

白及苯丙氨酸解氨酶基因的克隆、序列特征及激素响应表达分析

罗才林¹, 李林¹, 陈立², 邓琴², 张俊², 马璇², 徐德林^{1*}, 钱刚^{1*}

1. 遵义医学院 细胞生物学教研室, 贵州 遵义 563003

2. 遵义医学院第一临床学院, 贵州 遵义 563003

摘要: 目的 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是植物次生代谢与抗逆反应的关键酶类之一, 研究 PAL 基因的序列信息与逆境胁迫响应模式, 揭示其蛋白结构与功能及抗逆信号网络。方法 采用 RT-PCR、RACE 技术获得白及 PAL 基因 cDNA 全长; ProtParam、SOPMA、SWISS-MODEL 等生物信息学软件分析其编码蛋白的理化特性、结构域等特征; DNAMAN、MEGA 软件分别进行氨基酸多序列比对与系统进化分析; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术进行 PAL 基因时空表达特异性与外源激素胁迫下响应检测。结果 克隆得到的 BsPAL 基因 cDNA 全长为 2 708 bp, 编码 1 条 797 个氨基酸组成的多肽, 预测蛋白质相对分子质量为 86 216.94, 等电点 6.24, 具有植物 PAL 酶的典型结构域和活性中心, 不具有跨膜结构域, 与铁皮石斛、蝴蝶兰的 PAL 基因亲缘关系最近。qRT-PCR 结果表明白及根中 PAL 表达量显著高于叶与茎。在 MeJA 处理下, PAL 表达量呈逐渐上升再下降的趋势; SA 处理下, 则是先下降再上升的趋势。结论 白及 PAL 基因的克隆与序列特征分析、表达检测及响应 MeJA 和 SA 胁迫后的表达变化为阐明白及苯丙烷代谢途径与激素信号通路研究提供实验基础。

关键词: 白及; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 序列特征; 表达分析; 激素响应

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0694-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.024

Cloning, sequence characterization, expression profiling of hormones response of phenylalanine ammonia-lyase gene in *Bletilla striata*

LUO Cai-lin¹, LI Lin¹, CHEN Li², DENG Qin², ZHANG Jun², MA Xuan², XU De-lin¹, QIAN Gang¹

1. Department of cell Biology, School of Basic Medicine Sciences, Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

2. The First Clinical Institute of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

Abstract: Objective Phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL) is one of the key enzymes associated with stress resistance in secondary metabolism pathway of plants. Exploring its sequence information and expression profiling information in stress response could comprehensively peep at the protein structure, functions and signal network of plant stress resistance. **Methods** The full cDNA length of PAL from *Bletilla striata* was cloned by RT-PCR and RACE approaches. Physicochemical properties and conserved domain of BsPAL protein were determined by a series of bioinformatics tools as ProtParam, SOPMA, SWISS-MODEL, etc. Multiple alignment and phylogenetic tree were achieved by DNAMAN and MEGA Software, respectively. The qPCR was employed to examine the expression profiles of BsPAL under exogenous hormone stress. **Results** The full cDNA of BsPAL was 2 708 bp, encoding a 797 amino-acid protein with a molecular weight of 86 216.94 and an isoelectric point (pI) of 6.24. The BsPAL protein included the typical structural domain and active site of PALs in other plants, and without transmembrane region, which was more homologous with PALs of *Dendrobium officinale* and *Phalaenopsis aphrodita*. The qPCR results revealed the expression level of BsPAL in roots was much higher than that in leaves and stems. Under MeJA treatment, the expression trend of BsPAL was first gradually ascending and then descending, while SA treatment had the reverse effect. **Conclusion** The BsPAL's sequence characterizing, expression profiling and responding patterns against SA and MEJA provided a research basis for elucidating the metabolic pathways of phenylpropanoid and hormone signaling research in *B. striata*.

Key words: *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning; sequence characterization; expression profiling; hormones response

收稿日期: 2018-08-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31560079); 国家自然科学基金资助项目 (31560102); 贵州省科学技术基金项目 (QKH-ZY [2013] 3002); 贵州省科学技术基金项目 (QKH-LH [2014] 7549); 遵义市 15851 人才项目 (201424); 贵州省科技厅人才成长项目 (KY [2017] 194); 遵义医学院博士启动基金资助项目 (F-809)

作者简介: 李林 (1982—), 女, 博士, 副教授, 主要研究中药材遗传育种。E-mail: lilin@zmc.edu.cn

***通信作者:** 徐德林 (1981—), 男, 博士, 副教授, 主要研究中药材遗传育种。E-mail: xudelinqin@163.com
钱刚 (1968—), 男, 博士, 教授, 主要研究植物分子生物学。E-mail: pengjiaqiong@163.com

白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 是我国传统的名贵中药, 具有止血收敛、消肿生肌之功效, 主治肺结核、咯血、肝癌、胃癌、十二指肠溃疡、尿血、便血等症^[1]。现代药理学研究发现, 白及能合成大量的超氧化物, 具有抗菌、镇痛、抗肿瘤、强身健体和增加机体免疫力等功效^[2]。白及中丰富的次生代谢产物是白及发挥药理学功效的重要物质基础。其中, 二氢菲类、菲类、联苳类、酚类等化合物是目前药理学研究的重点, 它们的合成被认为与苯丙烷代谢途径有密切的关系。其中二氢菲类母核的合成途径主要通过酚类化合物次级代谢物中的苯丙基类生物合成途径来实现的^[3], 黄酮类化合物由苯丙烷类与多聚酮类相结合的途径合成, 酚类化合物由苯丙烷途径产生^[4]。因此, 对苯丙烷代谢途径的研究对于白及主要药用成分积累机制的研究具有重要的意义, 而研究其代谢途径中的关键基因是其中的重要步骤之一。

苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 是植物苯丙烷代谢途径的限速酶。在苯丙烷代谢途径中, *L*-苯丙氨酸经 PAL 催化解氨生成反式肉桂酸, 再由反式肉桂酸生成香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物, 这些酸进一步转化为香豆素、绿原酸, 形成乙酰辅酶 A 酯等, 也可再进一步转化为酚类、类黄酮和木脂素等多种次生代谢产物^[5]。苯丙烷类化合物不仅是植物中大量酚类化合物的前体, 它们在维持植物结构、抵御紫外线、形成花青素和植保素、保持花粉活力、信号转导与交流等方面发挥着重要作用^[6]。而经由苯丙烷途径的另一一些次级代谢产物水杨酸 (SA)、绿原酸、黄酮、木脂素, 香豆素类、植物防御素等在植物生长发育、抗病、抗逆中起到关键作用^[7-9]。近年以来, 包括拟南芥、甜菜、水稻等多个物种 PAL 基因的序列与功能得到阐述。对龙血竭研究认为其 PAL 基因与其重要的药用成分血竭的合成有密切的关系^[10]。在辣椒中研究发现 PAL 基因与植物的抗病性相关, 增加 SA 的产量。辣椒叶感染去毒黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* 时, PAL1 被诱导表达, 而该基因过表达导入的拟南芥中发现苯丙氨酸裂解酶活性增加, 可以使番茄细菌性斑点病的生长受到抑制、SA 含量增加等^[11]。因此, PAL 在植物的次生代谢合成、抗病、抗逆中具有重要的作用。然而对于白及 PAL 基因的研究还未见报道。本研究首次克隆了白及 PAL

基因的 cDNA 全长, 进而对其序列进行生物信息学分析, 并通过荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析该基因在白及不同组织中的表达特异性, 以及它在外源激素的胁迫下的表达特性, 以期解析白及相关药用成分的生物合成的遗传机制研究提供基础, 为优良品系的筛选鉴定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

将本实验室采集自贵州正安县紫花白及蒴果用 0.1% HgCl₂ 消毒灭菌后播种于 MS 培养基 (MS+蔗糖 30 g/L+琼脂 6 g/L), 在 25 °C 恒温 and 18 h/6 h 光照周期下, 培养 3 个月后, 挑选株高为 10 cm 左右且生长一致的幼苗备用。

1.2 白及 RNA 提取和 cDNA 合成

将幼苗转移到 MS 液体培养基 (pH 5.8) 中, 1 周后, 将幼苗分别转至 MS0、MS1 [附加 100 μmol/L 茉莉酸甲酯 (MeJA)] 和 MS2 (附加 100 μmol/L SA) 液体培养基中进行浸泡处理, 0、6、24、48、72、120 h 后将处理幼苗液氮速冻, 保存于 -80 °C, 各处理重复 3 次。

将白及幼苗的根、茎、叶以及 SA、MeJA 处理后不同时间点收集的幼苗样品分别提取 RNA。使用天根多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (批号 DP441) 提取白及总 RNA, 具体步骤参照说明书。进一步采用 Takara 公司的 PrimeScript™ RT Master Mix (批号 RR037A) 将 RNA 逆转录为 cDNA, 具体步骤及反应体系参见说明书。

1.3 白及 PAL 基因克隆

将铁皮石斛的 PAL 基因 (Gi: AGC23439.1) 核酸序列在白及转录组数据库 (NCBI BioSample acc: SAMN08971764) 中进行 Blast 比对, 获得 1 个与铁皮石斛 PAL 基因序列高度相似的 unigene, 具有完整的 3' 端。以该序列设计 PAL 5' 端特异引物 PAL-5R1、PAL-5R2 (表 1), 与通用性引物 Outer F、Inner F 于上海生工有限公司合成。将第 1 链合成的 cDNA 进行 TDT 加尾并作为模板, 巢式 PCR 扩增 5' 端。

TDT 加尾反应: 5×TDT buffer 5 μL, 0.1% BSA 2.5 μL, 10 mmol/L DGTP 2.5 μL, TDT 15 U, 第 1 链合成产物 10 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。37 °C 保温 30 min。

5'-RACE, 巢式 PCR 第 1/2 轮: Taq plus DNA Polymerase (5 U/μL) 0.5 μL, 10×TAQ plus PCR buffer 2.5 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL,

cDNA 0.5 μL, Outer F/Inner F (10 pmol/L) 1 μL, PAL-5R1/PAL-5R2 (10 pmol/L) 1 μL, dd H₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增条件: 95 °C、5 min; 95 °C、40 s, 60 °C、30 s, 72 °C、1 min, 35 个循环; 72 °C、10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 回收其中的特异片段, 连接、转化, 阳性克隆在上海生工有限公司测序。

将克隆得到的 5'端序列与候选 unigene 序列进行拼接, 获得具有完整开放阅读框 (ORF) 的

全长序列。以拼接的全长序列设计包含整个 ORF 阅读框的特异引物 (PAL-R1/F1)。扩增后的目标产物进行回收、克隆测序, 同上。PCR 反应体系: 2×KOD Fx PCR buffer 12.5 μL, dNTP Mixture(各 0.4 mmol/L) 5 μL, PAL-F1 (10 pmol/L) 0.5 μL, PAL-R1 (10 pmol/L) 0.5 μL, cDNA 0.5 μL, KOD Fx (1.0 U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增条件: 95 °C、5 min; 98 °C、10 s, 48 °C、2 min, 35 个循环; 68 °C、10 min。

表 1 基因克隆和 qRT-PCR 扩增引物

Table 1 Primers used for gene cloning and qRT-PCR experiments

引物名称	引物序列 (5'→3')	备注
PAL-5R1	GAGGACGACGGAGGCGAGGC	5'RACE 扩增
PAL-5R2	TTGGGGCGGCCGGTGAGGATTCC	
Outer F	GGCCACGCGTCGACTAGTACCCCCCCCCCCCCC	Kit
Inner F	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
PAL-F1	CTTGAAAATTTCGATAAGTCAAAAAT	ORF 区扩增
PAL-R1	AAGAAGTAATCAAACAACAACAAAT	
PAL-F2	ACAATAATTCCTTAGATACAGAGG	定量
PAL-R2	TTCGATAAGGTCTTTGATGC	
Actin-F	AATCCCAAGGCAAACAGA	qRT-PCR 内参基因
Actin-R	CACCATCACCAGAATCCAG	

1.4 白及 PAL 基因序列分析

通过 NCBI 的 BlastN 1.2 获得的 PAL 基因序列, ORF Finder 预测其 ORF; 用 InterProscan 在线分析 PAL 蛋白质的结构域; ProtParam 和 SOPMA 分析蛋白质理化性质和二级结构; 采用 SWISS-MODEL 软件以荷兰芹 *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman (Parsley), PAL 蛋白结构 1w27.1 的 A 链建模, 构建蛋白质三维模型; Signal P4.1 和 TMHMM2.0 预测蛋白质信号肽和跨膜区域; PSORT 进行蛋白质亚细胞定位分析。采用 DNAMAN 比较近缘物种及其模式植物 PAL 蛋白的氨基酸序列; 借助 MEGA 6.0 构建系统进化树。

1.5 qRT-PCR 分析

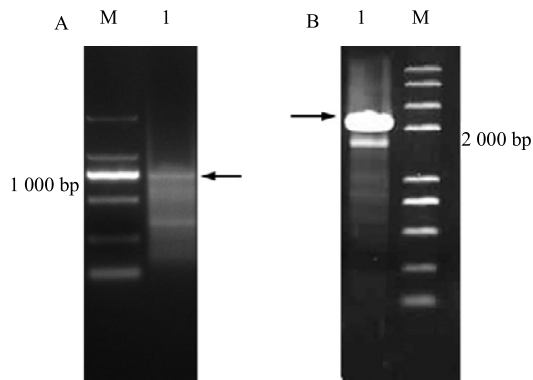
用 qRT-PCR 分析 PAL 基因在不同组织中的表达水平以及外源 MeJA 和 SA 处理下白及幼苗后 PAL 基因表达量变化。根据获得的全长 cDNA 序列, 设计定量引物 PAL-F2 和 PAL-R2。以白及 Actin 基因作为内参基因设计内参特异引物 Actin-F 和 Actin-R。反应体系 25 μL: 12.5 μL 2×SYBR[®] Premix Ex Taq TM (Takara 公司, 中国), 正/反向引物 (10

μmol/L) 各 1 μL, 2 μL cDNA 模板, ddH₂O 补足到 25 μL。每个反应 3 个复孔, 3 次生物学重复。PCR 程序: 95 °C、30 s; 94 °C、5 s, 60 °C、20 s, 72 °C、20 s, 40 个循环; 72 °C、10 min, 4 °C 保存。绘制熔解曲线判定产物特异性, 并根据定量扩增曲线达到平台期时的 C_t 值, 以 actin 为参比计算各组织与不同处理各时间点的 PAL 基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 PAL 基因克隆

通过 Blastn 分析将与铁皮石斛 PAL 基因 (Gi: AGC23439.1) 高度相似的白及 unigene 挑选并作为候选 PAL 基因片段。以该 unigene 设计 5' RACE 引物, 经过巢式 PCR 扩增反应, 琼脂糖电泳检测获得长度为 900 bp 左右的目标条带 (图 1)。将该目标条带进行回收、克隆测序后获得 905 bp 的序列, 与候选 PAL unigene 比对发现, 2 序列 200 bp 重叠部分序列一致。将 2 序列拼接后获得 1 条全长 2 708 bp 的 cDNA 序列。ORF Finder 发现, 该序列具有完整的 ORF, 包括 54 bp 的 5'-UTR、262 bp 的 3'-UTR, 2 394 bp 编码区。



A-5'-RACE 扩增片段 B-PAL ORF 全长扩增片段 M-Marker
1-扩增片段
A-5'-RACE amplification fragments B-PAL ORF amplification
fragments M-Marker 1-amplification fragments

图 1 BsPAL 基因 PCR 扩增
Fig. 1 PCR products of BsPAL gene

以 PAL-F1/PAL-R1 进行 PAL 全长 cDNA 编码区序列扩增，获得目标片段测序显示与拼接结果一致，全长 2 573 bp，可编码 797 个氨基酸。Blast X 分析表明其与 GeneBank 中已注册的多种植物的 PAL 基因高度相似，命名为 BsPAL。

2.2 PAL 基因序列分析

蛋白理化性质结果显示 BsPAL 编码的蛋白质的

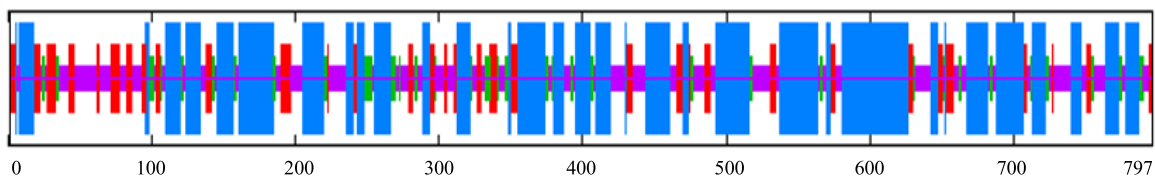
预测相对分子质量为 86 216.94，理论等电点为 6.24，其中 Ala、Arg、Asn、Asp 等是其主要的氨基酸；负电荷残基 (Asp+Glu) 总数为 86 个，正电荷残基 (Arg+Lys) 总数为 79 个，不稳定系数为 34.90，单条肽链属于稳定蛋白。利用 SOPMA 软件对其氨基酸序列的二级结构进行预测，结果如图 2 所示。BsPAL 基因所编码的蛋白由 47.55%的 α -螺旋 (alpha helix)、15.31%的延伸链 (extended strand)、8.53%的 β -折叠 (beta turn) 和 28.61%的无规卷曲 (random coil) 组成。 α -螺旋和无规卷曲是白及 PAL 蛋白质二级结构的主要结构元件， β -转角和延伸链散布于整个蛋白序列中。

InterProscan 分析表明 BsPAL 蛋白具有 3 个功能结构域，延胡索酸酶/组氨酸裂解酶 (IPR024083)，L-天冬氨酸酶 (IPR008948) 和苯丙氨酸解氨酶的结构域 (IPR023144)，进一步表明 BsPAL 很可能属于苯丙氨酸裂解酶合成的重要成员。

同源建模的方法预测 BsPAL 蛋白三级结构 (图 3) 表明，白及与荷兰芹 PAL 蛋白氨基酸序列一致性为 80.43%，由同源四聚体构成，与已报道植物相同^[12]。

2.3 BsPAL 蛋白信号肽、亚细胞定位、跨膜区预测分析

采用 Target P 在线软件对 BsPAL 蛋白质亚细



竖线由长到短依次为 α -螺旋 (蓝色)、延伸链 (红色)、 β -折叠 (绿色)、无规卷曲 (紫色)
Lines from long to short showed as follow: alpha helix (blue), extended strand (red), beta sheet (green), and random coil (purple)

图 2 BsPAL 蛋白二级结构的预测
Fig. 2 Secondary structure prediction of BsPAL protein

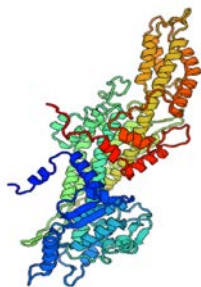


图 3 BsPAL 蛋白质的三级结构
Fig. 3 Three-dimensional structure prediction of BsPAL protein

胞定位进行预测，结果显示该蛋白质可能被定位于细胞质基质，预测的可靠性等级为 4 级，而与之同源性较高的铁皮石斛的 PAL 也被定位在细胞质基质上。Signal P4.0 Server 软件分析表明，BsPAL 基因编码的蛋白质无信号肽。TMHMM 2.0 Server 软件对白及 PAL 蛋白氨基酸序列的跨膜结构域进行在线预测表明，PAL 的整条肽链都位于细胞膜外，不存在跨膜区。结合上述预测结果可以推测出，BsPAL 在细胞质基质中合成后很可能不经蛋白转运就直接锚定在细胞质基质中的特定部位而行使催化功能。

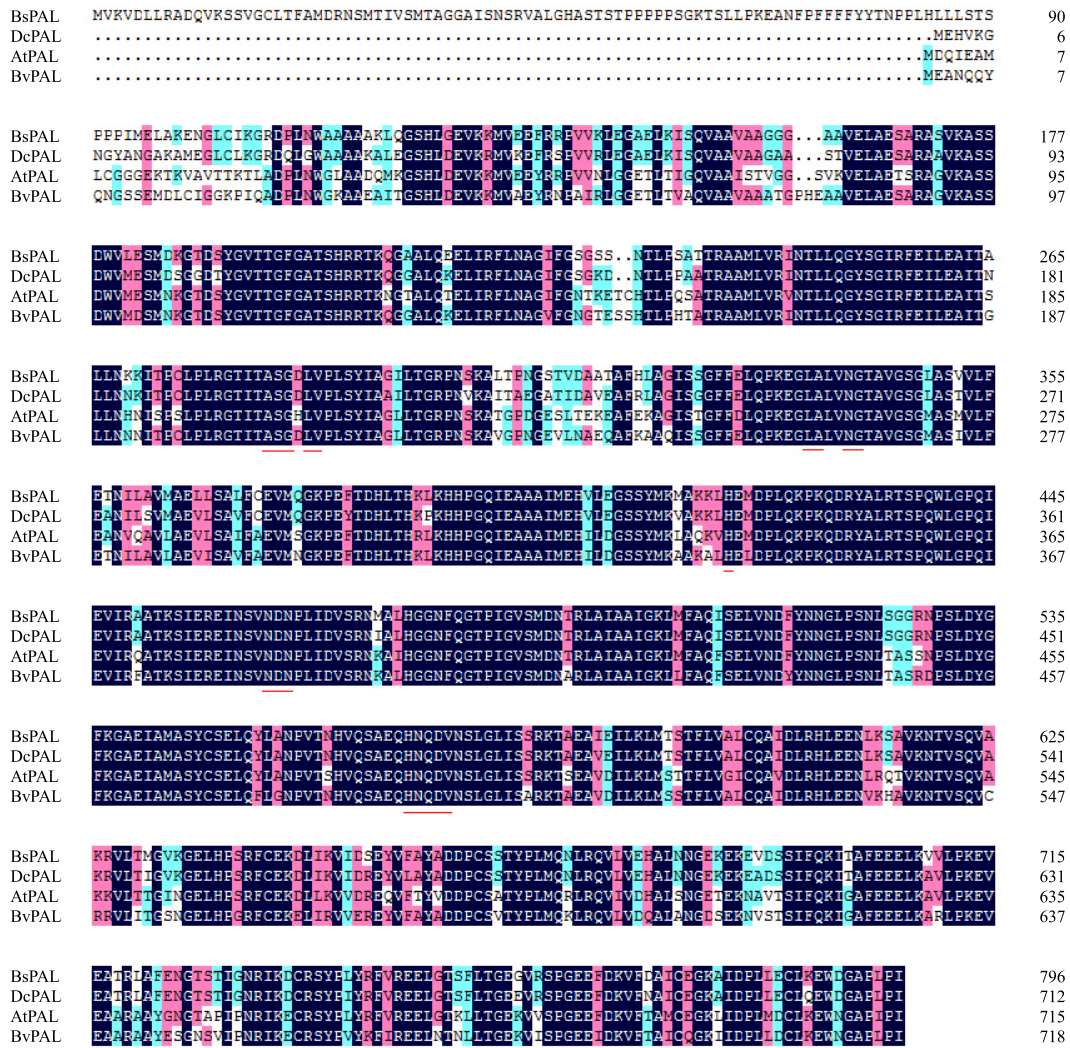
2.4 BsPAL 基因编码蛋白的多序列比对分析

比较白及与近缘物种单子叶植物铁皮石斛、模式植物拟南芥、甜菜的 PAL 基因蛋白序列发现, 4 个物种的 PAL 蛋白序列高度相似, 相似度为 77.34%, 同时 BsPAL 蛋白在 N 端有约 80 个残基长于其他 3 种植物(图 4)。进一步对保守功能结构和活性位点分析表明, BsPAL 蛋白在第 281~297 位点与其他 3 种植物均存在保守功能域, 该位点是 PAL 活性所必须的典型的多肽位点, 也是典型的 PAL/HAL 蛋白质标签。4 种植物的苯丙氨酸解氨酶保守活性基序(GTITASGDLVPLSYIAG, 279~305)也高度保守, 仅铁皮石斛和拟南芥各有一个氨基酸残基差异, 与

香蕉^[13]、草大青 *Isatis indigotica* L.^[14]等植物的 PAL 酶活性中心序列一致。另外, 保守的脱氨位点(L-288、V-289、L-338、A-339)和催化活性位点(N-341、G-342、H-419、NDN (465~467) 及 HNDQV (567~571) 与姜黄^[15]、铁皮石斛^[16]、黑三棱^[17]的氨基酸残基相同, 表现出了 PAL 基因家族的保守性, 也充分证明 BsPAL 蛋白质属于 PAL 家族。

2.5 BsPAL 系统进化分析

构建 BsPAL 与其他植物的蛋白序列的系统进化树, 发现来源于 18 种不同物种的 PAL 蛋白序列被聚为单子叶植物与双子叶植物 2 类, 与分类学结果一致(图 5)。其中白及与铁皮石斛、蝴蝶兰、深圳拟兰的



BsPAL-白及 DcPAL-铁皮石斛 (AGC23439.1) AtPAL-拟南芥 (AAC18871.1) BvPAL-甜菜 (CAH17686.1); 黑色背景表示相似性为 100%, 粉色、粉红色表示相似性大于等于 75%, 蓝色表示相似性大于等于 50%
BsPAL-*Bletilla striata* DcPAL-*Dendrobium candidum* (AGC23439.1) AtPAL-*Arabidopsis thaliana* (AAC18871.1) BvPAL-*Beta vulgaris* (CAH17686.1) Identical amino acids are highlighted in black, amino acids similarity in least 75% are highlighted in pink; Amino acids similarity in least 50% are highlighted in blue

图 4 BsPAL 与 3 种模式植物的蛋白序列比对

Fig. 4 Protein sequence alignment analysis between BsPAL and PALs of three model plants

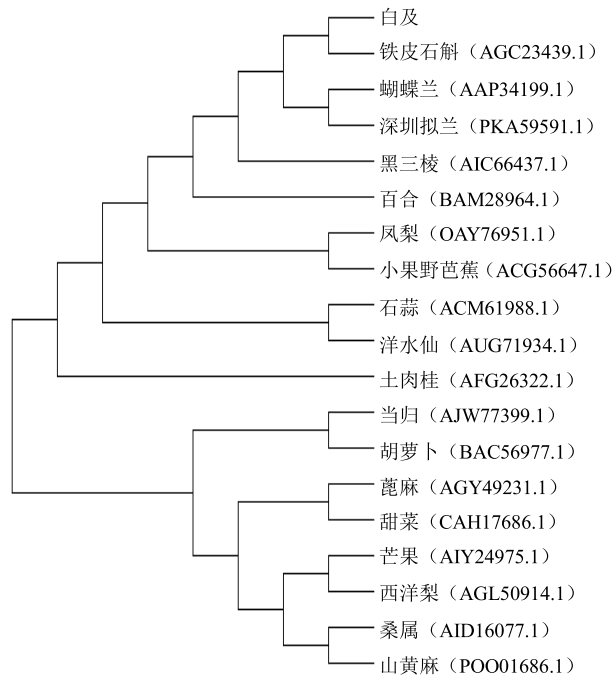


图 5 白及与 18 种不同物种的 PAL 系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of PAL genes between 18 different species and *B. striata*

PAL 蛋白聚在单子叶植物这一大类中的一个亚类上, 说明它们在进化上具有更近的亲缘关系。

2.6 BsPAL 基因表达分析

分别提取白及幼苗的根、茎、叶的总 RNA, 采用 qRT-PCR 方法检测 BsPAL 基因在各组织中的表达情况。以持家基因 Actin 基因的表达量为对照, 对 BsPAL 在根、茎、叶中的表达量进行比较, 发现该基因在白及根、茎、叶中均有表达, 在根中的相对表达量最高, 显著高于茎、叶, 呈现出根 > 叶 > 茎的趋势 (图 6)。

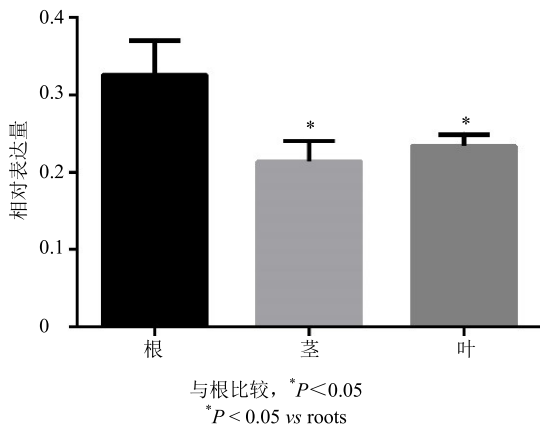
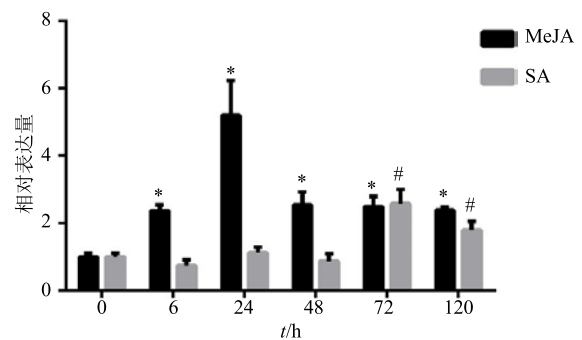


图 6 BsPAL 基因的组织特异性表达

Fig. 6 Analysis of expression levels of BsPAL gene in different tissues

对白及幼苗进行 MeJA 和 SA 的胁迫处理, 不同时间点的 BsPAL 表达量进行 qRT-PCR 检测, 结果发现白及 PAL 的转录水平在 2 种处理有不同变化趋势 (图 7)。MeJA 处理后, 白及 PAL 基因表达量逐步上升, 在 24 h 达到峰值, 随后下降, 48、72、120 h 的相对表达水平接近。而 SA 处理后, 白及幼苗中 BsPAL 表达量呈现出先下降后上升的趋势, 而 72、120 h 时相对表达量高于其他检测点, 与 0 h 处理点存在显著差异。



MeJA 处理组与对照组比较: * $P < 0.05$; SA 处理组与对照组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ MeJA treatment group vs control group; # $P < 0.05$ SA treatment group vs control group

图 7 SA 和 MeJA 胁迫下 BsPAL 在不同时间点的表达
Fig. 7 BsPAL expression profiles under SA and MeJA stress

3 讨论

PAL 基因是植物苯丙烷代谢途径的关键基因, 目前已经在铁皮石斛、长春花、黑三棱等多种药用植物中得到克隆。白及作为我国传统中草药, 到目前为止尚未见到对于其 PAL 基因的报道。本研究克隆得到紫花白及 PAL 基因, 全长 cDNA 2 708 bp, 编码 797 个氨基酸。通过生物信息学分析方法预测蛋白三级结构、保守结构域、活性位点、信号肽等信息, 表明白及 PAL 基因与其他植物的 PAL 基因具有较高同源性, 且在保守结构域、活性位点上表现出一致性。在组织表达与激素响应方面, 白及 PAL 基因主要在根中表达, 且对外源 MeJA 与 SA 表现出不同的表达模式, 总体水平上在 MeJA 处理后基因的表达水平高于 SA 处理。本研究克隆得到的 PAL 基因为首次从白及中获得的全长序列, 该基因的成功克隆为深入研究白及中 PAL 基因功能与药用成分积累的调控机制等方面的研究提供基础资料。

将白及、铁皮石斛、拟南芥与甜菜的 PAL 基因的蛋白序列进行比对发现, BsPAL 在 N 端长于其他 3 种模式植物约 80 个氨基酸残基。进一步与更多的物种比较发现与铁皮石斛 (DcPAL, PKU67212.1) 具有相近的长度 (798 个氨基酸), 进化分析也证实 BsPAL 与其归于一支, 具有更近的亲缘关系。结合白及转录组数据中存在多条与 PAL 基因高度相似的 unigene 的结果^[18-19], 表明在白及中可能存在多个 PAL 基因, 这些家族成员的结构上可能存在较大的差异。有意思的是, 对板蓝根^[20]、石斛^[21]等多种植物的研究表明, 植物中不同的 PAL 基因在时空表达与逆境响应等方面, 不同的家族成员担任不同的角色, 差异表达。但这些基因以何种方式接受调控, 实现差异表达, 是否与不同基因的结构有关系是值得关注的课题。而对于药用植物而言, 探查 PAL 基因的时空表达模式, 筛选调控药用活性成分积累的主要基因具有非常重要的意义。本研究克隆得到的 PAL 基因在白及的根、茎、叶中均有表达, 且根中表达丰度显著高于茎与叶, 这对以块茎和根为药用部位的白及来说具有重要的指示意义。

前人研究表明 PAL 基因参与植物的生长、发育、抗逆等重要生命活动, 可以被环境激发, 如低温, 脱水和紫外线照射^[12], 也可被植物信号分子, 包括 ABA、SA 和 MeJA 激发活性^[22]。对抗、感黑腐病的花椰菜接种黑腐病菌后不同发育阶段的叶片中 PAL 基因的相对表达量进行分析, 结果表明抗病材料 PAL 基因的上调表达更早, 表达更强^[23]。以不同的信号分子作为对象, 研究基因的表达模式是植物研究中常用的方法, 而在药用植物的研究也证实, 许多诱导子可以调节重要次级代谢物的产生, 例如钝鳞紫背苔中的双联苜^[24], 拟南芥中的木质素和花青素^[22], 贯叶金丝桃中的黄酮类化合物及酚类物质^[25]。本研究采用外源施加 MeJA 和 SA 时, BsPAL 的表达量都发生了显著性变化, 这与前人报道相一致。在 MeJA 作用下, BsPAL 的相对表达量高于 SA 作用下的表达量水平, 但是否更有利于其中某种代谢产物的积累需要更进一步研究。因此, 对于 BsPAL 响应 SA 与 MeJA 信号分子, 参与到 2 种信号途径中, 同时主要在根中表达等这些特点对于阐述植物药用成分的积累机制乃至细胞工程调控目标成分的生产具有极其重要的指导意义。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

- [2] 汤逸飞, 阮川芬, 应晨, 等. 白及属植物化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2864-2872.
- [3] 谷荣辉, 洪利亚, 龙春林. 植物细胞培养生产次生代谢物的途径 [J]. 植物生理学报, 2013, 49(9): 869-881.
- [4] 赵新坤, 李赫龙, 余雕, 等. 木质素模型化合物合成研究的现状与展望 [J]. 生物质化学工程, 2018, 52(1): 41-52.
- [5] 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 基因的表达调控与研究展望 [J]. 果树学报, 2003, 20(5): 351-357.
- [6] 董艳珍. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2006(10): 31-33.
- [7] Bernardo A, Bai G, Guo P, et al. Fusarium graminearum-induced changes in gene expression between *Fusarium* head blight-resistant and susceptible wheat cultivars [J]. *Funct Integr Genom*, 2007, 7(1): 69-77.
- [8] Zeng S, Liu Y, Zou C, et al. Cloning and characterization of phenylalanine ammonia-lyase in medicinal *Epimedium* species [J]. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2013, 113(2): 257-267.
- [9] Song J, Wang Z. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(5): 939-952.
- [10] Wang X H, Gong M, Tang L, et al. Cloning, bioinformatics and the enzyme activity analyses of a phenylalanine ammonia-lyase gene involved in dragon's blood biosynthesis in *Dracaena cambodiana* [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(1): 97-107.
- [11] Kim D S, Hwang B K. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens [J]. *J Exper Bot*, 2014, 65(9): 2295-2306.
- [12] Muñozspinoza V A, Lópezcliment M F, Casaretto J A, et al. Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions [J]. *Frontiers Plant Sci*, 2015, 138(6): 997-1014.
- [13] Wang Z, Li J Y, Jia C H, et al. Molecular cloning and expression of four phenylalanine ammonia lyase genes from banana interacting with *Fusarium oxysporum* [J]. *Biologia Plantarum*, 2016, 60(3): 1-10.
- [14] Ma R F, Liu Q Z, Xiao Y, et al. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Isatis indigotica* Fort.: Molecular cloning, characterization, and expression

- analysis [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(11): 801-812.
- [15] 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.
- [16] Jin Q, Yao Y, Cai Y, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Dendrobium* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62352.
- [17] 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.
- [18] Macdonald J M J, D'Cunha G B D B. A modern view of phenylalanine ammonia lyase [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(3): 273-282.
- [19] 盖江涛, 陈振玺, 王鹏. 茄科植物 PAL 基因家族的鉴定和序列分析 [J]. *热带作物学报*, 2015, 36(3): 474-479.
- [20] Ma R F, Liu Q Z, Xiao Y, *et al.* The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Isatis indigotica* Fort.: Molecular cloning, characterization, and expression analysis [J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(11): 801-812.
- [21] 姚瑶. 石斛苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及表达分析 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2013.
- [22] Pietrowska-Borek M, Nuc K, Guranowski A. Exogenous adenosine 5'-phosphoramidate behaves as a signal molecule in plants; it augments metabolism of phenylpropanoids and salicylic acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2015, 94: 144-152.
- [23] 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菌胁迫下的表达分析 [J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 2012, (4): 87-92.
- [24] Yu H N, Liu X Y, Gao S, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from liverwort *Plagiochasma appendiculatum* [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2014, 117(2): 265-277.
- [25] Dong C J, Shang Q M. Genome-wide characterization of phenylalanine ammonia-lyase gene family in watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. *Planta*, 2013, 238(1): 35-49.