

霸王环核苷酸门控通道基因ZxCNGC5的克隆及表达模式分析

刘亚琪, 王文颖, 崔彦农, 郭欢, 李孟湛, 王锁民*

兰州大学草地农业科技学院, 草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州730020

摘要: 钙离子(Ca^{2+})作为生命活动过程中重要的第二信使, 对植物的生长发育至关重要。环核苷酸门控离子通道(cyclic nucleotide-gated channels, CNGCs)是一类 Ca^{2+} 通道, 在植物的花粉发育、免疫反应以及响应逆境胁迫等生理过程中发挥着重要作用。本研究通过RACE和RT-PCR技术克隆了荒漠早生植物霸王(*Zygophyllum xanthoxylum*) CNGCs家族的一个编码基因, 命名为ZxCNGC5。生物信息学分析显示其编码728个氨基酸, 包含CNGCs家族所特有的6个跨膜域、1个P环以及环核苷酸结合域(cyclic nucleotide-binding domain, CNBD)和钙调蛋白结合域(calmodulin-binding domain, CaMBD); 系统进化树将CNGCs家族分为5个亚族(I、II、III、IVA和IVB), ZxCNGC5属于第II亚族; 组织特异性分析显示该基因主要在根中表达; 在0.01和10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 处理下, ZxCNGC5在根中的表达量短期内均显著升高, 并分别在3和12 h达到最高, 随后逐渐降低, 表明ZxCNGC5在根中的表达受外界 CaCl_2 的短期诱导。

关键词: 霸王; Ca^{2+} ; CNGC5; 基因克隆; 表达模式

Ca^{2+} 是植物生长发育必需的矿质营养, 且作为植物体内重要的第二信使在诸多信号转导过程中发挥重要作用。植物在受到生物和非生物胁迫时, 其体内与 Ca^{2+} 相关的转运蛋白在正向调节和负反馈作用下, 细胞内 Ca^{2+} 浓度会明显增加(Fischer等2017)。研究表明环核苷酸门控离子通道(cyclic nucleotide-gated channels, CNGCs)是植物体内最主要的介导 Ca^{2+} 参与信号转导过程的蛋白之一(DeFalco等2016a)。

CNGCs是一类非选择性阳离子通道, 对一价和二价阳离子均具有通透性, 广泛存在于动植物体中(Zelman等2012)。Schuurink等(1998)从大麦(*Hordeum vulgare*)中首次克隆得到CNGCs基因HvCBT1, 随后在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、水稻(*Oryza sativa*)和梨(*Pyrus bretschneideri*)等植物中相继克隆得到CNGCs的同源基因(王文颖等2015)。植物CNGCs的结构主要包括6个跨膜域(S1~S6)和1个P环(Pore loop), 其C端包含环核苷酸结合域(cyclic nucleotide-binding domain, CNBD)和钙调蛋白结合域(calmodulin-binding domain, CaMBD), 且两者部分重叠(Ma和Berkowitz 2011; Zelman等2012)。P环位于S5和S6之间, 主要决定CNGCs的离子选择特性。环核苷酸(3',5'-cyclic nucleotide monophosphate, cNMP; 3',5'-cAMP和3',5'-cGMP)是一类重要的第二信使, 当cNMPs结合到CNBD时, 会发生变构调节使通道打开, 从而活化CNGCs, 使得胞外 Ca^{2+} 内流; 当胞内 Ca^{2+} 过多时, CaM会结合

到CaMBD处, 抑制cNMPs的结合, 从而钝化通道, 限制 Ca^{2+} 的内流(DeFalco等2016b; Fischer等2017)。

在模式植物拟南芥中存在20个CNGCs家族成员, 它们与体内的 Ca^{2+} 内流密切相关(Ma和Berkowitz 2011)。Frietsch等(2007)将*AtCNGC18*转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)后, 大肠杆菌可吸收更多的 Ca^{2+} , 表明*AtCNGC18*可介导 Ca^{2+} 的内流; 随后进一步又将*AtCNGC18*转入HEK293 (human embryonic kidney)细胞中, 采用膜片钳技术直接证明了CNGC18是一个 Ca^{2+} 内流型通道。Gao等(2016)通过电生理实验证明*AtCNGC7*、*8*、*9*、*10*、*16*都与花粉管中 Ca^{2+} 的内流相关。Zhang等(2017)发现转入*AtCNGC14* cRNA的爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞在30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 条件下具有明显的内向电流。可见CNGCs家族在植物体内 Ca^{2+} 的积累中发挥了重要作用。

多浆早生植物霸王(*Zygophyllum xanthoxylum*)属蒺藜科(Zygophyllaceae), 主要分布于我国西北荒漠区, 具有极强的抗旱、耐盐能力, 是我国西北荒漠地区的优势建群种, 有很高的生态和饲用价值(周向睿等2006)。霸王适应干旱环境的主要策略之一是从含盐量很低的荒漠土壤中吸收大量 Na^+ 并将其上运至叶中、区域化于液泡, 研究表明

收稿 2017-10-11 修定 2017-12-22

资助 国家自然科学基金(31730093和31470503)。

* 通讯作者(smwang@lzu.edu.cn)。

50 mmol·L⁻¹ NaCl的添加缓解了渗透胁迫对其产生的伤害,增强了霸王的抗旱能力,并能显著促进霸王的生长(Wang等2004; Ma等2011)。在生理研究的基础上,我们课题组又进一步研究了Na⁺、K⁺吸收与转运的分子机制,相继克隆并鉴定了ZxNHX、ZxVP1、ZxSOS1、ZxSKOR和ZxAKT1等离子转运蛋白的编码基因(Wu等2011; Hu等2016; Ma等2016a),而对作为反映逆境胁迫下霸王体内Ca²⁺稳态的相关基因的研究还较少, Ma等(2016b)通过对霸王转录组的研究发现, CL3101.Contig1-All (编码CNGC5)的表达在50 mmol·L⁻¹ NaCl和-0.5 MPa渗透胁迫下受到显著诱导。鉴于此,本研究克隆了霸王ZxCNGC5的编码基因,对其编码的氨基酸序列进行生物信息学分析,并分析该基因在不同浓度Ca²⁺条件下的表达模式,以期揭示霸王适应逆境的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料及处理方法

霸王(*Zygophyllum xanthoxylum* Baill Hist.)种子采自内蒙古自治区阿拉善左旗巴彦浩特。挑选均匀一致且籽粒饱满无缺损的种子, 5%次氯酸钠(NaClO)消毒, 蒸馏水冲至无味, 随后在28°C条件下封口放置1 d, 4°C春化1 d, 后铺在培养皿上于暗处催芽。在胚根长至2~3 cm时, 挑选均匀一致的幼苗移至装有石英砂的穴盘(5 cm×5 cm×5 cm)中, 按照每穴2株幼苗进行播种, 浇灌调整后的1/2-Hoagland营养液(pH=5.7)进行培养。营养液配方为2 mmol·L⁻¹ KNO₃、0.5 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄、0.5 mmol·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O、0.5 mmol·L⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O、50 μmol·L⁻¹ H₃BO₃、10 μmol·L⁻¹ MnCl₂·4H₂O、1.6 μmol·L⁻¹ ZnSO₄·7H₂O、0.6 μmol·L⁻¹ CuSO₄、0.05 μmol·L⁻¹ Na₂MoO₄·2H₂O、0.06 mmol·L⁻¹ Fe-citrate·5H₂O。每3 d更换一次营养液, 温室的昼夜温度为(28±2)°C/(23±2)°C, 每天光照16 h, 光强度约600 μmol·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度约为60%~80%。

霸王幼苗生长3周龄时, 分别做以下处理: (1)对照: 正常浇灌1/2Hoagland营养液; (2)不同浓度Ca²⁺处理: 先用含有0.01 mmol·L⁻¹ Ca²⁺的1/2Hoagland营养液处理3 d, 随后分别用含有0.01和10 mmol·L⁻¹ Ca²⁺的1/2Hoagland营养液处理0、1、3、12、24 h

后, 分别收集根、茎、叶, 吸干表面水分后迅速于液氮中冷冻, 用于RNA提取。

1.2 霸王总RNA的提取及cDNA的合成

按照UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒(生工生物, 上海)的操作说明书提取总RNA。按照SMARTer™ RACE cDNA Kit (TaKaRa, 大连)试剂盒的说明书, 采用快速扩增cDNA末端(RACE)技术, 合成cDNA第一链。

1.3 ZxCNGC5基因全长克隆

利用转录组得到的核心片段设计5'→3'端外侧特异引物P1、P3和巢式特异引物P2、P4 (表1), 分别与试剂盒提供的P5和P6配对, 使用Phusion®超保真DNA聚合酶(Thermo, USA)进行外侧和巢式PCR扩增。外侧PCR反应条件: 98°C预变性30 s; 98°C变性10 s、62°C退火30 s、72°C延伸50 s, 30个循环; 最后72°C延伸10 min, 4°C保存。巢式PCR反应条件: 98°C预变性30 s; 98°C变性10 s、61°C退火30 s、72°C延伸42 s, 30个循环; 最后72°C延伸10 min, 4°C保存。扩增产物经电泳检测后, 回收纯化, 将得到的产物连接T-vector pMD19 (TaKaRa, 大连), 并转入大肠杆菌(*E. coli*) DH5α感受态(全式金, 北京)中, 通过蓝白斑筛选和菌落PCR检测, 将阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

将测序得到的5'端及3'端准确的序列拼接得到ZxCNGC5的全长, 用DNAMAN软件预测ORF区,

表1 基因克隆和表达分析的引物序列

Table 1 Primer sequences used for gene cloning and expression analysis

| 引物 | 序列(5'→3') |
|-----|--------------------------|
| P1 | CCACTGTTCTGAATCACGCCTTT |
| P2 | CGAGATGATGGAGCAATGTAAGC |
| P3 | CTTGGCATAACAGAGGAAGTTAGC |
| P4 | CCTATTTGCTCTTCTGATTGGC |
| P5 | CTAATACGACTCACTATAGGGC |
| P6 | AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT |
| P7 | ATGTTGACTCCAGCTAC |
| P8 | TCAATCAGCATCATCAGC |
| P9 | TTTTCCAGCCATCCCTTGT |
| P10 | TGCAGTGATCTCCTTGCTCATA |
| P11 | CGACTCCAGCTACAAATCGC |
| P12 | AAGGGGAGGACAGGCTAGAG |

设计全长ORF引物P7及P8 (表1), 通过RT-PCR扩增得到目的条带, 经回收纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.4 生物信息学分析

将拼接得到的基因序列用NCBI的Blast进行基因序列比对; 利用在线软件Compute PI/MW (<http://web.expasy.org/compute/pi>)分析蛋白的等电点、分子量; 使用PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>)预测蛋白的跨膜结构域; 使用InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)预测蛋白的保守结构域; 使用DNAMAN软件对不同物种的CNGC氨基酸序列进行多重比对; 系统进化树采用Clustalw1.83软件对GenBank中不同物种的CNGCs家族基因进行多序列比对分析, 并用MEGA5.1构建系统进化树, 系统进化树采用邻接法构建。

1.5 实时荧光定量PCR分析

利用StepOnePlus荧光定量PCR仪(ABI, 美国)对不同处理下霸王ZxCNGC5的表达量进行检测。本实验以霸王肌动蛋白编码基因ZxActin为内参基因(伍国强等2008), 扩增引物为P9及P10 (表1), 目的片段为176 bp; 用于扩增ZxCNGC5的引物为P11及P12 (表1), 目的片段为89 bp。qRT-PCR反应体系为5 μ L灭菌水、0.4 μ L ROX Reference Dye、0.8 μ L PCR Forward Primer (10 μ mol·L⁻¹)、0.8 μ L PCR Reverse Primer (10 μ mol·L⁻¹)、10 μ L SYBR[®] Premix Ex Taq TM II (Tli RnaseH Plus)、3 μ L cDNA, 总体积为20 μ L。反应条件: 95°C 30 s; 95°C 5 s、60°C 30 s, 40个循环。溶解曲线扩增条件: 95°C 15 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s。每个样品至少重复3次。采用2^{- $\Delta\Delta$ C_T}法计算ZxCNGC5的相对表达量。

1.6 数据分析

采用SPSS17.0对数据进行分析, 运用Duncan多重比较($P < 0.05$)进行差异显著性分析。用Sigma-Plot、DNAMAN等软件作图。

2 实验结果

2.1 ZxCNGC5基因的克隆

根据转录组数据得到的核心片段设计引物, 以RACE产物为模板, 克隆得到5'及3'端序列, 长度约为700 bp和1 400 bp (图1-A和B), 与推测的5' cDNA及3' cDNA的目的片段长度一致。测序结果

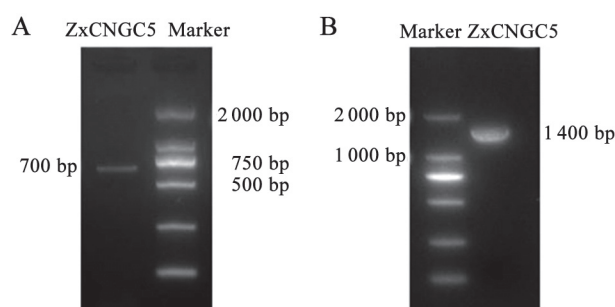


图1 霸王ZxCNGC5基因5'端片段(A)和3'端片段(B)产物凝胶电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of the 5' RACE (A) and 3' RACE (B) fragment of CNGC5 from *Z. xanthoxylum*

经BLAST比对表明与其他植物CNGC5有较高的同源性, 可见其为霸王CNGC5的编码基因片段。

2.2 ZxCNGC5蛋白的生物信息学分析

2.2.1 ZxCNGC5基因全长及推测的氨基酸序列

将得到的5'及3'端序列与转录组得到的核心片段进行拼接, 得到霸王CNGC5的cDNA全长序列, 共2 716 bp, 根据DNAMAN软件预测, 发现该序列包含5'非翻译区173 bp, 开放阅读框(ORF) 2 187 bp以及3'非翻译区356 bp, 共编码728个氨基酸(图2)。运用Compute PI/MW预测霸王ZxCNGC5蛋白的等电点为9.29, 分子量为83.5 kDa。本研究中将该基因命名为ZxCNGC5。

2.2.2 ZxCNGC5蛋白结构域和保守域的分析

通过PredictProtein和InterProScan在线软件对ZxCNGC5基因编码的氨基酸序列进行疏水跨膜结构域和保守域预测分析, 发现其包含6个跨膜域和1个P环, 并且在C端含有CNBD、CaMBD以及1个CaM结合位点异亮氨酸-谷氨酰胺IQ (isoleucine-glutamine)基序(图3)。运用DNAMAN软件对不同物种CNGC氨基酸序列进行多重比对, 发现ZxCNGC5蛋白与香橙(*Citrus sinensis*) CsCNGC5蛋白有较高的同源性, 氨基酸序列同源性达到79%; 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) AtCNGC5的氨基酸序列同源性也达到73%。

2.2.3 系统进化树分析

运用MEGA5.1构建的系统进化树表明CNGCs家族分为5个亚族, ZxCNGC5位于第II亚族, 与拟南芥AtCNGC5亲缘关系较近, 表明其为AtCNGC5的同源基因(图4)。

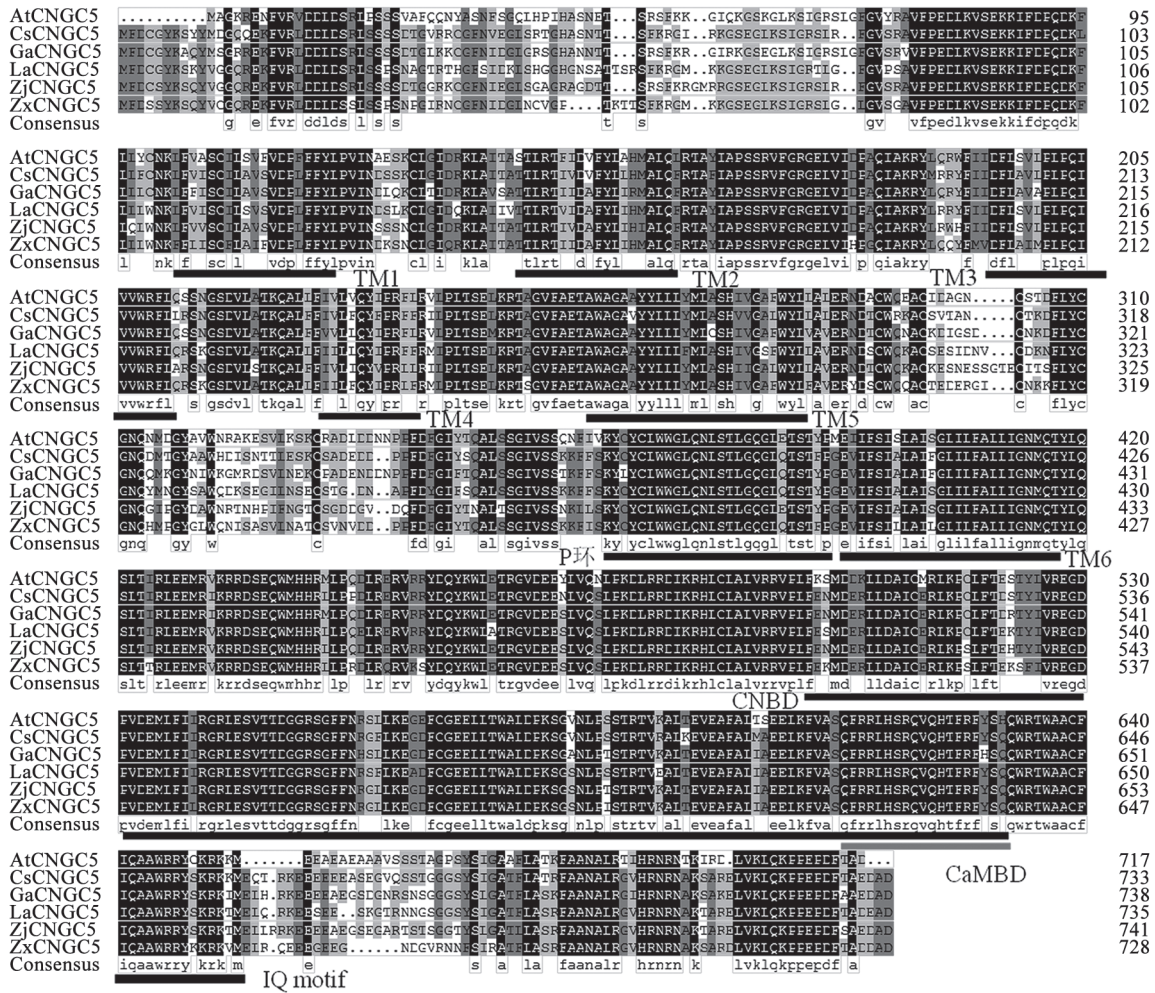


图3 ZxCNGC5与不同物种CNGC氨基酸序列比对

Fig.3 Alignment of ZxCNGC5 with its homologs in other species

At: 拟南芥; Cs: 香橙(*Citrus sinensis*); Ga: 树棉(*Gossypium arboreum*); La: 狭叶羽扇豆(*Lupinus angustifolius*); Zj: 酸枣(*Ziziphus jujuba*)。各基因编码氨基酸的GenBank登录号如下: AtCNGC5 (NP_851209), CsCNGC5 (XM_015528994.1), GaCNGC5 (XM_01774971.1), LaCNGC5 (XM_019576998.1), ZjCNGC5 (XM_016036737.1)。TM1~TM6为6个跨膜域。灰线标注的区域为CaMBD。

压门控的钾离子通道的S4区域结构相似, 研究者将小鼠A2亚族的S4区域转入果蝇的电压门控通道dmEAG (the *Drosophila* Eag channel)中, 发现嵌合的通道会在去极化作用下打开, 这表明环核苷酸门控通道的S4区域能够作为电压传感器而发挥作用(Kaup等2002)。CNBD位于C末端, 是由αA、αB、αC 3个α螺旋以及β1、β2 2个折叠构成, 序列分析表明植物的CaMBD也位于C端, 且和CNBD部分重叠, 而动物的CaMBD却位于N端, 这种差异表明动物CNGCs存在的CaM调节机制与植物CaM的调节机制不同。目前的研究表明, 植物不止存在唯一的CaM结合位点, CaM能通过一个特定的异亮

氨酸-谷氨酸胺(isoleucine-glutamine, IQ)基序结合到AtCNGC20上, 从而影响通道的活化; 在AtCNGC12上也发现了3个CaMBDs, 但它们的功能却并不一样, 其中位于N端的NT基序是通过负调控影响CNGC12的功能, 并进一步诱导细胞程序性死亡, 而位于C端的IQ基序对于CNGC12发挥功能却是必不可少的(Defalco等2016b)。尽管CNGCs家族序列保守性较高, 但是在酵母中的研究表明, 并不是所有的IQ基序都可以和CaM结合并发挥作用, 这同时依赖于IQ基序N端的2个丙氨酸。氨基酸序列比对分析(图3)表明, 在霸王ZxCNGC5蛋白的C末端不止存在1个和CNBD重叠的CaMBD,

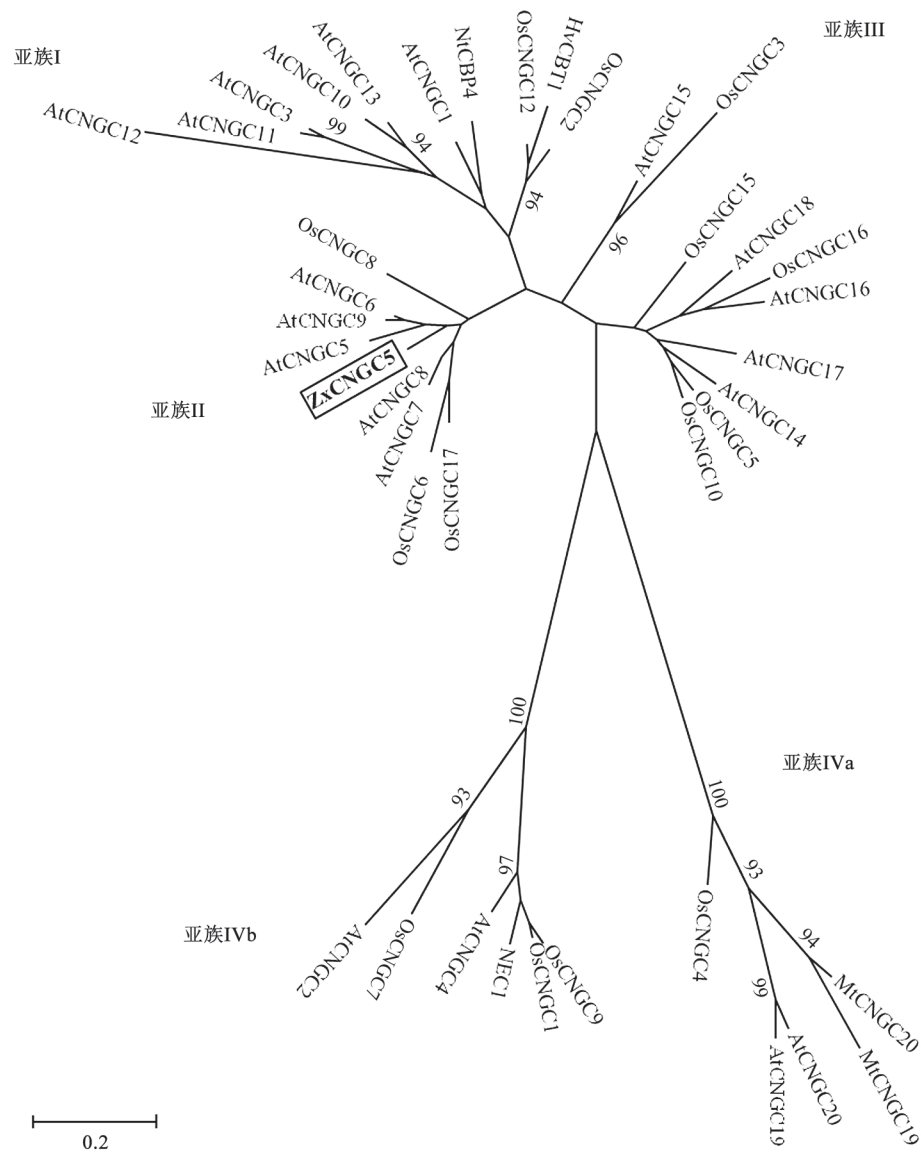


图4 植物CNGCs的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of plant cyclic nucleotide-gated channels

At: 拟南芥; Os: 水稻; Hv: 大麦; Nt: 烟草; Mt: 蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)。各基因编码氨基酸的GenBank登录号如下: AtCNGC1 (NP_200125), AtCNGC2 (NP_197045), AtCNGC3 (NP_566075), AtCNGC4 (NP_851188), AtCNGC5 (NP_851209), AtCNGC6 (NP_565560), AtCNGC7 (NP_173051), AtCNGC8 (NP_173408), AtCNGC9 (NP_194785), AtCNGC10 (NP_001184885), AtCNGC11 (NP_182167), AtCNGC12 (NP_850454), AtCNGC13 (NP_192010), AtCNGC14 (NP_850056), AtCNGC15 (NP_180393), AtCNGC16 (NP_190384), AtCNGC17 (NP_194765), AtCNGC18 (NP_196991), AtCNGC19 (NP_188396), AtCNGC20 (NP_566585), OsCNGC1 (NP_001046460), OsCNGC2 (NP_001057767), OsCNGC4 (ABF97880), OsCNGC5 (ABA98416), OsCNGC6 (NP_001054052), OsCNGC7 (NP_001047485), OsCNGC8 (ABA95858), OsCNGC9 (NP_001063911), OsCNGC10 (NP_001048351), OsCNGC11 (NP_001057019), OsCNGC12 (NP_001048268), OsCNGC13 (NP_001057101), OsCNGC14 (NP_001051331), OsCNGC15 (NP_001172593), OsCNGC16 (NP_001055973), HvCBT1 (CAA05637), NEC1 (AAY58312), NtCBP4 (AF079872), MtCNGC19 (XP_003620101), MtCNGC20 (XP_003610842)。系统进化树构建方法参照王文颖等(2015)。左下角标尺0.2表示系统进化树上进化枝的长短。

还存在1个IQ基序, 这种多选的CaM结合位点表明霸王中CNGCs的配体调节较为复杂, 而对于其具体功能的验证还需要进一步的深入研究。

Kugler等(2009)的研究表明, 盐胁迫下 *AtCNGC19* 和 *AtCNGC20* 在植株地上部的表达量上调, 但是根部的表达量并未发生明显变化, 因此认为

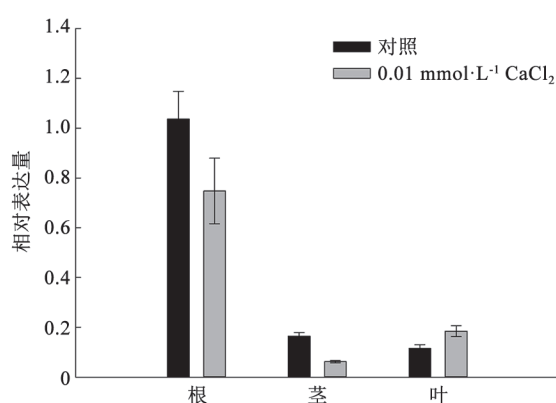
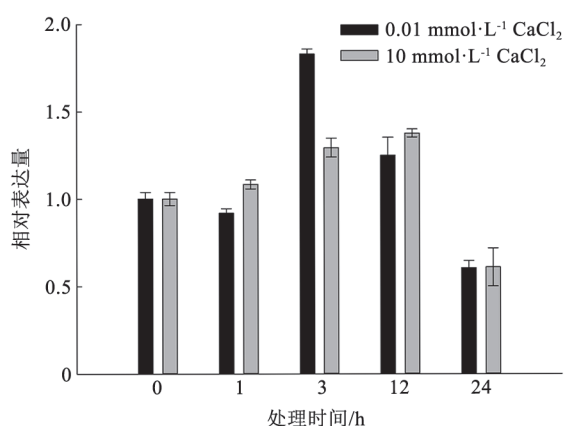


图5 霸王ZxCNGC5的组织特异性

Fig.5 The tissue expression characteristics of ZxCNGC5 in *Z. xanthoxylum*图6 不同浓度CaCl₂处理对ZxCNGC5基因表达水平的影响
Fig.6 The effect of CaCl₂ treatment with different concentrations on ZxCNGC5 gene expression level

AtCNGC19和AtCNGC20可能在Na⁺的再分配中发挥着重要作用。Jin等(2015)发现*AtCNGC10*在拟南芥根和花中的表达量较高,而在叶和茎中的表达量较低,进一步研究发现在200 mmol·L⁻¹ NaCl处理时,*AtCNGC10*的表达量明显下降,这表明*AtCNGC10*的表达量受到盐胁迫的负调控。组织特异性分析表明,ZxCNGC5主要在霸王根中表达(图5);用0.01和10 mmol·L⁻¹ CaCl₂处理霸王幼苗后发现,ZxCNGC5的表达短时间内受到介质中Ca²⁺的诱导,尤其当低Ca²⁺处理时,ZxCNGC5表达量增加较快(图6)。这表明当外界Ca²⁺亏缺时,植物会通过正向调控ZxCNGC5的表达,促进对Ca²⁺的吸收。CNGCs在植物生长发育中的作用不可或缺,我们通过用

不同浓度Ca²⁺处理分析了ZxCNGC5在霸王体内的表达模式,推测其可能与根部Ca²⁺的吸收有关。这为进一步分析其在荒漠植物霸王抗逆性中的作用奠定了初步的基础。

参考文献(References)

- Charpentier M, Sun J, Martins TV, et al (2016). Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science*, 352 (6289): 1102–1105
- DeFalco TA, Marshall CB, Munro K, et al (2016b). Multiple calmodulin-binding sites positively and negatively regulate *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated channel 12. *Plant Cell*, 28 (7): 1738–1751
- DeFalco TA, Moeder W, Yoshioka K (2016a). Opening the gates: Insights into cyclic nucleotide-gated channel-mediated signaling. *Trends Plant Sci*, 21 (11): 903–906
- Fischer C, DeFalco TA, Karia P, et al (2017). Calmodulin as a Ca²⁺-Sensing subunit of *Arabidopsis* cyclic nucleotide-gated channel complexes. *Plant Cell Physiol*, 58 (7): 1208–1221
- Frietsch S, Wang YF, Sladek C, et al (2007). A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (36): 14531–14536
- Gao QF, Gu LL, Wang HQ, et al (2016). Cyclic nucleotide-gated channel 18 is an essential Ca²⁺ channel in pollen tube tips for pollen tube guidance to ovules in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (11): 3096–3101
- Hu J, Ma Q, Kumar T, et al (2016). ZxSKOR is important for salinity and drought tolerance of *Zygophyllum xanthoxylum* by maintaining K⁺ homeostasis. *Plant Growth Regul*, 80 (2): 195–205
- Jin YK, Jing W, Zhang Q, et al (2015). Cyclic nucleotide-gated channel 10 negatively regulates salt tolerance by mediating Na⁺ transport in *Arabidopsis*. *J Plant Res*, 128 (1): 211–220
- Kaupp UB, Seifert R (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*, 82 (3): 769–824
- Kugler A, Köhler B, Palme K, et al (2009). Salt-dependent regulation of a CNG channel subfamily in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 9 (1): 140
- Ma Q, Bao AK, Chai WW, et al (2016b). Transcriptomic analysis of the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* in response to salt treatment and osmotic stress. *Plant Soil*, 402 (1-2): 343–361
- Ma Q, Hu J, Zhou XR, et al (2016a). ZxAKT1 is essential for K⁺ uptake and K⁺/Na⁺ homeostasis in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Plant J*, 90 (1): 48–60
- Ma Q, Yue LJ, Zhang JL, et al (2011). Sodium chloride improves photosynthesis and water status in the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Tree Physiol*, 32 (1): 4–13

- Ma W, Berkowitz GA (2011). Ca^{2+} conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytol*, 190 (3): 566–572
- Schuurink RC, Shartzler SF, Fath A, et al (1998). Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (4): 1944–1949
- Wang SM, Wan CG, Wang YR, et al (2004). The characteristics of Na^+ , K^+ and free proline distribution in several drought-resistant plants of the Alxa Desert, China. *J Arid Environ*, 56 (3): 525–539
- Wang WY, Chai WW, Ma Q, et al (2015). Research advances in cyclic nucleotide-gated channels in plant. *Plant Physiol J*, 51 (11): 1799–1808 (in chinese with English abstract) [王文颖, 柴薇薇, 马清等(2015). 植物环核苷酸门控离子通道的研究进展. *植物生理学报*, 51 (11): 1799–1808]
- Wu GQ, Xi JJ, Bao AK, et al (2008). Cloning and sequence analysis of Actin gene fragment from the succulent xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum*. *Biotechnol Bull*, 1 (2): 101–104 (in chinese with English abstract) [伍国强, 席杰军, 包爱科等(2008). 多浆旱生植物霸王Actin基因片段的克隆及序列分析. *生物技术通报*, 1 (2): 101–104]
- Wu GQ, Xi JJ, Wang Q, et al (2011). The *ZxNHX* gene encoding tonoplast Na^+/H^+ antiporter from the xerophyte *Zygophyllum xanthoxylum* plays important roles in response to salt and drought. *J Plant Physiol*, 168 (8): 758–767
- Zelman AK, Dawe A, Gehring C, et al (2012). Evolutionary and structural perspectives of plant cyclic nucleotide-gated cation channels. *Front Plant Sci*, 3: 95
- Zhang S, Pan Y, Tian W, et al (2017). *Arabidopsis* CNGC14 mediates calcium influx required for tip growth in root hairs. *Mol Plant*, 10 (7): 1004–1006
- Zhou XR, Zhou ZY, Wu CX (2006). The research of the breeding characters of *Zygophyllum xanthoxylum*. *Pratac Sci*, 23 (6): 38–41 (in chinese with English abstract) [周向睿, 周志宇, 吴彩霞(2006). 霸王繁殖特性的研究. *草业科学*, 23 (6): 38–41]

Cloning and expression analysis of cyclic nucleotide-gated channels gene *ZxCNGC5* from *Zygophyllum xanthoxylum*

LIU Ya-Qi, WANG Wen-Ying, CUI Yan-Nong, GUO Huan, LI Meng-Zhan, WANG Suo-Min*

State Key Laboratory of Grassland Agroecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China

Abstract: Ca^{2+} , a critical second messenger in the processes of plant life, is essential for the growth and development of plants. Cyclic nucleotide-gated channels (CNGCs) are Ca^{2+} -permeable channels that play an important role in pollen tube guidance, responses to biotic and abiotic stresses as well as immune responses. Here, by RACE and RT-PCR technology, we cloned a new *CNGC* from *Zygophyllum xanthoxylum*, designated as *ZxCNGC5*. By bioinformatics analysis of the *ZxCNGC5*, we found that this gene encoded 728 amino acids, including six transmembrane helix with a Pore loop, cyclic nucleotide-binding domain and calmodulin-binding domain, which were unique to CNGCs family. Phylogenetic analysis showed that CNGCs family could be divided into 5 subfamily (I, II, III, IVA and IVB) and *ZxCNGC5* belonged to the II subfamily. Tissue specificity analysis suggested that the gene was especially expressed in roots. Further, under the 0.01 and 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 treatment, the expression of *ZxCNGC5* in roots was significantly induced in short term and reached the highest at 3 and 12 h, and then decreased gradually. These results indicated that the expression of *ZxCNGC5* in roots was induced in short time when adding the CaCl_2 .

Key words: *Zygophyllum xanthoxylum*; Ca^{2+} ; CNGC5; gene cloning; expression pattern

Received 2017-10-11 Accepted 2017-12-22

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31730093 and 31470503).

*Corresponding author (smwang@lzu.edu.cn).