

丹参普遍胁迫蛋白基因(*SmUSP*)的克隆及表达模式分析

邝静, 生华, 武玉翠, 葛茜, 张媛, 王喆之*

药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西师范大学生命科学院, 西安 710062

摘要: 通过BLAST比对分析丹参EST数据库, 发现一个与普遍胁迫蛋白(USP)基因家族同源性较高的基因序列, 命名为*SmUSP*, GenBank登录号为JX416284。依据该序列, 从DNA和cDNA水平克隆得到该基因全长, 经分析发现该基因无内含子序列, 包含一个长711 bp的完整开放读码框(ORF), 编码236个氨基酸残基。生物信息学分析显示, *SmUSP*编码蛋白的相对分子量25.5 kDa, 为无信号肽和跨膜结构域的疏水酸性蛋白; *SmUSP*具有UspA结构域和ATP结合位点, 属于USP蛋白UspFG亚家族。实时荧光定量PCR分析表明, *SmUSP*在丹参的根、茎、叶、花中均有表达, 在根中的表达量较高。同时, *SmUSP*表达受茉莉酸甲酯(MeJA)、水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)以及脱水胁迫的上调诱导, 推测该基因可能在丹参防御反应中发挥作用。

关键词: *SmUSP*; 生物信息学分析; 表达模式分析

Cloning and Expression Analysis of Universal Stress Protein Gene (*SmUSP*) from *Salvia miltiorrhiza* Bunge

KUANG Jing, SHENG Hua, WU Yu-Cui, GE Qian, ZHANG Yuan, WANG Zhe-Zhi*

Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education; National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China; College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: A sequence showed high homology with universal stress proteins (USPs) was found by BLAST searching in EST database of *Salvia miltiorrhiza*. The full-length cDNA and gDNA sequences of the gene were cloned and named as *SmUSP*. The GenBank accession number is JX416284. *SmUSP* contained an intact open reading frame (ORF) of 711 bp without intron and encoded 236-amino acid peptides. Bioinformatic analysis showed *SmUSP* was a stable acidic protein with a predicted molecular weight of 25.5 kDa. There is no signal peptides and transmembrane domain in *SmUSP*. *SmUSP* protein has an UspA domain with an ATP-binding site and can be classified into the UspFG subfamily of USP. The results of real-time quantitative PCR revealed that *SmUSP* was expressed in roots, stems, leaves and flowers of *S. miltiorrhiza*, and most abundant in roots. Up-regulated expression of *SmUSP* could be induced by methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA) and drought, indicating that *SmUSP* might be involved in plant defenses.

Key words: *SmUSP*; bioinformatics analysis; expression analysis

普遍胁迫蛋白(universal stress protein, USP)是一个古老、保守的蛋白家族, 参与大量胁迫应答反应(Sauter等2002)。最早于大肠杆菌(*Escherichia coli*) K-12 strain W3110中被发现(VanBogelen等1990)。在高等植物中, USP的发现起始于Sauter等(2002)在水稻(*Oryza sativa*)水淹胁迫差减文库的构建。2008年, 王慧梅等(2008)利用抑制性消减杂交技术构建了干旱胁迫下黄檗(*Cortex phellodendri*)幼苗的消减文库, 然后对获得的EST序列分析发现USP基因的表达丰度较高, 这说明干旱胁迫可以上

调该基因的表达。之后, USP在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、紫云英(*Astragalus sinicus*)等高等植物中也相继被发现(Chou等2007; Kerk等2003)。该蛋白几乎与所有胁迫和饥饿应答有关(Nyström和Neidhardt 1993), 因而吸引了大量研究者对其基因

收稿 2012-12-03 修定 2013-03-12

资助 陕西省自然科学基金研究计划项目(2012JQ4013)、中央高校基本科研业务费专项资金资助(GK201102017)、陕西教育学院自然科学基金(2012KJ044)。

* 通讯作者(E-mail: zzwang@snnu.edu.cn; Tel: 029-85301260)。

表达及功能进行全面研究。

USP属于自磷酸化丝氨酸和苏氨酸的磷酸蛋白,可作为GTP和ATP的磷酸供体(Freestone等1997)。大肠杆菌USP基因家族被分为6类基因,分别为*uspA*、*uspC*、*uspD*、*uspE*、*uspF*和*uspG*(Gustavsson等2002)。USP相关蛋白根据Usp域的序列相似性可分为两个亚家族:UspA、UspC和UspD属于一类,命名为UspA亚家族;UspF和UspG属于另一类,命名为UspFG亚家族。UspE是一个串联型的USP,它的第一个结构域与UspFG亚家族相近,而第二个结构域却更接近UspA亚家族。目前在其他物种中发现的USP蛋白大多属于UspA亚家族。基于多序列比对UspA结构域的系统发生树分析,UspA亚家族也可分为结合ATP和不结合ATP两大类。而UspFG亚家族的USP蛋白均含有ATP结合位点,ATP结合保守结构域的特征序列是G-2X-G-9X-G[S/T](Oh等2009)。Mushegian和Koonin(1996)认为UspA结构域具有DNA结合特性,推测其可能有保护DNA的功能。本研究中的SmUSP蛋白有UspA结构域,并且含ATP结合位点G-2X-G-9X-G[S/T]序列结构,属于USP蛋白UspGF亚家族(VanBogelen等1990)。

丹参为唇形科(Labiatae)鼠尾草属多年生草本植物,以其干燥根及根茎入药,味苦,性微寒,具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦等功效,在临床上被广泛应用于心脑血管疾病、癌症以及各种炎症的治疗,是重要的大宗药材之一(冯玲玲和周吉源2004)。本研究从丹参中克隆得到一个USP蛋白基因*SmUSP*,采用生物信息学方法对该基因及其推导的氨基酸序列从氨基酸组成、理化性质、疏水性、亚细胞定位及结构功能域等方面进行了预测和分析,通过实时荧光定量PCR检测分析*SmUSP*的表达特征。

材料与方 法

1 材料与试剂

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)种子收集于陕西商洛药用基地。种子发芽后,实生苗于RXZ-2500D人工气候箱(宁波江南仪器有限公司)中培养。培养条件为:温度(25±2)℃;光强150 μmol·m⁻²·s⁻¹;光周期为光照16 h/黑暗8 h;湿度48%。培养2个月

的丹参实生苗用于本研究的各项实验。

RNA提取试剂盒、反转录试剂盒和DNase消化试剂购自OMEGA公司;SYBR Green II Premix Ex Taq、pMD19-T simple vector购自TaKaRa公司;大肠杆菌DH5α为本实验室保存。

2 材料处理方法

取丹参盛花期不同部位新鲜组织,液氮速冻后于-80℃储藏,用于基因器官特异性的表达检测。本研究中所选取的处理浓度均为经过不同浓度处理的梯度实验筛选而得到的最适浓度。

茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)处理时,用500 μmol·L⁻¹ MeJA溶液喷洒于二月龄的丹参实生苗表叶面,分别于处理后0、0.5、2、4、6、8、12、48、72 h取样。

水杨酸(salicylic acid, SA)处理时,用500 μmol·L⁻¹ SA溶液喷洒于二月龄的丹参实生苗表叶面,分别于0、1、2、4、6、12、24和60 h取样。

脱落酸(abscisic acid, ABA)处理时,用100 μmol·L⁻¹ ABA溶液喷洒于二月龄的丹参实生苗表叶面,分别于0、0.5、1、2、6、8、10和12 h取样。

干旱胁迫处理时,将二月龄的丹参实生苗从营养钵中小心地转移至干燥的滤纸上,室温下进行失水胁迫,分别于开始处理后的0、10、20、40、60、120、180和240 min取样。

取经处理的二月龄丹参全株为样品,收集后迅速放入PE袋中,置于液氮中速冻,5 min后取出,置于-80℃冻存备用。

3 核酸提取

采用CTAB法(郝岗平等2006)提取丹参总DNA。用OMEGA公司试剂盒提取丹参根、茎、叶、花以及各处理样品中的总mRNA,按照反转录试剂盒PrimeScript[®] RT Reagent Kit (TakaRa公司)说明书,以总mRNA为模板合成cDNA第一链。

4 丹参*SmUSP*基因的克隆

依据本实验室构建的丹参EST数据库中*SmUSP*的序列信息,采用Primer Premier 5.0软件设计特异性引物:5'-ATGGCATCACCAGGCAAACC-3'和5'-CAAAGAATGAATCCTCGTCGCA-3'。分别以丹参gDNA和cDNA为模板,扩增*SmUSP*片段。反应程序为:95℃预变性4 min;95℃变性30 s,57℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10

min. PCR扩增产物经胶回收后与pMD19-T simple vector连接, 转化至大肠杆菌DH5 α , 送至上海桑尼生物科技有限公司测序。

5 SmUSP的生物信息学分析

采用DNASar及http://www.ncbi.nlm.nih.gov/、http://www.ebi.ac.uk/、http://www.cbs.dtu.dk/、http://cn.expasy.org/等网站提供的各类生物信息学软件进行分析(Mount等2003; Baxevanis和Ouellette 2000)。核酸及氨基酸序列的组成分析、理化性质分析、开放阅读框(open reading frame, ORF)的查找和翻译与保守结构域的预测利用DNASar软件及ProtParam、pI/MV、ORF Finder、NCBI-CDS等在线工具进行; 核酸及氨基酸序列的同源性比对、多序列比对利用NCBI网站上的BLAST和

Clustal W在线工具完成; 蛋白质信号肽的预测、跨膜结构域及亲水性/疏水性的分析利用在线工具SignalP、TMHMM和ProtScale完成。

6 丹参SmUSP基因的表达分析

分别以丹参根、茎、叶、花以及经MeJA、SA、ABA和脱水处理的cDNA样品为模板进行实时荧光定量PCR分析。以持家基因(*SmActin*, DQ243702)为内参, 引物序列见表1。反应条件为: 95 °C变性3 min; 95 °C变性10 s, 60 °C退火30 s, 40个循环。每个样品3个技术重复及2次生物学重复。数据分析采用“ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ”的方法(Vandesompele等2002), 并用SPSS 13.0中one-way ANOVA方法进行单因素方差分析, 利用Tukey test分析各样品间基因表达的显著性($P < 0.05$)。

表1 实时荧光定量PCR检测SmUSP基因表达所用引物

Table 1 List of primers used for the analysis of the expression of *SmUSP* by real-time quantitative PCR

基因	扩增产物长度/bp	引物名称	序列
<i>SmUSP</i>	300	SmUSP-R	5'-CACCAGGCAAACCTCGGAA-3'
		SmUSP-F	5'-CCAGTTTCTGCTGCGATTCT-3'
<i>SmActin</i>	278	SmActin-R	5'-GGTGCCCTGAGGTCTGT-3'
		SmActin-F	5'-AGGAACCACCGATCCAGACA-3'

结果与讨论

1 SmUSP基因的克隆与生物信息学分析

分别从丹参gDNA和cDNA水平上克隆得到*SmUSP*基因(图1)。序列分析表明*SmUSP*基因包含一个全长711 bp的完整开放读码框, 不含内含子, 编码236个氨基酸残基。NCBI网站的BLAST在线工具分析结果显示, *SmUSP*蛋白具有UspA结构域(图2-A), 属于USP蛋白家族, 且含有UspFG亚家族典型的ATP结合位点G-2X-G-9X-G[S/T]结构序列(图2-B)。该基因编码蛋白的理论分子量为25.5 kDa, 理论等电点为5.26, 不稳定常数[instability index (II)]为35.69, 说明该蛋白是一个稳定的酸性蛋白。

疏水性是指氨基酸远离周围水分子、将自己包埋进蛋白质核心的相对趋势, 是蛋白质三维空间构象的影响因素之一(翟中和等2000)。疏水性/亲水性的预测和分析有助于了解蛋白的性质, 并为进一步预测其高级结构提供参考信息。利用ProtScale软件对丹参*SmUSP*氨基酸序列的疏水性/

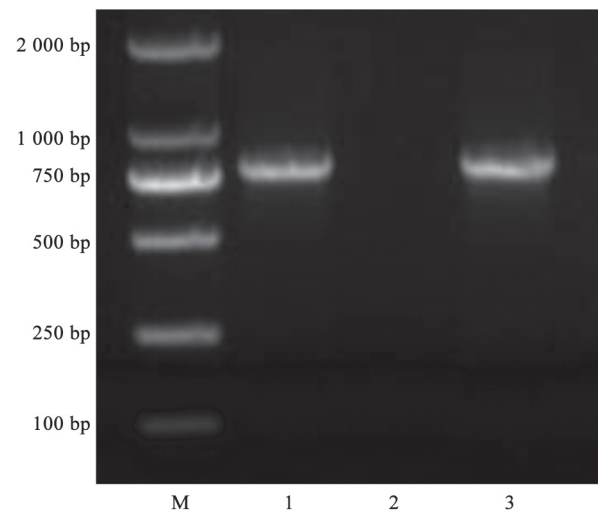


图1 *SmUSP*基因的PCR扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products of *SmUSP* gene
M: DL2000 Marker; 1: 模板为cDNA的扩增片段; 2: 不加模板的阴性对照; 3: 模板为gDNA的扩增片段。

亲水性进行预测, 结果显示, 最低值为-3.389, 最高值为2.356, 总体表现为疏水性。

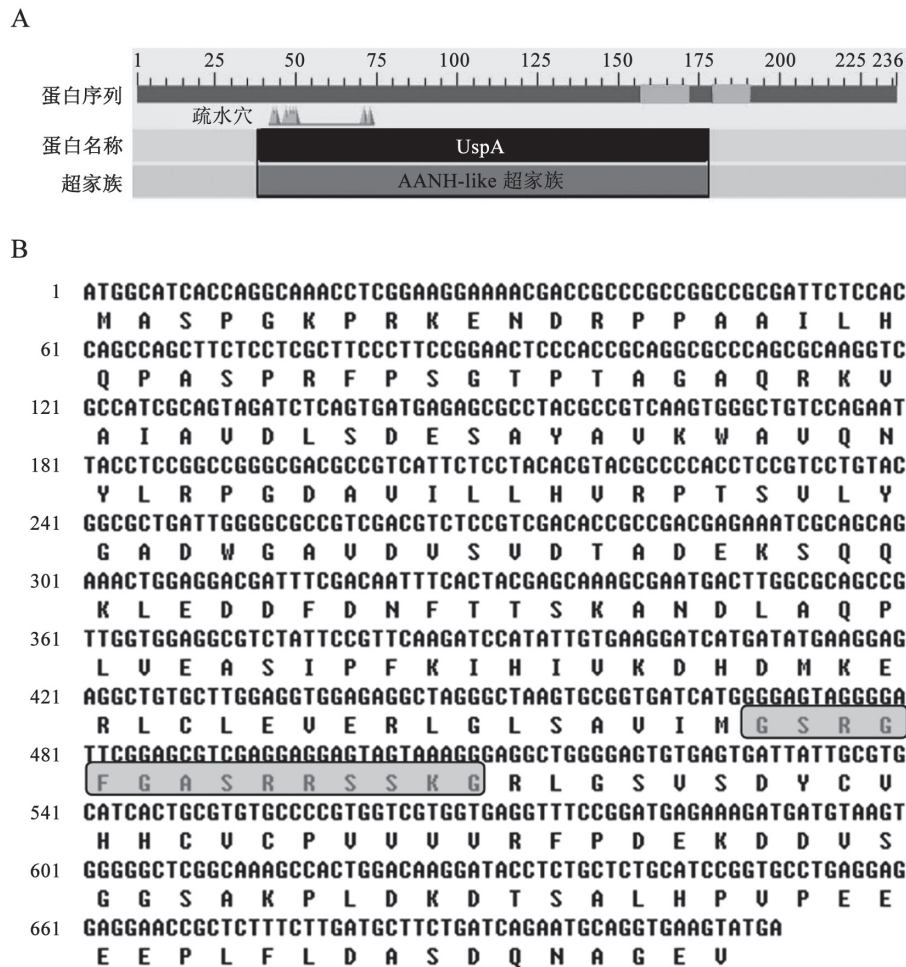


图2 SmUSP蛋白序列特征以及基因核酸序列和其编码蛋白序列

Fig.2 Sequence character of SmUSP and its nucleotide sequence and amino acid sequence

A: SmUSP蛋白保守结构域。蛋白序列上的数字表示组成SmUSP蛋白的氨基酸序号;三角表示组成疏水穴的8个氨基酸。B: *SmUSP*基因的核酸序列及其编码的蛋白序列。阴影表示G-2X-G-9X-G[S/T]基序(即ATP结合位点)。

信号肽(signal peptide)的预测和分析对认识和理解蛋白质的细胞定位及功能有重要意义。信号肽是位于蛋白质N端的信号序列,与蛋白质到不同的细胞器或细胞质基质的特定部位转运和分选相关(Nielsen等1997)。利用SignalP 3.0程序对SmUSP氨基酸序列的信号肽进行预测(Bendtsen等2004; Nyström和Neidhardt 1992),结果显示,SmUSP不具有信号肽,不存在信号肽酶切位点,据此推测SmUSP蛋白是定位于细胞质中的胞内蛋白。

跨膜结构域一般是由20个左右的疏水氨基酸残基组成的 α -螺旋,固着在细胞膜上起“锚定”作用,是膜脂与膜内在蛋白相结合的主要部位(Nielsen等1997)。利用TMHMM 2.0程序对SmUSP氨基

酸序列的跨膜结构域进行预测,结果显示,SmUSP不具有跨膜结构域,推测其可能游离在细胞质中发挥作用。

2 SmUSP蛋白序列特征分析

应用NCBI上的BLASTP在线工具进行序列同源性分析的结果显示,SmUSP蛋白与GenBank已注册的玉米(*Zea mays*) USP蛋白(NP_001149193)、水稻(*Oryza sativa*)胁迫相关蛋白(AAR87267)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) USP蛋白(NP_567770)、葡萄(*Vitis vinifera*) USP蛋白(XP_002281607)、苜蓿(*Medicago truncatula*) USP蛋白(XP_003591542)的同源性分别为:88%、72%、70%、66%和65%。对这6个蛋白进行蛋白序列比对分析的结果

显示, SmUSP在氨基酸序列第157~174位包含有在其他物种中已报道的USP蛋白的保守功能域, 即ATP结合位点(G-2X-G-9X-G[S/T]) (图3), 属于UspFG亚家族。对这6个蛋白理化性质进行分析的结果显示, 其蛋白分子量介于17~28 kDa之间, 理论等电点介于4.7~8.9之间, 其中拟南芥USP蛋白是不稳定的酸性蛋白, 苜蓿USP蛋白是稳定的碱性蛋白, 其他均为稳定的酸性蛋白。

3 SmUSP基因的表达水平检测

植物营固着生活, 需要适应周围不断变化的环境。受外界刺激时, 植物通过信号网络做出响应, 这对其生存和进化具有重要意义(刘庆霞等2012)。

目前, USP基因已在很多物种中发现。研究

表明USP蛋白可在许多情况下被诱导表达, 比如: C、N、磷酸盐、硫酸盐及必需氨基酸的缺乏, 有毒化学物质处理, 包括重金属、氧化剂、酸、乙醇、抗生素, 热击和DNA损伤等(Cheong和Choi 2003; Nyström和Neidhardt 1994)。这说明USP参与了这一系列胁迫条件下的细胞抗逆反应。且大多数USP基因都受到不同激素和胁迫的诱导表达, 说明其在植物防御反应中发挥重要作用。

基因的表达模式分析可为基因功能的揭示提供重要的线索。本研究在分析SmUSP基因的不同器官表达模式后发现, SmUSP在丹参的根、茎、叶、花中均有表达, 表达量由高到低依次为: 根>花>茎>叶(图4)。统计分析表明, 根中的表达量与

1 苜蓿USP蛋白	-----MASASSEQKSKP---VMLVAI	18
2 水稻胁迫相关蛋白	-----MEEKGASPAAAAATSGEPGAAAGTMKVVAV	31
3 丹参SmUSP蛋白	MASFG-KPRKENDRF--PAAILH-----QPASPRFP---SGTPTAGAQRKVAIAV	44
4 玉米USP蛋白	MATNP-SNGAGADVPAAPAAVRLSVAQAQAATQPSSPRFFSSLAGTNPASPHRRITAV	59
5 拟南芥USP蛋白	MNPDSDYPHLPNIKIDHFSRP RHS-----HHSSSTP-SAAATPTTAGARRKIGVAV	51
6 葡萄USP蛋白	-----MAKDRKIGVAV	11
	: : * :	
1 苜蓿USP蛋白	DES DHSAYALKWTL D H F F S T N N E V F K L V L V H A R P A A T S S V G -----L A G P G A -----	65
2 水稻胁迫相关蛋白	D A S E E S L N A L S W A L D N V I G R R A G A V S V V V W H A Q H G P D H F V Y P V A A H A I A Y A F -----	83
3 丹参SmUSP蛋白	D L S D E S A Y A V K W A V Q N Y L R P G D A V I L L H V R P T S V L Y G A D W G A V D V S V I T A D -----	95
4 玉米USP蛋白	D L S D E S A F A V K W A V Q N Y V R P G D A W L L H V R P T S V L Y G A D W G S I P V S V A E D D A A E D A A A A	119
5 拟南芥USP蛋白	D L S E S A F A V R W A V D H Y I R P G D A W I L H V S P T S V L F G A D W G P L P L Q T P P P S A A T D F ---	108
6 葡萄USP蛋白	D F S Q G S N I A L K W A I D N L L D K G I T L F F I H V K F S Q G D E S R N L L W S A T G S P L I P L -----	63
	* * : * * : * : : : . . : : :	
1 苜蓿USP蛋白	-----A E V L P I V D S D L R K I A A R V A E N A K Q L C I K K S V N D V I V E V V E G D A R N V L C D T V E K	118
2 水稻胁迫相关蛋白	-----A S A I E S M R K A Q E E I S R K V V S R A L D V C R Q R E V S - A T G A I V E G D A K E A I C Q A V E E	135
3 丹参SmUSP蛋白	-----E K S Q Q K L E D D F D N F T T S K A N D L A Q F L V E A S I P F K I H I V K D H D M K E R L C L E V E R	148
4 玉米USP蛋白	A E G D P S E E E L Q K K R E E D Y D A F T S T K A Q D L A Q F L V D A Q I P F K I H V V K D H D M K E R L C L E A E R	179
5 拟南芥USP蛋白	-----G A Q P K F S Q E D F D A F T S S K V A D L A K F L K E A G F P H K I H I V K D H D M R E R L C L E T E R	161
6 葡萄USP蛋白	-----E E F R D L D V A Q K Y E I N L D P E F L G M L A T A S S Q K K A K I I A K I Y W G D A R D K L C D A V A E	117
	. . . : * : : * . . .	
1 苜蓿USP蛋白	Y R A S I L V V G S H G Y G A I K R -- A V L G S V S D Y C A H H A C T V M I V K K P K T K H -----	164
2 水稻胁迫相关蛋白	M H A D M L V I G S R G L G K I K R -- A F L G S V S D Y L V H H A C C F V L V K P T K A H D K -----	182
3 丹参SmUSP蛋白	L G L S A V I N G S R G F G A S R R S S K G R L G E V S D Y C V H H C V C P V W V V R F P D E K D I V S --- G G S	203
4 玉米USP蛋白	L G L S A M I N G S R G F G A S R K G S K G R L G E V S D Y C V H H C V C P V W V V R Y P D D A A D A G ----- G D A	234
5 拟南芥USP蛋白	L N L S A V I N G S R G F G A E K R G S D G K L G E V S D Y C V H H C V C P V W V V R Y P D D R D G P A P P G N V G A T	221
6 葡萄USP蛋白	L K L D S L V I N G S R G L G I I Q R -- T F L G S V T N Y M M W A T C P V T I V K D P S S H G F -----	164
	. : : * * * * : : * * * : * * * * : * : . .	
1 苜蓿USP蛋白	-----	
2 水稻胁迫相关蛋白	-----	
3 丹参SmUSP蛋白	A K P L D K D T S A L H P V P E E E E --- P L F L D A S D Q N A G E V ---	236
4 玉米USP蛋白	S G --- V T D E L H T V P E D E --- P V Y H D A P E W Q K E N ---	261
5 拟南芥USP蛋白	R E A I V T V K S R R D D D D D D E D H E A K I A A A A S D H H E H I K D E	260
6 葡萄USP蛋白	-----	

图3 SmUSP与其他植物USP蛋白的多序列比对

Fig.3 Comparison of amino acid sequence of SmUSP with that of other USPs

*表示6个蛋白都相同的氨基酸残基; :表示4个蛋白都相同的氨基酸残基; -代表3个蛋白都相同的氨基酸残基; 方框内表示ATP结合位点。

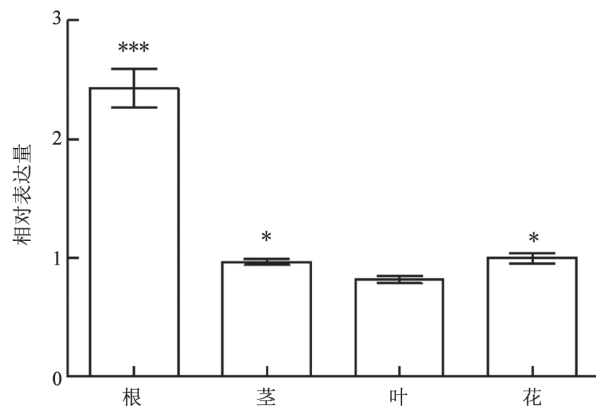


图4 *SmUSP*基因在丹参不同器官的表达水平
Fig.4 The expression levels of *SmUSP* in different organs of *S. miltiorrhiza*
* $P<0.05$; *** $P<0.001$.

茎、叶和花中的表达量有显著差异。

茉莉酸(酯)类物质是与抗性密切相关的植物生长调节物质, 它作为内源信号分子参与植物在机械伤害、病虫害、干旱、盐胁迫、低温等条件

下的抗逆反应。在植物受到伤害时, 植物体内茉莉酸及其衍生物的含量显著增加, 进而诱导一系列与抗逆有关的基因表达, 如蛋白酶抑制剂、硫蛋白和苯丙氨酸转氨酶等, 提高酯氧合酶活性, 从而增强植物的抗性(Cutler等2010)。ABA可调节植物对低温、干旱、盐碱及病原菌等多种逆境的抗性反应(Kim等2010)。SA与植物抗病性有关。本研究结果显示, $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MeJA胁迫处理后, *SmUSP*表达量在12 h达到最大, 约为对照组(0 h)的3.9倍(图5-A); $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA处理后, *SmUSP*表达量在1 h达到最大, 约为对照组(0 h)的10倍(图5-B); $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA处理后, *SmUSP*表达量在0.5 h达到峰值, 之后在检测的8 h内表达量有递减趋势, 在10 h时与对照持平(图5-C)。脱水胁迫后, *SmUSP*的表达量在20 min时达到最低值, 之后在检测的240 min内表达量呈递增趋势(图5-D)。因此推测*SmUSP*基因可能在植物防御反应中发挥作用。

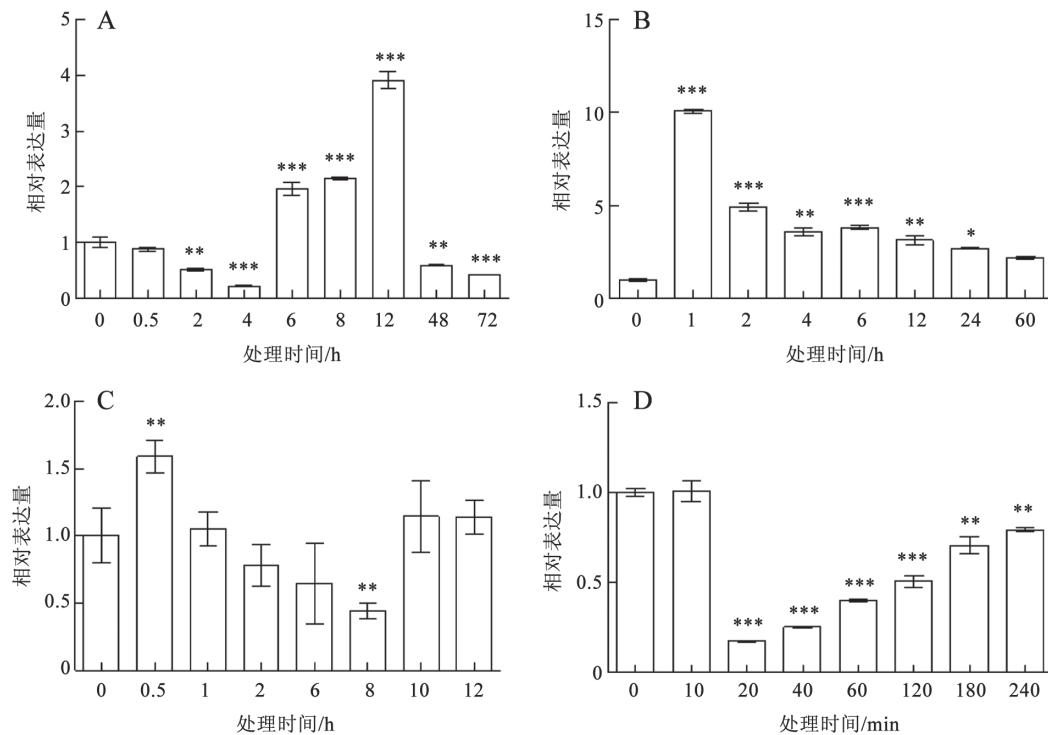


图5 *SmUSP*基因受MeJA (A)、SA (B)、ABA (C)、干旱(D)诱导或胁迫下的表达
Fig.5 Expression patterns of *SmUSP* gene under MeJA (A), SA (B), ABA (C) or drought treatments
* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

参考文献

- 翟中和, 王喜忠, 丁明孝(2000). 细胞生物学. 北京: 北京高等教育出版社, 191~193
- 冯玲玲, 周吉源(2004). 丹参的研究现状与应用前景. 中国野生植物资源, 23 (2): 4~7
- 郝岗平, 边高鹏, 张媛英(2006). 泰山白花丹参干叶片高质量DNA的提取. 中草药, 37 (6): 855~857
- 刘庆霞, 李梦莎, 国静(2012). 茉莉酸生物合成的调控及其信号通路. 植物生理学报, 48 (9): 837~844
- 王慧梅, 王延兵, 祖元刚, 孙莲慧(2008). 干旱胁迫下黄檗幼苗cDNA消减文库的构建和分析. 生物工程学报, 24 (2): 198~202
- Baxeavanis AD, Ouellette BFF (2000). 生物信息学. 李衍达, 孙之荣译. 北京: 清华大学出版社, 231~250
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol, 340: 783~795
- Cheong JJ, Choi YD (2003). Methyl jasmonate as vital substance in plants. Trends Genetics, 19 (7): 409~413
- Chou MX, Wei XY, Chen DS, Zhou JC (2007). A novel nodule-enhanced gene encoding a putative universal stress protein from *Astragalus sinicus*. J Plant Physiol, 164 (6): 764~772
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. Annu Rev Plant Biol, 61: 651~679
- Freestone P, Nystrom T, Trinei M, Norris V (1997). The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis. J Mol Biol, 274: 318~324
- Gustavsson N, Diez A, Nyström T (2002). The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. Mol Microbiol, 43 (1): 107~117
- Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Gribskov M (2003). *Arabidopsis* proteins containing similarity to the universal stress protein domain of bacteria. Plant Physiol, 131 (3): 1209~1219
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. Annu Rev Plant Biol, 61: 561~591
- Mount DW (2003). 生物信息学. 钟扬, 王莉, 张亮译. 北京: 高等教育出版社, 301~345
- Mushegian AR, Koonin EV (1996). Sequence analysis of eukaryotic developmental proteins: ancient and novel domains. Genetics, 144 (2): 817~828
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng, 10 (1): 1~6
- Nyström T, Neidhardt FC (1992). Cloning mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. Mol Microbiol, 6 (21): 3187~3198
- Nyström T, Neidhardt FC (1993). Isolation and properties of a mutant of *Escherichia coli* with an insertional inactivation of the *uspA* gene, which encodes a universal stress protein. J Bacteriol, 175 (13): 3949~3956
- Nyström T, Neidhardt FC (1994). Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. Mol Microbiol, 11 (3): 537~544
- Oh MM, Trick HN, Rajashekar CB (2009). Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. Plant Physiol, 166 (2): 180~191
- Sauter M, Rzewuski G, Marwedel T, Lorbiecke R (2002). The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. J Exp Bot, 53 (379): 2325~2331
- VanBogelen RA, Hutton ME, Neidhardt FC (1990). Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12: edition 3. Electrophoresis, 11 (12): 1131~1166
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paeye A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, 3 (7): 34~45