

小麦 *GzCIPK7-5B* 基因的生物信息学及表达分析

赵鹏鹏 李鲁华 任明见 安畅 洪鼎立 李欣 徐如宏

(贵州大学农学院/国家小麦改良中心贵州分中心, 550025, 贵州贵阳)

摘要 CIPK 是植物钙感受器钙调磷酸酶 B 类似蛋白特定靶向的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在钙离子信号转运中起到重要作用。为探究 *GzCIPK7-5B* 基因在小麦中的功能, 利用 RT-PCR 方法从小麦品种贵紫麦 1 号中克隆得到 *GzCIPK7-5B* 基因, 进行生物信息学分析。用 RT-PCR 检测 *GzCIPK7-5B* 基因在贵紫麦 1 号不同组织(根、茎、叶、籽粒)中的表达情况。运用 qRT-PCR 检测 *GzCIPK7-5B* 在籽粒 3 个时期(花后 10、25、35d)的表达水平。结果表明, *GzCIPK7-5B* 基因的开放阅读框为 1296bp, 编码 431 个氨基酸, 蛋白含有丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶家族保守结构域, 具有 CIPKs 家族基因的特征。其编码的蛋白含有 29 个磷酸化位点, 无跨膜结构, 是一种无信号肽的不稳定亲水性核蛋白。*GzCIPK7-5B* 基因与野生二粒小麦的 *TdCIPK7-5B* 序列相似度最高, 蛋白序列同源性为 100%, 在根、茎、叶和籽粒中均有表达, 在贵紫麦 1 号籽粒花青素合成 3 个重要时期(花后 10、25、35d), 花后 25 和 35d 的表达水平显著高于花后 10d。

关键词 小麦; *GzCIPK7-5B* 基因; RT-PCR 克隆; 生物信息学; 基因表达

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 是我国重要的粮食作物之一, 在其生长发育过程中, 会遭遇各种非生物胁迫, 进而严重影响产量与品质。钙调磷酸酶 B 类似蛋白互作蛋白激酶 (CBL-interacting protein kinase, CIPKs) 是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 能与钙离子感受器——钙调磷酸酶 B 样蛋白 (calcineurin B-like protein, CBL) 相互作用, 形成复杂的信号传递系统/网络^[1]及响应干旱^[2]、高温^[3]、低温^[4]和盐^[5]等多种非生物胁迫以及应答激素信号^[6-7]。

许多植物中都发现 CIPKs 家族基因, 如水稻、拟南芥、大麦、玉米、小麦和豌豆等^[8-9]。研究^[2]表明, 在非生物胁迫响应方面, 小麦 *TaCIPK2*、*TaCIPK27* 和 *TaCIPK23* 基因在拟南芥中异源过表达, 可增强转基因植株的耐旱性。*ZmCIPKHT* 基因的表达受高温胁迫的显著诱导, 该基因的拟南芥过表达株系对高温胁迫表现出耐受性^[3]。*CIPK7* 在拟南芥中与冷诱导的 *CBL1* 相互作用, 在冷反应中发挥作用, 提升了拟南芥在冷胁迫中的耐受性^[10]。*CIPK24* 在拟南芥中过量表达提高了植物对 Na^+ 的耐受能力^[11]。而 *OsCIPK03*、*OsCIPK12* 和 *OsCIPK15* 在水稻中过量表达可提高转基因植株的耐寒、耐旱

和耐盐能力^[12]。*TaCIPK25* 过表达增强了小麦对盐胁迫的敏感性^[13]。在植物对矿质营养吸收及植物生长方面, 有研究^[14]表明, *AtCIPK23* 在拟南芥中通过影响铁螯合还原酶活性参与铁的获取。*CIPK18* 在 *NHX5* 和 *NHX6* 介导拟南芥 Li^+ 稳态中起重要作用, 且协同控制幼苗生长^[15]。此外, 有研究^[16]发现, 高浓度的蔗糖载体能够结合到 *UFGT1* 的特异位点抑制其活性, 从而抑制草莓花青素的合成, 而钙/钙调蛋白能够特异地结合到 *UFGT1* 与域间链接器部分重叠的位点, 进而显著缓解底物的抑制作用。拟南芥中钙调蛋白结合蛋白 *CBP60g* 也能够通过负调控花青素合成的结构基因 (*CHS*、*CHI* 和 *DFR*) 及调控基因 (如 *PAP1*) 抑制蔗糖诱导的花青素积累^[17]。可知, 钙离子信号通路蛋白能够通过调控蔗糖途径参与花青素合成的生物学过程。

目前, 在紫粒小麦花青素合成途径的结构基因方面取得了较好的研究基础, 然而由于小麦基因存在于不同染色体的多拷贝以及多转录本等现象, 关于其他途径如钙离子信号途径和植物激素信号途径等相关基因调控花青素合成的研究较少。CIPKs 家族是钙离子信号途径中重要的蛋白家族, 且 *GzCIPK7-5B* 基因在影响小麦籽粒花青素的相关

作者简介: 赵鹏鹏, 研究方向为作物遗传育种, E-mail: 920848894@qq.com

徐如宏为通信作者, 主要从事小麦遗传育种研究工作, E-mail: xrhgz@163.com

基金项目: 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2021]一般 272); 贵州省科技厅成果推广计划(黔科合成果[2019]4246 号); 贵州省科技计划(黔科合基础[2020]1Z018 号); 国家自然科学基金(31660390)

收稿日期: 2022-03-04; 修回日期: 2022-05-06; 网络出版日期: 2023-03-31

研究鲜有报道。因此，本研究以特色小麦品种贵紫麦 1 号为试验材料，使用 RT-PCR 克隆获得 *GzCIPK7-5B* 基因，进行生物信息学分析以及实时荧光定量验证分析，为 *GzCIPK7-5B* 基因的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验以特色小麦品种贵紫麦 1 号（*Triticum aestivum* L. cv. Guizi 1，GZ1，审定编号为黔麦

2015003）为材料，种植于贵州大学农学院，取 15d 苗龄的根、茎、叶以及花后 10、25、35d 的籽粒为样品。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 从前期转录组数据库中筛选出 *GzCIPK7-5B* 基因，根据基因登录号从 Ensembl Plants 数据库中下载目的基因核苷酸序列，使用 Primer 5.0 设计特异性引物（表 1），用于 *GzCIPK7-5B* 基因扩增、RT-PCR 和荧光定量 PCR，引物由生物工程（上海）股份有限公司合成。

表 1 试验所使用的特异性引物
Table 1 Primers used in the experiment

| 引物名称 Name of primer | 引物序列 Sequence of primer | 用途 Usage |
|---------------------|--------------------------------------|------------------|
| CIPK7-5B-F | CC <u>TCTAG</u> AATGGCCGTCGCCAAGAGCA | 基因克隆 |
| CIPK7-5B-R | CCCCCGGGTCACAATTCCTCGCATCCATGCCAC | 基因克隆 |
| CIPK7-5B-F | CGTCTTCCTCCAGCTCGTCTCC | qRT-PCR 和 RT-PCR |
| CIPK7-5B-R | GATGAGGACGTTCTGCGGCTTG | qRT-PCR 和 RT-PCR |
| Actin-F | CCAAGGCGGAGTACGATGAGTCT | qRT-PCR 和 RT-PCR |
| Actin-R | TTCATACAGCAGGCAAGCACCAT | qRT-PCR 和 RT-PCR |

下划线部分为酶切位点
The underlined part is the enzyme digestion site

1.2.2 总 RNA 提取与 cDNA 的合成 选取生长一致的 15d 苗龄幼苗，利用植物总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技（北京）有限公司]提取总 RNA。分别用紫外分光光度计以及 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和质量。选取可用的 RNA 使用试剂盒（FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix，天根）进行反转录，获得根、茎、叶、籽粒 cDNA。

1.2.3 *GzCIPK7-5B* 基因的克隆 以贵紫麦 1 号 15d 苗龄叶片 cDNA 为模板，使用超保真 DNA 聚合酶对该基因进行 PCR 扩增，50μL PCR 反应体系为 2×Phanta 最大缓冲液 25μL、dNTP 混合物 1μL、上、下游引物各 2μL、超保真 DNA 聚合酶 1μL、DNA 模板 1.5μL、ddH₂O 17.5μL。扩增程序为预变性 95℃ 3min；变性 95℃ 15s，退火 61℃ 15s，延伸 72℃ 120s，循环 34 次；修复延伸 72℃ 10min，于 4℃ 保存。产物用 1%琼脂糖凝胶电泳，条件为 80V/cm 电压，稳定 10min 后，再升高电压到 120V/cm 40min，得到目的条带。将目的基因的 PCR 产物送北京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.4 生物信息学分析 使用在线软件对 *GzCIPK7-5B* 基因进行生物信息学分析，包括氨基酸多重序列比对、进化树构建、蛋白的理化参数分析、磷酸化位点和亚细胞定位预测、蛋白质结构与

功能预测，具体见表 2。

表 2 生物信息学分析软件及用途
Table 2 Softwares and usage of biological information analysis

| 在线软件 Online software | 用途 Usage |
|---|----------|
| http://web.expasy.org/prot_param/ | 蛋白的理化性质 |
| https://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/ | 信号肽预测 |
| https://web.expasy.org/protscale/ | 亲疏水性预测 |
| https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi | 保守结构域预测 |
| http://www.cbs.dtu.dk/services/ | 磷酸化位点预测 |
| https://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/ | 亚细胞定位预测 |
| https://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/ | 二级结构预测 |
| https://swissmodel.expasy.org/ | 三级结构预测 |
| MAGE 7.0 | 进化树构建 |
| DNAMAN 8.0 | 多重序列比对 |

1.2.5 表达谱分析 选用贵紫麦 1 号 15d 幼苗的根、茎、叶和花后 10d 时籽粒的 cDNA，用特异性引物（表 1）进行 RT-PCR 检测 *GzCIPK7-5B* 在各组织的表达情况。以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 检测。PCR 反应体系包括 DNA 模板 1μL、ddH₂O 4.5μL、2×*Taq* PCR 混合物II 12.5μL、上游引物（10μmol/L）1μL、下游引物（10μmol/L）1μL，总体积 20μL。PCR 反应条件为 94℃ 5min；94℃ 30s，41.5℃ 30s，72℃ 1min 34 个循环；72℃ 5min；

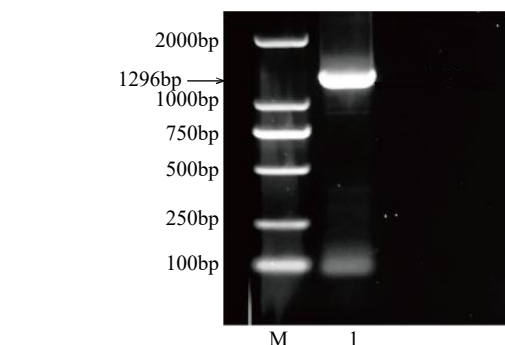
4℃进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 *GzCIPK7-5B* 在贵紫麦 1 号花青素合成重要时期相对表达量 选用贵紫麦 1 号花后 10、25、35d 时的籽粒 cDNA, 用特异性引物 (表 1) 及 qRT-PCR 检测花后 10、25、35d 时籽粒中 *GzCIPK7-5B* 表达情况与趋势。反应体系为 cDNA 1μL、2×Talent qPCR 预混物 (荧光染料掺入法) 10μL、ddH₂O 7.8μL、上游引物 (10μmol/L) 0.6μL、下游引物 (10μmol/L) 0.6μL, 总体积 20μL。反应条件为 95℃ 预变性 2min; 95℃变性 15s, 41.5℃退火 30s, 72℃ 延伸 20s, 40 个循环, 每个待测样设置 3 个重复。以 Actin 为内参基因, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因表达量。

2 结果与分析

2.1 *GzCIPK7-5B* 基因的克隆

以贵紫麦 1 号 15d 苗龄叶的 cDNA 为模板, 利用特异性引物进行 PCR 扩增 (表 1), 凝胶电泳检测 (图 1) 显示, *GzCIPK7-5B* 基因 (Genebank 登录号为 TraesCS5B02G381500) 在 1296bp 有明显的条带。符合目的基因序列的长度。测序结果表明, 扩增出来的基因序列与 *TaCIPK7-5B* 一致, 将其命名为 *GzCIPK7-5B*。



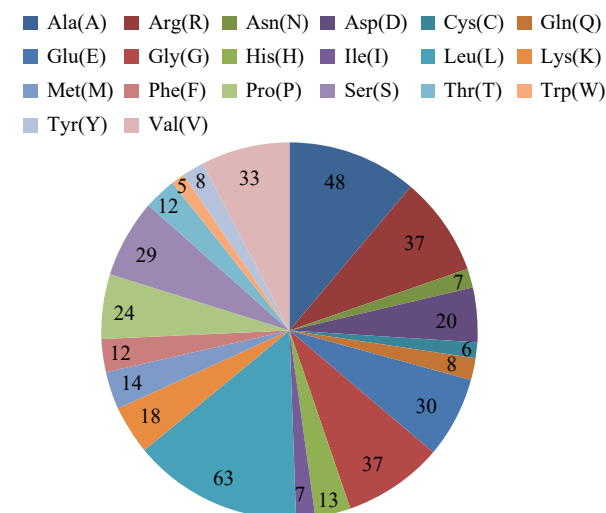
M: DL2000; 1: PCR 产物
M: DL2000; 1: PCR product

图 1 *GzCIPK7-5B* 的 PCR 扩增电泳图
Fig.1 PCR amplification and electrophoresis of *GzCIPK7-5B* gene

2.2 *GzCIPK7-5B* 编码蛋白理化性质分析与亚细胞定位预测

利用在线工具 ExPASy-ProtParam 对蛋白的理化性质进行分析。图 2 显示, 该蛋白的分子式为 C₂₀₈₇H₃₃₇₀N₆₀₆O₅₉₆S₂₀, 等电点 (pI) 为 8.82, 总原子数为 6679, 分子量为 47 128.62, 带负电荷的氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 50, 带正电荷的氨基

酸残基总数 (Arg+Lys) 为 55。其编码的氨基酸数量为 431 个, 其中亮氨酸含量最高, 为 63 个, 占氨基酸总数的 14.6%, 脂肪指数为 96.68, 不稳定系数为 53.83, 表明此蛋白为不稳定性蛋白。



Ala: 丙氨酸; Arg: 精氨酸; Asn: 天冬酰胺; Asp: 天冬氨酸; Cys: 半胱氨酸; Gln: 谷氨酰胺; Glu: 谷氨酸; Gly: 甘氨酸; His: 组氨酸; Ile: 异亮氨酸; Leu: 亮氨酸; Lys: 赖氨酸; Met: 蛋氨酸; Phe: 苯丙氨酸; Pro: 脯氨酸; Ser: 丝氨酸; Thr: 苏氨酸; Trp: 色氨酸; Tyr: 酪氨酸; Val: 缬氨酸
Ala: Alanine; Arg: Arginine; Asn: Asparagine; Asp: Aspartic acid; Cys: Cysteine; Gln: Glutamic acid; Glu: Glutamic acid; Gly: Glycine; His: Histidine; Ile: Isoleucine; Leu: Leucine; Lys: Lysine; Met: Methionine; Phe: Phenylalanine; Pro: Proline; Ser: Serine; Thr: Threonine; Trp: Tryptophan; Tyr: Tyrosine; Val: Valine

图 2 *GzCIPK7-5B* 的氨基酸组成

Fig.2 Amino acid composition of *GzCIPK7-5B*

利用 Cell-PLoc2.0 进行亚细胞定位预测分析, 分析结果显示该蛋白定位在细胞核。

2.3 *GzCIPK7-5B* 编码蛋白功能结构域、信号肽与亲疏水性分析

在 NCBI 中利用 CD search 对编码的蛋白进行保守结构域预测, 结果 (图 3) 显示, 该蛋白含有丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶家族保守结构域, 分别是丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶区和 CBL 结合区即 NAF 结构域, 同时还具有 ATP 结合区, 具有 CIPK 家族基因的特征。

利用 SignalP 5.0 Server 与 SignalP 3.0 Server 进行蛋白质信号肽分析。SignalP 5.0 Server 结果 (图 4) 显示, 编码蛋白具有信号肽的可能性为 0.0007, 推测该蛋白无信号肽; SignalP 3.0 Server 结果显示, 基因编码的蛋白为非分泌蛋白 (*D* 值为 0.14)。

通过在线工具 ProtScale 预测编码蛋白的亲疏水性, 分析结果 (图 5) 显示, 该蛋白第 213 个氨

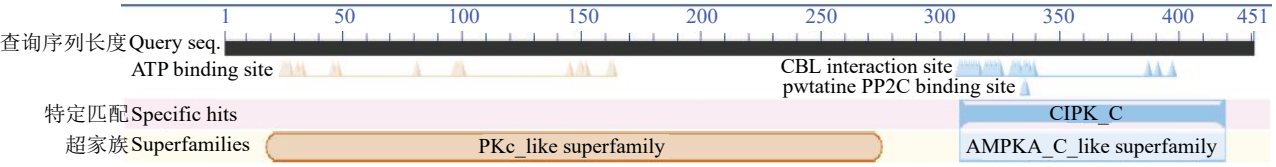


图 3 GzCIPK7-5B 的保守结构域预测
Fig.3 Prediction of amino acid conservative domain in GzCIPK7-5B

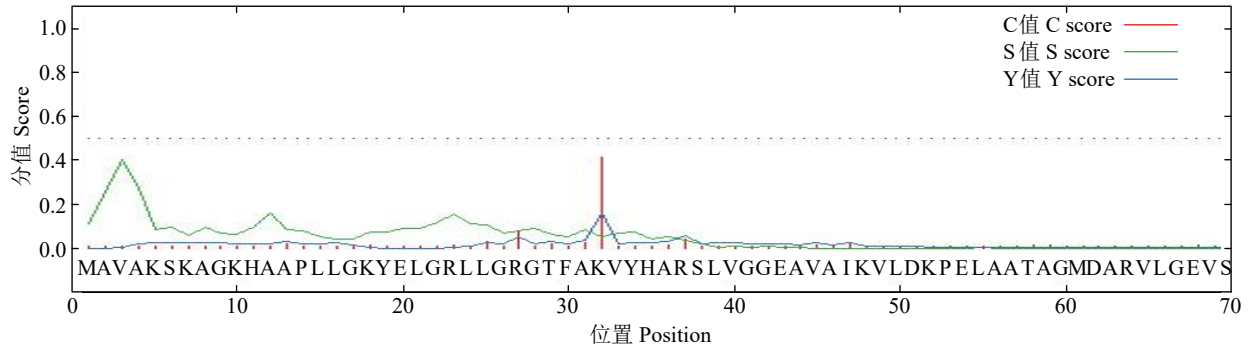


图 4 GzCIPK7-5B 蛋白信号肽预测
Fig.4 Prediction of signal peptide of GzCIPK7-5B protein

基酸表现最大疏水性，为 2.79，第 331 个氨基酸表现最大亲水性，为-3.69，亲水平均系数为-0.08，小于 0，故推测编码蛋白为亲水性蛋白。

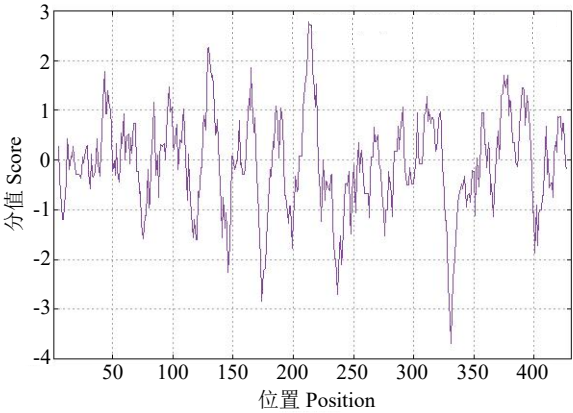


图 5 GzCIPK7-5B 蛋白亲疏水性预测
Fig.5 Prediction of affinity and hydrophobicity of GzCIPK7-5B protein

2.4 GzCIPK7-5B 编码蛋白跨膜结构域及磷酸化位点预测

利用工具 TMHMM 和 NetPhos 3.1Server 对蛋白质序列进行跨膜结构域预测（图 6），发现此蛋白质无明显的跨膜区域，说明该蛋白不具有转运蛋白相关功能的基础结构。

磷酸化位点分析结果（图 7）显示，此蛋白有 29 个磷酸化位点，其中丝氨酸（Serine）21 个、苏氨酸（Threonine）7 个、酪氨酸（Tyrosine）1 个。其中最有可能的潜在磷酸化位点是第 142、172、

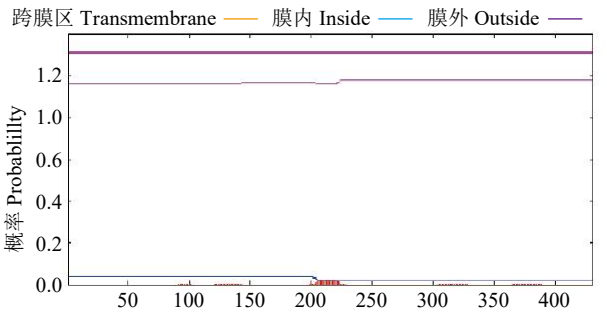


图 6 GzCIPK7-5B 蛋白跨膜结构预测
Fig.6 Prediction of transmembrane structure of GzCIPK7-5B protein

282、331、341 和 381 位的丝氨酸，它们的值均高于 0.95，远远超过标准值（0.5），同时这一结果也表明，编码的蛋白可能通过调控相应位点的磷酸化来实现其功能。

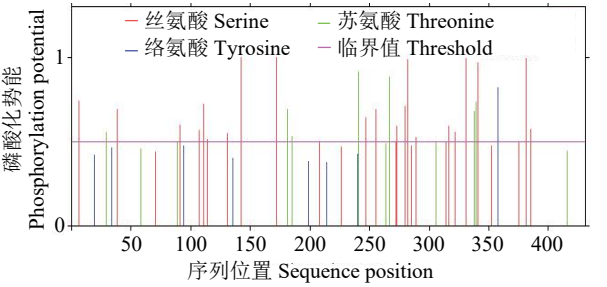


图 7 GzCIPK7-5B 蛋白磷酸化位点预测
Fig.7 Prediction of phosphorylation site of GzCIPK7-5B protein

2.5 GzCIPK7-5B 编码蛋白二、三级结构预测分析

利用 SOPMA 在线网站分析编码蛋白的二级结构（图 8）发现，该蛋白由α-螺旋（有 155 个氨基酸，

占 35.96%)、无规则卷曲 (有 155 个氨基酸, 占 35.96%)、延伸链 (有 81 个氨基酸, 占 18.80%) 和 β -转角 (有 40 个氨基酸, 占 9.28%) 二级结构组成。

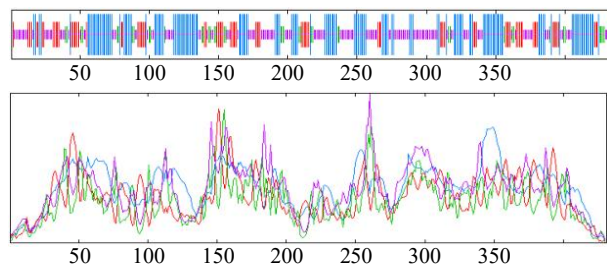


图 8 *GzCIPK7-5B* 蛋白二级结构预测

Fig.8 Prediction of secondary structure of *GzCIPK7-5B* protein

使用 SWISS-MODEL 进行三级结构预测, 结果 (图 9) 显示, 该蛋白三级结构由 1 个 PDB 号为 6c9d.1.A 的结构为模板建立, 6c9d.1.A 属于 KA1 自抑制 MARK1 激酶 (丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶) 的晶体结构, 序列一致性为 31.34%。推测蛋白可能参与相关激酶的合成。

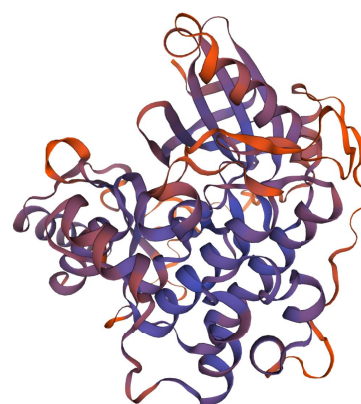


图 9 *GzCIPK7-5B* 蛋白三级结构预测

Fig.9 Prediction of tertiary structure of *GzCIPK7-5B* protein

2.6 *GzCIPK7-5B* 基因进化树分析与同源氨基酸序列比对

在 NCBI 数据库中获取野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 等 15 个物种的 CIPK 家族蛋白基因, 利用 MEGA7.0 进行同源性聚类分析, 构建系统进化树, 结果 (图 10) 显示, *GzCIPK7-5B* 基因与野生二粒小麦 *TdCIPK7-5B*、*AtCIPK7-5D*、*TdCIPK7-5A* 和 *TaCIPK7*

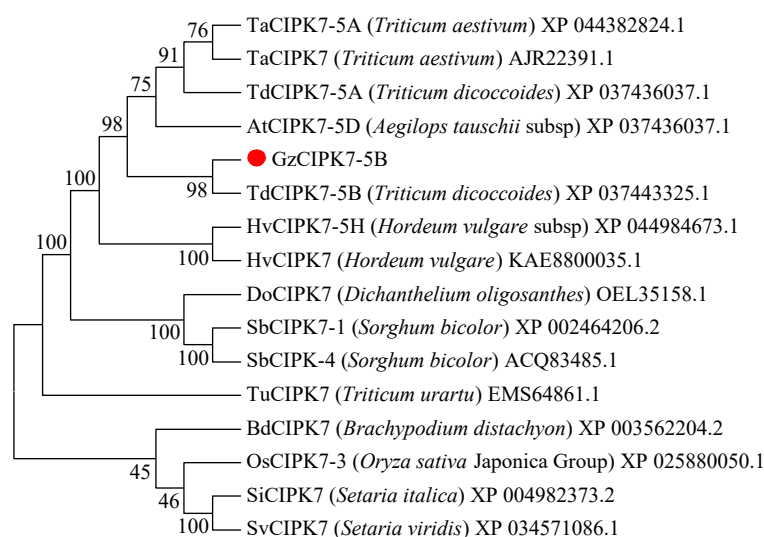


图 10 *GzCIPK7-5B* 基因的进化树分析

Fig.10 Phylogenetic tree analysis of *GzCIPK7-5B* gene

同源性较高。利用 DNAMAN 将 *GzCIPK7-5B* 与野生二粒小麦 *TdCIPK7-5B*、节节麦 *AtCIPK7-5D*、野生二粒小麦 *TdCIPK7-5A*、小麦 *TaCIPK7* 和小麦 *TaCIPK7-5A* 基因的蛋白质序列进行同源性序列比对, 结果 (图 11) 显示, 它们的同源性分别为 100.00%、99.07%、98.84%、98.61% 和 98.61%。综合多重序列比对和系统进化树分析, 可知 *GzCIPK7-5B* 在小麦中相对保守, 与野生二粒小麦

的 *TdCIPK7-5B* 在生物学功能上更为接近。

2.7 *GzCIPK7-5B* 基因的表达谱分析

为了分析 *GzCIPK7-5B* 在贵紫麦 1 号不同组织中的表达, 取 15d 苗龄幼苗的根、茎、叶以及花后 10d 时的籽粒为样品, 以 cDNA 为模板, Actin 为内参基因, 进行 RT-PCR 检测。结果 (图 12) 显示, *GzCIPK7-5B* 在贵紫麦 1 号的根、茎、叶、籽粒中均有表达, 叶与根中表达量高于茎和籽粒。

| | | |
|------------|--|-----|
| GzCIPK7-5B | MAVAKSKAGKHAAPLLGKYELGRLLGRGTFAKVYHARSLVGGEAVA1KVLDKPELAATAGMDARVLGEVSAAMRRLRHPNV | 80 |
| TdCIPK7-5B | MAVAKSKAGKHAAPLLGKYELGRLLGRGTFAKVYHARSLVGGEAVA1KVLDKPELAATAGMDARVLGEVSAAMRRLRHPNV | 80 |
| AtCIPK7-5B | MAVAKSKAGKHAAPLLGKYELGRLLGRGTFAKVYHARSLVGGEAVA1KVLDKPELAATAGMDARVLGEVSAAMRRLRHPNV | 80 |
| TdCIPK7-5A | MAVAKSKAGKHAAPLLGKYELGRLLGRGTFAKVYHARSLVGGEAVA1KVLDKPELAATAGMDARVLGEVSAAMRRLRHPNV | 80 |
| TaCIPK7-5A | MAVAKSKAGKHAAPLLGKYELGRLLGRGTFAKVYHARSLVGGEAVA1KVLDKPELAATAGMDARVLGEVSAAMRRLRHPNV | 80 |
| TaCIPK7 | MAVAKSKAGKHAAPLLGKYELGRLLGRGTFAKVYHARSLVGGEAVA1KVLDKPELAATAGMDARVLGEVSAAMRRLRHPNV | 80 |
| Consensus | mavakskagkhaapllgkyelgrllgrgtfakvyharslvggeavaikvldkpelaatagmdarvlgevsamrrlrhpnv | |
| GzCIPK7-5B | LRLHEVLATRSKVYLVMELAPGGDLLSRLASLPSSRLPEHAARRVFLQVLSALIYCHARGVSHRDVVKPQNVLIADGNLK | 160 |
| TdCIPK7-5B | LRLHEVLATRSKVYLVMELAPGGDLLSRLASLPSSRLPEHAARRVFLQVLSALIYCHARGVSHRDVVKPQNVLIADGNLK | 160 |
| AtCIPK7-5B | LRLHEVLATRSKVYLVMELAPGGDLLSRLASLPSSRLPEHAARRVFLQVLSALIYCHARGVSHRDVVKPQNVLIADGNLK | 160 |
| TdCIPK7-5A | LRLHEVLATRSKVYLVMELAPGGDLLSRLAALPKRRLPEHAARRVFLQVLSALIYCHARGVSHRDVVKPQNVLIADGNLK | 160 |
| TaCIPK7-5A | LRLHEVLATRSKVYLVMELAPGGDLLSRLAALPKRRLPEHAARRVFLQVLSALIYCHARGVSHRDVVKPQNVLIADGNLK | 160 |
| TaCIPK7 | LRLHEVLATRSKVYLVMELAPGGDLLSRLAALPKRRLPEHAARRVFLQVLSALIYCHARGVSHRDVVKPQNVLIADGNLK | 160 |
| Consensus | lrlhevlattrskvylvmelapggdllsrla lp rrlpehaarrvflqlvsaliychargvshrdvvpqnvliadgnlk | |
| GzCIPK7-5B | VCDFGLAALPESHRRDGRLLHTACGTPAFAAPEVLRKAYDGVKADAWSCGVI LYVLLAGRLPFDDSNIAEMCKAHRREY | 240 |
| TdCIPK7-5B | VCDFGLAALPESHRRDGRLLHTACGTPAFAAPEVLRKAYDGVKADAWSCGVI LYVLLAGRLPFDDSNIAEMCKAHRREY | 240 |
| AtCIPK7-5B | VCDFGLAALPESHRRDGRLLHTACGTPAFAAPEVLRKAYDGVKADAWSCGVI LYVLLAGRLPFDDSNIAEMCKAHRREY | 240 |
| TdCIPK7-5A | VCDFGLAALPESHRRDGRLLHTACGTPAFAAPEVLRKAYDGVKADAWSCGVI LYVLLAGRLPFDDSNIAEMCKAHRREY | 240 |
| TaCIPK7-5A | VCDFGLAALPESHRRDGRLLHTACGTPAFAAPEVLRKAYDGVKADAWSCGVI LYVLLAGRLPFDDSNIAEMCKAHRREY | 240 |
| TaCIPK7 | VCDFGLAALPESHRRDGRLLHTACGTPAFAAPEVLRKAYDGVKADAWSCGVI LYVLLAGRLPFDDSNIAEMCKAHRREY | 240 |
| Consensus | vedf glaalpeshrrdgrllhtacgt pafaapevlrrkaydgvk adawscgvi lyvllagrlpfddsniaemckahrrey | |
| GzCIPK7-5B | TLPEWSQPARRLVSRLLDPNPATRLTVAELSSHPWFKRSLSDSOLGSLGGAPERDLLFQAPPPTLNAFDIISMS PGLD | 320 |
| TdCIPK7-5B | TLPEWSQPARRLVSRLLDPNPATRLTVAELSSHPWFKRSLSDSOLGSLGGAPERDLLFQAPPPTLNAFDIISMS PGLD | 320 |
| AtCIPK7-5B | TLPEWSQPARRLVSRLLDPNPATRLTVAELSSHPWFKRSLSDSOLGSLGGAPERDLLFQAPPPTLNAFDIISMS PGLD | 320 |
| TdCIPK7-5A | TLPEWSQPARRLVSRLLDPNPATRLTVAELSSHPWFKRSLSDSOLGSLGGAPERDLLFQAPPPTLNAFDIISMS PGLD | 320 |
| TaCIPK7-5A | TLPEWSQPARRLVSRLLDPNPATRLTVAELSSHPWFKRSLSDSOLGSLGGAPERDLLFQAPPPTLNAFDIISMS PGLD | 320 |
| TaCIPK7 | TLPEWSQPARRLVSRLLDPNPATRLTVAELSSHPWFKRSLSDSOLGSLGGAPERDLLFQAPPPTLNAFDIISMS PGLD | 320 |
| Consensus | tlpewsqparrlvsrllldpnpatrltvaelsshpwfkrrslsdsolgsllgga erdllfqappptlnafdiismsgld | |
| GzCIPK7-5B | LSGLFGENRRSREKRFMITTAPEQMVEQLGHSGAKLGYFM/GKKGVVERLPLGGLSGLVAMSMEMSEVAPPLMLVELRLEA | 400 |
| TdCIPK7-5B | LSGLFGENRRSREKRFMITTAPEQMVEQLGHSGAKLGYFM/GKKGVVERLPLGGLSGLVAMSMEMSEVAPPLMLVELRLEA | 400 |
| AtCIPK7-5B | LSGLFGENRRSREKRFMITTAPEQMVEQLGHSGAKLGYFM/GKKGVVERLPLGGLSGLVAMSMEMSEVAPPLMLVELRLEA | 400 |
| TdCIPK7-5A | LSGLFGENRRSREKRFMITTAPEQMVEQLGHSGAKLGYFM/GKKGVVERLPLGGLSGLVAMSMEMSEVAPPLMLVELRLEA | 400 |
| TaCIPK7-5A | LSGLFGENRRSREKRFMITTAPEQMVEQLGHSGAKLGYFM/GKKGVVERLPLGGLSGLVAMSMEMSEVAPPLMLVELRLEA | 400 |
| TaCIPK7 | LSGLFGENRRSREKRFMITTAPEQMVEQLGHSGAKLGYFM/GKKGVVERLPLGGLSGLVAMSMEMSEVAPPLMLVELRLEA | 400 |
| Consensus | lsglfgenrrsrekrfmitta peqmveqlghsgaklgyfmvgkkgverlplgglsglvamsmemsevapplmlvelrlea | |
| GzCIPK7-5B | GDDEEVQAFGWDALRTELGEVVMMAWHGCEE | 430 |
| TdCIPK7-5B | GDDEEVQAFGWDALRTELGEVVMMAWHGCEE | 430 |
| AtCIPK7-5B | GDDEEVQAFGWDALRTELGEVVMMAWHGCEE | 430 |
| TdCIPK7-5A | GDDEEVQAFGWDALRTELGEVVMMAWHGCEE | 430 |
| TaCIPK7-5A | GDDEEVQAFGWDALRTELGEVVMMAWHGCEE | 430 |
| TaCIPK7 | GDDEEVQAFGWDALRTELGEVVMMAWHGCEE | 430 |
| Consensus | gddeevqafgwdalrtelgevvmawhgcee | |

图 11 GzCIPK7-5B 氨基酸多重序列比对

Fig.11 Multiple sequence alignment of amino acids GzCIPK7-5B

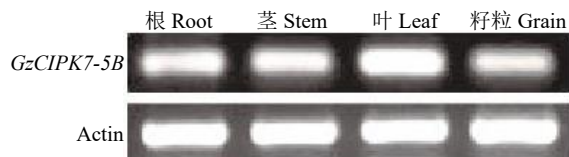


图 12 GzCIPK7-5B 的表达谱分析

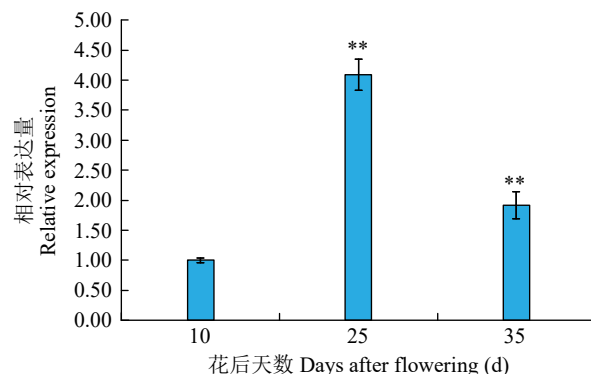
Fig.12 Expression profile analysis of GzCIPK7-5B

2.8 GzCIPK7-5B 在贵紫麦 1 号籽粒花青素合成重要时期的相对表达量

分析前期贵紫麦 1 号不同灌浆时期花青素积累的转录组数据发现, *GzCIPK7-5B* 在不同时期差异表达。为了确定 *GzCIPK7-5B* 在贵紫麦 1 号籽粒花青素合成重要时期的表达变化水平, 取花后 10、25、35d 时的籽粒为样品进行 qRT-PCR 验证。结果(图 13)显示, 在籽粒发育的 3 个时期中, 与花后 10d 时相比, 在 25d 时 *GzCIPK7-5B* 显著升高, 然后在 35d 时降低, 且 25 和 35d 时极显著上调($P < 0.01$)。

3 讨论

作为植物中普遍存在的激酶, CIPKs 在逆境胁迫信号传导中起着重要作用。它能与钙离子感应蛋白 CBL 结合实现信号传导, 激活下游相关基因。



*** 表示在 0.01 水平差异显著

*** indicates the significant difference at the level of 0.01

图 13 GzCIPK7-5B 在贵紫麦 1 号籽粒花青素合成关键期的相对表达量

Fig.13 Relative expression levels of GzCIPK7-5B in the critical period of anthocyanin synthesis in GZ1 grains

CIPKs 蛋白具有 2 个特定的结构域, 分别为 N 端的蛋白激酶催化结构域和 C 端的调节结构域。其中 C 端含有特定的由 24 个氨基酸组成的高度保守的 NAF 结构域。目前在许多植物中都鉴定出了该家族的基因, 如水稻^[18]、玉米^[8]、拟南芥^[18]和高粱^[19]等。本研究中, *GzCIPK7-5B* 具有该家族典型的 N 端蛋白激酶催化结构域和 NAF 结构域, 说明

GzCIPK7-5B 具有该家族的相似功能。

CIPKs 家族基因响应多种非生物胁迫。研究^[20]发现, 干旱和高盐胁迫显著诱导小麦 *TaCIPK23* 基因的表达。谷子 *SiCIPK16* 基因在低温胁迫下表达量呈现上调^[21]。*CIPK8* 基因在大豆中响应干旱胁迫, 根和叶表达量呈上调^[22]。在紫花苜蓿中, 不仅对干旱有响应, 还对低温和盐胁迫有应答^[23]。此外, CBL-CIPKs 网络还参与调节矿质元素的吸收和转运。研究表明, *CIPK23* 参与调节根系对 K^+ 的吸收^[24-25], 通过对高铁还原酶活性的调节参与拟南芥对铁的获取^[14], 还涉及通过磷酸化转运体 (CHL) 调节 CHL 对硝酸盐的亲和力^[26]。*GzCIPK7-5B* 具有 CIPKs 家族的典型特征, 可能对干旱、低温和高盐等胁迫存在响应以及与矿质营养元素吸收有关。因此, 该基因在小麦中的具体功能值得进一步研究。

CIPKs 家族基因在植物不同组织中广泛表达^[27-28], 本研究中, 贵紫麦 1 号 *GzCIPK7-5B* 的表达也有一定差异, 其在根、茎、叶和籽粒中均有表达, 根和叶中表达水平高于茎和籽粒。可能在该时期 *GzCIPK7-5B* 对根系和叶的生长发育影响较大。*GzCIPK7-5B* 属于钙离子信号通路系统中的钙调磷酸酶 B 类似蛋白互作蛋白激酶基因, 且在贵紫麦 1 号籽粒花青素生物合成 3 个重要时期 (花后 10、25、35d), 相比于 10d, *GzCIPK7-5B* 基因的表达量在 25 和 35d 时显著上调, 表明该基因与小麦籽粒花青素的积累有关。

4 结论

GzCIPK7-5B 具有 CIPKs 家族的典型特征。CDS 序列长 1296bp, 编码 431 个氨基酸, 蛋白含有 29 个磷酸化位点, 无跨膜结构, 是一种无信号肽的不稳定亲水性质的核蛋白。该基因与野生二粒小麦 *TdCIPK7-5B* 的序列相似度最高, 亚细胞定位显示该基因定位于细胞核。*GzCIPK7-5B* 在根、茎、叶、籽粒表达具有组织特异性, 在籽粒花青素合成关键期表达量具有显著变化, 其中在花后 25 和 35d 表达水平较 10d 时显著升高。该结果丰富了小麦 *CIPK7* 基因资源, 也为探讨钙离子信号途径参与小麦籽粒花青素积累奠定了基础。

参考文献

[1] 马瑞, 李世贵, 刘维刚, 等. 植物 CBL-CIPK 信号系统的功能及其响应非生物胁迫作用机制研究进展. 植物生理学报, 2021,

57(3): 521-530.

- [2] Wang Y, Li T, John S J, et al. A CBL-interacting protein kinase TaCIPK27 confers drought tolerance and exogenous ABA sensitivity in transgenic Arabidopsis. Plant Physiology Biochemistry, 2018, 123: 103-113.
- [3] 许静, 高景阳, 李程成, 等. 过表达 *ZmCIPKHT* 基因增强植物耐热性. 作物学报, 2022, 48(4): 851-859.
- [4] Wang R K, Li L L, Cao Z H, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel apple *MdCIPK6L* gene reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. Plant Molecular Biology, 2012, 79(1/2): 123-135.
- [5] Zhang Y M, Ling H J J, Dong W, et al. Foxtail millet *CBL4* (*SiCBL4*) interacts with *SiCIPK24*, modulates plant salt stress tolerance. Plant Molecular Reporter, 2017, 35(6): 634-646.
- [6] Song S J, Feng Q N, Li Chun L, et al. A Tonoplast-associated calcium-signaling module dampens ABA signaling during stomatal movement. Plant Physiology, 2018, 177(4): 1666-1678.
- [7] Sanya S K, Kanwar P, Yadav A K, et al. Arabidopsis CBL interacting protein kinase 3 interacts with ABR1, an APETALA2 domain transcription factor, to regulate ABA responses. Plant Science, 2017, 254: 48-59.
- [8] Zhao J F, Sun Z F, Zheng J, et al. Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize. Plant Molecular Biology, 2009, 69(6): 661-674.
- [9] Mahajaan S, Sopory S K, Tuteja N. Cloning and characterization of CBL-CIPK signaling components from legume (*Pisum sativum*). FEBS Journal, 2006, 27, 3(5): 907-925.
- [10] Huang C L, Ding S, Zhang H, et al. CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science, 2011, 181(1): 57-64.
- [11] Qiu Q S, Gou Y, Detrich M, et al. Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(12): 8436-8441.
- [12] Xing Y, Huang Y, Xiong L Z. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement. Plant Physiology, 2007, 144(3): 1416-1428.
- [13] 晋霞. 小麦盐胁迫响应基因 *TaCIPK25* 的功能研究. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [14] Tian Q Y, Zhang X X, Yang A, et al. CIPK23 is involved in iron acquisition of Arabidopsis by affecting ferric chelate reductase activity. Plant Science, 2016, 246: 70-79.
- [15] Zhang X, Li Z C, Li X J, et al. CBL3 and CIPK18 are required for the function of NHX5 and NHX6 in mediating Li^+ homeostasis in *Arabidopsis*. Journal of Plant Physiology, 2020, 255: 153295.
- [16] Peng H, Yang T, Whitaker B D, et al. Calcium/calmodulin alleviates substrate inhibition in a strawberry UDP glucosyltransferase involved in fruit anthocyanin biosynthesis. BMC Plant Biology, 2016, 16(1): 197.
- [17] Zong Y, Xi X, Li S, et al. Allelic variation and transcriptional isoforms of wheat *TaMYC1* gene regulating anthocyanin synthesis in pericarp. Plant Science, 2017, 8: 1645.
- [18] Yu Y H, Xia X L, Yin W L, et al. Comparative genomic analysis of CIPK gene family in *Arabidopsis* and *Populus*. Plant Growth Regulation, 2007, 52(2): 101-110.
- [19] Li L B, Zhang Y R, Liu K C, et al. Identification and bioinformatics analysis of SnRK2 and CIPK family genes in

- Sorghum*. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(1): 19-30.
- [20] Cui X Y, Du Y T, Fu T F, et al. Wheat CBL-interacting protein kinase 23 positively regulates drought stress and ABA responses. British Medical Council Plant Biology, 2018, 18(1): 93.
- [21] 余爱丽, 赵晋锋, 王高鸿, 等. 两个谷子 *CIPK* 基因在非生物逆境胁迫下的表达分析. 作物学报, 2016, 42(2): 295-302.
- [22] 冯志娟, 徐盛春, 刘娜, 等. *CIPK* 基因对逆境胁迫及激素的响应特征. 植物遗传资源学报, 2017, 18(6): 1168-1178.
- [23] 李亚坤, 陈乃钰, 杨晓雪, 等. 紫花苜蓿 *MsCIPK8* 基因的克隆与表达分析. 植物遗传资源学报, 2020, 21(2): 491-499.
- [24] Xu J, Li H D, Chen L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis*. Cell, 2006, 125: 1347-1360.
- [25] Lee S C, Lan W Z, Kim B G, et al. A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(40): 15959-15964.
- [26] Ho C H, Lin S H, Hu H C, et al. *CHL1* functions as a nitrate sensor in plants. Cell, 2009, 138: 1184-1194.
- [27] 毕惠惠, 贺亚伟, 毛伟伟, 等. 小麦 *TaCIPK8* 基因的表达分析及其与 *TaCBLs* 的互作. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 296-304.
- [28] 时丕彪, 洪立洲, 王军, 等. 藜麦 *CqCIPK7* 基因的克隆与表达分析. 江苏农业学报, 2020, 36(4): 1068-1072.

Bioinformatics and Expression Analysis of *GzCIPK7-5B* Gene in Wheat

Zhao Pengpeng, Li Luhua, Ren Mingjian, An Chang, Hong Dingli, Li Xin, Xu Ruhong

(College of Agriculture, Guizhou University/Guizhou Branch of National Wheat Improvement Center, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract CIPK is a kind of serine/threonine protein kinase specifically targeting calcineurin B similar protein in plant calcium receptors, which plays an important role in calcium ion signal transduction. To explore the function of *GzCIPK7-5B* gene in wheat, the *GzCIPK7-5B* gene from wheat variety ‘Guizimai 1’ was cloned by RT-PCR and analyzed by bioinformatics. RT-PCR was used to detect the expression of *GzCIPK7-5B* gene in different tissues (roots, stems, leaves and grains) of ‘Guizimai 1’. qRT-PCR was used to detect the expression levels of *GzCIPK7-5B* at three stages (10, 25, 35 days post anthesis) of grain. The results showed that the length of *GzCIPK7-5B* open reading frame was 1296bp, encoding 431 amino acids. The protein contained a conserved domain of serine-threonine protein kinase family and had the characteristics of CIPKs family genes. The encoded protein contained 29 phosphorylation sites and had no transmembrane structure. It was an unstable hydrophilic nuclear protein without signal peptide. The sequence similarity of *GzCIPK7-5B* gene and *TdCIPK7-5B* of wild two-grain wheat was the highest, and the protein sequence homology was 100%. *GzCIPK7-5B* gene was expressed in roots, stems, leaves and grains. In the three important periods of anthocyanin synthesis of ‘Guizimai 1’, the expression levels of 25 and 35 days post anthesis were significantly higher than that of 10 days after flowering.

Key words Wheat; *GzCIPK7-5B* gene; RT-PCR cloning; Bioinformatics; Gene expression