

铁皮石斛 DoSRK2E 基因的克隆与表达分析

张明英, 李依民, 高 静, 陈 莹, 李元敏, 王西芳, 张 岗*

陕西中医药大学药学院 陕西省中药基础与新药研究重点实验室, 陕西 西安 712046

摘 要: **目的** 克隆铁皮石斛蔗糖非酵解 1 型相关蛋白激酶 2 (SnRK2) 家族基因, 并进行生物信息学和表达分析。 **方法** 通过 RT-PCR、RACE 克隆铁皮石斛 SnRK2 (DoSRK2E) 基因 cDNA 全长, 利用生物信息学软件预测基因编码蛋白的相对分子质量、等电点、结构域、跨膜结构、信号肽及亚细胞定位等; 利用 DNASTAR 和 MEGA 进行多序列比对和系统发育关系重建分析; 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测基因组织表达模式。 **结果** 获得铁皮石斛 DoSRK2E 基因 (GenBank 登录号 API65110), cDNA 全长 1 795 bp, 包含 1 个 1 086 bp 的完整开放阅读框, 编码蛋白相对分子质量 40 850, 等电点 4.80, 无信号肽和跨膜域, 包含 1 个蛋白激酶结构域、1 个 ATP 结合位点和 1 个 Ser/Thr 蛋白激酶活化位点, 预测定位在内质网膜上; DoSRK2E 蛋白与植物 SnRK2 蛋白序列高度一致, 系统发育位置位于 SnRK2 亚家族的分支 III, 与拟南芥 AtSnRK2.6 的亲缘关系最近; DoSRK2E 基因在铁皮石斛根中表达量最高, 茎中次之, 叶中最低。 **结论** 首次从珍稀濒危药用植物铁皮石斛中克隆得到 SnRK2 家族基因 DoSRK2E, 对其分子特性与组织表达模式进行了分析研究, 为进一步揭示该基因在铁皮石斛逆境胁迫中的作用机制提供基础。

关键词: 铁皮石斛; 蛋白激酶; 克隆; 表达; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)21-4960-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.002

Cloning and expression analysis of gene DoSRK2E in *Dendrobium officinale*

ZHANG Ming-ying, LI Yi-min, GAO Jing, CHEN Ying, LI Yuan-min, WANG Xi-fang, ZHANG Gang

Shaanxi Provincial Key Laboratory for Chinese Medicine Basis & New Drugs Research, College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

Abstract: Objective To clone the SnRK2 gene in *Dendrobium officinale* and investigate its characteristics and expression pattern. **Methods** RT-PCR and RACE techniques were used to clone the full-length cDNA of DoSRK2E, with the aids of a series of online bioinformatic software, characteristics including molecular mass, isoelectric point, conserved domain, transmembrane structure, signal peptide, and subcellular localization of the deduced protein were analyzed. Besides, the sequence of the deduced protein was aligned with those of other plant SnRK2 by DNASTAR, and phylogenetic relationships were reconstructed utilizing MEGA. Finally, tissue specific expression pattern of DoSRK2E was tested by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** The full-length cDNA of DoSRK2E (GenBank accession API65110) is 1 795 bp with a 1 086 bp complete open reading frame (ORF). The predicted molecular mass and isoelectric point of the deduced protein DoSRK2E were 40 850 and 4.80, respectively. No signal peptide nor transmembrane region were detected, this protein contains one protein kinase domain, one ATP binding site, and one Ser/Thr active site, which was predicted most likely to be located in the endoplasmic reticulum membrane. DoSRK2E protein showed high similarity with those from other plant SnRK2, and its phylogenetic location was in Group III of SnRK2 subfamily, and phylogenetically closest to AtSnRK2.6 from *Arabidopsis*. In addition, qPCR analysis revealed that DoSRK2E showed the highest expression level in root, followed by stem and leaf. **Conclusion** A SnRK2 family gene DoSRK2E was cloned from the rare and endangered medicinal plant *D. officinale* for the first time. The Characteristics and expression pattern of this gene were analyzed. This study will provide a basis for further exploration of the regulation mechanisms of DoSRK2E in *D. officinale* under stress conditions. **Key words:** *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; protein kinase; clone; expression; bioinformatic analysis

收稿日期: 2018-05-16

基金项目: 陕西省教育厅科学研究计划项目 (18JK0221); 陕西中医药大学 2017 年博士科研启动经费 (104080001); 陕西省高校青年杰出人才支持计划项目; 咸阳市中青年科技领军人才项目

作者简介: 张明英 (1988—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为药用植物分子生物学。E-mail: zhangmy@sntcm.edu.cn

***通信作者** 张 岗, 男, 教授, 博士, 研究方向为药用植物生物技术与分子生物学。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

蔗糖非酵解 1 型相关蛋白激酶 (sucrose nonfermenting 1-related protein kinase, SnRK) 是广泛存在于植物中的一类丝氨酸/苏氨酸 (serine/threonine, Ser/Thr) 类蛋白激酶, 参与植物体内多种信号途径的转导, 在植物逆境胁迫应答生理过程中具有重要作用^[1-2]。根据蛋白序列相似性以及结构域、表达及功能等的差异, SnRK 家族成员被划分为 SnRK1、SnRK2 和 SnRK3 3 个亚家族^[3]。其中, SnRK2 亚家族成员能够被高渗、干旱、低温等多种非生物胁迫所激活, 在植物响应胁迫和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 信号转导等过程中扮演着重要角色^[4-5]。

Anderberg 等^[6]最早从 ABA 处理的小麦胚胎 cDNA 文库中分离得到第 1 个 SnRK2 基因家族成员 PKABA1, 发现该基因的表达受 ABA 及干旱胁迫所诱导。之后, SnRK2 基因家族的研究成为热点, 除模式植物拟南芥外, 水稻、玉米、小麦、马铃薯等作物中的 SnRK2 成员也相继被克隆和分析研究^[5,7-10]。然而, 关于 SnRK2 家族基因在药用植物中的研究还相对较少。贾彦彦等^[11]对丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. SnRK2 基因家族成员 SmSnRK2.4 的研究发现, 该基因在根中表达量较高, 对聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 和 ABA 胁迫有不同程度响应; 张春兰等^[12]对从菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 中克隆得到的 ItSnRK2.1 基因的分析结果显示, ItSnRK2.1 在菘蓝幼苗的根部表达量最高, 参与高盐和干旱胁迫应答反应, 但对 ABA 胁迫不敏感。这些研究为揭示 SnRK2 家族成员在药用植物抗逆生理中的作用奠定了一定的理论基础。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 *Dendrobium* Sw. 多年生草本植物, 以干燥茎入药, 具有益胃生津、滋阴清热等功效和抗疲劳、祛痰、镇咳等作用, 在我国已经有两千多年的药用历史^[13-14]。全基因组序列的成功解析为铁皮石斛这一珍稀濒危药用植物生理代谢途径相关基因的发掘和功能研究奠定了重要基础^[15]。目前, 尚未见铁皮石斛 SnRK2 家族基因研究报道。前期, 利用 SSH 技术富集真菌侵染铁皮石斛种子共生萌发的差异表达基因^[16], 分离得到 1 条 732 bp 的 EST 序列, BLASTx 分析显示其与 GenBank 中已注册的多种植物 SnRK2 亚家族成员序列具有较高的一致性 (>80%)。本研究拟利用 RT-PCR 和 RACE 技术从铁皮石斛中克隆该基因的

cDNA 全长, 并对其进行生物信息学及组织表达模式分析, 以期为进一步揭示该基因在铁皮石斛逆境胁迫应答机制中的作用奠定基础。

1 材料

野生植物材料采自云南西双版纳, 由陕西中医药大学药学院王继涛高级实验师鉴定为兰科石斛属铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo。取根、茎、叶组织样品, 液氮速冻, 置于 -80 °C 冰箱保存备用。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

利用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, 中国) 提取总 RNA, NanoDropTM 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国) 检测 RNA 质量、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。利用逆转录试剂盒 (M-MLV Reverse Transcriptase kit, Promega, 美国) 逆转录合成 cDNA 第 1 链, -20 °C 保存备用。

2.2 RACE 和 RT-PCR 验证

依据 EST 序列信息, 利用 Primer5 设计特异性引物, 按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 日本) 说明书的操作步骤, 分别与 UPM 引物组合进行 RACE-PCR 反应, 对 3' 和 5' 末端进行 PCR 扩增。3'-RACE 反应的特异性引物为 RACE-F: 5'-CCTTTTGAGGATCCAGAGGAGCCA-AAG-3', 5'-RACE 反应的特异性引物为 RACE-R: 5'-TTTTAAATCCCGGTGGCACACTTGTCAT-3'。2 次 RACE-PCR 反应体系均为 25 μL, 包括 10× Advantage[®] 2 PCR buffer 2.5 μL、dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL、RACE-F 或 RACE-R (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 10×UPM 0.5 μL、5'-RACE ready cDNA 或 3'-RACE ready cDNA 各 1.0 μL、50×Advantage[®] 2 Polymerase Mix (5 U/L) 0.5 μL, 补 ddH₂O 至 25 μL。PCR 程序为 95 °C、3 min; 95 °C、30 s, 68 °C、2 min, 32 个循环; 72 °C、7 min; 4 °C 保温。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, TianGen 胶回收试剂盒 (TianGen, 中国) 纯化目的条带。纯化后的 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体 (Takara, 中国), 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 随机挑选 3 个克隆进行测序。测序工作由上海生工生物工程技术有限公司完成。

将测序所获 cDNA 序列与原 EST 序列拼接, 获得基因全长 cDNA 序列信息, 设计跨开放阅读框 (open reading frame, OFR) 引物, 对全长基因进行

RT-PCR 扩增和测序验证。引物序列信息为 ORF-F: 5'-ATCATGGATCGGGCGGC-3', ORF-R: 5'-TTAC-ATGGCATAAACTATTTCTCCG-3'。

2.3 生物信息学分析

利用在线分析工具 BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 分析 cDNA 序列; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质理化性质; SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 分析蛋白质二级结构; InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>)、PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 和 PROSITE SCAN (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_proscan.html) 分析蛋白结构域和基元; SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测蛋白质信号肽; TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白质跨膜区域; PSORT (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) 进行蛋白质亚细胞定位分析; SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三维建模分析; NetPhos 3.1 Server 进行蛋白磷酸化位点的预测。

利用 DNASTAR7.0 将该基因编码蛋白序列与双子叶模式植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (AtSnRK2.6, Genbank 登录号 AEE86299)、单子叶模式植物水稻 *Oryza sativa* L. (OsSAPK3, Genbank 登录号 BAD17999) 和玉米 *Zea mays* L. (ZmSnRK2.6, Genbank 登录号 AQK52965), 以及兰科代表植物小兰屿蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris* (Schauer) Rchb. f. (SAPK10, Genbank 登录号 XP_020584154) 蛋白的氨基酸序列进行多序列对比分析。利用 MEGA 6 以距离法构建该蛋白与拟南芥 SnRK2 亚家族 10 个成员 (AtSnRK2.1 ~ AtSnRK2.10) 和水稻 SnRK2 亚家族 10 个成员 (OsSAPK1 ~ OsSAPK10) 共 21 个蛋白的邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树, 并以拟南芥 SnRK1 和 SnRK3 2 个亚家族的 AtSnRK1.1、AtSnRK1.2、AtSnRK1.3, AtSnRK3.1 和 AtSnRK3.6 作为系统发育分析的外类群。

2.4 实时定量 PCR (qRT-PCR) 分析

分别用 2 μ g 根、茎、叶样品总 RNA 反转录合成 cDNA, 以 EF1 α 基因^[17]为内参, 通过 qRT-PCR

分析该基因的组织表达模式。qRT-PCR 引物为 SnK-RTF: 5'-GCCAAAGAACTACCTGAAGACG-3', SnK-RTR: 5'-CTCATAGCAGGATCAGCCA CA-3', 引物扩增产物序列长度为 129 bp。利用 ABI PRISM 7500 qRT-PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行 qRT-PCR 反应。反应体系 25 μ L, 包括 2 $\times$ SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Master Mix (Takara, 中国) 12.5 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, ROX 0.5 μ L, cDNA 2 μ L, ddH₂O 9 μ L。每个反应重复 3 次, 包括不加模板的对照, 实验重复 3 次。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、45 s, 共进行 40 个循环。反应结束绘制熔解曲线。根据 ABI PRISM 7500 SDS (Applied Biosystems, 美国) 生成的循环阈值 (cycle threshold, C_t), 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法^[18] 计算基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 DoSRK2E 基因全长克隆

5'-RACE 和 3'-RACE 反应产物经克隆、测序、去载体后获得的扩增序列长度分别为 507 bp 和 556 bp, 与原始 EST 序列 (732 bp) 拼接成 1 条长度为 1 795 bp 的 cDNA 序列。该 cDNA 序列包含 1 个长度为 1 086 bp 的 ORF, 5'-UTR 长 350 bp, 3'-UTR 长 359 bp, 具有真核生物特有的 polyA 尾巴结构。BLASTx 分析表明其所编码蛋白的氨基酸序列与 GenBank 中收录的小兰屿蝴蝶兰等多种植物的 SnRK2 序列具有较高的一致度 (>80%)。利用 ORF-F/ORF-R 引物进行 qRT-PCR 验证, 扩增产物电泳检测获得 1 条目标条带 (图 1), 经克隆、测序分析获得完整的 ORF 序列, 证明已成功获得该基因全长 cDNA。将其命名为 DoSRK2E 基因并提交至 GenBank (登录号为 API65110)。

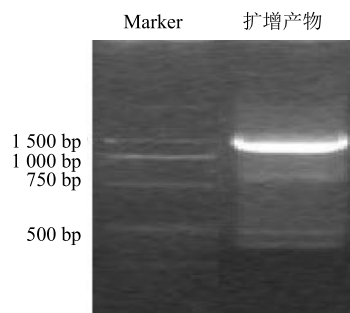


图 1 DoSRK2E 基因全长 cDNA 克隆电泳检测

Fig. 1 Full length of DoSRK2E cDNA detected by agarose gel electrophoresis

3.2 DoSRK2E 基因编码蛋白的理化特性分析

ProtParam 预测结果显示, DoSRK2E 蛋白的分子式为 $C_{1816}H_{2833}N_{481}O_{546}S_{22}$, 包含 361 个氨基酸, 相对分子质量为 40 850, 理论等电点 (isoelectric point, pI) 为 4.80; 带正电残基 (Arg+Lys) 为 34, 带负电残基 (Asp+Glu) 为 56; 不稳定系数 (instability index) 为 37.89, 脂肪系数 (aliphatic index) 为 89.94, 平均亲水系数 (grand average of hydropathicity, GRAVY) 为 -0.190。SOPMA 分析表明, DoSRK2E 二级结构主要由随机卷曲 (random coil, 37.67%)、 α 螺旋 (alpha helix, 33.52%)、延伸链 (extended strand, 17.17%) 和 β 转角 (beta turn, 11.63%) 组成。

3.3 DoSRK2E 蛋白结构域、定位和跨膜区分析

InterProScan 分析结果显示, DoSRK2E 含有 1 个保守的蛋白激酶结构域 (protein kinase domain, 23~279), 在该结构域内部, 分别包含 1 个蛋白激酶 ATP 结合位点 (protein kinase ATP binding site, 29~52) 和 1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活化位点 (serine/threonine-protein kinase active site, 138~150), 与 PROSITE 的预测结果一致 (图 2)。PROSITE SCAN 分析表明, DoSRK2E 蛋白包含有 6 种功能基元, 分别为 2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (protein kinase C phosphorylation site, 20~22、73~75), 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (casein kinase II phosphorylation site, 100~103、148~151、241~244、269~272、345~348、353~356), 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点 (tyrosine kinase phosphorylation site, 159~165), 2 个 *N*-豆蔻酰化位点 (*N*-myristoylation site, 129~134、237~242), 1 个蛋白激酶 ATP 结合位点 (29~52), 1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活化位点 (138~150)。

SignalP 4.1、TMHMM 分析表明 DoSRK2E 蛋白不含信号肽或跨膜域。PSORT 预测该蛋白定位在内质网膜 (endoplasmic reticulum membrane) 上的可能性最高, 为 85%, 定位于质膜 (plasma membrane)、微体/过氧化物酶体 (microbody/

peroxisome) 或叶绿体类囊体膜 (chloroplast thylakoid membrane) 上的可能性分别为 44%、30% 和 11%。

3.4 DoSRK2E 蛋白的三维建模及磷酸化位点分析

以蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB) 中已提交的拟南芥 AtSnRK2.6 (PDB No.: 3uc4.1) A 链晶体分子^[19]为模板, 在 SWISS-MODEL 中对 DoSRK2E 进行同源建模结构预测, 结果见图 3。DoSRK2E 与拟南芥 AtSnRK2.6 蛋白结构域序列间的一致性为 86.20%, 两者空间结构类似。磷酸化位点分析结果显示, DoSRK2E 蛋白的氨基酸序列包含有 14 个丝氨酸磷酸化位点, 7 个苏氨酸磷酸化位点和 6 个酪氨酸磷酸化位点 (图 4)。



图 3 基于 SWISS-MODEL 的 DoSRK2E 蛋白三维建模结构预测结果

Fig. 3 Three-dimensional structure of DoSRK2E predicted by SWISS-MODEL

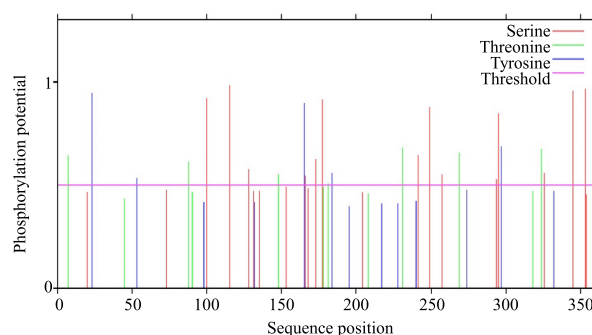


图 4 DoSRK2E 蛋白磷酸化位点

Fig. 4 Predicted phosphorylation sites of DoSRK2E

3.5 DoSRK2E 蛋白的多序列对比及系统发育分析

多序列比对结果表明 (图 5), 铁皮石斛 DoSRK2E 与小兰屿蝴蝶兰 SAPK10 蛋白的一致性最高, 为 87.8%, 与拟南芥 AtSnRK2.6 蛋白的一致性次之, 为 84.7%, 与水稻 OsSAPK3 蛋白和玉米 ZmSnRK2.6 蛋白的一致性分别为 67.2% 和 67.0%。系统发育分析结果显示 (图 6), 所有 21 个 SnRK2



图 2 DoSRK2E 蛋白的 PROSITE 结构域分析结果

Fig. 2 Protein kinase conserved domains of DoSRK2E predicted by PROSITE



图 5 DoSRK2E 与其他植物 SnRK2 蛋白的多序列比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment of DoSRK2E and SnRK2 proteins from other plants

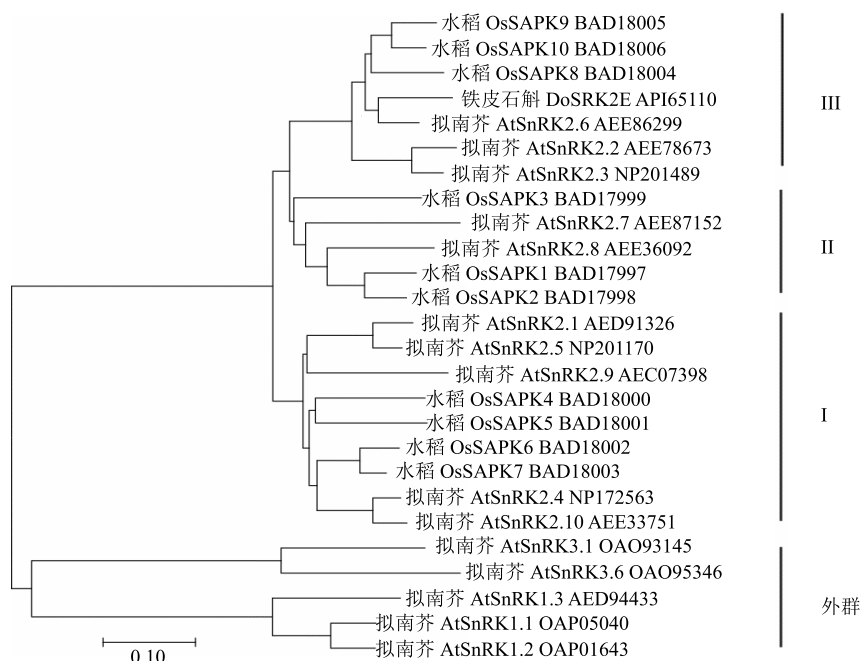


图 6 DoSRK2E 与拟南芥、水稻 SnRK2 亚家族成员的 NJ 系统发育树

Fig. 6 Neighbor-joining phylogenetic tree of DoSRK2E protein and SnRK2 subfamily members from *A. thaliana* and *O. sativa*

亚家族蛋白以 100% 的支持率聚为一个单系分支，与 SnRK1 和 SnRK3 亚家族蛋白区分开来。这 21 个 SnRK2 成员可以进一步划分为 3 个次级单系分支 (I、II、III)，其中，DoSRK2E 与拟南芥 AtSnRK2.6 的系统发育关系最近，构成姐妹类群，共同位于 III 之内。

3.6 DoSRK2E 基因表达模式分析

qRT-PCR 检测结果表明，DoSRK2E 基因在根、

茎、叶 3 种组织中均有表达，但相对表达量存在差异。以叶为校正样本，该基因在根中的表达量最高，茎中次之，根和茎中的表达量分别为叶中表达量的 3.60 倍和 1.32 倍（图 7）。

4 讨论

作为一类植物特有的 Ser/Thr 类蛋白激酶，SnRK2 在调节植物逆境生理适应中发挥着重要作用。野生状态下的铁皮石斛主要附生于半阴生环境

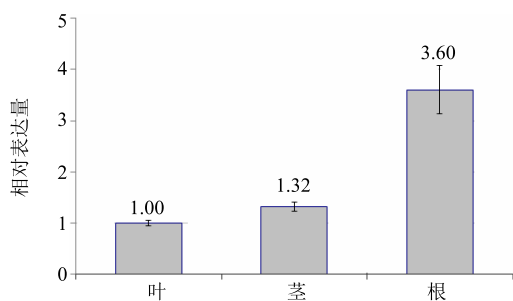


图 7 DoSRK2E 基因在铁皮石斛根、茎、叶中的表达量
Fig. 7 Expression pattern of DoSRK2E gene in root, stem, and leaf of *D. officinale*

的树杆、岩石等的表面，具有很强的抗逆（包括低温、干旱等）能力。本研究采用 qRT-PCR 和 RACE 技术，首次从铁皮石斛中克隆获得 1 个 SnRK2 家族基因 DoSRK2E。分析显示该基因与多种植物 SnRK2 基因高度同源，其编码蛋白 DoSRK2E 具有植物 SnRK 蛋白激酶典型的结构域，包含 1 个蛋白激酶 ATP 结合位点和 1 个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活化位点，与菰蓝 SnRK2 亚家族成员 ItSnRK2.1 蛋白激酶结构相似^[12]。此外，根据本研究系统发育分析结果，DoSRK2E 以 100% 的支持率被聚类在 SnRK2 亚家族的 III 分支中，并与拟南芥 AtSnRK2.6 构成姐妹类群。说明 DoSRK2E 应属于 SnRK2 蛋白激酶亚家族成员。DoSRK2E 理论等电点、不稳定系数和均亲水系数分别为 4.80、37.89 (<40) 和 -0.190，说明该蛋白为富含酸性氨基酸的稳定亲水性蛋白。PSORT 预测 DoSRK2E 定位在内质网膜上的可能性高达 85%，而 SignalP4.1 和 TMHMM 分析揭示其无信号肽或跨膜域，因此推测该蛋白在胞内发挥作用。

SnRK2 基因家族成员的表达在植物不同组织之间存在差异性。马铃薯 8 个 StSnRK2 成员中，StSnRK2.1、StSnRK2.2、StSnRK2.5（编码蛋白属于 SnRK2 亚家族的 I 分支）和 StSnRK2.6（II 分支）在根中表达水平最高，StSnRK2.3（III 分支）和 StSnRK2.4、StSnRK2.8（I 分支）在叶中的表达量最高，而 StSnRK2.7（I 分支）在茎和叶中的表达量远高于根^[8]；丹参 SmSnRK2.4（I 分支）^[11]和菰蓝 ItSnRK2.1（I 分支）^[12]均在根中的表达量最高；小麦的 TaSnRK2.9 和 TaSnRK2.8 蛋白属于 III 分支，但 TaSnRK2.9 基因在叶片中相对表达量最高^[20]，而 TaSnRK2.8 基因在根部表达量最高^[21]。本研究 qRT-PCR 检测结果表明，DoSRK2E 基因在铁皮石

斛的根、茎、叶中均有表达，但在根中的表达量明显高于茎和叶中。这些结果说明 SnRK2 家族成员虽在植物不同组织中的表达水平存在差异，但并未呈现出明显的组织表达特异性。

系统发育分析结果将 SnRK2 亚家族成员划分为 I、II、和 III 3 个分支。其中，I 分支各成员不受 ABA 的激活，II 分支对 ABA 具有微弱的响应或不响应，而 III 分支受 ABA 的强烈激活^[22]。III 分支的成员包括有拟南芥的 AtSnRK2.2、AtSnRK2.3、AtSnRK2.6 及水稻的 SAPK8、SAPK9、SAPK10。研究表明，除 ABA 外，AtSnRK2.2、AtSnRK2.3、AtSnRK2.6 及 SAPK8、SAPK9、SAPK10 还可同时被高渗（NaCl）胁迫所激活^[5,10]。本研究系统发育分析结果表明，DoSRK2E 的系统位置位于由 AtSnRK2.2、AtSnRK2.3、AtSnRK2.6 及 SAPK8、SAPK9、SAPK10 所构成的 III 分支之内，并与拟南芥 AtSnRK2.6 互为姐妹类群。据此推测，DoSRK2E 蛋白亦有可能被 NaCl 胁迫和 ABA 激活，参与铁皮石斛生长发育过程中的逆境胁迫应答。然而，其具体的作用机制还有待进一步深入研究揭示。

参考文献

- [1] Halford N G, Hardie D G. SNF1-related protein kinases: Global regulators of carbon metabolism in plants? [J]. *Plant Mole Biol*, 1998, 37(5): 735-748.
- [2] Halford N G, Hey S J. Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants [J]. *Biochem J*, 2009, 419(2): 247-259.
- [3] Hrabak E M, Chan C W, Gribskov M, et al. The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 666-680.
- [4] Yoshida T, Mogami J, Yamaguchi-Shinozaki K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 21: 133-139.
- [5] Kobayashi Y, Yamamoto S, Minami H, et al. Differential activation of the rice sucrose nonfermenting1-related protein kinase 2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(5): 1163-1177.
- [6] Anderberg R J, Walker-Simmons M. Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10183-10187.
- [7] Huai J, Wang M, He J, et al. Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays* [J]. *Plant Cell*

- Rep, 2008, 27(12): 1861-1868.
- [8] 毛娟. 马铃薯抗逆相关基因 *SnRK2* 家族的克隆与功能分析 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [9] Mao X, Zhang H, Tian S, *et al.* TaSnRK2.4, an SNF1-type serine/threonine protein kinase of wheat (*Triticum aestivum* L.), confers enhanced multistress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(3): 683-696.
- [10] Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Laurière C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(40): 41758-41766.
- [11] 贾彦彦, 汝梅, 金伟波, 等. 丹参蛋白激酶 SmSnRK2.4 的克隆及表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(2): 205-212.
- [12] 张春兰, 满丽莉, 向殿军, 等. 菘蓝 *ItSnRK2.1* 基因的克隆及其序列特性分析 [J]. 生物技术通报, 2018, 34(1): 119-128.
- [13] 张岗, 刘思思, 彭亮, 等. 铁皮石斛转录因子基因 DoWRKY3 的克隆与分子特性分析 [J]. 中草药, 2017, 48(14): 2930-2936.
- [14] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [15] Yan L, Wang X, Liu H, *et al.* The genome of *Dendrobium officinale* illuminates the biology of the important traditional Chinese orchid herb [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(6): 922-934.
- [16] Zhao M M, Zhang G, Zhang D W, *et al.* ESTs analysis reveals putative genes involved in symbiotic seed germination in *Dendrobium officinale* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72705.
- [17] Zhang G, Song C, Zhao M M, *et al.* Characterization of an A-type cyclin-dependent kinase gene from *Dendrobium candidum* [J]. *Biologia*, 2012, 67(2): 360-368.
- [18] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [19] Ng L M, Soon F F, Zhou X E, *et al.* Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA) signaling SnRK2 kinases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(52): 21259-21264.
- [20] 连魏卫, 唐益苗, 高世庆, 等. 小麦 TaSnRK2.9 蛋白激酶基因克隆与生物信息学分析 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(33): 6-12.
- [21] 张洪映. 小麦逆境应答基因 TaSnRK2.8 的克隆与分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [22] Kulik A, Wawer I, Krzywińska E, *et al.* SnRK2 protein kinases-key regulators of plant response to abiotic stresses [J]. *Omics*, 2011, 15(12): 859-872.