

研究报告

Research Report

花生 *AhCDPK32* 基因克隆及表达载体的构建

张青云^{1*} 孙全喜^{2*} 唐月异² 王秀贞² 吴琪² 王云云¹ 曹广英¹ 祁雪¹ 王传堂^{1**}

1 吉林农业大学, 长春, 130118; 2 山东省花生研究所, 青岛, 266100

* 同等贡献作者

** 通讯作者, chinapeanut@126.com

摘要 利用 RT-PCR 方法, 从花生品种“汕油 21”成熟种子中克隆了钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK)基因 *AhCDPK32*, 该序列包含 1 617 bp 开放阅读框, 共编码 538 个氨基酸。核苷酸序列在 NCBI 中进行 Blast 比较, 结果显示与大豆 *GmCDPK32* (GenBank 登录号为 XM_003554131) 基因同源性为 87%。生物信息学分析结果, 预测蛋白质分子量为 60.807 kD, 蛋白质等电点(PI)为 6.96, 蛋白质信号肽分析和疏水性分析, 表明信号肽剪切可能性小, 蛋白质具亲水性。我们构建了该基因超表达载体 pCambia-*AhCDPK32*, 为进一步研究该基因的功能提供了理论基础。这是第一次在花生中克隆到 *CDPK* 基因的报道。

关键词 花生, 钙依赖蛋白激酶, 进化树, 疏水性分析

Cloning and Expression Vector Construction of *AhCDPK32* Gene from Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

Zhang Qingyun^{1*} Sun Quanxi^{2*} Tang Yueyi² Wang Xiuzhen² Wu Qi² Wang Yunyun¹ Cao Guangying¹ Qi Xue¹ Wang Chuantang^{1**}

1 Jilin Agricultural University, Changchun, 130118; 2 Shandong Peanut Research Institute, Qingdao, 266100

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding author, chinapeanut@126.com

DOI: 10.13271/j.mpb.014.001171

Abstract We cloned calcium dependent protein kinase (CDPK) gene *AhCDPK32* from mature seeds of cultivated peanut “shanyou 21” by RT-PCR method and found its sequence contained 1 617 bp ORFs and encoded 538 amino acids. Homology of nucleotide sequence and soybean *GmCDPK32* (XM_003554131) was 87% in NCBI Blast comparison. Bioinformatics analysis showed that predicted protein molecular weight was 60.807 kD and predicted PI was 6.96. Protein signal peptide and hydrophobicity analysis showed that the possibility of the signal peptide shearing was small and the protein was hydrophilic. We constructed the over-expression vector pCambia-*AhCDPK32* of *AhCDPK32* gene to lay theoretical foundation for further research of its function. This is the first report on *CDPK* gene cloned from peanut.

Keywords Peanut, Calcium dependent protein kinase, Phylogenetic, Hydrophobicity analysis

花生制品早已是人们普遍接受的食物, 花生籽仁脂肪含量 50%左右, 其中油酸和亚油酸约占 80%。我国花生多种植于旱薄地, 易遭受干旱、病虫害、低温、营养元素匮乏等胁迫影响, 造成产量和品质下降。通过基因工程技术, 改良花生品质, 增强花生的

抗逆性, 是花生育种工作的重要方向。

植物生长繁殖过程经历种子萌发、生长分化、开花结果, 钙在植物每个生长阶段都发挥着重要作用。花生缺钙时, 生殖生长受到限制, 花生植株矮小、花败育、根系弱小、荚果萎缩腐烂等症状(王传堂和张建

成, 2013)。外界环境胁迫会引起细胞内钙离子浓度瞬时变化, 这种变化能够被钙离子受体或钙离子锚定蛋白接收并解码, 钙离子锚定蛋白将这种信号通过下游反应进行级联放大, 例如相应基因的调控表达及蛋白磷酸化(Sanders et al., 2002)。钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase, CDPK) 存在于多种植物、藻类及原生生物中, CDPK 在植物体内重要作用之一就是参与环境胁迫信号转导。寒冷、干旱、高盐、营养匮乏等都能引起 CDPK 基因特异性表达和 CDPK mRNA 特异性积累(Breviario et al., 1995; Mitra and Johri, 2000)。

Weckwerth 等(2014)在玉米中分离出 39 个 CDPK 基因家族成员 *Zmcpk1* 和 *Zmcpk25* 在玉米寒冷胁迫响应中起到重要的作用。研究表明, 过量表达水稻 *OsCPK7* 基因可以提高转基因水稻的抗寒性, *OsCPK13* 可以提高水稻的耐盐性和抗旱性(Abbasi et al., 2004)。研究发现 *AtCPK6* 是响应高盐和干旱胁迫的正调控因子(Xu et al., 2010)。过量表达水稻的 *OsCDPK12* 基因提高了水稻的耐盐性, 但易受真菌感染(Asano et al., 2012)。迄今在拟南芥中分离得到 34 个 CDPK 基因, 水稻中得到 31 个, 小麦中获得了 20 个, 并且很多基因功能都已得到验证(Liu et al., 2014)。

1 结果与分析

1.1 *AhCDPK32* 基因的克隆

设计引物 *AhCDPK32-F* 和 *AhCDPK32-R*, 以“汕油 21”第一链 cDNA 为模板扩增出 1 617 bp 片段(图 1), 共编码 538 个氨基酸(图 2)。该基因序列, 在 NCBI 上进行 Blast 比较, 结果与大豆已知基因同源率为 87% (基因登录号为 XM_003554131), 与棉花已知基因同源率为 81% (基因登录号为 XM_0126-

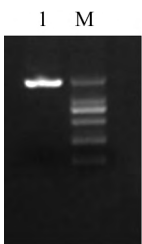


图 1 *AhCDPK32* 基因扩增片段

注: M: Trans2K DNA marker (全式金); 1: *AhCDPK32* 基因 PCR 产物

Figure 1 Amplified fragment of *AhCDPK32* gene

Note: M: Trans2K DNA marker (Trans Gen); 1: PCR product of *AhCDPK32* gene

15254)。将氨基酸序列进行同源性比较, 确定所扩增的 *AhCDPK32* 为花生“汕油 21”的钙依赖蛋白激酶基因。

1.2 生物信息学分析

利用信号肽分析网站, 对花生 *AhCDPK32* 蛋白进行信号肽剪切位点预测, 信号肽分值(图 3)较低, 结果显示, 氨基酸残基发生信号肽剪切可能性较小。对 *AhCDPK32* 蛋白质进行疏水性分析, 结果显示该蛋白具有亲水性(图 4)。

将花生的 *AhCDPK32* 氨基酸序列输入 NCBI 进行保守结构域分析, 发现具有明显的丝氨酸/苏氨酸型蛋白激酶结构域即 pkc-like superfamily 及两个典型的 EF 手型结构域(图 5)。

利用 DNAMAN 对 *AhCDPK32* 氨基酸序列与其它物种来源的 CDPK32 氨基酸序列比对, 并构建系统发育树(图 6; 图 7)。

1.3 植物超表达载体的构建和鉴定

将带有目的 *AhCDPK32* 基因片段的克隆载体和植物表达载体 pCambia2300EC 同时用 *BamH* 进行单酶切(图 8), 回收带有酶切位点 *AhCDPK32* 基因片段以及线性化植物表达载体 pCambia2300EC 片段, 16℃ 过夜连接后, 连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞, 选取阳性克隆进行酶切鉴定正确后, 再测序鉴定。结果表明 *AhCDPK32* 片段已正确地插入到植物表达载体 pCambia2300EC 上, pCambia2300EC-*AhCDPK32* 酶切鉴定(图 9), 载体结构(图 10)。

2 讨论

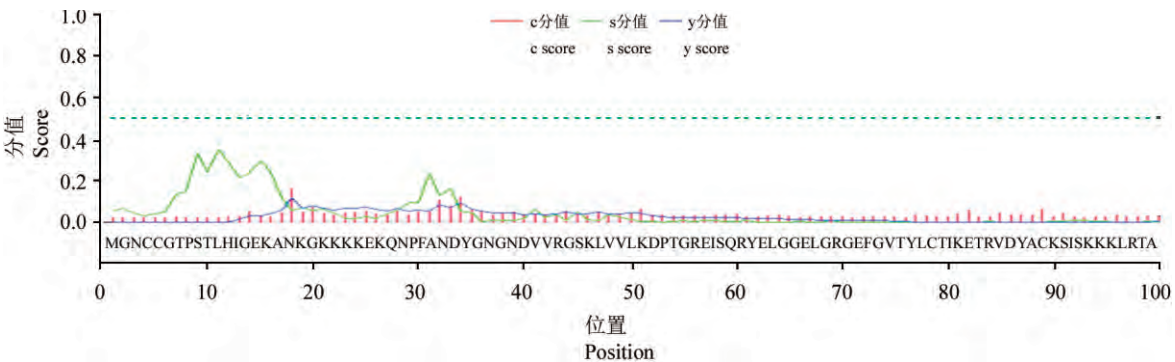
高等植物钙依赖蛋白激酶基因具有庞大的基因家族, 多数基因与植物抗性相关, 还有一些 CDPK 基因参与花粉管的发育, 根的生长, 细胞分裂及细胞凋亡。拟南芥突变体中获得 *AtCDPK32* 基因可以由植物损伤、氯化钠、黑暗诱导表达(Chotikacharoensuk et al., 2006)。拟南芥中过量表达 *CDPK32-GFP*, 发现其与花粉管形成有关联(Zhou et al., 2009)。花生在缺钙条件下, 钙依赖蛋白激酶基因参与负转录调控, 另外, 在花生有丝分裂时期和种子发育阶段, CDPK 也表现出时空表达特性(Jain et al., 2011)。

钙依赖蛋白激酶是单链肽, 从 N 端到 C 端具有典型的四个功能结构域, 分别为可变区、催化区、连接区和调控区。可变区一般由 20~200 个氨基酸残基组成, 很少有同源性, 所以保守性很差。催化区有 300

```

1 : ATGGGTAAGTGTGCGGGACGCCGTCGACTCTCCACGATGGAGAAAAAGGCCAACAAAGGGAAGAAGAAGGAGAAGCAGAACCCCTTC
1 : M G N C C G T P S T L H D G E K A N K G K K K K E K Q N P F
91 : GCAGTTGATTACGGGAACGGAAACGACGTCGTTCTGGCTCGAAGCTCGTCTGTTTGAAGGACCAACGGGTCGCGAGATCTCGCAGCGT
31 : A V D Y G N G N D V V R G S K L V V L K D P T G R E I S Q R
181 : TACGAGCTAGGTGGCGAGCTGGTGTGAGTTCGGAGTACCGTACCTTTGTACGGACAAGGAGACTCGCGTGGACTACCGTGCAAA
61 : Y E L G G E L G R G E F G V T Y L C T D K E T R V D Y A C K
271 : TCGATCTCGAAGAAGAAGCTGAGAACCGCCATAGACATCGAGGATGTTAGGAGAGAGGTTGAAATCATGAGGCACCTTCCCAAGCACCTT
91 : S I S K K K L R T A I D I E D V R R E V E I M R H L P K H P
361 : AACATCGTTTCTTTGAAGGATACTTTTGAAGATGATAGTGCAGTGCATCTTGTATGAGGCTCTGTGAGGGTGGTGGTGTGTTTGGACCGT
121 : N I V S L K D T F E D D S A V H L V M E L C E G G E L F D R
451 : ATCGTTGCCAGGGGCAATTACACGGAGAGAGCCGCTGCGGCTGTTACCAAAACCATCGTTGAAAGTGTTCAGATGTCCACAAACATGGT
151 : I V A R G H Y T E R A A A A V T K T I V E V V Q M C H K H G
541 : GTGATGCACCGGGATCTCAAACCTGAGAACCTTCTGTTTGAATAAAGAAGGAAACAGCAGCTCTCAAGGCTAATTGATTTTGGATTGTG
181 : V M E R A A G I K E G F Q L M D T S N R G K I N I D E L R V G
631 : GTCTTCTTTAAACCAGGGGAAAAGATTAAATGAGATTGTTGGAAGTCCATATTACATGGCTCCTGAGGACTAAAGAGAAATTTAGGCCA
211 : V F F K P G E R F N E I V G S P Y Y M A P E V L K R N Y G P
721 : GAAGTAGATATTTGGAGTGTGGAGTAATCTATACATCTTACTTTGTGGTGTCCCGCCATTTTGGCAGAAAAGTGAACAAGGAGTTGCA
241 : E V D I W S A G V I L Y I L L C G V P P F W A E T E Q G V A
811 : CAGGCAATTATACGATCTGTGGTTGATTTTAAAAGGGAACCATGGCCAAAAGTTTCTGATAATGCGAAAAGACCTTGTGAAGAAGATGCTT
271 : Q A I I R S V V D F K R E P W P K V S D N A K A D L V K K M L
901 : GATCCTGCACCTAAGCGTTCGCTTACTGCAACAAGATGTTAGATCATCCATGTTGCAAAATGCAAGAAGGCCCTAATGTTTCATTA
301 : D P D P K R R L T A Q E V L D H P W L Q N A K K A P N V S L
991 : GGAGAACTGTCAAAGCAAGGCTCATGCAATTTCTGTAATGAACAAGCTTAAGAAGAGAGCTTTGAGGGTGTATTCAGAGCATTGTCT
331 : G E T V K A R L M Q F S V M N K L K K R A L R V I A E H L S
1081 : GTAGAAGAAGCGGCTGGAATAAAGAGGGATTCCAGCTCATGGATACAAGCAATAGAGGCAAAATTAACATCGATGAACACGAGTAGGG
361 : V E E A A G I K E G F Q L M D T S N R G K I N I D E L R V G
1171 : TTGCAAAAAGTAGGCCATCAAGTTCAGAGTCAGATCTCCTAAATCTTATGGAAGCTGGTGTAGATAAGGATGGGTACCTAGATTAT
391 : L Q K L G H Q V P E S D L Q I L M E A G D V D K D G Y L D Y
1261 : GGAGAGTTTGTAGCCATTTCTGTTCATCTGAGAAAGATGGAAATGATGAGCACCTTCGCAAAGCCTTCCAGTTTTTTGATCAGAACC
421 : G E F V A I S V H L R K M G N D E H L R K A F Q F F D Q N Q
1351 : AACGGATATATTGAAATGGAGGAGCTGCGTAGCGCTTGCATGATGAGGTCGATGCAAAACAGCGAAGATGTCATAAGTGAATATGCA
451 : N G Y I E M E E L R S A L H D E V D A N S E D V I S A I M H
1441 : GATGTGGACACAGATAAGGATGGAAGAATAAGTTATGAGGAATTGCGCCAGATGTAAGGCCGGCACAGATTGGAGAAAAGCATCGAGA
481 : D V D T D K D G R I S Y E E F A T M M K A G T D W R K A S R
1531 : CAGTATTCGCGAGAGAGATTCAAGTCTCAGTCTCAAATTTGATGAAGGATGGCTCATTGTCGITAACAATGAGGGTCATAGATGA
511 : Q Y S R E R F T S L S L K L M K D G S L S L N N E G H R *

```

图2 *AhCDPK32* 基因核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Figure 2 Nucleotide acid sequence and deduced amino acid sequence of *AhCDPK32* gene图3 *AhCDPK32* 信号肽预测Figure 3 Signal peptide prediction of *AhCDPK32*

多个氨基酸残基, 同源性比较高, 具有典型的丝氨酸/苏氨酸型蛋白激酶拥有的 11 个高度保守的亚结构域, 即 I-XI 区(Hrabak et al., 2003)。连接区由 20~30 个氨基酸残基组成, 最为保守, 调控区具有与钙离子结合的 EF 手型结构, 保守性最低。

AhCDPK32 氨基酸序列保守结构域分析, 含有 2 个 EF 手型结构, 以及同源性较高的 I-XI 区。表明

克隆的该基因是 CDPK 同源基因。*AhCDK32* 第二位氨基酸为甘氨酸, 暗示可能含有与膜定位有关的豆蔻酰化位点(Martin and Busconi, 2008)。由于 *AhCDK32* 在花生成熟种子中克隆得到, 推测该基因可能参与花生种子的发育或者与某些抗性相关。本实验中构建的 pCambia2300EC-*AhCDPK32* 超表达载体, 为进一步研究该基因在花生中的功能奠定了基础。

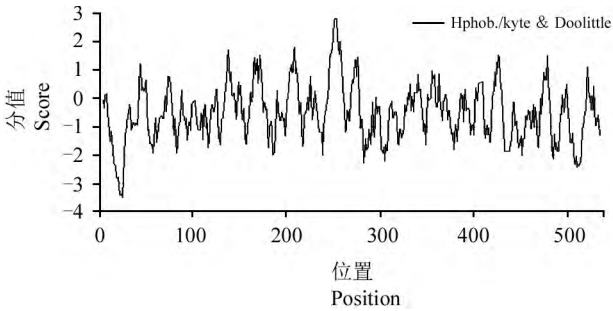


图 4 AhCDPK32 疏水性分析
Figure 4 Hydrophobicity analysis of AhCDPK32

3 材料与方法

3.1 植物材料及载体来源

试验所用植物材料花生种子“汕油 21”由山东省花生研究所提供,植物表达载体 pCambia2300EC (添加了 35S 启动子以及 Nos 终止子的 pCambia2300 载体)由山东农业大学亓宝秀教授馈赠。

3.2 引物和测序

AhCDPK32 基因测序所用引物为通用引物 M13-47 和 M13-48。

AhCDPK32 基因克隆所用引物: AhCDPK32-F: 5'-GGATCCATGGGTAAGTCTGCGGGACG-3', AhCDPK32-R: 5'-GGATCCTCATCTATGACCCTCAT TG-3' (斜体部分的碱基代表 BamH 内切酶识别位点) 本实验所用引物的合成及测序均由上海桑尼测序公司完成。

3.3 目的基因的克隆

利用拟南芥 *AtCDPK32* 序列 (GenBank 登录号 NM_115613.3) 在花生基因组数据库 (<http://www.peanutbase.org>) 中进行 Blast 获得可能的 AhCDPK32 基因序列。根据预测基因开放阅读框,利用 DNA-Club 设计扩增全长的引物 AhCDPK32-F 和 AhCDP-

K32-R。

以花生“汕油 21”第一链 cDNA 为模板,以 AhCDPK32-F 和 AhCDPK32-R 为引物进行扩增。PCR 反应体系为 50 μ L HiFi Mix (北京全式金生物技术有限公司) 25 μ L AhCDPK32-F (10 μ mol/L) 和 AhCDPK32-R (10 μ mol/L) 各 2 μ L cDNA (100 ng) 2 μ L ddH₂O 19 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min 预变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环数, 72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。

琼脂糖凝胶检测扩增的基因产物,参照 BIOMIGA 胶回收说明书回收目的基因片段。用 PCR 仪控温在 16 $^{\circ}$ C, 过夜连接回收的目的基因片段与载体 pMD18-T 构成 pMD18-T-AhCDPK32 重组质粒,并转化 Trans-T1 (北京全式金生物技术有限公司) 感受态细胞。选择新制备的 100 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基 (含 IPTG 和 x-Gal) 用涂布器均匀涂布转化产物, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养 12 h 后, 随机挑取白色单菌落, 菌落 PCR 鉴定, 挑选阳性克隆测序。

3.4 生物信息学分析

测序结果输入 NCBI 中 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 利用 Blastn 和 Blastp 进行基因序列和蛋白质序列相似性分析。利用 DNAMAN 预测蛋白质的分子量和等电点, 在 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/> 网站中进行信号肽预测, 将 DNAMAN 翻译的蛋白质序列输入 <http://web.expasy.org/protscal/> 网站, 分析预测的蛋白质疏水性, 保守结构域在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> 上分析, 利用 DNAMAN 构建系统发育树。

3.5 植物超表达载体的构建

参照天根质粒小提试剂盒说明书提取 pMD18-T-AhCDPK32 和 pCambia2300EC 质粒, 分别用 BamH (Thermo 公司) 切割, 酶切体系分别为 pMD-

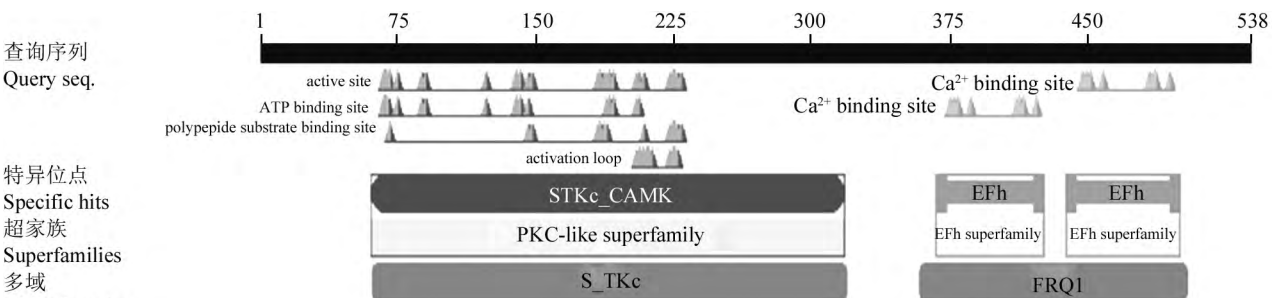


图 5 AhCDPK32 氨基酸保守结构域分析
Figure 5 Conservative domain analysis of AhCDPK32 amino acid

AHCDPK32	:	MGNCCGTPSTLHDGEKANKGKKKKEKQNPFAVDYGNNGNDVVRGS KLVVLKDP	PTGR	55
1	:	MGNCCATP STDETANKKGGKGGKENPFAIDYGFNAAAAANGS KLTVLKS	PTGR	53
2	:	MGNCCATPSTTASHEK KEKKGKKKQNPFSLDYGGHHHNG . GH KLTVLND	PTGG	53
3	:	MGNCCATPPVTGEETNNNNKKNKKPKKENPFAIDYNFNANNTN S KLTVLKDP	PTGR	56
4	:	MGNCC TNPITKLR RKEKPKKHGPTTKNKTKIKN TLVVLK	KKPTGR	46
5	:	MGNCCVTPPQTGS PLKNK . KNKPNPFAIDYVVANGG KLSVLK	KNPTGT	46
6	:	MGNCCAVPSTTDDID EQKRGKNKPNPFS THNHGNGGY NSYVLEN	PTGH	47
7	:	MGNCCGTAGSFPQND NKPKKGNKQNPFSIDYGLHHNGGGGG LKLTVLS	DP	57
8	:	MGNCCGTAGSLAQND NKPKKGRKKQNPFSIDYGLHHGGDGGGRPLKLI	VLNDPTGR	57
AHCDPK32	:	EISQRYELGGELGRGEFGVITYLCTDKETRVDYACKSISKKLRRTAIDIEDVRREVEIMRHL		116
1	:	EIEARYELGRELGRGEFGITYLCTDKETGEELACKSISKKLRRTAIDIEDVRREVEIMRHL		114
2	:	EIEQRYELGRELGRGEFGITFLCTDKETGDTFACKSISKKLRRTAVIDIEDVRREVEIMKHL		114
3	:	EIEVRYELGRELGRGEFGITYLCTDKENGEELACKSISKKLRRTLVIEDVRREVEIMKHM		117
4	:	EILQQYELGRELGRGEFGITYLCTDKDRETGEELACKSISKDKLRRTAIDIEDVRREVEIMRHL		107
5	:	EIEQTYELGRELGRGEFGITYLCTDKATNENYACKSISKQKLRRTAVIDIEDVRREVEIMKHL		107
6	:	DIETTYELGRELGRGEFGVITYLCTEKATGEFYACKSISKKLRTRIDIEDVRREVEIMKNL		108
7	:	EIEQKYTLGRELGRGEFGVITYLCTDKETGEVLACKSILKDKLRRTAVIDIEDVRREVEIMRHM		118
8	:	EIESKYTLGRELGRGEFGVITYLCTDKETDDVFAKSILKDKLRRTAVIDIEDVRREVEIMRHM		118
AHCDPK32	:	PKHPNIVSLKDTFEDDSAVHLVLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAAAVTKTIVEVVMQCH		177
1	:	PQHPNIVTLKDTYEDDNAVHLVLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAAAVTKTIVEVVMQCH		175
2	:	PHHPNIVTLKDTYEDDNAVHLVLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAAAVTKTIVEVVMQCH		175
3	:	PKHPNIVTLKDTYEDDNAVHLVLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAAAVTKTIVEVVMQCH		178
4	:	PKHPNIVTLKDTYEDDNAVHLVLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAATVKTIVQVVMQCH		168
5	:	PKHPNIVSLKDTYEDDNAVHLVLMELCEGGELFDRIVSRGHYTERAAAAVTKTIVEVVMQCH		168
6	:	PQHPNIVTLKDTYEDDI AVHLVLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAAAVTRTIVEVIMQCH		169
7	:	PEHPNIVTLKETYEDEYAVHLVLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAAAVTKTIEVVMQCH		179
8	:	PEHPNVVTLKETYEDEHAVHLVLMELCEGGELFDRIVARGHYTERAAAAVTKTIMEVVMQCH		179
AHCDPK32	:	KHGVMRDLKPENFLFANKKETAALKAIDFGLSVFFKPGER NEIVGSPYYMAPEVLKRN		238
1	:	KQGVMRDLKPENFLFANKKETAALKAIDFGLSVFFKPGER NEIVGSPYYMAPEVLKRN		236
2	:	KHGVMRDLKPENFLFANKKETAALKSIDFGLSVFFKPGEI TEIVGSPYYMAPEVLKRN		236
3	:	KHGVMRDLKPENFLFANKKETAALKAIDFGLSVFFTPGK NEIVGSPYYMAPEVLKRN		239
4	:	EHGVMRDLKPENFLFANKKETSPLKAIDFGLSITFKPGDK NEIVGSPYYMAPEVLKRN		229
5	:	KHGVMRDLKPENFLFANKKETAPLKAIDFGLSVFFKPGER SEIVGSPYYMAPEVLKRN		229
6	:	KHGVMRDLKPENFLFANKKETAPLKAIDFGLSVFFKPGER NEIVGSPYYMAPEVLKRN		230
7	:	KHGVMRDLKPENFLFANKKETAPLKAIDFGLSVFFKPGER NEIVGSPYYMAPEVLKRN		240
8	:	KHGVMRDLKPENFLFANKKETAPLKAIDFGLSVFFKPGER NEIVGSPYYMAPEVLKRN		240
AHCDPK32	:	GPEVDIWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQQVAQAIIRSVVDFKREPWPVKVSDNAKDLVKKM		299
1	:	GPEVDIWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQQVAQAIIRSVVDFKRDWPVKVSDNAKDLVKKM		297
2	:	GREVDVWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQQVAQAIIRSVVDFKRDWPVKVSDNAKDLVKKM		297
3	:	GPEVDIWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQQVAQAIIRSVVDFKRDWPVKVSDNAKDLVKKM		300
4	:	GPEIDIWSAGVILYILLCGI PPFWAETEQQTAQAIIRSVVDFKREPWPVKVSDNAKDLIKKM		290
5	:	GPEVDVWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQQVAQAIIRSVVDFKRDWPVKVSDNAKDLVKKM		290
6	:	GPEVDVWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQQVAQAIIRSVVDFRRDPWPVKVSDNAKDLVKKM		291
7	:	GPEVDIWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQQVAQAIIRSQLDFRRDPWPVKVSEHAKDLIRKM		301
8	:	GPEVDIWSAGVILYILLCGVPPFWAETEQQVAQAIIRSVLDFRRDPWPVKVSENAKDLIRKM		301
AHCDPK32	:	LDPDPKRRRLTAQEVLDHPWLQNAKKAPNVSLGETVRARLQKFSVMNKLKKRALRVIAEHL		360
1	:	LDPDPRRRLTAQEVLDHPWLQNAKKAPNVSLGETVRARLQKFSVMNKLKKRALRVIAEHL		358
2	:	LNPDPKQRLTAQEVLDHPWLQNAKKAPNVSLGETVRARLQKFSVMNKLKKRALRVIAEHL		358
3	:	LNPDPKRRRLTAQEVLDHPWLQNAKKAPNVSLGETVRARLQKFSVMNKLKKRALRVIAEHL		361
4	:	LDPDPKRRRLTAQEVLDHPWLQNAKTAPNVSLGETVRARLQKFSVMNKLKKTALRIADHLS		351
5	:	LDPDPKRRRLTAQQVLDHTIWLQNAKRAPNVSLGETVRARLQKFSVMNKLKKSALKVIAEHL		351
6	:	LNPDPKRRRLTAQEVLDHPWIQNAKKAPNVSLGETVRARLQKFSVMNKLKKRALRVIAEHL		362
7	:	LDPDQKRRRLTAQQVLDHPWLQNAKTAPNVSLGETVRARLQKFTVMNKLKKRALRVIAEHL		362
8	:	LDPDQKRRRLTAQQVLDHPWLQNAKTAPNVSLGETVRARLQKFTVMNKLKKRALRVIAEHL		421
AHCDPK32	:	VEEAAGIKEGFQLMDTNSRGGKINIDELRVGLQKLGHQVPESDLQILMEAGDVDDKDGFLDYG		419
1	:	VEEAAGLKEGFQLMDTNNRGGKINIDELRVGLHKLGHQVPESDVQALMEAGDVDDKDGFLDYG		419
2	:	VEEVAGIKEGFQLMDTANRGGKINIDELRVGLHKLGHQVPESDVQALMEAGDVDDKDGFLDYG		422
3	:	VEEAAGLKEGFQLMDTNSRGGKINIDELRIGLHKLGHQVPESDVQALMEAGDVDRDGHLDYG		412
4	:	VEEVAGIKEGFQVMDTENKGGKINIDELRVGLLKLGHQVPEGDVQILMEAGDVDDKDGFLDYG		412
5	:	QEEVAGIQEGFKIMDTNSRGGKINIDELRVGLHKLGHQVPESDVQALMEAGDVDDKDGFLDYG		413
6	:	VEEVAGIKEGFKLMDIGNKGGKIDMNELVGLQKLGHQVPESDVQALMEAGDVDDKDGFLDYG		423
7	:	DEEASGIREGFQIMDTNSRGGKINIDELKIGLQKLGHNIPQDDIQLM DAGDTDKDGFLDCD		423
8	:	DEEASGIREGFQIMDTNSRGGKINIDELKIGLQKLGHAIPQDDLQILM DAGDIDR DGFLDCD		423

AhCDPK32	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLRKAFFQFFDQNNQNGYIEMEELRSALHDEVDANSEEDVISAIMHD	481
1	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLRKAFFQFFDQNKSEYIEIEELRSALSDDLDTNSEEVISAIMHD	479
2	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLKKAFFQFFDRNQSGYIEIEELRGALTDDEVETNSEEVISAIMHD	479
3	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLHKAFFDFFDQNTQGYIEIEELRNALSDEIETNSEEVISAIMHD	482
4	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLQRAFFQFFDKNESGFIIELEELRNALADEVDTNSEEVISAIMHD	472
5	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLRKAFFDFFDQNKSGYIEVEELRTALATEVDDHVEDVISAIMHD	473
6	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLEKKAFFDFFDKNQTYIEIDELREALSDEIETNSEEVISAIMHD	473
7	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLKKAFAFFDQNNNGYIEIEELREALSDEVGTS.EEVVDATIRD	482
8	:	EFVAISVHLRKMGNDEHLKKAFAFFDQNNNGYIEIEELREALSDELGTS.EEVVDATIRD	482

AhCDPK32	:	VDTDKDGRISYEEFATMMKAGTDWRKASRQYSRERFTSLSLKLMKDGSLSLNNEGHR.	538
1	:	VDTDKDGRISYDEFATMMKAGTDWRKASRQYSRERFASLSLTLMRDGSLSHLNNEKQ..	535
2	:	VDTDKDGRISYDEFVMMKAGTDWRKASRQYSRERFNLSLKLMDGSLQMNNEPR..	535
3	:	VDTDKDGRISYEEFASMMKLGTDWRKASRQYSRERFNLSLKLMDGSLQLTNEQCQ	540
4	:	VDTDKDGRISYEEFATMMKAGTDWRKASRQYSRERFTSLSLIKLMKEGSLLELNNEGR..	528
5	:	VDTDKDGRISYEEFATMMKAGTDWRKASRQYSRERFNLSLKLMDGSLLEKGTESK..	529
6	:	VDTDKDGRISYEEFATMMKAGTDWRKASRQYSRERFNLSLKLMSDGSLEKGNESR..	529
7	:	VDTDKDGRISYEEFVTMMKTGTDWRKAFRQYSRERFNLSLKLMDGSLHANGDTR..	538
8	:	VDTDKDGRISYEEFVTMMKTGTDWRKASRQYSRERFNLSLKLMDGSLQVNGDTR..	538

图 6 花生 AhCDPK32 氨基酸序列与其它物种 CDPK32 氨基酸序列比对

注: 1: 大豆: *Glycine max* (XM_003554131); 2: 棉花: *Gossypium raimondii* (XM_012615254); 3: 鹰嘴豆: *Cicer arietinum* (NM_001279194); 4: 蒺藜苜蓿: *Medicago truncatula* (XM_013612094); 5: 草莓: *Fragaria x ananassa* (AF035944); 6: 烟草: *Nicotiana sylvestris* (XM_009760471); 7: 油菜: *Brassica napus* (KF169741); 8: 拟南芥: *Arabidopsis thaliana* (NM_115613); 划线部分为 AhCDPK32 催化区含有亚结构域 I-XI 区

Figure 6 Sequence alignment between AhCDPK32 amino acid from peanut and CDPK32 amino acid from other species

Note: 1: Soybean: *Glycine Max* (XM_003554131); 2: Cotton: *Gossypium raimondii* (XM_012615254); 3: Chickpea: *Cicer arietinum* (NM_001279194); 4: Thistle alfalfa: *Medicago truncatula* (XM_013612094); 5: Strawberry: *Fragaria x ananassa* (AF035944); 6: Tobacco: *Nicotiana sylvestris* (XM_009760471); 7: Rapeseed: *Brassica napus* (KF169741); 8: Arabidopsis thaliana: *Arabidopsis thaliana* (NM_115613); Underlined: AhCDPK32 catalytic area contains subdomain I - XI district

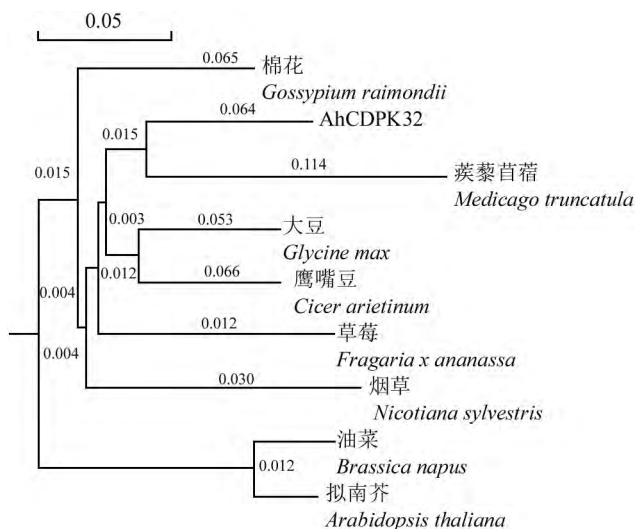


图 7 花生 AhCDPK32 与其它物种来源的 CDPK32 系统发育树分析

Figure 7 Phylogenetic tree analysis of AhCDPK32 from peanut and CDPK32 from other species

18-T-AhCDPK32 17 μ L, 10 \times Green Buffer 2.0 μ L, BamH 1 μ L, pCambia2300EC 16 μ L, 10 \times Green Buffer 2.0 μ L, BamH 1 μ L. 水浴酶切 5 min 将含有 BamH 酶切位点的目的基因 AhCDPK32 和载体片段 pCambia2300EC 连接。连接体系如下: Solution I 5 μ L,

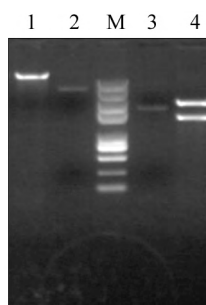


图 8 pMD18-T-AhCDPK32 和 pCambia2300EC 质粒酶切

注: 1: pCambia2300EC 酶切; 2: pCambia2300EC 质粒; 3: pMD18-T-AhCDPK32 重组质粒; 4: pMD18-T-AhCDPK32 酶切; M: Trans 2K plus DNA Marker (Trans Gen)

Figure 8 Enzyme digestion of pMD18-T-AhCDPK32 and pCambia2300EC plasmid

Note: 1: pCambia2300EC enzyme digestion; 2: pCambia2300EC plasmid; 3: pMD18-T-AhCDPK32 recombinant plasmid; 4: pMD 18-T-AhCDPK32 enzyme digestion; M: Trans 2K plus DNA Marker (Trans Gen)

AhCDPK32 4 μ L, pCambia2300EC 酶切产物 1 μ L, 16 $^{\circ}$ C 连接 5 h 构成 pCambia2300EC-AhCDPK32。将连接产物转化 Trans-1 感受态细胞, 转化方法同转化 pMD18-T-AhCDPK32, 最后涂在含有卡那霉素 LB 平板上, 菌落 PCR 鉴定后, 选取阳性克隆进行酶切

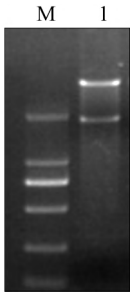


图 9 pCambia2300EC-AhCDPK32 质粒酶切

注: 1: pCambia2300EC-AhCDPK32 酶切; M: Trans 2K DNA Marker (全式金)

Figure 9 Enzyme digestion of pCambia2300EC-AhCDPK32 plasmid

Note: 1: pCambia2300EC-AhCDPK32 enzyme digestion; M: Trans 2K DNA Marker (Trans Gen)

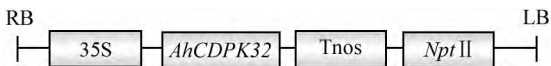


图 10 *AhCDPK32* 基因超表达载体结构

注: 35S: 烟草花叶病毒 35S 启动子; *AhCDPK32*: 花生 *AhCDPK32* 基因; Tnos: 胭脂碱合酶 *Nos* 终止子; *Npt* : 卡那霉素抗性基因

Figure 10 Construction of over-expression vector for *AhCDPK32* gene

Note: 35S: *Tobacco mosaic virus* 35S promoter; *AhCDPK32*: *AhCDPK32* gene from peanut; Tnos: Nopaline synthase *Nos* terminator; *Npt* : Kanamycin resistant gene

鉴定和测序鉴定。

作者贡献

张青云、孙全喜、唐月异、王秀贞、吴琪是本研究的实验设计和实验研究的执行人;张青云、王云云、曹广英、祁雪完成数据分析及论文初稿的写作;王传堂、孙全喜是项目的构思者及负责人,指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家花生产业技术体系(CARS-15)、山东省农业科学院科技创新重点项目(2014CGPY09)和山东省农业科学院青年科研基金(2016YQN17; 2015YQN13)共同资助。

参考文献

Abbasi F., Onodera H., Toki S., Tanaka H., and Komatsu S.,

2004, *OsCDPK13* a calcium-dependent protein kinase gene from rice, is induced by cold and gibberellin in rice leaf sheath, *Plant Molecular Biology*, 55(4): 541-552

Asano T., Hayashi N., Kobayashi M., Aoki N., Miyao A., Mitsuhashi I., Ichikawa H., Komatsu S., Hirochika H., Kikuchi S., and Ohsugi R., 2012, A rice calcium-dependent protein kinase *OSCPK12* oppositely modulates salt-stress tolerance and blast disease resistance, *The Plant Journal*, 69(1): 26-36

Breviaro D., Morello L., and Giani S., 1995, Molecular cloning of two novel rice cDNA sequences encoding putative calcium-dependent protein kinase, *Plant Molecular Biology*, 27(5): 953-967

Chotikacharoensuk T., Arteca R.N., and Arteca J.M., 2006, Use of differential display for the identification of touch-induced genes from an ethylene-insensitive *Arabidopsis* mutant and partial characterization of these genes, *Journal of Plant Physiology*, 163(12): 1305-1320

Estelle M.H., Chan C.W.M., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H.J., Michael R.S., Thomas M., Kay W.S., Zhu J.K., and Harmon A.C., 2003, The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases, *Plant Physiol.*, 132(2): 666-680

Jain M., Pathak B.P., Harmon A.C., Tillman B.L., and Gallo M., 2011, Calcium dependent protein kinase (CDPK) expression during fruit development in cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) under Ca²⁺-sufficient and -deficient growth regimens, *Journal of Plant Physiology*, 168(18): 2272-2277

Liu W., Li W., He Q.L., Daud M.K., Chen J.H., and Zhu S.J., 2014, Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in *Gossypium raimondii*, *PLoS One*, 9(6): 98189

Martin M.L., and Busconi L., 2000, Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation, *The Plant Journal*, 24(4): 429-435

Mitra D., and Johri M.M., 2000, Enhanced expression of a calcium-dependent protein kinase from the moss *Funaria hygrometrica* under nutritional starvation, *Journal of Biosciences*, 25(4): 331-338

Sanders D., Pelloux J., Brownlee C., and Harper J.F., 2002, Calcium at the crossroads of signaling, *The Plant Cell*, 14(1): 401-417

Wang C.T., and Zhang J.C., eds., 2013, Peanut genetic improvement, Shanghai Science and Technology Press, Shanghai, China, pp.414-416 (王传堂, 张建成, 编著, 2013, 花生遗传改良, 上海科学技术出版社, 中国, 上海, pp.414-416)

Weckwerth P., Ehlert B., and Romeis T., 2015, ZmCPK1, a calcium-independent kinase member of the *Zea mays* CDPK gene family, functions as a negative regulator in cold stress

- signalling, *Plant Cell and Environment*, 38(3): 544-558
- Xu J., Tian Y.S., Peng R.H., Xiong A.S., Zhu B., Jin X.F., Gao F., Fu X.Y., Hou X.L., Yao Q.H., and Hou X.L., 2010, *AtCPK6*, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*, *Plant*, 231(6): 1251-1260
- Zhou L.M., Fu Y., and Yang Z.B., 2009, A genome-wide functional characterization of *arabidopsis* regulatory calcium sensors in pollen tubes, *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(8): 751-761

《基因组学与应用生物学》征订启事

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办,公开发行的月刊科学期刊。《基因组学与应用生物学》主要刊登现代生物技术的前沿学科和基础学科如基因组学、分子细胞遗传学、生化与分子生物学和应用生物学等相关的原始研究成果。刊登植物、动物及微生物领域的生物在组织、器官、细胞、染色体、蛋白质、基因、酶和发酵工程等不同水平上的现代生物技术等基础与应用基础研究的成果。本刊按国际标准编排,题目摘要、图表和引用文献等均实行中英文对照。

《基因组学与应用生物学》前身是原《广西农业大学学报》,创刊于1982年。《基因组学与应用生物学》(原名《广西农业生物科学》)入编了2011年版北大图书馆《中文核心期刊要目总览》核心期刊,是中国科学引文数据“中国期刊方阵”,先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA: JYYS AZ)、美国《剑桥科学文摘:自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。2013年度《基因组学与应用生物学》影响因子为1.110。

《基因组学与应用生物学》(Genomics and Applied Biology), ISSN 1674-568X, CN 45-1369/Q, 邮发代号: 48-213; 月刊, 每月25日出版, 国内定价: ¥40.00/期, ¥480.00/年; 国际定价 \$40.00/期, \$480.00/年。

订户可到当地邮局订阅或直接通过邮局汇款至编辑部。

邮局汇款:

地址: 广西南宁市大学东路100号广西大学西校园榕江路《基因组学与应用生物学》编辑部1楼111室
邮编: 530004

收款单位: 《基因组学与应用生物学》编辑部

联系电话: 0771-3239102, 0771-3232621

传真: 0771-3232621 E-mail: gab@gabcn.org 网址: www.gabcn.org