

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.06.029

拟南芥钙依赖蛋白激酶 CPK12 与 bZIP 转录因子 ABF4 相互作用研究

刘盈盈, 刘宇, 黄奎, 姚润东, 王健美, 李旭锋, 杨毅
(四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘 要: 为分析拟南芥钙依赖蛋白激酶 CPK12 在不同物种中序列的相似性, 并研究 CPK12 与 ABA 信号通路的关系, 本研究对不同物种 CPK12 氨基酸序列进行比较, 以及通过体内和体外实验验证 CPK12 与 ABF4 之间是否存在直接相互作用关系. 通过对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 油菜(*Brassica napus*)与荠菜(*Capsella rubella*)等物种的同源氨基酸序列进行比较, 获得了它们的亲缘关系. 利用酵母双杂交系统, 将 CPK12 与 ABF4 共转酵母后, 在四缺型培养基上能够正常生长, 这说明 CPK12 与 ABF4 在体外有相互作用. 同时, 利用双分子荧光互补实验, CPK12 与 ABF4 共转烟草后能够在激发光下观察到烟草细胞核中出现明显荧光信号, 这说明 CPK12 与 ABF4 在植物体内也存在相互作用, 为 CPK12 参与 ABA 信号途径提供了直接证据.

关键词: 钙依赖蛋白激酶 12; ABA 响应原件结合因子 4; 氨基酸序列比对; 酵母双杂交实验; 双分子荧光互补实验

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0490-6756(2018)06-1301-06

The research on interaction between *Arabidopsis* Calcium-dependent kinase CPK12 and bZIP transcription factor ABF4

LIU Ying-Ying, LIU Yu, HUANG Kui, YAO Run-Dong, WANG Jian-Mei, YANG Yi
(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In order to analyze the sequence similarity of the *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK12 in different species and the function of CPK12 in the ABA signaling, this study carried on the amino acid sequence alignment of CPK12 among different species, and focused on the direct interaction between CPK12 and ABF4 *in vivo* and *in vitro*. The amino acid sequence alignment was conducted to analyze CPK12 homology among the *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Capsella rubella*, etc. In addition, CPK12 and ABF4 were co-transfected through the yeast two-hybrid system. The result showed that yeasts could grow normally on SD (-His/Ade Leu/Trp) agar medium, indicating that CPK12 interacted with ABF4 *in vitro*. In the bimolecular fluorescence complementary assay, the obvious yellow fluorescence signal could be observed in the nucleus when CPK12 and ABF4 were co-transfected into tobacco. The result also demonstrated that CPK12 interacted with ABF4 *in vivo*. All these provided direct

收稿日期: 2018-02-09
基金项目: 国家转基因重大专项(2016ZX08009003-002)
作者简介: 刘盈盈(1990-), 女, 四川省凉山彝族自治州西昌市人, 硕士研究生, 研究方向为植物遗传与分子生物学.
E-mail: 492946841@qq.com
通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@scu.edu.cn

evidence that CPK12 was involved in the ABA signaling.

Keywords: CPK12; ABF4; Sequence alignment of amino acid; Yeast two-hybrid system; BIFC

引 言

Ca^{2+} 作为植物中重要的第二信使,参与植物的生长发育^[1],各种生物、非生物胁迫^[2, 3]. 植物编码的 Ca^{2+} 传递体包括识别者可以分为钙调蛋白(Calmodulins, CaM), 类钙调蛋白(Calmodulin-like proteins, CMLs), 钙依赖蛋白激酶(Ca^{2+} -dependent protein Kinases, CDPKs), 钙调磷酸酶(Calcineurin B-like proteins, CBLs) 和其内源互作激酶类型(CBL-interacting protein Kinase, CIPKs)^[4]. 这些 Ca^{2+} 传递体由多基因家族编码,在植物体内形成了复杂的内源信号网络^[5, 6]. 其中,CDPKs 总共含有四个结构域,包括一个氨基端可变区,一个 Ser/Thr 激酶结构域,一个自我抑制的连接节点以及一个钙调类型结构域(calmodulin-like domain, CaM-LD)^[4]. 不同于 CBL 和 CIPK 类,CDPKs 不需要与其他蛋白结合形成复合物即可与底物发生相互作用,从而使植物在生长发育以及抗逆胁迫中能够正常的发挥生理功能^[7].

迄今为止发现拟南芥中有 34 个成员^[8],分为 4 个亚家族. 拟南芥 CDPKs 成员众多,在一定的基因同源性背景下不同的 CDPKs 具有相似的功能,其中一些 CDPKs 参与到了 ABA 信号通路. 如拟南芥 CPK3 和 CPK6 正调控 ABA 介导的气孔开闭^[9]; CPK32 通过正调控 ABA 信号通路参与种子的萌发^[10]; CPK4 和 CPK11 同属 CDPKs 亚家族 I,作为亲缘性最高的两个 CDPKs,在种子的萌发、发育、气孔开闭和植物对逆境的耐受中均参与 ABA 信号通路的正调控^[11]. CPK12 也属亚家族 I,虽与 CPK4、CPK11 亲缘性很近^[12],但在拟南芥种子萌发和萌发后的生长中负调控 ABA 信号通路^[13].

脱落酸(Abscissic acid, ABA)作为一种重要的植物激素,参与植物的胚胎发育、果实成熟、种子休眠^[14]以及在植物生长中调节胁迫相关基因的表达^[10]. 在对 ABA 的研究中,人们已经绘制出复杂的 ABA 通路信号网络^[15]. ABA 信号通路是通过 ABA 受体(PYR/PYL/RCAR)识别 ABA 信号开始的. 正常情况下,ABA 含量极低,PP2C 与 SnRK 结合,PP2C 处于去磷酸化状态,ABA 信号通路关闭;当 ABA 含量升高,ABA 受体感受信号,RCAR

与 PP2C 结合,释放 SnRK2 激酶活性并磷酸化下游 ABA 转录因子 ABF/AREB 或离子通道,调节 ABA 应答机制,从而使植物关闭气孔,增强植物对逆境胁迫的适应^[16]. ABA 响应原件结合因子(ABA-responsive Element Binding Factors, ABFs)作为含有亮氨酸拉链的转录因子亚家族,调节许多跟 ABA 相关基因的表达^[10]. 因此在对 ABA 信号通路的研究中,ABFs 的变化情况被作为研究目的基因是否参与该信号通路的重要参考依据.

有研究表明 CPK12 负调控 ABA 信号通路,是通过磷酸化相关基因 ABF1/ABF4/ABI2 实现的,但是,没有直接的证据证明拟南芥 CPK12 与 ABF1/ABF4/ABI2 有直接的相互作用. 本文通过对 CPK12 与 ABF4 的酵母双杂交实验以及双分子荧光互补实验,证明了拟南芥二者在酵母和烟草中存在直接相互作用,为进一步研究植物抗逆以及 ABA 信号通路应答奠定了基础.

2 材料与方 法

2.1 材 料

大肠杆菌菌株 DH5 α 、酵母菌株 AH109、农杆菌菌株 GV3101 以及酵母双杂交使用载体 PG-BKT7、PGADT7,双分子荧光互补实验使用载体 PSPYNE、PSPYCE 均由本实验室保存. 拟南芥哥伦比亚野生型(col)种子由本实验室保存. 引物合成及测序由华大基因完成.

2.2 方 法

2.2.1 序列比对及进化树的构建 拟南芥钙依赖蛋白激酶 CPK12 蛋白序列下载自 Arabidopsis Information Resource Database (<http://www.arabidopsis.org>),其他物种 CPK12 蛋白序列下载自 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 不同物种蛋白序列对比采用 DNAMAN,进化树构建采用 Mega 软件.

2.2.2 目的基因的克隆及载体的构建 从野生型拟南芥中提取总 RNA,反转为 cDNA 以后,以此为模板克隆得到 CPK12 和 ABF4 编码序列 DNA 片段. 该过程需 RNA 提取试剂和反转录试剂盒均购自 Takara 公司,操作流程和质量评估都按照产品说明书进行. 通过同源重组方法构建酵母双杂交载体 AD-CPK12、BD-ABF4 以及双分子荧光互补

载体 pSPYNE-CPK12、pSPYCE-ABF4. 重组酶购自 Vazyme 公司,限制性内切酶购自 Fermentas 公司.

2.2.3 酵母双杂交实验 酵母双杂交实验参照 Clontech 公司酵母双杂交使用手册,共转化 pG-BKT7-ABF4, pGADT7-CPK12. 同时设置阳性对照 pGADT7-CARK3 Δ N, pGBKT7-RCAR12^[17] 以及阴性对照 pGBKT7, pGADT7-CPK12 和 pG-BKT7-ABF4, pGADT7. 转化后的酵母涂布于 SD/-Trp-Leu 板上,培养 2~3 d 后挑取单菌落,经 PCR 鉴定为阳性菌落后接种于 SD/-Trp-Leu 液体培养基中,摇至光密度约为 0.6. 吸取适量菌液高速 15 s 下离心后用生理盐水悬起. 再次离心后,按 10 倍,100 倍,1000 倍比例稀释. 将稀释后不同浓度菌液分别滴于 SD/-Trp-Leu, SD/His-Trp-Leu 及 SD/Ade-His-Trp-Leu 固体培养基,培养 3~5 d. 酵母缺陷型培养基购自北京泛基诺公司.

2.2.4 双分子荧光互补实验 将相应的重组载体及 PSPYNE、PSPYCE 空载分别转入农杆菌 GV3101,挑取阳性克隆于 10 mL YEP 液体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素,25 mg/L 利福平霉素及 50 mg/L 庆大霉素)中,于 28℃下,220 r/min 摇床培养至光密度值接近 1. 吸取菌液于 1.5 mL EP 管中,低速离心 10 min 后收菌. 弃上清,加入浸染缓冲液,悬起细菌,并重复离心,收菌. 再次弃上清,加入浸染缓冲液,调整光密度值至 0.6~0.8. 室温避光静置 2 h,按照 1:1 比例取重悬液混匀后,注射烟草叶片背面至注射面积大于 1 平方厘米. 注射后烟草避光 16 h 后正常培养,2~3 d 后剪取注射叶片检测荧光信号.

3 结果与分析

3.1 不同物种中 CPK12 同源基因比对分析

利用 DNAMAN 软件将拟南芥 CPK12 氨基酸序列与油菜(*Brassica napus*), 荠菜(*Capsella rubella*), 欧洲棉(*Gossypium arboreum*), 川桑(*Morus notabilis*), 萝卜(*Raphanus sativus*), 醉蝶花(*Tarenaya hassleriana*), 莲藕(*Nelumbo nucifera*)和胡杨(*Populus euphratica*)的同源氨基酸序列对比分析,发现这些物种中 CPK12 同源氨基酸序列具有较高的相似度,特别是在蛋白激酶结构域区域(拟南芥 CPK12 第 21~279 位氨基酸). 其中拟南芥 CPK12 的氨基酸序列与荠菜的相似度最高,达 95.51%,与油菜,萝卜,醉蝶花,莲藕,胡杨,欧洲棉

和川桑中相似度分别达 90.22%, 86.94%, 83.20%, 77.58%, 76.28%, 75.40% 和 74.76% (图 1-A). 将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)与(*Brassica napus*), 荠菜(*Capsella rubella*), 欧洲棉(*Gossypium arboreum*), 川桑(*Morus notabilis*), 萝卜(*Raphanus sativus*), 醉蝶花(*Tarenaya hassleriana*), 莲藕(*Nelumbo nucifera*)和胡杨(*Populus euphratica*)的同源基因进行进化树分析,说明了拟南芥 CPK12 与荠菜的同源基因更为相似,与参与序列比对的多个物种的同源氨基酸序列相似度也较高(氨基酸相似度均在 74% 以上)(图 1-B). 这为接下来研究不同物种 CPK12 同源序列的功能差异提供了理论依据.

3.2 CPK12 与 ABF4 的酵母双杂交实验

在酵母双杂交实验中,所有共转化的酵母培养 2~3d 后,均能在氨基酸营养缺陷型 SD/-Trp-Leu 固体培养基上生长,菌落呈现白色光滑、有丘状隆起,经菌落 PCR 鉴定均为阳性菌落,说明酵母的共转是成功的. 在 SD/Ade-His-Trp-Leu 固体培养基上培养 3~5d 后,正对照 pGADT7-CARK3 Δ N, pGBKT7-RCAR12 能够长起来,阴性对照 pG-BKT7, pGADT7-CPK12 和 pGBKT7-ABF4, pGADT7 分别转化的酵母培养基不能长起来,说明实验体系可信. 在 SD/Ade-His-Trp-Leu 固体培养基上,实验组 pGBKT7-ABF4, pGADT7-CPK12 能长起来,说明 ABF4 与 CPK12 在酵母中存在相互作用,即 ABF4 与 CPK12 在体外存在相互作用.

3.3 CPK12 与 ABF4 的双分子荧光互补实验

双分子共转烟草后,培养烟草注射苗 2~3 d,剪取注射孔附近大小约 1 cm² 的叶片组织,在激光共聚焦扫描显微镜波长 515 nm 激发光下观察烟草叶片荧光. 正对照 pSPYNE-CARK3, pSPYCE-RCAR12^[17] 中烟草叶片表皮细胞轮廓出现大面积黄色荧光,而阴性对照 pSPYCE-ABF4, NE 及 pSPYCE, pSPYNE-CPK12 中未出现荧光,说明实验体系真实可信. 在实验组 PSPYNE-CPK12, PSPYCE-ABF4 中,能够观察到细胞核中出现黄色荧光,说明 CPK12 和 ABF4 之间在烟草中存在相互作用,并且相互作用发生的位置在烟草细胞核中(图 3),即 ABF4 与 CPK12 在体内存在相互作用.

4 讨论

Ca²⁺ 在植物的生长发育以及应对各种胁迫时都发挥重要第二信使的功能. CDPKs 是最具代表

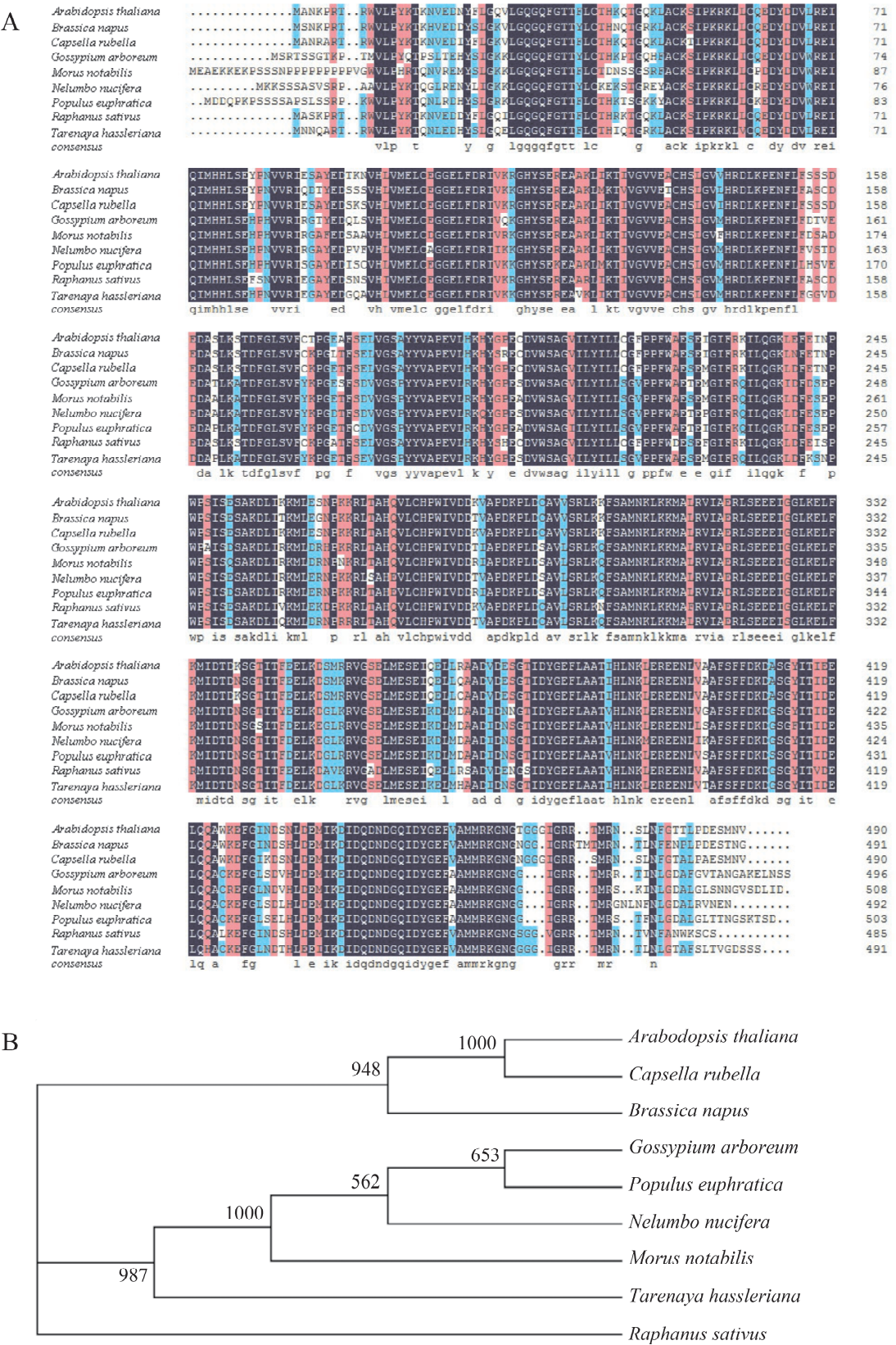


图 1 不同物种中 CPK12 同源基因氨基酸序列对比(A)和进化树分析(B)
不同物种的 CPK12 氨基酸序列来自 Tair 和 NCBI,序列比对由 DNAMAN 完成,而进化树由 Mega 构建
Fig. 1. Sequence alignment of amino acid(A)and phylogenetic tree(B) of CPK12 in different species
The amino acid sequence of CPK12 in different species was downloaded from Tair and NCBI,Sequence alignment was analyzed by DNAMAN and phylogenetic tree was constructed by Mega

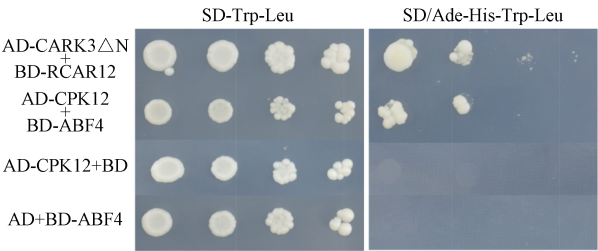


图 2 酵母双杂交验证 CPK12 和 ABF4 之间的相互作用
CPK12 与 ABF4 分别构建到了 PGADT7 和 PGBKT7 上
Fig. 2. The interaction of CPK12 and ABF4 in yeast two-hybrid assay
The CPK12 was fused with PGADT7 and ABF4 was fused with PGBKT7

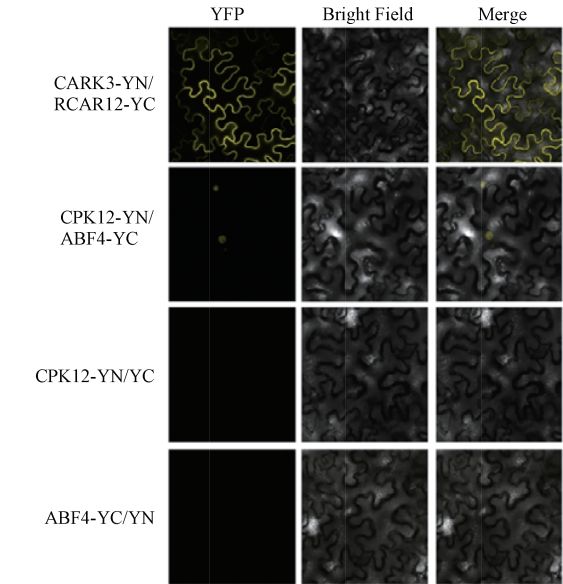


图 3 BiFC 验证 CPK12 与 ABF4 体内的相互作用
照片展示的是激光共聚焦显微镜下 pSPYNE-CPK12 与 pSPYCE-ABF4 在烟草叶片表皮细胞中相互作用的瞬时表达情况
Fig. 3. The interaction between CPK12 and ABF4 by BiFC *in vivo*
The photograph showed the laser scanning confocal images of transiently transformed tobacco epidermal cells co-expression pSPYNE-CPK12 and pSPYCE-ABF4

性的 Ca^{2+} 传感器,参与了植物的生长发育以及对各种逆境胁迫的抵御。近年来,越来越多的 CDPKs 成员被证明了参与 ABA 信号通路,对响应胁迫发挥着重要的生理功能。在对 CDPKs 的研究中,拟南芥 CPK4 与 CPK11 突变体表型出对 ABA 不敏感,而相关过表达株系则表现出对 ABA 敏感,说明 CPK4 与 CPK11 对 ABA 信号通路是正调控的作用^[11]。类似的表型也见于对 CPK32 的基因研究中^[10]。除此以外,CPK3、CPK6 对 ABA 信号通路也是正调控作用^[9]。而对拟南芥 CPK12 的研究发

现,虽然 CPK4、CPK11、CPK12 同属亚家族 I^[12],但 CPK12 在 ABA 信号通路中正好与 CPK4、CPK11 的调控作用相反,呈现负调控作用。这些特殊的结果说明,在拟南芥 CDPKs 众多家族成员中,CPK12 作为 ABA 信号转导途径中一个平衡因子存在。这揭示了在 ABA 信号通路中,一些 CDPKs 之间可能会形成调节环,他们分别参与 ABA 信号通路的正调控与负调控,却又因这种特殊的调节环而相互协调^[18]。

在对拟南芥 CPK12 的研究中,研究者发现了跟 ABA 信号通路的相关的基因 ABF1、ABF4 及 ABI2 能够被 CPK12 磷酸化,却没有更直接的证据。我们的研究对 ABF4 和 CPK12 进行了酵母双杂交实验以及双分子荧光互补实验,证明了 CPK12 与 ABF4 之间确实存在直接的相互作用。然而从现阶段来看,对拟南芥 CPK12 在 ABA 信号通路中是如何响应的机制依旧不够明确。拟南芥 CPK12 在 ABA 信号通路中能够磷酸化 ABF1、ABF4、ABI2,与 ABF4 发生直接相互作用,但会不会与其他 ABA 信号通路基因发生相互作用,影响下游基因调控及响应依旧有待探索。

在先前研究中,拟南芥 CPK12 定位在细胞核和细胞质中^[13],ABF4 是转录因子,所以推测二者发生相互作用的位置在细胞核和细胞质。但与正对照 pSPYNE-CARK3, pSPYCE-RCAR12 的强烈荧光相比,实验组荧光信号较弱,仅在细胞核中出现。这让我们对接下来的研究做出猜想—拟南芥 CPK12 能够在 ABA 信号通路起特异调节的作用,但与 ABF4 的作用又不是特别强烈,所以拟南芥 CPK12 在 ABA 信号通路中的底物还可能更多,这为我们进一步研究 CPK12 的功能和它潜在的底物提供了参考依据。

由于许多 CDPKs 参与植物生长发育以及逆境胁迫响应,因此对拟南芥 CPK12 的研究丰富了 CDPKs 家族基因功能的研究内容,为该基因家族在转基因育种中的潜在应用奠定了基础,具有重要的理论意义和应用前景。

参考文献:

[1] Uno Y, Rodriguez Milla M A, Maher E, *et al.* Identification of proteins that interact with catalytically active calcium-dependent protein kinases from *Arabidopsis* [J]. Mol Genet Genomics, 2009, 281: 375.

- [2] Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, *et al.* Calcium at the Crossroads of signaling [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: S401.
- [3] Yang D H, Hettenhausen C, Baldwin I T, *et al.* Silencing *Nicotiana attenuata* calcium-dependent protein kinases, CDPK4 and CDPK5, strongly up-regulates wound and herbivory-induced jasmonic acid accumulations [J]. *Plant Physiol*, 2012, 159: 1591.
- [4] 姜珊珊,张丹,孔祥培,等. 植物中的钙依赖蛋白激酶_CDPK_的结构特征和功能研究进展 [J]. *生物技术通报*,2013,6:12
- [5] 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: 469.
- [6] Ludwig A A, Romeis T, Jones J D. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55: 181.
- [7] Hashimoto K, Kudla J. Calcium decoding mechanisms in plants [J]. *Biochimie*, 2011, 93: 2054.
- [8] Boudsocq M, Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2013, 18: 30.
- [9] Mori I C, Murata Y, Yang Y., *et al.* CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca^{2+} -permeable channels and stomatal closure [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4: e327.
- [10] Choi H I, Park H J, Park J H, *et al.* *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 1750.
- [11] 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: 3019.
- [12] Hrabak E M, Chan C W, Gribskov M, *et al.* The *Arabidopsis* CDPK – SnRK superfamily of protein kinases [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132: 666.
- [13] Zhao R, Sun H L, Mei C, *et al.* The *Arabidopsis* Ca^{2+} -dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth [J]. *New phytol*, 2011, 192: 61.
- [14] Li S, Assmann S M, Albert R. Predicting essential components of signal transduction networks: a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling [J]. *PLoS Biol*, 2006, 4: e312.
- [15] Finkelstein R. Absciscic Acid synthesis and response [J]. *Arabidopsis Book*, 2013, 11: e0166.
- [16] Lynch T, Erickson B J, Finkelstein R R. Direct interactions of ABA-insensitive (ABI)-clade protein phosphatase (PP) 2Cs with calcium-dependent protein kinases and ABA response element-binding bZIPs may contribute to turning off ABA response [J]. *Plant Mol Biol*, 2012, 80: 647.
- [17] 黄琪, 李小意, 陈静波, 等. 拟南芥 CARK3 与 RCAR12 相互作用的研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 179.
- [18] Zhao R, Wang X F, Zhang D P. CPK12: A Ca^{2+} -dependent protein kinase balancer in abscisic acid signaling [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 6: 1687.

引用本文格式:

中 文: 刘盈盈, 刘宇, 黄奎, 等. 拟南芥钙依赖蛋白激酶 CPK12 与 bZIP 转录因子 ABF4 相互作用研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1301.

英 文: Liu Y Y, Liu Y, Huang K, *et al.* The research on interaction between *Arabidopsis* Calcium-dependent kinase CPK12 and bZIP transcription factor ABF4 [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2018, 55: 1301.