

拟南芥磷酸肌醇特异性磷脂酶 *AtPLC6* 基因的克隆与表达

徐小静 曹志翔 刘国琴 Madan K. Bhattacharrya 任东涛*

(植物生理学与生物化学国家重点实验室, 中国农业大学生物学院, 北京 100094; Agronomy Department, Iowa State University, Ames, IA 50011-1010, USA. * 联系人, E-mail: ren@cau.edu.cn)

摘要 利用文库筛选和RT-PCR方法, 从拟南芥中克隆到长度为 1954 bp, 包括全长 1734 bp编码区的 *AtPLC6* cDNA, 推测其编码一含有 578 个氨基酸的多肽, 其等电点为 7.24, 分子量为 66251.84 Da. 在 GenBank中进行序列比对发现, *AtPLC6* 为一新发现的拟南芥PI-PLC基因. 对推测的氨基酸序列结构的分析表明, *AtPLC6* 具有EF手性结构、X结构域、Y结构域和C2 结构域, 与植物中已知的其他磷酸肌醇特异性磷脂酶C(PI-PLC)在结构上相似, 类似于动物中典型的 δ -型磷酸肌醇特异性磷脂酶. 将*AtPLC6*的编码区序列插入原核表达载体后进行了原核表达, 纯化的*AtPLC6* 重组蛋白可水解PIP₂产生IP₃和DAG, 且水解活性呈明显的钙依赖特性, 反应的最适Ca²⁺浓度为 10 μ mol/L. Northern分析结果表明, 在检测的根、茎、叶、花、果和幼苗中均有*AtPLC6* mRNA的转录, 但转录水平较低. 用ABA, NaCl, 冷和热等胁迫处理的实验表明, *AtPLC6* mRNA的转录受到冷胁迫的诱导, 而受ABA, NaCl和热等胁迫影响较小, 推测*AtPLC6* 可能参与了植株对冷胁迫的响应.

关键词 拟南芥 *AtPLC6* 克隆 原核表达 冷胁迫

磷酸肌醇特异性磷脂酶C(简称PI-PLC)广泛存在于真核生物中, 是真核生物细胞信号转导途径的重要组成部分之一. PI-PLC可以被多种胞外刺激(如激素、生长因子和胁迫)所激活, 激活的PI-PLC可特异地水解4,5-二磷酸肌醇(简称PIP₂), 产生两个第二信使, 即1,4,5-三磷酸肌醇(简称IP₃)和 1,2-二酰基甘油(简称DAG). IP₃以水溶性形式进入胞质中, 诱导Ca²⁺从细胞内源钙库的释放, 从而调节Ca²⁺依赖的酶类或Ca²⁺依赖的通道. 脂类产物DAG仍留在膜内, 激活蛋白激酶C(PKC), PKC通过磷酸化作用调节一系列酶、受体、转运体、骨架等蛋白的活性^[1].

大量研究表明, 动物细胞中的PI-PLC参与了细胞生长、繁殖、代谢、分泌、收缩、感觉等过程的调节^[1]. 植物细胞PI-PLC的研究起步较晚, 但研究者从多种植物的质膜组分或可溶性组分中检测到类似于动物细胞 δ -型PI-PLC的活性, 其中一些组分还得到了部分纯化, 揭示了植物中可能也存在PI-PLC^[2,3]. 1995年, Hirayama等人^[4]首次从拟南芥中克隆到植物PI-PLC基因, 即*AtPLC1S*, 并证明该基因的产物即是PI-PLC后, 研究人员相继从拟南芥、马铃薯、大豆、烟草、油菜、发指草等植物中克隆到多个PI-PLC基因^[4~9]. 研究证明, PI-PLC不仅存在于植物中, 而且

在植物对诸如渗透压的改变^[10]、生长素^[11]及ABA^[12~14]的处理、光^[15]和重力的变化^[16]、病原菌的侵染^[17]等胞外刺激的响应, 以及授粉^[18]等发育过程的信号转导中发挥重要的作用.

在模式植物拟南芥中, 除已报道的 *AtPLC1S*, *AtPLC1F*, *AtPLC1G* 和 *AtPLC2* 外, 在其第 1 染色体的 一段 13 kb 大小的 DNA 序列中, 存在着 2 个与 *AtPLC1S* 顺序排列的基因序列, 推测其编码 PI-PLC. 我们将这 2 个推测的拟南芥 PI-PLC 分别命名为 *AtPLC5* 和 *AtPLC6*. 这 2 个基因是否可以表达、各自具有的功能如何, 尚未见有关报道. 本文报道了其中 *AtPLC6* 的基因克隆(cDNA GenBank 登录号: AF434167)、mRNA 的转录及重组蛋白的酶活性分析结果.

1 材料与方法

() 材料. 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Columbia ecotype)于 22 $^{\circ}$ C, 100 μ E $\cdot$ m⁻² $\cdot$ s⁻¹光照强度及 12 h光照条件下培养. 除用作组织特异性表达分析外, 实验用拟南芥均于 4 周后处理. 冷、热、NaCl和ABA的处理参照Yamaguchi-Shinozaki等人^[19]的方法, 处理后不同时间点取完全伸展的叶片, 样品用液氮速冻后于-80 $^{\circ}$ C保存备用.

() 拟南芥RNA和DNA的提取. 用Trizol试剂

(Invitrogen公司), 按产品说明提取拟南芥总RNA. DNA的提取参照Lin等人^[20]方法进行.

() *AtPLC6* 的3'末端的EST库筛选. 依据拟南芥基因组序列中推测的PI-PLC基因序列, 用正向引物(5'-CCTTGAGCTACATGCCTACATCATATGC-3')和反向引物(5'-TGTTTGGGACGCAACTGCAGCAGAG-3')对基因组DNA进行PCR扩增. 退火温度为 58 , 35 个循环. PCR产物纯化后进行序列测定. 从剩余PCR产物中取适量, 用*rediprime* 随机引物标记试剂盒(Amersham-Pharmacia Biotech公司)和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP(Parkin-Elmer公司)进行标记后作为探针, 筛选拟南芥cDNA文库CD4-7(购自美国拟南芥生物资源中心), 得到 2 个真阳性克隆. 经对测序结果检索发现, 核苷酸序列与拟南芥已有的 cDNA的同源性较低, 可能为一新基因, 我们将其命名为*AtPLC6*.

() *AtPLC6* 全长cDNA的 RT-PCR克隆. 为得到*AtPLC6* 全长cDNA及编码区, 我们以 Oligo dT (16) 作为引物, 对从叶中提取的RNA进行逆转录(逆转录酶M-MLV购自Promega公司). 以逆转录产物作为模板, 用PCR进行扩增. 所用引物分别为: 依据推测的基因序列 5'端设计的正向引物 *AtPLC6*-F2(5'- ATTTAACA-TAAATTGCAGGAAC-3', 扩增全长cDNA), 扩增编码区的正向引物 *AtPLC6*-C2 (5'-GGATCCAT- GAA-GAGAGATATGG-3', 下画线处的序列为*Bam*H 识别位点)和依据已知的 3'端设计的反向引物*AtPLC6*-A2 (5'-AAAGAAAGTGAAACCGCATGAG- AAG-3'). 退火温度为 57 , 35 个循环. PCR产物纯化后分别克隆到pGEM-T easy载体(Promega公司)进行序列测定. 所得全长cDNA序列在GenBank注册(GenBank登录号: AF434167).

() *AtPLC6* 的原核表达及纯化. 用限制性内切酶*Bam*H 和*Eco*R 从pGEM-T easy载体中切下*AtPLC6* 编码区, 与已用*Bam*H 和*Eco*R 双酶切的质粒pET30a连接, 构建可表达His tag-*AtPLC6* 重组蛋白的表达载体质粒pET30a-*PLC6*C2A2, 酶切和序列鉴定后用于表达蛋白质. 将重组质粒pET30a-*PLC6*C2A2转入大肠杆菌BL21. 随机挑取 6 个抗性转化子单菌落, 接种到 5 mL LB(Kan⁺)液体培养基中, 37 培养至 $A_{600} = 0.6$, 加入IPTG至终浓度为 0.1 mmol/L, 继续培养 3 h. 离心收集菌体, 破碎菌体后进行 SDS-PAGE 电泳检测. 挑取目的蛋白表达量高

的菌落进行大量培养, 冰浴中超声波破碎菌体, 离心后的上清液用于重组蛋白的纯化. 镍亲和填料 Chelating Sepharose TM Fast Flow(Amersham Pharmacia Biotech 公司)活化及亲和纯化按说明书进行.

() PI-PLC酶活测定. 亲和柱纯化的重组蛋白, 对 1/4×酶活测定缓冲液(50 mmol/L Tris-maleate, pH 6.25)于 4 透析 8 h以上, 期间更换 1 次透析液. 透析后的目的蛋白冷冻干燥. 用前以适量 ddH₂O溶解蛋白干粉至所需浓度. PI-PLC酶活测定基本按 Melin等人^[21]方法进行. 50 μ L反应体系中含 0.1 μ g/ μ L 重组蛋白, 50 mmol/L Tris-maleate(pH 6.25), 0.2 mmol/L PIP₂(Sigma公司), 一定浓度的 Ca²⁺(用 Ca²⁺/EGTA设置Ca²⁺ 浓度梯度), 37 反应 20 min后, 加入 1 mL氯仿: 甲醇溶液(2: 1, 体积比)终止反应. 冰浴 5 min后加入 1 mol/L HCl 250 μ L, 剧烈振荡 5 s, 室温 14000 $\times g$ 离心 2 min, 取出上层水相, 用 2 mol/L NaOH中和, 总共得到的反应产物 500 μ L. 用 D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) [³H] Biotrak Assay System试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech公司)测定反应产物中的IP₃浓度, 操作完全按产品说明书进行.

() 免疫印迹. 蛋白质的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按Laemmli等人^[21]方法进行, 浓缩胶浓度为 4.5%, 分离胶浓度为 10%. 电泳结束后, 电转移至硝酸纤维素膜, 按Towbin等人^[22]方法进行免疫印迹. 所用一抗为抗 6 $\times$ His的单克隆抗体(Sigma产品, 工作浓度 1: 4000), 二抗为辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠IgG(工作浓度 1: 10000). 用Roche公司的化学发光试剂盒显色, X射线片显影.

() Northern Blot分析. 拟南芥总RNA经 1.2% 琼脂糖(质量体积比)-甲醛变性凝胶电泳后, 用 10 $\times$ SSC转移至 Zeta-Probe膜(Bio-Rad), 用 2 $\times$ SSC洗膜 5 min后紫外交联, 干燥保存. 用正向引物*AtPLC6*-a3(5'-CTCGAGACTGAACTGGATACCTT-3')和反向引物*AtPLC6*-a4 (5'-GACTAGTTTTCCAACATGAGTC-3'), 以基因组DNA为模板, 扩增出含*AtPLC6* 5'非翻译区、大小为 600 bp的DNA片段, 用*rediprime* 随机引物标记试剂盒和 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP进行标记后作为探针. 按Church等人^[23]的方法进行杂交和洗膜.

2 结果

2.1 *AtPLC6* 的克隆及序列分析

用PCR从拟南芥基因组DNA扩增出推测的PI-PLC基因片段. 以此片段为探针筛选拟南芥EST库,

对 1×10^5 个噬菌斑的第 1 轮筛选中, 共得到 6 个阳性杂交斑, 经第 2 轮筛选, 其中 2 个为真阳性斑。测序结果发现, 所得的 2 个 cDNA 克隆片段均在 3' 端含有 Poly A, 最长的片段为 800 bp, 在 GenBank 检索结果发现, 其与拟南芥已克隆的 PI-PLC 的 cDNA 核苷酸序列相似性不高, 其中序列相似性最高的 *AtPLC5* cDNA 的 3' 端也只有 51%。目前, 拟南芥中已有 *AtPLC1S* (GenBank 登录号: D38544)、*AtPLC1F* (GenBank 登录号: U13203)、*AtPLC1G* (GenBank 登录号: U76423)、*AtPLC2* (GenBank 登录号: D50804) 和

AtPLC5 (GenBank 登录号: AF434168) 等 5 个 PI-PLC 基因登录, 我们将这一新基因命名为 *AtPLC6*。

依据由 EST 库筛选后所得阳性克隆的核苷酸序列结果, 我们设计了 3' 端引物, 依据基因组序列设计了一系列 5' 端引物, 经 RT-PCR 的方法扩增出长 1954 bp, 含全长编码区的 *AtPLC6* cDNA 序列。在 cDNA 的起始密码子 ATG 上游 39 和 48 bp 处出现 2 个终止密码子, 下游 1734 bp 长的可读框后出现终止密码子 (图 1), 其后有 polyA 结构。

由 *AtPLC6* cDNA 序列推测, 其编码一含 578 个

```

1  ATTTAACTAAATTGCAGGAACCTTTTGAAGAGAATCCAGCGGTTGAAAAATATAAATAGAGGTTGGCTGGTGTGATTGTGAAGTATCTGG
    *           *           *           *
91  GATGAAGAGAGATATGGGGAGTTACAAAATGGGTTTGTGTGCAGTGACAAGCTCAGGATGAACAGAGGAGCTCCACCTCAGGATGTGGT
1  M K R D M G S Y K M G L C C S D K L R M N R G A P P Q D V V
181 GACGGCGTTGTAGAGTATACCGAGGGCAGGAGCCACATGACGGCAGAGCAGCTATGTCGGTCTTGGTTGAGGTGCAGGACGAGACTGA
31  T A F V E Y T E G R S H M T A E Q L C R F L V E V Q D E T E
271 AGTGTGGTTTCAGATGCAGAGAAGATCATAGAAAGAATCACATGTGAAAGACATCATACTAAGTTCTTGAGGCATACGCTGAACCT
61  V L V S D A E K I I E R I T C E R H H I T K F L R H T L N L
361 CGATGATTCTTCAGTTCTTGTCTCAGATGATCTGAATCATCCAATTGATAGTAAGGTGCGTCAAGACATGGCCTCTCCCTTGTGCGCA
91  D D F F S F L F S D D L N H P I D S K V R Q D M A S P L S H
451 CTATTTCAATTACACGACCCATAATTCGTATCTGACTGGAATCAGATCAACAGCGAATGCAGCGAGCTACCTCTCATAAAGGCATTAA
121 Y F I Y T S H N S Y L T G N Q I N S E C S D V P L I K A L K
541 GAGAGGTGTTGAGCTCTTGAACCTGACATGTGGCCTAACTCTACTAAGGACGACATACTTGTCTCCATGGCTGGGCATGGACACCTCC
151 R G V R A L E L D M W P N S T K D D I L V L H G W A W T P P
631 AGTTGAAGTGTCAAAATGCTTGTAGATCTATAAAGAACATGCCTTTTATGCATCTGCATACCTGTGATCTTAACCTTGAAGATCATT
181 V E L V K C L R S I K E H A F Y A S A Y P V I L T L E D H L
721 GACTCCAGATCTTCAAGCCAAAGCAGCTGAGATGATGAAGAGATATTCATGGATATGGTGTATTTCCAGAGGCTGGTGGTTAAAGA
211 T P D L Q A K A A E M M K E I F M D M V Y F P E A G G L K E
811 GTTCTCTTACCAGGAAGATCTCAAGTACAAAATTGTAATATCTACAAAGCTCTCTAAAGGTAGCTTAAGAAAGGACAAGGATTCTGAGTC
241 F P S P E D L K Y K I V I S T K P P K G S L R K D K D S E S
901 AGATGCATCAGAAAGGCGTCATCAGATGTTTCAGCAGACGATGAGAAGACTGAGGAAGAAACAAGTGAGGCCAAAAATGAAGAGATGG
271 D A S G K A S S D V S A D D E K T E E E T S E A K N E E D G
991 ATTTGATCAAGAAATCCAGCAACTTGGATTTCCTCACCTATAGTCGCCTAATAACGATTCCTTCTGGAATGCTAAAAATGGATTAAAGGA
301 F D Q E S S N L D F L T Y S R L I T I P S G N A K N G L K E
1081 AGCACTAACATCGATAATGGTGGAGTTAGACGGCTGAGTTTGGGGAGCAGAAGTTCAAGAAAGCCACTGAAATGTATGGAACCGAAGT
331 A L T I D N G G V R R L S L R E Q K F K K A T E M Y G T E V
1171 CATAAAATTCACACAGAAGATCTGTTGAGAATATATCCCAAGGCTACCGAGTAAATCTCTCAACTATAGGCCATACAACGGTTGGAT
361 I K F T Q K N L L R I Y P K A T R V N S S N Y R P Y N G W M
1261 GTACGGAGCTCAAAATGGTCGCTTCAACATGCAGGCTATGGAAGAGCTCTTGGATGATGCATGGTATGTTTAGGGGAAATGGTGGATG
391 Y G A Q M V A F N M Q G Y G R A L W M M H G M F R G N G G C
1351 CGGGTACGTGAAAAACCGGACTTTATGATGAACAATAATCTCAGTGGAGAAGTGTCAACCCGAAAGCGAAGTTACCCATAAAGAAAAAC
421 G Y V K K P D F M M N N L S G E V F N P K A K L P I K K T
1441 TCTAAAGTGAAAGTATACATGGGCAAGGATGGGACTCTGGTTTCCAGCGAACATGTTTCAACACTTGGTCTCTCTCAACTTCTACAC
451 L K V K V Y M G K G W D S G F Q R T C F N T W S S P N F Y T
1531 AAGGTGGGGATAACAGAGTAAGAGGTGATAAGTAAATGAAGAAAACAAAGAAAGACAAAGACATGGGACCATTTCTGGAACGAGGA
481 R V G I T G V R G D K V M K K T K K E Q K T W E P F W N E E
1621 GTTTGAGTTTCAGTAAACAGTACCGAGCTGGCGTTGCTAAGAAATAGAAGTTCACGACTACAACATGCCAGAGAAGGACGATTCTCGGG
511 F E F Q L T V P E L A L L R I E V H D Y N M P E K D D F S G
1711 TCAGACATGTTGCTGTGTCAGAGCTGAGACAAGGCATACGTTCTGTTCTTGTATGATCGCAAGGCGGAGACTAGTTTTCAGTTAC
541 Q T C L P V S E L R Q G I R S V P L Y D R K G E R L V S V T
1801 ACTTCTCATCGGTTTCACCTTCTTAAACACAGAGTTTCTTAAACAGAGTTTCTTCTTCTTATAATAATAATAACTTCAAAGA
571 L L M R F H F L *
1891 GAGTGAAGCTTTTGGCATATGAAAAACGGACTAAATCAAAATTTGTCACTCGTTAATAAAAAA
    
```

图 1 *AtPLC6* cDNA 序列及推测的氨基酸序列图
核苷酸序列下排为推测的氨基酸序列。* 示终止密码子

氨基酸残基的多肽, 分子量为 66251.84 Da, 等电点为 7.24. 用GenBank的Blast软件预测AtPLC6 的保守性结构域, 发现AtPLC6的第26~109个氨基酸残基组成EF手型结构域, 第113~257个氨基酸残基组成X结构域, 第312~430个氨基酸形成Y结构域, 第438~562个氨基酸构成C2结构域, 没有PH结构域的存在(图2(a)). 利用DNA Star中的Cluster W对鼠 β -, γ -和 δ -型PLC和目前已知的植物PI-PLC推测的氨基酸序列进行相似性及结构预测分析, 结果表明, AtPLC6与动物的PI-PLC的 δ -型PLC结构类似(图2(a)), 而氨基酸序列与拟南芥中的AtPLC5, 烟草中

的CAA65127和CAA72681编码的PLC同源性较高((图2(b)), 分别为54.5%, 60.2%和59.7%.

2.2 原核表达的 AtPLC6 重组蛋白酶活性测定结果

与未经诱导的、带有 pET30a-PLC6C2A2 载体的大肠杆菌菌体总蛋白(图3(a)泳道1)相比, 经IPTG诱导的菌体总蛋白表达出一分子量为71 kD的蛋白条带(图3(a)泳道2), 该蛋白主要分布在包涵体中(图3(a)泳道3), 小部分出现在超声后的上清中(图3(a)泳道4). 经用镍亲和柱层析, 从上清中纯化出了该蛋白(图3(a)泳道5~7). 经免疫印迹检测, 纯化出的蛋白能与抗His tag的单克隆抗体发生免疫交叉反应, 表

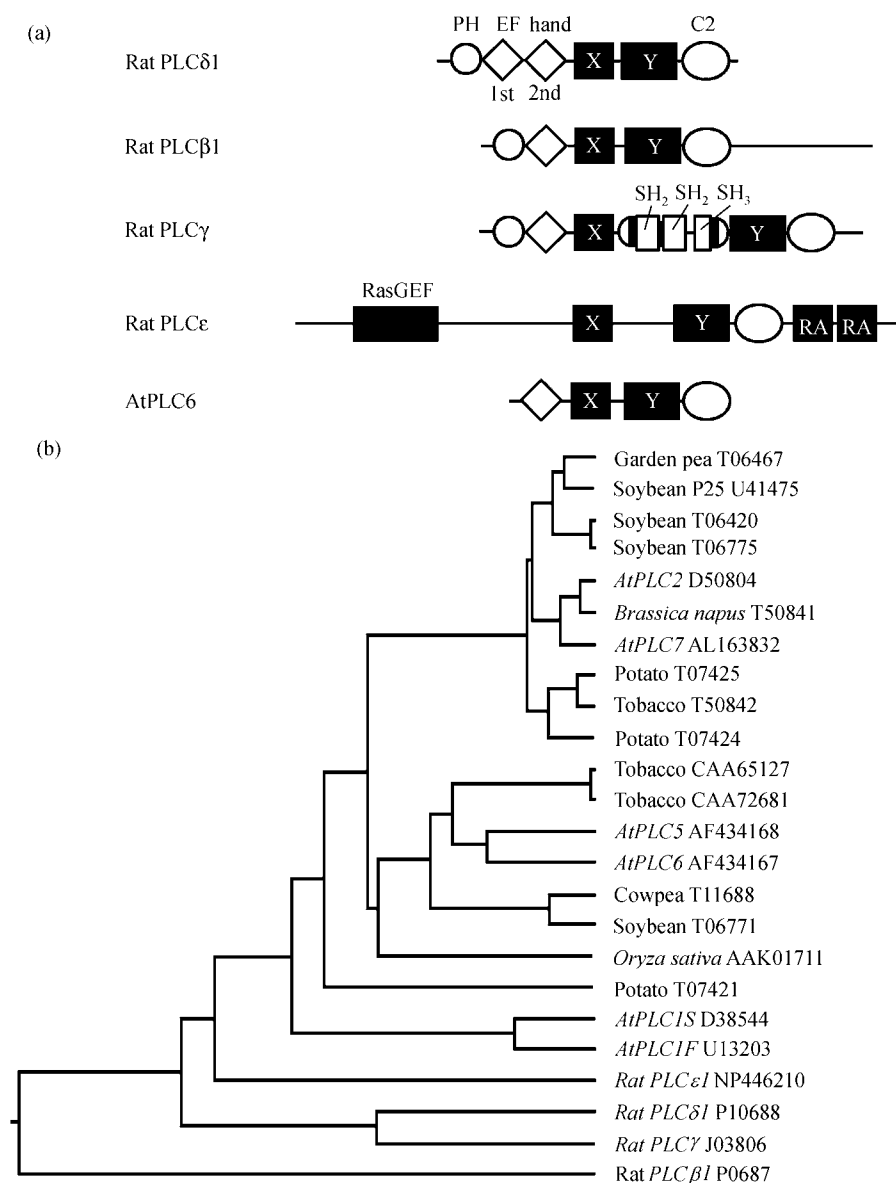


图2 依据氨基酸序列预测的 AtPLC6 结构(a)及由已克隆动植物 PI-PLC 预测的氨基酸序列绘制的系统树(b)

明纯化出的蛋白即是大肠杆菌表达的 *AtPLC6* 重组蛋白(图 3(b)). 分子量大小与预期的相符(*AtPLC6* 理论分子量 66 kD 加上 His tag 总共为 71kD).

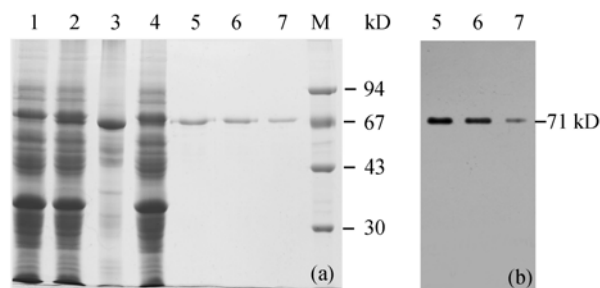


图 3 *AtPLC6* 原核表达产物纯化的 SDS-PAGE 检测(a)及抗 His tag 单克隆抗体免疫印迹鉴定(b)

1 示未诱导菌体总蛋白, 2 示诱导后菌体总蛋白, 3 示诱导后菌体非可溶性蛋白, 4 示诱导后菌体可溶性蛋白, 5~7 示从可溶性蛋白中亲和纯化的 *AtPLC6* 重组蛋白, M 示蛋白质分子量标准

以 PIP_2 为底物, 测定了纯化的 *AtPLC6* 重组蛋白在不同 Ca^{2+} 浓度下的水解 PIP_2 产生 IP_3 的量, 以此来检测酶活性. 结果表明(图 4), Ca^{2+} 浓度对 *AtPLC6* 重组蛋白水解 PIP_2 产生 IP_3 的比活力影响很大. 在实验设定的 Ca^{2+} 浓度范围内, 反应体系中无 Ca^{2+} 时, 重组蛋白比活力为 $246.7 \pm 54.0 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 之后随加入 Ca^{2+} 浓度的增加而升高, 在 Ca^{2+} 浓度达 $10 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 时重组蛋白比活力达到最高, 为 $1113.6 \pm 330.7 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$; 当反应体系中 Ca^{2+} 达 $100 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 以上时, 重组蛋白比活力明显降低, 仅为 $341.2 \pm 92.3 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

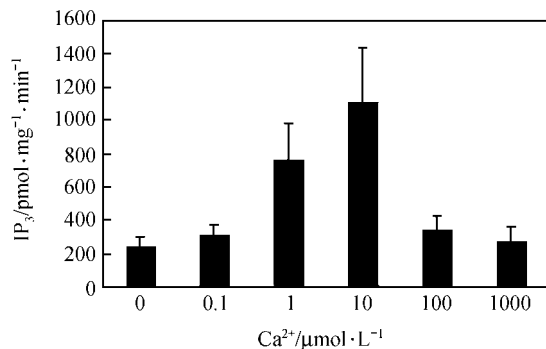


图 4 不同 Ca^{2+} 浓度下 *AtPLC6* 重组蛋白水解 PIP_2 的比活力测定结果

2.3 *AtPLC6* mRNA 的转录水平检测

用 *AtPLC6* 特异性片段作探针的 Northern 结果表

明, *AtPLC6* 在拟南芥根、茎、叶、花、果实和幼苗中都有表达, 只是茎、叶和花中表达略高于其他组织(图 5).

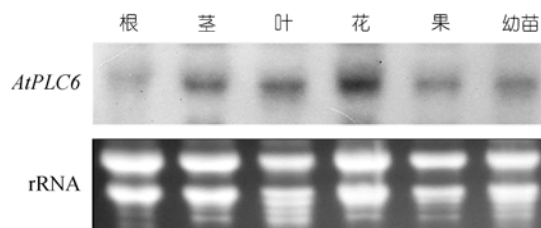


图 5 *AtPLC6* mRNA 在拟南芥不同组织中的表达

为了观察 *AtPLC6* mRNA 的转录受环境刺激的影响, 本实验首先用 ABA, NaCl, 热和冷等胁迫处理植株, 12 h 后取样提取 RNA 并进行 Northern 检测. 结果表明, 植株中 *AtPLC6* mRNA 的转录水平明显受冷胁迫的诱导, 而 ABA, NaCl, 热胁迫的影响较小(图 6(a)). 为研究冷胁迫对 *AtPLC6* mRNA 的转录水平诱导的时间进程, 本实验进一步选取冷处理的不同时间点取样. 结果发现, *AtPLC6* mRNA 的转录水平在 48 h 内出现 2 个高峰, 即在处理后的 1~2 h 出现一高峰(图 6(b)), 而后逐渐降低, 到 6 h 恢复到处理前的水平; 在 24 h 又出现高峰, 而后又逐渐降低, 48 h 基本恢复到处理前的水平(图 6(b)).

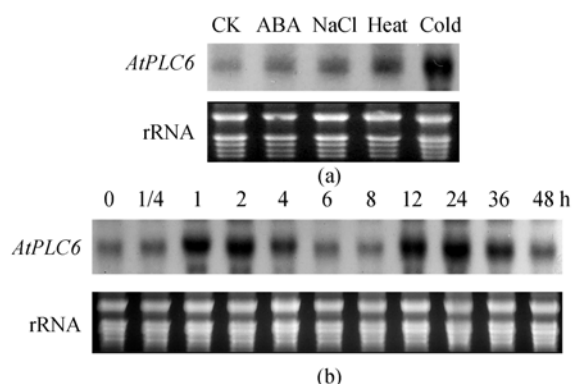


图 6 胁迫处理对拟南芥 *AtPLC6* mRNA 表达的影响 (a) 不同胁迫处理 12 小时的 *AtPLC6* mRNA 的 Northern blot; (b) 冷处理诱导 *AtPLC6* mRNA 表达的 Northern blot

3 讨论

拟南芥基因组测序的完成为新基因的克隆带来了许多便利. 研究者通过序列分析可以预测未知基因, 但基因组中预测的基因是否在植株中真正表达才是研究该基因功能的前提. 本文在拟南芥 EST 库

筛选的基础上,根据预测的基因序列克隆到了含全长编码区序列的 *AtPLC6* cDNA. 将克隆的 *AtPLC6* cDNA 序列与预测的基因序列比较发现,预测的基因序列在外显子的连接处并不正确. 如第4与第5个外显子连接处预测的基因序列比 *AtPLC6* cDNA 少48个核苷酸,第6与第7个外显子连接处比 *AtPLC6* cDNA 多21个核苷酸,预测基因序列的第1个外显子比 *AtPLC6* cDNA 多50个核苷酸.

动物中PI-PLC的结构分析表明, δ -型PLC一般含有PH结构域、EF手型结构域、X结构域、Y结构域和C2结构域等5个保守结构域,其中PH结构域不仅与酶分子结合质膜和脂类底物相关,而且参与酶的催化过程;C2结构域与酶作用于磷脂的 Ca^{2+} 依赖性有关;X结构域和Y结构域为酶的催化部位,而EF手型结构则与酶活性调节有关^[24-26]. 虽然目前尚未见到纯化的植物PI-PLC蛋白的氨基酸序列的报道,但从已克隆的基因编码的氨基酸序列分析,植物中PI-PLC均无PH结构域,这是区别于动物 δ -型PI-PLC的显著特征^[27]. 除对 Ca^{2+} 的依赖性确定外,植物PI-PLC酶的活性调节机制还不清楚,由于氨基酸序列中缺乏PH结构域,推测它们与质膜或PIP₂作用方式会与动物 δ -型PLC不同. 植物中C2结构域已被证明有结合 Ca^{2+} 的功能,删除组成C2结构域的拟南芥 *AtPLC2* 重组蛋白失去与脂囊泡的结合能力,显示C2结构域还可能兼有动物 δ -型PLC中PH结构域的结合质膜或PIP₂的功能^[27,28]. *AtPLC2*的EF手型结构域的氨基酸被删除会导致酶的活性丧失,证明EF手型结构域为其活性所必需的^[27]. 经对本文克隆的*AtPLC6*基因编码的蛋白质的结构预测发现,其含有EF手型结构域、X结构域、Y结构域和C2结构域,具植物典型PI-PLC的结构特征^[29],结构上类似于动物的 δ -型PI-PLC^[30].

对原核表达的重组蛋白的体外活性分析表明,多数表达的植物PI-PLC表现出对PIP₂或PI底物的水解活性,也有个别的重组蛋白(如豌豆PsPLC)无法作用于任何一种底物,与某些动物PI-PLC类似^[28]. 本文结果显示,*AtPLC6*能水解PIP₂产生IP₃和DAG,在10 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 浓度下水解PIP₂活性最高,是0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 时的4倍; Ca^{2+} 浓度达100 $\mu\text{mol/L}$ 和1 mmol/L水平时水解PIP₂的活性显著降低,这种 Ca^{2+} 浓度依赖性及最适 Ca^{2+} 范围与已报道的动物 δ -型PI-PLC和多数植物PI-PLC在水解PIP₂时的特性相似

^[31,32]. 但从*AtPLC6*编码的氨基酸序列与已知PI-PLC的同源性来看(图2),与烟草中一种PI-PLC(GenBank登录号:CAA72681)相似程度最高,而与拟南芥中已发现的PI-PLC的相似性较高的是*AtPLC5*,且这种序列相似区域主要集中于动、植物PI-PLC中都保守的X结构域和Y结构域(相似性达90%以上);因此,我们可以初步确定克隆的*AtPLC6*为一新克隆的拟南芥PI-PLC基因.

用PI-PLC特异性抑制剂U-73122的实验显示,在PI-PLC活性被抑制的同时,烟草气孔对ABA的反应及 Ca^{2+} 振荡现象也均被抑制,表明PI-PLC参与了植物气孔开关的调控过程^[12]. 最近,Mills等人^[33]在烟草中的研究则进一步揭示PI-PLC只与ABA抑制气孔开张有关,而与ABA诱导的气孔关闭无关;Sanchez等人^[14]的研究发现,拟南芥中胁迫诱导的*AtPLC1S*的反义基因诱导表达可以明显减弱ABA对拟南芥种子萌发和幼苗生长的抑制作用,但*AtPLC1S*的过表达却未诱导ABA-诱导基因,揭示出*AtPLC1S*的表达不仅与胁迫诱导相关,而且还参与了ABA相关的次级信号转导过程,但*AtPLC2*与此过程并不相关. 抑制剂的实验也证实,渗透胁迫时如抑制植物PI-PLC的活性可以抑制一些脱水诱导基因的表达,表明PI-PLC介入了植物适应渗透胁迫的调节过程^[34]. 病原菌激发子和PI-PLC抑制剂处理西红柿细胞的实验证明,PI-PLC对防御反应的发生是必需的^[35]. 豌豆中PsPLC的启动子序列中光响应顺式元件的发现,提示该基因可能与植株对光的响应过程有关^[28]. 总之,越来越多的证据显示,植物中的PI-PLC可能直接或间接地介入了多个重要生理反应和细胞信号转导过程. 拟南芥基因组中存在的PI-PLC同源基因中,*AtPLC2*为组成型表达基因^[3],*AtPLC1F*为开花特异性诱导表达基因^[5],*AtPLC1S*^[6]和*AtPLC1G*^[36]为胁迫诱导表达基因;本文克隆的*AtPLC6*基因在不同组织中都有较低表达,但在冷胁迫时被明显诱导(图6),至于这种诱导是冷胁迫的结果,还是植株响应冷胁迫的信号转导途径中直接起作用、*AtPLC6*预测的不同结构域的功能如何,乃至不同基因在拟南芥植株的生长发育及胁迫适应中的确切生物学功能,尚有待进一步研究.

致谢 拟南芥cDNA文库CD4-7由美国拟南芥生物资源中心馈赠;本工作为国家重点基础研究发展规划(批准号:2003CB114304)、国家自然科学基金(批准号:30270664,30370140和30170457)和教育部优秀青年教师资助计划资

助项目.

参 考 文 献

- Berridge M J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 1993, 361: 315~325[DOI]
- Melin P M, Pical C, Jergil B, et al. Polyphosphoinositide phospholipase C in wheat root plasma membranes. Partial purification and characterization. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 123: 163~169
- Einspahr K J, Peeler T C, Thompson G Jr. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phospholipase C and phosphomonoesterase in *Dunaliella salina* membranes. *Plant Physiol*, 1989, 90: 1115~1120
- Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, et al. A gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 903~3907
- Hirayama T, Ohto C, Mizoguchi T, et al. *AtPLC2*, a gene encoding phosphoinositide-specific phospholipase C, is constitutively expressed in vegetative and floral tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 1997, 34: 75~180
- Yamamoto Y T, Conkling M A, Sussex I M, et al. An *Arabidopsis* cDNA related to animal phosphoinositide-specific phospholipase C genes. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1029~1030[DOI]
- Kopka J, Pical C, Gray J E, et al. Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol*, 1998, 116: 239~250[DOI]
- Shi J, Gonzales R A, Bhattacharyya M K. Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant J*, 1995, 8: 381~390[DOI]
- Pical C, Kopka J, Muller-Rober J, et al. Isolation of 2 cDNA clones for phosphoinositide-specific phospholipase C from epidermal peels and guard cells of *Nicotiana rustica* (PGR97-086). *Plant Physiol*, 1997, 114: 747~749[DOI]
- Chapman K D. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends Plant Sci*, 1998, 11: 419~246[DOI]
- Ettlinger C, Lehle L. Auxin induces rapid changes in phosphatidylinositol metabolites. *Nature*, 1988, 331: 176~178[DOI]
- Staxen I, Pical C, Montgomery L T, et al. Absciscic acid induces oscillations in guard cell cytosolic free calcium that involve phosphoinositide-specific phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 1779~1784[DOI]
- Hunt L, Mills L N, Pical C, et al. Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *Plant J*, 2003, 34: 47~55
- Sanchez J P, Chua N H. *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to absciscic acid signals. *Plant Cell*, 2001, 13: 1143~1154[DOI]
- Morse, M J, Crain R C, Satter R L. Light-stimulated inositol phospholipid turnover in *Samanea saman* leaves pulvini. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 7075~7078
- Perera I Y, Heilmann I, Boss W F. Transient and sustained increases in inositol 1,4,5-trisphosphate precede the differential growth response in gavisstimulated maize pulvini. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 5838~5843[DOI]
- Kurosaki F, Tsurusawa Y, Nishi A. Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Plant Physiol*, 1987, 85: 601~604
- Franklin-Tong V E, Drøbak B K, Allan A C, et al. Growth of pollen tubes of *papaver rhoeas* is regulated by a slow-moving calcium wave propagated by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Plant Cell*, 1996, 8: 1305~1321[DOI]
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-saltstress. *Plant Cell*, 1994, 6: 251~264[DOI]
- Lin R C, Ding Z S, Li L B, et al. A rapid and efficient DNA mini-preparation suitable for screening transgenic plants. *Plant Mol Biol Reptr*, 2001, 19: 379a~379e
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680~685
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350~4354
- Church G, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 1991~1995
- Essen L O, Perisc O, Cheung M, et al. Crystal structure of mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Nature*, 1996, 380: 595~602[DOI]
- Paterson H F, Savopoulos J W, Perisc O, et al. Phospholipase C delta 1 requires a pleckstrin homology domain for interaction with the plasma membrane. *Biochem J*, 1995, 312: 661~666
- Nakashima S, Banno Y, Watanabe T, et al. Deletion and site-directed mutagenesis of EF-hand domain of phospholipase C-delta 1: Effects on its activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 211: 364~369[DOI]
- Otterhag L, Sommarin M, Pical C. N-terminal EF-hand-like domain is required for phosphoinositide-specific phospholipase C activity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 2001, 497: 165~170
- Venkataraman G, Goswami M, Tuteja N, et al. Isolation and characterization of a phospholipase C delta isoform from pea that is regulated by light in a tissue specific manner. *Mol Genet Gen*, 2004, 270: 378~386
- Mueller-Roeber B, Pical C. Inositol phospholipid metabolism in *Arabidopsis*. Characterized and putative isoform of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol*, 2002, 130: 22~46[DOI]
- Suh P G, Ryu S H, Moon KH, et al. Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase C. *Cell*, 1988, 54: 161~169
- Drøbak B K. The plant phosphoinositide system. *Biochem J*, 1992, 288: 697~712
- Kopka J, Pical C, Gray J E, et al. Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol*, 1998, 116: 239~250[DOI]
- Mills L N, Hunt L, Leckie C P, et al. The effects of manipulating phospholipase C on guard cell ABA signalling. *J Exp Bot*, 2004, 395: 199~204
- Munnik T, Meijer H J. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Letters*, 2001, 498: 172~178[DOI]
- Laxalt A M, Munnik T. Phospholipid signalling in plant defence. *Cur Opin in Plant Biol*, 2002, 5: 1~7[DOI]
- Hartweck L M, Llewellyn D J, Dennis E S. The *Arabidopsis thaliana* genome has multiple divergent forms of phosphoinositide-specific phospholipase C1. *Gene*, 1997, 202: 151~156[DOI]

(2003-10-24 收稿, 2004-01-09 收修改稿)