

张杰伟, 任 飞, 张中保, 等. 桃磷酸肌醇特异性磷脂酶 C 基因家族鉴定与分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 185-190.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.030

桃磷酸肌醇特异性磷脂酶 C 基因家族鉴定与分析

张杰伟, 任 飞, 张中保, 谢 华, 魏建华

(北京市农林科学院/农业基因资源与生物技术北京市重点实验室, 北京 100097)

摘要: 为了对桃(*Prunus persica* var. Lovell)中 *PI-PLC* 家族基因进行系统分析, 利用桃基因组数据库, 通过生物信息学手段, 鉴定桃 *PI-PLC* 家族基因的基因结构、染色体定位和编码蛋白, 通过序列比对进行进化和分类分析。结果表明, 桃中含有 5 个 *PI-PLC* 家族基因, 预测他们均含有 9 个外显子, 分布于桃的 2 条染色体上。保守结构域分析结果显示, 桃中 *PI-PLC* 蛋白均含有 4 个保守的 EF、X、Y 和 C2 结构域。进化树分析结果表明桃 *PI-PLC* 家族基因可分为 4 个亚家族。

关键词: 磷酸肌醇特异性磷脂酶 C; 桃; 进化分析; 基因家族

中图分类号: S662.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)01-0185-06

Genome-wide analysis and identification of phosphoinositide-specific phospholipase C gene family in Lovell peach (*Prunus persica* L.)

ZHANG Jie-wei, REN Fei, ZHANG Zhong-bao, XIE Hua, WEI Jian-hua

(Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Beijing Key Laboratory of Agricultural Genetic Resources and Biotechnology, Beijing, 100097, China)

Abstract: In order to analyze *PI-PLC* gene family in Lovell peach (*Prunus persica* L.), bioinformatics method was used based on the peach genome database to obtain peach *PI-PLC* family genes structure and their positions on chromosome and duplication information. *PI-PLC* proteins were classified according to their phylogenetic relationship. The results showed that five *PI-PLC* genes existed in the peach (*P. persica* L.) genome and located on two chromosomes. The results of conserved domains indicated that all peach *PI-PLC* proteins contained four conserved domains (EF, X, Y and C2). Phylogenetic analysis revealed that the peach *PI-PLC* gene family could be divided into four groups.

Key words: *PI-PLC*; *Prunus persica*; phylogeny analysis; gene family

磷酸肌醇特异性磷脂酶 C (Phosphoinositide-specific phospholipase C, *PI-PLC*) 是水解磷脂的酶

类, 其水解 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP_2), 产生 1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3) 和 1,2-二酰甘油(DAG)^[1]。植物细胞中, 水溶性 IP_3 进入细胞质在一系列磷酸激酶的作用下可以迅速转化为 IP_6 , 促进细胞内钙库中 Ca^{2+} 内流, 从而调节 Ca^{2+} 浓度及 Ca^{2+} 依赖的酶类或 Ca^{2+} 依赖的通道^[1]; 而脂溶性 DAG 停留在细胞膜上, 在二酰甘油激酶的作用下生成磷脂酸(Phosphatidic acid, PA), PA 通过与一些蛋白激酶、脂激酶和 *NADPH* 氧化酶等相互作用, 从而调节植物细胞生长、非生物胁迫和细胞死亡等生理过程^[2]。

高等植物中, 拟南芥的 *PI-PLC* 生物功能解析较

收稿日期: 2016-03-09

基金项目: 北京市农林科学院青年科研基金项目(QNJ201416);
北京市科技计划项目(Z151100001015005); 北京市农林
科学院科技创新能力建设专项(KJCX20140202)

作者简介: 张杰伟(1982-), 男, 山西闻喜人, 博士, 副研究员,
研究方向为林木分子生物学。(Tel) 010-51503196-
807; (E-mail) jwzhang919@163.com

通讯作者: 谢 华, (Tel) 010-51503832; (E-mail) xiehua@baafs.
net.cn; 魏建华, (Tel) 010-51503830; (E-mail) weijian-
hua@baafs.net.cn

为完整。拟南芥 *PI-PLC* 家族共有 9 个成员。其中 *AtPLC1* (曾用名 *AtPLC1S*) 参与不依赖 ABA 的高渗透胁迫信号转导^[3], *AtPLC2* 参与内质网胁迫反应和生长素调节的生长发育^[4-5], *AtPLC3* 和 *AtPLC9* 在耐热性方面起着重要作用^[6-7], 过量表达 *AtPLC5* 引起拟南芥和烟草叶片早衰^[8]。

2013 年桃基因组草图测序完成^[9], 为后续通过生物信息学挖掘、鉴定和分析桃基因组奠定了基础。本研究从桃基因组数据库出发, 重点分析桃 *PI-PLC* 家族基因进化关系及编码蛋白保守结构域, 为克隆桃 *PI-PLC* 基因提供有价值的信息, 以期为进一步研究 *PI-PLC* 基因的生物学功能提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 桃 *PI-PLC* 家族基因全基因组、cDNA 和蛋白质氨基酸序列的获得

拟南芥 *PI-PLC* 基因碱基序列及蛋白质氨基酸序列下载自 TAIR 数据库 (<http://www.arabidopsis.org>), 杨树 (*Populus trichocarpa*) 和桃 (*P. persica* var. Lovell) 的 *PI-PLC* 基因碱基序列及蛋白质氨基酸序列均下载自 phytozome 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)。

以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) *PI-PLC* 家族蛋白质氨基酸序列 *AtPLC1* (AT5G58670)、*AtPLC2* (AT3G08510)、*AtPLC3* (AT4G38530)、*AtPLC4* (AT5G58700)、*AtPLC5* (AT5G58690)、*AtPLC6* (AT2G40116)、*AtPLC7* (AT3G55940)、*AtPLC8* (AT3G47290)、*AtPLC9* (AT3G47220) 为基础, 利用 JGI 数据库 (杨树和桃) 提供的 Blast 程序进行 BlastP 搜索, 搜索结果如全序列 *E* 值大于 e^{-8} 的舍去, 再利用 NCBI 提供的在线 Conserved Domain Search (CDS) 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) 预测这些蛋白质有无 *PI-PLC* 结构域, 存在 *PI-*

PLC 结构域的蛋白质属于 *PI-PLC* 家族。

1.2 桃 *PI-PLC* 家族基因结构分析

将筛选出的桃 *PI-PLC* 基因的全基因组 (去除 5' 和 3' 非翻译区) 和编码区序列, 利用在线 GSDS 2.0 软件 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) 分析桃 *PI-PLC* 家族基因的基因结构。

1.3 *PI-PLC* 家族基因系统进化树的构建及编码蛋白保守结构

通过 Clustal X (2.0) 软件^[10] 对拟南芥、杨树和桃 *PI-PLC* 蛋白进行多序列比对分析, 将序列比对结果使用 MEGA 6.0 软件^[11], 采用 Neighborjoining 法 (Bootstrap 值设为 1 000) 生成 *PI-PLC* 家族基因的系统进化树。分别应用在线软件 MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>) 和 Pfam 数据库 (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>) 对拟南芥、杨树和桃的 *PI-PLC* 蛋白保守结构进行分析^[12-13]。

2 结果与分析

2.1 桃 *PI-PLC* 家族基因的鉴定和结构分析

根据拟南芥中已经鉴定出来的 9 个 *PI-PLC* 蛋白质序列, 利用 phytozome 数据库提供的 BlastP 程序得到 21 个杨树候选 *PI-PLC* 基因和 12 个桃候选 *PI-PLC* 基因。利用保守域在线预测软件 CDS 验证 *PI-PLC* 保守域的存在, 初步确定了杨树测序的基因型中含有 7 个 *PI-PLC* 基因和桃测序的基因型中含有 5 个 *PI-PLC* 基因。预测桃 *PI-PLC* 基因分布在第 2 和 6 染色体上, 根据其在染色体上的定位分别命名为 *PpPLC1* ~ *PpPLC5*, 每个成员的基因碱基序列长度、氨基酸序列长度、染色体定位、外显子个数等详细信息见表 1。预测桃 *PI-PLC* 基因含有 1~4 个转录本, 开放阅读框为 1 674 ~ 1 776 bp, 编码蛋白质大小为 557 ~ 591 aa, 均含有 9 个外显子 (图 1)。

表 1 桃 *PI-PLC* 家族基因的基本特征

Table 1 Characteristics of *PI-PLC* genes in peach

基因名称	定位名称	转录名称	别名	染色体定位	转录本个数	开放阅读框 (bp)	蛋白质大小 (aa)	外显子个数
<i>PpPLC1</i>	Prupe.2G250000	Prupe.2G250000.1	ppa003890m.g/.v1.0	Pp02;26504176..26508090 +	1	1 707	568	9
<i>PpPLC2</i>	Prupe.2G250100	Prupe.2G250100.1	ppa003223m.g/.v1.0	Pp02;26511167..26515194 +	1	1 776	591	9
<i>PpPLC3</i>	Prupe.6G056700	Prupe.6G056700.1	ppa003685m.g/.v1.0	Pp06;3982940..3986326 -	2	1 674	557	9
<i>PpPLC4</i>	Prupe.6G056800	Prupe.6G056800.1	ppa020283m.g/.v1.0	Pp06;3986754..3990412 -	2	17 64	587	9
<i>PpPLC5</i>	Prupe.6G056900	Prupe.6G056900.2	ppa003249m.g/.v1.0	Pp06;3990985..3994808 -	4	1 770	589	9

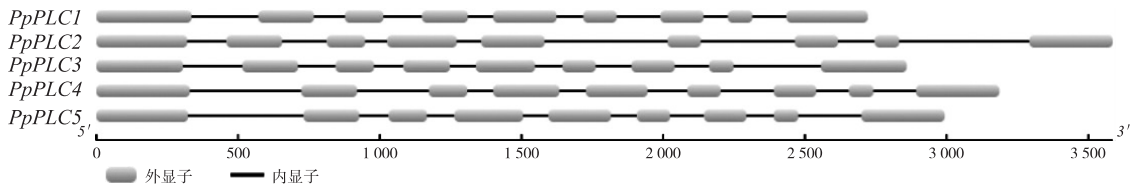


图1 桃 *PI-PLC* 家族基因结构分析
Fig.1 Gene structure of the peach *PI-PLC* gene family

2.2 桃 *PI-PLC* 家族蛋白质氨基酸序列相似性和系统进化分析

利用进化树分析软件 MEGA 6.0 对 9 个拟南芥 *PI-PLC*、7 个杨树 *PI-PLC* 和 5 个桃 *PI-PLC* 蛋白质氨基酸序列进行进化分析。结果显示,这 21 个 *PI-PLC* 分为 4 个亚家族,分别含有 10、4、4 和 3 个成

员。除第Ⅳ亚家族全部由拟南芥成员组成外,其他亚家族并未按照物种的界限聚类,而是混合分布在一起,均由拟南芥、杨树和桃的成员共同组成(图 2)。5 个桃 *PI-PLC* 蛋白的氨基酸序列相似性在 56.8% ~ 85.1%,其中 PpPLC4 和 PpPLC5 氨基酸序列的相似性达到 85.1%(表 2)。

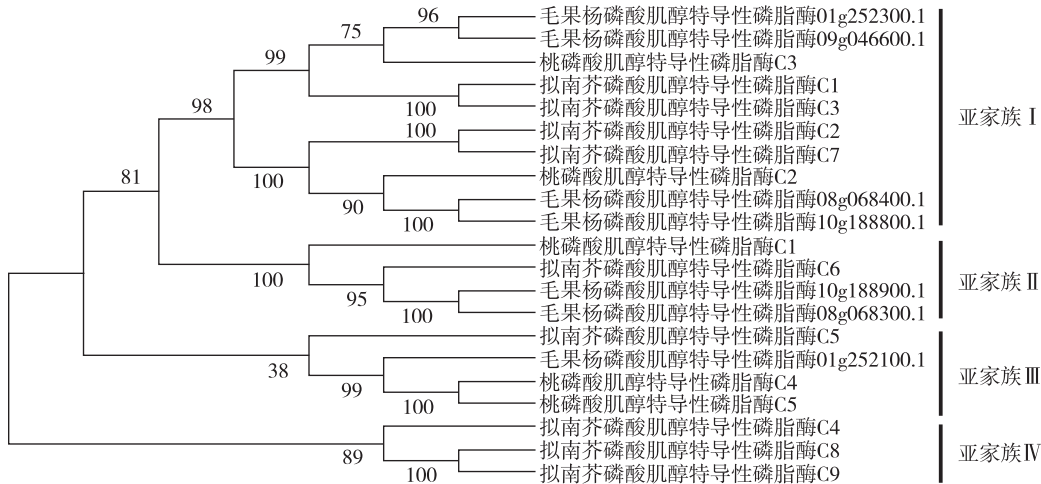


图2 拟南芥、杨树和桃的 *PI-PLC* 蛋白进化树
Fig.2 Phylogenetic tree of *PI-PLC* protein for arabidopsis, poplar and peach

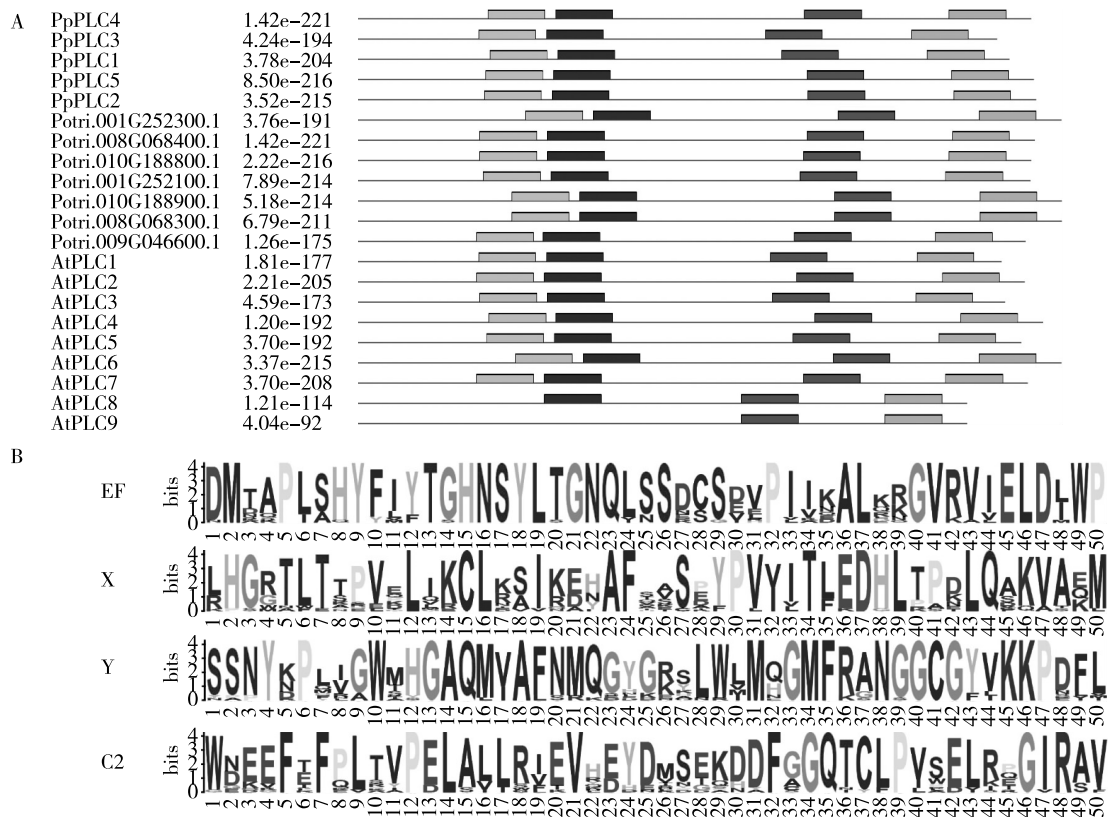
表 2 桃基因组中 *PI-PLC* 蛋白氨基酸序列相似性分析
Table 2 Similarity analysis of amino acid sequence for the *PI-PLC* family in peach

<i>PI-PLC</i> 家族	PpPLC2	PpPLC3	PpPLC4	PpPLC5
PpPLC1	0.629	0.568	0.643	0.624
PpPLC2		0.666	0.657	0.637
PpPLC3			0.607	0.591
PpPLC4				0.851

2.3 桃 *PI-PLC* 基因家族编码蛋白质保守结构域分析

使用在线软件 MEME 和 Pfam 对 *PI-PLC*

基因家族编码蛋白质保守结构域进行分析,结果表明,拟南芥、杨树和桃 *PI-PLC* 蛋白家族包含 4 个保守结构域。其中,元件 1 是 EF 结构域,2(X)和 3(Y)组成 *PI-PLC* 催化结构域,元件 4 是 C2 结构域。进化树分析结果显示,桃 PpPLC2 和 PpPLC3 聚类到第Ⅰ亚家族、PpPLC1 聚类到第Ⅱ亚家族、PpPLC4 和 PpPLC5 聚类到第Ⅲ亚家族。AtPLC8 和 AtPLC9 均聚类到第Ⅳ亚家族(图 2)。他们均含有 EF、X、Y 和 C2 4 个结构域,这表明 *PI-PLC* 蛋白在进化过程中含有相似的保守结构域(图 3)。



EF、X、Y、C2 为结构域。

图 3 拟南芥、杨树和桃的 *PI-PLC* 基因家族编码蛋白质保守结构域分布

Fig.3 Distribution of conserved domains for *PI-PLC* in arabidopsis, poplar and peach

3 讨论

PI-PLC 是磷酸肌醇信号途径中的一个关键酶,在许多植物中已经被证明参与非生物胁迫、调节骨架系统、C4 作物的呼吸作用等多个生理过程^[1,4-8,14-17]。随着分子生物学技术的发展,*PI-PLC* 基因家族已经在拟南芥、水稻中被鉴定^[18],但桃 *PI-PLC* 基因家族尚未鉴定。本研究鉴定桃和杨树 *PI-PLC* 基因家族分别含有 5 个和 7 个成员,而已鉴定的拟南芥和水稻 *PI-PLC* 基因家族分别含有 9 个和 4 个成员,这说明在进化过程中,*PI-PLC* 基因可能经历了不断发生谱系的特异扩张和拷贝丢失。桃 *PI-PLC* 基因家族的 5 个成员均含有 9 个外显子,编码的蛋白质均含有 EF、X、Y 和 C2 结构域,这表明 *PI-PLC* 基因家族的高度保守性。推测这些酶所参与的磷脂信号在植物诸多生理过程中起着类似作用。而不同

的物种中含有的成员数目不同,推测不同物种的各成员在特定的组织响应不同的外界刺激从而精细调节各生理过程。

蛋白质的进化分析结果表明,桃 *PI-PLC* 基因家族除没有第 IV 亚家族的成员外,分布于其他 3 个亚家族。其中 PpPLC1 与拟南芥 AtPLC6 聚类于第 II 亚家族, PpPLC2、PpPLC3 与 AtPLC1、AtPLC2、AtPLC3 和 AtPLC7 聚类于第 I 亚家族, PpPLC4、PpPLC5 与 AtPLC5 聚类于第 III 亚家族。到目前为止,拟南芥 AtPLC1 ~ AtPLC5、AtPLC9 已经被证明具有典型的 *PI-PLC* 生物学功能^[6]。Hirayama 等^[19]从拟南芥中克隆到第 1 个 *PI-PLC* 基因 *AtPLC1*, *AtPLC1* 在正常条件下表达量很低,在干旱、盐胁迫和低温胁迫时表达量急剧升高。后续的研究结果证实 *AtPLC1* 响应了 ABA 的次级信号转导^[20]。 *AtPLC2* 参与了内质网胁迫反应和生长素调节的生长发育^[4-5]。 *AtPLC3* (曾用名 *At-*

PLC1F)不仅在开花期诱导表达,而且参与了植株的耐热反应^[7]。推测 *PpPLC2* 和 *PpPLC3* 可能响应干旱、高盐、低温等各种非生物胁迫以及参与了生长素调节的生长发育过程。*AtPLC5* (曾用名 *AtPLC6*) 存在着典型的钙依赖的 *PI-PLC* 酶活性,其能够在冷胁迫下被强烈诱导^[21]。最近的研究结果^[8]显示,*AtPLC5* 超量表达后能引起烟草和拟南芥的叶片早衰,同时在超量表达的 *At-PLC5* 转基因植株中能检测到 *PI-PLC* 酶活性。与 *AtPLC5* 同源性最高的毛白杨 *PtoPLC1* 已经证明具有 *PI-PLC* 酶活性,并且其响应高盐、ABA 等各种非生物胁迫^[22]。表明聚类在一起的不同物种的同源基因可能具有不同的生物学功能,因此不能简单推测 *PpPLC4*、*PpPLC5* 响应何种非生物胁迫或者参与生长发育的哪个过程。桃 *PI-PLC* 各成员的生物学功能还需要从桃中克隆后逐一解析其功能。

预测桃 *PI-PLC* 基因家族中不同基因有不同的转录本个数,其中:*PpPLC1* 和 *PpPLC2* 均只有 1 个预测的转录本,*PpPLC3* 和 *PpPLC4* 均有 2 个预测的转录本,而 *PpPLC5* 含有 4 个预测的转录本。因为植物 *PI-PLC* 基因家族编码的蛋白质含有 EF、X、Y 和 C2 4 个保守的结构域,故在转录本选择上 *PpPLC1*~*PpPLC4* 均选取最大表达框。而 *PpPLC5* 中,最大的表达框 (Prupe.6G056900.1) 除这 4 个保守结构域以外,还含有 SOR/SNZ 结构域 (PF01680),该结构域所属 *SOR/PDX* 基因家族,主要参与维生素 B6 的重头合成^[23]。在本研究中选取 Prupe.6G056900.2 作为 *PpPLC5* 的转录本。在未来的研究中要从桃不同的组织中克隆不同的转录本,验证是否存在含有 SOR/SNZ 结构域的 *PpPLC*,并研究其生物学功能,以期完善对植物 *PI-PLC* 结构和生物学功能的认识。

参考文献:

- [1] MUNNIK T, TESTERINK C. Plant phospholipid signaling: 'in a nutshell' [J]. *Journal of Lipid Research*, 2009, 50 (Suppl): 260-265.
- [2] WANG X, DEVAIAH S P, ZHANG W, et al. Signaling functions of phosphatidic acid [J]. *Progress in Lipid Research*, 2006, 45 (3): 250-278.
- [3] TAKAHASHI S, KATAGIRI T, HIRAYAMA T, et al. Hyperosmotic stress induces a rapid and transient increase in inositol 1, 4, 5-trisphosphate independent of abscisic acid in *Arabidopsis* cell culture [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2001, 42 (2): 214-222.
- [4] KANEHARAK, YU C Y, CHO Y, et al. *Arabidopsis AtPLC2* is a primary phosphoinositide-specific phospholipase C in phosphoinositide metabolism and the endoplasmic reticulum stress response [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11 (9): e1005511. DOI:10.1371/journal.pgen.1005511.
- [5] LI L, HE Y, WANG Y, et al. *Arabidopsis PLC2* is involved in auxin-modulated reproductive development [J]. *Plant Journal*, 2015, 84 (3): 504-515.
- [6] ZHENG S Z, LIU Y L, LI B, et al. Phosphoinositide-specific phospholipase C9 is involved in the thermotolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Journal*, 2012, 69 (4): 689-700.
- [7] GAO K, LIU Y L, LI B, et al. *Arabidopsis thaliana* phosphoinositide-specific phospholipase C isoform 3 (*AtPLC3*) and *AtPLC9* have an additive effect on thermotolerance [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2014, 55 (11): 1873-1883.
- [8] ZHANG J, XIA K, YANG Y, et al. Overexpression of *Arabidopsis* phosphoinositide-specific phospholipase C5 induces leaf senescence [J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2015, 120 (2): 585-595.
- [9] VERDEI, ABBOTT G A, SCALABRIN S, et al. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution [J]. *Nature Genet*, 2013, 45 (5): 487-494.
- [10] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2007, 23 (21): 2947-2948.
- [11] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2013, 30 (12): 2725-2729.
- [12] BAILEY T L, BODEN M, BUSKE F A, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37 (Web server issue): W202-W208.
- [13] FINN R D, COGGILL P, EBERHARDT R Y, et al. The pfam protein families database: towards a more sustainable future [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44 (Database issue): D279-D285.
- [14] TRIPATHY M K, TYAGI W, GOSWAMI M, et al. Characterization and functional validation of tobacco PLC8 for abiotic stress tolerance [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 30 (2): 488-497.
- [15] WANG C R, YANG A F, YUE G D, et al. Enhanced expression of phospholipase C1 (*ZmPLC1*) improves drought tolerance in transgenic maize [J]. *Planta*, 2008, 227 (5): 1127-1140.
- [16] PAOLO G D, CAMILLI P D. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics [J]. *Nature*, 2006, 443 (7112): 651-657.
- [17] COURSOLO S, PIERRE J, VIDAL J, et al. Cloning and characterization of a phospholipase C from the C4 plant *Digitaria sanguinalis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53 (373): 1521-

- 1524.
- [18] SINGH A, KANWAR P, PANDEY A, et al. Comprehensive genomic analysis and expression profiling of phospholipase C gene family during abiotic stresses and development in rice [J]. PLoS ONE, 2013, 8 (4): e62494
- [19] 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* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995, 92(1): 3903-3907.
- [20] SANCHEZ J P, CHUA N H. *Arabidopsis PLCI* is required for secondary responses to abscisic acid signals [J]. Plant Cell, 2001, 13 (5): 1143-1154.
- [21] XU X, CAO Z, LIU G, et al. Cloning and expression of *AtPLC6*, a gene encoding a phosphatidylinositol-specific *Arabidopsis thaliana* [J]. Chinese Science Bulletin, 2004, 49(6): 567-573.
- [22] ZHANG J, ZHANG Z, ZHU D, et al. Expression and initial characterization of a phosphoinositide-specific phospholipase C from *Populus tomentosa* [J]. Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology, 2015, 24(3): 338-346.
- [23] EHRENSHAFT M, BILSKI P, LI M Y, et al. A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(16): 9374-9378.

(责任编辑:陈海霞)