

施圆圆, 张声祥, 赵德蕊, 王晨凯, 马克龙, 吴家文. 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

Shi YY, Zhang SX, Zhao DR, Wang CK, Ma KL, Wu JW. Gene cloning and structure characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Arisaema heterophyllum*[J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(2): 221~229

异叶天南星苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与蛋白结构分析

施圆圆^{1,2}, 张声祥^{1,2}, 赵德蕊^{1,2}, 王晨凯^{1,2}, 马克龙³, 吴家文^{2,4,5*}

(1. 安徽中医药大学研究生院, 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学科研实验中心、新安医学教育部重点实验室, 合肥 230038;

3. 安徽中医药大学中西医结合临床学院, 合肥 230012; 4. 安徽省中医药科学院, 合肥 230012;

5. 安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 合肥 230012)

摘要: 以异叶天南星(*Arisaema heterophyllum* Blume)为材料, 采用逆转录 PCR(RT-PCR)法扩增其苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)基因 *AhPAL*, 获得该基因的开放读码框(ORF), 并通过系统的生物信息学软件分析 *AhPAL* 的结构和理化性质。结果显示, *AhPAL* 的 ORF 全长为 2184 bp, 编码 727 个氨基酸; *AhPAL* 与郁金香(*Tulipa fosteriana* W. Irving)PAL 的亲缘关系最近, 序列相似性达 88%。空间结构模型分析结果显示, *AhPAL* 为同型四聚体, 每个单体由 3 个结构域组成, 其中 M10 结构域含有 PAL 酶家族的保守序列和 Ala-Ser-Gly 三肽活性中心, 是 *AhPAL* 酶活性的决定性结构域。利用荧光定量 PCR 方法检测 3 个 *AhPAL* Uni-gene 在根、块茎和叶中的表达情况, 发现它们在根中表达量均最高, 而在叶和块茎中表达较低。

关键词: 异叶天南星; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 生物信息学分析

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)02-0221-09

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.20221

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Gene cloning and structure characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Arisaema heterophyllum*

Shi Yuan-Yuan^{1,2}, Zhang Sheng-Xiang^{1,2}, Zhao De-Rui^{1,2}, Wang Chen-Kai^{1,2},
Ma Ke-Long³, Wu Jia-Wen^{2,4,5*}

(1. Graduate School of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 3. Clinical College of Anhui Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230032, China;

4. Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 5. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei 230012, China)

Abstract: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is the first key enzyme in the synthesis of flavonoids and the rate-limiting enzyme of the phenylpropanoid pathway, which is associated with secondary metabolites, growth and development, as well as defense of plants. In this study, the mRNA of *Arisaema heterophyllum* Blume was used as a template and the full-length open reading frame (ORF) of the phenylalanine ammonia-lyase gene (*AhPAL*) was amplified

收稿日期: 2018-10-25, 退修日期: 2018-11-14。

基金项目: 名贵中药资源可持续利用能力建设项目(2060302); 安徽高校自然科学研究重大项目(KJ2018ZD028); 安徽省自然科学基金项目(1608085MH177); 安徽省留学人员科技活动启动项目(20151x024); 国家级大学生创新创业训练项目(201810369050); 国家自然科学基金(81373598)。

This work was supported by grants from the Sustainable Utilization of Famous Traditional Chinese Medicine Resources (2060302), Natural Science Research Grant of Higher Education of Anhui Province (KJ2018ZD028), Natural Science Foundation of Anhui Province of China (1608085MH177), Anhui Province Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars (20151x024), National Students' Platform for Innovation and Entrepreneurship Training Program (201810369050), and National Natural Science Foundation of China (81373598).

作者简介: 施圆圆(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为中草药基因研究(E-mail: 871735748@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wujianwen@ahcm.edu.cn)。

by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The structure and physicochemical properties of AhPAL were then analyzed by bioinformatics. Results showed that the ORF of AhPAL was 2, 184 bp in length, encoding a protein with 727 amino acids. Furthermore, AhPAL had the closest relationship with PAL of *Tulipa fosteriana* W. Irving, with a sequence identity of 88%. Structure analysis indicated that AhPAL was a homotypic tetramer, and each monomer consisted of three domains. Among these domains, the MIO domain was highly important for the activity of AhPAL, containing a conserved sequence of the PAL family and Ala-Ser-Gly triad residues. The expression levels of three AhPAL unigenes in the roots, tubers, and leaves were detected by quantitative RT-PCR (qRT-PCR), with higher expression found for all three in the roots compared with that in the leaves and tubers.

Key words: *Arisaema heterophyllum*; Phenylalanine ammonia-lyase; Gene cloning; Bioinformatics analysis

异叶天南星 (*Arisaema heterophyllum* Blume)

是天南星科天南星属的多年生药用植物，以块茎入药，主要用于治疗癫痫、破伤风和抗肿瘤等^[1]。异叶天南星含有黄酮类、凝集素类以及氨基酸类等多种活性成分^[2, 3]。其中，黄酮类化合物是一类结构复杂、有多种生物学功能的次生代谢产物，具有抗炎、抗病毒和抗癌等功效^[4-7]。

苯丙氨酸途径是植物最重要的次生代谢途径之一，是植物黄酮类化合物合成的第一步关键反应。苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 催化苯丙氨酸非氧化脱氨生成反式肉桂酸和氨，是苯丙素类化合物合成途径中的第一个关键酶和限速酶^[8]。PAL 酶自发现以来受到人们的广泛关注，研究表明 PAL 在植物抗逆、抗菌、色素积累和木质化等过程中发挥重要作用^[8, 9]。乔枫等^[10]发现 PAL 表达升高可以提高植物抗干旱和抗盐的能力。Zhang 等^[11]报道大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) PAL 的过表达可增强植株对大豆疫霉菌的抗性。因此，借助基因工程手段增加 PAL 的表达，提高植物次生代谢物的产量，对植物生长发育具有重要意义。

近年来，有研究已从小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[12]、彩叶草 (*Coleus forskohlii* (Willd.) Briq.)^[13] 和芒果 (*Mangifera indica* L.)^[14] 等植物中克隆获得 PAL 基因，但目前尚未在异叶天南星中见到相关报道。本研究基于异叶天南星高通量测序的结果，利用 RT-PCR 扩增 AhPAL 的开放阅读框，分析 AhPAL 编码蛋白的理化性质和结构特点，以期为进一步研究 AhPAL 在异叶天南星黄酮类化合物合

成过程中的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

异叶天南星材料来源于安徽中医药大学药园，由安徽中医药大学杨青山鉴定。于 2017 年 5 月 12 日分别采集新鲜的成熟根、块茎和叶等材料，用无菌蒸馏水洗净后，置于液氮中速冻，于 -80℃ 冰箱中储存。

1.2 高通量测序

提取异叶天南星成熟的根、块茎和叶的总 RNA，富集 mRNA，逆转录成 cDNA，构建 cDNA 文库，利用 Illumina HiSeq-4000 (华大基因，武汉) 进行双端测序，得到异叶天南星转录组数据库 (NCBI SRA 数据库，登录号为 SRP118752)。将获得的高质量的数据进行 *De novo* 组装，进一步注释到 7 大数据库：Nr (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db>)，Nt (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db>)，GO (<http://geneontology.org>)，KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>)，Swissprot (<http://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/swissprot>)，KOG (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/KOG>) 和 Pfam (<http://pfam.xfam.org>)，共注释了 72 287 个 Unigene。其中，编码 AhPAL 的基因共 13 个，它们在根、块茎和叶中的表达情况，即 FPKM (Fragment per kilobase of exon model per Million mapped reads) 值见表 1。利用 TransDecoder (v3.0.1) 搜索 Unigene 的开放读码框 (ORF)。使用 ExPASy 软件将 AhPAL 的基因序列翻译为氨基酸序列，并与 NCBI 数据库中已知的

表 1 *AhPAL* 在根、块茎和叶中的表达量Table 1 Expression level of *AhPAL* in roots, tubers, and leaves of *Arisaema heterophyllum* Blume

基因名称 Gene ID	叶(FPKM) Leaf (FPKM)	根(FPKM) Root (FPKM)	块茎(FPKM) Tuber (FPKM)
CL4508.Contig1	1.54	1.25	1.14
CL4508.Contig2	14.29	54.97	4.40
CL4508.Contig3	14.50	413.50	37.43
Unigene43535	21.80	140.68	11.64
Unigene13257	0.57	2.39	1.29
Unigene14904	41.58	127.91	9.94
Unigene27466	0.00	0.00	0.25
Unigene27658	0.00	0.19	1.36
Unigene31887	0.00	0.27	1.18
Unigene6643	0.97	0.54	0.95
Unigene7064	0.21	19.52	1.63
Unigene18910	1.13	1.02	1.18
Unigene39424	0.00	0.42	1.29

PAL 进行序列比对, 得到 4 个编码完整 *AhPAL* 的 ORF, 本研究对表达量最高的 CL4508.Contig3 基因(以下简称 *AhPAL*)进行克隆。

1.3 引物设计

使用 Primer 5.0 软件在 *AhPAL* 两端设计 1 对特异性扩增引物。*AhPAL*-F: 5'-ATGGAGGCCT-TCGCCCCACCCAC-3'; *AhPAL*-R: 5'-CTAGCAGATGGGGATGGGGCGC-3'。

1.4 DNA 合成和 PCR 扩增

取冷冻的异叶天南星叶组织, 提取总 RNA。以 mRNA 为模板合成 cDNA。采用上述引物利用 KOD-Plus-Neo 高保真酶(ToYoBo 生物公司)和 ExTaq 酶(TaKaRa 生物公司)进行 *AhPAL* 的 PCR 扩增。

高保真酶扩增体系为 25.0 μL, 包括: 上、下游引物各 1.5 μL, 10 × Buffer 缓冲液 2.5 μL, dNTP Mix 2.5 μL, MgSO₄ 1.5 μL, cDNA 1 μL, KOD-Plus-Neo 0.8 μL。反应条件为: 94℃变性 2 min, 98℃退火 30 s、68℃延伸 75 s, 共 35 个循环。ExTaq 酶扩增体系为 25.0 μL, 包括: 上、下游引物各 1.5 μL, 10 × Buffer 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP Mix 2.0 μL, cDNA 1 μL, ExTaq 酶 1.0 μL。反应条件为: 94℃预变性 4 min; 94℃变性 1 min, 40℃退火 1 min, 72℃延伸 90 s, 共 10 个循环; 随后 94℃变性 1 min,

57℃退火 1 min, 72℃延伸 90 s, 共 25 个循环; 最后 72℃延伸 8 min。扩增产物进行回收和纯化。

1.5 重组质粒 pMD19-T-AhPAL 的构建和测序

将纯化的 *AhPAL* 基因片段与 pMD19-T 载体连接后转化至感受态细胞中培养, 挑选阳性克隆经鉴定后送测序。

1.6 生物信息学分析

用软件 DNAMAN 6.0.3.99 比对 *AhPAL* 核苷酸和氨基酸序列, 采用软件 ExPASy 预测 *AhPAL* 的理化性质; 采用在线软件 Motif scan (http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan/)、Prot Scale Server (<http://web.expasy.org/protscale/>) 和 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 预测 *AhPAL* 的结构域、亲水性及蛋白质家族种类等; 采用 Clustalx1.83、MEGA5.0 和 Blast 工具进行同源比对和进化关系分析; 采用 Clustalx1.83 和在线软件 ESPript 3.0 (<http://escript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>) 分析 *AhPAL* 的二级结构; 最后采用 Swiss-Model (<https://www.swissmodel.expasy.org/>) 和 PyMOL 软件模拟、绘制 *AhPAL* 的三级结构。

1.7 实时荧光定量 PCR

运用 Primer 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物(表 2)。以异叶天南星 β -actin 基因为内参, 分别以根、块茎和叶的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR。

表 2 荧光定量 PCR 的基因和引物信息

Table 2 Target genes and primers for qRT-PCR

基因名称 Gene ID	引物名称(5'-3') Primer name (5'-3')	长度 (bp) Length	T _m 值 T _m value
CL4508.Contig2	CGGAGGAAAATTCAAGAAC	20	54.20
	AGTTTGAGGAGCTCCTTCT	20	55.20
CL4508.Contig3	TGATGACGTCCACCTACCTG	20	56.00
	TGTTCTTCACGGCGTTCTTC	20	58.60
Unigene43535	GAGGAGAACAGAAGAACGCC	20	56.30
	TGAGGTCTCTCGCAGAAG	20	57.70
β -Actin	GACGTCGTGTGGAATCACTG	20	56.20
	TGAATTACCACGTCCGTCCA	20	56.10

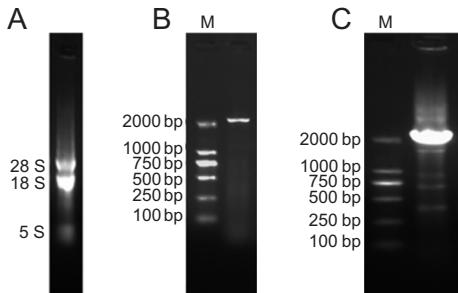
2 结果与分析

2.1 *AhPAL* 基因克隆和鉴定分析

2.1.1 总 RNA 提取、*AhPAL* 克隆和重组质粒鉴定

异叶天南星总 RNA 的提取质量较好(图 1:

A)。本实验以 cDNA 为模板, 利用特异性引物扩增后得到一个约 2000 bp 的片段, 命名为 *AhPAL* (图 1: B)。该扩增片段经 PCR 鉴定后, 目的条带位置正确(图 1: C)。



A: 异叶天南星总 RNA 电泳图; B: *AhPAL* 基因的克隆; C: 菌液 PCR 鉴定。

A: Isolation of total RNA; B: Gene cloning of *AhPAL*; C: Identification by PCR.

图 1 总 RNA 提取、*AhPAL* 基因克隆和鉴定

Fig. 1 Isolation of total RNA and cloning and identification of *AhPAL* gene

2.1.2 *AhPAL* 测序结果分析

AhPAL 的 ORF 长度为 2184 bp, 编码 727 个氨基酸(图 2)。序列比对结果显示, *AhPAL* 与异叶天南星转录组数据库中 CL4508.Contig3 基因的碱基序列相似性达 99.22%, 氨基酸序列相似性达 99.45%, 表明克隆成功。该序列已提交至 GenBank 数据库, 登录号为 MH729821。

2.2 *AhPAL* 生物信息学分析

2.2.1 *AhPAL* 蛋白的理化特性分析和结构域预测

分析结果表明, *AhPAL* 相对分子质量约为 78 kD, 理论等电点为 6.39; 该蛋白共含有 22 种氨基酸, 其中丙氨酸 84 个, 占比最高 (11.60%); 且该蛋白为亲水性蛋白; *AhPAL* 含有不同的结构域, 包括 1 个酰胺化位点、6 个 N-糖基化位点、7 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、13 个 N-肉豆蔻酰化位点和 7 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(表 3)。

```

1 M E A F A P P T C N G H A A N G T V E S L C L K P A A A P A V A S A D
1 ATGGAGGCCCTTCGCCCCACCCACCTGCACCGGCCAACGGCACCGTGGAGAGCCTCTGCCTCAAGCCGGCCGCCGCCGCCGTGCCCTCCGCCGAC
36 P L N W G A A A E S L K G S H L D E V K R M V E E S R P L V R L E G
106 CCCCTCAACTGGGGCGCCGCCGAGTCGCTCAAGGGCACGCCACCTCGACGGTGAAGCGCATGGTGGAGGAGTCGGCCGGCCCTGGTAAGCTGGAGGGA
71 A D L K I S Q V A A V A A S W A E V Q V E L A E S A R A G V K A S S D
211 GCGGACCTGAAGATCTCTCAGTCGCGGGCGTGGCGGCCAGCTGGGCGGAGGTGAGGTGGAGCTCGCCGAGTCGGCCAGGGCCGGCGTCAGGCCAGCAGCAG
106 W V M D S V N K G T D S Y G V T T G F G A T S H R R T K Q G G A L Q K
316 TGGGTATGGACAGCGTGAACAAGGGCACCGACAGCTACGGCGTACCCACCGGCTTCGGCGCACGTCTCACCGCCGACCAAGCAGGGGGGCCCTCAGAAG
141 E L I R F L N A G I F G S G P D Y G N T T L P P A A T R A A M L V R V
421 GAGCTCATCAGGTTCTCTGAACGGCGGCATATTGGATCCGGCCCGACTATGGAACACGACGGCTGCCGCCGGCCCATGCTCGCCGTC
176 N T L L Q G Y S G I R F E I L E A I T A L L N H N V T P C L P L R G T
526 AACACTCTGCTCCAGGGCTACTCGGCATCCGGATTCGAGATACTTGAGGCCATCACCGCCCTCTCAACCACACGTACCCCCCTGCCCTCCCCCTCGCCGAC
211 I T A S G D L V P L S Y I A G M L T G R P N A K A L S P D G R H V S A
631 ATCACCCGCTCCGGTGACCTCGTCCCACACTCTCTACATCGCCGGTATGCTCACCGGCCGCCAACGCGAACGGCCCTCTCCCGACGGCACGGTATCCGCC
246 E E A F R L A R I S G G F E L P K E G L A V N T G A V G S G L A
736 GAAGAGGCCCTCCGCGCATCTCGCGGCCCTCTCGAGCTGCCAGGCCAAAGGAGGGCTCGCCGTGGTAACCGCACTGCCGTGGCTCCGGCTCCGCC
281 S V V L F E A N I L A V L A E V L S A V F C E V M Q G K P E Y T D H L
841 TCCGTGGTGTTCGAGGCCAACATCTCGCGGTGCTGGCCGAGGTCTCTCCGCCGTCTCGAGGTCTACGAGGCCAACGGCCGAGTACACCGACCACTC
316 T H K L K H P G Q I E A A A I M E H I L D G S S Y M K M A K K L H E
946 ACCCCAAAAGTGAAGCACCACCCGGGACAGATCGAGGCCGCCATCGAGGACATCTCGACGGCAGCTCTACATGAAGATGGCCAAGAACGCTGACGAG
351 L D P L Q K P K Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q V E V L R Q A T K S I
1051 CTGGACCCGCTGAGAACGCCAACAGCAGGACCGTACGCCCTGCGCACATCCCGCAGTGGCTGGGCCAACGGCTGGAGGTGCTCCGGCAGGCCAACAGTCATC
386 E R E I N S V N D N P L I D V A R S K A L H G G N F Q G T P I G V S M
1156 GAGCGCAGATCAACTCTGTCACGACAACCCCTCATCGACGTCGCCGCCAGCAAGGCCCTCACGGTGGCAACTTCCAGGGCACCCCCCATGGTGTCCCATG
421 D N T R L A I A A I G K L M F A Q I S E L V N D F Y N G L P S N L S
1261 GACAATACCCGCTCGCCATCGCCGCAAGCTCATGTTGCCAGATTCCGAGCTGTCAACGACTCTACAAACAGGGCTGCCCTCCAAACCTGTC
456 G G R N P S L D Y G F K G A E I A M A A V C S E L Q F I L G N P V T N H
1366 GCGGGCGCAACCCCAAGCTGGACTACGGGTTCAAGGGCGCTGAGATGCCATGGCCCTACTGCTCGAGCTGAGTCTGGCAACCCCTGACCAACAC
491 V Q S A E Q H N Q D V N S L G L I S A R K T A E A V E I L K L M T S T
1471 GTCCAGAGCGCGGAGCACACAACCAGGAGCTCAACTCCCTCGCCCTGATCTCGCCAGGAAGACGGCGAGGGCTGGAGATCTGAGCTGATGACGTCACC
526 Y L V A L C Q A I D L R H L E E N Q K N A V K N T V S Q V A K R V L T
1576 TACCTGTGGCCCTCTCCAGGGCATCGCCACCTGGAGGAACAGAAGAACCCCGTGAAGAACACGGTCAAGCCAGTGGCCAAAGCGGTCTCACC
561 M G V N G E L H P S R F C E K D L I R A V D R E H V F T Y A D D P C S
1681 ATGGCGCTCAACGGAGAGCTCCACCCCTCCGCTCTCGCAGAAGGACCTCATCGGGCGAGCAGCTCTCACCTACGCCGACGACCCCTGCAAG
596 A T Y P L M Q K L R Q V L V E H A L G N G E K E K E A N T S I F Q K I
1786 GCCACCTACCCGCTGATGCAAGAACGCTGCCAGGTGCTGGAGCACGCCCTGGCAACGCCAGGAAGGAGAACAGGAGAACAGGAGAACAGGAGATC
631 A A F E D E L K M A L P K E V E A A R V A F E N G T C A I P N R I K E
1891 GCGGCCCTCGAGGACGAGCTCAAGATGGCGCTCCCCAAGGGAGGTGGAGGCCGCCGGTGGCTGAAAAGGGACGTCGCGCATACCCAAACGGATCAAGGAG
666 C R S P Y L V R F V R E Q L G T S M L T G E K V R S P G E E F D K V F
1996 TGCAGGTGCTACCCGCTGTACCGGTCGAGGGAGCAGCTGGGACGAGCATGCTCACGGGGAGAAGGTGAGGTGGCTGCCGGCAGGAGATTCGACAAGGTGTC
701 V A I S Q G K V I D P L F E C L Q G W N G A P I P I C *
2101 GTGGCCATCTCCAGGGAGGTGATGACCCGCTGTCAGTGCCTACAGGGCTGGAATGGCGCCCCCATCCCCATCTGCTAG

```

图 2 *AhPAL* 的碱基序列和编码蛋白的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of *AhPAL* and amino acid sequence of *AhPAL*

InterPro 预测结果显示, AhPAL 蛋白属于裂解酶 I 类超家族, 其 C 端含有 PAL 屏蔽结构域(540-654 AA), N 末端含组氨酸结构域(34-273 AA)以及 PAL 酶保守序列 GTITASGDLVPLSYIAG (209-225 AA)。

2.2.2 AhPAL 蛋白二级结构、三级结构分析

将 AhPAL 与其他 9 种植物的 PAL 蛋白进行氨基酸序列的比对(表 4), 并对 AhPAL 蛋白 D35-C715 部分的二级结构进行分析, 结果显示(图 3), 在该区域共有 22 个 α 螺旋结构, 7 个 β 折叠结构, 8 个 TT 结构和 1 个 TTT 结构, 该蛋白还含有 PAL 酶的标签序列(G209-A225, GTITASGDLVPLSYIAG), 表明 AhPAL 具有较高的序列和结构保守性。

以欧芹(*Petroselinum crispum* Nym.) PAL 酶(PDB ID: 1w27^[15])的晶体结构为模板(序列相似性为 80.65%), 预测 AhPAL 的三级结构, 发现 AhPAL 是以 α -螺旋为主的蛋白, 其空间结构呈现由 4 个“海马状”单体组成的“橄榄球”状的同型四聚体(图 4: A)。每个单体有 3 个结构域, 分别为 4-甲基-咪唑-5-酮(MIO)结构域(A26-A274)、核心结构域(V275-E540, I663-C727)和屏蔽结构域(E541-R662)(图 4: B)。其中, MIO 是决定 AhPAL 蛋白酶活性的结构域, 包含 PAL 酶家族的保守序列(GTITASGDLVPLSYIAG)和酶的活性中心(Ala-Ser-Gly)(图 4: C)。

聚体(图 4: A)。每个单体有 3 个结构域, 分别为 4-甲基-咪唑-5-酮(MIO)结构域(A26-A274)、核心结构域(V275-E540, I663-C727)和屏蔽结构域(E541-R662)(图 4: B)。其中, MIO 是决定 AhPAL 蛋白酶活性的结构域, 包含 PAL 酶家族的保守序列(GTITASGDLVPLSYIAG)和酶的活性中心(Ala-Ser-Gly)(图 4: C)。

2.3 AhPAL 的同源性及系统进化关系分析

PAL 蛋白序列的 BLAST 比对结果显示(表 4), AhPAL 与郁金香、虎眼万年青、野蕉等单子叶植物的 PAL 蛋白一致性均达到 80%以上。AhPAL 系统进化分析表明(图 5), AhPAL 与郁金香遗传距离最短, 亲缘关系最近。

2.4 AhPAL 基因在不同组织中的表达分析

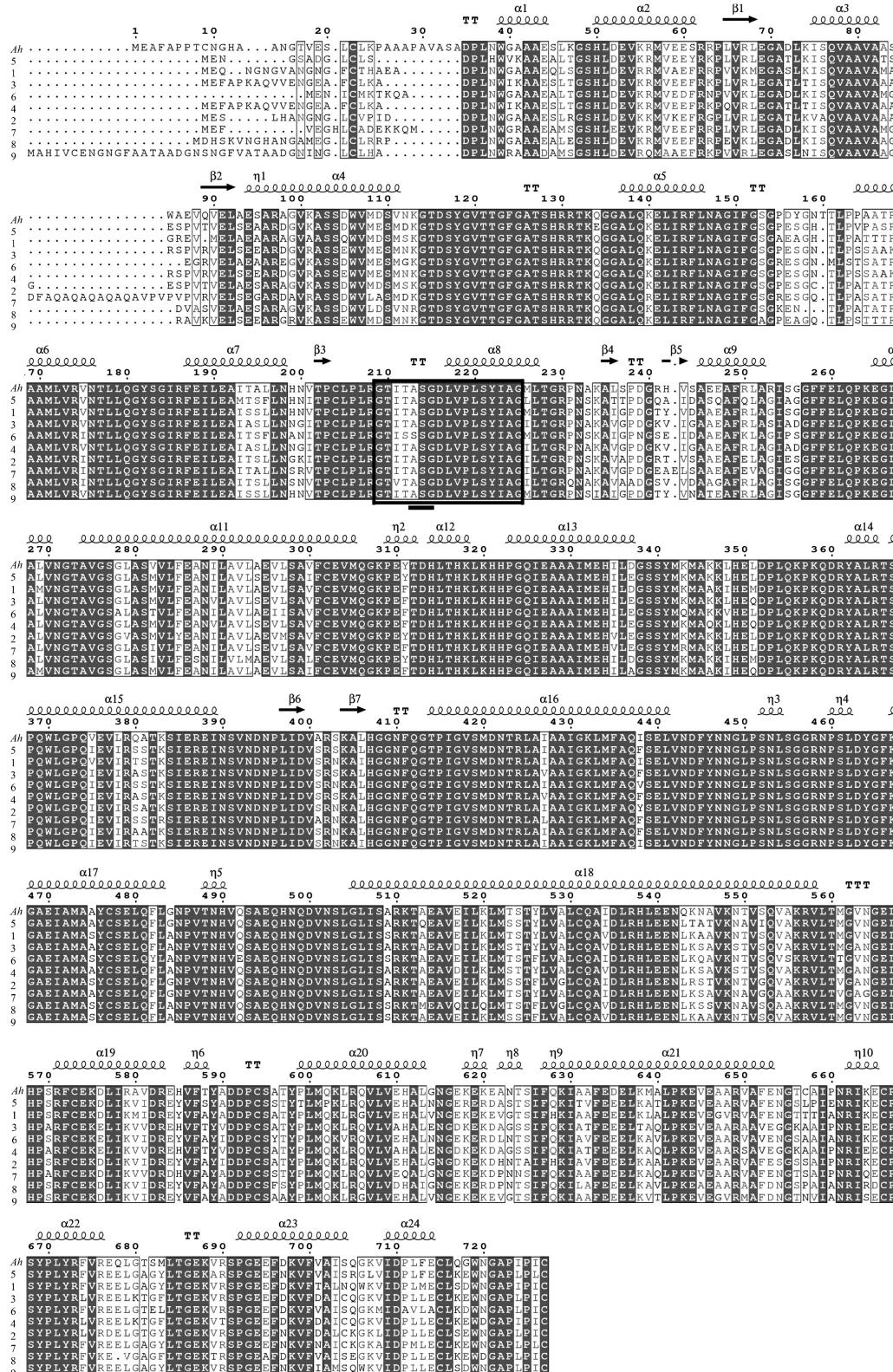
从表 1 中筛选 FPKM > 2 且编码蛋白较为完整的 AhPAL 基因, 利用 R 语言绘制热图。结果发现, CL4508.Contig2、CL4508.Contig3 和 UniGene43535 均在根中表达量最高, 在叶和块茎中较低(图 6: A)。

表 3 AhPAL 结构域分析
Table 3 Analysis of AhPAL domain

结构域功能 Function of domain	结构域位置 Position of domain
N-糖基化位点	N15-V18, N159-L162, N271-A274, N453-G456, N623-I626, N654-C657
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点	S49-D52, S84-E87, S153-D156, S244-E247, S391-D394, T588-D591, S691-E694
N-肉豆蔻酰化位点	G16-L21, G99-S104, G119-F124, G149-G154, G209-S214, G225-R230, G272-S277, G324-A329, G409-T414, G449-L454, G468-M473, G484-N489, G505-R510
蛋白激酶 C 磷酸化位点	S45-K47, S61-R63, S95-R97, S128-R13, T228-R230, T316-K318, S508-R510
酰胺化位点	R662-Y669

表 4 不同物种间 PAL 比对结果
Table 4 Homologous alignment of PALs in different species

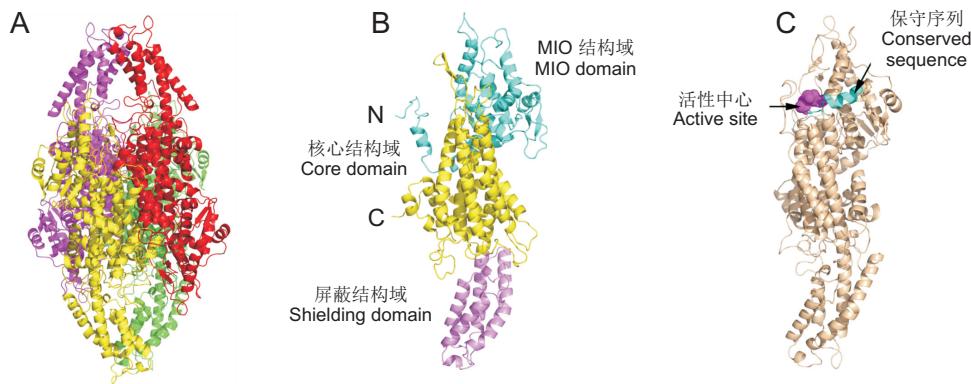
编号 No.	登录号 GenBank ID	蛋白功能归类 Classification of protein function	物种来源 Source	相似性 Identify (%)
1	AKN80396.1	PAL	郁金香 <i>Tulipa fosteriana</i> W. Irving	88
2	AHG06397.1	PAL	虎眼万年青 <i>Ornithogalum longibracteatum</i> Jacq.	87
3	BAG70992.1	PAL	野蕉 <i>Musa balbisiana</i> Colla	85
4	XP_009392118.1	PAL	香蕉亚种 <i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i> (Ridl.) N.W. Simmonds	84
5	ATG23645.1	PAL	西谷椰子 <i>Metroxylon sagu</i> Rottb.	84
6	XP_020259774.1	PAL	石刁柏 <i>Asparagus officinalis</i> L.	84
7	OAY76951.1	PAL	菠萝 <i>Ananas comosus</i> (L.) Merr	84
8	PKA59591.1	PAL	深圳拟兰 <i>Apostasia shenzhenica</i> Z.J. Liu & L.J. Chen	84
9	BAM28964.1	PAL	杂交百合 <i>Lilium hybrid</i>	84



编号对应的物种名见表4; *Ah*为异叶天南星; 黑色粗线框内为保守序列, 下划线处为活性中心 Ala-Ser-Gly 三肽。Numbers corresponding to species are shown in Table 4; *Ah* represents *A. heterophyllum*; Signature sequence of PAL and conserved “Ala-Ser-Gly” residues are boxed and underlined, respectively. Secondary structure elements for AhPAL are shown above the sequences with helices as squiggles and strands as arrows.

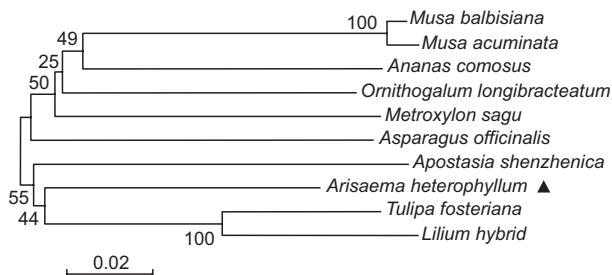
图3 不同物种间 PAL 比对图和 AhPAL 二级结构示意图

Fig. 3 Alignment of PAL in different species and secondary structure prediction of AhPAL



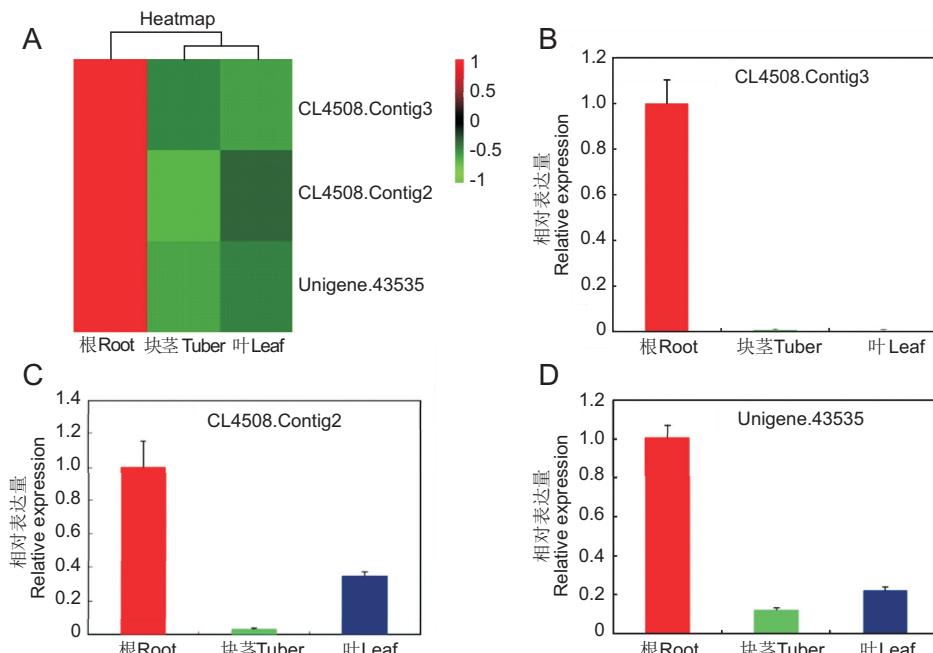
A: AhPAL 同型四聚体; B、C: AhPAL 单体。
A: Tetramer model of AhPAL; B, C: Monomer of AhPAL.

图 4 AhPAL 的三级结构
Fig. 4 Structure of AhPAL



自展值为 1000, 0.02 代表遗传距离。
Bootstrap = 1000, 0.02 shows genetic distance.

图 5 PAL 的系统发育进化树
Fig. 5 Phylogenetic tree of PAL



A: AhPAL 表达量热图; 红色示高表达量, 绿色示低表达量; B、C、D: 荧光定量 PCR 检测 CL4508.Contig3、CL4508.Contig2 和 Unigene.43535 的表达情况。

A: Heatmap of AhPAL; Red and green represent high and low expression levels, respectively; B, C, D: Expression levels of CL4508.Contig3, CL4508.Contig2, and Unigene.43535 detected by qRT-PCR.

图 6 AhPAL 的表达分析
Fig. 6 Expression analysis of AhPAL genes

为验证异叶天南星转录组数据,采用qRT-PCR方法检测3个Unigene在根、块茎和叶组织中的表达情况。结果表明,它们在根、块茎和叶的表达量存在明显差异,在根中表达最高,叶和块茎中表达均较低(图6),与转录组数据一致。

3 讨论

PAL具有别构酶的性质,是一种细胞内诱导酶,在酶促反应中加入诱导物,如生长调节剂、磷酸盐等可显著增强PAL酶的活性^[16]。植物黄酮类化合物的合成在转录水平上受到PAL的高度调控^[17]。Nag等^[18]指出在大花万代兰(*Vanda coerulea* Griff. ex Lindl.)中通过改变温度、盐度等条件提高PAL的活性,可增加黄酮类化合物的产量。Ghasemi等^[19]发现紫外辐射孜然(*Cuminum cyminum* L.)叶片,能使叶片PAL酶基因的表达增强,最终导致黄酮类化合物的产量显著增加。

异叶天南星是一种多年生药用植物,黄酮类是其重要的活性成分和有效成分^[2,3]。本研究从异叶天南星中克隆了一个AhPAL基因的ORF,其编码产物AhPAL氨基酸序列与9种不同物种的PAL序列一致性均超过80%,表明PAL在不同物种中具有较高的保守性,而保守的氨基酸序列保证了酶空间结构的稳定及功能的发挥。AhPAL的空间结构模型是同型四聚体,每个单体由MIO结构域、核心结构域和屏蔽结构域组成,其中MIO结构域含有与苦荞(*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.)^[20]和桑黄(*Inonotus baumii* Pilát)^[21]同样的PAL酶家族保守序列(GTITASGDLVPLSYIAG)和三肽活性中心。Ala-Ser-Gly三肽经环化脱水形成亲电基团,通过攻击芳香环增加亲电性,从而发挥酶辅助因子的作用,增强PAL酶的活性^[21,22]。AhPAL与组氨酸解氨酶(Histidine ammonia-lyase, HAL)结构类似,但HAL仅含有MIO结构域和核心结构域,而植物和真菌PAL还含有一个约100个残基的C端多螺旋屏蔽结构域^[23],该结构域可能通过限制底物与活性中心结合,在苯丙氨酸途径中发挥重要作用。此外,PAL单体的N-末端通过向外延伸锚定酶,可与其他细胞成分相互作用^[24]。

不同的植物组织中酶基因的多态性是同工酶形成的基础。异叶天南星转录组数据中存在多个核苷酸序列差异较大的AhPAL Unigene,表明编码

PAL酶的基因在异叶天南星中具有多态性。qRT-PCR证实异叶天南星中不同AhPAL Unigene在根、块茎和叶组织中存在明显的表达差异,其中在根中表达水平最高,表明PAL的表达模式具有组织特异性。研究表明,PAL在盐肤木(*Rhus chinensis* Mill.)^[25]茎中高表达,而在胡桃(*Juglans regia* L.)^[26]和黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge)^[27]的根中高表达。PAL特异性的表达模式可能与苯丙素类化合物生物合成的复杂性以及其它PAL亚型的存在有关^[20,28]。

参考文献:

- [1] 徐大林,朴花子,陈正爱.异叶天南星的药理作用研究进展[J].延边大学医学学报,2013(4):322-324.
- [2] Xu DL, Piao HZ, Chen ZA. Research development in *Arisaema heterophyllum* Blume. on pharmacological activities [J]. *Journal of Medical Science Yanbian University*, 2013 (4): 322-324.
- [3] 何达海,丁克毅,王晓玲.天南星属植物化学成分研究进展[J].西南民族大学学报(自然科学版),2014, 40(6): 861-865.
- [4] He DH, Ding KY, Wang XL. Chemical constituent research progress on plants belonging genus *Arisaema*[J]. *Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition)*, 2014, 40(6): 861-865.
- [5] 张帅.药用植物天南星中有效成分的筛选和药理学研究[D].郑州:郑州大学,2013.
- [6] 闵巍巍,张作法.黄酮类化合物的药理作用[J].蚕桑通报,2007, 38(4): 1-3.
- [7] Min WW, Zhang ZF. Research development in flavonoids on pharmacological activities [J]. *Bulletin of Sericulture*, 2007, 38(4): 1-3.
- [8] Mrvová N, Škandík M, Kuniaková M. Modulation of BV-2 microglia functions by novel quercetin pivaloyl ester [J]. *Neurochem Int*, 2015, 90: 246-254.
- [9] Li Y, Ma C, Qian M, Wen ZM, Jing HY, et al. Butein induces cell apoptosis and inhibition of cyclooxygenase-2 expression in A549 lung cancer cells[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9: 763-767.
- [10] Min N, Leong PT, Lee RCH, Khuan JSE, Chu JJH. A flavonoid compound library screen revealed potent antiviral activity of plant-derived flavonoids on human enterovirus A71 replication[J]. *Antiviral Res*, 2018, 150: 60-68.
- [11] 黄小贞,赵德刚.植物苯丙氨酸解氨酶表达调控机理的研究进展[J].贵州农业科学,2017, 45(4): 16-20.
- [12] Huang XZ, Zhao DG. Research progress in regulation and control mechanism of phenylalanine ammonia lyase in plants[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2017, 45(4):

- 16–20.
- [9] 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.
Xu XM, Yang SG. Advances in the studies of phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2009, 37(31): 15115–15119.
- [10] 乔枫, 耿贵工, 张丽, 金兰, 陈志. 枸杞苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析 [J]. 中国农业大学学报, 2017, 22(12): 64–73.
Qiao F, Geng GG, Zhang L, Jin L, Chen Z. Molecular cloning and expression pattern of *LcPAL* from *Lycium chinense* [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2017, 22(12): 64–73.
- [11] Zhang C, Wang X, Zhang F, Dong LD, Wu JJ, et al. Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 7242.
- [12] 虞光辉, 王桂平, 王亮, 尹华燕, 牟晶晶, 等. 小麦 PAL 基因的克隆及赤霉菌诱导下的表达分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 1055–1061.
Yu SH, Wang GP, Wang L, Yin HY, Mou JJ, et al. Cloning of *PAL* genes and their response to FHB in wheat [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(5): 1055–1061.
- [13] Zhu Q, Xie X, Lin H, Sui SZ, Shen RX, et al. Isolation and functional characterization of a phenylalanine ammonia-Lyase gene (*SsPAL1*) from *Coleus* (*Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd) [J]. *Molecules*, 2015, 20: 16833–16851.
- [14] 赵志常, 高爱平, 陈业渊, 黄建峰, 党志国, 等. 芒果 PAL 基因的克隆与序列分析 [J]. 安徽农业大学学报, 2015, 42(5): 825–830.
Zhao ZJ, Gao AP, Chen YY, Huang JF, Dang ZG, et al. Cloning and sequence analysis of the *PAL* gene from mango (*Mangifera indica*) [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2015, 42(5): 825–830.
- [15] Ritter H. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 3426–3436.
- [16] Jun SY, Sattler SA, Cortez GS, Vermerris W, Sattler SE, et al. Biochemical and structural analysis of substrate specificity of a phenylalanine ammonia-Lyase [J]. *Plant Physiol*, 2018, 176: 1452–1468.
- [17] Khan W, Prithiviraj B, Smith DL. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonialyase activities in soybean leaves [J]. *Plant Physiol*, 2003, 160: 859–863.
- [18] Nag S, Kumaria S. In silico characterization and transcriptional modulation of phenylalanine ammonia lyase (PAL) by abiotic stresses in the medicinal orchid *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl [J]. *Phytochemistry*, 2018, 156: 176–183.
- [19] Ghasemi S, Kumleh HH. Changes in the expression of some genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites in *Cuminum cyminum* L. under UV stress [J]. *Protoplasma*, 2019, 256(1): 279–290.
- [20] Li CL, Bai YC, Chen H, Zhao HX, Shao JR, et al. Characterization and functional analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*FtPAL*) from *Fagopyrum tataricum* Gaertn [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(5): 1172–1182.
- [21] Lin W, Liu A, Weng C, Li H, Sun SW, et al. Cloning and characterization of a novel phenylalanine ammonia-lyase gene from *Inonotus baumii* [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2018, 112: 52–58.
- [22] Calabrese JC, Jordan DB, Boodhoo A, Sariaslani S, Vannelli T. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis [J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 11403–11416.
- [23] MacDonald MJ, D'Cunha GB. A modern view of phenylalanine ammonia lyase [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85: 273–282.
- [24] Pilbák S, Tomin A, Rétey J. The essential tyrosine-containing loop conformation and the role of the C-terminal multi-helix region in eukaryotic phenylalanine ammonia-lyases [J]. *FEBS J*, 2006, 273: 1004–1019.
- [25] Ma WL, Wu M, Wu Y, Ren ZM, Zhong, Y. Cloning and characterisation of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Rhus chinensis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2013, 32(8): 1179–1190.
- [26] Xu F, Deng G, Cheng S, Zhang W, Huang X. Molecular cloning, characterization and expression of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Juglans regia* [J]. *Molecules*, 2012, 17(12): 7810–7823.
- [27] Liu RR, Xu SH, Li JL, Hu YL, Lin ZP. Expression profile of a PAL gene from *Astragalus membranaceus* var. *mongolicus* and its crucial role in flux into flavonoid biosynthesis [J]. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 705–710.
- [28] Zhao S, Tuan PA, Li X, Kim YB, Kim H, et al. Identification of phenylpropanoid biosynthetic genes and phenylpropanoid accumulation by transcriptome analysis of *Lycium chinense* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 802.