

文章编号:1000-8551(2020)07-1387-10

山葡萄 VaCIPK18 原核表达与多克隆抗体制备

吴楠¹ 张宁波^{1,2,4} 郑巧玲¹ 陈卫平⁵ 徐伟荣^{1,2,3,4,*}¹宁夏大学农学院,宁夏 银川 750021;²葡萄与葡萄酒教育部工程研究中心,宁夏 银川 750021;³宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室,宁夏 银川 750021;⁴宁夏葡萄与葡萄酒研究院,宁夏 银川 750021;⁵宁夏农林科学院,宁夏 银川 750021)

摘要:类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白(CBLs)互作蛋白(CIPKs)作为类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在植物响应非生物胁迫信号转导中起着重要作用。基于前期山葡萄响应低温胁迫转录组测序结果,发现低温胁迫引发的早期伤害及感知阶段的激酶基因中涉及 CBL-CIPK 信号通路的 VaCIPK18 表达显著上调。为进一步研究山葡萄(*Vitis amurensis*) VaCIPK18 激酶参与低温胁迫的功能,采用同源克隆获得了 VaCIPK18 基因,其开放阅读框为 1 320 bp,编码 439 个氨基酸。基于对 VaCIPK18 蛋白生物信息学分析,获取胞外结构域中抗原表位丰富的肽段,并将其 C 端调控结构域(230~439 aa)构建到原核表达载体 pET28a-SUMO。将重组表达载体转化至大肠杆菌(*E. coli* Rosetta)中,经 0.8 mmol·L⁻¹ IPTG、37℃ 诱导 4 h 表达出大小为 42 kDa 的包涵体蛋白。将重组蛋白作为抗原免疫日本大耳白兔,获得 anti-VaCIPK18 多克隆抗体,经检测具有高效价及特异性。Western Blot 结果表明,该抗体可以与葡萄内源 CIPK18 特异性结合,且在 50 kDa 位置出现与预期一致的条带。同时,CIPK18 在低温胁迫后葡萄叶片中蛋白表达水平与室温下相一致,但两种状态下均存在可能的磷酸化与泛素化修饰现象。本研究结果为进一步探究 VaCIPK18 的蛋白定位、表达及其功能奠定了基础。

关键词:山葡萄; CIPK18 蛋白激酶; 原核表达; 多克隆抗体; Western blot 检测

DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2020.07.1387

葡萄(*Vitis* spp.)是多年生落叶藤本果树类作物,被广泛用于酿酒、鲜食、制汁、制干、制罐。据联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization, FAO)统计,截至 2016 年,我国葡萄栽培面积为 84 万 hm²,居世界第 2 位;产量约 1 500 万 t,居世界首位。目前,在世界范围内广泛种植的葡萄多数为欧亚种葡萄(*V. vinifera* L.),其品质优,但抗逆性普遍较差。低温对葡萄的伤害是葡萄栽培中常遇到的问题,严重限制了葡萄的栽培区域。我国北方葡萄栽培地区,如西北、华北和东北地区均属于埋土防寒栽培区,由于低温、空气干燥、多风等气象因子,导致冻旱时有发生。因此,培育在我国北方地区免埋土即可安全越冬的抗寒早优质葡萄新品系是发展高产、优质寒地葡萄的有

效途径,也是葡萄育种中亟待解决的问题。

在低温胁迫下,植物通过信号感知、信号转导、转录调控等激活在冷胁迫下信号通路相关基因的表达,引发相应的生理生化反应,对冷胁迫做出相关抗逆响应。其中,Ca²⁺作为第二信使感应胁迫信号,当植物受到冷胁迫时,细胞 Ca²⁺浓度增大^[1]。Ca²⁺信号可通过激酶的磷酸化作用^[2]或转录因子的调控影响细胞的生理生化反应^[3-4]。在高等植物中已发现 4 个主要的钙感受器蛋白家族:钙依赖性蛋白激酶(calcium-dependent protein kinases, CDPKs)、钙调素(calmodulins, CaMs)、类钙调素蛋白(calmodulin-like proteins, CMLs)和类钙调磷酸酶 B 蛋白(calcineurin B-like proteins, CBLs),其中 CBLs 必须与 CIPKs 互作才

收稿日期:2019-05-23 接受日期:2019-08-27

基金项目:地区科学基金项目(31560550),宁夏回族自治区科技重大专项(2016BZ06),宁夏回族自治区重点研发计划重大(重点)项目(2019BBF02022),酿酒葡萄种质创新与现代栽培技术研究示范(YES-2016-06)

作者简介:吴楠,女,主要从事葡萄逆境分子生物学研究。E-mail:carolinew@126.com

* **通讯作者:**徐伟荣,男,副教授,主要从事葡萄逆境分子生物学研究。E-mail: xuwr@nxu.edu.cn

能完成 Ca^{2+} 的信号转导^[5]。CIPK 蛋白激酶普遍存在于陆生植物基因组中^[5], 如拟南芥^[6]、水稻^[7]、高粱^[8-9]、木薯^[10]、白杨^[11]、苹果^[12] 和葡萄^[13] 等。研究表明, CBL-CIPK 复合物参与大范围逆境胁迫条件下的信号转导, 如低温、造伤、干旱和高盐等^[14]。然而, 前期报道多通过目标基因在模式植物中的异源表达研究其功能, 有关其调控逆境胁迫的具体机制研究较少。

有关 CIPKs 参与低温胁迫的研究主要集中在模式植物拟南芥与水稻中。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中, *AtCIPK3* 受低温诱导表达, 且调控 CBF/DREB 靶基因如 *RD29A* 和 *KIN1/KIN2* 的表达^[15]。*AtCIPK7* 通过与负调控因子 *AtCBL1* 相互作用参与植物对低温刺激的信号转导^[16]。水稻 (*Oryza sativa*) *OsCIPK3* 受低温胁迫上调表达, 而过表达 *OsCIPK3* 增强转基因水稻的抗寒性^[17]。小麦 (*Triticum aestivum*) *TaCIPK14* 响应低温诱导表达, 在烟草中过量表达 *TaCIPK14* 增强了转基因植株的抗盐碱和抗寒性^[18]。在水稻中过量表达芜菁 (*Brassica rapa*) *BrCIPK1* 与 *OsCIPK7* 均能增强低温的耐受性^[19-20]。然而, 有关葡萄属植物 CIPK 蛋白激酶基因参与低温胁迫响应的调控机理尚不清楚。

山葡萄 (*Vitis amurensis*) 是葡萄属植物中最抗寒的一个种, 挖掘野生葡萄种质抗寒基因资源, 开展低温胁迫应答机制的解析, 是通过分子手段实现栽培葡萄抗寒性改良的有效途径。Xu 等^[21] 对中国野生抗寒材料山葡萄进行转录组测序分析, 发现参与低温胁迫引发的早期伤害及感知阶段的激酶基因中, 涉及 CBL-CIPK 信号通路的 7 个 CIPK 成员 (*CIPK3*、*CIPK12*、*CIPK13*、*CIPK14*、*CIPK17*、*CIPK18* 与 *CIPK19*), 均参与低温胁迫诱导, 其中 *VaCIPK18* 基因受低温胁迫呈明显上调表达。本研究通过生物信息学分析获取 *VaCIPK18* 胞外结构域中抗原表位丰富的肽段, 利用基因工程手段将编码该蛋白 C 端 230~439 aa 的基因片段构建至原核表达载体 pET28a-*VaCIPK18*²³⁰⁻⁴³⁹, 并诱导表达融合蛋白, 免疫实验级大耳白兔制备高效价特异性抗血清, 并利用该抗血清分析低温胁迫对 *VaCIPK18* 在葡萄叶片内的表达量的影响, 旨在为进一步从蛋白水平解析 *VaCIPK18* 参与葡萄低温信号转导中的功能作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试材料为两年生盆栽扦插的山葡萄左山-1 (*V.*

amurensis cv. Zuoshan-1), 于自然光照条件下温室进行培养。4℃ 低温培养箱 [LT-BIX120L, 立德泰克力 (上海) 科学仪器有限公司] 处理 2 d 后采集叶片组织, 以室温条件下的叶片组织作为对照 (CK), 液氮速冻, 置于 -80℃ 保存备用。

DNA Marker、pMD19-T Vector、PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase、限制性内切酶、反转录试剂盒、蛋白定量试剂盒均购自宝日医生物工程 (大连) 有限公司; 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒均购自北京天根公司; ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; 植物蛋白抽提试剂盒购自上海生工生物工程有限公司; 辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗兔抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。引物合成和测序由北京奥科生物公司完成。

1.2 目的基因克隆

以欧洲葡萄 *VvCIPK18* (VIT_06s0009g01840) 为参考序列, 设计特异引物 *VaCIPK18-F* (ATGAATCCACCTAAAGTCAAGCGTCC) 和 *VaCIPK18-R* (CTGAGGATGACATGCAAGAAACGAAATAA)。以山葡萄叶片 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得目的片段, 建立 25 μL PCR 反应体系: ddH₂O 9.5 μL, cDNA 模板 1 μL, 上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 1 μL, PrimSTAR Max Premix (2×) 12.5 μL; 离心混匀后, 进行 PCR 反应。PCR 反应程序: 98℃ 变性 10 s, 55℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 10 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 胶回收目的片段与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 (*E. coli*) Top10, 菌液 PCR 鉴定后, 阳性克隆送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序。

1.3 生物信息学分析

山葡萄 *VaCIPK18* 基因序列经北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序后, 提交至 NCBI 数据库。采用 ExpASy (<https://www.expasy.org/>) 在线分析氨基酸的理化性质; MEGA7.0 软件中的邻接 (Neighbor-Joining) 法构建蛋白系统进化树。运用 SMART: Main page (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 进行蛋白结构域分析; 通过 IEDB analysis Resource (<http://tools.immuneepitope.org/main/>) 进行线性表位预测。运用 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜结构预测。通过 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测。

1.4 原核表达载体构建

根据线性表位预测结果, 选择山葡萄 *VaCIPK18* 蛋白 230~439 aa 相应的区段, 设计特异引物,

VaCIPK18-SUMO-F:GAACAGATTGGTGGATCCGAATTACTTGCCACCTTGGCTCT 与 VaCIPK18-SUMO-R:T GCGGCCGCAAGCTTTTTCGTTTCTTGCATGT, 以 VaCIPK18 重组克隆质粒为模板, 通过 PCR 扩增获得目的片段。同时使用限制性内切酶 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切原核表达载体 pET28a-SUMO, 通过 ClonExpress® II One Step Cloning Kit (南京诺唯赞生物科技有限公司) 进行同源重组, 将连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 涂板, 挑取单菌落, 摇菌 14 h 后, 进行菌液 PCR 与酶切鉴定。测序正确的质粒命名为 pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹。

1.5 重组蛋白原核表达及可溶性分析

将 pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 重组质粒转化 *E. coli* Rosetta 菌株, 挑取单菌落接种培养 12 h, 进行菌液 PCR 鉴定, 正确的菌株用于原核诱导表达。37℃、200 r·min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 加入 0.8 mmol·L⁻¹ 异丙基-β-d-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-d-thiogalactoside, IPTG), 诱导 4 h 后, 取 1 mL 菌液, 经细菌裂解液处理 30 min 后离心, 对全菌体蛋白、菌体上清、裂解上清、裂解后的沉淀以及未诱导重组菌和诱导的 pET28a 空载体菌, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析, 确定重组蛋白的表达形式。

1.6 包涵体蛋白的处理

VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 重组蛋白以包涵体形式存在, 经大量诱导表达后, 5 500 r·min⁻¹ 离心 20 min 收集菌体, 取 50 mL 的 1×PBS 缓冲液, 重悬菌体, 转入 50 mL 烧杯中, 并加入 50 μL β-巯基乙醇。冰浴超声破碎细胞, 9 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 获得上清液 I 和沉淀; 上清 I 转移至 50 mL 离心管中, 4℃ 保存。沉淀用 8 mol·L⁻¹ 尿素进行二次破菌; 9 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 得到上清液 II 和沉淀, 上清液 II 装于 50 mL 离心管中, 4℃ 保存。沉淀先用去离子水洗涤 2 遍, 再加入 6 mL ddH₂O, 悬浮后平均分装到 4 个 2 mL 的离心管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 弃上清液。向管中加入 1.5 mL 8 mol·L⁻¹ 尿素溶解沉淀, 12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 上清液移入到新的 2 mL 离心管中, 采用 BCA 法^[22] 检测洗脱液中蛋白浓度, 进行 12% SDS-PAGE 电泳鉴定。

1.7 融合蛋白的抗血清的制备、效价测定

适应性饲养一周后, 将符合免疫要求浓度的 VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 融合蛋白乳化后, 多点注射 2 只实验级大耳白兔背部皮下, 按照每 kg 体重 1 mg 的剂量, 分别

在第 1、第 12、第 26、第 40 天注射一次, 共免疫 4 次, 第 4 次注射 7 d 后静脉少量采血样, 采用酶联免疫吸附试验法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定抗体效价^[23], 经检测合格后, 于第 52 天后动脉一次性采血。

1.8 免疫亲和层析柱的制备、兔抗血清的纯化与特异性检测

取 8 mg 多肽, 用 2 mL 偶联缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ Tris, 5 mmol·L⁻¹ EDTA-NA, pH 值 8.5) 溶解; 将 Sulfolink 偶联凝胶平衡至室温, 取 2 mL 加入层析柱中, 旋转培养 2 h。将层析柱静置于层析架, 连接恒流泵, 分别用 40 mL 1×PBS、30 mL 1×Gly、30 mL 1×PBS 平衡柱子。将获得的兔抗血清加入 1/20 4 mol·L⁻¹ NaCl 溶液, 过柱 2 次, 然后加入 40 mL 洗脱缓冲液 (1×PBS, 320 mmol·L⁻¹ NaCl) 洗脱, 再加入 1×Gly 收集样品, 最后向样品中加入过量的 Gly (pH 值 2.2) 洗脱抗体, 并用 1×PBS 平衡。将收集的抗体置于透析袋, 混匀之后取 30 μL 用于抗体浓度测定, 其余抗体置于 1×PBS 的甘油中透析浓缩过夜, -20℃ 保存。将不同剂量重组菌诱导表达的蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳, 并凝胶湿转至硝酸纤维素膜 (NC) 上, 以纯化的兔血清为一抗 (1:1 000), 以荧光标记的山羊抗兔抗体为二抗, 进行蛋白印迹 (Western Blot) 检测, 使用 Azure 蛋白成像 C400 系统 (Azure Biosystems, 美国) 扫描 NC 膜, 进行增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence, ECL) 染色, 采用电泳系统对电泳图像分析。

1.9 Western Blot 分析

将盆栽山葡萄转移至 4℃ 处理 2 d, 收集的叶片组织样品为试验组, 以室温条件下的叶片组织作为对照 (CK), 于液氮中进行研磨。取 200 mg 粉末, 加入 300 μL 蛋白提取液 [100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 值 6.8)、2% SDS、10% 甘油和 0.5% β-巯基乙醇], 4℃、10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液, 进行 12% SDS-PAGE 电泳及 Western Blot 分析。

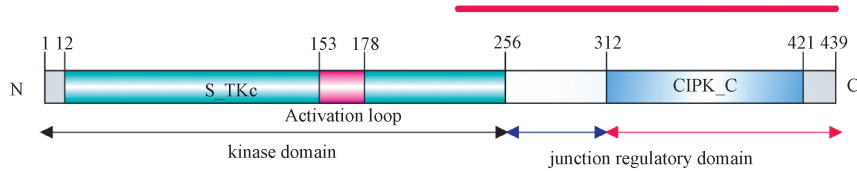
2 结果与分析

2.1 山葡萄 VaCIPK18 克隆与生物信息学分析

本研究克隆获得的山葡萄左山-1VaCIPK18 基因序列全长 1 320 bp, 编码 439 个氨基酸。蛋白结构域预测结果表明, 该蛋白激酶包括 2 个典型的结构域, 分别为 N 端的 S_TKc 激酶结构域 (kinase domain) 和 C 端的调控结构域 (junction regulatory domain) (图 1)。聚类分析表明, 源于植物中与山葡萄 VaCIPK18 同源

的蛋白可聚为双子叶植物与单子叶植物两类(其中人 HsAMPKalpha-2 蛋白为外群);VaCIPK18 与欧洲葡萄 VvCIPK18 亲缘关系最近(相似性为 99.8%),并与碧桃、甜樱桃、大豆与拟南芥聚为一类;同时发现二穗短柄草、山羊草、日本稻、高粱与谷子聚集在单子叶植物类(图 2)。经信号肽预测发现,VaCIPK18 信号肽分值

S 平均值(mean S-score) <0.5 ,表明其不存在信号肽片段,不是分泌蛋白。跨膜结构域预测表明,VaCIPK18 不存在跨膜区域。线性表位、亲水性、免疫原性和表位暴露性预测数据表明,C 端氨基酸抗原表位、暴露性及性质优于 N 端氨基酸区域,因此,选择 230~439 aa 抗原区进行抗体制备(图 1)。



注:S_TKc:蛋白激酶结构域;CIPK_C:C 端的调控结构域;红色直线:用于原核表达的区段。

Note: S_TKc: Kinase domain. CIPK_C: Regulatory domain at C terminal. Red line: Region used for prokaryotic expression.

图 1 山葡萄 VaCIPK18 蛋白结构域预测

Fig.1 Prediction of VaCIPK18 protein domain from *V. amurensis*

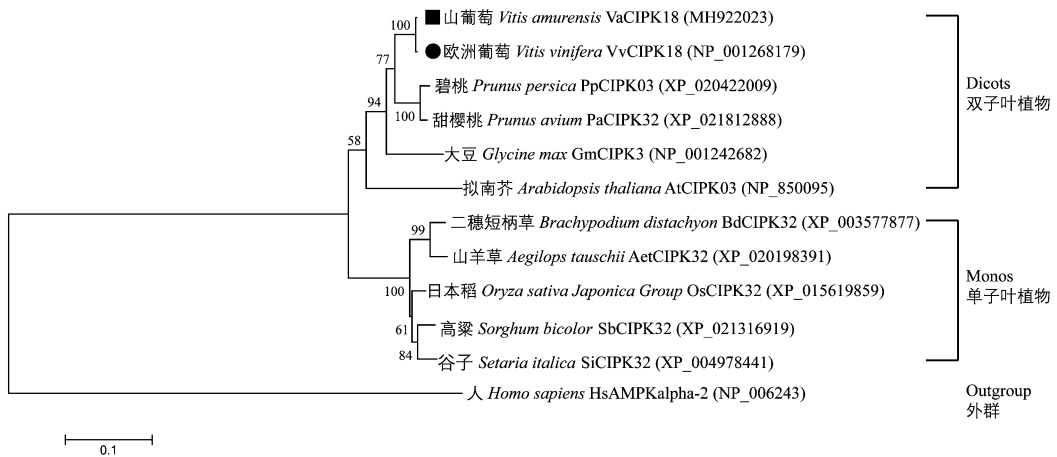


图 2 山葡萄 CIPK18 与其他植物 CIPK 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of CIPK18 amino acid sequence of *V. amurensis* and other related plant species

2.2 VaCIPK18 原核表达载体构建

以 pMD-19-T-VaCIPK18 质粒为模板,PCR 扩增出 630 bp 的目标片段。使用 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切原核表达载体 pET28a-SUMO,通过同源重组获得 pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹(图 3)。经菌液 PCR、双酶切鉴定为阳性的克隆进行测序,正确的克隆转化大肠杆菌 *Rosetta* 菌株。

2.3 VaCIPK18 激酶融合蛋白原核表达以及可溶性分析

将含重组表达质粒 pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 的大肠杆菌 *Rosetta* 进行小规模培养,并在 37℃ 条件下,经 0.8 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 4 h 后,离心取菌体裂解液,进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果表明,空载体与未经 IPTG 诱导的重组质粒 pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 的

Rosetta 菌体中均未检测到目标条带,而经 IPTG 诱导后的菌体中在 42 kDa 左右处出现目标条带,同预测的 VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 肽段分子量 24 kDa 与 His-T7-SUMO 分子量 18 kDa 之和大小一致(图 4),表明在 IPTG 诱导下重组蛋白进行了表达。

取重组菌株进行扩大培养,收集菌体经超声波破碎、离心后,取上清与沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定。结果表明,重组蛋白主要以不可溶的包涵体形式存在于破菌沉淀中,而上清中未检测到重组蛋白条带(图 5)。

2.4 抗血清 ELISA 检测

将包涵体溶解后经 SDS-PAGE 检测,包涵体蛋白纯度达到 90%,目标带清晰,但仍有少量杂带(图 6-A)。经检测,获得重组蛋白包涵体浓度为 10 mg·mL⁻¹,纯度达到免疫要求。免疫大耳兔后,制备抗

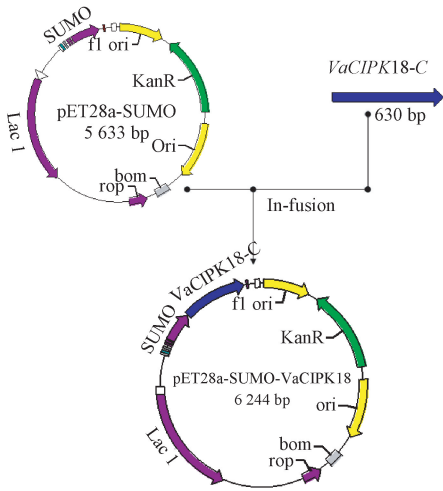
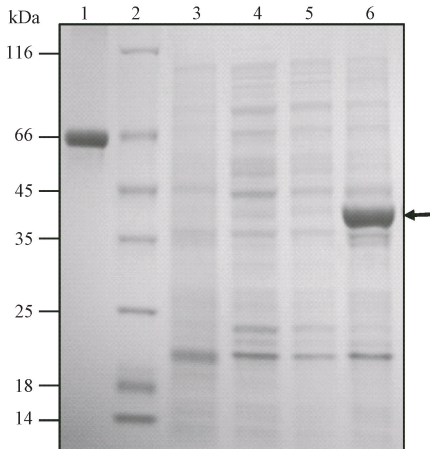


图3 融合蛋白原核表达载体 pET28a-SUMO-VaCIPK18 构建过程示意图

Fig.3 The construction process of fusion protein prokaryotic expression vector pET28a-SUMO-VaCIPK18

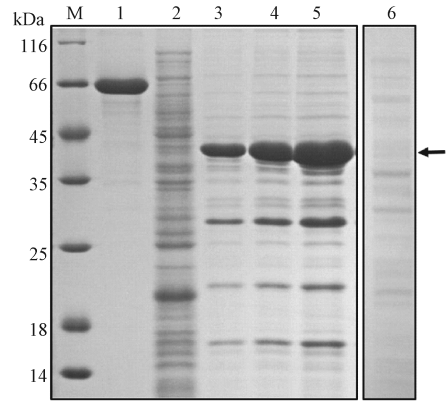


注:1:牛血清蛋白;2: Marker;3: pET28a-SUMO 空载体诱导表达;4、5: pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻²⁴⁹ 未诱导表达;6: pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻²⁴⁹ 诱导表达。

Note: 1: BSA. 2: Marker. 3: Induced expression products of empty pET28a-SUMO vector. 4 and 5: Uninduced expression products of pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻²⁴⁹. 6: Induced expression products of pET28a-VaCIPK18²³⁰⁻²⁴⁹.

图4 VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 原核蛋白诱导表达
Fig.4 Prokaryotic protein induced expression of VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹

血清,通过 ELISA 竞争性抑制法检测纯化血清和效价,结果显示,当抗原稀释比例为 4 K 和 512 K 倍时,纯化血清抗体效价和零标准 OD 值为 1.983 5 与 0.040 7,非纯化血清抗体效价 0.034 1,说明被免疫的兔子产生了抗体,效价最高可达到 1:512 000,其抗血



注:M: Marker; 1: 牛血清蛋白; 2: pET28a 空质粒转化的阴性对照; 3~5: 包涵体 10 倍、5 倍和 2 倍稀释液; 6: 上清部分。

Note: M: Marker. 1: BSA. 2: The negative control of empty plasmid transformation of pET28a. 3-5: Inclusion bodies of 10x, 5x and 2x diluents. 6: The supernatant.

图5 VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 融合蛋白可溶性分析
Fig.5 Analysis of the solubility of VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ fusion protein

清中抗体浓度能满足 Western Blot 的效价值(图 6-B)。

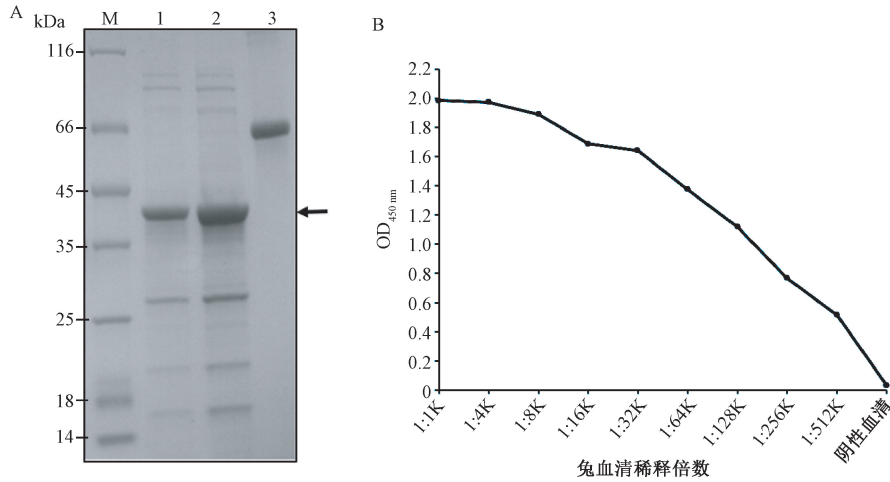
将重组菌诱导表达的不同剂量蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳后转膜,以制备的兔抗血清为一抗,进行 Western Blot 分析检测,10、5、1、0.5 ng 的抗原均可检测到 1 条特异性条带,且大小与预期结果相符(42 kDa),表明抗原与 anti-VaCIPK18 抗体特异性结合(图 7)。

2.5 anti-VaCIPK18 多克隆抗体的检测

为明确山葡萄 VaCIPK18 参与低温胁迫的表达模式,提取山葡萄叶片组织在室温与低温胁迫下的叶片总蛋白,进行 12% SDS-PAGE 电泳,用制备的 anti-VaCIPK18 抗血清进行 Western Blot 分析。结果表明,在室温与低温条件下,均能杂交出与预期大小一致的条带(50 kDa);与室温相比,低温诱导对 VaCIPK18 蛋白表达无显著差异。除了 50 kDa 的特异条带外,还发现在该特异条带上下共 3 条弱的条带(图 8),推测可能与 VaCIPK18 蛋白自磷酸化、蛋白间的磷酸化或泛素化降解有关^[24-25]。

3 讨论

植物为了适应环境胁迫,进化出精细的调控机制进行信号识别与转导,从而对非生物胁迫做出一系列的响应,以缓解对植物生长发育产生的不良影响^[26]。CBL-CIPK 系统是陆生植物特有的 Ca²⁺ 介导响应非生物胁迫的信号转导途径^[27-28]。作为感受器,CBLs 识

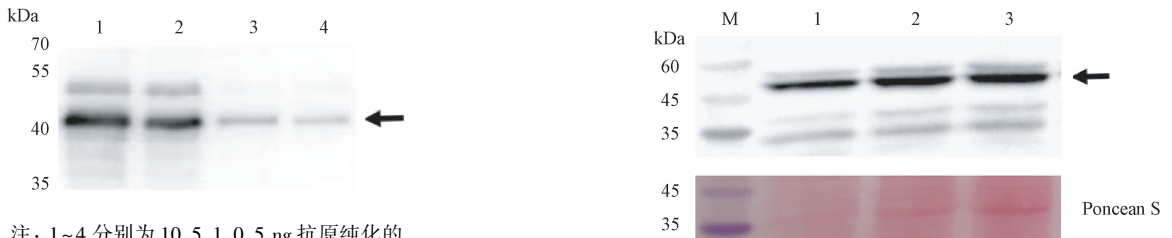


注: A: VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 包涵体蛋白溶解后的 SDS-PAGE 检测; M: Marker; 1~2: 上清部分 10 倍稀释液和 2 倍稀释液; 3: 0.4 mg·mL⁻¹ BSA.
B: ELISA 竞争抑制法检测 anti-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 多克隆抗体效价。

Note: A: Detection of VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ protein on SDS-PAGE gel. M: Marker. 1-2: Supernatant 10x and 2x diluents. 3: 0.4 mg·mL⁻¹ BSA. B: ELISA competitive inhibition method was used to detect the titer of anti-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ polyclonal antibody.

图 6 VaCIPK18 蛋白纯化与多克隆抗体制备

Fig.6 Protein purification and polyclonal antibody preparation of VaCIPK18



注: 1~4 分别为 10、5、1、0.5 ng 抗原纯化的 VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 蛋白。

Note: 1~4: 10, 5, 1, 0.5 ng purified VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ protein, respectively.

图 7 制备的 anti-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 多克隆抗体 Western Blot 分析

Fig.7 Western Blot analysis of anti-VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ polyclonal antibody

注: M: 蛋白 Marker; 1: 山葡萄室温 (25℃) 叶片蛋白; 2 和 3: 山葡萄 4℃ 低温处理 2 d 后叶片蛋白。

Note: M: Protein Marker. 1: Protein isolated from leaves collected at 25℃ from *V. amurensis*. 2 and 3: Protein isolated from leaves collected at 4℃ for 2 d from *V. amurensis*.

图 8 anti-VaCIPK18 在山葡萄叶片中 Western 的检测

Fig.8 Detection of anti-VaCIPK18 in *V. amurensis*

别并结合 Ca²⁺, 激活后的 CBLs 与特异的 CIPKs 激酶互作形成复合物^[29], 该复合物磷酸化其下游靶蛋白, 如 PP2C 磷酸酶^[30]、离子转运蛋白^[31]、转录因子^[32]以及 NADPH 氧化酶 RBOHF^[33]等, 继而调控植物响应逆境胁迫。然而, 有关葡萄属植物 CBL-CIPK 网络中成员参与冷胁迫信号转导中的功能尚鲜见报道。

本研究从抗寒山葡萄种质中克隆获得一个类钙调素 B 亚基蛋白的互作蛋白 VaCIPK18, 其与已报道的拟南芥逆境胁迫基因 AtCIPK3 蛋白高度同源, 表明其可能在低温胁迫中发挥重要的作用。为了深入了解 VaCIPK18 在细胞中的功能以及响应逆境过程中的作用特点, 本研究首先通过生物信息学预测, 综合分析了

该蛋白的跨膜区、信号肽、线性表位、亲水性、免疫原性和表位暴露性数据, 选择该蛋白 230~439 aa 区间, 采取原核表达方法制备了抗血清。在原核表达载体构建中, 考虑到小泛素相关修饰物 (small ubiquitin-like modifier-1, SUMO) 标签具有抗蛋白水解, 显著增加重组蛋白表达量以及消化后无氨基酸残留等优势^[34], 选择 pET28a-SUMO 载体进行原核表达。本研究结果表明, 在 37℃ 条件下, 经 IPTG 诱导获得了不溶性的包涵体蛋白。研究表明, 通过原核系统进行重组蛋白的表达通常会天然的可溶性蛋白与非天然的包涵体形式^[35-36]。推测 VaCIPK18²³⁰⁻⁴³⁹ 包涵体蛋白的形成, 可

能由于该蛋白折叠过程中缺乏所需要的酶和辅助因子,或环境不适,无法形成正确的次级键^[37-38]。由于包涵体蛋白是非折叠状态的聚集体,不具有生物学活性,但对后续免疫检测反应影响不大。因此,本研究对重组融合蛋白包涵体 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素与 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸胍溶解包涵体进行变性,经检测获得了较高纯度的重组蛋白,从而用于后续免疫。本研究制备的 anti-VaCIPK18 多克隆抗体与菌体总蛋白杂交后,目标条带清晰,背景低;ELISA 检测表明,其效价达到 1:512 000,满足抗血清制备要求。

泛素蛋白酶体系统参与众多蛋白的降解,对众多细胞进行调控。泛素依赖性蛋白水解酶在植物激素的形成、感知、信号转导与输出的调节中起着不可或缺的作用^[39]。有研究报道,拟南芥 CIPK26 是 ABA 信号通路中 Ring-type E3 泛素连接酶 KEG (Keep on Going) 的泛素化底物,KEG 靶向 CIPK26 激酶与下游转录因子 ABI5 的结合^[40]。同时,CIPK26 可在体外磷酸化 KEG,活化的 CIPK26 增强了 KEG 的降解^[41]。也有研究表明,未知激酶激活环磷酸化可能是 CIPK 激活的替代机制,其独立于与 CBL 的互作^[42]。本研究在山葡萄叶片蛋白检测的 Western Blot 分析中发现,除了与预期大小一致的内源特异条带(50 kDa)外,在 30~60 kDa 范围内还存在其他条带。一种可能是葡萄 CIPK18 蛋白的泛素化修饰,出现了在 30~45 kDa 区间的两条带,推测可能与 VaCIPK18 作为某种泛素连接酶的底物被蛋白酶体降解有关;另一种是 CIPK18 激酶自身磷酸化或未知蛋白对 CIPK18 的磷酸化,出现在目标条带上方(50~60 kDa)的蛋白条带,这与已报道的激酶 BRI1^[43-44]、BAK1^[45]、激酶抑制剂 BES1^[46] 以及泛素连接酶 PUB13^[47-48] 等蛋白都有磷酸化现象一致。CIPK18 蛋白是否以二聚体或者多聚体的形式存在于葡萄中也需要进一步研究。在本研究中的原核表达系统也发现有类似磷酸化条带的现象,进一步表明该蛋白在植物与细菌中具有保守的功能。因此,VaCIPK18 在植物中所存在的功能形式还需进一步通过构建敲除株系,结合质谱分析或泛素化/磷酸化抗体孵育研究确定。

4 结论

本研究克隆了抗寒山葡萄 VaCIPK18 基因,经生物信息学分析,获取胞外结构域中抗原表位丰富的肽段,并将其 C 端调控结构域(230~439 aa)构建到 pET28a-SUMO 原核表达载体,在大肠杆菌 Rosetta 中,

经 37°C 、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导表达,获得与预期相符的 42 kDa 的重组蛋白,经纯化后获得 anti-VaCIPK18 多克隆抗体。Western Blot 结果表明,该抗体可以特异识别葡萄内源的 CIPK18 激酶,同时发现该蛋白存在可能的磷酸化与泛素化修饰。本研究为进一步从蛋白水平研究 VaCIPK18 蛋白激酶参与低温胁迫中的功能提供了依据。

参考文献:

- [1] Carpaneto A, Ivashikina N, Levchenko V, Krol E, Jeworutzki E, Zhu J K, Hedrich R. Cold transiently activates Calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells [J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(1): 487-494
- [2] Zhu S, Zhou X P, Wu X M, Jiang Z H. Structure and function of the CBL-CIPK Ca^{2+} -decoding system in plant calcium signaling[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(6): 1193-1202
- [3] 张政委,索琳格,吴佩,刘慧英,崔金霞. Ca^{2+} 参与外源 NO 增强低温胁迫下黄瓜幼苗叶片抗氧化能力[J]. *核农学报*, 2018, 32(3): 600-608
- [4] 赵丽丽,王普昶,陈超,宋高翔,唐华江. 外源钙对干旱胁迫下岩溶山区白刺花幼苗生长、生理特性的影响[J]. *核农学报*, 2017, 31(10): 2039-2046
- [5] Luan S. The CBL-CIPK network in plant calcium signaling[J]. *Trends in Plant Science*, 2009, 14(1): 37-42
- [6] Kolukisaoglu U, Weinel S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(1): 43-58
- [7] Kanwar P, Sanyal S K, Tokas I, Yadav A K, Pandey A, Kapoor S, Pandey G K. Comprehensive structural, interaction and expression analysis of CBL and CIPK complement during abiotic stresses and development in rice[J]. *Cell Calcium*, 2014, 56(2): 81-95
- [8] Yu Y H, Xia X L, Yin W L, Zhang H C. Comparative genomic analysis of CIPK gene family in *Arabidopsis* and *Populus* [J]. *Plant Growth Regulation*, 2007, 52(2): 101-110
- [9] Zhang H C, Yin W L, Xia X L. Calcineurin B-Like family in *Populus*: Comparative genome analysis and expression pattern under cold, drought and salt stress treatment [J]. *Plant Growth Regulation*, 2008, 56(2): 129-140
- [10] Hu W, Xia Z Q, Yan Y, Ding Z H, Tie W W, Wang L Z, Zou M L, Wei Y X, Lu C, Hou X W, Wang W Q, Peng M. Genome-wide gene phylogeny of CIPK family in cassava and expression analysis of partial drought-induced genes[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 914
- [11] Weinel S, Kudla J. The CBL-CIPK Ca^{2+} -decoding signaling network:

- Function and perspectives[J]. *New Phytologist*, 2009, 184: 517–528
- [12] Niu L L, Dong B Y, Song Z H, Meng D, Fu Y J. Genome-wide identification and characterization of CIPK family and analysis responses to various stresses in apple (*Malus domestica*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 2131
- [13] Xi Y, Liu J Y, Dong C, Cheng Z M. The CBL and CIPK gene family in grapevine (*Vitis vinifera*): Genome-wide analysis and expression profiles in response to various abiotic stresses [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 978
- [14] Yu Q Y, An L J, Li W L. The CBL-CIPK network mediates different signaling pathways in plants[J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(2): 203–214
- [15] Kyung-Nam K, Hwa C Y, Grant J J, Pandey G K, Sheng L. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2003, 15(2): 411–423
- [16] Huang C L, Ding S, Zhang H, Du H, An L Z. CIPK7 is involved in cold response by interacting with CBL1 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Science*, 2011, 181(1): 57–64
- [17] Xiang Y, Huang Y M, Xiong L Z. Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement[J]. *Plant Physiology*, 2007, 144(3): 1416–1428
- [18] Deng X M, Zhou S Y, Hu W, Feng J L, Zhang F, Chen L H, Huang C, Luo Q C, He Y Z, Yang G X, He G Y. Ectopic expression of wheat TaCIPK14, encoding a calcineurin B-like protein-interacting protein kinase, confers salinity and cold tolerance in tobacco[J]. *Physiologia Plantarum*, 2013, 149(3): 367–377
- [19] Abdula S E, Lee H J, Ryu H, Kang K K, Nou I, Sorrells M E, Cho Y G. Overexpression of *BrCIPK1* gene enhances abiotic stress tolerance by increasing proline biosynthesis in rice [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, 34(2): 501–511
- [20] Zhang D G, Guo X Y, Xu Y Y, Li H, Ma L, Yao X F, Weng Y X, Guo Y, Liu C M, Chong K. OsCIPK7 point-mutation leads to conformation and kinase-activity change for sensing cold response[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2019. DOI: 10.1111/jipb.12800
- [21] Xu W R, Li R M, Zhang N B, Ma F L, Jiao Y Y, Wang Z P. Transcriptome profiling of *Vitis amurensis*, an extremely cold-tolerant Chinese wild *Vitis* species, reveals candidate genes and events that potentially connected to cold stress [J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 86(4/5): 527
- [22] Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, Mallia A K, Gartner F H, Provenzano M D, Fujimoto E K, Goeke N M, Olson B J, Klenk D C. Measurement of protein using bicinchoninic acid[J]. *Analytical Biochemistry*, 1985, 150(1): 76–85
- [23] Gillenius P, Jaatmaa E, Askelof P, Granstrom M, Tiru M. The standardization of an assay for pertussis toxin and antitoxin in microplate culture of Chinese hamster ovary cells [J]. *Journal of Biological Standardization*, 1985, 13(1): 61–66
- [24] Yasuda S, Aoyama S, Hasegawa Y, Sato T, Yamaguchi J. *Arabidopsis* CBL-interacting protein kinases regulate carbon/nitrogen-nutrient response by phosphorylating ubiquitin ligase ATL31 [J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(4): 605–618
- [25] Lyzenga W J, Liu H, Schofield A, Muisehennessy A, Stone S L. *Arabidopsis* CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signalling network and is degraded by the ubiquitin – proteasome system[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(10): 2779–2791
- [26] Zhu J K. Cell signaling under salt, water and cold stresses [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, 4(5): 401–406
- [27] Li R F, Zhang J W, Wei J H, Wang H Z, Wang Y Z, Ma R C. Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stress [J]. *Progress in Natural Science: Materials International*, 2009, 19(6): 667–676
- [28] Pandey G K. Emergence of a novel calcium signaling pathway in plants: CBL-CIPK signaling network [J]. *Physiology & Molecular Biology of Plants an International Journal of Functional Plant Biology*, 2008, 14(1/2): 51
- [29] Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants [J]. *Plant Cell*, 2002, 14 (Suppl.1): S389-S400
- [30] Lan W Z, Lee S C, Che Y F, Jiang Y Q, Luan S. Mechanistic analysis of AKT1 regulation by the CBL-CIPK-PP2CA interactions [J]. *Molecular Plant*, 2011, 4(3): 527–536
- [31] Xu J, Li H D, Chen L Q, Wang Y, Liu L L, He L, Wu W H. A Protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2006, 125 (7): 1347–1360
- [32] Song C P, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang P, Zhu J K. Role of an *Arabidopsis* AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2384–2396
- [33] Drerup M M, Schlücking K, Hashimoto K, Manishankar P, Steinhorst L, Kuchitsu K, Kudla R. The Calcineurin B-Like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase RBOHF [J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(2): 559–569
- [34] Amer B R, Macdonald R, Jacobitz A W, Liauw B, Clubb R T. Rapid addition of unlabeled silent solubility tags to proteins using a

- new substrate-fused sortase reagent [J]. *Journal of Biomolecular NMR*, 2016, 64(3): 197–205
- [35] Sørensen H P, Mortensen K K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2005, 4(1): 1
- [36] Ami D, Natalello A, Taylor G, Tonon G, Doglia S M. Structural analysis of protein inclusion bodies by Fourier transform infrared microspectroscopy[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1764(4): 793–799
- [37] Li Z Y, Liu C P, Zhu L Q, Jing G Z, Zhou J M. The chaperone activity of trigger factor is distinct from its isomerase activity during co-expression with adenylate kinase in *Escherichia coli* [J]. *Febs Letters*, 2001, 506(2): 108–112
- [38] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, 9(5): 497–501
- [39] Liu H, Stone S L. E3 ubiquitin ligases and abscisic acid signaling [J]. *Plant Signal and Behavior*, 2011, 6(3): 344–348
- [40] Lyzenga W J, Liu H, Schofield A, Muise-Hennessey A, Stone S L. *Arabidopsis* CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signalling network and is degraded by the ubiquitin–proteasome system[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(10): 2779–2791
- [41] Lyzenga W J, Sullivan V, Liu H, Stone S L. The Kinase activity of calcineurin B-like interacting protein kinase 26 (CIPK26) influences its own stability and that of the ABA-regulated ubiquitin ligase, keep on going (KEG) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 502
- [42] Guo G L, Johnson D R, Klaassen C D. Postnatal expression and induction by pregnenolone-16alpha -carbonitrile of the organic anion-transporting polypeptide 2 in rat liver [J]. *Drug Metabolism and Disposition the Biological Fate of Chemicals*, 2002, 30(3): 283–288
- [43] Wang Z Y, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids [J]. *Nature*, 2001, 410(6826): 380–383
- [44] Kinoshita T, Caño-Delgado A I, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S, Chory J. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1 [J]. *Nature*, 2005, 433(7022): 167–171
- [45] Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones J D, Felix G, Boller T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 497–500
- [46] Russinova E, Borst J W, Kwaaitaal M. Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1) [J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(12): 3216–3229
- [47] Zhou J G, Lu D P, Xu G Y, Finlayson S A, He P, Shan L B. The dominant negative ARM domain uncovers multiple functions of PUB13 in *Arabidopsis* immunity, flowering, and senescence [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(11): 3353–3366
- [48] Liao D, Cao Y, Sun X, Espinoza C, Nguyen C T, Liang Y, Stacey. *Arabidopsis* E3 ubiquitin ligase PLANT U-BOX13 (PUB13) regulates chitin receptor LYSIN MOTIF RECEPTOR KINASE5 (LYK5) protein abundance[J]. *New Phytologist*, 2017, 214(4): 1646

Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of Calcineurin B-like Proteins (CBLs) Interacting Protein Kinases Protein Kinase VaCIPK18 From *Vitis amurensis*

WU Nan¹ ZHANG Ningbo^{1,2,4} ZHENG Qiaoling¹ CHEN Weiping⁵ XU Weirong^{1,2,3,4*}

(¹ College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; ² Engineering Research Center of Grape and Wine, Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; ³ Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxia, Yinchuan, Ningxia 750021; ⁴ Ningxia Engineering and Technology Research Center of Grape and Wine, Yinchuan, Ningxia 750021; ⁵ Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Calcineurin B-like proteins (CBLs) interacting protein kinases (CIPKs) act as a class of serine/threonine protein kinases, which play critical roles in response to abiotic stress signaling in plants. Based on our previous RNA-seq data that *Vitis amurensis* responded to cold stress, seven CIPK members were observed to be involved in the early injury and perception phase of the CBL-CIPK signaling pathway, among which VaCIPK18 was significantly up-regulated. To further investigate the function of the kinase in cold stress, VaCIPK18 was cloned by homologous cloning. The ORF of VaCIPK18 was 1320 bp in length, encoding 439 amino acids. Based on the bioinformatics analysis of VaCIPK18 protein, the peptides rich in epitopes in the extracellular domain were obtained, and the C-terminal regulatory domain (230–439 aa) was constructed into the prokaryotic expression vector pET28a-SUMO. The recombinant expression vector was further transformed into *E. coli* Rosetta strain, and the inclusion body protein of 42 kDa was expressed under the condition of 0.8 mmol · L⁻¹ IPTG and induction at 37°C for 4 h. The recombinant protein was used as an antigen to immunize white rabbits, and an anti-VaCIPK18 polyclonal antibody was obtained with high titer-specificity. Western blotting indicated that the antibody specifically binds to grape endogenous CIPK18, and the band was coincided with the 50 kDa position as expected. The results showed that the protein expression level of CIPK18 in grape leaves responding to cold stress was consistent with that at normal temperature condition, but there were possible phosphorylation and ubiquitination under both conditions. The current study provides a basis for further investigations of protein localization, expression, and function of VaCIPK18.

Keywords: *Vitis amurensis*, CIPK18 protein kinase, prokaryotic expression, polyclonal antibody, Western blot detection