

• 药材与资源 •

灰毡毛忍冬 *LmPAL1* 基因的克隆及表达分析陈 勋¹, 刘畅宇¹, 陈 娅¹, 龙雨青¹, 童巧珍¹, 刘湘丹^{1,2*}, 周日宝^{1*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 克隆灰毡毛忍冬苯丙氨酸解氨酶 (*LmPAL1*) 基因全长序列, 并进行生物信息学和表达模式分析。方法 提取灰毡毛忍冬总 RNA, 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 RACE 技术克隆 *LmPAL1* 基因的全长 cDNA 序列; 运用相关软件对该基因序列进行生物信息学分析; 利用 qRT-PCR 测定灰毡毛忍冬茎、叶和不同花期花中该基因的相对表达量。结果 克隆的 *LmPAL1* 基因开放阅读框 (ORF) 长度为 2 145 bp, 编码 714 个氨基酸, 生物信息学分析预测为亲水性蛋白, 定位于叶绿体中, 包含 PAL shielding 结构域 (527~641 aa), 并且含有 PAL/HAL 活性中心序列 GTITASGDLVPLSYIAG (196~212 aa), 与其他 *LmPAL1* 具有较高的相似度; *LmPAL1* 基因 qRT-PCR 结果显示, 7 个花期材料以金黄色开花期相对表达量较高; 与茎、叶比, 白色花蕾期花的相对表达量最高, 叶的最低。结论 成功克隆了 *LmPAL1* 基因, 为进一步研究该基因的功能以及遗传改良灰毡毛忍冬品质奠定基础, 同时为探究灰毡毛忍冬绿原酸生物合成和调节机制提供了依据。

关键词: 灰毡毛忍冬; 苯丙氨酸解氨酶 (PAL); 基因克隆; 生物信息学; 表达分析

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)01-0178-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.027

Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene in *Lonicera macranthoides*CHEN Xun¹, LIU Chang-yu¹, CHEN Ya¹, LONG Yu-qing¹, TONG Qiao-zhen¹, LIU Xiang-dan^{1,2}, ZHOU Ri-bao¹

1. College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Research Center of Traditional Chinese Medicine Piece Standardization and Function Technology, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To clone the full length of *LmPAL1* gene and analyze bioinformatics and expression patterns from *Lonicera macranthoides*. **Methods** The total RNA of *L. macranthoides* was extracted. The full-length cDNA sequence of *LmPAL1* gene was cloned by RT-PCR and RACE technique; The genome sequence in bioinformatics was analyzed by using the relevant software; The relative expression of the gene in stem, leaf, and different flower period was determined by using real-time PCR. **Results** The cloned *LmPAL1* gene open reading frame (ORF) was 2 145 bp, encoding 714 amino acids. It was predicted by bioinformatics analysis as hydrophilic protein, being located in the chloroplasts, containing PAL shielding structure domain (527—641 aa). This gene contained PAL/HAL active center sequence GTITASGDLVPLSYIAG (196—212 aa), which was highly similar to other phenylalanine ammonia-lyase. Real-time PCR results showed that the relative expression level of golden yellow flowering flower was higher in seven florescence periods. When comparing the stem, leaf, and white flower bud period, the relative expression of flower was the highest and the leaf was the lowest. **Conclusion** In this study, *PAL1* gene of *L. macranthoides* was cloned successfully, laying a foundation for further study of the function of this gene and genetic improvement of *L. macranthoides* quality and providing the research basis for exploring the biosynthesis and regulation of chlorogenic acid in *L. macranthoides*.

Key words: *Lonicera macranthoides* Hand. -Mazz.; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning; bioinformatics; expression analysis

收稿日期: 2018-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673546); 国家自然科学基金资助项目 (81203007); 中央引导地方科技发展专项资金项目 (2017XF5044); 湖南省自然科学基金项目 (2017JJ3237); 湖南省教育厅资助科研项目 (16B193); 湖南省科技厅重点研发项目 (2017SK2124); 湖湘中药资源保护与利用 2011 协同创新中心 (湘教通 [2015] 351); 国家中医药管理局中药标准化项目 (ZYBZH-Y-HUN-24); 湖南中医药大学中药学一流学科项目 (校行科字 [2018] 3 号)

作者简介: 陈 勋, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量。E-mail: 610817667@qq.com***通信作者** 周日宝, 男, 博士, 教授, 主要从事中药资源质量与开发研究。E-mail: 1057323510@qq.com

刘湘丹, 女, 博士, 副教授, 主要从事中药资源质量与开发研究。E-mail: paeonia_dd@126.com

灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. 来源于为忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属 *Lonicera* Linn. 半常绿缠绕藤本植物, 归于山银花项下, 具有清热解毒、疏散风热的功效^[1]。绿原酸 (chlorogenic acid, CGA) 是灰毡毛忍冬的主要活性成分, 且含量较高, 现代研究表明绿原酸具抗氧化、抗高血压、抗菌、抗肿瘤、抗辐射、降血糖、调血脂、抗炎、补肾、保肝等多种药理作用^[2], 医药、化工和食品等领域对绿原酸均有广泛需求^[3], 应用前景广阔, 绿原酸生物合成途径及相关关键基因的研究成为目前的研究热点。

绿原酸是由咖啡酸的 1 位羧基和奎尼酸的 3 位羟基缩合成酯的天然产物^[3], 是重要的植物苯丙素类次生代谢产物之一, 最初由 *L*-苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 作用下生成反式肉桂酸, 然后在肉桂酸-4 羟化酶 (cinnamate 4-hydroxylase, C4H) 和 4-香豆酸连接酶 (4-coumarate CoA ligase, 4CL) 作用下生成对-香豆酰辅酶 A, 最后在羟基肉桂酰辅酶 A 奎尼酸羟基肉桂酰转移酶 (hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transferase, HQT) 作用下生成绿原酸^[4]。目前有研究者已对忍冬^[4]、杜仲^[5]、枸杞^[6]、黑三棱^[7]、细辛^[8]、姜黄^[9]、当归^[10]等植物进行 PAL 基因克隆、生物信息学及表达模式分析相关研究, PAL 主要在植物抗病和抗逆防御等过程中发挥着重要的作用^[11], 同时与绿原酸含量的积累密切相关^[12]。

查阅文献和 NCBI 数据库发现, NCBI 中有上传灰毡毛忍冬 PAL1 部分核心序列, 仅 493 个碱基, 编码 164 个氨基酸, 目前无灰毡毛忍冬 PAL1 基因全长克隆相关报道。本研究以灰毡毛忍冬花

为材料, 通过前期灰毡毛忍冬转录组数据中 Unigene 序列设计引物, 利用 RT-PCR 和 RACE 技术, 克隆灰毡毛忍冬 PAL1 (LmPAL1) 基因的全长 cDNA 序列, 并进行生物信息学分析, 运用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对灰毡毛忍冬不同花期和不同器官进行表达模式分析, 为进一步通过基因工程技术提高灰毡毛忍冬绿原酸含量、优选种质资源奠定基础, 同时也为完善绿原酸生物合成途径和调节机制研究提供实验数据。

1 材料和试剂

灰毡毛忍冬种于湖南中医药大学药植园, 于 2018 年 5 月下旬采收当年生新鲜茎、叶及 7 个不同花期 (花蕾初期、青绿色花期、绿白色花蕾期、白色花蕾期、白色开花期、金黄色开花期、枯萎期) 花样品, 用装有液氮的泡沫盒运回实验室, 经湖南中医药大学周日宝教授鉴定为灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. 的茎、叶、花, 保存于 -80 °C 超低温冰箱。

多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (杭州博日科技有限公司); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (Thermo 公司); 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、2×Taq MasterMix (Dye)、2×Pfu MasterMix (Dye) (康为世纪生物科技有限公司); pEASY[®]-T1 Cloning Vector、pEASY[®]-Blunt Cloning Vector、TranStart[®] Green qPCR SuperMix UDG (北京全式金生物科技有限公司); RACE 试剂盒 (SMARTer[®] RACE5'/3'Kit, Clontech 公司)。引物序列见表 1, 由上海生工生物工程股份有限公司合成, 引物浓度均为 10 μmol/L。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列 (5'→3')	实验目的	长度/bp
PAL1-F	GAATAAAGGGACGGACAGTTACGGT	核心片段	1 163
PAL1-R	CTTGTTGTGTTGCTCGGCACTTTG		
PAL1-3'	GATTACGCCAAGCTTGCCTGAATTTACCGACCATTTGACGCAC	3'端 RACE	1 463
PAL1-5'	GATTACGCCAAGCTTGTGCGTCAAATGGTCGGTAAATTCAGGC	5'端 RACE	1 167
V-PAL1-F	ACTCACCAAATCTTCACTTAACCACATAA	全长验证	2 519
V-PAL1-R	CTTATCATTCATCTCTTATTTGCAAA		
Q-PAL1-F	CCATTGGAGGAGGTGAAGAG	荧光定量	97
Q-PAL1-R	TATAGCCGCCACCTGAGATA		
18 S-F	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	内参基因	—
18 S-R	GCGGAGTCCTAGAAGCAACA		

2 方法

2.1 LmPAL1 基因的克隆

2.1.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 取适量灰毡毛忍冬白色花蕾期花, 按照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA^[13], 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 核酸蛋白分析仪检测 RNA 的纯度。将质量较好的 RNA, 参照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书, 逆转录合成 cDNA 的第一链。

2.1.2 LmPAL1 基因核心片段扩增 根据本课题组前期转录组测序结果, 选取注释为苯丙氨酸解氨酶的序列, 应用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物 PAL1-F 和 PAL1-R (表 1), 以逆转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μ L): ddH₂O 9.5 μ L, 2 $\times$ Taq MasterMix (Dye) 12.5 μ L, cDNA 1 μ L, PAL1-F 和 PAL1-R 各 1 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 切下目的条带, 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行回收, 以 pEASY[®]-T1 Cloning Vector 为载体, 与目的基因连接, 转化至感受态细胞中, 通过含有 X-gal、IPTG、Amp 的 LB 固体培养基进行蓝白斑筛选, 挑选白斑进行菌落 PCR, 将阳性克隆接种于含有 Amp 的 LB 液体培养基中过夜培养, 委托铂尚生物技术有限公司测序。

2.1.3 LmPAL1 基因 3' 和 5' 端 RACE 扩增 根据“2.1.2”项核心片段测序结果, 设计 RACE 特异性引物 PAL1-3' 和 PAL1-5' (表 1), 首先按照 Clontech 公司 SMARTer[®] RACE5'/3' Kit 试剂盒说明书, 获得 LmPAL1 基因的 5'- 和 3'-RACE-Ready cDNA, 用 Tricine-EDTA Buffer 稀释。PCR 反应体系 (50 μ L): PCR-Grade H₂O 15.5 μ L, 2 $\times$ SeqAmp Buffer 25 μ L, SeqAmp DNA Polymerase 1.0 μ L, 5' 或 3'-RACE-Ready cDNA 2.5 μ L, 10 $\times$ UPM 5 μ L, 5'-或 3' 引物 1 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 70 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、2 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、2 min, 25 个循环。扩增目的条带回收和测序等过程同“2.1.2”项, 其中载体使用 pEASY[®]-Blunt Cloning Vector。

2.1.4 LmPAL1 基因 cDNA 全长序列验证 利用 Conting Express 对 3' 端和 5' 端进行序列拼接, 得到

LmPAL1 基因的 cDNA 全长, 根据拼接全长设计 cDNA 全长验证引物 V-PAL1-F 和 V-PAL1-R (表 1), 以“2.1.1”项下 cDNA 为模板进行全长验证。反应体系 (25 μ L): ddH₂O 9.5 μ L, 2 $\times$ Pfu MasterMix (Dye) 12.5 μ L, cDNA 1 μ L, V-PAL1-F 和 V-PAL1-R 各 1 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增目的条带回收和测序等过程同“2.1.2”项, 其中载体使用 pEASY[®]-Blunt Cloning Vector。

2.2 生物信息学分析

采用 NCBI 在线软件“ORF finder” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 查找 HQT 的开放阅读框, 通过在线软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白结构, 分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等参数; 采用 ProtScale 软件 (<http://web.expasy.org/protscale/>) 测定蛋白亲/疏水性; WOLF PSORT (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>) 在线预测蛋白质亚细胞定位情况; TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行蛋白质跨膜结构分析; SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽; InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 分析蛋白质结构域; SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 和 SWISS-MODEL (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 软件分别预测蛋白质的二级结构和三级结构; 通过 NCBI 的蛋白质序列数据库进行 BLAST, 筛选出同源性较高的物种, 利用 DNAMAN 软件进行氨基酸多重序列比对, MEGA 7 软件构建系统进化树。

2.3 LmPAL1 基因的组织表达水平分析

根据 LmPAL1 基因全长序列, 设计 qRT-PCR 的特异性引物 Q-PAL1-R 和 Q-PAL1-F (表 1), 以 18 S rRNA 为内参基因^[14-15]。按照“2.1.1”项方法提取灰毡毛忍冬茎、叶和 7 个不同花期花的总 RNA, 将 RNA 定量后, 反转录成 cDNA, 进行实时荧光定量分析。反应体系 (20 μ L): TranStart[®] Green qPCR SuperMix UDG 10 μ L, cDNA 1 μ L, Q-PAL1-R 和 Q-PAL1-F 各 0.4 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。反应条件: 50 $^{\circ}$ C、2 min, 94 $^{\circ}$ C、10 min; 94 $^{\circ}$ C、5 s, 55 $^{\circ}$ C、15 s, 72 $^{\circ}$ C、10 s, 40 个循环, 做熔解曲

线分析,每个样品重复 3 次,实验在 Bio-Rad CFX96 上进行,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因的相对表达量。

3 结果与分析

3.1 LmPAL1 基因的克隆

3.1.1 总 RNA 的提取 灰毡毛忍冬花的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳见图 1, 可见 28 S 和 18 S 条带明显, 其中 28 S 条带亮度是 18 S 的 2 倍, 说明 RNA 完整性较好, A_{260}/A_{280} 值在 1.8~2.0, A_{260}/A_{230} 值大于 2.0, RNA 质量符合后续实验要求。

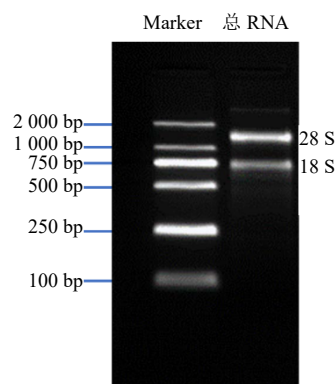


图 1 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA

3.1.2 LmPAL1 核心片段扩增 通过转录组 Unigene 序列设计引物, 利用 RT-PCR 扩增得到单一条带, 约为 1 100 bp (图 2), 经过回收、纯化、克隆、测序后, 获得该片段序列为 1 163 bp, 通过 DNAMAN 比对, 与转录组测序结果一致, 相似度

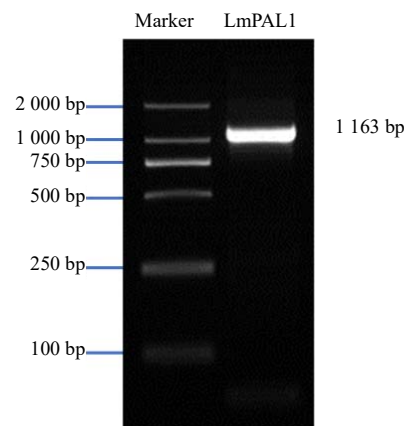
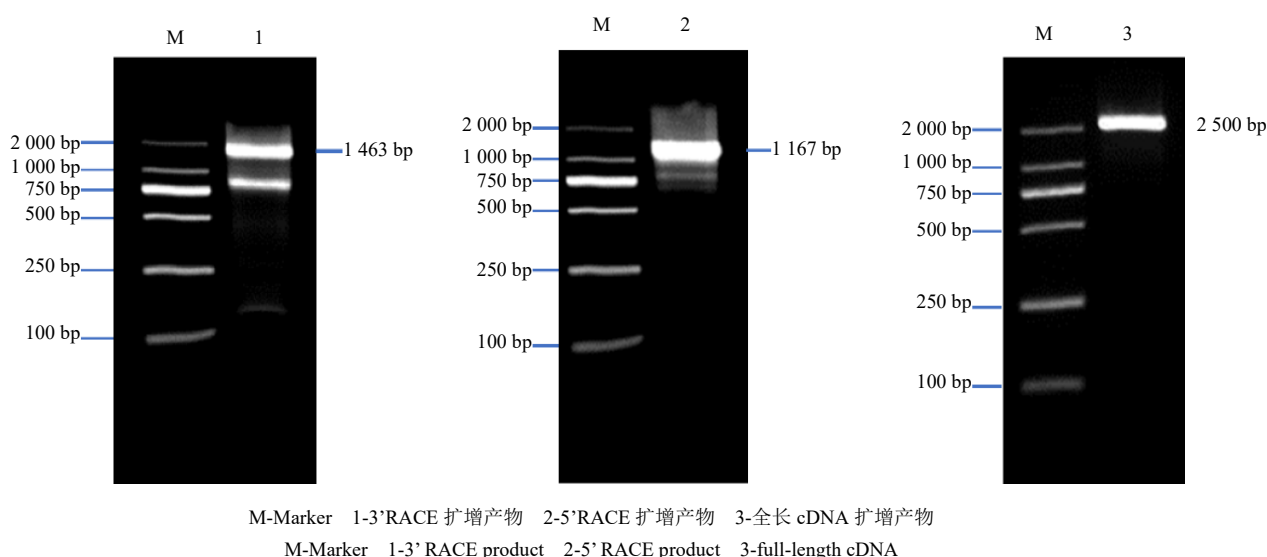


图 2 LmPAL1 基因核心片段扩增产物

Fig. 2 PCR product core fragment of LmPAL1 gene

达 100%。

3.1.3 LmPAL1 基因全长 cDNA 的获得 根据核心片段序列设计 RACE 特异性引物, 分别进行 5' 端和 3' 端扩增。3' 端在 1 463 bp 左右出现一条亮带, 5' 端在 1 167 bp 左右出现一条亮带。将亮带切下胶回收, 转化至载体上, 挑选阳性克隆测序, 将 3' 端、5' 端和核心片段序列进行拼接, 获得 LmPAL1 基因 cDNA 全长序列 2 549 bp (图 3)。设计全长验证引物, 以“2.1.1”项下的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 在 2 500 bp 左右有明显单一亮带, 将亮带回收、纯化、克隆、测序, 测序结果与拼接全长序列一致, 说明成功克隆出 LmPAL1 基因的 cDNA 全长。



M-Marker 1-3'RACE 扩增产物 2-5'RACE 扩增产物 3-全长 cDNA 扩增产物
M-Marker 1-3' RACE product 2-5' RACE product 3-full-length cDNA

图 3 LmPAL1 基因全长 cDNA 的扩增

Fig. 3 PCR product of full-length cDNA from LmPAL1 gene

3.2 LmPAL1 基因生物信息学分析

3.2.1 LmPAL1 蛋白理化特性 LmPAL1 基因全长 2 549 bp, 3'端非编码区 202 bp, 带有 30 bp 的 ployA 尾, 5'端非编码区 202 bp, 中间具有完整的开放阅读框 2 145 bp, 该序列编码氨基酸 714 个, 碱基和氨基酸序列见图 4。将其上传至 NCBI 数据库并命名为 LmPAL1, GenBank 登录号为 MH236488。利用 ExPASy ProtParam 在线软件对 LmPAL1 基因编码蛋白的理化性质进行预测分析, 推测其分子式为 $C_{3420}H_{5482}N_{950}O_{1043}S_{29}$, 相对分子质量为 77 526.63, 等电点为 6.04, 预测其在哺乳

动物体内半衰期为 30 h, 在酵母中的半衰期大于 20 h, 不稳定系数为 $35.26 < 40$, 属于稳定蛋白, 带正电残基 (Arg+Lys) 为 73, 带负电残基 (Asp+Glu) 为 83, 脂肪系数 91.25, 亲水性平均系数为 -0.146, ProtScale 进行蛋白亲水/疏水性分析 (图 5), 预测其为亲水性蛋白。

WOLF PSORT 预测 LmPAL1 蛋白可能定位于叶绿体中。运用在线软件 TMHMM 分析, 发现该基因编码的氨基酸 1~714 全部在膜外, 不具有跨膜区域。SignalP 4.1 Server 进行信号肽预测分析, 发现 LmPAL1 不具有信号肽序列, 推测其不是分泌蛋白。

```

1      ACTCACCAATCTTCACTTAACACATAAATACATACATTTCATTATCTCTCTCTCTCTATATATATATATATATATGCACACA
91     CATATCACAAATTAACCTGTTAAAAAACTGTGGGAGGAGGATTGTGTGTTGTGTGATATTTATCAGATCAGTTAATTTCCGTATT
181    ATATCAGATCTGTACTAGTAGAGATGGAGAATGGACAGAAATGGCGGGTCGTTTCGAATTGTGCGTGAAGGATCCGTTGAATTTGGG
1      M E N G H R N G G V V S E L C V K D P L N W G
271    AGTGGCGCCGAGGGAATGAAGGGAGCCATTTGGAGGAGGTGAAGAGGATGTTGGCGGAGTTTAGGAATCCGTAAGTGAAGCTCGCGGG
24     V A A E G M K G S H L E E V K R M V A E F R N P V V K L G G
361    CGAGGGCTGACGATATCTCAGGTGGCGCTATAGCTTCTGAGGAGGAGGTGAGACTAGTGAAGGGTGAAGGTGGAGTGTGGAGGG
54     E G L T I S Q V A A I A S A G G G E T S E G V K V E L W E G
451    GGCGAGGAGAGAGTGAAGCAAGTAGCATTGGGTGATGGAGAGTATGAATAAGGGACGGACAGTTACGGTGTACTACTGTTTGG
84     A R E R V K A S S D W V M E S M N K G T D S Y G V T T G F G
541    TGCTACTTCTCATCGGAGGACTAAACAAGGCGTGTCTTCAAAAGGAGCTTATTAGGTTCTTGAATTCGGGAATATTGGCAATGGAAC
114    A T S H R R T K Q G G A L Q K E L I R F L N S G I F G N G T
631    AGAATCATCCACACTACCACTACGCACTAGAGCAGCCATGTTAGTGAGGATCAACCCCTCTCCAGGCTACTCCGGCATCCG
144    E S S H T L P H S A T R A A M L V R I N T L L Q G Y S G I R
721    TTTGGAAGTCTCGAAGCCATCAGAAATCTCTCAACACAATGTCACCTCGTGTGTCCTTACGTCGACCAATCAGGCTCCGGAGA
174    F E V L E A I T K F L N H N V T P C L P L R G T I T A S G D
811    TCTTGTCCTTATCTACATTGCTGGACTTCTCACTGGCCGCCCAATTCAGGCAAGTGGACCGCGGAGAAATCTCACTGCGCA
204    L V P L S Y I A G L L T G R P N S K A V G P A G E I L T A E
901    AGCTGCTTCCGCTTGGCGGAGTCACTGGCGGATTTTCGAGCTCCACCCAAGGAAGGCTTGCACCTTGTAAATGGCACAGCTGTTGG
234    A A F G L A G V T G G F F E L Q P K E G L A L V N G T A V G
991    CTCTGGCATGGCCCTCTATGTTCTTTTGGGCAACATCTTGCCCTTTTATCTGAAGTCTTATCAGCTATCTTGTGAAGTTATGCA
264    S G M A S M V L F E A N I L A L L S E V L S A I F A E V M Q
1 081  AGGAAGGCTGAATTTACCGACCATTTGACGCAAAATTAAGCAACACCCGGCCAGATGAGGCTGCAGCAATATGGAACACATTTT
294    G K P E F T D H L T H K L K H H P G Q I E A A A I M E H I L
1 171  AGATGGAAGCTCTATGTCAAGGCCGCTGAAAACTTACAGAGATGGACCCCTTGCAAAAGCCCAACAGATCGCTACGCCCTCCGAAC
324    D G S S Y V K A A E K L H E M D P L Q K P K Q D R Y A L R T
1 261  GTCACCCCAATGGCTCGGCCCTCAAAATGAGGTGATCCGATCATCGACAAAGATGATTGAGAGGGAGATAAATCAGTGAATGACAACCC
354    S P Q W L G P Q T E V I R S S T K M T E R E I N S V N I P
1 351  GTTGATCGATGTTTCGAGGAACAAGGCCCTACATGGTGGCACTTCAAGGACCCCAATGGAGTCTCTATGGATAACACAGATTAGC
384    L I D V S R N K A L H G G N F Q G T P I G V S M D N T R L A
1 441  CATTCGCGCAATGGAAACTCATGTTTGGCCCAATTTTCGAGCTTGTGAATTTTACACAAATGGTTTACCTTCTAATCTCTCCGG
414    I A A I G K L M F A Q F S E L V N D F Y N N G L P S N L S G
1 531  TGGACGTAATCCAAGCTTGGACTATGGCTTCAAAAGGCCGCGAGATTGCCATGGCTTCATATTGTTCTGAACCTCAATTTTGCCAATCC
444    G R N P S L D Y G F K G A E T A M A S Y C S E L Q F L A N P
1 621  AGTCACTAACCAAGTCCAAAGTGCCGAGCAACACCAAGATGTGAACCTCATGGGCTTAACTCTCTCTCGAAAGACAGCTGAGGCGGT
474    V T N H V Q S A E Q H N Q D V N S L G L I S S R K T A E A V
1 711  TGATACTTGAAGCTAATGTATCCACATATCTAGTAGGTCTATGCCAGGCCATAGACTTGAGGCATTTGGAGGAGAAATTTACGGACCAC
504    D I L K L M S S T Y L V G L C Q A I D L R H L E E N L R I T
1 801  AGTAAAGAACCCGTGAGCCTAGTGGCTAAGCGGGTCTTGACCATGGGTGCCAAGCTGAACTCCACCCCTCAAGGTTCTGCGAGAAGGA
534    V K N T V S L V A K R V L T M G A N G E L H P S R F C E K E
1 891  ACTGCTTAGAGTGGTGGACCGTGAGTACGTGTTTGCTTACATTGATGACCCCTGCAGTGCTACCTACCCGTTAATGAAAACTAAGGCA
564    L L R V V D R E Y V F A Y I D D P C S A T Y P L M E K L R Q
1 981  AGTCTGTTGTAACACGCAATTGAAAAACGAAGTTAGTGAGAAGATGTGAGCACTTCCATCTTCCAAAAGATCGGAGCTTTGAGGAGA
594    V L V E H A L K N E V S E K N V S T S I F Q K I G A F E E E
2 071  ATTGAAGCCCTTTTGCCAAAAGAGGTGGAGGTACACGCGCTTTGATTGAGAGTGGGAATGGTGAATTGCTAACCGGATAAAGGATTG
624    L K A L L P K E V E S T R A L I E S G N G G I A N R I K D C
2 161  TCGGCTTACCCATTGTACAAGTTTGTGAGGGAAGAGCTTGGGACAGAGTTGCTGACTGGAGAGAAGGTCGGTCAACAGGGGAGGAGTT
654    R S Y P L Y K F V R E E L G T E L L T G E K V R S P G E E F
2 251  TGATAAAGTGTTCACGGCAATGTGTGAGGGAAGATAATTGATCCATTGTTGATTGCTCAAGAGTGGAAATGGTGTGATGCTTACCAAT
684    D K V F T A M C E G K I I D P L L D C L K S W N G S P L P I
2 341  CTGTTAGGTTTGTGTTTACATGTTTGTGAATAATGGTTTCGATTCTCTTGTGTTTCTGTTGTTTAAATTTGATCGGTTGATTATT
714    C *
2 431  AAAGTTGCAATGTAGAAGTGTGTTGTAATGCTTATGTATGTACCATCAGTAGCTTATTTTTCGAAATAAGAGATGGAATGATAAGA
2 521  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 4 LmPAL1 全长序列及推测的氨基酸序列

Fig. 4 Full-length cDNA sequence of LmPAL1 gene and predicted amino acid sequence

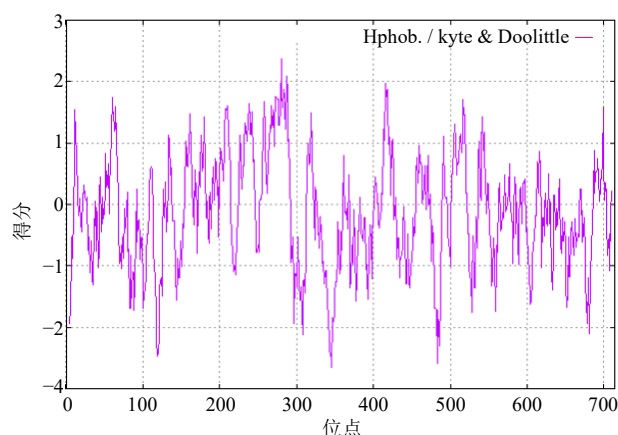


图 5 LmPAL1 基因所编码蛋白亲疏水性分析

Fig. 5 Hydrophobicity analysis of LmPAL1 encoding protein

3.2.2 LmPAL1 蛋白结构域和二、三级结构 InterPro 对 LmPAL1 蛋白结构域进行预测, 结果(图 6)显示, 该蛋白属于苯丙氨酸解氨酶家族, 包含 PAL shielding 结构域(527~641 aa), 此外 N 端含有延胡索酸酶/组氨酸结构域(17~260 aa), 并且含有 PAL/HAL(苯丙氨酸解氨酶和组氨酸解氨酶)活性中心序列 GTITASGDLVPLSYIAG(196~212 aa)。利用 SOPMA 软件对 LmPAL1 蛋白的二级结构进行预测(图 7), 该蛋白组成为 α -螺旋(alpha helix, 54.90%) 392 处、随机卷曲(random coil, 30.67%) 219 处, 延伸链(extended strand, 8.26%) 59 处以及 β 转角(beta turn, 6.16%) 44 处, α -螺旋和随机卷曲为该蛋白二级结构的主要元件。运用 SWISS-MODEL 建模工具在线预测 LmPAL1 蛋白的三级结构, 见图 8。

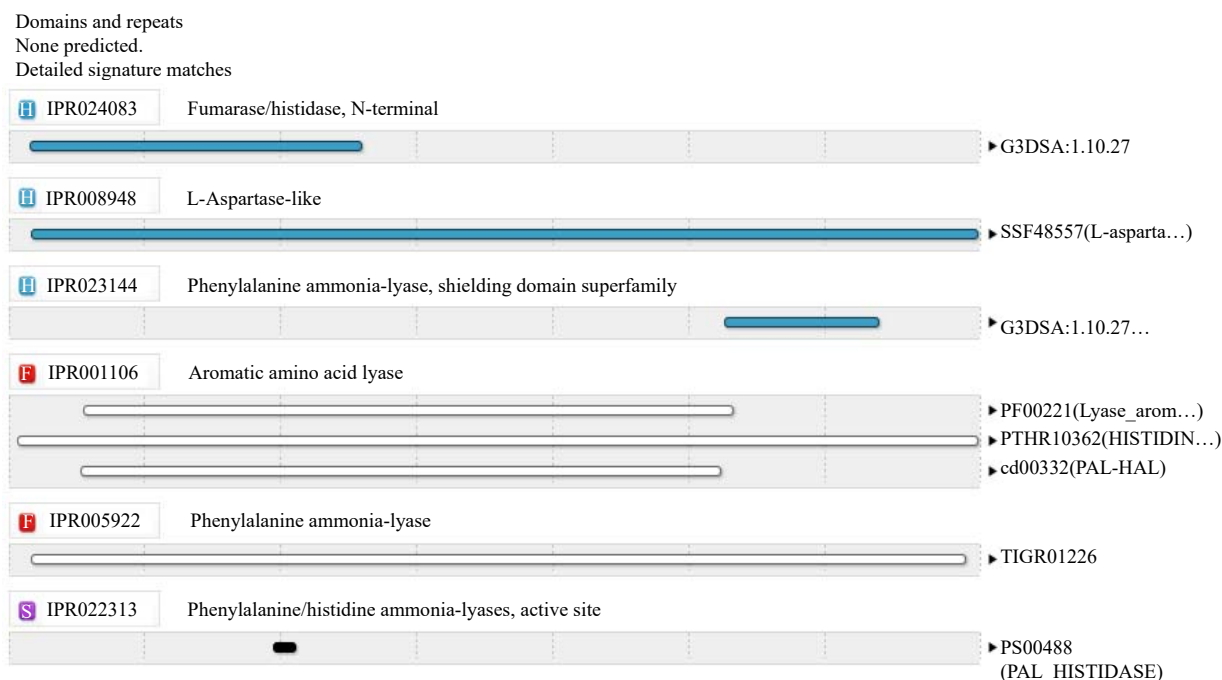
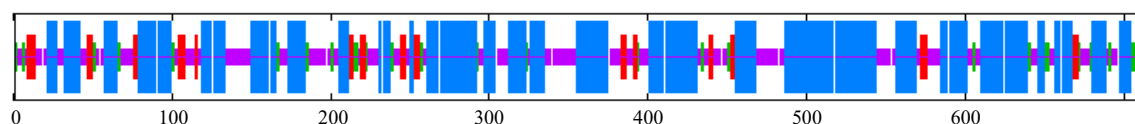


图 6 LmPAL1 结构域

Fig. 6 LmPAL1 domain



蓝色代表 α -螺旋, 红色代表延伸链, 绿色代表 β -转角, 紫色代表随机卷曲
Blue, red, green and purple stand for alpha helix, extended strand, beta turn and random coil, respectively

图 7 LmPAL1 的二级结构预测

Fig. 7 Secondary structure prediction of LmPAL1

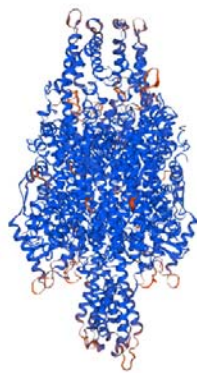


图 8 LmPAL1 的三维结构预测

Fig. 8 Three-dimensional structure prediction of LmPAL1

灰毡毛忍冬	...MENG...HRNGGVVSLGVK...DPLWGVAAEGMKSHLEVKRMVAEERFVWVLGGELTISQVAATASAG	68
忍冬	...MENG...HRNGGVVSLGVK...DPLWGVAAEGMKSHLEVKRMVAEERFVWVLGGELTISQVAATASAG	68
胡萝卜	...MAYTNG...HHENGNGVSLGVK...DPLWGVAAEGMKSHLEVKRMVAEERFVWVLGGELTISQVAATASAG	72
当归	...MAYTNG...HHENGNGVSLGVK...DPLWGVAAEGMKSHLEVKRMVAEERFVWVLGGELTISQVAATASAG	72
烟草	...MASNG...HVNNGENFELCKKSS...ATDPLWEMAAESLRGSHLEVKRMVAEERFVWVLGGELTISQVAATASAG	73
番茄	IASSIVQNG...HVNNGENFELCKKSS...ATDPLWEMAAESLRGSHLEVKRMVAEERFVWVLGGELTISQVAATASAG	77
拟南芥	...MDQIEAMLCGGGKTKAVTTTKTAGPLWGLAADQMKSHLEVKRMVAEERFVWVLGGELTISQVAATASAG	76
Consensus	pl w aa gshl evk mv e r p v lgge lt qva i	
灰毡毛忍冬	IGETSECVKVELWEGARERVKASSDWMVSMKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKGGALQKELIRFLNSGIFGNGTES.SHT	148
忍冬	IGETSECVKVELWEGARERVKASSDWMVSMKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKGGALQKELIRFLNSGIFGNGTES.SHT	148
胡萝卜	...DSGVKVELSEARACVKASSDWMVSMKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKGGALQKELIRFLNSGIFGNGTES.SHT	149
当归	...DSGVKVELSEARACVKASSDWMVSMKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKGGALQKELIRFLNSGIFGNGTES.SHT	152
烟草	...KSANGVKVELSEARACVKASSDWMVSMKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKGGALQKELIRFLNSGIFGNGTES.SHT	151
番茄	...NKSNGVKVELSEARACVKASSDWMVSMKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKGGALQKELIRFLNSGIFGNGTES.SHT	155
拟南芥	...GSKVELSEARACVKASSDWMVSMKGTDSYGVTTGFGATSHRRTKGGALQKELIRFLNSGIFGNGTES.SHT	155
Consensus	vkvel e r vkassdwm sm kgt dsygvttgfgatshrrtk g alq elirfln g fg	
灰毡毛忍冬	PLSATRAAMLVRNTLLQGYSGRFELEAITKFLNNVITPCLPLRGITITASGDLVPLSYIAG.LTGRPNKAVGPAE	229
忍冬	PLSATRAAMLVRNTLLQGYSGRFELEAITKFLNNVITPCLPLRGITITASGDLVPLSYIAG.LTGRPNKAVGPAE	229
胡萝卜	PLSATRAAMLVRNTLLQGYSGRFELEAITKFLNNVITPCLPLRGITITASGDLVPLSYIAG.LTGRPNKAVGPAE	230
当归	PLSATRAAMLVRNTLLQGYSGRFELEAITKFLNNVITPCLPLRGITITASGDLVPLSYIAG.LTGRPNKAVGPAE	233
烟草	PLSATRAAMLVRNTLLQGYSGRFELEAITKFLNNVITPCLPLRGITITASGDLVPLSYIAG.LTGRPNKAVGPAE	232
番茄	PLSATRAAMLVRNTLLQGYSGRFELEAITKFLNNVITPCLPLRGITITASGDLVPLSYIAG.LTGRPNKAVGPAE	236
拟南芥	PLSATRAAMLVRNTLLQGYSGRFELEAITKFLNNVITPCLPLRGITITASGDLVPLSYIAG.LTGRPNKAVGPAE	232
Consensus	p satraamlvr ntllogysg rfe leai t kflnnvit p clplrgititasgdlvplsyiag ltgrpnkav p a e	
灰毡毛忍冬	ITAEAFGLAGVTGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANTLALLSEVLSAIFAEVNGKPEFTD.LTHLKHHP	310
忍冬	ITAEAFGLAGVTGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANTLALLSEVLSAIFAEVNGKPEFTD.LTHLKHHP	310
胡萝卜	ITAEAFGLAGVTGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANTLALLSEVLSAIFAEVNGKPEFTD.LTHLKHHP	310
当归	ITAEAFGLAGVTGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANTLALLSEVLSAIFAEVNGKPEFTD.LTHLKHHP	314
烟草	ITAEAFGLAGVTGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANTLALLSEVLSAIFAEVNGKPEFTD.LTHLKHHP	313
番茄	ITAEAFGLAGVTGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANTLALLSEVLSAIFAEVNGKPEFTD.LTHLKHHP	317
拟南芥	ITAEAFGLAGVTGFFELQPKKEGLALVNGTAVGSGMASMVLFEANTLALLSEVLSAIFAEVNGKPEFTD.LTHLKHHP	313
Consensus	af ag gff lqpkkeglalvngtavsgmasmvl f ean t l a l l s e v l s a i f a e v n g k p e f t d l t h l k h h p	
灰毡毛忍冬	QTEAAAIHEHILDGSSYKKAQKHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKWIEREINSVNDNPLIDVSRNK	391
忍冬	QTEAAAIHEHILDGSSYKKAQKHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKWIEREINSVNDNPLIDVSRNK	391
胡萝卜	QTEAAAIHEHILDGSSYKKAQKHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKWIEREINSVNDNPLIDVSRNK	392
当归	QTEAAAIHEHILDGSSYKKAQKHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKWIEREINSVNDNPLIDVSRNK	395
烟草	QTEAAAIHEHILDGSSYKKAQKHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKWIEREINSVNDNPLIDVSRNK	394
番茄	QTEAAAIHEHILDGSSYKKAQKHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKWIEREINSVNDNPLIDVSRNK	398
拟南芥	QTEAAAIHEHILDGSSYKKAQKHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSSTKWIEREINSVNDNPLIDVSRNK	394
Consensus	qteaaaimehildgss y k k a q k h e m d p l q p k q d r y a l r t s p q w l g p q i e v i r s s t k w i e r e i n s v n d n p l i d v s r n k	
灰毡毛忍冬	LHGGNFQGTPIGVSMNDRLAAIAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLSSGGRNPSLDYGGKGAETAMASYCSELOLAN	472
忍冬	LHGGNFQGTPIGVSMNDRLAAIAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLSSGGRNPSLDYGGKGAETAMASYCSELOLAN	472
胡萝卜	LHGGNFQGTPIGVSMNDRLAAIAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLSSGGRNPSLDYGGKGAETAMASYCSELOLAN	473
当归	LHGGNFQGTPIGVSMNDRLAAIAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLSSGGRNPSLDYGGKGAETAMASYCSELOLAN	476
烟草	LHGGNFQGTPIGVSMNDRLAAIAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLSSGGRNPSLDYGGKGAETAMASYCSELOLAN	475
番茄	LHGGNFQGTPIGVSMNDRLAAIAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLSSGGRNPSLDYGGKGAETAMASYCSELOLAN	479
拟南芥	LHGGNFQGTPIGVSMNDRLAAIAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLSSGGRNPSLDYGGKGAETAMASYCSELOLAN	475
Consensus	i h g g n f q g t p i g v s m d n r l a a i a i g k l m f a q f s e l v n d y n n g l p s n l s s g g r n p s l d y g g k g a e t a m a s y c s e l o l a n	
灰毡毛忍冬	VTVHVQSAEQHNQDVNSLGLISRKTAEAVILKLMSTTVLVGLCOAQLDRHLEENLRITVKNVTSVAKRVLITGANGE	553
忍冬	VTVHVQSAEQHNQDVNSLGLISRKTAEAVILKLMSTTVLVGLCOAQLDRHLEENLRITVKNVTSVAKRVLITGANGE	553
胡萝卜	VTVHVQSAEQHNQDVNSLGLISRKTAEAVILKLMSTTVLVGLCOAQLDRHLEENLRITVKNVTSVAKRVLITGANGE	554
当归	VTVHVQSAEQHNQDVNSLGLISRKTAEAVILKLMSTTVLVGLCOAQLDRHLEENLRITVKNVTSVAKRVLITGANGE	557
烟草	VTVHVQSAEQHNQDVNSLGLISRKTAEAVILKLMSTTVLVGLCOAQLDRHLEENLRITVKNVTSVAKRVLITGANGE	556
番茄	VTVHVQSAEQHNQDVNSLGLISRKTAEAVILKLMSTTVLVGLCOAQLDRHLEENLRITVKNVTSVAKRVLITGANGE	560
拟南芥	VTVHVQSAEQHNQDVNSLGLISRKTAEAVILKLMSTTVLVGLCOAQLDRHLEENLRITVKNVTSVAKRVLITGANGE	556
Consensus	vtv hvqsaeqhnqdvns l g l i s r k t a e a v i l k l m s t t v l v g l c o a q l d r h l e e n l r i t v k n v t s v a k r v l i t g a n g e	
灰毡毛忍冬	HPFRFCEKLLRVVDREVFAYIDDPSCATYPLMKLRQVLVEHALKNEVSEKNVSTIFQKIFAFELKALLPKEVES	634
忍冬	HPFRFCEKLLRVVDREVFAYIDDPSCATYPLMKLRQVLVEHALKNEVSEKNVSTIFQKIFAFELKALLPKEVES	634
胡萝卜	HPFRFCEKLLRVVDREVFAYIDDPSCATYPLMKLRQVLVEHALKNEVSEKNVSTIFQKIFAFELKALLPKEVES	635
当归	HPFRFCEKLLRVVDREVFAYIDDPSCATYPLMKLRQVLVEHALKNEVSEKNVSTIFQKIFAFELKALLPKEVES	638
烟草	HPFRFCEKLLRVVDREVFAYIDDPSCATYPLMKLRQVLVEHALKNEVSEKNVSTIFQKIFAFELKALLPKEVES	637
番茄	HPFRFCEKLLRVVDREVFAYIDDPSCATYPLMKLRQVLVEHALKNEVSEKNVSTIFQKIFAFELKALLPKEVES	641
拟南芥	HPFRFCEKLLRVVDREVFAYIDDPSCATYPLMKLRQVLVEHALKNEVSEKNVSTIFQKIFAFELKALLPKEVES	637
Consensus	h p r f c e k l l r v v d r e v f a y i d d p c s a t y p l m k l r q v l v e h a l k n e v s e k n v s t i f o k i f a f e l k a l l p k e v e s	
灰毡毛忍冬	RAALIESNGGIANRITKCRSYPLRYVRVRELGTETLTGEVVRSPGEEFDKVFATKCEKIDPDLCLCKSWNGAPLPI	714
忍冬	RAALIESNGGIANRITKCRSYPLRYVRVRELGTETLTGEVVRSPGEEFDKVFATKCEKIDPDLCLCKSWNGAPLPI	714
胡萝卜	RAALIESNGGIANRITKCRSYPLRYVRVRELGTETLTGEVVRSPGEEFDKVFATKCEKIDPDLCLCKSWNGAPLPI	715
当归	RAALIESNGGIANRITKCRSYPLRYVRVRELGTETLTGEVVRSPGEEFDKVFATKCEKIDPDLCLCKSWNGAPLPI	718
烟草	RAALIESNGGIANRITKCRSYPLRYVRVRELGTETLTGEVVRSPGEEFDKVFATKCEKIDPDLCLCKSWNGAPLPI	717
番茄	RAALIESNGGIANRITKCRSYPLRYVRVRELGTETLTGEVVRSPGEEFDKVFATKCEKIDPDLCLCKSWNGAPLPI	721
拟南芥	RAALIESNGGIANRITKCRSYPLRYVRVRELGTETLTGEVVRSPGEEFDKVFATKCEKIDPDLCLCKSWNGAPLPI	717
Consensus	r a a l i e s n g g i a n r i t k c r s y p l r y v r v r e l g t e t l t g e v v r s p g e e f d k v f a t k c e k i d p d l c l c k s w n g a p l p i	

框内代表酶活性中心序列

characters in the box represent the enzyme activity center

图 9 LmPAL1 与其他植物 PAL 蛋白的多序列比对分析

Fig. 9 Analysis of multiple sequence alignment of LmPAL1 and other plant PAL proteins

3.2.3 LmPAL1 氨基酸序列同源性比对和系统进化树分析 应用 NCBI 中的 BlastP 在线软件, 对 LmPAL1 氨基酸序列进行同源性搜索, 用 DNAMAN 进行比对, 结果显示其与忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. (AGE10589.1)、胡萝卜 *Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm. (BAC56977.1)、当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (AJW77399.1)、烟草 *Nicotiana tabacum* L. (NP_001311946.1)、番茄 *Lycopersicon esculentum* Mill. (NP_001307538.1)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (NP_190894.1) 同源性分别为 98.74%、87.08%、86.19%、84.44%、84.39%、80.64%。氨基酸多重序列比对结果见图 9, 分析发现这些物

种均含有 GTITASGDLVPLSYIAG 酶活性中心序列。

为研究 LmPAL1 氨基酸序列与其他植物 PAL 的进化关系,在 NCBI 的 BlastP 筛选其他 21 种植物(均属双子叶植物纲),运用 MEGA7 构建 NJ 进化树,结果见图 10,系统进化树主要分为 3 个大的分支,灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. 与忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.、蓖麻 *Ricinus communis* L.、胡萝卜 *Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm.、莴苣 *Lactuca sativa* L.、向日葵 *Helianthus annuus* L.、茶树 *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze.、盐肤木 *Rhus chinensis* Mill. 聚为一个大类,与同科同属的忍冬亲缘关系最近。

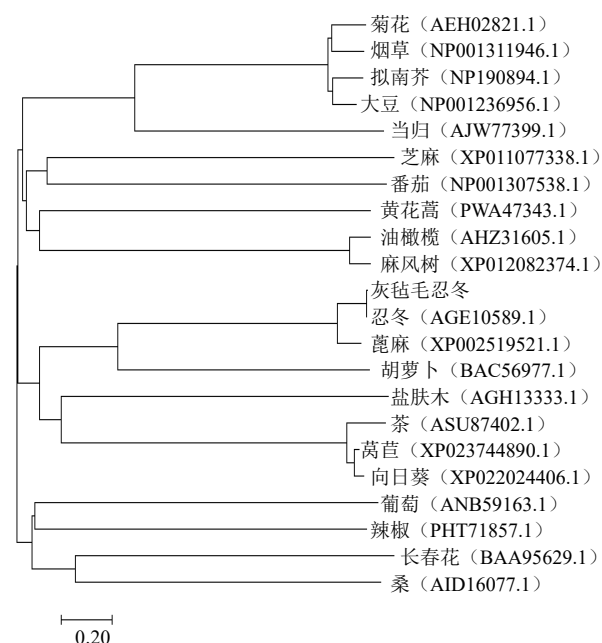


图 10 LmPAL1 蛋白的 NJ 系统进化树

Fig. 10 Neighbor-joining phylogenetic tree of LmPAL1 proteins

3.3 LmPAL1 基因的组织特异性表达

应用 qRT-PCR 技术测定不同花期和不同器官 LmPAL1 基因的表达量结果表明,不同花期表达模式结果见图 11,金黄色开花期相对表达量最高,白色花蕾期次之,与其他花期存在极显著差异 ($P < 0.01$)。不同器官中表达模式结果见图 12,相对表达量从高到低依次是白色花蕾期花 > 茎 > 叶, LmPAL1 在花相对表达量最高,是茎的 3 倍,是叶的 6.6 倍。

4 讨论

本研究成功克隆灰毡毛忍冬 PAL 基因,并命名为 LmPAL1,该基因全长 2 549 bp,具有完整的

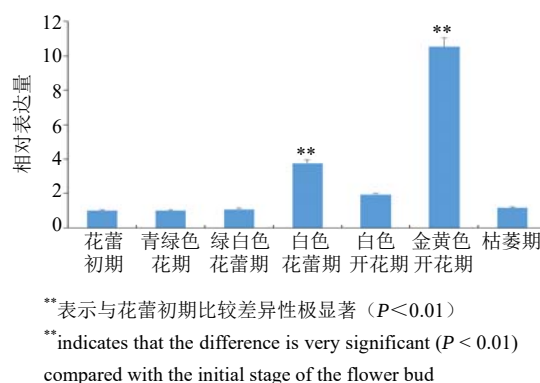
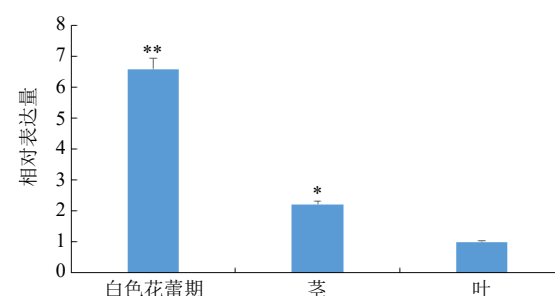


图 11 LmPAL1 基因在不同花期中相对表达量

Fig. 11 Relative expression of LmPAL1 gene in different flowering stages



*表示与叶比较差异性显著 ($P < 0.05$); **表示与叶比较差异性极显著 ($P < 0.01$)

*indicates that the difference is significant ($P < 0.05$); **indicates that the difference is very significant ($P < 0.01$) compared with leaf

图 12 LmPAL1 基因在各器官中的相对表达量

Fig. 12 Relative expression of LmPAL1 gene in several organs

ORF 2 145 bp, 氨基酸 714 个, 预测其为亲水性蛋白,可能定位于叶绿体中。结构域预测该蛋白属于苯丙氨酸解氨酶家族,并且含有苯丙氨酸解氨酶和组氨酸解氨酶活性中心序列 GTITASGDLVPLSYIA (196~212 aa)。

PAL 是苯丙烷代谢途径的第一个关键酶,催化苯丙氨酸脱氨生成反式肉桂酸,是连接初生代谢和次生代谢的关键酶^[16]。PAL 基因是一个比较保守的基因,该基因在不同植物种编码区变化范围不大, PAL 基因编码区一般在 2 100 bp 左右,但存在一些差异^[5]。在众多 PAL 基因研究中,发现其主要在植物生长发育和抗逆防御中发挥着重要作用,如抗病防御反应、抗虫反应、响应机械损伤、响应重金属胁迫等^[11],同时 PAL 基因与绿原酸含量的积累密切相关^[12]。灰毡毛忍冬的花作为山银花入药,文献研究表明灰毡毛忍冬的不同花期花中绿原酸含量有

差异^[17],为探究不同花期花的绿原酸含量与 LmPAL1 表达量相关性,本研究运用了 qRT-PCR 对不同花期花进行表达模式分析,发现 LmPAL1 在灰毡毛忍冬不同花期表达量存在差异;文献研究表明灰毡毛忍冬的不同器官绿原酸含量有差异^[18],本研究对比了 LmPAL1 在不同器官中相对表达量,结果为花>茎>叶,说明该基因在同一植物不同部位基因的表达量具有组织特异性。Yuan^[4]等实验表明 PAL1 在灰毡毛忍冬和忍冬中,花的相对表达量高于叶,与本研究结果相一致。目前已有研究者将基因转入模式植物中,进行功能验证,Howles 等^[19]将 PAL 基因转入烟草,比较转基因植株与野生型植株发现,PAL 转录水平提高,其转录产物苯丙氨酸解氨酶的含量比野生型植株高数倍,转基因植株中叶片绿原酸含量也显著增加。Chang 等^[20]从拟南芥中克隆出与绿原酸生物合成相关酶基因 AtPAL2,将该基因构建过表达载体转化至烟草,在烟草中过表达 AtPAL2 导致转基因植物绿原酸含量比野生型高 2 倍。以上研究说明 PAL 基因在绿原酸生物合成途径中可能具有促进绿原酸合成的功能,后期本项目组也将进一步进行 LmPAL1 基因功能验证。

《中国药典》2005 年版始将金银花和山银花分 2 个药材收载,在此之前南方地区习将山银花项下灰毡毛忍冬当做金银花使用,两者的药材性状特征比较相似。本研究通过同源性比对发现灰毡毛忍冬与同科同属的忍冬 PAL1 氨基酸相似度达 99%,且系统进化树分析两者归为一个小支,两者具有较高的亲缘关系。笔者对比两者 PAL1 碱基序列,发现忍冬 PAL1 的 ORF 碱基不确定,其氨基酸也有不确定,而本研究成功克隆了具有完整 ORF 的 LmPAL1 基因 cDNA 全长。同时有研究表明,灰毡毛忍冬绿原酸含量是忍冬的 2 倍左右^[21],该现象可能与 PAL1 氨基酸序列差异,引起该基因在 2 种植物体表达不同相关。

灰毡毛忍冬是我国南方山银花的主栽培品种,主要分布在湖南、重庆等地^[22],近年来被广泛应用于食品、饮料、保健品、化妆品和兽医用药等方面。目前灰毡毛忍冬研究主要集中在化学成分和药理作用方面,分子生物学研究较少,本研究成功克隆 LmPAL1 基因全长,为进一步研究该基因的功能以及遗传改良灰毡毛忍冬品质奠定基础,同时对完善灰毡毛忍冬绿原酸生物合成和调节机制具有重要意义。且灰毡毛忍冬是否能作为金银花入药还有很大的争议,忍冬为金银花的

原植物,灰毡毛忍冬为山银花的原植物之一,鉴别两者的方法主要是基原、性状、显微、理化鉴别等,而分子生物学具有快速、准确、现场化的特点^[23],可以通过分子生物学鉴别两者,同时本研究也为从分子水平探究两者绿原酸含量差异提供理论依据,具有一定的研究意义。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 张浩超,郝宝燕,孙皓熠,等. 绿原酸研究进展 [J]. 食品与药品, 2017, 19(3): 222-227.
- [3] 王玲娜,姚佳欢,马超美. 绿原酸的研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(11): 1121-1130.
- [4] Yuan Y, Wang Z, Jiang C, et al. Exploiting genes and functional diversity of chlorogenic acid and luteolin biosyntheses in *Lonicera japonica* and their substitutes [J]. *Gene*, 2014, 534(2): 408-416.
- [5] 李铁柱,杜红岩,刘慧敏. 杜仲 PAL 基因 cDNA 全长序列特征分析 [J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 40-44.
- [6] 乔枫,耿贵工,张丽,等. 枸杞苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(12): 64-73.
- [7] 高杰,谷巍,周娟娟,等. 黑三棱苯丙氨酸解氨酶基因克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 403-409.
- [8] 林懋怡,郑柳,刘晋杰,等. 华细辛苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与生物信息学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 38-43.
- [9] 刘建福,钟书淳,王明元,等. 姜黄苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2014, 45(21): 3141-3148.
- [10] 雒军,王引权,温随超,等. 当归苯丙氨酸解氨酶基因片段克隆和组织特异性表达分析 [J]. 草业学报, 2014, 23(4): 130-137.
- [11] 郝向阳,孙雪丽,王天池,等. 植物 PAL 基因及其编码蛋白的特征与功能研究进展 [J]. 热带作物学报, 2018, 39(7): 1452-1461.
- [12] 汪周勇,黄璐琦,袁媛,等. 金银花苯丙氨酸解氨酶 (LJPAL1) 抗体制备及酶联免疫吸附分析 [J]. 药学学报, 2013, 48(9): 1498-1502.
- [13] 刘湘丹,徐玉琴,王珊,等. 适用于基因全长克隆的灰毡毛忍冬不同器官总 RNA 提取方法筛选 [J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(12): 60-63.
- [14] 蔡嘉洛,朱贻霖,谢舒平,等. 灰毡毛忍冬内参基因筛选和 Mads-box 家族基因 AGL15 的时空表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2727-2733.
- [15] 彭美晨,徐玉琴,王珊,等. 灰毡毛忍冬

- Lm-XL-AP1 基因克隆、生物信息学和时空表达分析 [J]. 中草药, 2018, 8(7): 1652-1660.
- [16] 杨银菊, 陈爱国, 刘光亮, 等. 烟草绿原酸生物合成途径关键酶基因的研究进展 [J]. 现代农业科技, 2018(13): 5-8.
- [17] 李隆云, 张 应, 马 鹏, 等. 山银花 (灰毡毛忍冬) 适宜采收期研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3060-3064.
- [18] 吴飞燕, 卿志星, 曾建国. HPLC 测定灰毡毛忍冬不同部位中绿原酸和木犀草苷的含量 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(8): 614-617.
- [19] Howles P A, Dixon R A. Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112(4): 1617-1624.
- [20] Chang J L, Luo J, He G Y. Regulation of polyphenols accumulation by combined overexpression/silencing key enzymes of phenylpropanoid pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, 41(2): 123-130.
- [21] 周日宝, 童巧珍. 灰毡毛忍冬与正品金银花的绿原酸含量比较 [J]. 中药材, 2003, 26(6): 399-400.
- [22] 张 猛, 姚本玉, 汪先锋, 等. 灰毡毛忍冬产业现状及发展对策 [J]. 现代农业科技, 2014(16): 97-99.
- [23] 魏 颖, 李朋收, 时晓娟, 等. 金银花与山银花鉴别方法研究进展 [J]. 中医药导报, 2015, 21(16): 91-95.