



GbCDPK83 基因在干旱胁迫下的功能鉴定

史光珍,高鑫,朱新霞

(石河子大学 生命科学学院,绿洲城镇与山盆系统生态兵团重点实验室,新疆石河子 832003)

摘要 为了探究 *GbCDPK83* 基因在海岛棉响应干旱胁迫中的功能。利用 PCR 技术克隆 *GbCDPK83* 基因,采用生物信息学方法分析 *GbCDPK83* 蛋白的理化性质、结构特征和在细胞中的位置,通过基因重组技术构建 VIGS 沉默载体并侵染棉花。本研究成功构建了沉默表达载体,沉默植株中 *GbCDPK83* 的表达明显被抑制。干旱胁迫后, *GbCDPK83* 沉默植株叶片比对照萎蔫更严重,相对含水量显著降低,相对电导率和丙二醛含量显著上升,脯氨酸含量升高但低于空载体及非转基因植株。沉默 *GbCDPK83* 使海岛棉耐旱性减弱。

关键词 *GbCDPK83*; VIGS; 干旱; 沉默

中图分类号 Q785;Q789

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)04-0441-07

棉花是重要的经济作物也是最重要的纤维作物之一。干旱是制约棉花产业发展的一大问题,它会使棉花叶片出现萎蔫,棉株生长和发育受阻,对棉花的产量、品质影响非常大^[1-2]。新疆是中国最大的商品棉生产基地,海岛棉纤维品质优良、生育期较长,主要在无霜期较长的南疆种植,而南疆又干旱、少雨,挖掘海岛棉的耐旱基因,提高海岛棉的耐旱性是目前亟待解决的主要问题。

为了应对干旱胁迫,植物需要进行转录调控以尽量减少干旱对植物的危害。钙依赖性蛋白激酶(calcium dependent protein kinase,CDPKs)是一类重要的钙信号感受响应蛋白,当植物处于逆境时,C 端与 EF-hands 结构结合,CDPKs 的活性被激活,从而引发调控过程改变,使得植物细胞的生理生化发生变化,提高植物对不良环境的耐受性^[3]。前期研究报道在拟南芥中,*AtCPK10* 基因可通过参与 ABA 途径,增强植株耐旱性^[4];过表达 *AtCPK8* 可以显著提高转基因植株的抗旱能力^[5];在水稻中,过表达 *OsCDPK7* 可显著提高转基因植株的抗旱能力^[6]。这些研究结果说明 CDPKs 可能参与了植物对干旱胁迫的响应。

病毒介导的基因沉默(virus-induced gene silencing,VIGS)是一种利用 TRV 病毒来构建特异性载体,进行基因转化实现基因沉默的技术,

VIGS 技术在植物抗逆、抗病等相关基因功能鉴定中已被广泛应用^[7]。

绿洲城镇与山盆系统生态兵团重点实验室前期发现, *GbCDPK83* 基因在棉花植株受干旱胁迫时上调表达,为研究该基因对棉花抗旱性的影响,本研究采用基因沉默技术,在棉花幼苗中将 *GbCDPK83* 基因沉默,对沉默植株及对照植株作干旱胁迫处理,通过观察测定沉默植株与对照植株表型差异及生理生化指标变化,探究 *GbCDPK83* 基因的功能,为提高海岛棉抗逆性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

海岛棉 H7124 (*Gossypium barbadense* L. H7124),大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、农杆菌 GV3101、pTRV1(辅助载体)、pTRV2 均由绿洲城镇与山盆系统生态兵团重点实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取及 cDNA 的制备 采集海岛棉幼苗叶片,加液氮充分研磨后,使用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的 RNA 提取试剂盒和反转录 cDNA 试剂盒,按照说明书进行操作,得到海岛棉 cDNA。

收稿日期:2021-06-28 修回日期:2021-10-22

基金项目:国家自然科学基金(31760066)。

第一作者:史光珍,女,硕士研究生,研究方向为遗传学。E-mail:1106517620@qq.com

通信作者:朱新霞,女,博士,副教授,研究方向为植物生物技术。E-mail:302641316@qq.com

1.2.2 *GbCDPK83* 的克隆 从 CottonFGD (<https://cottonfgd.org/>) 数据库中调取 *GbCDPK83* 的序列, 使用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物(表 1)。以反转录的海岛棉 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 体系共 20 μ L: 1 μ L cDNA 模板、1 μ L 混合引物、10 μ L 2 $\times$ Mix、8 μ L ddH₂O 补足体积。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 回收、纯化, 送上海生工生物工程有限公司进行测序验证。

1.2.3 *GbCDPK83* 的生物信息学分析 基于该基因的氨基酸序列, 利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>) 分析蛋白的理化性质; ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale>) 分析蛋白的亲/疏水性; TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) 预测蛋白的跨膜结构域; SignalP-5.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) 分析蛋白的信号肽序列; PRABI-GERLAND (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin>) 预测蛋白的二级结构; SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 预测蛋白的高级结构; SMART MODE (<http://smart.embl-heidelberg.de>) 分析蛋白的结构域; PSORT Prediction (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) 预测蛋白的亚细胞定位信息。

1.2.4 VIGS 载体构建 以 pMD-19T-*GbCDPK83* 为模板进行 PCR 扩增, 所用引物见表 1, 表 1 中的下划线为酶切位点, 得到 VIGS 片段, 对 pTRV2 空载体用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切, 得到线性化载体。将回收所得 VIGS 片段与

pTRV2 线性载体用 T₄ 连接酶连接, 转入 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 及双酶切鉴定, 成功构建载体 pTRV-*GbCDPK83*。

1.2.5 VIGS 沉默及相对表达量检测 选取出苗 10 d 的海岛棉 H7124, 分别向子叶注射含有重组载体 pTRV1/pTRV2-GhCLA1 的农杆菌菌液和含有 *GbCDPK83* 基因沉默载体 pTRV1/pTRV2-*GbCDPK83* 的农杆菌菌液, 以非转基因植株和注射了仅含有空载体的农杆菌菌液的棉花植株作为对照, 置于 25 $^{\circ}$ C 黑暗培养 24 h 后于适宜条件下培养。当 pTRV-GhCLA1 的侵染苗表现出白化后, 分别采集沉默植株(pTRV-*GbCDPK83*) 和对照植株第二片真叶液氮保存, 提取 RNA 反转录成 cDNA, 以 UBQ7 做内参基因, 所用引物见表 1, 利用 SYBR Green 实时定量 PCR 染料对 *GbCDPK83* 基因进行实时荧光定量 PCR, 所得数据用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算获得相对表达量^[8]。

1.2.6 *GbCDPK83* 基因的功能探究 将非转基因棉株(CK)、空载对照棉株(pTRV-00)、试验组(pTRV-*GbCDPK83*) 分为两组, 对其中一组进行干旱胁迫处理, 另一组以正常条件进行培养。培养一段时间后, 观察表型变化, 并取叶片进行相对含水量、相对电导率、脯氨酸含量、丙二醛含量的测定。

2 结果与分析

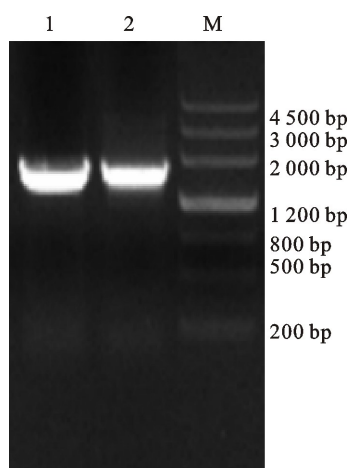
2.1 *GbCDPK83* 基因的克隆

以反转录获取的海岛棉 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *GbCDPK83* 基因, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 1 所示, 克隆得到全长 1 611 bp 的 *GbCDPK83* 基因序列, 测序后比对, 与数据库中的 CDS 序列相一致。

表 1 所用引物

Table 1 Primers used

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	功能 Function
<i>GbCDPK83</i> -F	GGGTGGTTGCCTCACAAAAA	基因克隆 Gene cloning
<i>GbCDPK83</i> -R	TGCTGGGTTCCACTTCTCATC	
<i>GbCDPK83</i> vigs-F	CGGGATCCTTCAACCCAGGTCTACCAC	<i>GbCDPK83</i> 沉默载体 Silencing vector
<i>GbCDPK83</i> vigs-R	CCGCTCGAGAACAATTACCACCAGCACA	
<i>GbCDPK83</i> -qRTF	ACACTGACAACAGTGGCACA	实时荧光定量 PCR qRT-PCR
<i>GbCDPK83</i> -qRTR	CATGTACCGAACTCCTCGT	
UBQ7-F	AGAGGTCGAGTCTTGGGACA	内参基因 Reference gene
UBQ7-R	GCTTGATCTTCTTGGGCTTG	



1,2. PCR 扩增产物; M. DL2000 DNA Marker

1,2 PCR amplified product; M. DL2000 DNA Marker

图 1 PCR 产物电泳图

Fig. 1 The product of PCR amplification

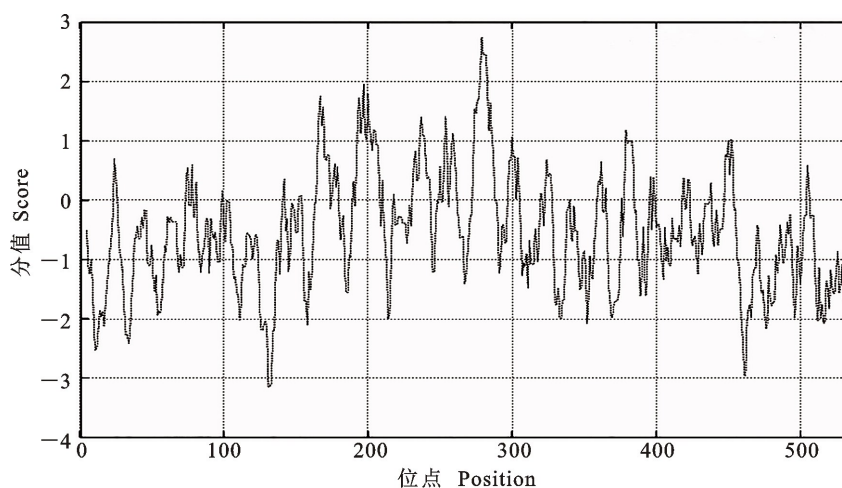


图 2 GbCDPK83 蛋白的亲/疏水性分析

Fig. 2 Hydrophilic/hydrophobic analysis of GbCDPK83 protein

2.2.3 GbCDPK83 蛋白的跨膜结构域分析与信号肽预测 经 TMHMM Server v. 2.0 分析 GbCDPK83 蛋白无跨膜结构域, 为非跨膜蛋白。SignalP-5.0 Server 分析 GbCDPK83 蛋白的信号肽预测评价为 0.003, 而无信号肽(其他)的评价为 0.997, 表明 GbCDPK83 蛋白并不具备信号肽。

2.2.4 GbCDPK83 蛋白的二级结构和三级结构分析 使用 PRABI-GERLAND 预测二级结构, 发现 GbCDPK83 蛋白二级结构组成主要为 α 螺旋(224 个氨基酸残基, 占比 41.79%), 其次为无规卷曲(211 个氨基酸残基, 占比 39.37%), β 转角(48 个氨基酸残基, 占比 8.96%)。使用 SWISS-MODEL 预测三级结构, 发现 GbCDPK83

2.2 GbCDPK83 蛋白的生物信息学分析

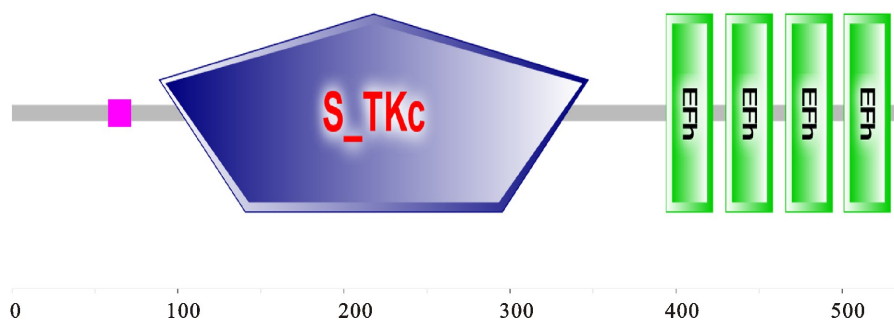
2.2.1 GbCDPK83 蛋白理化性质分析 Gb-CDPK83 共编码 536 个氨基酸, 其中精氨酸和赖氨酸(带正电荷)共计 67 个, 天冬氨酸和谷氨酸(带负电荷)共计 76 个; 单个数目最多的赖氨酸残基(Lys)共 41 个(7.6%), 数目最少的色氨酸残基(Trp)仅 5 个(0.9%)。分子式 $C_{2668}H_{4205}N_{741}O_{810}S_{25}$, 相对分子质量 60 423.72 u, 理论等电点(pI)为 6.09。

2.2.2 GbCDPK83 蛋白的亲/疏水性分析 利用 ProtScale 分析 GbCDPK83 蛋白的亲疏水性, 汇总为图 2 的曲线。其中 131 和 132 位的 Lys 和 Glu 评分最低(-3.144), 即亲水性最高, 而评分最高(2.744)的是 279 位的 Leu, 即疏水性最高。就整体而言, GbCDPK83 蛋白表现为亲水性。

蛋白三级结构空间构象中包含大量的 α 螺旋, 此外还有 β 转角及一些无规卷曲, 与二级结构预测相符。

2.2.5 GbCDPK83 蛋白的结构域分析 结构域预测此蛋白在 89~347 位具有一个 Ser/Thr 蛋白激酶基序, 在 394~422、430~458、466~494、501~529 四个位置, 有 4 个可结合 Ca^{2+} 进而激活其活性的 EF-hands 结构(图 3), 说明 GbCDPK83 蛋白具有 CDPKs 特有的结构。

2.2.6 GbCDPK83 蛋白的亚细胞定位预测 在线分析工具的预测结果: 质膜 0.850, 内质网膜 0.496, 微体(过氧化物酶体)0.306, 叶绿体内膜 0.118, 说明 GbCDPK83 蛋白发挥生物学功能的位点有可能在质膜上。

图 3 *GbCDPK83* 蛋白的结构域预测Fig. 3 Domain prediction of *GbCDPK83* protein

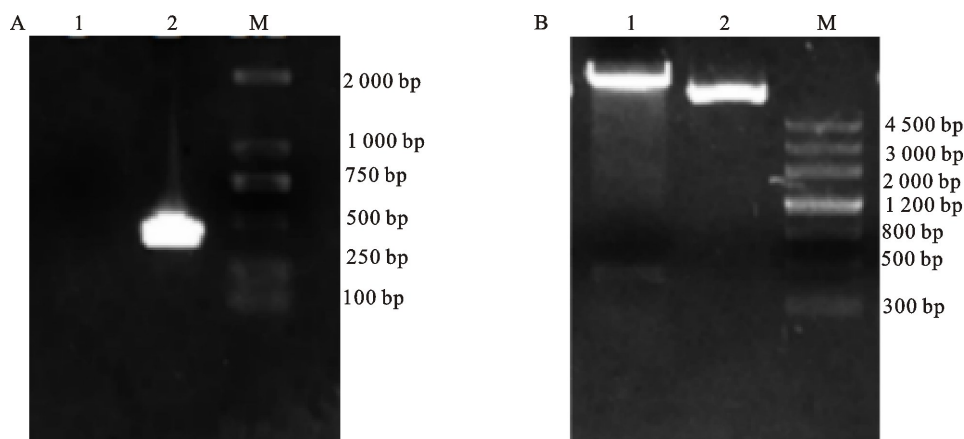
2.3 *GbCDPK83* 的基因沉默

2.3.1 *GbCDPK83* 基因的 VIGS 载体构建 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 4-A, 说明扩增出大小为 403 bp 的 *GbCDPK83* 基因沉默片段。使用 *Bam* H I 和 *Xho* I 对构建的 VIGS 载体进行双酶切鉴定(图 4-B), 发现 VIGS 片段与空载体 pTRV-00 成功连接, 表明沉默载体构建成功。

2.3.2 *GbCDPK83* 基因的沉默及相对表达量测定 VIGS 侵染后的结果如图 5 所示, 注射空

载体和注射 *GbCDPK83* 沉默载体菌液的棉花叶片颜色正常, 未出现白化现象。而注射 GhCLA1 沉默载体菌液的棉花植株, 叶片表现出明显白化, 表明本试验所使用的沉默载体可用于棉花 VIGS 沉默研究。

相对于注射了空载体 pTRV-00 的棉株, 注射 *GbCDPK83* 沉默载体菌液的棉花植株, 表达量极显著降低(图 6), 表明 TRV 体系成功抑制了 *GbCDPK83* 基因的表达。



A. *GbCDPK83* 沉默片段扩增产物; 1. 阴性对照; 2. 沉默片段; M. DL2000 DNA Marker; B. 沉默载体双酶切结果; 1. 双酶切结果; 2. 质粒对照; M. Marker III

A. *GbCDPK83* silent fragment amplification product; 1. Negative control; 2. Silent fragment; M. DL2000 DNA Marker; B. Double digestion detection results of silencing vector; 1. Double digestion result; 2. Plasmid control; M. Marker III

图 4 沉默载体构建

Fig. 4 Construction of gene silencing vector

2.4 *GbCDPK83* 基因的功能探究

2.4.1 干旱胁迫处理后表型变化 自然干旱 10 d 后, 注射 pTRV-GhCLA1 的植株失水萎蔫, 注射空载体和 pTRV- *GbCDPK83* 的植株严重失水枯萎, 注射 pTRV- *GbCDPK83* 的叶片枯萎更严重(图 7-A)。离体叶片在 20%PEG 中, 非转基因植株的叶片萎蔫程度较轻, 注射 pTRV- *GbCD*-

PK83 的沉默植株萎蔫严重(图 7-B)。

2.4.2 生理指标测定结果 在正常状态下, 空载体植株相对含水量最高, *GbCDPK83* 基因沉默植株的相对含水量和非转基因的植株相差不大。干旱胁迫后, 相对含水量均降低, 其中 *GbCD*-*PK83* 基因沉默植株的相对含水量极显著降低(图 8-A)。

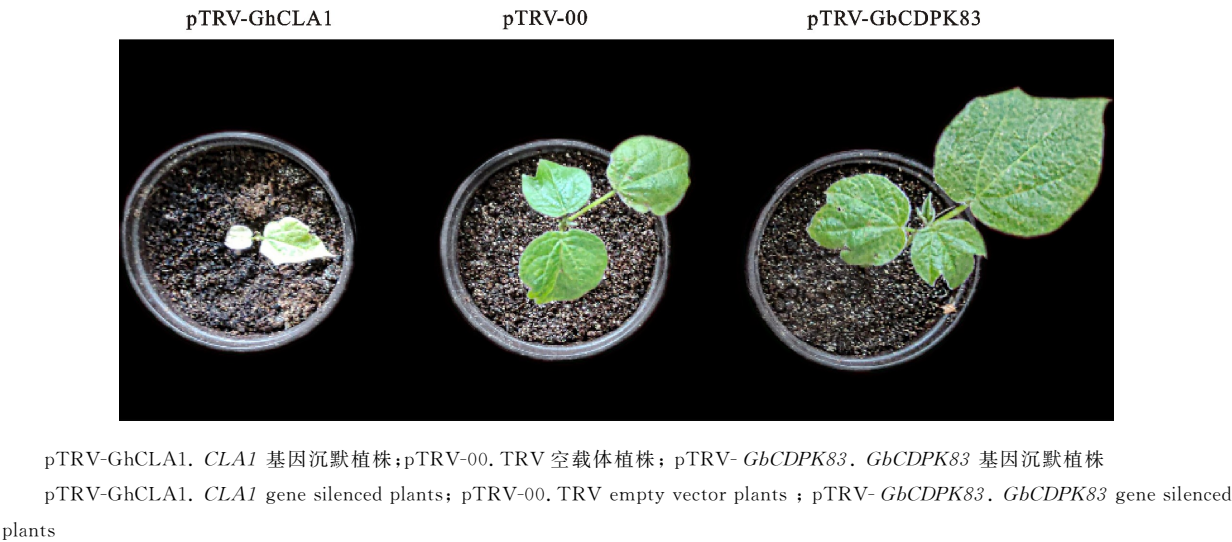


图 5 VIGS 侵染后的棉花

Fig. 5 Cotton after VIGS infection

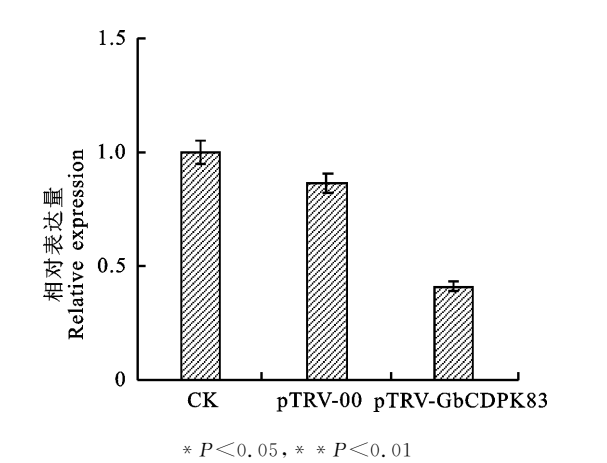


图 6 *GbCDPK83* 的表达

Fig. 6 Expression of *GbCDPK83* in cotton

在正常状态下,空载体植株相对电导率最高,*GbCDPK83* 基因沉默植株的相对电导率最低。干旱胁迫后,相对电导率均升高,其中 *GbCDPK83* 基因沉默植株的相对电导率极显著上升(图 8-B)。

在正常状态下,空载体植株脯氨酸含量最高,*GbCDPK83* 基因沉默植株的脯氨酸含量介于空载体植株和非转基因植株之间。干旱胁迫后,脯氨酸含量均增加,但非转基因植株的脯氨酸含量增加的最多,空载体植株次之,*GbCDPK83* 基因沉默植株增加的最少(图 8-C)。

在正常状态下,空载体植株丙二醛含量最低,*GbCDPK83* 基因沉默植株的丙二醛含量介于非

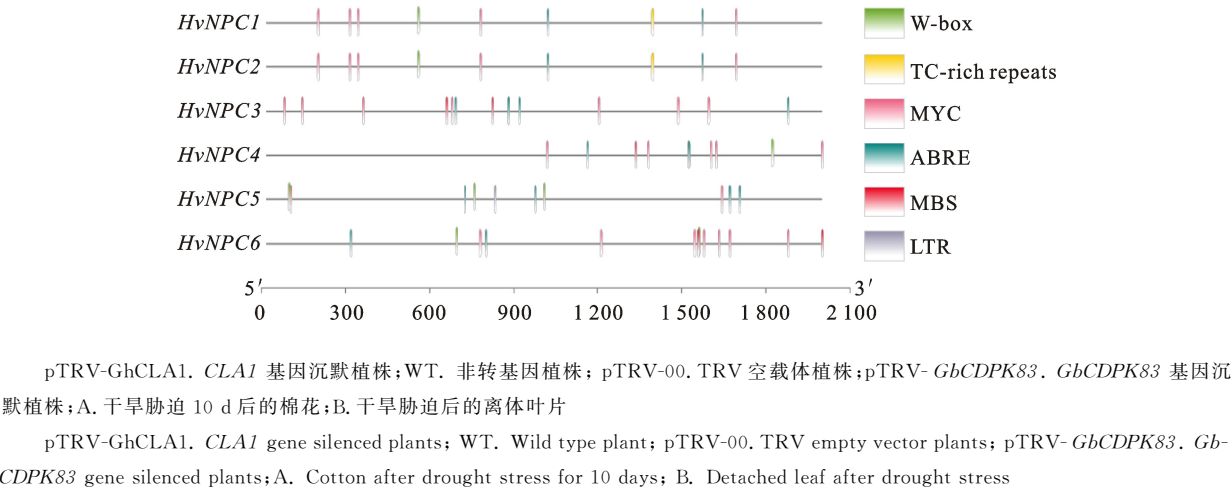


图 7 干旱胁迫后的棉花

Fig. 7 Cotton after drought stress

转基因植株和空载体植株之间。干旱胁迫后,MDA 含量均有升高,*GbCDPK83* 基因沉默植株

的 MDA 含量极显著上升,空载体植株次之,非转基因植株上升的不明显(图 8-D)。

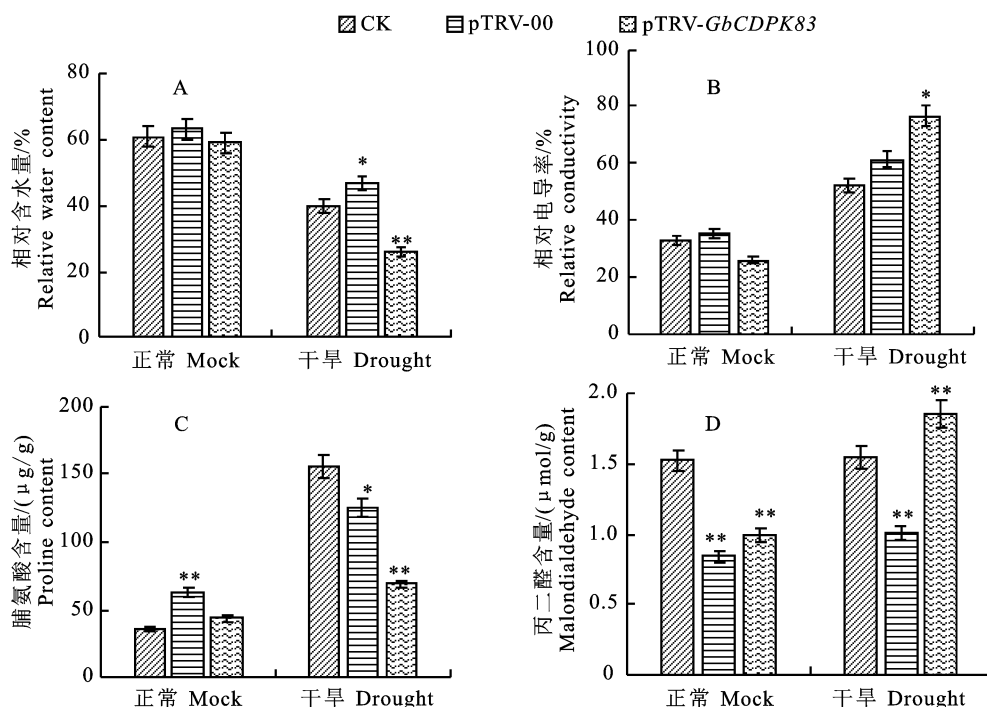


图 8 正常与干旱胁迫状态下生理指标

Fig. 8 Physiological indicators under normal and drought stress

3 讨论

GbCDPK83 蛋白具有 CDPK 家族典型的结构,二级结构和三级结构预测该蛋白主要由 α -螺旋组成,前人研究报道 CDPKs 中 EF-hand 功能域是保守的,该功能域中的保守氨基酸残基多数位于 α -螺旋中,*GbCDPK83* 蛋白具有相同的结构^[9]。

VIGS 技术能够在短期内稳定的将目标基因沉默,进而通过表型、生理生化指标对目标基因进行功能分析^[10]。为了进一步研究 *GbCDPK83* 的功能,本研究利用 VIGS 技术构建沉默表达载体,经分析沉默 *GbCDPK83* 基因前后基因表达量,发现 TRV 体系成功抑制了 *GbCDPK83* 基因的表达。

干旱胁迫下植物的生长发育变缓,其原因就是植物体内水分缺失,造成了渗透物质增加、膜脂过氧化损伤^[11]。丙二醛和电导率是反映植物细胞膜损伤程度的重要指标,干旱胁迫会增加丙二醛含量和电导率^[12]。脯氨酸对维持植物细胞渗透调节的平衡起着重要作用,脯氨酸含量越高,抗旱能力越强^[13],干旱胁迫后,*GbCDPK83* 基因沉默植株的相对含水量显著降低,相对电导率和丙二醛含量显著上升,脯氨酸含量升高但低于空载

体及非转基因植株,可能是 *GbCDPK83* 基因沉默植株中,*GbCDPK83* 基因表达受到了抑制,*GbCDPK83* 蛋白在细胞内的水平降低,响应干旱胁迫时,传递信号的能力受到影响,使得细胞无法及时适应干旱胁迫带来的不利影响,因此受到了比 *GbCDPK83* 基因正常表达植株更严重的细胞膜损伤,渗透调节平衡能力也受到影响。

4 结论

基于 VIGS 技术,成功构建 *GbCDPK83* 基因的沉默载体,获得 *GbCDPK83* 基因沉默棉株。干旱胁迫后,*GbCDPK83* 基因沉默棉株表现为相对含水量显著降低,相对电导率和丙二醛含量显著升高,脯氨酸含量升高但低于空载体及非转基因植株,表明沉默棉株耐旱性减弱。

参考文献 Reference:

- [1] SLETTE I J, POST A K, AEAD M, *et al.* How ecologists define drought, and why we should do better[J]. *Global Change Biology*, 2019, 25(10): 3193-3200.
- [2] 何庆雨, 代建敏, 窦巧巧, 等. 化学调控对干旱后棉花冠层时空分布及产量的影响[J]. *西北农业学报*, 2021, 30(6): 1-10.
- HE Q Y, DAI J M, DOU Q Q, *et al.* Effects of chemical regulation on the temporal and spatial distribution of cotton canopy and yield after drought[J]. *Acta Agriculturae Bore-*

- ali-occidentalis Sinica*, 2021, 30(6):1-10.
- [3] RANTY B, ALDON D, COTELLE V, *et al.* Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 16:327-336.
- [4] ZOU J J, WEI F J, WANG C, *et al.* Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid and Ca^{2+} -mediated stomatal regulation in response to drought stress[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(3):1232-1243.
- [5] ZOU J J, LI X D, RATNASEKERA D, *et al.* Arabidopsis calcium-dependent protein kinase8 and catalase3 function in abscisic acid-mediated signaling and H_2O_2 homeostasis in stomatal guard cells under drought stress[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(5):1445-1446.
- [6] SAIJO Y, HATA S, IZUI K, *et al.* Overexpression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants[J]. *The Plant Journal*, 2000, 23:319-327.
- [7] SENTHIL K M, MYSORE K S. Tobacco rattle virus-based virus-induced gene silencing in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(7):1549-1562.
- [8] PFAFFL M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9):e45.
- [9] SHI S, LI S, ASIM M, *et al.* The Arabidopsis calcium-dependent protein kinases(CDPKs) and their roles in plant growth regulation and abiotic stress responses[J]. *International Journal of Molecular Science*, 2018, 19(7):1900.
- [10] 李建平, 郝晓燕, 黄全生, 等. 棉花 VIGS 病毒载体的构建及其在抗病基因功能鉴定的应用[J]. *新疆农业科学*, 2018, 55(7):1203-1208.
- LI J P, HE X Y, HUANG Q SH, *et al.* Construction of cotton VIGS virus vector and its application in the identification of disease resistance genes[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2018, 55(7):1203-1208.
- [11] 王凯悦, 陈芳泉, 黄五星. 植物干旱胁迫响应机制研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2019, 21(2):19-25.
- WANG K Y, CHEN F Q, HUANG W X. Research progress in plant response mechanism to drought stress[J]. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2019, 21(2):19-25.
- [12] 聂石辉, 齐军仓, 李璐, 等. PEG6000 模拟干旱胁迫对大麦幼苗丙二醛含量及保护酶活性的影响[J]. *新疆农业学报*, 2011, 48(1):11-17.
- NIE SH, QI J C, LI L, *et al.* Effect of drought stress simulated by PEG600 on malondialdehyde content and activities of protective enzymes in barley seedlings[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2011, 48(1):11-17.
- [13] 潘瑞炽, 王小菁, 李娘辉. 植物生理学[M]. 7 版. 北京: 高等教育出版社, 2012:334-336.
- PAN R CH, WANG X J, LI N H. *Plant Physiology*[M]. 7th edition. Beijing: Higher Education Press, 2012: 334-336.

Functional Analysis of *GbCDPK83* Gene under Drought Stress

SHI Guangzhen, GAO Xin and ZHU Xinxia

(College of Life Science, Shihezi University, Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Oasis Town and Mountain-basin System Ecology, Shihezi Xinjiang 832003, China)

Abstract To explore the function of *GbCDPK83* gene in response to drought stress in sea-island cotton. The *GbCDPK83* gene was cloned by PCR technology. The physicochemical properties, structure characteristics and cellular location of *GbCDPK83* protein were analyzed by bioinformatics methods. The VIGS silencing vector was constructed by gene recombination technology and infected cotton. It was found that the expression of *GbCDPK83* was significantly inhibited in VIGS silenced plants. After drought stress, the leaves wilting of *GbCDPK83* silencing plants was more severely than the control, the relative water content was significantly decreased, the relative conductivity and malondialdehyde content increased, and the proline content increased but lower than that of the empty vector and non-transgenic plants. Therefore, the silencing of the *GbCDPK83* gene can weaken the drought tolerance of sea-island cotton.

Key words *GbCDPK83*; VIGS; Drought; Silencing

Received 2021-06-28

Returned 2021-10-22

Foundation item The National Natural Science Foundation of China(No. 31760066).

First author SHI Guangzhen, female, master student. Research area: genetics. E-mail: 1106517620@qq.com

Corresponding author ZHU Xinxia, female, Ph. D, associate professor. Research area: plant biotechnology. E-mail: 302641316@qq.com

(责任编辑: 成敏 Responsible editor: CHENG Min)