

青杆*PwUSP2*基因的克隆和表达分析

周燕妮, 李艳芳, 张通, 张凌云*

北京林业大学林学院, 省部共建森林培育与保护教育部重点实验室, 北京100083

摘要: 广泛逆境胁迫蛋白(USPs)参与碳缺乏、缺氧、干旱和高盐等多种非生物胁迫,但在植物中的研究尚不深入。本文通过RACE-PCR的方法获得青杆*PwUSP2*基因的cDNA全长,共987 bp,其中编码区723 bp,共编码240个氨基酸。利用生物信息学工具对其理化性质、二级结构和三级结构进行分析,结果显示,该蛋白理论分子质量为26.84 kDa,理论等电点为4.61,有丝氨酸和苏氨酸结合位点,为非跨膜的亲水蛋白。*PwUSP2*具有USP家族典型的UspA结构域,但无典型的ATP结合位点G-2X-G-9X-G[S/T]。RT-qPCR分析表明,*PwUSP2*在青杆花粉、果实、种子、成熟叶、幼叶、成茎中均有表达,在果实中表达量较高。同时,*PwUSP2*在脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)等非生物胁迫下表达量有明显变化,推测*PwUSP2*可能参与青杆对逆境胁迫的响应。

关键词: 青杆; *PwUSP2*; 组织表达; 胁迫响应

Cloning and Expression Analysis of *PwUSP2* from *Picea wilsonii*

ZHOU Yan-Ni, LI Yan-Fang, ZHANG Tong, ZHANG Ling-Yun*

Key Laboratory of Forest Silviculture and Conservation of the Ministry of Education, College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Universal stress proteins (USPs) involve in multiple abiotic responses including carbon starvation, O₂ deprivation, drought and high salinity; however, it still remains elusive in plants. In this study, the full length cDNA of *PwUSP2* was obtained using RACE-PCR method. Bioinformatics analysis showed that the full length cDNA of *PwUSP2* is 987 bp, including the open reading frame (ORF) 723 bp. The *PwUSP2* contains 240 amino acids with a theoretical molecular weight of 26.84 kDa and theoretical isoelectric points (pI) of 4.61. It is also a hydrophilic protein with serine and threonine binding sites and has non-transmembrane domain. Meanwhile, it has the typical UspA domain of USP family but not the characteristic of ATP-binding site G-2X-G-9X-G[S/T]. RT-qPCR analysis showed that *PwUSP2* was expressed in different tissues, while highly expressed in fruit. Furthermore, the expression of *PwUSP2* significantly changed under abiotic stresses such as abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MeJA), indicating that *PwUSP2* might be involved in response to multiple stresses in plants.

Key words: *Picea wilsonii*; *PwUSP2*; tissue expression; stress response

广泛逆境胁迫蛋白(universal stress proteins, USPs)是一个古老而保守的蛋白家族,属于自磷酸化丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)的磷酸蛋白,可以作为GTP和ATP的磷酸供体(Freestone等1997)。因其在IEF-PAGE凝胶上的迁移率而被命名为C13.5 (VanBogelen等1990)。目前,在细菌、古生菌、真菌、原生动物和植物中均已发现USP的存在(Kvint等2003)。

在大肠杆菌中,USPs根据结构分析和氨基酸序列可以分为4类:第一类为UspA、UspC、UspD;第二类为UspF、UspG;第三类和第四类分别是UspE的两种USP结构域蛋白(Nachin等2005)。UspA是一种小的细菌蛋白,它能在细胞受到饥

饿、有毒化学物质等一系列不利条件时,增强细胞生存能力(Nystrom和Neidhardt 1992, 1993, 1994)。在细菌中,UspA蛋白是USP家族中唯一的与特定的生物学活性相关的蛋白(Zarembinski等1998),是USPA结构域家族中的一员。而USPA结构域是以细菌中UspA蛋白所命名的一个蛋白结构,Aravind等(2002)推测USPA结构域只是一个更大的结构蛋白家族的其中一部分。他们还指出

收稿 2015-03-03 修定 2015-08-03

资助 国家自然科学基金项目(31270663)和国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2014ZX08009-003-002)。

* 通讯作者(E-mail: lyzhang73@sohu.com; Tel: 010-62336044)。

USPA结构域的最基本的功能可能是结合核苷酸和参与信号转导。USPA结构域家族可被分为两类,一类能与ATP结合,有ATP结合位点,如甲烷球菌中的MJ0577 (1MJH);另一类不能与ATP结合,如流感嗜血杆菌中的1JMV (Sousa和McKay 2001)。Kerk等(2003)分析了44个与细菌USPA结构域相似的拟南芥蛋白,认为拟南芥中包含USPA结构域的蛋白全部由近似于1MJH的蛋白演化而来。USP家族能够参与一系列胁迫应答反应,能在碳、氮、磷、硫酸盐、氨基酸缺乏时表达量增加(Liu等2007)。但在植物中只有一少部分USP家族的同源基因被分离和克隆出来(Chou等2007; Maqbool等2009),且具体的生物学功能尚未研究清楚。

青杆属于松科(Pinaceae)、云杉属(*Picea*)植物,是中国特有的多年生木本针叶树种,对恶劣的环境有较强的适应能力。基于木本植物的生活史较长,突变体较难获得等原因,目前对针叶植物的生物学研究相对较少。本文通过RACE-PCR的方法,从青杆cDNA文库中克隆出*PwUSP2*的全长cDNA序列,并对其进行生物信息学分析,预测其理化性质、二级结构、三级结构等。同时用RT-qPCR分析其在青杆各组织中的表达情况,以及在干旱、NaCl等非生物胁迫下的表达模式,旨在为深入研究青杆USP家族的功能提供基础。

材料与方法

1 植物材料

青杆(*Picea wilsonii* Mast)种子、花粉、果实采集于中国科学院北京植物园,成熟叶(多年生青杆的多年生叶)、幼叶(多年生青杆的一年生叶)、成茎(多年生青杆的多年生茎)采自北京林业大学。将用于逆境胁迫实验的八周大的青杆幼苗置于营养土和蛭石2:1 (V/V)混合的培养基质中培养,温室中光周期为16 h光照,8 h黑暗,温度21 °C,空气湿度50%~60%。各试验植物材料采集后用液氮处理,置于-80 °C备用。

2 青杆*PwUSP2*全长cDNA的获得

青杆cDNA文库用gateway技术构建,由Invitrogen公司完成(张盾等2012)。以青杆cDNA文库为模板,根据*PwUSP2*的EST序列与pDONR222载体的序列设计引物。经5'和3' RACE,获得*PwUSP2*

末端序列,与EST序列拼接后获得*PwUSP2*全长cDNA。设计引物USP2-F和USP2-R (表1)扩增*PwUSP2*的编码序列(coding sequence, CDS)区域,将PCR片段连接到pEASY-T₁载体上,通过酶切和测序进行验证。

表1 cDNA克隆和RT-qPCR引物序列

Table 1 Primers used in cDNA cloning and RT-qPCR

引物	序列(5'→3')
5'RACE-F	CAGTCTTAAGCTCGGGCCCCA
5'RACE-R	GACGTTGTCACTGGGTCGGAG
3'RACE-F	GTACGCCCGACCAGCGTCTCTC
3'RACE-R	CTGCCAGGAAACAGCTATGAC
EF1- α -F	AACTGGAGAAGGAACCCAAAG
EF1- α -R	AACGACCCAATGGAGGATAC
USP2-F	ATGGACGTTGGAAACAGGAAA
USP2-R	TCATATTTGTTCTTCTCTCTC
USP2-RT-F	TCAAGATTCACATCGTCAAGG
USP2-RT-R	GCAATGGCGAACACAATAATC

3 生物信息学分析

利用DNAMAN软件进行*PwUSP2*的cDNA序列的CDS区域分析,并得到其氨基酸序列。在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站上用BLAST找出其氨基酸序列的同源序列,用ClustalX和DNAMAN软件进行多序列比对,用MEGA5构建系统进化树。用ProParam预测该蛋白分子式及不稳定指数,蛋白等电点和分子质量(<http://web.expasy.org/protparam/>)。用NetPhos对磷酸化位点进行预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)。用ProtScale分析蛋白疏水性(<http://web.expasy.org/protscale/>)。用FoldIndex进行无序化特征预测(<http://bip.Weizmann.ac.il/fldbin/findex>)。用TMHMM预测蛋白跨膜区域(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)。用GOR4预测蛋白二级结构(https://npsa-prabi.ibcpfr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html)。用SWISS-MODEL预测蛋白三级结构(<http://swis-smdel.expasy.org/>)。

4 组织特异性表达

利用Aidlab公司的RNA提取试剂盒提取多年生青杆的花粉、果实、种子、成熟叶、幼叶和成茎的RNA,通过Fast Quant RT Kit反转录试剂盒(TIANGEN)反转录成单链cDNA,均一化浓度之后

在Step One Plus Real Time RT-PCR仪器(ABI)进行RT-qPCR实验, 检测*PwUSP2*在不同组织中的相对表达量。用于RT-qPCR的特异性引物为USP2-RT-F和USP2-RT-R, 以青杆*EF1- α* 作为内参基因(Yu等2011), 引物为EF1- α -F和EF1- α -R (表1), 试验设置3次重复。

5 胁迫处理

选取长势一致的八周大青杆幼苗, 参考Loukehaich等(2012)的方法进行胁迫处理: (1)幼苗分别置于4和42 °C金属浴中0、3、6、12 h和0、1、3、6、12 h; (2)根浸入100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱落酸(abscisic acid, ABA)中处理0、3、6、12 h; (3)根浸入200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl溶液中处理0、1、3、6、12 h; (4)幼苗置于吸水纸上放置0、1、3、6、12 h。参

考Nakashima等(2007)的方法, 将根浸入100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)中处理0、1、3、6、12 h。对照为正常生长的植株。所有试验设置3次重复, 取样后的材料进行液氮冻存, 置于-80 °C备用。

实验结果

1 青杆*PwUSP2*基因的克隆

通过RACE-PCR方法获得*PwUSP2*基因的末端序列, 与EST序列拼接后获得完整的cDNA序列全长。*PwUSP2*基因cDNA序列全长共987 bp, 编码区共723 bp, 共编码240个氨基酸。在85 bp处为起始密码子ATG, 805 bp处为终止密码子TGA, 968 bp处为Poly(A)₂₀尾巴(图1)。

```

1  GGAGATAATTGCAGAAGAGATTGTGGTTATATATAGATATATTTTCGAGGTGCGCAGTGG
61  AAAATTTGTAGCGACGAATACAATAATGGACGTTGGAACAGGAAAATCGCCATCGCAGTC
1  M D V G N R K I A I A V
121 GATCTGAGCGACGAGAGCGCGTTCGCCGTGAAATGGGCGGTGTGAACTATCTCCGACCC
13  D L S D E S A F A V K W A V L N Y L R P
181 AGTGACAACGTCATTCTCTCCATGTACGCCCGACCAGCGTCTCTACGGGGCCGACTGG
33  S D N V I L L H V R P T S V L Y G A D W
241 GGCGCCATCGATCTTTCCGTCGACACCTCCGACGAGGAATCCCATCAGAAGCTCGAAGAC
53  G A I D L S V D T S D E E S H Q K L E D
301 CACTTCGATGCTTTCACGTCCTCCAAGGCCCTCGGATCTTGCTCAGCCTCTGGTGGAGGGC
73  H F D A F T S S K A S D L A Q P L V E G
361 AACGTCCCCTTCAAGATTCACATCGTCAAGGACCACGACATGAAGGAGAGGATCTGCCTC
93  N V P F K I H I V K D H D M K E R I C L
421 GAGGTCGAGAGGCTTGGCGTCAATGCCGTCATCATGGGGAGCAGAGGCTTCGGGGCCTCC
113 E V E R L G V N A V I M G S R G F G A S
481 AAGAGGAATTGCAAGAGCAGGCTCGGGAGTGTGACGATTATTGTGTTCCGCAATTGCGTC
133 K R N C K S R L G S V S D Y C V R H C V
541 TGCCCCGTTGTTGTGTGTCAGGTTCCCCGAGGAGCCCGAGGCTGTCCCTTCCCTGTATCAT
153 C P V V V V R F P E E P E A V P S P D H
601 ATTGCTGTTCTTCATGAAGTGCCGGAAGAAGAGGAGGGCGTTCCCGAGGATCAGGATCAA
173 I A V L H E V P E E E E G V P E D Q D Q
661 TCATCAGATGGTGTGAAAGAAGAGGAACAGGTAGATGATGTGCAAAAAGGAGCAGCGGAAA
193 S S D G A E E E E Q V D D V Q K E Q R K
721 GATGGTGTCTCAGGAAGAGAAAACAGGTACATGTCCAGAAAAGCAGAACAGCGGACCGATGTT
213 D G A Q E E K Q V H V Q K D E Q R T D V
781 GTTCAAGAAGAGAAAGAAACAAAATATGAAATATATTGTTAGAAAAGCAAGTTAAGGGATTTTT
233 V Q E E K E Q I *
841 CATGTTTTGCACCTAGCGTGCTGCACATTTTCATTGTAAGGTTGTGGAAGCCTTTATGCC
901 TGTTCCAATGACTATTTTGTATGTTCTGCAAAACCAGATGTAAGGTTGGTGATTTACTT
961 TTCATGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图1 *PwUSP2*全长cDNA的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence of full-length cDNA and deduced amino acid sequence of *PwUSP2*

2 生物信息学分析

2.1 功能结构域分析

用NCBI网站上的BLAST对PwUSP2蛋白进行功能域分析,结果显示PwUSP2蛋白有典型UspA结构域,但无ATP结合位点G-2X-G-9X-G[S/T]结构序列,推测其可能属于USPA家族中不能与ATP结合的一类蛋白(图2-A)。

2.2 氨基酸组成及理化性质分析

采用ProParam工具预测PwUSP2分子质量为26.84 kDa,理论等电点为4.61,分子式为C₁₁₆₀-H₁₈₃₅N₃₂₉O₃₈₇S₈,其中缬氨酸(Val)含量最高,为12.9%,其次为谷氨酸(Glu),含量为11.7%,并带有负电残基(Asp+Glu) 51个,带有正电氨基酸残基(Arg+Lys) 26个,预测其半衰期约为30 h,不稳定指数为52.27,预测蛋白不稳定。

用NetPhos预测磷酸化位点,结果显示有12个丝氨酸磷酸化位点,有2个苏氨酸磷酸化位点(结果未显示)。用ProtScale分析蛋白疏水性,结果显示,在208位赖氨酸(Lys)和209位谷氨酸(Glu)分值最小,为-2.844,亲水性最强,在154位脯氨酸(Pro)分值最大,为2.356,亲水性最弱,预测蛋白为亲水性蛋白(图2-B)。采用FoldIndex预测蛋白质的无序化特征,结果显示,在51~58、61~90、164~240氨基酸处有无序化区域,预测此蛋白有很强的动态结构,在行使功能时其蛋白构象容易发生变化(图2-C)。用TMHMM预测蛋白跨膜区域,整条多肽链都位于细胞膜外,不存在跨膜结构域(结果未显示)。

2.3 二级结构和三级结构预测

用GOR4对PwUSP2蛋白的二级结构进行预测,发现PwUSP2中 α -螺旋含量达到35.42%,无规则卷曲结构含量为46.25%,延伸链含量为18.33%,无 β -转角结构(图3-A)。用SWISS-MODEL预测的三级结构与二级结构结果相似,蛋白含有较多无规则卷曲结构,且在空间上存在一定距离(图3-B)。

2.4 多序列比对和系统进化树分析

在NCBI网站上用BLAST对PwUSP2蛋白进行同源检索,找到其他物种中的同源蛋白:拟南芥AtUSP(AT1G11360.1)、丹参SmUSP(JX416284.1)、大豆GmUSP(XM_003540282.1)、桃PpUSP(XM_

007211909.1)、葡萄VvUSP(XM_003633275.1)、长春花CrUSP(KJ634235.1)、马铃薯StUSP(XM_006343208.1)、黄瓜CsUSP(XM_004144433.1),以及本实验室之前研究的青杆PwUSP1蛋白(崔晓燕等2014),利用ClustalX和DNAMAN进行同源比对,发现不同植物的USP有一定的同源性,但除PwUSP1蛋白有ATP结合位点G-2X-G-9X-G[S/T]外,其余均无此位点(图4)。用MEGA5构建系统进化树显示,PwUSP2和其他物种中的USPs同源性不高,其中与丹参SmUSP同源性最高,达52.21%。

3 PwUSP2的表达分析

3.1 组织特异性表达

用RT-qPCR技术测定PwUSP2基因在各组织中的相对表达量,结果显示,PwUSP2基因在果实、成熟叶、成茎中表达量较高,表达量相近,在种子中表达量最低(图5)。

3.2 对温度胁迫的响应

在4 °C低温胁迫下,PwUSP2在处理3 h时表达量上调,6 h时表达受到抑制,12 h时PwUSP2又被重新诱导表达,且达到最高值,是对照的2.7倍(图6-A)。PwUSP2在热激胁迫与冷胁迫下表现出不同的表达模式,42 °C处理青杆幼苗后,表达量先下降,然后逐渐升高,其中3 h时是对照的0.3倍(图6-B)。

3.3 对ABA和MeJA胁迫的响应

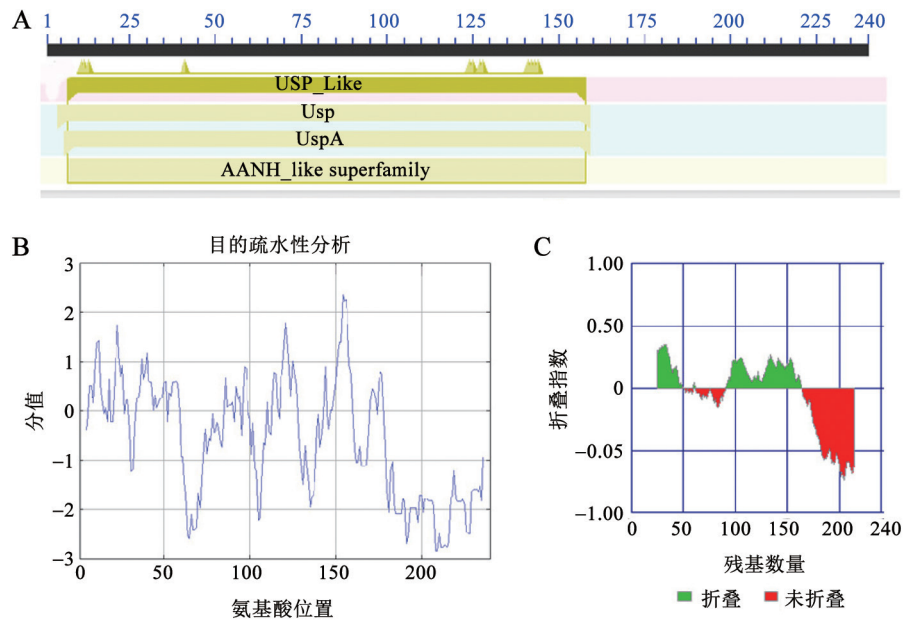
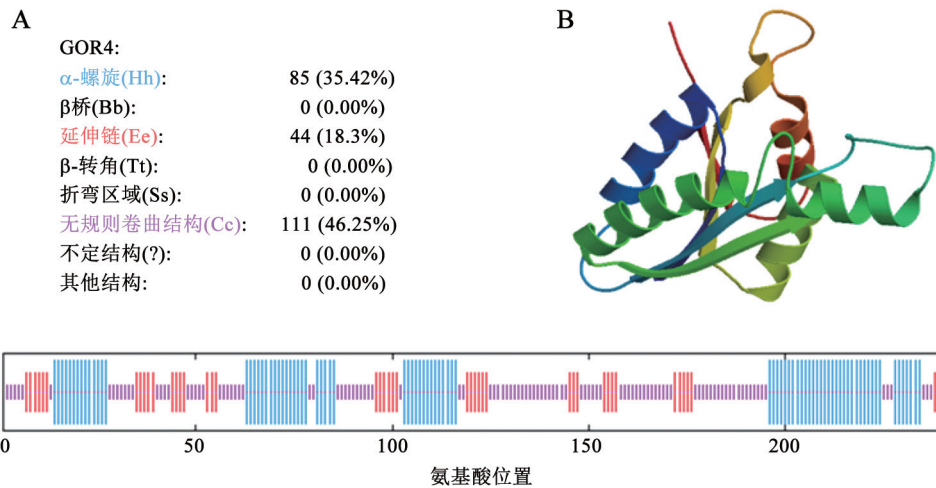
经ABA处理后,PwUSP2表达明显受到抑制,3和6 h时分别是对照的0.18和0.3倍,12 h时为0.5倍(图7-A)。而MeJA处理后,PwUSP2在1 h时表达量即达到最高,是对照的3.7倍,在3 h时表达量出现下降,胁迫6和12 h后又重新诱导,呈整体上升趋势(图7-B)。

3.4 对NaCl和干旱胁迫的响应

PwUSP2的表达量在NaCl处理1 h时显著上调,达到对照的1.8倍,而在3、6、12 h时表达量明显下调,维持在对照的0.5倍水平左右(图8-A)。干旱胁迫下,PwUSP2在处理3和12 h时表达量分别达到对照的2.3和2.6倍,而在处理1和6 h时则无明显变化(图8-B)。

讨 论

本研究基于RACE-PCR方法获得PwUSP2全长cDNA序列,与传统方法相比,RACE-PCR方法有

图2 *PwUSP2*蛋白功能结构域(A)、疏水性(B)和固有无序化特征(C)分析Fig.2 Protein functional domain (A), hydrophobicity (B) and inherent disordered characteristic (C) analyses of *PwUSP2*图3 *PwUSP2*的二级结构(A)和三级结构(B)分析Fig.3 Secondary structure (A) and tertiary structure (B) analyses of *PwUSP2*

简单、准确等优点(Borson等1992)。*PwUSP2*全长cDNA共987 bp, 其中编码区723 bp, 起始密码子出现在85 bp处。*PwUSP2*蛋白由240个氨基酸组成, 含有UspA结构域。研究显示, 在长时间胁迫条件下, UspA能提高细胞的存活率, 表明*PwUSP2*可能具有一定的响应逆境胁迫的能力。*PwUSP2*蛋白中无典型的ATP结合位点, 即无G-2X-G-9X-G[S/T]序列, 说明其可能属于USPA家族中不能结合ATP的一类蛋白。生物信息学分析磷酸化位点结果显

示*PwUSP2*有12个丝氨酸磷酸化位点和2个苏氨酸磷酸化位点, 与其作为GTP和ATP的磷酸供体的功能相一致。多序列比对结果显示, *PwUSP2*与其他物种中USPs同源性不高, 与丹参SmUSP同源性最高, 达52.21%, 且均无ATP结合位点G-2X-G-9X-G[S/T]结构序列, 这可能与USPs有两种不同的存在形式有关, 一种是只含有USP结构域, 另一种是USP结构域和其他结构域融合。

组织特异性表达结果显示, *PwUSP2*在青杆各

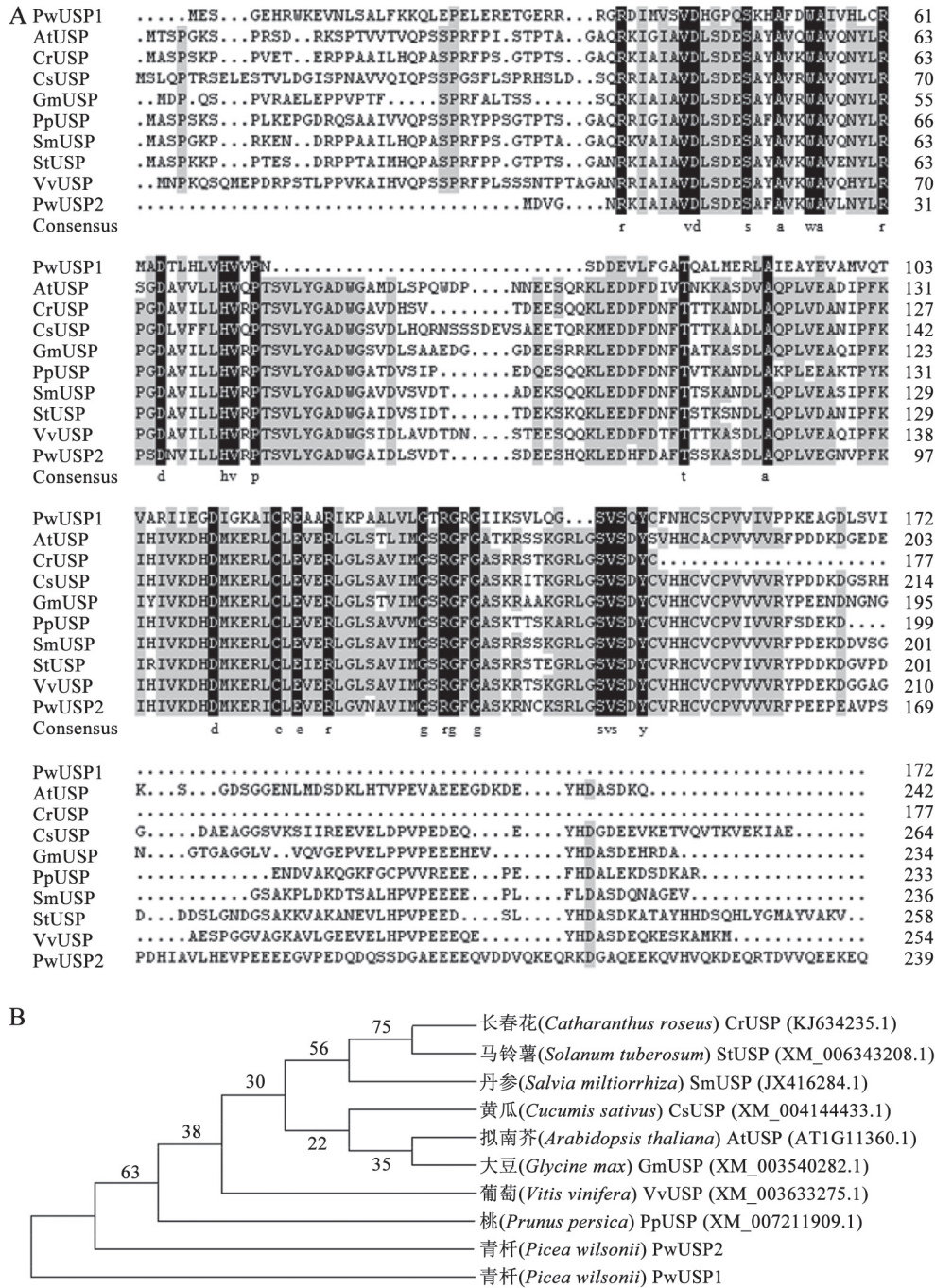
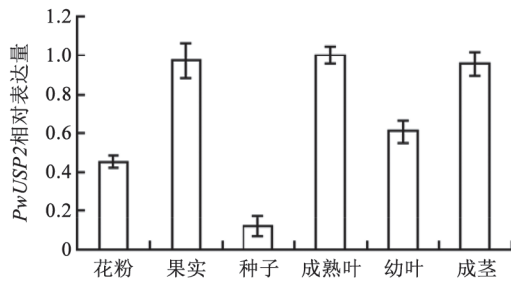


图4 PwUSP2蛋白的多序列比对(A)和系统进化树(B)

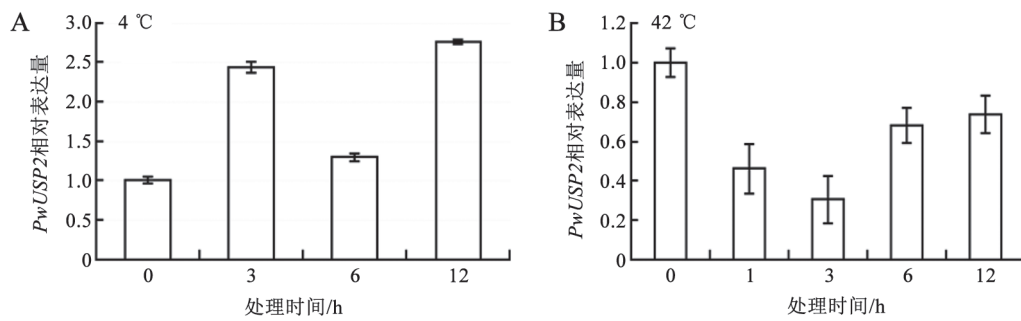
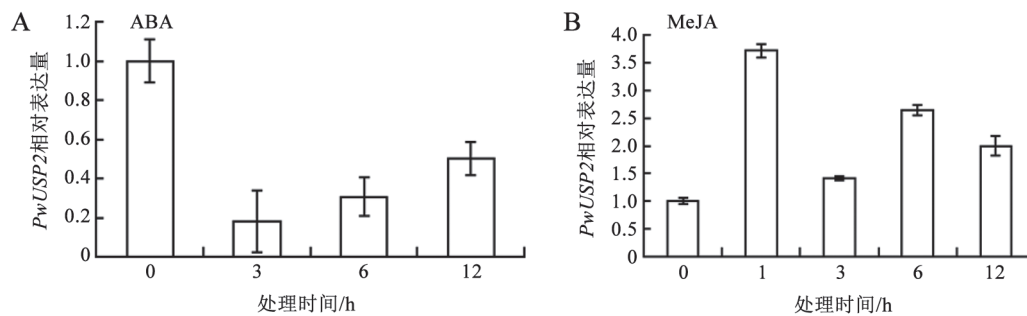
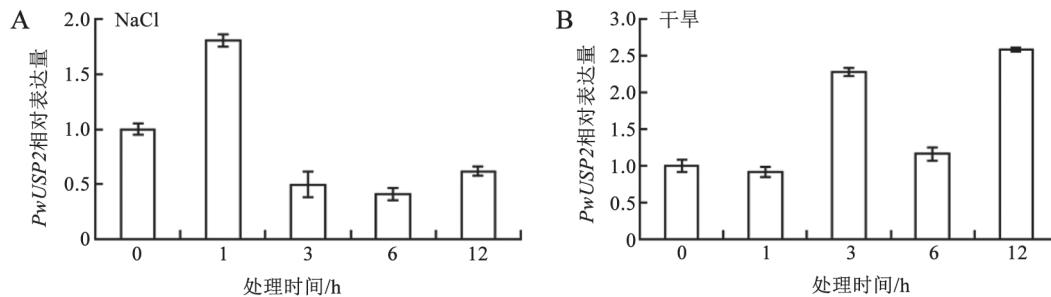
Fig.4 Multiple protein sequence alignment (A) and phylogenetic tree (B) of PwUSP2

组织中均有表达, 而其在果实和成熟叶中表达量均较高, 表明其可能参与多种生命活动。目前, 在细菌和植物中, 只有少数USPs基因被克隆和分离(Sauter等2002), 且部分参与了多种逆境胁迫。如番茄USP (*SpUSP*)通过ABA依赖型路径协同膜联蛋白共同参与干旱、盐胁迫等非生物胁迫(Louke-

haich等2012)。在大豆中, *GmUSP*在ABA、NaCl和聚乙二醇(polyethylene, PEG)的胁迫处理下在不同大豆品种中表达量均有明显变化(黄姍等2012)。邝静等(2013)发现, 丹参USP (*SmUSP*)可能在丹参非生物胁迫防御反应中发挥作用。木棉叶片在受到水涝胁迫后*GUSP1*和*GUSP2*的表达量显著上升

图5 *PwUSP2*在青杆不同组织中的表达水平Fig.5 Expression levels of *PwUSP2* in different tissues of *P. wilsonii*

(Maqbool等2009)。我们之前的研究显示*PwUSP1*参与了盐和干旱胁迫(崔晓燕等2014), 本研究发现, *PwUSP1*的同一家族基因——*PwUSP2*在不同非生物胁迫下的表达模式不同。*PwUSP2*受4℃低温诱导, 表达量上调, 且在12 h表达量达到最高, 在42℃热激胁迫下, *PwUSP2*呈现不同的表达模式, 表达量呈整体下降趋势; *PwUSP2*在ABA胁迫下表达量出现下降, 与42℃热激胁迫模式相似, 而在MeJA胁迫下, *PwUSP2*基因受到诱导, 表达量显著上调;

图6 温度胁迫下*PwUSP2*的表达分析Fig.6 Expression analysis of *PwUSP2* under temperature stress图7 ABA和MeJA胁迫下*PwUSP2*的表达分析Fig.7 Expression analysis of *PwUSP2* under ABA和MeJA stresses图8 NaCl和干旱胁迫下*PwUSP2*的表达分析Fig.8 Expression analysis of *PwUSP2* under NaCl and drought stresses

另外,在NaCl胁迫下,*PwUSP2*基因的表达量先上升后下降,同时*PwUSP2*基因的表达受干旱胁迫诱导上调。*PwUSP2*是广泛逆境胁迫蛋白,本研究结果显示其在多种逆境胁迫下存在表达差异,对不同胁迫的反应时间也存在差别,暗示其可能广泛参与多种逆境胁迫响应。

植物在逆境条件下逐渐进化出一套适应和响应逆境的机制。尽管*USPs*在植物中普遍存在,但其功能大部分仍然未知,尤其是在蛋白功能调控的分子机制研究方面尚不够深入(Isokpehi等2011)。因此,*PwUSP2*在抗逆过程中的具体功能,以及参与的信号转导路径和调控机制仍有待于研究。

参考文献

- 崔晓燕,李长江,孙帆,张凌云(2014).青杆*PwUSP1*基因的克隆及表达模式分析.植物生理学报,50(4):407-414
- 黄姗,王伟旗,侯文胜(2012).大豆*Usp1*基因的克隆和表达分析.大豆科学,31(4):546-551
- 邝静,生华,武玉翠,葛茜,张媛,王喆之(2013).丹参普遍胁迫蛋白基因(*SmUSP*)的克隆及表达模式分析.植物生理学报,49(4):362-368
- 张盾,刘亚静,李长江,张凌云(2012).青杆均一化cDNA文库构建及EST序列分析.生物技术通报,(6):71-76
- Aravind L, Anantharaman V, Koonin EV (2002). Monophyly of class I aminoacyl tRNA synthetase, USPA, ETFP, photolyase, and PP-ATPase nucleotide-binding domains: implications for protein evolution in the RNA world. *Proteins Struct Funct Genet*, 48 (1): 1-14
- Borson ND, Salo WL, Drewes LR (1992). A lock-docking oligo (dT) primer for 5' and 3' RACE-PCR. *PCR Methods Appl*, 2 (2): 144-148
- 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
- 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 (3): 318-324
- Isokpehi RD, Simmons SS, Cohly HHP, Ekunwe SIN, Begonia JB, Ayensu WK (2011). Identification of drought-responsive universal stress proteins in Viridiplantae. *Bioinform Biol Insights*, 5: 41-58
- 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
- Kvint K, Nachin L, Diez A, Nyström T (2003). The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol*, 6 (2): 140-145
- Liu WT, Karavolos MH, Bulmer DM, Allaoui A, Hormaeche RDCE, Lee JJ, Khan CMA (2007). Role of the universal stress protein UspA of *Salmonella* in growth arrest, stress and virulence. *Microb Pathog*, 42 (1): 2-10
- Loukehaich R, Wang TT, Ouyang B, Ziaf K, Li HX, Zhang JH, Lu YE, Ye ZB (2012). SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *J Exp Bot*, 63 (15): 5593-5606
- Maqbool A, Zahur M, Husnain T, Riazuddin S (2009). *GUSP1* and *GUSP2*, two drought-responsive genes in *Gossypium arboreum* have homology to universal stress proteins. *Plant Mol Biol Rep*, 27 (1): 109-114
- Nachin L, Nannmark U, Nystrom T (2005). Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol*, 187 (18): 6265-6272
- Nakashima K, Tran LSP, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K (2007). Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J*, 51 (4): 617-630
- Nystrom 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
- Nystrom 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
- Nystrom 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
- 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
- Sousa MC, McKay DB (2001). Structure of the universal stress protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure*, 9 (12): 1135-1141
- VanBogelen RA, Hutton ME, Neidhardt FC (1990). Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12: edition 3. *Electrophoresis*, 11 (12): 1131-1166
- Yu Y, Li Y, Huang G, Meng Z, Zhang D, Wei J, Yan K, Zhang C, Zhang L (2011). PwHAP5, a CCAAT-binding transcription factor, interacts with PwFKBP12 and plays a role in pollen tube growth orientation in *Picea wilsonii*. *J Exp Bot*, 62 (14): 4805-4817
- Zarebinski TI, Hung LW, Mueller-Dieckmann HJ, Kim KK, Yokota H, Kim R, Kim SH (1998). Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (26): 15189-15193