

宁夏枸杞苯丙氨酸解氨酶基因的cDNA克隆及其表达分析

邹彩云^{1,2}, 刘永亮³, 曾少华², 黎云祥^{1*}, 王瑛^{2*}

(1. 西华师范大学, 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室, 四川 南充 637002; 2. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与利用重点实验室, 广州 510650; 3. 中国科学院武汉植物园, 中国科学院植物种质创新与特色农业重点实验室, 武汉 430074)

摘要: 为探讨宁夏枸杞(*Lycium barbarum*)苯丙氨酸解氨酶基因(*LbPAL*)的表达特征, 采用PCR法克隆了宁夏枸杞 *LbPAL* 基因的cDNA, 并用实时定量PCR法分析了其表达特征。结果表明: 宁夏枸杞的 *LbPAL* 基因的全长cDNA为2321 bp, 包含2163 bp/编码720个氨基酸的开放阅读框; *LbPAL* 与茄科其他物种的PAL氨基酸序列及三维结构具有较高保守性; 与茄科物种的PAL聚类在同一个分支中。*LbPAL* 在叶、花瓣、S1期果实的表达量较高, 而在根及S2~S5期果实的表达水平较低。在NaCl胁迫处理下, *LbPAL* 在根和茎中的表达量均有下调的趋势; 而在叶片中, *LbPAL* 表达量先急剧增加而后急剧下降并趋于稳定。这为解析宁夏枸杞中类黄酮化合物的生物合成调节及生理功能提供了参考。

关键词: 宁夏枸杞; 苯丙氨酸解氨酶基因; 基因表达; 盐胁迫

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.02.008

Cloning and Expression Analysis of Phenylalanine Ammonia-lyase Gene from *Lycium barbarum* L.

ZOU Cai-yun^{1,2}, LIU Yong-liang³, ZENG Shao-hua², LI Yun-xiang^{1*}, WANG Ying^{2*}

(1. Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resource Conservation, Ministry of Education, China West Normal University, Nanchong 637002, China; 2. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 3. Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Speciality Agriculture, Wuhan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China)

Abstract: In order to understand the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Lycium barbarum* L., named as *LbPAL*, the cDNA of *LbPAL* was cloned using PCR and its expression was characterized. The results showed that the whole length of *LbPAL* cDNA was 2321 bp containing an open reading frame (ORF) of 2163 bp, encoding 720 amino acids. Amino acid sequence analysis indicated that *LbPAL* had high identity of sequence and similarly tertiary structure to PALs in other Solanaceae plants. Phylogenetic analysis demonstrated that *LbPAL* was clustered in the same clade with PALs in other Solanaceae plants. Real-time PCR analysis showed that *LbPAL* was highly expressed in leaves, petals and fruits at S1 stage, while few *LbPAL* transcripts were detected in roots and fruits at stages from S2 to S5. Under salt stress, *LbPAL* expression was downregulated in roots and stems, while sharply enhanced at 0.5 h and decreased hereafter in leaves. These results lay a foundation for elucidating the biosynthesis and physiological regulation of flavonoid in *L. barbarum*.

Key words: *Lycium barbarum*; Phenylalanine ammonia-lyase gene; Gene expression; Salt stress

收稿日期: 2013-05-21

接受日期: 2013-07-14

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31100223); 中国科学院装备研制项目(YZ201227)资助

作者简介: 邹彩云(1985~), 女, 硕士, 主要从事枸杞次生代谢研究。E-mail: zoucaiyun-19851010@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors. E-mails: yingwang@wbcas.cn, yx_li@263.net

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)为茄科(Solanaceae)枸杞属落叶灌木,是我国传统的药食两用植物。据《本草纲目》记载,枸杞全身是宝,“春采枸杞叶,名天精草;夏采花,名长生草;秋采子,名枸杞子;冬采根,名地骨皮”。枸杞子为宁夏枸杞的干燥成熟果实。《本草纲目》记载其具有调节“阴”、“阳”以达到补肝益肾明目之功效。我国传统中医常用枸杞子治疗肝肾阴亏、腰膝酸软、头晕、健忘、目眩、耳鸣、遗精等病症。近年药理学研究表明,枸杞子的活性成分具有调节神经免疫系统、抵抗脑缺血损伤、抑制过氧化反应、降低单胺类化学合成以及神经保护等作用^[1-3]。枸杞的功能活性成分主要包括类黄酮、类胡萝卜素和枸杞多糖^[4]。

植物类黄酮合成途径是类苯丙烷代谢途径的一个分支,作为合成类黄酮前体物质的肉桂酸,也是合成其他苯丙烷类化合物如木质素、花青素等的前体^[5](图 1)。苯丙氨酸解氨酶(PAL)是类苯丙烷代谢途径的第一个关键酶和限速酶,因此也是类黄酮合成的关键酶之一;它催化苯丙氨酸生成反式肉桂酸,并生成香豆酸、阿魏酸和芥子酸等中间产物,这些酸进一步合成香豆素和绿原酸;或进一步合成类黄酮,木质素和花色素等次生代谢产物^[5]。这些次生代谢物的合成积累为药用植物宁夏枸杞发挥药效作用奠定了重要的物质基础^[6]。近年来,鉴于宁夏枸杞叶片中富含黄酮类化合物等抗氧化物质,以枸杞为原料的相关营养保健产品,如枸杞叶茶等颇具商业价值。然而,目前有关宁夏枸杞类苯丙烷代谢途径的分子生物学研究极少。自 1961 年 Koukol 和 Conn 首次在大麦(*Hordeum vulgare*)中发现 PAL 以来,在所有的绿色植物、真菌、细菌和藻类中均发现了 PAL^[7]。据研究, PAL 的普遍特点是由低拷贝多基因家族组成,如杨树(*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*)至少有 2 个编码基因^[8],菜豆(*Phaseolus vulgaris*)有 3 个^[9]。研究表明 PAL 是植物应激反应的关键酶。当植物组织或器官受到刺激,如组织受创、紫外照射、病原体袭击、低温、低氮或低磷酸盐等胁迫^[10]时,植物会在相应组织或器官中产生应激反应转录 PAL^[11-12]。此外,研究还表明在紫外照射、抵抗病原体和昆虫袭击时 PAL 在不同的组织中的应激反应不同,这说明植物合成类黄酮能够使其更好地适应环境胁迫^[13-14]。鉴于 PAL 基因功能的重要性,分离、克隆药食两用宁夏枸杞 *LbPAL* 基因并深入研究其功能;为揭示其果实、叶

片中黄酮类功能活性物质积累奠定分子基础而具有重要的科学理论意义和实际应用价值。

目前,关于宁夏枸杞类黄酮合成的分子生物学研究鲜见报道^[6]。本研究从宁夏枸杞叶片 EST 文库中搜索到 1 条 PAL 序列,设计引物扩增得到包含完整 ORF 的基因序列,该基因编码的氨基酸序列与其他物种 PAL 的具有较高同源性。为进一步了解宁夏枸杞中 PAL 的表达分布及对胁迫的响应,通过 qRT-PCR 技术检测了 *LbPAL* 在宁夏枸杞不同组织以及 NaCl 胁迫处理时的表达情况,为进一步鉴定宁夏枸杞中该基因的生物学功能奠定基础。

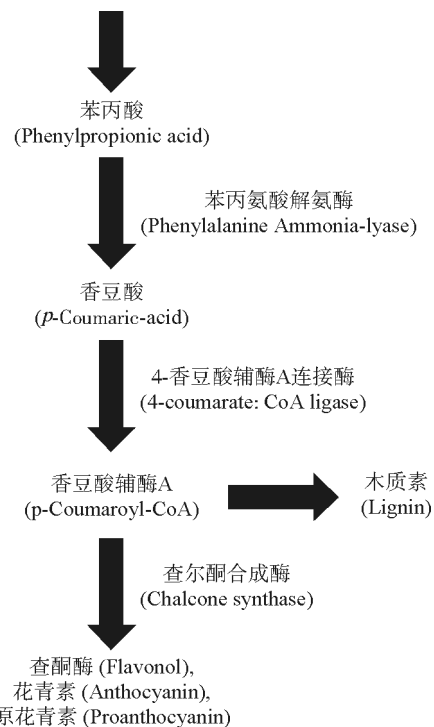


图 1 植物类黄酮生物合成途径

Fig. 1 Flavonoid biosynthetic pathway in plants

1 材料和方法

1.1 材料

材料宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)采自宁夏中宁县。采集宁夏枸杞的叶、花瓣、根及 5 个发育时期果实后立即用液氮速冻, -80℃ 冰箱中保存用于组织表达模式分析。S1 期果实青色、S2 期果实处于转色期、S3 期果实为淡红色、S4 期果实为淡红色且果实开始膨大、S5 期果实深红色且果实完全膨大成熟(图 2)。用于胁迫实验的宁夏枸杞幼苗生长的土壤成分为土壤:蛭石 = 1:1, 温度控制在

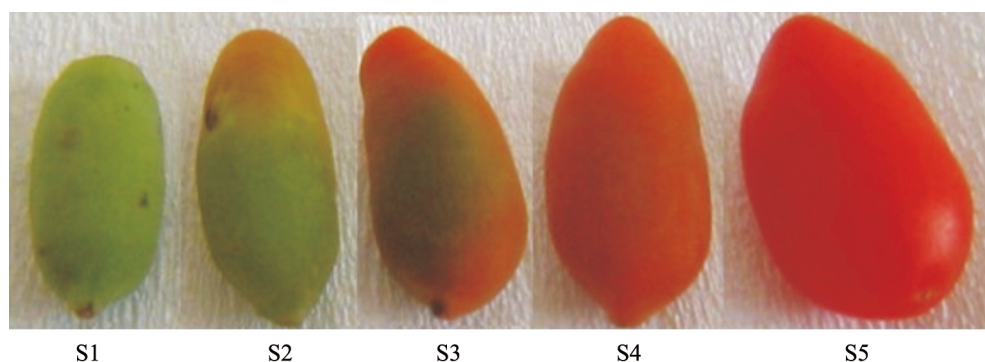


图2 宁夏枸杞果实的5个发育阶段(S1~S5)

Fig. 2 *Lycium barbarum* fruits at five development stages from S1 to S5

22℃~25℃,光暗周期为16 h/8 h。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态为实验室保存。LA *Taq* DNA聚合酶、PrimeScript RT Reagent Kit With gDNA Eraser、SYBR Premix Ex *Taq*TM II、克隆载体 pMD19-T 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 总RNA提取及cDNA第一链合成

采用英韦创津公司 Trizol 法提取宁夏枸杞总RNA;采用紫外分光光度计(NanoDrop, Thermor)检测RNA的纯度,并取少量RNA用1%琼脂糖凝胶电泳分析其完整性。RNA在-80℃下保存备用。参照英韦创津公司 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书,取5 μ L总RNA为模板合成cDNA第一链。

1.3 全长基因克隆

从本实验室测定的枸杞EST文库中搜索到宁夏枸杞PAL序列,根据该序列用Premier 5.0分别在5'-UTR和3'-UTR设计全长引物LbPAL-F: 5'-CCAAATTCTCCTCACTAAACTCTC-3'和LbPAL-R: 5'-CTAACAGATTGGAAGAGGAGCAC-3'。以宁夏枸杞总RNA反转录cDNA为模板,用全长引物进行PCR扩增。PCR扩增反应液包含10 $\times$ LA PCR Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μ L, dNTP 4 μ L, 全长引物各1 μ L, cDNA 2.5 μ L, LA *Taq* 0.25 μ L, 用双蒸水补足到25 μ L,并混匀。反应程序为95℃ 5 min;然后94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min,共35个循环;最后72℃延伸7 min。

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的片段。在4℃下,将回收产物与pMD19-T载体

连接过夜。最后,将连接产物转化大肠杆菌DH5 α 菌株,选取PCR检测为阳性的克隆进行测序验证。

1.4 生物信息学分析

在NCBI网站上的ORF Finder中查找ORF,并用Premier 5.0进行核苷酸翻译;利用Clustal X V1.83软件对来自不同植物的PAL蛋白序列进行完全比对,采用MEGA 4.0软件NJ法进行分子进化树分析,相关参数为:Gap/Complete Deletion, Model/Amino: Poisson correction, 自展值为2000。蛋白三维结构建模分析:采用SWISS-MODEL软件(<http://swissmodel.expasy.org/>)基于蛋白1w27B模板进行自动建模分析。采用PyMOL软件展示宁夏枸杞、番茄(*Lycopersicum esculentum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) PAL蛋白三维结构。采用Compute pI/Mw在线软件进行蛋白质分子量与等电点预测。

1.5 表达模式分析

提取总RNA,并采用PrimeScript RT Reagent Kit With gDNA Eraser试剂盒反转录RNA样品。以反转录cDNA为模板,SYBR Premix Ex *Taq*TM II为实时定量PCR反应缓冲液,在ABI 7500 Real-Time PCR system上进行PCR扩增。实时定量PCR反应体系参见SYBR Premix Ex *Taq*TM II试剂盒说明书。此外以LbPAL-RT-F和LbPAL-RT-R为上下游引物;选取看家基因Actin为内参,研究LbPAL在不同组织中的表达。为确保引物设计的基因特异性,LbPAL基因实时定量PCR正反向引物横跨ORF和3'-UTR区域,分别为LbPAL-RT-F: 5'-CCCCTATCGGTGTCTCCA-3'和LbPAL-RT-R:

5'-ACCCGTTGTTGTAATAGTCGTT-3'。内参基因正反向引物分别为 Actin-RT-F:5'-CAATCGGGTA-TTTCAAGGTCAAG-3' 和 Actin-RT-R:5'-GAGCA-GTGTTTCCCAGCATTG-3'。实时定量 PCR 反应程序为:95℃预变性 30 s;然后 95℃变性 5 s, 60℃退火延伸 34 s,共 40 个循环;最后在 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s 下构建溶解曲线。

1.6 盐胁迫处理

宁夏枸杞种子萌发 47 d 后,用 500 mmol L⁻¹、pH 7.0 的氯化钠溶液浇灌幼苗,进行胁迫处理。在处理 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h 和 12 h 后,分别采集根、茎和叶。以不同时间点采集的宁夏枸杞幼苗的 cDNA 为模板,进行实时定量 PCR,分析 *LbPAL* 的表达随着胁迫时间的变化情况。每个样品均采集 3 个生物学重复进行试验, *LbPAL* 基因表达水平以 3 次重复的平均值表示。

2 结果和分析

2.1 宁夏枸杞PAL全长特征

从 EST 文库中获得的序列与桑格测序结果一

致。ORF finder 软件预测和 BLAST 分析表明,该序列编码全长 *PAL*,命名为 *LbPAL*。 *LbPAL* 包含 1 个长度为 2163 bp 的开放阅读框,编码 720 个氨基酸(图 3)。

2.2 宁夏枸杞PAL的生物信息学特征

Compute pI/Mw 预测 *LbPAL* 单聚体蛋白的相对分子量为 78.2 kDa,等电点为 6.21。以往研究表明, *PAL* 是由 4 个亚基组成的四聚体酸性酶蛋白,其分子量为 220 ~ 330 kDa^[15],如马铃薯(*Solanum tuberosum*) *PAL* 的分子量为 330 kDa、玉米(*Zea mays*)的 306 kDa、水稻(*Oryza sativa*)的 280 kDa^[16]。在物理特性,如分子量大小和酸性蛋白等方面,本研究获得的 *LbPAL* 蛋白与其他物种 *PAL* 具有相似性。

LbPAL 与其他茄科植物 *PAL* 氨基酸序列的一致性超过 90%,与亲缘关系较远物种的 *PAL* 氨基酸序列也具有较高的一致性(表 1)。 *LbPAL* 与烟草和拟南芥 *PAL* 蛋白在 MIO 残基、活性位点、底物选择性位点和 *PAL* 蛋白活性磷酸化位点等具有高度保守性(图 4)。

利用 MEGA 软件将 *LbPAL* 推导的氨基酸序

表 1 *LbPAL* 蛋白与其他物种的 NCBI 比对注释分析

Table 1 Annotation analysis of *LbPAL* based on sequence alignment with *PAL* proteins in other plants

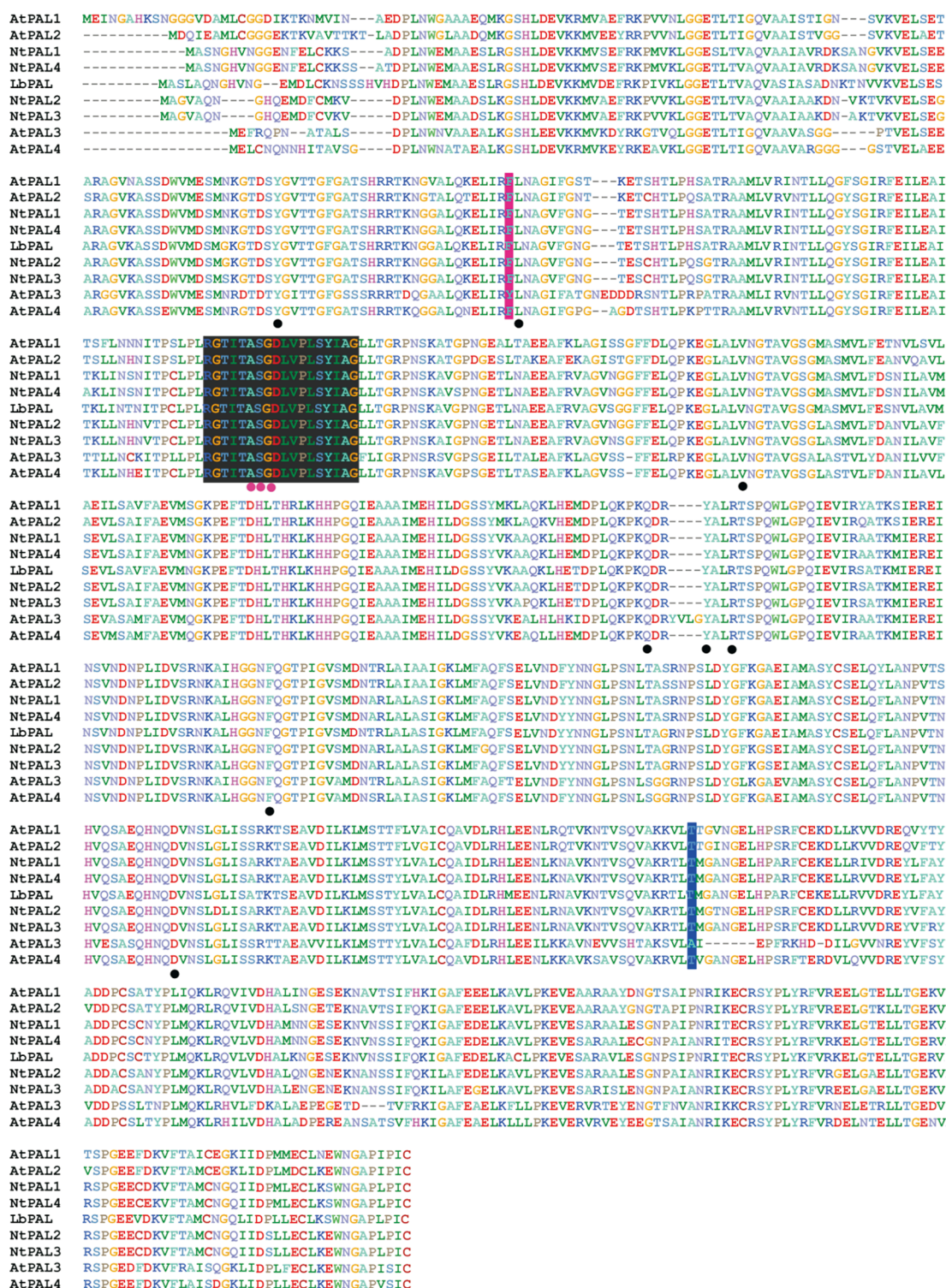
基因 Gene	NCBI 登录号 NCBI Accession No.	物种 Species	匹配覆盖率 Query coverage (%)	E	同源性 Identity (%)	注释 Annotation
<i>SlPAL</i>	XP_004246649	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	99	0	94	类似苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase-like
<i>CaPAL</i>	ACF17667	甜椒 <i>Capsicum annuum</i>	99	0	94	推测的苯丙氨酸解氨酶 Putative phenylalanine ammonia-lyase
<i>NaPAL2</i>	ABG75911	野生烟草 <i>Nicotiana attenuata</i>	99	0	93	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>NtPAL</i>	ACJ66297	烟草 <i>N. tabacum</i>	99	0	93	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>NaPAL1</i>	ABG75910	野生烟草 <i>N. attenuate</i>	100	0	90	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>InPAL</i>	AF325496	番薯 <i>Ipomoea nil</i>	99	0	88	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>CrPAL</i>	BAA95629	长春花 <i>Catharanthus roseus</i>	99	0	86	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>EpPAL</i>	ACS71953	一品红 <i>Euphorbia pulcherrima</i>	100	0	84	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>RcPAL</i>	XP_002519521	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	100	0	85	推测的苯丙氨酸解氨酶 Putative phenylalanine ammonia-lyase
<i>PtPAL</i>	AFZ78651	毛白杨 <i>Populus tomentosa</i>	98	0	85	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase


```
TTCGAACGGCCGGTGATTGCGAGCTCGGTACCCGG
GGATCCTCTAGAGATTCCAAATTCTCTCTACTAAAACCTCTCCATTATACAACCTTTCTAGCCATTTCTTGATCCA
1 M A S L A Q N G H V N G E M D L C K N S S S H V H
1 ATGGCATCACTTGCACAAATGGACATGTTAATGGAGAAATGGACTTGTGCAAGAATTCATCAAGTCATGTACAT
26 D P L N W E M A A E S L R G S H L D E V K K M V D
76 GATCCATTGAATTGGGAAATGGCTGCTGAATCTTTAAGAGGGAGTCATTTGGATGAAGTGAAAAAATGGTGGAT
51 E F R K P I V K L G G E T L T V A Q V A S I A S A
151 GAATTTAGGAAGCCAATTGTGAACTTGGAGGTGAAACTTTGACAGTGGCACAAGTTGCATCCATTGCAAGTGT
76 D N K T N V V K V E L S E S A R A G V K A S S D W
226 GATAATAAACTAATGTGGTCAAAGTGGAACTTTCTGAAAGTGCAAGGGCTGGTGTGAAAGCTAGTAGTGATTGG
101 V M D S M G K G T D S Y G V T T G F G A T S H R R
301 GTTATGGATAGTATGGGTAAAGAACAGATAGTTATGGTGTACCAGTGGTTTTGGTGCAACATCTCATAGAAGA
126 T K N G G A L Q K E L I R F L N A G V F G N G T E
376 ACCAAGAATGGTGGTGTCTTCAAAAAGAACTTATTAGGTTCTTGAATGCTGGAGTTTTTGGCAATGGAACAGAA
151 T S H T L P H S A T R A A M L V R I N T L L Q G Y
451 ACTTCACACACATTGCCACATTGACCAACAAGGGCAGCAATGCTTGAAGGATCAACACTCTCCTTCAAGGCTAC
176 S G I R F E I L E A I T K L I N T N I T P C L P L
526 TCTGGCATTAGATTGAAATCTTGAAGCAATCACCAACTTATCAACACCAACATCACCCCGTGTGGCCCTC
201 R G T I T A S G D L V P L S Y I A G L L T G R P N
601 CGTGGCAGCATCACTGCCTCGGGTGATCTTGTCCCTTTGTCTACATTGCTGGTTTGTCTCACTGGCAGGCTAAT
226 S K A V G P N G E T L N A E E A F R V A G V S G G
676 TCCAAGGCTGTGGGACCAATGGTGAACCCCTTAACGCTGAGGAAGCGTCCGAGTGTGCTGGTGTAGTGGTGA
251 F F E L Q P K E G L A L V N G T A V G S G M A S M
751 TTTTTCGAGTGCAGCCTAAAGAAGGACTTGCAGTGGTGAATGGTACAGCAGTAGGTTCTGGTATGGCATCAATG
276 V L F E S N V L A V M S E V L S A V F A E V M N G
826 GTCCTGTTTGAGTCGAACGTTCTTGTCTGTATGTCTGAAGTTTATCAGCGGTTTTCGCTGAAGTGATGAACGGA
301 K P E F T D H L T H K L K H H P G Q I E A A I M
901 AAGCCCGAATCACTGACCATTGACACACAAGTTGAAGCATCACCCCTGGTCAAATGAGGCTGCTGCTATTATG
326 E H I L D G S S Y V K A A Q K L H E T D P L Q K P
976 GAACACATTTTAGATGAAGCTCTTATGTTAAGCAGCTCAGAAGCTACATGAAACGGACCCCTTACAAAAACCA
351 K Q D R Y A L R T S P Q W L G P Q I E V I R S A T
1051 AAGCAAGATCGTTATGCTCTCCGAACATCTCCACAATGGCTTGGCCCTCAAATGAGTCATTGCTCTGCAACT
376 K M I E R E I N S V N D N P L I D V S R N K A L H
1126 AAGATGATCGAGAGGGAGATTAACTCAGTGAACGACAACCCATTGATCGACGTTTCAAGAAACAAGGCCTTACAT
401 G G N F Q G T P I G V S M D N T R L A L A S I G K
1201 GGTGGCAACTTCCAAGGCACCCTATTGGTGTCTCCATGGATAACACAAGATTGGCTCTTGCATCAATTGGGAAA
426 L M F A Q F S E L V N D Y Y N N G L P S N L T A G
1276 TTGATGTTTCGCTCAATTCTCAGAAGTGTCAACGACTATTACAACAACGGGTGGCCATCGAATCTCACAGCAGGA
451 R N P S L D Y G F K G A E I A M A S Y C S E L Q F
1351 AGGAATCCAAGCTTGAGCTATGGTTTCAAGGGTGCTGAAATCGCTATGGCTTCTTACTGTTTCGGAATCTCAATTC
476 L A N P V T N H V Q S A E Q H N Q D V N S L G L I
1426 TTGGCAATCCAGTGACTAACCATGTCCAAAGTGTGAGCAACACAACCAAGATGTGAATCCTTGGGCTTAATC
501 S A T K T S E A V D I L K L M S S T Y L V A L C Q
1501 TCAGCTACGAAAACATCCGAGGCTGTGATATCTTGAAGCTAATGTATCAACCTATCTAGTGGCGCTTTGTCAA
526 A I D L R H M E E N L R N A V K N T V S Q V A K R
1576 GCGATAGACTTGAGGCATATGGAGGAAAACCTTGAGGAATGCTGTTAAAAACACAGTTAGCCAAGTAGCTAAAAGG
551 T L T M G A N G E L H P A R F C E K E L L R V V D
1651 ACTTTAACAATGGGTGCCAATGGTGAACCTTATCCAGCAAGATCTGCGAAAAGGAATGCTACGAGTTGTGGAT
576 R E Y L F A Y A D P C S C T Y P L M Q K L R Q V
1726 AGGGAGTACTTGTGCTTATGCTGATGATCCTTGCAAGTGCAGTTACCCCTTGTATGCAGAAGCTGAGACAAGTA
601 L V D H A L K N G E S E K N V N S S I F Q K I G A
1801 CTTGTTGATCATGCATTGAAGAATGGTGAAGTGAAGAATGTGAACAGCTCAATCTTCCAAAAGATTGGTGTCT
626 F E D E L K A C L P K E V E S A R A V L E S G N P
1876 TTCGAGGACGAATTGAAGGCTTGTGCTTAAAGAGTTGAGAGTGCAAGAGCTGTTCTTGAAGTGGCAACCCCT
651 S I P N R I T E C R S Y P L Y K F V R K E L G T E
1951 TCAATTCCTAACAGGATCACAGAATGCAGATCATATCCATTGTACAAGTTTGTGAGGAAAGAACTTGAACAGAA
676 L L T G E R V R S P G E E V D K V F T A M C N G Q
2026 TTGTTGACAGGAGAAAGAGTTTCGATCGCCCGGCGAGGAGTTGACAAGGTGTTACAGCAATGTGAATGGACAG
701 L I D P L L E C L K S W N G A P L P I C *
2101 CTCATTGATCCATTGTTAGAGTGTCTCAAGAGCTGGAATGGTGTCTCTCTTCCAATCTGTTAGAATCGTCGACCT
GCAGGCATGCAAGCTGGCGAATCATCTGCTCTATAA
```

图3 *LbPAL* 核苷酸序列及其推导的蛋白序列Fig. 3 Nucleotide sequence of *LbPAL* and deduced amino acid sequence

列与其他 14 种植物的 PAL 进行 NJ 聚类分析(图 5)。聚类结果表明, *LbPAL* 与同是茄科植物的烟草、辣椒(*Capsicum annuum*)和马铃薯 PAL 的亲缘关系最近。此外, 聚类分析结果也表明, 单子叶植物和双子植物的 PAL 分别处于两个独立进化的分支中。

用 SWISS-MODEL 软件对 *LbPAL* 蛋白的三级结构进行自动建模预测。结果显示, *LbPAL* 与拟南芥、番茄、马铃薯 PAL 蛋白的三维结构以及重要活性位点残基高度保守(图 6)。该结果表明, *LbPAL* 与拟南芥、番茄和马铃薯等模式植物 PAL 蛋白在生化功能方面可能具有保守性。



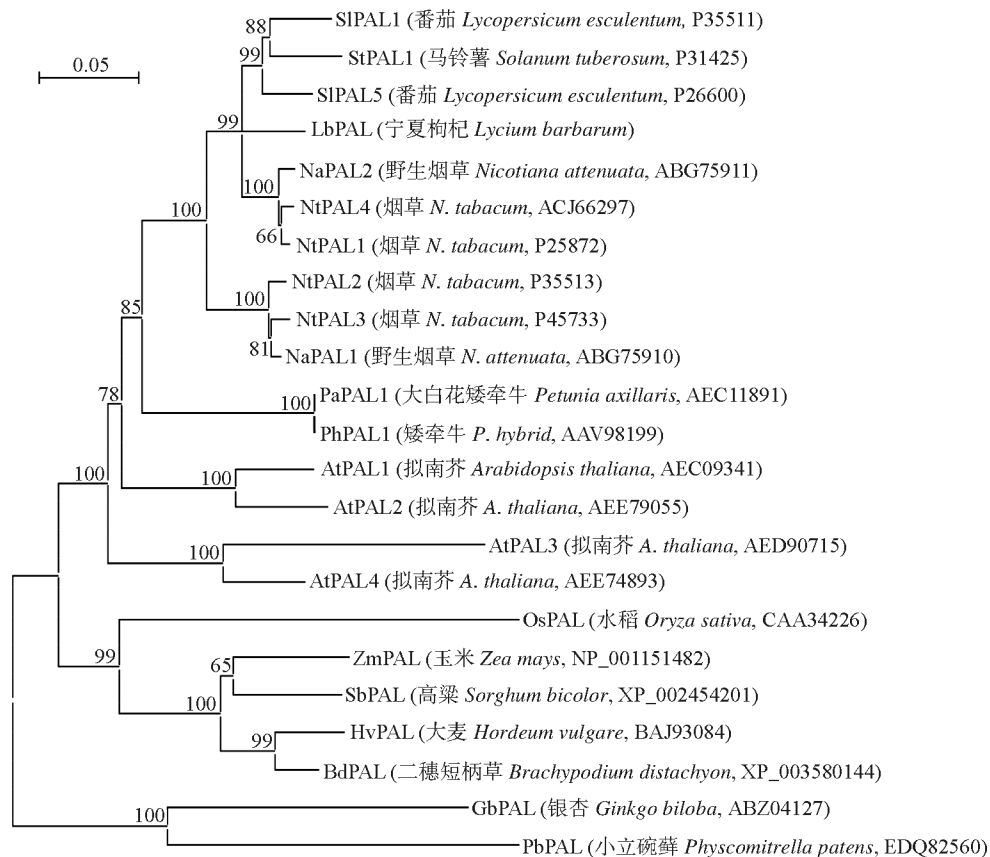


图 5 宁夏枸杞和其他植物 PAL 的分子进化树

Fig. 5 Molecular phylogenetic tree of LbPAL and PAL from other plants

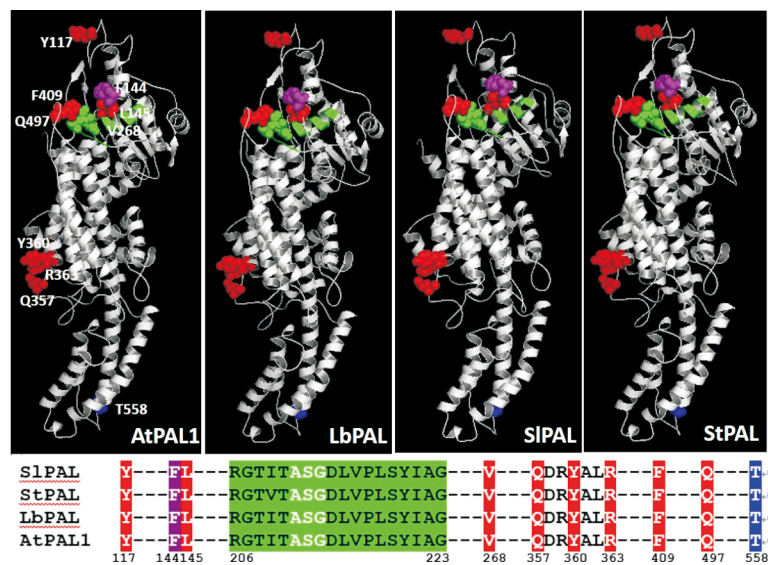


图 6 宁夏枸杞及其他物种 PAL 蛋白的三维结构分析。红色球体：活性残基；紫色球体：底物选择性位点；蓝色球体：活性磷酸化位点；绿色球体：MIO 残基；绿色 α 螺旋：保守的活性位点共有区域。氨基酸位点以 AtPAL1 蛋白序列计数进行标注。AtPAL：拟南芥 AEC09341；SIPAL：番茄 P35511；StPAL：马铃薯 P31425。

Fig. 6 Tertiary structure of PAL proteins of *Lycium barbarum* and other plants. Red, purple, blue, and green sphere indicated active residues, residue determinant to substrate selectivity, residue for phosphorylation, and MIO residues, respectively. Green α helix indicate the consensus sequences for the conserved active site. Amino acids are numbered according to AtPAL1 sequence. AtPAL: *Arabidopsis thaliana*, AEC09341; SIPAL: *Lycopersicum esculentum*, P35511; StPAL: *Solanum tuberosum*, P31425.

2.3 表达分析

用实时定量 PCR 技术对 *LbPAL* 在宁夏枸杞果实的 5 个发育时期以及叶、花瓣、根中的表达进行分析(图 7)。表达谱分析结果表明, *LbPAL* 基因在宁夏枸杞的不同组织中都有表达,但表达量有差

异。*LbPAL* 在叶中表达量最高,其次是花瓣和 S1 期果实,而在根和果实的其他时期表达量极低。

2.4 对盐胁迫处理的响应

为探知宁夏枸杞的耐盐胁迫反应,了解宁夏

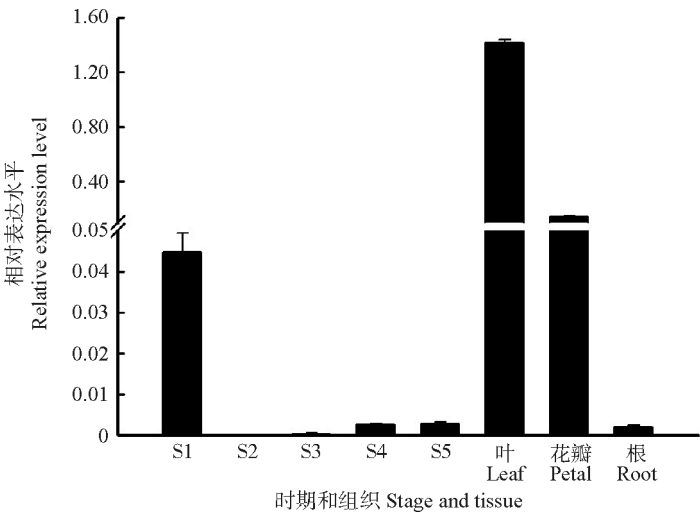


图 7 *LbPAL* 组织特异性表达模式
Fig. 7 Gene expression patterns of *LbPAL* in different tissues and fruit developmental stages

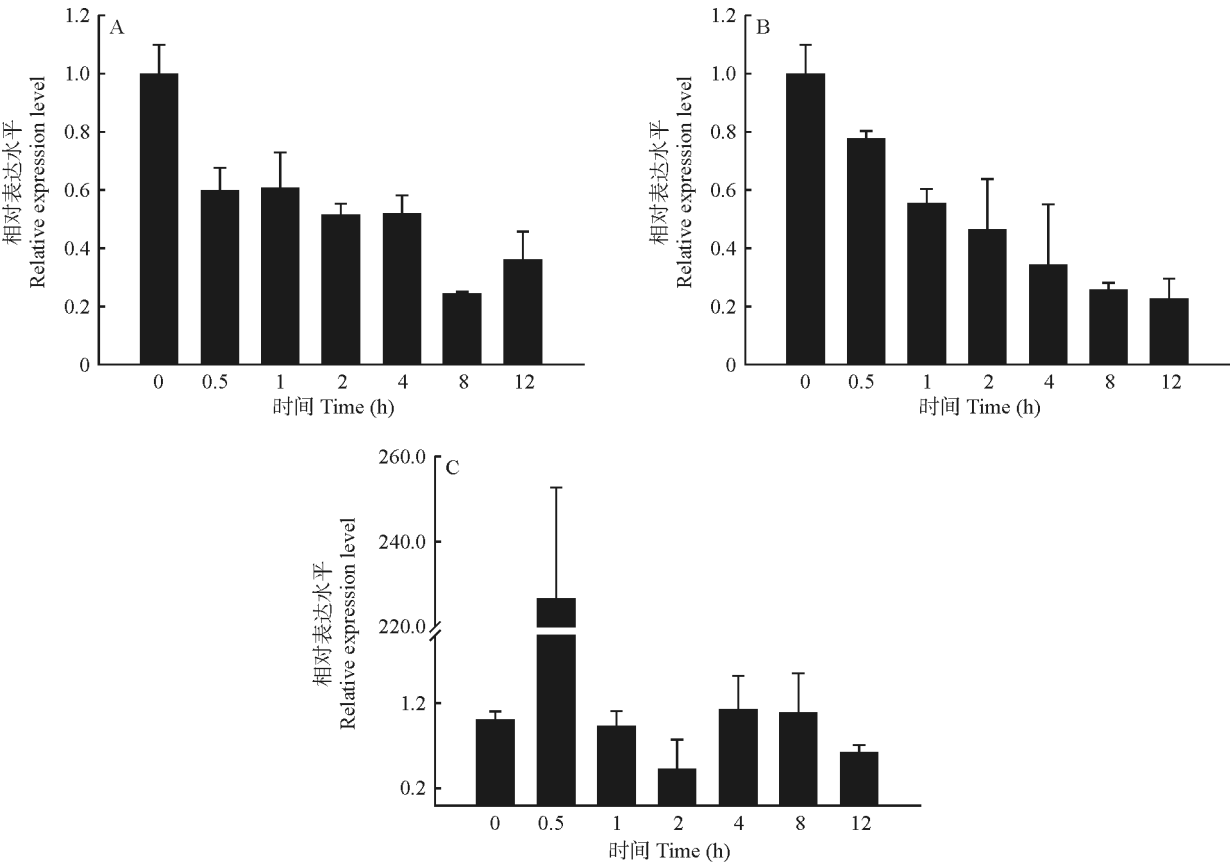


图 8 盐胁迫下 *LbPAL* 在根(A)、茎(B)和叶(C)中的表达
Fig. 8 Expression of *LbPAL* in root (A), stem (B), and leaf (C) under salt stress

枸杞在西北盐碱地区的耐盐胁迫性能,本研究将宁夏枸杞幼苗用 500 mmol L^{-1} 氯化钠溶液进行胁迫处理,在处理 0 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h 和 12 h 分别采集根、茎和叶片,采用实时定量 PCR 检测 *LbPAL* 的表达水平(图 8)。根中 *LbPAL* 在胁迫处理 4 h 内表达较稳定,但比未处理的表达量低;随着时间的推移,在盐胁迫处理 8 h 的表达量减半,而在 12 h 的表达量有较大的回升,但仍低于处理 4 h 的(图 8: A)。*LbPAL* 在茎中的表达与根中不同的是,处理 12 h 内 *LbPAL* 的表达量呈现逐渐降低趋势(图 8: B)。在叶片中, *LbPAL* 基因在受盐胁迫刺激 0.5 h 时表达急剧上调,此后急剧下降回到对照水平(图 8: C)。

3 讨论

本研究中克隆得到的 *LbPAL* 与茄科其他物种的 *PAL* 具有很高的保守性(图 4~6,表 1)。基因表达分析表明, *LbPAL* 在宁夏枸杞的不同组织中都有不同程度的表达。在果实的 5 个发育时期中, *LbPAL* 在 S1 期青果的表达量相对较高,而在其他几个时期的表达量极低,且在这几个时期的表达量没有明显的变化。*LbPAL* 在叶和花瓣中的表达量最高。前人的研究表明,在拟南芥和白杨(*Populus tremuloides*)中均含有低拷贝的 *PAL* 基因,且通过不同拷贝的组织特异性表达,使得在不同的组织中特异性地合成积累类黄酮或木质素^[17-18]。譬如,白杨 *PtPAL1* 基因主要在未木质化、积累原花青素的叶和根细胞中表达;而 *PtPAL2* 在木质化程度很高的茎中的表达很高^[18]。此外,在菜豆中的 3 个 *PAL* 基因(*PAL1*, *PAL2* 和 *PAL3*)都能在根部大量表达,但在花瓣中, *PAL2* 大量表达, *PAL1* 表达量很少, *PAL3* 不表达^[19-20]。鉴于此,宁夏枸杞也可能存在多个 *PAL* 基因拷贝,且各拷贝具有组织特异性表达特性,参与不同组织的不同次生代谢产物如花青素、原花青素和木质素等的合成。根据基因组织表达模式,推测本研究克隆到的 *LbPAL* 拷贝可能主要参与绿色组织中黄酮类化合物的合成。

以往的研究从植物生理角度阐明了宁夏枸杞具有很强的耐盐碱能力^[21-23],然而利用分子手段探讨宁夏枸杞耐盐碱胁迫的相关研究未见报道。植物遭遇生物胁迫和非生物胁迫时,植物的防御系统会被激活, *PAL* 活性迅速上升,因此 *PAL* 被作

为植物抗逆指标之一^[24]。王龙强等采用 50、150、300 和 450 mmol L^{-1} 氯化钠溶液对宁夏枸杞幼苗进行胁迫处理,研究结果表明,宁夏枸杞各器官中的 Na^{+} 和 Cl^{-} 相对含量均显著高于对照,且随着盐浓度的增加,其含量也逐渐增加^[22]。为此,本研究采用 500 mmol L^{-1} 氯化钠胁迫处理,探讨了宁夏枸杞耐高盐胁迫机制。在本研究中, *LbPAL* 的表达量呈现下降趋势,且表达量在后期有所波动。与 *LbPAL* 在根中表达模式略微不同的是, *LbPAL* 在茎中的表达量呈现逐渐降低的趋势。这些结果表明, 500 mmol L^{-1} 氯化钠胁迫处理对根和茎中 *LbPAL* 的表达有抑制作用,但随着时间的延长,抑制作用会逐渐降低。关于叶片 *LbPAL* 基因表达,盐胁迫信号由根传递至叶片并诱导 *LbPAL* 的表达先急剧上调而后快速下调、回升并趋于稳定。由此可见,宁夏枸杞幼苗对高浓度盐胁迫的时空响应或适应性具有差异。有研究表明,在 0~200 mmol L^{-1} 氯化钠的胁迫范围内,茄子(*Solanum melongena*)叶片的 *PAL* 活性会随盐浓度的增加而增强;而盐浓度在 200 mmol L^{-1} 以上时, *PAL* 的活性下降^[25]。在本研究中, 500 mmol L^{-1} 氯化钠盐胁迫抑制根和茎中 *LbPAL* 基因表达,从而可能间接降低 *LbPAL* 蛋白量及其酶活性。

参考文献

- [1] Li X L, Zhou A G. Evaluation of the antioxidant effects of polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* [J]. Med Chem Res, 2007, 15(9): 471-482.
- [2] Chen Z S, Sun M Y, Srinivasan N, et al. Activation of macrophages by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. [J]. Phytother Res, 2009, 23(8): 1116-1122.
- [3] Yu M S, Ho Y S, So K F, et al. Cytoprotective effects of *Lycium barbarum* against reducing stress on endoplasmic reticulum [J]. Int J Mol Med, 2006, 17(6): 1157-1162.
- [4] Wang C C, Chang S C, Inbaraj B S, et al. Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity [J]. Food Chem, 2010, 120(1): 184-192.
- [5] Hahlbrock K, Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism [J]. Annu Rev Plant Biol, 1989, 40(1): 347-369.
- [6] Amagase H, Farnsworth N R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji) [J]. Food Res Int, 2011, 44(7): 1702-1717.

- [7] MacDonald M J, D'Cunha G B. A modern view of phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(3): 273–282.
- [8] Subramaniam R, Reinold S, Molitor E K, et al. Structure, inheritance, and expression of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) phenylalanine ammonia-lyase genes [J]. *Plant Physiol*, 1993, 102(1): 71–83.
- [9] Cramer C L, Edwards K, Dron M, et al. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, 12(4): 367–383.
- [10] Dixon R A, Paiva N L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1085–1097.
- [11] Mauch-Mani B, Slusarenko A J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica* [J]. *Plant Cell*, 1996, 8(2): 203–212.
- [12] Ehness R E, Margit G, Dietmude E, et al. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation [J]. *Plant Cell*, 1997, 9(10): 1825–1841.
- [13] Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(3): 218–223.
- [14] Pang Y Z, Shen G A, Wu W S, et al. Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Plant Sci*, 2005, 168(6): 1525–1531.
- [15] Ouyang G C, Xue Y L. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant [J]. *Plant Physiol Commun*, 1988, 24(3): 9–16.
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.
- [16] Camm E L, Towers G H. Phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Phytochemistry*, 1973, 12(5): 961–973.
- [17] Ehlting J, Büttner D, Wang Q, et al. Three 4-coumarate: Coenzyme a ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms [J]. *Plant J*, 1999, 19(1): 9–20.
- [18] Kao Y Y, Harding S A, Tsai C J. Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 796–807.
- [19] Jiang C J, Yu Y B. Study progress of phenylalanine ammonia-lyase enzyme [J]. *J Anhui Agri Univ*, 2001, 28(4): 425–430
江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展 [J]. *安徽农业大学学报*, 2001, 28(4): 425–430
- [20] 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]. *J Biol Chem*, 1989, 264(24): 14486–14492.
- [21] Wei Y Q, Xu X, Wang P. Physiological responses of *Lycium barbarum* L. under soil salt stress [J]. *Plant Physiol Sci*, 2005, 21(9): 213–217.
魏玉清, 许兴, 王璞. 土壤盐胁迫下宁夏枸杞的生理反应 [J]. *植物生理科学*, 2005, 21(9): 213–217.
- [22] Wang L Q, Mi Y W, Lin H M. Effect of salt stress on ion absorption and distribution of two *Lycium* seedlings [J]. *Acta Prat Sin*, 2011, 20(4): 129–136.
王龙强, 米永伟, 蔺海明. 盐胁迫对枸杞属两种植物幼苗离子吸收和分配的影响 [J]. *草业学报*, 2011, 20(4): 129–136.
- [23] Wang L Q, Lin H M, Xiao W, et al. Physio-biochemistry indexes relative to salt-tolerance of *Lycium barbarum* in salinized land [J]. *J Gansu Agri Univ*, 2004, 39(6): 611–614.
王龙强, 蔺海明, 肖雯, 等. 盐地宁夏枸杞生理生化指标及抗盐特性研究 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2004, 39(6): 611–614.
- [24] Dixon R A, Achnine L, Kota P, et al. The phenylpropanoid pathway and plant defence: A genomics perspective [J]. *Mol Plant Pathol*, 2002, 3(5): 371–390.
- [25] Zhou B L, Lü N, Wang Z H, et al. Effect of grafting to eggplant growth and resistance physiology under NaCl [J]. *China Veget*, 2010(20): 42–46.