

# 结球甘蓝花粉钙调素基因的克隆与表达分析

孙梓健, 韦静宜, 王小佳\*, 宋明\*, 汤青林, 王志敏, 任雪松

(西南大学园艺园林学院, 重庆市蔬菜学重点实验室, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715)

**摘要:** 根据芸薹属植物钙调素基因保守区域设计引物, 采用同源克隆的方法从结球甘蓝自交不亲和系和自交系花粉中克隆得到一个钙调素开放阅读框 cDNA 序列, 该序列长 450 bp, 编码 149 个氨基酸; 编码蛋白不含跨膜区, 无信号肽, 具有 4 个完整的 EF-hand 结构域。构建了结球甘蓝花粉钙调素原核表达系统, 钙调素基因及其 3 个突变体在 *E. coli* 中得到表达, 均获得分子量约为 16 kD 的可溶性融合蛋白, 在 EGTA 存在的条件下, 各融合蛋白具有各自独特的凝胶迁移现象, 活性检测表明甘蓝花粉钙调素活性依赖于钙离子。该基因在甘蓝自交不亲和系花粉萌发过程中表达量先上升后下降, 在自交系中随花粉萌发增大而降低; 在含有钙调素拮抗剂 TFP 的培养基中, 自交不亲和系和自交系花粉中钙调素基因表达量均受到抑制; 在含有 W-7 琼脂糖的培养基中无明显差异。

**关键词:** 甘蓝; 花粉; 钙调素; 克隆; 表达分析

**中图分类号:** S 635.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2012) 04-0677-10

## Cloning and Expression Analysis of Calmodulin Gene in *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.

SUN Zi-jian, WEI Jing-yi, WANG Xiao-jia\*, SONG Ming\*, TANG Qing-lin, WANG Zhi-min, and REN Xue-song

(College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University; Chongqing Key Laboratory of Olericulture; Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Calmodulin (CaM) mediates lots of cellular processes in eukaryotes, it is a pivotal transducer of calcium signal. A *Brassica oleracea* CaM gene was isolated using homology based on the cloning method. The ORF (open reading frame) of this gene was 450 bp encoding 149 amino acids with four conserved EF-hand domains. There is no transmembrane domain or signal peptide sequence in tentative protein sequence. The recombinant CaM proteins (three mutants included) were expressed in *E. coli*, and subsequently separated on SDS-PAGE in the presence of EGTA, their electrophoresis motilities were related with that of mutant EF-Hand motifs. The activity assay showed that the CaM activity relied on the presence of  $Ca^{2+}$ . Gene expression in the pollen germination was investigated using qPCR, the results indicated that the gene expression increased first and then descended in pollen of self-incompatible line, but decreased continuously in self-compatible line, both of which were down-regulated significantly

**收稿日期:** 2011-12-26; **修回日期:** 2012-03-24

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31071802, 31000908); 重庆市自然科学基金重点项目 (2011BA1002); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2009C126, XDJK2012B020); 教育部博士点基金项目 (20090182120003)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wxj@swu.edu.cn; swausongm@yahoo.com.cn)

when TFP was added in pollens; There was no significant difference in the beginning or at the end of pollen germination when W-7 sepharose was added.

**Key words:** cabbage; pollen; calmodulin; cloning; expression analysis

甘蓝的自交不亲和现象对研究植物生殖细胞之间的信号传导机理和创新育种理论与方法提供了理想的模式。自交不亲和过程中的花粉萌发和花粉管生长是复杂并且受到高度调控的发育过程,涉及到多种信号分子。偶联胞外信号和胞内生理生化反应的钙离子在这一过程中起着重要的作用,在自交亲和和性花粉萌发并穿越柱头的伸长过程中,花粉管的伸长受到顶端钙梯度的诱导(Ellsabeth et al., 1994),钙通过对代谢关键酶或转录因子的活化实现对花粉管生长的调控(孙大业等, 2001)。

植物中许多花粉管萌发和伸长所需要的蛋白质,都是钙相关蛋白(Dai et al., 2007; Samuel et al., 2008),尚未分离鉴定的甘蓝花粉钙感应(如钙调素)蛋白在结构和功能上是值得深入研究的内容。

钙调素(Calmodulin, CaM)作为主要的多功能钙离子受体,是细胞内信号传导途径中的主要信号分子(Zielinski, 1998),在胡萝卜和小麦等(Yang et al., 1996; Ishigaki et al., 2005)植物中已有较多研究报道,因此研究钙调素在甘蓝花粉萌发过程中的作用具有十分重要的理论意义。

本研究中通过 RT-PCR 的方法克隆得到结球甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.)花粉钙调素基因,随后对该基因及其突变体的原核表达特性进行了研究,并对花粉萌发过程中该基因的表达进行了初步的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及其花粉 *CaM* 基因的 cDNA 和 gDNA 的克隆与序列分析

以西南大学十字花科蔬菜研究所试验田结球甘蓝高度自交不亲和系‘E1’和自交系‘226#’为材料。2011 年 4 月取盛花期自交不亲和系和自交系花粉在相对湿度 100%条件下静置培养 2 h,而后置于花粉液体萌发培养基中(Roberts et al., 1983) 25 °C 培养 1 h。

将萌发和未萌发花粉样品混合(不亲和系和自交系分别混合),使用 Trizol 提取总 RNA, DNase I 去除总 RNA 样品中的 gDNA,使用 PrimeScript RT-PCR Kit 合成第一链 cDNA。

根据芸薹属植物钙调素基因保守区域设计 PCR 扩增引物 BoCAM-F 和 BoCAM-R(表 1)用于 cDNA 序列的扩增,RT-PCR 扩增体系为 ddH<sub>2</sub>O 32.8 μL, 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 2 mmol · L<sup>-1</sup> dNTP 5 μL, 25 mmol · L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 3 μL, BoCAM-F/BoCAM-R 各 1.5 μL, KOD DNA 聚合酶 1 μL,模板 DNA 1 μL。

PCR 扩增参数为 94 °C 2 min, 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min; 35 个循环。回收目的片段分别连接到 pEASY-Blunt simple 载体和 pMD19-T Simple 载体,转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞,进行蓝白斑筛选后,挑取阳性克隆进行酶切鉴定并送测序。

### 1.2 甘蓝花粉 *CaM* 基因的原核表达

将测序正确的重组质粒命名为 pBoCAM-12#(pEASY-Blunt simple 载体)和 pBoCAM-12#-M(pMD19-T Simple 载体),分别进行 BamH I 和 Sal I 双酶切并回收所需目的片段,使用 T4 DNA 连接酶连接后转化至 *E. coli* JM109,对转化子进行 PCR 和双酶切鉴定。将测序正确的重组质粒命名为

pColdI-12#。

将含有 pColdI-12# 的 *E. coli* Rosseta 单菌落接种于含氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中, 37 °C 200 r·min<sup>-1</sup> 过夜培养, 次日将培养物按 1:100 接种至含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 37 °C 200 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6, 15 °C 静置 30 min, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>, 于 15 °C 180 r·min<sup>-1</sup> 诱导 24 h。

诱导结束后离心收集菌体, 使用 Ni<sup>2+</sup>-NTA 柱 (Qiagen) 纯化融合蛋白, 以转化 pCold I DNA 空载体的 *E. coli* Rosseta 作为对照。

纯化得到的融合蛋白等电聚焦使用 Bio-rad 7 cm IPG 3-10 非线性胶条在 PROTEAN II (Bio-rad) 上进行, 等电聚焦条件为: 250 V, 1 h; 4 000 V 2 h; 4 000 V 恒压至 20 000 Vh。第二向电泳条件: 10 mA·gel<sup>-1</sup>, 20 min; 15 mA·gel<sup>-1</sup> 至电泳结束。

### 1.3 甘蓝花粉 *CaM* 基因突变体的原核表达及其活性检测

以 pBoCAM-12#-M 为模板设计定点突变引物 (表 1), 以 pBoCAM-12#-M 为突变模板。首先使用 EF2F/EF2R 引物将第 2 个 EF-hand 结构域第 68 位的 Glu 突变为 Gln, 在得到突变克隆后以此突变克隆为模板使用 EF3F/EF3R 引物将第 3 个 EF-hand 结构域第 105 位 Glu 突变为 Gln, 以此类推, 最后使用 EF4F/EF4R 引物将第 4 个 EF-hand 结构域第 130 位 Asp 突变为 Asn (图 1)。

突变体构建所采用的 PCR 扩增体系为 ddH<sub>2</sub>O 32.8 μL, 10 × PCR 缓冲液 5 μL, 2 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 5 μL, 25 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 3 μL, 突变引物各 1.5 μL, KOD DNA 聚合酶 1 μL, 模板 DNA 1 μL。PCR 扩增参数为 94 °C 2 min, 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 3 min; 35 个循环。纯化回收目的片段, 使用 *Dpn* I 去除模板质粒, 最终将突变质粒转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 进行蓝白斑筛选后, 挑取阳性克隆进行酶切鉴定, 将测序正确的样本进行原核表达试验。

将 *CaM* 基因突变体原核表达产物进行纯化, 并测定 *CaM* 及其突变体对环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 活性的激活作用, 以蛇毒替代 5'-核苷酸酶 (叶正华 等, 1990)。

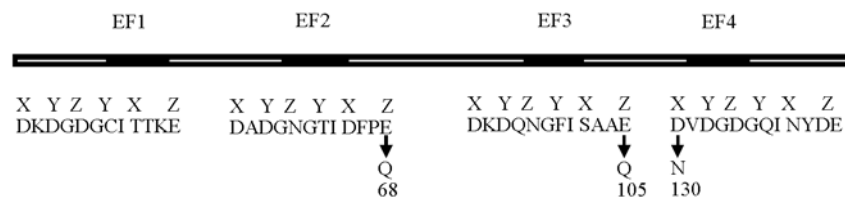


图 1 *CaM* 突变体示意图

Fig. 1 Schematic diagram of *CaM* mutants

### 1.4 甘蓝花粉萌发和 *CaM* 基因的表达分析

自交不亲和系和自交系花粉在 25 °C 条件下液体培养基 (Roberts et al., 1983) 中萌发 0、15 和 45 min 分别取样, 观察萌发情况。添加钙调素拮抗剂的样本在试验开始 5 min 时在培养基中添加 500 μmol·L<sup>-1</sup> 的 N-(6-氨基己基)-5-氯-1-萘磺胺盐酸盐 (W-7) 琼脂糖 (Jennings et al., 2006) 和 100 μmol·L<sup>-1</sup> 的三氟拉嗪 (TFP), 添加后 10 min 和 40 min 后分别取 10 μL 在显微镜下观察萌发情况。

分别收集无添加和添加钙调素抑制剂 0、15 和 45 min 的花粉样本进行实时荧光定量 RT-PCR 试验。以 *β-Actin* 为内参基因, 使用 *SsoFast*<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix (Bio-Rad) 配制反应体系, 扩增条

件为：95 ℃ 2 min（1 个循环）；95 ℃ 1 s，57.5 ℃ 2 s，72 ℃ 2 s（40 个循环）。每个取样点设 3 个技术重复，3 个生物学重复。

表 1 基因克隆、突变体构建和实时荧光定量引物  
Table 1 Primers used in gene cloning, mutants constructuion and qPCR

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence	退火温度/℃ T <sub>m</sub>
BoCAM-F	GCGCGGATCCATGGCGGATCAGCTCACCGAC	55
BoCAM-R	CGCGGTCGACATTCTTAGCCATCATGACTTTAACG	
EF4'-F	GATGATCCGTGAAGCT <sup>□</sup> ATGTTGATGG	57.5
EF4'-R	<sup>□</sup> AGCTTCACGGATCATCTCATCAAC	
EF3'-F	TTCATCTCCGCGGCT <sup>□</sup> AGCTCCGACA	60
EF3'-R	<sup>□</sup> AGCCGCGGAGATGAAACCGTTCTGGTC	
EF2'-F	ACCATCGACTTCCCT <sup>□</sup> AGTTCCTGAA	56
EF2'-R	<sup>□</sup> AGGGAAGTCGATGGTCCCGTT	
BoActin-F	TATCAACTACCAGCCACC	56.5
BoActin-R	GAACACCTCAGCTACACTC	
CAM-RT-F	CGACTTCCCTGAGTTCCTG	56
CAM-RT-R	AACCGTTCTGGTCTTTATC	

注：下划线部分为限制性内切酶位点，方框处碱基为突变位点。  
Note: Restriction enzyme sites were underlined; nucleotides with frame were mutation sites.

2 结果与分析

2.1 *BoCaM12* 的克隆及其序列分析

以逆转录合成的第一链 cDNA 为模板，利用特异性引物 BoCAM-F 和 BoCAM-R 扩增得到甘蓝自交不亲和系 ‘E1’ 与自交系 ‘226#’ 花粉共有的 1 条钙调素基因完整开放阅读框（ORF）序列，BLAST 比对结果发现，编码区包括 2 个外显子和 1 个内含子（数据未列出），命名为 *BoCaM12*。经测序分析，该序列长 450 bp（图 2），编码 149 个氨基酸残基（图 3），GenBank 登录号为 JN704116。

*BoCaM12* 所编码的蛋白，预测分子量为 16.84 kD，等电点(pI)为 3.87，含有 4 个 EF-hand 保守结构域，分别在 21 ~ 32、57 ~ 68、92 ~ 105 和 130 ~ 141 位氨基酸残基。每个 EF-hand 结构域均有 Ca<sup>2+</sup>结合位点，以 TMMHMM 和 TMpred 预测该蛋白不是跨膜蛋白，不含跨膜区。

*BoCaM12* 推导得到的氨基酸序列与旱芹（AAC16663）、油菜（AAF73157）、胡萝卜（AAT73619）、苹果（ADN96172）、小麦（AAC49582）、葡萄（AAL58535）和花生（AAR99409）等多种植物 CaM

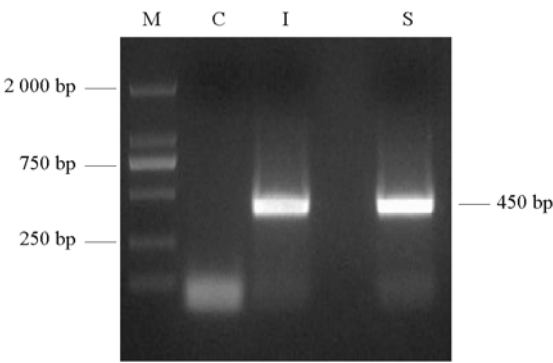


图 2 甘蓝花粉 *BoCaM12* RT-PCR 扩增结果  
M: DL2000 DNA marker; C: 阴性对照; I: E1; S: 226#。  
Fig. 2 RT-PCR amplification of *BoCaM12* in pollen of cabbages  
M: DL2000 DNA marker; C: No template control;  
I: E1; S: 226#.

氨基酸序列高度同源，同源性均在 99%以上。

Met Ala Asp Gln Leu Thr Asp Asp Gln Ile Ser Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ser Leu Phe  
1 ATG GCG GAT CAG CTC ACC GAT GAC CAG ATC TCA GAG TTC AAG GAA GCC TTC AGC CTC TTC  
Asp Lys Asp Gly Asp Gly Cys Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser Leu  
61 GAC AAG GAT GGC GAT GGT TGC ATC ACC ACC AAG GAG CTC GGA ACC GTG ATG AGG TCT CTG  
Gly Gln Asn Pro Thr Glu Ala Glu Leu Gln Asp Met Ile Asn Glu Val Asp Ala Asp Gly  
121 GGG CAA AAC CCG ACA GAA GCC GAG CTC CAA GAC ATG ATC AAC GAA GTT GAC GCT GAC GGG  
Asn Gly Thr Ile Asp Phe Pro Glu Phe Leu Asn Leu Met Ala Arg Lys Met Lys Asp Thr  
181 AAC GGG ACC ATC GAC TTC CCT GAG TTC CTG AAC CTG ATG GCG AGG AAG ATG AAG GAC ACT  
Asp Ser Glu Glu Glu Leu Lys Glu Ala Phe Arg Val Phe Asp Lys Asp Gln Asn Gly Phe  
241 GAC TCG GAG GAA GAG CTC AAG GAA GCC TTC AGG GTG TTT GAT AAA GAC CAG AAC GGT TTC  
Ile Ser Ala Ala Glu Leu Arg His Val Met Thr Asn Leu Gly Glu Lys Leu Thr Asp Glu  
301 ATC TCC GCG GCT GAG CTC CGA CAT GTG ATG ACT AAC CTC GGG GAG AAG CTG ACC GAC GAG  
Glu Val Asp Glu Met Ile Arg Glu Ala Asp Val Asp Gly Asp Gly Gln Ile Asn Tyr Asp  
361 GAA GTT GAT GAG ATG ATC CGT GAA GCT GAT GTT GAT GGC GAT GGT CAG ATC AAC TAC GAT  
Glu Phe Val Lys Val Met Met Ala Lys  
421 GAG TTC GTT AAA GTC ATG ATG GCT AAG TAA

图 3 BoCaM12 序列及推导氨基酸序列

双下划线部分为 EF-Hand 结构域。

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of BoCaM12

EF-Hand domains were underlined.

采用 ClustalX 2 和 MEGA v5.0 软件构建的进化树（图 4）表明，BoCaM12 与小麦和胡萝卜的亲缘关系最近，与已知甘蓝钙调素亚型（CAD20351）次之，与拟南芥 CaM8 和 CaM9 较远。

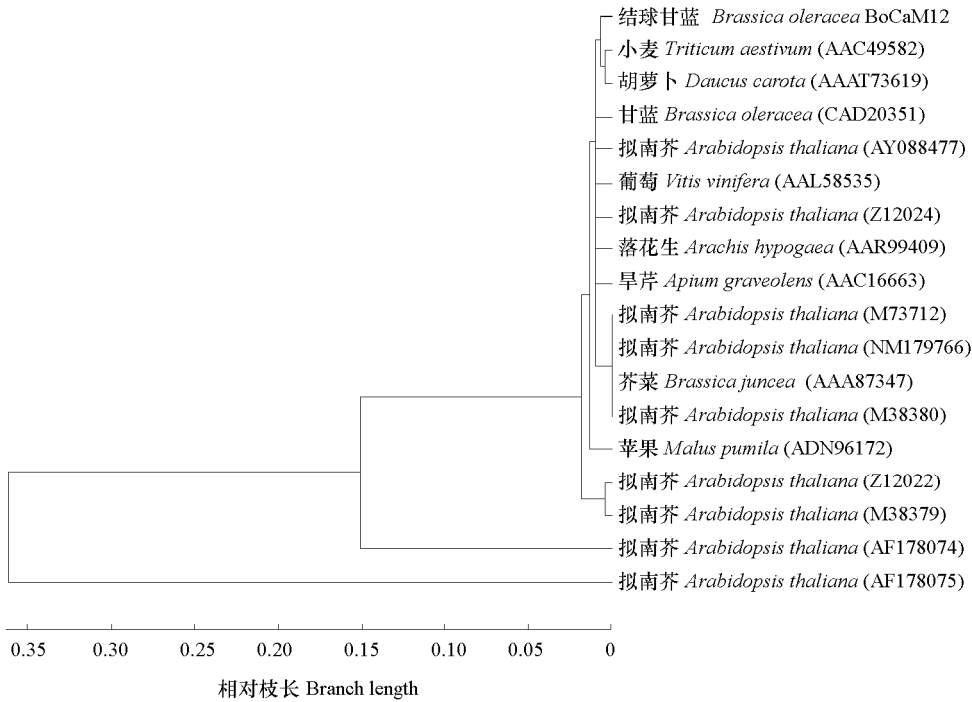


图 4 甘蓝花粉 BoCaM12 与其他植物钙调素氨基酸序列同源性分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of BoCaM12 deduced amino acid sequences homolog with related species

## 2.2 *BoCaM12* 的原核表达

*BoCaM12* 的原核表达结果如图 5 所示, 插入片段的重组质粒 pColdI-12#经诱导, 能够表达约 16 kD 的特异蛋白 *BoCaM12*, 空载对照及未诱导对照中无此条带。

CaM 的独特电泳行为是在有钙离子和无钙离子 (含 EGTA) 的条件下 SDS-PAGE 电泳图谱有明显的差异, 这是鉴定 CaM 的重要方法。

由图 5 可以看出, *BoCaM12* 在没有钙离子结合的情况下移动速度比结合钙离子的移动速度更慢, 由此可以说明 *BoCaM12* 在电泳特性上与其他来源的 CaM 相符合。

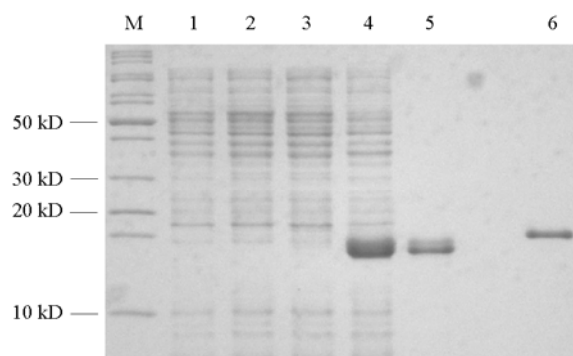


图 5 pColdI-12#在 *E. coli* 中的表达分析

M: 蛋白分子量标准; 1、2: 空载对照; 3: pColdI-12#; 4: IPTG 诱导; 5: 纯化后的 *BoCaM12*; 6: *BoCaM12* + EGTA。

Fig. 5 Expression analysis of pColdI-12# in *E. coli*

M: Protein standard; 1, 2: Control; 3: pColdI-12#; 4: IPTG induced; 5: Purified *BoCaM12*; 6: *BoCaM12* + EGTA.

纯化后的 *BoCaM12* 的双向电泳结果如图 6 所示, *BoCaM12* (箭头所指) 的等电点在 3 附近, 与预测等电点 (3.87) 相符。

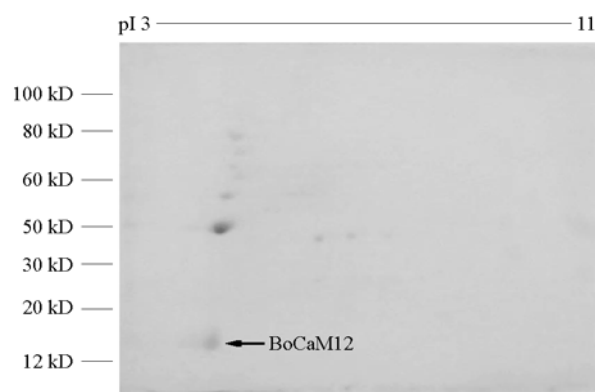


图 6 *BoCaM12* 的双向电泳分析

Fig. 6 *BoCaM12* separated with 3 - 11 NL IPG strips

## 2.3 突变体构建、原核表达和 CaM 活性测定

将构建得到的 3 条突变序列 (图 7) 进行原核表达, 最终得到 3 种部分失去钙离子结合能力的 *BoCaM12* 突变体, 分别命名为 *BoCaM12-2'*、*BoCaM12-23'*和 *BoCaM12-234'* (表 2)。如图 8 所显

示，*BoCaM12-2*和 *BoCaM12-23*的电泳行为与 *BoCaM12* 一致；而 *BoCaM12-234*与无钙离子对照 *BoCaM12*（未进行突变，EGTA 处理）的电泳行为一致。

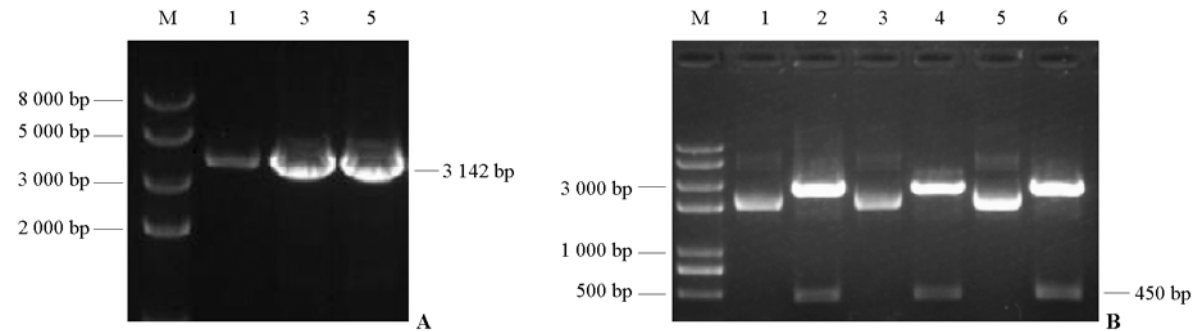


图 7 *BoCaM12* 突变体构建 (A) 及其酶切鉴定 (B)

Fig. 7 *BoCaM12* mutants construction (A) and restriction enzyme digestion analysis (B)

M: DL2000 Plus II DNA marker; 1: *BoCaM12-2*; 2: *BoCaM12-2* + *BamH* I + *Sal* I; 3: *BoCaM12-23*; 4: *BoCaM12-23* + *BamH* I + *Sal* I; 5: *BoCaM12-234*; 6: *BoCaM12-234* + *BamH* I + *Sal* I.

表 2 *BoCaM12* 突变体列表  
Table 2 Mutants property of *BoCaM12*

突变体名称 Name	EF-hand 结构域 EF-hand domain				突变位点 Mutation sites
	EF1	EF2	EF3	EF4	
<i>BoCaM12-2</i>	—	+	—	—	68-Glu
<i>BoCaM12-23</i>	—	+	+	—	68-Glu, 105-Glu
<i>BoCaM12-234</i>	—	+	+	+	68-Glu, 105-Glu, 130-Asp

注：“+”为发生突变；“—”为未发生突变。  
Note: “+”: Mutation induced; “—”: No mutation.

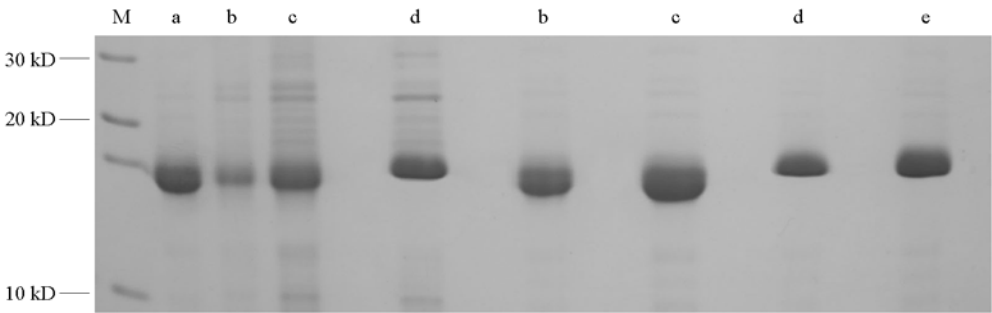


图 8 *BoCaM12* (a)、*BoCaM12-2* (b)、*BoCaM12-23* (c) 和 *BoCaM12-234* (d) 原核表达的 SDS-PAGE 分析

M: 蛋白分子量标准; e: *BoCaM12* + EGTA。

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of *BoCaM12* (a), *BoCaM12-2* (b), *BoCaM12-23* (c) and *BoCaM12-234* (d) expressed in *E. coli* Rosetta  
M: Protein standard; e: *BoCaM12* + EGTA.

*BoCaM12* 与 3 种突变体的活性检测结果如图 9 所示。*BoCaM12* 对 PDE 有明显的激活作用，而突变体 *BoCaM12-2*对 PDE 虽然有激活作用，但比 *BoCaM12* 弱。其余两种突变体 (*BoCaM12-23*和 *BoCaM12-234*) 对 PDE 的激活作用与无钙离子结合的 *BoCaM12*（含 EGTA）一致。

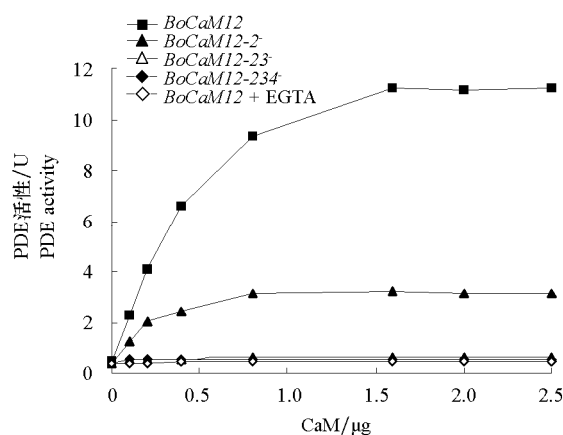


图 9 *BoCaM12*、*BoCaM12-2'*、*BoCaM12-23'* 和 *BoCaM12-234* 的活性检测  
Fig. 9 Effects of *BoCaM12*, *BoCaM12-2'*, *BoCaM12-23'* and *BoCaM12-234* on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity

## 2.4 花粉萌发过程中 *BoCaM12* 基因的表达

自交系与自交不亲和系甘蓝花粉在无钙调素抑制剂的对照组中均有萌发，而在含有钙调素抑制剂 TFP 和 W-7 琼脂糖的培养基中几乎观察不到花粉的萌发。

使用荧光定量的方法检测 *BoCaM12* 基因在甘蓝花粉中的表达情况，在没有钙调素拮抗剂的对照组中，自交不亲和系花粉萌发过程中 *BoCaM12* 在培养至 15 min 时表达量达到最高，在 45 min 后降低至 15 min 时的一半左右；自交系花粉从萌发开始至萌发 45 min 时表达量持续下降。自交不亲和系和自交系花粉在添加 TFP 之后 10 min 表达量明显下降，在 45 min 后表达量仅为起始的 1/5 左右。

在添加 W-7 琼脂糖后，自交不亲和系和自交系花粉 *BoCaM12* 表达量差异不大，前者在 W-7 琼脂糖添加 10 min 后小幅下降，而后者小幅上涨，45 min 后回落至培养开始时水平，二者最终表达量相差不大。

## 3 讨论

本试验从甘蓝萌发花粉中扩增得到的 *BoCaM12* 基因的 cDNA 序列推导氨基酸序列与其他植物中 CaM 基因的同源性都在 90% 以上，具有 4 个完整的 EF-hand 结构域，保守的 EF-hand 结构域是 CaM 的重要特征；在拟南芥中，CaM 不同亚型参与激活了不同  $\text{Ca}^{2+}$  诱导的信号传导，其中，CaM 1 仅在根部表达 (Ling et al., 1991)，CaM3 在花柱中不表达，CaM4 和 CaM5 在角果中表达 (Gawienowski et al., 1993)，CaM1、CaM2 和 CaM3 在叶片中的表达均通过触碰刺激诱导 (Perera & Zielinski, 1992)，CaM7 对维持细胞的生长具有重要作用 (Zielinski, 2002)，而已知的甘蓝 CaM 能与植物受体激酶 (Plant Receptor Kinase, PRKs) 发生相互作用，从而激活下游反应 (Vanoosthuyse et al., 2003)。本试验中扩增得到的 *BoCaM12* 基因推导蛋白与拟南芥 CaM7 和已知甘蓝 CaM 具有较高的同源性 (图 4)，推测它可能对花粉管的萌发生长具有重要的作用，与其他 PRKs 的相互作用还有待于进一步试验验证。

CaM 具有 4 个保守的 EF-hand 结构域，CaM 对钙离子的结合依赖 EF-hand 结构域氨基酸残基的保守性，如果 EF-hand 结构域的保守氨基酸残基位点改变，那么对于钙离子的结合能力越弱 (Yang



& Poovaiah, 2003), 这在 CaM 突变体活性的检测中可以明显的观察到(图 9)。CaM 中 4 个 EF-hand 结构域成对的通过氢键形成分子内反向平行的  $\beta$  折叠以形成钙离子结合位点, EF-hand 结构的 pair of pairs 模型表明 CaM 的 N 端和 C 端成对的 EF-hand 结构域形成的哑铃状构象对钙离子的结合具有重要的作用, 且 C 端结构(EF3 和 EF4)对钙离子具有更高的亲和能力(Babu et al., 1985; Osnat & Michael, 1985; Rajagopal et al., 1992), 因此, 当 EF3 与 EF4 突变掉后, 突变体对 PDE 均失去激活作用。

在添加不同的 CaM 拮抗剂后, 试验克隆得到的结球甘蓝 *BoCaM12* 基因在自交不亲和系花粉和自交系花粉萌发过程中表达量有着明显的差异: TFP 是一种小分子 CaM 拮抗剂, 可以进入胞内, 抑制胞内 CaM, 而 W-7 琼脂糖作为大分子 CaM 拮抗剂, 不能跨过质膜进入胞内, 仅能抑制胞外 CaM。本试验中采用实时荧光定量分析的方法对克隆得到的 *BoCaM12* 在花粉萌发过程中的表达进行了分析, 相对于无 CaM 拮抗剂的对照组, 添加 TFP 的试验组 *BoCaM12* 被强烈抑制, 花粉不萌发; 而添加 W-7 琼脂糖的试验组 *BoCaM12* 的表达变化并无明显抑制现象, 但花粉也不能萌发, 推测该 *BoCaM12* 作用位点位于胞内, 参与了胞内信号通路的反应, 但也可能参与了胞外的反应抑制了花粉萌发。CaM 在胞内多定位于细胞质内, 作为某些酶的亚基参与信号传导(Kakalis et al., 1995), 但也有部分 CaM 进入并定位于细胞核内, 参与基因的表达调控(Aitken et al., 1982; Feng & Stemmer, 1999)。

本试验中克隆得到的 *BoCaM12* 可能是因为被 TFP 抑制, 导致促进花粉萌发的关键基因不能正确转录和表达, 最终导致花粉不能正常萌发。

本试验构建了重组表达载体 pBoCAM-12#, 转化 *E. coli* Rosseta 菌株, 最终表达得到约 16 kD 的特异融合蛋白。随后在此基础上构建了 3 种 EF-hand 结构域失活的 *BoCaM12* 突变体, 并进行了体外活性分析, 为进一步研究 CaM 的结构和功能提供了重要的理论依据, 同时也为甘蓝花粉萌发过程中 CaM 调控作用的研究奠定了基础。

## References

- Aitken A, Cohen P, Santikarn S, Williams D H, Calder A G, Smith A, Klee C B. 1982. Identification of the NH<sub>2</sub>-terminal blocking group of calcineurin B as myristic acid. FEBS Letters, 150: 314 - 318.
- Babu Y S, Sack J S, Greenhough T J, Bugg C E, Means A R, Cook W J. 1985. Three-dimensional structure of calmodulin. Nature, 315: 37 - 40.
- Dai S, Chen T, Chong T, Xue Y, Liu S, Wang T. 2007. Proteomics identification of differentially expressed proteins associated with pollen germination and tube growth reveals characteristics of germinated *Oryza sativa* pollen. Mol Cell Proteomics, 6: 207 - 230.
- Ellsabeth S P, Deborah D M, Dale A C, Peter K H. 1994. Pollen tube growth is coupled to the extracellular calcium ion flux and the intracellular calcium gradient. The Plant Cell, 6: 1815 - 1828.
- Feng B, Stemmer P M. 1999. Interactions of calcineurin A, calcineurin B, and Ca<sup>2+</sup>. Biochemistry, 38: 12481 - 12489.
- Gawienowski M C, Szymanski D, Perera I Y, Zielinski R E. 1993. Calmodulin isoforms in *Arabidopsis* encoded by multiple divergent mRNAs. Plant Molecular Biology, 22 (2): 215 - 225.
- Jennings N S, Smethurst P A, Knight C G, O'Connor M N, Korhonen L J, Stafford P, Stephens J, Stephen F G, Ian J H, Richard W F, Nicholas A W, Willem H O. 2006. Production of calmodulin-tagged proteins in *Drosophila* Schneider S2 cells: A novel system for antigen production and phage antibody isolation. J Immunol Methods, 316: 75 - 83.
- Kakalis L T, Kennedy M, Sikkink R, Rusnak F, Armitage I M. 1995. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. FEBS Letters, 362: 55 - 58.
- Ishigaki E, Sugiyama R, Kurosaki F. 2005. Multiple forms of calmodulin genes in carrot treated with fungal mycelial walls. Biol Pharm Bull, 28: 1109 - 1112.

- Ling V, Perera I, Zielinski R E. 1991. Primary structures of *Arabidopsis* calmodulin isoforms deduced from the sequences of cDNA clones. *Plant Physiol*, 96: 1196 - 1202.
- Osnat H, Michael N G. 1985. Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. *Nature*, 313: 653 - 659.
- Perera I Y, Zielinski R E. 1992. Structure and expression of the *Arabidopsis* CaM-3 calmodulin gene. *Plant Molecular Biology*, 19: 649 - 664.
- Rajagopal C, William E M, Anthony R M, Florante A Q. 1992. Calmodulin structure refined at 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 228 (4): 1177 - 1192.
- Roberts I N, Gaude T C, Harrod G, Dickinson H G. 1983. Pollen-stigma interactions in *Brassica oleracea*, a new pollen germination medium and its use in elucidating the mechanism of self-incompatibility. *Theor Appl Genet*, 65: 231 - 238.
- Samuel M A, Yee D, Haasen K E, Goring D R. 2008. 'Self' pollen rejection through the intersection of two cellular pathways in the Brassicaceae: Self-incompatibility and the compatible pollen response//Self-incompatibility in flowering plants. Berlin: Springer: 173 - 191.
- Sun Da-ye, Ma Li-geng, Guo Yan-lin, Cui Su-juan. 2001. Cell signal transduction. Beijing: Science Press: 92 - 156. (in Chinese)
- 孙大业, 马力耕, 郭艳林, 崔素娟. 2001. 细胞信号转导. 北京: 科学出版社: 92 - 156.
- Vanoosthuysse V, Tichtinsky G, Dumas C, Gaude T, Cock J M. 2003. Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea* S locus receptor kinase. *Plant Physiol*, 133: 919 - 929.
- Yang T B, Poovaiah B W. 2003. Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci*, 8 (10): 505 - 512.
- Yang T S G, Abbo S F M, Fromm H. 1996. Characterization of the calmodulin gene family in wheat: Structure, chromosomal location, and evolutionary aspects. *Molecular & General Genetics*, 252 (6): 684 - 694.
- Ye Zheng-hua, Guo Ji-fang, Sun Da-ye. 1990. Quantitative assay of plant calmodulin by phosphodiesterase. *Plant Physiology Communications*, (1): 55 - 56. (in Chinese)
- 叶正华, 郭季芳, 孙大业. 1990. 应用磷酸二酯酶定量测定植物钙调素. *植物生理学通讯*, (1): 55 - 56.
- Zielinski R E. 1998. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49 (3): 697 - 725.
- Zielinski R E. 2002. Characterization of three new members of the *Arabidopsis thaliana* calmodulin gene family: Conserved and highly diverged members of the gene family functionally complement a yeast calmodulin null. *Planta*, 214: 446 - 455.

## 征 订

## 欢迎订阅《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会和中国农业科学院蔬菜花卉研究所主办的学术期刊,创刊于1962年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究报告、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中文核心期刊,被英国《CAB 文摘数据库》、美国 CA 化学文摘、日本 CBST 科学技术文献速报、俄罗斯 AJ 文摘杂志、CSCD 中国科学引文数据库等多家重要数据库收录。《园艺学报》荣获第三届国家期刊奖及中国科技信息所“中国精品科技期刊”、武汉大学中国科学评价研究中心“中国权威学术期刊”、中国期刊协会和中国出版科学研究所“新中国 60 年有影响力的期刊”等称号。

根据“中国学术期刊影响因子年报(2011 版)”,《园艺学报》复合总被引频次为 11 630,期刊综合总被引频次 5 317,复合影响因子 1.780,期刊综合影响因子 1.124。

《园艺学报》为月刊,每月 25 日出版。每期定价 40.00 元,全年 480.00 元。国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号 82 - 471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号 M448。漏订者可直接寄款至本编辑部订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部;

邮政编码:100081;电话:(010) 82109523。E-mail: [yuanyixuebao@126.com](mailto:yuanyixuebao@126.com)。网址: <http://www.ahs.ac.cn>。