

玉米 *PDI* 基因家族鉴定和表达模式分析

吴金丽^{1,2}, 汤泽洋^{1,2}, 鲁鑫², 周志强², 郭长虹¹, 李新海^{1,2}

(¹哈尔滨师范大学生命科学与技术学院黑龙江省分子细胞遗传与遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150025;

²中国农业科学院作物科学研究所/作物分子育种国家工程实验室, 北京 100081)

摘要: 蛋白质二硫键异构酶(PDI, protein disulfide isomerase)作为硫氧还蛋白家族的一员,是一种氧化还原酶,广泛存在于动物、植物及微生物中。在植物中,蛋白质二硫键的形成和异构主要由二硫键蛋白催化完成,在参与蛋白质正确组装折叠方面至关重要。本研究以拟南芥 *PDI* 家族基因序列信息为基础,利用同源序列比对方法,从玉米中鉴定出 21 个 *PDI* 基因,除 8 号染色体外,非均匀地分布在其余玉米 9 条染色体上。进化树分析表明,玉米 *PDI* 基因家族分为 4 个进化分支 11 个发育组,同一发育组的基因结构和保守基序相似。顺式作用元件分析表明,*PDI* 基因家族启动子含响应逆境胁迫、植物激素及胚乳特异表达的顺式作用元件。表达模式分析表明,*PDI* 基因家族在胚、胚乳和籽粒中表达量较高,在授粉后 10~20 d 的胚乳中表达量呈下降趋势,然后表达量又呈现上升趋势。生物多样性分析发现:*ZmPDIL1-1* 基因存在多样性。亚细胞定位结果表明 *ZmPDIL1-1* 定位在内质网。本研究结果为玉米 *PDI* 家族基因功能研究提供参考。

关键词: 玉米; *PDI* 基因家族; 基因表达; 亚细胞定位

Identification and Expression Pattern Analysis of *PDI* Gene Family in Maize

WU Jinli^{1,2}, TANG Zeyang^{1,2}, LU Xin², ZHOU Zhiqiang², GUO Changhong¹, LI Xinhai^{1,2}

(¹Key Laboratory of Molecular Cytogenetics and Genetic Breeding of Heilongjiang Province, College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Engineering Laboratory for Crop Molecular Breeding, Beijing, 100081)

Abstract: Protein Disulfide Isomerase (PDI), a member of the thioredoxin superfamily, is an oxidoreductase widely exists in animals, plants and microorganisms. In plants, the formation and isomerization of protein disulfide bonds, which are mainly catalyzed by disulfide bond proteins, are crucial in the correct assembly and folding of proteins. In this study, based on the sequence similarity to the *PDI* gene family in *Arabidopsis thaliana*, 21 *PDI* genes were identified and found on nine chromosomes of maize. The phylogenetic tree analysis showed that the maize *PDI* gene family members were divided into four evolutionary branches and 11 developmental groups, and within each group the gene structure and conserved motifs were similar. The analysis of cis-acting elements in the promoters identified cis-acting elements associating to stress, plant hormones and endosperm specific expression. By quantifying the transcriptional profiles, the high expression was detected in embryo, endosperm and grain. In endosperm, a downward trend followed by upward from 10 to 20 days after pollination was observed. Biodiversity analysis revealed that was diversity of *ZmPDIL1-1* gene. The result of subcellular localization showed that *ZmPDIL1-1* was located to the endoplasmic reticulum.

收稿日期: 2023-06-21 修回日期: 2023-07-20 网络出版日期: 2023-08-11

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230621001>

第一作者研究方向为植物遗传学, E-mail: wujinli1998@163.com

通信作者: 郭长虹, 研究方向为植物遗传学, E-mail: kaku3008@126.com

李新海, 研究方向为玉米遗传改良与种质创新, E-mail: lixinhai@caas.cn

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32001559); 国家玉米产业技术体系(CARS-02-02)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation Project (32001559); Modern Agro-Industry Research System of Maize(CARS-02-02)

Collectively, this study provided reference for the functional analysis of *PDI* gene family in maize.

Key words: maize; *PDI* gene family; gene expression; subcellular localization

玉米(*Zea mays* L.)是一种重要的粮、饲兼用作物,其中70%玉米用作饲料。普通玉米中蛋白质组分不平衡,限制了在动物饲料中的应用,而籽粒蛋白质是决定玉米品质的重要因素。玉米籽粒中蛋白质的积累,除受到蛋白质翻译和蛋白前体代谢相关基因直接调控外,蛋白亚基的修饰、折叠等相关基因修饰效应也广泛作用于蛋白质的合成。

蛋白质二硫键异构酶(*PDI*, protein disulfide isomerase)是硫氧还蛋白家族的成员^[1],硫氧还蛋白中含有一个或多个功能域为-CXXC-的硫氧还蛋白酶活性中心^[2]。在氧化状态下,*PDI*活性中心的二硫键与底物二硫键结合,*PDI*活性中心为还原状态。在还原状态下,*PDI*活性中心的二硫键催化底物二硫键的异构或者夺取底物的二硫键,此时*PDI*活性中心为氧化状态。因此,*PDI*是一种兼具氧化、还原、异构化和分子伴侣作用的多功能酶。在哺乳动物和酵母中,对*PDI*的结构与功能研究比较清楚,而植物中的*PDI*研究相对较少。近年来,随着生物信息学、分子生物学等技术的快速发展,已相继从水稻、大豆、玉米和紫花苜蓿中克隆出*PDI*基因,并对其亚细胞定位和进化树分析^[3-4]。在玉米 *floury-2* 突变体中诱导*PDI*作为分子伴侣的作用,同时*PDI*在醇溶蛋白加工和组装成蛋白质小体的不同阶段与BiP协同发挥作用^[5]。通过对水稻不同组织器官中*PDI*基因表达分析,发现水稻*PDI*基因在胚乳组织中高表达,说明该基因可能与籽粒中蛋白质的形成密切相关^[6]。在拟南芥中,*PDI*参与中间体淀粉的生物合成^[7],并在咖啡中促进了植物环蛋白的高效积累^[8]。

玉米籽粒蛋白质含量为8%~10%,其中80%贮存在胚乳中,主要为醇溶蛋白(60%以上)。据报道,Opaque2(O2)是一种调控贮藏物质积累的转录因子,在种子发育过程起重要作用^[9],可以直接或间接与ZmbZIP22和ZmMADS47蛋白相互作用,调节醇溶蛋白基因的表达^[10-11],同时还发现ZmABI19直接调控O2表达,在*zmabi19*纯合突变体中O2基因的mRNA和蛋白水平显著下降,下游醇溶蛋白基因表达也随之明显下降^[12]。由此可见,调控玉米籽粒蛋白质合成的基因研究较多,但是参与蛋白质正确组装折叠的基因在玉米中鲜有报道。本研究以拟南芥*PDI*家族基因为参考,采用同源比对方法,在玉

米参考基因组B73中鉴定玉米*PDI*基因家族成员,对玉米*PDI*基因家族的理化性质、功能域、同源基因系统发育、染色体定位、共线性分析、启动子顺式作用元件、表达模式及亚细胞定位等进行研究,为玉米*PDI*基因家族中基因功能研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用玉米自交系B73由中国农业科学院作物科学研究所提供。材料种植于作物科学研究所昌平试验基地,行长4 m,株距25 cm,种植10行,重复3次,常规田间管理。

相关试剂:RNA-easy Isolation Reagent(诺唯赞生物科技股份有限公司)、FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix(天根生化科技有限公司)、SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)(天根生化科技有限公司)、2×Phanta Flash Master Mix(Dye Plus)(诺唯赞生物科技股份有限公司)、*pEASY*[®]-T&B Zero Cloning Kit(北京全式金生物技术股份有限公司)。

载体质粒:pAN580-GFP-3Flag、CPB-GFP-3Flag、内质网标记载体KDEL。

1.2 方法

1.2.1 玉米*PDI*基因家族成员鉴定 从maizeGDB(<https://www.maizegdb.org>)数据库中获取玉米B73 RefGen_v5基因组序列、基因编码区序列、蛋白序列和注释文件,从拟南芥TAIR10(<https://www.arabidopsis.org/>)^[13]下载基因序列和蛋白序列,从NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载水稻基因序列和蛋白序列。本研究以拟南芥21个已知基因的蛋白序列为参考^[14-15],使用默认参数(E-value < 1e⁻¹⁰, identity > 50%) 在玉米蛋白序列中进行Blast和Hmms搜索,取交集并去除重复,从而在玉米参考基因组B73进行筛选,筛选出的玉米*PDI*基因家族成员均以参考基因组中的T001转录本进行分析。利用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线网站预测,确定候选基因的蛋白序列是否包含硫氧还蛋白结构域(PF00085)。

1.2.2 玉米*PDI*基因家族蛋白基本信息 利用TBtools软件^[16]分析玉米*PDI*家族成员的基本蛋白特性;使用Cell-PLoc(<http://chou.med.harvard.edu/bioinf/Cell-PLoc>)^[17]预测玉米*PDI*蛋白的亚细胞定位位置。

1.2.3 玉米 *PDI* 基因家族的序列分析及同源基因建树 通过 ClustalX 软件比对玉米、拟南芥和水稻 *PDI* 蛋白序列, 利用 MEGAX 中的 Neighbor-Joining 构建 3 个物种的进化树^[18]。通过 Bootstrap 重复 1000 次^[19], 利用 iTOL (<https://itol.embl.de/>) 对关系树进行优化^[20]。拟南芥 *PDI* 基因家族分类结果可作为玉米 *PDI* 基因家族的分类依据。

1.2.4 玉米 *PDI* 基因家族系统发育建树、保守基序、保守结构域和基因结构分析 为研究玉米 *PDI* 家族基因之间的结构异同, 利用 MEME (<http://meme-suite.org/>) 在线网站分析蛋白序列, 确定保守结构域, 设置保守基序数量为 10, 其他为默认参数^[21], 并利用 TBtools 软件可视化。将从 maizeGDB 数据库下载的注释文件和玉米 *PDI* 基因家族的 ID 文件输入到 TBtools 软件, 得出基因结构图^[22]。

1.2.5 染色体定位和共线性分析 从 TBtools 软件获取玉米 *PDI* 基因的染色体位置信息。利用玉米参考基因组 B73、拟南芥和水稻基因组文件和注释文件, 使用 TBtools 软件对玉米、拟南芥和水稻 *PDI* 基

因家族进行物种间共线性分析和玉米 *PDI* 基因家族的物种内共线性分析。

1.2.6 启动子顺式作用元件分析 利用 TBtools 软件从注释文件中提取 *PDI* 基因家族成员起始密码子 (ATG) 前 2000 bp 的 DNA 序列, 利用 Plant-Care (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 对顺式元件进行预测^[23], 利用 TBtools 进行可视化。

1.2.7 总 RNA 提取和 RT-PCR 分析 提取自交系 B73 灌浆期的根、茎、雄穗、雌穗、叶、旗叶、苞叶、花丝、胚、胚乳和籽粒 11 个组织部位, 以及授粉后 10、15、20、25、30 d 的胚乳总 RNA。利用 RNA-easy Isolation Reagent 试剂盒提取总 RNA, 以提取的总 RNA 为模板, 使用 FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix 反转录试剂盒得到 cDNA。利用玉米 *PDI* 家族基因特异性引物进行反转录 PCR (RT-PCR), 以玉米 *Ubi* 基因作为内参, RT-PCR 采用 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 模板 cDNA 0.8 μL , 1 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ 正向和反向引物各 0.8 μL (表 1), 8 μL Mix 酶, 无菌水补足至 20 μL 。PCR 反应

表 1 玉米 *PDI* 基因家族转录表达水平检测中使用的引物信息

Table 1 Primer information used in the transcriptional expression level detection of *PDI* gene family in maize

引物名称 Primer name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
<i>ZmPDIL1-1</i>	CCAAGCACCCCTTCATGGTC	GTAGCAAGCGCCTGTTCTT
<i>ZmPDIL1-2</i>	CCAAGCACCCCTTCATGGT	AAGCGCCTGTTCTTCTCC
<i>ZmPDIL2-1</i>	ACTTCCCCTTCTATTTTTGGCA	TTGTCTCGCTCCACAAAAGAC
<i>ZmPDIL2-2</i>	CCCCTTCTATTTTTGGCAATCC	CCTCACTGTCTCGTTCACAAA
<i>ZmPDIL3-1</i>	CTCCCGCCATACCACAAATC	GCTTCACAGTCAACACACAAA
<i>ZmPDIL4-1</i>	TGGTTTCCCAAAGTTCCCT	TCAGAACCACGACGCTTGAA
<i>ZmPDIL4-2</i>	ATCCAATGGTTCGGAAAGG	CTCTGGGGTGAGAACCACAAA
<i>ZmPDIL5-1</i>	AAGCAAGGACCTTTGGATTGTG	TCCACCTTGTACTTGCTCATCA
<i>ZmPDIL5-2</i>	GGACATTTGGATTGTGG	GAAAACCTTCCACCTTG
<i>ZmPDIL6-1</i>	CCGAAGAGACCTTCTCCGAC	TCCGCACCTTCCATAACCTT
<i>ZmPDIL7-1</i>	GTCGATTCTACGCGCCA	AAAGCATGAGGGTAGGGAAC
<i>ZmPDIL7-2</i>	GTGCGGCCACTGCAAGA	GCATGAGGGTAGGGAAC
<i>ZmPDIL7-3</i>	ACTTCTACGCTCCCTGG	TCAAAGTAGGGAACCCAT
<i>ZmPDIL8-1</i>	AGGTTGACTGCACTGAGGAA	ACTCTCAGTATCACGTTACCCAT
<i>ZmPDIL9-1</i>	TGAGAATGAAAGTATGCACCCA	AGCTAATAAGCGAGTCACGAGT
<i>ZmPDIL10-1</i>	GTCTCGACGAGGGGTACT	AACCCGTGAAAACATTGAGC
<i>ZmPDIL10-2</i>	CAGGGCTCCGGGTCA	AAAAGGGCACCAGAACGAT
<i>ZmPDIL10-3</i>	TCGTGGAATCCGTTCTTGGT	GGCACCACGAGGCATAGAAA
<i>ZmPDIL10-4</i>	TCGCGCAATCCGTCCTTAG	GTGAGAATGGGCACCACGA
<i>ZmPDIL11-1</i>	CCGAAATCGCCATCGCCTT	GATGCCGTAGTGCTTCTCCA
<i>ZmPDIL11-2</i>	GCTGGAGATCATGGATCGGG	ATAGCTGGTACGTCTCCGGG
<i>Maize-Ubi</i>	TAAGTGCCGATGTGCCTGCGTCG	CTGAAAGACAGAACATAATGAGCACAG

过程为98℃预变性30s;98℃变性10s,60℃复性5s,72℃延伸2s,变性复性延伸共30个循环;最终72℃1min。PCR产物在1.5%的琼脂糖凝胶上观察。

1.2.8 实时荧光定量PCR分析 利用NCBI设计定量引物,以玉米*Ubi*基因作为内参。使用SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒进行荧光定量PCR试验(qRT-PCR),体系及步骤按照说明书,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算相对表达量^[24],应用SPSS分析数据。

1.2.9 多样性分析 根据MaizeGDB重测序结果,对29份自交系材料中*ZmPDIL1-1*基因编码区进行分析,用MEGAX对查找出的前10个变异位点多序列比对。

1.2.10 亚细胞定位 为了解*PDI*基因参与蛋白质正确组装折叠的功能,选择1个预测定位在内质网的基因进行验证。本研究以基因*ZmPDIL1-1*为例,以玉米自交系B73授粉后10d的籽粒cDNA为模板,扩增*ZmPDIL1-1*基因的CDS序列,将目标条带胶回收连到通用载体T&B Zero上并进行一代

Sanger测序,测序结果与B73参考序列比对正确。以与参考序列一致的T&B-Zero-*ZmPDIL1-1*克隆载体为模板,利用同源重组方法将*ZmPDIL1-1*不含终止密码子的CDS序列连接到含绿色荧光蛋白GFP报告基因的玉米瞬时表达载体pAN580上,构建35S启动子驱动的pAN580-*ZmPDIL1-1*-GFP基因表达的融合载体。同时,将*ZmPDIL1-1*不含终止密码子的CDS序列连接到含绿色荧光蛋白GFP报告基因的烟草瞬时表达载体CPB上,构建35S启动子驱动的CPB-*ZmPDIL1-1*-GFP基因表达的融合载体。

2 结果与分析

2.1 玉米*PDI*基因家族的鉴定

以拟南芥21个*PDI*家族基因的蛋白序列为参考,结合生物信息学方法,在玉米蛋白序列中进行Blast和Hmms搜索,鉴定出21个*PDI*基因。根据玉米*PDI*蛋白与拟南芥*PDI*蛋白的系统发育关系,将其命名为*ZmPDIL1-1*~*ZmPDIL11-2*。由表2可知,

表2 玉米*PDI*基因家族成员的基本信息

Table2 Basic information of *PDI* gene families in maize

基因ID Gene ID	基因名称 Gene name	氨基酸数量(aa) Number of amino acid	编码区长度(bp) CDS length	分子量(Da) Molecular weight	外显子/内含子 Exon/intron	理论等电点 Theoretical isoelectric point
Zm00001eb168910	<i>ZmPDIL1-1</i>	514	1542	56873.65	10/9	5.01
Zm00001eb112590	<i>ZmPDIL1-2</i>	512	1536	56683.22	10/9	4.91
Zm00001eb229180	<i>ZmPDIL2-1</i>	561	1683	61888.65	11/10	4.74
Zm00001eb210140	<i>ZmPDIL2-2</i>	568	1704	62417.13	11/10	4.69
Zm00001eb375710	<i>ZmPDIL3-1</i>	515	1545	57506.75	13/12	5.05
Zm00001eb282710	<i>ZmPDIL4-1</i>	355	1065	38836.45	11/10	6.24
Zm00001eb131360	<i>ZmPDIL4-2</i>	367	1101	40122.76	10/9	5.91
Zm00001eb314620	<i>ZmPDIL5-1</i>	430	1290	46012.47	9/8	5.66
Zm00001eb100620	<i>ZmPDIL5-2</i>	439	1317	47096.66	9/8	5.58
Zm00001eb013190	<i>ZmPDIL6-1</i>	150	450	16835.46	4/3	5.16
Zm00001eb422640	<i>ZmPDIL7-1</i>	410	1230	45908.61	3/2	4.96
Zm00001eb082680	<i>ZmPDIL7-2</i>	418	1254	46962.8	5/4	4.86
Zm00001eb243460	<i>ZmPDIL7-3</i>	420	1260	46469.16	5/4	4.90
Zm00001eb106180	<i>ZmPDIL8-1</i>	381	1143	42824.43	15/14	7.24
Zm00001eb295030	<i>ZmPDIL9-1</i>	441	1323	49358.3	12/11	7.20
Zm00001eb410330	<i>ZmPDIL10-1</i>	303	909	33772.3	4/3	8.93
Zm00001eb042300	<i>ZmPDIL10-2</i>	178	534	19457.61	4/3	9.87
Zm00001eb255320	<i>ZmPDIL10-3</i>	178	534	19598.73	4/3	5.67
Zm00001eb194120	<i>ZmPDIL10-4</i>	323	969	36148.48	4/3	8.76
Zm00001eb105800	<i>ZmPDIL11-1</i>	456	1368	49526.39	4/3	8.40
Zm00001eb322440	<i>ZmPDIL11-2</i>	461	1383	50049.97	4/3	8.38

表 2(续)

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	不稳定系数 Instability index	脂溶指数 Aliphatic index	亲水指数 Hydrophilic index	染色体 Chromosome	亚细胞定位 Subcellular localization
Zm00001eb168910	<i>ZmPDIL1-1</i>	32.69	82.06	-0.251	4	内质网
Zm00001eb112590	<i>ZmPDIL1-2</i>	31.53	82.56	-0.268	2	内质网
Zm00001eb229180	<i>ZmPDIL2-1</i>	37.59	86.45	-0.258	5	叶绿体, 细胞质
Zm00001eb210140	<i>ZmPDIL2-2</i>	36.38	85.9	-0.224	4	叶绿体
Zm00001eb375710	<i>ZmPDIL3-1</i>	31.58	92.45	-0.167	9	叶绿体
Zm00001eb282710	<i>ZmPDIL4-1</i>	29.01	86.28	-0.247	6	内质网
Zm00001eb131360	<i>ZmPDIL4-2</i>	24.56	85.1	-0.255	3	内质网
Zm00001eb314620	<i>ZmPDIL5-1</i>	33.35	84.44	-0.138	7	叶绿体, 细胞质, 细胞核
Zm00001eb100620	<i>ZmPDIL5-2</i>	32.19	85.58	-0.145	2	叶绿体, 细胞质, 细胞核
Zm00001eb013190	<i>ZmPDIL6-1</i>	31.04	95.4	-0.106	1	叶绿体
Zm00001eb422640	<i>ZmPDIL7-1</i>	35.01	93.44	-0.111	10	叶绿体, 细胞质
Zm00001eb082680	<i>ZmPDIL7-2</i>	36.91	99.81	-0.019	2	叶绿体, 细胞质, 细胞核
Zm00001eb243460	<i>ZmPDIL7-3</i>	41.93	96.71	-0.009	5	叶绿体
Zm00001eb106180	<i>ZmPDIL8-1</i>	39.64	77.98	-0.37	2	叶绿体
Zm00001eb295030	<i>ZmPDIL9-1</i>	39.98	77.26	-0.283	6	叶绿体
Zm00001eb410330	<i>ZmPDIL10-1</i>	53.70	101.75	0.167	10	叶绿体
Zm00001eb042300	<i>ZmPDIL10-2</i>	42.13	89.94	0.211	1	叶绿体
Zm00001eb255320	<i>ZmPDIL10-3</i>	45.71	104.1	0.374	5	叶绿体
Zm00001eb194120	<i>ZmPDIL10-4</i>	52.78	89.23	-0.059	4	叶绿体
Zm00001eb105800	<i>ZmPDIL11-1</i>	49.91	82.94	-0.221	2	叶绿体
Zm00001eb322440	<i>ZmPDIL11-2</i>	48.98	82.91	-0.233	7	叶绿体

PDI 基因家族有 3~13 个外显子。外显子数目的改变, 可能是可变剪切导致的。玉米 *PDI* 基因家族编码蛋白的长度为 150~568 个氨基酸, 等电点在 4.69~9.87 之间, 蛋白分子量 19457.61~62417.13 Da。不稳定系数 24.56~53.70, 有 14 个蛋白不稳定系数 < 40, 大多数是稳定蛋白质, 这表明该家族编码的蛋白在理化性质方面的多样性。亚细胞定位预测发现, *ZmPDIL1-1*、*ZmPDIL1-2*、*ZmPDIL4-1* 和 *ZmPDIL4-2* 蛋白定位在内质网, 其他蛋白在叶绿体上都有定位, 但 *ZmPDIL2-1* 和 *ZmPDIL7-1* 蛋白定位在叶绿体和细胞质, 同时 *ZmPDIL5-1*、*ZmPDIL5-2* 和 *ZmPDIL7-2* 蛋白定位在叶绿体、细胞质和细胞核, 说明 *PDI* 基因家族编码的蛋白不仅参与内质网的折叠, 还可能在叶绿体参与光合作用以及在细胞核和细胞质发挥作用。

2.2 系统发育分析

为深入了解 *PDI* 基因在不同物种中的演化规

律, 利用 MEGAX 软件对玉米 (*Zea mays* L.)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 和水稻 (*Oryza sativa* L.) *PDI* 家族基因蛋白序列共同构建系统发育树 (图 1)。以拟南芥 *PDI* 基因家族进化树为划分依据, 将来自不同植物 *PDI* 家族基因划分为 4 个分支, 4 个分支划分成 11 个系统发育组。分支 1 由系统发育组 I、II、III 和 VII 组成, 其中 I、II 和 III 组 *PDI* 蛋白在 N 端和 C 端尾部有两个活性硫氧还蛋白结构域, 而 VII 组 *PDI* 蛋白在 N 端具有一个活性硫氧还蛋白结构域。分支 2 由系统发育组 IV、V 和 VI 组成, 其中 IV 和 V 组的 *PDI* 蛋白在其 N 端有两个活性硫氧还蛋白结构域, VI 组的 *PDI* 蛋白在 N 端包含一个硫氧还蛋白结构域。分支 3 由系统发育组 XI 组成, 其 *PDI* 蛋白在 C 端有一个单一的活性硫氧还蛋白结构域。分支 4 由 VIII、IX 和 X 组成, 其 *PDI* 蛋白包含一个活性硫氧还蛋白结构域。综上所述, *PDI* 基因在植物进化过程中结构域稳定且保守。

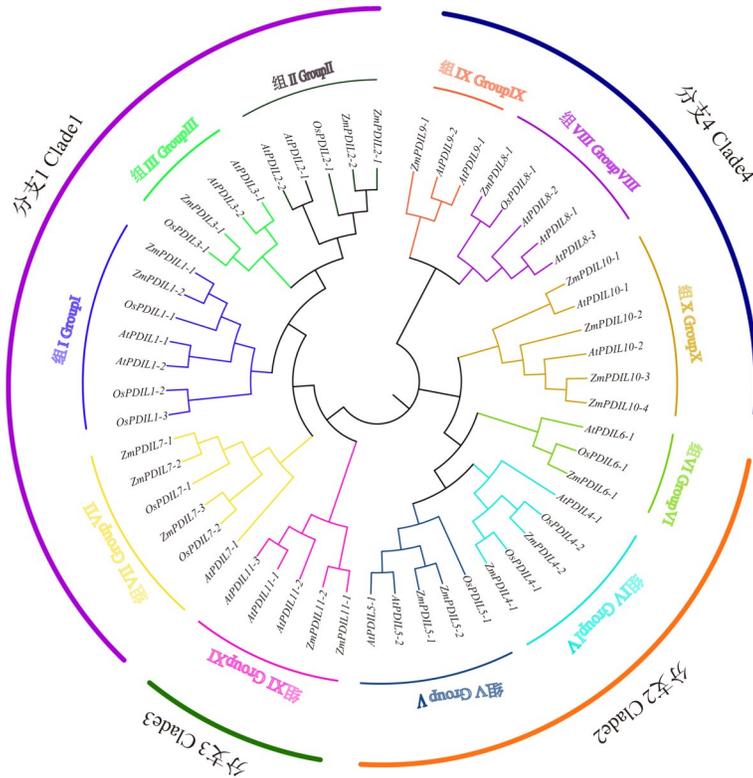


图1 玉米(Zm),拟南芥(At)和水稻(Os)中PDI家族基因系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of PDIs in *Zea Mays* L. (Zm), *Arabidopsis Thaliana* (L.) Heynh. (At) and *Oryza sativa* L. (Os)

2.3 玉米 PDI 基因家族系统发育建树、保守基序、保守结构域和基因结构分析

利用TBtools分析玉米PDI基因家族编码的氨基酸序列的保守基序、保守结构域和基因结构(图2)。在玉米PDI基因家族中,同一个发育组中预测的保守基序具有同一性,如系统发育组XI中ZmPDIL11-1和ZmPDIL11-2均仅有Motif 1、Motif 3和Motif 8 3个保守基序,其他发育组的保守基序一致或相近。蛋白质二硫键异构酶的结构域为硫氧还蛋白,筛选到的PDI基因均至少有一个硫氧还蛋白结构域。基因内含子和外显子的组成是决定基因功能的重要依据^[25],同一发育组的外显子数量相同或相近,说明PDI基因家族在氨基酸残基进化方面相对保守。

2.4 玉米 PDI 基因家族染色体定位和共线性分析

从玉米注释文件中提取染色体长度信息同时对21个基因进行染色体定位。PDI基因家族分布在玉米10条染色体的9条上,在2号染色体上分布5个基因,除8号染色体外,其他染色体上含有1~3个基因(图3)。这表明玉米PDI基因家族成员在染色体上的分布是非均匀的。

在植物进化过程中复制事件对基因家族成员的扩增起重要作用^[26]。如果2个同源基因之间的间

距小于5个基因,称串联重复,如果2个同源基因之间的间距大于5个基因称片段重复。本研究在对玉米PDI基因家族的扩增过程中,得到了8个重复基因对,均是片段重复(图4),表明片段重复是玉米PDI基因家族进化中的重要环节。通过对玉米、水稻和拟南芥PDI基因家族进行共线性分析,共鉴定到19对共线性关系,其中有13个玉米PDI基因与11个水稻PDI基因存在16对共线性关系(图5),表明PDI家族在禾本科作物进化过程中具有较高的保守性。

2.5 玉米 PDI 基因家族启动子顺式作用元件分析

通过对启动子中顺式作用元件的分析,可为基因的功能研究提供基础^[27]。已有的研究表明,启动子区的顺式作用元件与基因特异应答表达存在一定的相关性^[28-29]。在PDI基因家族的启动子区中发现多个与逆境胁迫、植物激素和胚乳发育有关的顺式作用元件(CREs, cis-acting elements)(图6)。对逆境胁迫响应的元件有干旱响应元件MBS(CAAGTGG)、光响应元件Box-4(ATTAAT)、厌氧诱导元件ARE(AAACCA)、低温响应元件LTR(CCGAAA)以及防御和应激响应元件TC-rich repeats(CACCGTT)等,推测PDI基因可能参与了

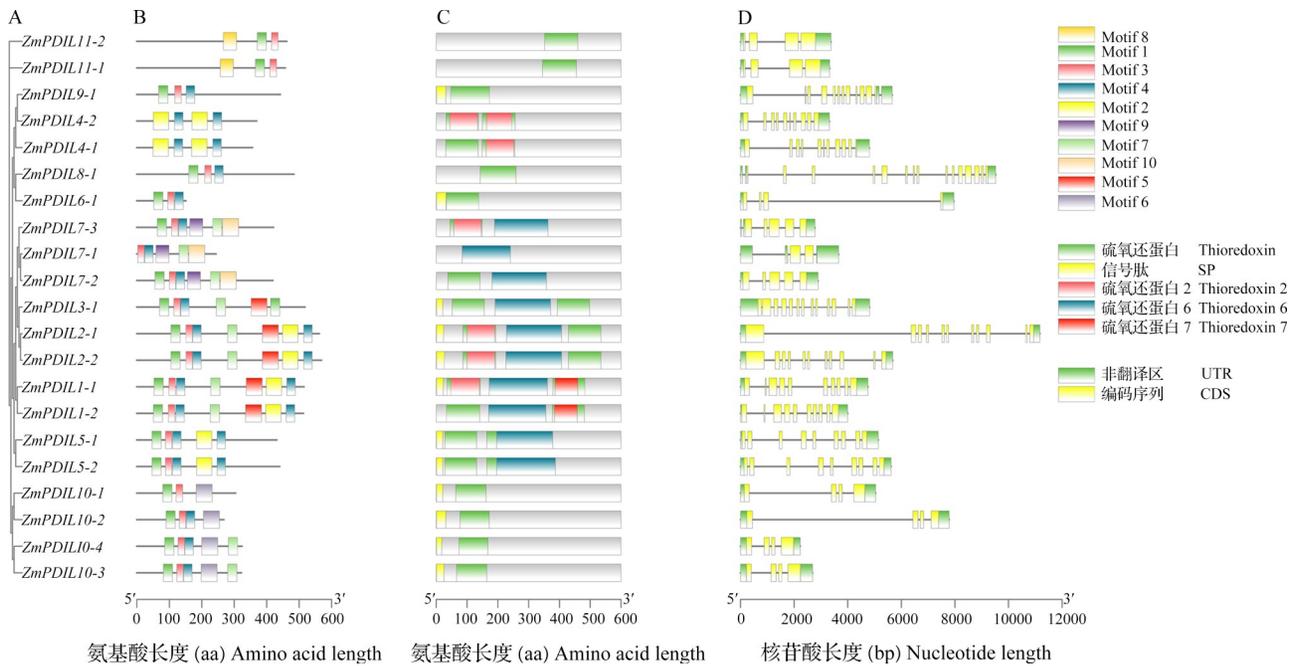
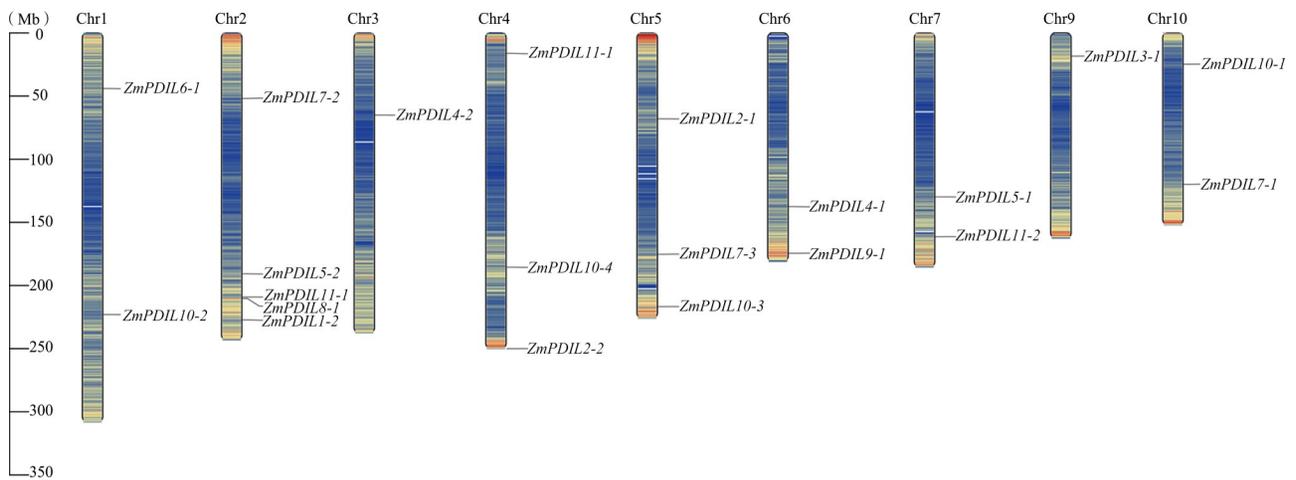


图2 玉米 *PDI* 基因家族系统进化树 (A)、蛋白保守基序 (B)、蛋白结构域 (C) 和基因结构 (D)

Fig.2 The phylogenetics (A), conserved motifs (B), domains (C) and gene structure (D) of *PDI* gene family in maize



不同的颜色表示基因在染色体上的密度, 由红到蓝表示由高到低

Different colors indicate the density of genes on chromosomes, from red to blue indicate high to low

图3 玉米 *PDI* 基因家族在染色体上的分布

Fig.3 The distribution of *PDI* gene family on chromosomes of maize

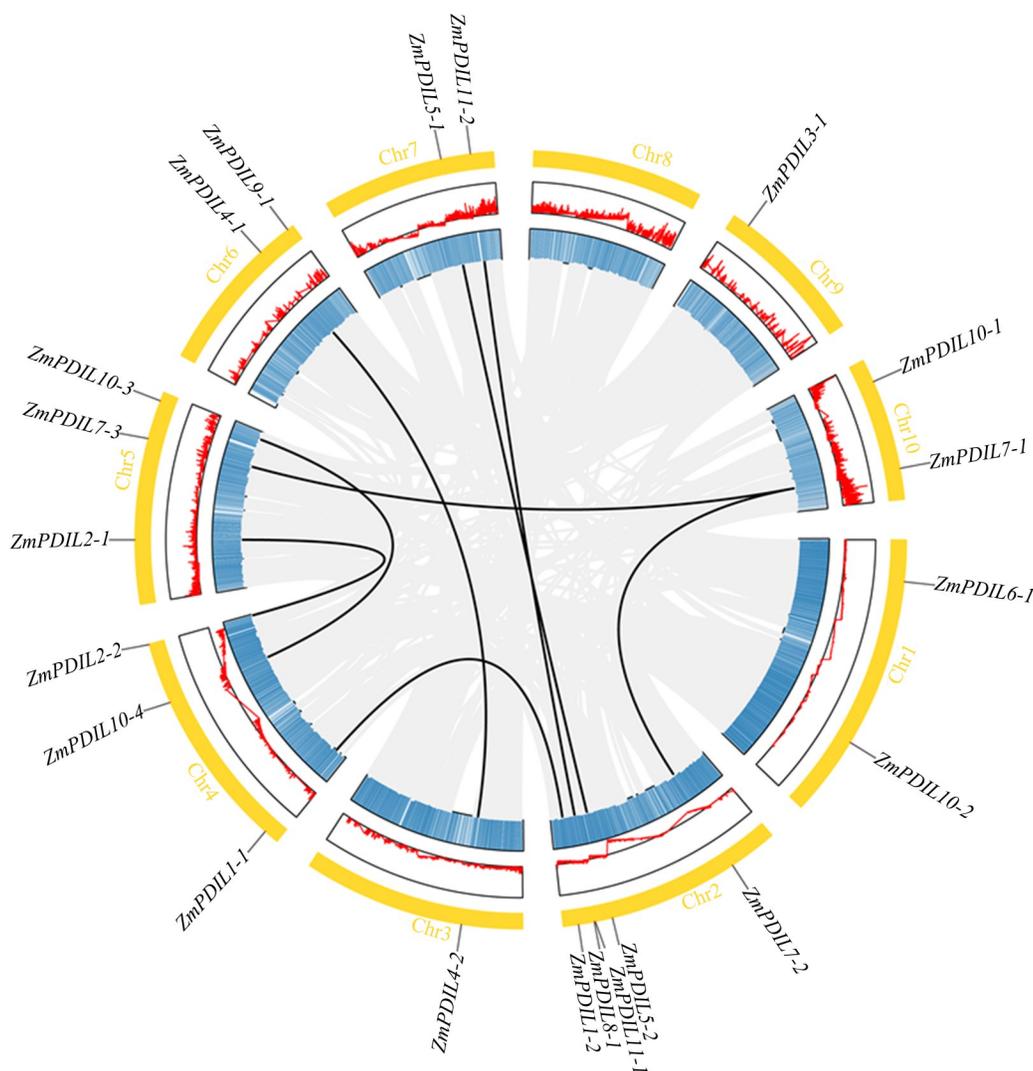


图4 玉米 *PDI* 基因家族共线性分析
 Fig.4 Synteny analysis in *PDI* gene family of maize

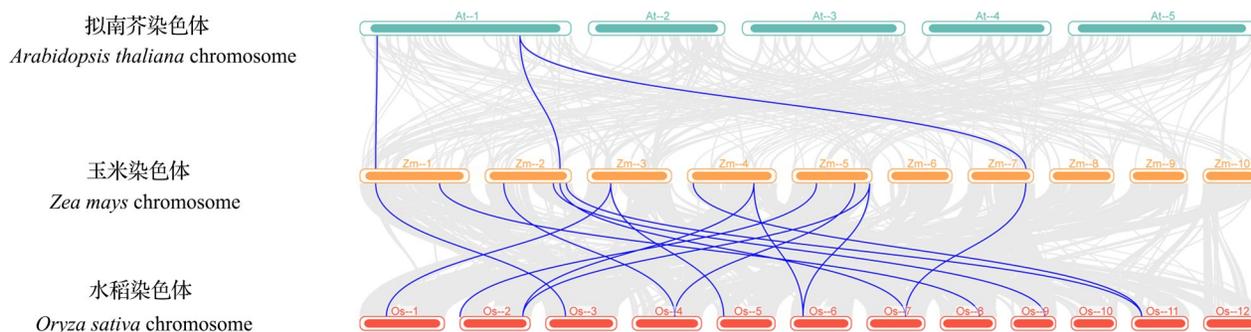


图5 玉米、拟南芥和水稻 *PDI* 基因家族共线性分析
 Fig.5 Synteny analysis in *PDI* gene family of *Z. mays*, *A. thaliana* and *O. sativa*

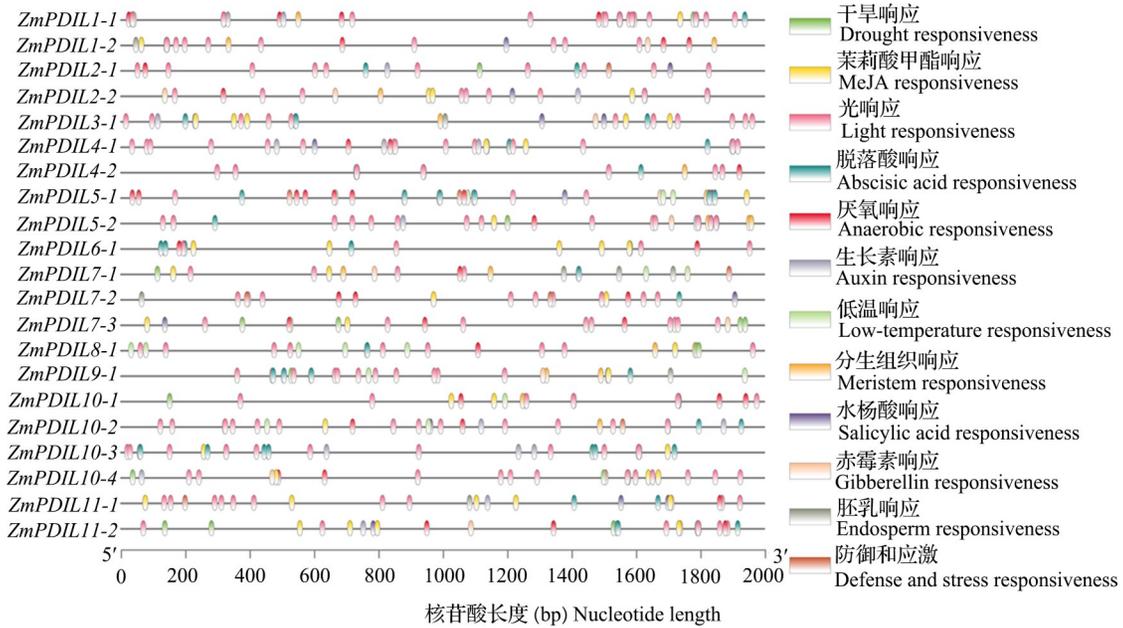


图6 玉米 *PDI* 基因家族启动子的顺式作用元件分析

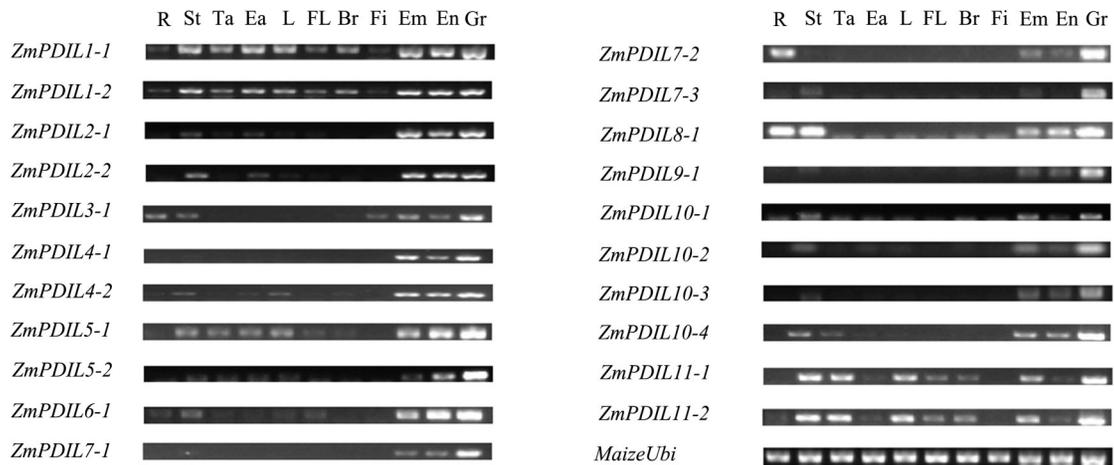
Fig.6 Cis-acting elements analysis in promoter region of *PDI* gene family in maize

多种胁迫应答反应。对植物激素响应的元件有茉莉酸甲酯(MeJA)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)、水杨酸(SA)和生长素(IAA)。其中,部分 *PDI* 基因还存在参与植物生长发育以及籽粒发育的元件,比如响应分生组织元件和响应胚乳发育元件,推测蛋白质二硫键异构酶可能在玉米生长发育过程中发挥一定的功能,特别是含有响应胚乳发育元件可能在籽粒胚乳中参与蛋白质的正确组装和折叠。

2.6 玉米 *PDI* 基因家族表达模式分析

采用RT-PCR技术分析21个玉米 *PDI* 基因在授粉后灌浆期的11个组织部位表达模式,同时采用

qRT-PCR技术分析21个玉米 *PDI* 基因在授粉后不同时间胚乳表达模式。RT-PCR分析表明(图7), *PDI* 基因家族的不同发育组间表达趋势各不相同,但同一发育组的基因表达模式相同或相近。玉米 *PDI* 基因家族主要在胚、胚乳和籽粒中表达量较高,除此之外, *ZmPDIL8-1* 在根和茎中表达量较高, *ZmPDIL11-1* 和 *ZmPDIL11-2* 在茎、雄穗和叶中表达量较高。qRT-PCR分析显示(图8),玉米 *PDI* 基因家族在授粉后不同时间胚乳的表达量存在差异,将授粉后10 d的胚乳表达量记为1,多数基因在授粉后10~20 d表达量呈下降趋势,但 *ZmPDIL1-1* 和

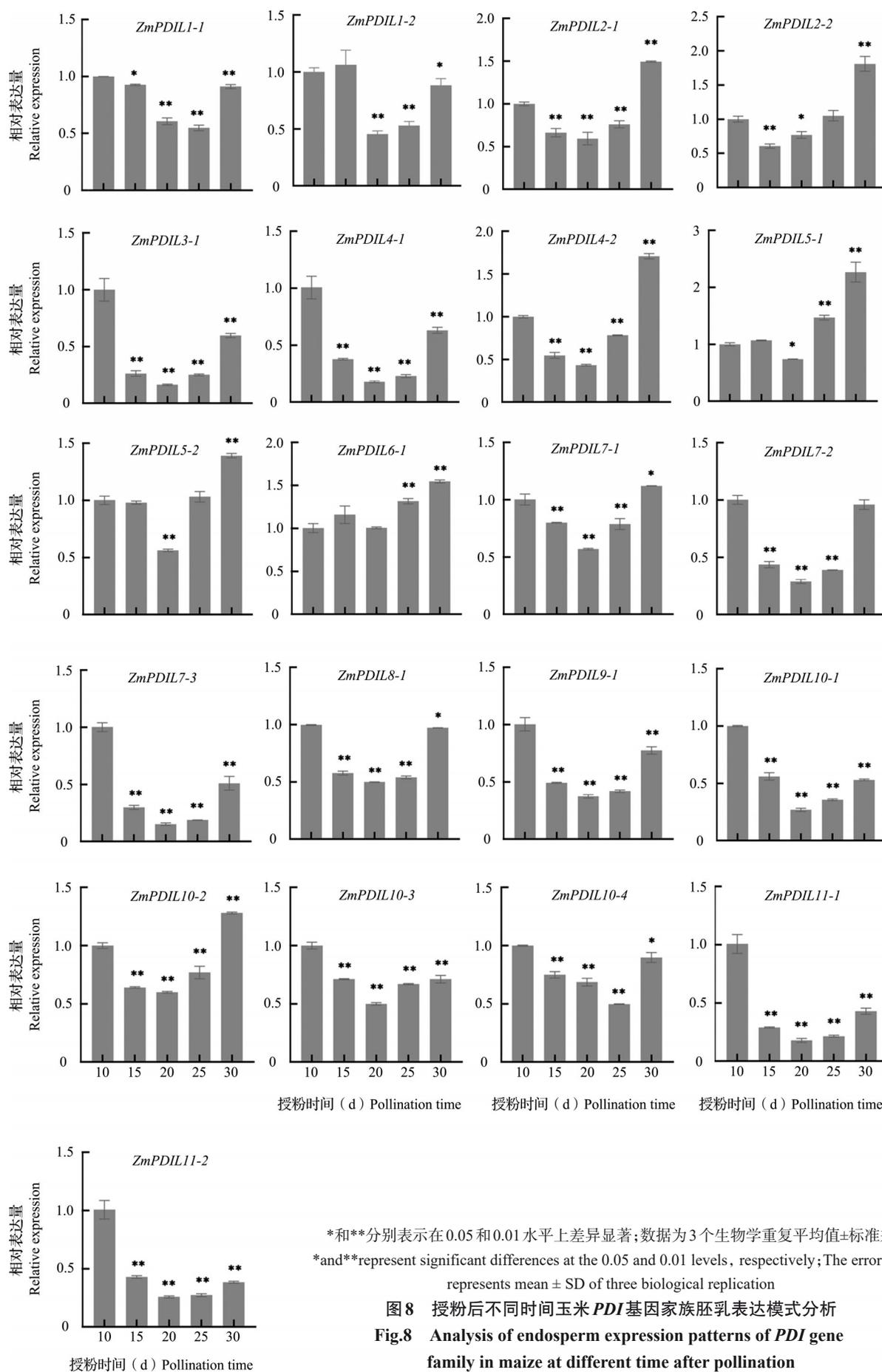


R: 根;St: 茎;Ta: 雄穗;Ea: 雌穗;L: 叶;FL: 旗叶;Br: 苞叶;Fi: 花丝;Em: 胚;En: 胚乳;Gr: 籽粒

R: Root;St: Stem;Ta: Tassel;Ea: Ear;L: Leaf;FL: Flag leaf;Br: Bract;Fi: Filament;Em: Embryo;En: Endosperm;Gr: Grain

图7 玉米 *PDI* 基因家族不同组织部位表达模式分析

Fig.7 Analysis of expression patterns of different tissue sites of maize *PDI* gene family



ZmPDIL10-4 在 20~25 d 表达量仍下调。*ZmPDIL1-1* 和 *ZmPDIL10-4* 在 25~30 d 表达量呈上升趋势, 其余 19 个基因在授粉后 20~30 d 表达量呈上升趋势。种子发育 10~20 d 是淀粉快速积累的时间^[30], 推测蛋白质二硫键异构酶在授粉后 20~30 d 籽粒胚乳发育期行使蛋白质正确折叠的功能。

2.7 *ZmPDIL1-1* 基因的多样性分析

根据玉米自交系重测序数据, 对 29 份材料中 *ZmPDIL1-1* 基因编码区的前 10 个变异位点进行分(图 9), 分别为 T+34C、C+39A、G+42A、G+45C、G+46A、T+50C、C+51G、C+53T、G+54T、G+76C。说明 *ZmPDIL1-1* 基因存在多样性。

	+34	+39	+42	+45	+46	+50	+51	+53	+54	+76
B73	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
Q319	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
K0326Y	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
NC350	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
NC358	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
W22	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
HZ4	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
B92	C	C	G	G	G	T	C	C	G	G
CML52	C	C	G	G	G	T	C	C	G	G
CML69	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
CML103	C	C	G	G	A	T	C	C	T	G
CML228	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
CML247	C	A	G	C	G	C	G	T	G	C
CML277	C	A	G	C	G	C	G	T	G	C
CML322	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
CML333	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
HP301	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
Ki3	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
Ki11	C	A	A	C	G	C	G	T	G	C
Ky21	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
M37W	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
M162W	C	C	G	G	G	T	C	C	G	G
Mo18W	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
Ms71	C	A	G	C	G	C	G	T	G	C
Oh7B	T	C	G	G	G	T	C	C	G	G
Oh43	C	C	G	G	G	T	C	C	G	G
P39	C	A	G	C	G	C	G	T	G	C
Tx303	C	A	G	C	G	C	G	T	G	C
Tzi8	C	A	G	C	G	C	G	T	G	C

左侧字母代表材料名称; +34: 代表编码区第 34 个碱基, 他同
The letter in the left the name of material; +34: Represents the 34th
base of the coding region, others is the same

图 9 *ZmPDIL1-1* 基因的多样性分析

Fig.9 Diversity analysis of *ZmPDIL1-1* gene

2.8 *ZmPDIL1-1* 蛋白亚细胞定位分析

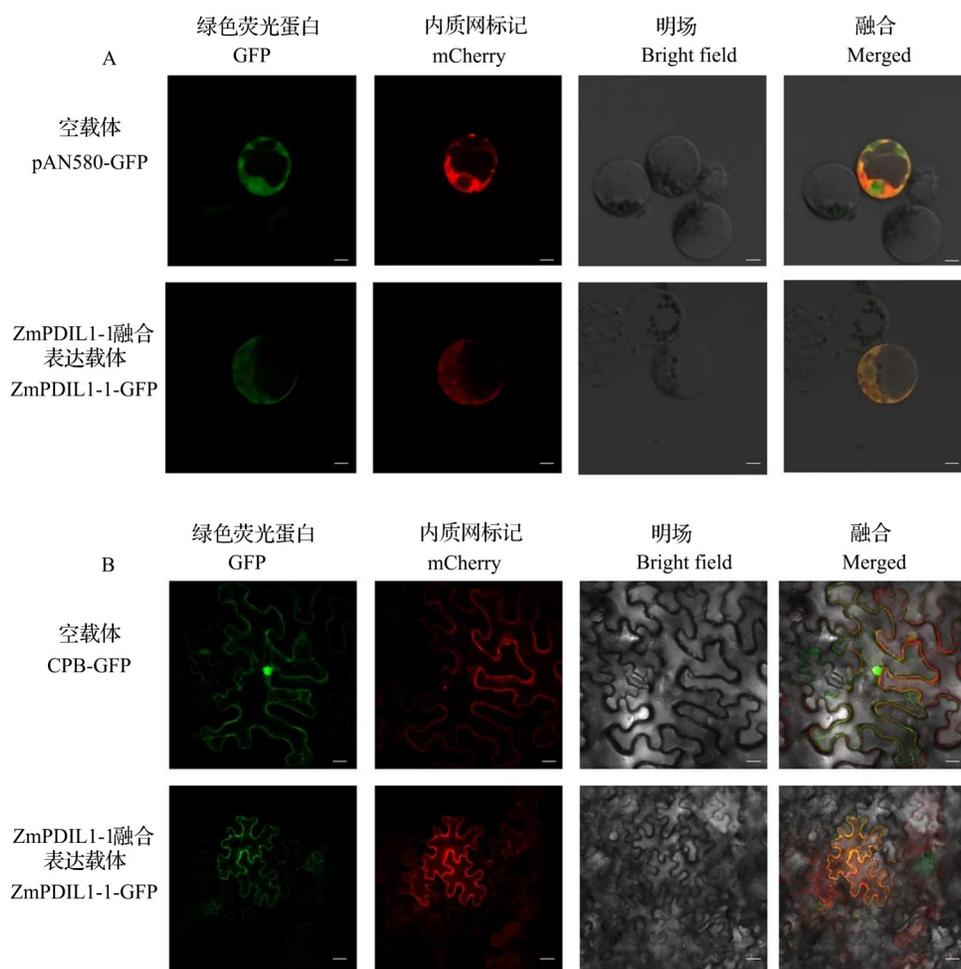
以 *ZmPDIL1-1* 为例, 构建 35S 启动子驱动的 pAN580- *ZmPDIL1-1*-GFP 融合表达载体, 转化至玉米原生质体中, 结果表明 pAN580- *ZmPDIL1-1*-GFP 与内质网标记载体共定位。同时, 构建 35S 启动子驱动的 CPB-*ZmPDIL1-1*-GFP 融合表达载体, 注射到烟草叶片细胞中, 结果表明 CPB- *ZmPDIL1-1*-GFP 与内质网标记载体共定位(图 10)。研究结果

表明 *ZmPDIL1-1* 定位在内质网, 符合在内质网中参与蛋白质组装折叠的定位特征。

3 讨论

蛋白质二硫键异构酶是硫氧还蛋白家族的一员。PDI 在真核生物内质网中是含量最高的家族蛋白, 占细胞蛋白总量的 0.4%^[31-32], 在原核生物中, 催化蛋白质二硫键的形成和异构的任务主要由二硫键蛋白催化完成^[33]。蛋白质二硫键异构酶在大部分组织和器官中组成性表达, 具有催化蛋白质二硫键氧化、还原和异构等功能, 与此同时具有分子伴侣活性和参与新陈代谢等功能^[34-35], 对催化内质网中新生肽链氧化折叠、维持蛋白以及细胞功能等方面具有重要作用。本研究以拟南芥 21 个 *PDI* 基因家族成员蛋白序列为靶序列, 在玉米参考基因组 B73 中共鉴定出 21 个 *PDI* 基因, 系统进化树分析发现, 玉米 *PDI* 基因家族分为 4 个分支, 4 个分支包含 11 个系统发育组。Motif 分析表明, 位于进化树同一系统发育组中的 *PDI* 基因家族成员之间保守基序种类和数量基本保持一致, 同时 Domain 分析表明 *PDI* 基因家族成员都包含硫氧还蛋白结构域。玉米 *PDI* 基因家族中亲缘关系近的基因间, 外显子内含子结构相似, 进一步表明 *PDI* 家族基因在进化上的保守性。在生物体进化中基因复制起着关键作用^[36], 基因复制主要有两种方式: 片段复制和串联复制^[36-37]。基因家族成员扩增分析表明, 片段复制对玉米 *PDI* 基因家族成员扩增更为重要。

启动子中顺式作用元件对基因的表达起到调控作用。顺式作用元件分析表明, *PDI* 基因家族含有参与逆境胁迫和植物激素的多种顺式作用元件。此外, *PDI* 基因家族还包含参与胚乳发育的顺式作用元件, 推测 *PDI* 基因家族可能在玉米籽粒发育过程中发挥重要作用。通过表达模式分析以及亚细胞定位分析发现该基因家族部分基因可能在内质网上行使功能, 但细胞体内质网的功能多样, 包括作为稳定钙离子的内环境、为其它细胞器提供脂质供体, 同时对蛋白质降解、定量控制和新生蛋白质分子的折叠有着重要作用, 尤其是可以增加新生蛋白的折叠效率。目前, 植物 *PDI* 生物学功能主要集中在调控种子萌发与发育^[38-41], Shimoni 等^[42]、Li 等^[43]首先报道了 *PDI* 参与种子胚乳的形成以及蛋白质的折叠。在水稻突变体 *esp2* 中, *PDIL1-1* 是醇溶蛋白和谷蛋白在内质网中正确组装和配送所必需的^[44]。Han 等^[45]研究表明, *PDIL1-1* 的缺失导致



A: ZmPDIL1-1在玉米原生质体中的亚细胞定位; B: ZmPDIL1-1在烟草叶片中的亚细胞定位; 比例尺: 20 μm
A: Subcellular location of ZmPDIL1-1 in maize protoplasts ; B: Subcellular location of ZmPDIL1-1 in tobacco leaves; Bar: 20 μm

图 10 ZmPDIL1-1 的亚细胞定位
Fig.10 The subcellular localization of ZmPDIL1-1

水稻粉状淀粉的形成及其对内质网胁迫的响应。Satoh-Cruz 等^[46]证明 *PDIL1-1* 不对称地分布内质网的池状皮层上,同时参与水稻胚乳内质网谷蛋白前体的成熟过程。Okuda 等^[47]证实 *GmPDIL6* 在种子贮藏蛋白的合成过程中主要在子叶中表达, *GmPDIL6* 的 mRNA 水平在内质网的胁迫下显著上调,推测 *GmPDIL6* 可能在内质网中进行氧化折叠,发挥主要作用的就是蛋白质二硫键异构酶。因此, *PDI* 基因可能在玉米蛋白质折叠以及玉米籽粒发育方面发挥重要作用。

PDI 基因家族参与植物体内蛋白质折叠,在植物生长发育过程起重要作用。在水稻中研究较为深入,目前对玉米 *PDI* 基因家族在蛋白质组装折叠过程中的功能了解有限。本研究提供了玉米 *PDI* 基因家族的进化关系、结构域、染色体定位、共线性关系、顺式作用元件,以及 11 个组织部位在相同时间

的表达模式分析和胚乳在授粉后不同时间的表达量变化。研究结果为从玉米基因组中选择参与蛋白质组装折叠、解析玉米 *PDI* 相关基因的生物学术功能提供参考依据。

参考文献

- [1] Ferrari D M, Soling H D. The protein disulphide-isomerase family: Unravelling a string of folds. *Biochemical Journal*, 1999, 339: 1-10
- [2] Freedman R B. The formation of protein disulphide bonds. *Current Opinion in Structural Biology*, 1995, 5: 85-91
- [3] Shorosh B S, Dixon R A. Molecular characterization and expression of an alfalfa protein with sequence similarity to mammalian ERp72, a glucose-regulated endoplasmic reticulum protein containing active site sequences of protein disulphide isomerase. *Plant Journal*, 1992, 2: 51-58
- [4] 刘颖慧,王秀堂,石云素,黄亚群,宋燕春,王天宇,黎裕.玉米蛋白质二硫键异构酶(*PDI*)基因的特征和表达(英文).中国

- 生物化学与分子生物学报, 2009, 25: 229-234
- Liu Y H, Wang X T, Shi Y S, Huang Y Q, Song Y C, Wang T Y, Li Y. Expression and characterization of a protein disulfide isomerases in maize (English). Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2009, 25: 229-234
- [5] Li C P, Larkins B A J G. Identification of a maize endosperm-specific cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase. Gene, 1996, 171: 193-196
- [6] 牛洪斌. 水稻谷蛋白及其相关基因的克隆和功能研究. 南京: 南京农业大学, 2005
- Niu H B. Cloning and functional study of rice gluten and its related genes. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005
- [7] Lu D D, Christopher D A. Immunolocalization of a protein disulfide isomerase to *Arabidopsis thaliana* chloroplasts and its association with starch biogenesis. International Journal of Plant Science, 2006, 167: 1-9
- [8] Gruber C W, Cemazar M, Clark R J, Horibe T, Renda R F, Anderson M A, Craik D J. A novel plant protein-disulfide isomerase involved in the oxidative folding of cystine knot defense proteins. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282: 20435-20446
- [9] Li C, Song R. The regulation of zein biosynthesis in maize endosperm. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 133: 1443-1453
- [10] Li C, Yue Y, Chen H, Qi W, Song R. The ZmbZIP22 transcription factor regulates 27-kD γ -zein gene transcription during maize endosperm development. Plant Cell, 2018, 30: 2402-2424
- [11] Qiao Z, Qi W, Wang Q, Feng Y, Yang Q, Zhang N, Wang S, Tang Y, Song R. ZmMADS47 regulates zein gene transcription through interaction with Opaque2. PLoS Genetics, 2016, 12: e1005991
- [12] Yang T, Guo L, Ji C, Wang H, Wang J, Zheng X, Xiao Q, Wu Y. The B3 domain-containing transcription factor ZmABI19 coordinates expression of key factors required for maize seed development and grain filling. Plant Cell, 2021, 33: 104-128
- [13] Swarbreck D, Wilks C, Lamesch P, Berardini T Z, Garcia-Hernandez M, Foerster H, Li D, Meyer T, Muller R, Ploetz L, Radenbaugh A, Singh S, Swing V, Tissier C, Zhang P, Huala E. The Arabidopsis Information Resource (TAIR): Gene structure and function annotation. Nucleic Acids Research, 2008, 36: D1009-D1014
- [14] Kayum M A, Park J I, Nath U K, Saha G, Biswas M K, Kim H T, Nou I S. Genome-wide characterization and expression profiling of PDI family gene reveals function as abiotic and biotic stress tolerance in Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp pekinensis*). BMC Genomics, 2017, 18: 885
- [15] Wai A H, Waseem M, Khan A B, Nath U K, Lee D J, Kim S T, Kim C K, Chung M Y. Genome-Wide identification and expression profiling of the PDI gene family reveals their probable involvement in abiotic stress tolerance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Genes, 2020, 12: 23
- [16] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Molecular Plant, 2020, 13: 1194-1202
- [17] Chou K C, Shen H B. Cell-Ploc: A package of web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. Nature Protocols, 2008, 3: 153-162
- [18] Davidson R, Martin Del Campo A. Combinatorial and computational investigations of neighbor-joining bias. Frontiers in Genetics, 2020, 11: 584785
- [19] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35: 1547-1549
- [20] Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. Nucleic Acids Research, 2021, 49: W293-W296
- [21] Bailey T L, Boden M, Buske F A, Frith M, Grant C E, Clementi L, Ren J, Li W W, Noble W S. MEME SUITE: Tools for motif discovery and searching. Nucleic Acids Research, 2009, 37: W202-W208
- [22] Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas H R, Frank M H, He Y, Xia R. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. Molecular Plant, 2020, 13: 1194-1202
- [23] Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucleic Acids Research, 2002, 30: 325-327
- [24] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method. Methods, 2001, 25: 402-408
- [25] 李鹏, 刘彻, 宋皓, 姚盼盼, 苏沛霖, 魏跃伟, 杨永霞, 李青常. 烟草非特异性脂质转移蛋白基因家族的鉴定与分析. 作物学报, 2021, 47: 2184-2198
- Li P, Liu C, Song H, Yao P P, Su P L, Wei Y W, Yang Y X, Li Q C. Identification and analysis of nonspecific lipid transfer protein gene families in Tobacco. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47: 2184-2198
- [26] Cannon S B, Mitra A, Baumgarten A, Young N D, May G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biology, 2004, 4: 10
- [27] Soltani B M, Ehling J, Hamberger B, Douglas C J. Multiple cis-regulatory elements regulate distinct and complex patterns of developmental and wound-induced expression of *Arabidopsis thaliana* 4CL gene family members. Planta, 2006, 224: 1226-1238
- [28] Walther D, Brunnemann R, Selbig J. The regulatory code for transcriptional response diversity and its relation to genome

- structural properties in *A. thaliana*. PLoS Genetics, 2007, 3: e11
- [29] Abdullah M, Cheng X, Cao Y, Su X, Manzoor M A, Gao J, Cai Y, Lin Y. Zinc finger-homeodomain transcriptional factors (ZHDs) in upland cotton (*Gossypium hirsutum*): Genome-wide identification and expression analysis in fiber development. Frontiers in Genetics, 2018, 9:357
- [30] 韩小花. 水稻籽粒中控制淀粉合成关键基因 *OsPDIL1-1* 的图位克隆及功能分析. 南京: 南京农业大学, 2011
- Han X H. Mapping cloning and functional analysis of *OsPDIL1-1*, a key gene for starch synthesis in rice grains. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011
- [31] 王志强, 周智敏, 郭占云. 蛋白质二硫键异构酶家族的结构与功能. 生命科学研究, 2009, 13: 548-553
- Wang Z Q, Zhou Z M, Guo Z Y. Structure and function of the protein disulfide isomerase family. Life Science Research, 2009, 13: 548-553
- [32] 王志珍. 蛋白质二硫键异构酶既是酶又是分子伴侣. 科学通报, 1998: 1345-1353
- Wang Z Z. Protein disulfide isomerase is both enzyme and molecular chaperone. Science Bulletin, 1998: 1345-1353
- [33] Gruber C W, Cemazar M, Heras B, Martin J L, Craik D J. Protein disulfide isomerase: The structure of oxidative folding. Trends in Biochemical Sciences, 2006, 31: 455-464
- [34] Meiri E, Levitan A, Guo F, Christopher D A, Schaefer D, Zryd J P, Danon A. Characterization of three PDI-like genes in *Physcomitrella patens* and construction of knock-out mutants. Molecular Genetics and Genomics, 2002, 267: 231-240
- [35] 王秀堂, 黄亚群, 李会勇, 石云素, 宋燕春, 黎裕, 王天宇. 玉米 PDI 基因 cDNA 的克隆及生物信息学分析. 河北农业大学学报, 2008, 137: 16-19
- Wang X T, Huang Y Q, Li H Y, Shi Y S, Song Y C, Li Y, Wang T Y. Cloning and bioinformatics analysis of cDNA of maize PDI gene. Journal of Agricultural University of Hebei, 2008, 137: 16-19
- [36] Xu G, Guo C, Shan H, Kong H. Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2012, 109: 1187-1192
- [37] Moore R C, Purugganan M D. The early stages of duplicate gene evolution. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2003, 100: 15682-15687
- [38] Takemoto Y, Coughlan S J, Okita T W, Satoh H, Ogawa M, Kumamaru T. The rice mutant *esp2* greatly accumulates the glutelin precursor and deletes the protein disulfide isomerase. Plant Physiology, 2002, 128: 1212-1222
- [39] Kamauchi S, Wadahama H, Iwasaki K, Nakamoto Y, Nishizawa K, Ishimoto M, Kawada T, Urade R. Molecular cloning and characterization of two soybean protein disulfide isomerases as molecular chaperones for seed storage proteins. FEBS Journal, 2008, 275: 2644-2658
- [40] Li L, Shimada T, Takahashi H, Ueda H, Fukao Y, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. MAIGO2 is involved in exit of seed storage proteins from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 2006, 18: 3535-3547
- [41] Wadahama H, Kamauchi S, Ishimoto M, Kawada T, Urade R. Protein disulfide isomerase family proteins involved in soybean protein biogenesis. FEBS Journal, 2007, 274: 687-703
- [42] Shimoni Y, Segal G, Zhu X Z, Galili G. Nucleotide sequence of a wheat cDNA encoding protein disulfide isomerase. Plant Physiology, 1995, 107: 281
- [43] Li C P, Larkins B A. Expression of protein disulfide isomerase is elevated in the endosperm of the maize floury-2 mutant. Plant Molecular Biology, 1996, 30: 873-882
- [44] Johnson J C, Appels R, Bhave M. The PDI genes of wheat and their syntenic relationship to the *esp2* locus of rice. Functional Integrative Genomics, 2006, 6: 104-121
- [45] Han X, Wang Y, Liu X, Jiang L, Ren Y, Liu F, Peng C, Li J, Jin X, Wu F, Wang J, Guo X, Zhang X, Cheng Z, Wan J. The failure to express a protein disulphide isomerase-like protein results in a floury endosperm and an endoplasmic reticulum stress response in rice. Journal of Experimental Botany, 2012, 63: 121-130
- [46] Satoh-Cruz M, Crofts A J, Takemoto-Kuno Y, Sugino A, Washida H, Crofts N, Okita T W, Ogawa M, Satoh H, Kumamaru T. Protein disulfide isomerase like 1-1 participates in the maturation of proglutelin within the endoplasmic reticulum in rice endosperm. Plant Cell Physiology, 2010, 51: 1581-1593
- [47] Okuda A, Matsusaki M, Masuda T, Morishima K, Sato N, Inoue R, Sugiyama M, Urade R. A novel soybean protein disulphide isomerase family protein possesses dithiol oxidation activity: Identification and characterization of GmPDIL6. Journal of Biological Chemistry, 2020, 168: 393-405