

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04227

半夏 *PtPAL* 基因的克隆、表达与酶动力学分析

何 潇^{1,2} 刘 兴³ 辛正琦^{1,2} 谢海艳^{1,2} 辛余凤^{1,2} 吴能表^{1,2,*}

¹ 西南大学生命科学学院, 重庆 400715; ² 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; ³ 重庆市大足中学, 重庆 402360

摘 要: 本研究以半夏为研究对象, 基于其转录组数据克隆获得 1 个苯丙氨酸解氨酶基因, 命名为 *PtPAL*, 通过 DNAMAN、MEGA 等生物信息学软件进行序列结构与系统进化分析表明, 该基因核酸序列长度为 2289 bp, 编码 762 个氨基酸, 终止密码子为 TAA, *PtPAL* 与单子叶植物百合 PAL 相似度达 78%, 具有 PAL-HAL、PLN02457、phe_am_lyase、Lyase_aromatic 及 HutH 结构域, 属于苯丙氨酸解氨酶家族成员(Lyase_I_like Superfamily)。半夏 *PtPAL* 与单子叶植物百合、菠萝和油棕亲缘关系较近, 归于单子叶植物。采用实时荧光定量 PCR 分析 *PtPAL* 在不同组织间的表达情况表明, *PtPAL* 基因在叶中表达量最高, 其次是块茎和根, 花中表达量最低。通过对半夏 *PtPAL* 基因进行功能表达分析发现, *PtPAL* 重组蛋白可以高效催化 L-Phe 生成 *t*-CA, 且催化反应最适 pH 与温度分别为 9.0、70℃; *PtPAL* 的 K_m 、 V_{max} 、 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 分别为 0.89 mmol L⁻¹、63.96 nKat mg⁻¹、6.56 s⁻¹ 和 7.37×10^3 s⁻¹ M⁻¹。进一步探究金属离子对 *PtPAL* 酶活性的影响表明, Ba²⁺ 显著增强了 *PtPAL* 酶活性, Mn²⁺、Co²⁺、Cu²⁺ 及 Zn²⁺ 抑制了 *PtPAL* 酶活性。本研究为进一步研究 *PtPAL* 的功能特点及半夏苯丙胺类生物碱代谢途径奠定基础。

关键词: 半夏; 麻黄碱; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 表达分析; 酶动力学分析

Molecular cloning, expression, and enzyme kinetic analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene in *Pinellia ternate*

HE Xiao^{1,2}, LIU Xing³, XIN Zheng-Qi^{1,2}, XIE Hai-Yan^{1,2}, XIN Yu-Feng^{1,2}, and WU Neng-Biao^{1,2,*}

¹ School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; ² Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Region, Ministry of Education, Chongqing 400715, China; ³ Chongqing Dazhu Middle School, Chongqing 402360, China

Abstract: In this study, based on the transcriptome data, a phenylalanine ammonia lyase gene was cloned and named *PtPAL* using *Pinellia ternate* as the experimental material. The analysis of sequence structure and systematic evolution revealed that the length of the gene was 2289 bp, encoding 762 amino acids, and the termination codon was TAA. *PtPAL* was the similarity of 78% compared with monocot *Lilium regale* PAL, with PAL-HAL, PLN02457, phe_am_lyase, Lyase_aromatic, and HutH domains that belonging to the Lyase_I_like superfamily. Phylogenetic tree analysis showed that *PtPAL* was closely related to the monocotyledon *Lilium regale*, *Ananas comosum*, and *Elaeis guineensis*, and thus belonging to Monocotyledons. Real-time fluorescent qPCR indicated that the relative expression level of *PtPAL* gene was the highest in leaves, followed by tubers and roots, and the lowest in flowers. The functional expression analysis of *PtPAL* gene revealed that the *PtPAL* recombinant protein could efficiently catalyze L-Phe to *t*-CA, and the optimal pH and temperature of the reaction were 9.0℃ and 70℃, respectively. K_m , V_{max} , K_{cat} , and K_{cat}/K_m of *PtPAL* were 0.89 mmol L⁻¹, 63.96 nKat mg⁻¹, 6.56 s⁻¹, and 7.37×10^3 s⁻¹ M⁻¹. Further exploration of the effect of metal ions on *PtPAL* enzyme activity showed that Ba²⁺ could significantly enhance *PtPAL* enzyme activity, and Mn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ inhibit the activity of *PtPAL* enzyme. This study lays the foundation for further research of the functional characteristics of *PtPAL* and the metabolic pathways of amphetamine alkaloids in *Pinellia ternate*.

Keywords: *Pinellia ternate*; ephedrine; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning; expression analysis; enzyme kinetics analysis

本研究由国家自然科学基金项目(30500041)资助。

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (30500041).

* 通信作者(Corresponding author): 吴能表, E-mail: wunb@swu.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: 992651097@qq.com

Received (收稿日期): 2020-10-14; Accepted (接受日期): 2021-03-19; Published online (网络出版日期): 2021-04-01.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210401.1048.004.html>

半夏源于天南星科植物半夏(*Pinellia ternate*)的干燥块茎,属于多年生草本植物,是我国传统中药材,其药用功效为燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结。现代研究发现半夏含有众多化学成分,主要包括生物碱、黄酮类、甾醇类、挥发油、芳香族成分、有机酸类、半夏蛋白、鞣质以及多种微量元素等,其中,生物碱为半夏药理作用的主要有效成分之一^[1]。麻黄碱是半夏生物碱的主要活性成分,属于苯丙胺类生物碱,因具有止喘、增加心输出量、兴奋中枢神经系统的作用及升血压缓慢、温和的特点,而具有较高的医学应用价值^[2-3]。从代谢合成途径看,植物麻黄碱生物合成属于苯丙氨酸代谢途径,其前体物质为 L-苯丙氨酸(L-Phe),但其生物合成机制并未完全研究清楚,因此,研究苯丙烷类代谢途径,对研究半夏麻黄碱合成代谢机制具有重要意义,而研究代谢途径上的关键酶基因又是重要步骤之一。

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶,催化 L-苯丙氨酸(L-Phe)生成反式-肉桂酸(*t*-CA)和氨,再进一步代谢转化为一类苯丙素类化合物,如黄酮体、木质素、生物碱等;此外,也是联系初级代谢和次级代谢的限速酶和关键酶^[4]。自 1961 年 Koukol 和 Conn 在高等植物、1966 年在微生物首次分离纯化 PAL 以来,该酶引起了人们广泛研究,至今已从裸子、被子、苔藓、蕨类等植物和真菌中分离得到大量的 PAL 家族基因^[5]。目前针对 PAL 家族基因的结构、编码信息及功能已得到广泛研究。研究表明, PAL 作为一个基因家族,其数量因物种不同而存在差异^[6-7]; PAL DNA 序列也相对保守,在多数植物中仅由 2 个外显子和 1 个内含子组成;其编码的蛋白酶分子量大小约为 275~330 kD,亚基分子量大小为 55~88 kD^[8],多数植物 PAL 上包含 PAL-HAL、PLN02457、phe_am_lyase 和 Lyase_aromatic 保守结构域,少部分植物 PAL 包含 HutH 结构域,但 PAL 酶活性位点主要位于 PAL-HAL 结构域上。PAL 催化 L-Phe 脱氨生成反式肉桂酸(*t*-CA)属于非氧化还原反应。在大多数双子叶植物中, L-phe 是 PAL 的最适底物,而在一些单子叶植物和酵母中 PAL 还可以催化 L-酪氨酸(L-Tyr)形成对香豆酸^[9]。Yu 等^[10]在大肠杆菌中异源表达附生苔草(*liverwort Plagiochasma appendiculatum*) PAL 重组蛋白表明, PaPAL 催化 L-Phe 转化为 *t*-CA 具有较高的酶活性,而在催化 L-Tyr 形成对香豆酸时表现出的酶活性较低。Ma 等

在对五倍子 RcPAL 的最适底物研究中发现,将 Phe126 突变为 His126 后,导致 RcPAL 酶活性降低了 75%,但 TAL 酶活性却增加了 22 倍,这进一步为 L-Phe 是 PAL 的最适底物提供了直接证据。PAL 家族基因的表达一方面受植物体内自身代谢产物的反馈调节,一方面受外界因子如病原菌、温度、重金属、机械损伤、及外源植物激素等生物和非生物胁迫的诱导。高浓度 *t*-CA 抑制了银杏^[11]和山药(*Dioscoreae rhizoma*)^[12] PAL 活性,一定浓度的阿魏酸抑制了山药 PAL 活性。玉米丝黑穗病菌可以导致玉米 PAL 活性升高^[13],美洲南瓜(*Cucurbita pepo*) PAL 受灰霉病菌诱导表达^[14]; PAL 在黄芩中参与胁迫诱导黄酮类化合物的合成^[15]。外源喷施植物激素茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)及水杨酸(salicylic acid, SA)后,植物 PAL 表达量也增加^[16-17]。尽管目前 PAL 家族基因已经在多类植物中得到克隆分析,但半夏中尚未见报道。本研究以半夏为试验材料,根据半夏转录组测序,通过 RT-PCR 方法首次成功克隆得到半夏 *PtPAL* 基因,经过生物学信息分析、组织表达分析以及酶动力学分析,旨在为后续深入研究 *PtPAL* 基因功能以及研究半夏麻黄碱代谢途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试半夏块茎购自湖北荆州,经西南大学生命科学学院吴能表教授鉴定为半夏(*P. ternate*)。选取生长健壮且大小一致的半夏块茎,经自来水流水冲洗干净后,种植于盛有河沙的培养盆里进行萌芽,期间保持河沙湿润。待萌芽后,挑选长势基本一致的幼苗移栽至盛有沙质土壤(土壤:河沙=3:1)的营养钵中,每钵 3 株,培养至 60 d 用于试验分析。培养条件:温度 25℃,光照强度为 80~220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,置于光照时间 16 h/8 h (光/暗)人工气候室进行培养。取 60 d 龄半夏幼苗的根、块茎、叶和花于液氮中迅速冷冻,置于-80℃冰箱冻存备用,用于半夏组织特异性分析。

1.2 试剂

Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒、Dnase I 酶购于北京贝洛生物科技有限公司; RNA PCR Kit (AMV) ver 3.0 逆转录试剂盒、Ex Taq 聚合酶、PrimeSTAR Max 高保真酶、pMD19-T Vector 载体均购于 TaKaRa (大连)有限公司; DNA 琼脂糖凝胶

回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购于 Axygen 公司; Hiafair II 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix for qPCR 逆转录试剂盒、Hieff TM qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒均购于上海翊圣生物科技有限公司; 由 Invitrogen 公司合成 PCR 引物; 由擎科生物技术有限公司完成 DNA 测序。

1.3 半夏总 RNA 提取和 cDNA 合成

取适量半夏组织样品于液氮中研磨成细粉, 按照 Biospin 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Cat#BSC65S1) 的使用说明提取半夏总 RNA, 用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 并用 Thermo Nanodrop 2000C 超微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, 合格 RNA 置于 -80℃ 保存备用。参照

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) 3.0 (RR019A) 反转录试剂盒说明书, 以提取的总 RNA 为模板, 反转录合成第 1 条互补链 cDNA。

1.4 半夏 *PtPAL* 基因扩增和克隆

在半夏转录组数据库中本地 BLASTP *PtPAL* 基因中, 以拟南芥模式植物的 *PAL* 基因家族保守序列为参考, 筛选出 1 个含完整读码框的候选 unigene 基因并命名为 *PtPAL*。利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *PtPAL* 基因特异性引物(表 1)。以半夏 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶回收与 pMD19-T vector 连接, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 菌落经 PCR 检测为阳性后, 送擎科生物技术有限公司测序。

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used for this study

引物用途 Primer function	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
基因克隆 Gene cloning	<i>PtPAL</i> -F	CACCTAAACCTTCTTCCGCAG
	<i>PtPAL</i> -R	GATCTTACTTGTACTGGTTCCAAT
荧光定量 PCR Fluorescence quantitative PCR	<i>PtPAL</i> -qF	CCAACATCCTGGCTCTGCTCTC
	<i>PtPAL</i> -qR	GTCCTGCTTCGGCTTCGTCA
	<i>PtGAPDH</i> -qF	TCGTCTTGAGAAATCGGCGAC
	<i>PtGAPDH</i> -qR	GTCAAAGATGCTCGACCGCT
原核表达载体构建 Construction of prokaryotic expression vector	<i>PtPAL</i> - <i>Hind</i> III-F	CGCAAGCTTTTATGGCGGCCAAGTCGAACGGTCT
	<i>PtPAL</i> - <i>Xho</i> I-R	CGCCTCGAGTTACTGGTTCCAATAACCCCTT

1.5 半夏 *PtPAL* 基因生物学信息分析

利用 DNAMAN 8.0 软件将测序所得的编码区序列翻译成氨基酸序列, 在 InterProScan 软件中进行结构域分析和 ORF Finder 查找 *PtPAL* 基因的完整开放阅读框(open reading frame, ORF)。采用 ExPASy 提供的在线工具 ProtParam 预测 *PtPAL* 蛋白的理化性质。在 SOPMA 软件上进行二级结构预测。采用 SWISS-MODEL 进行蛋白质三级结构和四级结构同源建模。根据 NCBI BLASTP 的比对结果, 找出同源性较高的其他物种的氨基酸序列, 在 DNAMAN 8.0 软件上进行氨基酸多重序列比对, 并用 MEGA 5.05 软件采用邻接法(neighbor joining method, NJ) (bootstrap 1000)构建系统进化树。

1.6 实时荧光定量 PCR (qRFPCR)

同上方法提取半夏叶、块茎、根和花的总 RNA, 参照 Hiafair II 1st Strand cDNA Synthesis Super Mix for qPCR 反转录试剂盒说明书反转录合成 cDNA, 同时进行 qPCR 反应。根据 *PtPAL* 基因序列设计荧

光定量 PCR 引物(表 1), 以半夏 *PtGAPDH* 为内参基因, 使用 Bio-Rad IQ5 实时荧光定量 PCR 仪进行反应检测。所有处理均设 3 个生物学重复, 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量, 使用 SPSS 22.0 软件分析显著性, 采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图。

1.7 半夏 *PtPAL* 基因原核表达

通过对 *PtPAL* 基因编码区序列的限制酶切位点和 pET32a(+)原核表达载体上的多克隆酶切位点进行 SnapGene 软件分析, 选择 *Hind* III 和 *Xho* I 作为酶切位点进行载体构建, 引物序列见表 1。将 pET32a(+)-*PtPAL* 重组载体转化大肠杆菌 BL21 (DE3)进行诱导表达, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测分析蛋白表达情况; 根据 ProteinIso Ni-NTA Resin (北京全式金生物技术有限公司)说明书进行半夏 *PtPAL* 重组蛋白 Ni 柱纯化, 采用考马斯亮蓝法 (Bradford 法), 按照 Easy Protein Quantitative Kit (北京全式金生物技术有限公司)的操作说明绘制标准曲线并测定蛋白浓度。

1.8 半夏 *PtPAL* 重组蛋白酶活性鉴定

配置不同 pH 值的 0.1 mol L^{-1} 硼酸缓冲液和 $100 \mu\text{L}$ 0.01 mol L^{-1} L-Phe (溶于 0.1 mol L^{-1} 硼酸缓冲液, pH 9.0), 对照组为 1 mL 0.1 mol L^{-1} 硼酸缓冲液(pH 9.0)进行 *PtPAL* 重组蛋白催化反应最适 pH 测定, 于紫外可见分光光度计 290 nm 处测定其吸光值; 在上述最适 pH 值条件下, 测定 *PtPAL* 重组蛋白在不同温度下的 OD_{290} 值。每个样品重复 3 次, 分别制作酶活性随 pH、温度变化曲线, 将最高酶活定义为 100%, 计算不同 pH 与温度下 *PtPAL* 的相对活力。在 0.1 mol L^{-1} 硼酸缓冲液(pH 9.0)中, 通过加入不同浓度的 L-Phe 为底物, 加入 $100 \mu\text{L}$ (约 $10 \mu\text{g}$) *PtPAL* 重组蛋白, 总体积为 1 mL , 在 70°C 和 37°C 下反应 5 min , 测定 *PtPAL* 酶活力。

2 结果与分析

2.1 半夏 *PtPAL* 基因克隆

根据拟南芥、玉米及烟草等植物基因编码的氨基酸序列, 利用 BioEdit 软件进行本地 BLASTP 检索, 从半夏转录组数据库中筛选出 1 个含完整读码框的候选 unigene 基因, 再利用 NCBI 中的 BLASTX 进行序列比对分析, 确定其为半夏 *PtPAL* 基因。根据 *PtPAL* 基因序列设计出特异性引物, 以半夏叶和块茎的 cDNA 为模板, 进行扩增, 得到一条主带, 大小为 2289 bp , 与预期目的条带大小一致。

2.2 半夏 *PtPAL* 基因生物信息学分析

2.2.1 半夏 *PtPAL* 核酸序列分析 经分析测序获得半夏 *PtPAL* 基因的核酸序列(图 1)。*PtPAL* 基因大小为 2289 bp , 编码 762 个氨基酸, 终止密码子为 TAA, 预测蛋白分子量为 83.44 kD , 蛋白理论等电点(pI)为 6.42。

2.2.2 半夏 *PtPAL* 氨基酸序列多重比对与系统进化树分析 通过 NCBI 的 BLASTX 对 *PtPAL* 氨基酸序列进行在线同源比对分析发现, *PtPAL* 与大多数植物的 PAL 氨基酸序列具有较高的相似性, 相似度达 58%~78%。从中选择相似度较高的百合、葡萄和银杏等植物的 PAL 氨基酸序列与 *PtPAL* 氨基酸序列进行多重比对(图 2)发现, 半夏 *PtPAL* 与单子叶植物百合 PAL 氨基酸序列相似度最高, 为 78%; 其次, 与双子叶植物葡萄 PAL 氨基酸序列相似度也较高, 为 75%; 与裸子植物银杏、蕨类植物问荆以及苔藓植物背苔的相似度分别为 58%、66%、59%。然后, 对 *PtPAL* 做进一步的保守结构域和活性位点分析表明, *PtPAL* 具有 PAL-HAL、PLN02457、phe_am_lyase、Lyase_aromatic 及 HutH 结构域, 属于解氨酶类家族

(Lyase_I_like Superfamily)。研究发现, *PtPAL* 具有保守的酶活性中心序列(GTITASGDLVPLSYIAG, 209~225 aa), 其中包含高度保守的 Ala-Ser-Gly 氨基酸三联体(213~215 aa), 除与百合存在 1 个氨基酸残基差异外, 与拟南芥、葡萄、银杏和白及等植物的酶活性中心序列一致^[17]。此外, *PtPAL* 还含有保守活性位点(Y124、F151、L152、N270、Q358、Y361、R364、F410、Q497), 与背苔和欧芹报道中的一致^[18], 说明 *PtPAL* 是苯丙氨酸解氨酶家族成员。

本研究从 NCBI 中收集到 17 条完整的 PAL 氨基酸序列, 其中包括麻风树、油棕、马尾松及白桦等植物, 通过 MEGA 5.05 软件中 Clustal W 进行氨基酸序列比对, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树, 对半夏进行聚类分析。结果发现, 可大致将来源于 18 种不同物种的 PAL 氨基酸序列分为 5 类(图 3), 分别为双子叶植物、单子叶植物、蕨类植物、苔藓植物以及裸子植物; 本研究中克隆的半夏 *PtPAL* 归于单子叶植物一类, 且与单子叶植物菠萝、百合和油棕的 PAL 氨基酸序列遗传距离最短。

2.2.3 半夏 *PtPAL* 蛋白结构预测 运用 SOPMA 对半夏 *PtPAL* 蛋白的二级结构进行预测发现, *PtPAL* 包含 53.41% α -螺旋(alpha helix)、6.43% β -转角(beta turn)、8.53%延伸链(extended strand)和 31.63%无规则卷曲(random coil), 表明 *PtPAL* 蛋白主要以 α -螺旋为形式的二级结构。

采用同源建模的方法, 在 SWISS-MODEL 在线软件中进行 *PtPAL* 蛋白的三维结构建模, *PtPAL* 蛋白以双子叶植物欧芹 PcPAL (PDB:1w27)^[19]的晶体结构为模版, 如图 4 所示。建模覆盖范围为 70~713 位氨基酸残基, *PtPAL* 与 PcPAL 氨基酸序列同源性为 61.79%。*PtPAL* 的单个亚基呈“海马”状, 由 MIO 域(MIO domain)、中心区域(core domain)及可插入屏蔽区域(inserted shielding domain) 3 个部分组成(图 4-A)。已有研究表明, PAL 是由 4 个相同亚基构成的同源四聚体蛋白; 而本研究中同源建模分析结果显示, *PtPAL* 与欧芹 PcPAL 均是由 4 个相同亚基构成的同源四聚体, 且每个亚基与其他 2 个亚单位以头尾相连的方式结合, 从而增加相邻亚基间的相互作用, 产生紧密结合地同源四聚体(图 4-B)。另外, *PtPAL* 含有植物中高度保守的 Ala-Ser-Gly (ASG) 氨基酸三联体, ASG 氨基酸三联体可以通过自身环化脱水而自动转化为 MIO 作为 PAL 的重要辅助因子发挥作用, 进一步说明 *PtPAL* 属于苯丙氨酸解氨酶家族。

1 ATGCGGCCAAGTCGACGGTCTCTTCGCCCCGCCGACGCCTCCGCCGCCACCTCCCTCCCAAGGATGGGTAAACCCCATCTCGTC
 M A A K S N G L F R P A D A F R P P T L P L P K D G L N P I F V
 97 GCGGCGAGCTCTACATCCCCGACCCGCGCACTGGAAGAAGCGCGGAGGCCCTCCAGTCACCCACTTCGACGAGGTCCGGCGATGATCTCC
 A G S S Y I P D P P H W K K A A E A L Q C T H F D E V R R M I S
 193 CAGTACCAGTCCACCCAGGCCGTCGACCTCCAGGACACCCCTCACCCTCGCCAGGTGGCCGCCGTCGCCGCCGCTCCGACGTCTCCGTCGGC
 Q Y Q S T Q A V D L Q G T T L T V A Q V A A V A R R S D V S V R
 289 CTCACGAGCGGTGGCCAGGGAACGCGTGACCCGAGCGCCACCTGGGTCTCCGACAACATCGCCCGCGCACCGACACTACGGCGTCAACC
 L N E P V A R E R V T R S A T W V S D N I A R G T D T Y G V T T
 385 GGGTTCGGCGGACCTCCACCGCGCACCAACAGGTGACCGACCTCCAGACCGAGCTCATCGCTTCCTCAACGCGGCGTCATCGGCAAGGAG
 G F G A T S H R R T N K V T D L Q T E L I R F L N A G V I G K E
 481 CACCTCCCAACGACTCTCAAGCGGCCATGCTGGTGGCGACCAACCCCTCATGACGGGCTACTCCGGCATCCGCTGGGAGCTCTGGAGGCC
 H L P T S Y S K A A M L V R T N T L M Q G Y S G I R W E L L E A
 577 GTCGCCAAGCTCATGAACATAACATCATCCCAAGCTCCCTCGGGGACCATACCGCTCCGGGACCTCGTCCCGTGTCTACATCGCG
 V A K L M N H N I I P K L P L R G T I T A S G D L V P L S Y I A
 673 GGACTGTCAACGGGCGCCACAACGCCGAGCGTCACCCCGCGGGGAGGATCACTCTCGGAGGCGCTCAAGCGGATCGCGTCACTGTC
 G L L T G R H N A R A V T P A G E E I T S S E A L K R I G V S C
 769 CCCTTCGAGCTGACGGGAAGGAGGCTCGCGCTGGTCAACGGCACGGCGTGGGTCCGCCGTCGCCGCCACCGTCTGCTACGACGCCAACATC
 P F E L Q A K E G L A L V N G T A V G S A V A A T V C Y D A N I
 865 CTGGCTCTGCTCCGTGGTGTCTCGGCGCTCTTCTGCGAGGCCATGACGGGTAAGCCGAGTTCGCGGACCCGCTCACACACGAGCTGAAGCAC
 L A L L S V V L S A L F C E A M Q G K P E F A D P L T H E L K H
 961 CACCCGGGCGAGTCGAGTCGGCGGATCATGGAGTTCCTGCTCGACGGCAGCTACATGGGGAGGCCAAGATCCGGAACGAGCGGAGCCG
 H P G Q I E S A A I M E F L L D G S D Y M R E A K I R N E R E P
 1057 CTGACGAAGCCGAGGACAGGTACGCCCTGCGACCTCGCCCGAGTGGCTGGGCCGAGCTGGAGGTATCCGATGGCCACCACTCCATC
 L T K P K Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q L E V I R M A T H S I
 1153 GAGCGCGAGATCAACTCGGTCAACGACAACCCCTCATCGACGTGCGCCGCGACATCGCCCTCCACGGCGGCAACTCCAGGGCACCCCATCGGG
 E R E I N S V N D N P L I D V A R D I A L H G G N F Q G T P I G
 1249 GTCTCCATGGACAACCTCCGATCGCCCTCGCCGCCATCGGCAAGCTCGTGTTCGCCAGTTCTCCGAGCTGGTCTGCGACTACTACAACAACGGG
 V S M D N L R I A L A A I G K L V F A Q F S E L V C D Y Y N N G
 1345 CTGCCCTCAACCTGTGCGGCGGCCGACCCGACCTGGACTACGGGCTCAAGGGCGCGAGATCGCATGGCGGCTACTGCTCGGAGCTCCAG
 L P S N L C G G A D P S L D Y G L K G A E I A M A A Y C S E L Q
 1441 TACCTGGCAACCCGCTACCAACCGTGCAGAGCGCGAGCAGCACAACAGGACGTCAACTCCCTGGGGCTGATCTCGCGAGGAGAGCGCC
 Y L A N P V T T H V Q S A E Q H N Q D V N S L G L I S A R K S A
 1537 GAGCGGTGGAGATCTGAGGTGATGGCGCGACCTTCATGGTGGGCTTGCAGGCGATCGACCTGCGCCACCTGGAGGAGAACCTCCGGGAG
 E A V E I L R L M A A T F M V G L C Q A I D L R H L E E N L R E
 1633 GTGGTAAGCAGCGGTGTGACGGCGGAGGAAGACGCTGTACACGGCGGAGACGGGTGATGCTGAGTTCGCGTCTTTCGCGAGAAGGAGCTG
 V V K H A V V Q A A R K T L Y T A E D G S M L E S R F C E K E L
 1729 CTGCAAGTGGTGGAGTGCCAGCCGTTCTCTACATCGACGACCCGCGCAACCCCTCTACGCGTGTGCTGCAGCTCCGGAGGTCTCTGTC
 L Q V V E C Q P V F S Y I D D P A N P S Y A L L L Q L R E V L V
 1825 GAGAAGTCCCTGCAGCAGAGCGAGGAGGAAGCGCGCGGCTACGCCGTGTTCAAGCGGATCCCGTCTCCAGGAGGAGCTGAAGAGGCGCTG
 E K S L Q Q S E E E G G A G Y A V F K R I P V F Q E E L K R A L
 1921 GAGGAGCGGTCCGCGGCGAGGAGCGCTTCGAGAAGGGGACTTCTCTCGGCCACCGCATCAGGAAGTCCGACCTACCCGCTCTACAAG
 E E A V P R A R E R F E K G D F L V G H R I R K C R T Y P L Y K
 2017 CTGGTGGCTCCGAGGCGCGCGGATTCTGACCGGAGAGAAGGTGAGCCCGGGAGTGCATCGAGAGAGTGGCGGACCGCTCGCGGAG
 L V R S E A G A G F L T G E K K V S P G E C I E R V A D A V A E
 2113 GGAAGCTCGGGAGGCCCTACCGGTTGCTTGCATGTGAGGGGATCGGCGGGCGGTTACGCCAGGCGGAGGTGCTGCTCGGCGCAC
 G K L G E A L T G C L A M W R G S A G P F T P R P E V S S P A H
 2209 AACACCCGGGTTCTGGAGCTGGTTCGACATCGTGAAGTCCGCTCTGCTACCAAGTGAAGGGGTATTGGAACCACTAA
 N N P A F W S W F D I V R S P S A T S G R G Y W N Q *

图 1 半夏 *PtPAL* 基因全长 CDS 核酸及氨基酸序列

Fig. 1 Full length CDS nucleotide sequence and amino acids sequence of *PtPAL* in *Pinellia ternate*

编码区核酸序列和翻译的氨基酸序列用大写字母表示。终止密码子用*表示, 起始密码子和终止密码子用横线表示。

The coding sequence and the deduced amino acid sequence are shown in uppercase letters in bold. Termination code is denoted by the asterisk; initiation code and termination code are denoted by underlines.



一致氨基酸残基用白色字体黑色背景表示,保守氨基酸残基用黑色字体红色背景表示。保守的 Ala-Ser-Gly 催化三联体用表示实心三角,其他保守活性位点用空心三角表示,保守活性基序用红色方框表示。AtPAL: 拟南芥(NP_187645.1); VvPAL: 葡萄(RVW44079.1); LrPAL: 百合(ASV46344.1); GbPAL: 银杏(ABU49842.1); EaPAL: 问荆(AAW80639.1); PaPAL: 背苔(AIU99853.1)。

The identical amino acids are shown in white with black background, the conserved amino acids are shown in black with red background. The conserved active site motif (Ala-Ser-Gly) is indicated by filled triangles under the sequences, the other active site residues are indicated by open triangle asterisk, the conserved active site motif is denoted by red box. AtPAL: *Arabidopsis thaliana* (NP_187645.1); VvPAL: *Vitis vinifera* (RVW40479.1); LrPAL: *Lilium regale* (ASV46344.1); GbPAL: *Ginkgo biloba* (ABU49842.1); EaPAL: *Equisetum arvense* (AAW80639.1); PaPAL: *Plagiochasma appendiculatum* (AIU99853.1).

达谱分析(图 5): 在转录水平上, *PtPAL* 基因在叶中大量表达, 其次在块茎、根中有少量表达, 在花中表达量相对较微弱。

利用实时荧光 PCR 技术(qRT-PCR),以半夏 *PtGAPDH* 作为内参基因,对基因 *PtPAL* 进行组织表

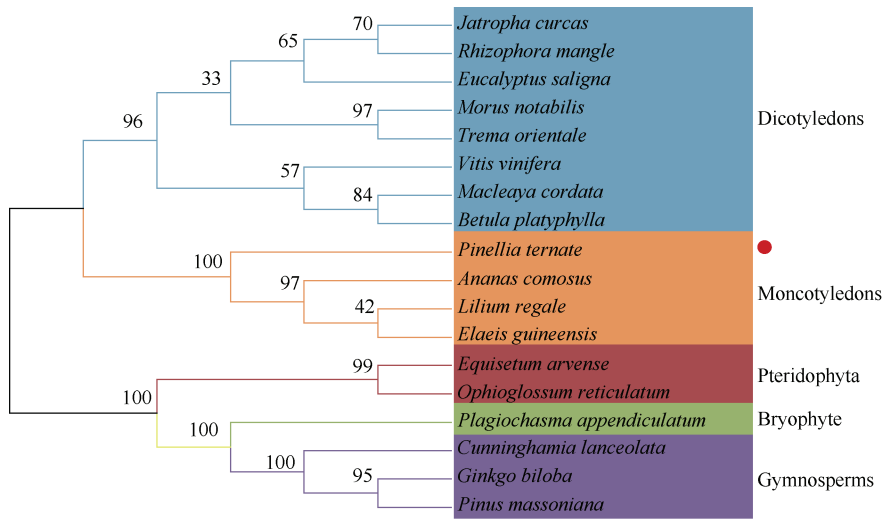


图 3 半夏 *PtPAL* 和其他植物 *PAL* 系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *PtPAL* and *PAL* from other plants
各节点处数值表示 Bootstrap 值百分比(重复 1000 次)。半夏 *PtPAL* 用红色点表示。
The number of each interior Branch is the percentage of bootstraps value (1000 replicates). *PtPAL* is denoted by red dot.

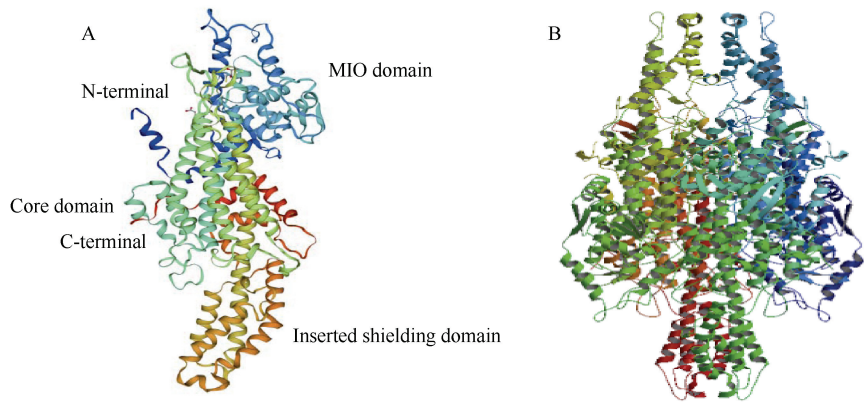


图 4 *PtPAL* 蛋白结构预测
Fig. 4 Deduced protein structure of *PtPAL*
A: 单体; B: 同源四聚体。MIO: 3,5-二氢-5-亚甲基-4H-咪唑-4-酮。
A: monomer; B: homotetramer. MIO: 3,5-dihydro-5-methylene-4H-imidazol-4-one.

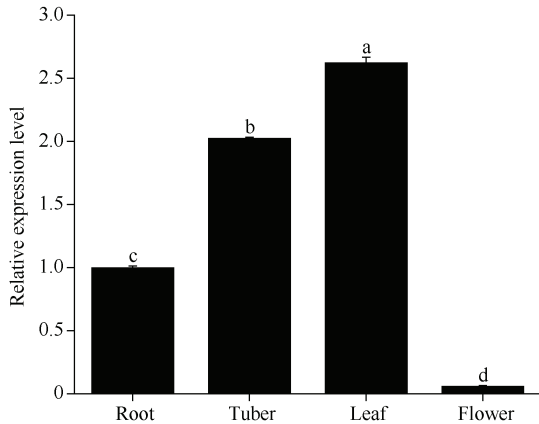


图 5 不同组织中半夏 *PtPAL* 基因表达分析
Fig. 5 Relative expression levels of *PtPAL* in different tissues
不同小写字母表示不同组织间在 0.05 水平差异显著。
Values with different lowercase letters show significant difference among different tissues at the 0.05 probability level.

2.4 半夏 *PtPAL* 基因原核表达和分离纯化

以 pET32a(+)载体作为原核表达载体, 通过在大肠杆菌 BL21 (DE3)中进行异源表达 *PtPAL* 重组蛋白, 获得分子量大小(MW)为 102.3 kD 的融合 His 标签的 *PtPAL* 重组蛋白。将 BL21-pET32a(+)-*PtPAL* 工程菌诱导, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 结果如图 6-A 所示: 在 1 h 时, *PtPAL* 在 102 kD 大小位置上有明显加粗的条带; 随着诱导时间的延长, 条带逐渐加粗。说明有目的蛋白产生且随诱导时间逐渐增加, 表明 *PtPAL* 重组蛋白可以被诱导。采用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化, 用不同咪唑浓度的 PBS 平衡缓冲液进行洗脱, 收集蛋白, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳检测发现, *PtPAL* 重组蛋白在 150 mmol L⁻¹ 咪唑浓度洗脱时, 目的蛋白较多而杂蛋白较少且纯化的 *PtPAL* 重组蛋白约为 102.3 kD (图 6-B)。

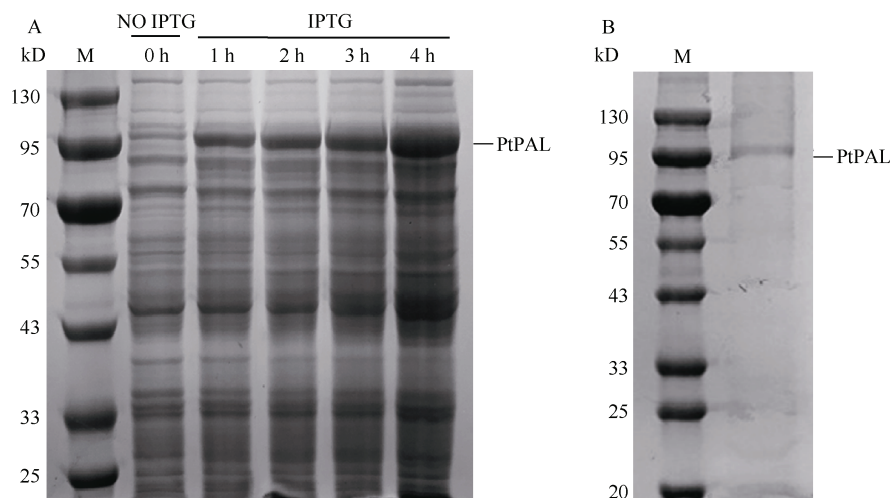


图 6 PtPAL 重组蛋白时间梯度诱导表达和融合 His 标签 PtPAL 重组蛋白纯化

Fig. 6 Time gradient induced of the recombinant PtPAL and its purified His-tagged PtPAL

M 为蛋白 marker。A: PtPAL 重组蛋白时间梯度诱导表达; B: 融合 His 标签 PtPAL 重组蛋白纯化。

M: protein molecular weight standards. A: time gradient induced of reconstructive PtPAL; B: the purified His-tagged PtPAL.

2.5 半夏 PtPAL 重组蛋白活性鉴定

2.5.1 半夏 PtPAL 重组蛋白功能鉴定 已知 PAL 催化 L-Phe 脱氨形成反式肉桂酸(*t*-CA)。通过 LC-MS 检测 PtPAL 反应对照样品、反应样品和反式肉桂酸的分析标准品(图 7)发现, 蓝色峰线为反式肉桂酸标准品, 保留时间为 22.638 min; 红色峰线为反应样品, 保留时间为 22.630 min, 与标准品保留时间基本一致; 黑色峰线为反应对照样品, 无明显波峰, 即无反式肉桂酸生成。表明 PtPAL 催化 L-Phe 生成了 *t*-CA。

2.5.2 半夏 PtPAL 重组蛋白催化反应最适条件和酶动力学分析 为探究半夏 PtPAL 重组蛋白催化反应的最适条件, 本研究在不同 pH 值与不同温

度条件下分别测定 PtPAL 催化活性。PtPAL 催化活性在 pH 为 7.4~9.8 范围内先升高后下降, 且当 pH 为 9 时, 催化活性最大, 即为最适 pH (图 8-A)。当温度在 30~70℃ 之间时, PtPAL 活性呈逐渐升高的趋势; 当温度大于 70℃ 时, PtPAL 活性逐渐降低; 而 PtPAL 在温度为 90℃ 时, 基本完全失活(图 8-B)。

在 pH 为 9.0 和温度为 70℃、37℃ 的条件下, 通过测定 PtPAL 对底物 L-Phe 酶动力学参数, 拟合 PtPAL 的米曼氏动力学曲线(图 9), 再计算得到酶动力学参数, 最后与其他物种的 PAL 酶动力学参数进行比对分析(表 2)发现, 最适温度 70℃ 下, PtPAL K_m 为 0.89 mmol L⁻¹, V_{max} 为 63.96 nKat mg⁻¹,

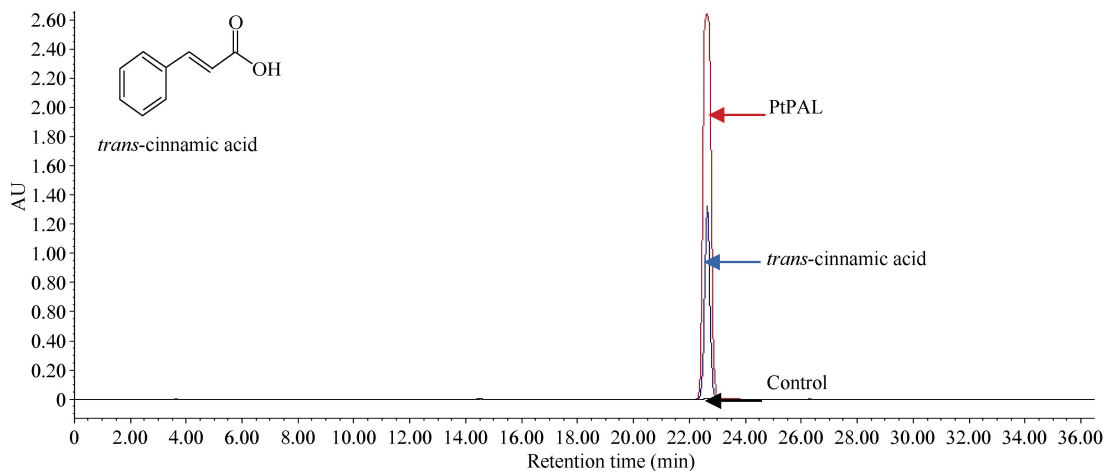


图 7 PtPAL 重组蛋白功能鉴定

Fig. 7 Functional identification of the recombinant PtPAL

蓝色、红色和黑色峰图分别表示反式肉桂酸标准品、反应样品、反应对照样品。

The blue, red, and black peak maps are *trans*-cinnamic acid standard, reaction, and control reaction sample, respectively.

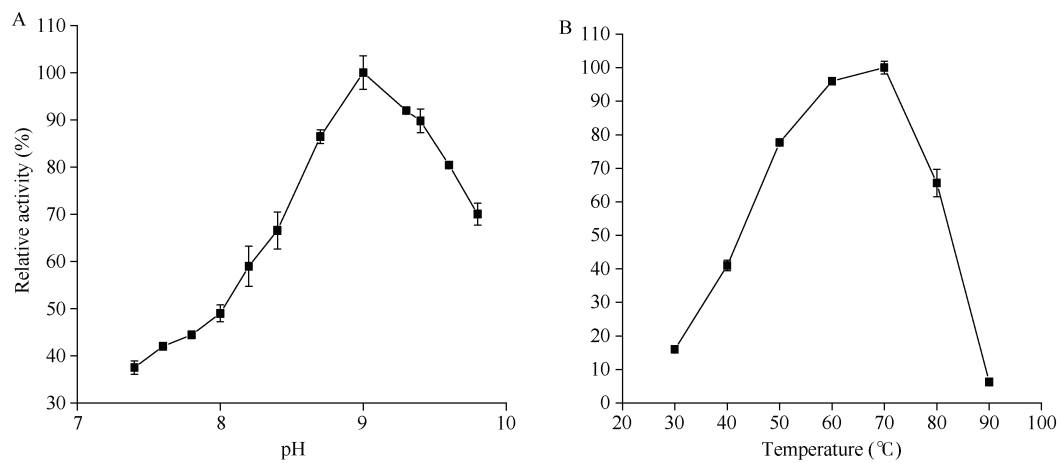


图 8 *PtPAL* 催化反应最适 pH 和温度

Fig. 8 Optimum pH and temperature of *PtPAL* for the reaction

A: 不同 pH 下 *PtPAL* 催化活性测定; B: 不同温度下 *PtPAL* 催化活性测定。误差线表示生物学重复的标准误差($n = 3$)。
A: the activity of *PtPAL* under changing pH levels; B: the activity of *PtPAL* across a range of temperatures. Bars indicate the standard errors of the means ($n = 3$).

表 2 不同植物 PAL 酶动力学参数比较

Table 2 Comparison of PAL kinetic properties from different plants

酶 Enzyme	温度 Temperature (°C)	米氏常数 K_m (mmol L ⁻¹)	最大酶促反应速率 V_{max} (nkat mg ⁻¹)	催化常数 K_{cat} (s ⁻¹)	催化效率 K_{cat}/K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)	参考文献 References
<i>PtPAL</i>	70	0.89	63.96	6.56	7.37×10^3	本研究 This study
	37	0.80	37.67	3.75	4.69×10^3	
<i>EsPAL1</i>	37	0.144	7.45×10^{-3}	0.588	3.87×10^3	Taketo et al. (2008) [20]
<i>EsPAL2</i>	37	0.152	5.77×10^{-3}	0.457	3.18×10^3	Hsieh et al. (2011) [21]
<i>BoPAL1</i>	50	1.01	—	10.11	1.0×10^4	
<i>BoPAL2</i>	50	0.33	—	16.04	4.86×10^4	Hu et al. (2011) [22]
<i>CdPAL</i>	55	0.101	—	3.36	3.32×10^3	
<i>RgPAL</i>	50	1.3	—	25×10^3	19.20	Zhu et al. (2013) [23]
<i>RcPAL</i>	45	7.90	—	52.31	6.62×10^3	Ma et al. (2013) [24]

Es: 草麻黄; Bo: 绿竹; Cd: 肉苁蓉; Rg: 黏红酵母; Rc: 五倍子。

Es, Sv, Rg, Cd, and Rc are *Ephedra sinica*, *Bambusa oldhamii*, *Rhodotorula glutinis* JN-1, *Cistanche deserticola*, and *Rhus chinensis*, respectively.

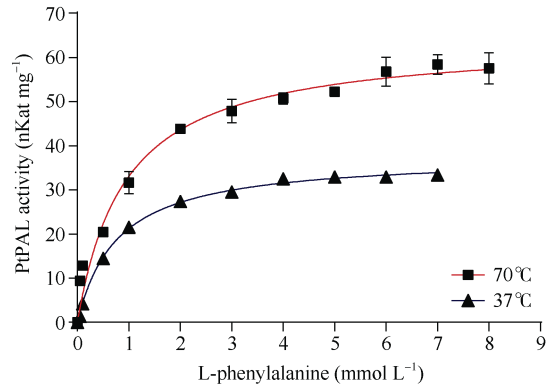


图 9 *PtPAL* 米曼氏动力学曲线

Fig. 9 Michaelis-Menten curves for the velocity of *PtPAL*

误差线表示生物学重复的标准误差($n = 3$)。
Bars indicate the standard errors of the means ($n = 3$).

K_{cat} 为 6.56 s^{-1} , K_{cat}/K_m 为 $7.37 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; 当反应温度为 37°C 时, *PtPAL* K_m 为 0.80 mmol L^{-1} , V_{max} 为 $37.67 \text{ nkat mg}^{-1}$, K_{cat} 为 3.75 s^{-1} , K_{cat}/K_m 为 $4.69 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; 且较于其他物种, *PtPAL* 的 K_m 较大, 但从 K_{cat}/K_m 参数来看, *PtPAL* 对 L-Phe 的催化效率较高。

2.5.3 金属离子对 *PtPAL* 重组蛋白酶活性影响

本研究通过添加不同外源金属盐离子, 探究金属离子对催化活性的影响(图 10)发现, Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 对 *PtPAL* 催化活性的没有显著影响; Ba^{2+} 对 *PtPAL* 催化活性具有显著的激活作用, 相对酶活性达到 110.20% ; Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 及 Cu^{2+} 金属离子对 *PtPAL* 催化活性具有显著的抑制作用。

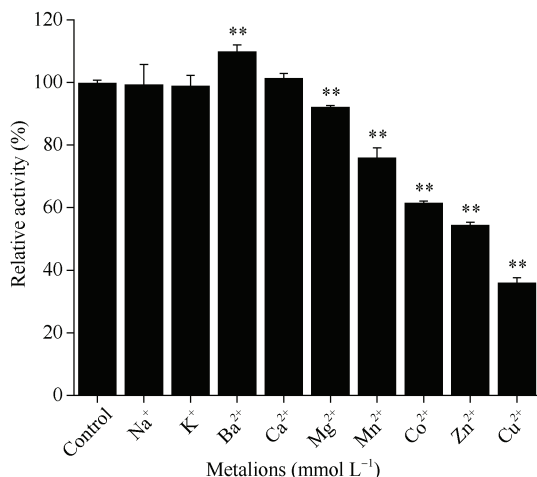


图 10 金属离子对 PtPAL 重组蛋白活性的影响

Fig. 10 Effects of metal ions on the recombinant PtPAL

**表示在 0.01 水平差异显著。

** means significant difference at the 0.01 probability level.

3 讨论

随着人们对野生半夏的不断挖掘、开发利用,导致野生半夏资源几近枯竭,又因为野生半夏中生物碱含量较低,而市场需求有增无减^[25],麻黄碱是半夏生物碱的主要活性成分,含量低,化学合成复杂且成本高昂,而苯丙氨酸解氨酶(PAL)是植物苯丙胺类生物碱生物合成途径的第 1 个关键酶,因此研究苯丙氨酸解氨酶(PAL)对进一步探究麻黄碱生物合成途径中的具有重要价值与意义。

本研究基于半夏转录组测序结果,从半夏中成功克隆获得 1 个 *PtPAL* 基因,编码 762 个氨基酸,具有 PAL-HAL、PLN02457、*phe_am_lyase*、*Lyase_aromatic* 及 *HutH* 结构域,属于苯丙氨酸解氨酶家族成员。研究表明, PAL 是多基因家族,一个染色体组中往往含有 2~6 个 *PAL* 基因,其基因个数因不同物种而不同;但对已报道的不同物种中 *PAL* 家族基因进行序列比对发现,其具有较高的同源性^[26]。通过氨基酸序列比对和系统进化树等分析表明,半夏 *PtPAL* 与多种单子叶植物 *PAL* 聚为一类,不与双子叶植物、蕨类植物、苔藓植物以及裸子植物 *PAL* 聚集在一起,这符合植物分类学研究结果。基于同源建模法构建的 *PtPAL* 蛋白结构含有在苯丙氨酸解氨酶家族成员中高度保守的 Ala-Ser-Gly (ASG)氨基酸三联体及保守的脱氨位点(L、V、L、A)和催化活性位点(N、G、H、NDN 及 HNDQV),与已报道的欧芹一样,表明 *PtPAL* 是苯丙氨酸解氨酶家族成员且可能具有催化苯丙氨酸(L-Phe)生成反式肉桂酸(*t*-CA)的功能。

为进一步鉴定 *PtPAL* 的功能,在大肠杆菌 BL21 (DE3)中进行异源表达发现, *PtPAL* 重组蛋白能够高效地催化 L-Phe 生成 *t*-CA。在大肠杆菌中异源表达附生苔草 *PaPAL* 重组蛋白发现, *PaPAL* 催化 L-Phe 转化为 *t*-CA 具有较高的酶活性,而在催化 L-Tyr 形成对香豆酸时表现出较低的酶活性^[10]。Chen 等^[27]研究发现,在拟南芥中, *AtPAL* 的最适底物是 L-Phe,当底物换成 L-Tyr 时, *AtPAL*1、*AtPAL*2 和 *AtPAL*4 催化效率极低,然而 *AtPAL*1 对 L-Tyr 没有酶活性。本研究中 *PtPAL* 并不能催化 L-Tyr 生成对香豆酸,这说明半夏体内, *PtPAL* 只具有催化 L-Phe 生成 *t*-CA 的活性。对 *PtPAL* 进行最适酶促反应条件探究发现, *PtPAL* 催化反应最适 pH 值为 9.0,介于研究已报道的 *PAL* 最适 pH 范围内^[28-29]; *PtPAL* 催化反应最适温度为 70℃,与已报道的油茶 *PAL* 最适温度一致^[30],略高于其他已报道植物中 *PAL* 的最适温度,如拟南芥 *AtPAL*2、*AtPAL*3 最适温度分别为 48℃、31℃,附生苔草 *PaPAL* 最适温度为 60℃,表明物种不同, *PAL* 的最适温度也会不同,在同一物种中, *PAL* 家族不同成员的最适温度也存在一定差异。酶动力学分析表明,在最适条件下, *PtPAL* 催化 L-Phe 反应 K_m 为 0.89 mmol L⁻¹, V_{max} 为 63.96 nKat mg⁻¹, K_{cat} 为 6.56 s⁻¹, K_{cat}/K_m 为 7.37×10^3 s⁻¹ M⁻¹。 K_m 参数显示, *PtPAL* 对底物 L-Phe 的亲和力较高,但低于已报道的绿竹 (*BoPAL*)^[30]和酵母(*RgPAL*、*RaPAL*)^[21];从 K_{cat}/K_m 来看, *PtPAL* 对 L-Phe 的催化效率较高,且高于草麻黄 (*EsPAL*1、*EsPAL*2)、肉苁蓉(*CdPAL*)。探究重金属盐离子对 *PtPAL* 酶活影响,结果表明 Ba²⁺显著增强半夏 *PtPAL* 酶活。

PAL 家族基因在不同植物组织中的表达模式已得到广泛研究。胡永胜等^[31]研究发现,丹参 *SmPAL* 在根茎叶中都有表达,但在根中表达量最多,其可能参与木质素的合成;刘俊频等^[32]从膜荚黄芪中克隆获得 *AmPAL*1、*AmPAL*2、*AmPAL*3 基因,其中 *AmPAL*2 在根中表达量最高,与毛蕊异黄酮葡萄糖苷积累一致, *AmPAL*2 也可能与毛蕊异黄酮葡萄糖苷的合成有关;李炳国等^[33]研究发现, *RgPAL* 在地黄叶中表达量明显高于花和根中;而 *PAL* 基因在水稻中却主要在茎中得以表达^[34]。这说明 *PAL* 基因在不同植物中具有表达部位特异性。在本研究中, *PtPAL* 基因在半夏叶中的表达量最高,其次在块茎与根中,而一直以来,半夏以块茎用药,半夏块茎也被认为是生物碱合成主要器官,这可能是因为麻黄碱合成

所需的前体物质主要位于半夏叶片, 然后运输至块茎中合成麻黄碱。综上所述, *PtPAL* 可能在半夏叶中参与麻黄碱的生物合成, 为开展半夏麻黄碱工程提供候选基因。

4 结论

从半夏中克隆得到 *PtPAL* 基因, 编码 762 个氨基酸, 含有高度保守的 Ala-Ser-Gly 氨基酸三联体, 与其他已报道的植物 PAL 具有较高的相似度。*PtPAL* 基因在半夏叶中表达量较高, 块茎、根中次之, 在花中表达量较少。纯化的 *PtPAL* 重组蛋白具有催化 L-Phe 生成 *t*-CA 的功能, 且具有较高的催化效率, *PtPAL* K_m 为 0.89 mmol L^{-1} , $V_{\max}$ 为 $63.96 \text{ nkat mg}^{-1}$, K_{cat} 为 6.56 s^{-1} , K_{cat}/K_m 为 $7.37 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; *PtPAL* 催化反应最适 pH 为 9.0, 最适温度为 70°C 。但在相同催化条件下, *PtPAL* 不能催化 L-酪氨酸生成对香豆酸。探究重金属离子对 *PtPAL* 酶活性的影响表明, Ba^{2+} 增强了 *PtPAL* 酶活性, Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 及 Zn^{2+} 抑制了 *PtPAL* 酶活性。

References

- [1] 刘永红, 郭建宏, 刘文婷, 梁宗锁. 药用植物半夏生物碱类成分研究进展. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(9): 171–177.
Liu Y H, Guo J H, Liu W T, Liang Z S. Research progress on alkaloids from *Pinellia ternata*. *J Northwest A&F Univ (Nat Sci Edn)*, 2015, 43(9): 171–177 (in Chinese with English abstract).
- [2] 郑萍, 戴贵东, 李汉青. 麻黄碱及伪麻黄碱药理作用研究进展. 宁夏医学杂志, 2002, 24(2): 126–127.
Zheng P, Dai G D, Li H Q. Research progress on the pharmacological effects of ephedrine and pseudoephedrine. *Ningxia Med J*, 2002, 24(2): 126–127 (in Chinese).
- [3] 高晔珩, 党力纳. 麻黄研究进展. 陕西中医学院学报, 2003, (6): 60–61.
Gao Y H, Dang L N. Research progress of *Ephedra*. *J Shaanxi Coll Trad Chin Med*, 2003, (6): 60–61 (in Chinese).
- [4] 杨顺楷, 杨亚力, 杨维力. 苯丙氨酸解氨酶(PAL, EC 4.3.1.5)反应机理研究新进展. 生物加工过程, 2004, 2(4): 1–5.
Yang S K, Yang Y L, Yang W L. Recent advances in the research of mechanism of the phenylalanine ammonia-lyase (PAL, EC 4.3.1.5) reaction. *Chin J Bioproc Eng*, 2004, 2(4): 1–5 (in Chinese with English abstract).
- [5] 刘千子, 宋文琦, 张世华, 张雪梅, 程卓鑫. 菰蓝中苯丙氨酸解氨酶家族基因的鉴定及分析. 中国校医, 2019, 33(6): 396.
Liu Q Z, Song W Q, Zhang S H, Zhang X M, Cheng Z X. Identification and analysis of phenylalanine ammonia-lyase family genes in *Lisatis indigotica* Fortune. *Chin J School Doctor*, 2019, 33(6): 396 (in Chinese with English abstract).
- [6] Appert C, Logemann E, Hahlbrock K, Schmid J, Amrhein N. Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym). *FEBS J*, 2010, 225: 491–499.
- [7] Shi R, Shuford C M, Wang J P, Sun Y H, Yang Z C, Chen H C, Anukit S T, Li Q Z, Liu J, Muddiman D C, Sederoff R R, Chiang V L. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene family in wood forming tissue of *Populus trichocarpa*. *Planta*, 2013, 238: 487–497.
- [8] Song J, Wang Z Z. Molecular cloning expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*SmPAL1*) from *Salvia miltiorrhiza*. *Mol Biol Rep*, 2009, 36: 939–952.
- [9] Rosler J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol*, 1997, 113: 175–179.
- [10] Yu H N, Liu X Y, Gao S, Han X J, Cheng A X, Lou H X. Molecular cloning and functional characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from liverwort *Plagiochasma appendiculatum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2014, 117: 265–277.
- [11] 王燕, 刘卫红, 杜何为, 许峰, 程水源. 底物、末端产物对离体银杏叶苯丙氨酸解氨酶活性的影响. 果树学报, 2004, 21: 443–446.
Wang Y, Liu W H, Du H W, Xu F, Cheng S Y. Effects of substrate and terminal products on the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities in *in vitro* leaves of *Ginkgo biloba*. *J Fruit Sci*, 2004, 21: 443–446 (in Chinese with English abstract).
- [12] 江力, 袁怀波, 周强, 江汉湖. 底物和产物对鲜切山药苯丙氨酸解氨酶活性的影响. 食品科学, 2007, 28(10): 35–37.
Jiang L, Yuan H P, Zhou Q, Jiang H H. Effects of substrate and products on activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in fresh-cut *Dioscorea batatas*. *Food Sci*, 2007, 28(10): 35–37 (in Chinese with English abstract).
- [13] 贺字典, 高增贵, 庄敬华, 陈捷, 郑俊强, 唐树戈. 玉米丝黑穗病菌对寄主防御相关酶活性的影响. 玉米科学, 2006, 14(2): 150–151.
He Z D, Gao Z G, Zhuang J H, Chen J, Zheng J Q, Tang S G. Effect of maize head smut pathology (*Sphacelotheca reiliana*) on the major defensive enzymes of Host. *J Maize Sci*, 2006, 14(2): 150–151 (in Chinese with English abstract).
- [14] 刘佳. 美洲南瓜苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因克隆、表达分析及品种抗灰霉病研究. 甘肃农业大学博士学位论文, 甘肃兰州, 2013.
Liu J. Cloning and Expression Analysis of Phenylalanine Ammonialyase gene (PAL) from *Cucurbita pepo* and the Study on Varieties Resistance to *Botrytis Cinerea*. PhD Dissertation of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [15] Muñoz-Espinoza V A, Lopez-Climent M F, Casaretto J A, Gomez-Cadenas A. Water stress responses of tomato mutants impaired in hormone biosynthesis reveal abscisic acid, jasmonic acid and salicylic acid interactions. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 997.
- [16] Ma R F, Liu Q Z, Xiao Y, Zhang L, Li Q, Yin J, Chen W S. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Lisatis indigotica* Fortune.: molecular cloning, characterization, and

- expression analysis. *Chin J Nat Med*, 2016, 14: 801–812.
- [17] 罗才林, 李林, 陈立, 邓琴, 张俊, 马璇, 徐德林, 钱刚. 白及苯丙氨酸解氨酶基因的克隆、序列特征及激素响应表达分析. *中草药*, 2019, 50: 694–701.
- Luo C L, Li L, Chen L, Deng Q, Zhang J, Ma X, Xu D L, Qian G. Cloning, sequence characterization, expression profiling of hormones response of phenylalanine ammonia-lyase gene in *Bletilla striata*. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2019, 50: 694–701 (in Chinese with English abstract).
- [18] Rother D, Poppe L, Morlock G, Viergutz S, Retey J. An active site homology model of phenylalanine ammonia-lyase from *P. crispum*. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3065–3075.
- [19] Ritter H. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell Online*, 2004, 16: 3426–3436.
- [20] Okada T, Mikage M, Sekita S. Molecular characterization of the phenylalanine ammonia-lyase from *Ephedra sinica*. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31: 2194–2199.
- [21] Hsieh L S, Hsieh Y L, Yeh C S, Cheng C Y, Yang C C, Lee P D. Molecular characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*BoPALI*) from *Bambusa oldhamii*. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 283–290.
- [22] Hu G S, Jia J M, Hur Y J, Chung Y S, Lee J H, Yun D J, Chung W S, Yi G H, Kim T H, Kim D H. Molecular characterization of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Cistanche deserticola*. *Mol Biol Rep*, 2011, 38: 3741–3750.
- [23] Zhu L, Cui W, Fang Y, Liu Y, Gao X, Zhou Z. Cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol Lett*, 2013, 35: 751–756.
- [24] Ma W L, Wu M, Wu Y, Ren Z, Zhong Y. Cloning and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Rhus chinensis*. *Plant Cell Rep*, 2013, 32: 1179–1190.
- [25] 周修任. 优质中草药——半夏的人工栽培技术与市场前景. *科学种养*, 2020, (8): 56–59.
- Zhou X R. High-quality Chinese herbal medicine—*Pinellia ternate*'s artificial cultivation technology and market prospects. *Sci Plant Breed*, 2020, (8): 56–59 (in Chinese).
- [26] 杜欣谊. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展. *现代化农业*, 2016, (7): 24–26.
- Du X Y. Research progress of phenylalanine ammonia lyase. *Modern Agric*, 2016, (7): 24–26 (in Chinese).
- [27] Chen M J, Vijaykumar V, Lu B W, Xia B, Li N. *Cis*- and *trans*-cinnamic acids have different effects on the catalytic properties of *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyases PAL1, PAL2 and PAL4. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47: 67–75.
- [28] 欧阳光察, 应初衍, 沃绍根, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究: VI. 水稻、小麦 PAL 的纯化及基本特性. *植物生理学报*, 1985, 11: 204–214.
- Ou-Yang G C, Ying C Y, Wo S G, Xue Y L. Studies on plant phenylalanine ammonia-lyase (PAL): VI. Purification and some properties of PAL from etiolated seedlings of rice (*Oryza sativa*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Mol Biol Plants*, 1985, 11: 204–214 (in Chinese with English abstract).
- [29] 卢涛, 赵德立, 夏凯, 杨亚力, 杨顺楷, 刘成君. 红酵母苯丙氨酸解氨酶的分离纯化及性质研究. *四川大学学报(自然科学版)*, 2004, 41: 865–868.
- Lu T, Zhao D L, Xia K, Yang Y L, Yang S K, Liu C J. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula* sp. A1401. *J Sichuan Univ (Nat Sci Edn)*, 2004, 41: 865–868 (in Chinese with English abstract).
- [30] 田晓明. 油茶 PAL 基因的全长克隆及其在原核和真核生物中的表达. 中南林业科技大学硕士学位论文, 湖南长沙, 2010.
- Tian X M. Phenylalanine Ammonia-lyase Gene from *Camellia oleifera* Full-length Gene and Expression in Prokaryotic and Eukaryotic. MS Thesis of Central South University of Forestry & Technology, Changsha, Hunan, China, 2010 (in Chinese with English abstract).
- [31] Hu Y S, Zhang L, Di P, Chen W S. Cloning and induction of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Salvia miltiorrhiza* and its effect on hydrophilic phenolic acids levels. *Chin J Nat Med*, 2009, 7: 449–457.
- [32] 刘俊频, 李胜立, 袁元, 郑玲辉, 全雪丽, 吴松权. 膜荚黄芪 3 个苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析. *中草药*, 2019, 50: 1669–1675.
- Liu J P, Li S L, Yuan Y, Zheng L H, Quan X L, Wu S Q. Cloning and expression of three *PAL* genes in *Astragalus membranaceus*. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2019, 50: 1669–1675 (in Chinese with English abstract).
- [33] Lee B K, Park M R, Srinivas B, Chun J C, Kwon I S, Chung M, Yoo N H. Induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression by paraquat and stress-related hormones in *Rehmannia glutinosa*. *Mol Cell*, 2003, 16: 34–39.
- [34] Zhu Q, Dabi T, Beeche A, Yamamoto R, Lawton M A, Lamb C. Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 535–550.