

铁皮石斛蛋白磷酸酶 DoPP2C1 基因的克隆与表达分析

张娜¹, 刘亮亮^{1,2}, 李欢¹, 黑小斌¹, 白庆庆¹, 郑丽¹, 郭顺星^{2*}, 张岗^{1,2*}

1. 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

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: 目的 克隆珍稀濒危兰科药用植物铁皮石斛蛋白磷酸酶 (protein phosphatase, PP) DoPP2C1 基因, 并进行生物信息学和表达模式分析。方法 采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 和 RACE 技术获基因全长; 利用生物信息学软件预测蛋白的理化性质、结构域和亚细胞定位等分子特性; 用 DNASTAR 7.0 和 MEGA 6.0 分别进行氨基酸多序列比对和进化关系分析; 借助 qRT-PCR 检测基因表达模式。结果 分离到 DoPP2C1 基因 (GenBank 注册号 KJ995533), cDNA 全长 1 221 bp, 编码 1 条由 285 个氨基酸组成的多肽, 相对分子质量 31 080, 等电点 6.18; 推定的 DoPP2C1 氨基酸序列具有植物 PP2C 蛋白家族保守的 1 个 PP2C 结构域 (27-285); 该蛋白预测无信号肽或跨膜域, 定位在细胞质; DoPP2C1 蛋白与多种植物 PP2C 蛋白一致性较高 (56.3%~73.7%), 与水稻 OsPP2C62、高粱 XP_002462907、大麦 BAK00362 和乌拉尔图小麦 EMS47641 蛋白等亲缘关系近, 聚在 PP2C 分子进化树的 F1 分支; DoPP2C1 基因具有组织表达特异性, 其转录本在石斛根和茎中表达量较高, 分别为叶中的 7.57 倍和 1.79 倍。结论 获得 DoPP2C1 基因分子特征, 为深入研究该基因在铁皮石斛生长发育、逆境生理以及次级代谢调控中的生物学功能奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; 蛋白磷酸酶; 生物信息学分析; 实时定量 PCR; DoPP2C1 基因

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)07-1661-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.026

Cloning and expression analysis on a protein phosphatase encoding gene DoPP2C1 in *Dendrobium officinale*

ZHANG Na¹, LIU Liang-liang^{1,2}, LI Huan¹, HEI Xiao-bin¹, BAI Qing-qing¹, ZHENG Li¹, GUO Shun-xing², ZHANG Gang^{1,2}

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

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To isolate and characterize a protein phosphatase (PP) encoding gene DoPP2C1 in a rare endangered medicinal orchid species *Dendrobium officinale*, followed by bioinformatics analysis and expression pattern detection. **Methods** qRT-PCR and RACE technologies were used to isolate the full length cDNA of DoPP2C1. Characteristics of physiochemical properties, conserved domains, and subcellular localization of DoPP2C1 protein were determined using a series of bioinformatics tools. The analyses of multiple alignment and phylogenetic tree were performed using DNASTAR 7.0 and MEGA 6.0 softwares, respectively. Quantitative PCR was used for gene expression analysis. **Results** The full length cDNA of DoPP2C1 (GenBank accession KJ995533) was 1 221 bp in length, and encoded a 285-aa protein with a molecular weight of 31 080 and an isoelectric point of 6.18; The deduced DoPP2C1 protein had one PP2C domain (27-285), which are all conserved among the PP2C proteins. DoPP2C1 protein did not contain a signal peptide or a transmembrane region, and was predicted to locate in cytoplasm; DoPP2C1 had high identities (56.3%—73.7%) with various PP2C proteins in plants; DoPP2C1 was closely related to *Oryza sativa* OsPP2C62, *Sorghum bicolor* XP_002462907, *Hordeum*

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费 (2017-I2M-3-013); 陕西省普通高校青年杰出人才支持计划项目; 咸阳市中青年科技创新领军人才项目

作者简介: 张娜, 女, 硕士生, 研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: 2510403058@qq.com

*通信作者 张岗, 男, 博士, 教授, 研究方向为中药资源与分子生药学。E-mail: jay_gumling2003@aliyun.com

郭顺星, 男, 博士, 研究员, 研究方向为药用植物菌根生物学研究。Tel/Fax: (010)62829619 E-mail: sxguo1986@163.com

vulgare BAK00362 and *Triticum urartu* EMS47641 proteins, and belonged to the Group F1 of the PP2C evolutionary tree; DoPP2C1 gene was differentially expressed in the three included organs. The transcripts were more abundant in the roots and stems, with 7.57 and 1.79 fold, respectively, over that in the leaves. **Conclusion** Molecular characterization of DoPP2C1 gene was obtained, which will be useful for further functional determination of the gene involving in the growth and development, physiological stress adaptations, and secondary metabolic regulations of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; protein phosphatases; bioinformatics analysis; qRT-PCR; DoPP2C1 gene

蛋白激酶和蛋白磷酸酶 (protein phosphatase, PP) 是真核生物体蛋白质可逆磷酸化的关键调控酶, 在植物体的信号转导途径和生理代谢过程中起重要调节作用^[1]。根据底物种类, PP 可分为丝氨酸/苏氨酸磷酸酶、酪氨酸磷酸酶和双特异性蛋白磷酸酶 3 类^[2]。生物体内含量丰富的蛋白磷酸酶 1 (PP1) 和蛋白磷酸酶 2 (PP2) 均属于丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶^[3], 其中最主要的为蛋白磷酸酶 2C (PP2C)。PP2C 无调控亚基, 是一种单体酶^[4], 其活性依赖于 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} , C 端有保守的催化结构域, N 端具有功能不同且长度各异的延伸区, 赋予其不同的调控功能^[5]。

PP2Cs 是生物体内普遍存在的一类多功能、多成员的 PP。高等植物 PP2Cs 主要参与胁迫反应, 是脱落酸 (ABA) 信号传递过程中的关键负调节因子^[6]。目前, 已从拟南芥中鉴定发现的 A 亚族 PP2C 类蛋白 ABI1、ABI2、HAB1、HAB2、AHG1 及 AHG3/AtPP2CA 等对 ABA 信号转导均具有负调控功能^[7-9]。AHG3 除调控植物冷胁迫时 ABA 的应答外, 还参与了低温信号传导及冷诱导相关基因的表达^[10]。ZmPP2C 基因是干旱和盐胁迫反应中的负调控因子^[11]。相反, 山毛榉 *Fagus longipetiolata* Seem. FsPP2C2 对 ABA 信号通路起正调控作用^[12]。水稻 *Oryza sativa* L. PP2C A 亚族成员能够不同程度地响应 ABA、低温、高盐等逆境胁迫^[13]。

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 是多年生草本药用植物, 为石斛属植物中最为珍稀名贵的种, 其药用部位为新鲜或干燥茎, 味甘, 微寒; 归胃、肾经, 具有益胃生津、滋阴清热的作用^[14]。研究表明, 石斛属植物主要含有多糖、萜类、酚类、木脂素类等活性成分, 具有抗衰老、抗肿瘤、降低血糖和提高免疫等药理作用, 而石斛多糖是其能发挥这些药理作用的主要成分, 因而也是石斛类药材质量鉴定的主要标准之一^[15]。PP2C 基因可能在铁皮石斛逆境生理、生长发育或次级代谢调控中起重要作用。目前还未见铁皮石斛 PP2C 基因克隆与表达的研究报道, 鉴定石斛 PP2C 基因并最终阐明其分子作用更为迫切。前期研究利用 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 715 bp 的 EST, BLASTx 分析显示其与小兰屿蝴蝶兰 *Phalaenopsis equestris* L. 一致性高达 96%。本研究利用实时定量 PCR (qRT-PCR) 和 RACE 技术从铁皮石斛中分离到一个 PP2C 基因 cDNA 全长 DoPP2C1, 并进行生物信息学及表达模式分析, 为进一步揭示其生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生铁皮石斛植物材料采自云南西双版纳, 由中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所郭顺星研究员鉴定为兰科石斛属铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo。取石斛根、茎、叶组织样品, 液氮速冻后置 -80°C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取和 cDNA 合成 按照 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司) 操作说明制备各样品总 RNA, NanoDrop™ 2000 分光光度计 (Thermo Fisher 公司, 美国) 分析 RNA 质量、纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测完整性。使用 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega 公司, 美国) 反转录合成 cDNA 第一链, -20°C 保存备用。

1.2.2 RACE 与 qRT-PCR 验证 序列分析表明, 原始 EST 编码一段由 130 个氨基酸残基组成的 PP2C 肽链, 羧基端完整, 因此仅需要进行 5'-RACE 反应。根据原 EST 设计一条引物, 按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司, 日本) 说明书进行巢式 5'-RACE 扩增。5'-RACE 引物为: PP2C1-R 5'-AATGCACAGAAACAGCACACAATC-TAC-3'。用 2 μg 总 RNA 合成 5'-RACE ready cDNA, 稀释 10 倍, -20°C 保存备用。

以 PP2C1-R 与 UPM 组合, 使用 Program 1 程序进行 5'-RACE。反应体系: 10 $\times$ Advantage® 2 PCR buffer 2.5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , PP2C1-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , UPM (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 5'-RACE ready cDNA 1.0 μL , 50 $\times$ Advantage® 2

Polymerase Mix(5 U/ μ L)0.5 μ L, 补 ddH₂O 至 25 μ L。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C、3 min, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、2 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C、7 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。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, 连接至 pMD18-T vector (Takara, 中国), 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 随机挑选 3 个克隆并送上海生物工程技术有限公司测序。与原始 EST 序列拼接分析后, 设计并合成跨开放阅读框 (open reading frame, ORF) 引物 DoPP2C1-orf-FP: 5'-CTGGTTA GAAAATGATGGGA-3' 和 DoPP2C1-orf-RP 5'-CTC ACTGCTCCAAACAAAAT-3', 进行全长基因的 RT-PCR 验证。

1.2.3 生物信息学分析 使用网络在线工具进行 DoPP2C1 基因及编码蛋白的生物信息学分析。利用 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 和 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 分析 cDNA 序列; 用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 和 PROSITE (<http://prosite.expasy.org/>) 分析蛋白质结构域和基元; ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 和 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopma.pl) 分析蛋白质理化性质和二级结构; 采用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行蛋白质三维建模分析; ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale>) 分析蛋白的亲水性/疏水性; SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 预测蛋白跨膜域。PSORT (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html>) 进行亚细胞定位分析。用 DNASTAR 7.0 和 MEGA 6.0 分别进行蛋白氨基酸序列比对和进化树构建分析。

1.2.4 qRT-PCR 分析组织表达特异性 分别用 2 μ g 根、茎、叶样品总 RNA 反转录合成 cDNA, EF1 α 作为内参基因^[14], qPCR 分析基因的组织表达模式。qRT-PCR 引物 DoPP2C1-qRT-S: 5'-GGATTGTGTGCTGTTTCTGTGC-3' 和 DoPP2C1-qRT-RT-AS: 5'-TTCCTTCCGTAAATTTTTTCTCTC-3' 的扩增产物长 320 bp。用 ABI PRISM 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, USA) 进行 qRT-PCR。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) 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 程序: 95 $^{\circ}$ C、30 s, 95 $^{\circ}$ C、10 s, 60 $^{\circ}$ C、45 s, 40 个循环, 反应结束绘制熔解曲线。根据 ABI PRISM 7500 SDS 软件生成的循环阈值 (CT), 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 方法^[17] 计算基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 DoPP2C1 基因的克隆分析

5'-RACE 产生长度约 1.0 kb 的目标条带, 克隆、测序获得 1 011 bp 的序列, 与原 EST 拼接得到 1 条 1 221 bp 的 cDNA, BLASTx 分析显示其与 GenBank 已注册植物 PP2C 基因一致性为 61%~75%。使用 DoPP2C1-orf-FP/orf-RP 引物, qRT-PCR 扩增产生单一条带 (图 1), 克隆分析获得 994 bp 的序列, 包含完整的 ORF, 与拼接序列一致, 进而验证已成功获得基因 cDNA 全长, 命名为 DoPP2C1, 提交 GenBank 获得注册号 KJ995533。根据基因全长及其编码的氨基酸序列, DoPP2C1 ORF 长 858 bp, 5'-UTR 长 45 bp, 3'-UTR 长 318 bp, 3'-UTR 包含加尾信号 "AATAA" 和真核生物特有的 polyA 尾巴结构, 起始密码子附近序列 AAAATGA 符合 Kozak 规则^[18]。

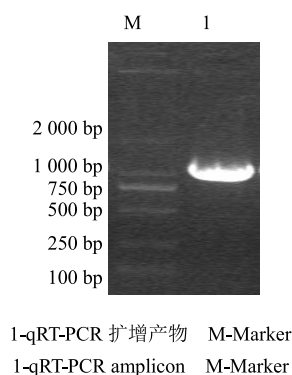


图 1 DoPP2C1 基因扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Cloning of a full length DoPP2C1 gene in *D. officinale*

2.2 DoPP2C1 蛋白的理化特性

ProtParam 预测 DoPP2C1 蛋白分子式为 C₁₃₇₁H₂₂₁₂N₃₇₆O₄₂₅S₁₀, 285 个氨基酸, Lys 最多, 为 30 个 (10.5%), 其次是 Asp 和 Leu, 分别为 26 (9.1%) 和 25 个 (8.8%), Gly 和 Ser 均为 24 个 (8.4%), 其他氨基酸数目在 7.4%~0.4%, 如 Phe 为 9 个 (3.2%), Trp 仅 1 个, 占 0.4%。DoPP2C1 蛋白等电点 (pI) 为 6.18, 相对分子质量为 31 080, 正电残基 (Arg+Lys) 为 38, 负电残基 (Asp+Glu) 为 43, 不稳定系数为 39.85, 脂肪系数为 89.30, 亲水性系数为 -0.307。ProtScale 分析 (图 2) 显示, DoPP2C1 蛋白氨基酸疏水性最大值为

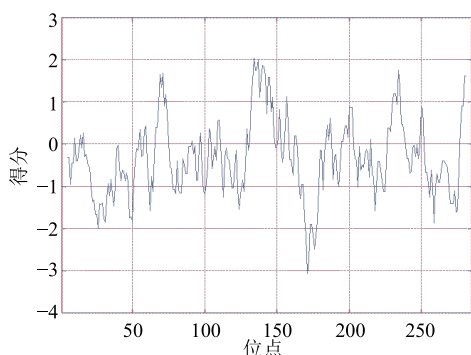


图 2 ProtScale 分析 DoPP2C1 蛋白的亲/疏水性

Fig. 2 Hydropathicity and hydrophobicity of DoPP2C1 using ProtScale analysis

2.044, 亲水性最高值为-3.067, 在较多位置上表现出亲水性, 是一个亲水性蛋白。

2.3 DoPP2C1 蛋白的结构域、二级结构和三维建模分析

InterProscan 分析显示 DoPP2C1 蛋白含有蛋白磷酸酶 2C 保守结构域 (27~285)。PROSITE SCAN 分析表明蛋白包括 1 个 cGMP 依赖性蛋白磷酸激酶位点 (34~37)、3 个 N-酰化位点 (15~20、128~133、181~186)、3 个酪蛋白激酶 II 位点 (19~22、243~246、273~276)、3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (24~26、32~34、208~210) 以及 1 个酰胺化位点 (32~35)。

SOPMA 预测结果显示, DoPP2C1 蛋白二级结构共有 α 螺旋 (alpha helix, 37.89%) 108 处、随机卷曲 (random coil, 31.93%) 91 处、延伸链 (extended strand, 21.75%) 62 处以及 β 转角 (beta turn, 8.42%) 24 处; α 螺旋和随机卷曲为二级结构的主要元件, 分散于整个蛋白质中。

在 SWISS-MODEL 依据保守结构域作图工具中, 以蛋白质数据库中已提交的拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh AtPP2C16 蛋白 (PDB No.3NMT.1) B 链晶体分子^[19]为模板, 对 DoPP2C1 蛋白进行三维建模 (图 3), 结果显示 DoPP2C1 与

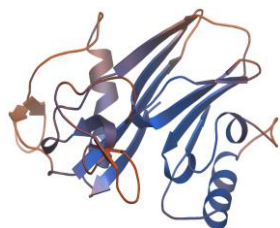


图 3 基于 SWISS-MODEL 的 DoPP2C1 蛋白三维建模

Fig. 3 Three-dimensional structure of DoPP2C1 protein using SWISS-MODEL

该蛋白有 47.17% 的序列相似性, 空间结构类似。

2.4 DoPP2C1 蛋白信号肽、跨膜域和亚细胞定位预测分析

SignalP 4.0 软件分析发现, Y-score 曲线无峰值, S-score=0.112, 说明 DoPP2C1 蛋白不存在含信号肽序列; D-score=0.111<0.45, 说明其为非分泌型蛋白。TMHMM 预测分析 DoPP2C1 蛋白无跨膜域, 说明 DoPP2C1 蛋白不是一个膜蛋白。PSORT 预测 DoPP2C1 蛋白定位于细胞质的可能性较高为 45%, 存在于微体 (过氧化物酶体) 的几率为 30%, 定位于线粒体基质和叶绿体内囊体膜的可能性均为 10%。

2.5 DoPP2C1 和植物 PP2C 蛋白的多序列对比

运用 DNASTar 7.0 中的 MegAlign 对 DoPP2C1 蛋白和已知植物 PP2C 蛋白进行多序列比对。图 4 结果表明, DoPP2C1 与水稻 OsPP2C62、大麦 *Hordeum vulgare* L. BAK00362、黑杨 *Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray XP_002316888、葡萄 *Vitis vinifera* L. XP_002272848 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. AtPP2C39 等蛋白的一致性分别为 73.7%、73.3%、72.3%、56.4%、56.3%。

2.6 DoPP2C1 与植物 PP2C 蛋白的进化关系

根据水稻和拟南芥 PP2C 蛋白家族进化树^[20], 下载代表性植物的 PP2C 蛋白序列, 用 MEGA 6.0 邻接法构建 DoPP2C1 系统进化树。图 5 结果显示, 20 个蛋白被聚成 PP2C 蛋白家族 13 个大类中 F1 和 F2 类群, DoPP2C1 所在 F1 类群包含水稻 OsPP2C41/62/63、拟南芥 AtPP2C9/10/17/20/39/62、葡萄 XP_002272848、黑杨 XP_002316888、克莱门柚 *Citrus clementine* Hort. XP_006447256、蓖麻 *Ricinus communis* Linn. XP_002517876、高粱 *Sorghum bicolor* (L.) Moench XP_002462907、大麦 BAK00362 和乌拉尔图小麦 *Triticum urartu* Thumanian ex Gandilyan EMS47641; DoPP2C1 与乌拉尔图小麦、大麦、高粱和水稻等单子叶植物 PP2C 蛋白的亲缘关系较近, 聚成一小分支。

2.7 DoPP2C1 组织表达特异性分析

分别提取石斛根、茎、叶等样品总 RNA, 利用 qRT-PCR 技术检测 DoPP2C1 基因的组织表达模式。图 6 结果表明, DoPP2C1 基因在 3 种器官中为组成型表达, 但相对表达量存在差异。以叶为校正样本, 该基因转录本在石斛根中的表达量较高, 茎中次之, 分别为叶中的 7.57 倍和 1.79 倍。



图 4 DoPP2C1 蛋白与多种植物 PP2C 蛋白的多序列比对

Fig. 4 Multiple sequence alignment of DoPP2C1 and PP2C proteins from other plants

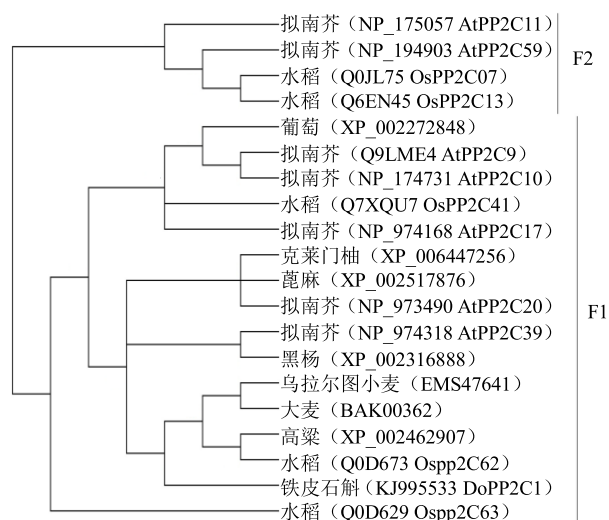


图 5 DoPP2C1 蛋白与多种植物 PP2C 蛋白的进化树分析
Fig. 5 Phylogenetic tree of DoPP2C1 with some PP2C proteins from three plants

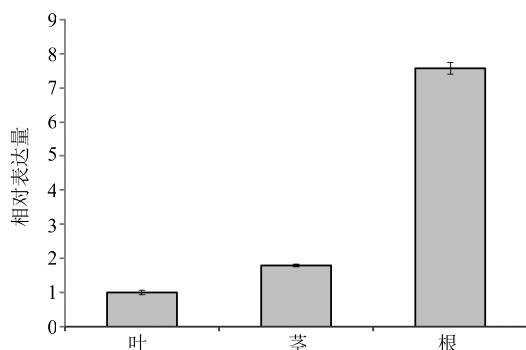


图 6 qRT-PCR 分析 DoPP2C1 基因的组织表达
Fig. 6 Tissue-specific expression pattern of DoPP2C1 gene using qRT-PCR analysis

3 讨论

PP2Cs 在植物生长发育和多种环境胁迫调控中具有极其重要的作用。对水稻、拟南芥等模式植物的系统研究表明, PP2Cs 属于多基因家族, 拟南芥和水稻中分别有 80 和 90 个成员, 这些基因成员参与协同调控植物多种生命活动过程, 例如 ABA 信号转导的负调控作用^[12]。基因家族庞大及其不同植物个体生理差异使得 PP2C 的分子作用及网络非常复杂。当前, 植物 PP2C 基因的鉴定、结构及功能研究结果非常有限。PP2C 蛋白通常包含 2 个保守区域, 一个是具有 6 个 α 螺旋和 11 个 β 折叠的催化区域, 另一个是含有 3 个 α 螺旋的 90 个氨基酸左右的 C 末端^[21], 而决定 PP2C 底物特异性的可能是 C 末端的 3 个反向平行 α 螺旋。本研究利用 RACE 克隆 DoPP2C1 基因, 编码蛋白含有 1 个 PP2C 保守结构域, 二级结构含 α 螺旋 108 处; PSORT 预测 DoPP2C1 蛋白定位于细胞质, 结合跨域分析结果, 说明该蛋白不是膜蛋白; DoPP2C1 属于植物 PP2C 蛋白进化树的 F1 分支, 与单子叶植物 PP2C 聚类在一起, 符合进化关系; 这些特征均与植物 PP2C 蛋白特征相似。这些结果说明 DoPP2C1 是新鉴定的铁皮石斛蛋白磷酸激酶 2C 基因。

PP2C 家族基因的分子表达特性差异与其所调控的植物生理代谢过程关系密切。LjPP2C 在百脉根叶、根、茎、接种的根瘤菌中均有表达, 但主要在叶和根中表达, 且叶中表达量最高^[22]。PdPP2C 基因在欧美杨不同组织, 即顶端叶、成熟叶、根、茎均有表达, 且在根中表达量最高^[23]。说明这些基因属于组织型表达, 且功能存在明显差异。PP2C 基

因除了具有组织表达特异性之外,还能响应各种生物与非生物胁迫,主要通过 ABA 激素信号转导途径,诱导或抑制目标基因表达,从而参与植物各种生理过程^[10]。本研究 qRT-PCR 分析表明,DoPP2C1 相对表达量有显著性差异,依次为根>茎>叶,说明该基因通过特异的分子表达机制参与植物组织的生长发育。DoPP2C1 在根中的高表达特征暗示其很可能在石斛根中具有重要的作用。

铁皮石斛具有较高的经济价值和突出的临床疗效,是我国目前中医药界研究者关注的热点,由于其生长条件特殊,对环境依赖性较强,且存在与真菌共生现象,使得铁皮石斛的研究变得极其重要,也极具挑战性。分子生物学基础研究又相对薄弱,限制了石斛资源的可持续控制。PP2C 在植物各项生命活动中发挥重要作用,基因家族成员数目众多,生物学功能多样而复杂。挖掘铁皮石斛 PP2C 家族成员并进行功能分析,将为石斛品质形成的分子机制提供基础资料。本研究后续将进一步研究 DoPP2C1 蛋白生化功能,鉴定 PP2C 家族其他成员,为通过遗传工程手段改良铁皮石斛种质提供理论支撑。

参考文献

- [1] Shinozaki K, Yamaguchi S K. Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3(3): 217-223.
- [2] Luan S. Protein phosphatases in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54(54): 63-92.
- [3] Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases [J]. *Annual Review Biochem*, 1989, 58: 453-508.
- [4] Fuchs S, Grill E, Meskiene I, et al. Type 2C protein phosphatases in plants [J]. *FEBS J*, 2013, 280(2): 681-693.
- [5] Carrasco J L, Ancillo G, Mayda E, et al. A novel transcription factor involved in plant defense endowed with protein phosphatase activity [J]. *EMBO J*, 2003, 22(13): 3376-3384.
- [6] Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. Plant PP2C phosphatase: Emerging function in stress signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(5): 236-243.
- [7] 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.
- [8] 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]. *Plant J*, 2004, 37(3): 354-369.
- [9] 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]. *Plant J*, 2007, 50(6): 935-949.
- [10] Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, et al. ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(12): 1473-1483.
- [11] Liu L X, Hu X L, Song J, et al. Over-expression of a *Zea mays* L. protein phosphatase 2C gene (*ZmPP2C*) in *Arabidopsis thaliana* decreases tolerance to salt and drought [J]. *Plant Physiol*, 2009, 166(5): 531-542.
- [12] Reyes D, Rodríguez D, González-García M, 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 Physiol*, 2006, 141(4): 1414-1424.
- [13] 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: 435-440.
- [14] 张 岗, 刘思思, 杨新杰, 等. 一个全新的铁皮石斛 *DoSWEET1* 基因的分子克隆与特性分析 [J]. *药学报*, 2016, 51(6): 991-997.
- [15] 陈晓梅, 王春兰, 杨俊山, 等. 铁皮石斛化学成分及其分析的研究进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(19): 1634-1640.
- [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] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acid Res*, 2001, 29(9): e45.
- [18] Kozak M. An analysis of 50-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(20): 8125-8132.
- [19] Melcher K, Xu Y, Ng L M, et al. Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 1102-1108.
- [20] 薛彤彤. 棉花金属硫蛋白基因 *GhMT3a* 的功能分析及拟南芥与水稻蛋白磷酸酶 *PP2C* 基因家族分析 [D]. 济南: 山东农业大学, 2009.
- [21] Jin F, Ji C N, Liu L F, et al. Molecular cloning and characterization of a novel human protein phosphatase 2C cDNA (*PP2Ce*) [J]. *Mol Biol Rep*, 2004, 31(3): 179-202.
- [22] 官晓敏. 百脉根 LjPP2C 蛋白磷酸酶负调控 MPK6 信号转导途径 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [23] 郭 鹏, 张士刚, 邢 鑫. 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.