

OsCPK12 基因功能研究和互作蛋白筛选

周非凡 刘 瑜 常鑫磊 林拥军

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/国家植物基因研究中心, 武汉 430070

摘要 通过反向遗传学研究方法,构建 *OsCPK12* 基因敲除和超表达突变体,用 150 mmol/L 的 NaCl 进行盐胁迫处理,结果显示:超表达株系无论株高、根长还是叶片状态都优于野生型,而基因敲除突变体相比于野生型株高明显矮化,根的发育形态差,叶片枯黄,证实 *OsCPK12* 对水稻耐盐有正调控作用。用 real-time PCR 对突变体株系的根、叶鞘、叶片多个部位的激素信号转导路径基因的表达量进行分析,结果显示:超表达株系的多个激素受体编码基因和下游调控基因表达量显著上调,说明 *OsCPK12* 参与激素的信号转导并影响水稻抗逆反应。为进一步研究 *OsCPK12* 的基因功能,通过在水稻原生质体中表达融合蛋白进行 *OsCPK12* 的亚细胞定位,确定 *OsCPK12* 定位于质膜。用酵母双杂交的方法在水稻中花 11 膜蛋白文库中筛选到 2 个水通道蛋白 *OsPIP1-1* 和 *OsPIP2-7*,且酵母点对点验证为阳性,推测 *OsCPK12* 可能通过与 *OsPIP1-1* 和 *OsPIP2-7* 互作,调控水分子进出细胞,提高了水稻的耐盐性。

关键词 信号转导; 水稻; *OsCPK12*; 基因敲除; 盐胁迫; 酵母双杂交

中图分类号 S 511.503.53; Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)06-0048-08

水稻在生长发育过程中,会受到高温、低温、干旱、高盐、病原菌等非生物胁迫或者生物胁迫,其正常生长发育将受到影响,导致减产。但水稻在长期进化中也形成了应对逆境的响应机制。钙离子作为重要的第二信使,在植物信号转导中扮演着重要角色。钙依赖蛋白激酶(calmodulin-dependent protein kinase, CPK)作为钙离子的感受器,CPK 能在胞内钙离子浓度达到阈值时与其特异性结合,改变自身构象,激发激酶活性,从而启动下游基因的表达,并介导下游蛋白磷酸化级联反应。典型的 CPK 具有 4 个功能区:依次为 N 端可变区、保守的 Ser/Thr 激酶催化区、自抑制区和 EF 手调控区^[1-2]。EF 手调控区相对于自抑制区保守性较低^[3]。CPK 的活性除了受到钙离子调节,还受到其他物质如 14-3-3 蛋白、脂类等的调节^[4]。有研究表明,CPK 广泛参与植物的抗逆反应^[5-7],因而对 CPK 家族基因开展功能研究可为培育抗逆水稻提供基因资源。在水稻基因组中有 31 个 CPK 基因^[8],CPK 家族基因间存在功能冗余和复杂的信号交叉现象,目前很多 CPK 基因的功能还不清楚。*OsCPK12* 是典型的钙

调蛋白激酶,其 N 端具有豆蔻酰化和棕榈酰化位点,该位点与 *OsCPK12* 亚细胞定位相关。拟南芥和水稻的研究都表明,CPK12 具有耐盐功能。*OsCPK12* 的 *Tos17* 插入突变体和 RNAi 突变体对高浓度 NaCl 更加敏感,超表达突变体对高浓度 NaCl 不敏感,植株有明显的耐盐性^[5]。超表达 *OsCPK12* 基因的水稻家系对 ABA 更加敏感,且更易感染稻瘟病,说明 *OsCPK12* 负调控水稻对 ABA 的响应和稻瘟病的防御过程^[9]。*OsCPK12* 也参与活性氧的清除,通过调节抗坏血酸过氧化物酶 OsAPx2 和 OsAPx8,或 NADPH 氧化酶 Osrboh1 的活性提高植物的耐盐能力^[5]。CPK 不仅影响植物的逆境响应,还参与其早期发育的调控。*AtCPK12* 超表达家系的种子施加一定浓度的 ABA 后,其萌发率与野生型相比明显降低,表明 *AtCPK12* 对种子的萌发起负调控作用^[10]。

CPKs 自身存在多个激酶结合位点且在细胞内广泛分布,它的功能和作用机制有待深入研究^[11]。事实上,CPKs 有众多的作用底物,ABF1 是 *AtCPK12* 的磷酸化底物^[9]; ABF4 是 *AtCPK4*、

收稿日期: 2019-04-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31571753)

周非凡,硕士研究生,研究方向:水稻基因组学。E-mail: zhouff@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 林拥军,博士,教授,研究方向:水稻基因组学。E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

AtCPK11 和 AtCPK12 的互作蛋白^[10,12-13]; PP2C 蛋白磷酸酶 ABI2 是 AtCPK12 的作用底物^[10]; 热激蛋白 HSP1 与 AtCPK10 相互作用^[13]; OsSPS4 和 OsPIP2-1/OsPIP2-6 能被 OsCPK17 磷酸化^[14]。CPKs 和其他信号通路也有交叉, 最常见的是 MAPK 通路。NtCDPK2 表达后会诱导茉莉酸和乙烯的合成, 不促进水杨酸的产生, 但能激活 MAK 路径^[15-16]。本研究通过反向遗传学研究方法, 构建 *OsCPK12* 基因敲除和超表达突变体, 用 150 mmol/L NaCl 进行盐胁迫处理, 研究 *OsCPK12* 的功能, 并通过在水稻原生质体中表达融合蛋白进行 *OsCPK12* 的亚细胞定位, 旨在为抗逆水稻品种的培育提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于遗传转化的品种为梗稻 (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) 日本晴, 用于原生质体分离的幼苗为梗稻中花 11。用于载体构建的菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 、农杆菌菌株 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105。酵母双杂交菌株为 NMY51。所用载体骨架: 超表达载体为 pCambia1300s, 基因敲除载体为 pYLCRISPR/Cas9-MH, 亚细胞定位载体为 Pm999-EYFP, 酵母双杂交 Bait 载体为 pBT3-SUC, Prey 载体为 pPR3-N。

rTaq 酶、dNTP 等常用 PCR 试剂为 TaRaKa 公司产品; 限制性内切酶为 TaKaRa 公司产品, 快切酶为 ThermoFisher 产品; 高保真酶 KOD FX 为 TOYOBO 公司产品, T₄ DNA 连接酶为 NEB 产品。RNA 抽提试剂盒、DNA marker 和钙转感受态等购自北京全式金公司; 反转录试剂购自 ThermoFisher 和 Roche; 组培试剂乙酰丁香酮、潮霉素、水解酪蛋白和 2,4-D 等购自 Sigma 公司; 普通抽提实验所用的乙醇、氯仿、异丙醇、异戊醇等均为国药产品; 去离子甲酰胺和 3-AT 购自上海生工生物工程有限公司; 鲑精 DNA、LiAC、PEG3350 以及原生质体转化所用 NaCl、MgCl₂、CaCl₂、KCl、MES、KOH 等均购自 Sigma 公司; 高质量质粒抽提所用试剂盒为 QIAGEN 的 Plasmid Plus Kit; 引物合成和测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 *OsCPK12* 基因敲除载体的构建

多靶点 pYLCRISPR/Cas9-MH 载体构建方法

源自华南农业大学刘耀光教授课题组^[17-19]。选取 *OsCPK12* 基因组上 CDS 区的 2 个靶位点, 分别为 U₃ 靶点和 U_{6a} 靶点, 构建 gRNA 表达盒, 核酸序列分别为 CTATCACCAGAGGAAATCAAGGG, CCAAGGGGAGCTACTCCGAGCGG (核酸序列 5'-3')。

1.3 *OsCPK12* 超表达载体的构建

OsCPK12 的超表达载体以 pCambia1300s 为骨架, 插入 *OsCPK12* 基因组片段构建而成。在基因片段 5' 端引入 Kpn I 酶切位点, 在 3' 端引入 Bam H I 酶切位点, PCR 扩增出目的片段后加入 6 $\times$ Loading buffer 进行琼脂糖凝胶电泳, 纯化回收目的片段, Kpn I、Bam H I 双酶切纯化回收产物, 再次纯化酶切产物后用 NEB T₄ 连接酶将目的片段连接至终载体。连接产物钙转并进行阳性克隆鉴定。

1.4 农杆菌侵染法转化水稻

所用农杆菌菌株为 EHA105, 受体品种为日本晴。将构建的基因敲除和超表达载体电激转化农杆菌, 通过菌液 PCR 和测序鉴定阳性菌落, 挑取阳性菌株划线, 侵染水稻愈伤, 经过 2 轮潮霉素抗性筛选后得到抗性愈伤, 抗性愈伤分化为幼苗后, 移至生根管中, 待转化苗长至 10~15 cm 时, 炼苗 3 d, 移栽入温室或者大田。

1.5 转化植株分子检测

取 *OsCPK12* 基因敲除突变体叶片, CTAB 法抽提 DNA。

1) 转基因植株阳性检测。以抽提的 DNA 小样为模板, 引物为通用 *hpt* 引物, PCR 体系为 DNA 模板 0.5 μ L; 10 $\times$ PCR buffer 2 μ L; 2 mmol/L dNTP 0.5 μ L; 10 μ mol/L 引物 F 和 R 各 0.2 μ L; rTaq 0.2 μ L; ddH₂O 16.4 μ L。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

2) 植株基因组编辑检测。在第 1 个靶点上游 200~400 bp 设计正向引物, 在第 2 个靶点下游设计反向引物, 通过扩增出的 PCR 条带大小判断基因敲除是否成功, 以及突变体的纯/杂合性。

3) 超表达植株的拷贝数检测 (Southern blot 法)。CTAB 法抽提水稻叶片 DNA, Hind III 酶切 8~10 μ g 基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳后将胶切成尼龙膜大小, 进行转膜, 12~16 h 后将膜烘干, 经预杂交、杂交、洗膜、压片, 最后在暗室显影、定影。

1.6 OsCPK12 突变体盐胁迫处理

选取生长 3 周、整齐一致的 *CPK12* 基因敲除突变体和超表达突变体 T₁ 代水稻苗,以野生型为对照,用 150 mmol/L 的 NaCl 溶液,保持 5 cm 水位线,处理 2 周^[20-21]。

1.7 激素信号路径基因表达量分析

通过对已知的激素信号通路上调控基因的分析,设计了其对应的 real-time PCR 引物,检测这些基因在 *OsCPK12* 超表达植株根、叶片和叶鞘中的表达情况。使用 Roche FastStart Universal SYBR Green Master,每孔分装 5 μ L SYBRMix、2 μ L 引物(F 引物 0.4 μ L+R 引物 0.4 μ L+ddH₂O 1.2 μ L)、3 μ L 模板。PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s;40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算基因的相对表达量。

1.8 OsCPK12 的亚细胞定位

已知 *OsCPK12* 蛋白序列 N 端含有豆蔻酰化和

棕榈乙酰化位点。PSORT 网站预测 *OsCPK12* 蛋白主要定位于质膜上。以载体 Pm999 基本骨架构建 *OsCPK12-EYFP* 融合基因的瞬时表达载体,将瞬时表达载体转化 15 d 左右的水稻幼苗分离的原生质体,培养 12~16 h 之后在激光共聚焦显微镜下观察^[22]。

1.9 OsCPK12 互作蛋白筛选

构建 *OsCPK12* 基因的 Bait 载体,与文库空载体 pPR3-N 共转酵母菌株 NMY51,于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基培养,检测 *OsCPK12* 自激活活性。进行膜蛋白酵母双杂筛库时,用已转入 Bait 载体的酵母菌液制作酵母转化感受态 200 mL,收集菌体后在 PEG/LiAC 介导下转入 28 μ g 文库质粒并涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 1 周。将 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培养基上长出的转化子用载体的特异引物进行菌落 PCR,测序并比对后得到候选目的蛋白。

表 1 载体构建中所用的引物序列

Table 1 Primer sequences used in vector construction

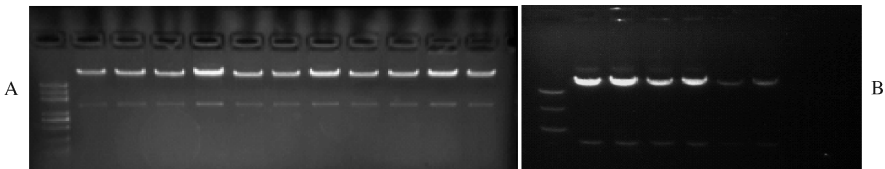
引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	作用 Function
CR12U3-F	GGCACTATCACCAGAGGAAATCAA	CRISPR 载体 CRISPR.vector
CR12U3-R	AAACTTGATTTCCTCTGGTGATAG	
CR12U6a-F	GCCGCAAGGGGAGCTACTCCGAG	
CR12U6a-R	AAACCCAAGGGGAGCTACTCCGAG	
U-F	CTCCGTTTACCTGTGGAATCG	
gRNA-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC	编辑效率检测 Editing efficiency detection
Cr12D-F	CAACATCGCGGAGTTCAGGG	
Cr12D-R	CCAACCTTCAGTTCTTCAACCG	
Bt3-N(SUC)-F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCATG GGCAACTGCTTCACCAAG	酵母 BD 载体 Bait vector for yeast
Bt3-N-R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCTCA GGTTTGTATTCTTTTCTCATC	
BtSUC(STE)-R	AACTGATTGGCCGAGGCGGCCCC GGTTTGTATTCTTTTCTCATCATTTCC	
BtSTE-F	ATTAACAAGGCCATTACGGCCGGCAA CTGCTTCACCAAGAC	
P12-F	GACTCTAGCATCGATGAATTCATGG GCAACTGCTTCACCAAG	亚细胞定位 Subcellular localization
P12-R	CTTGCTCACCATGGCTCTAGAGGTT TGTATTCTTTTCTCATC	
DPIP1-1-F	GTATCAACGCAGAGTGGCCATTACG GCCATGGAGGGGAAGGAGGAGGAC	酵母中验证 Verification in yeast
DPIP1-1-R	ATCGAATTCTCGAGAGGCCGAGGCGGCCT TAAGACCTGCTCTTGAATGGGATCGCC	
DPIP2-7-F	GTATCAACGCAGAGTGGCCATTACG GCCATGGCGTCAAGGAGGAGGTG	
DPIP2-7-R	ATCGAATTCTCGAGAGGCCGAGGCGGC CTCACGCCGTACGCTGGTGCTCCTGAA	

2 结果与分析

2.1 *OsCPK12* 突变体构建和检测

将构建的 CRISPR/Cas9 载体和超表达载体 (图 1A 中酶切 CRISPR 终载体质粒后, 阳性质粒串联的 gRNA 表达盒被 *Mlu* I 酶切开) 转入农杆菌菌株 EHA105, 转化日本晴愈伤, 得到转化苗进行 *hpt*

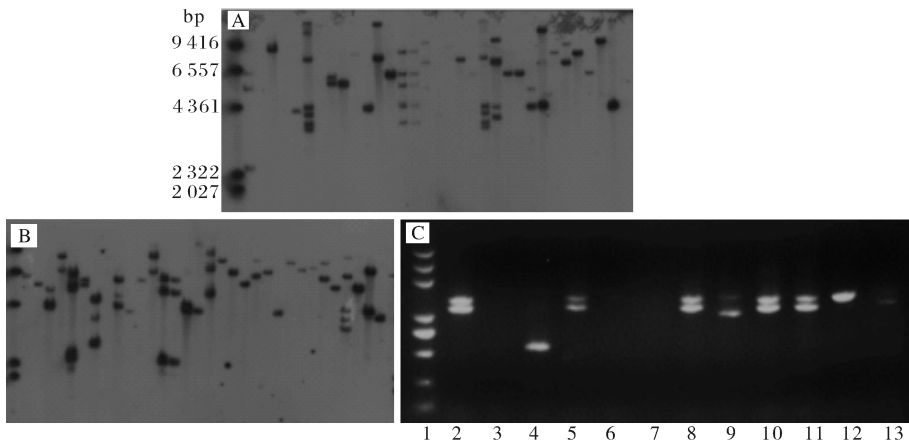
阳性检测, 基因敲除突变体进行基因编辑检测, 超表达突变体于分蘖期前后进行拷贝数检测。在 *OsCPK12* 的 CRISPR/Cas9 基因敲除突变体 T₀ 代得到 1 株纯合的大片段缺失突变体 (图 2C 泳道 4) 和多个杂合大片段缺失突变体。在 *OsCPK12* 超表达 T₀ 代转化植株中得到 28 株单拷贝家系 (图 2A、B 中 Southern blot 单一条带的家系)。



A. *Mlu* I 酶酶切 CRISPR 终载体质粒的琼脂糖凝胶电泳图; B. *Bam* H I、*Kpn* I 双酶切检测 *OsCPK12* 超表达载体质粒。A: Agarose gel electrophoresis of enzyme-excised end vectors PCR; B: Enzyme *Bam* H I, *Kpn* I detection for *OsCPK12* overexpression vector.

图 1 *OsCPK12* 基因敲除和超表达载体构建

Fig.1 Construction for *OsCPK12* knockout and overexpression vector



A、B: *OsCPK12* 超表达突变体的 Southern blot 检测; C: 基因敲除突变体编辑效率的 PCR 法检测, 泳道 4 所代表的植株为纯合突变体。A and B: Southern blot analysis for copy number detection of *OsCPK12* overexpression mutants; C: Gene editing efficiency for knockout mutants was detected by PCR. The plant represented by lane four was homozygous knockout mutant.

图 2 *OsCPK12* 敲除和超表达突变体的分子检测

Fig.2 Molecular detection for the knockout and overexpression mutants of *OsCPK12*

2.2 *OsCPK12* 提高水稻耐盐性

OsCPK12 突变体盐胁迫处理结果表明, *OsCPK12* 的超表达植株对盐胁迫具有明显的耐受性。野生型的植株叶片发黄和干枯, 杂合和纯合的基因敲除突变体则在同样条件下长势更为明显, 呈枯萎状 (图 3A)。株高也表现出明显的差异, 即超表达植株最高, 野生型次之, 敲除突变体明显矮化 (图 3B)。可以确定 *OsCPK12* 正调控水稻耐盐性。

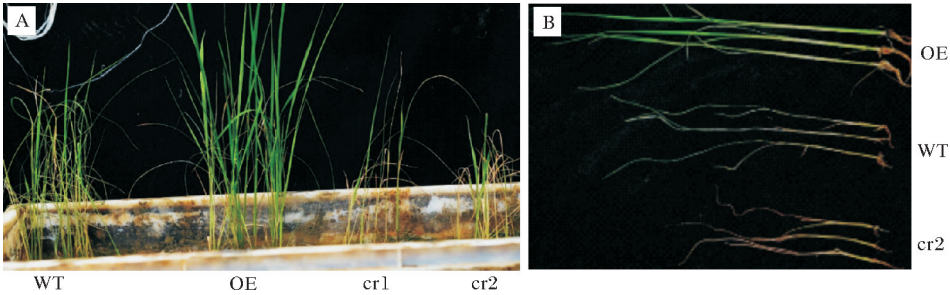
2.3 *OsCPK12* 的亚细胞定位

将构建的 *OsCPK12*-EYFP 融合蛋白表达载体转化水稻原生质体, 培养 12~16 h 后置于激光共聚焦显微镜下观察, 结果 (图 4) 显示, *OsCPK12* 定位

于细胞膜上。

2.4 *OsCPK12* 参与多个激素信号通路

取野生型和单拷贝的 *OsCPK12* 超表达植株的根、叶片和叶鞘 3 个部位样品, 单个样品为 3 个单株的混合样, 抽提 RNA, 反转录, real-time PCR, 以 *Actin* 作为内参基因, 检测 GA、BR、Auxin 等激素的信号通路上调控基因的表达量。结果显示: 生长素正调控基因 *ARF* (图 5A), BR 信号正调控基因 *BAK1*、*BRI1* (图 5B), GA 合成基因 *KIN4A*、*KAO*、*CPS1* (图 5C), 在 *OsCPK12* 超表达株系中有显著上调表达。这暗示 *OsCPK12* 可能参与了 GA、BR 和 Auxin 信号通路。



A: WT 为野生型, OE 为超表达株系, cr1 为杂合基因敲除突变体, cr2 为基因敲除突变体; B: OE 为超表达株系, WT 为野生型, cr2 为纯合基因敲除突变体; A: OE was the over-expressed strain, WT was the wild type, cr1 was the heterozygous gene knockout mutant, and cr2 was the knockout mutant; B: OE was the over-expressed strain, WT was the wild type, cr2 was the homozygous gene knockout mutant.

图 3 *OsCPK12* 突变体和野生型盐胁迫处理
Fig.3 Salt stress treatment of *OsCPK12* mutant and wild type

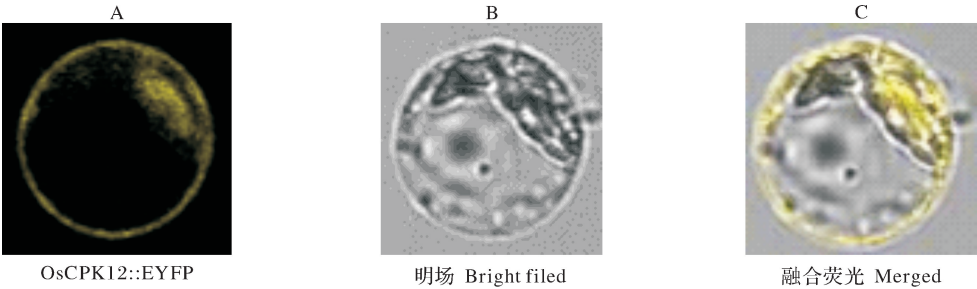
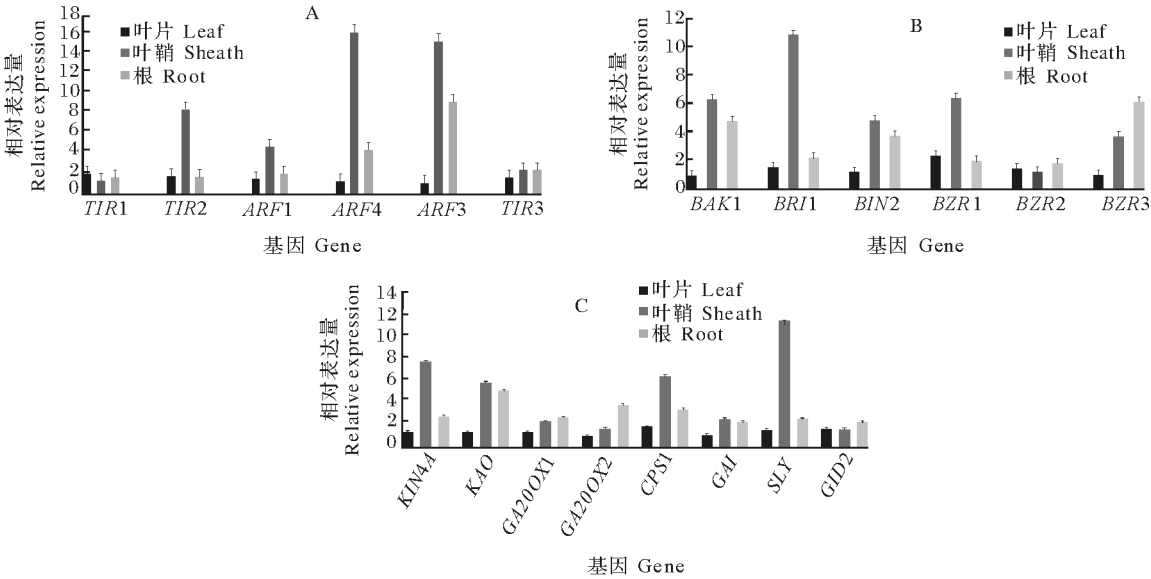


图 4 *OsCPK12* 在水稻原生质体中的亚细胞定位 (*OsCPK12* :: EYFP 表示 *OsCPK12* 和 EYFP 的融合蛋白)

Fig.4 Subcellular localization of *OsCPK12* in rice protoplast (*OsCPK12* :: EYFP is the fusion protein of *OsCPK12* and EYFP)



A: Auxin 途径; B: BR 途径; C: GA 途径; 每个反应进行 3 个技术重复。 A: Auxin pathway; B: BR pathway; C: GA pathway. Each reaction was repeated three times.

图 5 *OsCPK12* 超表达株系中激素路径调控基因表达量差异

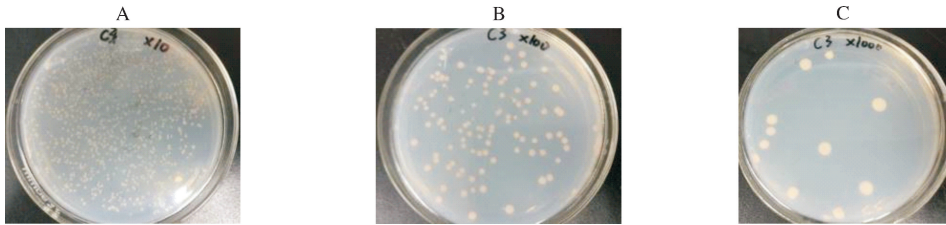
Fig.5 Expression difference of hormonal pathways regulatory genes in *OsCPK12* overexpression lines compared with the wild-type

2.5 *OsCPK12* 互作蛋白筛选

DUAL membrane 系统膜文库使用的 cDNA 为野生型中花 11 水稻全生育期各个器官组织的 cDNA。选择合适的 BD 载体 pBT3-SUC,自激活检测表明,*OsCPK12* 无自激活现象。筛库后,通过效

率平板计算得到转化效率为 2.3×10^7 ,其覆盖度满足筛库要求。

比对水稻基因组数据库排除假阳性的序列后,得到 8 个候选互作蛋白,包括具有乙酰辅酶活性的蛋白、内质网蛋白、核糖体蛋白、叶绿体蛋白、细胞构



A、B、C 分别为转化菌液稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍涂布的平板。A、B 和 C respectively represents the plate which was smeared with transformation of bacteria liquid diluted 10,100,1 000 times.

图 6 文库筛选的转化效率平板

Fig.6 Conversion efficiency plate for library screening

表 2 *OsCPK12* 的候选互作蛋白

Table 2 Candidate interaction proteins for *OsCPK12*

编号 Number	基因 ID Gene ID	功能描述 Functional description	编码区全长/bp Length of coding region
1	Os11g0549700	催化活性 Catalytic activity	1 656
2	Os02g0666200	水通道蛋白 <i>OsPIP1-1</i> Water channel activity <i>OsPIP1-1</i>	870
3	Os08g0179900	细胞组分蛋白 Cellular component	903
4	Os09g0534200	内质网滞留信号结合蛋白 ER retention sequence binding protein	819
5	Os04g0606800	内质网滞留信号结合蛋白 ER retention sequence binding protein	837
6	Os09g0541000	水通道蛋白 <i>OsPIP 2-7</i> Water channel activity <i>OsPIP2-7</i>	873
7	Os01g0242900	RNA 结合结构组分 RNA binding structural constituent	471
8	Os04g0675400	叶绿体蛋白 Chloroplast protein	1 461

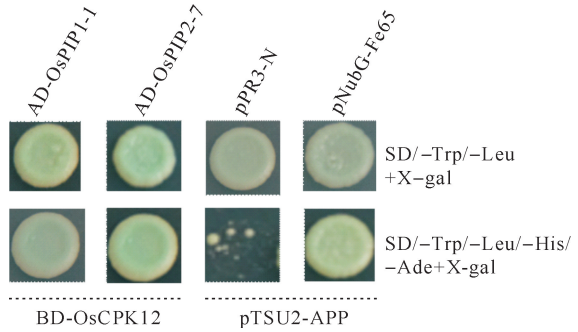
成组分蛋白和水稻水通道蛋白。

2.6 候选互作蛋白的验证

将 *OsPIP1-1* 和 *OsPIP2-7* 基因片段分别插入文库载体 pPR3-N,构成其基因全长的 Prey 载体,与 *OsCPK12* 基因全长的 Bait 载体共转至酵母菌 NMY51 中,于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板培养,从缺陷培养基中随机挑取 3 个菌落转移至加入了 X-gal 的培养基。如果 2 个蛋白互作激活了载体上的 LacZ 元件,则培养基上的菌落呈现蓝色(图 7),结果说明 *OsPIP1-1* 和 *OsPIP2-7* 在酵母验证实验中均和 *OsCPK12* 互作。

3 讨论

本研究通过超表达和抑制表达证实了 *OsCPK12* 的耐盐功能,筛选并验证了 *OsCPK12* 和 *OsPIP1-1*、*OsPIP2-7* 的互作,因此,可以推测 *OsCPK12* 通过与 *OsPIP1-1*、*OsPIP2-7* 互作,调控水分子进出细胞,从而提高了水稻的耐盐性。



pTSU2-APP/pNubG-Fe65 为阳性对照, pTSU2-APP/pPR3-N 为阴性对照。pTSU2-APP/pNubG-Fe65 was the positive control and pTSU2-APP/pPR3-N was the negative control.

图 7 *OsPIP1-1*、*OsPIP2-7* 和 *OsCPK12* 的酵母验证实验

Fig.7 Yeast verification experiments between

OsPIP1-1, *OsPIP 2-7* with *OsCPK12*

在水稻中已有研究证明水通道蛋白和 CPK 互作,即 *OsCPK17* 和 *OsPIP2-6* 互作,且水通道蛋白有磷酸化位点,可以被激酶磷酸化^[14]。水通道蛋白在 ABA 路径上发挥作用,和 CPK 一同增强了植物抗逆性。水稻的水通道蛋白和 CPK12 对种子萌发

和早期的发育起调控作用^[23]。OsPIP1-1 具有调节叶片气孔开关的作用,影响二氧化碳的吸收^[24]。在洪涝、干旱、盐碱、低温、病害等外界胁迫时,水通道蛋白可响应 ABA、SA、IAA 等信号通路,并通过影响细胞的水渗透率调控植物的应激反应。水通道蛋白和 OsCPK12 在功能上类似,且通过本研究结果可认为,OsCPK12 通过磷酸化作用调控 OsPIP1-1 和 OsPIP2-7 的活性,增强水稻抗逆性。

水稻 CPK 家族基因功能具有多样性,且调控网络复杂。对 CPK 基因下一步的研究可以围绕以下几个方面进行:(1)CPK 精细的作用机制。从分子和结构层面上解析 CPK 蛋白如何响应钙离子信号,及其与钙离子结合后的构像变化,EF 手调控区域发挥作用的具体机制。(2)CPK 的作用底物研究。CPK 参与多种路径调节植物的生命活动,与其他多种信号通路也存在交叉。通过分子生物学方法研究其作用机制,不同类型的作用底物可能参与相应的信号路径。(3)CPK 基因在植物抗逆方面的应用。结合实际的生态环境,培育出抗逆品种,应对土地沙化、植被减少、盐碱化等不利环境条件。

参 考 文 献

- [1] BREVIARIO D, MORELLO L, GIANI S. Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinases[J]. Plant molecular biology, 1995, 27(5): 953-967.
- [2] HRABAK E M, DICKMANN L J, SATTERLEE J S, et al. Characterization of eight new members of the calmodulin-like domain protein kinase gene family from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant molecular biology, 1996, 31(2): 405-412.
- [3] WELJIE A M, CLARKE T E, JUFFER A H, et al. Comparative modeling studies of the calmodulin-like domain of calcium-dependent protein kinase from soybean[J]. Proteins, 2000, 39(4): 343-357.
- [4] CAMONI L, HARPER J F, PALMGREN M G. 14-3-3 proteins activate a plant calcium-dependent protein kinase (CDPK) [J]. FEBS letters, 1998, 430: 381-384.
- [5] ASANO T, HAYASHI N, KOBAYASHI M, et al. A rice calcium-dependent protein kinase OsCPK12 oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance[J]. Plant journal, 2012, 69: 26-36.
- [6] DUBROVINA A S, KISELEV K V, KHRISTENKO V S. Expression of calcium-dependent protein kinase (CDPK) genes under abiotic stress conditions in wild-growing grapevine *Vitis amurensis* [J]. Journal of plant physiology, 2013, 170: 1491-1500.
- [7] ZUO R, HU R, CHAI G, et al. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*) [J]. Molecular biology reports, 2013, 40: 2645-2662.
- [8] ASANO T, TANAKA N, YANG G, et al. Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice [J]. Plant cell physiology, 2005, 46: 356-366.
- [9] ZHAO R, SUN H L, MEI C, et al. The *Arabidopsis* Ca²⁺-dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth [J]. New phytologist, 2011, 192: 61-73.
- [10] ZHAO R, WANG X F, ZHANG D P. CPK12: a Ca²⁺-dependent protein kinase balancer in abscisic acid signaling [J]. Plant signal behavior, 2011, 6: 1687-1690.
- [11] 吕丽莎, 程瑾, 司婧娜, 等. CDPKs 在植物适应非生物胁迫过程中的调节作用 [J]. 植物生理学报, 2015, 51(9): 1387-1394.
- [12] 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 physiology, 2005, 139: 1750-1761.
- [13] 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: 3019-3036.
- [14] ALMADANIM M C, ALEXANDRE B M, ROSA M T G, et al. Rice calcium-dependent protein kinase OsCPK17 targets plasma membrane intrinsic protein and sucrose-phosphate synthase and is required for a proper cold stress response [J]. Plant cell and environment, 2017, 40(7): 1197-1213.
- [15] ASAI T, TENA G, PLOTNIKOVA J, et al. MAPK kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity [J]. Nature, 2002, 415: 977-983.
- [16] ROMEIS T, LUDWIG A A, MARTIN R, et al. Calcium dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response [J]. The EMBO journal, 2001, 20: 5556-5567.
- [17] 李希陶, 刘耀光. 基因组编辑技术在水稻功能基因组和遗传改良中的应用 [J]. 生命科学, 2016, 28(10): 1243-1249.
- [18] 彭亚琼, 陈光辉, 李懿星, 等. CRISPR/Cas9 系统的研究进展及其在水稻上的应用 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(22): 128-131, 134.
- [19] MA X L, ZHANG Q Y, ZHU Q L, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants [J]. Molecular plant, 2015, 8: 1274-1284.
- [20] 耿雷跃, 马小定, 崔迪, 等. 水稻全生育期耐盐性鉴定评价方法研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2018, 20(2): 267-275.
- [21] 郑崇珂, 张治振, 周冠华, 等. 不同水稻品种发芽期耐盐性评价 [J]. 山东农业科学, 2018, 50(10): 38-42.

[22] CHEN H,ZOU Y,LIN H,et al. Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants [J]. Plant physiology,2008,146(2):368-376.

[23] LIU C,FUKUMOTO T,MATSUMOTO T,et al. Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination [J]. Plant physiology and biochemistry,2013,63:151-158.

[24] DING L,GAO L M,LIU W,et al. Aquaporin plays an important role in mediating chloroplastic CO₂ concentration under high-N supply in rice (*Oryza sativa*) plants [J]. Physiologia plantarum,2016,156:215-226.

Gene function of *OsCPK12* and screening of its interaction proteins

ZHOU Feifan LIU Yu CHANG Xinlei LIN Yongjun

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/College of Biology Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract The knockout and overexpression mutants of *OsCPK12* were constructed with reverse genetics. The plant height, root length and leaf phenotype of the over-expressed lines was much better than that of the wild type under the 150 mmol/L NaCl treatment. The plant height of knockout mutants was shorter, the root development were affected, and the leaves were withered and yellow compared with the wild type, indicating that *OsCPK12* had positive regulation effect on rice salt tolerance. The results of the expression level of hormone signal transduction pathway genes in different tissues of mutant lines analyzed by real-time PCR showed that expression of multiple hormone receptor coding genes and downstream regulatory genes in the overexpression lines were significantly upregulated compared with the wild-type. It is indicated that *OsCPK12* was involved in signal transduction of hormones, which affected rice stress response. Subcellular localization of *OsCPK12* was done by fusion expression of target protein with fluorescent protein to further characterize the gene function of *OsCPK12* and explain the mechanism. *OsCPK12* was proved to be mostly located in the plasma membrane, laying the foundation for further research. Two water channel proteins, *OsPIP1-1* and *OsPIP2-7* were screened from Zhonghua 11's membrane protein library and its interaction with *OsCPK12* was further confirmed with yeast two-hybrid test. Results indicated that *OsCPK12* may interact with *OsPIP1-1* and *OsPIP2-7* and regulate the entry and exit of water molecules which improve the rice salt tolerance.

Keywords signal transduction; rice; *OsCPK12*; gene knockout; salt tolerance; yeast two-hybrid

(责任编辑:张志钰)