

文章编号: 1001-1498(2008)05-0611-08

国槐苯丙氨酸解氨酶基因的克隆、反义表达载体构建及遗传转化

许 锋^{1, 2}, 朱 俊¹, 张风霞¹, 王 燕¹, 程水源^{3*}, 程述汉²

(1. 长江大学园艺园林学院, 湖北 荆州 434025; 2. 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018;
3. 黄冈师范学院生命科学与工程学院, 湖北 黄冈 438000)

摘要:根据其它植物 *PAL* 基因的保守区域, 设计一对兼并引物, 采用 RT-PCR 方法从国槐中克隆了一个长 866 bp 的 *PAL* 基因片段, 命名为 *SjPAL*。序列分析发现 *SjPAL* 多肽与其它植物的 *PAL* 氨基酸序列高度同源 (87% 以上), 且包含与水稻和拟南芥的 *PAL* 类似的活性位点。系统进化树分析表明 *SjPAL* 与豆科植物的 *PAL* 亲缘关系较近。RT-PCR 结果显示, *SjPAL* 在根和茎的表达量约为叶中的 3 倍。利用反义 RNA 技术将 *SjPAL* 基因克隆至植物表达载体 pB II21, 构建了 *SjPAL* 反义 RNA 植物表达载体 pB II21-*PAL*, 通过根癌农杆菌 EHA105 将其导入拟南芥基因组, 对获得的抗性植株进行 PCR 鉴定、Northern 杂交分析、*PAL* 活性分析以及总多酚含量和类黄酮含量分析。结果表明, 该反义 RNA 已整合到拟南芥基因组中, 转基因拟南芥的 *PAL* 基因表达量、单位材料 *PAL* 活性、总多酚含量和类黄酮含量均显著低于野生型对照。本研究为下一步利用该基因反义表达载体转化国槐, 通过调节酚类物质含量提高其在再生体系中的生根能力提供了试验依据。

关键词: 国槐; 生根能力; *PAL* 基因; 反义表达载体; 遗传转化; 总多酚; 类黄酮

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Cloning of *PAL* Gene from *Sophora japonica*, Construction of Anti-Sense Gene of *SjPAL* and Its Genetic Transformation in *Arabidopsis*

XU Feng^{1, 2}, ZHU Jun¹, ZHANG Feng-xia¹, WANG Yan¹, CHENG Shui-yuan³, CHENG Shu-han²

(1. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China;

2. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China;

3. College of Life Science and Engineering, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, Hubei, China)

Abstract: A *PAL* gene fragment with 866 bp length (named as *SjPAL*) was cloned from *Sophora japonica* by RT-PCR and using a pair of degenerated primers, which were designed basing on the sequence of other plant *PAL* genes conserved region. The deduced *SjPAL* polypeptide showed high identities (>87%) to other plant *PAL* amino acids via sequence analysis, and contained the similar active sites in *PAL* proteins of *Oryza sativa* and *Arabidopsis*. Phylogenetic tree analysis indicated that the *SjPAL* had a closer relationship with *PAL* proteins from leguminous plant species. RT-PCR analysis revealed that the relative abundance of *SjPAL* mRNA in root and stem was about three times as in leaf. Utilizing anti-sense RNA technology, *SjPAL* gene was inserted directionally into pB II21, a plant expression vector, to construct an anti-sense fusion gene and a plant expression vector pB II21-*PAL*. Genetic transformation to *Arabidopsis* was mediated by EHA105. Transgenic *Arabidopsis* lines were performed using PCR,

收稿日期: 2007-12-23

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0746), 湖北省教育厅重大项目 (Z200627002), 湖北省自然科学基金 (2002AB094) 和湖北省青年杰出人才基金 (2003AB 014)

作者简介: 许锋 (1979—), 男, 湖北武汉人, 讲师, 博士, 主要从事植物次生代谢基因工程方面的研究。

* 通讯作者: E-mail: s_y_cheng@sina.com

Northern blot, *PAL* activity of per unit material, and total polyphenolic and flavonoid concentration analysis. The results showed that the expression level of *PAL* gene, *PAL* activities of per unit material, and total polyphenolic and flavonoid concentration of transformed lines were all significantly lower than the wild control. The present studies provided an experimental basis for further genetic transformation in *S. japonica* of *SjPAL* gene anti-sense expression vector to improve its rooting ability in regeneration system via regulating its phenolic compound content.

Key words: *Sophora japonica*; rooting ability; *PAL* gene; anti-sense expression vector; genetic transformation; total polyphenolic; flavonoid

国槐 (*Sophora japonica* L.) 原产中国北方^[1], 广泛分布于我国大江南北。其树型美观, 生长速度中等, 寿命极长, 耐寒、耐旱、耐贫瘠、抗烟尘及有害气体, 木材坚韧、纹理美观, 在水土保持、防风固沙、减少环境污染、提供民用建筑用材等方面发挥着重要的作用, 是城乡绿化的主要树种之一。此外, 国槐还具有重要的药用价值。国槐中的干燥花蕾, 即槐米, 内含丰富的芸香苷, 具有抗菌消炎、抗心律不齐、抗氧化、降低胆固醇等药效, 是一种广泛应用于心脑血管疾病的药物^[2-3]。但是, 国槐这一优良树种的繁殖仍采用传统的种子种植和嫁接繁殖, 繁殖系数低, 年限长。目前, 组织培养作为植物离体快速繁殖的技术已很成熟且应用广泛, 在国槐上也已有少量应用^[1,4-6]。在组织培养的过程中, 不定芽生根是一个重要的环节, 外植体诱导生根的能力随着木质化的程度加深而显著降低。虽然利用国槐幼嫩树苗的外植体进行离体繁殖已有成功报道^[1], 但由于国槐外植体在离体培养中生根缓慢, 生根力低, 大大限制了通过组培技术进行国槐的商品化生产^[5-6]。

组织培养中根系的生长和发育由多种生理和化学因子所调控, 如培养的温度、氧浓度、培养基 pH 值、根系发育相关的酶、植物激素、多胺、多糖以及酚类物质^[7]。许多研究表明, 外植体中酚类物质的存在显著抑制不定芽的生根力和生根率^[8-9]。由于国槐的外植体中含有大量的酚类物质, 这给国槐外植体离体培养的生根带来了极大的困难。因此, 降低国槐外植体的酚类物质含量可作为提高其生根力和生根率的一个重要途径。近年来, 反义 RNA 技术已多次成功应用于抑制植物酚类物质代谢途径中相关酶基因的表达, 如杨树 (*Populus* sp.) 的甲基转移酶^[10], 矮牵牛和大丁草的查尔酮合成酶 (CHS)^[11-12], 番茄的多酚氧化酶和肉硅酸羟化酶^[13-14]等, 这些酶在转基因植株中的表达受到消减使得相应的代谢产物如木质素、类黄酮、花青苷和多酚类等物质含量也显著减少。Euch 等^[8]也报道了通过反义 RNA 技术抑制核桃的类黄酮和多酚类化

合物的合成可大幅度提高核桃在离体培养中的生根力和生根速度, 并具有良好的商业化前景。

苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, *PAL*; EC 4.3.1.5) 是植物苯丙烷类代谢的第一个关键酶, 它催化 L-苯丙氨酸解氨酶生成反式肉桂酸, 再由反式肉桂酸生成香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物, 这些酸可以进一步转化为香豆素、绿原酸, 也可形成 CoA 酯, 再进一步转化为类黄酮、木质素和酚类等次生代谢产物, 植物酚类物质的合成与 *PAL* 基因的表达密切相关^[15]。植物 *PAL* 基因因为多基因家族所编码, *PAL* 基因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发育特异性^[15-18]。目前已从 25 种被子植物与两种裸子植物中克隆到 *PAL* 基因^[19-20], 但在国槐中尚未见到包括 *PAL* 基因在内的苯丙烷类代谢途径中相关酶基因的报道。本研究首次克隆到国槐 *PAL* 基因片段, 构建了 *PAL* 反义 RNA 植物表达载体, 并通过根癌农杆菌系统导入拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh), 获得转基因拟南芥再生植株, 以期为下一阶段转化国槐, 提高其外植体离体培养过程中的生根能力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及质粒 大肠杆菌 *Escherichia coli* (Migula Castellani) DH5, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn) EHA105, 植物表达载体 pB II 21 均由本实验室保存。

1.1.2 植物材料 国槐 (*Sophora japonica* L.) 的叶片、根与茎取自长江大学银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 种植园, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh) 哥伦比亚生态型无菌苗为本实验室保存。

1.1.3 酶及试剂 逆转录试剂盒、限制性内切酶、PCR 试剂盒为晶美生物工程有限公司产品, DNA 纯化回收试剂盒为美国 AXYGEN 公司产品, 一步法 RT-PCR 试剂盒和 pMD18-T 载体试剂盒购自于大连

宝生物公司, Trizol 试剂盒购自于上海英骏公司, Northern 杂交试剂盒 (DIG Northern Starter kit) 购自于德国罗氏公司, 抗生素、植物生长调节剂为 Sigma 公司产品。其它试剂均采用进口或国产分析纯。引物合成及序列测定由上海生工完成。

1.2 方法

1.2.1 国槐不同组织的总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成 国槐根、茎和叶的总 RNA 提取采用 CTAB 法^[21], cDNA 第一链的合成参考逆转录试剂盒说明书。

1.2.2 PAL 基因 cDNA 片段的扩增 根据其他植物 PAL 基因中的保守序列, 设计了一对兼并引物: PALsP: 5'-GC(A/T/C)TC(T/C/G)GGT GAT(C/T)T(A/G)GT(T/C)-3', PALaP: 5'-ACA TCT TGG TT(A/G)TG(T/C)TGC TC-3'。PCR 扩增反应液为 25 μ L 反应体系: cDNA 第一链 1 μ L (0.5 μ g \cdot μ L⁻¹), 10 \times Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2 μ L (25 mmol \cdot μ L⁻¹), 1 μ L PALsP (10 μ mol \cdot L⁻¹), 1 μ L PALaP (10 μ mol \cdot L⁻¹), dNTP 0.5 μ L (10 mmol \cdot L⁻¹), Taq 聚合酶 0.5 μ L (5 U \cdot μ L⁻¹)。PCR 扩增条件为: 94 3 min; 94 1 min, 49 1 min, 72 1 min, 35 个循环; 72 10 min。

扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将 PCR 特异条带用胶回收试剂盒回收, 并连接到 pMD18-T 载体, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 感受态细胞中, 筛选阳性克隆用于测序。

DNA 序列相似性比较及氨基酸活性位点在 NCBI 网站上用 BLAST 和 RPS-BLAST 完成, 氨基酸序列比较利用 VectorNTI 10.0 完成, 氨基酸序列进化树由 Clustal X 1.81 和 MEGA 3.0 完成。

1.2.3 PAL 基因不同组织表达模式分析 通过序列比较, 在已证实获得的片段为国槐 PAL 基因片段的基础之上, 根据已获得的 PAL 序列设计了一对特异引物, PALFP: 5'-CGG GTG ATT TGG TTC CTT TGT C-3', PALRP: 5'-CAG CCC ATT GTT GTA GAA GTC A-3'。分别提取国槐根、茎和叶的总 RNA, 分别以 0.5 μ g 总 RNA 作为模板进行一步法 RT-PCR, 扩增 PAL 基因的特异片段。反应条件为: 50 30 min; 94 3 min; 94 1 min, 59 1 min, 72 1 min, 25 个循环; 72 10 min。同时利用国槐的看家基因 18S 基因作为对照, 扩增所用的特异引物根据 GenBank 中已发表的序列设计 (AF174638), 即 18SFP: 5'-TAG AAA TCG TTC AGT GCT CCC C-3',

18SRP: 5'-CTC CAC CAC GGA CTC AGT TTT C-3'。

1.2.4 反义表达载体的构建与转化 根据测序结果, 设计带 Sac I 和 Bam HI 酶切位点的引物, PALF-SacI: 5'-C GAG CTC CGG GTG ATT TGG TTC CTT TGT C-3', PALR-Bam HI 5'-CG GGA TCC CAG CCC ATT GTT GTA GAA GTC A-3' (下划线表示酶切位点识别序列)。以国槐 cDNA 为模板, 回收纯化 700 bp 左右的片段和表达载体 pB II21, 均用 Sac I 和 Bam HI 双酶切, 将酶切后的 PAL 片段与酶切后的 pB II21 载体连接 (牛小肠碱性磷酸酶去磷酸化), 连接产物转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞, 碱法提取质粒 DNA, 通过 Sac I 和 Bam HI 酶双酶切和菌落 PCR 鉴定插入片段成功与否, 上游引物利用 pB II21 载体的 35S 启动子序列设计, 35SP: 5'-GTT GAA GAT GCC TCT GCC GA-3', 下游引物利用 PAL 片段的下游引物 PALR-Bam HI 片段插入成功后扩增的目的条带大小应为 35S 启动子引物下游碱基数与 PAL 基因片段长度之和 937 bp。构建的反义植物表达载体命名为 pB II21-PAL。采用电击法将质粒转化进农杆菌感受态细胞 EHA105, 电激仪为 BioRad, 转化电压为 2500V (电阻 200 Ω), 电激时间为 3~4 s, 具体操作方法见参考文献 [22]。

1.2.5 根癌农杆菌介导拟南芥的转化和转基因拟南芥的筛选及鉴定 农杆菌介导拟南芥的转化参照花序浸染法进行^[23]。T₀ 代种子在 MS + Kan^r 50 mg \cdot L⁻¹ 上培养, 筛选转基因植株, 再生拟南芥移至温室里的土壤中生长。待土壤中再生植株长大后, 取少量叶片抽提总 DNA, 使用 35SP 和基因下游 PALR-Bam HI 引物 PCR 检测阳性植株。

1.2.6 拟南芥的 RNA 提取及 Northern 杂交分析 分别取野生型对照和转基因型拟南芥叶片, 利用 Trizol 试剂盒提取叶片 RNA。以国槐 PAL 基因片段作为探针, 分别以对照和转基因拟南芥叶片的总 RNA 为模板进行 Northern 杂交。杂交方法参照 DIG Northern Starter kit 说明书。

1.2.7 PAL 活性测定及总多酚与类黄酮含量的测定 PAL 的提取和活性测定参照文献 [24], 略作改进。取叶片 0.5 g, 加 5 mL 提取液 (含 1% PVP, 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, 20 mmol \cdot L⁻¹ 巯基乙醇, 1% 甘油, 0.1 mL \cdot L⁻¹ 硼酸缓冲液, pH 值 8.8), 加入石英砂, 冰浴研磨成匀浆, 4 \times 下 4 层纱布过滤, 4 12 000 离心 20 min, 上清液即为酶粗提液。在 pH 值 8.8 硼酸缓冲液中加入 3 底物_L-苯丙氨酸和粗

酶液, 40 ℃ 保温 60 min, $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 终止反应, 测定 290 nm 处 OD 值。以 290 nm 处吸光度的变化来表示酶活力。规定每小时每毫升粗酶液 OD 值变化值 0.01 为 1 个酶活性单位 (U)。

总多酚含量的测定采用 Folin Ciocalteu 比色法^[25]。取叶片 1 g, 加入液氮研磨成粉状, 加入 10 mL 80% 甲醇溶液混合均匀。混合液在 40 ℃ 下过夜超声振荡抽提, 提取液抽滤得滤液, 滤液浓缩除去有机溶剂后用 4 mL 蒸馏水定容, 即为总多酚浓缩待测液。Folin Ciocalteu 试剂配制参照文献^[25], 取 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Folin Ciocalteu 试剂、1 mL 15% Na_2CO_3 溶液和 1 mL 适当稀释的待测液均匀混合 (1 mL 蒸馏水作为空白对照), 在室温下反应 10 min, 测定在 760 nm 下的吸光值, 以没食子酸作为标样。总多酚含量用等量没食子酸 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 表示。

类黄酮含量的测定参照文献^[26], 取 0.5 g 鲜叶片加入液氮研磨成粉状, 加入 10 mL 70% 乙醇 40 ℃ 下过夜超声振荡抽提, 提取液抽滤得滤液, 滤液浓缩除去有机溶剂后用 4 mL 蒸馏水定容得类黄酮浓缩待测液。取适当稀释的 1 mL 待测液 (1 mL 蒸馏水作为空白对照) 转移至 10 mL 容量瓶中, 加入 0.3 mL 5% NaNO_2 , 摇匀; 放置 5 min 后加入 10% AlCl_3 0.3 mL, 摇匀; 放置 6 min 后再加入 4% NaOH 溶液 2 mL, 摇匀; 最后用 60% 的乙醇定容至 10 mL, 15 min 后于 510 nm 处测定吸光值。以芦丁作为标样, 类黄酮含量以等量芦丁 $\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 表示。

2 结果与分析

2.1 PAL 基因 cDNA 片段克隆及序列分析

以国槐叶片总 RNA 为模板, 采用兼并引物 RT-PCR 扩增获得预期大小的目的片段 (850 bp 左右)。将目的片段回收, 经克隆测序得到长度 866 bp 的 DNA 序列。BLAST 分析显示该序列与其它植物的 PAL 基因序列高度同源, 如豇豆 (*Vigna unguiculata* (Linn) Walp, 86%), 杨树 (*Populus kitakam iensis*, 81%), 花叶木薯 (*Manihot esculenta*, 80%), 矮牵牛 (*Petunia hybrida* Vilm., 79%), 海桐 (*Pittosporum tobira* (Thunb) Ait, 78%) 和夹竹桃 (*Nerium oleander* L., 76%)。这表明获得的 DNA 片段为国槐 PAL 基因 cDNA 片段, 命名为 *SjPAL*, 在 GenBank 中的注册

号为 AY747679。*SjPAL* 编码 289 个氨基酸, 利用序列比对软件 VectorNTI 10.0 对 *SjPAL* 编码的蛋白质序列与其它植物 PAL 的蛋白质序列进行多重比较发现 (图 1), *SjPAL* 蛋白质与其它植物的 PAL 序列都具有很高的同源性, 如豇豆 (91%), 鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* Linn, 89%), 紫花苜蓿 (*Medicago sativa* Linn, 88%), 大豆 (*Glycine max* (Linn) Merr, 88%), 百脉根 (*Louss japonicus*, 87%) 和烟草 (*Nicotiana tabacum* L., 87%), 这进一步验证了 *SjPAL* 为国槐 PAL 基因家族中的成员之一。

2.2 PAL 氨基酸序列进化树分析

为研究国槐 PAL 基因和其它植物 PAL 基因之间的进化关系, 利用软件 Clustal X1.83 和 MEGA 3.0 通过 neighbor-joining (NJ) 法构建了 PAL 氨基酸序列的进化树 (图 2)。基因进化树的分析结果主要呈现出两大特征。首先, 以大豆查尔酮合成酶 (GmCHS) 作为 PAL 基因的外部分支单独列成一类, 进化树中所有植物的 PAL 氨基酸序列聚合成另外一大类, 这表明 PAL 基因在植物进化上起源相同, 不同植物的 PAL 基因可能具有相同的保守结构和功能。其次, 在 PAL 基因家族中, 不同植物以科为单位分别聚成一类, 如国槐与苜蓿, 豇豆以及大豆等豆科 (Leguminosae) 植物聚成一类, 禾本科 (Gramineae) 植物水稻 (*Oryza sativa* L.)、玉米 (*Zea mays* L.) 和小麦 (*Triticum aestivum* Linn) 也聚成一类等。此外, 裸子植物与被子植物的 PAL 基因也由于物种亲缘关系不同而各聚为一类。上述由 PAL 基因进化树分析出的植物分类结果符合植物形态学上的分类地位。

2.3 *SjPAL* 基因的组织表达特异性分析

从国槐的根、茎和叶中分别提取总 RNA, 分别以 $0.5 \mu\text{g}$ 总 RNA 作为模板进行一步法 RT-PCR 扩增, 用特异引物 PCR 扩增得到 18S 基因片段作为内参。结果如图 3 所示, *SjPAL* 在根和茎中的表达量较高, 大约是叶的 3 倍。

2.4 *SjPAL* 基因反义表达载体的构建与转化拟南芥

重组质粒利用电激法导入农杆菌 EHA105, 采用花序浸染法将载体 pB II21-PAL 转化拟南芥, 收获 T_0 代种子在 $\text{MS} + \text{Kan}^r 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上培养, 转基因阳性植株在培养基上可以生根萌芽且生长良好, 而对照在含有卡那培养基上不能发芽。

***** *

SjPAL ---ASGDLVPLSYVAGLLIGRPNSKSI GPNGQV LNAKEAFELAEIDGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSSL
 CaPAL TITASGDLVPLSYVAGLLIGRPNSKSI GPNGQV LNAKEAFQLAGIETGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSSL
 VuPAL TITASGDLVPLSYVAGLLIGRPNSKSI GPNGEDLNAKDFAKLAEDGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSSL
 NtPAL TITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPNGETLNAEEAFRVAGVNGGFFELQPKEGLALVNGTAVGSSGM
 GmPAL TITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPSGEV LNAKEAFELASINSEFFELQPKEGLALVNGTAVGSSL
 LjPAL TVTASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPSGEV LNAKEAFELASIDSGFFELQPKEGLALVNGTAVGSSL
 MsPAL TITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAHGPSGEV LNAKEAFNLAGINAEFFELQPKEGLALVNGTAVGSSL
 Consensus TITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAIGPNGEV LNAKEAF LAIDSGFFELQPKEGLALVNGTAVGSSL

SjPAL ASI VLF EANTLAVLSEILLSAIFAEVMQ GKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAART EYIYD GSSYV KAAQKLH
 CaPAL ASLALFETNLLVWLSEILLSAIFAEVMQ GKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYV KAAQKVH
 VuPAL ASI VLF EANTLAVLSEILLSAIFAEVMQ GKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYV KAAQKLH
 NtPAL ASM VLF DSNILAVMSEVLSAIFAEVMQ GKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYV KAAQKLH
 GmPAL ASM VLF EANILAVLSEVLSAIFAEVMQ GKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYV KAAQKLH
 LjPAL ASI VLF EANILAVLSEVLSAIFAEVMQ GKPEFTDHLTHRLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYV KAAQKLH
 MsPAL ASI VLF EANILAVLSEVLSAIFAEVMQ GKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYV KAAQKLH
 Consensus ASI VLF EANILAVLSEVLSAIFAEVMQ GKPEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMEHILDGSSYV KAAQKLH

* * *

SjPAL EIDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGQIEVLRQATKTIEREIYSGNDNPLVDVSRNKALHGGNFQGTPIGVS
 CaPAL DIDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGQIEVIRNATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVS
 VuPAL EIDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGQIEVIRHATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVS
 NtPAL EMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGQIEVIRAAATKMIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVS
 GmPAL EIDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPLIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVS
 LjPAL EMDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPLIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVS
 MsPAL EIDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGPLIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVS
 Consensus EIDPLQKPKQDRYALRTSPQWLGQIEVIR ATKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVS

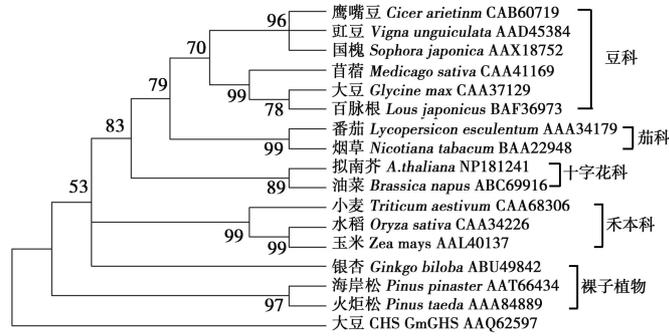
SjPAL MDNTRLARASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEI AMASYCSELQYLANPVTN
 CaPAL MDNTRLAIIASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEI AMASYCSELQYLANPVTN
 VuPAL MDNTRLAIIASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEI AMASYCSELQYLANPVTN
 NtPAL MDNARLALASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEI AMASYCSELQYLANPVTN
 GmPAL MDNTRLALASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEI AMASYCSELQYLANPVTT
 LjPAL MDNTRLALAAIGKLMFAQFTLVDVDDHYNNGLPSNLTASRNPSLDYGLKGAEI AMASYCSELQYLANPVTT
 MsPAL MDNTRLALASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEI AMASYCSELQYLANPVTT
 Consensus MDNTRLALASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLTASRNPSLDYGFKGAEI AMASYCSELQYLANPVTN

SjPAL HVQS AEQH NQDV-----
 CaPAL HVQS AEQH NQDVNSLGLISSRKTAEAEIILKLMSSSTFLIALCQAI DLRHIEENLKSVKNTVSVQAKRVL
 VuPAL HVQS AEQH NQDVNSLGLISSRKTAEAEIILKLMSSSTFLIALCQAI DLRHLEENMKNAVKNVSVQAKRVL
 NtPAL HVQS AEQH NQDVNSLGLISARKTAEAVDIILKLMSSSTFLIALCQAI DLRHLEENLNKNAVKNTVSVQAKRTL
 GmPAL HVQS AEQH NQDVNSLGLISSRKTNEAEIILKLMSSSTFLIALCQAI DLRHLEENLNKNSVKNTVSVQSKRIL
 LjPAL HVQS AEQH NQDVNSLGLISSRKTNEAEIILKLMSSSTFLIALCQAI DLRHLEENLRYSVKNTVSVQAKRTL
 MsPAL HVQS AEQH NQDVNSLGLISARKTNEAEIILKLMSSSTFLIALCQAI DLRHLEENLNKNSVKNTVSVQAKRTL
 Consensus HVQS AEQH NQDVNSLGLISSRKT EAEIILKLMSSSTFLIALCQAI DLRHLEENLNKNSVKNTVSVQAKR L

PAL 蛋白质名称缩写、植物名及 GenBank 登录号如下所示: CaPAL, 鹰嘴豆, CAB60719; VuPAL, 豇豆, AAD45384; SjPAL, 国槐, AAX18752; NtPAL, 烟草, BAA22948; GmPAL, 大豆, CAA37129; LjPAL, 百脉根, BAF36973; MsPAL, 紫花苜蓿, CAA41169。完全一致氨基酸序列用黑底白字表示,

高度保守氨基酸序列用灰底白字表示,非保守氨基酸序列用白底黑字表示; * 表示 PAL 保守区域催化活性位点

图 1 SjPAL 氨基酸序列与其它植物 PAL 蛋白质序列的多重比较



植物学名后的字母数字表示该植物 PAL 蛋白质序列的 GenBank 登录号

图 2 SjPAL 与其它植物 PAL 蛋白质序列的系统进化树分析

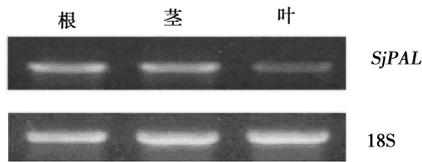
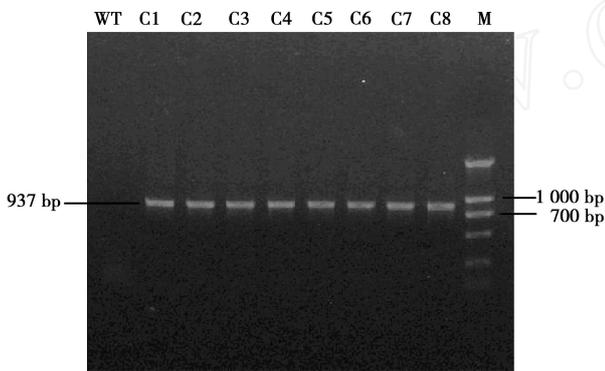


图 3 SjPAL 在不同组织中的表达特性

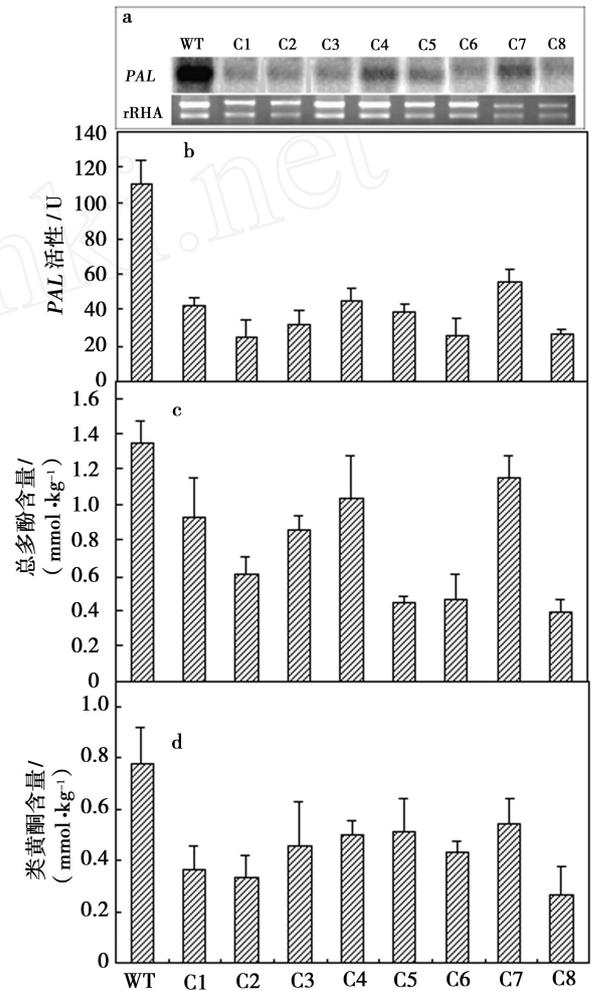


M: DNA Marker DL2000; W T:野生型对照拟南芥 PCR 产物; C1 ~ C8:转基因拟南芥 PCR 产物

图 4 转 SjPAL 反义 RNA 拟南芥的 PCR 鉴定

2.5 转基因拟南芥的分子鉴定及分析

通过 35S 启动子上游引物和基因下游引物 PCR 检测 (图 4), 野生型对照 PCR 产物电泳无目的条带, PCR 结果成阳性 (可扩增出 937 bp 的目的片段) 的初步确定为转基因拟南芥, 共获得 42 株转基因拟南芥, 随机挑选 8 株转基因拟南芥做分子和生理性状分析。Northern 杂交分析结果表明, 转基因拟南芥 PAL 基因的表达量均明显低于对照 (图 5a), 其中转基因拟南芥 C1、C2、C6 和 C8 的 PAL 基因表达量最小, 约为野生型对照的 10%。PAL 活性分析结果表明, 转基因拟南芥的单位质量叶片 PAL 活性均显著低于野生型对照 (110.6 U, $P < 0.05$), 转基因拟南芥 C2、C6 和 C8 的 PAL 活性最低, 分别为 24.6 U、25.7 U 和 26.5 U, 约为野生型对照的 21% ~ 24%



WT:野生型对照拟南芥; C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8:转基因拟南芥株系

图 5 野生型对照和转基因拟南芥分子和生理分析

- (a) 野生型对照和转基因拟南芥 PAL 基因 Northern 杂交分析;
- (b) 野生型对照和转基因拟南芥 PAL 活性分析;
- (c) 野生型对照和转基因拟南芥总多酚含量分析;
- (d) 野生型对照和转基因拟南芥类黄酮含量分析

(图 5b), 这与 PAL 基因表达量的结果相对应。总多酚含量和类黄酮含量分析与 PAL 活性分析结果

相似,野生型对照的总多酚含量和类黄酮含量最高(图 5c 和 5d),分别为 $1.35 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.78 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$,显著高于其它 8 株转基因拟南芥的总多酚含量和类黄酮含量 ($P < 0.05$),转基因拟南芥中 C8 的总多酚含量和类黄酮含量最低,分别为 $0.39 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.27 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$,约为对照的 28.9% 和 34.6%。

3 讨论

3.1 S_jPAL 基因的克隆与表达

本研究首次克隆到国槐的 PAL 基因片段, S_jPAL 基因编码的蛋白质序列包含很多 PAL 基因的催化活性位点(图 1),如 P⁵¹, K⁵², E⁵³, G⁵⁴, L⁵⁵, N⁵⁹, Y¹⁵⁰, N¹⁸³ 和 H¹⁹⁵,这些活性位点与拟南芥和水稻的活性位点非常相似^[27-28]。通过 PAL 基因进化树分析,发现 S_jPAL 与豆科植物的 PAL 基因聚类关系最近,这与植物分类学上的地位是一致的,同时也暗示了国槐 PAL 基因与其它豆科植物 PAL 基因的进化起源相同,可能与其它豆科植物 PAL 基因的氨基酸保守结构、保守区域以及功能是相似的^[29,30]。组织特异性表达分析显示 S_jPAL 在根和茎中的表达量较高,在叶中最低,这与 Kervinen 等^[29]和 Osakabe 等^[31]的结果相同。相对叶而言,根和茎的木质化程度较高, S_jPAL 在根和茎的转录本较高表明 S_jPAL 基因可能参与调节国槐体内木质素的合成^[32]。PAL 基因在植物体内是由多基因家族编码,如拟南芥^[27]、大麦^[29]、松树 (*Pinus* spp.)^[30]和杨树^[31]均有多个 PAL 基因。PAL 基因家族中各成员在不同的生物或非生物因子诱导下具有不同的表达特征,它们定位于不同的组织细胞内,调控不同的代谢途径^[18,33]。

3.2 转 S_jPAL 反义 RNA 拟南芥的获得为提高国槐组培苗生根能力提供了试验依据

反义 RNA 技术是指通过人工导入反义 RNA 来调控细胞内靶基因的表达从而定向控制某些生物性状。自 Izant 等^[34]首次证实人工构建的反义寡核苷酸在真核生物中具有生物学效应以来,反义技术在真核生物的研究得到迅速发展。通过反义 RNA 技术调节苯丙烷代谢相关酶基因的表达水平来调控植物酚类物质和类黄酮含量,是目前提高木本植物在组培苗生根能力的一个重要途径^[7-8]。本研究将 S_jPAL 反义 RNA 导入拟南芥中,转基因拟南芥总多酚和类黄酮含量显著低于对照(图 5),与 Euch 等^[8]的研究结果一致,转 S_jPAL 反义 RNA 拟南芥的获得

为下一步将 S_jPAL 反义 RNA 导入国槐中以提高国槐组培生根能力,提供了试验依据和技术平台。虽然近年来国槐的转基因技术也已有报道,如张晓英等^[1]和 Zhang 等^[5]分别将抗虫基因 *scK* 和 *gus* 基因导入国槐,成功获得转基因国槐再生植株,但是由于国槐抗性芽的生根率低导致获得完整国槐再生植株的效率也很低。因此,下一步利用反义 RNA 技术调控国槐的酚类物质含量提高其生根力将为国槐的转基因研究奠定基础。此外,本研究中 S_jPAL 基因在植物中的作用部位,与其它酚类物质和类黄酮合成酶基因之间的相互关系,外界温度和光照等环境条件对基因表达的影响以及 PAL 基因沉默在后代遗传的稳定性等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张晓英,王华芳,朱 祯,等. 国槐离体再生及抗虫基因 *scK* 的转导[J]. 林业科学, 2006, 42(9): 34-38
- [2] 陈箐筠,干 信. 槐米中斛皮素的提取及对中枢神经系统作用的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2007, 24(3): 11-13
- [3] Qi Y, Sun A, Liu R, et al. Isolation and purification of flavonoid and isoflavonoid compounds from the pericarp of *Sophora japonica* L. by adsorption chromatography on 12% cross-linked agarose gel media [J]. J Chromatogr A, 2007, 1140(1): 219-224
- [4] 孟庆杰,王光全,孟庆军,等. 蝴蝶槐的组织培养和快速繁殖技术[J]. 林业科技, 2006, 31(3): 63-64
- [5] Zhang X, Wang H, Yin W, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *GUS* gene transfer to *Sophora japonica* L. [J] Forestry Studies in China, 2006, 8(4): 6-9
- [6] 孙书伟. 影响香花槐生根的几个因素[J]. 甘肃农业, 2006(1): 206
- [7] Davis TD, Haissig B E: A historical evaluation of adventitious rooting research to 1993 [M] // Davis TD, Haissig B E Biology of Adventitious Root Formation. Basic Life Science, vol 62, New York: Plenum Press, 1994: 274-335
- [8] Euch C E, Jay-Allenand C, Pastuglia M, et al. Expression of anti-sense chalcone synthase RNA in transgenic hybrid walnut microcuttings. Effect on flavonoid content and rooting ability [J]. Plant Mol Biol, 1998, 38(3): 467-479
- [9] Tobec M, Štampar F, Veberič R, et al. Fluctuations of different endogenous phenolic compounds and cinnamic acid in the first days of the rooting process of cherry rootstock 'GiSeLA 5' leafy cuttings [J]. J Plant Physiol, 2005, 162(5): 589-597
- [10] van Doorselaere J, Baucher M, Chognot E, et al. A novel lignin in Poplar trees with a reduced caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase activity [J]. Plant J, 1995, 8(1): 855-864
- [11] van der Krol A R, Lenting P E, Veenstra J, et al. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation [J]. Nature, 1988, 333(6179): 866-869

- [12] Elomaa P, Honkanen J, Pusk R, *et al* Agrobacterium-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation [J]. *Bio/Technology*, 1993, 11 (2): 508 - 511
- [13] Bachem CW B, Speckmann GJ, van derLinde P C G, *et al* Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers [J]. *Bio/Technology*, 1994, 12 (2): 1101 - 1105
- [14] Blee K, Choi J W, O'Connell A P, *et al* Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57(7): 1159 - 1166
- [15] 程水源,陈昆松,刘卫红,等. 植物苯丙氨酸解氨酶 (PAL)基因的表达调控与研究展望 [J]. *果树学报*, 2003, 20 (5): 351 - 357
- [16] Hahlbrock K, Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1989, 40(6): 347 - 369
- [17] Holton TA, Comish E. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(9): 1071 - 1083
- [18] Ritter H, Schulz G E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 3426 - 3436
- [19] Butland S L, Chow M L, Ellis B E. A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37(1): 15 - 24
- [20] 程水源,杜何为,许 锋,等. 银杏苯丙氨酸解氨酶基因的克隆和序列分析 [J]. *林业科学研究*, 2005, 18(5): 573 - 577
- [21] 程水源,陈昆松,杜何为,等. 银杏 RNA的提取 [J]. *果树学报*, 2005, 22(4): 428 - 429
- [22] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989
- [23] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735 - 743
- [24] Koukol J, Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. Purification and properties of the L-phenylalanine decarboxylase of *Hedeum vulgare* [J]. *J Biol Chem*, 1961, 236(10): 2692 - 2698
- [25] Singleton V L, Rossi Jr J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents [J]. *Am J Enol Viticult*, 1965, 16(3): 144 - 158
- [26] 程水源,王 燕,李俊凯,等. 银杏叶黄酮含量变化及分布规律的研究 [J]. *园艺学报*, 2001, 28(4): 353 - 355
- [27] Wanner L A, Li G, Ware D, *et al* The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27(2): 327 - 338
- [28] Zhu Q, Dabi T, Beeche A, *et al* Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29(3): 535 - 550
- [29] Kervinen T, Peltonen S, Utriainen M, *et al* Cloning and characterization of cDNA clones encoding phenylalanine ammonia-lyase in barley [J]. *Plant Sci*, 1997, 123(1): 143 - 150
- [30] Stefanie L, Monica L, Brian E. A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37(1): 15 - 24
- [31] Osakabe K, Kawai S, Katayama Y. Characterization of the structure and determination of mRNA levels of the Phenylalanine ammonia-lyase gene family from *Populus kitakam iensis* [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28(6): 1133 - 1141
- [32] Kervinen T, Peltonen S, Teeri T H, *et al* Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase genes in barley induced by fungal infection or elicitors [J]. *New Phytol*, 1998, 139(3): 293 - 300
- [33] 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
- [34] Izant J G, Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analysis [J]. *Cell*, 1984, 36(4): 1007 - 1015