

拟南芥钙依赖蛋白激酶 CPK11 与 ABA 响应元件结合因子 ABF4 相互作用的研究

胡 搏, 刘盈盈, 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 610065)

摘 要: 为研究钙依赖蛋白激酶 CPK11 参与 ABA 信号通路的方式, 本文利用体外酵母双杂实验(Y2H)以及体内双分子荧光互补实验(BiFC)分析 CPK11 与 ABA 响应元件结合因子(ABA-responsive element binding factors, ABFs)ABF4 之间的关系. 酵母双杂交实验表明 CPK11 与 ABF4 存在体外相互作用, 双分子荧光互补实验表明 CPK11 与 ABF4 存在体内相互作用. 以上实验共同证明 CPK11 与 ABF4 存在直接相互作用. 作为 CPK11 的同源蛋白 CPK4 与转录因子 ABF4 在植物体内也存在相互作用. 以上实验表明 CPK11 及其同源蛋白 CPK4 可能通过与转录因子 ABF4 相互作用从而参与钙离子介导的 ABA 信号通路.

关键词: 钙依赖蛋白激酶 11; ABA 响应元件结合因子 4; 同源蛋白; 酵母双杂交实验; 双分子荧光互补实验

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2022.026001

Research on the interaction between CPK11 and ABF4

HU Bo, LIU Ying-Ying, YANG Yi

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: To investigate the way that the calcium-dependent protein kinase CPK11 involved in regulating ABA signal transduction, Yeast two hybrid (Y2H) assay and Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay were used to analyze the relationship between CPK11 and ABA-responsive element binding factors ABF4. Y2H assay showed that CPK11 and ABF4 had an interaction *in vitro*, and BiFC assay showed that CPK11 and ABF4 had an interaction *in vivo*. The above experiments together proved that there was a direct interaction between CPK11 and ABF4. As a homologous protein of CPK11, CPK4 also interacted with transcription factor ABF4 in plants. In summary, these results indicated that CPK11 and its homologous protein CPK4 may participate in calcium-mediated ABA signaling pathway by interacting with transcription factor ABF4.

Keywords: CPK11; ABF4; Homologous protein; Y2H; BiFC

收稿日期: 2021-07-06

基金项目: 国家自然科学基金(31870240)

作者简介: 胡搏(1996-), 女, 江苏淮安人, 硕士研究生, 研究方向为遗传学. E-mail: 3263402011@qq.com

通讯作者: 杨毅. E-mail: yangyi528@scu.edu.cn

1 引言

钙离子(Ca^{2+})是细胞内的第二信使,钙离子转运蛋白的 EF-hand 结构可以结合 Ca^{2+} 从而传递钙信号^[1]. 钙依赖蛋白激酶 CPKs 是一类含有丝氨酸/苏氨酸激酶域的蛋白质,是植物中必不可少的钙信号感受器. CPKs 在大豆中被第一次发现^[2]. 拟南芥中 CPKs 家族共有 34 个成员^[3],各成员中具有保守的结构域,分别包括:N 端可变域、丝氨酸/苏氨酸激酶域、自抑制域和类钙调素结合域^[4]. CPKs 在植物体内的功能主要体现在能够参与激素相关的反应,如 CPKs 能够参与植物激素脱落酸 ABA 信号转导过程^[5]. 此外,CPKs 还能调控植物生长发育过程. 如 CPK32 可以调节植物的开花时间等^[6]. CPK11 和 CPK24 可以共同调节拟南芥花粉管中钾离子通道^[7]. CPK2 和 CPK20 也能调控花粉管生长^[8].

利用酵母双杂交实验证明部分钙依赖蛋白激酶与碱性亮氨酸拉链转录因子(basic leucine zipper, bZIP)家族亚组 ABFs 存在相互作用^[9]. 分析 ABFs 的过表达和突变体株系的表型可证明其在 ABA 信号通路以及非生物胁迫下扮演重要角色^[10]. 说明钙依赖蛋白激酶可以通过与 ABFs 相互作用参与到 ABA 信号通路中. 拟南芥中 ABFs 有 4 个成员,分别是 ABF1、ABF2、ABF3 和 ABF4. ABFs 家族成员都具有 5 个保守序列,分别为 N 端的 C1、C2、C3 和一个结合 DNA 序列的 bZIP 区域以及 C4^[11]. 保守序列中均含有 R-X-X-S/T,能够被 CPKs 和蔗糖非发酵型蛋白激酶 2(Sucrose non-fermenting-1 related protein kinase 2, SnRK2)磷酸化,从而激活 ABFs 的转录活性^[12]. 如 CPK4 和 CPK11 能够通过磷酸化方式激活 ABF1 和 ABF4^[13]. CPK32 可以和 ABF4 发生相互作用并且磷酸化 ABF4 进而调控 ABA 信号通路相关基因的表达^[14]. CPK12 可以和 ABF4 发生相互作用,也可以与 ABI2 相互作用影响拟南芥种子萌发以及幼苗生长^[15].

CPK11 能够正向调控 ABA 信号通路,也能够体外磷酸化 ABF4^[13],因而 CPK11 可能通过磷酸化 ABF4 从而影响 ABA 信号转导. 但是 CPK11 能否与 ABF4 在植物体内发生直接相互作用进而参与到 ABA 信号通路中还未见报道. 本文通过体外酵母双杂交实验以及体内双分子荧光互补实验对 CPK11 与 ABF4 蛋白之间的直接相互作用提供了

实验依据,对 CPKs 参与 ABA 信号通路的分子机制的研究具有补充和丰富的作用,为后续研究植物参与 ABA 信号通路以及抵御逆境胁迫提供理论和实验支持.

2 材料与方法

2.1 材料

植物材料拟南芥哥伦比亚野生型 Columbia (Col-0)种子由实验室密封常温保存.

实验中使用到的菌株大肠杆菌菌株(*Escherichia coli*)、农杆菌菌株(*Agrobacterium Strain*)、酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae*),所使用的载体 pGADT7、pGBKT7、pSPYNE、pSPYCE 均由本实验室于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 长期保存.

Primestar MAX DNA 高保真酶购于诺唯赞公司. dNTPs 及反转录试剂盒购于 Takara 公司. T4 DNA 连接酶、同源重组酶、限制性内切酶购于 Thermo 公司. 胶回收纯化试剂盒、质粒小提试剂盒购于北京天根公司. 营养缺陷型培养基购于泛基诺科技公司. 引物合成以及测序由华大基因公司以及擎科和有康生物科技有限公司完成.

2.2 方法

2.2.1 目的基因的获取以及载体的构建 从野生型拟南芥中提取总 RNA,通过反转录合成 cDNA,详细步骤参考反转录试剂盒说明书. 以合成的 cDNA 为模板,通过设计的特异性的引物(表 1)从模板中扩增出所需的目的片段. 扩增目的片段所用酶为 Primestar DNA 高保真酶,扩增程序为 DNA 变性、退火以及延伸,设置的温度和时间分别为 $97\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s、 $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s 以及 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s,扩增循环数为 34. PCR 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳检测目的片段分子大小正确后利用胶回收试剂盒回收纯化目的片段,即获得所需的目的基因 CPK4、CPK11 以及 ABF4.

将目的片段和质粒利用限制性内切酶分别酶切,具体酶切位点见表 1. T4 DNA 连接酶连接目的片段和质粒的酶切产物,后将连接产物转入大肠杆菌感受态. 接着将转入重组质粒的大肠杆菌感受态按照质粒所携带的抗性基因分别涂布于卡那和氨苄抗性培养基上过夜培养. 利用菌落 PCR 技术从抗性培养基上筛选阳性克隆菌落. 得到的阳性克隆菌在 LB 液体培养基中扩大培养后,利用质粒小提试剂盒按试剂盒说明书提取重组质粒 pGADT7-ABF4、pGBKT7-CPK11、pSPYNE-CPK11、pSPYNE-

CPK4、pSPYCE-ABF4. 其中 pSPYCE-ABF4 重组质粒构建过程中除利用同源重组连接目的片段与载体外其他操作过程同上. 最后将获得的重组质粒送擎科以及有康生物科技公司测序.

表 1 实验所用引物
Tab.1 Primers used in assay

用途	引物名称	引物序列(5'→3')
酵母双杂交	pGBKT7-CPK11-F	CGCTGCAGGTCGACGGATCCTCAGTCATCAGATTTTTCACC
	pGBKT7-CPK11-R	CAGAGGAGGACCTGCATATGATGGAGACGAAGCCAAACC
	pGADT7-ABF4-F	TACCAGATTACGCTCATATGATGGGAACTCACATCAATTTCAACA
	pGADT7-ABF4-R	AGCTCGAGCTCGATGGATCCTCACCATGGTCCGGTTAATGTCCTT
双分子荧光互补	pSPYNE-CPK11-F	CCGCTCGAGATGGAGACGAAGCCAAACC
	pSPYNE-CPK11-R	TCCCCCGGGTCATCAGATTTTTCACC
	pSPYNE-CPK4-F	CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGAGAAACCAAACCCTAG
	pSPYNE-CPK4-R	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCTTTGGTGAATCATCAG
	pSPYCE-ABF4-F	GCCTGGCGCGCCACTAGTATGGGAACTCACATCAATTTCAACA
	pSPYCE-ABF4-R	CATCCCGGGAGCGGTACCCCATGGTCCGGTTAATGTCCTT

注:F 表示上游引物,R 表示下游引物. 酶切位点用实下划线表示,同源重组引物用虚下划线表示.

2.2.2 氨基酸序列比对及进化树构建 CPK11 的氨基酸序列下载于 Tair 网站,即 Arabidopsis Information Resource database(<http://www.arabidopsis.org/>),CPK11 在拟南芥中的同源氨基酸序列下载自 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). CPK11 的氨基酸序列二级结构用 SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl)网站预测,利用 IBS 软件制作蛋白质二级结构域. 不同 CPKs 之间的氨基酸序列的比对利用 DNAMAN 软件. 进化树的构建利用 MEGA7.0 软件,构建进化树时选择 Neighbor-joining 邻接法,设置步长值为 1000,模型用 Kimura 2-parameter Model,缺失数据处理选择部分缺失,完整度设置参数为 95.

2.2.3 酵母双杂交实验 根据酵母双杂交实验步骤(Clontech),利用 AH109 酵母菌株制备酵母感受态,将重组质粒 AD-ABF4+BD-CPK11 共转进感受态酵母中作为实验组,实验室保存的 AD-CARK3+BD-RCAR12 质粒转入酵母感受态作为阳性对照组,转入 AD-ABF4+BD 以及 AD+BD-CPK11 重组质粒的酵母感受态作为阴性对照. 吸取 5 μ L 酵母菌液滴于氨基酸营养缺陷型固体培养基 SD/-Trp-Leu 上于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中生长 2~3 d,并且通过菌落 pcr 鉴定为阳性菌落,说明共转体系正确. 之后将阳性单克隆接种在 SD/-Trp-Leu 液体培养基中 30 $^{\circ}$ C,220 r/min 振荡培养 48 h,用生

理盐水将样品 OD600 调至相同. 此后将样品分别稀释 10 倍,100 倍,1000 倍后取 5 μ L 滴于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His 固体培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 4~6 d 观察实验结果.

2.2.4 双分子荧光互补实验 根据双分子荧光互补实验步骤(Lee)^[16],将阳性对照 NE-CARK3+CE-RCAR12,阴性对照组 NE-CPK11/CPK4+CE 以及 NE+CE-ABF4 和实验组 NE-CPK11/CPK4+CE-ABF4 分别转进农杆菌感受态中,随后涂布于含有卡那、庆大、利福平三种抗生素的 YEP 固体培养基上生长两天. 挑取经过鉴定的阳性克隆菌落于含有卡那、庆大、利福平三种抗生素的 YEP 液体培养基中 28 $^{\circ}$ C,220 r/min 振荡过夜培养. 取菌液低速离心得到沉淀的菌体后,用浸染液重悬菌体,再次 4000 r/min 离心 10 min,重复以上步骤几次后,用浸染液重悬菌体. 溶液 OD₆₀₀ 的值在 0.8 附近时,将溶液静止避光 2 h 后,等量混合,用注射器将含有不同质粒的混合农杆菌液一次性注射到烟草叶片中,48 h 后利用激光共聚焦显微镜在一定波长的激发光下观察正负对照组以及实验组的荧光情况.

3 结果分析

3.1 CPK11 与同源蛋白氨基酸序列比对及亲缘关系分析

拟南芥中 CPK11 的氨基酸序列下载自 TAIR

网站,利用 SMART 网站预测拟南芥 CPK11 蛋白质二级结构,CPK11 共有 495 个氨基酸,其中从第 26 到第 284 个氨基酸为 CPK11 的蛋白激酶结构域,并且包含了 4 个 EF-hand 域(图 1a). 利用 NCBI 网站下载了拟南芥中与 CPK11 属于同一亚家族的 CPK4 和 CPK6. 利用 DNAMAN 软件比对上述 CPKs 与 CPK11 氨基酸序列. 根据比对结果可知 CPK6 与 CPK11 氨基酸序列的相似度为 68%, CPK4 与 CPK11 氨基酸序列相似度达 95%(图 1b).

通过 MEGA 软件分析拟南芥 CPK11 与其他

钙依赖蛋白激酶 CPK1、CPK2、CPK4、CPK5、CPK6、CPK12、CPK20、CPK26 的亲缘关系,发现 CPK11 与其他 CPKs 亲缘关系由近及远依次为 CPK4、CPK12、CPK26、CPK6、CPK5、CPK20、CPK2、CPK1(图 1c),其中 CPK4 与 CPK11 亲缘关系最近. 结合序列比对与亲缘关系分析可知 CPK4 是与 CPK11 高度同源的蛋白质. 以上结果为研究 CPK11 同源蛋白的功能提供了相关的理论依据,为后续实验中开展该同源蛋白相关实验研究提供理论支持.

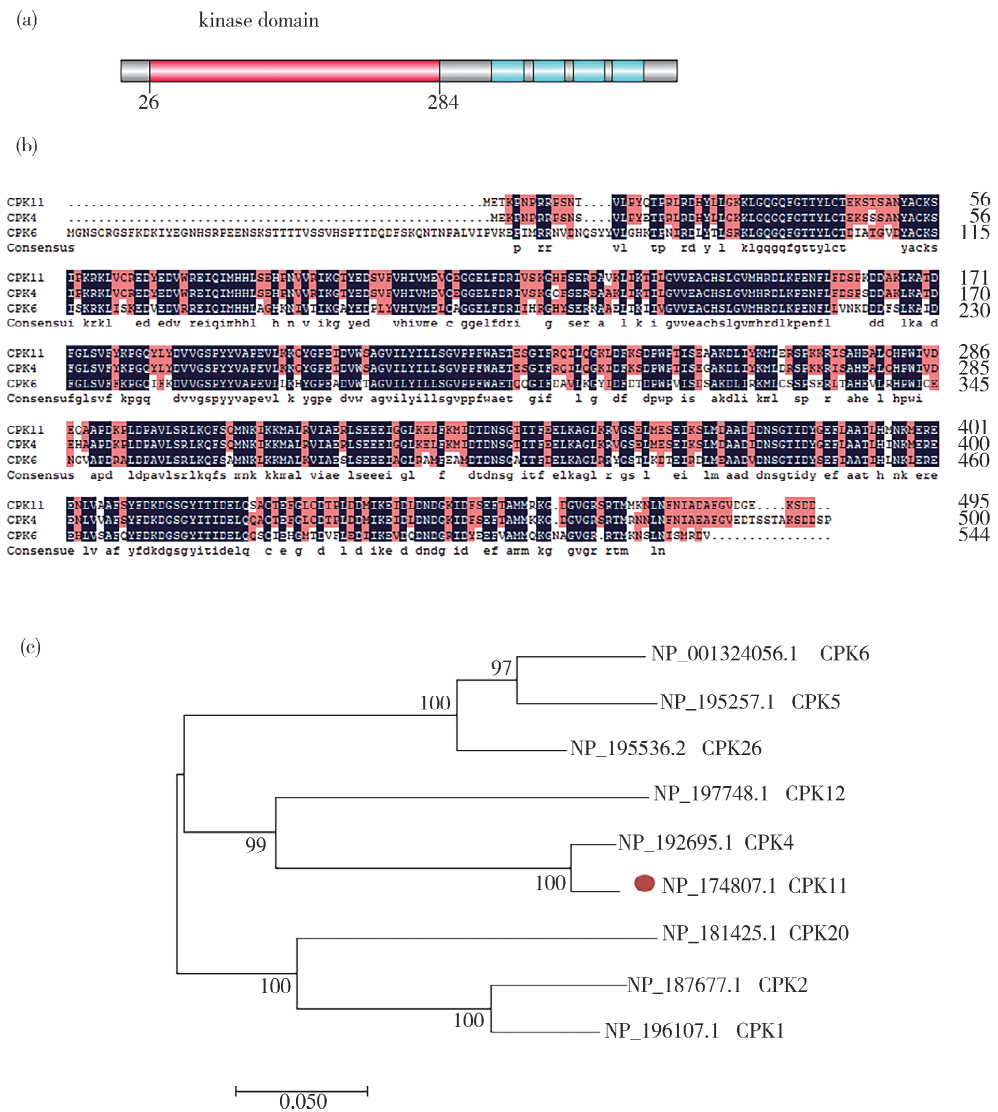


图 1 CPK11 蛋白质二级结构(a)同源氨基酸序列比对(b)及不同 CPKs 进化关系分析(c)
(a)代表蛋白激酶域,代表 EF-手性域;(b)表示完全匹配的氨基酸序列,为部分匹配的氨基酸序列,“.”代表缺失位点;图 C 分支旁的数字表示该节点在 1000 次重复引导验证后的可信度;标尺上的数字为氨基酸替换率
Fig. 1 Protein secondary structure of CPK11(a) and Alignment of CPK11 homologous amino acid sequences(b) and Phylogenetic tree analysis (c)
(a) represents the kinase domain, and represents the EF-hand domain, (b) represents the fully matched amino acid sequences, while represents the partially matched amino acid sequences; “.” represents the missing site, (c) The number next to the branch represents the credibility of the node after 1000 repeated verification. The number on the scale represents the amino acid replacement rate

3.2 酵母双杂交实验验证 CPK11 与 ABF4 体外相互作用

为了探究 CPK11 与 ABF4 是否存在体外相互作用,我们利用酵母双杂交实验进行验证. 首先将构建成功的载体共转入酵母感受态 5 d 左右观察酵母在二缺固体培养基(SD/-Leu-Trp)以及三缺固体培养基上(SD/-Leu-Trp-His)的生长情况. 观察酵母生长情况可以发现阳性对照组 AD-CARK3+BD-RCAR12、阴性对照组 AD-ABF4+BD、AD+BD-CPK11 和实验组 AD-ABF4+BD-CPK11 均能在二缺培养基上长出丘状隆起,颜色呈乳白色的酵母菌落(图 2 左),说明实验体系以及操作正确. 观察酵母生长情况发现共转 AD+BD-CPK11 的酵母感受态在三缺培养基上长出白色菌落,说明 BD-CPK11 具有自激活现象,故在三缺培养基中加入 0.5 mmol/L 的 3AT 抑制此现象. 加入 3AT 的三缺培养基中阳性对照组以及共转 CPK11 与 ABF4 的实验组能够长出乳白色酵母菌落,并且随着稀释倍数的增大酵母菌落逐渐减少,而阴性对照组未长出酵母菌落(图 2 右),证明 CPK11 与 ABF4 两者之间存在体外相互作用.

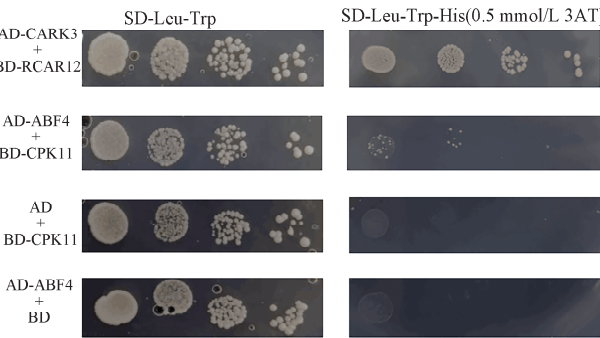


图 2 酵母双杂交实验检测 CPK11 与 ABF4 体外互作
SD-Leu-Trp 表示完全培养基中缺少亮氨酸和色氨酸,SD-Leu-Trp-His 表示完全培养基中缺少亮氨酸和色氨酸和组氨酸;3AT 指的是 3-氨基-1,2,4-三唑;AD-CARK3+BD-RCAR12 作为正对照组;每一组从左到右依次为酵母感受态稀释 1 倍,10 倍,100 倍以及 1000 倍
Fig. 2 Interaction between CPK11 and ABF4 detected by yeast two hybrid assay in vitro

SD-Leu-Trp represents the lack of leucine and tryptophan in the complete medium; SD-Leu-Trp-His represents the lack of leucine, tryptophan and histidine in the complete medium; 3AT refers to 3-amino-1,2,4-triazole; AD-CARK3+BD-RCAR12 as a positive control; the sample is diluted by a factor of 1, 10, 100 and 1000 in each experiment from left to right

3.3 双分子荧光互补实验验证 CPK11 与 ABF4 体内相互作用

CPK11 与 ABF4 除存在体外相互作用外,是否也存在体内相互作用? 为了验证这一猜想我们

随后进行了双分子荧光互补实验. 将阳性对照组 NE-CARK3 + CE-RCAR12, 阴性对照组 NE-CPK11+CE 以及 NE+CE-ABF4, 以及实验组 NE-CPK11+CE-ABF4 的农杆菌液注射烟草细胞 2 d 后,利用共聚焦显微镜在激发光下观察烟草细胞. 荧光结果显示,阳性对照组 NE-CARK3+CE-RCAR12 产生荧光,而阴性对照组 NE-CPK11 + CE 以及 NE+CE-ABF4 未产生荧光,说明实验体系以及操作正确. 实验组 NE-CPK11+CE-ABF4 在激发光下观察到荧光,同时定位在细胞核中(图 3),说明 CPK11 与 ABF4 存在体内相互作用.

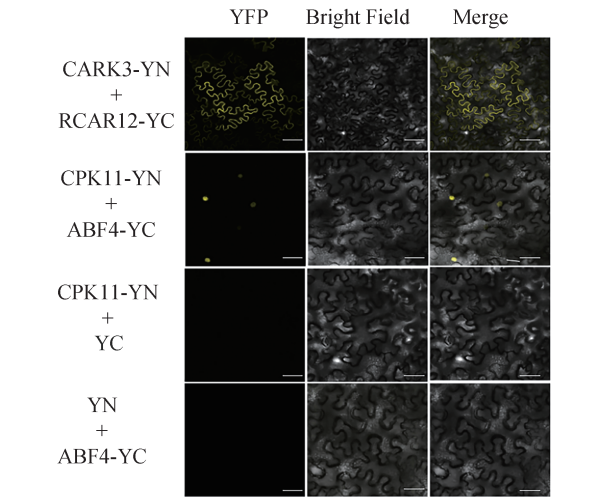


图 3 BiFC 验证 CPK11 与 ABF4 体内相互作用
图片展示的是共聚焦荧光显微镜下烟草表皮细胞
标尺: 25 μ m

Fig. 3 The interaction between CPK11 and ABF4 detected by BiFC in vivo
Photographs show fluorescence confocal images of transiently transformed tobacco epidermal cells. Bars: 25 μ m

3.4 CPK11 同源蛋白 CPK4 与 ABF4 的体内相互作用

通过图 1 序列比对以及亲缘关系分析可知 CPK4 是与 CPK11 高度同源的蛋白质. 蛋白的结构决定蛋白功能,进化关系相近的蛋白往往也具有相似的功能. 因此推测 CPK4 也有可能 与 ABF4 在植物体内具有直接的相互作用. 随后利用双分子荧光互补实验来证明此猜想. BiFC 实验结果显示:阳性对照组 NE-CARK3+CE-RCAR12 产生荧光,而阴性对照组 NE-CPK4+CE 以及 NE+CE-ABF4 未产生荧光,说明实验体系正确. 实验组 CPK4 与 ABF4 在激光下能够产生荧光,证明 CPK4 与 ABF4 存在体内相互作用,且互作定位在细胞核中(图 4).

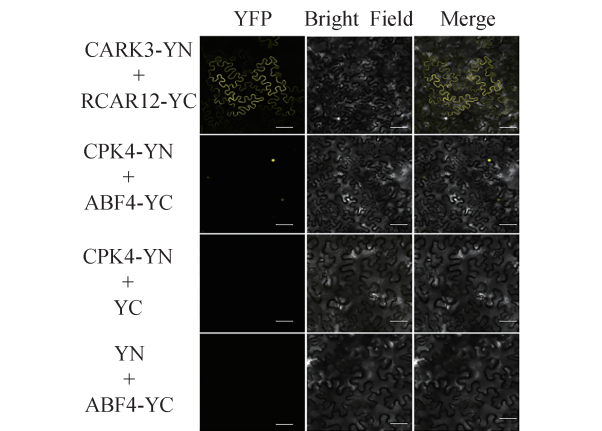


图 4 BiFC 验证 CPK4 与 ABF4 体内相互作用
图片展示的是共聚焦荧光显微镜下烟草表皮细胞
标尺: 25 μm

Fig. 4 The interaction between CPK4 and ABF4 detected by BiFC in vivo
Photographs show fluorescence confocal images of transiently transformed tobacco epidermal cells. Bars: 25μm

4 讨 论

植物激素脱落酸 ABA 在植物生长发育过程中起着关键的调节作用,ABA 信号网络已经被逐步阐明^[17]. 通过对 ABA 信号通路的研究可以明确部分钙依赖蛋白激酶能够正向调控 ABA 信号通路,已知的如 CPK4 和 CPK11^[13] 以及 CPK6^[18]. 拟南芥中 CPK4、CPK11、CPK6 同属于一个亚家族^[3],具有保守的激酶结构域,亲缘关系较近(图 1). 它们在 ABA 信号通路中起正调控作用,可以从其蛋白互作底物角度进行阐释.

之前的文章中报道酵母双杂交实验中 CPK11 与 ABF4 在四缺固体培养基 (SD-Trp-Leu-His-Ade) 不表现出直接的相互作用^[9,19]. 由于蛋白激酶具有自抑制结构域,猜测可能是 CPK11 与 ABF4 的结合位点由于蛋白激酶自抑制结构域的存在而处于出非活性状态,因而表现出较弱的相互作用. 因此,本文在酵母实验中使用三缺固体培养基 (SD-Trp-Leu-His),发现将含有 CPK11 与 ABF4 重组质粒的酵母感受态稀释不同浓度后滴在三缺培养基上能够长出白色酵母菌落,说明两者之间存在体外相互作用(图 2),但是相互作用较弱,因此在更加严格的筛选条件下两者之间相互作用不易被检测到. 通过酵母双杂交实验证明 CPK11 与 ABF4 具有体外相互作用后,本文又通过双分子荧光互补实验进一步证明 CPK11 与 ABF4 在植物体内也存在相互作用(图 3). 同时,本文还证明了 CPK11 的同源蛋白 CPK4 可以与

ABF4 在植物体内发生直接的相互作用(图 4). 结合之前的研究报道 CPK6 可以与正调控因子 ABF3 以及 ABI5 相互作用^[19],说明 CPK 家族中 CPK4、CPK6、CPK11 与钙离子结合之后通过与不同的正调控因子进行相互作用,从而调控下游 ABA 信号通路中相关基因的表达,使植物能够适应环境变化并且迅速作出应答(图 5).

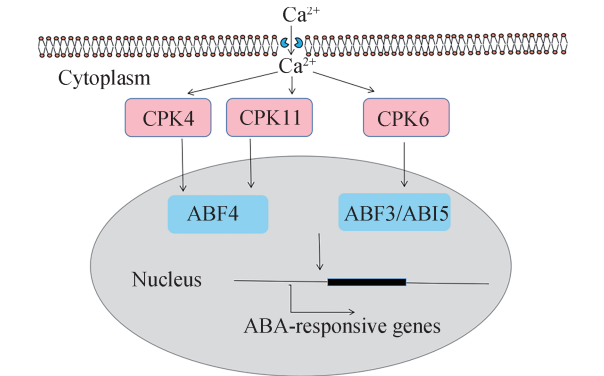


图 5 CPK11 及其同源蛋白在 ABA 信号通路中的工作模型

钙离子通过载体蛋白进入细胞质中,激活 CPK4、CPK11、CPK6,随后上述 CPKs 进入细胞核中与转录因子进行相互作用,最后转录因子激活下游 ABA 信号应答基因
Fig. 5 The working model of CPK11 and homologous proteins in the ABA signaling pathway
 Ca^{2+} enters the cytoplasm through carrier proteins and activates CPK4, CPK11 and CPK6. Then the CPKs enter the nucleus and interact with transcription factors. Finally the transcription factors activate ABA-responsive genes

本文研究 CPK11 与 ABF4 的直接相互作用为钙依赖蛋白激酶家族筛选其潜在底物提供方向,后续可以进一步筛选与 CPK11 蛋白互作的其他底物. 本文对 ABA 信号通路分子机制的研究具有补充与丰富的作用,为此后研究钙依赖蛋白激酶家族参与调控植物的生长发育及抵御逆境胁迫提供理论和实验依据.

参考文献:

[1] Batistic O, Kudla J. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/ CIPK protein kinase network[J]. *Planta*, 2004, 219: 915.

[2] Hetherington A, Trewavas A. Calcium-dependent protein kinase in pea shoot membranes[J]. *FEBS letters*, 1982, 145: 67.

[3] Cheng H S. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 469.

- [4] 麻浩,王爽,周亚丽. 植物中钙依赖蛋白激酶的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40: 565.
- [5] 张翰风. 拟南芥中两个钙相关蛋白激酶调控ABA信号转导的机制研究[D]. 西安:西北农林科技大学, 2019.
- [6] 李希东. 钙依赖型蛋白激酶CPK32调节拟南芥开花时间的机制研究[D]. 北京:中国农业大学, 2015.
- [7] Zhao L N, Shen L K, Zhang W Z, *et al.* Ca^{2+} -dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K^{+} channels in *Arabidopsis* pollen tubes [J]. *Plant Cell*, 2013, 25: 649.
- [8] Gutermuth T, Lassig R, Portes M T, *et al.* Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and Calcium-Dependent protein kinases CPK2 and CPK20 [J]. *Plant Cell*, 2013, 25: 4525.
- [9] 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.
- [10] Kim S Y. The role of ABF family bZIP class transcription factors in stress response [J]. *Physiol Plantarum*, 2006, 126: 519.
- [11] Hong L, Hu B, Liu X, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of a new stress-related AREB gene from *Arachis hypogaea* [J]. *Biol Plantarum*, 2013, 57: 56.
- [12] Kagaya Y. Absciscic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an absciscic acid response element binding factor, TRAB1 [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 3177.
- [13] Zhu S, Yu X, Wang X, *et al.* Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate absciscic acid signal transduction in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19: 3019.
- [14] Choi H, Park H, Park J H, *et al.* *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of absciscic Acid-Responsive gene expression, and modulates its activity [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 1750.
- [15] Zhao R, Sun H L, Mei C, *et al.* The *Arabidopsis* Ca^{2+} -dependent protein kinase CPK12 negatively regulates absciscic acid signaling in seed germination and post-germination growth [J]. *New Phytol*, 2011, 192: 61.
- [16] Sparkes I A, Runions J, Kearns A, *et al.* Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 2019.
- [17] Finkelstein R. Absciscic acid synthesis and response [J]. *Arabidopsis Book*, 2013, 11: e166.
- [18] Zhang H, Liu D, Yang B, *et al.* *Arabidopsis* CPK6 positively regulates ABA signaling and drought tolerance through phosphorylating ABA-responsive element binding factors [J]. *J Exp Bot*, 2019, 71: 188.
- [19] 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.

引用本文格式:

- 中文: 胡搏,刘盈盈,杨毅. 拟南芥钙依赖蛋白激酶CPK11与ABA响应元件结合因子ABF4相互作用的研究[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2022, 59: 026001.
- 英文: Hu B, Liu Y Y, Yang Y. Research on the interaction between CPK11 and ABF4 [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2022, 59: 026001.