

山葡萄低温诱导酵母双杂三框 cDNA 文库构建和 VaCIPK18 互作蛋白筛选鉴定

郑巧玲¹, 申威¹, 姚文孔¹, 徐伟荣^{2,3,4,*}

(¹宁夏大学农学院, 银川 750021; ²宁夏大学食品与葡萄酒学院, 银川 750021; ³中国葡萄酒产业技术研究院, 银川 750021; ⁴宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 银川 750021)

摘要: 类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 CBL (calcineurin B-like protein) 与其互作蛋白激酶 CIPK (CBL-interacting protein kinase) 组成的 CBL-CIPK 系统, 在真核生物钙信号转导及各种胁迫应答途径中发挥重要作用。采用 SMART 与 LD-PCR 技术构建了山葡萄 ‘双丰’ (*Vitis amurensis* Rupr. ‘Shuangfeng’) 叶片组织低温胁迫下的均一化酵母双杂交三框 cDNA 文库, 库容量分别为 1.7×10^6 、 1.3×10^6 与 1.9×10^6 cfu · mL⁻¹, 外源基因插入片段长度约为 500 ~ 2 000 bp, 重组率为 100%, 符合后续双杂交筛选要求。以本课题组前期鉴定受低温诱导表达、具有核质亚细胞定位的山葡萄 VaCIPK18 全长 (VaCIPK18)、激酶结构域缺失 (VaCIPK18^{ΔS-TKc}) 以及 NAF 结构域缺失 (VaCIPK18^{ΔNAF}) 为诱饵, 进行酵母双杂交筛选, 获得了 17 个候选互作靶蛋白; 从中选取并克隆了 7 个参与非生物胁迫的候选互作蛋白进行酵母回转变验证, 仅发现 1 个 ABA 信号通路上游信号调节因子 VaPYL9 与 VaCIPK18 有互作关系。通过酵母双杂交和双分子荧光互补验证, 确定了 VaPYL9 可与 VaCIPK18 和 VaCIPK18^{ΔNAF} 在酵母中物理互作, 而在植物拟南芥原生质体中 VaPYL9 与 VaCIPK18^{ΔS-TKc} 和 VaCIPK18^{ΔNAF} 互作, 但与全长 VaCIPK18 不互作。

关键词: 山葡萄; 低温胁迫; cDNA 三框文库; VaCIPK18; VaPYL9; 互作分析

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 12-2301-16

Construction of Yeast Two-hybrid Three-frame cDNA Library of *Vitis amurensis* and Screening of VaCIPK18 Interaction Protein

ZHENG Qiaoling¹, SHEN Wei¹, YAO Wenkong¹, and XU Weirong^{2,3,4,*}

(¹College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; ²School of Food and Wine, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; ³China Wine Industry Technology Institute, Yinchuan 750021, China; ⁴Key Laboratory of Modern Molecular Breeding of Dominant and Special Crops in Ningxia, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The CBL-CIPK signaling system is comprised of calcineurin B-like protein (CBL) and its interacting protein kinases (CIPK), playing critical roles in response to calcium signal transduction and various stress responses in eukaryotes. A yeast two-hybrid (Y2H) three-frame cDNA library with the leaves of *Vitis amurensis* Rupr. ‘Shuangfeng’ under low temperature stress was constructed using SMART and LD-PCR techniques. The capacities of three-frame libraries were 1.7×10^6 , 1.3×10^6 and 1.9×10^6

收稿日期: 2020-04-14; **修回日期:** 2020-07-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD1002500); 国家地区科学基金项目 (31560550, 31860542); 宁夏回族自治区重点研发计划重大 (重点) 项目 (2019BBF02022-02); 国家科技重大专项 (106001000000150012)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xuwr@nxu.edu.cn)

cfu · mL⁻¹, respectively, with the inserted fragment of 500 - 2 000 bp in length, and 100% recombination rate, which could meet with the requirements of yeast two-hybrid screening. A low-temperature-induced gene VaCIPK18 that previously identified by our team, which localized at both nucleus and cytoplasm, was used as a “bait” to obtain three constructs containing the full length cDNA, as well as the two truncations of the S_TKc domain (VaCIPK18^{ΔS_TKc}) and the NAF domain (VaCIPK18^{ΔNAF}), respectively. The result showed that a total of 17 candidate interacting proteins of VaCIPK18 were screened from the library, from which 7 previously reported candidate proteins that involved in abiotic stresses were selected and cloned for rotated verification in yeast. As a result, one upstream signal regulator of ABA pathway, VaPYL9 was preliminary confirmed to interact VaCIPK18. Furthermore, Y2H rotation verification and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) were used to verify the interaction between them. Our result demonstrated that VaPYL9 specifically interacts with VaCIPK18 and VaCIPK18^{ΔNAF} protein in yeast, and VaPYL9 could also interact with VaCIPK18^{ΔS_TKc} and VaCIPK18^{ΔNAF} protein in plant cells. Interestingly, there is no interaction between VaPYL9 and VaCIPK18 in *Arabidopsis* protoplast.

Keywords: *Vitis amurensis*; cold stress; Y2H three-frame cDNA library; VaCIPK18; VaPYL9; interactive analysis

欧亚种葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 因品质优良被广泛栽培, 但抗逆性普遍较差。中国北方冬季低于 - 15 °C 或根际温度低于 - 5 °C 时, 均可导致葡萄栽培生产中根和芽冻伤或冻死, 严重影响浆果品质及产量。因此, 发掘葡萄抗寒应答代谢途径中关键基因, 解析葡萄冷害发生的调控机理, 对于深入理解低温胁迫应答的作用模式和利用分子育种增强葡萄属植物的抗寒性具有重要意义。

Ca²⁺作为第二信使, 当植物遭遇低温刺激后钙离子感受器蛋白会感知 Ca²⁺浓度的变化, 从而引发一系列的理化反应 (Xiong et al., 2002; 刘涛 等, 2020)。类钙调磷酸酶 B 亚基蛋白 (CBL) 作为植物中重要的钙离子感受器, 能通过与其下游互作的蛋白激酶 (CIPK) 形成 CBL-CIPK 复合体应答外界胁迫 (沈金秋 等, 2014; 刘昊 等, 2019; 吴娟娟 等, 2019)。CIPK 是植物特有的激酶家族, 属于 SnRK3 (Sucrose non-fermentation-related kinases 3) 亚家族成员 (Lyzena et al., 2013), 广泛参与植物非生物胁迫信号转导。目前, 已从拟南芥 (Yu et al., 2007)、水稻 (陈析丰 等, 2010)、葡萄 (Martin et al., 2010)、玉米 (Zhao et al., 2009)、甘蔗 (黄珑, 2016)、小麦 (邓小敏, 2013)、烟草 (杨尚谕 等, 2018) 等植物中鉴定出多个 CIPK 家族成员。该蛋白家族由位于 N 端催化激酶域和 C 末端调节结构域 (Li et al., 2012) 组成, 其中 C 端的 NAF 保守结构基序与其上游的 CBL 蛋白互作, 使 CIPK 发生磷酸化, 解除自身活性抑制, 进而向下游传递信号, 参与多种非生物胁迫响应 (Li et al., 2009)。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) AtCBL4/SOS3 是第 1 个被鉴定出的 CBL 蛋白, 其与 AtCIPK24/SOS2 互作形成 SOS2-SOS3 复合体激活其下游 Na⁺/H⁺ 交换器 SOS1 的活性, 可将细胞中多余的 Na⁺ 排出, 从而调节根系的耐盐性 (Liu & Zhu, 1997; Qiu et al., 2002)。研究表明, 拟南芥 CBL-CIPK 复合物参与众多生物学过程的调控, 包括 Na⁺、K⁺ 的平衡 (Cheong et al., 2007; Kim et al., 2007), K⁺ 离子通道 AKT2 的活性 (Held et al., 2011), 气孔开闭 (Maierhofer et al., 2014), 种子萌发过程中 ABA 响应 (Pandey et al., 2008) 与冷胁迫应答 (黄聪琳, 2011) 等。在非模式植物中也有一些关于 CBL-CIPK 互作组分参与非生物胁迫应答调控的报道。例如, 胡杨 (*Populus euphratica*) CBL1 与 CIPK24/25/26 互作调节 Na⁺/K⁺ 的动态平衡 (Zhang et al., 2013)。玉米 (*Zea mays*) ZmCIPK16

可分别与 CBL3/4/5 形成复合物, 通过与一些膜定位蛋白相互作用在体内发挥作用 (Zhao et al., 2009)。在葡萄属植物中已有研究表明, 在干旱胁迫下 VvCBL1-VvCIPK23 互作可激活 K^+ 内流通道 (Cuéllar et al., 2010), 且 VvCBL1-CIPK4-VvKT1.1 和 VvCBL2-CIPK3-VvKT1.2 也参与 K^+ 通道运输 (Cuéllar et al., 2013)。除了能与上游 CBL 互作外, 近年来相继报道了 CIPK 与其下游的转录因子互作参与生物与非生物胁迫。玉米 ZmCIPK21 可与 4 个生长调控因子 (Growth-regulating factor, GRF) 蛋白互作参与调控逆境信号通路 (陈勋基, 2014)。拟南芥 CIPK26 可与 ABA 信号通路中的 ABI1/2/5 互作 (Lyzenga et al., 2013)。然而, 目前对于 CIPK 互作的下游蛋白研究较少。因此, 发掘 CIPK 激酶的下游互作蛋白, 解析其功能特点, 对阐明 CIPK 蛋白水平的调控机制具有重要的理论意义。

酵母双杂交系统 (Yeast two-hybrid system, Y2H) 是 1989 年由 Fields 和 Song 等提出, 现被广泛用于蛋白之间的互作研究。在模式植物中利用该系统鉴定了与 JAZ 家族互作的 MYB21 和 MYB24 蛋白 (Song et al., 2011); 发现了与盐超敏感蛋白 SOS2 互作的 SIP1, 可通过减少活性氧 (ROS) 的累积增强拟南芥的耐盐性 (Wang et al., 2018)。此外, 在番茄 (王洋 等, 2019)、水稻 (Wang & Guo, 2018)、玉米 (Holtgräwe et al., 2005)、柑橘 (肖雪, 2017) 等植物中该系统也被广泛用于目标基因互作蛋白的筛选。在葡萄属植物中姚文孔 (2017) 报道了以泛素连接酶 VpPUB24 蛋白为诱饵筛选出 VpICE1 和 VpEXO70B1 两个互作蛋白; 魏瑾瑜 (2015) 鉴定了与 F-box SKIP31-like 互作的胚败育相关的功能蛋白基因。

山葡萄 (*Vitis amurensis* Rupr.) 是葡萄属植物中最抗寒的一个种。笔者课题组在前期研究中从山葡萄中克隆了 8 个 CBL 与 19 个 CIPK 基因 (丁小玲, 2017)。基于酵母双杂交确定了 8 个 CBL 与 19 个 CIPK 之间的互作关系, 其中成员之一山葡萄丝/苏蛋白激酶 VaCIPK18 亚细胞定位核质, 并与所有 CBL 均互作, 表明其是 CBL-CIPK 网络的“信号枢纽”。然而, VaCIPK18 及其互作靶蛋白参与低温胁迫应答调控的分子机理尚未明晰。本研究中构建了山葡萄低温胁迫诱导的酵母双杂三框 cDNA 文库, 利用酵母双杂交技术, 分别以 VaCIPK18 全长、激酶结构域缺失 (VaCIPK18^{ΔS-TKc}) 与 NAF 结构域缺失 (VaCIPK18^{ΔNAF}) 为诱饵, 筛选山葡萄低温诱导 cDNA 文库, 获得与其互作的候选靶蛋白并进行初步的功能验证, 为进一步探究山葡萄 VaCIPK18 参与抗寒调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

山葡萄‘双丰’两年生盆栽扦插苗保存于宁夏大学农科实训基地日光温室 (38°30'43.44"N; 106°08'19.67"E), 自然光照条件下培养, 每 2 周浇灌 1 次 1/5MS 液体培养基, 并定期修剪。2017 年 10 月, 将 12 株长势一致且生长健壮葡萄幼苗置于 -2 °C 低温培养箱 (LT-BIX120L, 上海) 中, 光照强度 2 000 lx, 16 h 光照/8 h 黑暗。设置 3 个重复, 每个重复 3 株, 分别于 0、2、4、8 h 取中部成熟叶片。用液氧速冻后, 于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 山葡萄叶片组织低温诱导酵母双杂交核三框 cDNA 文库构建

采用植物 RNA 提取试剂盒 (Omega, 美国) 提取总 RNA, 按照 SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System 试剂盒 (Life Technologies) 说明书反转录合成第 1 链 cDNA。为构建包含 3 种读码框的初级 cDNA 文库, 参照 Advantage 试剂盒说明, 应用 LD-PCR 技术将第 1 链 cDNA 扩增为三框双链 cDNA。

引物为 5'-Primer (Adapter 1)、5'-Primer (Adapter 2)、5'-Primer (Adapter 3), 分别与 3'-Primer 组合 (表 1)。产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后, 采用 cDNA Size Fractionation Columns (Invitrogen) 进行 cDNA 片段的分级分离并电泳检测。将 pGADT7 与各框 cDNA (100 ng) 连接过夜, 分别转至大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞 DH5 α , 加入 5 mL SOC 液体培养基培养过夜。取上述菌液 10 μ L 稀释 100 倍后涂布含有 Amp⁺ 的 LB 平板培养过夜。随机挑取 24 个单克隆, 使用 T7/3'AD 引物进行菌落 PCR 鉴定。将三框文库剩余转化液分别加 50%甘油保存, 即为原始文库。取 50 μ L 原始库液涂布在含 100 mg \cdot L⁻¹ Amp⁺ 与 50 mg \cdot L⁻¹ Kan⁺ 的 LB 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后进行文库质粒提取。将文库质粒转化酵母 Y187 感受态细胞, 转化液分别稀释 10² 倍、10⁴ 倍、10⁵ 倍和 10⁶ 倍后各取 100 μ L 涂布于 100 mmol \cdot L⁻¹ SD/-Leu 缺陷性培养基, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 ~ 5 d 后, 计算转化效率及库容。将剩余的悬浮液各取 150 μ L 涂布于直径 150 mm SD/-Leu 选择培养基上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 ~ 4 d。4 $^{\circ}$ C 预冷培养板 3 ~ 4 h 后, 向每个培养板加入 5 mL 预冷的 YPDA 培养基 (含 25%甘油), 使用无菌玻璃珠将板中的菌落分离下来, 收集于无菌的离心管中, 用血球计数板计算细胞密度。剩余文库置于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 诱饵表达载体的构建

采用 SMART 软件预测 (<http://smart.embl-heidelberg.de>) CIPK18 蛋白结构域, 发现其 N 端包含激酶结构域 (S_TKc), C 端包含调控结构域 (NAF)。以 pMD19-T/VaCIPK18 质粒为模板, 根据 VaCIPK18 全长序列设计不同结构域缺失片段。设计引物 BD-CIPK18 Δ S-TKc-F/R 和 BD-CIPK18 Δ NAF-F/R (表 1), 按照 Primer STAR[®] Max DNA Polymerase (TaKaRa) 说明书扩增包含 VaCIPK18 全长及两个关键结构域缺失的片段 VaCIPK18 Δ S-TKc 和 VaCIPK18 Δ NAF, 经 in-fusion 克隆至经 BamH I /EcoR I 双酶切的 pGBKT7 线性载体, 按 Quick-clone Mix (陕西普莱斯笛生物科技有限公司) 说明书进行同源重组连接, 转化 DH5 α , 并涂布于含 Kan⁺ 的 LB 平板筛选。经菌落 PCR 筛选阳性克隆及并送菌液测序, 正确克隆分别命名为 pGBKT7-VaCIPK18、pGBKT7-VaCIPK18 Δ S-TKc 及 pGBKT7-VaCIPK18 Δ NAF。

1.4 诱饵表达载体自激活活性及毒性测定

采用 PEG/LiAc 法将诱饵载体 pGBKT7-VaCIPK18、pGBKT7-VaCIPK18 Δ S-TKc、pGBKT7-VaCIPK18 Δ NAF 和空载体 pGBKT7 分别转化至 Y2H Gold 感受态细胞中, 涂布于单缺培养基 (SD/-Trp), 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3 ~ 4 d。挑取大小一致的单克隆接种至 200 μ L 0.9% NaCl 溶液中, 混匀后调整至 OD₆₀₀ = 0.3。各取 1 μ L 点样于 SD/-Trp/AbA/X- α -Gal 和 SD/-Trp 营养缺陷型培养基, 阳性对照为 pGADT7-T 与 pGBKT7-p53 的共转酵母菌株 Y2H Gold, 阴性对照为 pGADT7-T 与 pGBKT7-Lam 的共转酵母菌株 Y2H Gold, 根据菌落生长情况确定诱饵蛋白的自激活活性。将转化后的酵母菌分别接种于 50 mL SD/-Trp 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C 200 r \cdot min⁻¹ 振荡培养 24 h, 采用紫外分光法检测菌液 OD₆₀₀ 值, 确定诱饵载体对细胞是否有毒性。

1.5 VaCIPK18、VaCIPK18 Δ S-TKc 及 VaCIPK18 Δ NAF 互作蛋白筛选

分别将 3 个诱饵载体接种至 100 mL SD/-Trp 的液体培养基中, 经 30 $^{\circ}$ C 220 r \cdot min⁻¹ 过夜培养至 OD₆₀₀ = 0.8, 离心后的菌体用 5 mL 2 \times YPDA 液体培养基重悬。将上述菌液与 1 mL 文库菌液混合, 用 45 mL 2 \times YPDA 液体培养基将混合菌液全部转移至 2 L 三角瓶中, 于 30 $^{\circ}$ C 30 r \cdot min⁻¹ 振荡培养 20 ~ 24 h。离心集菌, 用 50 mL 0.5 \times YPDA 液体培养基重悬沉淀后离心, 弃上清液, 用 0.9% NaCl 重悬菌液, 分别涂布 350 μ L 至 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 营养缺陷型培养基上, 于 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 7 ~ 10 d

后观察菌落生长情况。将长出的单个菌落挑至 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/AbA/X- α -Gal 筛选培养基上, 30 °C 倒置培养 3 ~ 5 d 后, 挑取筛选培养基上呈蓝色的菌落接种于 4 mL SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 液体培养基; 30 °C 200 r · min⁻¹ 振荡培养 3 ~ 5 d, 将振荡浑浊的菌液 12 000 r · min⁻¹ 离心 1 min 收集酵母菌体, 质粒小提筛选获得的阳性克隆。设计引物 REC-F/R (表 1), 进行 PCR 鉴定。取 10 μ L PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将 > 500 bp 的 PCR 产物送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序, 在 NCBI blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 进行比对, 分析候选蛋白。

表 1 本研究中使用的 PCR 引物
Table 1 PCR primers used in this study

引物编号 Primer No.	引物序列 (5' - 3') Primer sequence
SMARTIII Oligo	AAGCAGTGGTATCATCGCAGTTAAGCAATTATGTCCGGG
CDSIII Primer	AAGCTGAGTCGACCGACATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV
5'-Primer (Adapter 1)	ATATGGCCATGGAGGCCGTTAAGCAATTATGTCCGGG
5'-Primer (Adapter 2)	ATATGGCCATGGAGGCCAGTTAAGCAATTATGTCCGGG
5'-Primer (Adapter 3)	ATATGGCCATGGAGGCCAAGTTAAGCAATTATGTCCGGG
3'-Primer	CCGGGGCCATAATGGCCAAGCTGAGTCGACCGACATG
BD-CIPK18 ^{ΔS_{TKc}} -F	TATGGCCATGGAGGCCAATTCATGAATCCACCTAAAGTCAAGCGTCG
BD-CIPK18 ^{ΔS_{TKc}} -R	GCCGCTGCAGGTCGACGGATCCTTAATCCAAGTTTGCATCTCCTTCTCCT
BD-CIPK18 ^{ΔNAF} -F	TATGGCCATGGAGGCCAATTCGATGGTAGAAGCTGTATTTAAAGATTACG
BD-CIPK18 ^{ΔNAF} -R	GCCGCTGCAGGTCGACGGATCCTTATTCGTTTCTTGCATGTCATCC
BD-PYL9-F	TATGGCCATGGAGGCCAATTCATGGCTTTGGGGGAATAGACGG
BD-PYL9-R	GCCGCTGCAGGTCGACGGATCCTCAGACTGCATTGGCAGGTTCAACTC
REC-F	GATGATGAAGATACCCCAACCAACCC
REC-R	GGTGACAGTGCACAGTTGAAGTG
Entry-VaPYL9-F	AAAAAAGCAGGCTTTGACTTTATGGCTTTGGGGGAATAGACGG
Entry-VaPYL9-R	AAAGCTGGGTCTAGAGACTTCCGACTGCATTGGCAGGTTCAACTCG
LR-CIPK18-F	AGCAGGCTTTGACTTTATGAATCCACCTAAAGTCAAGCGT
LR-CIPK18-R	TGGGTCTAGAGACTTTCCTTTCGTTTCTTGCATGTCATCCTC

注: 5'-Primer (Adapter 1-3) 序列 ATATGGCCATGGAGGCC 3'端相差 1 个碱基, 允许以 3 种读码框表达蛋白。

Note: 5'-Primer (Adapter 1-3) differ by one nucleotide in length at the back of the ATATGGCCATGGAGGCC to permit expression of ORFs in all the 3 possible reading frames.

1.6 回转验证

随机挑选含正确 ORF 的候选互作蛋白, 根据其比对序列设计引物 (表 1), 克隆至 pGADT7, 并与 pGBKT7-VaCIPK18 共转 Y2H Gold 感受态细胞, 涂布于 SD/-Trp/-Leu 营养缺陷型培养基, 30 °C 倒置培养 3 ~ 5 d 后观察菌落生长情况。将单克隆接种至 100 μ L 灭菌水中, 分别稀释 10、40、100 倍后点样至 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/AbA/X- α -Gal 筛选培养基上, 30 °C 倒置培养 3 ~ 5 d 后观察菌落是否变蓝, 并针对与其互作的蛋白, 分别与 pGBKT7-VaCIPK18 ^{Δ S_{TKc}} 及 pGBKT7-VaCIPK18 ^{Δ NAF} 共转酵母验证其互作关系。

1.7 双分子荧光验证候选蛋白互作关系

根据 VaCIPK18 和 VaPYL9 序列分别设计不含终止子序列的扩增引物 LR-CIPK18-F/R 和 Entry-VaPYL9-F/R (表 1), 经 PCR 扩增后采用 Quick-clone Mix 克隆至经 *Ahd* I (TaKaRa) 酶切的入门克隆载体 pGWC-Fan, 形成 pGWC-VaCIPK18、pGWC-VaCIPK18 ^{Δ S_{TKc}}、pGWC-VaCIPK18 ^{Δ NAF} 及 pGWC-VaPYL9。采用 Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) 分别将前三者与 p201-nYFP 重组, 将后者与 p201-cYFP 重组, 分别形成融合蛋白 VaCIPK18-nYFP、VaCIPK18-nYFP ^{Δ S_{TKc}}、

VaCIPK18^{ΔNAF}-nYFP 和 VaPYL9-cYFP。采用纤维素酶 (Cellulase R10) 和离析酶 (Macerozyme R10) 酶解法分离拟南芥叶肉组织原生质体, 通过 PEG 介导法分别将质粒共转化拟南芥原生质体, 22 °C 弱光孵育 18 h 进行瞬时表达, 激光共聚焦显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 山葡萄低温诱导酵母双杂交核三框 cDNA 文库构建及鉴定

低温诱导 0、2、4、8 h 的山葡萄叶片组织混合后提取总 RNA, 电泳检测表明 5.8S、18S 和 28S 条带清晰 (图 1, A), OD₂₈₀/OD₂₆₀ 值在 1.8 ~ 2.1 之间, 表明 RNA 完整性较好, 符合建库要求。通过长距离 PCR (LD-PCR) 扩增出三框双链 cDNA (ds cDNA), 电泳结果呈现均匀的弥散带, 分布在 100 ~ 4 000 bp 之间 (图 1, B)。对各框 cDNA 双链纯化并进行分级分离, 结果显示双链 cDNA 大小处于 800 ~ 4 000 bp 之间 (图 1, C), 表明包含不同大小和丰度的 mRNA 进行了有效地反转录, 符合 cDNA 文库构建要求。

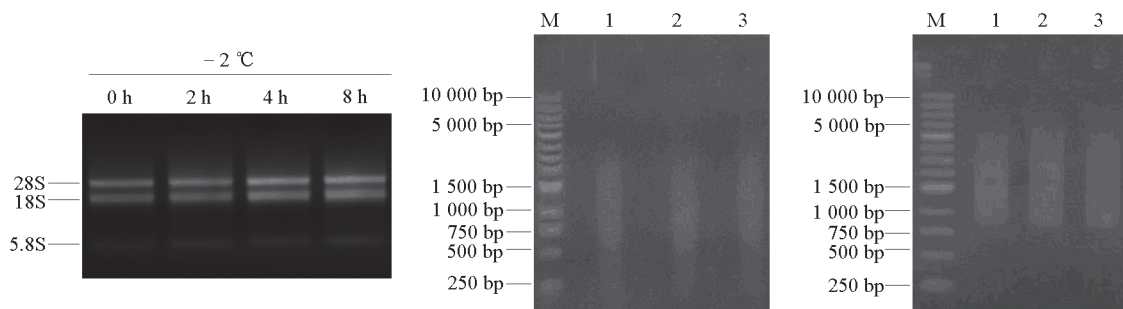


图 1 山葡萄总 RNA 提取 (A)、三框 ds cDNA (B) 及其纯化后 (C) 的电泳图

M: DNA marker DL10000; 1 ~ 3: 分别表示采用 3 种读码框引物经 LD-PCR 扩增出三框双链 cDNA。

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA isolated from *Vitis amurensis* (A), three frame ds cDNA (B) and purified three frame ds cDNA (C)

M: DNA marker DL10000; 1 - 3: Three frame ds cDNA was amplified by LD-PCR using 3 reading frame primers.

经纯化后的双链 cDNA 分别与文库载体 pGADT7 连接后转化 DH5 α , 并涂布于含 Amp⁺ LB 平板上, 检测三框文库库容量分别为 1.7×10^6 、 1.3×10^6 与 1.9×10^6 cfu · mL⁻¹。

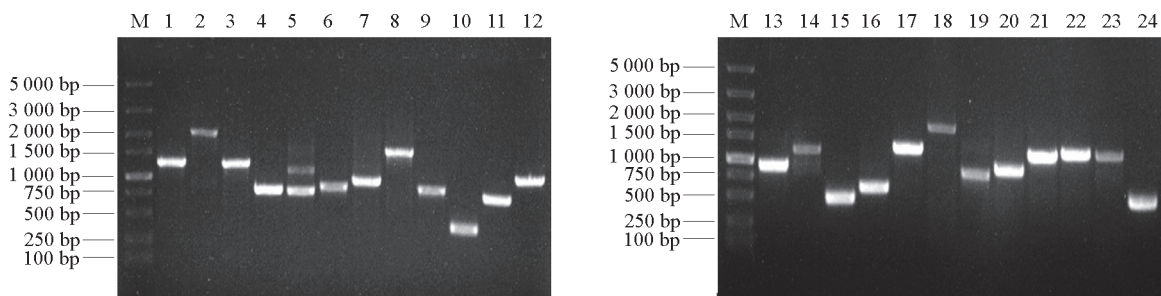


图 2 PCR 检测 cDNA 文库插入片段 (1 ~ 24)

Fig. 2 PCR identification of inserts in the cDNA library (1 - 24)

从 3 个平板随机挑取 24 个克隆进行文库插入片段鉴定, 结果 (图 2) 表明, 扩增产物均有条带 500 ~ 2 000 bp, 重组率为 100%。文库转化完成后用 15 mL 0.9% NaCl 重悬菌体, 然后分别取转化液稀释 10^2 、 10^4 、 10^5 和 10^6 倍后取 100 μ L 涂布 100 mm SD/-Leu 缺陷性培养基 (图 3), 倒置培养 3 ~ 5 d 后, 计算文库滴度为 1.75×10^8 cfu \cdot mL $^{-1}$, 符合酵母双杂交筛选要求 (滴度 2×10^7 cfu \cdot mL $^{-1}$)。收集酵母转化子, 用血球计数板计数, 细胞密度为 1.72×10^8 。

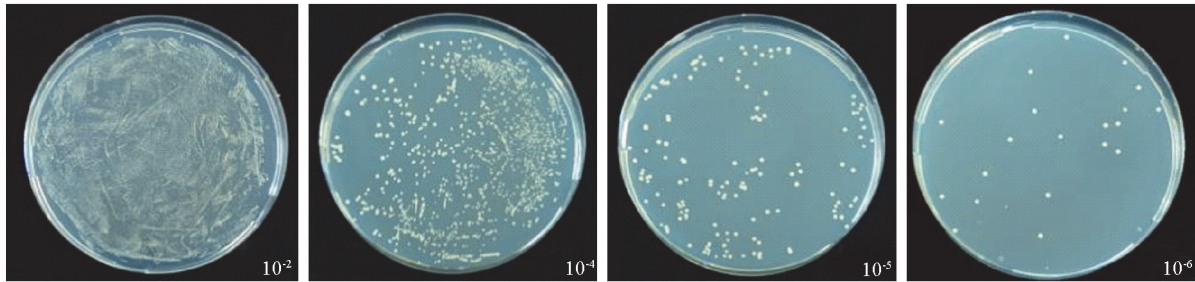


图 3 不同稀释度文库的滴度检测
Fig. 3 Titer detection of different dilution libraries

2.2 VaCIPK18 全长及缺失片段诱饵载体自激活及毒性检测

根据 SMART 预测的 VaCIPK18 蛋白结构域 (图 4, A), 分别构建其全长及 5'端与 3'端缺失的诱饵载体 pGBKT7-VaCIPK18 及 pGBKT7-VaCIPK18 $^{\Delta S_TKc}$ 与 pGBKT7-VaCIPK18 $^{\Delta NAF}$ 。经双酶切、电泳检测及测序分析, 获得的正确的重组质粒, 并分别转化酵母 Y2H Gold, 通过 Y2H 验证自激活活性。3 种诱饵载体在 SD/-Trp 上均有酵母菌落生长, 但在 SD/-Trp/AbA/X- α -Gal 培养基上仅有阳性对照 (pGADT7-T + pGBKT7-p53) 有菌落出现, 阴性对照 (pGADT7-T + pGBKT7-Lam) 和空白对照 (BD) 及转化重组质粒的菌株均不能正常生长 (图 4, B), 表明 3 种重组质粒均已转入酵母细胞, 且均无自激活活性。为进一步确定 3 种诱饵载体是否具有自毒性, 将其重组酵母细胞分别接种至 50 mL SD/-Trp 液体培养基中, 培养 24 h 后, 菌液的 OD₆₀₀ 均大于 0.8, 表明上述重组诱饵蛋白的表达对酵母菌的生长无毒性, 均可用于后续文库筛选。

2.3 文库筛选与候选互作蛋白的鉴定

将 pGBKT7-VaCIPK18、pGBKT7-VaCIPK18 $^{\Delta S_TKc}$ 及 pGBKT7-VaCIPK18 $^{\Delta NAF}$ 的诱饵酵母单菌落接种于 SD/-Trp 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后集菌, 用 2 \times YPDA 重悬菌落后与 1 mL 山葡萄叶片低温诱导酵母文库菌液杂交筛选。为了观察诱饵菌株 Y2H Gold 与文库酵母菌株 Y187 是否发生了杂交作用且形成结合子, 在 30 $^{\circ}$ C 培养 22 h 后取 1 滴混合培养物在 40 倍倒置显微镜下镜检, 可观察到三裂合子结构 (三叶草型), 说明诱饵菌株 Y2H Gold 与文库酵母菌株 Y187 发生了杂交作用且形成结合子 (图 5)。

取出菌液, 集菌后用 0.9%NaCl 重悬菌液, 涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 平板上生长 5 ~ 7 d 后, 挑取直径大于 2 mm 的单克隆, 接种于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/AbA/X- α -Gal 筛选培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后观察有 98 个阳性克隆菌落变蓝。挑取阳性克隆至 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C 培养 3 ~ 5 d 后提取酵母质粒, 用 2 \times Taq Master Mix (TaKaRa) 进行 PCR 检测, 结果 (图 6) 显示不同克隆插入的片段大小不同, 大部分 PCR 扩增结果为 1 条带, 但也有结果为 2 条带。

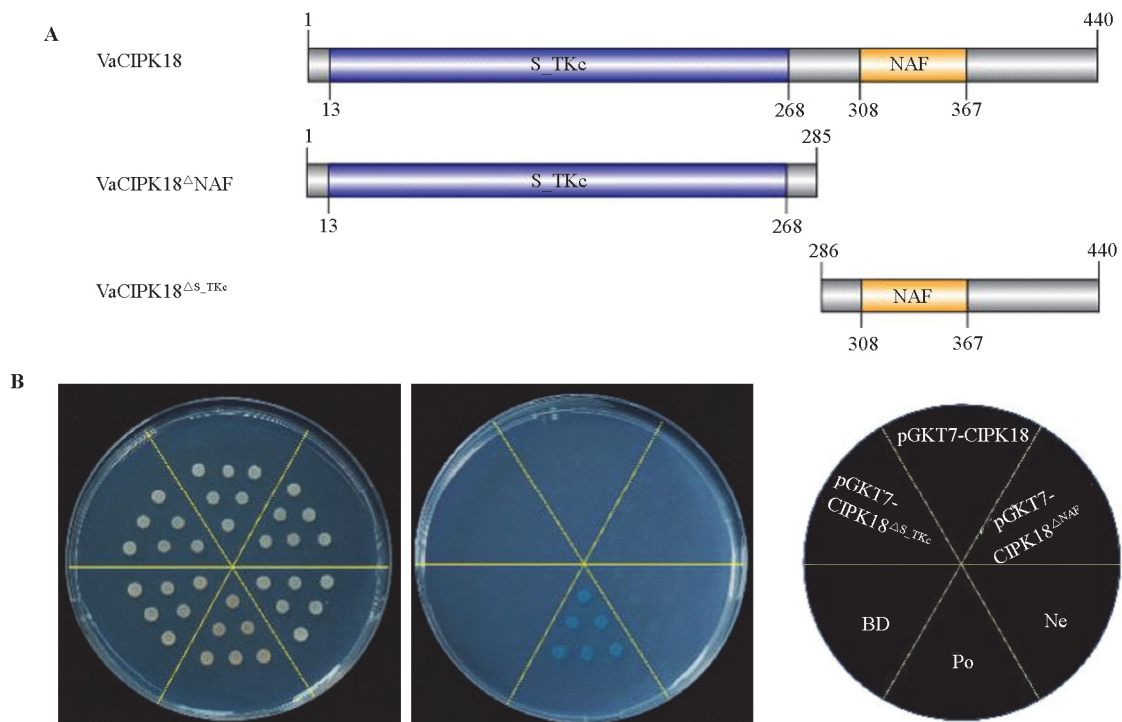


图4 VaCIPK18 蛋白结构图 (A) 及自激活活性分析 (B)

BD: pGBKT7 空载体作为空白对照; Po: pGADT7-T 和 pGBKT7-p53 互作作为阳性对照 (SV-40T 抗原蛋白和小鼠 p53 蛋白之间确证相互作用); Ne: pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam 互作作为阴性对照 (SV-40T 抗原蛋白和人的核纤层蛋白 Lamin 确证不能互作)。

Fig. 4 Protein structure (A) and auto-activation tests (B) of VaCIPK18, VaCIPK18^{ΔS_TKc} and VaCIPK18^{ΔNAF}

BD: pGBKT7 vector as blank control; Po: pGADT7-T interact with pGBKT7-p53 served as positive control (Confirmed interaction between SV40 large T-antigen and murine p53); Ne: pGADT7-T interact with pGBKT7-Lam served as negative control (Confirmed non-interaction between SV40 large T-antigen and human Lamin C).

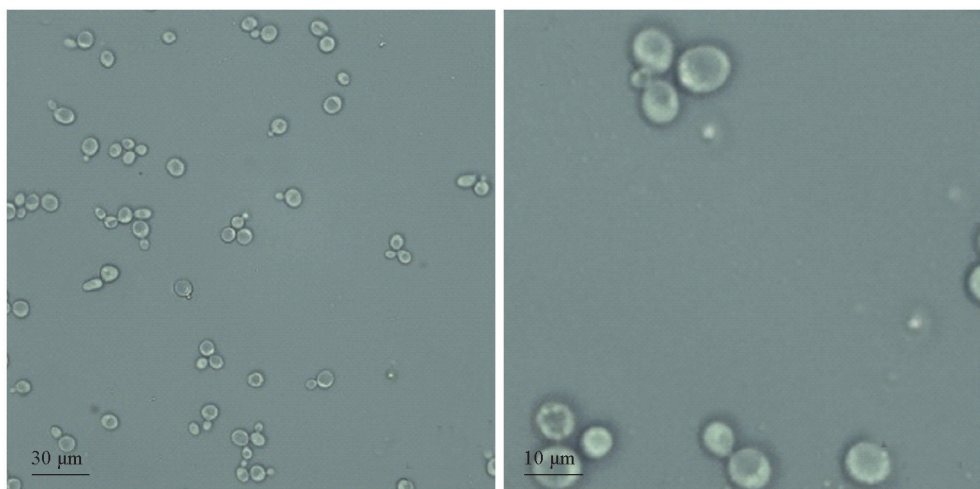


图5 酵母双杂交“三叶草”型细胞结构镜检

Fig. 5 Microscopic examination of yeast two-hybrid cells

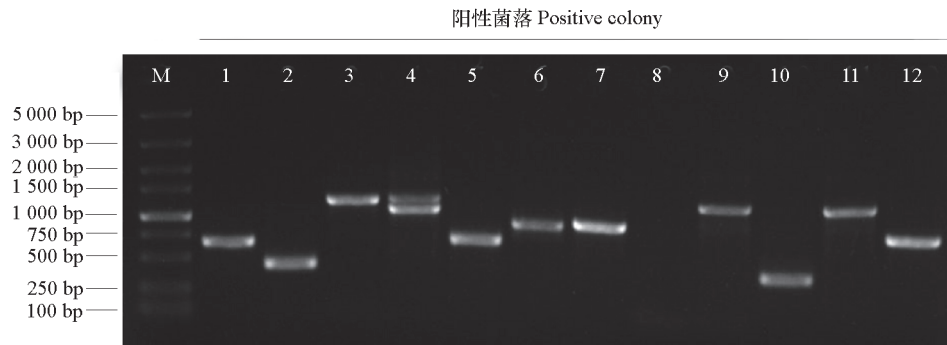


图 6 PCR 检测文库质粒插入片段大小
Fig. 6 PCR detection of insert size of library vector

将克隆的单一一条带 PCR 产物送至北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序, 测序结果用 NCBI 的 Blastx 进行序列比对分析, 最终确定了 17 个可能与 pGBKT7-VaCIPK18、pGBKT7-VaCIPK18^{ΔS-TKc} 及 pGBKT7-VaCIPK18^{ΔNAF} 互作的候选蛋白 (表 2)。

表 2 山葡萄 VaCIPK18、VaCIPK18^{ΔS-TKc}、VaCIPK18^{ΔNAF} 候选互作蛋白的 BLAST 分析结果
Table 2 BLAST analysis of candidate proteins interacted with VaCIPK18, VaCIPK18^{ΔS-TKc}, VaCIPK18^{ΔNAF} respectively in the yeast two-hybrid system

克隆序号 Clone No.	与葡萄属植物比对的同源基因 Homologous genes compared with <i>Vitis</i>	E 值 E-value	相似度/% Identity	登录号 Accession
CIPK18 ^{ΔS-TKc} -6	钙依赖性蛋白激酶基因 1 相关衔接因子蛋白 2 Calcium-Dependent Protein Kinase1 Adaptor Protein 2, CAP2	3.00E-114	98	XP_010649049.1
CIPK18 ^{ΔS-TKc} -7	放氧增强蛋白 1, 叶绿体 Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic, OEE1	9.00E-177	100	XP_002283699.1
CIPK18 ^{ΔS-TKc} -8	剪接因子 SF3a60 同源物 Splicing factor SF3a60 homolog, SF3a60	8.00E-137	97	XP_002268036.2
CIPK18 ^{ΔNAF} -9	类钙调磷酸酶 B 蛋白 10 亚型 X1 Calcineurin B-like protein 10 isoform X1, CBL10	5.00E-25	97	XP_003631807.1
CIPK18 ^{ΔNAF} -15	增强抗病性相关基因 2 ENHANCED DISEASERESI STANCE2	2.00E-43	94	XP_010664779.1
CIPK18 ^{ΔNAF} -10	脱落酸受体 PYL9 Abscisic acid receptor PYL9, PYL9	3.00E-71	99	XP_002281200.1
CIPK18 ^{ΔNAF} -20	胚胎发育晚期丰富蛋白 Le14-A Late embryo genes is abundant protein Le14-A, LEA14	2.00E-74	89	XP_002277223.1
CIPK18-1	水杨酸结合蛋白 2 Salicylic acid-binding protein 2, SABP2	2.00E-107	91	XP_010646594.1
CIPK18-33	ATP 依赖的 Clp 蛋白酶水解亚基 Clp A 同源物 CD4B, 叶绿体 ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA homolog CD4B, chloroplastic, CD4B	1.00E-139	100	CBI15747.3
CIPK18-46	类黄酮相关的 R2R3-MYB4a 转录因子 Flavonoid-related R2R3 MYB4a repressor transcription factor, MYB4a	4.00E-145	98	NP_001268129.1
CIPK18-60	40S 核糖体蛋白 S2-3S2-3 40S ribosomal protein S2-3S2-3	5.00E-167	100	XP_002283793.1
CIPK18-61	细胞色素 P45094A1 Cytochrome P45094A1	1.00E-120	99	XP_002278009.1
CIPK18-62	3-磷酸甘油醛脱氢酶, 细胞质 Glyceraldehyde-3-phosphatede hydrogenase, cytosolic, GAPDH	3.00E-91	99	XP_002263145.2
CIPK18-77	类动蛋白 KIN-14C Kinesin-like protein KIN-14C	6.00E-131	99	XP_002265300.1
CIPK18-83	类铁氧化还原蛋白 Ferredoxin-like protein, FLP	1.00E-58	95	XP_002269617.1
CIPK18-81	FAR1 相关序列 7 FAR1-RELATED SEQUENCE 7-like, FRS7	6.00E-62	96	XP_010660826.1
CIPK18-90	苷酸激酶 5, 叶绿体亚型 X2 Adenylate kinase5, chloroplastic isoform X2, AK5	5.00E-57	87	XP_019078594.1

2.4 酵母回转变验证候选蛋白

为了验证 VaCIPK18 与其潜在候选互作蛋白的互作关系, 从 17 个候选蛋白中克隆了 7 个包含完

整 ORF 的候选互作蛋白基因, 并构建至 pGADT7 载体, 分别与 VaCIPK18 共转酵母后, 均可在 SD/-Trp/-Leu 培养基上正常生长 (图 7), 但在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/AbA/X- α -Gal 筛选培养基仅有 VaPYL9 和阳性对照 (pGADT7-T + pGBKT7-p53) 出现蓝色菌落, 并且随着稀释倍数变大, 蓝色菌落越少, 说明 CIPK18 与 VaPYL9 在酵母中有互作关系。

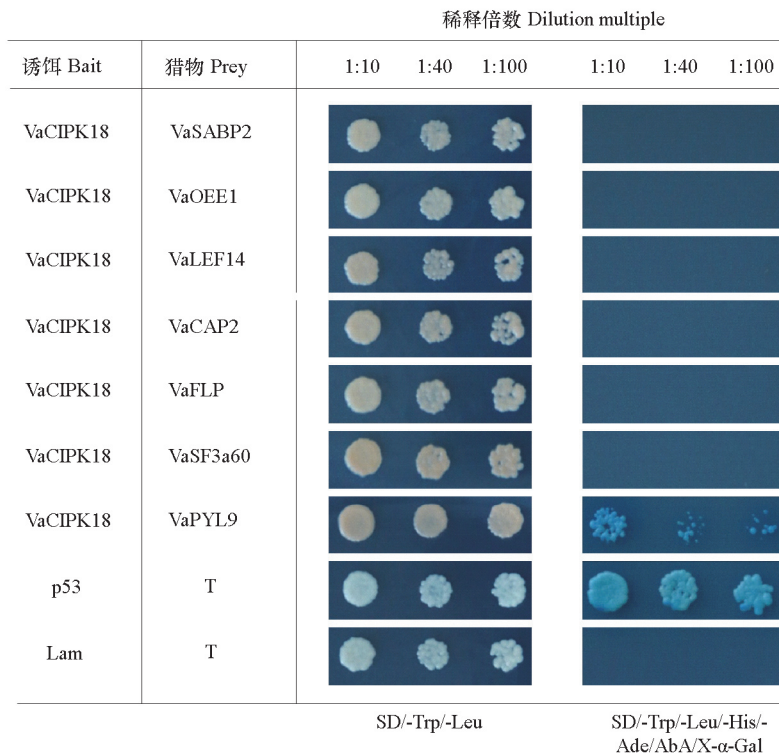


图 7 酵母双杂交筛选候选互作蛋白回转变验证

Po: pGADT7-T 和 pGBKT7-p53 互作作为阳性对照 (SV-40T 抗原蛋白和小鼠 p53 蛋白之间确证相互作用);
Ne: pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam 互作作为阴性对照 (SV-40T 抗原蛋白和人的核纤层蛋白 Lamin 确证不能互作)。

Fig. 7 Retest of Yeast two-hybrid candidate proteins

Po: pGADT7-T interact with pGBKT7-p53 served as positive control (Confirmed interaction between SV40 large T-antigen and murine p53); Ne: pGADT7-T interact with pGBKT7-Lam served as negative control (Confirmed non-interaction between SV40 large T-antigen and human Lamin C).

2.5 VaCIPK18 与 VaPYL9 互作鉴定

为了进一步验证 VaPYL9 与 VaCIPK18 互作关系及互作的结构域, 分别将 3 种诱饵载体与 pGADT7-VaPYL9 共转酵母, 点样于二缺与四缺验证培养基。结果 (图 8) 显示, 共转酵母在 SD/-Trp/-Leu 培养基上长出白色菌落, 说明各个载体均转化至酵母细胞中。含有 pGADT7-VaPYL9/pGBKT7-VaCIPK18 和 pGADT7-VaPYL9/pGBKT7-VaCIPK18 ^{Δ NAF} 组合的载体在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/AbA/X- α -Gal 培养基上长出菌落且能够显色, 表明 VaPYL9 可与 VaCIPK18 及 VaCIPK18 ^{Δ NAF} 在酵母中互作。

为了进一步确定 VaCIPK18 与 VaPYL9 在植物体内的互作关系, 利用 BiFC 系统验证两者共转化拟南芥原生质体的相互作用。激光共聚焦结果 (图 9) 显示, 共转化 VaPYL9-cYFP + VaCIPK18 ^{Δ NAF}-nYFP

和 VaPYL9-cYFP+VaCIPK18^{ΔS-TKc}-nYFP 能够在拟南芥原生质体中观察到明显的黄色荧光信号, 但共转化 VaPYL9-cYFP+VaCIPK18-nYFP 未观察到荧光信号, 说明 VaPYL9 与 VaCIPK18^{ΔNAF}、VaCIPK18^{ΔS-TKc} 在植物体内互作, 但 VaPYL9 与 VaCIPK18 在植物体内不互作。

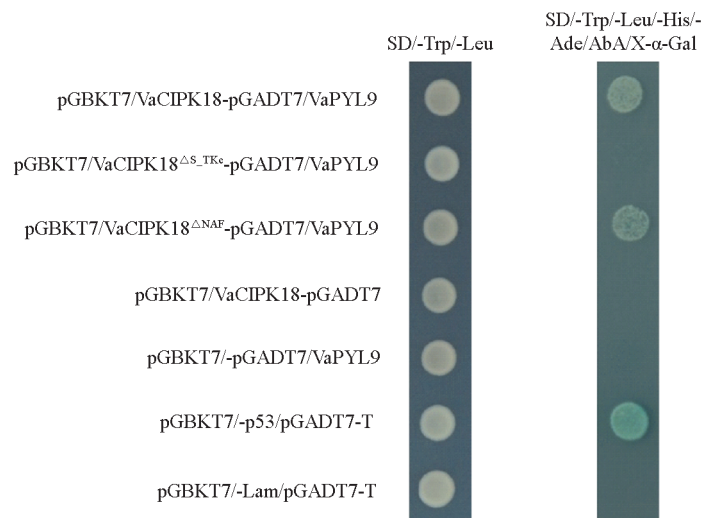


图 8 利用酵母双杂交检测 VaCIPK18 与 VaPYL9 的相互作用

Po: pGADT7-T 和 pGBKT7-p53 互作作为阳性对照 (SV-40T 抗原蛋白和小鼠 p53 蛋白之间确证相互作用); Ne: pGADT7-T 和 pGBKT7-Lam 互作作为阴性对照 (SV-40T 抗原蛋白和人的核纤层蛋白 Lamin 确证不能互作)。

Fig. 8 Interaction analysis between VaCIPK18 and VaPYL9 in the yeast two-hybrid system

Po: pGADT7-T interact with pGBKT7-p53 served as positive control (Confirmed interaction between SV40 large T-antigen and murine p53);

Ne: pGADT7-T interact with pGBKT7-Lam served as negative control (Confirmed non-interaction between SV40 large T-antigen and human Lamin C).

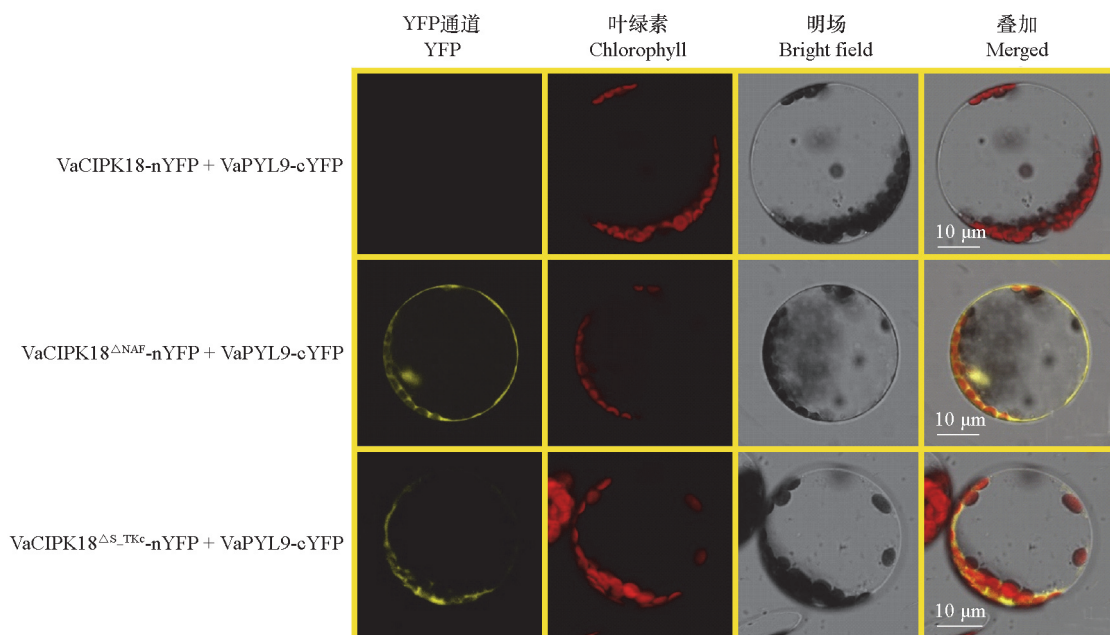


图 9 BiFC 检测 VaCIPK18 与 VaPYL9 的相互作用

Fig. 9 Interaction detection of VaCIPK18 and VaPYL9 by BiFC

3 讨论

蛋白之间的相互作用对于阐明胞内信号转导有重要意义 (Waadt et al., 2008)。目前常用的蛋白互作研究方法包括酵母双杂交 (Y2H)、双分子荧光互补技术 (BiFC)、GST 融合蛋白沉降技术 (GST pull down)、免疫共沉淀 (Co-IP) 及串联亲和纯化 (TAP) 技术等。这些方法各有优缺点, 其中 BiFC 能够较便捷的检测蛋白互作发生的时间、位置和强弱, 但表达量过高会引起非特异性 (严晶和霍克克, 2006)。Y2H 操作简单方便, 但仅适用于能转运到细胞核内的蛋白质且假阳性较高 (Braun et al., 2013), 正如本研究中筛选了 98 个单克隆, 经测序分析包含 17 个插入片段, 但经回转验证后仅确定了 1 个互作蛋白。利用 Y2H 进行蛋白筛选对新基因发掘及蛋白互作调控网络研究至关重要 (Heyninck et al., 2004), 而高质量均一化酵母 cDNA 文库的构建是互作蛋白筛选的基础, 其质量优劣可从库容量、冗余率和插入片段大小等方面来衡量 (李晨 等, 2010)。本研究获得的原始文库的库容分别为 1.7×10^6 、 1.3×10^6 和 1.9×10^6 cfu · mL⁻¹, 表明文库具有较高的完整性, 对随机挑取的 24 个单克隆进行 PCR 检测也表明, 插入片段均大于 500 bp, 重组率为 100%, 表明该文库为高质量的均一化文库。

在已报道的 CBL-CIPK 信号通路中, 一种 CBL 可能与多种 CIPK 相互作用, 或者几种 CBL 和一个 CIPK 相互作用, 从而形成不同的复合体参与多种逆境胁迫响应, 这一过程中涉及多种靶向相关胁迫蛋白互作共同参与逆境应答调控 (Kim et al., 2000)。本课题组的研究表明, 山葡萄中的 19 个 CIPK 基因, 除 VaCIPK8 和 VaCIPK14 外, 其余 17 个 CIPK 均与 VaCBL01 物理互作 (申威 等, 2019), 表明 CBL-CIPK 信号网络在葡萄属植物中也具有保守性。然而, 在葡萄属植物中参与 CBL-CIPK 网络的其他互作组分的报道较少。

本研究中以课题组前期从山葡萄中鉴定的一个受低温诱导表达、具有核质定位的 VaCIPK18 为诱饵, 筛选出 17 个候选蛋白; 选取并克隆了 7 个与非生物胁迫相关的候选互作蛋白并进行回复验证, 但仅 VaPYL9 与 VaCIPK18 共转酵母后显示有互作关系。为了进一步确定其互作区段, 分别进行了酵母双杂和双分子荧光互补互作验证试验, 结果显示在酵母中 VaPYL9 与 VaCIPK18 和 VaCIPK18^{△NAF} 结构域互作, 而在植物体内 VaPYL9 与 VaCIPK18^{△S-TKc} 和 VaCIPK18^{△NAF} 互作而不与 VaCIPK18 互作。类似现象也在 CIPK26 与 RBOHF 互作关系研究时发现。CIPK26 在酵母中与 RBOHF 的 N 末端两个 Ca²⁺结合 EF 手基序结构域互作, 而在植物细胞中与 RBOHF 全长互作, 从而推测可能是由于强烈的过度表达会导致蛋白质的错误定位所致, 在植物体内的研究也发现在荧光可检测范围内蛋白荧光在相当低的表达水平也具有相同的定位模式 (Drerup et al., 2013)。也有研究指出, BiFC 受蛋白质表达水平、折叠效率和两者的空间等因素的影响较大, 而 Y2H 能够检测到短暂、较弱的相互作用 (Xing et al., 2016)。后续仍需通过免疫共沉淀, GST 融合蛋白沉降技术等方法进一步确定其互作关系。

CIPK 的 C 端 NAF 结构域可以与 CIPK 激酶区域结合对激酶活性起到抑制作用, 当 NAF 结构域与 CBL 互作时可解除这种自抑制作用 (Albrecht et al., 2001)。邻近 NAF 结构域的 PPI (protein phosphatase interaction) 结构域能介导 CIPK 与 2C 型蛋白磷酸酶 PP2C (protein phosphatases 2C) 特异结合 (Weinl & Kudla, 2009), 表明激酶与磷酸酶通过拮抗作用调控靶蛋白的活性。为了验证 NAF 结构域是否也影响 VaCIPK18 与下游基因互作, 进行了酵母双杂交试验, 结果表明在缺失 NAF 结构域时, VaCIPK18 与 VaPYL9 有互作关系, 说明 NAF 结构域不影响 VaCIPK18 与 VaPYL9 互作, 但在缺失 S_TKc 结构域时, VaCIPK18 与 VaPYL9 不互作, 表明包含 S_TKc 的 N 末端是其互作关系

的关键区域, 同时也证明了用不同的缺失结构域筛选互作蛋白的必要性。

ABA 信号转导是生物和非生物应激反应的交叉点 (Lee & Luan, 2012)。研究表明, ABA 信号分子受体过表达可增强作物的生物和非生物胁迫耐受性 (Dalal & Chinnusamy, 2015)。如源于中国野生抗旱燕山葡萄 (*Vitis yeshanensis*) ABA 受体蛋白 PYR/PYL/RCAR 家族基因 *VjPYL9*, 在拟南芥中过表达增强了种子发芽和初生根生长过程中对 ABA 的敏感性, 并通过 ABA 信号通路参与葡萄对干旱胁迫的反应 (Liu et al., 2019)。在拟南芥中, 过表达 *RCAR5 /PYL11* 可延迟种子萌发, 并分别通过 ABA 依赖性和 ABA 非依赖性途径诱导种子气孔关闭来响应冷胁迫 (Lim & Lee, 2019); *RCAR12* 和 *RCAR13* 过表达可诱导冷响应基因 *CBFs* 表达, 从而增强拟南芥的冷胁迫耐受性 (Zhang et al., 2019)。在水稻 (*Oryza sativa*) 中, *OsPYL10* 过表达改善了粳稻的干旱和寒冷胁迫耐受性 (Verma et al., 2019)。目前尚无葡萄 PYR/PYL/RCAR 家族基因响应冷胁迫的报道。基于上述研究报道, 推测 *VaPYL9* 可能参与低温胁迫响应。本研究结果也表明 VaCIPK18 与 VaPYL9 存在互作关系, 但目前为止尚无葡萄 PYL 与 CIPK 互作的直接证据, 推测山葡萄 VaCIPK-VaPYL9 互作模块可能参与冷胁迫并通过 ABA 依赖性和 ABA 非依赖性途径发挥作用。

本研究中为进一步探究 CBL-CIPK 信号通路与 ABA 信号通路之间的“交叉”提供了新思路。后续研究将对 VaCIPK18 与 VaPYL9 互作关系进一步验证, 并深入研究其互作参与冷胁迫通路的调控机制。

References

- Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K, Kudla J. 2001. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺ regulated kinases. *The EMBO Journal*, 20 (5): 1051 - 1063.
- Braun P, Sébastien A, Leene J V, De J G, Lurin C. 2013. Plant protein interactomes. *Annual Review of Plant Biology*, 64 (6): 161 - 187.
- Chen Xi-feng, Gu Zhi-min, Liu Feng, Ma Bo-jun, Zhang Hong-sheng. 2010. Molecular analysis of rice *CIPKs* involved in biotic and abiotic stress responses. *Chinese Journal of Rice Science*, 24 (6): 567 - 574. (in Chinese)
- 陈析丰, 顾志敏, 刘 峰, 马伯军, 张红生. 2010. 生物与非生物胁迫下水稻 *CIPK* 基因的鉴定分析. *中国水稻科学*, 24 (6): 567 - 574.
- Chen Xun-ji. 2014. Cloning and molecular mechanism analysis of stress tolerance genes *ZmCIPK12* and *ZmCIPK21* from maize [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 陈勋基. 2014. 玉米 *ZmCIPK12* 和 *ZmCIPK21* 基因的克隆及抗逆分子机理研究 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Cheong Y H, Pandey G K, Grant J J, Batistic O, Li L, Kim B G, Lee S C, Kudla J, Luan S. 2007. Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase *CIPK23*, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 52 (2): 223 - 239.
- Cuéllar T, Azeem F, Andrianteranagna M, Pascaud F, Verdeil J L, Sentenac H, Zimmermann S, Gaillard I. 2013. Potassium transport in developing fleshy fruits: the grapevine inward K⁺ channel VvK1. 2 is activated by CIPK-CBL complexes and induced in ripening berry flesh cells. *The Plant Journal*, 73 (6): 1006 - 1018.
- Cuéllar T, Pascaud F, Verdeil J L, Torregrosa L, Adam-Blondon A F, Thibaud J B, Sentenac H, Gaillard I. 2010. A grapevine shaker inward K⁺ channel activated by the calcineurin B-like calcium sensor 1-protein kinase *CIPK23* network is expressed in grape berries under drought stress conditions. *The Plant Journal*, 61 (1): 58 - 69.
- Dalal M, Chinnusamy V. 2015. ABA receptors: prospects for enhancing biotic and abiotic stress tolerance of crops. *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, 88: 271 - 298.
- Deng Xiao-min. 2013. Cloning and function analysis of wheat *CBL* and *CIPK* genes in response to abiotic stresses [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huanzhong University of Science and Technology. (in Chinese)
- 邓小敏. 2013. 小麦 *CBL* 基因和 *CIPK* 基因的克隆及在非生物胁迫中的功能研究 [博士论文]. 武汉: 华中科技大学.

- Ding Xiao-ling. 2017. Characterization of *CBLs/CIPKs* from *Vitis amurensis* and expression analysis of cold-stress responsive pattern [M. D. Dissertation]. Yinchuan: Ningxia University. (in Chinese)
- 丁小玲. 2017. 山葡萄 *CBLs/CIPKs* 基因的克隆及其参与低温胁迫响应的研究 [硕士论文]. 银川: 宁夏大学.
- Drerup M M, Schlücking K, Hashimoto K, Manishankar P, Steinhorst L, Kuchitsu K, Kudla J. 2013. The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the *Arabidopsis* NADPH oxidase *RBOHF*. *Molecular Plant*, 6 (2): 559 - 569.
- Fields S, Song O K. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340 (6230): 245 - 246.
- Held K, Pascaud F, Eckert C, Gajdanowicz P, Hashimoto K, Corratgé-Faillie C, Offenborn J N, Lacombe B, Dreyer I, Thibaud J B. 2011. Calcium-dependent modulation and plasma membrane targeting of the *AKT2* potassium channel by the *CBL4/CIPK6* calcium sensor protein kinase complex. *Cell Research*, 21 (7): 1116.
- Heyninck K, Van Huffel S, Kreike M, Beyaert R. 2004. Yeast two-hybrid screening for proteins interacting with the anti-apoptotic protein A20. *Apoptosis Methods and Protocols*, 282 (1): 223 - 241.
- Holtgräwe D, Scholz A, Altmann B, Scheibe R. 2005. Cytoskeleton-associated, carbohydrate-metabolizing enzymes in maize identified by yeast two-hybrid screening. *Physiologia Plantarum*, 125 (2): 141 - 156.
- Huang Cong-lin. 2011. *Arabidopsis thaliana* *CIPK* and *CBL* involved in cold signal pathway in [Ph. D. Dissertation]. Lanzhou: Lanzhou University (in Chinese)
- 黄聪琳. 2011. 拟南芥 *CBL* 和 *CIPK* 参与冷胁迫信号通路的研究 [博士论文]. 兰州: 兰州大学.
- Huang Long. 2016. Cloning and identification of *ScCBLs* and *ScCIPKs* family gene from sugarcane [M. D. Dissertation]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. (in Chinese)
- 黄珑. 2016. 甘蔗 *ScCBLs* 和 *ScCIPKs* 基因家族的克隆与鉴定 [硕士论文]. 福州: 福建农林大学
- Kim B G, Waadt R, Cheong Y H, Pandey G K, Dominguez-Solis J R, Schültke S, Lee S C J, Luan S. 2007. The calcium sensor *CBL10* mediates salt tolerance by regulating ion homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 52 (3): 473 - 484.
- Kim K N, Cheong Y H, Luan G S. 2000. *Arabidopsis* genome: a milestone in plant biology interaction specificity of *Arabidopsis* calcineurin B-like calcium sensors and their target kinases. *Plant Physiology*, 124 (4): 1844 - 1853.
- Lee S C, Luan S. 2012. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell and Environment*, 35 (1): 53 - 60.
- Li Chen, Yan Xiao-hong, Zhou Xin-an, Sha Ai-hua, Shan Zhi-hui, Zhou Rong, Wei Wen-hui. 2010. Construction of a normalized full-length cDNA library of soybean seed at different developmental stages. *Science Agricultura Sinica*, 43 (3): 462 - 467. (in Chinese)
- 李晨, 闫晓红, 周新安, 沙爱华, 单志慧, 周蓉, 魏文辉. 2010. 大豆种子不同发育时期全长均一化 cDNA 文库的构建. *中国农业科学*, 43 (3): 462 - 467.
- Li R F, Zhang J W, Wu G Y, Wang H Z, Chen Y J, Wei J H. 2012. *HbCIPK2*, a novel CBL-interacting protein kinase from halophyte *Hordeum brevisubulatum*, confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 35 (9): 1582 - 1600.
- Li R, Zhang J, Wei J, Wang H, Wang Y, Ma R. 2009. Functions and mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stress. *Progress in Natural Science*, 19 (6): 667 - 676.
- Lim C W, Lee S C. 2019. ABA-dependent and ABA-independent functions of RCAR5/PYL11 in response to cold stress. *Plant Biology*, 723 - 627.
- Liu Hao, Wang Wenli, Teng Ruimin, Li Hui, Wang Yu, Wang Yongxin, Zhuang Jing. 2019. Cloning and profiles analysis of *CSCIPK* gene from tea plant. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (1): 96 - 106. (in Chinese)
- 刘昊, 王文丽, 滕瑞敏, 李辉, 王瑜, 王永鑫, 庄静. 2019. 茶树蛋白激酶基因 *CsCIPK* 的克隆与表达特性分析. *园艺学报*, 46 (1): 96 - 106.
- Liu J P, Zhu J K. 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 114 (2): 591 - 596
- Liu J, Zhao F L, Guo Y, Fan X C, Wang Y J, Wen Y Q. 2019. The ABA receptor-like gene *VyPYL9* from drought-resistance wild grapevine confers drought tolerance and ABA hypersensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 138 (3): 543 - 558.

- Liu Tao, Wang Pingping, He Honghong, Liang Guoping, Lu Shixiong, Chen Baihong, Mao Juan. 2020. Identification and expression analysis of *CIPK* gene family in strawberry. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (1): 127 - 142. (in Chinese)
- 刘 涛, 王萍萍, 何红红, 梁国平, 卢世雄, 陈佰鸿, 毛 娟. 2020. 草莓 *CIPK* 基因家族的鉴定与表达分析. 园艺学报, 47 (1): 127 - 142.
- Lyzenga W J, Liu H X, Schofield A, Muise-Hennessey A, Stone S L. 2013. *Arabidopsis* CIPK26 interacts with KEG, components of the ABA signaling network and is degraded by the ubiquitin-proteasome system. *Journal of Experimental Botany*, 64 (10): 2779 - 2791.
- Maierhofer T, Diekmann M, Offenborn J N, Lind C, Bauer H, Hashimoto K, Al-Rasheid K A, Luan S, Kudla J, Geiger D. 2014. Site and kinase-specific phosphorylation-mediated activation of *SLAC1*, a guard cell anion channel stimulated by abscisic acid. *Science Signaling*, 7 (342): 86 - 86.
- Martin D M, Aubourg S, Schouwey M B, Daviet L, Schalk M, Toub O, Lund S T, Bohlmann J. 2010. Functional annotation, genome organization and phylogeny of the grapevine (*Vitis vinifera*) terpene synthase gene family based on genome assembly, FLcDNA cloning, and enzyme assays. *BMC Plant Biology*, 10 (1): 226.
- Pandey G K, Grant J J, Cheong Y H, Kim B G, Luan S. 2008. Calcineurin-B-like protein CBL9 interacts with target kinase CIPK3 in the regulation of ABA response in seed germination. *Molecular Plant*, 1 (2): 238 - 248.
- Qiu Q S, Guo Y, Dietrich M A, Schumaker K S, Zhu J K. 2002. Regulation of *SOS1*, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by *SOS2* and *SOS3*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (12): 8436 - 8441.
- Shen Jin-qiu, Zheng Zhong-zhong, Pan Wei-huai, Pan Jian-Wei. 2014. Functions and action mechanisms of CBL-CIPK signaling system in plants. *Plant Physiology Journal*, 50 (5): 641 - 650. (in Chinese)
- 沈金秋, 郑仲仲, 潘伟槐, 潘建伟. 2014. 植物 CBL-CIPK 信号系统的功能及其作用机理. 植物生理学报, 50 (5): 641 - 650.
- Shen Wei, Yao Wen-kong, Zheng Qiao-ling, Zhang Ning-bo, Xu Wei-rong. 2019. Cloning of *VaCBL01* gene from *Vitis amurensis* and analysis of its interaction with VaCIPKs protein. *Journal of Agricultural Biotechnology* 27 (7): 2. (in Chinese)
- 申 威, 姚文孔, 郑巧玲, 张宁波, 徐伟荣. 2019. 山葡萄 *VaCBL01* 基因克隆及其与 VaCIPKs 蛋白互作分析. 农业生物技术学报, 27 (7): 2.
- Song S S, Qi T C, Huang H, Ren Q C, Wu D W, Chang C Q, Peng W, Liu Y L, Peng J R, Xie D X. 2011. The jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect jasmonate-regulated stamen development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23 (3): 1000 - 1013.
- Verma R K, Santosh Kumar V, Yadav S K, Pushkar S, Rao M V, Chinnusamy V. 2019. Overexpression of ABA Receptor *PYL10* gene confers drought and cold tolerance to indica rice. *Frontiers in Plant Science*, 10 (2): 1488 - 1503.
- Waadt R, Schmidt L K, Lohse M, Hashimoto K, Bock R, Kudla J. 2008. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta. *The Plant Journal*, 56 (3): 505 - 516.
- Wang C T, Chen Q, Xiang N, Liu Y Y, Kong X X, Yang Y P, Hu X Y. 2018. SIP1, a novel SOS2 interaction protein, is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 124: 167 - 174.
- Wang Yang, Zhang Zhen, Wang Ying-ying, Feng Guo-dong, Chen Dan-yang, Zhou Yu, Niu Xiang-li. 2019. Screening of Pti4 interaction proteins by using yeast two-hybrid cDNA library of tomato. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 47 (18): 111 - 114. (in Chinese)
- 王 洋, 张 政, 王莹莹, 冯国栋, 陈丹阳, 周 宇, 牛向丽. 2019. 利用番茄 cDNA 酵母双杂交文库筛选 Pti4 互作蛋白. 安徽农业科学, 47 (18): 111 - 114.
- Wang Y, Guo F Q. 2018. *AGF4* regulates grain filling during seed development in rice// National Congress of Plant Biology: 56.
- Weinl S, Kudla J. 2009. The CBL-CIPK Ca^{2+} decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytologist*, 184 (3): 517 - 528.
- Wei Jin-yu. 2015. Screening protein interact with *F-box SKIP31* from Thompson Seedless[M. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 魏瑾瑜. 2015. 无核白葡萄 *F-box SKIP31* 基因互作蛋白筛选[硕士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Wu Juanjuan, Yuan Ping, Li Weidong, Li Xianxin, Kong Youhan. 2019. Identification of potassium transport function and analysis of interaction proteins for *CsKTI* in *Citrus sinensis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (2): 215 - 226. (in Chinese)
- 吴娟娟, 苑 平, 李卫东, 李先信, 孔佑涵. 甜橙 *CsKTI* 的钾转运功能鉴定及其互作蛋白分析. 园艺学报, 46 (2): 215 - 226.

- Xiao Xue. 2017. Screening and validation of interacting proteins of citrus NAC036[M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 肖 雪. 2017. 柑橘 NAC036 互作蛋白的筛选与验证[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Xing S P, Wallmeroth N, Berendzen K W, Grefen C. 2016. Techniques for the analysis of protein-protein interactions *in vivo*. *Plant Physiology*, 171 (2): 727 - 785.
- Xiong L M, Schumaker K S, Zhu J K. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*, 14 (1): 165 - 183.
- Yang Shan-yu, Zhuo Wei, Chen Qian, Jiang Yao, Tong Zhu, Li Li-qin, Ren Xue-liang, Lu Li-ming. 2018. Analysis of the relationship between *NtCIPK* family gene expression and potassium content in tobacco. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 33 (6): 88 - 94. (in Chinese)
- 杨尚谕, 卓 维, 陈 倩, 蒋 垚, 童 铸, 李立芹, 任学良, 鲁黎明. 2018. 烟草 *NtCIPK* 家族基因表达与其含钾量之间的关系分析. *华北农学报*, 33 (6): 88 - 94.
- Yan Jing, Huo Ke-ke. 2006. Bimolecular fluorescence complementation assay: application in the study of protein-protein interaction. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 33 (6): 589 - 595. (in Chinese)
- 严 晶, 霍克克. 2006. 双分子荧光互补技术及其在蛋白质相互作用研究中的应用. *生物化学与生物物理进展*, 33 (6): 589 - 595.
- Yao Wen-kong. 2017. Functional analyses of E3 ubiquitin ligase gene *PUB24* from Chinese wild grape *Vitis pseudoreticulata*[Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 姚文孔. 2017. 中国野生华东葡萄泛素连接酶基因 *VpPUB24* 功能研究[博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Yu Y H, Xia X L, Yin W L, Zhang H C. 2007. Comparative genomic analysis of *CIPK* gene family in *Arabidopsis* and *Populus*. *Plant Growth Regulation*, 52 (2): 101 - 110.
- Zhang H C, Lv F L, Han X, Xia X L, Yin W L. 2013. The calcium sensor *PeCBL1*, interacting with *PeCIPK24/25* and *PeCIPK26*, regulates Na^+/K^+ homeostasis in *Populus Euphratica*. *Plant Cell Reports*, 32 (5): 611 - 621.
- Zhang Q, Kong X G, Yu Q, Ding Y Q, Li X Y, Yang Y. 2019. Responses of PYR/PYL/RCAR ABA receptors to contrasting stresses, heat and cold in *Arabidopsis*. *Plant Signaling Behavior*, 14 (12): 167 - 169.
- Zhao J F, Sun Z F, Zheng J, Guo X Y, Dong Z G, Huai J L, Gou M Y, He J G, Jin Y S, Wang J H. 2009. Cloning and characterization of a novel CBL-interacting protein kinase from maize. *Plant Molecular Biology*, 69 (6): 661 - 674.