

文章编号: 1001-1498(2005)05-0573-05

银杏苯丙氨酸解氨酶基因的克隆和序列分析

程水源^{1,2}, 杜何为³, 许 锋¹, 陈昆松¹

(1. 浙江大学果树研究所, 浙江 杭州 310029; 2. 长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025;

3. 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 根据其他植物 PAL 基因的 DNA 序列的保守区域, 设计了一对简并引物, 经 PCR 扩增, 得到一条 862 bp 的特异性扩增带。将 PCR 扩增产物构建到 T 载体并测序, 获得了 862 bp DNA 序列。通过分析所得的 862 bp DNA 序列及其编码的氨基酸序列, 与其他植物 PAL 基因的 DNA 序列和蛋白质序列分别进行比较, 证实了所得序列为银杏 PAL 基因的部分序列。Gbpall 已经被 Genbank 收录, 序列号为 AY578145。Southern 杂交结果表明银杏 PAL 是一个多基因家族。

关键词: 银杏; PAL; 克隆; Southern blot

中图分类号: S792.95 **文献标识码:** A

Molecular Cloning of Phenylalanine Ammonia-lyase in *Ginkgo biloba*

CHENG Shui-yuan¹, DU He-wei³, XU Feng², CHENG Kun-song¹

(1. Fruit Science Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310000, Zhejiang, China; 2. College of Gardening and Horticulture,

Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China; 3. College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China)

Abstract: According to the conservative domain of some other plants DNA sequences of PAL gene, a pair of degenerate primer was designed. A special DNA fragment was obtained by PCR amplifying, which length is 862 bp, and it is named *Gbpall*. We analysed the nucleotide and amino acid sequence of similarity to the corresponding gene of other organism, the results showed that *Gbpall* is a partial PAL gene of *Ginkgo biloba*. The sequence had been embodied in Genbank, and Accession NO. is AY578145. The southern blot analysis indicated that *Ginkgo biloba* PAL belonged to a multigene family.

Key words: *Ginkgo biloba*; PAL; cloning; southern blot

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 叶片中的黄酮类化合物具有重要的药用价值。黄酮类化合物在生物体内合成代谢是从苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL, E C4.3.1.5) 催化苯丙氨酸脱氨反应开始的^[1], 通过莽草酸酯和醋酸丙二酸酯两条生物合成途径合成并衍生为黄酮类化合物。研究表明, PAL 活性与叶黄酮的合成积累成正相关, 是银杏叶黄酮合成代谢途径中的关键酶之一^[2]。许多研究表明, 不同植物中 PAL 的活性不同, 同一植物的不

同组织和器官间 PAL 的活性也存在差异, 如毛果杨、美洲黑杨 (*Populus trichocarpa* Torr. et Groy × *Populus deltoides* Bartr.) 的幼叶、顶芽、幼茎中 PAL 活性最高, 而老茎和成熟叶中 PAL 则很低^[3]。另外, PAL 的表达受发育和环境信号 (如温度、光质、机械损伤、激素和营养等) 的调节, 表现出严格的组织和时间特异性^[4]。在植物的抗病、抗胁迫、花色素的合成等方面起着重要的作用。PAL 为多基因家族所编码, 在诸如马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.)、拟南芥 (*Arabidopsis*

收稿日期: 2004-12-02

基金项目: 湖北省科技厅科技攻关重大项目 (2002AB094)

作者简介: 程水源 (1965—), 男, 湖北天门人, 教授, 浙江大学在站博士后。

dopsis thaliana (L.) Heynh.)、烟草 (*Nicotiana tabacum* L.)、黄瓜 (*Cucumis sativus* Linn.) 以及大麦 (*Hordeum vulgare* Linn.)^[5-9] 等植物中, 已克隆到了编码这个酶的 cDNA 片段或基因组序列。

银杏叶片中存在大量 PAL 的表达并受发育和环境信号的调节^[10], 但编码银杏 PAL 酶的 cDNA 和基因组序列仍有待研究。克隆银杏中 PAL 基因对了解这个基因的结构、进化及其表达调控具有重要意义, 同时也为旨在提高银杏叶片中类黄酮含量的遗传改良提供了基因资源。本研究以银杏叶为试材, 利用 PCR 技术克隆 PAL 基因组序列, 为 PAL 表达调控研究奠定了基础, 所获得基因片段命名为 *Gbpall*。

1 材料与方法

1.1 材料

银杏品种家系佛手, 由长江大学园艺园林学院银杏课题组栽培、提供, 采其幼叶贮藏于 -70℃ 冰箱中备用。

1.2 方法

1.2.1 银杏叶片 DNA 提取 用改良的 CTAB 法提取。提取缓冲液成分为: 10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 值 8.0), 200 mmol · L⁻¹ NaCl, 50 mmol · L⁻¹ EDTA, 2% PVP, 2% CTAB, 140 mmol · L⁻¹ ME (ME 在使用前加)。

1.2.2 PAL 基因 PCR 扩增 根据其他植物 PAL 基因中的保守序列, 设计了一对简并引物:

Sense primer: 5' GC (A/T/C) TC (T/C/G) GGT GAT (C/T) T(A/G) GT(T/C) 3'

Anti-sense primer: 5' ACA TCT TGG TT(A/G) TG(T/C) TGC TC 3'

PCR 扩增反应液: 10 × Buffer 2.5 μL, 25 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 2 μL, 10 mmol · L⁻¹ dNTPs 0.5 μL, 10 μmol · L⁻¹ left Primer、right Primer 1 μL, 5u · μL Taq 酶 0.2 μL, 30 ng · μL⁻¹ 模板 DNA 1 μL, 加 ddH₂O 至 25 μL, 混匀后加一滴矿物油。

PCR 反应扩增运行程序: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 48℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 30 min。

1.2.3 PCR 产物的回收、克隆及测序 PCR 产物的回收: 将 PCR 扩增产物在 10 mg · g⁻¹ 琼脂糖凝胶中电泳, 然后在紫外灯下切下目的带, 再使用试剂盒回收。

使用试剂盒将回收的 PCR 产物构建到 T 载体

中, 连接反应如下:

pMD 18-T vector 1 μL, PCR 回收产物 1 μL, ligation solution 5 μL, ddH₂O 3 μL。于 4℃ 连接 24 h, 然后把连接产物转化 *E. coli* DH5 菌株, 筛选重组子用于测序。

DNA 序列相似性比较及氨基酸序列保守区域预测在 NCB 站点上用 BLAST 和 RPS-BLAST 完成, 氨基酸序列比较在 EMBL 站点上用 Clustal X 1.81 完成, DNA 序列分析利用软件 DNA assist 完成。

1.2.4 Southern blot 分析 用 *HIND* 酶切银杏基因组 DNA (15 μg/sample), 37℃ 下过夜, 并不切断 *Gbpall*。酶切产物在 10 mg · g⁻¹ 琼脂糖凝胶中电泳, 经变性后应用毛细管转移法将酶切片断转移至 Hybond-N⁺ 尼龙膜上 (Amersham Pharmacia, UK), 在膜上做好位置标记, 依次用双蒸水和新鲜 0.4 mol · L⁻¹ NaOH 溶液浸泡, 充分湿润和平衡固定。探针制备利用所扩增 DNA 片断 (862 bp), 采用 Promega 公司的 Primer-a-Gene Labeling System 试剂盒标记。62℃ 预杂交 2 h, 然后加入标记探针 55℃ 水浴杂交 12 h, 洗膜条件参考 Sambrook^[11] 等。显影采用富士 X 光胶卷在室温下曝光 30 min。

2 结果与分析

2.1 银杏 PAL 基因 PCR 扩增结果

使用简并引物, 对银杏叶片 DNA 进行 PCR 扩增, 将 PCR 扩增产物于 10 mg · g⁻¹ 琼脂糖凝胶中电泳、检测, 电泳结果如图 1, 可以看出, 经 PCR 扩增, 得到了一条近 900 bp 的特异性 DNA 片段。

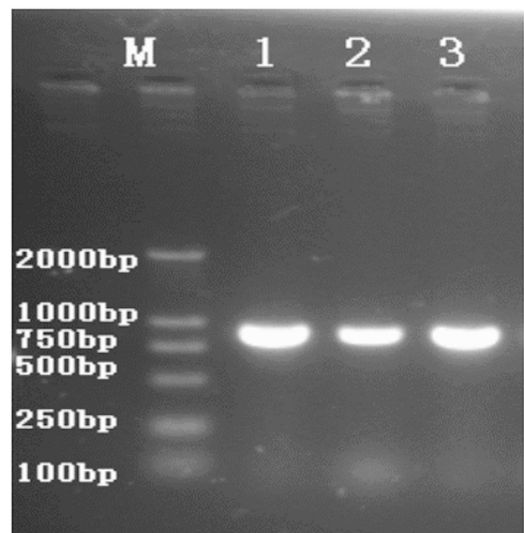


图 1 PCR 产物电泳

2.2 PCR扩增产物的克隆及测序

从 10 mg · g⁻¹琼脂糖凝胶中回收近 900 bp 特异性 PCR 扩增 DNA 片段,将回收的 DNA 片段克隆

于 T 载体,经克隆、酶切及 PCR 验证再挑选阳性克隆测序,得到了 862 bp 的 DNA 片段。核酸及编码氨基酸序列结果如图 2。

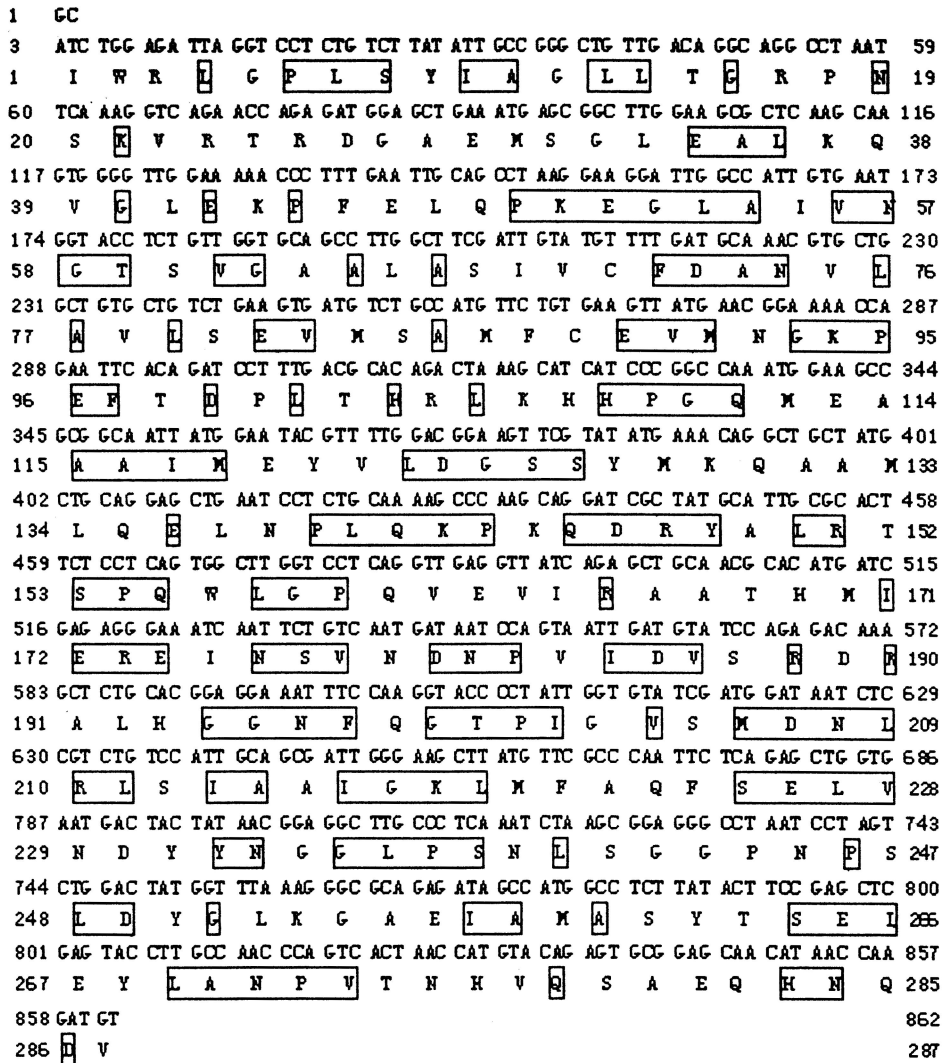


图 2 Gbpal1 核苷酸序列及推测的氨基酸序列,方框部分为高度保守氨基酸残基序列

2.3 核苷酸序列比较分析

登录 NCB 网址主页,使用 Blast 对 Gbpal1 序列进行分析比较,结果如表 1。Gbpal1 DNA 序列与其它植物的苯丙氨酸解氨酶基因具有很高的同源性,与其它植物的 PAL 基因的同源性都在 79% ~ 82% 之间。氨基酸序列与长白松 (*Pinus sylvestris* var. *syvestrifomis* Cheng et C. D. Chu)、海岸松 (*Pinus pinaster* Ait)、火炬松 (*Pinus taeda* L.) 和亮石杉 (*Huperzia lucidula* (Michx.) Ching) PAL 的氨基酸同源性分别为 93%、93%、91% 和 90%。说明所获得的 DNA 序列的确是银杏苯丙氨酸解氨酶基因的部分序列。

表 1 Gbpal1 核苷酸序列与其他植物 PAL 基因的同源性

基因登录号	物种	碱基同源性 / %	同源碱基数	E 值
AF353986	长白松 <i>Pinus sylvestris</i> var. <i>syvestrifomis</i> Cheng et C. D. Chu	83	842	e - 153
AY641535	海岸松 <i>Pinus pinaster</i> Ait	83	842	e - 151
U39792	火炬松 <i>Pinus taeda</i> Linn	82	842	e - 146
AY803280	三穗石松 <i>Lycopodium tristachyum</i> Pursh	78	434	8e - 25
AY803279	亮石杉 <i>Huperzia lucidula</i> (Michx.) Ching	82	228	5e - 26
AB015871	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> L.	79	226	3e - 15
X63103	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i> L.	79	212	1e - 11
AY803286	心月藏叶瓶尔小草 <i>Ophioglossum reticulatum</i> L.	78	267	1e - 08

2.4 氨基酸比较分析

使用 Clustal X1.81 软件其它几种植物 PAL 基因的氨基酸序列与所克隆的序列推测的氨基酸序列进行比较,部分比较结果如图 3。从 Clustal X1.81 分析比较的结果可以看出, *Gbpa11* 编码的氨基酸序列与酵

母 (*Saccharomyces cerevisiae* var.)、菜豆 (*Phaseolus m-dianus* Linn.)、毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. et Gray)、水稻 (*Oryza sativa* L.) 的 PAL 基因的氨基酸序列具有非常高的同源性,进一步证实了 *Gbpa11* 的 DNA 序列为银杏 PAL 基因的部分序列。

	170	180	190	200	210	220	230	240
consensus	142	SGDLAPLSHIALLLIGEGNAKAP--GPT-----WLP	AKEALALAGIE-P--VTLKPK	KEGLALVNGTQVGTAMAV	MALF	FD	211	
Ginkgo	1	iwrLGPLSYIAGLLTGRPN	SKVRtrDGA-----EMSGLEAL	KQVGLekP--FELQPK	EGLAIVNGTSVGAALASIVCF	FD	73	
Yeast	212	SGDLSPLSYIAAAISGHPDSKVH--V	VhegkekILYAREAMALFNLE-P--VVLG	PKPKEGLVNGTAVSASMATLALHDA	286			
Navy bean	199	SGDLIPLSYIAALLIGRRNSKAV--G	Psg---eSLNAKEAFHLAGVD-Ggf	FELKPK	EGLALVNGTAVGSGVASMVL	FEA	272	
Poplar	169	SGDLVPLAYIAGLLTGRHNSKAV--G	Png---ePLTSTEAFQTQAGIN-Ggf	FELQPK	EGLALVNGTAVGSGLASMVL	FEA	242	
Rice	190	SGDLVPLSYIAGLITGRPNAQAI--S	Pdg---rKVDAEAFKLAGIE-Ggf	FTLNPKEGLAIVNGTSVGSALAATVM	FD	263		
	250	260	270	280	290	300	310	320
consensus	212	NILALLAEVLAALTLEVMQGKP-EFF	DHLIHKLRPHPGQIEVAAIMRHL	LDGSSFD	SHHQSKVPEKDPLQKPVQDRY	SLR	290	
Ginkgo	74	NVLAVLSEVMSAMFCEVMNGKP-E	FTDPLTHRLKHPGQMEAAAIMEYV	LDGSSYMKA-AMLQELNPLQKPK	QDRYALR	151		
Yeast	287	HMLSLLSQSLTAMTVEAMVGHAg	SFHPFLHDVTRPHPTQIEVAGNIR	KLLEgssrfAVHHEEVEVKKdde	GILRQDRYPLR	366		
Navy bean	273	NILALLAEVLSAVFAEVMQGKP-E	FDHLIHKLYHPGQIEAAAIMEHIL	DgssyVKNA--KLQPDpIQKPK	DRYALV	349		
Poplar	243	NVLAILSEVLSAIFAEMQGKP-E	FDHLTHKLKHPGQIEAAAIMEHIL	DgsayVKEAQ-KLLEIdpIQKPK	DRYALR	320		
Rice	264	NILAVLSEVLSAVFCEVMNGKP-E	YTDHLTHKLKHPGSIDAAAIMEHIL	AgssfMSHAK-KVNEMdpILKPK	DRYALR	341		
	330	340	350	360	370	380	390	400
consensus	291	CSPQVLGPLIDTLRHATKVI	ERELN-SVTDNPLIDVDRGKVIS	GGNFHGTPIAVAMDNLRLAIAE	IGKLSERRISELVNK	369		
Ginkgo	152	TSPQWLGPQVEVIRAATHMI	EREIN-SVNDNPVIDVSRDKAL	HGGNFQGTPIGVSMNLRLSIAA	IGKLMFAQFSELVND	230		
Yeast	367	TSPQWLGPLVSDLIHAHAVL	TIEAGqSTTDNPLIDVENKTS	HHGGNFQAAAANTMEKTR	LGLAQIGKLNFTQLTEMLNA	446		
Navy bean	350	TSPQWLGPQIEIIRFSTKSI	EREIN-SVNDNPLIDVTRNKAV	SGGNFQGTPIGVSMNARLAVAS	IGKLIFAQFTELAND	428		
Poplar	321	TSPQWLGPLIEVIRTSTKMI	EREIN-SVNDNPLIDVSRSKAL	QGGNFQGTPIGVSMNTRLAIAS	IGKLMFAQFSELVND	399		
Rice	342	TSPQWLGPQIQVIRAATKSI	EREIN-SVNDNPVIDVHRGKAL	HGGNFQGTPIGVSMNARLAIAN	IGKLMFAQFSELVNE	420		
	410	420	430	440	450	460	470	480
consensus	370	FYNGLPSFLA--AE--PGLDS	GFMIQIAAAALVSELKALAN	PVSVDSQPTSAHNEDHVS	MGLIAARKTLEAIDNLKLV	445		
Ginkgo	231	YNGGLPSNLSggPN--PSLDY	GLKGAIEAMASYTSELEYLAN	PVTNHVQSAEQHNQDV-----	287			
Yeast	447	GMNrgLPSCLA--AEd--P	LSYHCKGLDIAAAAYTSELG	HLANPVTTHVQPAEMANQAV	NSLALISARRTTESNDVLSLL	523		
Navy bean	429	LYNnGLPSNLS--VGrn	PSLDYGFKASEVAMAAYCSEL	QYLANPVTSHVQSTEQHNQ	DVNSLGLISALKTVEAIEILKLM	506		
Poplar	400	FYNnGLPSNLT--GGrn	PSLDYGFKGAIEAMASYCSEL	QFLANPVTNHVQSAEQHNQ	DVNSLGLISSRKTAEAVDILKLM	477		
Rice	421	FYNnGLTSNLA--GSrn	PSLDYGFKGTEIAMASYSEL	QYLANPITNHVQSAEQHNQ	DVNSLGLVSARKTLEAVDILKLM	498		

图 3 不同植物 PAL 氨基酸序列的 Clustal 分析 (Ginkgo, Accession NO: AY578145; P11544; Yeast, Accession NO: P11544; Navy bean, Accession NO: P19143; Poplar, : Accession NO: P45731; Rice, Accession NO: P14717)

2.5 Southern blot 分析

Gbpa11 序列的限制性酶切图谱如图 5 所示, *HND* 酶切银杏基因组 DNA, 不会切断 *Gbpa11* 片段。Southern blot 结果表明, 银杏 DNA 被 *HND* 酶切后杂交, 在 0.5 Kb ~ 10.3 Kb 之间有 8 条以上的特异条带, 说明银杏 PAL 是一个多基因家族。这与所报道的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)^[6]、三叶草 (*Trifolium subterraneum* L.)^[12]、大麦 (*Hordeum vulgare* Linn.)^[13]、马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.)^[14] 和毛果杨 (*Populus trichocarpa* Torr. et Gray)^[15] PAL 多基因家族的结果是一致的,

PAL 基因家族中有 3 个以上的基因成员。

3 讨论

使用简并引物对银杏叶片 DNA 进行 PCR 扩增, 成功克隆了银杏 PAL 基因的部分序列 *Gbpa11*, 该序列被 GeneBank 收录, 登录号为 AY578145。利用增调中限速酶得活性来调控黄酮含量, 是一种非常有效的方法。对银杏叶黄酮代谢途径中关键酶 PAL 的分子水平上的研究具有重要的理论和生产实践意义^[2, 16]。银杏 PAL 基因的克隆, 对阐明银杏叶黄酮合成的分子机理、提高银杏叶黄酮的含量以及

指导银杏叶黄酮的遗传改良等具有十分重要的理论价值和实际应用价值。目前银杏 PAL 基因的全长克隆及功能证实等相关研究工作正在进行。

参考文献:

- [1] Amrita K, Brian E E. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in raspberry: structure, expression, and evolution[J]. *Plant Physiology*, 2001, 127: 230 ~ 239
- [2] 程水源, 顾曼如, 束怀瑞. 银杏叶黄酮研究进展[J]. *林业科学*, 2000, 36(6): 110 ~ 115
- [3] Subramaniam R, Reinold S, Molitor E K, et al. Structure, inheritance, and expression of hybrid polar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoids*) phenylalanine ammonia-lyase genes[J]. *Plant Physiology*, 1993, 102: 71 ~ 83
- [4] 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
- [5] Wolfgang R H, Ralf G, Thomas B. Analysis of randomly selected cDNAs reveals the expression of stress-and defence-related genes in the barley mutant albostrians[J]. *Plant Science*, 1998, 133(2): 191 ~ 201
- [6] Fiona C C, Laurence B D, Norman G L. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(11): 1557 ~ 1564
- [7] Xiben Wang, Abdelbasset E H, Lome A, et al. US-1 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans* differentially affect local, proximal and distal gene expression of phenylalanine ammonia-lyase and 3-hydroxy, 3-methylglutaryl CoA reductase in potato leaves[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2004, 65(3): 157 ~ 167
- [8] Gail L, Varsha W, Kenneth L, et al. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of phenylalanine ammonia-lyase[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64(1): 153 ~ 161
- [9] Cools H J, Ishii H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (PAL1) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, 61(5): 273 ~ 280
- [10] Heather M W, Kenal K, Neena M, et al. Constitutive expression of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced disease resistance but impaired plant growth[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, 60(6): 275 ~ 282
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南, 第 2 版[M]. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 1993
- [12] Paul A H, Tony A, Jeremy J W. Characterization of a phenylalanine ammonia-lyase multigene family in *Trifolium subterraneum* [J]. *Gene*, 1994, 138(1): 87 ~ 92
- [13] Timo K, Sari P, Merja U, et al. Cloning and characterization of cDNA clones encoding phenylalanine ammonia-lyase in barley[J]. *Plant Science*, 1997, 123(1): 143 ~ 150
- [14] Stefanie L B, Monica L C, Brian E E. A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 37(1): 15 ~ 24
- [15] Yuriko O, Keishi O, Shinya K, et al. Characterization of the structure and determination of mRNA levels of the phenylalanine ammonia-lyase gene family from *Populus kitakan iensis*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28(6): 1133 ~ 1141
- [16] ZhengHua Li, Hiroshi G, Shuichi I. Stimulation of 'Fuji' apple skin color by ethephon and phosphorus-calcium mixed compounds in relation to flavonoid synthesis[J]. *Scientia Horticulturae*, 2002, 94(1): 193 ~ 199