

• 药材与资源 •

红花 PAL 家族全基因组分析及其在悬浮细胞中的表达

郭英男, 刘月扬, 马静雨, 张敬, 马鑫彤, 张馨月, 刘建雨, 姚娜, 刘秀明*, 李海燕*

吉林农业大学生命科学学院, 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118

摘要:目的 完成红花 *Carthamus tinctorius* PAL 基因家族的生物信息学分析, 克隆 1 条红花 PAL4 基因编码区序列, 通过农杆菌介导的方法, 实现 *CtPAL4* 在红花悬浮细胞中的过表达。方法 在红花基因组测序基础上, 对红花 PAL 家族进行全基因组分析, 利用荧光定量 PCR (RT-PCR) 方法克隆 1 条红花 PAL4 编码区序列, 并进行生物信息学分析, 利用 clustalW1.83 软件构建系统进化树, 在 *CtPAL4* 基因序列 2 端引入酶切位点 *Bgl* II 和 *BstE* II, 构建含有 35 S 启动子的植物超表达载体 pCAMBIA3301-*CtPAL4*, 并在红花悬浮细胞中进行超表达。结果 红花基因组中注释到 6 个 PAL 基因, 分析显示 5 个基因具有典型的苯丙氨酸解氨酶的功能结构域及活性位点, 并进行启动子和进化分析。*CtPAL4* 基因编码 707 个氨基酸, 相对分子质量为 76 820, 具有典型的苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 基因的功能结构域及活性位点, 编码蛋白的三维结构与 PAL 的 X 射线蛋白质晶体结构类似。系统进化分析表明, *CtPAL4* 基因编码的蛋白与拟南芥的亲缘关系最近。GUS 染色结果证实, 成功建立红花悬浮细胞遗传转化体系, 并初步实现了 *CtPAL4* 基因在红花悬浮细胞中的过表达。结论 成功克隆 1 条红花 PAL4 编码区基因 *CtPAL4*, 并构建了植物表达载体 pCAMBIA3301-*CtPAL4*, 初步在红花悬浮细胞中实现了超表达, 为研究 *CtPAL4* 基因在红花黄酮代谢途径的功能奠定基础。

关键词: 红花; PAL 基因; 黄酮合成; 全基因组; 悬浮细胞

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3362-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.024

Genome analysis of PAL gene family from *Carthami Flos* and its expression in suspension cells

GUO Ying-nan, LIU Yue-yang, MA Jing-yu, ZHANG Jing, MA Xin-tong, ZHANG Xin-yue, LIU Jian-yu, YAO Na, LIU Xiu-ming, LI Hai-yan

Engineering Research Center of the Chinese Ministry of Education for Bioreactor and Pharmaceutical Development, College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective The bioinformatics analysis of the PAL gene family from *Carthami Flos* were performed, and cloned a sequence encoding the PAL4 gene of *Carthami Flos*. The overexpression of *CtPAL4* in *Carthami Flos* suspension cells was analyzed, laying a foundation for the study of the function of *CtPAL4* gene in *Carthami Flos* flavonoids metabolism pathway. **Methods** On the basis of *Carthami Flos* genome sequencing, the PAL family of *Carthami Flos* was analyzed. Coding region of PAL4 was cloned by RT-PCR and bioinformatics analysis was performed. The phylogenetic tree was constructed by clustalW 1.83 software, *Bgl* II and *BstE* II restriction sites were introduced to construct over-expression vector pambia3301-*CtPAL4* containing 35 S promoter. It was overexpressed in suspension cells of *Carthami Flos* through agrobacterium mediated method. **Results** Six PAL genes were annotated in *Carthami Flos* genome sequencing. The analysis showed that five genes of PAL gene family had typical functional domain and active site of phenylalanine ammonia lyase, and promoter and evolution analysis were carried out. The *CtPAL4* gene encoded 707 amino acids with a molecular weight of 76 820. The *CtPAL4* gene had typical functional domain and active site of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene. The three-dimensional structure of the coding protein was similar to the crystal structure of the X-ray protein in PAL family. Phylogenetic analysis showed that the

收稿日期: 2020-09-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31771868); 国家自然科学基金资助项目 (31501366); 吉林省科技厅项目 (20190201172JC); 吉林省科技厅项目 (20190201175JC); 吉林农业大学大学生创新创业训练计划项目

作者简介: 郭英男, 硕士研究生, 研究方向为生物反应器与代谢调控。E-mail: 260289791@qq.com

*通信作者: 刘秀明, 博士, 高级实验师, 研究方向为生物反应器与代谢调控。Tel: (0431)84533428 E-mail: xiuming1211@163.com
李海燕, 教授, 研究方向为生物反应器。Tel: (0431)84532885 E-mail: hyl99@163.com

protein encoded by CtPAL4 was the closest relationship of *Arabidopsis thaliana*. GUS characterization results confirmed that the genetic transformation system of *Carthami Flos* suspension cells was established successfully, and CtPAL4 gene was expressed preliminarily in *Carthami Flos* suspension cells. **Conclusion** Coding region gene of *Carthami Flos* PAL4 was cloned and a plant expression vector pCAMBIA3301-CtPAL4 was constructed successfully, which was initially overexpressed in *Carthami Flos* suspension cells.

Key words: *Carthami Flos*; PAL gene; flavonoid biosynthesis; genome-wide; suspension cells

红花 *Carthamus tinctorius* L.为菊科红花的干燥管状花。辛、温，归心、肝经。气微香，味微苦。具有活血通经、散瘀止痛功效。主治经闭、痛经、胸痹心痛、跌扑损伤和疮疡肿痛等^[1]。《本草纲目》记载红花汁与血同类，“故能行男子血脉，通女子经水。多则行血，少则养血”^[2]。现代药理、临床研究证明，红花具有扩张血管、抗凝血、抗血栓、抗炎镇痛、抗氧化、抗肿瘤、保护心脑血管、保护神经、降压和增强免疫等活性^[3-6]。红花花瓣最主要的活性化学成分是黄酮类化合物，主要分为黄酮类、黄酮醇类、醌式查耳酮类和二氢黄酮类。醌式查耳酮类的红花黄色素(SY)占1/5~1/3^[5-6]，是红花的主要有效成分，有抗心肌缺血、扩张冠状动脉、抑制血小板凝聚、促进血液循环、抗氧化、抗炎等药理作用^[7-9]。

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)将苯丙氨酸脱氨转化成反式肉桂酸，该反应是红花黄酮类生物合成途径的起始反应，苯丙烷类合成代谢的关键酶。PAL在植物发育过程中起作用，对苯基丙烷次生代谢产物进行调控，对多种环境刺激产生响应^[10-13]。PAL通常是由小的多基因家族编码^[12]，PAL基因家族常含有的2~6个家族成员(PAL1、PAL2和PAL3等)在植物中的表达具有组织特异性^[13]，其相对分子质量在220 000~340 000，是一种由4个77 000~83 000亚基构成的寡聚酶^[14-15]。PAL受内部钝化因子、调节因子和末端产物的调控，是一种诱导酶，当植物在受到病原体攻击、机械损伤、紫外线照射、盐胁迫、植物激素(乙烯等)和光等刺激后，快速在转录水平上诱导PAL编码基因的表达^[16]。

利用真核或原核微生物研究一个简单的次生代谢产物的生物合成，至少需转入多个植物外源基因才能实现^[17]。并且利用原核微生物表达植物蛋白酶，尚存在缺乏辅助因子、蛋白折叠错误、宿主膜的插入和产生包涵体等问题^[18-19]。因此，与微生物相比，植物细胞含有次生代谢产物合成和储存的全部遗传信息。红花植株的生长周期为1~2年，故在整株植物水平上进行遗传操作较困难，而组织培养产生再生植株则容易存在生根困难和再生率低等问题^[20-21]，这极大地

限制了红花功能基因研究和红花黄酮生物合成研究的进程。未分化的植物愈伤组织在受控的液体培养基中进行不断搅动或摇动，可产生悬浮细胞。悬浮细胞具有增殖迅速、遗传背景清晰、分散性好、可体外操作且易控制^[20-22]的优点，成为研究植物次生代谢产物及合成生物学必不可少的工具，可以作为体外大量合成植物次生代谢产物的良好生物反应器^[22]。

因此，建立转基因红花悬浮细胞遗传体系，对进一步深入研究黄酮合成代谢调控具有重要的意义。目前，已有相关研究利用悬浮细胞，在基因和细胞水平上进行克隆表达，如利用烟草^[23]、白桦^[24]、雷公藤^[25-27]、绿竹^[28]、甘草^[29]、苹果^[30]悬浮细胞，研究其功能基因在生长发育、次生代谢和环境适应中的作用^[31]。但是，通过红花悬浮细胞研究苯丙烷类次生代谢关键酶基因的相关研究，尚无报道。本研究在红花基因组测序基础上，对红花PAL家族进行全基因组分析，并建立了红花悬浮细胞遗传转化体系，成功构建了对红花PALA(CtPALA)基因表达载体，并初步在悬浮细胞中进行表达，一方面，为研究红花PAL基因的功能，探讨其在红花黄酮次生代谢途径中的作用奠定基础；另一方面，为红花悬浮细胞在功能基因、次生代谢调控及生物反应器等方面的研究提供理论依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品经笔者鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L.吉红一号，于吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程中心基地种植，于盛花期采集花瓣，锡箔纸包好液氮处理后，保存于-80℃冰箱备用。pCAMBIA 3301植物表达载体由本实验室保存。

1.2 试剂

RNA提取试剂盒，购自北京百泰克生物技术有限公司；反转录酶，购自Clontech公司；LA Taq酶等购自宝日医生物技术(北京)有限公司；Bgl II、BstE II等内切酶，购自Thermo Scientific公司；pEASY-T1 Simple Cloning Kit(CT111-01)，购自北京全式金生物技术有限公司；胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒，购自爱思进生物技术有限公司；T4连接酶购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司；引

物由上海生工生物工程有限公司合成。

MS 基础培养基 (蔗糖 20 g/L、MS 粉 4.33 g/L、肌醇 0.1 g/L、有机营养液 3.4 mg/L 和琼脂粉 8 g/L)、有机营养液配方 (甘氨酸 0.4 g/L、烟酸 0.1 g/L、盐酸吡哆素 0.1 g/L 和盐酸硫酸素 0.08 g/L); 愈伤诱导培养基 (MS 基础培养基、NAA 2 mg/L 和 6-BA 0.5 mg/L); 继代培养基 (MS 基础培养基、NAA 1 mg/L 和 6-BA 0.5 mg/L); 悬浮细胞液体培养基 (不加琼脂粉的 MS 基础培养基、NAA 1 mg/L 和 6-BA 0.5 mg/L); YEP 培养基 (酵母粉 10 g/L、蛋白胨 10 g/L 和氯化钠 5 g/L, 如需固体 YEP 则添加琼脂粉 8 g/L); LB 培养基 (蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L 和酵母粉 5 g/L)。

2 方法

2.1 红花 PAL 家族全基因组分析

从 Pfam 数据库下载 PAL 蛋白保守结构域的隐马尔科夫模型文件 (PF00221), 以 PF00221 为探针, 利用 HMMER3.0 软件在红花基因组中检索具有该结构域的基因。利用 DNAMAN 软件进行多序列比对分析, NCBI 的 CDD (conserved domain database) 数据库对蛋白质序列的功能结构域进行分析预测。提取转录起始点上游 2000~200 bp 序列, 利用 plantCARE 在线分析启动子上游区域顺式作用元件, 并用 TBtools 实现重要顺式作用元件的可视化分析。利用 CLSTAL X1.81 和 MEGA 5.2 进行多重序列比对分析和聚类分析, 构建红花 PAL 家族的系统发育进化树。

2.2 红花总 RNA 提取及 cDNA 合成

红花 (吉红一号) 盛花期花瓣总 RNA 提取使用 RNA 提取试剂盒 (BioTeke 公司), 按说明书进行操作, 然后用反转录酶合成 cDNA 第 1 链, 反转录 cDNA 作为 *CtPAL4* 基因克隆模板。

2.3 *CtPAL4* 基因的克隆

根据红花基因组测序结果, 获得红花 PAL 基因的多条候选序列, 将候选序列与 NCBI 数据库其他植物进行同源性比对, 将同源性高的序列 (*CtPAL4*) 作为候选基因进行克隆, 基因的特异性引物序列为 5'-ATGGATCAATACATGAGCAATGTTATGAAGA-AATAGGAAGTGG-3'。

以红花花瓣 cDNA 为模板进行编码区序列的扩增, 首先进行温度梯度 PCR, 获得最佳退火温度。PCR 反应体系: cDNA 1 μ L, dNTP Mixture 8 μ L, 10 \times LA Buffer 5 μ L, 上游引物 *CtPAL4f* (10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 *CtPAL4r* (10 μ mol/L) 1 μ L, LA Taq 0.5 μ L, 水 33.5 μ L, 总体积 50 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预

变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55~60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 次循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。凝胶电泳检验是否获得目的条带。扩增产物凝胶回收后连接 T 载体进行测序。

2.4 *CtPAL4* 基因的生物信息学分析

利用 WOLF PSORT 进行亚细胞定位分析, 分别利用 EXPASY-SOPMA 软件和 EXPASY-phyre2 进行蛋白质二级结构和三级结构分析。利用 DNAMAN 软件进行多序列比对分析, 用 Conserved Domains Search (InterProScan) 预测蛋白质序列的功能结构域, 利用 CLSTAL X1.81 进行系统进化树分析。利用 Tmpred 预测蛋白的跨膜结构, 利用 ProtFun202 进行功能预测, ProtParam 软件 (<http://web.expasy.org/>) 分析编码蛋白的氨基酸序列的组成、相对分子质量和等电点等理化性质。

2.5 *CtPAL4* 基因植物表达载体的构建

以 pCAMBIA 3301 (图 1) 作为植物表达载体骨架, 将测序正确的 *CtPAL4* 两端分别引入酶切位点 *Bgl* II 和 *Bst*E II, 替换载体上的 β -葡聚糖苷酶报告基因 (GUS), 构建植物表达载体。以获得的 *CtPAL4* 基因 T 载体为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增产物凝胶回收后连接 T 载体进行测序。对连有酶切位点的 *CtPAL4* 基因的 T 载体和 pCAMBIA 3301 载体分别进行双酶切, 建立 200 μ L 酶切体系, 经过 4 h 酶切后, 获得的酶切产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 利用胶回收试剂盒切胶回收 *CtPAL4* 目的基因片段和 pCAMBIA 3301 载体。将获得的 *CtPAL4* 目的基因片段和 pCAMBIA 3301 载体用 T4 DNA Ligase 酶连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞, 过夜培养。次日, 挑取白斑至 10 mL LB 液体培养基的试管中, 200 r/min, 37 $^{\circ}$ C, 培养 8 h。提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定, 酶切鉴定正确的菌液进行测序。

2.6 工程农杆菌的转化

验证正确的质粒 1 μ L, 加入到 EHA105 农杆菌感受态细胞中, 冰浴 30 min。液氮冷冻 5 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴, 热击 5 min。在离心管中加入 1 mL 不加抗生素的 YEP 液体培养基, 混匀后放于摇床中, 28 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡 4 h。5000 r/min 离心 6 min。离心后加入 200 mL YEP 液体培养基进行重悬。取重悬后的菌体涂在含有 10 mg/L 利福平的 YEP 固体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d。待长出菌落后, 挑取单菌落, 于 10 mg/L 利福平的 YEP 液体培养基的试管中,

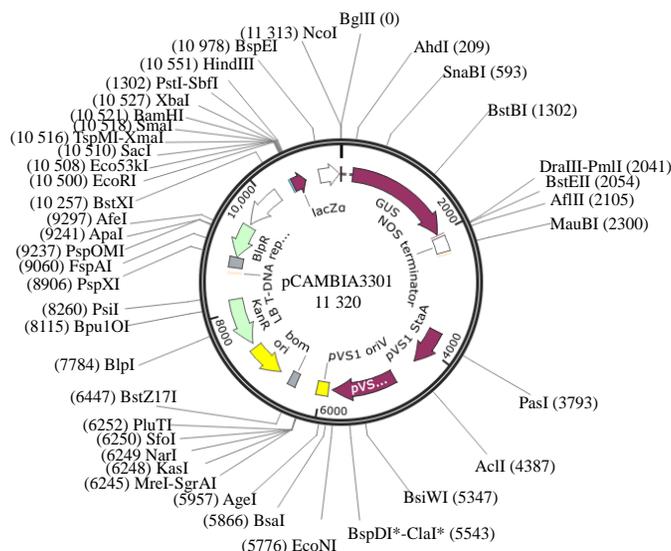


图 1 pCambia3301 表达载体结构示意图

Fig. 1 Structure of pCambia3301 expression vector

过夜培养后进行菌液 PCR 验证, 将验证正确的菌液加入甘油, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.7 红花悬浮细胞遗传体系的建立

利用实验室已建立的体系获得红花悬浮细胞^[19], 将红花种子接种到 MS 基础培养基中培养出无菌苗; 无菌苗子叶外植体接种到愈伤诱导培养基中, 进行诱导; 诱导出的愈伤组织接种到继代培养基中培养 4~5 代。挑选质地疏松、不透明且淡黄色的愈伤组织^[32]用于遗传转化。按照设计的实验组别进行遗传转化实验, 每个组别进行 3 次平行实验。三角瓶开口放一漏斗, 漏斗上覆盖空气滤膜。三角瓶放于真空干燥罐内真空处理, 调节空气压力至 10、20、30 kPa, 分别在 15、10、7 min 内缓慢地释放压力, 完成侵染过程。过滤除去液体培养基, 滤纸吸收多余工程农杆菌, 洗菌后转移至选择培养基上暗培养 3 或 4 天。使用羧苄 (0、75 mg/L), 头孢 (100 mg/L) 和草甘膦 (0.50、0.75、1.00、1.25 mg/L) 对遗传转化后的愈伤组织进行压力筛选, 每个组别进行 3 次平行实验。

对获得的愈伤组织进行 GUS 组织化学分析^[34]。利用含有 GUS 基因 pCambia3301 的转化农杆菌, 侵染红花愈伤组织, 在转化后 15 d, 进行 GUS 染色, 将红花愈伤组织浸泡在含有 1 mmol/L X-Gluc [溶于 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 和 30% Triton X-100] 的 GUS 染色液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 暗培养过夜。分析前, 用 95% 乙醇脱色除去叶绿素。在 Olympus 显微镜下, 观察转基因愈伤组织中 GUS 基因瞬间表

达产物 (β -葡聚糖苷酶) 对底物的水解情况。

2.8 转 *CtPAL4* 基因红花悬浮细胞的 PCR 鉴定

选取质地疏松且分散性好的胚性愈伤组织接种到悬浮细胞液体培养基中, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养, 避光摇床转速为 100 r/min, 获得红花悬浮细胞。吸取连续继代 3 代的转基因红花悬浮细胞, 经孔径 100 目筛网过滤, 过滤物 0.5 g 提取基因组, 用于 PCR 扩增。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 30 次循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

3 结果与分析

3.1 红花 PAL 家族全基因组分析

在红花基因组测序结果中, 共注释到红花 PAL 家族 6 个基因。利用 NCBI 的 CDD 数据库预测蛋白质序列的功能结构域。结果显示, 5 个 (*CtPAL1*~5) 红花 PAL 基因均具有 PAL 家族的典型结构域 (MIO 结构域) 及活性位点 (图 2-A), 且含有 PAL 酶家族的保守序列 (GTITASGDLVPLSYIAG)。使用 plantCARE 在线分析顺式作用元件, 并用 TBtools 对红花 PAL 家族基因启动子中选定的 9 个重要顺式作用元件进行可视化分析 (图 2-B)。启动子区域包含多个典型启动子核心调控元件、激素响应元件和植物逆境胁迫响应元件。9 个顺式作用元件分别为茉莉酸甲酯响应元件 (CGTCA-Motif)、防御及胁迫响应元件 (TC-rich)、分生组织表达元件 (CAT-box)、光响应元件 (G-box)、光响应元件 (MRE)、MYBHv1 结合位点 (CCAAT-box)、MBSI (类黄酮合成相关的 MYB

转录因子结合位点)、AAGAA-motif。

利用 DNAMAN 软件将 6 个红花 PAL 家族基因与大麦、拟南芥和水稻等的基因进行同源性比较分析, 并利用软件 MEGA 5.2 邻接法聚类分析构建系统发育树 (图 3)。结果表明: 80 个 PAL 序列明显聚成 5 个分支, 6 个红花 PAL 家族基因单独聚在一

个进化枝, 同时与拟南芥 (AT3G53260.1, AT2G37040.1) 聚集在相同的分支, 说明红花与拟南芥 PAL 基因家族的亲缘关系较近。其中, CiPAL4 单独聚在一个分支上, 说明在红花植株中 CiPAL4 可能与其他 PAL 基因行使不同的功能。因此, 本研究将 CiPAL4 基因作为后续研究对象。

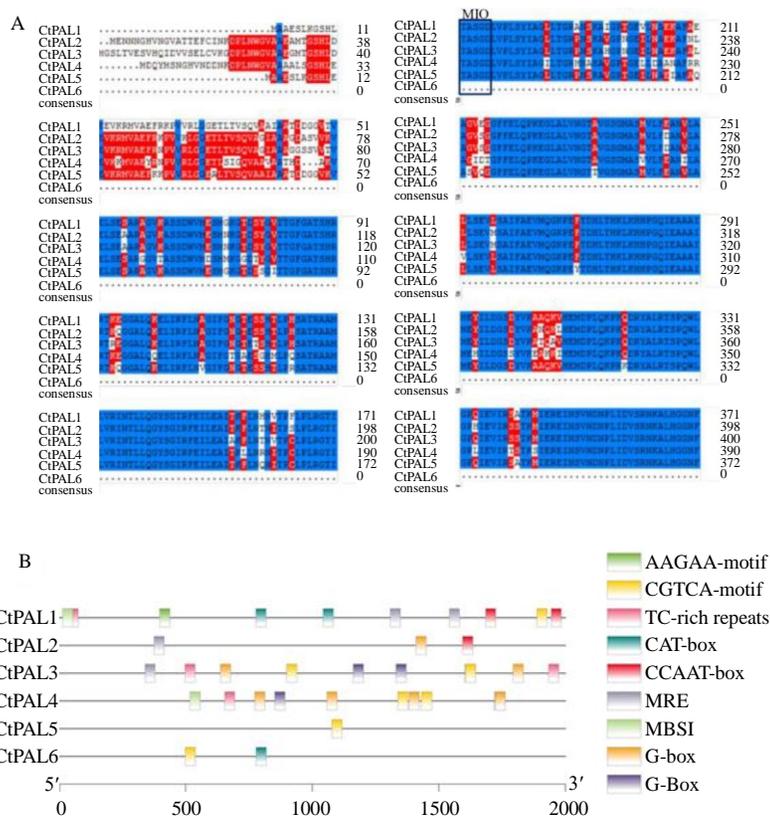


图 2 红花 PAL 家族基因功能结构域 (A) 及顺式作用元件 (B) 分析

Fig. 2 Analysis of functional domains (A) and cis-acting elements (B) of *Carthami Flos* PAL family genes

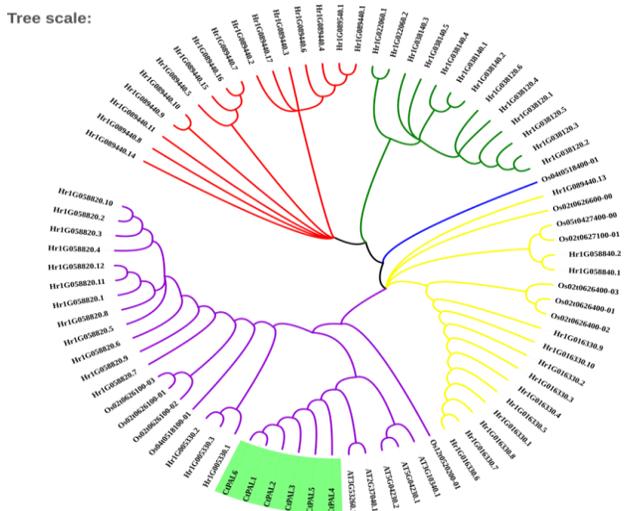


图 3 红花 PAL 家族基因的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Carthami Flos* PAL family genes

3.2 红花总 RNA 的提取

选择红花花瓣作为材料,提取总 RNA。提取后的 RNA 使用 Nanodrop2000 进行 RNA 浓度检测,其浓度为 1368 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 的比值为 1.92, $A_{260}/230$ 的比值为 1.94。由此可见提取的 RNA 样品纯度较高。琼脂糖凝胶电泳结果中 28 S、18 S、5 S 条带清晰可见,无明显拖尾现象(图 4),说明所获得 RNA 样品完整性较好。综上,所提取的红花总 RNA 纯度较高、完整性较好,可用于反转录获得 cDNA 实验。

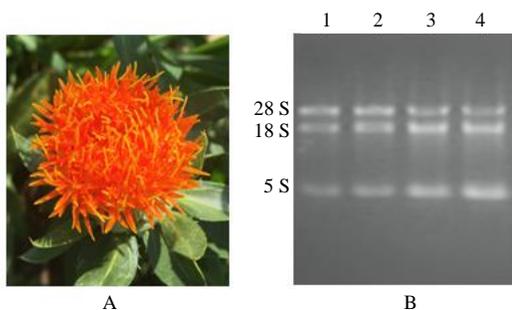


图 4 红花花瓣 (A) 及 RNA 提取 (B) 电泳结果

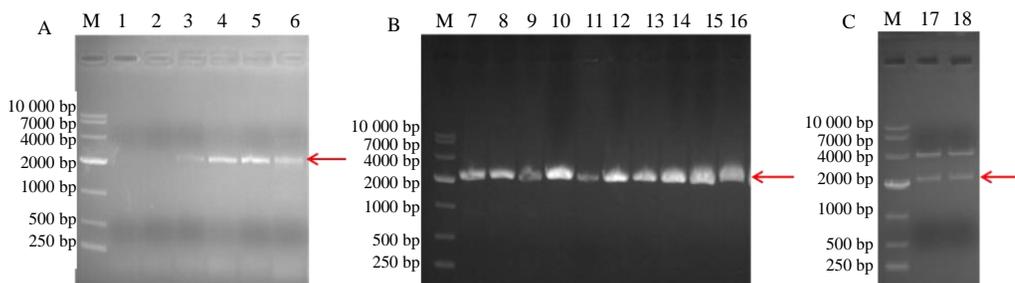
Fig. 4 Total RNA agarose gel electrophoresis and petals from *Carthami Flos*

3.3 *CtPAL4* 基因的克隆

根据基因组中获得的 *CtPAL4* 基因编码区序列,以反转录的红花花瓣 cDNA 为模板,首先进行温度梯度 PCR 验证(图 5-A),利用 *CtPAL4f* 和 *CtPAL4r* 特异性引物进行 PCR 扩增,结果显示,退火温度 58 $^{\circ}\text{C}$ 时,在 2000~4000 bp 位置扩增出目的片段,条带较亮且特异,说明设计的该对引物特异性良好。将目的基因片段胶回收后与 T1 连接并转化大肠杆菌,菌液 PCR 电泳验证(图 5-B)有目的条带出现,对含有目的条带的大肠杆菌提取质粒,用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶过夜双酶切。产物电泳检测(图 5-C),将鉴定正确的菌液送苏州金唯智公司测序,测序结果获得 2124 bp 的目的序列,测序结果与原序列吻合,因此将其命名为 *CtPAL4*。

3.4 *CtPAL4* 基因的生物信息学分析

将测序正确的 *CtPAL4* 基因序列进行生物信息学分析。序列分析表明, *CtPAL4* 基因的开放阅读框(ORF)为 2124 bp,编码 707 个氨基酸(图 6-A),相对分子质量为 76 820,蛋白的三维结构如图 6-B 所示,与苯丙氨酸解氨酶 X 射线蛋白质晶体结构类似。用 Conserved Domains Search (InterProScan)



A-温度梯度 PCR 电泳图 B-菌液 PCR 电泳图 C-质粒酶切电泳图 M-Marker 1~6-温度依次为 55、56、57、58、59、60 $^{\circ}\text{C}$ 梯度 PCR 7~16-菌液 PCR 17,18-质粒酶切

A-temperature gradient PCR electrophoretogram B-bacterial solution PCR electrophoretogram C-plasmid digestion electrophoretogram M-Marker 1—6-55, 56, 57, 58, 59, 60 $^{\circ}\text{C}$ gradient PCR 7—16-bacterial PCR 17, 18- plasmid digestion

图 5 *CtPAL4* 基因编码区克隆

Fig. 5 Cloning of coding sequence for *CtPAL4* gene

预测蛋白质序列的功能结构域结果显示, *CtPAL4* 基因具有典型的苯丙氨酸解氨酶基因的功能结构域及活性位点(图 6-C)。基于蛋白质数据库,应用 WOLF PSORT 在线分析软件,对 *CtPAL4* 基因编码蛋白进行亚细胞定位分析,推测其在细胞中的位置,结果显示,其可能定位在叶绿体和细胞质中,与 PAL 定位于细胞质和一些细胞器(叶绿体、线粒体、过氧化酶体)相吻合。

3.5 *CtPAL4* 基因的系统进化分析

利用 DNAMAN 软件将 *CtPAL4* 基因与其他物种的基因进行系统发育进化分析。利用 clustalW1.83 软件进行多重序列比对、聚类分析,并构建系统发育树。结果显示, *CtPAL4* 基因与拟南芥 (AY303130.1) 的 *PAL* 基因聚在相同的分支,说明从进化上看,红花 *CtPAL4* 和拟南芥 *PAL* 基因亲缘关系最近(图 7)。

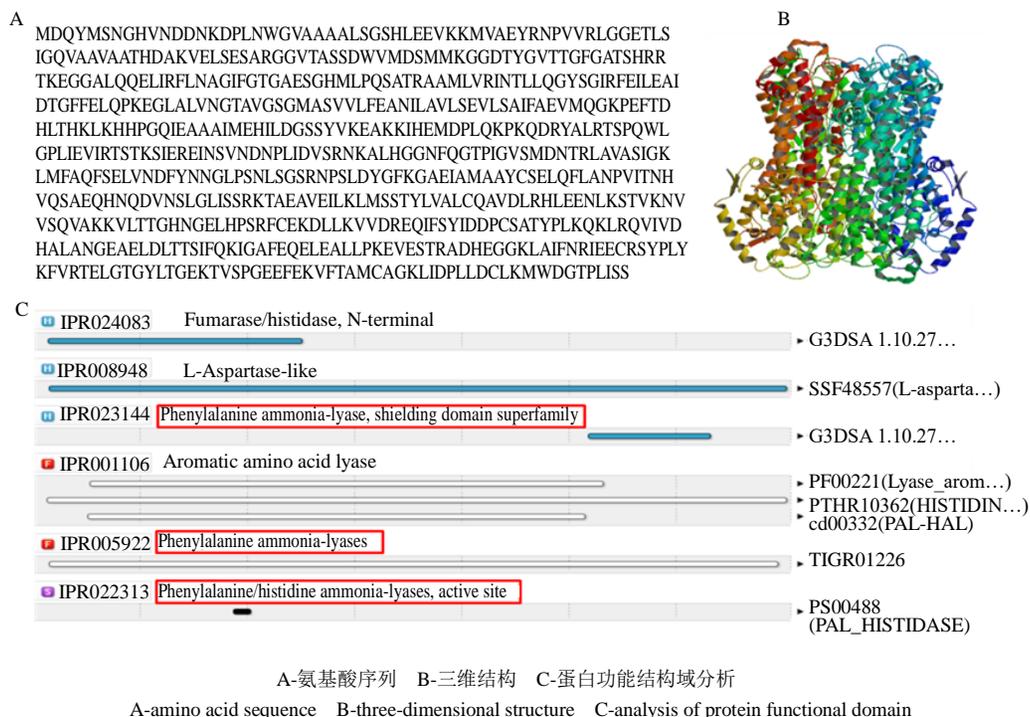


图 6 *CtPAL4* 基因编码氨基酸组成及蛋白结构分析

Fig. 6 Amino acids and protein structure of *CtPAL4* gene

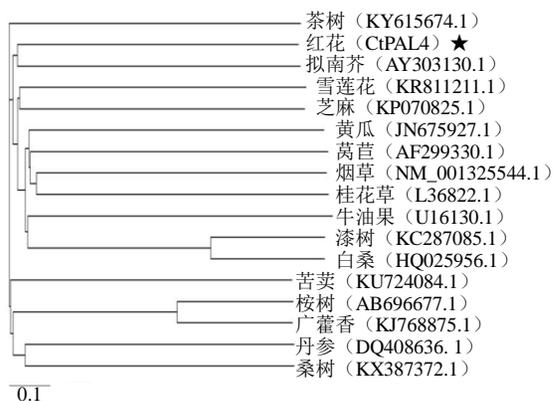
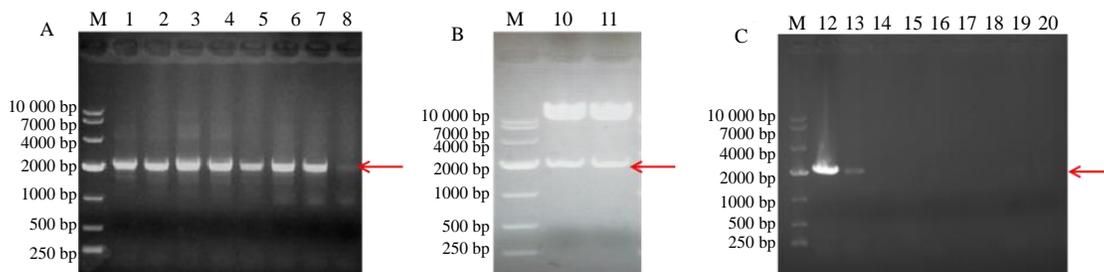


图 7 *CtPAL4* 基因的系统发育进化树

Fig. 7 Analysis of evolutionary of *CtPAL4* gene and others

3.6 *CtPAL4* 基因的植物表达载体构建

将前期验证成功的 *CtPAL4* 基因, 在其引物两端引入 *Bgl* II 和 *Bst*E II, 进行 PCR 扩增, 获得带有含 *Bgl* II 和 *Bst*E II 双酶切位点的 *CtPAL4* 基因, 将其连接 T 载体后命名为 pEASY-T1-*CtPAL4*。将植物表达载体 pCAMBIA3301 和 pEASY-T1-*CtPAL4* 分别用 *Bgl* II 和 *Bst*E II 进行双酶切, 目的片段与酶切后的 pCAMBIA3301 载体用 T4-DNA 连接酶连接后, 得到植物表达载体 pCAMBIA3301-*CtPAL4*。将构建好的植物表达载体转化大肠杆菌 DH5 α , 对重组阳性质粒进行菌液 PCR 验证 (图 8-A) 和双酶切验证 (图 8-B), 都获得预期大小为 2124 bp 的目的



A-重组阳性质粒菌液 PCR B-双酶切图谱 C-农杆菌菌液 PCR M-Marker

A-PCR of recombinant positive plasmid B-double restriction C-agrobacterium tumefaciens liquid PCR M-Marker

图 8 *CtPAL4* 基因植物表达载体构建

Fig. 8 Construction of plant expression vector of *CtPAL4*

片段, 测序结果与预期相符, 证明植物表达载体构建成功。将酶切测序正确的植物表达载体 pCambia3301-*CtPAL4* 质粒, 利用冻融法转化农杆菌感受态 EHA105, 转化后涂板, 对挑取的 9 个单菌落进行农杆菌菌液 PCR 鉴定 (图 8-C), 其中有 2 条非常亮的目的条带出现, 说明农杆菌转化成功, 可以用于下一步的遗传转化。

3.7 红花悬浮细胞遗传体系的建立

对红花种子暗培养而成的无菌苗子叶进行愈伤诱导和继代培养, 获得质地疏松、不透明且黄绿色的愈伤组织, 作为遗传转化受体。农杆菌介导的遗传转化经过预培养、侵染、共培养、抑菌培养、pBaster 筛选和继代培养后获得转基因红花愈伤组织。获得的愈伤组织经过液体培养, 形成均一的转基因红花悬浮细胞。

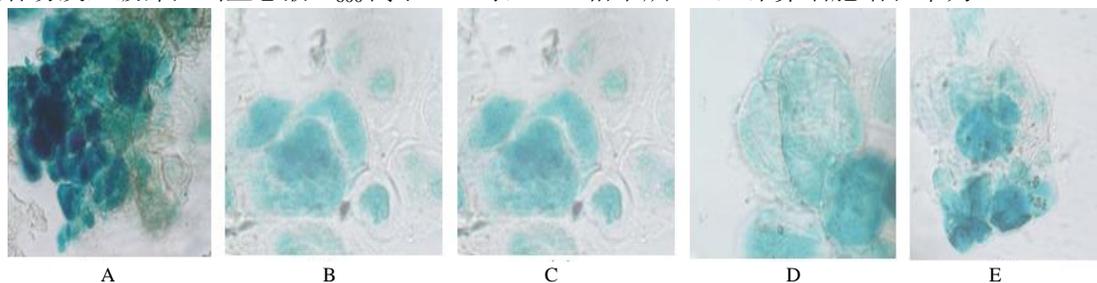
结果表明, 当真空压力超过 20 kPa 时, 愈伤组织细胞容易发生破碎; 当重悬液 A_{600} 高于 0.5 时,

农杆菌难以被抑制, 愈伤组织生长缓慢易褐化; 共培养时间可延长至 4 d。实验得出较优的遗传转化条件组合: 重悬液 $A_{600}=0.5$ 、10 kPa、侵染 15 min 并共培养 4 d。

结果表明, 在 75 mg/L 羧苄、100 mg/L 头孢和 1.0 mg/L 草甘膦压力下, 起到了一定的筛选作用。未经转化的愈伤组织几乎全部褐化死亡, 而遗传转化的愈伤组织因为具有筛选标记基因可以正常生长且长势良好。

对转 *GUS* 基因愈伤组织进行组织化学染色, 如图 9 所示, 显微镜下观察 *GUS* 转基因细胞为蓝色, 而非 *GUS* 转基因则为棕绿色, 说明外源基因已经成功转入到愈伤组织中。

同时, 将愈伤组织置于液体培养基中, 避光摇床 25 °C、100 r/min 培养 7 d, 滤出愈伤组织, 滤纸吸干表面水分。将细胞培养物置于 60 °C 烘箱中烘 3 h, 计算细胞增长率为 190.7%。



A-*GUS* 转基因愈伤组织 B-*GUS* 染色 2 h C-打碎组织细胞染色 24 h 并脱色 D、E-显微镜下观察 *GUS* 转基因细胞为蓝色, 非转基因为棕绿色
A-*GUS* transgenic callus B-*GUS* staining for 2 h C-The cells were broken and stained for 24 hours D, E-Under microscope, *GUS* transgenic cells were blue and non transgenic cells were brown green

图 9 转基因愈伤组织 *GUS* 染色验证

Fig. 9 *GUS* staining of transgenic callus

3.8 转 *CtPAL4* 基因悬浮细胞的分子鉴定

经过压力筛选去除掉未经转化的愈伤组织, 遗传转化的愈伤组织形成的转 *CtPAL4* 基因悬浮细胞, 继代培养 3 次后, 提取转基因愈伤组织的基因组 DNA, 利用 PAL 特异引物 *CtPAL4r* 和 *CtPAL4f* 进行 PCR 鉴定。电泳结果如图 10 所示, 目的基因条带与 *CtPAL4* 基因大小一致, 为 2124 bp。因此, 说明 *CtPAL4* 基因初步在红花悬浮细胞中实现过表达。

4 讨论

PAL (EC 4.3.1.5) 通常是由小的多基因家族编码^[12], 在不同的植物物种中, PAL 基因家族的数量差异很大, 从 2 个到 12 个不等, 甚至达到 40~50 个^[34]。在大多数高等植物中, PAL 是由 2~6 个基因家族构成的小基因家族编码的^[35]。通过对红花

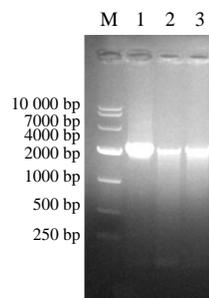


图 10 转 *CtPAL4* 基因悬浮细胞的分子鉴定

Fig. 10 Molecular identification of transgenic callus

PAL 基因家族进行生物信息学分析, 在红花基因组中共检索到 6 个含有 PAL 特有结构域的红花 *PAL* 家族基因, 说明红花有 6 个 *PAL* 基因家族成员, 与其他大多数植物 *PAL* 基因家族成员个数相似, 基本

不含冗杂和未被利用的 PAL。PAL 为同源四聚体, 每个单体含有 1 个 MIO 结构域。MIO 结构域是 PAL 酶催化的辅因子, MIO 结构域含有 PAL 酶家族的保守序列 (GTITASGDLVPLSYIAG) 和三联体活性中心 (Ala-Ser-Gly) [36]。MIO 结构域三联体活性中心作为辅酶增强 PAL 活性, 通过攻击苯丙氨酸的芳香环, 而增加苯丙氨酸的亲电性, 来实现催化苯丙氨酸生成肉桂酸 [37], 红花中的 *CtPAL1~5* 基因家族成员均含有 MIO 结构域, 均可以催化苯丙氨酸生成肉桂酸。*CtPAL6* 不具有 MIO 结构域, 在红花中可能行使不同的生理功能, 也可能属于冗杂或未被利用的 PAL。

农杆菌介导的遗传转化已经被广泛应用于多种植物物种, 目前, 番茄、甜椒、马铃薯、油桐、烟草和橡胶树等多种植物的遗传转化日趋完善 [38-40]。但是, 通过农杆菌介导的红花愈伤组织 *CtPAL4* 基因遗传转化研究尚少, 尚未建立一个有效完整的方案。本研究应用农杆菌介导的遗传转化, 成功将红花黄酮代谢中关键酶 PAL 基因转化入红花愈伤组织, 并形成红花悬浮细胞。红花种子暗培养而成的无菌苗子叶外植体, 诱导形成的愈伤组织对农杆菌侵染有敏感性, 且耐侵染、抑菌性强、恢复力强, 符合作为遗传转化的受体条件 [41], 红花种子经过 5 d 的种子萌发、12 d 的植物激素 (萘乙酸和 6-苄基氨基嘌呤) 诱导愈伤和愈伤继代培养, 获得质地疏松、不透明且黄绿色的愈伤组织, 可以作为根瘤农杆菌遗传转化的受体。农杆菌介导的遗传转化需要经过预培养、侵染、共培养、抑菌培养、pBaster 筛选和继代培养, 才能获得转基因红花愈伤组织。目前的研究结果表明, 农杆菌介导红花遗传转化效率取决于红花的基因型、苗龄、共培养时间、细菌细胞密度、AS 浓度和外植体类型等多种因素 [33]。本实验建立的遗传转化方案较优, 转化效率较高。

PAL 是目前研究最广泛的植物次生代谢酶之一。PAL 因其在植物发育中的作用, 对植物类苯基丙烷次生代谢产物的调控, 对多种环境刺激响应而被广泛研究。PAL 催化的转氨反应, 是红花黄酮类生物合成途径的起始反应, 其表达水平与木脂素、黄酮类、香豆素和植物抗毒素的合成和积累密切相关 [42-44]。PAL 又是一种诱导酶, 当植物在受到病原体攻击、机械损伤、紫外线照射、盐分胁迫、植物激素 (乙烯等) 和光等刺激后, 快速在转录水平上诱导 PAL 编码基因的表达 [12-14, 16]。本研究通过生物

信息学分析红花 PAL 基因家族启动子上游顺式作用元件, 发现红花具有茉莉酸甲酯响应元件、防御及胁迫响应元件、光响应元件和类黄酮合成相关的 MYB 转录因子结合位点等顺式作用元件。可见当红花受到环境刺激, 相应的顺式作用元件在转录水平进行调控 [45], 从而影响 PAL 的转录表达。

转基因悬浮细胞培养被应用于细胞和分子生物学的基础研究 (如功能基因的研究) 和合成生物学方面 (如药用蛋白的生产)。在这 2 种情况下, 外源基因或内源基因的转移和稳定整合都是必需的技术 [46]。目前, 王立勇等 [19] 实现人源 CD20 片段抗体在红花悬浮细胞中的外源基因表达; 刘金娜等 [47] 实现番茄 Bax inhibitor-1 基因在烟草悬浮细胞中的外源基因表达; 在研究雷公藤、绿竹、甘草等植物生长代谢相关基因功能时, 悬浮细胞同源基因的转化与表达也得以实现 [25-26, 28-29, 46]。本研究转 *CtPAL4* 基因红花悬浮细胞在经过 3 次继代培养后, PCR 鉴定仍有目的基因出现, 说明 *CtPAL4* 基因已经初步在红花悬浮细胞中实现过表达, 为后续利用转基因红花悬浮细胞鉴定外源基因提供理论依据。为研究 *CtPAL4* 等合成代谢关键酶基因在次生代谢产物中的功能和作用、红花悬浮细胞产业化生物合成黄酮类次生代谢产物, 奠定理论和实践基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 151.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [3] 乐世俊. 红花化学成分研究与活性评价 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [4] 易善勇, 官丽莉, 杨晶, 等. 红花药理作用及其开发与应用研究进展 [J]. 北方园艺, 2015(5): 191-195.
- [5] 崔猛. 红花成分及提取工艺研究 [D]. 武汉: 武汉工程大学, 2014.
- [6] 扈晓佳, 殷莎, 袁婷婷, 等. 红花的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31(3): 161-168.
- [7] 李玲美, 付建华, 郭浩, 等. 注射用红花黄色素经 TLR-NF- κ B 炎症通路抗大鼠 MIRI 的保护作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 12(44): 2566-2571.
- [8] Wang N, He D, Zhou Y, et al. Hydroxysafflor yellow A activates BK_{Ca} channels and inhibits L-type Ca channels to induce vascular relaxation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 870: 172873.

- [9] 施峰. 红花黄酮类成分提取分离及其质量分析研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2007.
- [10] 郭丹丹. 红花黄酮类成分生物合成途径关键基因的特征和功能研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- [11] 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, 45(4): 87-92.
- [12] Dehghan S, Sadeghi M, Pöppel A, *et al.* Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and Chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius* [J]. *Biosci Rep*, 2014, 34(3): e00114.
- [13] 宋婕. 丹参苯丙氨酸解氨酶基因 (SmPAL1) 的克隆及其功能初探 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2007.
- [14] 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(5): 351-357.
- [15] Hyun M W, Yun Y H, Kim J Y, *et al.* Fungal and plant phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Mycobiology*, 2011, 39(4): 257-265.
- [16] Ritter H, Schulz G E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(12): 3426-3436.
- [17] Appelhagen I, Wulff-Vester A K, Wendell M, *et al.* Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures [J]. *Metab Eng*, 2018, 48: 218-232.
- [18] Dudnik A, Almeida A F, Andrade R, *et al.* BacHBerry: BACterial Hosts for production of bioactive phenolics from bERRY fruits [J]. *Phytochem Rev*, 2018, 17(2): 291-326.
- [19] 王立勇, 刘秀明, 张玲, 等. CD20 片段抗体在红花悬浮细胞中的表达研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2017, 45(12): 112-120.
- [20] 刘飞. 红花黄酮类化合物生物合成途径关键酶基因的克隆与功能验证 [D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [21] 杨帆, 赵君, 张之为, 等. 植物悬浮细胞的研究进展 [J]. 生命科学研究, 2010, 14(3): 257-262.
- [22] Akhtar M S, Swamy M K. *Natural Bio-active Compounds volume 3: Biotechnology, Bioengineering, and Molecular Approaches* [M]. Berlin: Springer, 2019.
- [23] 张付云, 陈士云, 赵小明, 等. NtSKP1-GFP 植物表达载体的构建及亚细胞定位 [J]. 西北农业学报, 2009, 18(4): 144-148.
- [24] 李蕾蕾, 孙丰坤, 李天宇, 等. 白桦 BpGT14 基因启动子克隆及表达活性分析 [J]. 北京林业大学学报, 2016, 38(7): 16-24.
- [25] 武莹, 李威, 祝传书, 等. 雷公藤 hmgr 基因克隆、序列分析及诱导表达 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(11): 103-111.
- [26] 赵瑜君, 张萌, 刘雨佳, 等. 雷公藤乙酰 CoA 酰基转移酶基因全长 cDNA 克隆及表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 847-852.
- [27] 宋雅迪, 赵瑜君, 陈上, 等. 雷公藤 MCT 基因 RNAi 对雷公藤萜类活性成分生物合成的影响 [J]. 药学报, 2018, 53(8): 1209-1214.
- [28] 高志民, 陈颖, 胡陶, 等. 绿竹 BoCOBL 基因的分子特征及其表达分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2013, 21(6): 560-565.
- [29] 邹广平, 李雅丽, 冯梦薇, 等. 甘草悬浮细胞肉桂酸-4-羟基化酶 (C4H) 基因的克隆及表达分析 [J]. 生物技术通报, 2017, 33(11): 96-100.
- [30] Sarkate A, Saini S S, Gaid M, *et al.* Molecular cloning and functional analysis of a biphenyl phytoalexin-specific O-methyltransferase from apple cell suspension cultures [J]. *Planta*, 2019, 249(3): 677-691.
- [31] 陈月华, 朱艳, 张翔, 等. 植物细胞悬浮培养中次生代谢产物积累的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2016, 35(3): 41-47.
- [32] 陈书安, 王晓东, 袁晓凡, 等. 藏红花细胞悬浮培养体系的建立及优化 [J]. 生物技术通报, 2010(7): 157-160.
- [33] Sri Shilpa K, Dinesh Kumar V, Sujatha M. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2010, 103(3): 387-401.
- [34] Kong J Q. Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(77): 62587-62603.
- [35] 吴智华. 中国莲 PAL 基因家族及核外基因组进化研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2014.
- [36] 施圆圆, 张声祥, 赵德蕊, 等. 异叶天南星苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与蛋白结构分析 [J]. 植物科学学报, 2019, 37(2): 221-229.
- [37] Lovelock S L, Lloyd R C, Turner N J. Phenylalanine ammonia lyase catalyzed synthesis of amino acids by an MIO-cofactor independent pathway [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(18): 4652-4656.
- [38] 苏振华, 张俊华, 张泽鑫, 等. 农杆菌介导的甜椒遗传转化体系的建立 [J]. 江西农业学报, 2019, 31(6): 9-15.
- [39] 黄天带. 农杆菌介导的橡胶树遗传转化体系的建立 [D]. 海口: 海南大学, 2010.
- [40] 马晓晓, 李哲, 戴雪梅, 等. 橡胶树 HbHMGR1 基因克隆及其愈伤组织转化 [J]. 南方农业学报, 2014, 45(5): 818-823.

- [41] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [42] 宋慕波, 帅良, 段振华, 等. 萆苳苯丙氨酸解氨酶基因的克隆和表达 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 77-83.
- [43] Halpin C. Investigating and manipulating lignin biosynthesis in the postgenomic era [J]. *Adv Bot Res*, 2004, 41: 63-106.
- [44] Goy M A. Identification and expression analysis of phenylalanine ammonia-lyase in *Echinacea purpurea* [J]. 2017, 32: 1619.
- [45] Campos R, Nonogaki H, Suslow T, *et al.* Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from *Romaine lettuce* leaves [J]. *Physiol Plant*, 2004, 121(3): 429-438.
- [46] Santos R B, Pires A S, Hoorn R A L, *et al.* Generation of transgenic cell suspension cultures of the model legume *Medicago truncatula*: A rapid method for *Agrobacterium* mediated gene transfer [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult PCTOC*, 2019, 136(3): 445-450.
- [47] 刘金娜, 张秀清, 马秋敏, 等. 转番茄 Bax inhibitor-1 基因烟草悬浮细胞系的建立 [J]. 北方园艺, 2010(24): 149-151.

[责任编辑 时圣明]