

杜梨类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白基因 *PbCBL2* 的克隆和功能初探

李 慧^{1,2,*}, 李刚波^{1,3,*}, 丛 郁⁴, 常有宏^{1,2,**}, 蔺 经¹, 盛宝龙¹

(¹江苏省农业科学院园艺研究所, 南京 210014; ²国家农业科技华东(江苏)创新中心——高效园艺作物遗传改良实验室, 南京 210014; ³南京农业大学园艺学院, 南京 210095; ⁴中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 南京 210008)

摘 要: 类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 (Calcineurin B-like protein, CBLs) 是植物中一类重要的钙离子传感器, 参与调控植物生长发育及逆境胁迫响应过程。为了探明杜梨 CBLs 家族成员 *PbCBL2* 的序列特征和表达模式, 以杜梨 (*Pyrus betulaefolia* Bunge) 幼苗为试材, 运用 EST 搜索结合 RACE 技术、染色体步移法对 *PbCBL2* 的 cDNA、DNA 和启动子进行克隆, 采用半定量 RT-PCR 和原核表达研究该基因在非生物胁迫下的表达模式。结果表明, *PbCBL2* 基因 cDNA 序列长 681 bp, 编码一个含有 226 个氨基酸残基的蛋白。基因组 DNA 序列长 1 927 bp, 包括 8 个外显子和 7 个内含子, 启动子序列包含光反应元件、厌氧诱导必需顺式作用元件、赤霉素反应元件和水杨酸响应顺式作用元件。*PbCBL2* 编码的多肽具有植物类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白结合 Ca^{2+} 所必需的 4 个 EF 手型结构和 1 个典型的植物钙调磷酸酶 A 亚基结合位点。未经处理的杜梨幼苗 (对照) 根和叶中未检测到 *PbCBL2* 的表达, *PbCBL2* 的表达受 NaCl、PEG6000、甘露醇和 ABA 诱导上调。*PbCBL2* 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 能够明显减轻 NaCl、甘露醇和 PEG6000 对该菌株的生长抑制。*PbCBL2* 基因具备植物 CBLs 基因家族的固有特征, 对盐碱、干旱、渗透胁迫和 ABA 处理均存在转录响应, 大肠杆菌转入该基因后能够提高对盐胁迫和渗透胁迫的耐受能力。

关键词: 杜梨; 类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白; 基因克隆; 基因表达特点; 原核表达; 逆境胁迫

中图分类号: S 661

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 08-1445-11

Isolation of a Calcineurin B-like Protein Gene *PbCBL2* from *Pyrus betulaefolia* and Preliminary Study of Gene Function

LI Hui^{1,2,*}, LI Gang-bo^{1,3,*}, CONG Yu⁴, CHANG You-hong^{1,2,**}, LIN Jing¹, and SHENG Bao-long¹

(¹Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; ²National Agricultural Science and Technology Jiangsu Innovative Center - Efficient Horticulture Crop Genetic Improvement Laboratory, Nanjing 210014, China; ³College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ⁴State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: Calcineurin B-like protein (CBLs), as a plant calcium sensor, plays critical role in the regulation of plant growth and stress response process. However, *CBL2* gene sequence feature, expression

收稿日期: 2013-03-12; **修回日期:** 2013-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101529); 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (12) 5033]

* 并列第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: cyh@jaas.ac.cn)

characteristic and physiological function in birch-leaf pear (*Pyrus betulaefolia* Bunge) are largely unknown. In this study, we isolated the cDNA, genomic DNA and its responding promoter sequences of *PbCBL2* gene from birch-leaf pear seedlings by EST database mining, rapid amplification of cDNA ends (RACE) and genome walking approaches. The results have showed that *PbCBL2* cDNA sequence contained a 681 bp open reading frame which encoded 226 amino acid residues. The length of genomic DNA sequence was 1 927 bp which consists of 8 exons and 7 introns. The promoter region of *PbCBL2* harbored some specific regulatory elements or motifs, such as light responsive element, cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction, gibberellin-responsive element and cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness. The deduced *PbCBL2* polypeptide had four EF-hand structure domains (58 - 71, 95 - 106, 132 - 143 and 176 - 187 amino acids) which was necessary for calcium-binding and one calcineurin A subunit binding sites (156 - 171 amino acids). Semi-quantitative RT-PCR and prokaryotic expression analyses validated that the mRNA abundance of *PbCBL2* is responsive to different abiotic stresses. However, *PbCBL2* expression was barely detected in roots and leaves of birch-leaf pear seedling without abiotic stresses treatment. The inhibition effects on BL21 (DE3) growth causing by NaCl, mannitol or PEG6000 were significantly alleviated after *PbCBL2* gene transformation. Our studies have suggested that *PbCBL2* gene has the inherent characteristics of the CBLs gene family in plants, which transcription level is respond to salt, drought, osmotic stresses and ABA treatment. *E. coli* BL21 (DE3) tolerance to salt stress and osmotic stress was enhanced by transferred *PbCBL2*.

Key words: *Pyrus betulaefolia* Bunge; calcineurin B-like protein; gene cloning; gene expression characteristics; prokaryotic expression; environment stress

植物通过 Ca^{2+} 结合蛋白及其靶蛋白对细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化进行识别、放大和向下游转导,从而调控生长、发育和逆境胁迫应答反应 (Tang et al., 2012)。类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 (CBLs) 为植物 Ca^{2+} 传感蛋白之一,参与调控植物生长发育及逆境胁迫响应过程。该家族在多数植物中有 10 个成员,含有可结合 Ca^{2+} 的 EF 手型结构域,该结构域起着稳定蛋白和增加对钙亲和力的作用;在 2 个 α -螺旋之间,EF 手型结构域的 12 个氨基酸残基构成环 (Loop),环上氨基酸残基 1 (X)、3 (Y)、5 (Z)、7 (-Y)、9 (-X) 和 12 (-Z) 为钙离子结合的关键位置,直接决定蛋白对 Ca^{2+} 的亲合能力 (Nagae et al., 2003; Batistič & Kudla, 2009, 2012; Weinl & Kudla, 2009)。CBLs 仅以丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 CIPK (CBL-interacting protein kinase) 作为靶蛋白 (Luan, 2009),在逆境条件下,CBLs 基因家族中的部分成员与相应的 CIPK 组合形成蛋白激酶复合物,感受胞内 Ca^{2+} 浓度变化,调节下游基因的表达,参与植株应对非生物胁迫的转录调控 (Batistič & Kudla, 2009; Luan, 2009)。在不同植物中均发现参与盐胁迫信号转导的 CBLs 基因家族成员,敲除 *AtCBL1* (Albrecht et al., 2003) 或 *AtCBL10/SCABP8* (Kim et al., 2007; Quan et al., 2007) 后,拟南芥突变体对盐胁迫敏感,过量表达 *AtCBL1* (Cheong et al., 2003) 或 *AtCBL5* (Cheong et al., 2010) 可以提高拟南芥植株对盐胁迫的耐受能力;胡杨 *PeCBL6* 和 *PeCBL10* 的过量表达均能够提高受体植物的耐盐能力 (Li et al., 2012a)。此外,拟南芥 *AtCBL4/AtSOS3* (Gong et al., 2004)、油菜 *BnCBL1* (Chen et al., 2012) 和大豆 *GmCBL1* (Li et al., 2012b) 亦在植株耐盐碱过程起作用。目前,尚无 CBL2 基因参与植物耐盐碱过程 Ca^{2+} 信号转导的报道,并且由于物种进化的特异性,不同物种间 CBLs 同源基因的具体功能和作用方式存在差异 (Kolukisaoglu et al., 2004)。因此,分离不同物种中响应盐胁迫信号的 CBLs 基因家族成员并验证其功能具有重要意义。

杜梨 (*Pyrus betulaefolia* Bunge) 是梨属植物重要的抗性资源,适生性强,为中国普遍应用的梨

砧木之一。以杜梨为砧木嫁接,能够改善梨树的耐盐性。杜梨对盐胁迫的耐受主要通过减少 Na^+ 在根中积累并限制其向地上部运输来实现 (Okubo et al., 2000; Okubo & Sakuratani, 2000; Matsumoto et al., 2006, 2007)。CBL-CIPK 信号通路为盐胁迫下植物调控 Na^+ 稳态分布的主要途径之一 (Weinl & Kudla, 2009)。目前,杜梨 CBLs 基因家族成员中仅分离了 *PbCBL10*, 虽然该基因的表达可以响应盐胁迫,但是其具体功能尚未研究 (李慧 等, 2012), 也无该物种其它的 CBLs 成员参与植株耐盐碱调控过程的相关报道。克隆 CBLs 基因家族盐胁迫响应的其它成员并研究其功能,有助于全面阐明杜梨 CBLs 家族基因所介导的逆境调控机制。

本研究中借助 EST 搜索结合 RACE 技术和染色体步移法,从盐胁迫后的杜梨幼苗中分离 *PbCBL2* 基因的 cDNA、基因组 DNA 和启动子序列,并采用半定量 RT-PCR 和原核表达研究该基因在不同非生物胁迫处理下的诱导表达模式,初步揭示杜梨 *PbCBL2* 基因对逆境胁迫的转录响应,为进一步探讨杜梨抗逆机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2011 年 11 月于山东泰安收集杜梨的单株成熟种子。种子在江苏省农业科学园园艺研究所进行层积和培养:种子用流水冲洗干净后,湿砂拌种贮藏在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏柜中进行层积处理;4 个月后将种子取出,播种于光照培养箱石英砂基质钵内,培养温度 $(25 \pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照周期 14 h/10 h (光照/黑暗),光强为 $300\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。生长期常规管理,并用改良 1/4MS 营养液浇灌 (李慧 等, 2012)。

1.2 方法

1.2.1 *PbCBL2* 基因的克隆

经 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 处理 8 h 的杜梨 4 叶龄幼苗叶片总 RNA 和 DNA 提取分别采用天根生化 (北京) 科技有限公司的 RNA plant plus Reagent 和植物基因组 DNA 提取试剂盒进行, cDNA 第一链合成按照 3'-Full RACE Core Set with PrimeScriptTM RTase (TaKaRa 公司) 说明书操作。依据拟南芥 *AtCBL2* 基因氨基酸序列 (AAC26009) 为探针,通过 tblastn 检索苹果 EST 数据库,选取 1 条含有 ATG 起始密码子的序列 (GO519468) 作为模板,设计引物 PbCBL2-S1 (5'-ATGTTGCAGTGCATAGACG-3') /PbCBL2-F1 (5'-CTGCGAGGGTAGCCACAACC-3') 扩增杜梨 *PbCBL2* 基因的 5'端片段。根据获得的 5'端片段设计 3'端基因特异嵌套引物 PbCBL2-3-1 (5'-GTGATTGATGACGGGTTGAT-3') 和 PbCBL2-3-2 (5'-CAGGAGGTG-AAACAAATGGT-3'), 分别与试剂盒中 3' RACE Outer Primer 和 3' RACE Inner Primer 进行巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 产物稀释 10 倍作模板进行第 2 轮巢式扩增。比对、拼接杜梨 *PbCBL2* 基因 5'端片段和 3'端片段,获得 cDNA 序列编码区信息,并设计引物 PbCBL2-ORF-S1 (5'-ATGTTGCAGTGCATAGACGGG-3') /PbCBL2-ORF-F1 (5'-TCAGGTGTCGTCAACTGCG-3'),以杜梨叶片 cDNA 和基因组 DNA 为模板,用高保真耐热 DNA 聚合酶 (Pfu DNA Polymerase, TIANGEN 公司) 对其进行扩增验证。根据目的基因的 DNA 序列设计扩增启动子的特异引物 SP1 (5'-ATCAACCCGTCATCAATCACTG-3'), SP2 (5'-TGCCTCTATTTCACTCACACTG-3') 和 SP3 (5'-CATAACACGGTCTCCCTTGCT-3'), 按照 Genome Walker Kit (TaKaRa 公司) 说明书进行染色体步移。

利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒 [爱思进生物技术 (杭州) 有限公司] 回收 PCR 产物,回收产物连接到 pMD[®]19-T Vector (TaKaRa 公司),转化 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克

隆, PCR 确认后送上海生工生物技术有限公司测序。

1.2.2 *PbCBL2* 基因序列分析

杜梨 *PbCBL2* 基因的核苷酸翻译采用 BioXM 软件, 根据它们的 DNA 和 cDNA 序列, 利用 Gene Structure Display Server (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 分析内含子和外显子组成。结构域分析通过 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>) 完成。

采用 MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>) 构建系统进化树, 序列来自 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

利用生物学数据库 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和在线工具 Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) (Reese, 2001) 进行启动子元件分析和转录起始位点的预测。

1.2.3 *PbCBL2* 基因表达研究

选择长势健壮、大小一致的杜梨 4 叶龄幼苗置于含 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱落酸 (ABA, Sigma 公司)、 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠 (NaCl, Sigma 公司)、 $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 聚乙二醇 (PEG6000, Sigma 公司) 或 $180 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇 (Mannitol, Sigma 公司) 的改良 1/4MS 营养液 (李慧 等, 2012) 中, 处理 8、16、24 h, 然后分别采集植株根和叶用于研究 *PbCBL2* 对不同非生物胁迫的转录响应, 同时以生长于改良 1/4MS 营养液中未经处理的杜梨 4 叶龄幼苗根和叶作为对照。

总 RNA 提取和 cDNA 第一链合成同 1.2.1, 采用跨内含子引物 PbCBL2-BD-S1 (5'-GCAGTGA TTGATGACGGGTT-3') 和 PbCBL2-BD-F1 (5'-CTCGGGAATGTTGTGGTG-AT-3') 扩增 *PbCBL2* 基因, 以 *PbActin* 基因作为内参基因 (李慧 等, 2012), 进行半定量 RT-PCR, 分析 *PbCBL2* 基因的表达情况。

1.2.4 *PbCBL2* 的原核表达

包含 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点的引物 PbCBL2-YHBD-S1 (5'-CCGGAATTCATGTTGCAGTGC ATAGACGGGTT-3') 和 PbCBL2-YHBD-F1 (5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCAGGTGTCGTCAACTTGC G-3') 对杜梨 *PbCBL2* 基因 cDNA 序列的编码区进行扩增 (下划线部分为酶切位点, 斜体部分为保护碱基), PCR 产物经回收、连接和测序后, 将含目的基因的重组质粒命名为 pMD[®]19-*PbCBL2*。用 *EcoR* I 和 *Not* I 分别双酶切 pMD[®]19-*PbCBL2* 重组质粒 DNA 和原核表达载体 pET-22b(+), 分别回收插入的目的片段和表达载体, 经 T4-DNA 连接酶 (TaKaRa 公司) 连接后转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在氨苄青霉素 (Amp) 抗性的 LB 平板上挑取重组质粒, 进行酶切鉴定和测序验证, 将成功融合目的基因的表达载体命名为 pET-22b(+)-*PbCBL2*。

将含有融合表达载体 pET-22b(+)-*PbCBL2* 的质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 挑取单菌落接种于 5 mL 液体 LB 培养基 (含 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp) 中, 37°C 振荡培养过夜。次日按 1:100 的比例接到新的液体 LB 培养基 (含 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp) 中, 于 37°C 振荡培养至 $\text{OD}_{600} = 0.5$, 随后加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG) (终浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行诱导表达 3 h 后收集菌体; 或加入氯化钠 (NaCl, Sigma 公司)、甘露醇 (Mannitol, Sigma 公司) 或聚乙二醇 (PEG6000, Sigma 公司), 使它们在培养液中的浓度分别达到 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $1.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $150 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每隔 0.5 h 测定 OD_{600} 至培养 12 h, 用于绘制生长曲线, 并且在诱导 0、1、6 和 12 h 后收集菌体; 采用 StarSpin Bacterial RNA Kit (北京康润诚业生物科技有限公司) 提取大肠杆菌总 RNA, 按照 PowerScript II[™] 反转录酶 (TaKaRa 公司) 说明书合成 cDNA 第一链, 以 PbCBL2-BD-S1 和 PbCBL2-BD-F1 为引物, 扩增 *PbCBL2* 基因, *16S rDNA* 作为内参基因 (Chaurasia et al., 2008) 进行半定量 RT-PCR, 分析 *PbCBL2* 基因的表达情况。

2 结果与分析

2.1 *PbCBL2* 基因 cDNA、DNA 及启动子克隆

以 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理 8 h 的杜梨 4 叶龄幼苗叶片 cDNA 为模板, 用 PbCBL2-S1/ PbCBL2-F1 进行 PCR 扩增, 获得 460 bp *CBL* 基因 5'端片段 (图 1, A); 以 PbCBL2-3-1 和 PbCBL2-3-2 分别与 3' RACE Outer Primer 和 3' RACE Inner Primer 结合, 进行巢式 PCR 扩增, 获得 408 bp 3'末端片段 (图 1, B)。拼接 5'端片段和 3'末端片段, 获得 1 条具有完整编码区的 cDNA 序列。利用引物 PbCBL2-ORF-S1/PbCBL2-ORF-F1 进行扩增 (图 1, C) 及测序验证后将该序列登录 (GenBank 登录号 KC6333132), 用相同引物扩增基因组 DNA, 获得该基因编码区 1 927 bp DNA 序列 (图 1, D, GenBank 登录号 KC6333133)。采用基因特异引物 SP1、SP2 和 SP3 进行染色体步移巢式 PCR, 获得 1 491 bp 条带 (图 1, E), 测序后发现该序列与编码区 DNA 序列有一段重叠区域, 确认其为所获得基因的上游启动子序列。

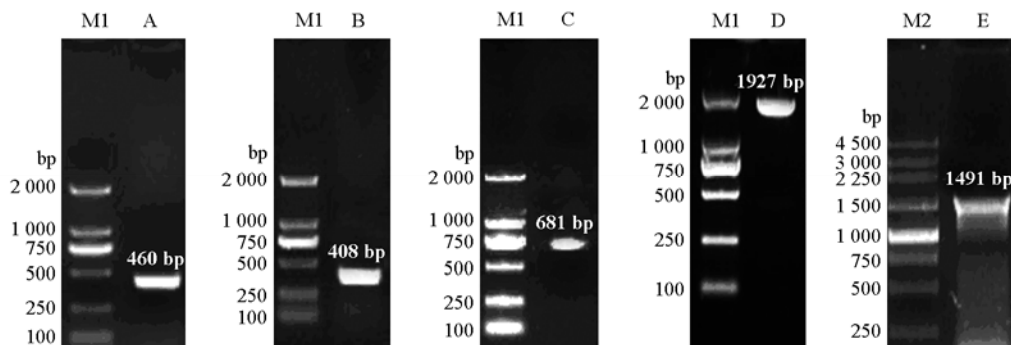


图 1 杜梨 *PbCBL2* 基因的 PCR 扩增结果

M1: DL2000 DNA marker; M2: 250 bp DNA ladder marker; A: 5'端片段; B: 3'末端片段扩增产物;

C: 编码区 cDNA; D: 编码区 DNA; E: 启动子扩增产物。

Fig. 1 The PCR amplification results of *PbCBL2* from *Pyrus betulaefolia* Bunge

M1: DL2000 DNA marker; M2: 250 bp DNA ladder marker; A: 5' terminal fragment; B: The amplification product of 3' terminal fragment; C: cDNA coding sequence; D: DNA coding sequence; E: Promoter amplification products.

2.2 *PbCBL2* 基因编码区特征及启动子分析

所获得基因的编码区 DNA 序列为 1 927 bp, 由 8 个外显子和 7 个内含子组成 (图 2), cDNA 序列长 681 bp, 编码一个含有 226 个氨基酸残基的蛋白 (图 3)。该基因推导的多肽具有植物类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白结合 Ca^{2+} 所必需的 4 个 EF 手型结构: SSAVIDDGLINKEE (58 ~ 71 位氨基酸), DTKHNGILGFEE (95 ~ 106 位氨基酸), DLKQQGFIERQE (132 ~ 143 位氨基酸) 和 DTKHDGRIDKEE (176 ~ 187 位氨基酸), 1 个典型的植物钙调磷酸酶 A 亚基结合位点 GMNLSDDVIESIIDKT (156 ~ 171 位氨基酸)。

该基因与其它植物 *CBLs* 基因所推导的氨基酸序列间存在较高的相似性, 如棉花 (EU085040) (95%)、葡萄 (FJ901268) (94%) 和苜蓿 (XM_003617824) (93%)。在拟南芥类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 (*CBLs*) 基因家族系统进化树上, 所获得的杜梨 *CBL* 基因与拟南芥 *AtCBL2* 亲缘关系最近 (图 4)。本研究中克隆获得的杜梨 *CBL* 基因属于植物 *CBLs* 家族, 编码类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白, 并将其命名为 *PbCBL2*。

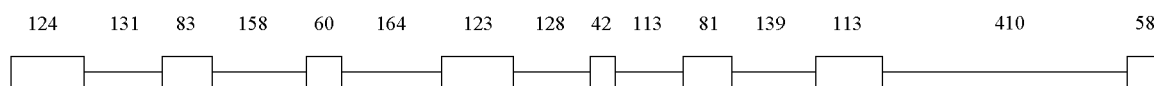


图 2 杜梨 *PbCBL2* 基因内含子与外显子分布

外显子和内含子分别用方框和直线表示, 数字为核苷酸的数量。

Fig. 2 The distribution of introns and exons in *PbCBL2* gene from birch-leaf pear

The boxes represent exons, straight lines indicate introns and numbers mean nucleotide number, respectively.

```

1  atgttgcagtgcatagacgggttaaggcatgtatgtgcttccctgctgaggtgctgtgatcttgacttgacaaacaatcgagaggctta
   M L Q C I D G L R H V C A S L L R C C D L D L Y K Q S R G L
91  gaagaccctgaaattctagcaaggagaccgtgttcagtgtagtgaaatagaggcactttatgagctatttaagaagatcagcagtgca
   E D P E I L A R E T U F S U S E I E A L Y E L F K K I S S A
181 gtgattgatgacgggttgattaacaaggaggaatttcgactggcattattcaagacaaacaagaagagagcctgtttgctgatcgtgtt
   U I D D G L I N K E E F R L A L F K T N K K E S L F A D R U
271 ttgacttggttgacacaaagcacaatggaatactaggttttgaagagtttgcgcagctctctctgtctttcatcccaatgcccaatt
   F D L F D T K H N G I L G F E E F A R A L S U F H P N A P I
361 gacgataagattgggttttcttttcagtttatatgaccttaagcagcaaggcttcacgaaaggcaggaggtgaaacaaatggttggtgct
   D D K I G F S F Q L Y D L K Q Q G F I E R Q E U K Q M U U A
451 accctcgagaatcaggcatgaatctttcagatgatgtgatagagacataattgataagacctttgaggaagctgatacaaaacatgat
   T L A E S G M N L S D D U I E S I I D K T F E E A D T K H D
541 gggaggatcgacaaggaagagtgagaagccttggtttgcggcatccatcccttcttaaaaatgatgacgtccaatacctcaaggacatc
   G R I D K E E W R S L U L R H P S L L K N H T L Q Y L K D I
631 accacaacattcccgagccttggctcttctcactcgcaagttgacgacacctga
   T T T F P S F U F H S Q U D D T *
  
```

图 3 杜梨 *PbCBL2* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸

* 为终止密码子, EF 手型结构和钙调磷酸酶 A 亚基结合位点分别用下划线和虚线标注。

Fig. 3 cDNA and deduced amino acid sequences of *PbCBL2* from birch-leaf pear

* Shows termination codon, solid lines above the sequence indicate position of EF-hand regions and the dotted line denotes the calcineurin A (catalytic) subunit interaction domain, respectively.

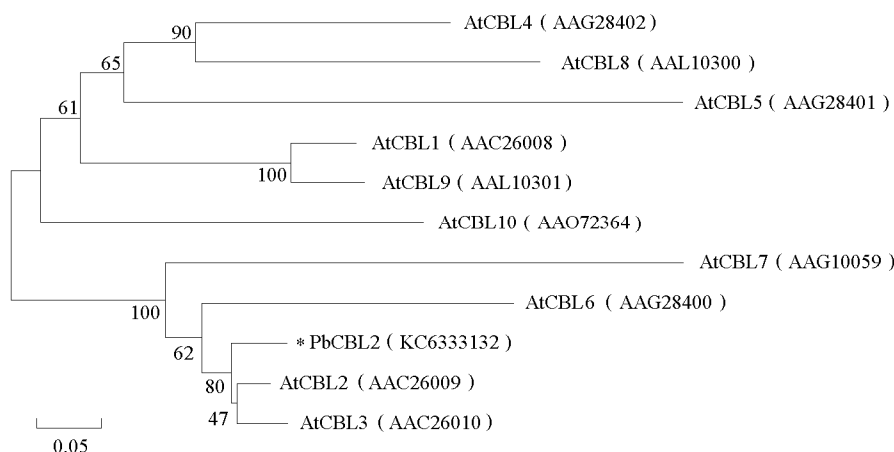


图 4 杜梨 *PbCBL2* 推导的氨基酸序列和拟南芥 CBLs (AtCBL) 蛋白的系统进化树

标尺表示进化距离, 节点上的数值表示 bootstrap 验证中基于 1 000 次重复该节点可信度的百分比 (%)。

Fig. 4 The phylogenetic tree of birch-leaf pear *PbCBL2* protein with 10 *Arabidopsis thaliana* CBLs

Scale shows evolutionary distance, the number at the nodes represents the reliability percent (%) of bootstraps values based on 1 000 replications.

去除 *PbCBL2* 基因染色体步移获得的 1 491 bp 条带 (图 1, E) 中与基因组 DNA 序列重叠区域, 获得 1 362 bp 启动子序列 (图 5)。预测的转录起始位点 G 位于翻译起始位点 ATG 上游 - 119 bp 处 (将转录起始位点定义为 0), 启动子基本作用元件 TATA-box 位于转录起始位点上游 - 87、- 144、- 223、- 248、- 271、- 295、- 319、- 341、- 385 及 - 984 bp 处, 增强子 CAAT-box 位于转录起始位点上游 - 70、- 446、- 526、- 580、- 592、- 850、- 922、- 942 及 - 968 bp 处。在该启动子还存在着光反应元件 (GT1-motif, - 18 bp; Box I, - 601 bp; G-box, - 610 bp; Sp1, - 1 017 bp)、厌氧诱导必需顺式作用元件 (ARE, - 147 和 - 840 bp)、赤霉素反应元件 (GARE-motif, - 892 bp) 和水杨酸响应顺式作用元件 (TCA-element, - 991 bp)。

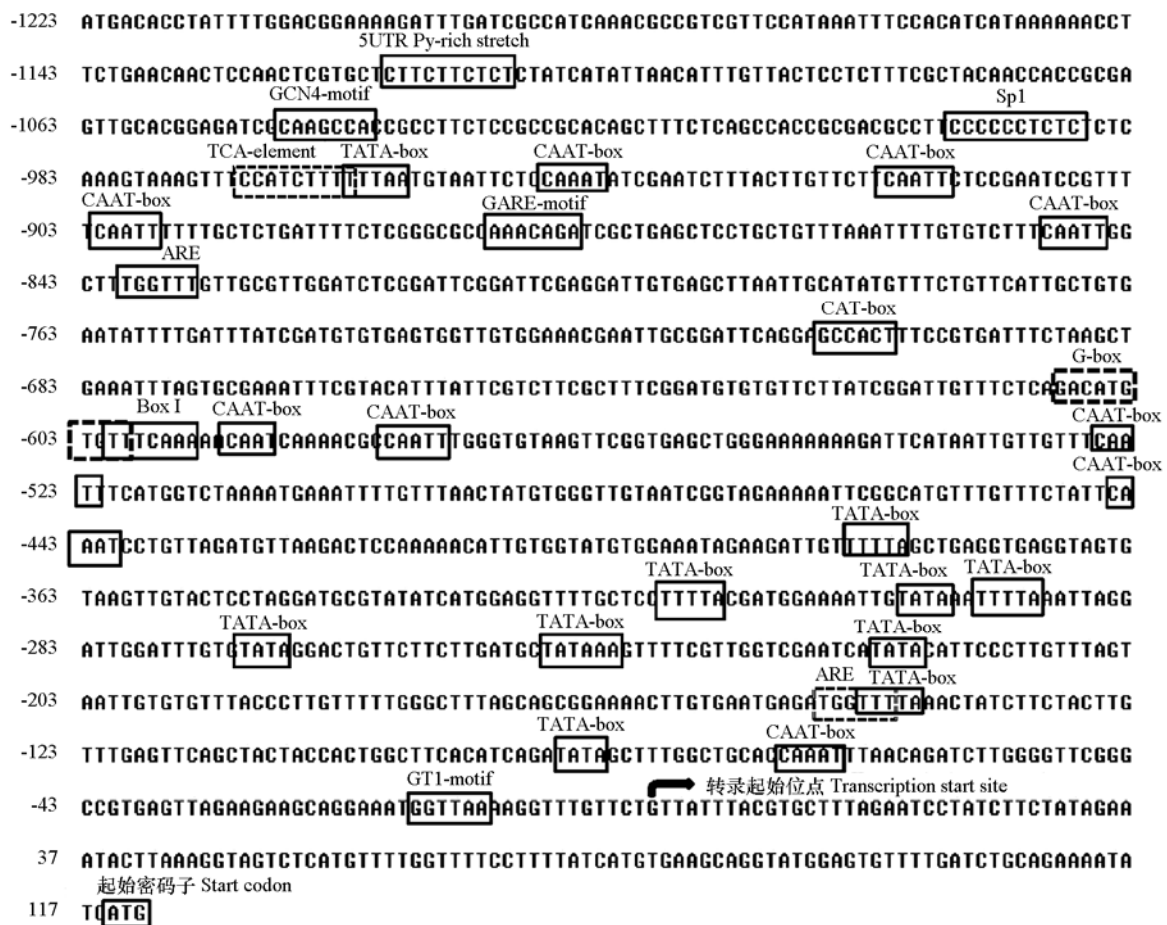


图 5 杜梨 *PbCBL2* 基因启动子序列分析

5'UTR Py-rich stretch: 转录水平顺式作用元件; ARE: 厌氧诱导必需顺式作用元件; Box I: 光敏感元件; CAAT-box: 增强子;

CAT-box: 分生组织表达相关的顺式调控元件; GARE-motif: 赤霉素反应元件; G-box: 光反应顺式作用元件;

GCN4_motif: 在胚乳中表达的顺式调控元件; GT1-motif: 光敏感元件; Sp1: 光敏感元件;

TATA-box: 启动子基本作用元件; TCA-element: 参与水杨酸响应的顺式作用元件。

Fig. 5 Sequence analysis of promoter *PbCBL2* from birch-leaf pear

5'UTR Py-rich stretch: cis-acting element conferring high transcription levels; ARE: cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction; Box I: Light responsive element; CAAT-box: Common cis-acting element in promoter and enhancer regions;

CAT-box: cis-acting regulatory element related to meristem expression; GARE-motif: Gibberellin-responsive element;

G-box: cis-acting regulatory element involved in light responsiveness; GCN4_motif: cis-regulatory element involved in endosperm expression;

GT1-motif: Light responsive element; Sp1: Light responsive element; TATA-box: Core promoter element;

TCA-element: cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness

2.3 胁迫条件下 *PbCBL2* 的表达特点

采用跨内含子引物进行半定量 RT-PCR, 对杜梨 *PbCBL2* 的表达特点进行研究。结果发现: 生长在改良 1/4MS 营养液中的杜梨幼苗根和叶 (对照) 中未能检测到 *PbCBL2* 基因的表达; 施加 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ PEG6000、 $180 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇或 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理后, *PbCBL2* 在杜梨根中的表达先上升后下降, 表达高峰均出现在处理 16 h; 施加 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ PEG6000 或 $180 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇处理后, *PbCBL2* 在杜梨叶中表达量上升, 持续到处处理 24 h; 施加 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 处理后, *PbCBL2* 在杜梨叶中的表达先上升后下降, 表达高峰出现在处理 16 h (图 6)。即 *PbCBL2* 基因在杜梨根和叶中均为诱导型表达, 对盐碱、干旱、渗透胁迫和 ABA 处理均存在转录响应, 表明它参与杜梨对非生物胁迫的防御机制。

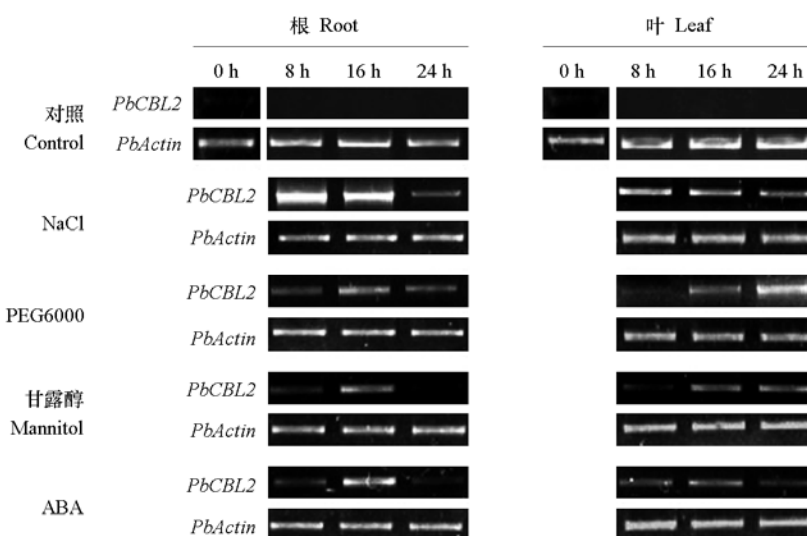


图 6 不同非生物胁迫处理对杜梨幼苗 *PbCBL2* 基因表达的影响

Fig. 6 Effects of different abiotic stresses on expression level in birch-leaf pear seedlings of *PbCBL2* gene

2.4 转 *PbCBL2* 大肠杆菌抗逆能力

采用半定量 RT-PCR 研究转化重组质粒 pET-22b(+)-*PbCBL2* 的大肠杆菌 BL21(DE3)中 *PbCBL2* 的表达情况, 未加 IPTG 诱导时 *PbCBL2* 有表达, 加入 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 3 h 后表达量明显增加, 表明该基因已成功转入 BL21 (DE3) 并能够正常表达。 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl, $1.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇和 $150 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ PEG6000 处理后, *PbCBL2* 的表达量增加 (图 7)。

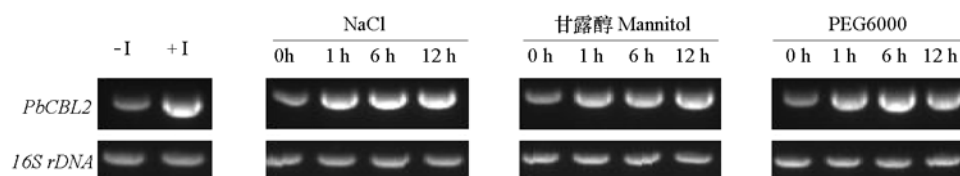


图 7 转 pET-22b(+)-*PbCBL2* 载体的大肠杆菌 BL21 (DE3) 中 *PbCBL2* 表达情况

-I: 未加 IPTG 诱导; +I: $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 3 h。

Fig. 7 *PbCBL2* expression levels in transformed *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) cells with recombinant plasmid pET-22b(+)-*PbCBL2*

-I: Without IPTG induction; +I: 3 hours post-induction with $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG.

与大肠杆菌 BL21 (DE3) 原始菌株相比较, 转 *PbCBL2* BL21 (DE3) 在 LB 液体培养基中的生长情况没有显著变化; 加入 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ NaCl、 $1.00 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘露醇和 $150 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ PEG6000 处理后, BL21 (DE3) 的生长受到显著抑制, 而转 *PbCBL2* BL21 (DE3) 的生长并未受到明显影响, 表明该基因的转入能够提高大肠杆菌 BL21 (DE3) 对盐胁迫和渗透胁迫的耐受能力 (图 8)。

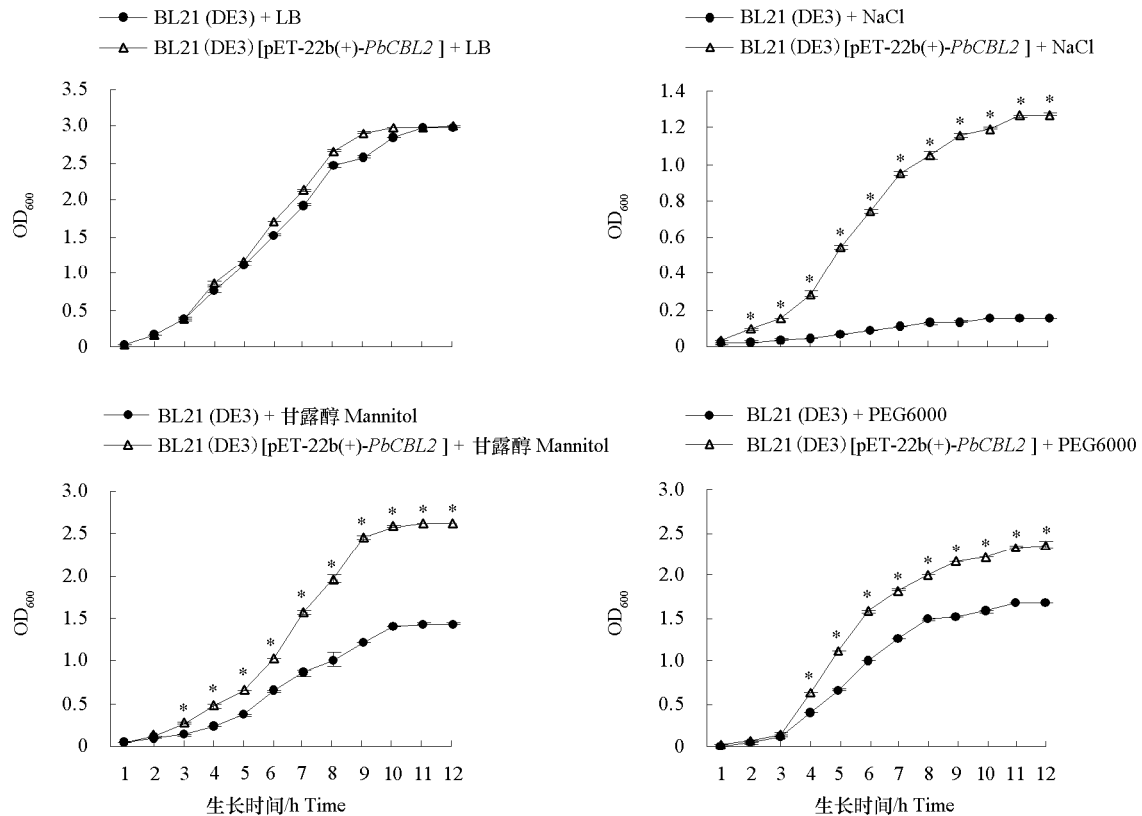


图 8 不同处理下转 *PbCBL2* 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 的生长情况

* 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 8 Effect of salt, monnitol and PEG6000 on the growth of transformed *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) with recombinant plasmid pET-22b(+)-*PbCBL2*

Asterisk means significant difference ($P < 0.05$).

3 讨论

CBLs 基因家族在不同植物中普遍存在, 参与调控植株的生长发育与逆境胁迫响应过程, 但不同物种间 CBLs 同源基因的序列特点、表达模式和具体功能存在差异 (Kolukisaoglu et al., 2004)。比较杜梨 *PbCBL2* (GenBank 登录号为 KC6333132) 与拟南芥 *AtCBL2* (AF076252)、菜豆 *PvCBL2* (AB378095) 所编码蛋白后发现, 它们的氨基酸序列之间有很高的相似性 (分别为 91% 和 93%), 并且它们的 4 个 EF 手型结构只存在 1 个氨基酸的区别 (杜梨为 Arg₁₈₂, 拟南芥和菜豆为 Lys₁₈₂)。基于拟南芥的研究表明, 并不是每个 CBL 蛋白上的所有 EF 手型结构都有结合 Ca^{2+} 的功能 (Batistič & Kudla, 2012)。拟南芥 *AtCBL2* 的 4 个 EF 手型结构域都能够结合钙离子 (Akaboshi et al., 2008), 它的第 4 个 EF 手型结构中第 7 个氨基酸残基 (-Y, Lys₁₈₂) 为结合钙离子的必需位点 (Nagae et al.,

2003; 图 2), 杜梨 *PbCBL2* 编码蛋白中该位点为 Arg, 因此推测它仅能在第 1、2 和 3 个 EF 手型结构区域结合钙离子。

进一步比较 *PbCBL2*、*AtCBL2* 和 *PvCBL2* 的表达模式和生理功能发现, 拟南芥 *AtCBL2* 在植株根和叶中为组成型表达, 光照能诱导其在叶片中上调表达, 该基因负责将钙信号传递给细胞内离子平衡调控中心 V-ATPase, *Cbl2* 突变体和 *AtCBL2* 过量表达植株对低钾敏感 (Nozawa et al., 2001; Tang et al., 2012; Liu et al., 2013); 菜豆 *PvCBL2* 在叶片中为组成型表达, 在种子发育过程中传递 Ca^{2+} 信号 (Hamada et al., 2009); 杜梨 *PbCBL2* (图 6) 在根和叶片中为诱导型表达, NaCl、PEG6000 和甘露醇处理后均表现出转录上调响应, 表明它参与盐胁迫和渗透胁迫下的转录调控, 而 *PbCBL2* 的转入, 能够提高大肠杆菌对盐胁迫和渗透胁迫的耐受能力 (图 8), 初步表明该基因参与杜梨盐胁迫和渗透胁迫过程中的 Ca^{2+} 信号转导, 这一特性与其它植物 *CBL2* 同源基因功能有所差别, 为首次报道植物 *CBL2* 基因在盐胁迫和渗透胁迫情况下起作用。目前 *PbCBL2* 的转基因工作正在进行, 以期进一步明确该基因的具体功能。结合 *PbCBL2*、*AtCBL2* 和 *PvCBL2* 的氨基酸组成比较结果, 推测可能由于 *PbCBL2* 第 4 个 EF 手型结构域中第 7 个氨基酸残基 (-Y) 的点突变 (拟南芥 *AtCBL2* 和菜豆 *PvCBL2* 为 LyS_{182} , *PbCBL2* 为 Arg_{182}), 导致该基因的功能与 *AtCBL2* 和 *PvCBL2* 有所差异, 但是这一观点需要氨基酸点突变试验结果的支持。

Ca^{2+} 在质膜和液泡膜中的流动对 ABA 介导的气孔关闭来说非常重要, 它依赖于不同的 ABA 浓度来调节 (MacRobbie, 2000)。拟南芥 *Cbl2* 突变体的研究表明, *CBL2* 作为第一个响应的 Ca^{2+} 传感器, 负责转导 ABA 所诱导的液泡 Ca^{2+} 信号 (Batistič et al., 2012)。杜梨 *PbCBL2* 的表达受到 ABA 诱导上调 (图 6), 表明 *PbCBL2* 所介导的钙信号传导途径可能为 ABA 依赖的调控方式, 但 *PbCBL2* 的具体作用仍需通过转基因试验来加以证实。

总之, 本研究中成功分离了杜梨类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白基因家族成员 *PbCBL2*, 该基因具备植物 *CBLs* 基因家族的固有特征, 它可能在植株响应非生物胁迫过程起重要作用, 其表达受 ABA 调控, 这为进一步通过基因工程技术验证其功能, 进而从分子水平上揭示杜梨抗逆机理提供工作基础与理论依据。

References

- Akaboshi M, Hashimoto H, Ishida H, Saijo S, Koizumi N, Sato M, Shimizu T. 2008. The crystal structure of plant-specific calcium-binding protein AtCBL2 in complex with the regulatory domain of AtCIPK14. *Journal of Molecular Biology*, 377: 246 – 257.
- Albrecht V, Weinl S, Blazevic D, D'Angelo C, Batistic O, Kolukisaoglu U, Bock R, Schulz B, Harter K, Kudla J. 2003. The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *The Plant Journal*, 36: 457 – 470.
- Batistič O, Kudla J. 2009. Plant calcineurin B-like proteins and their interacting protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1793: 985 – 992.
- Batistič O, Kudla J. 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1820: 1283 – 1293.
- Batistič O, Reher M, Akerman A, Schlücking K, Steinhorst L, Yalovsky S, Kudla J. 2012. S-acylation-dependent association of the calcium sensor CBL2 with the vacuolar membrane is essential for proper abscisic acid responses. *Cell Research*, 22 (7): 1155 – 1168.
- Chaurasia N, Mishra Y, Rai L C. 2008. Cloning expression and analysis of phytochelatin synthase (pcs) gene from *Anabaena* sp. PCC 7120 offering multiple stress tolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376: 225 – 230.
- Chen L, Ren F, Zhou L, Wang Q Q, Zhong H, Li X B. 2012. The *Brassica napus* calcineurin B-Like 1/CBL-interacting protein kinase 6 (CBL1/CIPK6) component is involved in the plant response to abiotic stress and ABA signalling. *Journal of Experimental Botany*, 63: 6211 – 6222.
- Cheong Y H, Kim K N, Pandey G K, Gupta R, Grant J J, Luan S. 2003. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15: 1833 – 1845.

- Cheong Y H, Sung S J, Kim B G, Pandey G K, Cho J S, Kim K N, Luan S. 2010. Constitutive overexpression of the calcium sensor CBL5 confers osmotic or drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells*, 29: 159 – 165.
- Gong D, Guo Y, Schumaker K S, Zhu J K. 2004. The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134: 919 – 926.
- Hamada S, Seiki Y, Watanabe K, Ozeki T, Matsui H, Ito H. 2009. Expression and interaction of the CBLs and CIPKs from immature seeds of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytochemistry*, 70: 501 – 507.
- Kim B G, Waadt R, Cheong Y H, Pandey G K, Dominguez-Solis J R, Schültke S, Lee S C, Kudla J, Luan S. 2007. The calcium sensor CBL10 mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 52: 473 – 484.
- Kolkisaoglu U, Weinl S, Blazevic D, Blazevic D, Batistic O, Kudla J. 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology*, 134: 43 – 58.
- Li D D, Song S Y, Xia X L, Yin W L. 2012a. Two CBL genes from *Populus euphratica* confer multiple stress tolerance in transgenic triploid white poplar. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 109: 477 – 489.
- Li Hui, Cong Yu, Chang You-hong, Lin Jing, Sheng Bao-long. 2012. Cloning and expression characteristics of a calcineurin B-like protein gene (*PbCBL10*) from *Pyrus betulaefolia*. *Journal of Fruit Science*, 29 (4): 550 – 556. (in Chinese)
- 李 慧, 丛 郁, 常有宏, 蔺 经, 盛宝龙. 2012. 杜梨类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 *PbCBL10* 基因的克隆和表达特性研究. *果树学报*, 29 (4): 550 – 556.
- Li Z Y, Xu Z S, He G Y, Yang G X, Chen M, Li L C, Ma Y Z. 2012b. Overexpression of soybean *GmCBL1* enhances abiotic stress tolerance and promotes hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427: 731 – 736.
- Liu L L, Ren H M, Chen L Q, Wang Y, Wu W H. 2013. A protein kinase, calcineurin B-like protein-interacting protein kinase9, interacts with calcium sensor calcineurin B-like protein3 and regulates potassium homeostasis under low-potassium stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161: 266 – 277.
- Luan S. 2009. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends in Plant Science*, 14: 37 – 42.
- MacRobbie E A. 2000. ABA activates multiple Ca^{2+} fluxes in stomatal guard cells, triggering vacuolar K^+ (Rb^+) release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 12361 – 12368.
- Matsumoto K, Chun J P, Tamura F, Kamamoto Y, Tanabe K. 2006. Salt tolerance in *Pyrus* species is linked to levels of Na and Cl translocation from roots to leaves. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75: 385 – 391.
- Matsumoto K, Tamura F, Chun J P, Ikeda T, Imanishi K, Tanabe K. 2007. Enhancement in salt tolerance of Japanese pear by using *Pyrus betulaefolia* rootstock. *Horticultural Research (Japan)*, 6: 47 – 52.
- Nagae M, Nozawa A, Koizumi N, Sano H, Hashimoto H, Sato M, Shimizu T. 2003. The crystal structure of the novel calcium-binding protein *AtCBL2* from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 42240 – 42246.
- Nozawa A, Koizumi N, Sano H. 2001. An *Arabidopsis* SNF1-related protein kinase, AtSR1, interacts with a calcium-binding protein, AtCBL2, of which transcripts respond to light. *Plant & Cell Physiology*, 42 (9): 976 – 981.
- Okubo M, Furukawa Y, Sakuratani T. 2000. Growth, flowering and leaf properties of pear cultivars grafted on two Asian pear rootstock seedlings under NaCl irrigation. *Scientia Horticulturae*, 85: 91 – 101.
- Okubo M, Sakuratani T. 2000. Effects of sodium chloride on survival and stem elongation of two Asian pear rootstock seedlings. *Scientia Horticulturae*, 85: 85 – 90.
- Quan R, Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y, Shang M, Chen S, Pardo J M, Guo Y. 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect *Arabidopsis* shoots from salt stress. *The Plant Cell*, 19: 1415 – 1431.
- Reese M G. 2001. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers and Chemistry*, 26: 51 – 56.
- Tang R J, Liu H, Yang Y, Yang L, Gao X S, Garcia V J, Luan S, Zhang H X. 2012. Tonoplast calcium sensors CBL2 and CBL3 control plant growth and ion homeostasis through regulating V-ATPase activity in *Arabidopsis*. *Cell Research*, 22: 1650 – 1665.
- Weinl S, Kudla J. 2009. The CBL-CIPK Ca^{2+} -decoding signaling network: Function and perspectives. *New Phytologist*, 184: 517 – 528.