

大豆类钙调磷酸酶 B 亚基 GmCBL1 互作候选蛋白的筛选

李林蔚^{1,2}, 张双喜³, 周永斌², 裴丽丽², 陈 明², 李连城², 马有志², 刘生祥¹, 徐兆师²

(¹宁夏大学农学院, 银川 750021; ²中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/
农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081; ³宁夏农林科学院农作物研究所, 永宁 750105)

摘要: Ca^{2+} 是非生物胁迫信号转导途径中的重要信号分子, 植物类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 (CBL, calcineurin B-like proteins) 是一类重要的钙信号受体蛋白, 主要通过与其他蛋白的特异结合传递信号, 使植物形成对非生物胁迫的响应。本实验室已经获得大豆 *GmCBL1* 基因, 功能鉴定显示 *GmCBL1* 增强了转基因拟南芥对非生物胁迫的耐性。为了进一步研究 *GmCBL1* 的作用机理, 本研究构建诱饵载体 pGBKT7::GmCBL1, 利用酵母双杂交技术筛选大豆 GmCBL1 的互作蛋白。通过对筛选获得的 106 个蛋白基因测序和 Blast 比对分析, 并根据其可能的生理功能对这些候选蛋白归类, 整理得到 4 类蛋白: 能量代谢相关蛋白、修饰蛋白、防御蛋白、钙信号转导相关蛋白。筛选得到候选蛋白的功能预测初步表明, 大豆 *GmCBL1* 参与多条信号途径, 为进一步研究探索大豆 CBL 介导的抗逆信号转导途径奠定了基础。

关键词: 大豆; 类钙调磷酸酶 B 亚基; GmCBL1; 酵母双杂交; 互作蛋白

Screening of Candidate Interacting Proteins of the Calcineurin B-like Protein GmCBL1 in Soybean

LI Lin-wei^{1,2}, ZHANG Shuang-xi³, ZHOU Yong-bin², PEI Li-li², CHEN Ming²,
LI Lian-cheng², MA You-zhi², LIU Sheng-xiang¹, XU Zhao-shi²

(¹ Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan 750021; ² Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of
Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of
Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crops, Ministry of Agriculture, Beijing 100081;
³ Institute of Crop Science, Ningxia Academy of Agricultural Sciences, Yongning 750105)

Abstract: Calcium is a critical messenger in abiotic stress responses signal transduction pathways in plants. Calcineurin B-like proteins (CBLs) represent a family of plant calcium sensor proteins that function in calcium signaling by associating with their interacting protein to transduce signal, making plant response to abiotic stress. Our laboratory has identified a putative soybean *CBL* gene that functions in abiotic stress tolerance in the transgenic *Ara-bidopsis* plants. In order to further explore the *GmCBL1*-mediated stress resistance mechanism, the mixture of constructed pGBKT7::GmCBL1 bait vectors and cDNA library was introduced into yeast competent cells AH109 to screen for the interaction proteins from soybean cDNA library by yeast-two hybrid system. A total of 106 candidate positive clones were sequenced and analyzed through BLAST. According to their possible physiological functions, those candidate proteins were classified into four categories including energy metabolism proteins, modified protein, defense protein, and calcium signaling transduction proteins. Function prediction of the candidate proteins suggested

收稿日期: 2014-09-18 修回日期: 2014-10-16 网络出版日期: 2015-02-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150206.1638.011.html>

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2014ZX08002-002, 2014ZX08003-004B)

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: liliwei@live.com; 张双喜为共同第一作者

通信作者: 徐兆师, 主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail: xuzhaoshi@caas.cn

刘生祥, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: LSX2004@126.com

that *GmCBL1* was possibly involved in several stress signal transduction pathways. This work would provide a basis for a defined further functional dissection of CBL-mediated signaling system in soybean.

Key words: soybean; calcineurin B-like proteins; *GmCBL1*; yeast two hybrid; interaction protein

土壤盐渍化、干旱、低温主要通过渗透胁迫和离子胁迫导致植物代谢失调和营养缺乏,已成为制约作物生长发育的主要因素^[1-3]。植物从感知胁迫信号到产生适应性生理反应,形成了一个复杂的信号转导网络^[4]。当植物受到胁迫刺激时, Ca^{2+} 作为信号转导途径中的第二信使,与钙信号受体结合而传递信号,引起特定胁迫相关基因的表达^[5]。类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白(CBL, calcineurin B-like proteins)是一类重要的钙信号受体蛋白,CBL 并不具有激活结构域,主要通过下游一类蛋白激酶(CIPK, CBL-interacting protein kinases)或其他蛋白的特异结合才能传递信号,使植物形成对非生物胁迫较强的响应,从而将胁迫信号传递到下游^[6-7,9]。因此研究植物中 CBL 的抗逆分子机制,对于减弱植物的胁迫伤害有重要的意义。

CBL 作为 Ca^{2+} 信号受体蛋白,具有与 Ca^{2+} 结合的 EF 手型结构域。但不同 CBL 的 EF 手型结构数目不同,并且这些手型结构域并不十分保守^[8]。已经在拟南芥中发现 10 个 CBL 家族成员,研究表明拟南芥 *AtCBL* 能够被多种外界刺激如低温、干旱、低钾离子浓度和高盐所诱导而感知钙信号^[10]。拟南芥 *CBL1* 和 *CBL5* 的过表达提高了植株的抗渗透胁迫能力^[11-12]。*AtCBL2* 和 *AtCBL9* 突变体 *cbl2* 和 *cbl9* 在种子萌发阶段对 ABA 敏感^[13-14]。其他物种 CBL 的功能也有所报道,如从水稻中克隆获得 10 个 CBL,其中 *OsCBL1*、*OsCBL3* 和 *OsCBL5* 参与各种胁迫响应^[15]。杨树 *CBL10* 的 2 个同源基因 *PtCBL10A* 和 *PtCBL10B* 的表达增强了苗期盐害的耐受能力^[16]。因此 CBL 在植物的抗逆反应中可能起着重要作用。

本实验室已经获得大豆 *GmCBL1* 基因,功能鉴定显示 *GmCBL1* 增强了转基因拟南芥对非生物胁迫的耐性^[17]。为了进一步研究 *GmCBL1* 的作用机理,本研究拟以大豆 *GmCBL1* 为诱饵,采用酵母双杂交实验技术筛选鉴定与 *GmCBL1* 互作的蛋白,为阐明 CBL 提高植物抗逆分子机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料和试剂

将铁丰 8 号大豆种子播种于沙壤土中,25 ℃ 生

长约 15 d,至第 1 对真叶完全展开时,将幼苗取出用蒸馏水冲洗干净,置于干净的滤纸上干旱处理 2 h,立即用锡箔纸包住液氮速冻,-80 ℃ 保存备用。铁丰 8 号种子由中国农业科学院作物科学研究所邱丽娟研究员提供。

Trizol 试剂盒、质粒小提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、酵母质粒小提试剂盒均购自天根公司;酵母转化试剂盒、PrimeScript™ RT Reagent Kit 反转录试剂盒、限制性内切酶、PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 和 In-Fusion® HD Cloning Kit 均购自 Takara 公司;pEASY-Blunt Cloning Kit 和 Trans10 Competent Cell 购自 TransGen 公司。

1.2 大豆总 RNA 的提取和 cDNA 文库构建

采用 Trizol 试剂盒提取大豆幼苗总 RNA,用 1.2% 琼脂糖凝胶检测 RNA 质量,将达到要求的 RNA 用 PrimeScript™ RT Reagent Kit 反转录试剂盒合成第一链 cDNA。利用 RT-PCR 扩增获得双链 cDNA,并克隆到载体 pGADT7 中,分析 cDNA 的插入片段,扩增得到大豆幼苗干旱处理 cDNA 文库(TaKaRa 公司)。

1.3 诱饵载体的构建

根据 *GmCBL1* 已知基因序列,设计特异引物,以大豆 cDNA 为模板,利用 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase 进行 PCR 扩增,将扩增产物纯化后连接到 pEASY-Blunt。选择 *EcoRI* 酶切位点,单酶切质粒 pGBKT7,在 <http://bioinfo.clontech.com/infusion/convertPcrPrimersInit.do> 网站设计引物,从连有诱饵基因的 pEASY-Blunt 上扩增目的片段,二者纯化后,采用 In-Fusion® HD Cloning Kit 将 *GmCBL1* 基因构建到质粒 pGBKT7 上,将测序正确的克隆提取质粒。

1.4 诱饵载体的自激活验证

将 pGADT7 + pGBKT7、pGADT7 + pGBKT7::*GmCBL1*、pGADT7 + pGBKT7::*GAL4* 分别共转入酵母菌株 AH109 中,划线于 SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His 缺陷培养平板,30 ℃ 倒置培养 2 ~ 5 d,观察各平板菌落生长情况,验证 pGBKT7::*GmCBL1* 是否具有自激活活性。

1.5 诱饵质粒与文库质粒的酵母共转和阳性筛选

采用酵母双杂交系统说明书(MATCHMAK2 ER pLexA Two-Hybrid User Manual 和 Yeast Protocols

Handbook) 和酵母转化试剂盒制备 AH109 感受态细胞,将 pGADT7 + pGBKT7、pGADT7 + pGBKT7::GmCBL、pGBKT7::GmCBL 质粒 + 大豆文库质粒分别混合转入酵母细胞 AH109,分别涂布在 SD/-Trp/-Leu 和 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上,待酵母单克隆生长至直径约 2~3 mm 时,挑取单克隆置于液体培养基中培养 1~2 d 后,取 1 μ L 点在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/x-gal 平板上,进行蓝白斑筛选。利用酵母质粒小提试剂盒提取蓝色克隆的酵母质粒。

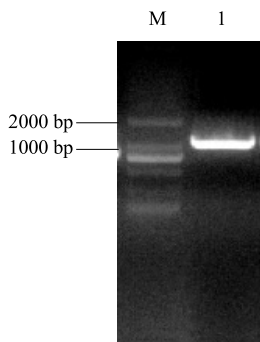
1.6 酵母阳性克隆的 PCR 鉴定、测序及序列比对分析

将阳性克隆质粒进行 PCR 检测(上游引物 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3';下游引物 5'-AG-ATGGTGCACGATGCACAG-3')。统计检测结果后将插入片段大小在 500 bp 以上的酵母单克隆质粒转化到大肠杆菌中,送到北京奥科生物公司测序。通过 DNAMAN 软件、NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 Glycine max Wm82. a2. v1 (http://www.phytozome.org/search.php?show=blast&org=Org_Gmax_Wm82.a2.v1) 网站对测序结果进行比对分析整理。

2 结果与分析

2.1 诱饵载体的构建

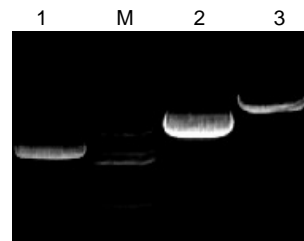
根据已知基因序列设计特异引物,以大豆 cDNA 为模板,PCR 扩增获得 GmCBL1 序列,得到一条与已知片段大小相符的单一一条带,大小约 1100 bp(图 1),切胶回收后连接到 pEASY-Blunt 载体。利用 EcoRI 单酶切质粒 pGBKT7(图 2)。采用 In-Fusion[®] HD Cloning Kit 将 GmCBL1 基因构建到质粒 pGBKT7 上,命名为 pGBKT7::GmCBL1。提取 pGBKT7::GmCBL1 重组质粒,浓度达到 1000 ng/ μ L, $A_{260/280} = 1.9$ 。



M: DL2000 Marker, 1: GmCBL1

图 1 GmCBL1 基因的扩增

Fig. 1 Amplification of GmCBL1 gene



M: DL2000 Marker; 1: PCR 扩增结果;

2: 重组质粒 pGBKT7::GmCBL1; 3: EcoRI 单酶切鉴定

M: DL2000, 1: PCR amplification result,

2: Recombined plasmid pGBKT7::GmCBL1,

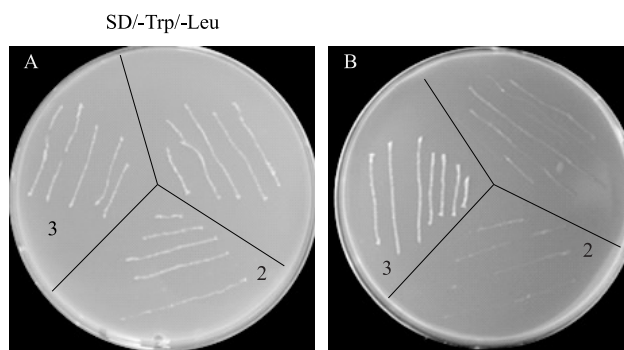
3: Identification by EcoRI digestion

图 2 质粒 pGBKT7::GmCBL1 的构建及 PCR 鉴定

Fig. 2 Construction and identification of pGBKT7::GmCBL1

2.2 诱饵基因的自激活验证

将 pGADT7 + pGBKT7、pGADT7 + pGBKT7::GmCBL1、pGADT7 + pGBKT7::GAL4 分别共转入酵母菌株 AH109 中,各涂布于 SD/-Trp/-Leu (二缺)、SD/-Trp/-Leu/-Ade/-His (四缺) 缺陷培养平板上,30 $^{\circ}$ C 倒置培养 4 d。结果酵母菌在二缺平板上生长,说明共转化成功,涂布转 pGADT7 + pGBKT7 的酵母菌作为阴性对照在四缺平板上未生长, pGADT7 + pGBKT7::GAL4 作为阳性对照在四缺板上生长,转 pGBKT7::GmCBL1 的酵母菌在四缺平板上未出现菌落,说明 pGBKT7::GmCBL1 在酵母菌株 AH109 中无自激活活性,可以用作诱饵载体直接筛大豆 cDNA 文库。



1: pGADT7 + pGBKT7; 2: pGADT7 + pGBKT7::GmCBL1;

3: pGADT7 + pGBKT7::GAL4

图 3 GmCBL1 的自激活验证

Fig. 3 Transactivation assays of GmCBL1

2.3 阳性克隆的筛选和鉴定

将诱饵质粒 pGBKT7::GmCBL1、文库质粒 pGADT7::cDNA 共转化酵母 AH109,涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 营养缺陷型平板,30 $^{\circ}$ C 倒置培养 4 d。挑取直径大约 2 mm 以上的菌落,初步选择得到 216 个候选克隆。吸取候选克隆菌液 1 μ L,按顺序点在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal 平板上,

30 ℃避光培养 12 h,开始观察,统计显蓝克隆,得到 120 个显蓝克隆。按对应编号提取显蓝克隆的质粒,采用 pGADT7 通用引物 T7 和 3'AD 将显蓝克隆质粒进行 PCR 鉴定,将鉴定条带大于 500 bp 的 PCR 反应液送去测序,共有 106 个。

2.4 候选克隆的序列比对分析

测序结果通过 DNAMAN 软件、NCBI 和 Glycine max Wm82. a2. v1 (Soybean) 网站进行 BLASTN 和 BLASTX 比对分析整理后,得到大豆 GmCBL1 类钙调磷酸酶互作候选蛋白,预测生理功能发现候选蛋白主要包括参与能量代谢、蛋白修饰、防御和信号转导(表 1)。

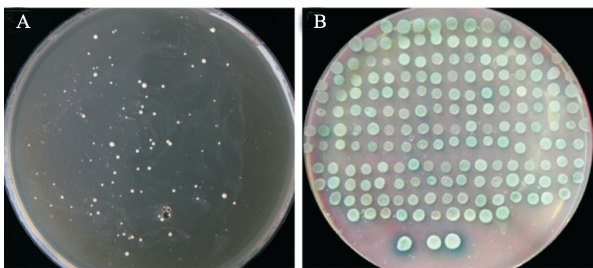
表 1 候选蛋白的 BLAST 分析结果及功能预测

Table 1 Function annotation for partial candidate proteins

编码蛋白	生理功能预测
Encoding protein	Function
能量代谢相关蛋白 Protein involved in energy metabolism	
细胞色素 P450 Cytochrome P450	参与内源性物质和外源性物质的代谢
电子传递黄素蛋白 Electron transfer flavoprotein	作为脱氢酶特定的电子受体,参与脂肪酸的氧化
核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 Ribulose biphosphate carboxylase	参与催化光合作用中卡尔文循环里第一个主要的碳固定反应
修饰蛋白 Modified protein	
DNA 甲基化酶 C-5cytosine-specific DNA methylase	调节参与植物花和叶片的发育、油菜素内酯信号转导途径等方面基因表达
小热激蛋白 Hsp20/alpha crystallin family	参与蛋白质翻译后修饰,促进蛋白质折叠为天然空间构象
类泛素蛋白 Ubiquitin-like protein	参与蛋白泛素化降解途径和 DNA 损伤修复
防御蛋白 Defense/immunity protein	
过氧化物酶 Peroxidase	与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等有关,作为组织老化的一种生理指标
硒结合蛋白 SBP56	参与蛋白运输,与硒结合,控制目标蛋白的氧化还原状态
抗坏血酸盐氧化还原酶家族 Ascorbate family oxidoreductases	响应植物非生物逆境胁迫的重要作用
钙信号转导相关蛋白 Proteins of calcium signal transduction	
C2 结构域蛋白 C2 domain	Ca ²⁺ /磷脂基序,存在于许多参与信号转导和质膜运输的蛋白中
与 CBL 相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	参与 Ca ²⁺ 结合和钙信号转导
CBL-Interacting serine/threonine-protein kinase	
IQ 钙调素结合蛋白 IQ calmodulin-binding motif	因细胞质溶质中的 Ca ²⁺ 浓度不同而得以与不同的蛋白相互作用,调节细胞的活动

3 讨论

酵母双杂交系统自 1989 年被提出以来^[18],已经得到愈来愈广泛的应用。整个过程只对核酸进行操作,不需要分离纯化蛋白质,易于操作,这种方法对进行高通量的蛋白质筛选和研究蛋白质之间的相互作用提供了一个强有力的技术平台,对蛋白质组中特定蛋白质相互作用关系网络的认识发挥了重要的作用^[19]。本研究以大豆类钙调磷酸酶 B 亚基 Gm-CBL1 为诱饵,利用酵母双杂交实验技术,筛选大豆干旱诱导 cDNA 文库,获得 GmCBL1 的候选互作蛋白,对这些候选蛋白功能进行预测分析,为进一步探索大豆 CBL 介导的抗逆信号途径打下基础。但酵母双杂交系统也存在一定的假阳性和假阴性,还需后续试验



A: 筛库得到的克隆;
B: 在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X-α-gal 平板上鉴定阳性克隆
A: Clones screened from the cDNA library,
B: The positive clones tested on SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/ X-α-gal plates

图 4 GmCBL1 互作蛋白的筛选
Fig. 4 Screening of GmCBL1-interacting proteins

验证 GmCBL1 与感兴趣的候选蛋白之间的互作。

GmCBL1 具有结合钙离子的 EF 手型结构域,作为一类重要的钙离子结合蛋白能够感受并传递钙信号^[8]。前人研究显示在植物中 CBL 受多种胁迫条件诱导,并参与调节多种抗逆反应。拟南芥 *CBL5* 在干旱和盐反应中作为一个正向调控因子^[20]。番茄 *SICBL* 的表达受高盐、干旱和冷害调控^[21]。拟南芥中异源过表达玉米 *ZmCBL4* 提高了耐盐性^[22]。转 *OsCBL8* 水稻幼苗时期更加耐盐^[23]。本实验室从旱盐诱导的大豆 cDNA 文库中克隆出一个与拟南芥 *AtCBL1* 基因同源的大豆 GmCBL1,研究表明参与调控渗透胁迫和光依赖的下胚轴发育^[17]。

CBL 参与的信号传导途径目前研究比较清楚的是 CBL-CIPK 信号通路,CBL-CIPK 是一个重要的

钙信号通路,拟南芥中 CBL-CIPK 研究的比较清楚^[9],但研究表明并不是所有 AtCBL 成员都将 CIPKs 作为目标,一个 CBL 可以和多个 CIPK 相互作用,同一个 CIPK 可以和多个 CBL 互作,这预示着 CBL-CIPK 信号通路是个复杂的过程,可能针对不同的蛋白质特异性结合其他蛋白激酶或其他蛋白^[24]。关于大豆 CBL 与 CIPK 的研究还未见报道,因此,筛选 GmCBL1 的互作蛋白对于解析大豆 CBL 信号转导途径及抗逆机理具有重要作用。

本试验筛选到与 GmCBL1 互作的候选蛋白中,包括能量代谢的相关蛋白、修饰蛋白、防御蛋白和与钙信号转导相关的蛋白。其中硒结合蛋白 SBP56 与金属离子的解毒过程相关,对这些蛋白的生物功能预测说明 GmCBL1 可能通过多种途径调控植物抗逆和生长发育。GmCBL1 互作候选蛋白 CIPK 是一类与 CBL 特异结合的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,CBL 与 CIPK 特定结构互作后,使 CIPK 转化为激活形式,将信号向下游传递,促进逆境蛋白的表达,调控植物中胁迫信号的转导,是细胞信号转导途径中的一个重要组分。据报道,水稻 *OsCIPK03*、*OsCIPK12* 和 *OsCIPK15* 的过表达分别提高了转基因水稻的抗冷性、抗寒性和耐盐性^[25-27]。综合本研究结果,大豆 GmCBL1 可能参与 CIPK 的信号转导途径,当外界刺激产生时,GmCBL1 会接收 Ca^{2+} 的信号而激活 CIPK,调控下游基因的表达。本研究为阐明 CBL 提高植物抗逆分子机制提供了实验基础和理论依据。

4 结论

本试验构建了大豆干旱诱导 cDNA 文库和诱饵载体,应用酵母双杂交的方法,筛选类钙调磷酸酶 B 亚基 GmCBL1 的互作蛋白,这些候选蛋白包括能量代谢的相关蛋白、修饰蛋白、防御蛋白和与钙信号转导相关的蛋白,对候选蛋白功能预测表明可能参与抗逆和防御、信号转导、生长发育等过程,推测 GmCBL1 在调节抗逆反应和植物信号转导中起重要作用。

参考文献

- [1] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Plant Sci, 2002, 7: 405-410
- [2] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants[J]. Ann Rev Plant Biol, 2002, 53: 247-273
- [3] Ulrich D, Aaron B S, Tomoaki H, et al. Plant salt-tolerance mechanisms[J]. Plant Sci, 2014, 19: 371-379
- [4] Suzuki N, Rivero R M, Shulaev V, et al. Abiotic and biotic stress combinations[J]. New Phytol, 2014, 203: 32-43
- [5] Yang T B, Poovaiah B W. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants[J]. Plant Sci, 2003, 8: 505-512
- [6] Sheng L, Jorg K, Manuel R C. Calmodulins and calcineurin B-like proteins; calcium sensors for specific signal response coupling in plants[J]. Plant Cell, 2002, 14: 389-400
- [7] Yu Q Y, An L J, Wen L L. The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants[J]. Plant Cell Rep, 2014, 33: 203-214
- [8] Batistic O, Kudla J. Analysis of calcium signaling pathways in plants[J]. Biochim Et Biophys Acta, 2012, 8: 1283-1293
- [9] Luan S. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling[J]. Plant Sci, 2009, 14: 37-42
- [10] 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: 43-58
- [11] 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
- [12] Cheong Y H, Sung S J, Kim B G, et al. Constitutive overexpression of the calcium sensor CBL5 confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Mol Cell, 2010, 29: 159-165
- [13] Batistic O, Rehers M, Akerman A, et al. S-acylation-dependent association of the calcium sensor CBL2 with the vacuolar membrane is essential for proper abscisic acid responses[J]. Cell Res, 2012, 22: 1155-1168
- [14] Pandey G K, Grant J J, Cheong Y H. Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination[J]. Mol Plant, 2008, 1: 238-248
- [15] Sunhee Y, Jimyeong P, Migyeong R, et al. Calcineurin B-like proteins in rice can bind with calcium ion and associate with the *Arabidopsis* CIPK family members[J]. Plant Sci, 2009, 177: 577-583
- [16] Tang R J, Yang Y, Yang L. 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
- [17] Li Z Y, Xu Z S, He G Y, et al. Overexpression of soybean GmCBL1 enhances abiotic stress tolerance and promotes hypocotyl elongation in *Arabidopsis* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427: 731-736
- [18] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340: 245-247
- [19] Heyninck K, Van Huffel S, Kreike M, et al. Yeast two-hybrid screening for proteins interacting with the anti-apoptotic protein A20[J]. Methods Mol Biol, 2004, 282: 223-241
- [20] Cheong Y, Hwa S, Sun J. Constitutive overexpression of the calcium sensor CBL5 confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis*[J]. Mol Cell, 2010, 29: 159-165
- [21] Kabir M H, Wang M H. Stress-induced expression profiling of a calcium sensor, calcineurin B-like protein gene (*SICBL*) in tomato [J]. J Hortic Sci Biotechnol, 2010, 85: 154-160
- [22] Wang M Y, Gu D, Liu T S. Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance [J]. Plant Mol Biol, 2007, 65: 733-746
- [23] Gu Z M, Ma B J, Jiang Y. Expression analysis of the calcineurin B-like gene family in rice (*Oryza sativa* L.) under environmental stresses[J]. Gene, 2008, 415: 1-12
- [24] Kim K N, Cheong Y H. Interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases[J]. Plant Physiol, 2000, 124: 1844-1853
- [25] Piao H L, Xuan Y H, Park S H, et al. *OsCIPK31*, a CBL-interacting protein kinase is involved in germination and seedling growth under abiotic stress conditions in rice plants[J]. Mol Cell, 2010, 30: 19-27
- [26] Xiang Y, Huang Y M, Xiong L Z. Characterization of stress-responsive CIPK gene in rice for stress tolerance improvement[J]. Plant Physiol, 2007, 144: 1416-1428
- [27] Yang W Q, Kong Z S, Omo-Ikerodah E, et al. Calcineurin B-like interacting protein kinase *OsCIPK23* functions in pollination and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. J Genet Genomics, 2008, 35: 531-543