



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104498514 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201510026143. 4

C12N 1/21(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 01. 20

A01H 5/00(2006. 01)

(71) 申请人 南京林业大学

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇国家农业科技园南京林业大学白马白马教学科研基地

(72) 发明人 成铁龙 鲁路 陈金慧 施季森
周艳威 郑晨 盛宇 史胜青
杨秀艳 李霞

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 邱兴天

(51) Int. Cl.

C12N 15/54(2006. 01)

C12N 9/12(2006. 01)

C12N 15/84(2006. 01)

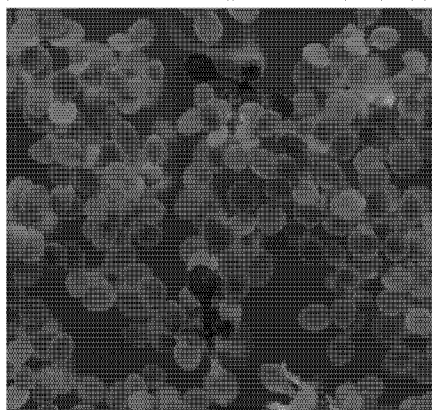
权利要求书1页 说明书7页
序列表9页 附图6页

(54) 发明名称

一种唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因及其表达蛋白和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因及其表达蛋白和应用, 所述 *NtCIPK9* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示, 氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。本发明根据唐古特白刺的抗逆特性, 利用唐古特白刺的叶片组织, 在已有的部分转录组数据的基础上, 同源克隆了唐古特白刺抗逆相关的 *CIPK* 基因全长, 依据拟南芥中的同源基因而命名为 *NtCIPK9*。通过 *NtCIPK9* 基因纯合拟南芥植株的耐盐性分析, 证明了唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因在植物耐盐方面的功能, 为植物抗逆基因库增加资源。



1. 一种唐古特白刺 *NtCIPK9*基因,其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。
2. 权利要求 1 所述的唐古特白刺 *NtCIPK9*基因的表达蛋白,其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。
3. 权利要求 1 所述的唐古特白刺 *NtCIPK9*基因在提高植物耐盐性中的应用。
4. 含有权利要求 1 所述的唐古特白刺 *NtCIPK9*基因的载体。
5. 含有权利要求 1 所述的唐古特白刺 *NtCIPK9*基因的宿主细胞。

一种唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因及其表达蛋白和应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程技术领域,具体涉及一种唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因及其表达蛋白和应用。

背景技术

[0002] 唐古特白刺 (*Nitraria tangutorum*) 属于蒺藜科 (Zygophyllaceae) 白刺属 (*Nitraria*), 强旱生落叶灌木, 为中国特有白刺种类, 主要分布于我国西北部地区。唐古特白刺抗旱、耐盐碱、防风沙、耐贫瘠, 可改善盐碱质土壤, 提高土壤肥力, 防风固沙, 维持绿洲, 保护生态平衡。其浆果状核果富含维生素 C、黄酮、蛋白质、以及 19 种氨基酸和 21 种微量元素, 具有食用价值。此外, 其果实还具有健脾胃, 降血脂, 降血糖以及抗氧化等药用价值。唐古特白刺作为一种生态和经济植物逐渐受到关注。目前, 对唐古特白刺的研究主要集中在抗旱耐盐生理生化性质, 果实营养成分分析以及育种等方面, 为唐古特白刺的分子机理研究提供大量的数据支持, 为抗性基因及其它功能基因的运用奠定基础。

[0003] *CIPKs* (CBL-interacting protein kinase), Ca^{2+} 信号途径中与上游 CBL 特异性相互作用的蛋白激酶, 这类蛋白在 N 端含有保守的 SNF 激酶结构域和 C 端的 NAF 结构域。在模式植物拟南芥中有 26 个 *CIPK* 类同源异型盒基因, 水稻中有 30 个 *CIPK* 类同源异型盒基因, 杨树中有 27 个 *CIPK* 类同源异型基因。另外, 到目前为止, 还没有在植物以外的物种中发现类似基因, 因此 *CIPK* 基因是植物所特有的 Ca^{2+} 信号通路中的 Ser/Thr 类磷酸蛋白激酶基因。众多研究表明, 植物所特有的 *CIPK* 类基因在植物耐盐, 耐低钾, 抗寒和抗旱等抗逆过程中发挥重要作用。

[0004] 在拟南芥的研究中发现, *AtCIPK9* 基因是植物响应低钾环境的一个关键调控基因。在拟南芥突变体 *cipk9-1* 和 *cipk9-2* 植株与野生型相比, 其生长明显受到低钾环境的抑制。*CIPK9* 基因启动子的 GUS 染色和荧光实时定量 PCR 分析表明, *CIPK9* 基因在拟南芥的根茎叶中均有表达。根部的表达主要是在根部的成熟区, 包括根毛, 在根尖和伸长区并无 *CIPK9* 基因的表达。此外, 在拟南芥的花瓣, 萼片和荚果中也能检测到 *CIPK9* 基因的表达。分子生物学研究证明了 *CIPK9* 与 *CBL3* 共同作用, 调节植物体内钾离子平衡。

发明内容

[0005] 发明目的: 针对现有技术中存在的不足, 本发明的目的是提供一种唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因。本发明的另一目的是提供唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因的表达蛋白。本发明还有一目的是提供唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因在植物耐盐育种中的应用。

[0006] 技术方案: 为了实现上述发明目的, 本发明采用的技术方案如下:

一种唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0007] 上述的唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因的表达蛋白, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

[0008] 上述的唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因在植物耐盐育种中的应用。

[0009] 含有唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因的载体。

[0010] 含有唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因的宿主细胞。

[0011] 有益效果：与现有技术相比，本发明根据唐古特白刺的抗逆特性，利用唐古特白刺的叶片组织，在已有的部分转录组数据的基础上，同源克隆了唐古特白刺抗逆相关的 *CIPK* 基因全长，依据拟南芥中的同源基因而命名为 *NtCIPK9*。在正常培养环境中，唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因过表达的拟南芥 T3 代纯合植株的生长发育与野生型无明显差异。在盐胁迫处理过程中，转 *NtCIPK9* 基因纯合株的耐盐性大于野生型拟南芥。通过 *NtCIPK9* 基因纯合拟南芥植株的耐盐性分析，证明了唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因在植物耐盐方面的功能，为植物抗逆基因库增加资源，这对于提高植物的耐盐性研究具有重要意义。

附图说明

[0012] 图 1 是唐古特白刺总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图；

图 2 是 *NtCIPK9* 基因片段克隆，5' RACE, 3' RACE 以及 *NtCIPK9* 基因全长克隆的 PCR 结果；

图 3 是 *NtCIPK9* 基因的表达载体图；

图 4 是 T1 代拟南芥植株筛选结果；

图 5 是转基因拟南芥种子子叶萌发率统计图；

图 6 是拟南芥种子在含盐培养基上萌发后两周的生长状态图；

图 7 是转基因拟南芥盐处理 10 天后生长表型图；

图 8 是转基因拟南芥盐处理 10 天后叶片及侧根数量统计结果图；

图 9 是转基因拟南芥盐处理 10 天后主根长度统计结果图；

图 10 是转基因拟南芥盐处理 10 天后植株整体干重统计结果图；

图 11 是盐溶液处理转基因拟南芥表型图；

图 12 是 200mM 盐水处理转基因拟南芥 4 天后的拟南芥表型图。

具体实施方式

[0013] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明。

[0014] 实施例 1

以唐古特白刺的叶片为材料，提取总 RNA，并反转成 cDNA，设计相应引物进行 PCR，琼脂糖凝胶电泳后，回收目的条带，与 pMD19-T 载体连接，转入大肠杆菌，测序并分析。确定为目的序列后，依据该序列设计 RACE 引物，PCR 获取 5' 和 3' 序列，测序分析后，拼接得到 *NtCIPK9* 全长序列。依据全长序列设计引物，PCR 获得全长片段，与 pMD19-T 载体连接，转入大肠杆菌，再次测序和分析，确定为全长片段后，挑取阳性克隆进行质粒抽提，加入酶切位点后与载体 pBI121 同时双酶切，在 T4 连接酶的作用下连接后，转入农杆菌 EHA105 和 GV3101 中，待拟南芥适龄后，通过花器官浸泡转化法进行转化，获取 T1 代和 T2 代种子，筛选到纯合 T3 代后，进行盐处理，表型观察和耐盐性分析。具体如下：

(1) 总 RNA 的提取

以唐古特白刺的叶片为材料，按照 NORGEN 试剂盒 (*Norgen Biotek*) 的操作步骤进行 RNA 的提取，所使用的试剂和耗材均处理使其无 RNA 酶。唐古特白刺叶片总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果如图 1 所示，条带清晰；测定总 RNA 的吸光度， OD_{260}/OD_{280} 值为 2.01， $OD_{260}/$

OD₂₃₀为 1.98,可见 RNA 质量较好。

[0015] RNA 提取的具体过程为:加入 800 μ L Lysis Solution 磨样。匀浆后将裂解液转移至新管中。混匀 2min 使其彻底裂解,12000rpm 离心 2min,上清移至新管中。加入等体积的 70% 乙醇,涡旋混匀。将混合液移至柱子中(下接 2ml 收集管),离心 1min,倒掉滤液,放回收集管。加入 400 μ L Wash Solution,离心 1min,弃滤液,放回收集管。加入 DNAI 工作液,12000rpm 离心 1min,将滤液吸回柱子上,25-30 $^{\circ}$ C 静置 15min。加入 400 μ L Wash Solution,12000rpm 离心 1min,弃滤液。第三次加入 400 μ L Wash Solution,12000rpm 离心 1min,弃滤液。将柱子放回收集管,12000rpm 离心 2min,弃收集管。将柱子放入 1.7ml 管子中加入 50 μ L Elution Solution。200~2000rpm 离心 2min,12000rpm 离心 1min,体积不足 50 μ L,再用 14000rpm 离心 1min。

[0016] (2) cDNA 的获得

以所提 RNA 为模板,反转录获得 cDNA,所使用的是 Invitrogen 公司的 SuperScript[®] III First-Strand Synthesis Kit。实验中的 RNA 使用量为 1 μ g,具体过程为:配置反应液(1 μ L RNA (\leq 5 μ g),1 μ L Primer (OligodT),1 μ L 10mM dNTPmix,DEPC-Treated Water, up to 10 μ L),短暂低速离心后,65 $^{\circ}$ C 5min,立即置于冰上 1~2min。向上一步的管中加入试剂(2 μ L 10 \times RT Buffer,4 μ L 25mM MgCl₂,2 μ L 0.1M DTT,1 μ L RNaseOUT (40U/ μ L),1 μ L SuperScript III RT),置于 PCR 仪上,反应程序为 50 $^{\circ}$ C 50min,85 $^{\circ}$ C 5min。将上一步的反应液离心,每管中加入 1 μ L 的 RNase H,37 $^{\circ}$ C 20min。

[0017] (3) 目的基因的同源克隆

根据唐古特白刺的部分转录组数据,通过 NCBI Blast 进行保守的特异性序列分析,利用 Oligo7 设计引物,克隆 *NtCIPK9* 基因片段,然后进行连接转化测序和序列分析,确定为目的基因。克隆引物,PCR 体系和 PCR 程序如下所示。克隆结果如图 2-A 所示。

[0018] *NtCIPK9* 片段克隆引物为:

CIPK9 forward primer: 5'-GTGATCAAGTCCTGCGTCACAA-3',

CIPK9 reverse primer: 5'-CTACCTCAAACACCTCAGTGGCTAC-3'。

[0019] PCR 反应体系(20 μ L)为:2 μ L 10 \times PCR Buffer、1.2 μ L Mg²⁺ (25mM/L)、0.4 μ L 10 \times dNTP、0.1 μ L Tag (5.0U/uL)、1 μ L Forward primer (10uM/L)、1 μ L Reverse primer (10uM/L)、1 μ L Template cDNA (100ng/uL)、13.3 μ L ddH₂O。

[0020] PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 5min,55 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延长 1min,35 个循环。

[0021] (4) 目的基因 5' 端和 3' 端序列克隆

利用 Oligo7 设计 RACE 引物,进行 *CIPK9* 基因 3' 末端和 5' 末端的克隆,切胶回收获得目的片段,然后与载体 pMD19-T 连接,转化大肠杆菌,挑取单克隆,测序和序列分析,确定获得 *NtCIPK9* 基因的两个末端序列后,拼接得到 *NtCIPK9* 基因全长序列。RACE 引物,PCR 反应体系和程序如下所示。克隆结果如图 2-B~G 所示。

[0022] RACE 引物为:

CIPK9:3' race primer A:5'-GTGGATGCCGTTTTCAATGACTCGAAGG-3',

CIPK9:3' race primer B:5'-CCTCGAGAACTTATTTGAGAAGCAGACGGG-3',

CIPK9:3' race primer C 5'-GAGAAGCAGACGGGTCTTGTGAAGCGAG-3',

CIPK9:5' race primer A 5'-CCGCACTTGCTGCGACAGCGCAC-3',

CIPK9:5' race primer B 5' -TCTGTTTCGACCATCTTGTGACGCAGGACTTG-3',

CIPK9:5' race primer C 5' -CTCCGGTCTCAATCTTGGCGAATTTACACC-3',

RACE A item 的 PCR 反应体系 (20 μ L) 为 :2 μ L 10' PCR Buffer、1.2 μ L Mg^{2+} (25mM/L)、0.4 μ L 10' dNTP、0.1 μ L Tag (5.0U/u1)、1 μ L *CIPK9*:3' / 5' race primer A (10uM/L)、1 μ L 10' Universal Primer A Mix、1 μ L Template cDNA (100ng/u1)、13.3 μ L ddH₂O。

[0023] RACE A item 的 PCR 反应程序 :95 $^{\circ}$ C 变性 5min,67 $^{\circ}$ C /69 $^{\circ}$ C 退火 (3' end/5' end) 30s,72 $^{\circ}$ C 延长 (3' end/5' end) 40s/35s,35 循环。

[0024] RACE B 和 C item 的 PCR 反应体系 (20 μ L) 为 :2 μ L 10' PCR Buffer、1.2 μ L Mg^{2+} (25mM/L)、2 μ L dNTP、0.4 μ L Kode、0.6 μ L Universal Primer A Mix、0.6 μ L *CIPK9*:3' / 5' race primer B/C、1 μ L Diluent of race A product、12.2 μ L ddH₂O。

[0025] RACE B 和 C item 的 PCR 反应程序 :94 $^{\circ}$ C 预变性 2min,98 $^{\circ}$ C 变性 10s,67 $^{\circ}$ C /66 $^{\circ}$ C /68 $^{\circ}$ C /68 $^{\circ}$ C 退火 (3' race B /3' raceC/5' raceB/5' raceC) 30s,68 $^{\circ}$ C 延长 (3' end/5' end) 40s/35s,35 循环。

[0026] (5) 基因全长获取

根据 *CIPK9* 基因全长序列,利用 Oligo7 设计全长引物,克隆得到 *NtCIPK9* 全长基因,切胶回收目的条带,与 pMD19-T 连接后转入大肠杆菌,经过测序分析,确定 *CIPK9* 基因的 ORF 是完整的。唐古特白刺的 *CIPK9* 基因全长为 1735bp,命名为 *NtCIPK9*,具体序列如 SEQ ID NO. 1 所示,所表达的蛋白序列如 SEQ ID NO. 2 所示,包括 443 个氨基酸的开放阅读框 (ORF)。全长基因克隆的引物,PCR 反应体系、程序以及克隆结果具体如下:

全长基因克隆引物为:

CIPK9:wl forward primer :5' -GGATCCATGAATAAGGTACCGGGGAC-3',

CIPK9:wl reverse primer :5' -CCCGGGCGTGATTTCTTTACAGC-3',

Forward restricted site of BamHI :5' -G \wedge GATCC-3',

Reverse restricted site of SmaI :5' -CCC \wedge GGG-3',

PCR 反应体系 (20 μ L) 为 :2 μ L 10' PCR Buffer、1.2 μ L Mg^{2+} (25mM/L)、0.4 μ L 10' dNTP、0.1 μ L Tag (5.0U/u1)、1 μ L Forward primer (10uM/L)、1 μ L Reverse primer (10uM/L)、1 μ L Template cDNA (100ng/u1)、13.3 μ L ddH₂O。

[0027] PCR 反应程序 :95 $^{\circ}$ C 变性 5min,63 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延长 1min30s,35 循环。

[0028] *NtCIPK9* 基因片段克隆,5' RACE,3' RACE 以及 *NtCIPK9* 基因全长克隆的 PCR 结果如图 2 所示,其中,图 2-A 为从白刺叶片中克隆到的 *CIPK9* 基因片段 ;B 为 *CIPK9* 基因 3' RACE A 引物克隆产物 ;C 为 *CIPK9* 基因 3' RACE B 引物克隆产物 ;D 为 *CIPK9* 基因 3' RACE C 引物克隆产物 ;E 为 *CIPK9* 基因 5' RACE A 引物克隆产物 ;F 为 *CIPK9* 基因 5' RACE B 引物克隆产物 ;G 为 *CIPK9* 基因 5' RACE C 引物克隆产物 ;H 为 *CIPK9* 基因全长引物克隆产物。

[0029] 实施例 2 基因功能验证

构建 35S :*CIPK9* 表达载体,转入野生型哥伦比亚拟南芥中,观察唐古特白刺 *NtCIPK9* 基因是否能增强拟南芥的耐盐性,比较转基因拟南芥和野生型拟南芥的表型差异,推测唐古特白刺 *CIPK9* 基因的功能。

[0030] 1) 载体的构建

本发明所用大肠杆菌菌株为 E. coli JM109 (宝生物工程(大连)有限公司购入);表达

载体为 pBI 121 (Biovector Co., LTD 公司购入)。

[0031] 具体过程如下：

1. 通过 PCR 向 *CIPK9* 基因片段上下游分别添加 BamH I 和 SmaI 酶切位点, PCR 体系及反应条件同全长扩增, 引物分别是：

NtCIPK9F+BamH :5' -CGCGGATCCATGAATAAGGTACCGGGGAC-3',

NtCIPK9R+SmaI :5' -TCCCCCGGGACGTGATTTCTTTACAGCTTTTTC-3',

2. PCR 产物测序正确后, 在 T4 连接酶的作用下, 可进行载体的构建。使用 BamHI 和 SmaI 内切酶进行酶切反应处理空的 pBI 121 表达载体。

[0032] 双酶切反应体系 (20 μ L) 为 :2 μ L 10 \times K buffer、0.5 μ L BamH I、0.5 μ L SmaI、1 μ g 回收产物、ddH₂O 补足 20 μ L。

[0033] 37 $^{\circ}$ C 水浴, 酶切 4h。加入 10 \times 终止液停止酶切反应, 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分离。用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (AXYGEN) 进行回收并纯化酶切产物, 溶于 20 μ L 的 TE 缓冲液中。

[0034] 3. 检测所回收的酶切产物浓度, 按连接体系加入各试剂 (目的片段分子数 : 载体分子数 =3:1~5:1), 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。25 μ L 连接反应体系为 :2.5 μ L T4 DNA ligase buffer (10 \times)、5 μ L 酶切的表达载体、15.5 μ L 酶切的 PCR 产物、2 μ L T4 DNA ligase、ddH₂O 补足 25 μ L。

[0035] 4. 连接产物转化大肠杆菌 JM109 超感细胞, 挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜 ; 使用全长引物进行菌液 PCR, 以筛选阳性克隆, 之后用 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (AXYGEN) 提取质粒进行酶切验证。同时测序检测载体构建过程中是否发生突变或者缺失现象。构建表达载体如图 3 所示。

[0036] 2) 农杆菌的转化

1. 本发明使用的农杆菌菌株为 GV3101 (Biovector Co., LTD 公司购入)。采用的是液氮冻融法将构建好的 pBI121+NtCIPK9 表达载体转入农杆菌。具体过程为 :1) 冰浴融化 GV3101 感受态细胞, 加入至少 100ng 回收纯化的表达载体质粒, 轻轻混匀, 冰浴 20~30 min ; 2) 液氮速冻 1 min, 37 $^{\circ}$ C 热击 3 min, 迅速置于冰上 1~2min ; 3) 加入 800 μ L 无抗生素的 LB 培养基, 28 $^{\circ}$ C, 200 rpm 复苏 3.5h ; 4) 4000 rpm 离心 3 min, 吸掉培养基 ; 5) 混匀剩余菌液, 涂抹于添加 50 mg. L⁻¹ 卡那霉素的固体 LB 培养基上 ; 6) 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 30~48h ; 7) PCR 检测阳性克隆, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0037] 2. 待种植的健康状态的拟南芥生长至开花。将 PCR 检测的阳性克隆, 摇菌至 OD₆₀₀ 0.8 时, 进行拟南芥花器官浸泡转化。具体过程如下 :1) 将菌液 5000 rpm, 5 min 离心, 收集菌体, 用 5% 蔗糖溶液悬浮 ; 2) 在浸泡前, 加入 SilwetL-77, 浓度为 0.05% (500 μ L/L), 晃出泡沫 ; 3) 将拟南芥的地上部分在农杆菌悬浮溶液中浸泡 15~30 sec, 期间轻轻晃动, 4) 将浸过的拟南芥平躺在托盘里, 用保鲜膜覆盖保湿, 锡箔纸密封避光 24h ; 5) 揭开锡箔纸, 正常条件下培养, 当种子成熟时停止浇水。

[0038] 3. 收获干燥的种子, 将 T1 代种子进行筛选, 筛选培养基 :1/2MS+ 卡那霉素 100mg/L+ 头孢 200mg/L。筛选结果如图 4 所示。

[0039] 4. 再移至土里继续培养, 收取 T1 代拟南芥种子后, 将种子继续进行筛选获得 T2 代植株。然后, 收取 T2 代拟南芥植株后, 将种子继续进行筛选, 获得纯合筛选出 T3 代纯合株

系。

[0040] 3) 转 *NtCIPK9* 基因拟南芥抗盐性试验

1. 选择 3 个株系的纯合转基因拟南芥种子各 50 粒分别放在含有 0mM, 100mM 和 150mM NaCl 的 1/2MS 培养基上萌发, 种子春化后放于光照下, 5 天后统计子叶萌发率, 三个过表达纯合转基因株系和野生型拟南芥株系分别命名为 OX-1, OX-2, OX-3 和 WT。三次重复试验同时进行。萌发率统计结果如图 5 所示。

[0041] 统计结果显示, 在正常条件下相同时间内 (0mM NaCl 处理), 转 *NtCIPK9* 基因的三个过表达株系种子的子叶萌发率与野生型拟南芥种子的子叶萌发率无明显差异。在 100mM 盐处理条件下, 过表达株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 分别比野生型的子叶萌发率高 15.3%, 11.3% 和 14.6%, 呈极显著性差异 ($P < 0.01$)。在 150mM 盐处理条件下, 三个过表达株系分别比野生型高 139.2%, 60.7% 和 296.4%, 其中 OX-3 与野生型之间差异极显著 ($P < 0.01$)。从萌发实验结果可知, *NtCIPK9* 可以增强拟南芥种子萌发对盐的耐受性。

[0042] 种子在含盐培养上萌发生长两周后, 观察转基因植株和野生型植株的表型。三次重复试验同时进行。生长表型如图 6 所示。观察转基因拟南芥和野生型拟南芥的生长状态, 可知 *NtCIPK9* 在正常条件下不会影响植株的生长发育, 在 100mM 和 150mM 盐处理条件下, 可以增强植物对盐的耐受性, 表现出比野生型更好的生长状态。

[0043] 2. 将三个纯合株系拟南芥种子和野生型拟南芥种子正常萌发生长 10 天后, 转移到分别含有 0mM (未处理组) 和 150mM NaCl (处理组) 的培养基上, 生长 10 天后, 观察其生长状态, 并统计生物量。三次重复试验同时进行。试验植株生长表型如图 7 所示; 试验植株生物量统计结果如图 8、9 和 10 所示, 其中每个数据均来自于 6 个以上平行试验的平均值。

[0044] 盐处理拟南芥幼苗的实验结果显示, *NtCIPK9* 不会影响植株的正常生长, 在盐处理条件下可以增强幼苗的抗盐能力。由统计数据可知, 在正常生长条件下 (0mM NaCl 处理), 转基因株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 的叶片数量分别比野生型多 27.9%, 16.3% 和 27.9%, 呈差异显著性 ($P < 0.05$); 在正常生长条件下, 转基因株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 的侧根数量分别比野生型多 -22.9%, 4.9% 和 -18.0%; 转基因株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 的主根长度分别比野生型长 -12.8%, 21.5% 和 20.5%, 其中 OX-2 与野生型之间差异显著 ($P < 0.05$); 转基因株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 的植株整体干重比野生型重 23.5%, 13.0% 和 78.3%, 其中 OX-1 与野生型之间差异显著 ($P < 0.05$)。在 150mM NaCl 处理条件下, 转基因株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 的叶片数量分别比野生型多 -4.1%, 4.1% 和 8.2%; 转基因株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 的侧根数量分别比野生型多 20.5%, 44.1% 和 38.2%, 其中 OX-2 与野生型之间呈差异显著性 ($P < 0.05$); 转基因株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 的主根长度分别比野生型长 61.1%, 148% 和 70.3%, 其中 OX-2 和 OX-3 与野生型之间呈差异极显著性 ($P < 0.01$); 转基因株系 OX-1, OX-2 和 OX-3 的植株整体干重比野生型重 157.7%, 76.3% 和 48.4%, OX-1 和 OX-2 与野生型之间呈差异极显著性。综上所述可知, 在盐环境中, 转 *NtCIPK9* 基因的拟南芥植株与野生型相比, 叶片数多, 侧根数量多, 主根长度长以及植株整体干重高, 进一步证明了 *NtCIPK9* 基因可以增强拟南芥耐盐性的功能。

[0045] 3. 拟南芥种子萌发一周后, 将转基因株系和野生型拟南芥各 20 株转移到泥炭土中生长, 每盆种一株, 两周后, 配制 200mM 的盐水进行浇灌处理, 处理周期为 4 天。三次重复试验同时进行。

[0046] 盐水浇灌 1 天后,野生型拟南芥叶片轻微萎焉,转基因拟南芥为发生明显变化;第 2 天后,野生型叶片明显萎焉,转基因拟南芥叶片开始卷曲;第 3 天后,野生型拟南芥叶片出现枯死斑点,转基因拟南芥开始明显萎焉;第 4 天后,野生型拟南芥枯死,转基因拟南芥明显萎焉;其表型如图 11 所示。盐水浇灌处理 4 天后,用清水恢复,并观察后期生长。

[0047] 200mM 盐水处理 4 天后的拟南芥表型如图 12 所示,其中,A 为清水恢复盐处理拟南芥 1 天后的表型图;B、C 为清水恢复 10 后的表型图,可知,转基因拟南芥在清水恢复后,仍正常生长,并开花结果;野生型拟南芥在盐水浇灌处理 4 天后无法恢复,最终死亡。盐水浇灌试验结果进一步证明了 *NtCIPK9* 增强植株耐盐性的功能。

SEQUENCE LISTING

<110> 南京林业大学

<120> 一种唐古特白刺 NtCIPK9 基因及其表达蛋白和应用

<130> 100

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1735

<212> DNA

<213> *Nitraria tangutorum*

<400> 1

```

gggcgaccta gaaacgtctt cactccgtcc ctccctccct ctgtatttac cacccaaact      60
ctgcaaagaa aaaacaacgt ttgcagagat tagataaaac caactttgtg cgcgtcgttt      120
tcgacagtta tccgaattgc ttccgattag ttataagtat cgtcagccgg tgcgtctctgg      180
caacgggaga ttttcgtcgt acttactgat cggacggcgg tgcggaacg attgaaagca      240
tgaataaggt accggggacg aggacacgtg tggggaaata tgaaatagga aggacaattg      300
gtgagggtag ctttgccaag gtgaaattcg ccaagattga gaccggagag tttttcgcca      360
ttaaagtgct tgaccgtgat caagtcctgc gtcacaagat ggtcgaacag ataaagagag      420
agatatcaac aatgaagctg atcaagcacc ctaatgtcgt gaaaatgatt gaggttatgg      480
caagcaaac aaagatctac attgttcttg agtttgcga tgggggtgag ctctttgaca      540
aaattgcaag gactgggaaa ctcaaagaag atgaagcaag aagatatttc caccagctca      600

```

ttaatgctgt ggactattgt cacagtagag ggggtgtcca cagagatttg aaaccggaga	660
atctttcttct tgacagatct ggcgctctga aaatttcaga tttcggttta agtgcgctgt	720
cgcagcaagt gcgggaagat gggctgcttc acacagcttg tgggactcca aattatgttg	780
ctcctgaggt gcttaatgac aaaggctatg atggactgc atcggatgtt tggctctgtg	840
gagtcattct ctttgtctg atggcaggat acttaccttt tgatgagcca agtctaattg	900
ccttatacag aaaaatatgc aaggctgagt tctcttgtcc atcatggttc tcatctggtg	960
ctaagaaatt gatcaagcgt attcttgacc caaatcctca tactcgaata actattttgg	1020
aaatattaga ggatgaatgg tttagaagg ggtacaagcc accacaattt gataaggagg	1080
aagatgttaa tctagatgat gtggatgccg ttttcaatga ctcgaaggaa tatctcgtaa	1140
cagaaaggaa ggagaaacct gtatcaatga atgcttttga gctaactctg aggtcacgga	1200
gttttaacct tgagaactta ttgagaagc aaacgggtct tgtgaagcga gaaacgcgtt	1260
ttacttccca acgcccggca aatgagatca tgtctaaaat tgaggaaact gcaaagcctt	1320
tgggcttcaa cgttcgcaa ggaaactata agatgaagtt gcaaggtgac aaaagtggaa	1380
ggaaaggcca gctctctgta gccactgagg tgtttgaggt agctccctct gtgcacatgg	1440
tggaggtccg taaaactggt ggcgacacac tagaatttca caagttctac aaaactttct	1500
catcaggatt gaaagatgta gtctggcaaa cagaagaaaa tgacgaaaaa gctgtaaaga	1560
aatcacgtta ggaggatcgt gctgcttata ctttccttct gattttttta catgccattg	1620
tccatacaaa cataccatac ccatagaaag ttggaagggt agggatgctt gactagcaca	1680
ggccatagtt gtgaaaaacg aactgaaaag cccacccaaa aaaaaaaaaa aaaaa	1735

<210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> *Nitraria tangutorum*

<400> 2

Met Asn Lys Val Pro Gly Thr Arg Thr Arg Val Gly Lys Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Gly Arg Thr Ile Gly Glu Gly Ser Phe Ala Lys Val Lys Phe Ala Lys
 20 25 30

Ile Glu Thr Gly Glu Phe Phe Ala Ile Lys Val Leu Asp Arg Asp Gln
 35 40 45

Val Leu Arg His Lys Met Val Glu Gln Ile Lys Arg Glu Ile Ser Thr
 50 55 60

Met Lys Leu Ile Lys His Pro Asn Val Val Lys Met Ile Glu Val Met
65 70 75 80

Ala Ser Lys Thr Lys Ile Tyr Ile Val Leu Glu Phe Val Asp Gly Gly
 85 90 95

Glu Leu Phe Asp Lys Ile Ala Arg Thr Gly Lys Leu Lys Glu Asp Glu
 100 105 110

Ala Arg Arg Tyr Phe His Gln Leu Ile Asn Ala Val Asp Tyr Cys His
 115 120 125

Ser Arg Gly Val Phe His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu
 130 135 140

Asp Arg Ser Gly Ala Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ser Ala Leu
145 150 155 160

Ser Gln Gln Val Arg Glu Asp Gly Leu Leu His Thr Ala Cys Gly Thr
 165 170 175

Pro Asn Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Asn Asp Lys Gly Tyr Asp Gly
 180 185 190

Thr Ala Ser Asp Val Trp Ser Cys Gly Val Ile Leu Phe Val Leu Met
 195 200 205

Ala Gly Tyr Leu Pro Phe Asp Glu Pro Ser Leu Met Ser Leu Tyr Arg
 210 215 220

Lys Ile Cys Lys Ala Glu Phe Ser Cys Pro Ser Trp Phe Ser Ser Gly
 225 230 235 240

Ala Lys Lys Leu Ile Lys Arg Ile Leu Asp Pro Asn Pro His Thr Arg
 245 250 255

Ile Thr Ile Leu Glu Ile Leu Glu Asp Glu Trp Phe Lys Lys Gly Tyr
 260 265 270

Lys Pro Pro Gln Phe Asp Lys Glu Glu Asp Val Asn Leu Asp Asp Val
 275 280 285

Asp Ala Val Phe Asn Asp Ser Lys Glu Tyr Leu Val Thr Glu Arg Lys
 290 295 300

Glu Lys Pro Val Ser Met Asn Ala Phe Glu Leu Ile Ser Arg Ser Arg
 305 310 315 320

Ser Phe Asn Leu Glu Asn Leu Phe Glu Lys Gln Thr Gly Leu Val Lys
 325 330 335

Arg Glu Thr Arg Phe Thr Ser Gln Arg Pro Ala Asn Glu Ile Met Ser
 340 345 350

Lys Ile Glu Glu Thr Ala Lys Pro Leu Gly Phe Asn Val Arg Lys Gly
 355 360 365

Asn Tyr Lys Met Lys Leu Gln Gly Asp Lys Ser Gly Arg Lys Gly Gln
 370 375 380

Leu Ser Val Ala Thr Glu Val Phe Glu Val Ala Pro Ser Val His Met
385 390 395 400

Val Glu Val Arg Lys Thr Gly Gly Asp Thr Leu Glu Phe His Lys Phe
405 410 415

Tyr Lys Thr Phe Ser Ser Gly Leu Lys Asp Val Val Trp Gln Thr Glu
420 425 430

Glu Asn Asp Glu Lys Ala Val Lys Lys Ser Arg
435 440

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CIPK9 forward primer

<400> 3

gtgatcaagt cctgcgtcac aa

22

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CIPK9 reverse primer 引物序列

<400> 4

ctacctcaaa cacctcagtg gctac

25

<210> 5

<211> 28

- <212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> CIPK9:3' race primer A 引物序列
- <400> 5
gtggatgccg ttttcaatga ctcgaagg 28
- <210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> CIPK9:3' race primer B 引物序列
- <400> 6
cctcgagaac ttatttgaga agcagacggg 30
- <210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> CIPK9:3' race primer C 引物序列
- <400> 7
gagaagcaga cgggtcttgt gaagcgag 28
- <210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> CIPK9:5' race primer A 引物序列

<400> 8

ccgcacttgc tgcgacageg cac

23

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CIPK9:5' race primer B

<400> 9

tctgttcgac catcttgtga cgcaggactt g

31

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CIPK9:5' race primer C 引物序列

<400> 10

ctccggtctc aatcttggcg aatttcacc

29

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CIPK9:w1 forward primer 引物序列

<400> 11	
ggatccatga ataaggtacc ggggac	26
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> CIPK9:w1 reverse primer	
<400> 12	
cccgggcgtg atttctttac agc	23
<210> 13	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Forward restricted site of BamHI 引物序列	
<400> 13	
g ^ gatcc	6
<210> 14	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Reverse restricted site of SmaI 引物序列	
<400> 14	
ccc ^ ggg	6

<210>	15	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	NtCIPK9F+BamH 引物序列	
<400>	15	
	cgcggatcca tgaataaggt accggggac	29
<210>	16	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	NtCIPK9R+SmaI 引物序列	
<400>	16	
	tcccccgga cgtgatttct ttacagcttt ttc	33

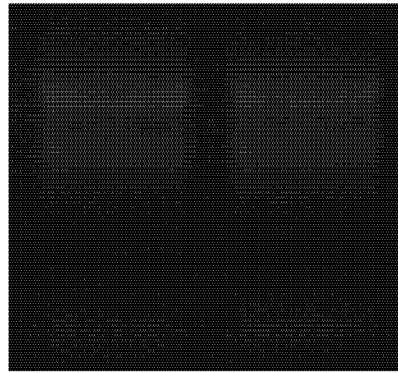


图 1

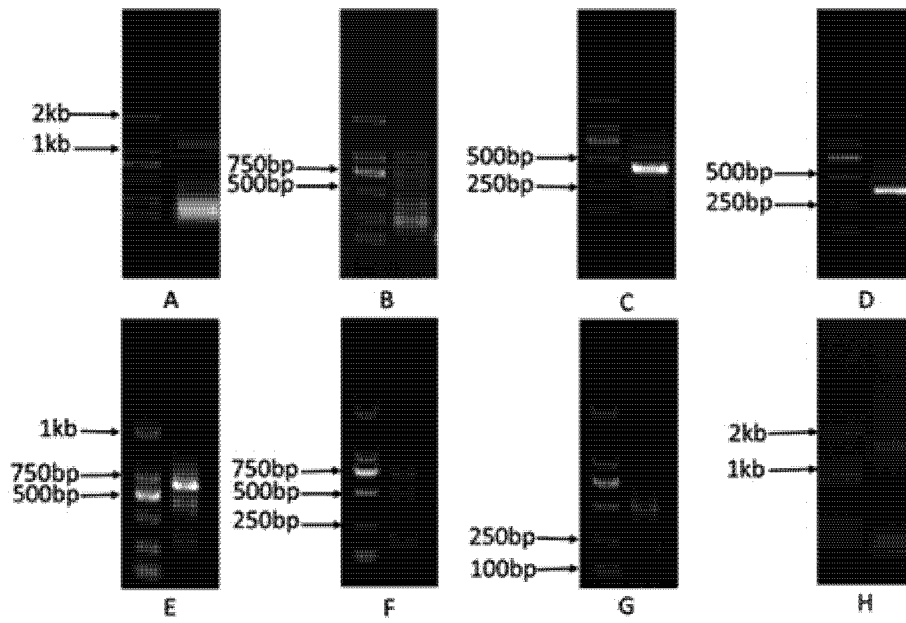


图 2

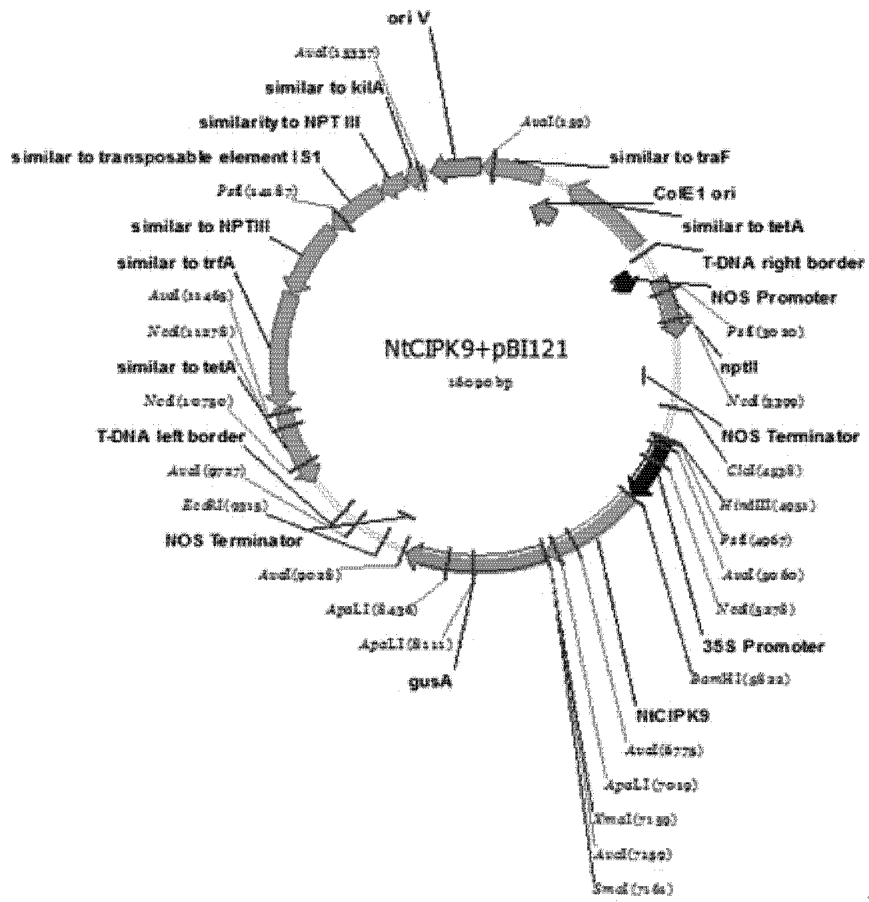


图 3

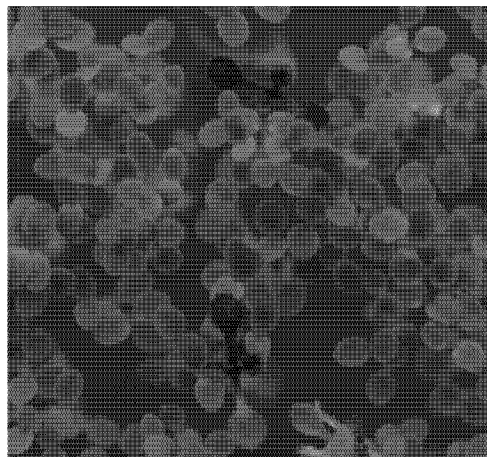


图 4

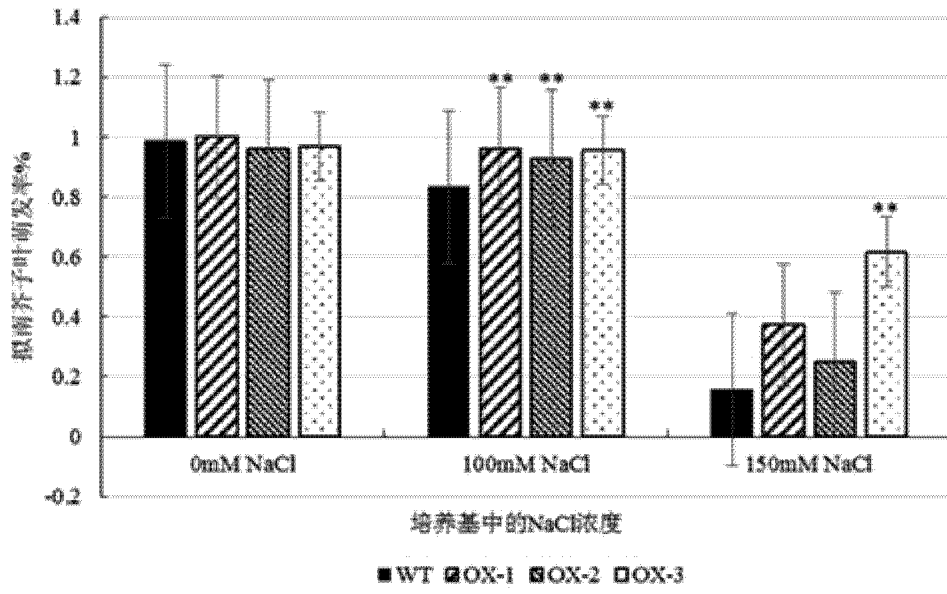


图 5

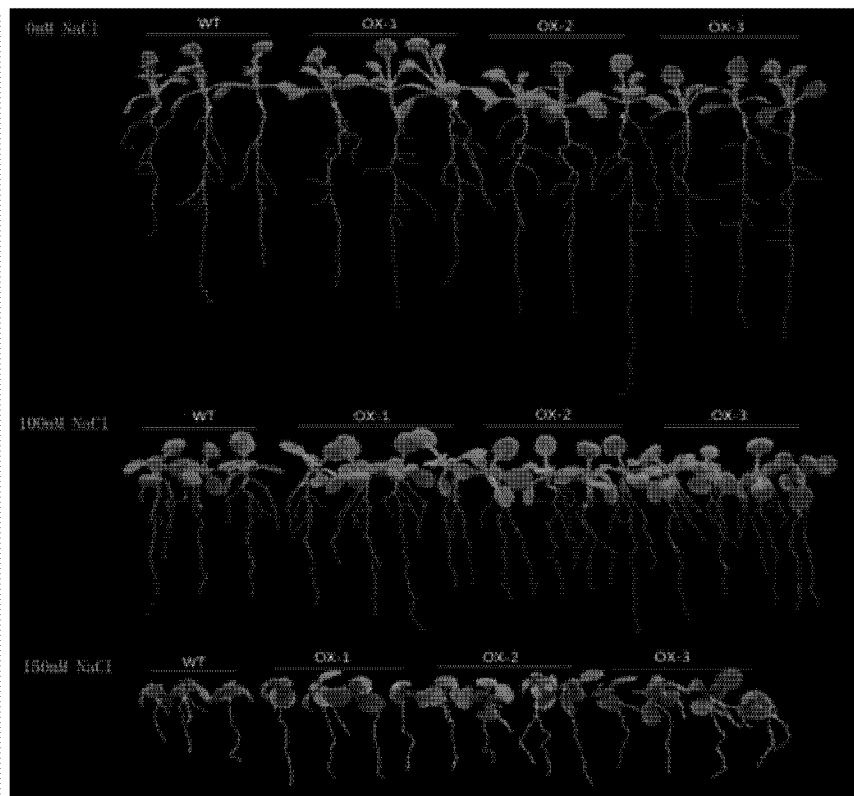


图 6

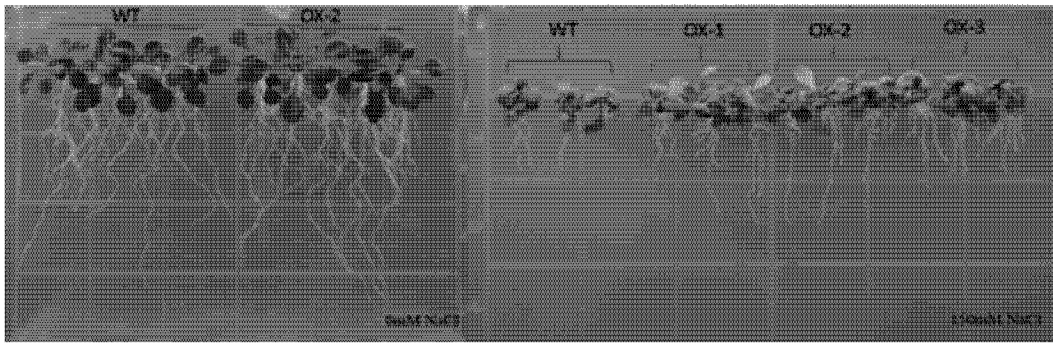


图 7

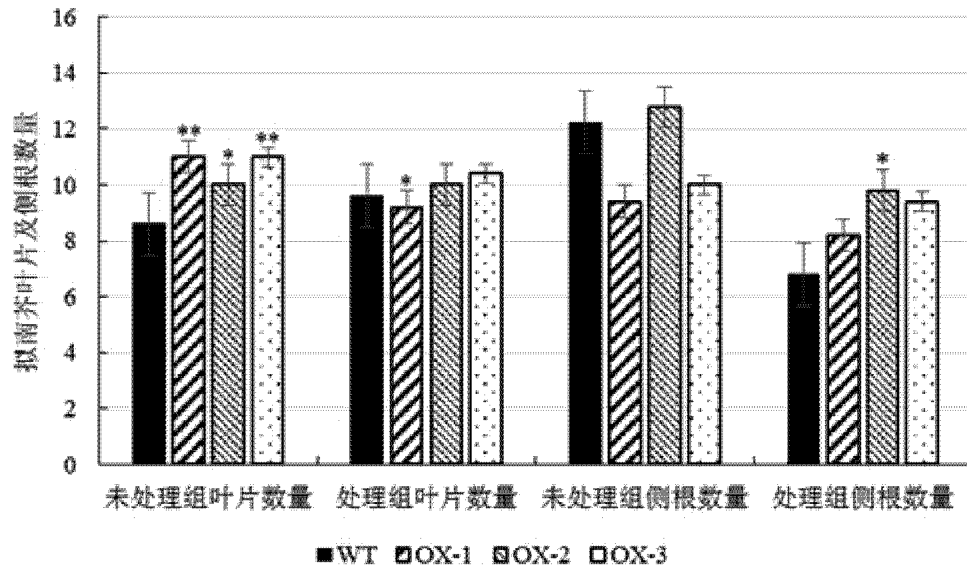


图 8

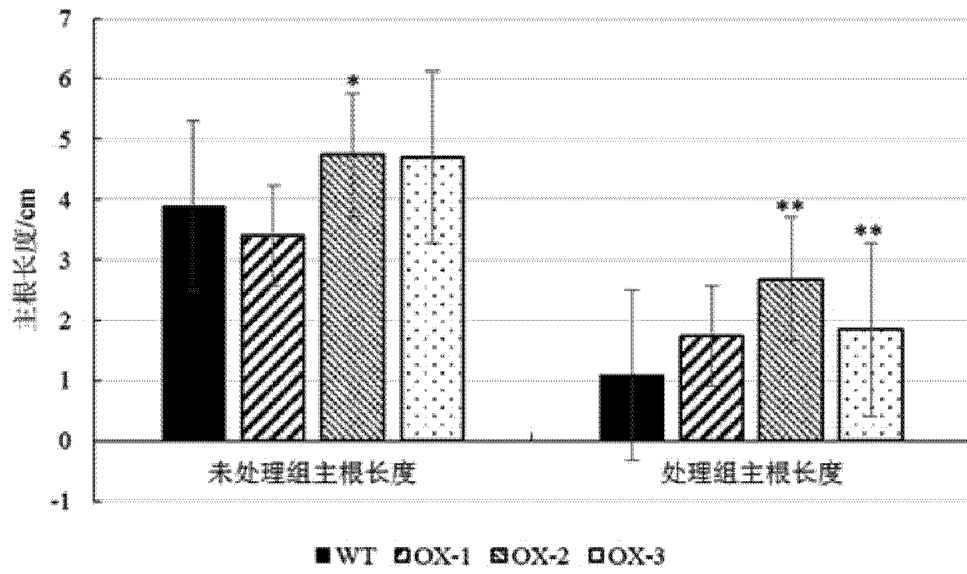


图 9

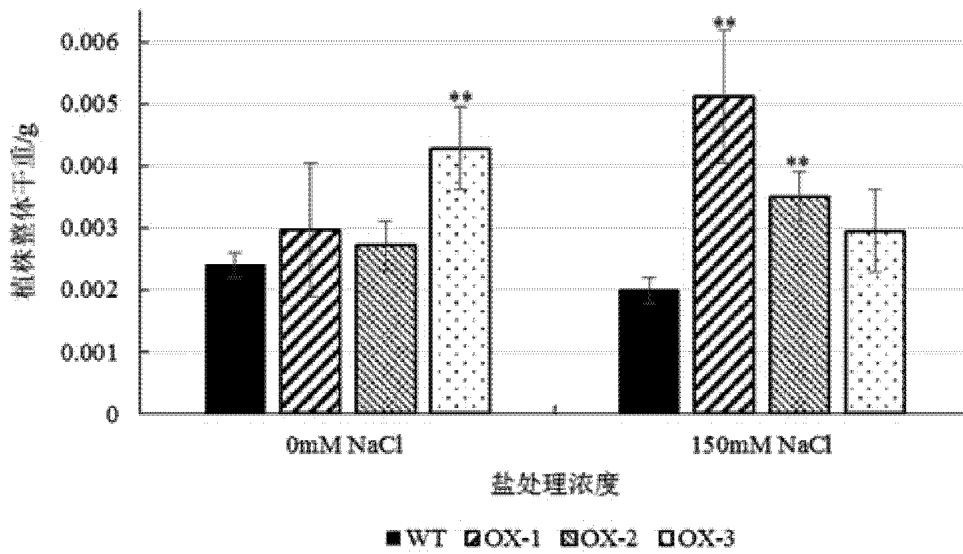


图 10

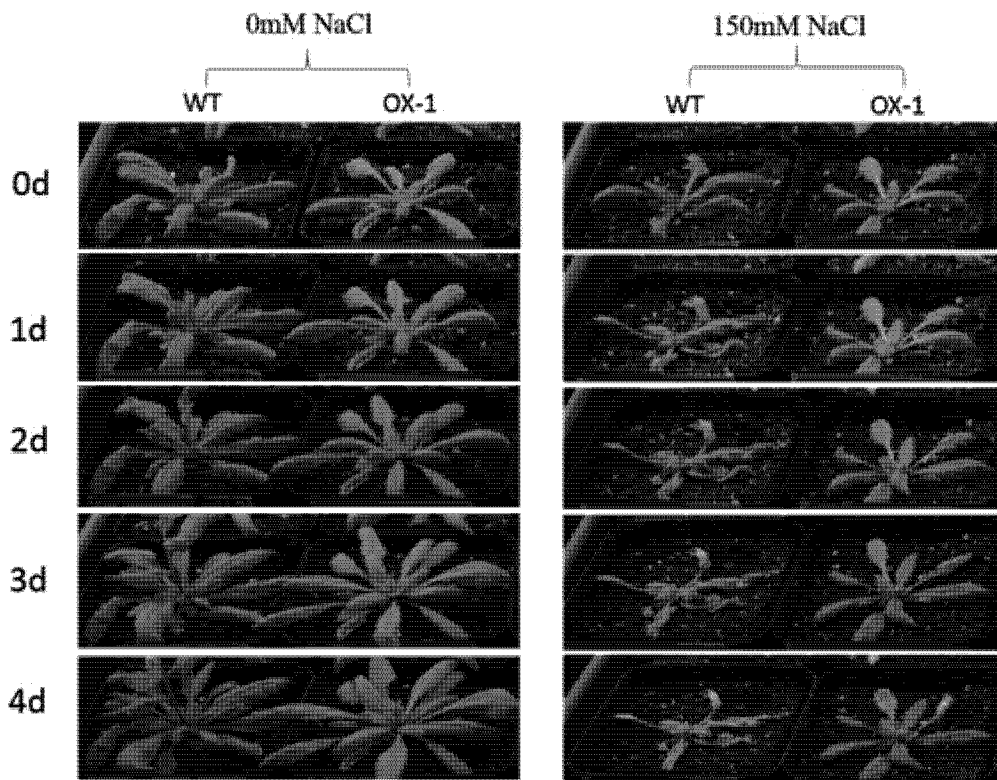


图 11

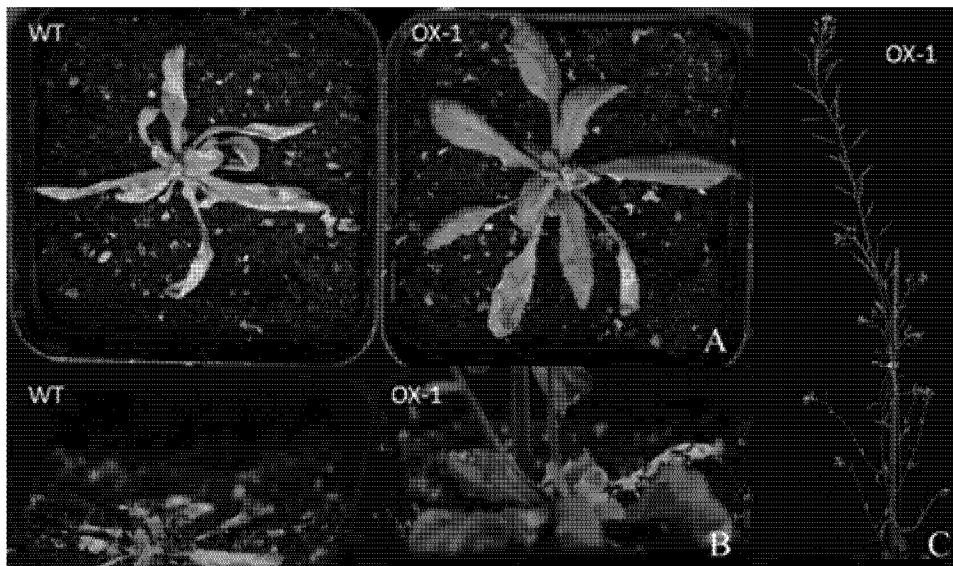


图 12