

本氏烟PP2A亚基基因的表达模式和克隆

陈孝仁*, 黄沈鑫, 张焯, 李艳朋, 车通, 纪兆林

扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州225009

摘要: 蛋白磷酸酶2A (protein phosphatase 2A, PP2A)由结构亚基A、催化亚基C和调节亚基B组成, 控制生物体内多种生命代谢过程, 但目前尚不清楚其在植物抗病中的作用。本研究利用拟南芥、普通烟草、番茄和水稻PP2A的亚基序列, 比对分析获得本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)中对应的亚基序列。利用实时定量RT-PCR技术, 分析了6个亚基基因在辣椒疫霉侵染本氏烟阶段(灌根后8、24、72 h)以及2个结构亚基基因在本氏烟不同组织部位(根、茎、叶、花和种子)中的转录水平。结果发现, 在病原物侵染时, 多数基因均显著上调表达, *NbPP2Ac-4*在侵染阶段的表达量显著高于其他基因; 2个结构亚基基因(*NbPP2Aa-1*和*NbPP2Aa-2*)在茎、叶、花和种子中的表达量均显著高于在根部中的表达量。克隆获得本氏烟和辣椒中2个结构亚基基因的全长cDNA序列, 它们的二级结构主要为 α 和 η 螺旋, 含有保守的功能域, 与其他植物和人的结构亚基具有很高的同源性。

关键词: 蛋白磷酸酶2A; 植物抗病性; 转录水平; 功能域; 辣椒疫霉

蛋白磷酸化和去磷酸化是生物体内普遍存在的调节不同生物学功能的一种机制(Hunter 1995)。蛋白磷酸酶2A (protein phosphatase 2A, PP2A)是真核生物体内一种主要的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶, 是由催化亚基C、结构亚基A和多种功能特异的调节亚基B组成的异源三聚体全酶复合物。PP2A是真核生物压力信号调控中的一个关键元件, 调节生物的细胞分化和发育过程。在动物和酵母中, PP2A在多条信号途径中发挥作用, 如参与调节细胞周期、细胞凋亡、DNA复制、细胞分化和细胞恶性转化等多种代谢过程, 并与肿瘤等多种疾病的发生有关(薛娴靖和刘晓晴2009)。然而, 对PP2A在植物信号途径中的作用知之甚少, 目前发现其主要参与脱落酸、植物生长素和乙烯等激素的信号转导(Kwak等2002; Muday等2006; Michniewicz等2007; Pernas等2007)。

现有的PP2A形成模型表明, 结构保守的C亚基和同样结构保守的A亚基首先结合形成AC二聚体, 然后再与高度变异的B亚基形成PP2A全酶复合物(Janssens和Goris 2001)。由于B亚基影响PP2A的结构构象, 因而它对PP2A的活性具有重要影响, 决定着全酶的靶标特异性和亚细胞定位, 因此被称作“特异性亚基”(Farkas等2007)。已经鉴定出多种植物中PP2A亚基的编码基因, 发现每个亚基都由多个基因编码(Kerk等2002)。例如, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的基因组含有5个C亚基编码基因、3个A亚基编码基因和17个B亚基编码基因

(Farkas等2007)。同一亚基的不同基因编码的产物称为该亚基的同系物(isoforms), 同一亚基多个同系物的存在为构成PP2A全酶提供了多种组合方式, 从而使PP2A具有多种功能。

病原物和昆虫等生物威胁植物健康, 它们往往通过削弱植物的生理功能来破坏植物的正常生长。为应对这种生物胁迫, 植物进化出信号途径, 利用蛋白激酶和磷酸酶形成基础防卫机制(Uhrig等2013; Van Wijk等2014)。最近的研究表明, PP2A可能是植物中控制病害反应的一个关键因子, 它或者作为一个调节酶发挥作用, 通过调节转录水平实现功能调节(Vainonen和Kangasjärvi 2015; Durian等2016), 或者也可能作为质膜感知系统调节子发挥作用(Segonzac等2014)。这些结果综合表明, PP2A是一个在受体水平上控制PTI免疫反应(PAMP-triggered immunity)的关键调节元件。但是, 对于PP2A在植物抗病中的具体作用尚不清楚, 存在关于全酶或其亚基功能相互矛盾的研究报道。一些研究表明, PP2A的催化亚基、调节亚基和特定全酶起着植物感病因子的作用(Segonzac等2014; He等2004; Degrave等2015; Jin等2016), 但都没有解释为激发防卫反应, 植物是如何暂时失活防卫反应

收稿 2018-01-04 修定 2018-05-31

资助 国家自然科学基金(31671971)、扬州市自然科学基金(YZ2016121)、公益性行业(农业)科研专项(201303018)和2016年度扬州大学优秀青年骨干教师培养对象。

* 通讯作者(xrchen@yzu.edu.cn)。

负调控因子PP2A的活性。与之相反,也有研究报道PP2A全酶或其结构亚基可能在植物抗病中起着重要作用(Alignan等2006; Wang等2012)。

综合现有的研究报道,可知PP2A的生物学功能十分丰富,根据不同的互作体系和互作条件,PP2A可能在植物抗病过程中起着不同的作用。茸鞭生物界的卵菌(oomycetes)在形态特征和生活习性方面与真菌相似,但在进化地位上与其相差很远,而与褐藻和硅藻有更近的亲缘关系,因而形成一个独特的真核微生物类群(Baldauf等2000)。疫霉属(*Phytophthora*)卵菌可侵染许多种植物,引致农、林业生产上很多种毁灭性的植物疫病(Erwin和Ribeiro 1996)。到目前为止,尚没有关于疫霉等卵菌与植物PP2A互作的研究报道。在前期的工作中,我们发现辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)的RxLR效应蛋白作用于茄科植物的PP2A结构亚基以利于自身的侵染(另文发表)。因此,本研究拟进一步对茄科植物的PP2A亚基进行分析:首先基于拟南芥、普通烟草、番茄和水稻PP2A的亚基序列,比对分析获得模式植物本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)中PP2A的不同亚基序列;然后利用实时定量RT-PCR(qRT-PCR)技术分析不同亚基基因在疫霉侵染条件下和本氏烟不同组织部位(根、茎、叶、花和种子)中的转录表达情况;克隆本氏烟和辣椒(*Capsicum annuum*)中结构亚基基因的全长cDNA序列,并进行二级结构、功能域和同源性分析。研究结果为进一步阐明PP2A的功能及在植物抵抗疫霉菌侵染时的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 疫霉和植物培养

从福建发病辣椒上分离获得的辣椒疫霉菌株(*Phytophthora capsici*) Pc537生长于10%的V8培养基(Erwin和Ribeiro 1996)中。利用Chen等(2013)的方法获得其菌丝和游动孢子悬浮液(1×10^6 个 \cdot mL⁻¹)。

本氏烟(*Nicotiana benthamiana* Domin)和辣椒(*Capsicum annuum* L.)均栽培于含有无菌土的聚苯乙烯泡沫塑料(Styrofoam)杯中,置于22~25°C、16 h/8 h光暗交替温室,生长4~6周后使用。

灌根接种本氏烟前1~2 h进行浇灌,以保证接种时土壤湿润。接种时,每株本氏烟的根部滴加5 mL辣椒疫霉游动孢子悬浮液,以接种无菌水的本

氏烟作为对照。所有本氏烟均置于温室进行培养。在接种后8、24和72 h (hour post-inoculation, hpi)依次割取本氏烟根部(每个时间点均接种10株本氏烟),迅速置入液氮速冻,进行RNA提取。

1.2 核酸提取

依据陈孝仁等(2015)的方法提取Pc537菌丝的基因组DNA。利用大连TaKaRa公司的RNAiso Plus提取植物样品的总RNA,然后用DNase I (TaKaRa)处理去除RNA中残余基因组DNA的污染,再使用RNA纯化试剂盒(RNAClean Kit, 北京天根生物)对RNA样品进行纯化。用1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA和总RNA的完整性,并用紫外分光光度法进行浓度和纯度分析。

1.3 生物信息学分析

从Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/>)公共数据库中下载拟南芥的PP2A亚基序列,从NCBI数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和UniProtKB数据库(<http://www.uniprot.org/>)下载普通烟草和水稻的PP2A亚基序列,从PlantGDB数据库(<http://www.plantgdb.org/SIGDB/>)下载番茄的PP2A亚基序列。将这些植物的PP2A亚基序列在本氏烟基因组数据库(https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_benthamiana/genome)进行比对(blastp, expected value $<10^{-10}$),下载本氏烟PP2A亚基序列。利用本氏烟PP2A结构亚基序列在NCBI中比对(blastx, expected value $<10^{-30}$),获得辣椒中同源的亚基序列。利用软件Primer 3设计基因RT-PCR引物和全长扩增引物,交由上海生工生物工程股份有限公司合成。

利用软件BioEdit (v7.2.0)和CLUSTALW进行多重序列比对。通过I-TASSER、COFACTOR在线软件(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>)预测本氏烟和辣椒的PP2A结构亚基的二级结构,从RCSB protein data bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)下载参考蛋白的PDB结构文件,利用软件ESPrpt 3.0着色作图。利用软件Batch Web CD-Search Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi)和SMART数据库(smart.embl-heidelberg.de)进行蛋白保守结构域的预测。

1.4 qRT-PCR分析

依据陈孝仁等(2015)的方法,利用反转录酶

M-MLV (RNase H-)和随机引物Oligo d(T)₁₈ (TaKaRa)将纯化过的mRNA反转录成第1链cDNA。依次取Oligo d(T)₁₈ Primers (50 μmol·L⁻¹) 1 μL、总RNA (700 ng·μL⁻¹) 1 μL和无核酸酶水4 μL, 置入冰浴的不含核酸酶的PCR管中。混匀离心PCR管5 s后, 于70°C孵育10 min, 然后迅速置于冰上冷却5 min。离心PCR管5 s, 往管中继续加入下列试剂: 5×M-MLV Buffer 2 μL、dNTPs (各10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL、Recombinant RNase Inhibitor (40 U·μL⁻¹) 0.3 μL、反转录酶M-MLV (200 U·μL⁻¹) 0.3 μL、无核酸酶水0.9 μL。快速混匀后离心5 s, 于42°C孵育1 h, 然后70°C孵育15 min, 再置于冰上5 min。

将第1链cDNA溶液稀释5倍用于PCR扩增。20 μL的PCR扩增体系含有: iQ SYBR Green Supermix (南京诺唯赞公司) 10 μL、上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各0.4 μL、第1链cDNA 100~300 ng, 无菌水补足到20 μL。PCR反应在CFX Connect荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)上进行, 程序为: 95°C预变性3 min; 95°C变性10 s, 53~59°C (依据不同的基因, 表1)退火30 s, 在退火及延伸阶段检测荧光强度, 收集信号, 共40个循环。扩增结束后, 做熔解曲线分析以检测扩增产物的特异性: 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。以温度为横坐标, 荧光强度的变化值为纵坐标制作熔解曲线, 如熔解曲线为单峰时用于后续分析。将DNA以10倍梯度稀释5~7次, 并以稀释的DNA为模板进行qPCR扩增; 以模板量的对数为横坐标, C_t值(PCR反应过程中荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)为纵坐标制作标准曲线, 计算扩增效率($E=10^{-1/\text{直线斜率}}$)。基因表达的数据分析采用Pfaffl (2001)的方法进行, 本氏烟*EFlα* (Elongation factor 1-alpha) (表1)为内参基因。每个样品设置3个技术重复。实验重复3次, 均得到一致的结果。

1.5 基因克隆

以本氏烟和辣椒叶片的cDNA为模板, 利用高保真DNA聚合酶(Platinum Taq DNA polymerase High fidelity, Invitrogen)和扩增引物(表1)扩增PP2A结构亚基的基因序列。PCR扩增体系含有: 10× High Fidelity buffer 2 μL、第1链cDNA 100~300 ng、上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各1 μL、Mg²⁺ (25 mmol·L⁻¹) 1.2 μL、dNTPs (2.5 mmol·L⁻¹) 2 μL、

表1 qRT-PCR分析及克隆PP2A亚基基因使用的引物
Table 1 Primers used for qRT-PCR analysis and cloning of PP2A subunit genes

基因名称	引物名称	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')	退火温度/ °C	产物长度/ bp	用途
<i>NbPP2Aa-1</i>	NbPP2Aa-1-qF/R	TGCTGTACCCGTGAATCTA	CTCCAAACAGCTTGCCAAAGT	56	133	qRT-PCR
	NbPP2Aa-1-F/R	GACCAATGATGGCAATGGTAGATGAGC	CGCGTCGACCTTTTGTTCATCTCAAGCCGAC	67	2 285	TA cloning
<i>CaPP2Aa-1</i>	CaPP2Aa-1-F/R	ataaCATAATGATGGCCATGGTAGATGAGCCATTG	atatGAATTCCTAGCCTGACATCATCACATTATC	58	1 783	TA cloning
<i>NbPP2Aa-2</i>	NbPP2Aa-2-qF/R	ACCAATGTTTGGTTGAATCAGC	GGAGAAAACACTCTTTGAACTAC	56	123	qRT-PCR
	NbPP2Aa-2-F/R	ATGCGCCCGCCTTCTCCGACTACAGATCAATC	CGCGTCGACTGCCAAGAGTATACTCAACACT	67	2 284	TA cloning
<i>CaPP2Aa-2</i>	CaPP2Aa-2-F/R	AFAACCGGGTATGTCAGCAATGATGAGCCATTG	CACGGAATCCTACTGGTGTGTTAGGGGCTTG	61	1 765	TA cloning
<i>NbPP2Ab-3</i>	NbPP2Ab-3-qF/R	GTGGCCAGTTCTAGCGTTC	TGCATGGGCATACACTCTTC	55	192	qRT-PCR
<i>NbPP2Ab-8</i>	NbPP2Ab-8-qF/R	CAAGGAGATGCAAGAGAGT	GACACAGAAAGAGCAIATC	53	115	qRT-PCR
<i>NbPP2Ab-10</i>	NbPP2Ab-10-qF/R	TGAACAATTCGACGAGCAG	AGCCATGGCACGCTCTCA	59	104	qRT-PCR
<i>NbPP2Ac-1</i>	NbPP2Ac-1-qF/R	CTCAGTTCAACCACACCAATG	TGGCTAITTTCTAGAATTGCA	53	163	qRT-PCR
<i>NbPP2Ac-4</i>	NbPP2Ac-4-qF/R	TTGGAGGTTGACGACTGCAGA	TCAGGGGTTCTTCGTGTIACA	54	92	qRT-PCR
<i>NbEFlα</i>	NbEFlα-qF/R	AAGGTTACCAACCTTGAC	ACGTAGGGGTTTGTGTGAG	55	97	qRT-PCR
<i>M13</i>	M13-47/RV-M	CGCCAGGGTTTCCAGTCCAGC	GAGCGATAACAATTCACACAGG	55	na	Colony PCR

na: 表示不适用。

Platinum Taq DNA聚合酶($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.2 \mu\text{L}$, 无菌水补齐到 $20 \mu\text{L}$ 。PCR反应程序为: 94°C 预变性5 min; 94°C 变性30 s, $58\sim 67^\circ\text{C}$ (依据不同的基因, 表1)复性30 s, 72°C 延伸 1 min, 31个循环; 72°C 延伸5 min。

利用胶回收试剂盒(AXYGEN AxyPrep DNA Gel Extraction Kit, 杭州爱思进公司)纯化回收PCR产物后, 将其克隆进TA载体pMD19-T (TaKaRa)。重组质粒转化进大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 后, 利用M13通用引物(表1)和上面的体系进行菌落PCR, 将筛选出的阳性克隆送至南京金斯瑞公司进行序列测定。

2 实验结果

2.1 本氏烟PP2A的亚基组成

利用拟南芥、普通烟草、番茄和水稻PP2A的A、B和C亚基编码基因序列在本氏烟基因组数据库进行比对, 结果(表2)发现多个提交序列比对到同一本氏烟序列, 在剔除比对产生的相同序列后, 分别获得了本氏烟PP2A的2个A亚基、16个B亚基和4个C亚基同系物的编码基因序列。这些A亚基(581和587 aa)和C亚基(312~315 aa)的同系物在长度上彼此差别较小, 而B亚基(413~617 aa)的同系物在长度上差异较大。

2.2 本氏烟PP2A亚基编码基因的转录特征

前期研究发现辣椒疫霉RxLR效应蛋白作用于茄科植物PP2A的A亚基, 但尚不清楚PP2A的亚基编码基因是否直接响应病原菌的侵染。因此, 本研究分析病原菌侵染时本氏烟PP2A的22个亚基编码基因的转录水平变化。序列分析后发现, 由于序列之间的相似性很高, 针对这22个基因不能都设计出基因特异的qRT-PCR引物, 仅能对A亚基的2个编码基因(*NbPP2Aa-1*、*NbPP2Aa-2*)、B亚基的3个编码基因(*NbPP2Ab-3*、*NbPP2Ab-8*和*NbPP2Ab-10*)和C亚基的2个编码基因(*NbPP2Ac-1*、*NbPP2Ac-4*)进行特异的转录分析。

模式植物本氏烟受辣椒疫霉侵染后, 出现典型的植物疫病症状(Chen等2013)。qRT-PCR实验结果(图1)表明, 在辣椒疫霉侵染后, 相比于未接种对照, 上述7个亚基编码基因的表达均出现不同程度的上调变化, 其中*NbPP2Ac-4*在侵染阶段的整体表达水平显著高于其他基因。在8 hpi, *NbPP2Ac-4*

表达量最高, 其次是*NbPP2Ab-3*, 最低是*NbPP2Ab-10*; 在24 hpi, *NbPP2Ac-4*表达量最高, 其次是*NbPP2Ab-3*, 最低是*NbPP2Ab-8*; 在72 hpi, *NbPP2Ac-4*表达量最高, 其次是*NbPP2Ab-3*, 最低是*NbPP2Ab-10*。这些结果表明, 疫霉菌侵染诱导了PP2A不同亚基编码基因的上调表达。

为了进一步了解PP2A结构亚基A的2个编码基因(*NbPP2Aa-1*、*NbPP2Aa-2*)在本氏烟不同部位中的表达情况, 分别提取本氏烟的根、茎、叶、花和种子的总RNA, 进行qRT-PCR分析, 根部作为对照。结果(图2)显示, *NbPP2Aa-1*和*NbPP2Aa-2*在茎、叶、花和种子中的表达量均显著高于在根部中的表达量, 其中*NbPP2Aa-2*在花中的表达量约是在根部中表达量的13倍。

2.3 PP2A-A基因的克隆与序列特征

经生物信息学分析, 分别获得了本氏烟(NCBI登录号MF996339和MF996340)和辣椒(XM_016692206和XM_016700428)中PP2A两个结构亚基同系物的编码基因。本研究进一步对这4个基因的cDNA序列进行了高保真PCR扩增(图3), 克隆测序后获得了基因的全长序列。经比较分析, 这些基因序列与数据库中对应的序列一致。本氏烟和辣椒中*PP2Aa-1*编码长587个氨基酸残基的亚基蛋白, 而*PP2Aa-2*编码长581个氨基酸残基的亚基蛋白。

人体PP2A结构亚基(PR65 α)与茄科植物PP2A结构亚基高达60%的序列完全相同, 本研究与已知的PR65 α 二级结构(RCSB PDB entry code: 1B3U)进行比对, 发现茄科植物本氏烟和辣椒PP2A结构亚基的二级结构主要成分是 α 螺旋($\alpha 1\sim\alpha 44$)和 η 转角螺旋($\eta 1\sim\eta 8$) (图4)。由SMART和Batch Web CD-Search Tool分析可知, 这两种茄科植物中PP2A的结构亚基含有保守的功能域(图5)。其中, 同系物之一的PP2Aa-1含有2个HEAT_2功能域(Pfam PF13646)。另外一个同系物PP2Aa-2含有1个Vac14_Fab1_bd功能域(PF12755)和2个HEAT_2功能域, Vac14_Fab1_bd功能域与第一个HEAT_2功能域部分重叠。HEAT_2功能域由15个串联HEAT重复组成, 这些HEAT重复形成一个钩状结构以结合催化亚基和调节亚基(Ahn等2011)。Vac14_Fab1_bd功能域则负责与Fab1激酶结合, 同样含有多个串联HEAT重复(图5)。和本氏烟相比, 辣椒的结构

表2 本氏烟PP2A不同亚基的编码基因信息
Table 2 The summary of PP2A subunits of *N. benthamiana*

亚基类型	拟南芥基因ID	普通烟草基因ID	番茄基因ID	水稻基因ID	本氏烟基因ID	本氏烟基因名称	蛋白长度/aa	qRT-PCR
A	AT1G25490 [RCN11/AT1G13320 [PDF2]	Q40556 ^a [CAA66487.1] ^b	Solyc05g009600	Os09g0249700 [XP_015612104 ^d]	Niben101Scf09716g01002.1	NbPP2Aa-1	587	+
	AT3G25800 [PDF1]	na	na	Os09g07510.3 [XP_015612105 ^d]	Niben101Scf16939g00010.1	NbPP2Aa-2	581	+
	AT1G03960	na	Solyc04g010070	na	Niben101Scf03918g00029.1	NbPP2Ab-1	491	-
ATGG28850/AT5G28900/ AT1G54450/AT5G44090	na	na	na	Os10g33680	Niben101Scf20000g00002.1	NbPP2Ab-2	526	-
AT1G17720/AT1G51690	na	na	Solyc03g121410	Os02g13110/ OS02G0224200/ OS06G0563300	Niben101Scf09321g00009.1	NbPP2Ab-3	517	+
AT1G09880	na	na	Solyc04g076640	OS08G44020	Niben101Scf02615g01006.1	NbPP2Ab-4	617	-
AT5G18580	na	na	Solyc01g067500	OS05g05710	Niben101Scf02752g00016.1	NbPP2Ab-5	530	-
AT3G26020	na	na	Solyc02g093800	OS08g02860/ OS03G62730	Niben101Scf00600g00005.1	NbPP2Ab-6	524	-
AT3G26030	na	na	Solyc02g067980	na	Niben101Scf28762g00001.1	NbPP2Ab-7	524	-
AT3G21650	na	na	na	na	Niben101Scf01037g02004.1	NbPP2Ab-8	552	+
na	na	na	na	OS03G47790	Niben101Scf11751g01002.1	NbPP2Ab-9	493	-
na	na	na	Solyc09g008400	na	Niben101Scf06999g01002.1	NbPP2Ab-10	505	+
na	na	na	na	OS05G05710 ^c	Niben101Scf01586g00003.1	NbPP2Ab-11	525	-
na	na	na	Solyc06g065690	na	Niben101Scf05800g02014.1	NbPP2Ab-12	413	-
AT1G03460	na	na	na	OS04G40860	Niben101Scf11693g00001.1	NbPP2Ab-13	524	-
AT4G15415	na	na	na	na	Niben101Scf02968g02019.1	NbPP2Ab-14	550	-
AT5G03470/AT3G54930	na	na	Solyc10g083920	na	Niben101Scf02502g06015.1	NbPP2Ab-15	490	-
AT5G25510	na	na	na	na	Niben101Scf08341g03011.1	NbPP2Ab-16	507	-
AT1G59830/AT1G10430/ AT1G69960	na	na	Solyc01g011340	OS02G12580/ OS06G37660/ OS03G59060	Niben101Scf07437g01001.1	NbPP2Ac-1	315	+
na	Q9XGH7 ^a	na	na	na	Niben101Scf10502g00009.1	NbPP2Ac-2	312	-
AT3G58500/AT2G42500	na	na	Solyc01g005950	P0C5D7 ^c	Niben101Scf04118g01006.1	NbPP2Ac-3	312	-
na	O04860 ^a	na	na	na	Niben101Scf09360g02006.1	NbPP2Ac-4	314	+

a: 表示普通烟草基因IDs来自UniProtKB数据库; b: 表示普通烟草基因IDs来自NCBI数据库; c: 表示水稻基因来自本氏烟(*O. sativa* subsp. *japonica*); d: 表示水稻基因IDs来自NCBI数据库, 其余水稻基因来自UniProtKB数据库。方括号内的基因IDs与前面的IDs为同一个基因; “P”: 表示前后分隔开的基因IDs都比到同一个本氏烟基因; na: 表示未注释; “+”: 表示基因经qRT-PCR分析; “-”: 表示基因未经qRT-PCR分析。

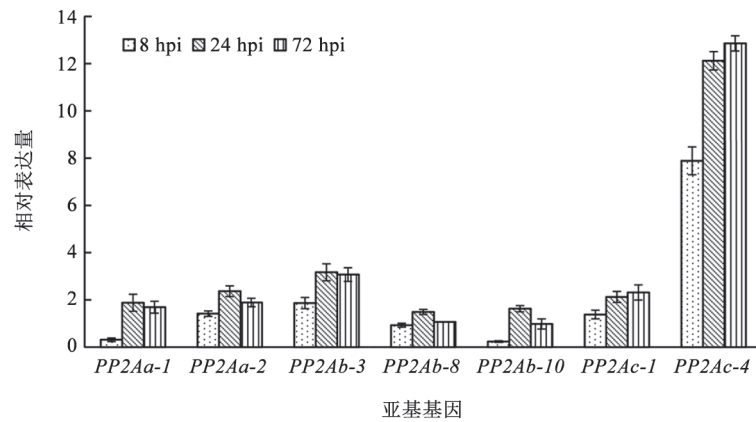


图1 本氏烟PP2A的7个编码不同亚基的基因在辣椒疫霉侵染时的表达模式

Fig.1 Expression profile of seven genes encoding different subunits of NbPP2A during the infection by *P. capsici* 基因在侵染阶段的表达值均相对于基因在未侵染对照植物中的表达值来表示。3次重复试验的标注误标注为误差线。

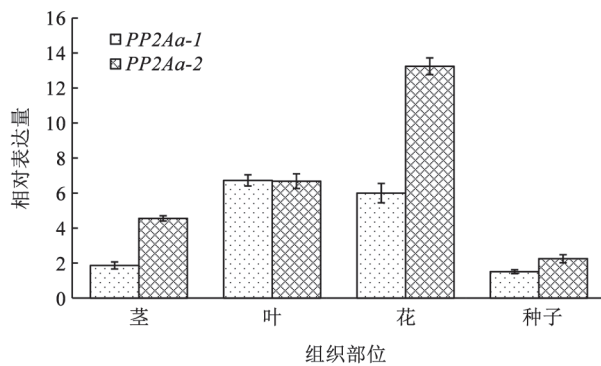


图2 本氏烟PP2A的2个编码结构亚基基因在不同组织部位中的表达水平

Fig.2 The expression level of two genes encoding NbPP2A-A in different tissues of *N. benthamiana*

基因在不同组织部位中的表达值均相对于基因在根部(calibrator)中的表达值来表示。3次重复试验的标注误标注为误差线。

亚基仅功能域具体起止位置不同: CaPP2Aa-1中, HEAT_2位于242~344 aa和360~461 aa; CaPP2Aa-2中, Vac14_Fab1_bd位于221~302 aa, HEAT_2位于243~344 aa和360~461 aa (结果未列出)。

2.4 PP2A-A基因的同源性分析

序列比对中发现, 本氏烟结构亚基的2个同系物PP2Aa-1与PP2Aa-2在氨基酸水平上有90%的序列完全相同(identity)。由图4可知, 本氏烟和辣椒PP2A结构亚基与人体PP2A结构亚基PR65 α 具有60%完全相同的序列。进一步与植物的同源序列进行比较, 发现本氏烟PP2A结构亚基(NbPP2Aa-1和NbPP2Aa-2)与拟南芥(PDF1、PDF2和RCN1)、

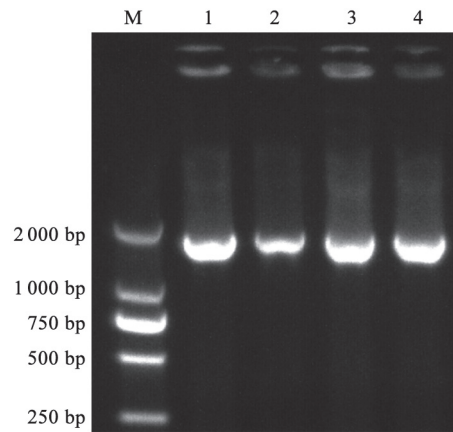


图3 本氏烟和辣椒中PP2A结构亚基基因cDNA扩增电泳
Fig.3 Electrophoresis of cDNA amplification of PP2A-encoding genes from *N. benthamiana* and bell pepper

M: DL2000 DNA marker; 1: *NbPP2Aa-1*; 2: *CaPP2Aa-1*; 3: *NbPP2Aa-2*; 4: *CaPP2Aa-2*。

普通烟草(*N. tabacum*, CAA66487.1)、水稻(*Oryza sativa*, XP_015612104和XP_015612105)和辣椒(CaPP2Aa-1和CaPP2Aa-2)中PP2A结构亚基的序列高度同源, 有80%以上的序列完全相同(图6)。这些结果揭示了该亚基在进化中的高度保守性。

3 讨论

PP2A是真核生物应对外界压力的一个关键调控元件, 但在茄科模式植物本氏烟中尚无系统研究, 仅有少数亚基的相关报道。He等(2004)报道, 本氏烟PP2A的催化亚基PP2Ac亚家族I是植物

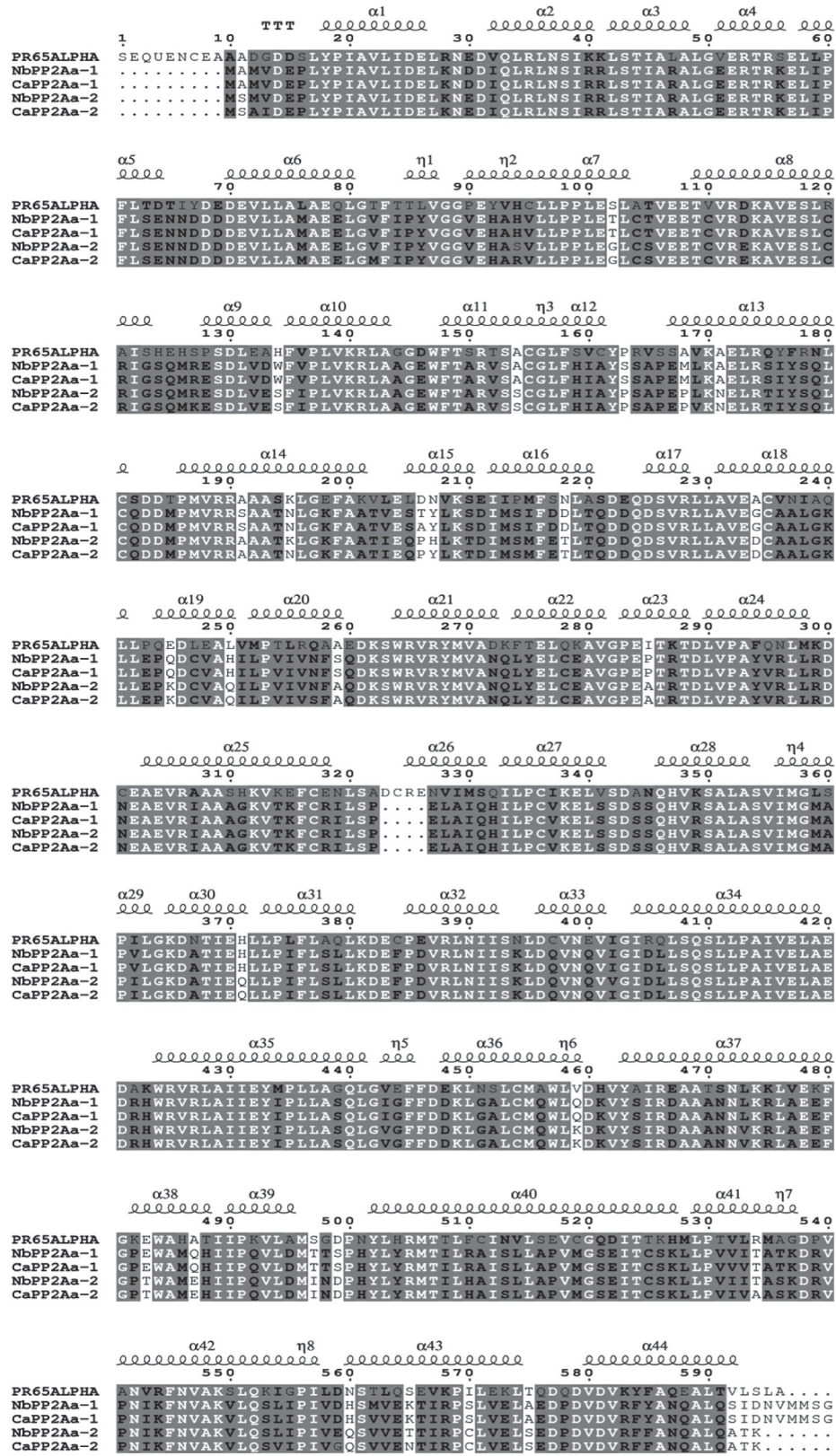


图4 PP2A结构亚基的二级结构

Fig.4 Secondary structure of PP2A-A subunit

NbPP2Aa-1和NbPP2Aa-2: 本氏烟; CaPP2Aa-1和CaPP2Aa-2: 辣椒; PR65α: 人。序列上方标注的为二级结构元件。

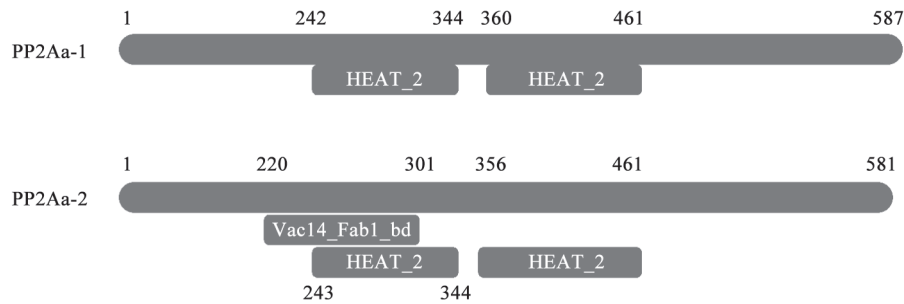


图5 预测的本氏烟PP2A结构亚基的功能域

Fig.5 The predicted domains of PP2A-A subunit from *N. benthamiana*

抗性反应的负调节子, 它的沉默激活植物防卫反应和局部细胞死亡; Ahn等(2011)发现, 本氏烟PP2A的一个调节亚基基因*Tap46*的沉默导致急性细胞死亡。在本研究中, 我们利用拟南芥、普通烟草、番茄和水稻中PP2A不同亚基序列, 通过序列比对获得了本氏烟的对应序列, 为系统分析PP2A在本氏烟应对病原物侵染中发挥的作用提供了重要数据。

现有研究表明, PP2A可能是植物应对生物胁迫的一个重要因子(Durian等2016), 但是尚缺乏清楚解析PP2A全酶及其亚基在植物抗病中作用的研究, 也不明确PP2A不同亚基编码基因的表达特征。有报道称, 黑茎病菌(*Phoma macdonaldii*)接种向日葵48 h后, 导致植物体内PP2A基因的转录本水平升高(Alignan等2006), 但不清楚具体亚基编码基因的表达情况。另有研究报道认为, PP2A基因是植物中的持家基因(house-keeping genes), 在不同条件下其表达量保持恒定, 因此多用做基因表达分析中的内参基因(Reddy等2016; Gopalam等2017)。针对此情况, 本研究在挖掘出的本氏烟PP2A不同亚基编码基因中, 针对包括结构亚基编码基因在内的7个基因进行了侵染条件下的表达分析。结果(图1)发现, 在侵染阶段, 绝大多数基因的表达量显著上调。其中, *NbPP2Ac-4*基因的转录水平显著高于其它基因, 表明其在应对病原菌的侵染过程中可能起着更为重要的作用。但目前尚无该基因的研究报道。是否辣椒疫霉RxLR效应蛋白与A亚基互作进而影响其与C亚基的结合, 从而发挥其毒性功能? 此具体作用机制仍需深入研究。在内参基因选择分析中, Baek等人(2017)也发现, 无论是病毒系统侵染还是局部侵染, 普通烟草PP2A调

节亚基编码基因(NCBI登录号X97913)都表现出一定的表达变化, 认为其是“the least stable genes”(最不稳定)内参基因之一。病原物侵染或激发子处理均导致拟南芥体内催化亚基基因(*PP2Ac-5*、*PP2Ac-2*)和调节亚基基因(*B''α*、*B'ζ*、*B'η*和*B'θ*)的表达量升高, 而在非生物胁迫下这些基因的表达量下降(Vainonen和Kangasjärvi 2015)。可见, 特定的PP2A亚基编码基因在特定的互作体系中响应生物胁迫, 参与了植物应对病原物侵染的过程。我们同时分析了PP2A结构亚基编码基因在本氏烟不同组织中的表达情况, 发现这两个基因(*NbPP2Aa-1*、*NbPP2Aa-2*)在茎、叶、花和种子中的表达量均显著高于在根部中的表达量(图2)。辣椒疫霉一般从根部开始侵染植物, 是否压力调控元件基因*NbPP2Aa-1*和*NbPP2Aa-2*在根部的本底表达水平本身就低于在其他部位的表达水平? 这两个基因在本氏烟不同部位中的差异表达是否与其参与抗病有关还有待深入分析。类似地, 研究发现田紫草(*Buglossoides arvensis*)中PP2A的一个调节亚基编码基因(KJ883542)在不同的组织(叶、茎、种子和花)中也呈现差异表达的情况(Gadkar和Filion 2015)。因此, 在功能分析中, 鉴于PP2A家族的庞大和组成复杂的情况, 需逐一分析不同亚基编码基因在生物、非生物胁迫条件下以及不同组织间的表达情况。

目前尚不清楚PP2A全酶或其亚基在植物抗病性中发挥的作用。据研究报道, PP2A的催化亚基、调节亚基和特定全酶是植物中的感病因子(Segonzac等2014; He等2004; Degraeve等2015; Jin等2016)。例如, 沉默普通烟草中PP2A的催化亚基C导致植物对丁香假单胞的抗性增强(He等2004)。细菌三型泌出通道效应蛋白AvrEs结合PP2A后干

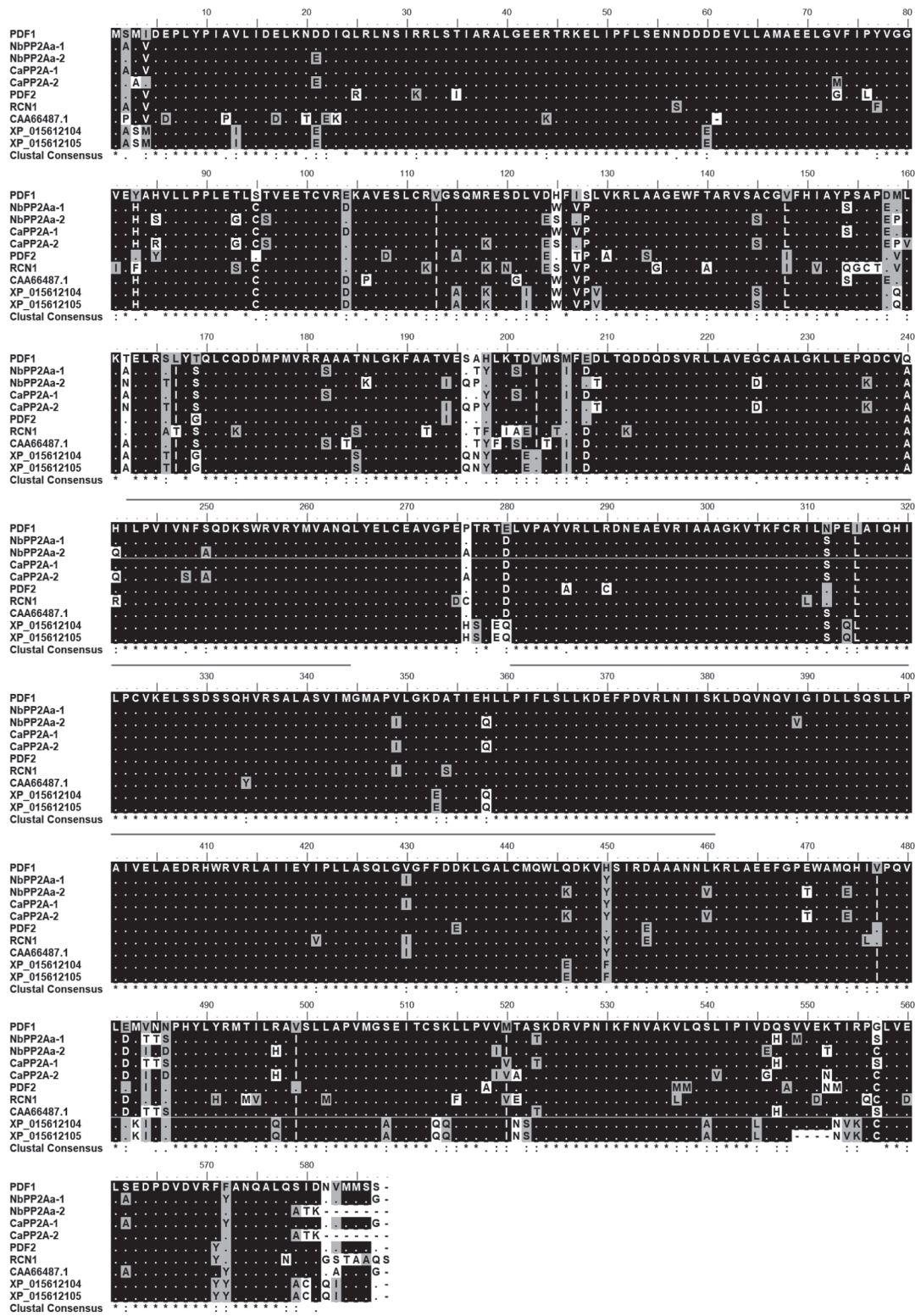


图6 本氏烟PP2A结构亚基同系物与水稻、普通烟草、辣椒和拟南芥中同源序列的比对

Fig.6 Protein sequence alignment of NbPP2A-A isoforms with homologues in rice, common tobacco, bell pepper and *A. thaliana*

本氏烟(NbPP2Aa-1和NbPP2Aa-2)、拟南芥(PDF1、PDF2和RCN1)、普通烟草(CAA66487.1)、辣椒(CaPP2Aa-1和CaPP2Aa-2)与水稻(XP_015612104和XP_015612105)的信息参见表2。拟南芥PDF1的全长蛋白序列作为参照,其余序列与之相同的残基均用黑点表示,而不同的残基均表示出来。位于参照序列顶部的线条表示2个保守的HEAT_2功能域(242~344 aa和360~461 aa)的位置。位于比对序列下方的为Clustal比对共有序列,星号表示保守的氨基酸残基,点和冒号表示不太保守的位点。

扰植物的免疫反应(Degrave等2015)。最近发现,玉米细菌性枯萎病菌(*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*)中AvrE蛋白家族的WtsE与玉米的PP2A调节亚基发生互作;丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)中AvrE1与玉米的PP2A调节亚基和同源的拟南芥PP2A调节亚基发生互作;当亚基基因突变,或者化学药剂抑制PP2A的活性后,均阻止了WtsE和AvrE1发挥促侵染的毒性功能(Jin等2016)。但是在这些研究中,尚不清楚为激发防卫反应,植物是如何暂时失去防卫反应负调控因子PP2A的活性。矛盾的是,也有研究报道称PP2A全酶或其结构亚基在植物抗病过程中起着重要作用。例如,向日葵在接种黑茎病菌48 h后,体内PP2A基因的转录本水平升高(Alignan等2006)。在293T Rex人原胚肾细胞中,PP2A的结构亚基(PR65 α)与一个锌指抗病毒蛋白ZAP互作,PR65 α 基因的下调表达导致ZAP的抗病毒活性下降,推测PR65 α 在细胞抵抗病毒感染中起着重要作用(Wang等2012)。

本研究经序列比对后发现本氏烟PP2A结构亚基与动植物中的PP2A结构亚基具有较高的同源性(图4和6)。结构亚基是PP2A核心酶的重要组成部分,对核心酶乃至整个全酶起到支架固定作用(Janssens和Goris 2001)。之前有报道称,拟南芥PP2A结构亚基与质膜上H⁺-ATPase同系物2的C末端互作(Fuglsang等2006)。敲除拟南芥PP2A结构亚基(PDF1、PDF2和RCN1)后发现,这些亚基参与植物激素信号途径,控制植物的发育,或者影响植物响应盐压力反应(Farkas等2007)。在人体细胞中,PR65 α 基因的表达下调促使互作蛋白ZAP的抗病毒活性下降(Wang等2012)。但是,对PP2A结构亚基在植物抗病中的作用尚无研究报道。我们对本氏烟PP2A结构亚基编码基因(*NbPP2Aa-1*、*NbPP2Aa-2*)进行转录分析,结果发现它们在病原物侵染条件下的表达水平相比于模拟侵染条件下的表达水平有显著差异(图1)。结构亚基作为PP2A全酶的重要支架,它的表达量变化会引起植物生长的变化,导致生长出现异常(Farkas等2007)。是否本氏烟体内还存在其他序列高度相似的PP2A结构亚基编码基因以响应疫霉菌的侵染?在疫霉菌侵染的情况下,为维持正常生长,本氏烟是否尽量维持体内结构亚基表达量的稳定?PP2A结构亚基在植物抗病过

程中究竟起着什么作用?为了更加清楚地认识PP2A结构亚基在植物抵抗疫霉菌侵染中所起的作用,本课题组正在利用Southern Blot和Northern Blot等技术手段进一步明确本氏烟中是否还存在序列高度相似的PP2A结构亚基同系物及其表达情况;利用双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation)、体外GST pull-down等技术手段分析疫霉菌效应蛋白与它的相互作用;利用VIGS(virus-induced gene silencing)技术沉默或者转基因过表达PP2A结构亚基编码基因,分析植物抗病性是否发生变化。

本研究通过序列挖掘、转录分析、基因克隆、二级结构和功能域预测、同源性比较,对茄科模式植物本氏烟的PP2A的亚基进行了分析,并首次克隆获得了本氏烟和近缘种辣椒中PP2A结构亚基的2个编码基因。序列比对表明,本氏烟PP2A结构亚基的氨基酸序列在动物和植物的不同物种间具有比较高的同源性,说明该亚基在进化和功能上保守。这些研究结果为进一步阐明PP2A的功能奠定了基础。

参考文献(References)

- Ahn CS, Lee HS, Pai HS (2011). Molecular functions of the PP2A regulatory subunit Tap46 in plants. *Plant Signal Behav*, 6: 1067–1068
- Alignan M, Hewezi T, Petitprez M, et al (2006). A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus*) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. *New Phytol*, 170: 523–536
- Baek E, Yoon JY, Palukaitis P (2017). Validation of reference genes for quantifying changes in gene expression in virus-infected tobacco. *Virology*, 510: 29–39
- Baldauf SL, Roger AJ, Wenk-Siefert I, et al (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 290: 972–977
- Chen XR, Li YP, Xing YP, et al (2015). Cloning, transcriptional profiles and roles of *Phytophthora capsici* CRN-encoding genes in the interaction with host plants. *Acta Phytopathol Sin*, 45: 384–394 (in Chinese with English abstract) [陈孝仁, 李艳朋, 邢玉平等(2015). 辣椒疫霉CRN编码基因的克隆、转录特征及在与寄主互作中的作用. *植物病理学报*, 45: 384–394]
- Chen XR, Xing YP, Li YP, et al (2013). RNA-Seq reveals infection-related gene expression changes in *Phytophthora capsici*. *PLoS ONE*, 8: e74588
- Degrave A, Siamer S, Boureau T, et al (2015). The AvrE superfamily: ancestral type III effectors involved in sup-

- pression of pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Mol Plant Pathol*, 16: 899–905
- Durian G, Rahikainen M, Alegre S, et al (2016). Protein phosphatase 2A in the regulatory network underlying biotic stress resistance in plants. *Front Plant Sci*, 7: 812
- Erwin DC, Ribeiro OK (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwide. St. Paul: APS Press, 10–455
- Farkas I, Dombrádi V, Miskei M, et al (2007). *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci*, 12: 169–176
- Fuglsang AT, Tulinius G, Cui N, et al (2006). Protein phosphatase 2A scaffolding subunit A interacts with plasma membrane H⁺-ATPase C-terminus in the same region as 14-3-3 protein. *Physiol Plant*, 128: 334–340
- Gadkar VJ, Filion M (2015). Validation of endogenous reference genes in *Buglossoides arvensis* for normalizing RT-qPCR-based gene expression data. *Springerplus*, 4: 178
- Gopalam R, Rupwate SD, Tumaney AW (2017). Selection and validation of appropriate reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Salvia hispanica*. *PLoS ONE*, 12: e0186978
- He X, Anderson JC, del Pozo O, et al (2004). Silencing of subfamily I of protein phosphatase 2A catalytic subunits results in activation of plant defense responses and localized cell death. *Plant J*, 38: 563–577
- Hunter T (1995). Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80: 225–236
- Janssens V, Goris J (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J*, 353: 417–439
- Jin L, Ham JH, Hage R, et al (2016). Direct and indirect targeting of PP2A by conserved bacterial type-III effector proteins. *PLoS Pathog*, 12: e1005609
- Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, et al (2002). The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 129: 908–925
- Kwak JM, Moon JH, Murata Y, et al (2002). Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14: 2849–2861
- Michniewicz M, Zago MK, Abas L, et al (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell*, 130: 1044–1056
- Muday GK, Brady SR, Argueso C, et al (2006). RCN1-regulated phosphatase activity and EIN2 modulate hypocotyl gravitropism by a mechanism that does not require ethylene signaling. *Plant Physiol*, 141: 1617–1629
- Pernas M, García-Casado G, Rojo E, et al (2007). A protein phosphatase 2A catalytic subunit is a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J*, 51: 763–778
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29: e45
- Reddy DS, Bhatnagar-Mathur P, Reddy PS, et al (2016). Identification and validation of reference genes and their impact on normalized gene expression studies across cultivated and wild *Cicer* species. *PLoS ONE*, 11: e0148451
- Segonzac C, Macho AP, Sanmartín M, et al (2014). Negative control of BAK1 by protein phosphatase 2A during plant innate immunity. *EMBO J*, 33: 2069–2079
- Uhrig RG, Labandera AM, Moorhead GB (2013). *Arabidopsis* PPP family of serine/threonine protein phosphatases: many targets but few engines. *Trends Plant Sci*, 18: 505–513
- Vainonen JP, Kangasjärvi J (2015). Plant signalling in acute ozone exposure. *Plant Cell Environ*, 38: 240–252
- van Wijk KJ, Friso G, Walther D, et al (2014). Meta-Analysis of *Arabidopsis thaliana* phospho-proteomics data reveals compartmentalization of phosphorylation motifs. *Plant Cell*, 26: 2367–2389
- Wang ZF, Wang XL, Gao GX (2012). PR65A regulates the activity of the zinc-finger antiviral protein. *Prog Biochem Biophys*, 39: 431–437
- Xue XJ, Liu XQ (2009). Progress of study on the structure and function of protein phosphatase 2A. *Chem Life*, 28: 41–44 (in Chinese with English abstract) [薛娴靖, 刘晓晴(2009). 蛋白磷酸酶2A结构与功能. *生命的化学*, 28: 41–44]

Expression profile and cloning of genes encoding PP2A subunits of *Nicotiana benthamiana*

CHEN Xiao-Ren*, HUANG Shen-Xin, ZHANG Ye, LI Yan-Peng, CHE Tong, JI Zhao-Lin

College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China

Abstract: Ser/Thr protein phosphatase 2A (PP2A), consisting of a catalytic subunit C, a scaffold subunit A, and a highly variable regulatory subunit B, plays important roles in cellular processes in organisms. However, its role in plant disease resistance is obscure. In the present study, the genes encoding PP2A subunits of *Nicotiana benthamiana* were obtained by searching its genome database using *Arabidopsis thaliana*, common tobacco, tomato and rice PP2A subunit sequences as queries. Real-time RT-PCR was performed to determine the expression pattern of six selected genes during an infection period of *N. benthamiana* by *Phytophthora capsici* (0, 8, 24, 72 h post-inoculation), and of two PP2A-A genes in different plant tissues (root, stem, leaf, flower and seed). It turned out that most of the genes demonstrated significant up-regulation during the infection stage relative to the un-infected control. The most significant up-regulation was observed for *NbPP2Ac-4* during the infection course. PP2A-A genes (*NbPP2Aa-1* and *NbPP2Aa-2*) showed significantly higher expression level in stem, leaf, flower and seed than in root. These two PP2A-A genes were cloned with full length from *N. benthamiana* and its relative bell pepper. Sequence analysis showed that α - and η -helices were the main components of their secondary structure. They possess conserved domains such as HEAT_2 and showed high similarity to the homologues of PP2A-A in other plant species and human. This study provides essential experimental data for elucidating the roles of PP2A-A subunit in plant resistance against diseases.

Key words: protein phosphatase 2A; plant disease resistance; transcriptional level; domain; *Phytophthora capsici*

Received 2018-01-04 Accepted 2018-05-31

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31671971), the Natural Science Foundation of Yangzhou City (China) (YZ2016121), the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of China (201303018) and the Yangzhou University 2016 Project for Excellent Young Key Teachers.

*Corresponding author (xrchen@yzu.edu.cn).