

大豆苯丙氨酸解氨酶及其基因的研究进展

张必弦^{1,2}, 李 炜³, 来永才³, 徐香玲¹, 齐 宁⁴, 林 红⁴, 刘广阳⁴, 杨雪峰⁴

(¹哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025; ²黑龙江省农业科学院博士后工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086; ³黑龙江省农业科学院栽培所, 黑龙江 哈尔滨 150086; ⁴黑龙江省农业科学院作物育种所, 黑龙江 哈尔滨, 150086)

摘 要: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等次级代谢途径关键酶、限速酶。综述了大豆 PAL 及其基因的研究进展, 主要包括大豆 PAL 的分布及活性、分离纯化及酶活性的测定、对植物生理代谢的意义、在抗病中的作用机制、基因克隆、表达特性、基因的应用展望等。

关键词:大豆; 苯丙氨酸解氨酶; 苯丙氨酸解氨酶基因; 关键酶

中图分类号:S435. 6 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2008)06-1058-04

Advances of Studies on Soybean Phenylalanine Ammonia-lyase and its Gene

ZHANG Bi-xian^{1,2}, LI Wei³, LAI Yong-cai³, XU Xiang-ling¹, QI Ning⁴, LIN Hong⁴, LIU Guang-yang⁴, YANG Xue-feng⁴

(¹Life Sciences and Technology of Institute of Harbin Normal University, Harbin 150025; ²Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Postdoctoral Station, Harbin 150086; ³Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; ⁴Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: Phenylalanine ammonia-lyase(PAL) was the key enzyme and rate-limiting enzyme that linked primary metabolism to phenylpropanoid metabolism. The review summerized the research advances of studies on soybean phenylalanine ammonia-lyase and its gene, including the distribution and enzyme activity, method of purification and enzyme assay, function in physiological metabolism and disease-resistance; gene expression characteristics, gene cloning and application prospect.

Key words: Soybean; Phenylalanine ammonia-lyase; Phenylalanine ammonia-lyase gene; Key enzyme

大豆是我国重要的粮食作物之一, 是农产品加工中的重要原料之一, 其多种初级代谢产物和次级代谢产物均被广泛利用, 同人们日常生活紧密相关。苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是连接初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类次级代谢的第一步反应的酶, 是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶, 也是苯丙烷类代谢途径中研究最多的酶^[1](如图 1)。在植物形成次级代谢物如木质素、植保素等中起到重要作用, 对植物生长发育、防紫外辐射、抵御病虫害和构成植物支撑系统等方面具有重要的意义和价值^[2]。

1 大豆 PAL 研究进展

PAL 是一种只存在于植物及微生物细胞内的酶, 可定位于细胞质^[3]和一些膜胞器^[4]。PAL 酶

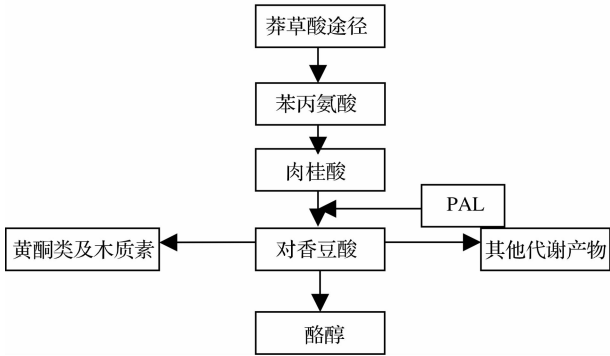


图 1 苯丙烷类代谢的一般途径

Fig. 1 General pathway of phenylpropanoid metabolism
蛋白是一种含有 4 个相同亚单位的寡聚体, 其氨基酸组成随不同来源而异, 蛋白质分子量一般为 220KDa-330KDa^[5]。PAL 活性部位具有脱氢丙氨酸基的亲电中心^[6]。

收稿日期: 2008-10-07
基金项目: 国家支撑计划资助项目(2006BA001A04); 农业部行业科研专项资助项目(200803060); 黑龙江省政府博士后基金资助项目(LBH-Z06233); 黑龙江省农业科学院博士后基金资助项目(LRB06-363); 哈尔滨市科技局基金资助项目(2007RFXYN053)。
作者简介: 张必弦(1981-), 男, 研究实习生, 硕士, 现主要从事分子育种、基因工程。E-mail: zg_2008@163.com。
通讯作者: 来永才, 研究员, 博士。E-mail: yame0451@163.com。

1.1 大豆 PAL 的分布及活性

1961 年 Koukol 和 Conn 首次从植物中发现此种酶,并进行了分离纯化,之后陆续开展关于该酶的多方面研究工作。随着分离纯化技术的完善,已经从大豆^[7]、豌豆^[8]、水稻^[9]、小麦^[10]等多种植物中分离纯化得到 PAL。细胞水平研究发现,PAL 主要分布在表皮下的细胞和维管组织细胞中^[10],组织印迹显示 PAL mRNA 常出现在表皮和微管束附近的组织细胞中。而在亚细胞水平上,PAL 则定位于细胞质^[3]和一些膜细胞器如叶绿体、白色体、线粒体、过氧化物酶体、乙醛酸体^[4]。Jin Nakushima 等^[11]也进行了 PAL 的亚细胞定位,发现细胞间质部分 PAL 活性最高,电子显微术显示,PAL 分散在细胞的基质中,定位在高尔基体囊泡和次生壁加厚层中。

经过研究发现,不同种植物中 PAL 活性不同,但是在同一株植物中,不同的组织部位 PAL 活性也不相同。一般来说越嫩的部位 PAL 活性越高^[12],如萌发的大豆幼苗,其幼叶、根、胚轴中的 PAL 活性依次降低,同时,随着叶片成熟度的增加而降低。经研究发现分别提取不同时期同一株大豆叶片的总 RNA 进行反转录进行钓取 PAL 基因,嫩叶(开花前)较成熟叶片(开花后)更容易,对其 PAL 活性进行测定发现,嫩叶比成熟叶片中 PAL 活性高。

1.2 大豆 PAL 的分离纯化及酶活性的测定

PAL 的分离纯化主要步骤是:将大豆叶片放置在液氮中固定,用硼酸缓冲液研磨匀浆,砂布过滤,离心,弃沉淀,得粗酶液。粗酶液经过硫酸铵分级沉淀、DETE-纤维素层析、亲和层析等步骤,即可得到纯化的 PAL 蛋白^[9]。

PAL 活性常用测定步骤是:称取 1 g 新鲜大豆叶片,液氮固定研磨,然后用提取缓冲液提取,4℃ × 10 000 r · min⁻¹离心得粗酶液,30℃ 反应适当时间,化学灭活,测定 290 nm 下测吸光度值,按照 OD 值变化 0.01 为一个酶活性单位的原则计算。一般常用两种提取缓冲液,一种是 0.1 mol · L⁻¹ 硼酸缓冲液(pH 8.8)^[13],检测反应液总体积 5 mL(内含 0.1 mol · L⁻¹ 硼酸缓冲液(pH 8.8),120 μmol · L⁻¹ L-苯丙氨酸,粗酶液 1 mL),30℃ 反应 60 min,加 0.2 mL 6 mol · L⁻¹ HCl 终止反应,另一种是用 0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.8)提取,检测反应液总体积 1.2 mL(内含 0.05 mol · L⁻¹ Tris-HCl(pH 8.8),1 mmol · L⁻¹ L-苯丙氨酸,粗酶液 200 μL),30℃ 反应 45 min,加 1 mL 2 mol · L⁻¹ HCl 终止反应,

再加 3 mL 甲苯,离心 5 min 后吸取甲苯相在 290 nm 下测吸光度值。

1.3 大豆 PAL 对植物生理代谢的意义

大豆苯丙氨酸经过苯丙烷类途径可生成反式肉桂酸、香豆酸、阿魏酸、芥子酸等中间产物,又可进一步转化为香豆素、绿原酸,也可形成反式香豆酰辅酶 A 酯,再通过多个途径进一步转化为木质素、黄酮、异黄酮、生物碱、苯甲酸酯糖苷等次级代谢产物。这些次级代谢产物在植物生长发育过程中起着重要的作用,而含量总是与 PAL 的活性密切相关,因此 PAL 对大豆的生理有重大意义^[1]。

在对细胞分化和木质化研究方面,1970 年以来,PAL 与细胞分化的关系已有报道^[14-17],发现愈伤组织分化过程中 PAL 活性有所增高,在分化组织中有管状分子形成,主要是由于木质素在细胞壁中的沉积。Tubery 和 Notheote^[14]在植物中发现在木质化组织中 PAL 的活性较高,而在这些植物的非木质化组织中不能检测到 PAL 活性。

在对植物色素形成过程研究方面,1960 年,Neish 证实 PAL 催化花青素的合成^[18]。苯丙烷类产物反香豆酰辅酶 A 经过类黄酮途径可生成花色色素、花色苷等,这都是植物花朵、果实和叶片颜色的重要组成部分,而且这些物质的合成都与 PAL 的活性密切相关^[19-21]。

在对植物的根瘤形成过程研究方面,苯丙烷类代谢产物经类黄酮途径所形成的黄酮类化合物对根瘤菌有趋化作用^[22],有些还可作为根瘤菌结瘤基因的诱导物质^[23]。这些黄酮类物质的含量与 PAL 活性存在着密切的关系,在根瘤菌的形成过程中常伴随着 PAL 活性逐渐增加。

1.4 大豆 PAL 在抗病中的作用机制

1.4.1 参与酚类物质合成 酚类化合物也是苯丙烷类代谢产物。PAL 活性增高与酚类物质的合成亦有一致性^[24]。

1.4.2 参与木质素合成 木质素可通过加强细胞壁,增加组织木质化程度,形成病原菌入侵的机械屏障^[25],其与莽草酸-苯丙烷类中间代谢物密切相关。木质素的合成也来自苯丙烷类代谢途径中的苯丙氨酸。PAL 是这条途径的第一个而且是最重要的酶。研究表明,在植物-病原物互作中,PAL 参与木质素合成和累积。

1.4.3 参与植保素合成 植保素多为异黄酮类物质,是植物防御反应的重要生理活性物质之一。它

们能直接阻止病原物的生长发育和侵染。在异黄酮类物质合成中涉及苯丙氨酸。PAL 催化苯丙氨酸直接脱氨基转化为反式肉桂酸,是植保素生物合成的关键酶。研究表明,在植物—病原物互作中 PAL 活性与植保素生物合成有明显的一致性^[25]。

2 大豆 PAL 基因研究进展

2.1 大豆 PAL 基因克隆

大豆 PAL 基因结构的特点是由小的多基因家族组成,在 1 组染色体中,含有 2-3 个 PAL 基因,并且可以分为不同的类群或亚族。大豆 PAL 基因一般由两个外显子和一个内含子组成。编码区长度变化不大,一般在 2 100 bp 左右。栽培大豆 PAL 基因的编码区为 2 142 bp^[26],野生大豆 PAL 基因的编码区为 2 139 bp(张必弦,未发表)。

2.2 大豆 PAL 基因的表达特性

大豆 PAL 基因的表达及活性会受到多种因素的影响,而 PAL 的表达模式因影响因素而异。研究表明在不同处理(紫外处理、机械损伤、冷诱导、激素浇灌)下,PAL 多肽链的合成是特异的,这说明 PAL 基因的选择性表达受到复杂的调控,这些调控因子包括与发育有关的因子和影响苯丙烷代谢途径的环境因子。作者也研究了同样的 4 种状态和正常状态下,野生大豆 PAL 酶活性的周期变化,利用酶学工程中酶活力变化曲线也证明了不同影响因子的作用程度,如紫外处理、机械损伤、冷诱导、激素浇灌等方法在一定时间内,能够刺激 PAL 的表达,引起 PAL 活性的升高。同时,大豆 PAL 的表达具有组织特异性,受发育的调控,同一 PAL 基因家族中不同 PAL 基因的表达模式也不相同。在大豆中,PAL 在根部和成熟的花中表达量最高,在茎中的表达水平中等,成熟的叶片中几乎不表达。

2.3 大豆 PAL 基因的应用展望

PAL 是催化苯丙烷类代谢途径中第一步反应的酶,且是关键酶和限速酶,其表达具有复杂的调控机制。研究大豆 PAL 的性质及基因的表达,特别是其表达调控,对于今后更好地利用 PAL 对植物进行改造或是利用基因工程来生产在医学保健上具有重要价值的生物活性物质是有重大意义的。对大豆 PAL 基因启动子及相关的转录因子深入分析,可以进一步阐明 PAL 基因的表达调控机理。对大豆 PAL 基因启动子进行剖析,找出有关的顺式作用元件将会是今后研究的热点之一。苯丙烷代谢途径的不同去向受植物发育的时空调节,其调控过程主要是通过转录因子对生物合成基因的活化来实现的。因此,

转录因子充当了“分子开关”的作用。当这些特定转录因子得到特定发育阶段所发出的信号后,将活化苯丙烷代谢途径的特定生物合成途径。然而对这些发育信号及其传导目前还很不清楚。开展大豆 PAL 特异基因的结构特点、克隆、测序、表达部位和时空表达模式的研究,以便有目的地控制其在大豆中的表达,从而增强植物对病害的广谱持久抗性、提高特定次生代谢产物(如大豆异黄酮)的含量或是降低某些次生物质(如大豆中多酚类、木质素等)的积累,这些将是今后大豆 PAL 研究的重点。

参考文献

[1] 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. (Jiang C J,Yu Y B. Advances of studies on phenylalanine ammonia-lyase[J]. Journal of Anhui Agricultural University,2001,28(4):425-430.)

[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,2006,731-34. (He L H,Zhang J B,Bin J H. Research progress of phenylalanine ammonia-lyase[J]. Food Science and Technology,2006,731-34.)

[3] Jones D H. Review Article Number3: phenylalanine ammonia-lyase. Regulation of its induction and its role in plant development [J]. Phytochemistry,1984,23(7):1349-1359.

[4] Hanson R R,Havir E A. Secondary Plant Products[C]. New York: Academic Press,1981,577-625.

[6] 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(3):9-26. (Ouyang G C,Xue Y L. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant[J]. Plant Physiology Communications,1988,(3):9-26.)

[7] Havir E A. Phenylalanine ammonia-lyase; purification and characterization from soybean cell suspension cultures[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,1981,211(2):556-563.

[8] Munn C B,Drysdale R B. Kievitone production and phenylalanine ammonia-lyase activity in cowpea [J]. Phytochemistry,1975,14(5/6):1303-1307.

[9] Koukol J,Conn E E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Herdeum vulgare* [J]. Journal of Biology and Chemistry,1961,236:2692-2698.

[10] 欧阳光察,应初衍,沃绍根,等. 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[J]. 植物生理学报,1985,11(2):204-214. (Ouyang G C,Ying C Y,Wo S G et al. Study on plant phenylalanine ammonia-lyase,VI. purification and some properties of PAL from etiolated seedlings of rice (*Oryzasativa*) and wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Journal of Plant Physiology,1985,11(2):204-214.)

[11] Nakashima J, Awano T, Takabe K, et al. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia mesophyll* cells [J]. Plant and Cell Physiology,1997,38(2):113-123.

[12] Subramaniam R, Reinold S, Molitor E K, et al. Structure, inheritance

ance, and expression of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) phenylalanine ammonia-lyase genes [J]. Plant Physiology, 1993, 102(1): 71-83.

[13] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究 I. 植物激素对甘薯块根植物苯丙氨酸解氨酶和肉桂酸羟化酶活性变化及其伴随性的影响 [J]. 植物生理学报, 1981, 7(4): 373-379. (Wang J W, Xue Y L. Study on plant phenylalanine ammonia-lyase. I. The effect of phytohormone on the increase in phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and cinnamic acid 4-hydroxylase (CA4H) activity and the sequence of concomitant of enzyme activities in sweet potato [J]. Journal of Plant Physiology, 1981, 7(4): 373-379.)

[14] Rubery R H, Northcote D H. Site of phenylalanine ammonia-lyase activity and synthesis of lignin during xylem differentiation [J]. Nature (London), 1968, 210: 1230-1234.

[15] Fukuda H, Komamine A. Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells Isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans* [J]. Plant Physiology, 1980, 65: 57-60.

[16] 余沛涛, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 在细胞分化中的作用 [J]. 植物生理学报, 1986, 12(1): 37-38. (Xu P T, Xue Y L. The role of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in cell differentiation [J]. Journal of Plant Physiology, 1986, 12(1): 37-38.)

[17] 余沛涛, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 在细胞分化中的作用 [J]. 植物生理学报, 1987, 13(1): 14-19. (Xu P T, Xue Y L. The role of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in cell differentiation [J]. Journal of Plant Physiology, 1987, 13(1): 14-19.)

[18] Neish A C. Biosynthetic pathway of aromatic compounds [J]. Annual Review of Plant Physiology, 1960(11): 5-80.

[19] Lister C E, Lancaster J E, Walker J R L. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars [J]. American Society for Horticultural Science, 1996, 121(3): 281-285.

[20] 赵宗方, 赵勇, 吴桂法. 果实花青素含量与 PAL 活性关系的研究 [J]. 园艺学报, 1994, 21(2): 199-200. (Zhong Z F, Zhao Y, Wu G F. Studies on Relationship between Anthocyanidin and PAL [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1994, 21(2): 199-200.)

[21] Kataoka I, Kubo Y, Sugiura A, et al. Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars [J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 1983, 52(3): 273-279.

[22] Caetano-Anolles G, Crist-Estes D K, Bauer W D. Chemotaxis of rhizobium meliloti to the plant flavone luteolin requires functional nodulation gene [J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170(7): 3164-3169.

[23] Hartwing U A, Phillips D A. Release and modification of mod-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds [J]. Plant Physiology, 1991, 95: 804-807.

[24] 曾永三, 王振中. 苯丙氨酸解氨酶在植物抗病反应中的作用 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 1999, 12(3): 56-65. (Zeng Y S, Wang Z Z. Role of phenylalanine ammonia-lyase in plant disease resistance [J]. Zhongkai University of Agriculture and Technology, 1999, 12(3): 56-65.)

[25] 刘亚光, 李海英, 杨庆凯. 大豆品种的抗病性与叶片内苯丙氨酸解氨酶活性关系的研究 [J]. 大豆科学, 2002, 21(3): 185-198. (Liu Y G, Li H Y, Yang Q K. Study on the relationship between resistance of soybean and activity of PAL in leaves of soybean infected by *Cercospora sojina* hara [J]. Soybean Science, 2002, 21(3): 185-198.)

[25] 王敬文, 薛应龙. 植物苯丙氨酸解氨酶的研究 II. 苯丙氨酸解氨酶在抗马铃薯晚疫病中的作用 [J]. 植物生理学报, 1982, 8(1): 35-42. (Wang J W, Xue Y L. Study on plant phenylalanine ammonia-lyase (PAL) II. The role of PAL in the resistance of potato late blight [J]. Journal of Plant Physiology, 1982, 8(1): 35-42.)

[26] Frank R L, Vodkin L O. Sequence and structure of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Glycine max* [J]. DNA Sequencing, 1991, 1(5): 335-346.

参考文献著录格式

7. 电子文献
著录格式：
[序号] 主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志]. 出版地: 出版者, 出版年(更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径.

对于载体为“DK”“MT”和“CD”等的文献, 将对应的印刷版的[文献类型标志]换成[文献类型标志/载体类型标志] (包括[DB/MT]和[CP/DK]等); 对于载体为“OL”的文献, 除了将对应的印刷版的[文献类型标志]换成[文献类型标志/载体类型标志]以外, 尚须在对应的印刷版著录项目后加上发表或更新日期(加圆括号, 有出版年的文献可不选此项)、引用日期(加方括号)和电子文献的网址. 建议在网址和相应的文献间建立起超链接。

例：
[1] 方舟子. 学术评价有新招[N/OL]. 中国青年报, 2006-01-11. (2006-01-11) [2006-03-02]. <http://scitech.people.com.cn/GB/1057/4017988.html>.

[2] 萧钰. 出版业信息化迈入快车道[EB/OL]. (2001-12-19) [2002-04-15]. <http://www.book-tide.com/news/20011219/200112190019.html>.