

水稻 *OsPP6C* 基因的克隆、过表达载体构建与生物信息学分析

王青云^{1 2}, 王润青^{2 3}, 方聪燕², 侯佩², 苏亮², 李建平²,
宋梅芳², 杨建平^{2 3}, 李雪梅¹, 吴大付³

(1. 沈阳师范大学 化学与生命科学学院 辽宁 沈阳 110034; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; 3. 河南科技学院 资源与环境学院 河南 新乡 453003)

摘要:为克隆水稻蛋白磷酸酶 6(PP6) 催化亚基基因 *OsPP6C*, 并构建该基因的过表达载体以及进行生物信息学分析。采用 RT-PCR 技术从水稻中花 11 叶片 cDNA 中扩增 *OsPP6C* 基因全长, 并构建与 *GUS* 融合的 pBI121-*OsPP6C*-*GUS* 表达载体。通过生物信息学方法分析了 *OsPP6C* 蛋白的理化性质、与拟南芥 *AtPP6C* (即 *AtFyPP*) 之间的同源性以及不同物种间的系统发育关系。此外, 对 *OsPP6C* 基因的启动子进行了顺式作用元件分析。结果表明, 该基因转录序列包含一个 912 bp 的开放阅读框, 编码 303 个氨基酸残基, 蛋白的分子量约为 3.47 kDa, 等电点为 5.13; 具有疏水性, 但不存在信号肽, 属于非分泌型蛋白。*OsPP6C* 与拟南芥 *AtFyPP1* 和 *AtFyPP3* 氨基酸序列一致性分别为 93.73% 和 93.40%, 系统进化树显示 *OsPP6C* 与小麦 *TaPP6C* 的亲缘关系最近, 而与其他物种亲缘关系相对较远。对该基因启动子中含有的顺式作用元件分析表明, 该启动子中除 TATA 盒和 CAAT 盒外, 还含有多种参与光应答、激素 (ABA、乙烯、生长素、MeJA 和赤霉素等) 应答以及低温、热激和干旱等非生物胁迫因子应答的调控元件。为进一步研究水稻 *OsPP6C* 基因的表达特性和功能奠定了基础。

关键词: 水稻; 蛋白磷酸酶 6; 过表达载体构建; 生物信息学分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)05-0059-07

Cloning, Construction of Overexpression Vector and Bioinformatics Analysis of *OsPP6C* Gene from *Oryza sativa*

WANG Qing-yun^{1 2}, WANG Run-qing^{2 3}, FANG Cong-yan², HOU Pei², SU Liang²,
LI Jian-ping², SONG Mei-fang², YANG Jian-ping^{2 3}, LI Xue-mei¹, WU Da-fu³

(1. College of Chemical and Life Sciences, Shenyang Normal University, Shenyang 110034; 2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 3. College of Resources and Environment, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: The aims of this study are to clone the catalytic subunit gene of rice protein phosphatase 6 (*OsPP6C*), construct the over-expressing vector of this gene and conduct the bioinformatics analysis. Using the RT-PCR technique, the full length of *OsPP6C* gene was amplified from the complementary DNA (cDNA) of rice Zhong-hua 11 variety, and it was fused with *GUS* to form pBI121-*OsPP6C*-*GUS* expression vector. Through bioinformatics methods, the physiochemical characteristics of *OsPP6C* protein, the homology among *Arabidopsis* PP6Cs (i. e. *AtFyPPs*) and *OsPP6C*, and the phylogenetic relationship among different species were analyzed; in addition, the *cis*-acting elements of the *OsPP6C* promoter were analyzed. The results show that the transcript sequence of this gene contains an open reading frame of 912 base pairs, this gene encodes a peptide of 303 amino acids, the molecular weight and isoelectric point of this protein is approximately 3.47 kDa and 5.13, respectively; the *OsPP6C* protein

收稿日期: 2013-05-20

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08010-002)

作者简介: 王青云(1986-), 男, 山西忻州人, 在读硕士, 主要从事植物分子生物学研究。

王润青(1990-), 女, 河南焦作人, 在读硕士, 主要从事植物分子生物学研究。王青云、王润青为同等贡献作者。

通讯作者: 吴大付(1967-), 男, 河南确山人, 教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事分子生态学及其应用研究。

李雪梅(1967-), 女, 河北三河人, 教授, 博士, 硕士研究生导师, 主要从事植物逆境生理生化研究。

has the hydrophobic property, but there is no signal peptide in this protein and it belongs to the non-secretory proteins. The amino acid identity of OsPP6C with AtFyPP1 and AtFyPP3 was 93.73% and 93.40%, respectively; the phylogenetic tree shows that OsPP6C has the closest genetic relationship with wheat TaPP6C. The *cis*-acting element analysis in the promoter of this gene shows that besides the TATA box and CAAT box, the promoter also contains multiple light-responsive elements, various responsive elements in relation to hormones such as ABA, ethylene, auxin, methyl jasmonate (MeJA) and gibberellic acid, and the regulatory elements involved in various abiotic stresses such as low temperature, heat stress and drought. This paper will lay a solid foundation for further studying expression characteristics and functions of *OsPP6C* gene in rice.

Key words: *Oryza sativa*; Protein phosphatase 6; Vector construction for overexpression; Bioinformatics analysis

蛋白磷酸酶 6 (PP6) 参与转录调节、翻译、形态建成以及细胞循环^[1]。豌豆 PP6 (即 FyPP) 被发现与燕麦光敏色素 A (phyA) 和拟南芥光敏色素 B (phyB) 在酵母中相互作用,此外,体外 Pull-down 检测表明 FyPP 优先结合磷酸化形式的 phyA 以及 Pfr 形式的 phyA 和 phyB^[2]。而接触红光后,phyA 和 phyB 被输入进核,而 FyPP 显示组成型细胞质定位。拟南芥有 2 个高度同源的 PP6 催化亚基基因,即 *At-FyPP1* 和 *AtFyPP3*,它们的多肽序列中只有 2 个氨基酸残基的差异。在 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 存在下,豌豆 FyPP 和拟南芥 FyPPs 体外去磷酸化自磷酸化的燕麦 phyA。豌豆 *FyPP* 基因在拟南芥中异源过表达导致开花延迟,而 *AtFyPP* 基因的下调则引起提前开花。最近的研究表明 *AtFyPP* 基因的缺失突变引起 ABA 超敏,而 *AtFyPP* 基因的过表达则导致转基因拟南芥种子萌发和幼苗生长中对 ABA 的敏感度下降^[3]。

尽管对拟南芥蛋白磷酸酶 6 催化亚基的研究已取得了一定的进展,但在水稻中对该类蛋白的了解还非常少,尤其对其功能的研究,至今尚无文献报道。为了研究水稻 *OsPP6C* 的功能,本研究成功克隆了水稻 *OsPP6C* 基因并构建了过表达载体,此外,对该基因及其启动子进行了生物信息学分析,为进一步研究该基因功能及分析其表达特性奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

水稻粳稻品种中花 11 由中国农科院作物科学研究所杨建平研究员课题组提供。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株、植物表达载体 pBI121 均为中国农科院作物科学研究所杨建平研究员课题组保存。限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司,反转录酶购自北京康为世纪生物科技有限公司, pEASY-Blunt-Simple 克隆载体购自北京全式金生物技术有限公司, PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶购自

TaKaRa 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自北京博迈德生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 取中花 11 幼嫩叶片 (约 1.5 mg) 液氮研磨成粉后,采用 TRIzol 试剂 (Invitrogen) 提取总 RNA。反转录用 Oligo (dT) 作下游引物合成 cDNA 第一条链,按照康维世纪 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒操作说明进行。

1.2.2 目的基因的克隆与序列分析 根据 GenBank 中的 *OsPP6C* (AK068018) 序列,用 Primer Premier 5 软件设计 2 对特异引物 (表 1),用于巢式 PCR (nested PCR) 扩增。

表 1 本研究中所用引物序列

Tab. 1 Primer sequence used in this study

引物名称 Primer name	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')
上游外侧引物 (P1)	CTAAATCCCCTTTGCCTCCCCA
下游外侧引物 (P2)	AATCAGAAACAAAACCTTGACAACGCCAC
上游内侧引物 (P3)	<u>TCTAGAATGGATTGTGGATCTGTGGATCTCT</u>
下游内侧引物 (P4)	<u>GGATCCGAGGAAATATGGGACAGCAGTC</u>

注: P3 下划线显示 *Xba*I 识别位点。P4 下划线显示 *Bam*H I 识别位点。

Note: The underline of P3 shows the recognition site of *Xba*I. The underline of P4 shows the recognition site of *Bam*H I.

以 cDNA 的第一条链为模板, P1 和 P2 为引物, 高保真 PCR 扩增约 1 194 bp 的片段, 取 5 μ L PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。然后以第一轮 PCR 产物 (取 1 μ L, 20 倍稀释) 为模板, 用内侧引物 P3 和 P4 进行第二轮高保真 PCR 扩增, 预期片段大小为 909 bp, 再取 5 μ L PCR 产物, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 随后, 用回收试剂盒回收纯化第二轮 PCR 扩增产物。将回收纯化的目的片段与 pEASY-Blunt Simple 克隆载体连接。连接反应: pEASY-Blunt Simple 克隆载体 0.5 μ L, 回收纯化的 DNA 片段 3.5 μ L; 25 $^{\circ}$ C 保温 20 min。连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。经 PCR 扩增筛选和酶切鉴定, 得到重组质粒 pEASY-Blunt-*OsPP6C*。

经鉴定的重组质粒送到北京金唯智 DNA 测序部测序。

1.2.3 *OsPP6C* 基因表达载体的构建 用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 将重组质粒 pEASY-Blunt-*OsPP6C* 充分酶切,回收目的片段,与限制性内切酶 *Xba* I 和 *Bam*H I 完全酶切的植物表达载体 pBI121 连接,转化得到重组质粒 pBI121-*OsPP6C*。用 PCR 和双酶切(*Xba* I 和 *Bam*H I) 方法鉴定重组质粒 pBI121-*OsPP6C*。

1.2.4 生物信息学分析 多序列比对分析,从 GenBank 中挑选了 2 个来源于模式植物物种的蛋白磷酸酶 6 催化亚基氨基酸序列。这 2 种重要的植物物种为: 双子叶模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 和单子叶模式植物水稻(*Oryza sativa*)。利用 DNAMAN 软件和 ClustalW2 程序(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 将拟南芥 *AtFyPPI* 和 *AtFyPP3* 基因的氨基酸序列与水稻 *OsPP6C* 的氨基酸序列进行多序列比对。

系统进化树构建,从 GenBank 中搜检后获得 10 个来源于不同植物物种的蛋白磷酸酶 6 催化亚基基因 *PP6C* 的核苷酸及氨基酸序列。这些植物依次为: 高粱(*Sorghum bicolor*)、玉米(*Zea mays*)、小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、短柄草(*Brachypodium distachyon*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、油菜(*Brassica napus*)、棉花(*Gossypium hirsutum*) 以及大豆(*Glycine max*); 使用 MEGA 5.1 软件,采用 Neighbor joining 方法,Bootstrap 分析重复数为 1000,构建系统发育树。

通过 PLAZA(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>) 和 PPDB(<http://ppdb.agr.gifu-u.ac.jp/ppdb/cgi-bin/index.cgi>) 数据库,获得 *OsPP6C* 基因(RAP ID: Os01g0691700) 起始密码上游 2 500 bp 的启动子序列;将序列登录至启动子顺式作用元件预测数据库 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 *OsPP6C* 基因 cDNA 编码区的扩增和回收

以反转录合成的 cDNA 第一链为模板,首先用 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,得到预期约 1 194 bp 的特异条带(图 1-A),然后以其 PCR 产物为模板用带有酶切位点的引物 P3 和 P4 进行 PCR 扩增(表 1),得到与预期的 *OsPP6C* 基因 cDNA 编码区大小一致的

约 909 bp 的特异条带(图 1-B),采用胶回收试剂盒将其回收备用。

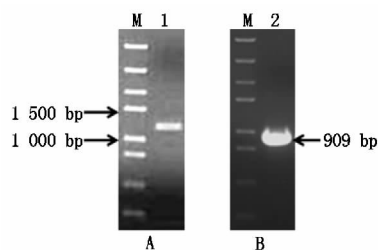


图 1 水稻 *OsPP6C* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *OsPP6C* gene in rice

2.2 *OsPP6C* 基因的克隆和检测

回收的 PCR 产物与 pEASY-Blunt Simple 克隆载体连接后转化 DH5 α 感受态细胞,挑阳性克隆进行目的片段 PCR 及质粒提取,检测结果表明,PCR 扩增片段大小为 909 bp(图 2-A),符合预期结果,证明 *OsPP6C* 基因已克隆到 pEASY-Blunt 载体,将此质粒用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切,电泳图谱上显示 2 条带,小片段为目的片段(图 2-B)。将含有重组质粒 pEASY-Blunt-*OsPP6C* 的大肠杆菌送北京金唯智公司进行序列测定,测序结果与 GenBank 中公布的序列完全一致。

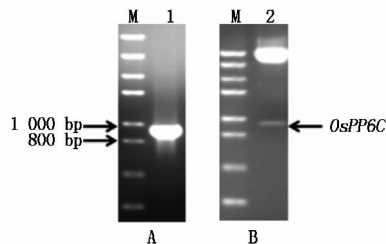


图 2 重组质粒 pEASY-Blunt-*OsPP6C* 的鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pEASY-Blunt-*OsPP6C*

2.3 过表达载体的构建与鉴定

将重组质粒 pEASY-Blunt-*OsPP6C* 和植物表达载体 pBI121 分别用 *Xba* I 和 *Bam*H I 双酶切并回收目的片段,经连接得到重组质粒 pBI121-*OsPP6C*。经 PCR 和双酶切鉴定,证明 *OsPP6C* 基因已插入到植物二元载体 pBI121 中(图 3-A、B)。

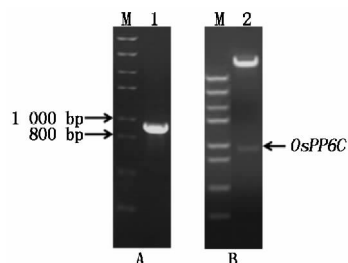


图 3 植物过表达载体 pBI121-*OsPP6C* 的鉴定

Fig. 3 Identification of plant over-expression vector pBI121-*OsPP6C*

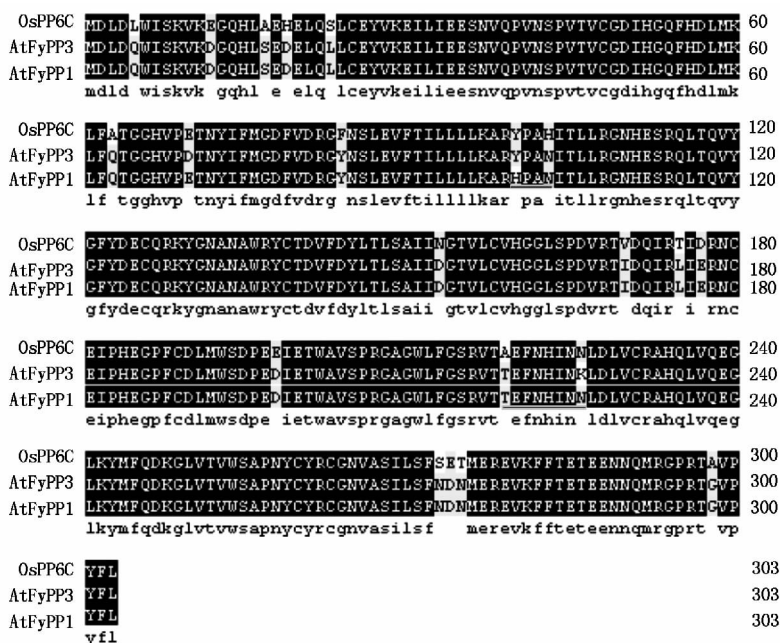
2.4 *OsPP6C* 基因编码蛋白的理化性质、亲/疏水性及信号肽切割位点分析

利用在线数据库 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 和 SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对水稻 *OsPP6C* 基因编码蛋白进行理化性质、亲/疏水性及信号肽切割位点分析。结果表明,该蛋白的分子量约为 3.47 kDa,等电点为 5.13;具有疏水性,但不存在信号肽,属于非分泌型蛋白。

2.5 同源性与多序列比对分析

OsPP6C 与拟南芥中的 2 个蛋白磷酸酶 6 催化亚基基因的氨基酸序列进行同源性比较(图 4),结果显示其与拟南芥 *AtFyPP1* 和 *AtFyPP3* 一致性分别为 93.73% 和 93.40%。*OsPP6C* 基因 cDNA 全长

1 650 bp,编码 303 个氨基酸;*AtFyPP1* cDNA 全长 1 461 bp,编码 303 个氨基酸;*AtFyPP3* cDNA 全长 1531 bp,编码 303 个氨基酸。*OsPP6C*、*AtFyPP1* 和 *AtFyPP3* 的氨基酸序列分析表明,3 个蛋白具有较高的序列一致性,均含有 1 个 Metallophos(Calcineurin-like phosphoesterase, 钙调磷酸酶-类磷酸酯酶)结构域,该结构域对它们功能的行使起至关重要的作用,而且,该结构域中还含有一个 VWA_3(von Willebrand factor type A domain, 血管性血友病因子 A 型域)结构域。氨基酸序列高度的一致性表明它们有类似的基因功能,这 3 个基因之间也可能存在功能上的互补性。同时,这 3 个蛋白的氨基酸也有各自差异的序列(下划线显示),表明,它们在生物学功能上也可能存在差异。



下划线表示氨基酸差异位点。

The underline shows the discrepant sites of amino acids.

图 4 多序列比对

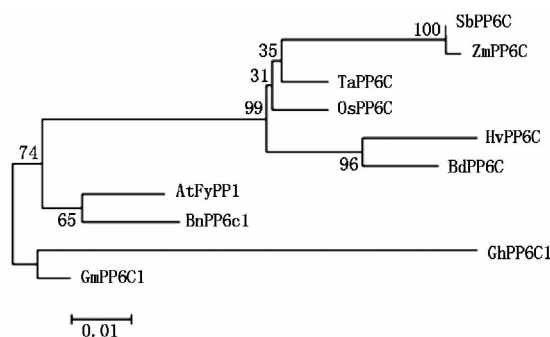
Fig. 4 Multiple sequence alignment

2.6 系统发育树的构建

利用 NCBI 在线数据库,我们寻找到包括拟南芥、油菜、棉花、大豆、短柄草、大麦、水稻、小麦、玉米以及高粱等不同种属的 PP6C 蛋白的同源序列。应用 MEGA 软件,对不同种属的家族成员进行系统发育树构建(图 5),我们观察到水稻 PP6C 与小麦具有较高同源性。研究表明,亲缘关系越近,同源性越高;另外,蛋白磷酸酶 6 催化亚基基因在单子叶植物中只有一个,而在双子叶植物中通常有 2 个(图 4.5)。

2.7 水稻 *OsPP6C* 启动子顺式作用元件分析

通过 PlantCARE^[4] (<http://bioinformatics.psb.>



Sb. 高粱; Zm. 玉米; Ta. 小麦; Os. 水稻; Hv. 大麦; Bd. 短柄草; At. 拟南芥; Bn. 油菜; Gh. 棉芯; Gm. 大豆。

At. *Arabidopsis thaliana*; Os. *Oryza sativa*; Ta. *Triticum aestivum*; Sb. *Sorghum bicolor*; Zm. *Zea mays*; Hv. *Hordeum vulgare*; Bd. *Brachypodium distachyon*; Bn. *Brassica napus*; Gh. *Gossypium hirsutum*; Gm. *Glycine max*.

图 5 系统发育树的构建

Fig. 5 Construction of phylogenetic tree

2500 · GCAAATACTT · CTGTAAGGCT · TATATGACAT · CTAGTTATTT · TCCGGACGTG · AACGCATCAT ·
G-box⁺

-2440 · ATCCTTTTTT · TTTTACAGAA · CATCAATTTA · TATACTCCCT · CCGTTTTTTA · ATAGATGACG ·
TGACG-motif⁺

-2380 · CCGTTGACTT · TTTCTCACAT · GTTTGACCAT · TCGTCTTATT · CAAAAAATTT · ATGTAATTAT ·
HSE⁺

-2320 · AATTTATTTT · GCTATGAGTT · ATTTTATCAC · TCATAGTATT · TTAAGTGTGA · TTTATATCTT ·
TCT-motif⁺

-2260 · ATACATCTAC · ATAAAAATTT · TAAATAAGAC · GAATGTTAA · ACATGTAAGA · AAAGGTCAAC ·
GT1-motif⁺ TC-rich repeats⁺

-2200 · AGCGTCATCT · ATTTAAAAAA · CGGTTATCTA · AGGTAGTATA · AATCAGTGAC · ATCAGAATTA ·
CGTCA-motif⁺ ACE⁺ I-box⁺

-2140 · TGCTGATGAG · GTGAGATGCA · GGTGCTACA · CACAAGTAGT · CTGGTGAGGT · GTTAGTACTG ·
TCT-motif⁺

-2080 · CATCGTCGTC · CGTTGACAAT · TTCTTGCTGC · TCTTCTTTTT · TTAAATGTT · TCCTATTTCT ·
AuxRR-core⁺ GARE-motif⁺

-2020 · TTTCTTAGGA · CAAAGATGTT · ATGAATGGAC · CGGTTAAAA · CAGACTATTG · ACAAGATTAT ·
AuxRR-core⁺ GARE-motif⁺

-1960 · TTTATCTTAC · ATGGTTATAG · ATATAAATTA · AATATTTTAA · TAAATAAACT · TCACAGATAG ·
TCT-motif⁺

-1900 · CTCATAACAA · GGGATTGGAA · GAAAGTTCG · ACTTTAAAGC · AAAGTGAGTT · TAGATCAACT ·
HSE⁺ MBS⁺

-1840 · GACTAGGTTG · CTTGTGGTAG · AACCAGATCA · CCCC GTTCAA · GTTATAAAGT · TGACACATGT ·
TCT-motif⁺

-1780 · GTTTGTATTT · ACAGCTAATT · ATTATTTTCA · TGATAGACGG · TGTACCTGTT · GATAGTGAGG ·
TCT-motif⁺

-1720 · CGTTCTGAGT · GAC TTTCGGT · AGTGAGGCGT · CGTTGTATTG · TGTTTCTGAA · AAAAATCTTT ·
WUN-motif⁺ LTR⁺ TGA-element⁺ TC-rich repeats⁺ HSE⁺

-1660 · TCTTTAAAAA · GACGTCGAGC · AAATAATTTA · CGATAATAAT · CTA CTTGAGT · AGTTAAAAAT ·
TCT-motif⁺

-1600 · AATACGAGGG · CCAGTTACCC · CTTTGATCGC · TAAATTTTTC · TGTTCCATGT · GAATAAAGCC ·
MBS⁺ G-box⁺

-1540 · ACTACTCGGA · CGCCAAAGGG · CCTGTAGCCT · AGTG GTTATA · AAAGCCTCAG · AAAGATGTGC ·
TCT-motif⁺

-1480 · AGCAACTAAT · TTACGATAAT · AATCTACTGG · AGTAGTTAAA · AATAACATGG · GGCCCAGTTA ·
MBS⁺

-1420 · CCCCTTTGAA · CGCTAGATTT · TTTTT CCATG · TGAATAAAGG · CATTACTAAG · ATGCGAAAAA ·
G-box⁺

-1360 · GGATATAGCC · CCTAGTGATT · ACAAGAGTCT · CAGTAGCCCC · TGTTCCATT · TGAGGTTTCA ·
TCT-motif⁺

-1300 · TAACGAGCCT · GAAAGGACGT · AAATACGGTT · GTGTTTAGAT · TTAGGGGTGT · AAAGTTTGG ·
TCT-motif⁺

-1240 · TGTGTCACAT · CGGATATGCC · GGTACACATT · TAAAGTATTA · AATATAGACT · AATAAAGAA ·
TCT-motif⁺

-1180 · CTAATTACAT · AATCCGTTAG · TAAACCACGA · GATGAATTTA · TTAAACCTAA · TTAATCCGTC ·
ACE⁺ MRE⁺ Box 4⁺

-1120 · ATTAGCAAAT · ATTTACTGTA · GCACCACATT · GTCAAATCAT · GTACTAATTA · GGCTTAAAG ·
CGTCA-motif⁺

-1060 · ATTCGTCTCG · CAAATTAGTC · GCAATCTGTG · CACTTAATTA · TTTTTTAGCC · TATATTTAAT ·
TCT-motif⁺

-1000 · ACTTCATACT · CCCTCCGTCC · CATAATATAA · GGGATTTTGA · GTTTTTATTT · GTACTGTTTG ·
TCT-motif⁺

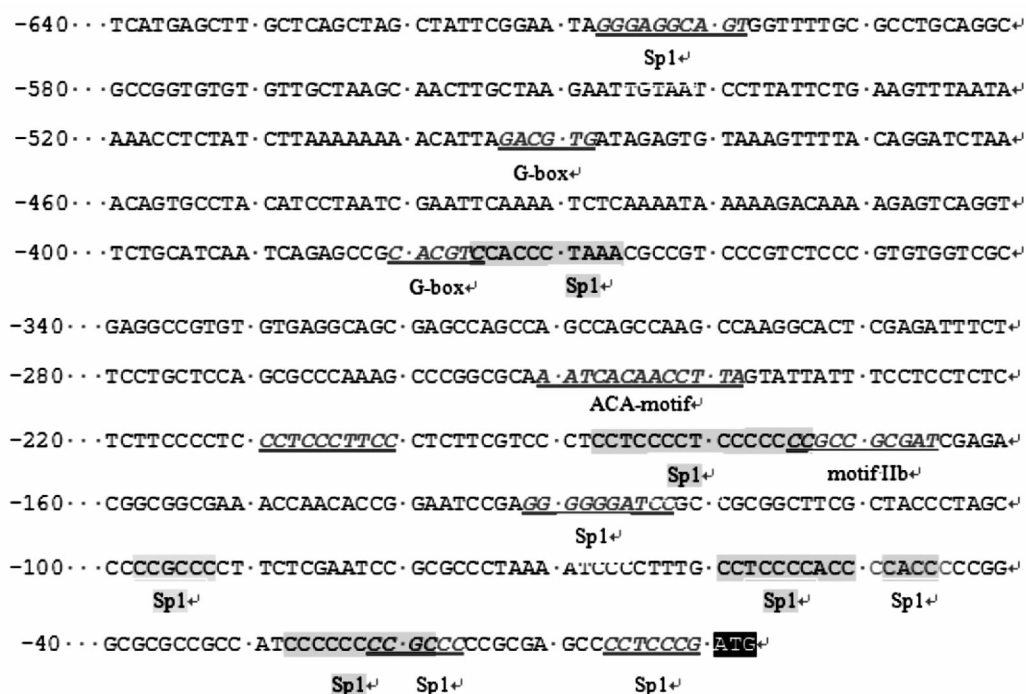
-940 · ACCGCTAGTC · ATATTCAAAAA · AAATTTGAAA · TTATTATTTA · TATTTTTTGT · GACTTACTTT ·
HSE⁺ Box 1⁺

-880 · ATTATCCAGA · GTACTTTAAG · TACA ACT TTT · CGGGTTTTAT · ATTTGCACAA · AATTTTTGAA ·
I-box⁺ LTR⁺

-820 · TAAGACGAGT · GATCAAACAG · TGCAAGTAAA · AACTCAAAT · CCCTTATATT · ATGGGATGGA ·
TCT-motif⁺

-760 · GGGAGTACAT · GTGTACAAAC · ATTAGACGTG · ACTGCGTGCT · GCTCTGAAG · CGAGAGCGGG ·
G-box⁺

-700 · TCTGCGTGCT · GCTCCTGAAG · CTCGCACGGC · TCTGATTCGC · AGGGGTGCTA · ATAAGGTGCT ·
TCT-motif⁺

图6 水稻 *OsPP6C* 启动子的生物信息学分析Fig. 6 Bioinformatics analysis of the *OsPP6C* promoter

ugent. be/webtools/plantcare/html/) 和 PLACE^[5] (http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html) 数据库,对选取的启动子序列(ATG上游2 500 bp)进行顺式作用元件分析。结果显示,除核心启动子成分(如TATA框)、上游启动子成分(如CAAT框等)和远端上游元件(增强子和沉默子等)以及参与胚乳、叶肉、维管和分生组织等特异表达的重要顺式作用元件外,*OsPP6C*启动子中还存在着10种光应答元件(ACA-基序、TCT-基序、GT1-基序、ACE、G-box、I-box、Box 1、Box 4、Sp1以及MRE等)、各种激素(包括ABA、乙烯、生长素、赤霉素以及茉莉酸甲酯等)应答元件(如motif IIb、ERE、AuxRR-core、GARE-motif和CGTCA-motif等)以及参与非生物胁迫(如低温、干旱和热胁迫等)应答的特殊顺式作用元件(图6),这些关键的调控元件对该基因的表达调控起重要作用。

3 讨论

蛋白磷酸酶6(PP6)是蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶PPP家族中的一个重要分支^[6],其蛋白结构与生化机制都和其他丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶明显不同,但都在光、非生物胁迫和植物激素信号转导中具有重要作用^[7]。高等植物PP6的催化亚基(即PP6C)参与脱落酸(ABA)信号途径,如*FyPP1*(光敏色素相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶1)和*FyPP3*这2个基因的缺失突变体对ABA敏感;相

反,*FyPP*的过表达导致ABA的敏感性降低^[3]。ABA是调控植物与病原物互作和植物生长发育以及应答干旱、高盐和极端温度等非生物胁迫的重要植物激素之一^[8-10]。

亮氨酸拉链转录因子ABI5,为ABA介导的种子萌发和萌发后幼苗生长过程中的关键调控因子之一^[3];已有研究表明,除ABI5外,含B3结构域的转录因子ABI3和APETAL2域转录因子ABI4也可调控LEA蛋白(Late embryogenesis abundant proteins)等的表达,进而控制种子的休眠或萌发^[11-12]。在侧根发育中,ABI4经抑制生长素输出载体PIN1的表达制约生长素的极性运输,生长素水平的降低最终阻碍了侧根的生长发育^[13]。最近的研究表明,*FyPP*蛋白能直接去磷酸化ABI5蛋白。此外,遗传和生化试验分析表明,*FyPP*蛋白与SnRK2激酶发生拮抗作用,进而调节ABI5的磷酸化和ABA应答。总之,拟南芥PP6通过去磷酸化ABI5,从而调控ABA信号途径^[3]。

本研究构建了水稻*OsPP6C*基因的过表达载体,为进一步研究其功能奠定了基础。生物信息学分析表明,*PP6C*基因分布于拟南芥和主要农作物(水稻、小麦、玉米、棉花和大豆等)中,这说明该基因均保守存在于包括双子叶和单子叶植物在内的陆地植物中;此外,该水稻*OsPP6C*基因启动子中含有多种光应答元件、各种激素(尤其是ABA)应答元件以及参与不同非生物胁迫的应答元件,表明其在植

物高光效和抗逆性基因工程育种中有着广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Cohen P T W. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life [J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22: 245 – 251.
- [2] Kim D H, Kang J G, Yang S S *et al.* A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2002, 14: 3043 – 3056.
- [3] Dai M, Xue Q, McCray T *et al.* The PP6 phosphatase regulates ABI5 phosphorylation and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell 2013, 25: 517 – 534.
- [4] Lescot M, Dhais P, Thijs G *et al.* PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences [J]. Nucleic Acids Res 2002, 30: 325 – 327.
- [5] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M *et al.* Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27: 297 – 300.
- [6] Shi Y. Serine/Threonine phosphatases: mechanism through structure [J]. Cell 2009, 139: 468 – 484.
- [7] Farkas I, Dombrádi V, Miskei M *et al.* *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine phosphatases [J]. Trends Plant Sci 2007, 12: 169 – 176.
- [8] Mauch-Mani B, Mauch F. The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions [J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8: 409 – 414.
- [9] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R *et al.* Abscisic acid: emergence of a core signaling network [J]. Annu Rev Plant Biol 2011, 61: 651 – 679.
- [10] Hauser F, Waadt R, Schroeder J I. Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms [J]. Curr Biol, 2011, 21: R346 – R355.
- [11] Holdsworth M J, Bentsink L, Soppe W J. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination [J]. New Phytol 2008, 179: 33 – 54.
- [12] Reeves W M, Lynch T J, Mobin R *et al.* Direct targets of the transcription factors ABA-insensitive (ABI) 4 and ABI5 reveal synergistic action by ABI4 and several bZIP ABA response factors [J]. Plant Mol Biol 2011, 75: 347 – 363.
- [13] Shkolnik-Inbar D, Bar-Zvi D. ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell 2010, 22: 3560 – 3573.