

大豆磷脂酶C基因*GmPLC12*的表达分析与原核表达

王法微¹, 包桥桥², 邓宇², 董金晔², 崔志彤², 王慧莹², 修华谦², 李海燕^{1,2,*}

吉林农业大学¹生物反应器与药物开发教育部工程研究中心; ²生命科学学院, 长春130118

摘要: 磷脂酶C (phospholipase C, PLC)是一类能够水解磷脂生成肌醇三磷酸与二酰甘油的酶, 在植物非生物胁迫中起着重要的调控作用。本研究首次从大豆中克隆了大豆磷脂酶C基因*GmPLC12*, 其全长cDNA序列1 671 bp, 编码一个由556个氨基酸组成的蛋白。系统发育树分析发现, *GmPLC12*与菜豆PvPLC1、豇豆VuPLC1同源性最近。利用实时定量PCR分析发现, *GmPLC12*在盐、碱以及盐碱胁迫下表达量升高极为显著, 尤其是盐碱胁迫。将*GmPLC12*基因连接到原核表达载体中并利用IPTG诱导表达, 产生一条约为70 kDa的条带, 与预期结果一致。

关键词: 磷脂酶C; 生物信息学分析; 基因表达; 原核表达

Expression Analysis and Prokaryotic Expression of *GmPLC12* in *Glycine max*

WANG Fa-Wei¹, BAO Qiao-Qiao², DENG Yu², DONG Jin-Ye², CUI Zhi-Tong², WANG Hui-Ying², XIU Hua-Qian², LI Hai-Yan^{1,2,*}

¹Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development; ²College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Phospholipase C (PLC) is a class of enzymes that cleave phospholipids into diacyl glycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). It plays an important role in plant abiotic stresses. In this study, we firstly cloned the *GmPLC12* gene from soybean (*Glycine max*). The full-length of *GmPLC12* is 1 671 bp and encoding 556 amino acids. Phylogenetic analysis indicated that *GmPLC12* shared highest homology with PvPLC1 and VuPLC1. Real-time quantitative analysis showed that the expression levels of *GmPLC12* were induced by salt, alkali and salt-alkaline treatments, especially salt-alkaline stress. Subsequently, *GmPLC12* was ligated into pE-T28a vector and transferred into *Escherichia coli* strain BL21. The recombinant protein was induced by IPTG and showed an about 70 kDa bands, which was consistent with prediction.

Key words: phospholipase C; bioinformatics analysis; gene expression; prokaryotic expression

磷脂酶C (phospholipase C, PLC)是一种能够水解磷脂的酶类, 它可以水解磷脂酰肌醇(4,5)-二磷酸生成两个重要的第二信使分子——二酰甘油 (diacylglycerol, DAG)与肌醇三磷酸(inositol trisphosphate, IP₃) (Rupwate和Rajasekharan 2012)。DAG可以被二酰甘油激酶磷酸化为磷脂酸(phosphatidic acid, PA), PA能够与一些蛋白激酶、脂激酶和NADPH氧化酶等蛋白相互作用, 从而调节植物逆境胁迫、细胞生长离子运输以及细胞死亡等生理过程(Wang等2006)。而IP₃在植物中可以迅速转化为IP₆, 进而调节Ca²⁺信号传导网络(Munnik和Testerink 2009; Lemtiri-Chlieh等2003)。Shi等(1995)首先从大豆质膜中分离出一种蛋白, 通过cDNA文库筛选并测序后证实为磷脂酶C, 酶活性分析发现它对不同磷脂酰肌醇均具有水解活性。近年来已经从拟南芥(Peters等2010; Wimalasekera等2010)、水稻(Singh等2013)、番茄(Vossen等

2010)等植物中克隆并鉴定了它们的功能, 研究发现, 磷脂酶C在植物受到盐胁迫时能够通过调节气孔状态使植物减少因渗透胁迫而受到的伤害(Peters等2010)。植物受到病原菌感染时, 磷脂酶C能够激活一系列病程相关蛋白的表达, 从而抵抗胁迫所带来的影响(Vossen等2010)。这些研究结果均说明磷脂酶C对植物逆境, 尤其是盐胁迫, 具有重要的调控作用。

大豆是一种含有丰富蛋白质与脂肪酸的作物, 以大豆为原料可以加工为中国的传统食物豆腐。同时, 大豆也可以榨油, 大豆油已经成为我国食用

收稿 2015-01-14 修定 2015-04-20

资助 国家自然科学基金(31201144和31271746)、教育部高等学校博士学科点专项科研基金新教师类(20122223120003)、吉林省发改委项目(JF2012C002-04)和吉林农业大学国家级大学生创新创业训练计划项目(201410193036)

* 通讯作者(E-mail: hyl99@163.com; Tel: 0431-84533427)。

最多的植物油。然而,随着近些年来气温逐渐升高因素,加剧土壤的干旱以及盐碱化,这些非生物胁迫严重影响大豆的产量以及质量(高中超等2007;郝兴宇等2010)。选育抗逆性强的大豆新种质已经成为大豆育种的一个重要目标。本文克隆了一个大豆磷脂酶C基因,分析其在不同逆境胁迫下的表达模式,并对其进行原核表达研究,为该基因深入研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 植物材料

大豆(*Glycine max* L.)品种‘威廉姆斯82’(‘Williams 82’)来源于生物反应器与药物开发教育部工程研究中心,并种植于吉林农业大学试验田中。

1.2 菌株与试剂

大肠杆菌DH5 α 菌株、BL21菌株和表达载体pET28a由本实验室保存;克隆载体pGEM T-easy载体购自于Promega公司;植物总RNA提取试剂盒(RP3301)购自于北京百泰克生物技术有限公司;限制性内切酶、反转录试剂盒(RR047A)、Extaq、DNA Marker、荧光定量PCR试剂盒(RR420A)均购自于TaKaRa公司;质粒提取试剂盒与凝胶回收试剂盒购自于爱思进生物技术有限公司;其他生化试剂均为国产或进口分析纯试剂。

2 材料的处理

将大豆种子播种于装有Hoagland液体培养基的水培桶中,在12 h白天(26 °C)与12 h黑暗(22 °C)的培养室中培养,光照强度150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。当大豆生长至12 d时,选取生长状态一致的大豆进行以下不同胁迫处理: ABA处理(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA)、干旱处理(8% PEG8000)、盐处理(120 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl)、碱处理(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO₃)和盐碱处理(70 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl+50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO₃)。处理时间分别为0、1、3、6、9与12 h,处理结束后,迅速将根及叶片包于锡箔纸中,液氮速冻后保存于-80 °C冰箱备用。另外,在大豆生长过程中分别取生长20 d的茎、花、未成熟种子(花后30 d)以及成熟种子,液氮速冻后保存于-80 °C冰箱备用。

3 总RNA的提取及cDNA的合成

将冻存的大豆材料取出后迅速置于液氮中,依次取出后在液氮中充分研磨。研磨充分后收集

样品粉末,根据植物总RNA提取试剂盒说明书中的方法提取总RNA。总RNA经琼脂糖凝胶电泳检测后反转录为cDNA,反转录步骤与反转录体系见TaKaRa反转录试剂盒说明书,每个反转录体系中所含总RNA质量为1.5 μg 。

4 *GmPLC12*基因的克隆与表达载体构建

根据*GmPLC12*基因(GenBank登录号XM_003538420.2)的序列设计1对含有*Xba*I酶切位点的特异引物(上游引物: 5' gCTCTAgAATggC-CAGTCACA ACTACAAA 3'; 下游引物: 5' gCTCTAgATCATCTAAACTgAAACCgCA 3'),以cDNA为模板进行PCR扩增目的基因。PCR扩增体系为: 18.3 μL ddH₂O, 上游引物与下游引物、模板、dNTP各1 μL , PCR缓冲液2.5 μL , Extaq 0.2 μL 。PCR反应程序为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性50 s, 55 °C退火50 s, 72 °C延伸60 s, 反应进行32个循环后72 °C后延伸5 min。通过琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,将阳性条带回收并克隆入pGEM T-easy载体中,将阳性质粒送交北京金唯智生物技术有限公司进行测序。

以阳性克隆载体质粒为模板,利用原核表达引物(上游引物: 5' CGGGATCCATggCCAgTCACA ACTACA 3'; 下游引物: 5' CCCTCGAGTCTAAACTgAAACCgCA 3')进行PCR扩增(反应体系同上)。将PCR产物与pET28a空载体分别进行*Bam*HI与*Xho*I双酶切,酶切产物经琼脂糖电泳后分别回收目的基因与载体大片段,连接后转化至大肠杆菌BL21中,验证阳性克隆后进行蛋白诱导表达实验。

5 *GmPLC12*的生物信息学分析

利用Primer Premier 5.0软件将测序获得的*GmPLC12*基因编码区序列翻译为氨基酸序列,在NCBI (www.nlm.nih.gov)中进行BLAST分析并查找与*GmPLC12*相似性较高的其它植物PLC。利用DNAMAN软件对选取的与*GmPLC12*相似性相高的序列进行系统发育树分析。同时,对*GmPLC12*与PvPLC1、VuPLC进行相似性分析。另外,将*GmPLC12*的氨基酸序列利用SWISS模型(<http://swissmodel.expasy.org>)分析*GmPLC12*蛋白的三维结构。

6 实时荧光定量PCR

利用实时定量PCR技术分析*GmPLC12*基因在不同组织以及ABA、干旱、盐、碱和盐碱胁迫下

的表达模式。*GmPLC12*基因上游引物为: 5' GAGCTCAGATGGTTGCGTTCA 3', *GmPLC12*基因下游引物为: 5' TCAGGCTTTTTACATAACCGC 3'。并以*Act11*基因(上游引物: 5' GCGGGAAATTGTAAGGGATGT 3', 下游引物: 5' TCGCCAATAGTGATGACCTG 3')为内参基因进行相对表达量分析。采用TaKaRa公司的实时荧光定量PCR试剂盒进行PCR反应, 反应体系(20 μ L)含有10 μ L Premix酶, 7 μ L ddH₂O, 上、下游与模板各1 μ L。定量PCR反应程序为94 $^{\circ}$ C预变性30 s; 94 $^{\circ}$ C变性5 s, 60 $^{\circ}$ C退火与延伸20 s, 反应进行40个循环后计算溶解曲线。定量PCR结束后, 根据内参基因与目的基因的C_t值计算*GmPLC12*基因的相对表达量。*GmPLC12*基因在不同组织的相对表达量按照2^{- Δ C_t}法计算, *GmPLC12*基因在不同逆境胁迫下的表达量按照2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算。每次实验每个样品做3个重复, 并进行3次生物重复实验。

7 *GmPLC12*基因的原核表达

挑取大肠杆菌BL21阳性单菌落, 接种于2 mL LB液体培养基中37 $^{\circ}$ C培养至OD₆₀₀值为0.8~1.0, 再将此菌扩大培养至200 mL LB液体培养基中继续培养。当菌液生长至OD₆₀₀值为0.8左右时, 分别加入0、0.1、0.3、0.5、0.7和1.0 mmol·L⁻¹ IPTG, 在28 $^{\circ}$ C诱导表达6 h后离心收集菌体, 超声破碎后离心并取上清液, 加入蛋白上样缓冲液后沸水浴煮10 min, 用于SDS-PAGE和Western blot检测。

8 SDS-PAGE及Western blot

将变性后的蛋白样品进行SDS-PAGE, 每个点样孔上样20 μ L样品蛋白, 在5%浓缩胶与12%分离胶下进行电泳。浓缩胶区域电压为60 V, 分离胶区

域电压为140 V。待电泳结束后利用考马斯亮蓝染色, 之后利用脱色液进行脱色以检测蛋白的表达情况。

测定各个蛋白的浓度, 并按照每个点样孔20 μ g标准再次进行SDS-PAGE, 电泳结束后进行转膜, 将SDS-PAGE胶上的蛋白转移至PVDF膜上。利用封闭液(PBST+5%脱脂奶粉) 4 $^{\circ}$ C封闭2 h, 随后与鼠抗6 \times His单克隆抗体室温孵育2 h, PBST洗膜3次后加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠二抗, 室温孵育2 h。孵育结束后, 利用PBST洗膜3次, 加入3 mL显色液进行显色, 显色结束后用PBST洗膜一次后拍照记录。

实验结果

1 *GmPLC12*基因的克隆

以反转录的cDNA为模板, PCR扩增*GmPLC12*基因后获得1条长度为1 671 bp的条带(图1-A)。将该片段利用凝胶回收试剂盒回收后与pGEM T-easy载体在T4 DNA连接酶的作用下连接过夜, 并将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞。提取阳性菌液的重组质粒DNA, 利用*Xba*I进行酶切鉴定。结果显示, 泳道3~4酶切得到1条大小为1 671 bp的片段, 初步证实克隆片段正确(图1-B)。将重组质粒送交北京金唯智生物技术有限公司进行测序, 测序结果与预期基因序列一致, 证实成功克隆了大豆*GmPLC12*基因。

2 *GmPLC12*蛋白的生物信息学分析

将测序得到的基因序列利用软件进行翻译后得到其编码的蛋白质序列, 该蛋白含有556个氨基酸, 预计分子量大小为62 987.4 Da, 等电点为

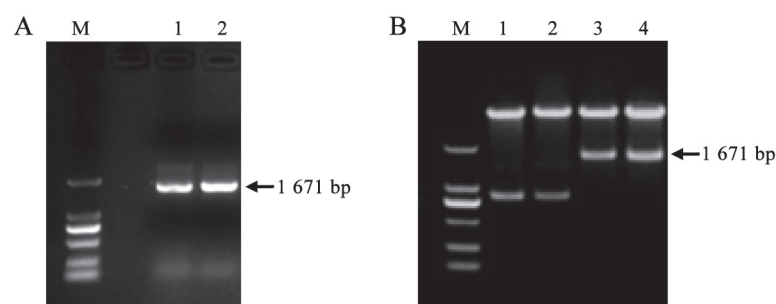


图1 大豆*GmPLC12*基因的克隆与鉴定

Fig.1 Cloning and identification of the *GmPLC12* gene

A: 大豆*GmPLC12*基因的克隆; 1~2: PCR扩增结果。B: 重组质粒酶切鉴定; 1~4: 酶切结果。M: DNA marker DL2000。

5.78。利用SWISS分析GmPLC12的三维结构发现,该蛋白主要包含3个结构域,分别为EF指型结构域、X-Y催化结构域与C2结构域(图2)。其中,EF指型结构域由7个 α 螺旋与6个 β 折叠构成;X-Y结构域由9个 α 螺旋与11个 β 折叠构成,C2结构域则由1个 α 螺旋与12个 β 折叠构成(图2)。

3 GmPLC12蛋白的系统发育树分析

利用NCBI中的BLAST工具搜索与GmPLC12相似性较高的蛋白,将这些蛋白与GmPLC12进行系统发育树分析。分析结果发现GmPLC12与菜豆PvPLC1亲缘关系最近,其次为豇豆VuPLC、绿豆VrPLC、鹰嘴豆CaPLC与苜蓿MtPLC(图3)。在这些PLC中,GmPLC12与PvPLC1的相似性为87.05%,与VuPLC的相似性也达到84.89%,大豆GmPLC12与豆科其他PLC的相似性均高于其他作物的PLC。通过系统发育树分析以及同源性分析表明,GmPLC12属于植物磷脂酶C,其在分子进化中十分保守,并且其分子进化与不同物种间的生物进化相一致。

4 GmPLC12基因的表达分析

结果(图4)发现,GmPLC12在各个组织中均有表达,茎中的表达量最高,而在未成熟种子中的表达量最低,在叶片、花及根中的表达量约为茎中

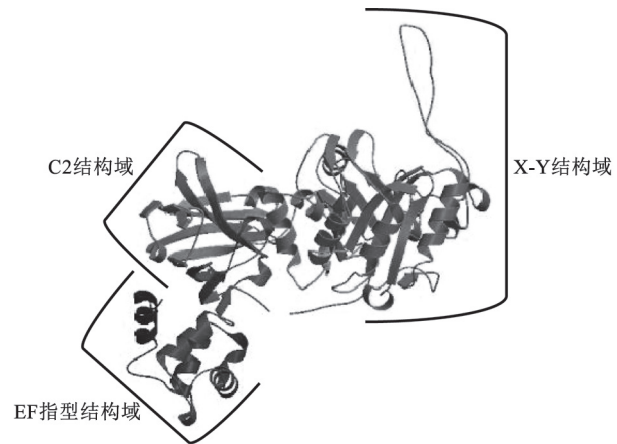


图2 大豆GmPLC12的3D结构图

Fig.2 3D structure of GmPLC12

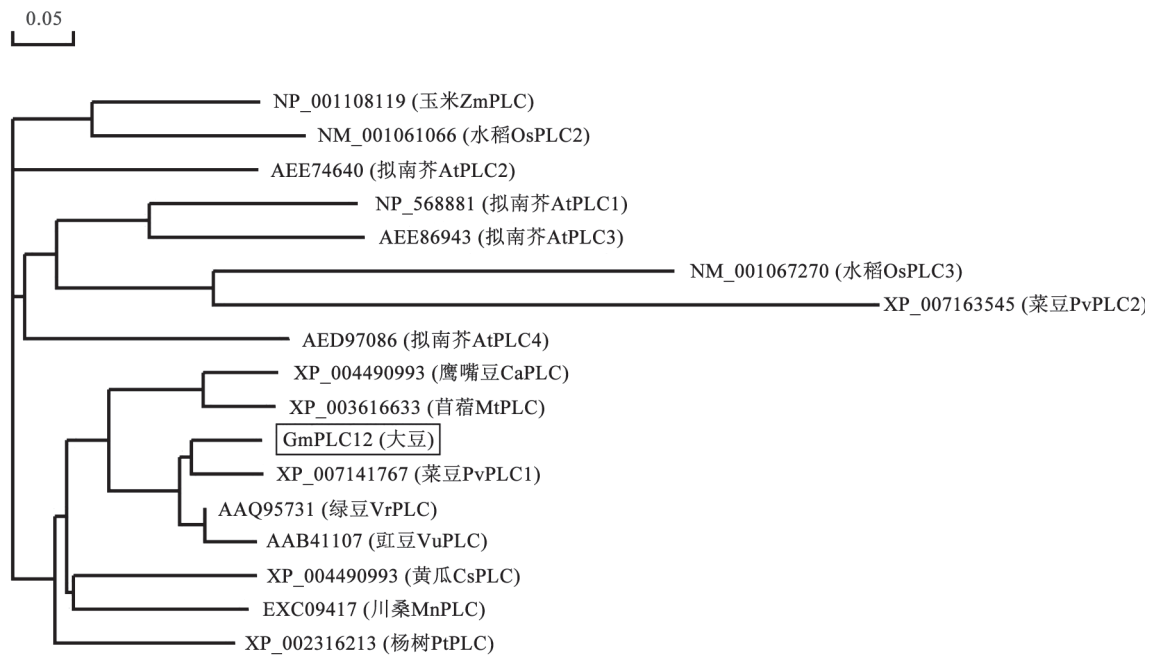


图3 几种植物PLC蛋白的进化分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of PLC from several plants

ZmPLC: 玉米(*Zea mays*), NP_001108119; OsPLC2: 水稻(*Oryza sativa*), NM_001061066; OsPLC3: 水稻, NM_001067270; AtPLC1: 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), NP_568881; AtPLC2: 拟南芥, AEE74640; AtPLC3: 拟南芥, AEE86943; AtPLC4: 拟南芥, AED97086; PvPLC1: 菜豆(*Phaseolus vulgaris*), XP_007141767; PvPLC2: 菜豆, XP_007163545; CaPLC: 鹰嘴豆(*Cicer arietinum*), XP_004490993; MtPLC: 苜蓿(*Medicago truncatula*), XP_003616633; GmPLC12: 大豆(*Glycine max*), XM_003538420.2; VrPLC: 绿豆(*Vigna radiata*), AAQ95731; VuPLC: 豇豆(*Vigna unguiculata*), AAB41107; CsPLC: 黄瓜(*Cucumis sativus*), XP_004490993; MnPLC: 川桑(*Morus notabilis*), EXC09417; PtPLC: 杨树(*Populus trichocarpa*), XP_002316213。

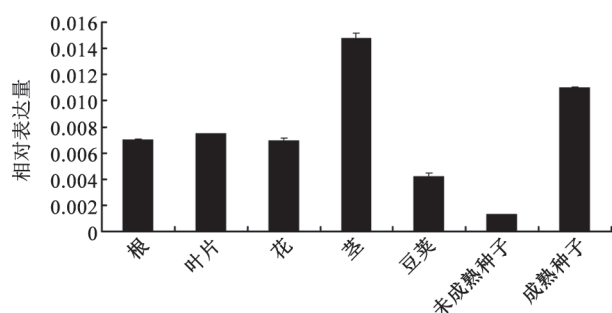


图4 大豆*GmPLC12*基因在不同组织的表达分析
Fig.4 Expression analysis of *GmPLC12* in different organs

的一半。其次,分析了大豆叶片及根中*GmPLC12*基因在盐、碱、盐碱、干旱以及ABA处理后的表达量的变化。结果(图5)表明,叶片中*GmPLC12*在ABA处理后表达量没有发生明显变化;在干旱处理下,表达量略微升高,在6 h达到表达量的峰值,为对照的1.88倍;在碱处理下,*GmPLC12*表达量迅

速升高,在3 h达到对照水平的2.36倍,之后一直维持这个表达水平到12 h;在盐胁迫初期*GmPLC12*表达量略微升高,在12 h时升高到对照的2.09倍;当大豆在盐碱胁迫时,*GmPLC12*基因的表达量随着处理时间出现先升高后降低的趋势,并且在9 h出现表达量的最大值,为对照的3.04倍(图5-A)。而在根中*GmPLC12*在ABA处理后表达量迅速升高,在3 h后即达到对照的2.53倍;在盐处理1 h后*GmPLC12*的表达量即达到峰值,然后表达量逐渐降低;在盐碱、碱及干旱处理下*GmPLC12*的表达量略微升高(图5-B)。

5 *GmPLC12*在大肠杆菌中的表达

经考马斯亮蓝染色及脱色后,发现空载体条带与各个不同浓度IPTG诱导后的蛋白条带几乎一致,推测的目的蛋白条带处也均有一条明显的条带(图6-A)。为了进一步确定目的蛋白是否诱导表达成功,我们对蛋白进行定量上样并进行Western

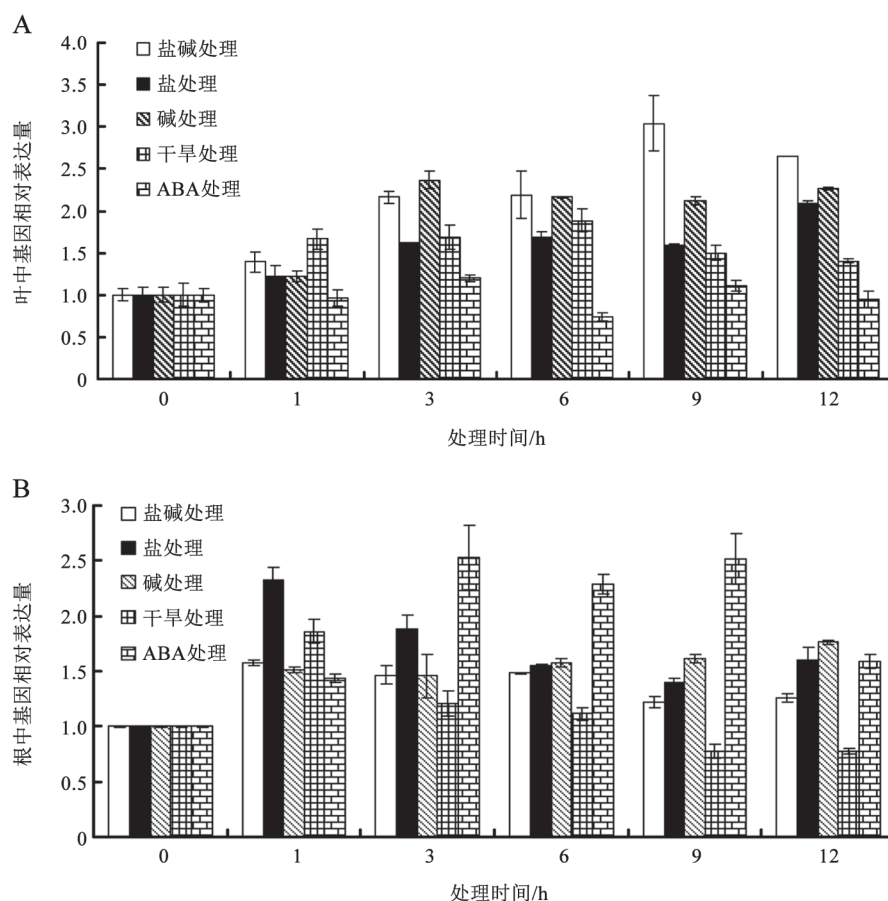


图5 不同逆境胁迫下大豆的叶片及根中*GmPLC12*基因的表达分析
Fig.5 Expression analysis of *GmPLC12* in leaves and roots under various stresses

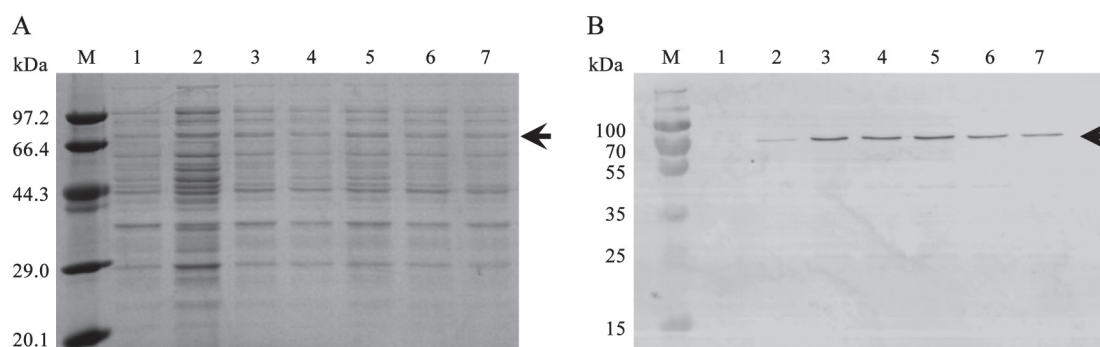


图6 GmPLC12重组蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig.6 Expression of GmPLC12 protein in *E. coli* cells

A: SDS-PAGE检测; B: Western blot检测。M: 蛋白分子量标准; 1: pET28a空载; 2~7: IPTG浓度分别为0、0.1、0.3、0.5、0.7和1.0 mmol·L⁻¹诱导的重组蛋白; 箭头表示GmPLC12的融合蛋白条带。

blot检测。结果发现空载体处没有任何条带, 未诱导的样品中在70 kDa处有一条较弱的条带(图6-B)。而经IPTG诱导后, 目的蛋白的表达量明显增加。其中, 0.1、0.3与0.5 mmol·L⁻¹ IPTG诱导的目的蛋白表达量最高, 且没有任何杂带(图6-B)。

讨 论

迄今为止, Shi等(1995)首次从大豆中克隆了1个磷脂酶C基因(*GmPLC1*), 但并未对该基因进行更进一步的研究。Chou等(2004)利用磷脂酶C的特异性抑制剂U-73122研究了磷脂酶C酶活性被抑制, 发现PLC在病原菌侵染时对防御基因的表达起负调控的作用。许多学者将U-73122与新霉素作为磷脂酶C的专一性抑制剂开展反向研究(Ghars等2012; Andreeva等2010; Komis等2008), 但近些年来Klein等(2011)提出了对PLC专一性抑制剂的质疑, 他发现不同剂量的U-73122在一定的时间内能够激活PLC的活性, 并且活性是对照组的8倍。所以, 关于磷脂酶C的研究还应该从基因本身入手。为此, 本研究克隆了大豆*GmPLC12*基因, 通过BLAST及系统发育树分析证实该基因属于植物磷脂酶C基因。*GmPLC12*与Shi等(1995)克隆得到的*GmPLC1*基因序列相似性为57.9%, 但在X-Y催化区相似性相对较高。Mikami (2014)表明X-Y催化区是决定磷脂酶C水解底物的关键区域, 该区域的保守性对磷脂酶C的活性至关重要, 这说明*GmPLC12*应该具有磷脂酶活性。Kopka等(1998)报道马铃薯StPLC中共有14个 α 螺旋和19个 β 折叠, 而*GmPLC12*含有17个 α 螺旋和29个 β 折叠, 这可能是

PLC在进化过程中发生的改变所致。在磷脂酶C的原核表达中, 王志刚等(2012)与刘菲菲等(2013)分别选取0.8及1.0 mmol·L⁻¹ IPTG进行诱导表达。而本研究结果显示, 0.1、0.3与0.5 mmol·L⁻¹ IPTG诱导条件下*GmPLC12*的表达量较好(图6)。

磷脂酶C基因在进化的过程中不仅在蛋白结构上发生变化, 其表达模式在不同植物以及同种植物不同基因之间也存在着差异。大豆叶片中*GmPLC12*的表达量对ABA处理不敏感, 但Liu等(2006)报道豌豆叶片中*PsPLC*可以被外源ABA及SA所诱导。在盐处理条件下, 水稻*OsPLC1*表达量升高显著, *OsPLC2*与*OsPLC3*变化不明显, 而*OsPLC4*表达量却降低(Singh等2013)。而本研究在盐处理条件下大豆叶片中*GmPLC12*的表达量随处理时间的推移而升高, 在处理12 h时达到表达量峰值。在根中*GmPLC12*的表达量却迅速升高, 达到表达量的峰值。磷脂酶C基因表达模式的差异说明这些基因在不同逆境胁迫下的作用有所不同。我们的研究结果表明大豆磷脂酶C基因可能参与植物对盐、碱和盐碱胁迫的应答, 但其作用机理仍不清楚。在后续的研究中, 试图通过将磷脂酶C在拟南芥中进行过表达, 以及利用Pull-down技术筛选与*GmPLC12*相互作用的蛋白, 从而研究该基因调控植物逆境胁迫的机制。

参考文献

- 高中超, 周宝库, 张喜林(2007). 大豆对干旱胁迫生理生化的响应. 大豆通报, (5): 27~30
郝兴宇, 韩雪, 林而达(2010). 气候变化对大豆影响的研究进展. 应

- 用生态学报, 21 (10): 2697~2706
- 刘菲菲, 张梁, 顾正华, 丁重阳, 石贵阳(2013). 蜡状芽孢杆菌磷脂酶C基因在大肠杆菌中的异源表达. 食品科学, 34 (11): 182~187
- 王志刚, 杨志邦, 杜祎, 石中全, 邓西川, 周雪(2012). 脓肿分枝杆菌非溶血性磷脂酶C的原核表达及活性鉴定. 中国生物制品学杂志, 25 (6): 685~688
- Andreeva Z, Barton D, Armour WJ, Li MY, Liao LF, McKellar HL, Pethybridge KA, Marc J (2010). Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in *Arabidopsis* roots. *Planta*, 232 (5): 1263~1279
- Chou WM, Shigaki T, Dammann C, Liu YQ, Bhattacharyya MK (2004). Inhibition of phosphoinositide-specific phospholipase C results in the induction of pathogenesis-related genes in soybean. *Plant Biol (Stuttg)*, 6 (6): 664~672
- Ghars MA, Richard L, Lefebvre-De VD, Leprince AS, Parre E, Bordenave M, Abdelly C, Savoure A (2012). Phospholipase C and D modulate proline accumulation in *Thellungiella halophila/salsuginea* differently according to the severity of salt or hyperosmotic stress. *Plant Cell Physiol*, 53 (1): 183~192
- Klein RR, Bourdon DM, Costales CL, Wagner CD, White WL, Williams JD, Hicks SN, Sondek J, Thakker DR (2011). Direct activation of human phospholipase C by its well known inhibitor u73122. *J Biol Chem*, 286 (14): 12407~12416
- Komis G, Galatis B, Quader H, Galanopoulou D, Apostolakis P (2008). Phospholipase C signaling involvement in microtubule assembly and activation of the mechanism regulating protoplast volume in plasmolyzed root cells of *Triticum turgidum*. *New Phytol*, 178 (2): 167~282
- Kopka J, Pical C, Gray JE, Ruller-Rober B (1998). Molecular and enzymatic characterization of three phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms from potato. *Plant Physiol*, 116 (1): 239~250
- Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie E, Webb A, Manison NF, Brownlle C, Skepper JN, Chen J, Prestwich GD, Brearley CA (2003). Inositol hexakisphosphate mobilizes an endomembrane store of calcium in guard cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (17): 10091~10095
- Liu HT, Liu YY, Pan QH, Yang HR, Zhan JC, Huang WD (2006). Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP₂-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *J Exp Bot*, 57 (12): 3337~3347
- Mikami K (2014). Structural divergence and loss of phosphoinositide-specific phospholipase C signaling components during the evolution of the green plant lineage: implications from structural characteristics of algal components. *Front Plant Sci*, 5: 380
- Munnik T, Testerink C (2009). Plant phospholipid signaling—"in a nutshell". *J Lipid Res*, 50 (Suppl): S260~S265
- Peters C, Li MY, Narasimhan R, Roth M, Welti R, Wang XM (2010). Nonspecific phospholipase C NPC4 promotes responses to abscisic acid and tolerance to hyperosmotic stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22: 2642~2659
- Rupwate SD, Rajasekharan R (2012). Plant phosphoinositide-specific phospholipase C: an insight. *Plant Sign Behav*, 7 (10): 1281~1283
- Shi J, Gonzales RA, Bhattacharyya MK (1995). Characterization of a plasma membrane-associated phosphoinositide-specific phospholipase C from soybean. *Plant J*, 8 (3): 381~390
- Singh A, Kanwar P, Pandey A Tyagi AK, Sopory SK, Kapoor S, Pandey GK (2013). Comprehensive genomic analysis and expression profiling of phospholipase C gene family during abiotic stresses and development in rice. *PLoS ONE*, 8 (4): e62494
- Vossen JH, Abd-El-Halim A, Fradin EF, van den Berg GC, Ekengren SK, Meijer HJ, Seifi A, Bai Y, ten Have A, Munnik T et al (2010). Identification of tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC1) family members and the role of PLC4 and PLC6 in HR and disease resistance. *Plant J*, 62 (2): 224~239
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welti R (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 45 (3): 250~278
- Wimalasekera R, Pejchar P, Holk A, Martinec J, Scherer GF (2010). Plant phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C NPC3 and NPC4 with roles in root development and brassinolide signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*, 3 (3): 610~625