

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2026.01.012

大豆中磷脂酶 D 基因家族生物学功能研究

孙红叶, 张 华, 姚改芳, 胡康棣, 程雪婷

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘 要:为探究大豆中磷脂酶 D(PLD)家族的生物学功能,文章利用染色体定位分析、基因结构分析、蛋白理化性质分析、核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)、亚细胞定位分析预测、蛋白基序分析、蛋白结构域分析、蛋白二级和三级结构预测等生物信息学手段对大豆中 5 个亚型共 21 个 *PLD* 基因家族进行分析,发现在同一亚类中基因与蛋白结构更为保守,其结构与性质更为接近。通过对大豆中 *PLD* 基因表达水平进行分析,发现 *PLD* 基因可能在大豆种子发育、豆荚发育、开花、根和叶片生长方面发挥作用。研究结果为深入分析 *PLD* 基因家族在大豆中的生物学功能提供了参考。

关键词:大豆;磷脂酶 D(PLD);生物信息学分析;基因表达

中图分类号:Q943.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2026)01-0080-09

Study on biological functions of phospholipase D gene family in soybean

SUN Hongye, ZHANG Hua, YAO Gaifang, HU Kangdi, CHENG Xueting

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract:In order to investigate the biological functions of phospholipase D(PLD) family in soybean, this paper utilized chromosomal localization analysis, gene structure analysis, protein physicochemical property analysis, nuclear localization sequence (NLS), subcellular localization prediction, protein motif analysis, protein structural domain analysis, and protein secondary and tertiary structure prediction for a total of twenty-one *PLD* gene families of five isoforms in soybean, and found that the genes and proteins were more conserved with the same subclasses, and their structures and properties were more similar. By performing an analysis of *PLD* gene expression levels in soybean, it was found that *PLD* genes might play a role in soybean seed and pod development, flowering, and root and leaf growth. The findings of the paper provide a reference for an in-depth study of the biological functions of *PLD* gene family in soybean.

Key words:soybean; phospholipase D(PLD); bioinformatics analysis; gene expression

0 引 言

磷脂酶 D(PLD)主要存在于植物体中,磷脂酶 A1(PLA1)、磷脂酶 A2(PLA2)主要存在于动物体中,磷脂酶(PLC)主要存在于微生物中^[1]。PLD 在植物组织(根、茎、叶、种子和花等)中普遍存在,成熟初期的种子、萌发初期的幼苗以及生长

代谢活跃的器官部位中 PLD 含量更加丰富^[2-3]。植物 PLD 是从胡萝卜根和菠菜叶中提取出来的^[4],其作用底物较多,有磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸等,能专一地水解磷脂中的 4 位酯键生成磷脂和有机碱^[5],由于其不稳定性和多型性,直到 1978 年人们才在动物和微生物(细菌、真菌)中发现 PLD^[6-9],并发现 PLD 不仅是通过水解细胞膜

收稿日期:2023-10-26;修回日期:2023-12-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31970312;32170315);安徽省科技重大专项资助项目(202003a06020011)

作者简介:孙红叶(1995—),女,安徽合肥人,合肥工业大学博士生;

张 华(1973—),男,江苏徐州人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者, E-mail: hzhanglab@hfut.edu.cn.

中的磷脂来影响膜的结构、功能和稳定性,还在信号转导、激素作用的发挥、细胞骨架组装、胞内蛋白激酶和肌动蛋白的有序化、细胞分裂的发生、穿膜运输、分泌作用、防御反应以及种子萌发和细胞衰老等过程中起重要作用^[10-11]。

PLD 作为植物磷脂酶家族中的重要组成亚类,其结构和功能受到越来越多的关注和研究。目前,已经在拟南芥中鉴定出 12 个 *PLD* 基因,依据基因结构、序列相似性、蛋白结构域、生化性质和 cDNA 克隆顺序可将 *PLD* 基因分为 α (1、2、3)、 β (1、2)、 γ (1、2、3)、 δ 、 ϵ 和 ζ (1、2) 6 个亚类^[12-13]。其他植物中克隆分离出的 *PLD* 基因,它们的 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 ζ 分类是依据其在拟南芥中克隆的顺序来命名的^[2]。大豆 *PLD* 家族含有 21 个成员,均为拟南芥 *PLD* 的同源蛋白,但与拟南芥不同的是大豆中不含 γ 亚类的 *PLD* 蛋白^[14]。大量研究结果表明拟南芥 *PLD* 参与干旱、盐和低温等胁迫应答。*AtPLD α 1* 过表达提高了拟南芥植株对脱落酸(ABA)的敏感性,促进气孔关闭,减少水分蒸腾散失,从而增强植株的抗旱能力^[15-16]; *AtPLD α 1* 和 *AtPLD δ* 过表达提高了拟南芥植株抵抗盐胁迫的能力^[17-18]; 同样地,番茄 *LePLD α 1* 过表达显著提高了植株的耐盐性^[19]; 在大豆中, *GmPLD α 1* 和 *GmPLD β 5* 不但参与根瘤的发育过程,还对根瘤形成的过程发挥重要作用^[14]。但是目前,关于大豆中 *PLD* 基因家族基因功能的研究相对较少。本研究利用生物信息学手段分析了大豆中 21 个 *PLD* 基因家族成员的基因结构、蛋白基序和结构域、蛋白定位和结构预测以及时空表达模式,旨在为进一步研究大豆 *PLD* 基因家族成员的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 大豆 *PLD* 家族信息获取和染色体定位

从文献^[14]中获取大豆 *PLD* 基因家族基因的登录号,然后通过登录号在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载其基因序列、蛋白序列以及编码序列(coding sequence, CDS); 从网站 SoyBase (<https://www.soybase.org/>)下载大豆基因组序列,将其和大豆 *PLD* 基因家族基因的登录号输入 TBtools 软件中进行染色体定位分析。

1.2 大豆 *PLD* 基因家族基序、结构和理化性质

在 GSDS 2.0 网站(Gene Structure Display Server 2.0 (gao-lab.org))中导入大豆 *PLD* 基因家族的 CDS 序列和基因序列,分析 *PLD* 基因家族的外显子和内含子结构; 在 MEME 网站(<https://meme-suite.org/>)导入大豆 *PLD* 蛋白序列,进行蛋白基序分析; 在 SMART 网站(<http://smart.embl.de/>)导入大豆 *PLD* 蛋白序列,进行蛋白结构域分析; 在 EXPASY 网站(<https://www.expasy.org/>)输入 21 个大豆 *PLD* 蛋白序列,获取其蛋白长度、等电点(isoelectric point, pI)和分子量等理化参数。

1.3 大豆 *PLD* 家族蛋白定位和结构预测

将大豆 *PLD* 蛋白序列导入 NLS Mapper 网站(https://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper-form.cgi)进行蛋白的核定位信号预测; 然后在 Wolf PSORT 网站(<https://wolfsort.hgc.jp/>)输入大豆中 21 个 *PLD* 蛋白序列,进一步预测 *PLD* 蛋白的亚细胞定位。

在 SOPMA 网站(<https://npsa-pbil.ibcp.fr/>)和 SWISS 网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)中分别导入大豆 *PLD* 蛋白序列,然后对 21 个 *PLD* 蛋白的二级结构和三级结构进行预测和分析。

1.4 大豆中 *PLD* 基因表达水平分析

在 SoyBase 网站输入 21 个大豆 *PLD* 基因家族的登录号,对大豆中 *PLD* 基因在野生型大豆中不同组织、种子和豆荚发育不同阶段的基因表达水平进行数据挖掘,并利用基迪奥网站(<https://www.omicshare.com/>)进行热图绘制。

2 结果与分析

2.1 大豆 *PLD* 基因家族染色体定位分析

目前,大豆基因组测序工作已经完成^[20],利用拟南芥已报道的 *PLD* 基因家族通过同源比对搜索的方法,发现大豆 *PLD* 基因家族总共包含 21 个成员^[14],具体信息见表 1 所列。从表 1 可以看出,21 个大豆 *PLD* 基因家族分布在 20 条染色体中的 13 条上,并且主要分布在前 10 个染色体上。与拟南芥类似,大豆 *PLD* 基因家族也含有 *GmPLD α* 、*GmPLD β* 、*GmPLD δ* 、*GmPLD ϵ* 和 *GmPLD ζ* 亚类,但与拟南芥不同的是大豆中不含有 *GmPLD γ* 亚类,其中 *GmPLD α* 亚类含有 5 个成员(*GmPLD α 1*、*GmPLD α 2*、*GmPLD α 3*、*GmPLD α 4*、*GmPLD α 5*), *GmPLD β* 亚类含有 4 个

成员 (*GmPLDβ1*、*GmPLDβ2*、*GmPLDβ3*、*GmPLDβ4*)，*GmPLDδ* 亚类含有 6 个成员 (*GmPLDδ1*、*GmPLDδ2*、*GmPLDδ3*、*GmPLDδ4*、*GmPLDδ5*、*GmPLDδ6*)，*GmPLDε* 亚类含有 3 个

成员 (*GmPLDε1*、*GmPLDε2*、*GmPLDε3*)，*GmPLDζ* 亚类含有 3 个成员 (*GmPLDζ1*、*GmPLDζ2*、*GmPLDζ3*)，不同染色体上含有的 *PLD* 同源基因数目也相同。

表 1 大豆 *PLD* 基因家族的相关信息

基因名称	基因登录号	蛋白登录号	参考基因组定位	基因所在染色体名称
<i>GmPLDα1</i>	LOC100784434	XP_003543677.1	Glyma13g44170	Chrom13
<i>GmPLDα2</i>	LOC100786410	XP_003531710.1	Glyma08g22600	Chrom08
<i>GmPLDα3</i>	LOC100794849	XP_003528334.1	Glyma07g03490	Chrom07
<i>GmPLDα4</i>	LOC100791688	XP_006581357.1	Glyma06g07220	Chrom06
<i>GmPLDα5</i>	LOC100794115	XP_006581358.1	Glyma06g07230	Chrom06
<i>GmPLDβ1</i>	LOC100791059	XP_003520025.1	Glyma02g10360	Chrom02
<i>GmPLDβ2</i>	LOC100801286	XP_003551823.1	Glyma18g52560	Chrom18
<i>GmPLDβ3</i>	LOC100805294	XP_003529972.1	Glyma07g08740	Chrom07
<i>GmPLDβ4</i>	LOC100786241	XP_003517450.1	Glyma01g42420	Chrom01
<i>GmPLDδ1</i>	LOC100814486	XP_006590738.1	Glyma11g08640	Chrom11
<i>GmPLDδ2</i>	LOC100801787	XP_003516537.1	Glyma01g36680	Chrom01
<i>GmPLDδ3</i>	LOC100789389	XP_006581145.1	Glyma06g02310	Chrom06
<i>GmPLDδ4</i>	LOC100795859	XP_003523254.1	Glyma04g02250	Chrom04
<i>GmPLDδ5</i>	LOC100810824	XP_003532794.1	Glyma08g13350	Chrom08
<i>GmPLDδ6</i>	LOC100779740	XP_003524234.1	Glyma05g30190	Chrom05
<i>GmPLDε1</i>	LOC100807431	XP_003546669.1	Glyma15g02710	Chrom15
<i>GmPLDε2</i>	LOC100789235	XP_006583020.1	Glyma07g01310	Chrom07
<i>GmPLDε3</i>	LOC100812642	XP_006585521.1	Glyma08g20710	Chrom08
<i>GmPLDζ1</i>	LOC100796914	NP_001275522.1	Glyma20g38200	Chrom20
<i>GmPLDζ2</i>	LOC100780514	XP_003546370.1	Glyma15g16270	Chrom15
<i>GmPLDζ3</i>	LOC100782187	XP_003534832.1	Glyma09g04620	Chrom09

2.2 大豆 *PLD* 基因家族结构

利用 GSDS 2.0 在线软件分析 21 个大豆

PLD 基因结构中内含子和外显子的分布情况，结果如图 1 所示。

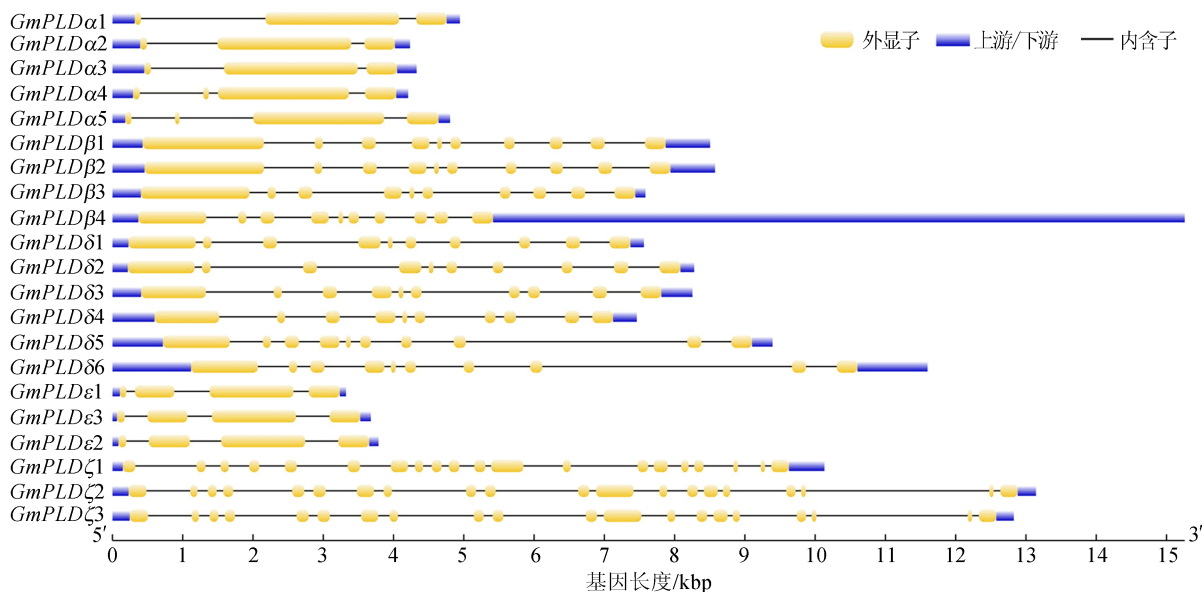


图 1 大豆 *PLD* 基因结构分析

从图 1 可以看出：大豆 *PLD* 基因家族成员的基因长度在 3.323~15.260 kbp 范围内，绝大

多数的 *PLD* 基因长度均大于 4 kbp；不同亚类的 *PLD* 基因可能具有不同的外显子数目，但同一亚

类的 *PLD* 基因所含有的外显子数差异不大,其中 *GmPLD α 1*、*GmPLD α 2*、*GmPLD α 3* 含有 3 个外显子,而 *GmPLD α 4* 和 *GmPLD α 5* 含有 4 个外显子;*GmPLD β 1*、*GmPLD β 2*、*GmPLD β 3*、*GmPLD β 4*、*GmPLD δ 1*、*GmPLD δ 2*、*GmPLD δ 3*、*GmPLD δ 4*、*GmPLD δ 5*、*GmPLD δ 6* 均含有 10 个外显子;*GmPLD ϵ 1*、*GmPLD ϵ 2*、*GmPLD ϵ 3* 均含有 4 个外显子;*GmPLD ζ 1*、*GmPLD ζ 2*、*GmPLD ζ 3* 均含有 20 个外显子。

综上所述,同一亚类的 *PLD* 基因具有相似的外显子数,而不同亚类的 *PLD* 基因含有的外显子数差异较大,这为大豆 *PLD* 基因家族生物学功能的多样性奠定了基础。

2.3 大豆 *PLD* 蛋白家族基序结构

利用在线网站 MEME 分析大豆中 21 个 *PLD* 蛋白的基序结构,21 个 *PLD* 蛋白的保守基序分布以及基序对应的蛋白序列如图 2 所示。图 2 中,不同色条代表不同的保守基序。

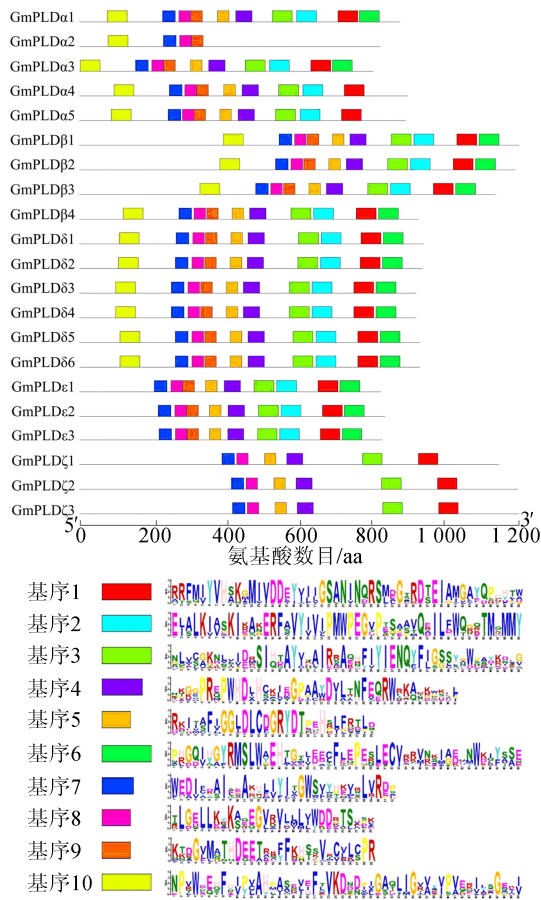


图 2 大豆 *PLD* 蛋白基序分析

由图 2 可知:大豆 *PLD* 蛋白家族含有的氨基酸数目在 739~1 126 aa 之间; β 和 δ 亚类 *PLD* 蛋

白以及 *GmPLD α 1*、*GmPLD α 3* 蛋白含有 1 个完整的基序,表明它们可能具有保守的生物学功能; ϵ 亚类 *PLD* 蛋白缺少了基序 1, ζ 亚类 *PLD* 蛋白则缺少了基序 2、基序 6、基序 9 和基序 1,表明 ϵ 亚类 *PLD* 蛋白的生物学功能与 α 、 β 、 δ 亚类 *PLD* 蛋白相比可能略有差异,而 ζ 亚类 *PLD* 蛋白可能与 α 、 β 、 δ 亚类 *PLD* 蛋白有着差异较大的生物学功能。其中, α 亚类中 *GmPLD α 2* 蛋白只含有基序 7、基序 8、基序 9 和基序 1,而 *GmPLD α 4* 和 *GmPLD α 5* 蛋白则缺少基序 6,表明 α 亚类中的 *PLD* 蛋白可能具有不同的生物学功能。

2.4 大豆 *PLD* 蛋白家族结构域

PLD 蛋白的界定是其氨基酸序列的 N 端作为催化活性部位应包含 Ca^{2+} 结合位点的 C2 结构域或者包含 *phox* 和 *pleckstrin* 的 PX/PH 结构域,其 C 端作为信号刺激感受以及膜运输部位应包含与磷脂合成相关的 2 个 HKD(HxKxxxD)的 *PLDc* 结构域^[21]。利用在线网站 SMART 对 21 个大豆 *PLD* 家族成员进行蛋白结构域分析,结果如图 3 所示。

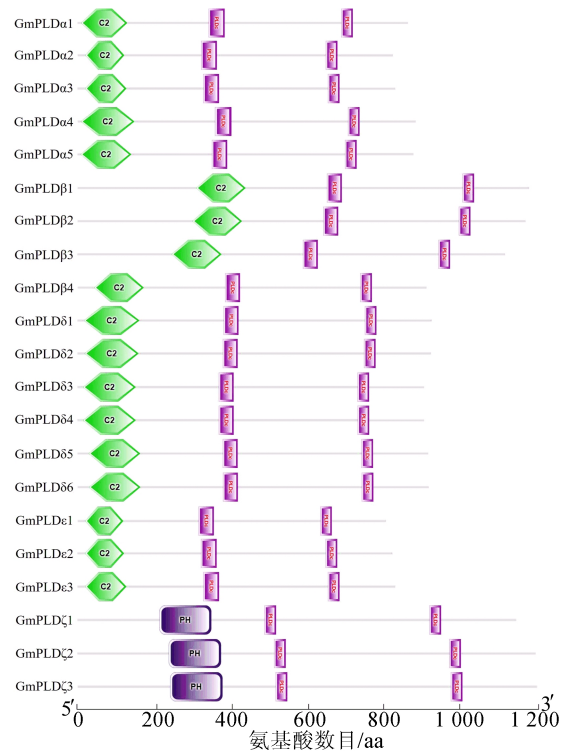


图 3 大豆 *PLD* 蛋白结构域分析

由图 3 可知: α 亚类 *PLD* 蛋白的 C2 结构域位于第 8~第 140 个氨基酸之间,2 个 *PLDc* 结构域分别位于第 340~第 379 个氨基酸和第 635~第 696 个氨基酸之间;在 β 亚类中,*GmPLD β 1*、*GmPLD β 2*、*GmPLD β 3* 蛋白的 C2 结构域位于

第 233~第 415 个氨基酸之间,2 个 PLDc 结构域分别位于第 558~第 652 个氨基酸和第 893~第 979 个氨基酸之间,而 GmPLD β 4 蛋白的 C2 结构域位于第 41~第 163 个氨基酸之间,2 个 PLDc 结构域分别位于第 365~第 400 个氨基酸和第 699~第 726 个氨基酸之间; δ 亚类 PLD 蛋白的 C2 结构域位于第 14~第 155 个氨基酸之间,2 个 PLDc 结构域分别位于第 350~第 397 个氨基酸和第 693~第 738 个氨基酸之间; ϵ 亚类 PLD 蛋白的 C2 结构域位于第 12~第 121 个氨基酸之间,2 个 PLDc 结构域分别位于第 296~第 349 个氨基酸和第 603~第 647 个氨基酸之间; ζ 亚类 PLD 蛋白的 N 末端不含有 C2 结构域,其含有的 PH 结构域位于第 203~第 357 个氨基酸之间,2 个 PLDc 结构域分别位于第 463~第 517 个氨基酸和第 871~第 950 个氨基酸之间。

拟南芥中的 PLD 主要分为 2 类:N 末端含有 C2 结构域的 PLD,包括 PLD α 、PLD β 、PLD δ 和 PLD ϵ ;N 末端含有 PX/PH 结构域的 PLD,主要有 PLD ζ ^[2]。相关研究表明,PLD 蛋白结构的共性及差异与相应 PLD 的生物学功能及调控密切相关^[21]。因此,大豆中的 α 、 β 、 δ 和 ϵ 亚类 PLD 蛋白与拟南芥类似,它们具有相似的结构,生物学功能可能也较为相近,而 ζ 亚类 PLD 蛋白结构的差异可能导致其具有不同的生物学功能。

2.5 大豆 PLD 蛋白家族理化性质

利用 EXPASY 网站获取 21 个大豆 PLD 家族成员的蛋白长度、等电点(pI)和分子量等理化参数,具体见表 2 所列。

从表 2 可以看出: α 亚类 PLD 蛋白的氨基酸数目在 739~826 aa 之间,分子量在 83 922.85~94 258.93 g/mol 之间,pI 均为酸性;GmPLD β 1、GmPLD β 2、GmPLD β 3 蛋白的氨基酸数目在 1 047~1 106 aa 之间,分子量在 117 361.38~124 092.70 g/mol 之间,pI 均为酸性,而 GmPLD β 4 的理化性质与其他 β 亚类 PLD 蛋白差异较大,其氨基酸数目为 853 aa,分子量为 96 097.42 g/mol,pI 为碱性; δ 亚类 PLD 蛋白的氨基酸数目为 847~866 aa,分子量在 96 095.22~98 442.89 g/mol 之间,pI 均为酸性; ϵ 亚类 PLD 蛋白的氨基酸数目在 759~776 aa 之间,分子量在 87 080.18~89 339.89 g/mol 之间,pI 均为酸性; ζ 亚类 PLD 蛋白的氨基酸数目在 1 075~1 126 aa 之间,分子量在 122 885.86~127 843.18 g/mol 之间,pI 均为酸性。

综上所述,同一亚类的 PLD 蛋白具有相似的理化性质,进一步表明 PLD 蛋白理化性质的保守性。其中 α 、 δ 、 ϵ 亚类 PLD 和 GmPLD β 4 蛋白的氨基酸数目与分子量较为接近,表明它们可能发挥着类似的生物学功能,而 GmPLD β 1、GmPLD β 2、GmPLD β 3 蛋白和 ζ 亚类 PLD 蛋白的氨基酸数目以及分子量与它们相比差异较大,表明 GmPLD β 1、GmPLD β 2、GmPLD β 3 和 ζ 亚类 PLD 蛋白可能发挥着其他不同的生物功能。

表 2 大豆 PLD 蛋白的理化性质

蛋白名称	氨基酸数目/aa	摩尔质量/(g/mol)	pI
GmPLD α 1	807	92 078.64	5.90
GmPLD α 2	757	86 504.18	6.80
GmPLD α 3	739	83 922.85	5.36
GmPLD α 4	826	94 258.93	5.77
GmPLD α 5	821	93 469.59	6.16
GmPLD β 1	1 106	124 092.70	6.63
GmPLD β 2	1 097	123 221.67	6.64
GmPLD β 3	1 047	117 361.38	6.63
GmPLD β 4	853	96 097.42	7.65
GmPLD δ 1	866	98 442.89	6.56
GmPLD δ 2	864	98 119.54	6.56
GmPLD δ 3	847	96 410.70	6.99
GmPLD δ 4	847	96 095.22	6.94
GmPLD δ 5	857	96 935.73	6.22
GmPLD δ 6	857	96 970.60	6.24
GmPLD ϵ 1	759	87 080.18	6.75
GmPLD ϵ 2	769	88 231.65	6.11
GmPLD ϵ 3	776	89 339.89	6.23
GmPLD ζ 1	1 075	122 885.86	6.01
GmPLD ζ 2	1 123	127 634.88	6.28
GmPLD ζ 3	1 126	127 843.18	6.31

2.6 大豆 PLD 蛋白家族亚细胞定位预测结果

大豆 PLD 蛋白的核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)及亚细胞定位分析结果见表 3 所列。利用网站 NLS Mapper 预测大豆 PLD 蛋白的 NLS,发现 GmPLD δ 1、GmPLD δ 2、GmPLD δ 3、GmPLD δ 4、GmPLD δ 5、GmPLD δ 6 蛋白含有潜在的 NLS,表明只有 δ 亚类的 PLD 蛋白可能在细胞核中发挥作用。利用网站 Wolf PSORT 预测大豆 PLD 蛋白的亚细胞定位,发现大多数 PLD 蛋白可能在细胞质和过氧化物酶体发挥主要作用,有的 PLD 蛋白还可以在叶绿体、细胞骨架、质体、线粒体等细胞器中发挥作用;甚至有的 PLD 蛋白可能同时具有不同的亚细胞定位,进而行使自身的功能,如 GmPLD α 3、GmPLD β 2、GmPLD δ 5 等。

表 3 大豆 PLD 蛋白的核定位序列及亚细胞定位预测

蛋白名称	核定位序列	亚细胞定位预测
GmPLD α 1	—	cyto:5, chlo:4, cysk-plas:1.33333, mito-plas:1.33333, nucl:1, pero:1, golg:1
GmPLD α 2	—	nucl:12, chlo:1, mito-plas:1
GmPLD α 3	—	chlo:4, cyto:4, pero:2, cysk-plas:1.33333, mito-plas:1.33333, nucl:1, E. R.:1
GmPLD α 4	—	nucl:5, cyto:4, cysk:2.5, chlo:2, cysk-plas:2
GmPLD α 5	—	chlo:5, nucl:3, cyto:2, cysk:1.5, cysk-plas:1.5, vacu:1, golg:1
GmPLD β 1	—	pero:6, chlo:4, nucl:3, cyto:1
GmPLD β 2	—	pero:7, chlo:6, cyto:1
GmPLD β 3	—	chlo:5, nucl:4, cysk:2, mito:1, vacu:1, pero:1
GmPLD β 4	—	chlo:5, nucl:3, pero:2, cysk:1.5, cysk-plas:1.5, cyto:1, vacu:1
GmPLD δ 1	FKHSSVMCVLSPRYASSKMSFLKQQV	nucl:5, cysk:4.5, cyto:3, cysk-plas:3, chlo:1
GmPLD δ 2	FKHSSVMCVLSPRYASNKMSFLKQQV	nucl:6, cysk:3.5, cyto:3, cysk-plas:2.5, chlo:1
GmPLD δ 3	FKHSSVRCLLSPRYASSKLSIFKQQV	nucl:8, cyto:3, cysk:1.5, cysk-plas:1.5, chlo:1
GmPLD δ 4	FKHSSVRCLLSPRYASSKLSIFRQQV	chlo:7, nucl:3, cyto:2, plas:1.5, mito-plas:1.5
GmPLD δ 5	FKHSTVHCVLSPRYASNKLSIFKQQV	nucl:5, cyto:5, vacu:2, pero:2
GmPLD δ 6	FKHSTVHCVLSPRYASNKLSIFKQQV	nucl:6, cyto:5, vacu:1, pero:1, cysk-plas:1
GmPLD ϵ 1	—	cyto:8, nucl:3, plas:1.5, cysk-plas:1.5, vacu:1
GmPLD ϵ 2	—	nucl:6, cyto:3, cysk:2.5, cysk-plas:2.5, plas:1.5, chlo:1
GmPLD ϵ 3	—	nucl:6, cyto:4, cysk:2.5, cysk-plas:2, chlo:1
GmPLD ζ 1	—	nucl:9, chlo:2, cyto:1, vacu:1, golg:1
GmPLD ζ 2	—	nucl:7, cyto:3, cysk:2, mito:1, golg-plas:1
GmPLD ζ 3	—	nucl:6, cyto:3, chlo:2, cysk:2, golg-plas:1

注:cyto 表示细胞质;chlo 表示叶绿体;cysk 表示细胞骨架;plas 表示质体;mito 表示线粒体;nucl 表示细胞核;pero 表示过氧化物酶体;golg 表示高尔基体;E. R. 表示内质网;vacu 表示大液泡。

2.7 大豆 PLD 蛋白家族高级结构预测结果

利用网站 SOPMA 预测 PLD 蛋白的二级结构,结果如图 4 所示。图 4 中:蓝色表示 α -螺旋;红色表示延伸链;绿色表示 β -转角;紫色表示无规则卷曲。

由图 4 可知,大豆 PLD 蛋白主要是由 α -螺旋和无规则卷曲所构成,其中: α -螺旋在 α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 ξ 这 5 种亚类 PLD 蛋白中的占比分别为 22.72%~30.45%、23.25%~27.90%、25.75%~27.54%、26.29%~27.70%、33.04%~35.88%;延伸链占比分别为 17.32%~23.12%、15.85%~20.40%、18.48%~19.91%、20.23%~20.69%、14.51%~19.32%; β -转角占比分别为 3.92%~11.49%、3.74%~5.28%、4.37%~5.60%、4.38%~5.01%、7.82%~8.01%;无规则卷曲占比分别为 42.67%~51.45%、46.42%~55.52%、47.84%~51.27%、46.94%~49.10%、39.63%~43.91%。综上可知,处于同一亚类的 PLD 蛋白具有较为相似的二级结构排布,表明其在蛋白二级结构上的保守性。

为了分析大豆中 21 个 PLD 蛋白的三级结构,利用网站 SWISS 分别预测并构建 α 、 β 、 δ 、 ϵ 和

ζ 亚类中 PLD 蛋白的三维结构模型,如图 5 所示。

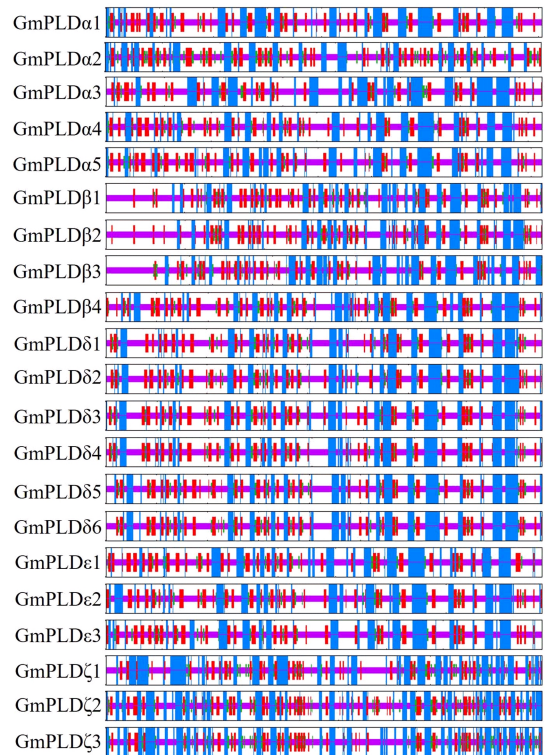


图 4 大豆 PLD 蛋白二级结构分析

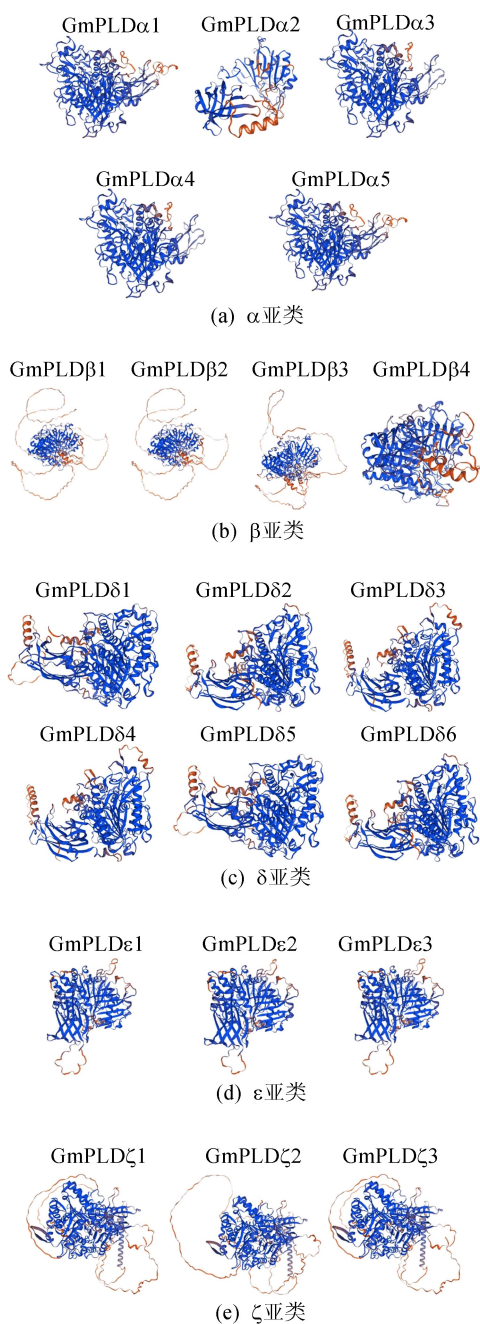


图 5 大豆 PLD 蛋白三维结构分析

从图 5 可以看出,除 GmPLD α 2 和 GmPLD β 4 之外,同一亚类 PLD 蛋白的三维结构相似,而不同亚类 PLD 蛋白之间的三维结构差异较大,表明不同亚类 PLD 蛋白在大豆中发挥不同的生物学功能,例如:拟南芥中的 AtPLD α 1 参与调控种子活力、信号传导以及逆境抵抗等过程;AtPLD β 1 具有病原体抗性功能;AtPLD δ 可以诱导细胞死亡并具有耐冷早能力;AtPLD ϵ 可以抵抗重金属胁迫;而 AtPLD ζ 1 则具有生物素响应的生物学功能^[22]。

由图 5 可知,GmPLD α 2 蛋白的三维结构与

其他 α 亚类 PLD 蛋白相比差异较大,其构象较为简单,表明 GmPLD α 2 可能在大豆中的生物学功能与 α 亚类其他的 PLD 蛋白不同;GmPLD β 4 蛋白的三维结构与其他 β 亚类 PLD 蛋白相比保留了中间的构象,而缺少了外围的环状构象,表明 GmPLD β 4 的生物学功能可能与 β 亚类其他的 PLD 蛋白不同。这与之前的蛋白基序、结构域以及理化性质分析结果基本一致。

2.8 大豆中 PLD 基因的组织表达水平分析

本文利用网站 SoyBase 和基迪奥分析大豆中 PLD 基因家族的组织表达水平,为研究大豆中 PLD 基因家族的生物学功能提供了参考。大豆中 21 个 PLD 基因在大豆的不同组织、豆荚和种子不同发育阶段的表达量热图分析如图 6 所示。

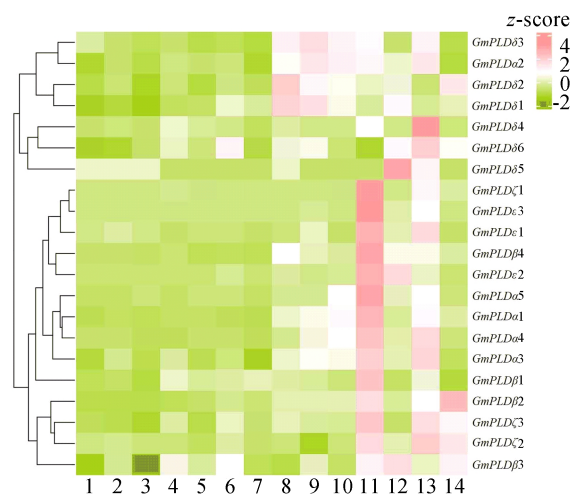


图 6 大豆中 PLD 基因在不同组织中的表达量热图

图 6 中,1~14 分别代表 10DAF 种子、14DAF 种子、21DAF 种子、25DAF 种子、28DAF 种子、35DAF 种子、42DAF 种子、5DAF 豆荚、10DAF 豆荚、14DAF 豆荚、根、叶片、花、根瘤,其中 DAF 表示开花后天数。

从图 6 可以看出,大豆中 PLD 基因家族在不同组织部位和不同发育时期呈现不同的表达特性,一般在豆荚、根、叶、花和根瘤部位的表达相对较高,而在种子部位的表达较低。在 α 亚类中,除了 GmPLD α 2 在豆荚发育过程中表达量较高外,其余 4 个成员在种子、豆荚、叶和根瘤中表达较低,而在根和花中表达较高; β 亚类 PLD 基因在根中表达较高,除了 GmPLD β 2、GmPLD β 3 在根瘤中表达较高外,其余成员在种子、豆荚、叶、花和根瘤中表达均较低; δ 亚类 PLD 基因在种子中表

达普遍较低,而 *GmPLD* δ 1、*GmPLD* δ 2、*GmPLD* δ 3 在豆荚中表达较高,*GmPLD* δ 4/6、*GmPLD* δ 5 分别在花和叶中显著高表达; ϵ 亚类和 ζ 亚类 *PLD* 基因在根中显著高表达,除了 *GmPLD* ϵ 1、*GmPLD* ζ 2、*GmPLD* ζ 3 在花中表达较高外,其余成员而在种子、豆荚、叶等部位中的表达较低。

综上所述,*PLD* 基因家族在种子发育过程中表达普遍较低,表明 *PLD* 可能负调控大豆种子的生长发育过程,参与大豆种子的萌发以及胚的发育;而它们在根中普遍高表达,表明 *PLD* 可能正调控大豆根的生长发育过程,而这些过程与大豆的生长与发育具有一定的关联。前期对 *PLD* 蛋白进行理化性质以及结构分析发现,*GmPLD* α 2 和 *GmPLD* β 4 蛋白与同一亚类的 *PLD* 蛋白存在显著差异,对其在大豆不同组织中的表达量进行分析发现,*GmPLD* α 2 在豆荚中的表达量高于其他 α 亚类 *PLD* 基因,而 *GmPLD* β 4 在根中的表达量也比其他 β 亚类 *PLD* 基因高,这与之前生物信息学分析预测的结果一致。

3 结 论

目前,在拟南芥和水稻等植物中已经鉴定出了多个 *PLD* 家族成员^[23-24],发现 *PLD* 不仅可以调控植物的生长发育,还能响应逆境胁迫^[25],但是大豆中 *PLD* 的相关研究较少。本文以大豆 *PLD* 基因家族为研究对象,通过染色体定位分析、基因结构分析、蛋白理化性质分析、NLS、亚细胞定位分析预测、蛋白基序分析、蛋白结构域分析、蛋白二级和三级结构预测等生物信息学手段对其进行研究。结果发现:大豆 *PLD* 基因家族成员的基因长度和外显子数呈现多样化特点,所属同一亚类的 *PLD* 成员拥有较为一致的外显子数目;大部分的 *PLD* 成员蛋白含有相同类型的基序和结构域,表明它们在功能上具有保守性和一致性,且部分 *PLD* 成员蛋白具有广泛的亚细胞定位。

本文通过对大豆中 21 个 *PLD* 基因进行表达水平分析,研究 *PLD* 基因家族在大豆生长发育中的功能和作用,结果发现 *PLD* 基因可能参与了种子的萌发与胚的发育、根的生长与发育过程,表明 *PLD* 在大豆生长发育以及成熟过程中发挥着重要的作用。因此,通过对大豆中 21 个 *PLD* 基因的生物信息学分析以及表达数据的挖掘,分析出 *PLD* 基因可能具有的功能,为深入研究大豆中 *PLD* 基因家族的生物学功能提供了参考。

[参 考 文 献]

- [1] 梁丽,常明,刘睿杰,等. 磷脂酶研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(4):4.
- [2] WANG X M. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses[J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(2):566-573.
- [3] 王涛,梅旭荣,钟秀丽,等. 磷脂酶 D δ 参与植物的低温驯化过程[J]. *植物学报*, 2010, 45(5):541-547.
- [4] HANAHAN D J, CHAIKOFF I L. A new phospholipid-splitting enzyme specific for the ester linkage between the nitrogenous base and the phosphoric acid grouping[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1947, 169(3):699-705.
- [5] 李丽,孙健,何雪梅,等. 逆境胁迫下植物磷脂酶 D 的生理功能和作用机制综述[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(8):1-5.
- [6] SAITO M, KANFER J. Phosphatidohydrolase activity in a solubilized preparation from rat brain particulate fraction[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1975, 169(1):318-323.
- [7] HELLER M. Phospholipase D[J]. *Advances in Lipid Research*, 1978, 16:267-326.
- [8] HAMMOND S M, ALTSHULLER Y M, SUNG T C, et al. Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(50):29640-29643.
- [9] CHALIFOUR R J, KANFER J N. Microsomal phospholipase D of rat brain and lung tissues[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1980, 96(2):742-747.
- [10] FRANK W, MUNNIK T, KERKMANN K, et al. Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* [J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(1):111-124.
- [11] WANG X. The role of phospholipase D in signal transduction cascade[J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(3):456-462.
- [12] QIN C B, WANG X M. The Arabidopsis phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective *PLD* ζ 1 with distinct regulatory domains [J]. *Plant Physiology*, 2002, 128(3):1057-1068.
- [13] QIN W S, PAPPAN K, WANG X M. Molecular heterogeneity of phospholipase D (*PLD*): cloning of *PLD* γ and regulation of plant *PLD* γ , β and α by polyphosphoinositides and calcium[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(45):28267-28273.
- [14] 张高阳. 大豆磷脂酶 D 对大豆结瘤过程和种子油脂代谢的影响[D]. 武汉:华中农业大学, 2017.
- [15] ZHANG W H, QIN C B, ZHAO J, et al. Phospholipase D alpha 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(25):9508-9513.

(下转第 93 页)

[参 考 文 献]

- [1] WHITE J C, GARDEA-TORRESDY J. Achieving food security through the very small[J]. *Nature Nanotechnology*, 2018, 13(8):627-629.
- [2] 张萍, 张阳, 徐文平, 等. 农业纳米生物技术促进植物生长和提高抗逆性[J]. *世界农药*, 2020, 42(6):23-32.
- [3] HE X, DENG H, HWANG H. The current application of nanotechnology in food and agriculture[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2019, 27(1):1-21.
- [4] CHARIOUS P L, ORTEGA-RIVERA O A, STEINMETZ N F. Nanocarriers for the delivery of medical, veterinary, and agricultural active ingredients[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(3):2678-2701.
- [5] GEBBERS R, ADAMCHUK V I. Precision agriculture and food security[J]. *Science*, 2010, 327(5967):828-831.
- [6] ZULFIQUAR F, ASHRAF M. Nanoparticles potentially mediate salt stress tolerance in plants[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 160:257-268.
- [7] LIU J, FU C, LI G, et al. ROS homeostasis and plant salt tolerance: plant nanobiotechnology updates[J]. *Sustainability*, 2021, 13(6):3552.
- [8] AN J, HU P, LI F, et al. Emerging investigator series: molecular mechanisms of plant salinity stress tolerance improvement by seed priming with cerium oxide nanoparticles[J]. *Environmental Science: Nano*, 2020, 7(8):2214-2228.
- [9] KHAN M N, LI Y, KHAN Z, et al. Nanoceria seed priming enhanced salt tolerance in rapeseed through modulating ROS homeostasis and α -amylase activities[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1):1-19.
- [10] MITTER N, HUSSEY K. Moving policy and regulation forward for nanotechnology applications in agriculture[J]. *Nature Nanotechnology*, 2019, 14(6):508-510.
- [11] ZHANG R, CHEN L, LIANG Q, et al. Unveiling the active sites on ferrihydrite with apparent catalase-like activity for potentiating radiotherapy[J]. *Nano Today*, 2021, 41:101317.
- [12] HUANG G, ZANG J, HE L, et al. Bioactive nanoenzyme reverses oxidative damage and endoplasmic reticulum stress in neurons under ischemic stroke[J]. *ACS Nano*, 2021, 16:431-452.
- [13] 李鹏民, 高辉远. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2005, 31(6):559-566.
- [14] KALAJI H M, JAOO A, OUKARROUM A, et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38:1-11.
- [15] MITTAL S, KUMARI N, SHARMA V. Differential response of salt stress on Brassica juncea; photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 54:17-26.
- [16] WANG A D, JIN Q J, XIN X, et al. High-throughput screening for engineered nanoparticles that enhance photosynthesis using mesophyll protoplasts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(11):3382-3389.
- [16] MISHRA G, ZHANG W H, DENG F, et al. A bifurcating pathway directs abscisic acid effects on stomatal closure and opening in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2006, 312(5771):264-266.
- [17] HONG Y Y, PAN X Q, WELTI R, et al. Phospholipase D α 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2008, 20(3):803-816.
- [18] WELTI R, LI W Q, LI M Y, et al. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(35):31994-32002.
- [19] HONG Y Y, ZHENG S Q, WANG X M. Dual functions of phospholipase D α 1 in plant response to drought[J]. *Molecular Plant*, 2008, 1(2):262-269.
- [20] SEVERIN A J, WOODY J L, BOLON Y T, et al. RNA-Seq Atlas of Glycine max: a guide to the soybean transcriptome[J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10:160.
- [21] PAPPAN K, WANG X. Molecular and biochemical properties and physiological roles of plant phospholipase D[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1439(2):151-166.
- [22] 史敬芳, 张琪, 宋松泉, 等. 磷脂酶及其调控种子活力研究进展[J]. *南方农业学报*, 2022, 53(9):2612-2623.
- [23] 郑晓东. 拟南芥和水稻基因组中 PLD 家族分析[D]. 济南: 山东农业大学, 2009.
- [24] MUNNIK T, MEIJER H J. Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants[J]. *FEBS Letters*, 2001, 498(2/3):172-178.
- [25] 李丽, 游向荣, 孙健, 等. 植物磷脂酶 D 基因表达与衰老的关系[J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(1):99-106.

(责任编辑 闫杏丽)

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 87 页)