

曾 坚,谢雅倩,陈丽萍,等. 木薯 2C 型蛋白磷酸酶基因 *MePP2C55* 的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学,2022,50(8):73-78.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.08.014

木薯 2C 型蛋白磷酸酶基因 *MePP2C55* 的克隆及表达分析

曾 坚^{1,3}, 谢雅倩¹, 陈丽萍¹, 颜 彦², 胡 伟²

(1. 韶关学院英东生物与农业学院,广东韶关 512005; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海南海口 571101;
3. 韶关市芳香植物工程技术研究中心,广东韶关 512005)

摘要:2C 型蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2C, PP2C) 基因是 ABA 信号途径中主要组成部分,为分析其在木薯非生物胁迫和块根采后生理性变质(post-harvest physiological deterioration, PPD)中的作用,采用 RT-PCR 技术从木薯叶片(SC124)中克隆得到 *MePP2C55* 基因。对 *MePP2C55* 基因的理化性质、保守结构域、遗传进化关系、蛋白质结构预测及基因的启动子元件进行了预测和分析,并对 *MePP2C55* 基因在不同处理和 PPD 过程中的表达进行了分析。结果显示:(1) *MePP2C55* 基因全长 1 100 bp,编码 369 个氨基酸残基,蛋白相对分子量 40.7 ku,理论等电点为 7.57,含有 PP2C 的家族结构域。蛋白质序列分析显示, *MePP2C55* 与橡胶树和麻风树的 PP2C 最相似,分别为 88.80% 和 80.60%。 *MePP2C55* 和其他 PP2C 一样,在 C-端保守。这些结果均表明, *MePP2C55* 基因属于 PP2C 家族。(2) *MePP2C55* 基因在不同木薯组织中的表达均较高,在侧芽和叶柄中最高。(3) *MePP2C55* 基因属于 ABA 核心通路,所以启动子序列分析显示含有 10 个 ABRE(abscisic acid responsiveness)元件。 *MePP2C55* 基因能被 PEG 和 ABA 处理显著诱导,且在 PPD 过程中也能被显著诱导。从上述结果可推测, *MePP2C55* 基因具有提高植物应对非生物胁迫的潜力,同时也参与了 PPD 过程,为下一步研究该基因在木薯采后和抗逆中的功能提供了线索。

关键词:ABA; *MePP2C*; 非生物胁迫; 采后生理性变质; 表达分析

中图分类号: S533 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)08-0073-06

脱落酸(abscisic acid, ABA)是一种非常重要

的植物激素,它能够调控植物的生长发育,也是植物应对不同逆境的重要信号因子^[1]。ABA 信号可以提高植物在高渗、干旱和高盐等逆境中的生存能力。2C 类蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2C, PP2C)是 ABA 信号通路中重要的组成成分之一。在 ABA 信号转导过程中, PYR/PYL/RCAR 为 ABA 受体,通过接收上游的信号进行信息传递; SnRK2 属于信号通路正调控因子; PP2C 属于信号通路负调控因子。从而 ABA 受体、SnRK2 和 PP2C 共同组成

收稿日期:2021-07-01

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金(编号:2021A151011236);广东省教育厅青年创新人才项目(编号:2018KQNCX234);韶关学院重点项目(编号:SZ2018KJ05);广东省韶关市科技计划(编号:2019sn087);国家自然科学基金(编号:31901537);韶关学院博士启动项目(编号:99000615)。

作者简介:曾 坚(1987—),男,湖南岳阳人,博士,副教授,主要从事植物抗逆基因功能研究。E-mail: zengjian@sgu.edu.cn。

通信作者:胡 伟,博士,研究员,主要从事植物基因功能研究。E-mail: huwei2010916@126.com。

2302.

[6] Angelo J, Chollangi S, Müller - Späth T, et al. Virus clearance validation across continuous capture chromatography [J]. Biotechnol Bioeng, 2019, 116(9): 2275-2284.

[7] David L, Bayer M P, Lobedann M, et al. Simulation of continuous low pH viral inactivation inside a coiled flow inverter [J]. Biotechnol Bioeng, 2020, 117(4): 1048-1062.

[8] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2007: 237-258.

[9] Roush D J. Integrated viral clearance strategies - reflecting on the present, projecting to the future [J]. Curr Opin Biotechnol, 2018, 53: 137-143.

[10] 药品生产质量管理规范(2010 年修订)附录生物制品[S]. 北

京: 国家食品药品监督管理局, 2020.

[11] 杨红艳, 隋礼丽. 层析介质使用寿命缩小模型的建立和确认 [J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(6): 894-896.

[12] 王 聪, 张 军, 杜 研, 等. 亲和层析的介质寿命和清洗检测研究 [J]. 产业与科技论坛, 2021, 20(24): 48-49.

[13] 史清洪, 孙 彦. 适应高滴度抗体制备的抗体捕集纯化技术研究进展 [J]. 化工进展, 2019, 38(1): 576-585.

[14] Karlsson E, Hirsh I. Ion exchange chromatography [M]//Protein purification: principles, high resolution methods, and applications. New Jersey: John Wiley & Sons, 2011: 93-133.

[15] Miesegaes G R, Lute S, Strauss D M, et al. Monoclonal antibody capture and viral clearance by cation exchange chromatography [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(8): 2048-2058.

了 ABA 介导的信号通路^[2-4]。PP2C 属于蛋白磷酸酶中的 PPM 类,是一类活性依赖于 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 等离子且进化保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶^[5]。

PP2C 是高等植物体内广泛存在的蛋白磷酸酶,在植物中也是一个数量庞大的蛋白家族。它没有调节亚基,是一种单体酶。PP2C 蛋白的 C-端是保守的催化区域,N-端保守性很弱,能够结合不同的序列,所以 PP2C 的功能比较多样化。在植物中,目前总共发现了 6 种 PP2C 磷酸酶,如 ABI1、ABI2、ABI3、HAB2、AHG1 和 PP2CA/AHG3^[6]。到目前为止,水稻中找到 90 个 PP2C 基因^[7],拟南芥中找到 80 个,二穗短柄草中找到 86 个^[8]。PP2C 在植物中参与了不同信号途径的转导,在 ABA 信号转导途径中^[9],ABA 受体蛋白、SnRK2 与 PP2C 三者结合共同调控相关转录因子、干旱/低温胁迫和植物创伤/种子休眠/萌发等信号转导途径^[6]。在小麦中过表达 *Wcs120*(PP2C 基因)提高了植株的耐冷性^[10]。在拟南芥中,A 亚族的 PP2C 蛋白对 ABA 信号转导均具有负调控功能^[11-13]。玉米中 *ZmPP2C* 基因是干旱和盐胁迫反应中的负调控因子^[14]。在水稻中,A 亚族的 PP2C 蛋白成员能够不同程度地响应 ABA、低温、高盐等逆境胁迫^[15]。

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)是热带及亚热带地区广泛种植的作物,约有 8 亿人将木薯作为主粮^[16]。木薯主要在我国华南地区种植,种植面积约 50 万 hm^2 ,总产量不低于 100 亿 kg/年,总产值不低于 140 亿元/年,是华南地区一种重要的经济作物^[17]。木薯的淀粉含量高,具有很好的抗旱和耐贫瘠特性,可作为重要的绿色能源作物^[17-19]。但木薯采收后的块根容易出现“采后生理性变质(post-harvest physiological deterioration, PPD)”,因而存储期短,大大限制了木薯块根的大规模利用^[20-22]。目前,关于木薯中 *PP2C* 基因家族的研究还很少^[23]。因此,对木薯 *PP2C* 相关基因进行克隆和相关的表达分析,有利于分析 *PP2C* 基因在木薯抗逆过程和 PPD 过程中的表达调控,为研究其功能有重要意义。本试验通过克隆 *MePP2C55* 基因,对其编码蛋白序列进行生物信息学分析,同时对 *MePP2C55* 在干旱胁迫、ABA 处理和 PPD 过程中的表达模式进行了分析,为研究 *MePP2C55* 基因功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

木薯材料为中国热带农业科学院热带生物技

术研究所保存的木薯品种 SC124 (*Manihot esculenta* cv. SC124)。样品取自中国热带农业科学院热带生物技术研究所温室大棚,2020 年 4—10 月在中国热带农业科学院热带生物技术研究所完成试验。RNA 提取试剂和反转录试剂分别购自天根生化科技(北京)有限公司和 Fermentas 公司。生工生物工程(上海)股份有限公司合成 PCR 引物。

1.2 材料处理

木薯种茎切成合适长度(15 cm 左右)的茎秆小节,每个小节有 3~4 个芽点,分别种入盆中生长,盆中的土壤为蛭石:营养土=1:1(体积比)。取生长约 60 d 后生长状况一致的幼苗进行后续的试验处理。使用 200 mg/mL PEG-6000 模拟干旱,对照植株浇水,分别在 0、3、5、7 d 后收集相应处理时间植株的叶片(取植株的老叶、第 1 张完全展开叶和未展开叶混合为 1 个样品,共 5 个),叶片样品在液氮速冻后保存于 -80 ℃ 冰箱中;ABA 处理浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$,分别在 0、3、5、7 d 收集处理后植株的叶片,叶片样品液氮速冻后置于 -80 ℃ 冰箱中;木薯块根的生长期约为 10 个月,置于培养箱内进行暗培养(25 ℃、70% 相对湿度),在 0、6、12、48 h 收集相应处理时间后的块根,块根液氮速冻后置于 -80 ℃ 冰箱内保存(样品取 3 个重复)。

1.3 基因克隆

叶片 cDNA 模板通过反转录叶片 RNA 获得。根据 Phytozome 数据库中的木薯同源序列(Manes. 06G158800)设计引物(P1,5'-ATGAATCAACTCAC CGTCATCA-3';P2,5'-TTAAGAAATGCTGCCAAG TTTA-3'),以叶片 cDNA 为基因克隆模板进行 *MePP2C55* 克隆,扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序进行验证。

1.4 生物信息学分析

BLASTp 搜索 NCBI 中和 MePYL12 同源的蛋白质序列;理化性质使用 ExPASy ProtParam 进行计算和预测;蛋白的结构预测使用 SWISS-MODEL 和 SOPMA 等在线网站^[23];在线网站 Plantcare 进行基因的启动子元件分析(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>);保守结构域使用 NCBI-CDD 在线数据库预测;序列比对采用 DNAMAN6;进化树采用 NJ 法构建;引物设计使用软件 Primer 5.0。

1.5 基因的表达分析

上海美吉生物医药科技有限公司完成处理样品的 RNA 提取和建库,然后通过 Illumina GA II (美

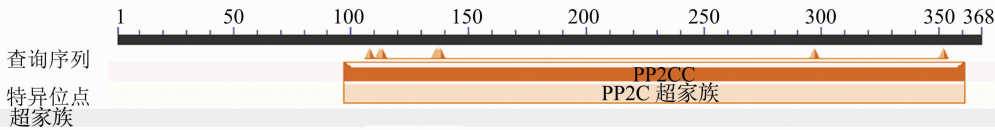


图3 MePP2C55 蛋白结构域分析

也显示,PP2C 蛋白氨基酸序列在进化上高度保守、高度相似,和橡胶树及麻风树的保守元件完全相同(图4)。*MePP2C55* 和 *HbPP2C*、*RcPP2C* 都属于大

戟科,这些结果表明,*MePP2C55* 基因属于 PP2C 家族。

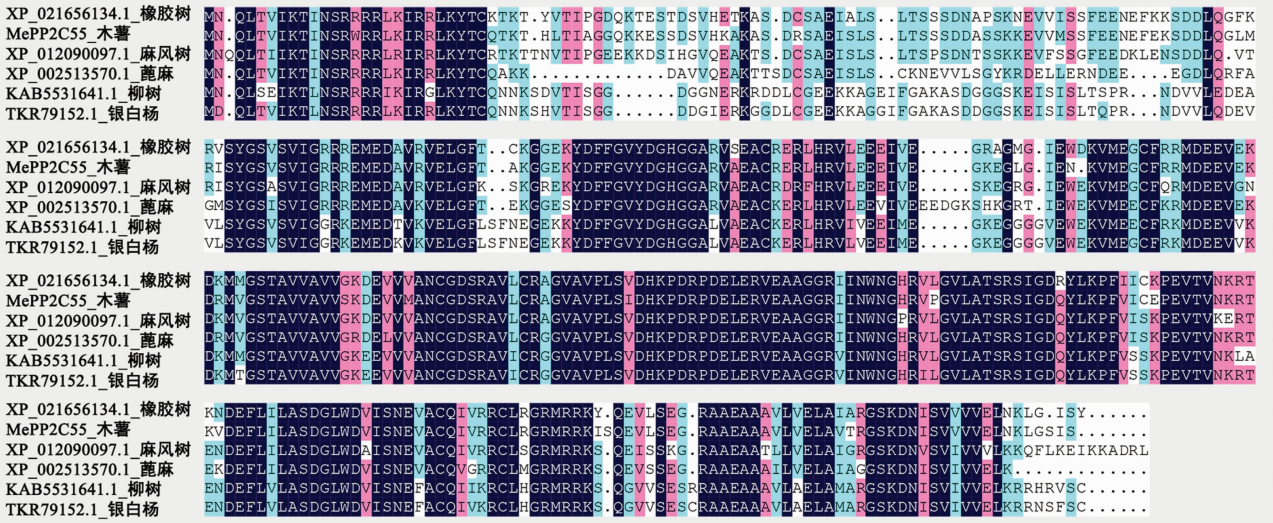


图4 MePP2C55 与其他植物 PP2C 蛋白的多序列比对分析

2.3 *MePP2C55* 基因的组织表达分析

以数据库 (shiny. danforthcenter. org/cassava_atlas/) 中的木薯组织表达数据来分析 *MePP2C55* 基因的组织表达差异。结果显示,*MePP2C55* 基因在不同组织中的表达都较高,在侧芽和叶柄中的表达最高(图5)。

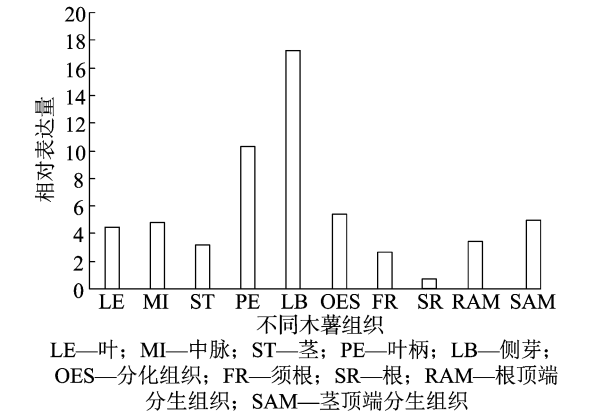


图5 *MePP2C55* 基因在不同木薯组织中的表达水平分析结果

2.4 *MePP2C55* 基因在不同处理条件下的表达分析

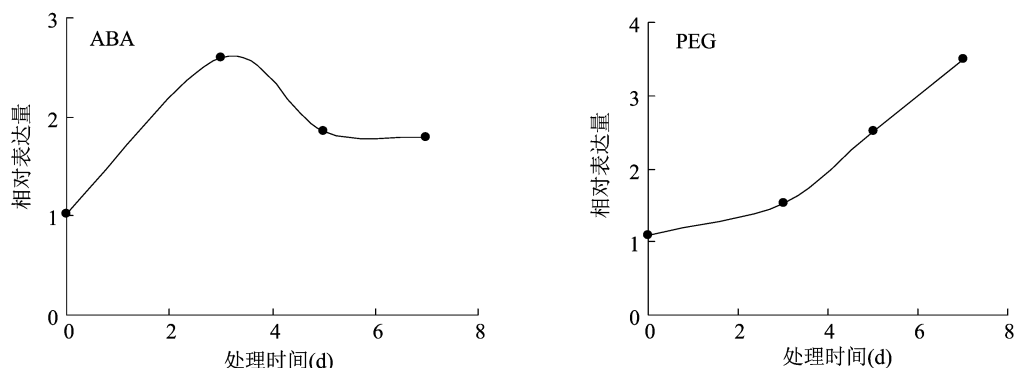
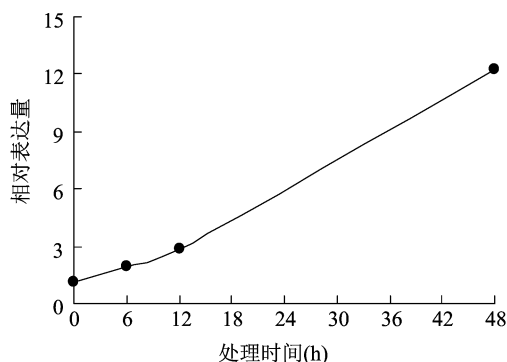
MePP2C55 基因属于 ABA 信号通路的核心组

分,所以启动子序列分析显示含有 10 个 ABRE (abscisic acid responsiveness) 元件。*MePP2C55* 基因都能被 PEG 和 ABA 处理显著诱导。*MePP2C55* 基因的相对表达量在 ABA 处理 3 d 后达到最高,为不处理时的 2.6 倍,随后慢慢下降到 1.8 倍;而在 PEG 处理中,*MePP2C55* 基因的相对表达量随着处理时间延长而不断增加,在 7 d 时达到最高,为不处理时的 3.5 倍(图6)。

MePP2C55 基因的相对表达量也和木薯块根的采后生理性变质过程密切相关。*MePP2C55* 基因的相对表达量随着采后时间增加不断提高,在采后 48 h 达到最大值,总共提高了 12.2 倍,表明 *MePP2C55* 基因的表达在该过程中明显受到诱导(图7)。

3 讨论与结论

PP2C 基因家族的数量在不同的植物物种中并不相同,而 PP2C 属于 ABA 信号途径的核心组成,因此研究 PP2C 的功能有助于阐述 ABA 信号通路。本研究克隆得到木薯 *MePP2C55* 基因,氨基酸残基

图6 *MePP2C55* 基因在不同处理下的表达图7 *MePP2C55* 基因在木薯块茎 PPD 过程中的表达分析

总数为 369 个,具有 PP2C 的家族结构域(图 4),序列比对分析显示,包含和其他 PP2C 基因类似的保守 C 末端催化结构域,它属于 A 类 PP2C^[25]。在亲缘关系上 *MePP2C55* 与橡胶树 *HbPP2C* 和及麻风树 *JcPP2C* 较近。这些结果都证明 *MePP2C55* 基因属于 PP2C 家族基因。

木薯是一种在热带被广泛种植的粮食和经济作物,具有粗生易长等特点^[26]。在木薯的生产实践中由于木薯块根在收获后极易出现 PPD 现象,从而导致其在工业生产中受到大大的限制^[20-22]。在果实的成熟和采后存储过程中,ABA 信号具有非常重要的作用,有研究表明 ABA 信号的传递对果实最终的存储品质和相应的采后相关生理指标具有显著影响^[27]。ABA 信号途径也是植物响应非生物逆境的重要信号通路,PP2C 是核心的组成成分^[28]。模式植物拟南芥中鉴定得到的 A 类 PP2C 基因都能对 ABA 信号进行负调控,其中多个基因和氧化胁迫相关,此外 *AHG3* 还参与抗冷胁迫^[11-13]。在小麦中分离得到的 PP2C 基因 *Wcs120* 也能够提高小麦的抗寒能力^[10]。苜蓿中的 PP2C 受到逆境胁迫的诱导^[29]。冰叶日中花克隆得到的 10 个 PP2C 类基因都响应非生物逆境的胁迫^[30]。玉米 PP2C 基因在高盐和干旱胁迫中属于负调控因子^[14],而山毛榉

(*Fagus longipetiolata* Seem.) 中的 PP2C2 则属于正调控因子^[31]。A 类 PP2C 基因在重要作物水稻中都可以在对非生物逆境如高盐、干旱和低温等逆境有不同的响应程度^[15]。木薯经过干旱和 ABA 处理后,*MePP2C55* 基因的表达明显受到诱导,在拟南芥中 A 类 PP2C 家族基因通常属于非生物逆境胁迫和 ABA 信号途径的负调控因子,但 *FsPP2C2* 基因的超表达能够提高植株耐受逆境胁迫的能力和对 ABA 信号的敏感性^[31],同时 *AtPP2CG1* 基因的超表达也能够提高植株对高盐的耐受及对 ABA 信号的敏感性^[32]。因此,*MePP2C55* 基因可能是木薯响应非生物胁迫和 ABA 信号的正调控因子。在 PPD 过程中 *MePP2C55* 基因的表达也显著受到诱导。例如,在拟南芥中超表达 *PdPP2C* 基因能够提高植株的对氧化胁迫的能力^[33]。在烟草中超表达 *ZmPP2C2* 基因能够提高植株中抗氧化酶的活性^[34]。*OsBiPP2C1* 也和细胞中的抗氧化酶活性密切相关^[35]。由此推测,*MePP2C55* 基因参与了木薯 PPD 的抗氧化过程。以上结果为下一步研究 *MePP2C55* 基因在延缓木薯 PPD 过程和提高非生物胁迫中的适应能力提供了参考。

参考文献:

- [1] Raghavendra A S, Gonugunta V K, Christmann A, et al. ABA perception and signalling[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15 (7): 395 - 401.
- [2] Krasensky J, Jonak C. Drought, salt, and temperature stress - induced metabolic rearrangements and regulatory networks[J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63 (4): 1593 - 1608.
- [3] Park S Y, Fung P, Nishimura N, et al. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins[J]. Science, 2009, 324 (5930): 1068 - 1071.
- [4] Ma Y E, Szostkiewicz I, Korte A, et al. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors[J]. Science, 2009, 324 (5930): 1064 - 1068.

- [5] Fuchs S, Grill E, Meskiene I, et al. Type 2C protein phosphatases in plants[J]. The FEBS Journal, 2013, 280(2): 681–693.
- [6] 张继红, 陶能国. 植物 PP2C 蛋白磷酸酶 ABA 信号转导及逆境胁迫调控机制研究进展[J]. 广西植物, 2015, 35(6): 935–941.
- [7] Xue T T, Wang D, Zhang S Z, et al. Genome – wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 550.
- [8] Cao J M, Jiang M, Li P, et al. Genome – wide identification and evolutionary analyses of the PP2C gene family with their expression profiling in response to multiple stresses in *Brachypodium distachyon* [J]. BMC Genomics, 2016, 17: 175.
- [9] Komatsu K, Nishikawa Y, Ohtsuka T, et al. Functional analyses of the ABI1 – related protein phosphatase type 2C reveal evolutionarily conserved regulation of abscisic acid signaling between *Arabidopsis* and the moss *Physcomitrella patens* [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 70(3): 327–340.
- [10] Mishra G, Zhang W H, Deng F, et al. A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis* [J]. Science, 2006, 312(5771): 264–266.
- [11] Meyer K, Leube M P, Grill E. A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana* [J]. Science, 1994, 264(5164): 1452–1455.
- [12] Saez A, Apostolova N, Gonzalez – Guzman M, et al. Gain – of – function and loss – of – function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling[J]. The Plant Journal, 2004, 37(3): 354–369.
- [13] Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, et al. ABA – hypersensitive germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed [J]. The Plant Journal, 2007, 50(6): 935–949.
- [14] Liu L X, Hu X L, Song J A, et al. Over – expression of a *Zea mays* L. protein phosphatase 2C gene (*ZmPP2C*) in *Arabidopsis thaliana* decreases tolerance to salt and drought[J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(5): 531–542.
- [15] Singh A, Giri J, Kapoor S, et al. Protein phosphatase complement in rice: genome – wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 435.
- [16] Liu S, Zainuddin I M, Vanderschuren H, et al. RNAi inhibition of feruloyl CoA 6′ – hydroxylase reduces scopoletin biosynthesis and post – harvest physiological deterioration in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage roots[J]. Plant Molecular Biology, 2017, 94(1/2): 185–195.
- [17] 张 鹏, 杨 俊, 周文智, 等. 能源木薯高淀粉抗逆分子育种研究进展与展望[J]. 生命科学, 2014, 26(5): 465–473.
- [18] Hu W, Kong H, Guo Y L, et al. Comparative physiological and transcriptomic analyses reveal the actions of melatonin in the delay of postharvest physiological deterioration of cassava[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 736.
- [19] 颜 彦, 铁韦韦, 丁泽红, 等. 木薯 *MePYL8* 基因克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(14): 4498–4504.
- [20] Xu J, Duan X G, Yang J, et al. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots [J]. Plant Physiology, 2013, 161(3): 1517–1528.
- [21] Zidenga T, Leyva – Guerrero E, Moon H, et al. Extending cassava root shelf life via reduction of reactive oxygen species production [J]. Plant Physiology, 2012, 159(4): 1396–1407.
- [22] 张振文, 李开绵. 木薯块根采后腐烂及贮藏方法研究进展[J]. 热带作物学报, 2012, 33(7): 1326–1331.
- [23] Zhao H, Wu C L, Yan Y, et al. Genomic analysis of the core components of ABA signaling reveals their possible role in abiotic stress response in cassava [J]. Environmental and Experimental Botany, 2019, 167: 103855.
- [24] 曾 坚, 廖凤凤, 吴春来, 等. 木薯 *MeHSF7* 基因克隆及表达分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(6): 1256–1264.
- [25] Li W Q, Wang L, Sheng X L, et al. Molecular basis for the selective and ABA – independent inhibition of PP2CA by PYL13 [J]. Cell Research, 2013, 23(12): 1369–1379.
- [26] 罗兴录, 吴美艳, 陶 林. 木薯不同时期施钾对淀粉合成关键酶活性和淀粉积累的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(16): 115–119.
- [27] 杨方威, 段懿菲, 冯叙桥. 脱落酸的生物合成及对水果成熟的调控研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(3): 266–272.
- [28] Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(5): 236–243.
- [29] Millward T A, Zolnierowicz S, Hemmings B A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1999, 24(5): 186–191.
- [30] Miyazaki S, Koga R, Bohnert H J, et al. Tissue – and environmental response – specific expression of 10 PP2C transcripts in *Mesembryanthemum crystallinum* [J]. Molecular & General Genetics, 1999, 261(2): 307–316.
- [31] Reyes D, Rodríguez D, González – García M P, et al. Overexpression of a protein phosphatase 2C from beech seeds in *Arabidopsis* shows phenotypes related to abscisic acid responses and gibberellin biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2006, 141(4): 1414–1424.
- [32] 叶兴国. 新模式植物短柄草模式特性研究进展[J]. 作物学报, 2008, 34(6): 919–925.
- [33] 郭 鹏, 张士刚, 邢 鑫, 等. 欧美杨 *PdPP2C* 基因的克隆与功能分析[J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(2): 100–106.
- [34] 萧蓓蕾, 李冬梅, 刘丽霞. 水分胁迫对转 *ZmPP2C2* 基因烟草膜脂过氧化及抗氧化酶活性的影响[J]. 河南农业科学, 2010, 39(11): 36–39.
- [35] 倪 岚. OsBiPP2C1 和 OsDMI3 调节 ABA 诱导的抗氧化防护的机制研究. [D]. 南京: 南京农业大学, 2014.