

• 药材与资源 •

膜荚黄芪 3 个苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析

刘俊频¹, 李胜立², 袁元¹, 郑玲辉², 全雪丽^{1*}, 吴松权^{1*}

1. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133000

2. 浙江海正药业股份有限公司, 浙江 台州 318000

摘要:目的 克隆膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因家族成员,分析它们在不同组织中的表达模式与毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量变化,为揭示膜荚黄芪毛蕊异黄酮葡萄糖苷积累的分子机制提供理论依据。方法 以膜荚黄芪总 RNA 为模板,采用同源克隆法和 RACE 技术克隆 PAL 基因并进行生物信息学分析;利用实时荧光定量 PCR 技术测定 PAL 基因在根、茎、叶中的表达量;采用 HPLC 法测定了根、茎、叶中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量。结果 从膜荚黄芪中克隆了 3 个 PAL 基因 AmPAL1、AmPAL2、AmPAL3, Genbank 登陆号分别为 KY086279、KY086280、KY086281。AmPAL1、AmPAL2 和 AmPAL3 的全长 cDNA 长度分别为 2 508、2 401、2 498 bp, 均含有 2 157 bp 的完整开放阅读框, 编码 718 个氨基酸。蛋白质序列分析表明, 它们均含典型的 PAL 酶活中心序列, 与植物 PAL 蛋白同源, 且与同属于豆科的植物 PAL 蛋白相似性最高。系统进化树表明, AmPAL1 与 AmPAL2 和 AmPAL3 聚为不同的亚类。实时荧光定量 PCR 分析发现, 这些基因在根、茎、叶中表达模式不同, 在检测的所有组织中 AmPAL1 的表达量最高、AmPAL2 的表达量次之、AmPAL3 的表达量最低, 只有 AmPAL2 的表达水平与毛蕊异黄酮葡萄糖苷积累变化一致(即根>茎>叶)。结论 从膜荚黄芪中克隆的 AmPAL1、AmPAL2 和 AmPAL3 是典型的 PAL 基因家族成员, 推测它们在膜荚黄芪各组织发育过程中起着不同的作用, 且 AmPAL2 可能参与了毛蕊异黄酮葡萄糖苷的积累。

关键词: 膜荚黄芪; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 表达分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)07-1669-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.026

Cloning and expression of three PAL genes in *Astragalus membranaceus*LIU Jun-pin¹, LI Sheng-li², YUAN Yuan¹, ZHENG Ling-hui², QUAN Xue-li¹, WU Song-quan¹

1. Agricultural College, Yanbian University, Yanji 133000, China

2. Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China

Abstract: Objective To disclose the molecular mechanism of calycosin-7-O- β -D-glucoside (CG) accumulation in *Astragalus membranaceus*, we cloned PAL genes and analyzed the expression patterns of them and changes of CG contents in different tissues of *A. membranaceus*. **Methods** PAL genes were cloned with the methods of homology cloning and RACE technique using the total RNA as template and the analysis of bioinformatics on the cloned genes was carried out, gene expressions in root, stem, and leaf were determined with real-time PCR method, and CG content in root, stem, and leaf were analyzed by HPLC methods. **Results** Three PAL genes were cloned from *A. membranaceus*. The genbank accession number was KY086279 (AmPAL1), KY086280 (AmPAL2), and KY086281 (AmPAL3), respectively; The full-length cDNA of them was 2 508 bp, 2 401 bp, and 2 498 bp, respectively; And they all consisted of 2 157 bp open reading frame encoding 718 amino acids. Deduced AmPAL proteins had typical active sequences of PAL proteins, they were homology with other PAL proteins, and they shared the highest identities with PAL proteins of leguminous plants. Phylogenetic tree analysis showed AmPAL1 belonged to the different sub-class with the sub-class of AmPAL2 and AmPAL3. Real-time PCR analysis indicated that expression levels of AmPALs were different from each other, the expression level of AmPAL1

收稿日期: 2018-09-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目“延边地区膜荚黄芪生物合成毛蕊异黄酮葡萄糖苷的分子机制研究”(21462044); 国家自然科学基金资助项目“转 PAL 基因膜荚黄芪种质改良研究(30860036)”; 吉林省自然科学基金项目“膜荚黄芪 cDNA 文库构建与次生代谢功能基因挖掘”(201115228)

作者简介: 刘俊频(1994—), 女, 硕士在读, 研究方向为特种植物资源。Tel: 17519473336 E-mail: 925191115@qq.com

*通信作者 全雪丽 Tel: (0433)2435590 E-mail: qxl2000@aliyun.com

吴松权 Tel: (0433)2435633 E-mail: arswsq@ybu.edu.cn

was the highest, the expression level of AmPAL2 was the next, and that of AmPAL3 was lowest in all detected tissues, and only the expression levels of AmPAL2 was similar to the changes of CG contents in different tissues (root > stem > leaf). **Conclusion** The cloned AmPAL1, AmPAL2, and AmPAL3 from *A. membranaceus* were typical genes of PAL, each might have different function in developing of different tissues, and AmPAL2 might involve in CG accumulation in different tissues.

Key words: *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning; expression analysis; real-time PCR

膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 是常用中药, 具有补气固表、利水消肿、生津养血、脱毒排脓的功效^[1]。膜荚黄芪的活性成分主要包括皂苷类、多糖类和异黄酮类^[2]。其中异黄酮类化合物毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (calycosin-7-O-β-D-glucoside) 是评价黄芪药材质量的“标记化合物”之一^[1], 具有抗炎、抗氧化、抗病毒、保肝和增强骨质再生等多种药理作用^[3-4]。随着黄芪野生资源的减少, 现主要依赖于人工栽培, 但由于人们不了解毛蕊异黄酮葡萄糖苷生物合成机制, 盲目生产, 导致在栽培过程中植株内毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量不稳定。目前, 黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的测定主要采用高效液相色谱法 (HPLC), 此法具有操作简便、准确可靠和重复性好的优点^[1,5]。

苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 催化 L-苯丙氨酸形成肉桂酸, 是生物合成苯丙烷类化合物的第一步, 也是苯丙烷途径的关键酶和限速酶^[6]。而苯丙烷类化合物是植物中生物合成黄酮、异黄酮、花青素、香豆素、芪类和水杨酸等酚类产物的前体物质^[7]。PAL 基因在植物中通常以小的基因家族形式存在, 如拟南芥中存在 4 个 PAL 基因 (AtPAL1、AtPAL2、AtPAL3、AtPAL4), 其中 AtPAL1 和 AtPAL2 聚为一类, 而 AtPAL3 和 AtPAL4 聚为另一大类^[8-10]。吴松权等^[11]首次从膜荚黄芪中克隆一个 PAL 基因 (AmPAL), Genbank 登陆号为 EF567076, 但并没有进行基因表达分析, 也没有分析 AmPAL 基因的表达与其下游次生代谢产物积累之间的关系。本研究利用同源克隆和 RACE 技术从膜荚黄芪中克隆 PAL 基因家族成员, 并用生物信息学分析这些 PAL 基因的序列特征; 利用实时荧光定量 PCR 技术测定 PAL 基因家族成员在不同组织中的表达特性, 分析每个 PAL 基因表达与下游产物毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量变化的关系, 为揭示膜荚黄芪毛蕊异黄酮葡萄糖苷积累的分子机制奠定理论依据。

1 材料、试剂和仪器

1.1 材料

膜荚黄芪种植于延边大学农学院中草药圃地, 由延边大学全雪丽教授鉴定为黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.。取一部分新鲜的根、茎、

叶, 用液氮冷冻后保存于 -80 °C 超低温冰箱中, 用于总 RNA 提取; 另一部分样品于 50 °C 的烘干箱中烘干至恒定质量, 用于毛蕊异黄酮葡萄糖苷的提取。

1.2 试剂和仪器

TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司; 合成 cDNA 第一条链的试剂盒购自 Toyobo 公司; 5'和 3' RACE 试剂盒购自 Clontech 公司; DNA 凝胶回收试剂盒和 PMD-19T 载体试剂盒购于宝生物工程 (大连) 有限公司; 对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 110907) 购自上海融禾医药科技有限公司, 质量分数大于 98%; 乙腈和甲醇为色谱级, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

T100™ 型 PCR 仪 (Bio-Rad 公司); Mx3005P 型荧光定量 PCR 仪 (安捷伦公司); -80 °C 超低温冰箱 (海尔集团有限公司); CR22G 型高速冷冻离心机 (Hitachi 公司); MI-78A 型高压蒸汽灭菌锅 (施都凯仪器公司); 岛津高效液相色谱仪 (LC-10ATVP Plus); Unitary C₁₈ 反相色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 华谱科仪科技有限公司; RE-2000B 型旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); DLSB-5/20 型低温冷却液循环泵 (上海豫康科教仪器设备有限公司); KQ-500D 型数控超声波清洗器 (昆山市超速仪器有限公司); BAO-250A 型精密鼓风干燥箱 (上海施都凯仪器设备有限公司); RHP-600 型高速多功能粉碎机 (浙江荣浩工贸有限公司)。

2 方法

2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

参照 Invitrogen 公司的 TRIzol 一步法提取总 RNA, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 C 超微量分光光度计检测其质量和浓度; 按照 Toyobo 公司反转录试剂盒的步骤合成 cDNA 第 1 条链。

2.2 PAL 基因保守区克隆

从 NCBI 的 Genbank 中下载已登陆的豆科植物及拟南芥等模式植物的 PAL 基因同源序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计了 1 对 AmPAL 基因的兼并引物 AmPAL-DF 和 AmPAL-DR (表 1)。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。以合成的 cDNA 第 1 条链为模板, 进行 PCR 扩增, 反应体系

为 20 μL: 10×PCR Buffer 2.0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL, 2 mmol/L dNTP 2.0 μL, cDNA 模板 1 μmol/L, 2.0 μL, 上游引物 AmPAL-DF 2.0 μL, 2 μmol/L 下游引物 AmPAL-DR 2.0 μL, 5 U ExTaq 酶 0.2 μL, 剩余用超纯水补足。反应条件: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 32 个循环; 72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物在 1.2%琼脂糖凝

胶上电泳, DNA 凝胶回收试剂盒回收后, 连入 PMD-19T 载体。将重组质粒转化至大肠杆菌感受态 JM109, 通过蓝白斑筛选, 挑取白斑, 将提取的重组质粒 DNA 原液稀释 50 倍后, 使用 M13 引物(表 1)进行 PCR 检测。PCR 检测的反应体系和条件同上述克隆 PCR, 检测为阳性的克隆菌株进行测序, 测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

引物名称	核苷酸序列 (5'-3')	用途
AmPAL-DF	GGAATATTT(C)GGA(C)AATGGT(A)AC	保守区克隆
AmPAL-DR	ACATCA(g)ATCAAA(g)GGGTTA(g)TC	
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT	PCR 检测
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC	
AmPAL1-gsp1	TCAGCCAAAACAGCTAACACGTTTGCTT	AmPAL1 的 5'RACE 克隆
AmPAL1-gsp2	ACTGAATCCAATTGTACTGCCACACA	AmPAL1 的 3'RACE 克隆
AmPAL2-gsp1	ACTTGGCTTACACAGTCCTTTACTGAGC	AmPAL2 的 5'RACE 克隆
AmPAL2-gsp2	GATCCTTTACAGAAGCCAAAACAAGATA	AmPAL2 的 3'RACE 克隆
AmPAL3-gsp1	GCCACACGCTGCCACAAAATGCC	AmPAL3 的 5'RACE 克隆
AmPAL3-gsp2	CAAGCATGGCTGCTCTTGTGGCAT	AmPAL3 的 3'RACE 克隆
AmPAL1-CF	ATGGAGGGAGAAGGAGGCAAT	AmPAL1 的编码区克隆
AmPAL1-CR	CTAAGAAATTGGAAGAGGAGCACC	
AmPAL2-CF	TCTCTAAAACATTTGTATTAACA	AmPAL2 的编码区克隆
AmPAL2-CR	AAAATATTTCTAAAATAAATGAT	
AmPAL3-CF	TTCTCTCTGAACATTTTGCATT	AmPAL3 的编码区克隆
AmPAL3-CR	AACGTTTCCAAAAGTAAATGAA	
AmPAL1-qF	CTTAGGTCCATCTGTTCTTTTGGC	AmPAL1 的荧光定量 PCR
AmPAL1-qR	CACCCAAAGTTATGACAAACAAATG	
AmPAL2-qF	TGGCGTCTTATTGTTCCGAGC	AmPAL2 的荧光定量 PCR
AmPAL2-qR	TGGCTTACACAGTCCTTTACTGAGC	
AmPAL3-qF	CCATTTACTTTTGAAACGTTTCT	AmPAL3 的荧光定量 PCR
AmPAL3-qR	TCCTCTTGACATTGAGGAAACG	
Am18S-qF	CCATAAACGATGCCGACCAG	Am18 S 的荧光定量 PCR
Am18S-qR	AGCCTTGCGACCATACTCCC	

2.3 5'RACE 和 3'RACE 扩增

根据 3 个 PAL 基因家族的保守序列分别设计 3 对 5'RACE 和 3'RACE 的特异引物 AmPALsGSP1 和 AmPALsGSP2 (表 1), 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。5'RACE 和 3'RACE 扩增的具体反应体系和条件参照 Clontech 公司的 SMARTer™ RACE cDNA 扩增试剂盒说明书进行。PCR 产物克隆与测序同上述“2.2”项。

2.4 PAL 基因编码区克隆

用 Lasergene 软件包中 SeqMan 分别对 3 个 AmPAL 家族的保守区、5'RACE 和 3'RACE 的序列进行拼接获得了 3 个 AmPAL 家族的全长 cDNA, 并分别设计了 3 对包括完整开放阅读框(编码区)的引物(表 1)。反应体系与保守区克隆一致, 反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 60 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸

7 min。PCR 产物克隆与测序同“2.2”项。

2.5 生物信息学分析

用 Lasergene 软件预测编码区、蛋白相对分子质量和等电点；通过 NCBI-blast 进行同源性分析并下载其他植物 PAL 氨基酸序列；利用 ExPASy ProtScale 服务器分析蛋白疏水性；利用 PSIPRED 服务器对蛋白质二级结构进行预测，用 TargetP 1.1 服务器预测亚细胞定位情况；用 SignalP 4.1 服务器预测信号肽；通过 Lasergene 软件比对 PAL 蛋白家族，分析其保守域和结构域，构建 PAL 氨基酸序列系统发育进化树。

2.6 实时荧光定量 PCR

针对获得的 3 个 AmPAL 家族的特异序列分别设计了 3 对荧光定量 PCR 引物（表 1），所用内参基因为黄芪 18 S 基因（Genbank 登陆号为 AF359594，表 1）。反应体系为 20 μ L，除了 SYBR 10 μ L 和 ROX 2 μ L 外，其他同“2.2”项。反应程序：95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min，95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，60 $^{\circ}$ C 退火 10 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s，40 个循环。以标准的 AmPAL 和 18 S 基因拷贝数的对数值为横坐标，以测得的 CT 值为纵坐标，绘制各自的标准曲线。之后，根据未知样品的 CT 值，即可在各自标准曲线中得到样品的拷贝数，再求出相对于内参基因 18 S 的相对表达量。每组样品进行 3 次重复检测。

2.7 毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的测定

毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的测定，采用李子羊等^[12]的 HPLC 方法进行，每组样品 3 次重复。

2.8 统计分析

数据分析采用 SPSS 19.0 软件的 ANOVA 分析，多重比较采用 Duncan 新复极差法 ($P < 0.05$)，相关性分析采用 Pearson 相关系数。

3 结果与分析

3.1 AmPAL 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

以膜荚黄芪根总 RNA 反转录的 cDNA 为模板，用兼并引物扩增得到了 1 条大约 750 bp 的片断（图 1 泳道 1），测序结果显示 AmPAL 基因由长度均为 752 bp 的 3 个基因构成。

根据保守区测序结果设计了 3 对 5'RACE 和 3'RACE 的特异引物（表 1），PCR 扩增结果分别获得 AmPAL1 的 5'端序列 938 bp（图 1 泳道 2）和 AmPAL1 的 3'端序列 1 989 bp（图 1 泳道 3）、AmPAL2 的 5'端序列 1 739 bp（图 1 泳道 4）和 AmPAL2 的 3'端序列 1 270 bp（图 1

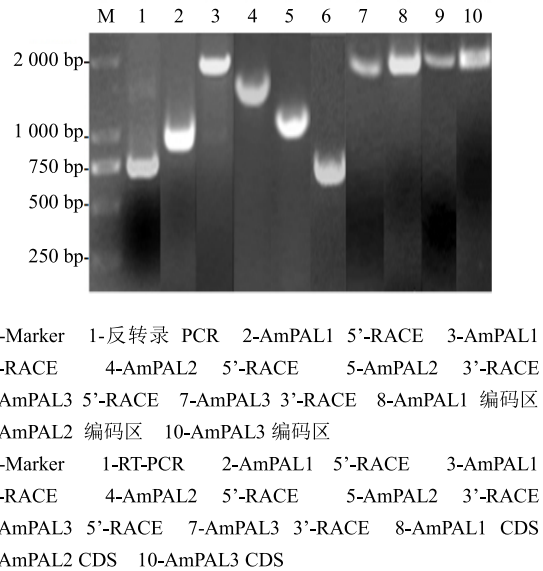


图 1 膜荚黄芪 PAL 基因 PCR 结果

Fig. 1 PCR results of AmPAL genes

泳道 5)、AmPAL3 的 5'端序列 601 bp(图 1 泳道 6) 和 AmPAL3'端序列 1 939 bp（图 1 泳道 7）。

使用 Lasergene 软件包中 SeqMan 分别对 3 个 AmPAL 家族的序列拼接获得了 3 个 AmPAL 家族的全长 cDNA 序列，利用设计的 3 对包括编码区在内的引物(表 1)，PCR 结果分别获得了 AmPAL1 的 2 157 bp 序列(图 1 泳道 8)、AmPAL2 的 2 210 bp 序列(图 1 泳道 9)和 AmPAL3 的 2 215bp 序列(图 1 泳道 10)，测序结果与拼接结果完全一致，Genbank 登陆号分别为 KY086279 (AmPAL1)、KY086280 (AmPAL2) 和 KY086281 (AmPAL3)。

核苷酸序列和氨基酸序列分析结果表明 AmPAL1 的 cDNA 全长为 2 508 bp，其中编码区为 2 157 bp，5'非翻译区(5'-UTR)为 81 bp，3'非翻译区(3'-UTR)为 242 bp，以及 28 bp 的 polyA 尾，推测其编码 718 个氨基酸；AmPAL2 的 cDNA 全长为 2 401 bp，其中编码区为 2 157 bp，5'非翻译区(5'-UTR)为 105 bp，3'非翻译区(3'-UTR)为 110 bp，以及 29 bp 的 polyA 尾，推测其编码 718 个氨基酸；AmPAL3 的 cDNA 全长为 2 498 bp，其中编码区为 2 157 bp，5'非翻译区(5'-UTR)为 111 bp，3'非翻译区(3'-UTR)为 205 bp，以及 25 bp 的 polyA 尾，推测其编码 718 个氨基酸。核苷酸序列相似性分析表明，AmPAL1 与 AmPAL2 和 AmPAL3 的一致性分别为 79.8%和 78.3%，AmPAL2 与 AmPAL3 的一致性为 92.3%。

3.2 AmPAL 生物信息学分析

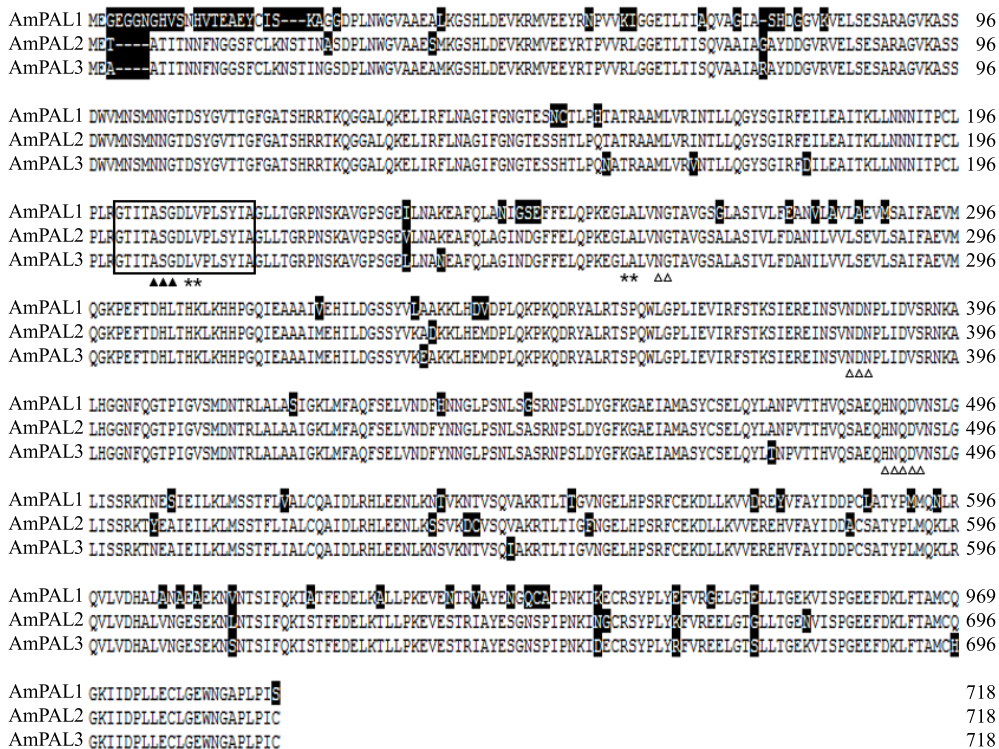
用 Lasergene 软件包中 Protean 对预测的氨基酸序列分析表明, AmPAL1 蛋白相对分子质量 77 920, 等电点为 5.86, 酸性氨基酸 82 个, 碱性氨基酸 66 个, 极性氨基酸 188 个, 疏水性氨基酸 259 个; AmPAL2 蛋白相对分子质量 78 260, 等电点为 5.92, 酸性氨基酸 80 个, 碱性氨基酸 67 个, 极性氨基酸 197 个, 疏水性氨基酸 257 个; AmPAL3 蛋白相对分子质量 78 430, 等电点为 5.98, 酸性氨基酸 81 个, 碱性氨基酸 68 个, 极性氨基酸 197 个, 疏水性氨基酸 255 个。

氨基酸序列相似性分析表明, AmPAL1 与 AmPAL2 和 AmPAL3 的一致性分别为 88.1% 和 88.5%, AmPAL2 与 AmPAL3 的一致性为 96.4%。在 NCBI 网站上进行保守结构预测分析, 3 个 AmPAL 蛋白均含有 phe_am_lyase、Lyase_aromatic、PAL-HAL、HutH 4 个结构域, 属于 Lyase_I_like 和 PLN02457 超家族, 均含有苯丙氨酸解氨酶的特征序列 GTITASGDLVPLSYIA (200-216) [13]。氨基酸序列比对结果如图 2 所示, AmPAL1 与 AmPAL2 和

AmPAL3 之间的差异在 N 端较大, 不过 3 个 AmPAL 蛋白均含有 PAL 保守的脱氨基位点 (L-208、V-209、L-258、A-259) 和催化活性位点 (N-262、G-263、NDN-[384-386]、HNQDV-[488-492]) [14]。而且, 其特征序列中均包含 1 个丙氨酸-丝氨酸-甘氨酸三联体的保守区域, 它可以自催化转换, 通过内部环化脱水, 形成 MIO 电辅基, 而丝氨酸残基则被认为是各个物种中 PAL 蛋白中高度保守的活性位点 [15]。

疏水性分析显示, 3 个 AmPAL 蛋白均为亲水性蛋白; 二级结构预测结果, 3 个 AmPAL 蛋白均以 α -螺旋 (54.1%~55.1%) 和无规卷曲 (41.6%~42.1%) 为主, β -折叠 (3.9%~4.2%) 含量则较少; 不存在信号肽序列; 定位在细胞质。

为了研究 3 个 AmPAL 与其他植物 PAL 的进化关系, 利用 Clustal W 方法对氨基酸序列比对后, 构建了系统进化树, 结果如图 3 所示, 基本按照不同科聚类, 3 个 AmPAL 与同属于豆科的蒺藜苜蓿和大豆聚为一类, 但不同科之间 PAL 有很高的相似性。与拟南芥 PAL 家族比较, 3 个 AmPAL 均与 AtPAL1 和 AtPAL2 亲缘关系较近, 同时 AmPAL1



黑色-氨基酸差异 方框-PAL 的特征序列 星号-保守的脱氨基位点 空心三角形-催化活性位点 实心三角形-丙氨酸-丝氨酸-甘氨酸三联体
 Black color-difference of amino acid box-characteristic sequence of PAL star-conserved deamination site hollow triangle-catalytic active site
 solid triangle-Ala-Ser-Gly triad

图 2 AmPAL 氨基酸序列多重比对
 Fig. 2 Multiple sequence alignment of amino acids of AmPAL proteins

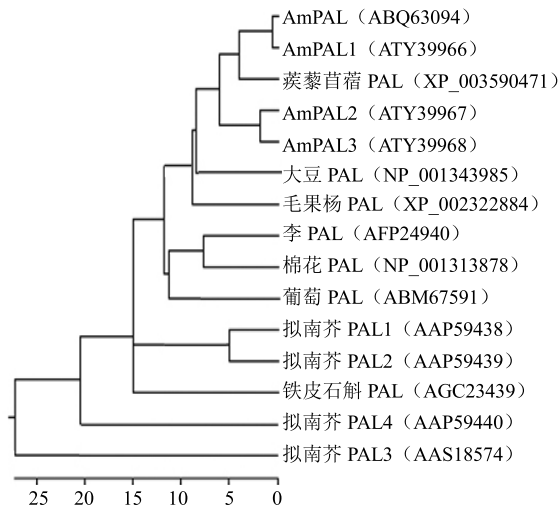


图 3 膜荚黄芪 PAL 与其他植物 PAL 氨基酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic relationship of amino acid sequences between AmPALs and other PALs

和已报道的 AmPAL^[11]聚为亚类，明显区别于 AmPAL2 和 AmPAL3 构成的亚类。

3.3 AmPAL 组织特异性表达与毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的变化

利用 3 对 AmPAL 的荧光定量 PCR 引物(表 1)进行特异 PCR，分别获得了长度为 183、241 和 125 bp 的特异序列，测序结果与 AmPAL1、AmPAL2 和 AmPAL3 的 cDNA 序列完全一致。之后，运用实时荧光定量 PCR 技术，分析了膜荚黄芪植株根、茎、叶 3 个不同组织中 3 个 AmPAL 的表达特性。结果如图 4 所示，3 个 AmPAL 在根、茎、叶中均表达，但是表达量明显存在差异，在检测的所有组织中 3 个 AmPAL 表达量大小顺序为 AmPAL1 > AmPAL2 > AmPAL3；但只有 AmPAL2 在不同组织中的表达量与毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量变化一致（即根 > 茎 > 叶）（图 5）且 Pearson 相关系数为 0.949，AmPAL1 在不同组织中的表达量大小为茎 > 根 > 叶，而 AmPAL3 在根和茎中表达量一致，在叶中表达量最小。

4 讨论

黄芪黄酮类化合物主要包括黄酮、黄酮醇类、异黄酮类和花青素等，其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷是含量最高的异黄酮类化合物，它具有多种药理作用，是评价黄芪药材质量的标记化合物之一^[1-2]。PAL 是生物合成苯丙烷类化合物的第一个酶，也是生物合成异黄酮的关键酶之一^[16]。植物 PAL 通常由

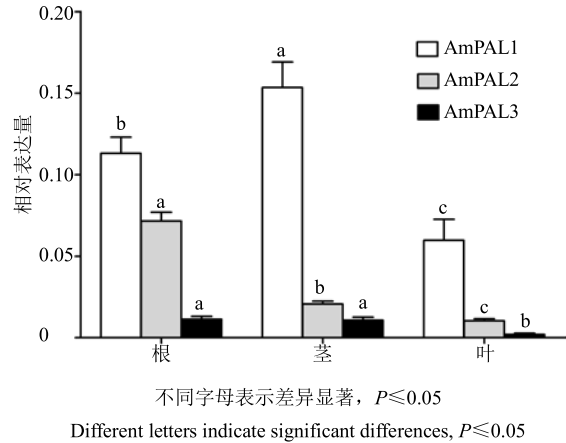


图 4 AmPAL 组织特异性表达

Fig. 4 Tissue-specific expression of AmPAL

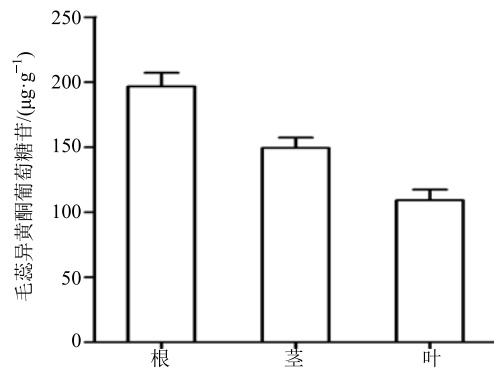


图 5 膜荚黄芪不同组织中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量

Fig. 5 Calycosin-7-O-β-D-glucoside content in different tissues of *A. membranaceus*

多个基因编码，它们的不同成员在不同组织中的表达特性不同，参与的代谢途径也不同^[8-9]。但是，还不清楚哪个或哪些 PAL 基因参与了膜荚黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷的生物合成。

本研究利用同源克隆和 RACE 技术，从膜荚黄芪中克隆了 3 个 AmPAL，生物信息学分析结果表明这 3 个 AmPAL 是典型的 PAL 基因家族成员。由进化树分析结果可知，相对于拟南芥 PAL3 和拟南芥 PAL4，所克隆的 3 个 AmPAL 与拟南芥 PAL1、PAL2 亲缘关系更近（图 3）。有研究表明在拟南芥 4 个 PAL 基因中，只有拟南芥 PAL1 和 PAL2 参与了黄酮类的生物合成^[10]，暗示所克隆的 3 个 AmPAL 均与黄酮类生物合成密切相关^[10]。不过，这 3 个 AmPAL 在不同组织中的表达特性明显不同（图 4），AmPAL2 在根、茎、叶中的表达量均介于拟南芥 PAL1 和 PAL3 之间，并且只有 AmPAL2 在不同组织中的表达方式与毛蕊异黄酮葡萄糖苷的积累相关（图 5），而且二者之间还存在较高的相关性

(0.949), 推测 AmPAL2 与毛蕊异黄酮葡萄糖苷的生物合成密切相关。不过, 这还需要进一步的实验来验证。

总之, 本研究成功地从膜荚黄芪中克隆了 3 个 AmPAL, 推测这些基因可能与黄酮类生物合成相关, 其中 AmPAL2 的表达与毛蕊异黄酮葡萄糖苷的积累密切相关。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李延勋, 栗章彭, 颜世利, 等. 膜荚黄芪化学成分研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 409-411.
- [3] Ma C H, Wang R R, Tian R R, *et al.* Calycosin 7-*O*- β -D-glucopyranoside, an anti-HIV agent from the roots of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* [J]. *Chem Nat Compd*, 2009, 45(2): 282-285.
- [4] Jian J, Sun L, Cheng X, *et al.* 2015. Calycosin-7-*O*- β -D-glucopyranoside stimulates osteoblast differentiation through regulating the BMP/WNT signaling pathways [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 454-460.
- [5] 宋成英, 封加福. HPLC 同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 115-117.
- [6] Huang J, Gu M, Lai Z, *et al.* Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(4): 1526-1538.
- [7] 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(2): 781-793.
- [8] Cochrane F C, Davin L B, Lewis N G. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: Kinetic characterization of the four PAL isoforms [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(11): 1557-1564.
- [9] 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, 56(2): 123-130.
- [10] Olsena K M, Lea U S, Slimestad R, *et al.* Differential expression of four *Arabidopsis* PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis [J]. *Plant Physiol*, 2008, 165(14): 1491-1499.
- [11] 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.
- [12] 李子羊, 刘佳, 孙海燕, 等. IBA 浓度对膜荚黄芪不定根生物量、毛蕊异黄酮及毛蕊异黄酮葡萄糖苷积累的影响 [J]. 延边大学农学学报, 2016, 38(3): 209-213.
- [13] Schuster B, Rétey J. Serine-202 is the putative precursor of the active site dehydroalanine of phenylalanine ammonia lyase. Site-directed mutagenesis studies on the enzyme from parsley (*Petroselinum crispum* L.) [J]. *FEBS Lett*, 1994, 349(2): 252-254.
- [14] 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): 1-7.
- [15] Ritter, H, Schulz G E. Structural basis for the entrance into the phenyl-propanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(12): 3426-3436.
- [16] Pan H, Wang Y, Zhang H, *et al.* Phenylalanine ammonia lyase functions as a switch directly controlling the accumulation of calycosin and calycosin-7-*O*- β -D-glucoside in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* plants [J]. *J Exp Bot*, 2008, 59(11): 3027-3037.