

野大麦 HbCBL1 和 HbCBL2 结构与亚细胞定位分析

吴广宇^{1,2}, 李国婧¹, 王瑞刚¹, 李瑞芬², 魏建华²

(1. 内蒙古农业大学 生命科学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要: 利用 RT-PCR 从野大麦 cDNA 扩增出两个基因 *HbCBL1* 和 *HbCBL2*。蛋白结构分析表明, 其具有典型的 EF 手臂, 且 *HbCBL1* 的 N-端含有豆蔻酰化结构域。为了明确野大麦 *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 结构对其在植物体内亚细胞水平分布的作用, 分别构建了以 35S 为启动子驱动的和绿色荧光蛋白基因 *GFP* 融合的植物表达载体, 通过基因枪介导法将重组载体转入洋葱上表皮细胞, 同时通过蘸花法获得拟南芥稳定转基因株系, 利用激光共聚焦扫描显微镜检测融合蛋白的表达部位。瞬时表达结果表明, 融合蛋白 *HbCBL2::GFP* 在液泡膜上可见; *HbCBL1::GFP* 在质膜上可见, 同时在核中也有信号; *HbCBL1* 的 N 端豆蔻酰化位点参与了该基因的定位。稳定表达结果表明, *HbCBL2* 主要定位于液泡膜上; *HbCBL1* 主要定位于质膜和细胞核; 同时这两个蛋白在保卫细胞中也有表达。研究表明, *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 的结构决定了其亚细胞水平的表达部位, 为进一步分析其生物学功能奠定了基础。

关键词: 野大麦; *HbCBL1*; *HbCBL2*; 激光共聚焦扫描显微镜; 亚细胞定位

中图分类号: Q71 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)04-0001-07

Analyses for Protein Structure and Subcellular Localization of HbCBL1 and HbCBL2 from *Hordeum brevisubulatum*

WU Guang-yu^{1,2}, LI Guo-jing¹, WANG Rui-gang¹, LI Rui-fen², WEI Jian-hua²

(1. College of Life Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China;

2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: RT-PCR was used to obtain two genes named as *HbCBL1* and *HbCBL2* from *Hordeum brevisubulatum*. Protein structure analysis showed that the proteins encoded by these two genes have the typical EF-hands, and *HbCBL1* has N-myristoylation motif. In order to clarify whether *HbCBL1* and *HbCBL2* protein structures contribute to their subcellular localization, several plant expression vectors were constructed and transformed into onion epidermal cells by particle bombardment, respectively. These vectors were also transformed into *Arabidopsis* by floral dip. The subcellular localization of fusion proteins was determined by Confocal laser scanning microscope. The results of transient expression showed that the fusion protein *HbCBL2-GFP* was accumulated in tonoplast, but the *HbCBL1-GFP* fusion protein was accumulated in plasma membrane as well as in nucleus; N-myristoylation motif of *HbCBL1* involves in its localization at cell level. The results of stable expression showed that *HbCBL2* was located at tonoplast and *HbCBL1* was located at plasma membrane, additionally, both *HbCBL2* and *HbCBL1* are located at the guard cells. It was suggested that *HbCBL1* and *HbCBL2* protein structures involved in their subcellular localization, which play roles for further analyses of gene functions.

Key words: *Hordeum brevisubulatum*; *HbCBL2*; *HbCBL1*; Confocal laser scanning microscope (CLSM); Subcellular localization

收稿日期: 2011-04-11

基金项目: 国家重大转基因专项(2009ZX08009-060B); 国家自然科学基金项目(30971850); 北京自然科学基金项目(5102017); 北京市农林科学院科技项目(2010A003)

作者简介: 吴广宇(1983-), 女, 蒙古族, 内蒙古呼伦贝尔人, 在读硕士, 主要从事植物抗逆基因资源挖掘与利用研究。

通讯作者: 魏建华(1971-), 男, 内蒙古人, 研究员, 博士, 主要从事植物基因工程研究。

李瑞芬(1970-), 女, 内蒙古人, 研究员, 博士, 主要从事植物抗逆基因资源挖掘与利用研究。

钙调磷酸酶 B 类蛋白 (Calcineurin B-like proteins, CBLs) 是近年来鉴定出的一类植物所特有的 Ca^{2+} 感受器,最初是从拟南芥中克隆出来的,与其互作的蛋白 CIPK (CBL-interacting protein kinase) 一起在植物特定的生长发育和应答胁迫过程中起重要作用。植物 CBL 蛋白因与动物的钙调磷酸酶 B 亚基 (CNB) 及中枢神经钙感受器 (NCS) 极其相似而命名,在单子叶模式植物水稻和双子叶模式植物拟南芥基因组中, CBL 基因家族均含有 10 个成员^[1-4]。

CBL 作为钙感受器,具有典型的 EF 手型结构域,其功能主要是结合 Ca^{2+} ^[5]。每个 EF 手型结构由 12 个氨基酸组成,其中第 1、3、5、7、9、12 位氨基酸比较保守,是与 Ca^{2+} 互作的位点^[6]。通过比对分析发现,拟南芥中 10 个 CBL 都有 4 个 EF 手型结构,并且所有 AtCBLs 的第 1 个 EF 手在 Ca^{2+} 结合位置发生了氨基酸取代,不属于典型的 EF 手型结构^[7,8]。动物和酵母中几乎所有已知的 NCS 和钙调磷酸酶都发生了肉豆蔻酰化,部分拟南芥 CBLs,包括 CBL1、CBL4、CBL5 和 CBL9 含有保守的 N 端肉豆蔻酰化结构域 MGXXXS/T,可以发生肉豆蔻酰化反应使得 CBL 被肉豆蔻酸盐所修饰,加强了与细胞膜的结合^[9]。

CBL-CIPK 信号成分参与多种信号途径,在植物特定发育过程中以及抗逆过程中转导特异钙信号。目前功能研究最为清楚的是拟南芥中的 AtCBL4/AtCBL10-AtCIPK24 及 AtCBL1/AtCBL9-AtCIPK23。前者在盐胁迫下发挥功能。后者主要在低钾胁迫下发挥功能。

最初对 CBL 的研究主要集中在拟南芥和水稻上,目前在其他植物上的报道也相继出现,如豌豆 (*Pisum sativum*) 里的第 1 个 PsCBL,与拟南芥 AtCBL3 同源;玉米中与拟南芥 CBL4 可能同源的 ZmCBL4,并且已经有 CBL 基因的生物信息学分析;棉花中与纤维细胞伸长相关的 GhCBL2 和 GhCBL3^[10-13]。

野大麦 (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link) 是禾本科大麦属一种多年生兼性的优良牧草,是盐化和碱化草甸草原的建群种,可在含盐 0.6%~1% 的土地上良好生长,具有重要的应用和科学研究价值。但前人大多只局限在形态、解剖、生理等方面的研究,虽然近年来已有关于野大麦 HbCIPK 的相关报道,但还没有关于 CBL 基因方面的报道^[14-20]。本研究旨在了解 HbCBL1 和 HbCBL2 结构及其在亚细胞水平上的分布,为进一步了解他们的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

野大麦采自内蒙古盐渍化草原。拟南芥生态型 Columbia 拟南芥突变体 *sos3*。T4 连接酶、DNA 快速回收试剂盒为 Promega 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 为天根公司产品。根癌农杆菌菌株 GV3101、辅助载体 pSoup、植物表达载体 pGreen0029 等均为实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 野大麦 *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 基因序列分析

利用 Mega4.1 及 DANMAN 软件对野大麦 *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 进行遗传进化分析,并与拟南芥和水稻等的 CBL 进行比较分析。

1.2.2 *HbCBL1/2* 与绿色荧光蛋白 GFP 融合表达载体的构建

根据 *HbCBL2* 和 *HbCBL1* 基因与表达载体 pGreen0029-35S-HbCIPK-GFP 和 pGreen0029-35S 上的酶切位点设计带有酶切位点的特异性引物。在 *HbCBL1* 基因的上游引入 *Bam*H I 酶切位点,下游引入 *Kpn* I 酶切位点;去除 *HbCBL1* 基因 N-豆蔻酰化位点后的序列上游引入 *Bam*H I 位点,下游引入 *Kpn* I 酶切位点。*HbCBL2* 基因的上游引物的 5' 端引入 *Bgl* II 酶切位点,下游引物的 5' 端引入 *Kpn* I 酶切位点;以 *HbCBL2* 和 *HbCBL1* 全长 cDNA 为模板进行扩增。在 GFP 前引入 *HbCBL1n* 序列;以 GFP 基因为模板,设计含有 *HbCBL1* 基因 N-豆蔻酰化位点的上游引物并引入 *Bam*H I 酶切位点,下游引入 *Sac* I 酶切位点,扩增 *HbCBL1nGFP* 基因序列。

*Bam*H I / *Kpn* I 双酶切表达载体 pGreen0029-35S-HbCIPK-GFP,回收不含 *HbCIPK* 片段的大片段,分别与 *HbCBL2*、*HbCBL1* 和 Δ *HbCBL1* 片段连接,得到 pGreen0029-HbCBL1GFP、pGreen0029- Δ *HbCBL1*GFP 和 pGreen0029-HbCBL2GFP。*Bam*H I / *Sac* I 双酶切表达载体 pGreen0029-35s,与 *HbCBL1nGFP* 连接形成 pGreen0029-HbCBL1nGFP。

1.2.3 利用基因枪转化法转入洋葱表皮细胞

以洋葱内表皮为材料,用刀片切取洋葱内层鳞茎(约第 4 或第 5 层)并用镊子小区剥取内表皮,于 MS 固体培养基内培养 6 h。钨粉制子弹,超净台中轰击洋葱表皮细胞。28℃ 黑暗培养 16~24 h 后利用共聚焦激光显微镜扫描成像。

1.2.4 转化农杆菌及拟南芥

载体构建完成后转化农杆菌 GV3101,验证阳性菌株,参照 Steven 介绍的方法转化拟南芥^[25]。收集转化当代的种子,在含 50 mg/L 卡那霉素的 MS 培养基上筛选存活的植株,

继续收集 T₁ 种子,进一步筛选获得 T₂ 单拷贝和多拷贝转基因株系。将 T₂ 种子消毒后置于 MS 培养基中 7 d 后在共聚焦激光显微镜下扫描成像。

2 结果与分析

2.1 野大麦 *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 序列分析

利用 Mega4.1 软件对野大麦 *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 进行进化分析,并与拟南芥和水稻等的 *CBL* 进行序列比较分析。发现 *HbCBL2* 与水稻 *OsCBL2*、*OsCBL6* 以及拟南芥 *AtCBL2* 和 *AtCBL3* 的同源性较高,而 *HbCBL1* 与水稻 *OsCBL1* 及 *AtCBL1* 和 *AtCBL9* 同源性较高。研究表明,*OsCBL1* 和 *OsCBL6* 能够响应干旱胁迫,*OsCBL6* 还能响应冷胁迫^[26-27]。拟南芥 *AtCBL1* 和 *AtCBL9* 在大部分组织都表达,但在根部局限于根尖生长区^[28-29]。干旱、高盐、低温和外源 ABA 胁迫都可诱导 *AtCBL1* 基因表达^[4];外源 ABA 胁迫可强烈诱导 *AtCBL9* 表达^[30];两蛋白均具有 N-豆蔻酰化,即磷脂修饰结构,蛋白亚细胞定位于细胞膜^[31]。而 *AtCBL2* 和 *AtCBL3* 却不受诱导,但对光有响应^[32],蛋白定位于液泡膜。通过与拟南芥 *AtCBLs* 进行结构域及组成分析,发现野大麦 *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 都具有典型的 EF-hand,且 *HbCBL1* 含有 N-豆蔻酰化结构域。因此推测野大麦 *HbCBL1* 可能定位于细胞膜而 *HbCBL2* 可能定位于液泡膜(图 1 2)。

图 1 野大麦、拟南芥、水稻 CBLs 的遗传进化分析
Fig. 1 Phylogenic analysis of CBLs from *Hordeum brevisubulatum*, *Arabidopsis* and rice

图 2 *AtCBLs* 与 *HbCBLs* 结构域及组成分析
Fig. 2 Motif structures and constitutions of *AtCBLs* and *HbCBLs*

图 3 植物表达载体图

Fig. 3 The maps of plant expression vectors

2.2 植物表达载体的构建和鉴定

经过分析各片段酶切图谱,首先扩增出含有所用酶切位点的各个片段,因为 *HbCBL2* 含有多种酶切位点,因此上游引入 *BamH I* 的同尾酶 *Bgl II* 酶切位点,下游加入 *Kpn I* 位点。*HbCBL1* 及 $\Delta nHbCBL1$ 片段上游加入 *BamH I* 位点,下游加入 *Kpn I*。将表达载体 pGreen0029-35s-*HbCIPK*-GFP (本实验室保存) 进行 *BamH I* / *Kpn I* 双酶切,将 *HbCIPK* 片段切除,分别替换成 *HbCBL2*、*HbCBL1* 和 $\Delta nHbCBL1$ 片

段,构建 pGreen0029-*HbCBL2*-GFP、pGreen0029-*HbCBL1*-GFP 和 pGreen0029- Δn *HbCBL1*-GFP 表达载体。*HbCBL1nGFP* 片段上游加入 *BamH I* 位点,下游加入 *Sac I* 酶切位点。将表达载体 pGreen0029-35s 进行 *BamH I* / *Sac I* 双酶切,回收大片段,然后与 *HbCBL1nGFP* 片段连接,构建 pGreen0029-*HbCBL1nGFP* 表达载体(图 3)。将构建完的表达载体进行酶切验证(图 4),得到与预期相同的片段,表明载体构建正确。

M1. Trans5K DNA Marker ; M2. 1Kb DNA Ladder. A. pGreen0029-*HbCBL2*GFP 1. *Sac I* ; 2. *Hind III* ; 3. *Xba I* ; 4. *BamH I* ; B. pGreen0029-*HbCBL1*GFP 1. *BamH I* + *Kpn I* ; 2. *BamH I* + *EcoR I* ; 3. *Hind III* ; C. pGreen0029- $\Delta nHbCBL1$ GFP 1. *BamH I* + *EcoR I* ; 2. *BamH I* + *Kpn I* ; 3. *BamH I* ; D. pGreen0029-*HbCBL1nGFP* 1. *BamH I* + *EcoR I* ; 2. *Hind III* + *Sac I* ; 3. *Xba I* .

图 4 植物表达载体酶切鉴定

Fig. 4 Restriction analysis of recombinant plasmid

2.3 荧光显微检测

2.3.1 在洋葱表皮细胞的瞬时表达 已知拟南芥 *AtCBL1* 和 *AtCBL3* 基因分别定位在质膜和液泡膜上,将这两个基因与 RFP 融合构建 pGreen0029-35s-*AtCBL1*-RFP 和 pGreen0029-35s-*AtCBL3*-RFP 表达

载体(本实验室构建),作为定位的内标。

2.3.1.1 GFP 的亚细胞定位 利用基因枪轰击洋葱表皮细胞后,先用激光共聚焦显微镜观察只导入携带 GFP 空载体的洋葱表皮细胞,可以看出绿色荧光在整个细胞中均有分布,无明确的定位性(图 5)。

图 5 空载体瞬时表达

Fig. 5 Transient expression of the empty vector

2.3.1.2 野大麦 *HbCBL2* 在洋葱表皮细胞的瞬时表达 绿色荧光为融合蛋白 *HbCBL2*-GFP 所发出,

红色荧光为拟南芥 AtCBL3-RFP 所发出,在这里作为定位的内标。*HbCBL2* 基因与 GFP 融合后瞬时表达主要在洋葱细胞的液泡膜上,与 AtCBL3-RFP 所发出的红色荧光重合,表明该基因所编码的蛋白可能定位在液泡膜上(图 6)。

图 6 *HbCBL2*-GFP 瞬时表达

Fig. 6 Transient expression of *HbCBL2*-GFP

2.3.1.3 野大麦 *HbCBL1* 在洋葱表皮细胞的瞬时表达 绿色荧光为融合蛋白 HbCBL1-GFP 所发出。红色荧光为拟南芥 AtCBL1-RFP 所发出,在这里作为定位的内标。*HbCBL1* 基因 GFP 融合后瞬时表达主要在洋葱细胞质膜上,与 AtCBL1-RFP 所发出的

红色荧光重合,表明该基因所编码的蛋白可能定位在质膜上。另外,在细胞核中也发现有绿色荧光出现,推测该基因还可能定位在细胞核中(图 7)。

图 7 *HbCBL1*-GFP 瞬时表达

Fig. 7 Transient expression of *HbCBL1*-GFP

2.3.1.4 野大麦 Δn *HbCBL1* 在洋葱表皮细胞的瞬时表达 去掉 N-豆蔻酰化位点的 *HbCBL1* 基因与 GFP 融合后在洋葱细胞中瞬时表达,可见在整个细胞中均有绿色荧光,与 GFP 的表达情况相同。表明失去 N-豆蔻酰化位点的 *HbCBL1* 不能够明确定位(图 8)。

图 8 Δn *HbCBL1*-GFP 瞬时表达

Fig. 8 Transient expression of Δn *HbCBL1*-GFP

图 9 *HbCBL1n*-GFP 瞬时表达

Fig. 9 Transient expression of *HbCBL1n*-GFP

2.3.1.5 野大麦 *HbCBL1n*-GFP 在洋葱表皮细胞的瞬时表达 将 *HbCBL1* 基因的 N-豆蔻酰化位点与 GFP 融合后在洋葱细胞中的瞬时表达与 *HbCBL1* 在洋葱细胞中的表达相同,定位于质膜上,而不是如同 GFP 在整个细胞中都有表达。说明 *HbCBL1* 的 N-豆蔻酰化位点参与基因的定位(图 9)。

2.3.2 在转基因拟南芥中的亚细胞定位

2.3.2.1 *HbCBL2* 的亚细胞定位 将转基因拟南芥 T₂ 植株(单拷贝)生长 7 d 后的子叶进行观察,发现在细胞液泡膜上有绿色荧光^[33],有趣的是在保卫细胞中也发现了信号(图 10)。

图 10 *HbCBL2*-GFP 在拟南芥叶中的亚细胞定位情况

Fig. 10 *HbCBL2*-GFP was localized at the leaf cells of transgenic *Arabidopsis*

2.3.2.2 *HbCBL1* 的亚细胞定位 同样是转基因拟南芥 T₂ 植株(多拷贝)生长 7 d 后进行观察,除在细胞膜中有信号外,与 *HbCBL2*-GFP 相同,*HbCBL1*-GFP 也在保卫细胞中出现信号。但 *HbCBL1* 是否定位在核中,还有待于进一步研究(图 11)。

图 11 *HbCBL1*-GFP 在拟南芥叶中的亚细胞定位情况

Fig. 11 *HbCBL1*-GFP was localized at the leaf cells of transgenic *Arabidopsis*

3 讨论

目前的文献报道中,对野大麦的研究相对较少,虽然近年来已出现野大麦 *HbCIPK* 基因的报道,但还没有关于 *CBL* 基因方面的报道。由于大麦与野大麦亲缘关系较近,通过在 GenBank 中搜索大麦 EST 序列,发现 2 个完整的 *CBLs* 序列。本试验通过 RT-PCR 获得了野大麦 *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 基因的全长 cDNA。经序列对比和进化树分析发现,*HbCBL2* 与拟南芥 *AtCBL2* 和 *AtCBL3* 的同源性较高,而 *HbCBL1* 与 *AtCBL1* 和 *AtCBL9* 同源性较高。*AtCBL1* 和 *AtCBL9* 在 N 端都含有 N-豆蔻酰化位点,很多试验表明蛋白质的 N-豆蔻酰化能促进蛋白质之间的相互作用,并且为细胞膜定位所必需^[21-23]。前期研究表明,*AtCBL2* 和 *AtCBL3* 是定位于液泡膜上,而 *AtCBL1* 和 *AtCBL9* 定位于质膜上^[24],且在根部局限于根尖生长区^[28,29]。但是 *HbCBL1* 和 *HbCBL2* 在亚

细胞中定位情况还未知,*HbCBL1* 的 N 端豆蔻酰化位点是否也参与 *HbCBL1* 基因的定位也并不明确。为此,笔者利用绿色荧光蛋白(GFP)基因为报告基因,构建了以 35S 为启动子表达 *HbCBL2*-GFP、*HbCBL1*-GFP、*HbCBL1n*GFP 和 Δn *HbCBL1*-GFP 融合蛋白(35S::*HbCBL2*-GFP、35S::*HbCBL1*-GFP、35S::*HbCBL1n*GFP 和 35S:: Δn *HbCBL1*-GFP)的植物表达载体,轰击洋葱表皮,同时将表达载体 35S::*HbCBL2*-GFP、35S::*HbCBL1*-GFP 转化拟南芥,利用共聚焦激光扫描显微镜检测 *HbCBL2* 和 *HbCBL1* 在亚细胞水平上的分布。研究结果表明,*HbCBL2* 主要定位于液泡膜,有可能在液泡膜感受并传递 Ca²⁺ 信号,但通过何种方式实现其功能及其功能如何需要进一步研究。*HbCBL1* 主要定位于质膜和细胞核,这为其功能分析提供了必要信息;*HbCBL1* 的 N-豆蔻酰化结构决定了它在亚细胞水平上的表达部位,说明这个基因可能在膜上感受钙信号;同时又分布于细胞核,有可能该蛋白在执行其功能中存在不同表达部位的穿梭运动。

大部分报道中研究基因亚细胞定位表达是通过瞬时表达方式,也有人主张采用稳定表达研究基因亚细胞定位更为可靠。本研究通过两种方式都得到了相似的结果。但有趣的是,通过稳定表达可以看到这两个基因编码蛋白在叶片气孔保卫细胞有较明显的信号。Guo 等^[34]报道,*AtCIPK15* 与 *AtCBL1* 主要在气孔表达,其参与逆境 ABA 信号传导。*HbCBL1* 和 *HbCBL2* 是否确实在叶片气孔表达,需克隆其启动子进一步开展组织部位表达分析;它们也是否与传导逆境 ABA 信号有关,还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Liu J, Zhu J K. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance [J]. *Science*, 1998, 280:1943-1945.
- [2] Shi J, Kim K N, Ritz O, et al. Novel protein kinases associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1999, 11:2393-2405.

- [3] Kolukisaoglu U, Weigl S, Blazevic D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 43–58.
- [4] Kudla J, Xu Q, Harter K, et al. Genes for calcineurin B-like proteins in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 4718–4723.
- [5] Kolukisaoglu U, Weigl S, Blazevic D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 43–58.
- [6] Lewit-Bentley A, Rety S. EF-hand calcium-binding proteins [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10: 637–643.
- [7] Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, et al. Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 389–400.
- [8] Gong D, Guo Y, Schumaker K S, et al. The SOS3 family of calcium sensors and SOS2 family of protein kinases in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 42240–42246.
- [9] Ishitani M, Liu J, Halfter U, et al. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 1667–1677.
- [10] Mahajan S, Sopory S K, Tuteja N. Cloning and characterization of CBL-CIPK signaling components from a legume (*Pisum sativum*) [J]. *FEBS J*, 2006, 273: 907–925.
- [11] Wang M Y, Gu D, Liu T S, et al. Overexpression of a putative maize calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* confers salt tolerance [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 65: 733–746.
- [12] Gao P, Zhao P M, Wang J, et al. Co-expression and preferential interaction between two calcineurin B-like proteins and a CBL-interacting protein kinase from cotton [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2008, 46: 935–940.
- [13] 李立斌, 刘开昌, 王殿峰, 等. 玉米 CBL 基因的生物信息学分析 [J]. *玉米科学* 2010, 18(1): 6–11.
- [14] 李瑞芬. 小麦族内多年生牧草远缘杂种的形态和细胞遗传学研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 1996.
- [15] 李瑞芬, 魏建华, 王宏之. NaCl 胁迫下野大麦耐盐性的研究 [J]. *草业科学*, 2004(7): 516–522.
- [16] Lü S Y, Jing Y X, Shen S H, et al. Antiporter gene from *Hordium brevisubulatum* (Trin) Link and its overexpression in transgenic tobaccos [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47(3): 343–349.
- [17] 李瑞芬, 贺杰, 王雪青, 等. 野大麦在 NaCl 胁迫下适应性反应机制的研究 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2459–2466.
- [18] 王雪青, 张俊文, 魏建华, 等. 盐胁迫下野大麦耐盐生理机制初探 [J]. *华北农学报* 2007, 39(3): 17–21.
- [19] 张俊文, 魏建华, 王宏之, 等. CBL-CIPK 信号系统在逆境胁迫响应中的作用与机制 [J]. *自然科学进展* 2008, 18(7): 847–856.
- [20] Li Ruifen, Zhang Junwen, Wei Jianhua, et al. Functions and Mechanisms of the CBL-CIPK signaling system in plant response to abiotic stresses [J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(6): 667–676.
- [21] Martin M L, Busconi L. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation [J]. *Plant J*, 2000, 24: 429–435.
- [22] Rutschmann F, Stalder U, Piotrowski M, et al. LeCPK1, a calcium-dependent protein kinase from tomato: plasma membrane targeting and biochemical characterization [J]. *Plant Physiol*, 2002, 129: 156–168.
- [23] Podel S, Gribskov M. Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins [J]. *BMC Genomics*, 2004, 5: 37–51.
- [24] Batisti c O, Sorek N, Schültke S, et al. Dual Fatty Acyl Modification Determines the Localization and Plasma Membrane Targeting of CBL/CIPK Ca Signaling Complexes in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2008, 20: 1346–1362.
- [25] Steven J Clough, Andrew F Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735–743.
- [26] Gu Z, Ma B, Jiang Y, et al. Expression analysis of the calcineurin B-like gene family in rice (*Oryza sativa* L.) under environmental stresses [J]. *Gene*, 2008, 415: 1–12.
- [27] Kolukisaoglu U, Weigl S, Blazevic D, et al. Calcium sensors and their interacting protein kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and rice CBL-CIPK signaling networks [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134: 43–58.
- [28] Pandey G K, Cheong Y H, Kim K-N, et al. The calcium sensor calcineurin B-Like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 1912–1924.
- [29] Cheong Y H, Kim K N, Pandey G K, et al. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2003, 15: 1833–1845.
- [30] Batisti c O, Kudla J. Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network [J]. *Planta*, 2004, 219: 915–924.
- [31] Xu J, Li H D, Chen L Q, et al. A protein kinase, interacting with two calcineurin B-like proteins, regulates K⁺ transporter AKT1 in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 2006, 125: 1347–1360.
- [32] Nozawa A, Koizumi N, Sano H. An *Arabidopsis* SNF1-related protein kinase, AtSR1, interacts with a calcium binding protein, AtCBL2, of which transcripts respond to light [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 976–981.
- [33] Batisti c O, Waadt R, Steinhorst L, et al. CBL-mediated targeting of CIPKs facilitates the decoding of calcium signals emanating from distinct cellular stores [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(2): 211–222.
- [34] Guo Y, Xiong L, Zhu J K. A calcium sensor and its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2002, 3: 233–244.