

黑三棱苯丙氨酸解氨酶基因克隆与序列分析

高 杰, 谷 巍*, 周娟娟, 吴启南, 巢建国

南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘 要: 目的 对连接黑三棱初生代谢及次生代谢途径的关键酶苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia lyase, PAL), 进行基因全长的克隆和生物学信息分析。方法 以黑三棱总 RNA 为模板, 采用同源克隆法和 RACE 技术克隆黑三棱 PAL 基因的 cDNA 全长, 并通过 DNAMAN 软件和 ExPASy 在线分析等方法对其生物信息学进行分析。结果 获得黑三棱 PAL 基因全长 cDNA, GenBank 注册号为 KF633470, 序列分析表明, 所克隆的 cDNA 全长为 2 413 bp, 包含一个 2 151 bp 的开放阅读框架, 编码 716 个氨基酸的蛋白。预测该蛋白的相对分子质量为 1.98×10^5 , 等电点为 4.84, 无信号肽, 含有 PAL 酶活性中心序列 GTITASGDLVPLSYIAG。结论 首次克隆并获得黑三棱 PAL 基因全长 cDNA, 为黑三棱药效成分生源合成途径的阐明和改善中药材品质提供科学依据。

关键词: 黑三棱; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 信号肽; 生物信息学分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)03-0-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.

Gene cloning of and sequence analysis of phenylalanine ammonia lyase in *Sparganium stoloniferum*

GAO Jie, GU Wei, ZHOU Juan-juan, WU Qi-nan, CHAO Jian-guo

College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA encoding phenylalanine ammonia lyase (PAL), which is the key enzyme that links primary metabolism to secondary metabolism in *Sparganium stoloniferum* and to perform bioinformatic analysis. **Methods** With the total RNA as template, the full length cDNA of PAL in *S. stoloniferum* was cloned through homology-based cloning approach and rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. The bioinformatics of the cloning PAL gene was analyzed by DNAMAN and ExPASy. **Results** The full-length cDNA (2 413 bp) of PAL gene was obtained (GenBank accession number KF633470), with an open reading frame (ORF) of 2 151 bp and encoding 716 amino acid polypeptides. The relative molecular mass of PAL calculated was 1.98×10^5 , the isoelectric point was 4.84, and there was no signal peptide in PAL. The protein sequence contained the active center sequence GTITASGDLVPLSYIAG. **Conclusion** The cDNA encoding PAL from *S. stoloniferum* is cloned and reported for the first time. This work provides a scientific basis for exploring the biosynthetic pathway of the medicinal ingredient and improving its quality in *S. stoloniferum*. **Key words:** *Sparganium stoloniferum* (Graebn.) Buch.-Ham.ex Juz.; phenylalanine ammonia lyase; gene cloning; bioinformatics analysis

三棱 *Sparganii Rhizoma* 为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* (Graebn.) Buch.-Ham.ex Juz. 削去外皮的干燥块茎。味苦、性平, 入肝、脾经, 具有破血行气, 消积止痛的功效。现代研究表明, 还具有抗肿瘤、镇痛、抗凝血等功效^[1]。三棱中主要含黄酮类、苯丙素类、生物碱类等有效成分^[1-2], 这

些成分在植物体中通过苯丙烷代谢进入莽草酸、乙酸-丙二酸等复合途径合成^[3-5], 关键酶在其生物合成途径中起至关重要的调节作用。

苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia lyase, PAL) 是苯丙烷代谢首步反应的关键酶, 也是连接初生代谢与次生代谢产物的连接酶, 由此途径进入

收稿日期: 2013-10-16

基金项目: 国家自然科学基金 (81073002); 江苏省“青蓝工程” (2012); 江苏省中药学优势学科开放课题 (2011ZYX1-006)

作者简介: 高 杰 (1987—), 男, 安徽桐城人, 研究生, 研究方向为分子生药学、药用植物生理生态学。

Tel: 15850587593 E-mail: gaojie0665@163.com

*通信作者 谷 巍 E-mail: guwei9926@126.com

可以生成阿魏酸、香豆酸等中间产物,进一步代谢为香豆素和绿原酸,进而生成苯丙素类和黄酮类等有效成分,近年来 PAL 酶已成为研究热点^[6-8]。随着生物合成关键酶基因的克隆,生物工程已成为提高药效成分产量的有效途径,本研究首次克隆黑三棱苯丙氨酸解氨酶基因的全长,将为进一步研究该酶在植物体内基因的调控与表达提供理论依据,并为利用基因工程改善中药材品质奠定基础。

1 材料

黑三棱采自南京中山植物园,经南京中医药大学中药资源教研室谷巍教授鉴定为黑三棱科植物黑三棱 *S. stoloniferum* Buch. -Ham.。取新鲜叶片分装于冻存管中,于液氮中保存备用。

2 方法

2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

按照 Tiangen 公司总 RNA 提取试剂盒(批号:DP419)操作步骤提取黑三棱叶片总 RNA,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,于 G: BOX 凝胶成像系统观察拍照,并用 Eppendorf 核酸分析仪检测 RNA 纯度和浓度;按照 Invitrogen 公司反转录试剂盒(批号:C28025021)合成 cDNA。

2.2 PAL 基因保守区克隆

从 GenBank 下载 PAL 的同源基因序列,运用引物设计软件 Primer 5.0 设计简并引物。引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。上游引物 5'-CCBGARTTYACHGAYCAYYTGAC-3';下游引物 5'-GCCATNRCDATYTC DGMNCCYTT-3',以反转录后 cDNA 为模板进行保守区片段的 PCR 扩增,25 μ L 反应体系:10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L,25 mmol/L dNTP 1.0 μ L,10 mmol/L 引物各 1.0 μ L,cDNA 模板 2.0 μ L,5U rTaq 酶 1.0 μ L,ddH₂O 15.0 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将以上获得的 PCR 扩增产物经 1.2% 琼脂糖电泳后,用 DNA 胶回收试剂盒纯化回收。连入 pUC19-T 载体(上海生工生物工程有限公司),用大肠杆菌菌株 DH5 α 进行质粒转化,并进行蓝白斑筛选,挑取白斑质粒,提取质粒 DNA 进行酶切鉴定,获得带有目的 PCR 产物的阳性克隆质粒进行测序,测序由上海生工生物工程有限公司完成。

2.3 5'RACE 和 3'RACE 的扩增

根据 PAL 基因保守区片段的测序结果,在序列

内部设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性引物 GSP1: 5'-TGCTTTGGCTTCTGGAGTGCGTCAACTTCGTGC-3'; GSP2: 5'-GCACGAAGTTGACGCACTCCAGAAGCCAAAGCA-3',引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。利用 Clontech 公司 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒扩增该基因的 cDNA 5'端和 3'端。5'RACE 以 5'RACE-ready first-strand cDNA 为模板,按照 BD Advantage2 PCR kit 操作,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,5 个循环;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,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,12 $^{\circ}$ C 终止反应。3'RACE 以 3'RACE-ready first-strand cDNA 为模板,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,69 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min;12 $^{\circ}$ C 终止反应。PCR 产物克隆及测序等过程同上。

2.4 PAL 基因全长 cDNA 克隆

用 DNAMAN 对 5'RACE 和 3'RACE 所得序列进行拼接得到 cDNA 全长,设计 PAL 基因全长 cDNA 扩增引物:上游引物 5'-ACATGGGGAGGAA-AATTTTACATT-3';下游引物 5'-GTAAAGAACA-ACAAGATACAACATATATTG-3',引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。以 5'RACE-ready first-strand cDNA 为模板,按照 BD Advantage2 PCR kit 操作,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min,12 $^{\circ}$ C 终止反应。PCR 产物克隆及测序等过程同上。

2.5 生物信息学分析

将测序的结果通过 DNAMAN 软件翻译成氨基酸序列,并通过 NCBI 中 BLAST 功能搜索下载同源性高的其他植物 PAL 氨基酸序列,用 Clustal1.83 分析软件进行比较,根据同源比对结果,选择 18 种植物的 PAL 氨基酸序列用 MEGA 5.0 的邻位相联法^[9-10]构建进化树并分析。

PAL cDNA 的开放阅读框(ORF)查找与相应的氨基酸序列翻译使用 ORF Fider,相对分子质量与理论等电点(pI)预测采用 ExPASy 在线服务器的 Compute Pi/Mw 工具,二级结构预测使用 Dublin 大学的 PORTER 服务器,三级结构预测使用 SWISS-MODEL 服务器,结构功能域分析采用 Sanger-Pfam 和 ExPASy^[10-12]在线服务器的 PROSITE-Scanprosite^[12-13]。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 检测结果

黑三棱总 RNA 的 1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果见 (图 1-A), 条带清晰完整, 28 S RNA 条带的亮度约

为 18 S RNA 条带的 2 倍, Eppendorf 蛋白核酸分析仪检测结果显示, 总 RNA A_{260}/A_{280} 为 1.93, 为典型的 RNA 吸收值, 表明提取的总 RNA 质量较好, 可用于后续实验。

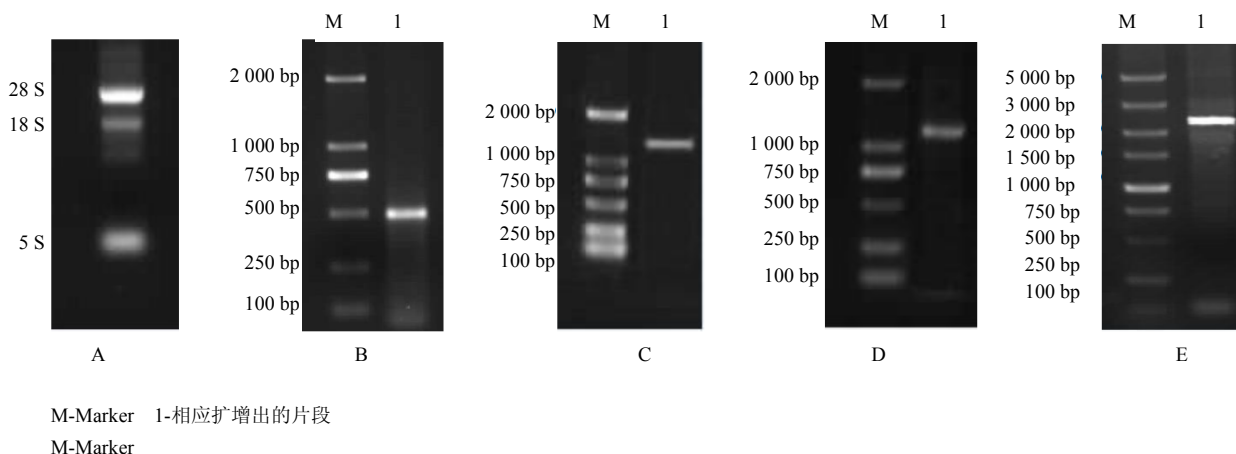


图 1 黑三棱总 RNA (A), PAL 基因保守区片段 (B), 5'RACE (C), 3'RACE (D) 和全长 (E) 凝胶电泳图
Fig. 1 Electropherograms of total RNA (A), conservation fragment (B), 5'RACE (C), 3'RACE (D), and full-length cDNA (E) in PAL gene of *S. stoloniferum*

3.2 PAL 基因保守区片段扩增结果

以黑三棱叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 用简并引物扩增得到一条大约 500 bp 的 PAL 基因的特异片段, 符合引物设计推断的片段大小 (图 1-B)。PCR 片段纯化、克隆, 经测序后得到其序列, 长度为 473 bp。

3.3 RACE 和 PAL 全长 cDNA 序列分析

根据已获得的黑三棱 PAL 基因保守区序列设计特异引物, 通过 RACE-PCR 技术获得 5'端 1 308 bp (图 1-C) 和 3'末端序列为 1 350 bp (图 1-D)。将 5'RACE 和 3'RACE 扩增片段克隆测序结果与已有保守区片段拼接得到全长 cDNA 为 2 413 bp。为了验证全长结果, 根据拼接得到的全长序列设计引物, 以 cDNA 为模板, 扩增黑三棱 PAL 全长序列并测序, 扩增结果见 (图 1-E), 在推断的位置得到单一清晰的条带, 克隆测序结果与拼接结果一致。

3.4 PAL 全长序列生物信息学分析

从得到的黑三棱 PAL 全长 cDNA 序列可以得知: 5'端存在 124 bp 的非翻译区 (UTR), 中间为 2 151 bp 的开放阅读框 (ORF), 该序列编码 716 个氨基酸的蛋白质, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA, 3'端非翻译区 (UTR) 长度为 111 bp, 其中含有 27 bp 的 poly (A) 尾巴。该序列 GenBank 中的登录号为: KF633470。经过 NCBI-Blast 比对,

氨基酸序列与石蒜 *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb、丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge、蓖麻 *Ricinus communis* L. 等药用植物的同源性分别达到 86%、83%、82%。

利用 ExPASy Proteomics Server 在线软件 ProtParam 对 PAL 基因编码蛋白的理化性质进行预测分析。推测 PAL 的分子式为 $C_{7097}H_{11783}N_{2413}O_{2900}S_{664}$, 相对分子质量为 1.98×10^5 , 理论等电点 pI 为 4.84, 为亲水蛋白; 用 TopCons 预测 PAL 跨膜区, 结构显示该蛋白无跨膜区, 为非膜蛋白。在线软件 SignalP 4.0Server 分析结果表明 PAL 无信号肽。通过 Clustalw1.83 序列比对, 并在线工具 Sanger-Pfam 在线对 PAL 氨基酸功能域进行预测, 结果显示 (图 2): 黑三棱 PAL 含有植物 PAL 酶活性中心序列 GTITASGDLVPLSYIAG, 在氨基酸 198~214。Blast 比对显示 (图 3) 黑三棱 PAL 包含保守的脱氨位点 (L-206, V-207, L-256, A-257) 和保守的催化活性位点 (N-260, G-261) 及 HNDQV (486-490)。

PAL 蛋白的二级结构预测结果显示: 该蛋白的二级结构主要由 α -螺旋、无规则卷曲、 β -转角构成。三级结构预测如图 4 所示: 其单体呈“海马”状, 与 PDB 在线软件使用 X 射线晶体衍射对石蒜和欧芹 *Petroselinum crispum* (Mill.) Hill 等的 PAL 空间结构鉴定结果相一致。

1 ACATGGGGAGGAAAATTTTACATTCTCTACTCTCCTCACCAGAAGAGAAAATTTTCTCTAACCCCCCTCCCTTC
 76 CCACCAAAATCACAAAAGGCTCCCTCAGAAAATAATACATTAAGATAAGATGGAGTGCGAGCCGGCCACCGCCAC
 1 GTAAACGGCACCAGCAACGGATCCGCCCGGGCTTCTGCCTTAAGGACCTCTCAACTGGGCAAGGCCCGCGAG
 151 V N G T A N G S A A G F C L K D P L N W A K A A E
 10 GCCCTCTCCGGGAGCCACCTCGACGAGGTGAAGCGCATGGTGGAGGACTACCGTGCGCCGGTGGTCTCCTCGAG
 226 A L S G S H L D E V K R M V E D Y R A P V V L L E
 35 GGCGCTCGCTGAACATCTCGCAGGTGGCGGCGGTGGCGGCGGAGTCGGAGGTGACGGTGGAGCTGTCCGAG
 301 G A S L N I S Q V A A V A A A E S E V T V E L S E
 60 GCGAAGAGGGAGGGGTGAAGGCGAGCAGCATTGGGTGATGGAGAGCATGATGAAGGGGACGGATAGCTATGGA
 376 A K R E G V K A S S D W V M E S M M K G T D S Y G
 85 GTTACTACTGGGTTTGGTGTACTTCTCATAGGAGGACCAAGCAAGGTGGTGTCTTCCAAAAGGAGCTCATTAGA
 451 V T T G F G A T S H R R T K Q G G A L Q K E L I R
 110 TTCCTGAACGCCGAGTATTCGGCTCCGGCCAGAGCCCGGCCACACACTGCCTCCTGCCGCCACACGGCGCGG
 526 F L N A G V F G S G P E P G H T L P P A A T R A E
 135 ATGCTCGTCCGGATCAACACTCTCCTCCAGGGCTACTCCGGCATCCGGCTCGAAATCCTGGAGGCGATCACCAGC
 601 M L V R I N T L L Q G Y S G I R L E I L E A I T S
 160 CTCCTCAACTCCAACGTCACCCCTGCCTCCCCCTCCGCGGCACCATCACCGCTCGGGGACCTTGTCCCGTTG
 676 L L N S N V T P C L P L R G T I T A S G D L V P L
 185 TCCTACATCGCGGATTGCTCACCGGCGCCCAATTCGATCGCTAAACCTCAGACGGCCGGTCCGTTGACGCC
 751 S Y I A G L L T G R P N S I A K T S D G R S V D A
 210 GGCGAGGCGTTCCGCTCGCCGGCATCACCCACGGCTTCTTCGAGCTGCAGCCAAAGGAAGGCTGGCCCTCGTC
 826 G E A F R L A G I T H G F F E L Q P K E G L A L V
 235 AACGGCACCAGCGCTCGGCTCTGGCTCGCTCCATGGTCTTGTGTTGAAACCAACATTCTTGCACTGTAGCAGAG
 901 N G T A V G S G L A S M V L F E T N I L A V L A E
 260 GTTTTATCAGCAATCTTTGCCGAGGTAATGCAGGGGAAACAGAGTTTACAGACCACCTGACCCACAAATTAAG
 976 V L S A I F A E V M Q G K P E F T D H L T H K L K
 285 CACCACCCAGGCCAAATCGAAGCTGCTGCTATAATGGAACACATATTGGAAGGCAGCTCTTACGTCAAAATGGCT
 1051 H H P G Q I E A A A I M E H I L E G S S Y V K M A
 310 AAGAACTGCACGAAGTTGACGCACTCCAGAAGCCAAAGCAAGACCGCTACGCTCTGCGCACTTCACTCAATGG
 1126 K K L H E V D A L Q K P K Q D R Y A L R Q W
 335 CTCGGTCCCCAAATTGAAGTCATCAGAGCATCCACCAATCGATCGAGAGAGAGATCAATTCACTTAACGACAA
 1201 L G P Q I E V I R A S T K S I E R E I N S V N D N
 360 CCAGTATCGATGTCTCGAGGAACAAAGCCCTCCATGGAGGCAATTTCCAAGGGAGGCCAATTGGTGTGTCCATG
 1276 P L I D V S R N K A L H G G N F Q G T P I G V S M
 385 GACAACACCAGACTGGCCATTGCAGCTATTGGCAAGCTAATGTTCCGCCAATTCTCAGAGCTGGTGAATGATTTC
 1351 D N T R L A I A A I G K L M F A Q F S D L F
 410 TACAACAAATGGGCTTCCTTCCAATCTCTCCGGTGGCCGAATCCGAGCTTGGACTACGGCTTCAAAGGCGCAGAG
 1426 Y N N G L P S N L S G G R N P S L D Y G F K G A E
 435 ATCGCCATGGCGTCTGACTGCTCTGAGCTGCAATTCCTCGCCAATCCGGTGACCAACCATGTCCAGAGCGCAGAG
 1501 I A M A S Y C S E L Q F L A N P V T N H V Q S A E
 460 CAGCACAACCCAGGACGTGAATCCCTCGGCTGATCTCTCAAGGAAGACAGCAGAGGCAGTAGACATACTCAAG
 1576 Q H N Q D V N S L G L I S S R K T A E A V D I L K
 485 CTCATGTCTTCGACTTACTTGATAGCTCTATGCCAAGCCATCGATCTCAGGCCTTGGAGGAGAATTGAAGAGC
 1651 L M S S T Y L I A L C Q A I D L R H L E E N L K S
 510 AGTGTCAAGAACACAGTGACCAAGTCGCCAAGAAGGTCTCACCATGGGAGTAAACGGAGAGCTCCACCCTTCC
 1726 S V K N T V T Q V A K K V L T M G V N G E L H P S
 535 AGGTTCTGCGAGAAGGATTGTCAAGATTATAGACCACGAGTACGTCTCAGCTATGTCTGATGACCCGTGCAGC
 1801 R F C E K D L I K I I D H E Y V F S Y V D D P C S
 560 TCCACCTACCCATTGATGCAGAAGCTAAGGCAAGTGCTCGTAGAGCACGCACTCAACAATGGGAGAGGAGAAG
 1876 S T Y P L M Q K L R Q V L V E H A L N N G E K E K
 626 GACGCCAACCTCCATCTTCCAAAAGATTGCAGATTTGCAAGAGGAGTTAAAGACCCAATTGCCGAAGGAAGTG
 1951 D A N T S I F Q K I A D F E E L K T Q L P K E V
 651 GAGGCCACAAGGTTGGCTTTTGAGAATGGAACATCGACGATCGGGAACAGGATCAAGGATTGTAGTCTTATCCT
 2026 E A T R L A F E N G T S T I G N R I K D C R S Y P
 676 ATTTACAGGTTTGTGAGGGAGGAGCTAGGAACAGTTTCTCACTGGCGAGGAGGTGAGATCTCCTGGGGAAGAG
 2101 I Y R F V R E E L G T S F L T G E E V R S P G E E
 701 TTCGACAAGGTCTTTAACGCTAGCAACAGAGGCAAGGTGATCGATCCACTGCTCGAGTGTGTAAGGAGTGGAAT
 2176 F D K V F N A S N R G K V I D P L L E C L K E W N
 726 GGTGTCCACTCCCCATATGTTAAGCAAATGGTGAATAAAAACTTTATATGATATTTAGAATTTGTGATGTATAA
 2251 G A P L P I C *
 751 CCTGCGATTCTAAGCAGGATAAGTGAAATCAATATATGTTGTATCTTGTGTTCTTTACAAAAA
 2326 AAAAAAAAAA
 2401

图2 PAL 全长序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Full-length cDNA sequence of PAL gene and predicted amino acid sequence

铁皮石斛	--MEHVKGNGYANGAKAMEGLCLKGRDQLGWAAAAKALEGSHLDEVKRMVKEFRSPVVRLEGAELKISQVAAVAAGAA--	75
黑三棱	--MECEPATAHVNGTANGSAAGFCLKDPLNWAKAAEALSGSHLDEVKRMVEDYRAPVVLLEGASLNISQVAAVAAAES--	76
石蒜	-----MAYANGNGNANGFCILDPLNWGAAAEALTGSHLDEVKRMVKDYREAYVKLEGATLKVAQIAAVANDGS--	78
丹参	-----MAAENGHHEESNGFCVKQNDPLNWVAAAEESLKGSHLDEVKRMVEEFRKPVVKLGGETLTISQVAIAAKDN--	71
紫茎泽兰	MENGHNHNGFTNGVNVGVNDPFCIKDPLNWGAAAEALTGSHLDEVKRMVAEFRKPVVKLGGETLTVAQVAGIAAADGGS	80
	* * * * *	
铁皮石斛	STVELAESAR-AAVKASSDWMESMDSGDITYGVTTFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGSGKD--NTLPPAAT	155
黑三棱	EVTVELSEAKREGVKASSDWMESMMKGTDSYGVTTFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGVFGSGPEPGHTLPPAAT	156
石蒜	AVKVELDESARARVKASSDWMESMNKGTDSYGVTTFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFESGHNSNTLPASTT	158
丹参	AVAVELAESSRAGVKASSDWMESMSKGTDSYGVTTFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFNGTESNHTLPHTAT	151
紫茎泽兰	AVKVELSEARAGVAASSDWMESMNKGTDSYGVTTFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFNGTESHTLPHSAT	160
	* * * * *	
铁皮石斛	RAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAITNLLNNKIPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAAILTGRPNVKAITAEGATIDAVE	235
黑三棱	RAAMLVRINTLLQGYSGIRLEILEAITSLNSNTPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNIAKTSDDRSDVAGE	236
石蒜	RAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEIVITRLNNNIPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAITPDGTKIDASE	238
丹参	RAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNENIPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGEPLNAEE	231
紫茎泽兰	RAAMLVRINTLLQGYSGIRFEILEAITKFLNNNIPCLPLRGTITASGGLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGEILNAET	240
	* * * * *	
铁皮石斛	AFRLAGISGGFFELQPKGLALVNGTAVGSGLASTVLFANILSVMAEVL SAVFCEVMQKGPEYDHLTHLKP KHPGQIE	315
黑三棱	AFRLAGITHGFFELQPKGLALVNGTAVGSGGLASMLVFNILAVLAEVL SAIFAEMVQKGPEYDHLTHLKP KHPGQIE	316
石蒜	AFKLAGITDGFQELQPKGLALVNGTAVGSGLASTVLYDNLAVLAEVL SAIFAEMVQKGPEYDHLTHLKP KHPGQIE	318
丹参	AFKLAGVKGFFELQPKGLALVNGTAVGSGGLASIALFDANILAVLSEVMSAVFAEVMNGKPEYDHLTHLKP KHPGQIE	311
紫茎泽兰	AFARAGVEGGFFELQPKGLALVNGTAVGSGMASMLVFEANVALLSEVLP AIFAEMVQKGPEYDHLTHLKP KHPGQME	320
	* * * * *	
铁皮石斛	AAIMEHVLEGSSYMKVAKKHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRAATKSIEREINSVNDNPLIDVSRNIALH	395
黑三棱	AAIMEHILEGSSYMKMAKKLHEVDALQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRASTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALH	396
石蒜	AAIMEHILEGSSYMKMAKKLHEHDLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSATKSIEREISSVNDNPLIDVSRNKALH	398
丹参	AAIMEHILDGSGYVKAQKLHEQDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALH	391
紫茎泽兰	AAAMEYILDGSDYVKAQKVHEMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPQIEVIRSATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALH	400
	* * * * *	
铁皮石斛	GGNFQGTPIGVSMNDTRLIAAIGKLMFAQISELVNDFYNNGLPSNLGGRNP SLDYGFKGAEIAMASYCSELQYLANPV	495
黑三棱	GGNFQGTPIGVSMNDTRLIAAIGKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLGGRNP SLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPV	496
石蒜	GGNFQGTPIGVSMNDTRLIAISIKLMFAQFSELVNDYNNGLPSNLGGRNP SLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPV	498
丹参	GGNFQGTPIGVSMNDNRLIAISIGKLLFAQFSELVNDYNNGLPSNLGGRNP SLDYGFKGSEIAMASYCSELQFLANPV	491
紫茎泽兰	GGNFQGTPIGVSMNDNRLIAAIGELMFAQFSELVNDYNNGLPSNLGGRNP SLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPV	500
	* * * * *	
铁皮石斛	TNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVEILKLMSTSTFLVALCQAIDLRHLEENLKS AVKNTVSQVAKRVL TIGVKGEL	575
黑三棱	TNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSSSTYLIALCQAIDLRHLEENLKSSVKNVT TQVAKKVL TMGVNGEL	576
石蒜	TNHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTEEAVQILKLMSTSTFLVGLCQAIDLRHLEENLKSTVKTTISQVAKRVL TMGAKGEL	578
丹参	TNHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTVEALDILKLMSSSTYLVALCQAVDLRHLEENLKHAVKNTVSQVAKRVL TMGVNGEL	571
紫茎泽兰	TNHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTAEAVEILKLMSSSTYLVALCQSIDL RHLEENLMKSTVKNTVSQVAKKVL TMGASGEL	580
	* * * * *	
铁皮石斛	HPSRFCEKDLIKVIDREYVLAYADDPSCSTYPLMQKLRLVVEHALNNGEKEKEADSSIFQKITAFEEELKAVLPKEVEA	635
黑三棱	HPSRFCEKDLIKVIDHEYVFSYDDPCSTYPLMQKLRLVVEHALNNGEKEKEADNTSIFQKIADFEELKTQLPKEVEA	636
石蒜	HPSRFCEKDLIKVVDREYVFSYIDDPSCSTYPLMQKLRLVVEHALNNGEKEKEADNTSIFQKISAFEEELNVVLPKEVEN	638
丹参	HPSRFCEKDLIRVVDREYVFAYIDDPSCSATYPLMQKLRLVVDHALKNGDLEKNASTSIFQKIEAFEEELKALLPKEVES	631
紫茎泽兰	HPSRFCEKDLIRVVDREYVFAYIDDPCLATYPLMQKLRLVVDHALNAGETEKNLNTSIFQKITTFEDELKAILPKEVEG	640
	* * * * *	
铁皮石斛	TRLAFENGSTIGNRIKDCRSYPIYRFVREELGTSFLTGEVRSPEGEEFDKVFNAICEGKAIDPLLECLQEWDGAPLPIC	713
黑三棱	TRLAFENGSTIGNRIKDCRSYPIYRFVREELGTSFLTGEVRSPEGEEFDKVFNASNRGKVIDPLLECKEWNGAPLPIC	716
石蒜	AWVAYENGTSATKNRIEDCRSYPIYRFVREELGTSFLTGEKVRSPGEEFDKVFNAICKGKLVDPLECLQEDWNGAPLPIC	708
丹参	ARMALESGSPTVANRIAECRSYPLYKFIREQLGAGFLTGEKAVSPGEECEKVFTALSNGLIIDPLLECLQGWNGQPLPIC	711
紫茎泽兰	VRVAFENGTLIPNRIKDCRSYPIYRFVREELAGEYLTGEKVTSPGEEFDKVFAMSNHGIIDPLLECEVGEWNGAPLPIC	720
	* * * * *	

*-一致性氨基酸序列 :-高保守氨基酸序列 •-低保守氨基酸序列

*- identical amino acid sequence :- high-conservative amino acid sequence •- semi-conservative amino acid sequence

图3 黑三棱及其他植物 PAL 氨基酸序列同源性比对

Fig. 3 Comparison of amino-acid sequences of PAL in *S. stoloniferum* and other plants

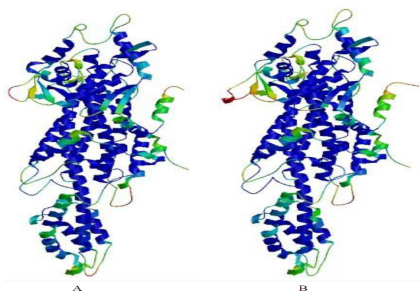


图 4 黑三棱 (A) 与石蒜 (B) PAL 三级结构预测图
Fig. 4 Predicted tertiary structures of PAL protein from *S. stoloniferum* (A) and *Lycoris radiata* (B)

3.5 PAL 氨基酸序列的系统进化分析

在软件 MEGA 5.0 平台上采用 Neighbor-joining 方法,对推测蛋白 PAL 基因编码的氨基酸与 GenBank 记载的 17 种植物 PAL 蛋白之间构建系统进化树,进行聚类分析。结果显示 (图 5): 黑三棱与单子叶植物亲缘关系最近,聚为一类,而双子叶植物距离较远,体现了其在分子系统演化关系中所处的位置,也为植物分类学提供了佐证。

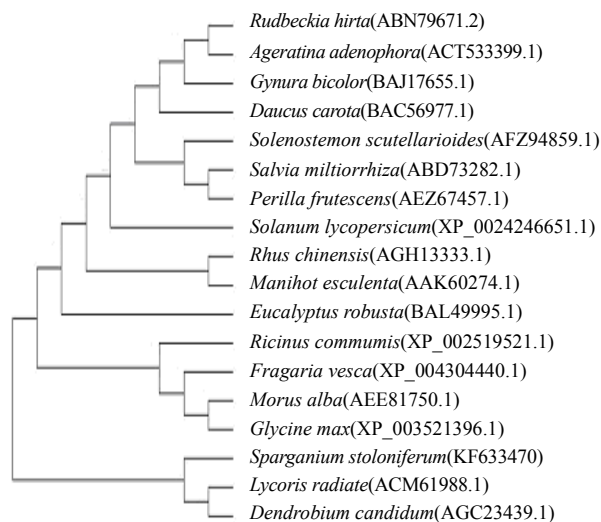


图 5 18 种植物的 PAL 基因氨基酸序列构建出的进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of amino acid sequences of PAL gene from 18 species of plants

4 讨论

PAL 是连接初级代谢和次生代谢,催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶,也是苯丙烷途径的关键酶,在植物生长发育、花色形成、抵御病害和次生代谢产物的积累等过程中起着重要的作用^[14]。

酶的功能与其氨基酸组成及空间结构有关,黑三棱 PAL 基因推导的蛋白序列与其他植物存在一定差异,但其功能域氨基酸组成与其他同源性较高的植物,均具有植物 PAL 的酶活性中心序列 GTITASGDLVPLSYIAG,暗示功能域在分子进化中具有较高的稳定性,这是由于它们在生物代谢中行使同一功能所致^[15]。

对黑三棱 PAL 氨基酸序列的信号肽进行预测,结果显示: PAL 不存在信号肽酶切位点,不具有信号肽,表明 PAL 在细胞质中合成后,不进行蛋白转运,直接在细胞质基质中与代谢底物相作用。

综上所述,本文首次克隆了黑三棱 PAL 基因的全长 cDNA,生物信息学分析结果表明该基因具有 PAL 活性所必需的多肽位点,初步探明 PAL 的全长序列信息。本研究结果为进一步研究 PAL 蛋白功能奠定了基础,同时也为深入探讨药用植物 PAL 酶在苯丙烷类代谢途径中的作用提供参考。

参考文献

- [1] 孙杰, 吴艺舟, 王苟, 等. 不同醋制工艺对三棱有效成分群溶出的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(12): 1593-1598.
- [2] Lee S Y, Choi S U, Lee D U, et al. Two New Chemical Constituents from the Rhizome of *Sparganium stoloniferum* [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(4): 515-521.
- [3] Reichert A I, He X Z, Dixon R A. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*): characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes [J]. BJ Plant, 2009, 424: 233-242.
- [4] 曹福祥, 王猛, 龙绛雪, 等. 马尾松苯丙氨酸解氨酶基因 cDNA 全长克隆与序列分析 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2010, 33(1): 92-95.
- [5] MacDonald J D, Cunha G B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase [J]. Biochem Cell Biol, 2007, 85(3): 273-282.
- [6] Sakamoto S, Fujikawa Y, Tanaka N, et al. Molecular cloning and characterization of L-galactose-1-phosphate phosphatase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2012, 76(6): 1155-1162.
- [7] 徐晓梅, 杨署光. 苯丙氨酸解氨酶研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(31): 15115-15119, 15122.
- [8] 吴松权, 祖元刚, 管清杰, 等. 膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 456-460.

- [9] 殷秀梅, 白志川, 牛云云, 等. 蛇足石杉鲨烯合酶 HsSQS1 基因克隆和序列分析 [J]. 药学报, 2012, 47(8): 1079-1084.
- [10] 周生茂, 王玲平, 向 珣, 等. 山药 PAL 基因全长 cDNA 序列的克隆、表达与分析 [J]. 核农学报, 2008, 22(6): 781-788.
- [11] 谷 巍, 吴启南, 巢建国, 等. 建泽泻法呢基焦磷酸合酶分子克隆、分布表达及生物信息学研究 [J]. 药学报, 2011, 46(3): 605-612.
- [12] Qing J, Yao Y. , Yong P C, *et al.* Molecular Cloning and Sequence Analysis of a Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene from *Dendrobium* [J]. *PLOS one*, 2013, 8(4): e62352.
- [13] Tzi B N, Liu J, Wong J H, *et al.* Review of research on *Dendrobium*, a prized folk medicine [J]. *Applied Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(5): 1795-1803.
- [14] 崔建东, 李 艳, 牟德华. 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2008, (7): 306-308.
- [15] Huang J, Gu M, Lat Z, *et al.* Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environment stress [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(4): 1526-1538.