

DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.2019.02.016

# 盐藻钙依赖蛋白激酶基因 DsCDPK 的表达分析

丛玉婷,邢震宇,岳金荣,高相楠,张晓琳,柴晓杰

(大连海洋大学,辽宁省省级高校水生生物学重点实验室,辽宁 大连 116023)

**摘 要:**以盐藻总 RNA 为模板,利用 RT-PCR 技术扩增了盐藻 DsCDPK 基因的 cDNA 序列,将其克隆到 pMD™19-T simple 载体上,经测序获得的克隆片段全长 1650 bp,与已发表的盐藻 DsCDPK(GenBank: JQ964113)的编码区序列同源性达 100%。将 DsCDPK 基因的开放阅读框与质粒 pET-32a(+) 连接,构建原核表达载体 pET-32a-DsCDPK。将该重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 中,经 IPTG 诱导融合,蛋白在大肠杆菌 BL21 中得到成功表达。通过 SDS-PAGE 检测发现,融合蛋白为部分可溶性表达,将上清蛋白经过 His 柱纯化后获得了纯度较高的可溶性融合蛋白,Western 杂交检测显示,融合蛋白能被抗 His 单克隆抗体特异性识别,初步证明该融合蛋白就是带有 His 标签的 DsCDPK 蛋白。采用实时荧光定量 PCR 方法分析了高盐胁迫下 DsCDPK 基因的表达模式。试验结果表明,盐藻 DsCDPK 基因为盐胁迫上调基因,在高盐(3.0 mol/L NaCl)胁迫下,DsCDPK 基因表达量显著增加,盐胁迫 1 h 时表达量达到最高,为正常生长状况(1.0 mol/L NaCl)下的 3 倍,差异达到极显著水平( $P < 0.01$ )。该研究成果为进一步阐明盐藻钙依赖蛋白激酶基因的功能及作用机制奠定了基础。

**关键词:**杜氏盐藻;DsCDPK;原核表达;实时荧光定量 PCR;盐胁迫

**中图分类号:** Q786

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-1111(2019)02-0248-06

盐藻(*Dunaliella salina*)是已知最为耐盐的细胞真核生物,它能在低盐和高盐(NaCl 的浓度为 0.05~5.0 mol/L)的极端环境中生存,已引起了生物学家的广泛关注,并成为耐盐植物中的模式生物。一直以来,国内外学者从渗透调节<sup>[1-3]</sup>、耐盐基因<sup>[4-5]</sup>和盐适应蛋白质<sup>[6-7]</sup>等多个方面对其进行了深入研究,并取得了一些研究成果。但盐藻应答盐胁迫信号的分子机制目前尚不清楚。

钙依赖蛋白激酶(CDPK)是一种新型的仅仅依赖  $Ca^{2+}$  而不依赖钙调素的蛋白激酶。当结合上  $Ca^{2+}$  后该蛋白才具有活性,活化状态的蛋白分子具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的活性<sup>[8]</sup>。钙依赖蛋白激酶广泛存在于植物、藻类及部分原生动物中,尚未在细菌、真菌、酵母、线虫和动物中发现<sup>[9]</sup>。研究表明,钙依赖蛋白激酶广泛参与了  $Ca^{2+}$  信号转导通路介导的细胞碳氮代谢<sup>[10]</sup>、逆境胁迫应答<sup>[11]</sup>、植物细胞膜系统的物质运输<sup>[12-13]</sup>、植物细胞肌动蛋白张力的调节<sup>[14-15]</sup>和生长发育调节<sup>[16]</sup>等诸多生物学过程,特别是在抗逆胁迫信号转导途径中起到了关键作用。因此,研究盐藻钙依赖蛋白激酶基因的功

能,对于阐明盐藻耐盐的分子机制和信号转导途径具有重要的科学意义。

笔者自盐藻中提取其总 RNA,以总 RNA 为模板,利用实时荧光定量 PCR 技术获得盐藻钙依赖蛋白激酶基因 DsCDPK,构建原核表达载体并在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中成功表达;通过实时荧光定量 PCR 技术分析在盐胁迫条件下 DsCDPK 基因的表达情况,以期为进一步阐明盐藻适应高盐环境的分子机制及盐藻应答盐胁迫信号的分子途径提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

盐藻藻种由大连海洋大学水生生物学实验室提供。盐藻培养液为康威试液<sup>[17]</sup>,25 °C,12 h 光照(光照度为 1250 lx),12 h 黑暗,进行交替静置培养。大肠杆菌 BL21, pET-32a 由本室保存, pMD™19-T simple 购自 TaKaRa 公司。

RNAiso Plus、DNA Marker DL-2000、限制性内切酶、Taq 酶、溶菌酶、IPTG、X-gal、DEPC、Re-

收稿日期:2018-03-21; 修回日期:2018-08-22。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31472260,30972240)。

作者简介:丛玉婷(1980—),女,实验师,硕士;研究方向:基础生物学。E-mail:conguyuting@dlou.edu.cn。通讯作者:柴晓杰(1963—),女,教授,博士;研究方向:海洋生物分子生物学。E-mail:cxi63@126.com。

verse Transcriptase M-MLV (RNase H<sup>-</sup>)均购自 TaKaRa 公司,凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术有限公司,其他分析纯试剂均为科密欧生产厂家提供。

### 1.2 盐藻总 RNA 的提取

取对数生长期的盐藻 10 mL(培养液含 3.0 mol/L NaCl),离心收集藻细胞,按照 RNAiso Plus 试剂盒(TaKaRa, China)操作说明书提取总 RNA。经 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 含量。

### 1.3 盐藻 DsCDPK 基因的克隆及原核表达载体的构建

根据 DsCDPK 基因 cDNA 全长序列(GenBank: JQ964113)设计引物,N1:5'-CGGAATTCATGGGGTGTTCGGACAGCAAACCTG-3'(下划线处为 EcoRI 酶切位点)和 N2:5'-GTCGACTCAAGCCGTGGCCTTGACCATGGGT-3'(下划线处为 Sal I 酶切位点)。用总 RNA 反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板,N1、N2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 min,35 个循环;72 °C 延伸 10 min。目的片段与 pMD<sup>TM</sup>19-T simple 载体连接,获得阳性单克隆。将重组质粒 pMD<sup>TM</sup>19-DsCDPK 和 pET-32a 质粒均用 EcoR I、Sal I 双酶切,回收目的片段及载体大片段,T4 DNA 连接酶连接,重组克隆经筛选、鉴定及测序。

### 1.4 盐藻 DsCDPK 基因的原核表达及融合蛋白的可溶性分析

将测序正确的 pET-32a-DsCDPK 重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(TIANGEN 公司)感受态细胞,挑取单菌落,接种于 5 mL LB 液体培养基(Amp 50 mg/L)中,37 °C 振荡培养(200 r/min)24 h。取 1 mL 菌液转接到 50 mL LB 液体培养基(Amp 50 mg/L)中,37 °C,200 r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,培养 5 h 后(同时设置对照)离心收集沉淀,再加入 0.1 mol/L PBS 10 mL 重悬,在冰浴中用超声波细胞破碎仪进行破碎细胞 20 min(功率 30 W,工作 9 s,间歇 9 s)。8000 r/min 离心 5 min,分别收集上清液和沉淀,进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.5 重组蛋白的 Western 杂交检测

用超声波细胞破碎仪破碎诱导后的菌液(冰浴,间歇时间为 10 s,10 min),12 000 r/min,4 °C 离心 20 min 后取上清液用 0.45 μm 滤膜抽滤。然后用 His60 镍柱纯化试剂盒(Clontech 公司)纯化,纯化产物经 SDS-PAGE 分离,电转移(200 mA,3 h)

至硝酸纤维素膜,用 3% BSA 4 °C 封闭 24 h,然后将硝酸纤维素膜置于用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液按 1:1000 比例稀释的 Anti-His Antibody(TIANGEN 公司)中,37 °C 孵育 1 h,用 0.01 mmol/L PBST 洗涤 3 次,每次 5 min。然后加入二抗(TIANGEN 公司)HRP-IgG(1:200),37 °C 孵育 1 h,洗涤(方法同上),最后使用 TMB 显色液(TIANGEN 公司)进行显色。

### 1.6 盐胁迫下盐藻 DsCDPK 基因的表达分析

盐藻在培养液中生长至对数生长期(培养液含 1.0 mol/L NaCl),此时加入 NaCl 致使其盐浓度达到 3 mol/L。分别提取胁迫 0(对照)、0.5、1、6、12、24 h 的盐藻的总 RNA。用紫外分光光度法检测 RNA 样品的纯度和含量,然后取各 RNA 样品 500 ng 反转录。目的基因引物为 D1:5'-GGACTTTGGGCTGTCTCGTTT-3' 和 D2:5'-CTTGGCTGCGTCTGTGATCTT-3';18S 内参基因引物为 N1:5'-TTGGGTAGTCGGGCTGGTC-3',N2:5'-CGCTGCGTTCTTCATCGTT-3'。荧光定量 PCR 反应在 ABI 7300 Real-Time PCR System 上进行,反应体系为:SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II (TaKaRa, China)10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL,ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL,cDNA 模板 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 6 μL。反应条件为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 34 s,40 个循环,反应结束后确认扩增曲线和融解曲线。采取 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 DsRab 基因的相对表达量<sup>[20]</sup>。采用 SPSS 软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 盐藻 DsCDPK 基因的克隆及原核表达载体的构建

以盐藻总 RNA 为模板进行 PCR 扩增,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物(图 1a)。在约 2000 bp 位置有一条清晰的条带,与试验预期结果一致。重组质粒 pMD19-T Simple-DsCDPK 经双酶切及质粒 PCR 检测,结果表明,目的片段已连接到克隆载体 pMD19-T simple 上(图 1b)。重组质粒的测序结果与目的基因序列比对后,与 DsCDPK 开放阅读框完全一致,表明重组质粒 pMD19-T Simple-DsCDPK 构建成功。将已经鉴定正确的克隆载体 pMD19-T Simple-DsCDPK 和原核表达载体 pET-32a 进行 EcoR I、Sal I 双酶切,经 T4 连接酶连接,构建原核表达载体 pET-32a-DsCDPK,转化大肠杆菌 BL21 感受态,筛选出阳性单克隆。经 EcoR I、

Sal I 双酶切和质粒 PCR 检测(图 1c),结果显示,目的片段大小与预期一致,说明目的片段与原核表达载体正确连接。测序结果表明,扩增片段为 1650

bp,与 DsCDPK(GenBank: JQ964113)开放阅读框完全一致,读码框正确,原核表达载体 pET-32a-DsCDPK 构建成功。

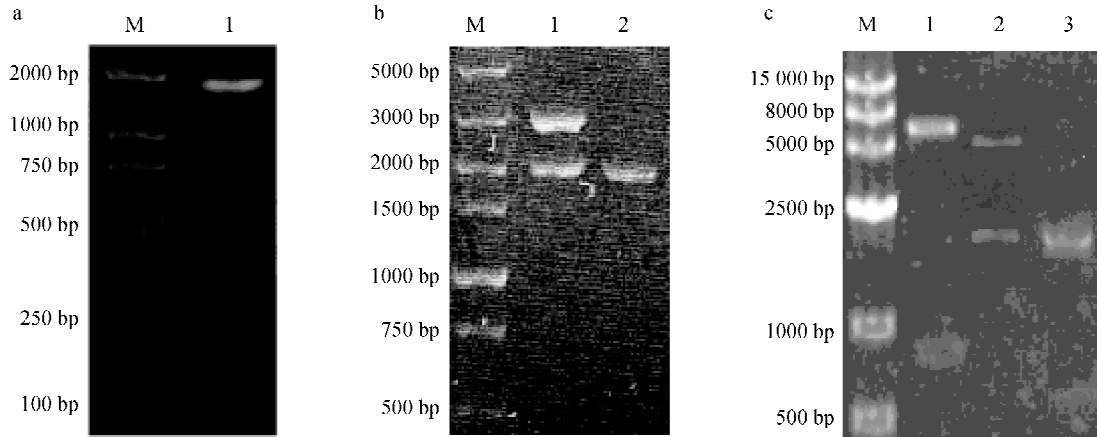


图1 盐藻 DsCDPK 的 PCR 及酶切产物的琼脂糖凝胶电泳分析

a, M: DNA marker DL-2000, 1: PCR 产物; b, M: DNA marker DL-5000, 1: 酶切产物, 2: PCR 产物; c, M: DNA marker DL-15 000, 1: 重组质粒, 2: 酶切产物, 3: PCR 产物。

## 2.2 盐藻 DsCDPK 基因的原核表达及重组蛋白的 Western 杂交检测

将 pET-32a-DsCDPK 及 pET-32a 转化至表达菌大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,含有空载体 pET-32a 的表达菌为对照组,含有 pET-32a-DsCDPK 重组质粒的表达菌,经 IPTG 诱导后,电泳结果显示,约在 82 ku 处有一条明显增强的条带,与预期结果相符(融合蛋白包括预计分子量为 61 ku 的 DsCDPK 蛋白和 21 ku 的 His 标签蛋白),而含有空载体 pET-32a 的表达菌,未显示该目的条带,表明

DsCDPK 基因在大肠杆菌中成功表达。诱导后的大肠杆菌表达菌经超声波破碎,取上清液和沉淀分别电泳,结果表明,上清液和沉淀均可见清晰的目的蛋白条带,说明目的蛋白为部分可溶性表达(图 2)。可溶性蛋白经 His60 镍柱纯化试剂盒纯化,纯化产物经 Western blotting 检测,在 82 ku 处有明显的单一蛋白条带(图 3),说明融合蛋白能与抗 His 单克隆抗体特异性结合,具有良好的免疫学活性,初步证明纯化的蛋白就是带有 His 标签的钙依赖蛋白激酶。

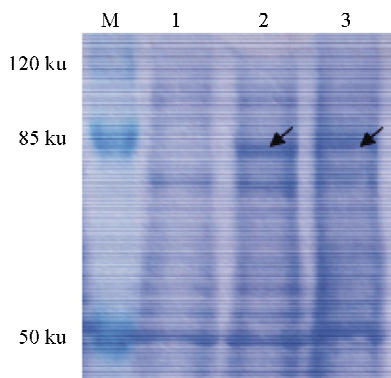


图2 融合蛋白的诱导表达和表达形式分析

M: 标准蛋白分子量; 1: 含 pET-32a 质粒的表达菌株经 IPTG 诱导; 2: 含 pET-32a-DsCDPK 的表达菌株经 IPTG 诱导后在上清液中的表达; 3: 含 pET-32a-DsCDPK 的表达菌株经 IPTG 诱导后在沉淀中的表达。

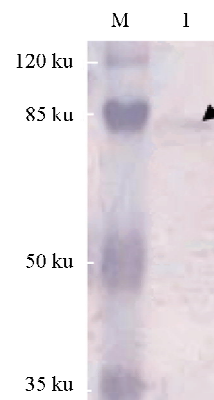


图3 Western blotting 检测  
M: 标准蛋白分子量, 1: 纯化的融合蛋白。

### 2.3 盐胁迫条件下 DsCDPK 基因的表达分析

通过实时荧光定量 PCR 方法分析了盐藻 DsCDPK 基因在盐胁迫条件下的表达模式,结果见图 3。在 0 h 正常生长条件下(未胁迫),DsCDPK 基因的表达量很低,当受到 3.0 mol/L NaCl 胁迫时,DsCDPK 基因的表达量明显升高,在胁迫 1 h 时表达量是未胁迫时的 3 倍,并且达到最高,差异达极显著水平( $P < 0.01$ )。随着胁迫时间的延长,表达量有所下降,但仍高于正常情况下的表达量(图 4),表明 DsCDPK 为盐胁迫上调基因,可能在盐藻应答高盐胁迫的生理过程中起重要作用。

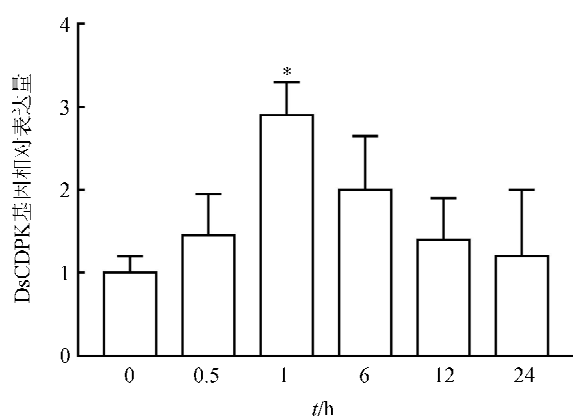


图 4 盐藻 DsCDPK 基因在不同盐胁迫时间下的表达分析

## 3 讨论

### 3.1 钙依赖蛋白激酶参与植物应答盐胁迫过程的调控

细胞在各种外界信号刺激下做出的应答反应主要是通过蛋白激酶对通路蛋白的磷酸化修饰、蛋白质的相互作用以及下游靶基因表达的改变等一系列生化事件最后导致特定的生物效应。研究表明,钙依赖蛋白激酶广泛参与了逆境胁迫应答和生长发育等多种  $Ca^{2+}$  信号传递途径中信号的介导。盐胁迫、干旱胁迫、冷胁迫、光照及渗透胁迫等多种逆境胁迫,均能诱导钙依赖蛋白激酶基因的特异性表达并引起钙依赖蛋白激酶在 mRNA 水平的特异性积累。在拟南芥中发现的钙依赖蛋白激酶基因 cATCDPK1 和 cATCDPK2,在高盐和干旱胁迫下其 mRNA 水平的表达被迅速诱导<sup>[11]</sup>。Saijo 等<sup>[18]</sup>在转基因水稻中对钙依赖蛋白激酶基因进行了盐胁迫、干旱胁迫和冷胁迫的表达分析,研究发现,水稻应对盐胁迫(200 mmol/L NaCl)时 OsCDPK7 基因的表达量增加。Kiselev 等<sup>[19]</sup>研究发现,人参钙依赖蛋白激酶基因 PgCDPK1c、PgCDPK2c 和 PgCDPK4a 在 60 mmol/L NaCl 盐浓度下表达量明

显增加。Romeis 等<sup>[20]</sup>发现,低渗胁迫能够诱导烟草钙依赖蛋白激酶基因 NtCDPK2 的磷酸化及其转录产物的增加。Yuasa 等<sup>[21]</sup>在半咸水轮藻(*Lamprothamnium succinctum*)中发现了钙依赖蛋白激酶,并证明其参与了低渗条件下细胞体积的调节。而有关盐藻钙依赖蛋白激酶基因在该方面的研究尚未见报道。

本试验采用 Real-time PCR 技术分析了盐藻在高盐胁迫条件下的表达模式。研究发现,在正常生长条件下盐藻 DsCDPK 基因的表达量很低,当受到 3 mol/L NaCl 胁迫时,DsCDPK 基因的表达量明显升高,胁迫 1 h 时表达量达到最高。说明盐藻 DsCDPK 基因受盐胁迫诱导。Harmon 等<sup>[22]</sup>研究表明,钙依赖蛋白激酶可调节许多底物包括转录因子、代谢酶类、离子通道和离子泵、骨架蛋白等。推测钙依赖蛋白激酶可能调控盐藻在高盐胁迫下迅速的体积变化、离子的转运和细胞增殖等,在盐藻应答高盐胁迫的生理过程中可能发挥着非常重要的作用。

### 3.2 钙依赖蛋白激酶的原核表达与纯化

在前期工作中,克隆到了一种钙依赖蛋白激酶基因<sup>[23]</sup>,为进一步研究该蛋白激酶的性质及功能,需要获得高纯度的可溶性蛋白。由于大肠杆菌表达系统具有易于培养和控制、操作简单、表达蛋白产量高、需时短、试验成本低、表达产物易于纯化等优点,在科研和生产领域已成为最常用的表达外源蛋白的宿主<sup>[24]</sup>。本研究中融合蛋白的表达采用原核表达系统,以大肠杆菌 BL21 为表达菌,将构建的原核表达载体 pET-32a-DsCDPK 导入受体菌,融合蛋白在大肠杆菌中获得了成功表达。但外源基因在宿主细胞的表达水平,不仅依赖于宿主本身,还受诱导条件、目的基因核苷酸序列组成、蛋白质的性质等因素的影响。有研究报道,如果目的基因的 GC 含量大于 70%,可能会降低其在宿主细胞中的表达水平<sup>[25-27]</sup>。通过 Bioedit 软件分析发现,DsCDPK 基因开放阅读框基因序列的 GC 含量为 54.52%,对表达水平的影响不大。有研究表明,亲水性的蛋白质较疏水性的膜蛋白更易表达<sup>[28-29]</sup>。生物信息学分析发现,DsCDPK 蛋白为亲水性蛋白质,这将提高其表达可溶性蛋白质的效率。经过反复摸索诱导条件,最后确定 DsCDPK 基因最适表达条件为:温度 28 °C, IPTG 浓度 0.6 mmol/L,诱导培养时间 4 h。将获得的融合蛋白进行可溶性分析,发现在破碎细胞的上清液中表达量较多,而在包涵体中表达量较小,结果很理想。

为获得高纯度的融合蛋白,将收集的可溶性蛋白经 His60 镍柱纯化试剂盒纯化,能识别 His 标签的融合蛋白被吸附在柱子上,再经过洗脱,得到纯度较高的融合蛋白。为进一步确定得到的融合蛋白是否为目的蛋白,对纯化的融合蛋白进行 Western 杂交检测。结果显示,融合蛋白与羊抗鼠 IgG 单抗进行了特异性的结合,并且具有良好的免疫学活性,初步证明纯化的蛋白就是带有 His 标签的钙依赖蛋白激酶。后续的工作将利用获得的 DsCDPK 蛋白制备抗体,应用免疫共沉淀技术、液相二级质谱技术和生物信息学方法筛选出与钙依赖蛋白激酶相互作用的蛋白质,构建蛋白质相互作用网络,在蛋白质组学的水平上研究钙依赖蛋白激酶的功能,这将为进一步阐明钙依赖蛋白激酶在盐藻应答盐胁迫信号传递途径中的作用提供新的理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 周丽,孟祥红,刘成圣,等. 渗透胁迫对杜氏盐藻胞内甘油含量及相关酶活性影响[J]. 植物学通报,2006,23(2):145-151.
- [2] Chen H, Lao Y M, Jiang J G. Effects of salinities on the gene expression of a (NAD<sup>+</sup>)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Dunaliella salina* [J]. Science of The Total Environment,2011,409(7):1291-1297.
- [3] Zhao L N, Gong W F, Chen X W, et al. Characterization of genes and enzymes in *Dunaliella salina* involved in glycerol metabolism in response to salt changes[J]. Phycological Research,2013,61(1):37-45.
- [4] He Q, Qiao D, Bai L, et al. Cloning and characterization of a plastidic glycerol 3-phosphate dehydrogenase cDNA from *Dunaliella salina* [J]. Journal of Plant Physiology,2007,164(2):214-220.
- [5] Jia Y, Xue L, Liu H, et al. Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene from the halotolerant alga *Dunaliella salina* and inhibition of its expression by RNAi [J]. Current Microbiology,2009,58(5):426-431.
- [6] Liska A J, Shevchenko A, Pick U, et al. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics [J]. Plant Physiology,2004,136(1):2806-2817.
- [7] Katz A, Waridel P, Shevchenko A, et al. Salt-induced changes in the plasma membrane proteome of the halotolerant alga *Dunaliella salina* as revealed by blue native gel electrophoresis and nano-LC-MS/MS analysis [J]. Molecular & Cellular Proteomics,2007,6(9):1459-1472.
- [8] 陈硕,陈珈. 植物中钙依赖蛋白激酶(CDPKs)的结构与功能[J]. 植物学通报,2001,18(2):143-148.
- [9] Roberts D M, Harmon A C. Calcium-dependent proteins: target of intracellular calcium signals in higher plants [J]. Annual Review of Plant Biology,1992(43):375-414.
- [10] Johnson C H, Knight M R, Kondo T, et al. Circadian oscillations of cytosolic and chloroplastic free calcium in plants [J]. Science,1995,269(5232):1863-1865.
- [11] Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, et al. Two genes that encode Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase are induced by drought and high salt stresses in *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular Genetics and Genomics,1994,244(4):331-340.
- [12] Camoni L, Fullone M R, Marra M, et al. The plasma membrane H-ATPase from maize roots is phosphorylated in the C-terminal domain by a calcium-dependent protein kinase [J]. Physiology of Plant,1998,104(4):549-555.
- [13] Huang J Z, Hardin S C, Huber S C. Identification of a novel phosphorylation motif for CDPKs: phosphorylation of synthetic peptides lacking basic residues at P-3/P-4 [J]. Archives of Biochemistry Biophysics,2001,393(1):61-66.
- [14] Moutinho A, Trewavas A J, Malho R. Relocation of a Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase activity during pollen-tube reorientation [J]. Plant Cell,1998,10(9):1499-1509.
- [15] Grabski S, Arnoys E, Busch B, et al. Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphatases [J]. Plant Physiology,1998,116(1):279-290.
- [16] Frattini M, Morello L, Breviaro D. Rice calcium-dependent protein kinase isoforms OsCDPK2 and OsCDPK11 show different responses to light and different expression patterns during seed development [J]. Plant Molecular Biology,1999,41(6):753-764.
- [17] 陈明耀. 生物饲料培养 [M]. 北京:中国农业出版社,1995:62-63.
- [18] Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, et al. Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confer both cold and salt/drought tolerance on rice plants [J]. Plant Journal,2000,23(3):319-327.
- [19] Kiselev K V, Grishchenko O V, Zhuravlev Y N. CDPK gene expression in salt tolerant rolB and rolC transformed cell cultures of *Panax ginseng* [J]. Biologia Plantarum,2010,54(4):621-630.
- [20] Romeis T, Ludwig A A, Martin R, et al. Calcium-dependent protein kinase plays an essential role in a plant defence response [J]. Embo Journal,2001(20):5556-5567.

- [21] Yuasa T, Okazaki Y, Iwasaki N, et al. Involvement of a calcium-dependent protein kinase in Hypoosmotic Turgor Regulation in a Brackish Water Characeae *Lamprothamnium succinctum* [J]. *Plant & Cell Physiology*, 1997, 38(5):586-594.
- [22] Harmon A C, Cribbskov M, Harper J F. CDPKs-B kinase for every  $Ca^{2+}$  signal [J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(4):154-159.
- [23] 张晓琳, 柴晓杰, 张婷, 等. 盐藻 CDPK 基因的克隆与生物信息学分析 [J]. *核农学报*, 2013, 27(4):418-424.
- [24] Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review [J]. *Protein Expression and Purification*, 2011, 80(2):260-267.
- [25] 王鸿鹤, 朱孝峰, 谢冰芬. 人细胞周期蛋白 D1 及细胞周期蛋白激酶 CDK4 的原核表达及鉴定 [J]. *中山大学学报*, 2003, 24(5):444-447.
- [26] Mueller R B, Pical C. Inositol phospholipid metabolism in arabidopsis, characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(1):22-46.
- [27] Yuasa T, Muto S. Activation of a 40-kDa protein kinase in response to hypo- and hyperosmotic shock in the halotolerant green alga *Dunaliella tertiolecta* [J]. *Plant and Cell Physiology*, 1996, 37(1):35-42.
- [28] Kamigaki A, Mano S, Terauchi K, et al. Identification of peroxisomal targeting signal of pumpkin catalase and the binding analysis with PTS1 receptor [J]. *The Plant Journal*, 2003, 33(1):161-175.
- [29] Durban M A, Silbersack J, Schweder T, et al. High level expression of a recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2007, 74(3):634-639.

## Expression of $Ca^{2+}$ -dependent Protein Kinase (CDPK) Gene from Green Alga *Dunaliella salina*

CONG Yuting, XING Zhenyu, YUE Jinrong, GAO Xiangnan, ZHANG Xiaolin, CHAI Xiaojie  
(Key Laboratory of Hydrobiology in Liaoning Province, College of Fisheries and Life Science,  
Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

**Abstract:** In this study, cDNA corresponding to  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase (CDPK) gene (DsCDPK) was isolated from green alga *Dunaliella salina* using the total RNA of the green alga as a template by reverse transcription PCR (RT-PCR), and the DsCDPK gene was cloned into pMDTM19-T simple vector. The DNA sequence of DsCDPK gene was shown to contain a 1650 bp open reading frame. Alignment analysis showed that the amino acid sequence of the gene was 100% identical to DsCDPK gene (GenBank No. JQ964113) submitted in previous study. Then the DsCDPK gene was cloned into pET-32a (+) expression vector, and introduced into *Escherichia coli* BL21 (DE3) for expression. The fusion protein was induced with isopropyl  $\beta$ -D-1 thiogalactopyranoside (IPTG), and the soluble recombinant protein was expressed successfully and purified using a His-Sefinose<sup>TM</sup> Kit. The purified DsCDPK protein was identified further by SDS-PAGE and western blotting analysis. Real time quantitative RT-PCR demonstrated that DsCDPK was up-regulated genes with salt stress. The expression level of DsCDPK was induced by 3.0 mol/L NaCl, with the maximum in 1 h. The relative expression level of DsCDPK was 3-fold higher than that by 1.0 mol/L NaCl ( $P < 0.01$ ). These findings provide the bases for research of biological function and mechanism of DsCDPK gene.

**Key words:** *Dunaliella salina*; DsCDPK; prokaryotic expression; real time quantitative RT-PCR; salt-stress