

田晓涵, 刘玉玲, 李永梅, 等. 两种不同生境植物棉花与雪莲 *CDPK1* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1005-1012.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.008

## 两种不同生境植物棉花与雪莲 *CDPK1* 基因的克隆及生物信息学分析

田晓涵, 刘玉玲, 李永梅, 李 锦, 庞学兵, 祝建波, 朱新霞  
(石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室, 新疆 石河子 832000)

**摘要:** 为了研究两种不同生境植物钙依赖性蛋白激酶基因 1 (*CDPK1*) 的差异, 分别从冷敏感作物陆地棉和高耐寒植物天山雪莲中克隆得到 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 基因。通过生物信息学分析发现, *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 的开放阅读框长度分别为 1 764 bp 和 1 716 bp, 各编码 587 和 571 个氨基酸。蛋白质表现为弱酸性, 且不稳定, 亲水; 二级结构中以无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋为主, 三级结构同源建模成功; 无跨膜结构域和信号肽, 有多个磷酸化位点, 但数量存在差异; 均具有典型的 CDPK 保守结构域。GhCDPK1 和 SikCDPK1 氨基酸序列同源性为 79.9%, 二者明显的区别在于 GhCDPK1 含有 4 个 EF-hand 基序, 但 SikCDPK1 只存在 2 个 EF-hand 基序。进化分析结果表明, GhCDPK1 与可可 CDPK1 亲缘关系最近, SikCDPK1 与菊花 CDPK2 亲缘关系最近。

**关键词:** 钙依赖性蛋白激酶 (*CDPK*); 生物信息学; 序列分析; 结构预测

**中图分类号:** Q785      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1005-08

## Cloning and bioinformatics analysis of *CDPK1* gene in *Gossypium hirsutum* and *Sasussured involucrata* from two different habitats

TIAN Xiao-han, LIU Yu-ling, LI Yong-mei, LI Jin, PANG Xue-bing, ZHU Jian-bo, ZHU Xin-xia  
(College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** To study the functional differences of calcium-dependent protein kinase gene 1 (*CDPK1*) in different habitats, 2 calcium-dependent protein kinase genes *GhCDPK1* and *SikCDPK1* were obtained from coldness-sensitive crop *Gossypium hirsutum* and hardy plant *Sasussured involucrata* Kar. et Kir, respectively. *GhCDPK1* gene contains a 1 764-bp open reading frame encoding 587 amino acids, and *SikCDPK1* contains a 1 716-bp open reading frame encoding 571 amino acids. The corresponding proteins are unstable, hydrophilic and mildly acidic, with random coil and  $\alpha$ -helix dominating the secondary structure. Two deduced proteins have no transmembrane region and signal peptide. The protein sequences of GhCDPK1 and SikCDPK1 include multiple phosphorylation sites with different numbers, and contain a typical CDPK con-

served domain. The GhCDPK1 and SikCDPK1 shared amino acid sequence homology of 79.9%. There are four conservative EF-hands in GhCDPK1 but only two EF-hands in SikCDPK1. Phylogenic analysis revealed that the GhCDPK1 protein was the closest to *Theobroma cacao* CDPK1, and the SikCDPK1 protein was the closest to *Chrysanthemum boreale* CDPK2.

**Key words:** calcium-dependent protein kinase (*CDPK*); bioinformatics; sequence analysis; structure prediction

收稿日期: 2016-01-07

基金项目: 新疆生产建设兵团项目 (2014CC005); 国家自然科学基金项目 (31360053); 石河子大学育种专项 (gxjs2014-yz04)

作者简介: 田晓涵 (1990-), 女, 新疆昌吉人, 硕士研究生, 生物化学和分子生物学专业。 (Tel) 15609932775; (E-mail) 723745781@qq.com

通讯作者: 朱新霞, (Tel) 13029616626; (E-mail) zhuxxshz@126.com

极端温度、干旱和土地盐渍化等逆境严重影响农作物的生长、发育和产量。研究作物抗性分子机理,提高作物对逆境的适应性是提高农作物产量与品质的基础。外界刺激引起的作物生理生化反应大多与钙信号转导有关, $\text{Ca}^{2+}$ 作为第二信使在调控植物生长发育与各种逆境响应中发挥着重要作用。

钙依赖性蛋白激酶(CDPK)是钙信号转导的主要感受器与效应器,是一类依赖钙离子而不依赖钙调素的蛋白激酶,广泛存在于植物、藻类和部分原生生物中<sup>[1-2]</sup>。CDPK是一个多基因家族,自1982年在豌豆<sup>[3]</sup>中发现至今,又在拟南芥<sup>[4]</sup>、水稻<sup>[5]</sup>、小麦<sup>[6]</sup>、棉花<sup>[7]</sup>、番茄<sup>[8]</sup>、马铃薯<sup>[9-10]</sup>、烟草<sup>[11]</sup>、葡萄<sup>[12]</sup>、玉米<sup>[13]</sup>、杨树<sup>[14]</sup>、雷蒙德氏棉<sup>[15]</sup>、黄瓜<sup>[16]</sup>等植物中相继克隆出CDPK基因,对其应对逆境胁迫的研究也逐渐深入。大量研究结果表明,CDPK参与多种逆境胁迫应答、碳氮代谢过程、细胞膜系统的物质运输、植物细胞肌动蛋白张力的调节、气孔开放和生长发育、激素调节等多种 $\text{Ca}^{2+}$ 信号转导通路中信号的介导,尤其是在植物对光、温度、触摸、水分胁迫和氧化胁迫等信号转导途径中起关键作用<sup>[17-22]</sup>。

棉花是中国重要的纤维和油料作物。新疆为中国优质棉基地,但由于地理位置和气候因素棉花生产常遭受干旱、盐碱和低温等非生物逆境危害,棉花生长、产量以及纤维品质受到很大影响,经济损失巨大。与棉花生境迥然不同的天山雪莲(*Sasussured involucrata* Kar.et Kir)是典型的耐极端低温的珍贵植物,在极端低温下能旺盛生长并且开花。雪莲这种特异抗寒能力,可能是富集了特异的抗寒或耐寒基因,从而产生了适应极端低温环境条件的生存机制,也因此引起了学者的关注。本研究以冷敏感作物陆地棉新陆早33号和高耐寒植物天山雪莲植物为材料,分别克隆*GhCDPK1*基因和*SikCDPK1*基因,通过生物信息学对比分析两个基因的核酸序列及其编码的氨基酸序列,探究不同生境植物中CDPK1基因结构的差异,以期为进一步研究不同生境植物CDPK1基因的功能及探究其抗逆机制的信号转导途径奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 陆地棉早熟品种新陆早33(*Gossypium hirsutum* L.cv.Xinluzao 33)由石河子农业科学

院棉花研究所提供,天山雪莲(*Sasussured involucrata* Kar.et Kir)无菌苗由石河子大学农业生物技术重点实验室保存。

1.1.2 菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 由石河子大学农业生物技术重点实验室保存。

1.1.3 试剂及PCR引物 植物总RNA提取试剂盒购于艾德莱生物公司,cDNA合成试剂盒购于北京全式金公司,Trans5K DNA marker、250 bp DNA ladder marker 购自 TaKaRa 公司,凝胶回收试剂盒、pMD19-T 克隆载体、10 $\times$ Taq reaction buffer、Taq DNA polymerase、dNTP 购自 TIANGEN 公司。引物合成及序列测定均由华大基因公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 植物总RNA提取及cDNA合成 参照EASY spin Plus 植物RNA快速提取试剂盒说明书提取新陆早33和雪莲无菌苗叶片总RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测,将条带清晰的RNA置于-80℃保存备用。cDNA的合成参照北京全式金公司TransScript II First-Stand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书进行操作。

#### 1.2.2 基因的克隆

1.2.2.1 *GhCDPK1*基因的克隆 根据GenBank登录号为FJ938290的cds序列,利用Primer 5.0设计特异性引物(表1)。以已反转录的棉花cDNA为模板进行PCR扩增,PCR反应体系参见Taq DNA Polymerase说明书。PCR反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性40 s,58℃复性30 s,72℃延伸1 min 30 s,30个循环,72℃延伸10 min,4℃保存。

1.2.2.2 *SikCDPK1*基因的克隆 根据天山雪莲转录组测序数据,以*GhCDPK1*基因序列为探针搜索得到多条候选序列,经过多序列比对除去重复序列后,得到3条序列。利用NCBI中的ORF Finder工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/orfig.cgi>)逐一分析序列的完整开放阅读框(ORF),设计该ORF引物(表1)。以已反转录的雪莲cDNA模板进行PCR扩增,PCR的反应体系参见Taq DNA Polymerase说明书。PCR反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,63℃复性40 s,72℃延伸1 min 30 s,30个循环,72℃延伸10 min,4℃保存。

上述PCR产物经浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳分离后,参照琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书回收目的条带。将*GhCDPK1*、*SikCDPK1*基因回收产物与

克隆载体 pMD19-T Vocter 连接,连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,挑取阳性克隆进行 PCR 鉴定,鉴定正确后交由北京华大基因公司进行测序。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primer pairs used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
GhCDPK1- <i>Xba</i> I	<u>TCTAGA</u> ATGGGGAATACTTGTGTAGGA
GhCDPK1- <i>Sa</i> I	GTCGACCCAGTGAATTGCCTGTACTAA
SikCDPK1-F	GGATCCATGGGGAATACTTGTGTGGAC
SikCDPK1-R	GTCGACCCGTCGATACCGAAAAAAC

下划线为酶切位点

1.2.3 基因生物信息学分析 利用 ProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对 GhCDPK1 和 SikCDPK1 蛋白质相对分子质量、氨基酸组成、等电点、疏水性等基本理化性质进行分析,利用 NCBI 中 CDD (Conserved Domain Database) 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 进行保守结构域分析,用 SiggnalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SiggnalP/>) 分析信号肽,用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测跨膜区,利用 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 数据库分析蛋白质的功能位点,通过 Predictprotein (<https://www.predictprotein.org/>) 分析蛋白质的二级结构,通过 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/index.cgi>) 软件预测蛋白质的三级结构。用 MEGA 5.0 进行不同物种 *CDPK1* 基因的系统进化分析,利用 Clustal W 程序比对氨基酸序列,Neighbor-Joining 方法构建进化树,其中进行 1 000 次 Bootstrap 分析以使得分枝的结果更可靠。

2 结果与分析

## 2.1 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 基因的克隆

分别以棉花和雪莲 cDNA 为模板,用表 1 中引物进行 PCR 扩增,结果 (图 1) 显示目的条带均位于 1 500 bp 至 2 250 bp 之间,与预期结果一致。测序、拼接后得到编码区全长为 1 764 bp 的 *GhCDPK1* 基因和 1 716 bp 雪莲新基因 *SikCDPK1*, GenBank 登录号为 (KU133953)。

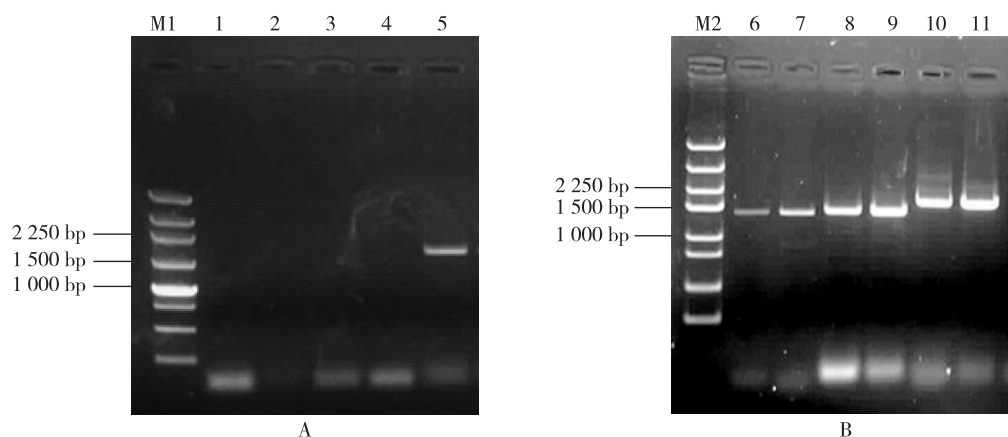


图 1 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 基因 PCR 扩增  
A: *GhCDPK1* 扩增; B: *SikCDPK1* 扩增。M1: 250 bp DNA ladder marker; M2: Trans5K DNA marker; 1~5: *GhCDPK1* cDNA 全长扩增; 6~9: 其他基因; 10, 11: *SikCDPK1* cDNA 全长扩增。

图 1 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 基因 PCR 扩增

Fig.1 Amplification of *GhCDPK1* and *SikCDPK1* genes by PCR

## 2.2 *GhCDPK1*、*SikCDPK1* 基因编码蛋白质的理化性质

用 NCBI ORF Finder 及 ProtParam 在线分析工具对 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 基因的核苷酸序列及其编码的蛋白质氨基酸序列进行分析,结果 (表 2)

表明, *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 蛋白质理论等电点均小于 7, 说明这 2 个蛋白质呈酸性; 总平均亲水性 (Grand average of hydropathicity, GRAVY) 均为负值, 说明为亲水性蛋白。相比之下, *SikCDPK1* 的亲水性更强, 众多的亲水性氨基酸残基可以结合大量

的水分子,使水膜加厚,避免胁迫下生物大分子大量失水而导致结构变性。从氨基酸组成特点看,GhCDPK1 中,谷氨酸所占比例最高(9.4%),其次是亮氨酸(8.0%)和丙氨酸(8.0%);而在 SikCDPK1 中,谷氨酸所占比例最高(8.2%),其次是亮氨酸(7.9%)和赖氨酸(7.9%)。

表 2 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 基因编码的蛋白质理化性质分析  
Table 2 Physico-chemical properties of *GhCDPK1* and *SikCDPK1* deduced proteins

组成及性质	GhCDPK1	SikCDPK1
推导氨基酸残基数量	587	571
分子质量( $\times 10^4$ )	6.55	6.35
理论等电点	5.46	5.44
原子数	9 176	8 917
分子式	C <sub>2 907</sub> H <sub>4 577</sub> N <sub>791</sub> O <sub>880</sub> S <sub>24</sub>	C <sub>2 821</sub> H <sub>4 452</sub> N <sub>762</sub> O <sub>859</sub> S <sub>23</sub>
不稳定系数(%)	45.04(不稳定)	43.74(不稳定)
脂肪系数	80.26	80.07
总平均亲水性(GRAVY)	-0.385	-0.406

2.3 *GhCDPK1*、*SikCDPK1* 基因编码蛋白质的功能位点

蛋白质序列分析的关键是确定其是否含有重要的功能位点。利用 PROSITE 数据库分析 GhCDPK1 和 SikCDPK1 蛋白质的功能位点,发现 GhCDPK1 蛋白质含有 2 个酰胺化位点(126~129、568~571),1 个 *N*-糖基化位点(494~497),2 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点(100~103、369~372),12 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(70~73、86~89、146~149、162~165、350~353、354~357、372~375、421~424、446~449、496~499、507~510、518~521),5 个 *N*-豆蔻酰化位点(38~43、133~138、234~239、562~567、572~577),6 个蛋白激酶 C 磷酸化位点

(145~147、187~189、221~223、354~356、496~498、578~580);而 SikCDPK1 蛋白质含有 1 个酰胺化位点(112~115),1 个 *N*-糖基化位点(9~12),3 个 cAMP 和 cGMP 依赖性蛋白激酶磷酸化位点(86~89、209~212、355~358),9 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(105~108、148~151、267~270、336~339、358~361、407~410、432~435、493~496、504~507),2 个 *N*-豆蔻酰化位点(220~225、547~552),4 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(67~69、105~107、207~209、562~564)等。这些磷酸化位点大都位于基因的激酶区和调控区,推测对于蛋白激酶的结构和功能有重要作用。

2.4 *GhCDPK1*、*SikCDPK1* 基因编码蛋白质的信号肽和跨膜结构预测

利用 SignalP 4.1 分析了 GhCDPK1 和 SikCDPK1 的信号肽序列,结果表明二者均无信号肽,由此推测 *GhCDPK1*、*SikCDPK1* 基因可能不进行蛋白质转运,直接在细胞质基质中起作用。同时利用 TMHMM 2.0 预测了二者的跨膜结构域,预测结果表明,二者都不存在跨膜结构域。结合信号肽的预测结果进一步证明,植物 CDPK 可能在细胞质基质中合成后,不经蛋白质转运,直接锚定于细胞质基质中的特定部位行使催化功能。

2.5 *GhCDPK1*、*SikCDPK1* 蛋白质保守结构域的预测

利用 NCBI 在线分析工具 CCD 分析 GhCDPK1、SikCDPK1 的保守结构域,结果(图 2、图 3)显示 GhCDPK1 和 SikCDPK1 具有典型的 CDPK 保守结构域,蛋白质的 N 端都有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶域、Ca<sup>2+</sup> 结合位点;在 CDPK 特有的 C 端调控区(也是钙结合区),GhCDPK1 有 4 个 EF-hands 结构域,而 SikCDPK1 只有 2 个 EF-hands 结

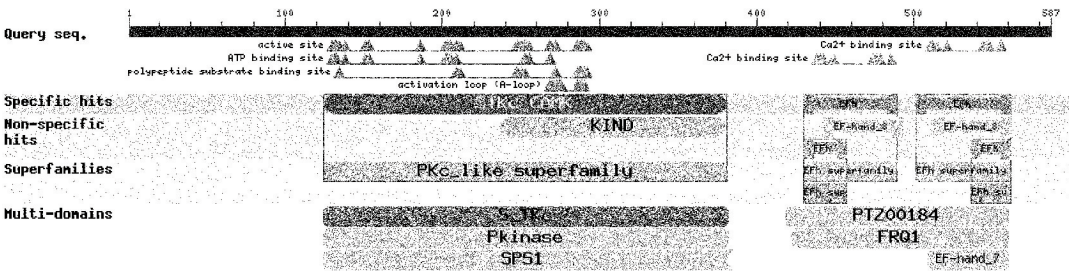


图 2 *GhCDPK1* 保守结构域预测  
Fig.2 Prediction of conserved domains in *GhCDPK1*



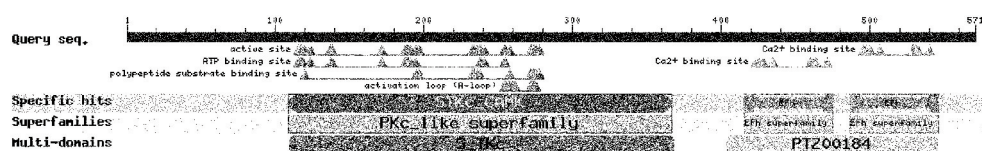


图3 SikCDPK1 保守结构域预测

Fig.3 Prediction of conserved domains in SikCDPK1

构域。

## 2.6 *GhCDPK1*、*SikCDPK1* 基因编码蛋白质的亲水性和疏水性

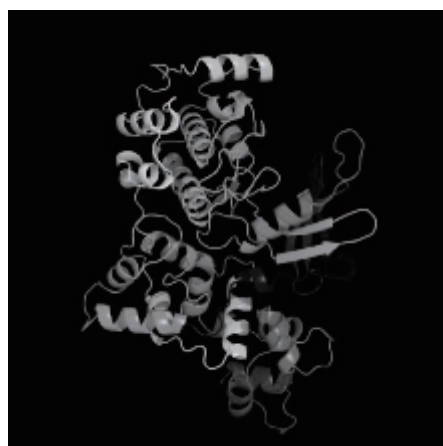
蛋白质亲、疏水性氨基酸组成是蛋白质折叠的主要驱动力,一般通过亲水性分布图反映蛋白质的折叠情况。利用 ProtScale 进行蛋白质亲、疏水性预测,结果显示:*GhCDPK1* 在多肽链第 220 位的缬氨酸(Y)具有最低分值-2.833,第 314 位的亮氨酸(L)具有最高分值 2.744;而 *SikCDPK1* 在多肽链第 69、70 位的赖氨酸(K)具有最低分值-3.11,第 300 位的缬氨酸(V)具有最高分值 2.789。按照亲水性越强氨基酸分值越低、疏水性越强分值越高的规律,从整条链来看亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,且在整个肽链中分布较均匀,说明 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 蛋白质都是亲水性蛋白质,这也与先前

ProtParam 的预测结果相符。

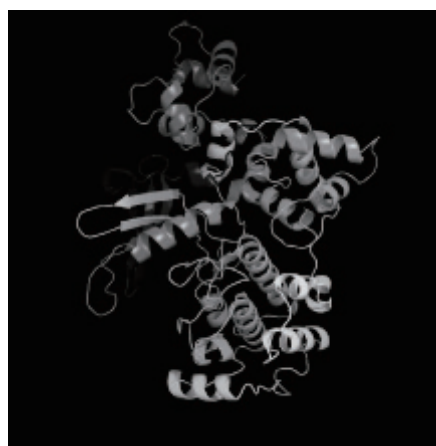
## 2.7 *GhCDPK1*、*SikCDPK1* 蛋白质高级结构预测及比较

通过 Predictprotein 对蛋白质的二级结构进行预测,结果表明:*GhCDPK1* 蛋白质肽链中含有  $\alpha$ -螺旋 (Alpha helix) 35.95%, $\beta$ -转角 (Beta turn) 10.39%,无规则卷曲 (Random coil) 53.66%;*SikCDPK1* 蛋白质肽链中含有  $\alpha$ -螺旋 35.55%, $\beta$ -转角 11.56%,无规则卷曲 62.89%。二者蛋白质二级结构的主要结构元件都是无规则卷曲和  $\alpha$ -螺旋。

通过 Phyre 2 软件采用折叠识别建模法预测蛋白质三级结构,结果(图4)表明:*GhCDPK1* 蛋白质与隐孢子虫 CDPK1 蛋白质的三级结构相似性为 41%;*SikCDPK1* 蛋白质与恶性疟原虫 CDPK2 蛋白质的三级结构相似性为 39%。



A



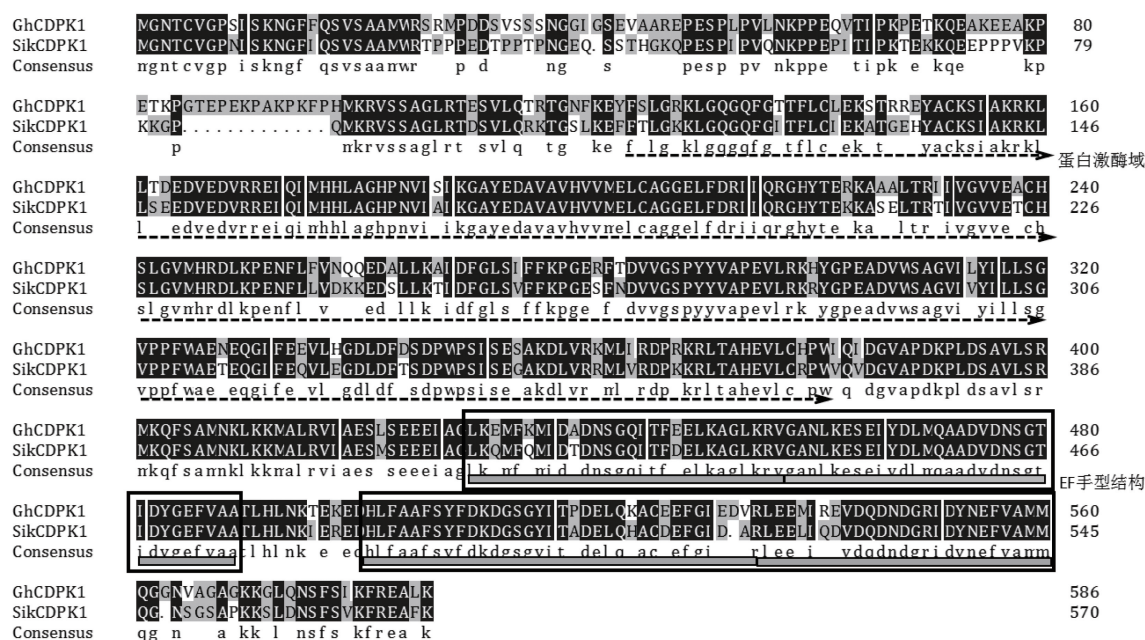
B

A: *GhCDPK1*; B: *SikCDPK1*。图4 *GhCDPK1*、*SikCDPK1* 蛋白质的三级结构预测Fig.4 Three-dimensional structure of *GhCDPK1* and *SikCDPK1* proteins

## 2.8 植物 CDPK 蛋白质的同源比对和系统进化树的构建

用 DNAMAN 对 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 的氨基酸序列进行比对,结果表明 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1*

同源率为 79.9%(图5)。*N* 端可变区保守性较差,且在氨基酸水平上同源性低;催化区通常由 300 多个氨基酸残基组成,该区域具有典型的 Ser/Thr 蛋白激酶保守结构域,不同种属或不同成员之间具有



图中黑色部分为完全匹配,灰色部分为部分匹配;虚线箭头表示 Ser/Thr 蛋白激酶域;黑色方框表示 SikCDPK1 蛋白的 2 个 EF-hand 结构域;灰色矩形表示 GhCDPK1 蛋白的 4 个 EF-hand 结构域。

图 5 GhCDPK1 和 SikCDPK1 氨基酸序列比对

Fig.5 Amino acid sequence alignment of GhCDPK1 and SikCDPK1

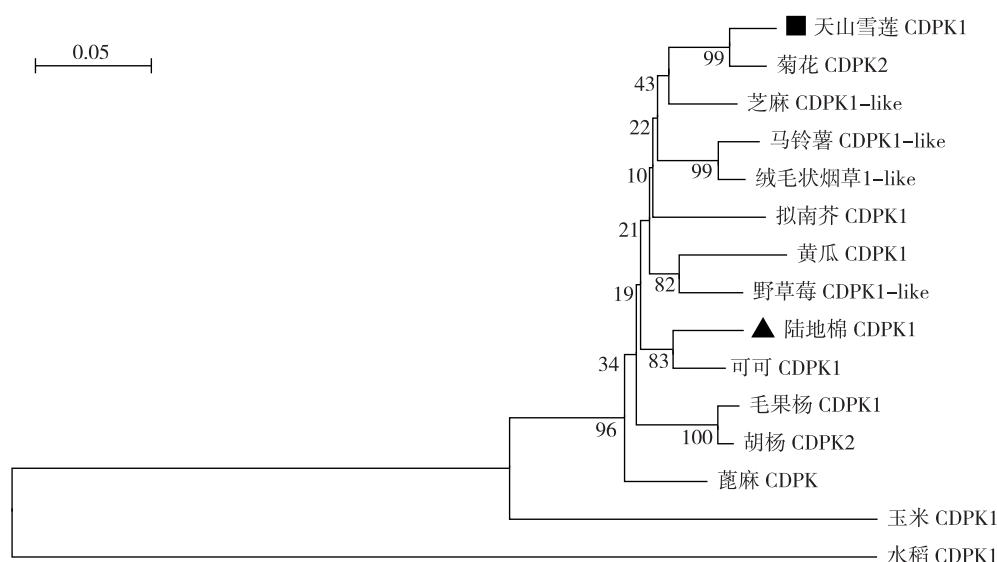
较高的同源性;连接区由 20~30 个氨基酸残基组成,是蛋白激酶活性自抑制的区域,该区域最为保守,富含碱性氨基酸。在没有  $\text{Ca}^{2+}$  时,CDPK 催化区可能与连接区结合,使其激酶活性被抑制;C 端调控区是钙结合区,通过该手型结构使 CDPK 在不依赖于钙调素 (CaM) 的条件下与  $\text{Ca}^{2+}$  高度亲和,该区域保守性差。GhCDPK1 有 4 个 EF 手型结构,分别在 430~457、430~489、501~561 和 536~561 位氨基酸处,而 SikCDPK1 只有 2 个 EF 手型结构,在 416~475 和 487~546 位。由此推测,胞质中微小的  $\text{Ca}^{2+}$  变化就能使 SikCDPK1 构象发生变化,激酶产生活性。

用 MAGE 5.0 软件对马铃薯 (NP\_001305572.1)、毛果杨 (XP\_002310978.1)、黄瓜 (XP\_004135049.2)、野草莓 (XP\_004307068.1)、可可 (XP\_007010504.1)、蓖麻 (XP\_002514436.1)、芝麻 (XM\_011078576.1)、绒毛状烟草 (AJ344155.1)、拟南芥 (NM\_120569.2)、天山雪莲、菊花 (KC202418.1)、胡杨 (XM\_002310942.2)、陆地棉 (FJ938290.1、EU723087.1、HM002634.1)、玉米 (NM\_001111834.2) 和水稻 (AF194413.1) 的 CDPK 氨基酸序列构建系统进化树预测基因的起源和功

能。结果 (图 6) 显示, GhCDPK1 与可可 CDPK1 亲缘关系最近, SikCDPK1 与菊花 CDPK2 并为一处,其亲缘关系最近。由于 CDPK 在植物中的高度保守性,可根据亲缘关系推测其蛋白质功能也可能具有高度的一致性。

### 3 讨论

到目前为止,尚未发现有关雪莲 CDPK 基因的报道,棉花中只有少量 CDPK/CPK 基因功能的报道,其中 GhCPK1 基因参与调控棉花纤维的发育<sup>[7,23]</sup>; GhCDPK5 能够应答盐胁迫的诱导,在盐胁迫信号传导路径中发挥作用<sup>[24]</sup>;用探针在相关基因芯片上检测发现干旱和碱胁迫下, GhCDPK2、GhCDPK3、GhCDPK11、GhCDPK14、GhCDPK16 及 GhCDPK28 基因表达量增加<sup>[25]</sup>。拟南芥 AtCDPK1 基因受干旱、高盐等逆境胁迫诱导表达,在非生物胁迫介导的信号转导中起正向调节作用<sup>[26]</sup>;冰叶日中花 McCPK1 基因能响应盐害和脱水胁迫<sup>[27]</sup>;低温胁迫下,玉米 ZmCPK1 基因表达上调,同时能够抑制冷胁迫诱导的 Zmerf3 的表达,是冷胁迫信号途径中的负向调节因子<sup>[21]</sup>。从植物 CDPK 基因的高度保守性来看,我们推测 GhCDPK1 和 SikCDPK1 在耐受



▲和■分别为本研究中克隆的 GhCDPK1 和 SikCDPK1 蛋白质;图中分支点的数字表示 Boot-strap 验证中基于1 000次重复该节点可信度的百分比。

图6 GhCDPK1 与 SikCDPK1 蛋白和其他物种基于氨基酸序列的进化树

Fig.6 Phylogenetic tree of GhCDPK1, SikCDPK1 and other plant species based on acid sequences

干旱、高盐、低温等非生物胁迫方面有一定的作用,有必要进行深入研究。

本试验克隆得到的 *GhCDPK1* 和 *SikCDPK1* 基因,同源性为 79.9%。生物信息学分析结果表明, *GhCDPK1* 为不稳定的亲水性蛋白质,无跨膜结构域,无信号肽,有多个磷酸化位点,与可可 CDPK1 亲缘关系最近; *SikCDPK1* 也为不稳定的亲水性蛋白质,无跨膜结构域和信号肽,有多个磷酸化位点,与菊花 CDPK2 的亲缘关系最近。本研究的 *GhCDPK1* 有 4 个 EF 手型,而 *SikCDPK1* 只存在 2 个 EF 手型,绝大部分植物 CDPK 都含有 4 个 EF 手型结构域,但有些 CDPK 却只有 3 个或者 3 个以下,例如拟南芥中 *AtCPK7*、*AtCPK8*、*AtCPK10*、*AtCPK14*、*AtCPK19*、*AtCPK23* 和 *AtCPK32* 只有 3 个 EF 手型结构, *AtCPK13* 仅有 2 个 EF 手型结构, *AtCPK25* 仅有 1 个 EF 手型结构<sup>[28]</sup>。将 *AtCPK6* 进行人为突变减少其 EF 手型结构后,其激酶活性仅为野生型的 11.6%~21.4%<sup>[29]</sup>;而水稻中的 EF 手型结构的突变对其激酶活性无明显影响<sup>[30]</sup>。是否 EF 手型结构的数量和结构域的变化对激酶活性有影响,是否不同生境植物棉花和雪莲 *CDPK1* 基因响应不同非生物胁迫等问题仍需进一步研究。

## 参考文献:

[1] HARMON A C, GRIBSKOV M, GUBRIUM E, et al. The CDPK

superfamily of protein kinases[J]. *New Phytol*, 2001, 151 (1): 175-183.

[2] GEIGER D, SCHERZER S, MUMM P, et al. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct  $\text{Ca}^{2+}$  affinities[J]. *Plant Biology*, 2010, 107 (17): 8023-8028.

[3] HETHERINGTON A, TREWAVAS A. Calcium-dependent protein kinase in pea shoot membranes[J]. *FEBS Lett*, 1982, 145 (1): 67-71.

[4] HARMON A C, GRIBSKOV M, HARPER J F. CDPKs-a kinase for every  $\text{Ca}^{2+}$  signal [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5 (4): 154-159.

[5] ASANO T, TANAKA N, YANG G, et al. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene family: comprehensive annlysis of the CDPKs gene family in rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46 (2): 356-366.

[6] 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.

[7] HUANG Q S, WANG H Y, GAO P, et al. Cloning and characterization of a calcium dependent protein kinase gene associated with cotton fiber development [J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27 (12): 1869-1875.

[8] CHANG W J, SU H S, LI W J, et al. Expression profiling of a novel calcium-dependent protein kinase gene, *LeCPK2*, from tomato (*Solanum lycopersicum*) under heat and pathogen-related hormones [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73 (11): 2427-2431.

[9] GARGANTINI P R, GIAMMARIA V, GRANDELLIS C, et al. Genomic and functional characterization of *StCDPK1* [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 70 (1-2): 153-172.

- [10] GIAMMARIA V, GRANDELLIS C, BACHMANN S, et al. *StCD-*PK2** expression and activity reveal a highly responsive potato calcium-dependent protein kinase involved in light signalling[J]. *Plant*, 2011, 233 (3): 593-609.
- [11] WITTE C P, KEINATH N, DUBIELLA U, et al. Tobacco calcium-dependent protein kinases are differentially phosphorylated in vivo as part of a kinase cascade that regulates stress response [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (13): 9740-9748.
- [12] DUBROVINA A S, KISELEV K V, KHRISTENKO V S. Expression of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* [J]. *J Plant Physiol*, 2013, 170 (17): 1491-1500.
- [13] 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 (7): 2111-2125.
- [14] ZUO R, HU R, CHAI G, et al. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*) [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40 (3): 2645-2662.
- [15] LIU W, LI W, HE Q, et al. Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in *Gossypium raimondii* [J]. *Plos One*, 2014, 9 (6): 1-11.
- [16] XU X, LIU M, LU L, et al. Genome-wide analysis and expression of the calcium-dependent protein kinase gene family in cucumber [J]. *Mol Genet Genomics*, 2015, 290 (4): 1403-1414.
- [17] MARTIN M L, BUSCONI L. A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125 (3): 1442-1449.
- [18] ZHU S Y, YU X C, WANG X J, et al. Two calcium-dependent protein kinases, *CPK4* and *CPK11*, regulate abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19 (10): 3019-3036.
- [19] ASANO T, HAYASHI N, KOBAYASHI M, et al. A rice calcium-dependent protein kinase *OsCPK12* oppositely modulates salt [J]. *Plant J*, 2012, 69 (1): 26-36.
- [20] CAMPO S, BALDRICH P, MESSEGUER J, et al. Overexpression of a calcium-dependent protein kinase confers salt and drought tolerance in rice by preventing membrane lipid peroxidation [J]. *Plant Physiol*, 2014, 165 (2): 688-704.
- [21] WECKWERTH P, EHLERT B, ROMEIS T. *ZmCPK1*, a calcium-in-dependent kinase member of the *Zea mays* CDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress signalling [J]. *Plant Cell Environ*, 2015, 38 (3): 544-558.
- [22] ZOU J J, LI X D, RATNASEKERA D, et al. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase 8 and catalase 3 function in abscisic acid-mediated signaling and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis in stomatal guard cells under drought stress [J]. *Plant Cell*, 2015, 27 (5): 1445-1460.
- [23] WANG H, MEI W, QIN Y, et al. 1-Aminocyclopropane carboxylic acid synthase is phosphorylated by calcium-dependent protein kinase 1 during cotton fiber elongation [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43 (8): 654-661.
- [24] 甄军波, 张 曦, 王玉美, 等. 棉花盐胁迫应答基因 *GhCPK5* 的克隆及序列分析 [J]. *中国农业大学学报*, 2011, 16 (3): 8-14.
- [25] LI L B, YU D W, ZHAO F L, et al. Genome-wide analysis of the calcium-dependent protein kinase gene family in *Gossypium raimondii* [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2015, 14 (1): 29-41.
- [26] 聂利珍, 于肖夏, 李国婧, 等. 拟南芥 *AtCDPK1* 基因克隆与转化马铃薯的研究 [J]. *西北植物学报*, 2015, 35 (3): 447-453.
- [27] PATHARKAR O R, CUSHMAN J C. A stress-induced calcium-dependent protein kinase from *Mesembryanthemum crystallinum* phosphorylates a two-component pseudoresponse regulator [J]. *Plant Journal*, 2000, 24 (5): 679-691.
- [28] 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.
- [29] 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.
- [30] BREVIARIO D, MORELLO L, GIANI S. Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27 (5): 953-967.

(责任编辑:张震林)