

· 药材与资源 ·

膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析

吴松权¹, 祖元刚², 管清杰², 吴基日¹

(1. 延边大学农学院 园艺系, 吉林 龙井 133400; 2. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 对膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因进行克隆及序列分析。方法 应用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增法, 以膜荚黄芪根总 RNA 为模板克隆 PAL 基因。结果 所克隆的膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因命名为 *AmPAL*, Genbank 登录号为 EF567076。序列分析表明, *AmPAL* 全长为 2 650 bp, 含有一个完整的 2 154 bp 开放读码框。*AmPAL* 是植物苯丙氨酸解氨酶家族的一个新成员, 推测其编码 718 个氨基酸的多肽, 相对分子质量为 7.805×10^4 , 等电点为 5.96, 与豆科植物已知的 PAL 氨基酸序列的同源并且相似性都大于 80%。结论 首次成功地从膜荚黄芪中克隆出了 PAL 基因, 为有效利用该基因调控药用植物苯丙烷代谢途径奠定了基础。

关键词:膜荚黄芪; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0456-05

Cloning and sequence analysis of a novel phenylalanine ammonia-lyase gene from *Astragalus membranaceus*

WU Song-quan¹, ZU Yuan-gang², GUAN Qing-jie², WU Ji-ri¹

(1. Department of Horticulture, Agricultural College of Yanbian University, Longjing 133400, China;

2. Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract : Objective To clone and sequence the cDNA encoding phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene from *Astragalus membranaceus*. **Methods** RT-PCR and RACE Techniques were used to clone a phenylalanine ammonia-lyase gene from *A. membranaceus* roots with the total RNA as the template. **Results** The cloned gene named as *AmPAL* and the Genbank registry number is EF567076. Sequence analysis showed that the full-length of *AmPAL* cDNA was 2 650 bp, including a 2 154 bp open reading frame (ORF). *AmPAL* was a new member of PAL family that consisted of 718 amino acids with predicted molecular weight of 7.805×10^4 and isoelectric point (PI) of 5.96. At the same time, *AmPAL* had the homology with PAL of known leguminous plants and shared above 80% identity of amino acid sequences. **Conclusion** It is the first report that a novel PAL gene is cloned from *A. membranaceus*. This work lays a foundation for regulating phenylpropanoid pathway of medical plant with *AmPAL*.

Key words : *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning

Koukol 和 Conn(1961)首次从绿色植物中发现了苯丙氨酸解氨酶,并进行了纯化^[1]。苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC 4.3.1.5) 是连接初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶,是苯丙氨酸代谢途径的关键酶、限速酶。它催化 L-苯丙氨酸生成反式肉桂酸,从而进入苯丙烷类代谢的途径,生成香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物,这些酸可以进一步转化

为香豆素、绿原酸,也可以形成 CoA 脂,再进一步转化为类黄酮、木质素等次生代谢产物(图 1)^[2,3]。

黄芪来源豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 或蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 干燥根,为传统的补气药,具有补气固表、利尿排脓、敛疮生肌的功效。黄芪化学成分主要含有皂苷类、类黄酮、多糖类等^[4~6]。本实验根据

收稿日期:2009-05-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30860036)

作者简介:吴松权(1972—),男,吉林龙井人,副教授,从事植物基因工程研究。

Tel:13944705260 (0433)3263389 Fax:(0433)3263483 E-mail:arswsq@ybu.edu.cn

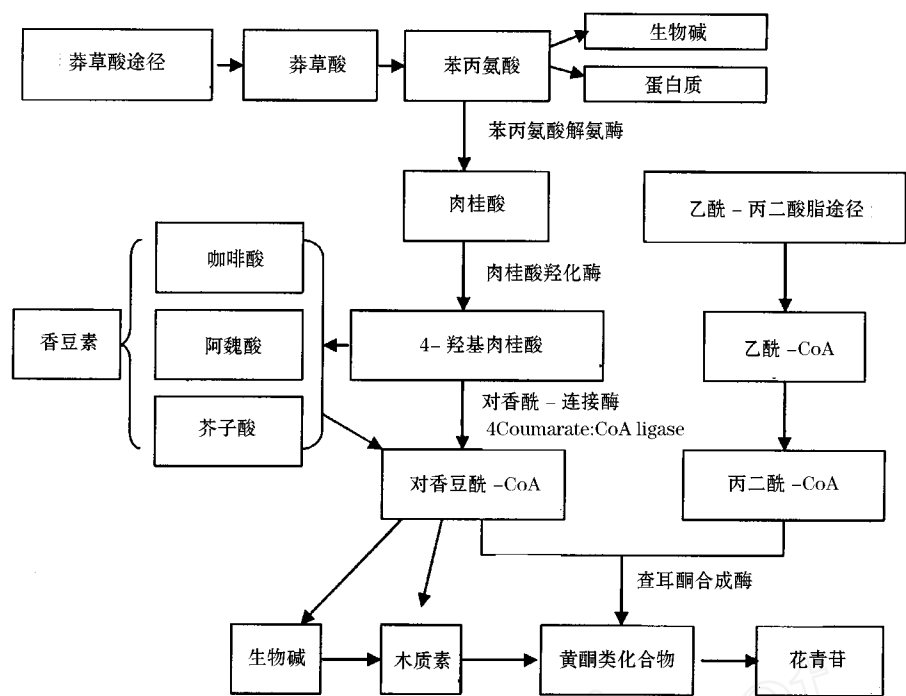


图 1 植物体内苯丙烷合成代谢的一般途径^[3]

Fig 1 General pathway of phenylpropane synthesis and metabolism in plant^[3]

已知的 PAL 的氨基酸序列进行同源序列比对,根据其保守序列设计出简并引物,应用 RT-PCR 和 RACE 技术从膜荚黄芪中克隆 PAL 基因全长并进行序列分析。这对从分子水平上探讨黄芪苯丙烷类次生代谢途径具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料:膜荚黄芪种子采自延边大学农学院中草药圃地。播种于花盆中,置于温度为 25℃、光照为 3 000 lx、光/暗为 16/8 h、湿度 60 % 的培养室中培养 30 d 后,取幼苗的根。

1.2 试剂:TRIzol 购自 Gibco BRL 公司,反转录试剂盒购于 TOYOBO,5'和 3'RACE 试剂盒、各种限制性内切酶、胶回收试剂盒、PMD18-T 载体购自宝生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 的提取:参照 TRIzol 说明书操作。

1.3.2 引物设计与合成:利用生物信息学资源在 NCBI 上寻找所有豆科植物的 PAL 蛋白序列,利用 DNASTar 软件进行多序列比对确定其共有的保守区,设计了一对简并引物 AmPALu 和 AmPALd;根据 RT-PCR 获得的膜荚黄芪 PAL 基因片段,设计 3'RACE 上游特异性引物 AmPALu3',5'末端 P 标记引物 AmPALp5',5'端两对特异引物 AmPAL-S1、AmPAL-A1 和 AmPAL-S2、AmPAL-A2,其碱基序列如表 1 所示。

表 1 引物设计

Table 1 Design of primers

引物	碱基序列
AmPALu	5'-CA(C/T)(T/C)/T(T/G)GA(T/C)GAGGTGAA(G/A)CG-3'
AmPALd	5'-TC(G/A)CA(G/A)AA(C/T)CT(A/T)GA(A/T)GG(A/G)TG-3'
AmPALu3'	5'-GGGTGTCAATGGCGAACTCC-3'
AmPALp5'	5'-CAGTCACTACTAGC-3'
AmPAL-S1	5'-GACTCTTACCAATTGCTCAGG-3'
AmPAL-A1	5'-ATCTTAACCACCGGATTGCG-3'
AmPAL-S2	5'-TAAGGTGGAGTTGTCGGAA-3'
AmPAL-A2	5'-CCATCCGCTTCACCTCATCG-3'

1.3.3 RT-PCR 合成保守区 cDNA:参照 TOYOBO 公司 ReverTra Dash™ 反转录试剂盒的说明书,以提取的膜荚黄芪总 RNA 为模板,用 ReverTra Ace 进行逆转录反应合成 cDNA 第 1 链,之后用简并引物 AmPALu、AmPALd 进行 PCR。反应条件:预变性 94℃、2 min,变性 94℃、30 s,退火 60℃、30 s,延伸 72℃、2 min。30 个循环结束后 72℃ 延伸 10 min,取 PCR 产物在 1 % 琼脂糖凝胶上电泳。

1.3.4 3'RACE 扩增:参照 TaKaRa 公司 3'Full RACE 试剂盒的说明书。使用 AMV 反转录酶由 RNA 反转录成 cDNA,然后用 3'RACE 上游特异性引物 AmPALu3'和 3 sites Adapter 引物(5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCC-3')进行 PCR。

反应条件:预变性 94 ℃、2 min,变性 94 ℃、30 s,退火 58 ℃、30 s,延伸 72 ℃、1 min。30 个循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min,取 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。

1.3.5 5' RACE 扩增:参照 TaKaRa 公司 5' Full RACE 试剂盒的说明书。以总 RNA 为模板,使用 *AmpALp5* 引物进行反转录反应,合成第 1 链 cDNA,使用 RNase H 分解 Hybrrid DNA-RNA 中的 RNA 链;使用 T4 RNA Ligase 使单链 cDNA 进行环化或形成首尾连接物;然后进行巢式 PCR。第一轮 PCR 用 5' 端特异引物 *AmpAL-S1* 和 *AmpAL-A1*。反应条件:预变性 94 ℃、2 min,变性 94 ℃、30 s,退火 55 ℃、30 s,延伸 72 ℃、1 min。30 个循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min。第二轮 PCR 用 *AmpAL-S2* 和 *AmpAL-A2*,以稀释 10 倍的第一轮 PCR 产物为模板。反应条件:预变性 94 ℃、2 min,变性 94 ℃、30 s,退火 56 ℃、30 s,延伸 72 ℃、1 min。30 个循环结束后 72 ℃ 延伸 10 min,取 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳。

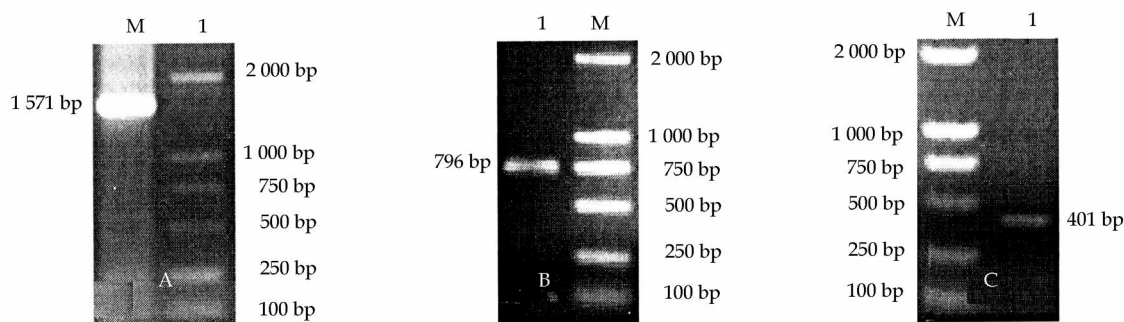
1.3.6 克隆与测序:PCR 产物从胶上回收后,克隆入 pMD 18-T 载体,构建重组质粒,操作方法按 pMD 18-T 载体重组操作说明书(宝生物工程(中国)有限公司提供)进行。将重组质粒转化感受态 *E. coli* JM109,通过蓝白斑筛选、用限制性内切酶 *Bam*

HI/Sal 双酶切电泳筛选重组子,鉴定为阳性克隆的菌株,送至上海英俊生物公司进行测序。

1.3.7 序列分析:将所测定定的序列结果通过 DNAStar 软件寻找最大开放阅读框(ORF)并翻译成氨基酸序列、预测蛋白质相对分子质量和等电点,通过 National Center for Biotechnology Information(NCBI)protein blast 程序进行同源性检索,通过 Mega 3.1 分析软件与其他植物的 PAL 氨基酸序列进行多重比较。

2 结果与分析

根据豆科植物 PAL 的保守区序列设计简并引物 *AmpALu* 和 *AmpALd*,以总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,PCR 产物获得一个约 1 600 bp 大小的预期片段,DNA 序列测定表明产物大小为 1 571 bp(图 2-A),命名为 *AmpAL-RT*。根据此保守区 cDNA 设计了 3' RACE 和 5' RACE 特异引物(见 1.3.2 引物设计与合成)。采用 3' RACE 上游特异性引物 *AmpALu3* 和 3 sites Adapter 引物扩增得到了一个 796 bp 大小的 cDNA 片段,序列测定结果表明其为 *AmpAL* 的 3' 端上游编码序列(图 2-B),命名为 *AmpAL-3'*。采用 5' RACE 两队特异引物巢式 PCR 得到了一个 401 bp 大小的 cDNA 片段,序列测定结果表明其为 *AmpAL* 的 5' 端上游编码序列(图 2-C),命名为 *AmpAL-5'*。



A-RT-PCR B-3' RACE C-5' RACE 1-PCR 产物 M-DL 2000 相对分子质量标准

A-RT-PCR B-3' RACE C-5' RACE 1-PCR products M-DL 2000 Marker

图 2 膜荚黄芪 PAL 基因 PCR 扩增结果

Fig 2 PCR Products of *A. membranaceus* PAL gene

依据 *AmpAL-RT*、*AmpAL-3'* 和 *AmpAL-5'* 的核苷酸序列,通过拼接获得了膜荚黄芪 PAL 基因的全长 cDNA 序列命名为 *AmpAL*,NCBI 登陆号为 EF567076。利用 DNAStar 软件对获得的 *AmpAL* 全长 cDNA 进行序列分析(图 3),图中方框部分为起始密码子和终止密码子。*AmpAL* cDNA 全长 2 650 bp,包括 2 154 bp 的 ORF,199 bp 的 5' 非转译区(5' UTR),283 bp 的 3' 非转译区(3' UTR)和 14

bp 的 polyA 尾。推测其编码 718 个氨基酸,相对分子质量(M_v)为 7.805×10^4 ,等电点(PI)值为 5.96。

登录 NCBI 主页,使用 Blast 同源性检索并进行核苷酸比对显示 *AmpAL* 与一些豆科植物序列高度同源,如与红三叶 *Trifolium pratense* L.、百脉根 *Lotus corniculatus* L. var. *japonicus* Reg. 和豌豆 *Pisum sativum* L. 的相似性分别为 88%、84% 和 83%,特别是与同属于黄芪属的膜荚黄芪的变种蒙

古黄芪相似性最高为 96 %;氨基酸比对也显示 *AmPAL* 与豆科植物 *PAL* 同源,与豌豆、大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 和苜蓿 *Medicago sativa* L. 相似性分别为 91.7 %、88.8 %和 79.7 %,特别是与同属于黄芪属的膜荚黄芪的变种蒙古黄芪相似性最

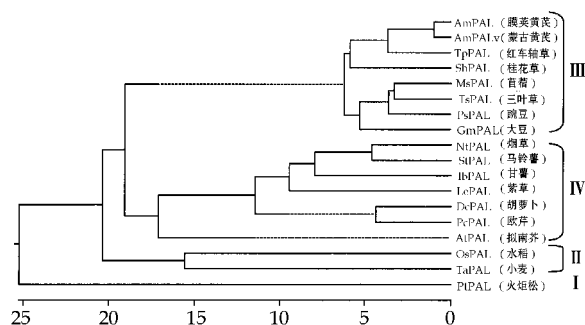
高(98.1 %)。同时在推测的 *AmPAL* 第 204、205 和 206 个氨基酸位置上有丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸残基,它们被认为是各物种 *PAL* 蛋白中高度保守的氨基酸基序(Motif)^[7],说明 *AmPAL* 是 *PAL* 基因家族中的新成员。

```
GCAACTCAGCACCGTCTGGCCAAGACCAACCCACATTGTCATTATTTACACCACAAAAAGCTCAACTGG
GGTGTAGCAGCAGAGGCGCTGAAGGGGAGTCATTTGGATcAGGTGAAGCGGATtACAATTTACACAGA
ATTCATTAGAGAGGAGAAATTAATATCAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCC[ATG]GAGGGA
GAAGGAGCCAATGGACACGTGTCAAACCACGTTACCGAAGCCGAATATTGCATCAGCAAAGCCGGTGG
TGATCCACTCAACTGGGGTGTAGCAGCGGAGGCGCTGAAGGGGAGTCATTTGGATGAGGTGAAGCGGA
TGGTGGAGGAGTACCGCAATCCGGTGGTTAAGATCGGTGGTGAGACTCTTACCATTGCTCAGGTGGCTG
GAATTGCCTCCCATGACGGAGGTGTTAAGGTGGAGTTGTCGGAATCGGCGAGGGCTGGCGTTAAGGCTA
GTAGTGACTGGGTGATGAATAGCATGAACAATGGCACTGATAGCTATGGTGTACCACCGGTTTCGGTGC
TACTTCCCATCGTAGAACCAAACAGGGCGGTGCC'TTGCAGAAAGAGTTAATTAGGTTTTTGAATGCTGG
AATATTTGGCAATGGTACTGAATCCAATTGTACACTGCCACACACAGCAACTAGAGCTGCCATGCTAGTG
AGAATCAACACACTTCTTCAAGGGTACTCTGGTATTAGATTTGAAATCCTAGAAGCCATCACTAAGCTTC
TAAACAACAACATCACCCCATGTTTGCCTCTTCGTGGAACAATCACAGCTTCTGGTGATCTTGTTCCTCCT
TTCTTACATTGCCGGTTTGCTAACTGGCCGACCTAACTCCAAAGCTGTTGGACCCTCTGGAGAGATTCTC
AATGCCAAAGAAGCTTTTCAGTTGGCTAACATTGGTTCTGAGTTCTTTGAATTGCAACCCAAAGAAGGT
CTTGCACTTGTTAATGGAAGTCCGTTGGTTCTGGCTTAGCTTCAATTGTTCTCTTTGAAGCAAACGTGTT
AGCCGTTTTGGCTGAAGTTATGTCAGCAATTTTTGCTGAAGTCATGCAAGGGAAACCTGAATTCACCGAT
CATTTGACACATAAGCAAAAACATCACCTGGTCAAATTGAAGCCGCTGCTATCATGGAACATATTTTGG
ATGGAAGCTCTTATGTTTAGCAGCTAAAAAGTTGCACGATGTAGATCCTTTGCAAAAACCTAAACAAGA
TCGCTATGCACCTAGAACTTCACCACAATGGCTTGGTCTTTGATTGAAGTTATTAGATTTTCAACCAAGT
CAATTGAGAGAGAGATTAACTCGGTGAACGACAACCCCTTGATTGATGTTTCAAGGAACAAGGCTTTAC
ATGGTGGTAACTTTCAAGGAAGTCCCATTTGGAGTTTCAATGGATAATACACGTTTAGCTCTTGCTTCAATT
GGTAAACTTATGTTTGCTCAATTCTCTGAACCTTGCAATGATTTTTACAACAATGGGTTGCCATCAAATCT
CTCTGGCAGTAGGAATCCCAGCTTGGATTATGGTTTCAAGGGAGCTGAAATTGCCATGGCATCTTATTGC
TCTGAGTTACAATATCTTGCTAACCCCTGTGACCACCATGTCCAAAGTGCTGAGCAGCATAACCAAGATG
TGAACCTCACTGGGATTGATTTCTTCTAGAAAAACAAGTGAGTCTATTGAGATCCTGAAGCTCATGTCCTC
CACTTTCTTGTTGCACTTTGCCAAGCAATTGACTTGAGGCATTGGAAGAGAATTGAAGAACACCGT
GAAGAACACTGTAAGCCAAGTTGCCAAGAGGACACTCACACGGGTGTCAATGGCGAAGTCCACCCTT
CTAGATTTTGTGAGAAGGATTTGCCCAAAGTTGTTGATAGGGAGTATGTATTTGCCTACATTGATGACCCT
TGCTTGCTACATACCCAATGATGCAAAATTTGAGGCAAGTGCTTGTGGACCATGCATTAGCAAATGCAG
AAGCAGAGAAGAAGTGAACACATCAATTTTTCAAAGATTGCAACATTGAGGATGAGTTGAAGGCTC
TCTTGCCAAAGGAGGTTGAAAATACAAGGGTTGCATATGAAAATGGCCAATGGGCAATCCCTAACAAGA
TTAAGGAATGCAGGTCCTATCCATTGTACAAGTTTGTTAGAGGAGAGTTGGGGACAGAGTTGCTAACTG
GAGAAAAGGTAATCTCACCAGGTGAGGAGTTTGACAACTTTTACAGCAATGTGCCAGGGTAAAATTA
TTGATCCTCTTTTGAATGTCTCGGCGAATGGAATGGTGCTCCTCTTCCAATTTCT[TAG]CTCGGCGAATGG
AATGGTGCTCCCCTTCCAATTTCTTAGGTCCATCTCTTCTTTGGCAACAAGGGGTTTCATTCTACATCTG
TGTTTGTATCGACAAGAAATTTGGTTTGTCAATTAAGTGTGGCAAATCGAACTTAGAAAGTTTTCATTGAT
GTTAAGGAAGTTTAAATGTTTTATTGTAATAGAATTCATTTGTTTGTGATAACTTTGGGTGCAAATATGA
TACATGATCTTCAATGTAAATGATGTTTTTCATGAATAAAACTTATTAGATTTCAAAAAAAAAAAAAA
```

图 3 膜荚黄芪 *PAL* 基因的全长 cDNA 序列

Fig 3 Full cDNA sequence of *A. membranaceus* *PAL* gene

为研究 *AmPAL* 和其他植物 *PAL* 之间的进化关系,以氨基酸序列作为分析对象,利用 DNAStar 软件构建了 *PAL* 分子进化树(图 4)。从进化树中可知植物之间的进化关系,裸子植物(火炬松)单独聚为一类(),而所有被子植物聚合成另一大类(、 、),其中按照物种亲缘关系的远近又分为 3 大类:禾本科植物聚为第 2 类();豆科植物聚为第 3 类();被子植物其他科聚为第 4 类();并且双子叶植物(、)的遗传距离小于单子叶植物();该结果与传统的分类结果一致。



PAL 的 GenBank 登录号为: *AmPAL* (ABQ63094), *AmPALv* (P27991), *TpPAL* (BAE71252.1), *ShPAL* (P45732), *MsPAL* (X58180), *TsPAL* (P45734), *PsPAL* (BAA00885.1), *GmPAL* (CAA37129.1), *NtPAL* (P25872), *StPAL* (P31425), *IbPAL* (P14166), *LePAL* (Q49835), *DcPAL* (O23865), *PcPAL* (P45729), *AtPAL* (AAC18870), *OsPAL* (P14717), *TaPAL* (Q43210), *PtPAL* (P52777)

PAL GenBank accession numbers are: *mPAL* (ABQ63094), *AmPALv* (P27991), *TpPAL* (BAE71252.1), *ShPAL* (P45732), *MsPAL* (X58180), *TsPAL* (P45734), *PsPAL* (BAA00885.1), *GmPAL* (CAA37129.1), *NtPAL* (P25872), *StPAL* (P31425), *IbPAL* (P14166), *LePAL* (Q49835), *DcPAL* (O23865), *PcPAL* (P45729), *AtPAL* (AAC18870), *OsPAL* (P14717), *TaPAL* (Q43210), *PtPAL* (P52777)

图 4 植物 *PAL* 的分子进化树

Fig 4 Molecular phylogenetic tree of plant *PAL*

3 讨论

本研究中使用的植物材料没有经过任何诱导处

理,所提取总 RNA 中 mRNA 的量足够满足克隆 *AmPAL* 基因的需要,表明 *PAL* 基因在膜荚黄芪中是以结构基因的形式存在的,因此,支持 Hahlbrock 等^[8]关于 *PAL* 基因作为结构基因在植物的不同发展阶段活性会有所变化的观点。

近年来转 *PAL* 基因研究表明,转 *PAL* 基因植物,*PAL* 活性明显增加,并且 *PAL* 活性的增加与次生代谢产物的富集呈显著的正相关^[9,10]。通过本研究克隆了膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因并进行了序列分析,这对开展黄芪次生代谢基因工程研究,利用遗传转化技术提高黄芪特定次生代谢产物量从而改良黄芪品质具有重要意义(此项工作正在进行中)。

参考文献:

- [1] Koukol J, Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. Purification and properties of the *L*-phenylalanine deaminase of *Herdeum vulgare* [J]. *J Biol Chem*, 1961, 236(10): 2692-2698.
- [2] Yu O, Jung W, Shi J, et al. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124:781-793.
- [3] 程水源,陈昆松,刘卫红,等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望[J]. 果树学报, 2003, 20(6): 351-357.
- [4] 张庚芝,吴晓俊,刘 涤,等. 影响黄芪有效成分含量的因子的研究[J]. 中草药, 2002, 33(4): 314-315.
- [5] 赵 文,任永凤,樊建航. 伊犁黄芪与蒙古黄芪成分的比较及多糖含量的测定[J]. 中草药, 2001, 32(2): 122-124.
- [6] 马晓丰,田晓明,陈英杰,等. 蒙古黄芪中黄酮类成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(9): 1293-1296.
- [7] Xue Z, McCluskey M, Cantera K. Identification, characterization and functional expression of a tyrosine ammonia-lyase and its mutants from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2007, 34: 599-604.
- [8] Hahlbrock K, Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, 40: 350.
- [9] Liu R R, Xu S H, Li J L, et al. Expression profile of a *PAL* gene from *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and its crucial role in flux into flavonoid biosynthesis [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25(7): 705-710.
- [10] Gail L, Shadlea S, Wesley V, et al. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of *L*-phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(1): 153-161.