

• 药材与资源 •

姜黄苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析

刘建福^{1,2}, 钟书淳², 王明元², 唐源江², 范燕萍^{1*}, 陈 钦²

1. 华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642

2. 华侨大学 生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

摘要: 目的 对姜黄 *Curcuma longa* 苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 基因 (*CurPAL*) 全长进行克隆并开展生物信息学分析, 为姜黄次生代谢产物的生物合成机制研究奠定基础。方法 利用 RT-PCR 和 RACE 相结合的方法, 以姜黄叶片 cDNA 为模板, 克隆获得 *CurPAL* 全长, 进行生物信息学分析。结果 克隆的 *CurPAL* (登录号为 KJ780359) 全长 cDNA 为 1 293 bp, 其中包括 5'-UTR 243 bp, 3'-UTR 123 bp, 含有 1 个 927 bp 的完整开放阅读框 (opening reading frame, ORF), 编码 308 个氨基酸; 预测蛋白质相对分子质量为 33 000, 理论等电点 pI 为 5.76; *CurPAL* 蛋白性质稳定, 为可溶性蛋白; *CurPAL* 编码的蛋白质序列包含与夹竹桃 PAL 蛋白质相同的脱氨基位点和催化活性位点, 氨基酸序列多重比较发现, *CurPAL* 编码的氨基酸序列与中国李、浙江红山茶、拟南芥、辣椒、小果野蕉 PAL 氨基酸序列的同源性达到 75% 以上; 与姜目类的植物 (如小果野蕉) 的 PAL 聚为一支, 说明两者亲缘关系较近; 通过蛋白质二维、三维结构的预测, 表明 *CurPAL* 蛋白为全 α 型蛋白, 由同源四聚体构成。结论 首次克隆并获得 *CurPAL* 基因全长 cDNA, 为姜黄素生物合成途径的阐明和改善中药材品质提供科学依据。

关键词: 姜黄; *CurPAL*; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 序列分析; RT-PCR; RACE

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)21-3141-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.019

Cloning and sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Curcuma longa*LIU Jian-fu^{1,2}, ZHONG Shu-chun², WANG Ming-yuan², TANG Yuan-jiang², FAN Yan-ping¹, CHEN Qin²

1. College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

2. Department of Biological Engineering and Technology, Huaqiao University, Xiamen 361021, China

Abstract: Objective This study aimed at cloning the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene from *Curcuma longa* (*CurPAL*) and analyzing the bioinformatics. **Methods** PAL gene was cloned by RT-PCR and RACE strategy with the template of RNA extracted from *C. longa* leaves. The bioinformatic analysis of this gene and its corresponding protein were performed. **Results** One unique sequence of PAL, named as *CurPAL* (GenBank NO. KJ780359), was cloned from *C. longa*. The full-length of *CurPAL* cDNA was 1 293 bp, including 243 bp of 5'-UTR, 123 bp of 3'-UTR, and 927 bp of ORF encoding 308 amino acids. The molecular weight and theoretical isoelectric point (pI) of the deduced *CurPAL* protein were 33 000 and 5.76, respectively. The protein of *CurPAL* was stable and soluble. The domination sites and catalytic active sites in PAL protein of *Nerium oleander* were also found in *CurPAL*. It was found that the amino acid sequence of *CurPAL* had more than 75% homology with PAL of *Prunus salicina*, *Camellia chekiangoleosa*, *Capsicum chinense*, and *Musa acuminata* via multiple alignments. It revealed that *CurPAL* had closer relationship with PALs from *Zingiberales* plants than from other plants by phylogenetic tree analysis. Secondary and tertiary structures indicate that *CurPAL* is a full α protein contained by homotetramer. **Conclusion** The cDNA encoding PAL from *C. longa* 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 *C. longa*.

Key words: *Curcuma longa* L.; *CurPAL*; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning; sequence analysis; RT-PCR; RACE

收稿日期: 2014-07-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31101512); 中央高校基本科研业务费专项基金项目 (JB-ZR1151); 泉州市科技计划项目 (2014Z111)

作者简介: 刘建福 (1975—), 男, 福建泉州人, 博士研究生, 副教授, 硕士生导师, 从事植物生理及代谢调控研究。E-mail: jianfu@hqu.edu.cn

*通信作者 范燕萍, 教授, 博士生导师。Tel: (021) 85288266 E-mail: fanyanping@scau.edu.cn

姜黄 *Curcuma longa* L. 是我国传统中药,是姜科姜黄属多年生草本植物。姜黄属植物全世界有 60 多种,盛产于东南亚和澳大利亚北部^[1],中国主要分布在东南至西南部。姜黄属植物主要包含挥发油和姜黄素类,其中姜黄素是姜黄的主要成分^[2]。研究表明,姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗癌等药理作用^[3-5],可以改善糖尿病、代谢性疾病、自身免疫疾病、动脉粥样硬化、关节炎、中风、外周神经病、肠炎和脑外伤等多种疾病症状^[6]。姜黄素对阿尔茨海默病等神经变性病具有很强的神经保护作用^[7]。

苯丙烷类代谢途径是一切含苯丙烷骨架物质的直接或间接合成途径。苯丙烷类代谢可生成类黄酮、木质素等多种次生代谢产物,这些次生产物在植物的生长发育、抗病、抗逆反应中起着重要的作用^[8]。姜黄素的生物合成是通过苯丙烷代谢途径进行的,苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物苯丙烷类代谢第一步反应的关键酶和限速酶,它催化 L-苯丙氨酸解氨酶生成反式肉桂酸,再由反式肉桂酸生成香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物,进一步形成对香豆酸辅酶 A 和阿魏酸辅酶 A,然后在姜黄素合成酶催化下与丙二酰辅酶 A 生成姜黄素^[9-10]。

PAL 基因与植物酚类、类黄酮、木质素等次生代谢产物的合成密切相关^[11]。植物 PAL 基因为多基因家族所编码, PAL 基因的表达受发育和环境信号(如温度、光质、机械损伤、激素和营养等)的调节,表现出严格的组织和发育特异性^[12-13]。目前已从多种植物中克隆到 PAL 基因并进行了表达分析^[14-15],但在姜黄中尚未见到包括 PAL 基因在内的苯丙烷类代谢途径中相关酶基因的报道。本研究以姜黄叶片为材料,开展姜黄 PAL 基因(*CurPAL*)全长 cDNA 的克隆,并进行序列分析和系统进化等生物信息学方面的研究,为 PAL 基因功能分析和遗传转化奠定基础,为姜黄次生代谢产物的生物合成机制提供理论依据。

1 材料

姜黄叶片于 2013 年 10 月采自华侨大学温室,经唐源江副研究员鉴定为姜黄 *Curcuma longa* L.,清洗干净后迅速放入液氮中冷冻,置于-80 °C 保存备用。

M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit, pMD19-T 载体, LA Taq Polymerase, DH5 α 感受态, DNA 标准相对分子质量 DNA Marker DL2000, Takara 5'-Full RACE Kit with TAP, Takara 3'-Full RACE Core Set with PrimeScriptTM RTase 均购于宝生物工

程(大连)有限公司;各引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。柱式植物 RNAout 试剂盒购于北京天恩泽基因科技有限公司, TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒购自天根生化科技有限公司,逆转录引物为试剂盒提供的 oligo (dT)₁₅。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成

取叶样品液氮中研磨,根据北京天恩泽基因科技有限公司的柱式植物 RNAout 试剂盒说明书提取姜黄总 RNA, -80 °C 保存,分别用紫外分光光度计和电泳检测其浓度和纯度。以姜黄总 RNA 为模板,根据 TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,合成 cDNA 第一链,反转录产物置于-80 °C 保存,备用。

2.2 PAL 基因 cDNA 片段的扩增

根据小果野蕉 *Musa acuminata* Colla、生姜 *Zingiber officinale* Rosc 等芭蕉目植物 PAL 基因的序列,设计一对保守序列引物 PAL-F 和 PAL-R(表 1),以上述合成的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增。RT-PCR 反应体系为 0.4 μ L 的 TaKaRa LA Taq (5 U/ μ L), 引物 PAL-F (10 μ mol/L) 和 PAL-R (10 μ mol/L) 各 1.0 μ L, cDNA 1.0 μ L, 2.0 μ L 的 dNTP (2.5 mmol/L), 2.5 μ L 的 10 $\times$ 缓冲液, 17.1 μ L 的 ddH₂O。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 70 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

2.3 PAL 基因 cDNA 的 RACE 扩增

姜黄 PAL 全长 cDNA 的 5'、3'端的克隆采用 RACE 的方法。根据测序得到的 PAL 片段序列信息设计 RACE 引物,在 cDNA 5'和 3'端分别设计 2 条特异性引物(表 1),并利用 Takara 5'-Full RACE Kit with TAP 和 Takara 3'-Full RACE Core Set with PrimeScriptTM RTase 分别进行 2 次巢式扩增获得姜黄 PAL 基因的 5'和 3'末端序列,按照试剂盒使用说明书进行实验操作。RACE 反应体系为 cDNA 1.0 μ L、dNTP(2.5 mmol/L)2.0 μ L、上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L、缓冲液(10 $\times$)2.5 μ L、Dream Taq 酶 0.15 μ L 和 ddH₂O 17.35 μ L。PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 35 s, 58 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 2.5 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

2.4 PAL 基因 ORF 扩增

根据拼接全长的 ORF 区域,设计一对保守序列引物 ORF-F 和 ORF-R(表 1),以上述合成的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增。反应体系为 0.75 μ L

的 Trans Taq™ HiFi DNA polymerase, 引物 ORF-F (10 μmol/L) 和 ORF-R (10 μmol/L) 各 1.0 μL, cDNA 2.0 μL, 4.0 μL 的 dNTP (2.5 mmol/L), 5.0 μL 的 10 × Trans Taq™ HiFi 缓冲液 II, 36.25 μL 的 ddH₂O。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

2.5 PCR 产物的回收、克隆与测序

用 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物并与 PMD19-T 载体 (Takara, 日本) 进行连接, 然后将连接产物转化大肠杆菌 DH5α, 37 °C 过夜培养, 通过在含有 Amp 的 LB 培养基上进行蓝白斑筛选, 随机挑取白色菌落进行 PCR 鉴定, 将获得的阳性克隆进一步提取质粒进行酶切鉴定后送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。

表 1 姜黄 *PAL* 基因克隆的引物序列

Table 1 Primer sequence for *PAL* cloning of *C. longa*

引物名称	引物序列 (5'-3')
PAL-F	ATTGCAAAAGCCGAAGCAGGAC
PAL-R	ACCGGATTGCCAGAACTGG
3'-PAL-Outer	ACACCCATCGGCGTCTCCAT
3'-PAL-Inner	GCTTCGCCACCAAATCCATC
5'-PAL-Outer	AGGGCAATCCGTTGTTGTAAAAGTCG
5'-PAL-Inner	TGAGGGGATTATCGTTCACGGAGTTG
ORF-F	GCGCGGATCCATGGACAACACTCGTCTCGCGATC 下划线为 BamHI 酶切位点
ORF-R	GCGCAAGCTTTTAGCAGATGGGAATTGGAGCGCC 下划线为 HindIII 酶切位点

2.6 生物信息学分析

用 DNASTar 进行基因片段拼接, 利用 NCBI-protein blast 在线分析软件分析姜黄 *PAL* 基因与其他物种的同源性; 用在线网站 (<http://isoelectric.ovh.org/>) 预测基因编码氨基酸的等电点和蛋白质相对分子质量; 利用 NCBI/ORFfinder 的 ORF 分析核酸序列的开放阅读框架, 用 ExPASy 软件预测编码蛋白的基本性质和疏水性; 应用 TM-HMM 软件分析编码蛋白的跨膜区; 用 SignalP 软件预测编码蛋白信号肽; 用 COILS Server 软件进行 Coil 区分析; 用 TargetP 软件预测编码蛋白的亚细胞定位; 用 PORTER 软件预测蛋白质二维结构; 用 SWISS-MODEL 软件预测蛋白质三维结构; 用 Mega 5.0 软件中的 Clustal W 软件对不同 *PAL* 氨

基酸序列进行多重序列比对以后, 再使用最大简约法构建系统发育树。

3 结果与分析

3.1 姜黄叶片总 RNA 的提取和检测

取 5 μL 提取后的总 RNA, 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 由图 1 可以看出提取的姜黄叶片总 RNA 完整性好; 总 RNA 在波长 260 nm 和 280 nm 处吸光度比值为 2.0, 纯度比较高。DNA 污染少, 可以进行后续的反转录反应。

3.2 姜黄 *PAL* 基因克隆及序列特征

根据小果野蕉、生姜等姜科植物 *PAL* 基因的序列, 设计一对引物, 从姜黄叶片 cDNA 中扩增出一条 250~500 bp 长的特异性条带 (图 2), 经测序该片段长度为 419 bp; Blastx 比对分析表明其与多个 *PAL* 基因有较高的同源性, 确认为姜黄 *PAL* 基因序列。

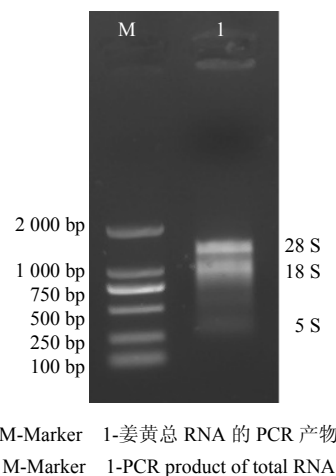


图 1 姜黄叶片总 RNA
Fig. 1 Total RNA of *C. longa* leaves

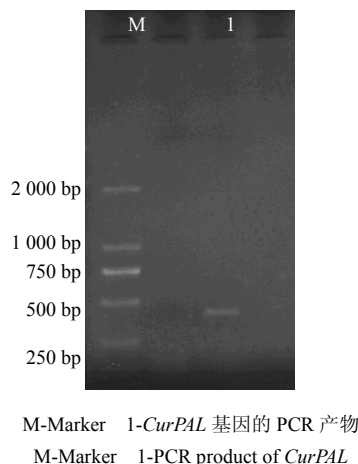
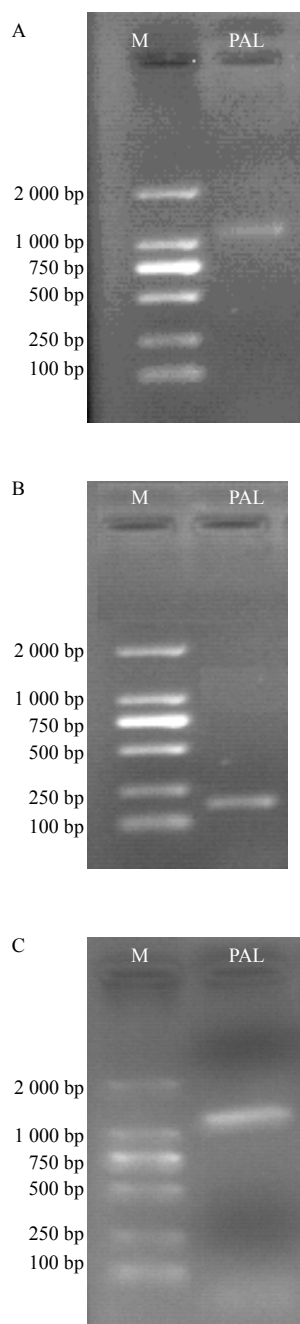


图 2 *CurPAL* 基因保守序列
Fig. 2 Conserved sequence of *CurPAL*

采用 RACE 技术进行 cDNA 两端序列的扩增, 经过 3'-RACE 获得 1 条 1 204 bp 的片段 (图 3-A), 经过 5'-RACE 获得了 1 条在 212 bp 的片段 (图 3-B), 测序和拼接结果表明其为 *PAL* 基因的 3' 端和 5' 端序列。姜黄 *PAL* 基因的 cDNA 全长序列



M-Marker A-*CurPAL* 基因 3'-RACE 产物 B-*CurPAL* 基因 5'-RACE 产物 C-*CurPAL* 基因 ORF 产物

M-Marker A-PCR product of 3'-RACE B-PCR product of 5'-RACE C-PCR product of ORF

图 3 RACE 扩增的 *CurPAL* 基因

Fig. 3 Result of RACE amplification of *CurPAL* gene

为 1 293 bp, Blastp 比对结果表明, 该基因推测的氨基酸序列与小果野蕉、菠萝 *Ananas comosus* (Linn.) Merr. 的苯 *PAL* 有 90% 以上的相似性, 推测其为姜黄的 *PAL* 基因。

姜黄 *PAL* 基因全长 cDNA 命名为 *CurPAL*, 经 DNASTar 及 ORF finder 软件分析表明, *CurPAL* 的 cDNA 由 243 bp 的 5'-UTR、123 bp 的 3'-UTR, 包括 12 bp 的 polyA 结构及 927 bp 编码 308 个氨基酸的开放阅读框 (ORF) 组成 (图 4)。244~246 bp 的 ATG 及邻近序列 (GCGATGG) 符合真核生物起始密码 ATG 预测保守序 (A/GXXTGG); 在 3'-UTR 处有典型的加尾信号 “AATAAA” (图 4); 在 *CurPAL* 序列中, 包含 L6、V23、A7 和 L22 等脱氨基氨基酸残基 (图 4); 它们催化活性位点 N29、G30、N145、G146、N300、G301、HNQDV (78~82), 这些活性位点与夹竹桃 *Nerium oleander* L.^[16] 中报道的相同, 说明 *CurPAL* 是 *PAL* 蛋白质家族成员之一。该基因序列在 GenBank 数据库的登陆号为 KJ780359。

3.3 *CurPAL* 氨基酸序列同源性分析及进化树分析

通过 NCBI 上的蛋白序列 Blastp 和 ClustalW 软件分析表明, *CurPAL* 的氨基酸与其他植物 *PAL* 编码的氨基酸序列具有较高的同源性 (大于 75%, 图 5), 如与中国李 *Prunus salicina* Lindl.、浙江红山茶 *Camellia chekiangoleosa* Hu 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. 氨基酸序列的一致性达到 78%, 与辣椒 *Capsicum annuum* L. 的一致性达到 79%, 与小果野蕉的一致性达到 84%。

为研究 *CurPAL* 与其他植物 *PAL* 之间的亲缘关系, 用 Clustal W 对氨基酸序列比对后, 利用 Mega 5.0 软件通过 Neighbor-Joining (NJ) 法构建氨基酸序列的进化树 (图 6), 结果显示, 姜黄与野蕉 *Musa balbisiana* Colla 和小果野蕉聚为一支, 均为芭蕉目, 其与野蕉的亲缘关系最近; 双子叶植物中罂粟目、大戟目、蔷薇目、管状花目、侧膜胎座目聚为另一支。从进化树上看, 相同科或类群的植物聚为一类, 但不同植物间 *PAL* 也有很高的同源性, 这也可推测 *PAL* 在进化过程中是相当保守的, *CurPAL* 与野蕉在结构和功能上具有一定的相似性。

3.4 *CurPAL* 蛋白理化性质分析

运用 ProtParam 工具分析 *CurPAL* 编码蛋白的理化性质, 结果表明, *CurPAL* 编码蛋白相对分子质量

```

1 GAA ACC TAC ATC AAG CAC GCC AAG AAG CTC CAC GAT CAG GAT CCG CTG CAG AAG CCG AAG
61 CAG GAT CGC TAC GCG CTC CGA ACG TCG CCG CAG TGG CTT GGC CCT CAA ATA GAA GTC CTC
121 CGC TTC GCC ACC AAA TCC ATC GAA CGC GAG ATC AAC TCC GTG AAC GAT AAT CCC CTC ATC
181 GAC GTC GCC CGG AAC AAG GCC CTC CAC GGC GGC AAC TTT CAG GGC ACA CCC ATC GG CGTC
241 TCC ATG GAC AAC ACT CGT CTC GCG ATC GCC GCA ATC GGC AAG CTC ATG TTC GCC CAA TTC
      M D N T R L A I A A I G K L M F A Q F
301 TCC GAA CTC GTC AAC GAC TTT TAC AAC AAC GGA TTG CCC TCT AAT CTC TCC GGC GGA CGG
      S E L V N D F Y N N G L P S N L S G G R
361 AAC CTT AGC CTT GAC TAC GGT TTC AAG GGG GCG GAA ATC GCG ATG GCC GCC TAT TGC TCC
      N L S L D Y G F K G A E I A M A A Y C S
421 GAG CCC CAG TTT CTG GGC AAT CCG GTG ACC AAC CAC GTT CAG AGT GCG GAG CAG CAT AAC
      E P Q F L G N P V T N H V Q S A E Q H N
481 CAG GAC GTG AAC TCG CTG GGG GTG ATC TCC GCG AGG AAG ACG GCT GAG GCC GTC GAC ATC
      Q D V N S L G L I S A R K T A E A V D I
541 CTC AAG CTC ATG TCG GCG ACC TAC TTG GTG GCC CTC TGC CAA GCC ATC GAC CTG CGA CAC
      L K L M S A T Y L V A L C Q A I D L R H
601 CTG GAG GAG AAC CTA AAG CAC GCG GTG AAG GCG GCG GTG AGC CTC GTC GGC AAG CGC GTA
      L E E N L K H A V K A A V S L V G K R V
661 CTC ACC ACT GGC GCC AAC GGA GAG CTC CAC CCC GCG CGT TTC TGC GAG AAG GAC CTC CTC
      L T T G A N G E L H P A R F C E K D L L
721 ACC GTG GTC GAC CGC GAG CAC GTG CTG AGC TAC GCC GAC GAC CCC TGC AGC TCC GCC TAC
      T V V D R E H V L S Y A D D P C S S A Y
781 GTG CTG ATG CCC AAG CTG CGG ATG GTA CTG GTG GAG CAC GCC CTC GGC CAC GGC GAC AAG
      V L M P K L R M V L V E H A L G H G D K
841 GAG AAG GAC GCC GCC GCG TCC ATC TTC CAC AAA GTC GCG GCT TTC GAG GAG GAG CTC AAG
      E K D A A A S I F H K V A A F E E E L K
901 GCG GTG TTG CCG AAG GAG GTG GAA GCG GCG GCG GCC TTG GAG AGC GGC AAC CCG GCC
      A V L P K E V E A A R A A L E S G N P A
961 ATC AGC ATC CGG ATC AAG GAG TGC AGG TCG TAC CCA CTG TAT CGG TTG GTG AGG GAG CAG
      I S I R I K E C R S Y P L Y R L V R E Q
1 021 CTG GGG GCG GCT TAC CTG ACC GGC GAG AAG GTG CCG TCG CCG GGG GAG GAG TTC GAG AAG
      L G A A Y L T G E K V R S P G E E F E K
1 081 GTG TCC GCA GCC ATC AAC GCC GGG CTG GTC ATC GAT CCT CTG CTT CAA TGC TTG AAC GAG
      V S A A I N A G L V I D P L L Q C L N E
1 141 TGG AAT GGC GCT CCA ATT CCC ATC TGC TAA GTG TGA GAT TAT TAA TTA AAG CAA AAA AAA
      W N G A P I P I C *
1 201 GTG TGG AAT TGT GTC CAA TGA AAT CAG AAG CAA GTT ATT TCT TGT TTT TAT TTT CTT TTT
1 261 AAT CGA AAA TAT GTT CTT GTT AAA AAA AAA AAA

```

粗、斜体表示起始密码子 (ATG); 粗体加*表示终止密码子 (TAA); 脱氨基位点为方框加粗体; 催化激活位点为粗体加下划线; 左侧数字为核苷酸序号

Start codon is in bold and italics, stop codon is indicated by an asterisk and bold, and the deamination site are boxed and in bold, the catalytic active sites are underlined and in bold, nubers on the left margins represent nucleotide sequences

图 4 *CurPAL* 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide and deduced amino acid sequences of *CurPAL*

约为 33 000, 理论等电点为 5.76, 总共包括 4 728 个原子, 分子式为 $C_{1484}H_{2376}N_{410}O_{445}S_{13}$ 。CurPAL 的负电荷氨基酸残基 (Asp+Glu) 数为 38, 正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 数为 31; 在组成 CurPAL 蛋白的 20 种氨基酸中, 丙氨酸所占的比例最高, 达到 13%, 色氨酸所占的比例最低。CurPAL 蛋白的不稳定指数为 29.55, 脂肪指数为 100.49, 根据 Guruprasad 方法表明 CurPAL 蛋白稳定; Grand average of hydropathicity (GRAVY) 值为 -0.022, 肽链表现为亲水性; TM-HMM 预测结果显示该蛋白不是膜蛋白, 无跨膜结构域, 定位于细胞质中, 且 N 端不含有蛋白定位信号肽, 说明 CurPAL 是一个可溶性蛋白。

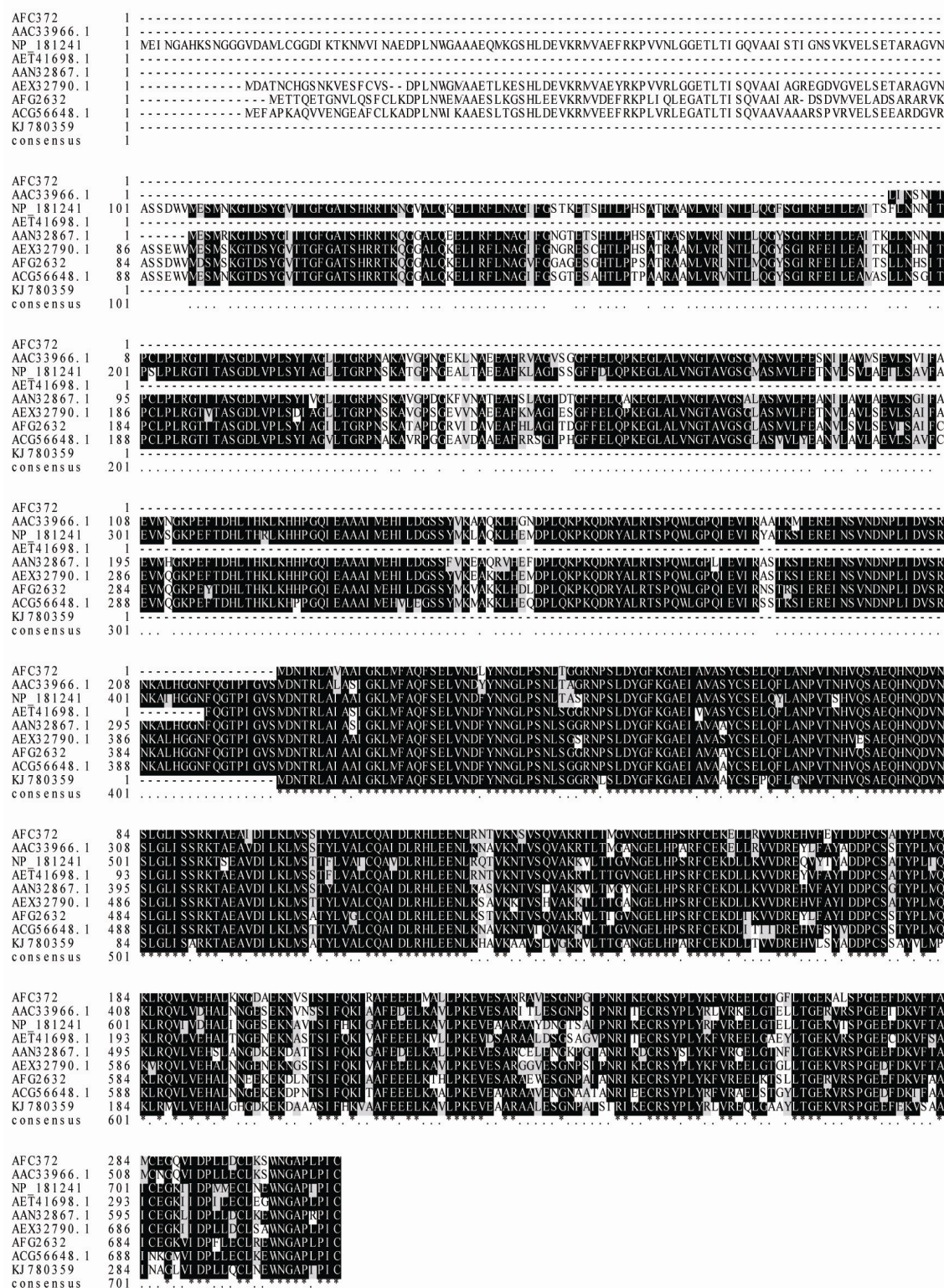
3.5 CurPAL 蛋白二维和三维结构的预测

运用 PORTER 在线软件进行姜黄 PAL 蛋白二维结构的预测 (图 7), 由预测的结果来看, CurPAL 蛋白二维结构组分中, α -螺旋 (H) 占 65.91% > 45%,

β -折叠 (E) 占 0.65% < 5%, 无规则卷曲 (C) 占 34.44%, α -螺旋和无规则卷曲是其蛋白质二级结构中量最大的结构元件, 故 CurPAL 属于全 α 型蛋白。运用 SWISS-MODEL 在线软件进行 CurPAL 蛋白三维结构的预测 (图 8), 由预测的结果来看, 本实验中的姜黄 PAL 蛋白是基于荷兰芹 [*Petroselinum crispum* (Mill.) Hill] PAL 蛋白原子结构 1w27.1 的 A 链建模的, 两者序列一致性达到 78.57%, CurPAL 蛋白由同源四聚体构成, 与其他植物相同^[17]。表明本实验克隆得到的 PAL 基因是正确的。

4 讨论

苯丙氨酸解氨酶广泛存在于各种植物和少数微生物中。它是连接生物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, 是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶, 也是苯丙烷类代谢途径中研究最多的酶。它在类黄酮、木质素、香豆素、水杨酸、鞣质等次生代谢产物的合成过程中也起着很重



AET 41698.1-中国李 NP_181241-拟南芥 AAN32867.1-中粒咖啡 AEX32790.1-葡萄 AFC372-浙江红山茶 AAC33966.1-辣椒
AFG2632-土肉桂 ACG56648.1-小果野蕉 KJ780359-姜黄

AET 41698.1-*P. salicina* NP_181241-*A. thaliana* AAN32867.1-*C. canephora*. AEX32790.1-*V. vinifera* AFC372-*C. chekiangoleosa*
AAC33966.1-*C. annuum* AFG2632-*C. osmophloeum* ACG56648.1-*M. acuminata* KJ780359-*C. longa*

图5 *CurPAL* 与其他植物 *PAL* 氨基酸序列多重比对

Fig. 5 Multiple alignments of amino acid sequence between *CurPAL* and *PAL* from other plants

- autoimmune and neoplastic diseases [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(1): 40-59.
- [7] Begum A N, Jones M R, Lim G P, *et al.* Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's Disease [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 32(1): 196.
- [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] Katsuyama Y, Kita T, Horinouchi S. Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb *Curcuma longa* [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(17): 2799-2803.
- [10] del Carmen Ramirez-Ahumada M, Timmermann B N, Gang D R. Biosynthesis of curcuminoids and gingerols in turmeric (*Curcuma longa*) and ginger (*Zingiber officinale*): Identification of curcuminoid synthase and hydroxycinnamoyl-CoA thioesterases [J]. *Phytochemistry*, 2006, 67: 2017-2029.
- [11] Xu H, Park N, Li X H, *et al.* Molecular cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase, cinnamate 4-hydroxylase and genes involved in flavone biosynthesis in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101: 9715-9722.
- [12] 孙梓健, 汤青林, 宋 明, 等. 红叶芥低温胁迫下苯丙氨酸解氨酶活性及其基因的克隆表达 [J]. *西南大学学报: 自然科学版*, 2010, 32(2): 90-94.
- [13] 江汉民, 王 楠, 赵 换, 等. 花椰菜苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及黑腐病胁迫下的表达分析 [J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 2012, 45(4): 87-92.
- [14] 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.
- [15] 徐莉莉, 童再康, 林二培, 等. 杉木苯丙氨酸解氨酶基因 CIPAL 的克隆与表达分析 [J]. *林业科学*, 2013, 49(12): 64-72.
- [16] 王 燕, 许 锋, 杜何为, 等. 夹竹桃苯丙氨酸解氨酶的基因克隆与序列分析 [J]. *华北农学报*, 2007, 22(4): 19-24.
- [17] 黄志伟, 郑亚凤, 许 明, 等. 籼稻苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与原核表达 [J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(5): 1194-1196.