

毛竹苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及组织特异性表达分析

高志民¹, 彭镇华^{1,2*}, 李雪平¹, 牟少华¹, 马艳军¹

(1. 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102;

2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

关键词: 毛竹; 苯丙氨酸解氨酶; 克隆; 组织特异性表达

中图分类号: S795.7

文献标识码: A

Isolation and Tissue Specific Expression Analysis of Phenylalanine Ammonialyase Gene from *Phyllostachys edulis*

GAO Zhi-min¹, PENG Zhen-hua^{1,2}, LI Xue-ping¹, MU Shao-hua¹, MA Yan-jun¹

(1. International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, State Forestry

Administration, Beijing 100102, China; 2. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: As a critical enzyme in secondary metabolism of plant, Phenylalanine ammonialyase (PAL) has significant meaning to its development and strong tolerance ability against hard. A full-length cDNA of PAL gene was isolated from *Phyllostachys edulis* through RT-PCR and RACE methods, and named as *PePAL1* (GenBank accession number: FJ195650). *PePAL1* is 2 436 bp, which contains an open reading frame encoding 701 amino acids. The results of amino acid sequence analysis showed that *PePAL1* had high identities with other gramineous PAL in *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Saccharum officinarum*, *Bambusa ventricosa*, *Bambusa oldhamii* and *Triticum aestivum*, especially with PAL from *O. sativa* up to 93.0%. Phylogenetic analysis showed that *PePAL1* and *LLB1* were on different branch sites. Tissue specific expression showed that *PePAL1* expressed in leaf, sheath, stem and root, much higher in stem.

Key words: *Phyllostachys edulis*; Phenylalanine ammonialyase (PAL); isolation; tissue specific expression

苯丙烷类代谢途径是植物代谢中一条非常重要的途径,一切含苯丙烷骨架的物质都是由这一途径直接或间接生成。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^[1-2],而苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是连接植物初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类代谢第1步反应的酶,是苯丙烷类代谢的关

键酶^[3]。分离编码苯丙氨酸解氨酶的基因,分析基因的结构与表达特性,将有助于深入了解苯丙氨酸解氨酶的表达调控机制。

近年来,越来越多的研究集中在苯丙氨酸代谢途径关键酶方面^[4],以期通过调节这些酶的表达活性,来实现有效地调节与之相应的次级代谢产物的生物合成,培育出适合人类生产生活需要的植物新品种,如适于造纸的低木质素含量树种、高异黄酮含

收稿日期: 2008-09-18

基金项目: 国家林业局重点项目“重要竹种基因组测序及功能基因开发”(2007-01); 国际竹藤网络中心基本科研业务费专项资金“毛竹细胞壁发育及其调控机制研究”(06/07-A03)

作者简介: 高志民(1971—),男,河北唐山人,副研究员,博士。

* 通讯作者: pengzh@icbr.ac.cn

量的大豆品种等。竹子作为我国重要的森林资源,由于竹材具有强度高、韧性好、硬度大等特点,在建筑、造纸、装饰材料等领域得到广泛的应用^[5]。毛竹是我国重要的经济竹种,以毛竹为材料进行 PAL 基因的研究,对于更好地开发利用毛竹资源具有重要的现实意义。本研究采用 RT-PCR 及 RACE 方法从毛竹中克隆了 PAL 基因 cDNA 全长,并对其进行了相关分析和组织特异性表达研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2007 年 10 月用购自广西省柳州地区的毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie) 种子进行播种,在国际竹藤网络中心培养室培养成实生苗,盆植于直径为 15 cm 的塑料盆中,培养介质为混合土(腐殖质土:蛭石=7:3)。培养条件为 25 ℃,每天光暗培养时间为 16 h/8 h。2008 年 3 月取新鲜、无病虫害的叶片、叶鞘、幼茎和根,用于 RNA 提取。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取毛竹新鲜材料的 RNA^[6],用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA。采用 Clontech 公司的 SMARTTM RACE 试剂盒合成 3'cDNA 和 5'cDNA。

1.3 基因的克隆与测序

根据已知苯丙氨酸裂解酶基因序列设计保守区扩增引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物 1:5'-TGTCGACCAGCGTCAACGG-3';引物 2:5'-TACTCTTCGTCGTCGCTGAC-3'。

PCR 反应体系为:cDNA(0.04 μg · L⁻¹)1 μL,正向引物(10 μmol · L⁻¹)1 μL,反向引物(10 μmol · L⁻¹)1 μL,dNTP(各 2.5 mmol)3 μL,2 × Buffer 10 μL,Taq 酶(5 U · μL⁻¹)0.2 μL,加水至总体积为 20 μL。反应条件:94 ℃ 1 min,55 ~ 65 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min 30 s,共 35 个循环。PCR 产物电泳分析后,用上海申能博彩生物科技有限公司试剂盒回收,按照 Promega 的 pGEM-T easy 载体快速连接试剂盒操作流程,将回收的 DNA 片段连接到载体上,转化大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers) DH5α 菌株,经蓝白斑筛选,提取阳性克隆质粒并经酶切图谱分析后,送北京三博远志科技有限公司测序。

根据保守区序列设计 RACE 引物。5'-RACE 引物: PAL5-1: 5'-CATCTCGTTGACCTTCTTGGCGTG-GCTC-3';3'-RACE 引物: PAL3-1: 5'-GCTCCAGTTC-

CTTGCCAACCCGATCACC-3', PAL3-2: 5'-CCGTGT-TCAGCTACGCCGACGACCCG-3'

PAL5-1、PAL3-1 分别与 UPM 配对的第 1 轮 PCR 反应条件为:94 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,5 个循环;94 ℃ 30 s,70 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,5 个循环;94 ℃ 30 s,68 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,25 个循环。PAL3-2 与 NUP 配对的巢式 PCR 反应条件为:94 ℃ 30 s,68 ℃ 30 s,72 ℃ 3 min,25 个循环。PCR 产物经回收、连接后送公司测序。

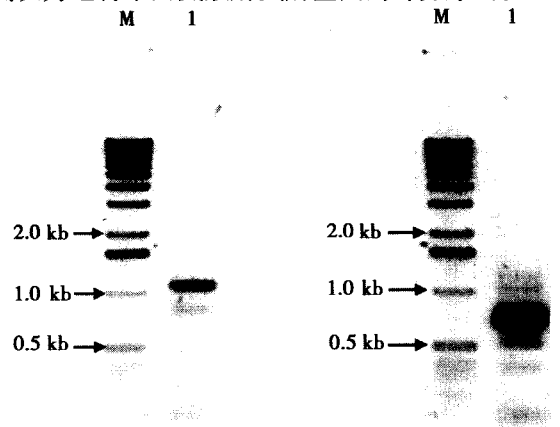
1.4 *PePAL1* 基因的组织特异性表达检测

采用 RT-PCR 法确定 *PePAL1* 基因在不同器官中的表达量。以毛竹 *Actin* 基因 (FJ601918) 作内标(正向引物:5'-ATGGCTGAAGAGGATATCCAGC-3',反向引物:5'-TTCCATGCCAATAAAAAGATGGCTG-3',PCR 反应条件:94 ℃,5 min;94 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,循环数为 28 个;72 ℃ 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 基因保守区片段的克隆与分析

以毛竹叶片 RNA 反转录合成的 cDNA 作为模板,用引物 1 和引物 2 进行扩增反应,PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色结果显示:在 1 000 bp 左右有 1 条亮带(图略),与预测的基因片段基本相符,初步确定为目的基因片段。将片段回收与 pGEM-T easy 载体连接,转化后将单克隆送公司测序。测序结果表明:插入片段位 1 063 bp。应用 Blast 在线软件,将测序的序列与已报道的基因进行同源比较,发现插入片段与苯丙氨酸裂解酶基因家族的保守区有着较高的相似性,其中与玉米的一致性达 95%,初步确认为毛竹苯丙氨酸解氨酶基因的部分序列。



1: RACE 产物;M: 1 kb 分子量标记
图 1 5'-RACE 产物电泳 图 2 3'-RACE 产物电泳

2.2 cDNA 编码区全长的克隆与分析

为了获得基因的全长,根据已获得保守区片断的序列设计了5'-RACE引物PAL5-1和3'-RACE引物PAL3-1,与SMARTTM RACE试剂盒通用引物(UPM)配对进行扩增。引物PAL5-1和UPM的产物在100 bp左右有1条亮带(图1),而引物PAL3-1和UPM的产物电泳呈现弥散状态,没有特异性条

带。将引物PAL3-1和UPM的PCR产物稀释50倍作为模板,用引物PAL3-2与NUPM配对进行扩增,电泳结果显示在800 bp左右有1条亮带(图2)。将PCR产物回收、连接后转化,在得到的大量克隆中,选取阳性克隆进行测序。通过测序并于保守区序列拼接,去掉重叠部分,得到一个全长为2436 bp的基因序列,GenBank注册号为FJ195650。

-95 AC GCGGGGAAGAAGAGCTCACCACCCTCTCCTCCGGCTTCTTTCGACCTCTCCTCCTCCTCCTAACCCTACCCACC
-18 ACCGCCACCCACCGAGCAATGGCGGGCAACGGGCTCATCATCAAGAATGACCCGCTCAACTGGGGCGGGCGGGGGCC
M A G N G L I I K N D P L N W G A A A A
61 GAGCTCACGGCAGCCACCTCGACGAGGTGAAGCGGATGGTGGCGCAGTTCGGCGAGCCCGTGGTCAAGATCGAGGGC
E L T G S H L D E V K R M V A Q F R E P V V K I E G
139 TCCAGCCTCCGGCTCGGCCAGGTGGCCCGCTCGCCAGGCCAAGGACGCCCGCGCTCGCGTTCGAGCTGGACGAG
S S L R V G Q V A A V A Q A K D A A G V A V E L D E
217 GAGGCGCCCGCCCGCTCAAGGCCAGCAGCGAGTGGATCCTCAACTGCCTCGCCCATGGCGGGACATCTACGGCGTC
E A R P P R Y K A S S E W I L N C L A H G G D I Y G V
295 ACCACCGGCTTCGGGGCACCTCCACCCCGCACCAAGGAGCGGGCCCGCTCCAGGTTCGAGTCTCCTCAGGCATCTC
T T G F G G T S H R T T K D G P A L Q V E L R H L
373 AATGCGGAATCTTCGGCACCGGCACCGGGCACACGCTGCGCTCGGAGGTGACCGCTGCGGCCATGCTCGTGGCC
N A G I F G T G T D G H T L P S E V T R A A M L V R
451 ATCAACACCCCTCTCCAGGGCTACTCCGGCATCCGGTTCGAGATCCTCGAGGCCATCACCAAGCTCATCAACACGGCC
I N T L L Q G Y S G I R F E I L E A I T K L I N T G
529 GTCAGCCCTGCCTCCCGCTCAGGGAAACCATACCCGCTCCGGGACCTGGTCCCGCTGTCTACATTGGCGGCTT
V S P C L P L R
607 ATCACTGGCGCCCAATGCGCAGGCCGCTCGCCCGGCAGCGCAGGAAGGTGGACGCCCGCGAGGGCGTTCAAGATCGCC
I T G R P N A Q A V A P D G R K V D A A E A F K I A
685 GGCATCGAGGGCGGTTCTTCAAGCTCAACCCCAAGGAGGGTCTCGCCATCGTCAACGGCACGTCGGCTCCGGC
G I E G G F F K L N P K E G L A I V N G T S V G S A
763 CTCGGCCACCGGTGCTCTATGATTGCAACGCTCCTCGCGCTCCTCTCCGAGGTCTGTCCCGCTGTTCTCGGAGGTC
L A A T V L Y D C N V L A V L S E V L S A V F C E Y
841 ATGAACGGCAAGCGGAGTACACCGACCACTGACCCACAAGCTGAAGGACCAACCCGGGCTCGATCGAGGCGCGGGCC
M N G K P E Y T D H L T H K L K H H P G S T E A A A
919 ATCATGGAGCACATCGTCGGCGGCTCGTTTCATGACCCAGCCCAAGGAGTCAACGAGATGGACCCGCTCGAAG
I M E H I L A G S S F M S H A K K Y N E M D P L L K
997 CCCAAGCAGGACAGGTACCGCTCCGACGTCGCGCGAGTGGCTCGGCCACAGATCGAGGTTCATCCGGCGGGCCACC
P K Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q I E V I R A A T
1075 AAGTCCATCGAAGGTGAGGTCAACTCCGTCACAGCACCCGGTTCATCGACCTCCACCGGGCAAGGCGCTCCACGGC
K S I E R E V N S V N D N P V I D V H R G K A L H G
1153 GGCATTTCCAGGGCACCAATCGGTGTGTCCATGGACAACCCCGTTCGCCATTCGCCAATCGGCCAATCGGCCATCG
G N F Q T G T P I G Y S M D N T R L A I A N I G K L M
1231 TTCGCGCAGTTCTCAGAGCTCGTGAACGAGTTCTACAACAACGGGCTGACGTCCAACCTTGGCGGGCAGCGCAACCCG
F A Q P S E L V N E F L N N G L T S N L A G S R N P
1309 AGCTTGAGCTACGGCTTCAAGGGCACCGAGATCGCCATGGCTCCTACTGCTGAGCTCCAGTTCCTTGCCAACCCG
S L D Y G F K G T E I A M A S Y C S E L Q F L A N P
1387 ATCAACACCATGTGACAGCGCGGAGCAGCACCAAGGACGTGAACCTCGCTCGGCTCGTCTCGGCCAGGAAGACC
I T N H V Q S A E Q H N Q D V N S L G L V S A R K T
1465 GCGGAGCGGTTGGACCTCCTCAAGCTCATGTCTCGACGTACATGGTTCGGCTGTGCCAGGCCATCGACCTCCGGCAC
A E A V D I L K L M S S T Y M V A L C Q A I D L R H
1543 CTCGAGGAGAACAATCAAGACCTCCGTCAGAAGTGGGTGACGCGAGGTGGGCAAGAAGGTGCTCACCATGAACCCACC
L E E N I K T S V K N C V T Q V G K K V L T M N P T
1621 GGCAGCTCTCCAGCGCGCTTCAAGGAGAAGGACCTCCTCACCGCCATCGACCCGAGCGGCTGTTACGCTACGCC
G D L S S A R F S E K D L L T A I D R E A V F S Y A
1699 GACGACCCGTGCAGCGCAACTACCCGCTGATGCAAGAGTGGCGGCGGTGCTCGTGCACCACCGCCCTCACCAGGGCC
D D P C S A N Y P L M Q K L R A V L V D H A L T S G
1777 GACGAGAGAGGGAGCCCTCCGTTTTCTCAAGATCAACAAGTTCGAGGAGGAGCTGCGCTCGGGCTGCCCGGGAG
D G E R E P S V F S K I T K F E E E L R S A L P R E
1855 ATCGAGGCGCCCGCTGGCGGTGGAGAACGGCACCGGCCCATCGCCAACCGGATCAAGGAGAGCAGGTGCTTCCCC
I E A A R V A V E N G T A P I A N R I K E S R S F P
1933 GTGTACCGCTCGTCCGTGAGGAGCTCGGCTGGGTACTCTACTGGCGAGAAGCTCAAGTCCCGCGGAGGAGTGC
Y Y R L V E L G C V Y L T G E K L K S P G G E G
2011 AACAGGGTGTTCATCGGCATCAACAGGGCAAGCTCATCGACCCAATGCTCGAGTGCCTCAAGGAGTGAACGGCGAG
N R V F I G I N Q G K L I D P M L E C L K E W N G E
2089 CCCCTGCCATCAACTAAGCATCCGTCATCCACCCGTCGAGTTCGTTGGAGGAGGACACTACAGAATACATCAAAGAA
P L P I N
2167 AATAAAACCGCTCGTGTATGTTCCGATCGTGTCTCGCTTTTTCCTTCTCGTTCGTTGGTGGCGGTTGTTCTTTGTG
2245 TAGCTGCTCTGCCATCGCCTGTAATCGCATGCCCTGGCGGGCGGCTTTTTTAAGATATGTTTGTACAAAAA
2323 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

(下划线部分为保守域序列,阴影为PAL-histidase信号,着重号部分为起始密码子,边框部分为终止密码子)

图3 PePAL1的核酸序列及其推导出的氨基酸序列

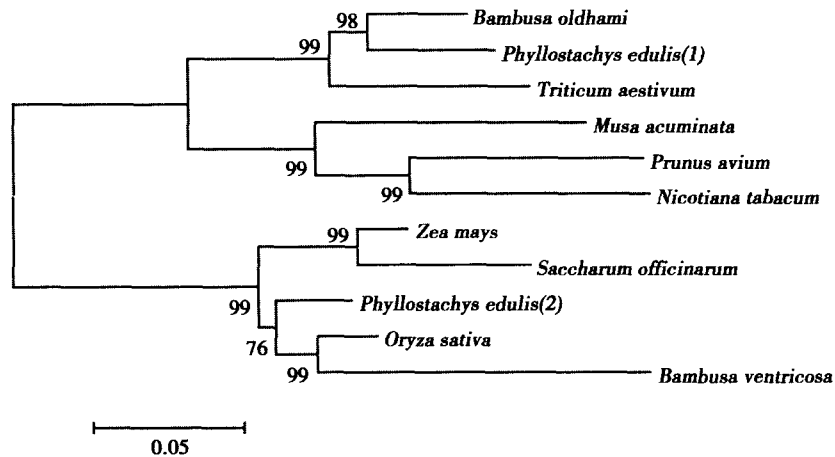
序列分析表明:FJ195650 包含一个完整的编码区 2 106 bp,5'非翻译区(UTR)95 bp,3'非翻译区 235 bp 和 polyA 尾巴 28 bp。FJ195650 编码区 GC 含量达 66.0%,编码 701 个氨基酸,第 41~450 位为苯丙氨酸解氨酶保守域,在第 185~201 位为苯丙氨酸解氨酶-组氨酸酶(PAL-histidase)信号(图 3),具备苯丙氨酸解氨酶的特征,该基因命名为 *PePAL1*。*PePAL1* 编码蛋白的等电点为 6.398,分子量为 75 697.71 Da。

2.3 氨基酸序列比较与系统进化树分析

通过 blast 软件在线比较分析,结果显示:*PePAL1* 编码的氨基酸序列与其它单子叶植物的 PAL 具有较高的一致性,尤其与同是来自禾本科的水稻(*Oryza sativa* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、甘蔗(*Saccharum offi-*

cinarum L.)、小佛肚竹(*Bambusa ventricosa* McClure)、绿竹(*B. oldhami* Munro)和小麦(*Triticum aestivum* L.)的 PAL 的一致性都在 75% 以上,其中与水稻的 PAL(P14717)的一致性最高,达 93.0%,与来自毛竹的 LLB1(ABP96954)的一致性为 76.9%。由此可见, PAL 在系统进化中是比较保守的。

应用 MEGA4.0.2 软件构建了基于 PAL 基因编码氨基酸序列的系统进化树(图 4),分析表明:来自毛竹的 2 个 PAL 聚类到了不同的分支位点上,其中 LLB1(*Ph. edulis*(1))与绿竹的 PAL 位置较近,位于同一个分支上,而与小佛肚竹的 PAL 位置却较远;*PePAL1*(*Ph. edulis*(2))与水稻、小佛肚竹的 PAL 位置较近,位于另一个分支上,而与同是来自竹亚科的绿竹的位置却较远。



构建系统进化树所选用的 PAL:水稻(P14717)、玉米(NP_001105334)、甘蔗(ABM63378)、小佛肚竹(AAX97448.1)、绿竹(AAR24505)、小麦(Q43210)、毛竹(1)(ABP96954)、毛竹(2)(FJ195650)、小果野蕉((*Musa acuminata*) ACG56648)、欧洲甜樱桃((*Prunus avium*) O64963)和烟草((*Nicotiana tabacum*) P25872)。每个分支上的数字表示 1 000 次重复搜索的靴带值。

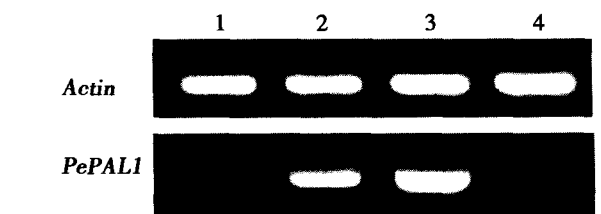
图 4 基于 PAL 基因编码的氨基酸序列构建的系统进化树

2.4 *PePAL1* 基因的组织表达特异性分析

分别提取毛竹叶片、叶鞘、幼茎和根的 RNA,反转录成 cDNA 第 1 链,用毛竹 *Actin* 基因作内标,调整 cDNA 用量和循环数,使内标基因的表达丰度一致。以调整后的 cDNA 模板量进行 *PePAL1* 基因的扩增。结果(图 5)表明:*PePAL1* 基因在叶片、叶鞘、幼茎和根中均有表达,其中在幼茎中的表达丰度最高,在叶鞘中次之,在根中的表达丰度最低。

3 讨论

植物 PAL 基因结构的普遍特点是由小的多基因家族组成^[7]。GenBank 中来自毛竹苯丙氨酸解氨酶基因 *LLB1* 的序列为 2 363 bp,该基因组序列由 2 个



1: 叶片; 2: 叶鞘; 3: 幼茎; 4: 根

图 5 *PePAL1* 在不同组织中的表达特性

外显子(1~395,517~2 263)和 1 个内含子(396~516)组成,其编码的蛋白序列(ABP96954)与 *PePAL1* 的一致性达 76.9%。系统进化分析显示,同是来自毛竹的苯丙氨酸解氨酶基因其编码的蛋白 *PePAL1* 和 *LLB1* 却聚类到不同的分支位点,从一定

程度上反应了竹类植物在系统进化上的复杂性。由此推测, *LLB1* 与 *PePAL1* 分别编码毛竹苯丙氨酸解氨酶的不同亚基, 可能具有不同的功能。

PAL 在植物组织中的表达具有组织特异性, 本研究中 *PePAL1* 基因在叶片、叶鞘、幼茎和根中均有表达, 且在幼茎中的表达丰度最高, 在根中的表达丰度最低。这与某些植物 *PAL* 在根部中表达量最高^[8-9] 的表达模式不同, 这可能是由于物种差异造成的。*PAL* 基因的表达模式除受到不同部位的影响外, 还受发育时期的调控。如草莓^[10] 的果实在发育过程中, *PAL* 活性有两个高峰, 一个为幼果期, 一个为果实成熟期。本研究仅研究了毛竹幼苗期的表达模式, 其在笋期、成竹期的表达模式需要进一步研究。

目前, 已经从拟南芥、番茄、松树、大豆、杨树、水稻、胡萝卜等多种植物中分离了包含 *PAL* 基因在内的多类次生代谢调控基因, 并对其进行了比较全面的研究^[11], 对 *PAL* 的活性及其调控的次生代谢产物的药用价值倍受关注^[12], 然而对于竹子的相关研究却刚刚起步。本研究从毛竹中分离了苯丙氨酸解氨酶基因, 并初步探讨了其表达模式, 这仅仅是探索竹子次生代谢调控的开始, 但对于未来通过基因工程手段来改变竹子木质素、纤维素的含量或改变其组分的定向培育, 形成新品系有着重要的现实意义。

参考文献:

[1] 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J].

植物生理学通讯, 1988, 24(3): 9-16

- [2] 贺立红, 张进标, 宾金华. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 食品科技, 2006, 31(7): 31-34
- [3] 李莉, 赵越, 马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: *PAL*、*C₄H₄CL* 研究新进展[J]. 生物信息学, 2007(4): 187-189
- [4] 马俊彦, 杨汝德, 敖利刚. 植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展[J]. 现代食品科技, 2007, 23(7): 71-75
- [5] 江泽慧. 世界竹类[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2002: 3-6
- [6] Gao Z, Li X, Li L, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo[J]. Chinese forestry science and technology, 2006, 5(3): 52-54
- [7] 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(增刊): 31-33
- [8] Cramer C L, Edwards K, Dron M, et al. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure[J]. Plant Molecular Biology, 1989, 12(4): 367-383
- [9] Liang X W, Dron M, Cramer C L, et al. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(24): 14486-14492
- [10] Cheng G W, Breen P J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit[J]. Journal of American Society for Horticultural Science, 1991, 116(5): 865-869
- [11] 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 等. 植物次生代谢物途径及其研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2007, 25(5): 500-508
- [12] Okada T, Mikage M, Sekita S. Molecular Characterization of the Phenylalanine Ammonia-Lyase from *Ephedra sinica*[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2008, 31(12): 2194-2199