上。该病危害茎秆、叶片、角果等,容易引起植株早枯,角果减少,种子皱瘪,千粒重和出油率降低,产量下降^[22],已成为影响我国油菜高产、优质的关键因素之一。菌核菌致病力强,寄主范围广,目前还没有十分简便、有效的防治方法,也没有找到有效的抗源。

本实验室前期研究中发现油菜中钙含量与抗病性有关,抗病性强的品种中钙含量高^[23],同时在对抗、感菌核病的油菜品种的转录组测序中(未发表)发现钙依赖蛋白基因的表达存在差异。根据转录组测序获得的 EST 序列设计引物,通过 RT-PCR 和 RACE 技术,获得 *BnCDPK1* 的全长,利用荧光定量 PCR 分析该基因的组织表达特性,以及在菌核菌胁迫下,高抗、高感菌核病品种的表达模式变化及差

异,为今后深入研究 CDPK 基因在应答病菌胁迫中的功能和油菜抗菌核病育种提供基础和候选基因。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为本实验室培育的甘蓝型油菜湘油 15 和 98C40,种于本校温室。基因克隆和组织表达特异性研究于 3 ~ 4 叶期取样,病菌接种试验在盛花期进行。菌核菌从田间收集的菌核中分离得到,然后培养保存。从保存的菌种平板上取直径 1 cm 的带菌琼脂块,置于 PDA 平板上,于 24 °C 倒置培养,待菌丝长满平板后,取直径 0.5 cm 的带菌琼脂块接种到油菜叶片上,并于接种前、接种后 12 h 和 24 h 分别取接种点附近的叶片组织,用液氮速冻后于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。试验设置 3 个重复,每个处理取 10 株的样品混合建池,以消除单株差异。

1.2 *BnCDPK1* 基因的克隆

根据转录组测序获得的 EST 序列,设计引物 EST-F 和 EST-R(表 1),以湘油 15 叶片 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系包括 cDNA 1 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 1 μL , 10 \times *Taq* buffer(含 Mg^{2+}) 5 μL , dNTP (2.5 mmol/L each) 4 μL , *Taq* 酶 (2.5 U/ μL) 0.5 μL ,用 ddH₂O 补齐至 50 μL 。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 30 次;72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,胶回收使用 TIANGEN 生化科技公司的琼脂糖凝胶回收试剂盒(DP209-02),具体操作参照说明

表 1 PCR 引物列表

Table 1 Primers for PCR

引物编号 Primer code	引物序列(5' - 3') Primer sequence(5' - 3')
EST-F	CTTCCCATAGCGGTTGAG
EST-R	TCCAGCGACTTTGAGCAT
3'-RACE	CTTTCCGGCCACGAGAACGTTG
5'-RACE	CGTTCTCGTGGCCGAAAGAG
QC-F	TGCTCTCATTGGAATCGCTCT
QC-R	GTTTGCTGCCTCACACAAC
DL-F	GCACCGATTTTGATACGCC
DL-R	CCCGAATTGACCATGACCC
UBC21-F	CCTCTGCAGCCTCCTCAAGT
UBC21-R	CATATCTCCCTGTCTTGAATGC

书。回收片段用 TAKARA 的 PMD™18-T vector cloning Kit (6011) 连接到 T 载体。连接产物通过 42 °C 水浴 1 min 热激转化大肠杆菌 DH5 α , 加入 500 μ L LB 液体培养基于 37 °C 摇床 200 r/min 振荡培养 1 h, 然后将菌液均匀涂布于含有 X-Gal 和 IPTG 的 LB 培养基平板, 于 37 °C 倒置培养过夜, 进行蓝白斑筛选, 挑选白斑于 LB 液体培养基置于摇床 37 °C 振荡培养 6 h, 取菌液进行 PCR 鉴定, 鉴定的阳性克隆送上海生工测序。

1.3 *BnCDPK1* 基因的全长克隆

根据测序的序列信息, 分别设计 3'-RACE 和 5'-RACE 引物 (表 1)。3'-RACE 使用 TaKaRa 的 3'-Full RACE Core Set with PrimeScript™ RTase (6106) 试剂盒, 5'-RACE 使用 Clontech 的 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒 (634923), 操作步骤参照说明书。扩增的片段通过琼脂凝胶电泳、回收和 T 载体克隆 (参照 1.3) 后测序。将测序获得的 3'-RACE 和 5'-RACE 序列用 DNAMAN 进行拼接, 根据拼接的全长序列信息, 在 5'端和 3'端分别设计上下游引物 QC-F 和 QC-R (表 1), 分别以 cDNA 和 DNA 为模板, 用 TAKARA 公司的高保真酶 Speed-STAR® HS DNA Polymerase (DRR070A) 进行扩增, PCR 体系和程序参照说明书, 扩增片段加 A 后回收, 然后连接到载体上测序 (参照 1.2)。

1.4 *BnCDPK1* 基因的生物信息学分析

利用 NCBI 提供的 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) 对 *BnCDPK1* 基因进行分析, 查找基因的编码区, 推断其氨基酸序列, 并进行验证。通过 ProtParam (<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析蛋白序列的基本性质, 使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 分析蛋白的结构功能域, 用 CLUSTWAL 和 MEGA 5.2 软件进行同源性比对分析, 并构建进化树。

1.5 *BnCDPK1* 基因的表达分析

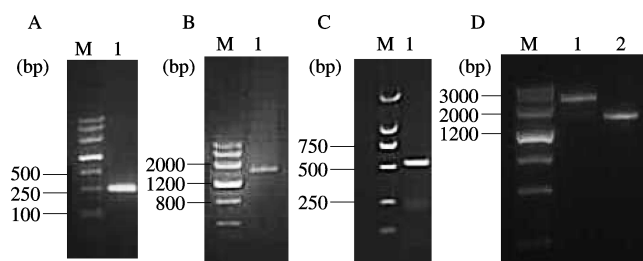
从油菜湘油 15 的根、茎、叶、花、种子中分别提取总 RNA, 进行反转录, 通过荧光定量 PCR 分析 *BnCDPK1* 在油菜各组织中的表达情况。在油菜盛花期, 利用带菌琼脂块接种湘油 15 (高抗菌核菌)、98C40 (高感菌核菌) 叶片, 并于接种前、接种后 12 h 和 24 h 取病斑周围叶片组织提取 RNA, 反转录合成 cDNA, 以 *UBC21* 为内参基因, 使用 BIO-RAD 的 CFX96 进行荧光定量 PCR。荧光定量引物为 DL-F 和 DL-R, 内参基因引物为 UBC21-F 和 UBC21-R (表 1), 荧光定量试剂为 BIO-RAD SsoAdvanced SYBR Green

Supermix, 采用 20 μ L 体系, 含 300 nM 的引物, 100 ng cDNA, SsoAdvanced SYBR Green Supermix 10 μ L, 用两步法进行扩增, 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 10 s (real-time 荧光采集), 40 个循环; 65 ~ 95 °C (每个循环升高 0.5 °C) 5 s, 建立溶解曲线。每个样品设置 3 个重复, 根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak) 法计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *BnCDPK1* 基因的 cDNA 克隆

根据转录组测序获得的 EST 序列设计引物, 通过 RT-PCR 获得了一个 234 bp 的片段, 根据获得的片段序列信息, 设计 3'-RACE 和 5'-RACE 引物, 通过 RACE 扩增, 分别获得 1525 bp 和 600 bp 的 3'片段和 5'片段, 将 5'和 3'序列进行拼接, 获得了全长为 2115 bp 的 cDNA。根据拼接序列推断的编码区设计引物, 分别以湘油 15 叶片 cDNA 和基因组 DNA 为模板进行扩增, 获得 2115 bp 的 cDNA 编码区全长和 2857 bp 基因组编码区全长, 将基因命名为 *BnCDPK1*, Genbank 登录号为 KF740477。



A: EST 片段扩增; B: 3'-RACE 扩增; C: 5'-RACE 扩增; D: DNA 全长扩增; 泳道 1: gDNA 全长扩增; 泳道 2: cDNA 全长扩增
A: Amplification result of EST, B: Amplification result of 3'-RACE, C: Amplification result of 5'-RACE, D: Amplification of full length DNA, Lane 1: Amplification of full length gDNA, Lane 2: Amplification of full length cDNA

图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products

2.2 *BnCDPK1* 基因的生物信息学分析

通过 ORF Finder 分析, 该基因编码区全长 1581 bp (位置为 231 ~ 1814), 基因组全长为 2857 bp, 将 cDNA 全长序列与基因组 DNA 编码区序列进行比对, 发现 *BnCDPK1* 基因含有 11 个内含子 (位置分别为 304 ~ 516, 650 ~ 740, 778 ~ 854, 970 ~ 1201, 1282 ~ 1362, 1534 ~ 1621, 1747 ~ 1836, 1954 ~ 2045, 2154 ~ 2234, 2297 ~ 2425, 2600 ~ 2698) 和 12 个外显子 (1 ~ 303, 517 ~ 649, 741 ~ 777, 855 ~ 969, 1202 ~ 1281, 1363 ~ 1533, 1622 ~ 1746, 1837 ~ 1953, 2046 ~

2153, 2235 ~ 2296, 2426 ~ 2599, 2699 ~ 2857)。该基因编码 527 个氨基酸, 含有 1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域(66 ~ 326)和活化位点(188 ~ 200), 4 个 EF-hand 结构域(373 ~ 401, 410 ~ 438, 452 ~ 480, 482 ~ 510)基元, 具有 CDPKs 典型的结构特征。通过 ProtParam 工具分析, BnCDPK1 分子量为 59 kD、理论等电点为 8.5, 总共包括 8405 个原子, 分子式为 $C_{2643}H_{4204}N_{758}O_{788}S_{12}$, 在组成 BnCDPK1 蛋白的 20 种氨基酸中, 亮氨酸(Leu)所占比例最高, 达到 9.3%, 半胱氨酸(Cys)、蛋氨酸(Met)、色氨酸(Trp)所占的比例最低, 都为 1.1%。不稳定指数为 37.00, 可归纳为稳定蛋白, 脂肪指数为 85.48, 总

平均亲水性为 -0.472, 为水溶性蛋白。PROSITE 分析表明, 该蛋白含有 5 个 N-豆蔻酰化位点(2 ~ 7, 12 ~ 17, 46 ~ 51, 329 ~ 334, 478 ~ 482), 8 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(15 ~ 17, 21 ~ 23, 40 ~ 42, 158 ~ 160, 165 ~ 167, 298 ~ 300, 44 ~ 448, 514 ~ 516), 3 个 cAMP 磷酸化位点(42 ~ 45, 159 ~ 162, 242 ~ 245), 3 个酰胺化位点(50 ~ 53, 222 ~ 225, 263 ~ 266), 2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(52 ~ 58, 459 ~ 467), 1 个 N-糖基化位点(331 ~ 334), 14 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(87 ~ 90, 122 ~ 125, 158 ~ 161, 165 ~ 168, 203 ~ 206, 245 ~ 248, 294 ~ 297, 298 ~ 301, 364 ~ 367, 365 ~ 368, 390 ~ 393, 420 ~ 423, 469 ~ 472, 499 ~ 502)等。

```
1      ACATGGGGGGGGGAGGAAAGTGGAGGGAGATTTCGTTTCATGATTCACTCGCTCTTTGGCTTTGACCAACTCA
76     ACCCTCTTCTCCTTCTCTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTATTTTTTGTGTTTATTAAATCTTCATCCAC
151    CACCCCACTCTCTCTCCCTCAACTCCAATCCATGCTCTCATTGGAATCGCTCTCTCTCCGATCTTAGCATAATA
226    AGCCAATGGGTGTGTGTTTCTCCGCCATTAGAGTCACCGGTGCCAGCAGTAGTAGACAGACCAACAGCAACAAGG
      M G V C F S A I R V T G A S S S R Q T N S N K
301    CTCATAAAGGATGCAAGAAACCCCGGAGAATAAGCCATCTACCAACACGAAGCGGAGAGCCACGGGTCAGTCC
      A H K G C K K P P E N K P S T N T K R R A T G S V
376    CTTGGCGGAAGCGCACCGATTCTTGATACGCCAAAGACTTCCACGAGCAGTATACCATCGGGAAGTGTGGGTC
      P C G K R T D F G Y A K D F H E Q Y T I G K L L G
451    ATGGTCAATTCGGGTATACCTACGTTGCCATCGACAAGTCCACTGGCGATCGTGTGCGCGTCAAGAGACTCGATA
      H G Q F G Y T Y V A I D K S T G D R V A V K R L D
526    AGAGTAAGATGGTTCTTCCCATAGCGGTTGAGGACGTGAAGCGGAGGTTGAGATACTTAAAGCTCTTTCGGGCC
      K S K M V L P I A V E D V K R E V E I L K A L S G
601    ACGAGAACGTTGTACAGTTTACAATGCCTTTGACGACGACGACTACGTCTACATTGTTATGGAGTTGTGCGGAG
      H E N V V Q F Y N A F D D D D Y V Y I V M E L C E
676    GAGGCGAGTTGTGATCGGATTATCCAGGAAAGATAGTCGTTACTCCGAGAAAGATGCAGCCGTTGTGGTTA
      G G E L L D R I L S R K D S R Y S E K D A A V V V
751    GACAGATGCTCAAAGTCGCTGGAGAATGTCATCTCCACGGTCTTGTTCATAGAGATATGAAACCTGAGAATTTTT
      R Q M L K V A G E C H L H G L V H R D M K P E N F
826    TGTTTAAATCAACTCAACTGGATTGCGCTCTAAAGGCTACAGATTTTGGTTTATCCGATTTTATCAAAACGAGGA
      L F K S T Q L D S P L K A T D F G L S D F I K P G
901    AAAGGTTCCATGACATTGTTGGCAGCGCCTATTATGTAGCTCCAGAAGTACTTAAGCGCAGATCAGGCCCGGAAT
      K R F H D I V G S A Y Y V A P E V L K R R S G P E
976    CAGATGCTGGAGCATTGGTGTATACCTATATCTTGTCTGTGGAAGACGCCCTTTTGGGATAGGACAGAGG
      S D V W S I G V I T Y I L L C G R R P F W D R T E
1051   ACGGTATATTTAAGGAGGTCTTAAGGAACAAACCTGACTTCCGTCGCAACCATGGTCAACTATAAGTGACAGTG
      D G I F K E V L R N K P D F R R K P W S T I S D S
1126   CCAAAGATTTTATTAAGTTACTTGTTAAAGACCCAGCAGCGGCTAACTGCTTCACAAGCCCTGTCACATG
      A K D F I K K L L V K D P R A R L T A S Q A L S H
1201   CGTGGGTTAGAGAAGGAGGAATGCCACTGACATCCCTGTCGACATTTCTGTTCTGAACAACCTACGTCACTTTG
      A W V R E G G N A T D I P V D I S V L N N L R Q F
1276   TTAGATACAGCGTCTGAAGCAGTTTGCTTTACGGGCGCTTGCTAGCACACTTGACGAGGCAGAGATATCTGACC
      V R Y S R L K Q F A L R A L A S T L D E A E I S D
1351   TCAGAGATCAGTTTGATGCAATTGATGTGGATAAAACGGCGTCATTAGTCTTGAGGAGATGAGACAGGCACCTTG
      L R D Q F D A I D V D K N G V I S L E E M R Q A L
```



```

1426  CCAAAGATCTTCCTTGAAACTGAAGGAATCACGAGTTGCCGAGATACTTGAAGCGATTGATAGCAACACTGATG
      A K D L P W K L K E S R V A E I L E A I D S N T D
1501  GGTTAGTGGACTTCACAGAGTTTGTAGCAGCAGCTCTACATGTTTCATCAGCTGGAAGAACATGACTCAGAGAAAT
      G L V D F T E F V A A A L H V H Q L E E H D S E K
1576  GGCAGCTAAGATCAAGAGCAGCTTTTGAGAAATTCGACATTGACAAAGACGGGTACATAACCCCTGAGGAGCTTC
      W Q L R S R A A F E K F D I D K D G Y I T P E E L
1651  GATTGCACACGGGTTAAGAGGGTCAATAGACCCACTTCTGGATGAAGCAGACATAGACAGAGACGGGAAAAATAA
      R L H T G L R G S I D P L L D E A D I D R D G K I
1726  GCCTGCATGAGTTCAGGAGACTTCTAAGAACAGCAGCATAAGTTCCCGAGAGTTCCAAGCACTGCAGGCCACA
      S L H E F R R L L R T A S I S S P R V P S T A G H
1801  GGATTCTCGGTAGTTTTAAATGGTGTATATACTAGAAGAGGACAATAAGTGGAGACAGGCAATGTGATTATAT
      R I P R *
1876  ATATATGTAATGTTGTTTGTAAAGATAAGTGGGGGTTTGGGCTATTGTAGTGATAAGTAAGTAGTTTGGTTGTGT
1951  GAGGCAGCCAAACCAAGAAACAGTGTGAGTGGTTTGGTACCAGGTTAAAGAGGATATGGGATAGGTACATGC
2026  CCATTCCCTGACTCGACCAGAGCACCAGAAAGATAGATCCAGCTGTAATTGAACATCTCGTATGTTTGT
      2101  CCAAAAAAAAAAAAA

```

下划线为丝氨酸/苏氨酸激酶区域,方框内为活化位点,虚线为 4 个 EF-hand 钙结合域

Underlines means protein kinase domain,block diagram means serine/threonine protein

kinases active-site signature,dotted lines means EF-hand calcium-binding domains

图 2 *BnCDPK1* 的 cDNA 序列和推断的氨基酸序列

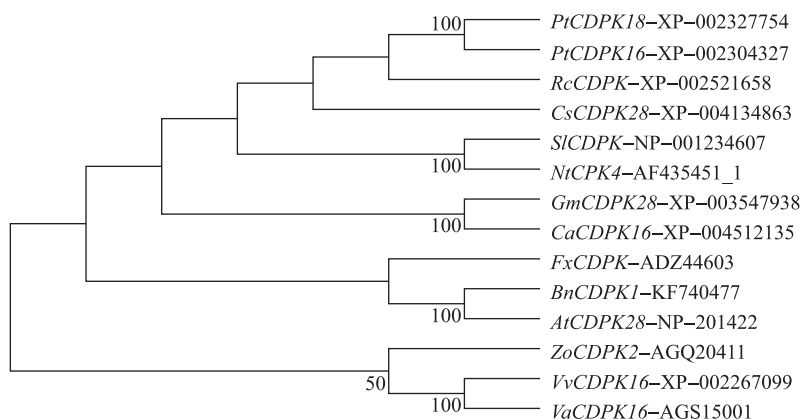
Fig. 2 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *BnCDPK1*

2.3 *BnCDPK1* 基因的同源性分析与进化树构建

从 NCBI 数据库中下载拟南芥、杨树、葡萄、番茄、蓖麻等同源基因,通过 Clustwal 软件进行比对分析,发现该基因与拟南芥的 *CDPK28* 基因同源性为 91%,其次是杨树和葡萄,分别是 78% 和 77%。各物种的 CDPK 蛋白序列在 5' 端可变区同源性很低,而在丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶催化结构域和 EF-

hand 结构域同源性较高。

采用 MEGA 5.2 软件,通过邻接法 (NJ, neighbor-joining) 构建了 *BnCDPK1* 基因与 13 条来自于不同物种的同源基因的进化树。分析发现 (图 3), *BnCDPK1* 基因与拟南芥的 *AtCDPK28* 亲缘关系最近,属于第 IV 亚家族



Pt: *Populus trichocarpa* (毛果杨), Re: *Ricinus communis* (蓖麻),

Cs: *Cucumis sativus* (黄瓜), Sl: *Solanum lycopersicum* (番茄), Nt: *Nicotiana tabacum* (烟草), Gm: *Glycine max* (大豆),

Ca: *Cicer arietinum* (鹰嘴豆), Fx: *Fragaria × ananassa* (草莓), Bn: *Brassica napus* (油菜), At: *Arabidopsis thaliana* (拟南芥),

Zo: *Zingiber officinale* (铁皮石斛), Vv: *Vitis vinifera* (葡萄), Va: *Vitis amurensis* (山葡萄)

图 3 *BnCDPK1* 与其他物种 CDPKs 的进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of *BnCDPK1* with CDPKs from other plant species

2.4 *BnCDPK1* 基因的组织表达分析

通过实时荧光定量 PCR 分析发现, *BnCDPK1*

基因在油菜根、茎、叶、花、种子中都有表达,但是在叶中的表达量最高,其次是茎,再次为根和种子,在

花中的表达量最低(图4)。

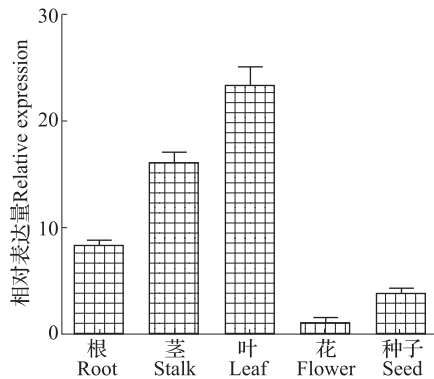


图4 *BnCDPK1* 的组织表达特性

Fig. 4 Expression patterns of *BnCDPK1* in different organs of rapeseed

2.5 *BnCDPK1* 基因受菌核菌胁迫表达分析

对高抗品种(湘油15)和高感品种(98c40)接种菌核菌,提取接种前、接种后12 h和24 h接种点周围叶片组织总RNA进行反转录,通过荧光定量PCR分析该基因对菌核菌胁迫的响应。发现在高抗和高感品种中,菌核菌均能诱导 *BnCDPK1* 基因的上调表达。但是高抗品种比高感品种上调的时间更早,更迅速,表达量更高,在接种前、接种后12 h、接种后24 h,高抗品种中的表达量分别是高感品种的1.4倍、4倍和3倍(图5)。

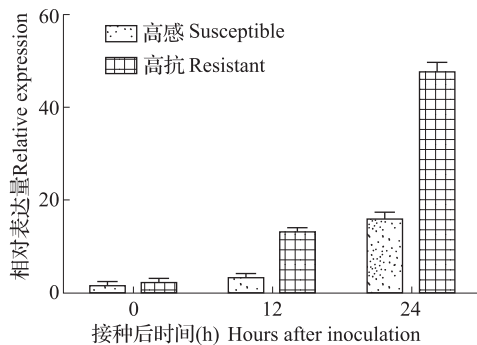


图5 *BnCDPK1* 受菌核菌诱导表达

Fig. 5 Expression patterns of *BnCDPK1* induced by *Sclerotinia sclerotiorum*

3 讨论

CDPKs 作为钙信号途径的 Ca^{2+} 受体,广泛存在于植物中,目前已从多种植物中克隆获得 CDPKs 基因,包括拟南芥 34 个^[19],水稻 31 个^[18],小麦 20 个^[7],绒毛状烟草 25 个^[24],杨树 36 个^[25],玉米 35 个^[26]等,这些基因可以归纳为 4 个亚家族,但是从甘蓝型油菜中克隆 CDPKs 基因尚未报道。本研究从甘蓝型油菜湘油 15 中克隆的 *BnCDPK1* 基因含有

CDPKs 家族的典型结构域,包括 N 端可变区,由 261 个氨基酸组成的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域和 4 个 EF-Hand 结构域,且 N 端可变区保守性差,而催化区和调控区与其他物种的同源性较高,通过比对和进化树构建分析,该基因与拟南芥 *AtCDPK28* 同源性最高,属于第 IV 亚家族。

研究发现,CDPKs 的组织表达特点不一,有些可以在植物的大多数组织器官表达,而有些却只在特定的组织表达,如烟草 *NtCPK1* 在根、茎和花中表达,在叶片中不表达^[27],拟南芥的 *AtCPK16*、*AtCPK17*、*AtCPK25*、*AtCPK34* 只在花粉管中表达,参与调控花粉管的生长^[28]。*BnCDPK1* 在根、茎、叶、花和种子中都有表达,叶中的表达最高,茎次之,花中的表达量最低,推测 *BnCDPK1* 可能参与调控油菜的生长发育过程。

CDPKs 参与植物对外界各种逆境的应答和调控,包括激素、低温、干旱、盐胁迫等^[3],同时也参与病原微生物入侵的防御反应。研究发现,CDPKs 能够迅速识别病原侵染导致的植物体内钙离子浓度的变化,诱导植物产生防御反应,包括 ROS 的合成,防卫基因的表达,植物激素的合成和信号转导,以及细胞死亡,如拟南芥的 *AtCPK4/5/6* 和 *AtCPK11*^[29]、烟草 *NtCPK2*^[30]、马铃薯 *StCPK4* 和 *StCPK5*^[31]、水稻 *OsCPK13*^[32]。水杨酸和茉莉酸信号途径与植物对病原真菌的防御密切相关。M. Coca 等^[33]发现,过表达 *AtCPK1* 基因的拟南芥植株出现 SA 的积累及 SA 调控的抗病基因的组成型表达。而烟草 *NtCDPK2* 基因则会诱导启动茉莉酸和乙烯信号途径^[30]。本研究发现,在腐生型菌核菌的胁迫下 *BnCDPK1* 基因的表达量上升,并且在高抗品种和高感品种中的表达存在明显差异,在高抗品种中表达上升更快,表达量更大。因此,推测 *BnCDPK1* 基因参与了油菜对菌核菌的应答和防御反应,但是其在防御反应中的具体作用机制还需要进一步研究。

参考文献

- [1] Douglas S B. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995, 46: 95-122
- [2] Weljie A M, Clarke T E, Juffer A H, et al. Comparative modeling studies of the calmodulin-like domain of calcium-dependent protein kinase from soybean [J]. Proteins, 2000, 39(4): 343-357
- [3] Cheng S H, Willmann M R, Chen H C, et al. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family [J]. Plant Physiol, 2002, 129(2): 469-485
- [4] Ray S, Aqarwal P, Arora R, et al. Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive devel-

- oment and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. Mol Genet Genomics, 2007, 278(5) : 493-505
- [5] Li A L, Zhu Y F, Tan X M, et al. Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plant Mol Biol, 2008, 66(4) : 429-443
- [6] Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, et al. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase [J]. Plant Cell, 2007, 19(3) : 1065-1080
- [7] Liop T I, Dominguez P E, Vendrell M. Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature [J]. J Exp Bot, 2002, 53(378) : 2283-2285
- [8] Battey N H, Venis M A. Calcium-dependent protein kinase from apple fruit membranes is calmodulin-independent but has calmodulin-like properties [J]. Planta, 1988, 176(1) : 91-97
- [9] Frylinck L, Dubery I A. Protein kinase activities in ripening mango, *Mangifera indica* L., fruit tissue; III. purification and characterisation of a calcium-regulated protein kinase [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1387(1-2) : 342-354
- [10] Schulz P, Herde M, Romeis T. Calcium-dependent protein kinases: Hubs in plant stress signaling and development [J]. Plant Physiol, 2013, 163(2) : 523-530
- [11] Estruch J J, Kadwell S, Merlin E, et al. Cloning and characterization of a maize pollen-specific calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(19) : 8837-8841
- [12] Hong Y, Takano M, Liu C M, et al. Expression of three members of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 1996, 30(6) : 1259-1275
- [13] Lee S S, Cho H S, Yoon G M, et al. Interaction of *NtCDPK1* calcium-dependent protein kinase with NtRpn3 regulatory subunit of the 26S proteasome in *Nicotiana tabacum* [J]. Plant J, 2003, 33(5) : 825-840
- [14] Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, et al. Calcium dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase [J]. Plant Cell, 2007, 19(3) : 1065-1080
- [15] Boudsocq M, Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling [J]. Trends Plant Sci, 2013, 18(1) : 30-40
- [16] Wan B, Lin Y, Mou T. Expression of rice Ca²⁺ dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses [J]. FEBS Lett, 2007, 581(6) : 1179-1189
- [17] Asano T, Tanaka N, Yang G, et al. Genome wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice [J]. Plant Cell Physiol, 2005, 46(2) : 356-366
- [18] Klimecka M, Muszynska G. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases [J]. Acta Biochim Pol, 2007, 54(2) : 219-233
- [19] Murillo I, Jaecck E, Cordero M J, et al. Transcriptional activation of a maize calcium-dependent protein kinase gene in response to fungal elicitors and infection [J]. Plant Mol Biol, 2001, 45(2) : 145-158
- [20] Romeis T, Ludwig A, Martin R, et al. Calcium-dependent protein kinases play an essential role in plant defense response [J]. EMBO J, 2001, 20(20) : 5556-5567
- [21] Freymark G, Diehl T, Miklis M, et al. Antagonistic control of powdery mildew host cell entry by barley calcium-dependent protein kinases (CDPKs) [J]. Mol Plant Microbe In, 2007, 20(10) : 1213-1221
- [22] 王春芝. 油菜菌核病的发病规律与综合防治技术 [J]. 农技服务, 2008, 25(6) : 55-56
- [23] 张志元, 张翼, 罗永兰, 等. 油菜抗菌核病的部分生理生化机制 [J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(2) : 189-194
- [24] 张丽, 张磊, 康乐, 等. 绒毛状烟草钙依赖蛋白激酶基因家族分析 [J]. 中国烟草科学, 2012, 33(30) : 56-62
- [25] 薛彬, 夏新莉, 尹伟伦. 杨树钙依赖蛋白激酶基因家族生物信息学分析 [J]. 经济林研究, 2010, 28(1) : 20-25
- [26] Ma P, Liu J, Yang X, et al. Genome-wide identification of the maize calcium-dependent protein kinase gene family [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2013, 169 : 2111-2125
- [27] Mee Yoon G, Sun C H, Jung H H, et al. Characterization of *NtCDPK1*, a calcium-dependent protein kinase gene in *Nicotiana glauca*, and the activity of its encoded protein [J]. Plant Mol Biol, 1999, 39(5) : 991-1001
- [28] Myers C, Romanowsky S M, Barron Y D, et al. Calcium-dependent protein kinases regulate polarized tip growth in pollen tubes [J]. Plant J, 2009, 59(4) : 528-539
- [29] Boudsocq M, Willmann M R, McCormack M, et al. Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases [J]. Nature, 2010, 464 : 418-422
- [30] Ludwig A A, Saitoh H, Felix G, et al. Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants [J]. Proc Natl Acad Sci UAS, 2005, 102 : 10736-10741
- [31] Kobayashi M, Ohura I, Kawakita K, et al. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase [J]. Plant Cell, 2007, 19 : 1065-1080
- [32] Mall T K, Dweikat I, Sato S J, et al. Expression of the rice *CDPK-7* in sorghum: molecular and phenotypic analyses [J]. Plant Mol Biol, 2011, 75 : 467-479
- [33] Coca M, San Segundo B. *AtCPK1* calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant J, 2010, 63 : 526-540
- (上接第 1319 页)
- [44] Miura K, Hasegawa P M. Sumoylation and other ubiquitin-like post-translational modifications in plants [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(4) : 223-232
- [45] Webster D E, Thomas M C. Post-translational modification of plant-made foreign proteins, glycosylation and beyond [J]. Biotech Adv, 2011, 30(2) : 410-418
- [46] Zhao P, Wang W J, Sun M X. Characterization and expression pattern analysis of *DcNAC* gene in somatic embryos of *Dendrobium candidum* Wall Ex Lindl [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2011, 107(1) : 151-159
- [47] Liu Q L, Xu K D, Zhao L J, et al. Overexpression of a novel chrysanthemum NAC transcription factor gene enhances salt tolerance in tobacco [J]. Biotechnol Lett, 2011, 30(10) : 2073-2082
- [48] Han Q Q, Zhang J H, Li H X, et al. Identification and expression pattern of one stress-responsive NAC gene from *Solanum lycopersicum* [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2) : 1713-1720
- [49] Paul A, Muoki R C, Singh K, et al. *CsNAM-like* protein encodes a nuclear localised protein and responds to varied cues in tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] [J]. Gene, 2012, 502(1) : 69-74
- [50] Zhu Z G, Shi J L, He M Y, et al. Isolation and functional characterization of a transcription factor *VpNAC1* from Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* [J]. Biotechnol Lett, 2012, 34 : 1335-1342
- [51] 才华, 朱延明, 李勇, 等. 野生大豆转录因子 *GsNAC20* 基因的分离及胁迫耐性分析 [J]. 作物学报, 2011, 37(8) : 1351-1359
- [52] Wang X E, Basnayake B M, Zhang H J, et al. The *Arabidopsis AT-AFL1*, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens [J]. Mol Plant Microbe In, 2009, 22(10) : 1227-1238
- [53] Bu Q, Jiang H, Li C B, et al. Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors *ANAC019* and *ANAC055* in regulating jasmonic acid-signaled defense responses [J]. Cell Res, 2008, 18(7) : 756-767