

大豆 *PAL2* 基因的克隆与分析

王婵婵, 王安娜, 吴 蕾, 李业成, 刘 成, 马凤鸣

(东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要:采用 RT-PCR 法克隆了 1 个大豆 *PAL* 基因, 并利用网络工具分析预测了其编码蛋白。结果表明: 该基因是大豆 *PAL* 基因家族的 1 个新成员, 命名为 *GmPAL2* (登录号: GQ220305), 其全长 2284bp, 编码 1 个包含 717 个氨基酸残基的多肽链, 分子量为 78. 116kD; 经 BLASTp 比对表明: 该蛋白序列与菜豆 *PAL2* 蛋白同源性最高, 达到 92%, 与大豆 *PAL1* 的同源性为 89%。该研究结果为进一步研究整个大豆 *PAL* 基因家族的特性奠定了基础。

关键词:大豆; 苯丙氨酸解氨酶 (*PAL*); 序列分析

中图分类号: S565. 1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841 (2010) 01-0013-05

Cloning and Analysis of *PAL2* Gene from Soybean

WANG Chan-chan, WANG An-na, WU Lei, LI Ye-cheng, LIU Cheng, MA Feng-ming

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The *PAL2* gene, cloned from soybean by RT-PCR, is a new member of *PAL* gene family. It is named *GmPAL2* and the accession number is GQ220305. The protein encoded by *PAL2* was analyzed by informatics tools provided on internet. The complete cDNA of *PAL2* was 2284bp and it encoded a polypeptide chain which contained 717 amino acid residues. The molecular weight of the protein encoded by *PAL2* gene was 78. 116kD. The homology of soybean *PAL2* and bean *PAL2* reached 92% by BLASTp tool, the homology of soybean *PAL2* and soybean *PAL1* was only 89%. The obtained *PAL2* gene will be a base for the recombinant expression and the analysis of *PAL* gene family in soybean.

Key words: Soybean Phenylalanine Ammonia-lyase (*PAL*); Sequence analysis

苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine Ammonialyase, *PAL*, EC4. 3. 1. 5) 是催化苯丙烷代谢途径第一步反应的酶, 也是这个途径的关键酶之一, 对植物有非常重要的生理意义, 该酶催化 L- 苯丙氨酸 (L- Phe) 经过非氧化脱氨反应生成反式肉桂酸和氨^[1-2], 是连接初级代谢和苯丙氨酸代谢途径的纽带^[3]。植物苯丙烷类代谢途径是植物体内次生物质代谢的一条重要途径, 一切含苯丙烷骨架的物质都是该途径直接或间接的产物, 这些化合物在植物体内各具多种生理功能, 在植物形成如木质素、植保素等次级代谢物中起重要作用, 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^[4-5]。

研究表明, *PAL* 基因的普遍特点是由小的多基因家族组成, 如杨树的 *PAL* 基因至少有 2 个, 菜豆有 3 个, 欧芹有 4 个, 拟南芥中有 4 个, 而茶树和火

炬松中仅有 1 个 *PAL* 基因。对已报道的 *PAL* 基因进行比对, 发现高等植物中 *PAL* 基因同源性较高, 即 *PAL* 基因在不同的植物中保守性强。高等植物的 *PAL* 基因一般由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 不同物种的内含子长度差异较大, 但内含子的位置及两端碱基一致。完整的读码框 (ORF) 一般在 2. 0 ~ 2. 3kb 之间, 有些植物的 ORF 较短, 约为 1. 8 kb^[5-6]。*PAL* 是胞内诱导酶, 不同来源 *PAL* 的结构、分子量等不尽相同, 但总的来说分子量大约在 220 ~ 330kD 之间, 亦是寡聚酶, 酶蛋白是由 4 个亚基组成, 多数 *PAL* 有均一的亚基, 分子量在 55 ~ 88kDa^[7-8]。

大豆 *PAL* 基因结构的特点也是由小的多基因家族组成, 含有 2 ~ 3 个 *PAL* 基因, 并且可以分为不同的类群或亚族^[9]。但至目前为止, 对大豆 *PAL1* 的相关研究较多, 而对大豆 *PAL2* 则鲜有报导, 该研

收稿日期: 2009-07-03

基金项目: 黑龙江省自然科学基金重点资助项目 (ZJN0701)。

第一作者简介: 王婵婵 (1983-), 女, 硕士, 研究方向为作物生理与分子生物学。E-mail: wccetss@163.com。

通讯作者: 马凤鸣, 教授, 博士生导师。E-mail: fengming_ma@sohu.com。

究利用 RT-PCR 法从大豆中克隆了 1 个新的 *PAL* 家族成员—*PAL2*, 并利用现代生物信息学工具对其编码蛋白进行疏水区域、二级结构和三级结构的预测, 为深入研究大豆 *PAL* 基因家族的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆材料 大豆栽培品种绥农 14, 正常盆栽 7 d 后, 剪取嫩叶、茎及子叶, -80°C 冻存备用。

1.1.2 质粒和菌种 pMD19-T 载体和大肠杆菌 JM109 感受态细胞均购自 TAKARA 公司。

1.1.3 酶和其它试剂 Trizol 试剂, Invitrogen 公司; 反转录酶、DNA 回收试剂盒, BMI 公司; ExTaq DNA 聚合酶、Marker, TAKARA 公司; 质粒 DNA 小量提取试剂盒, Bioflux 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆总 RNA 的提取及反转录 大豆 RNA 的提取按照 Invitrogen 的 Trizol 试剂盒说明进行操作, mRNA 的反转录按照 BMI 反转录酶说明进行。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增 以大豆 *PAL1* 基因 DNA 序列 (X52953) 和大豆 *PAL* mRNA 片段 (S46988) 为参照, 经 BLAST 比对分析, 在大豆 mRNA 文库中分别找到同源性最高的 mRNA 序列 (AK245923), 根据该 mRNA 序列的保守区域分别设计引物, 引物序列如下:

Sense 引物 CATCTCCCTCCACTCACCATAACAT

Anti-sense 引物 GGATTGATTTGCCACAGCCT-TAT

以大豆总 RNA 反转录产物 cDNA 为模板进行 PCR。PCR 扩增条件: 94°C 1 min; 94°C 30 s, 58°C 1 min, 72°C 3 min, 30 cycle; 72°C 5 min; 4°C 保存。

1.2.3 PCR 产物的回收、克隆 PCR 产物电泳后按照 DNA 胶回收试剂盒说明书回收目的片段。将回收的 PCR 产物连接至 pMD19-T 载体上, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 利用 α 互补及菌落 PCR 筛选阳性克隆, 提取连接有目的片段的质粒送上海生工测序。

1.2.4 *PAL2* 的序列分析 测序得到的 *PAL2* cDNA 序列利用 NCBI 网站提供的 ORF Finder 找出基因的读码框, 然后利用瑞士生物信息学研究所提供的 ProtParam 软件进行氨基酸残基数目、组成、蛋白质

相对分子量、理论等电点、平均疏水性及三维结构等参数在线分析。

2 结果与分析

2.1 大豆 *PAL2* cDNA 片段的克隆

以大豆总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 方法 (图 1) 克隆得到 1 个新的大豆 *PAL* cDNA 完整编码序列, 命名为 *GmPAL2* (登录号: GQ220305), 总长度为 2284 bp。

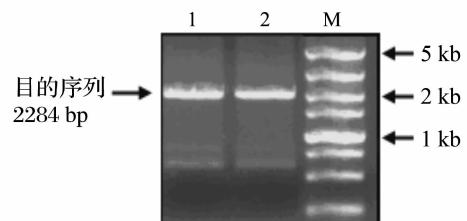


图 1 *GmPAL2* cDNA 扩增结果

Fig. 1 Amplification of *GmPAL2* cDNA

2.2 序列分析

2.2.1 不同植物 *PAL* 蛋白分子进化树分析 选取 32 种具有代表性的植物 *PAL* 蛋白序列, 与所克隆的大豆 *PAL2* cDNA 推导的蛋白序列比较, 用 Clustal X 构建进化树 (图 2)。

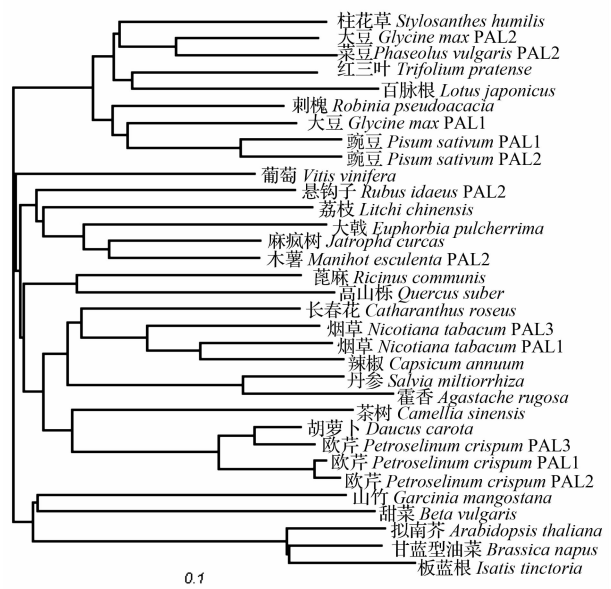


图 2 大豆 *PAL2* 蛋白的分子进化树分析

Fig. 2 Phylogenetic relationships between various

PAL proteins

PAL 进化树分析表明, 大豆 *PAL2* 与豆科植物 *PAL* 亲缘关系较近, 与其它植物存在一定差别。在该进化树中同科植物表现出较近的亲缘关系, 如十

字花科的拟南芥、甘蓝型油菜和板蓝根;伞形科的欧芹和胡萝卜;大戟科的麻疯树、木薯和大戟都处于同一分支,同时,亲缘关系较近的科也聚在一起,推测 *PAL* 在进化过程中的变异不大,有很强的保守性。

2.2.2 大豆 *PAL2* 基因编码蛋白一级结构分析

大豆 *PAL2*cDNA 序列通过 ORFfinder 分析,可得到完整的 ORF 位于核酸序列的 24 ~ 2177 区域,编码蛋白包含 717 个氨基酸残基(图 3),分子量为 78.116 kD,理论等电点为 5.83。酸性氨基酸残基总数(Asp + Glu)81 个,碱性氨基酸残基总数(Arg + Lys)69 个。原子总数为 11 008,分子式为 $C_{3451}H_{5521}N_{949}O_{1061}S_{26}$ 。根据所编码蛋白质的一级序列进行了疏水性作图(图 4),疏水性较高的肽段处于蛋白质内部,反之,亲水性较高的肽段处于蛋白质分子的表面。大豆 *PAL2* 的平均疏水性分析显示约有 11 个峰值,表明该肽段约有 11 个疏水区域。

2.2.3 大豆 *PAL2* 基因编码蛋白二级结构预测
利用 ExPASy 的 HNN 进行二级结构预测(图 5),h 代表 α 螺旋,e 代表延伸链,c 代表无规则卷曲。 α 螺旋、延伸链、无规则卷曲分别占 49.09%、7.11% 和 43.79%。

2.2.4 大豆 *PAL2* 基因编码蛋白立体结构预测

将所推测的大豆 *PAL2* 蛋白序列提交后,采用首选模式,经过序列相似性和对已有的三维结构数据库搜索,选择程序搜索到的第一个模板,以这一蛋白结构作为模板进行 Geno3d 建模。Geno3d 建模如图 6,其中包括 33 个 α 螺旋,9 个铰链结构和 67 个转角。

3 讨论

PAL 作为初级代谢与苯丙烷次级代谢的纽带,是很多重要天然物质合成的关键酶,不仅对植物的生理代谢和抗逆性有很重要的作用,对医药和生物化工领域也具有重要的应用价值。*PAL* 的直接催化产物—肉桂酸,是合成治疗冠心病的药物“心可安”的重要中间体,也用于植物生长促进剂、长效杀菌剂和果蔬防腐剂,而大豆作为我国的传统食品,依赖苯丙烷代谢途径的大豆异黄酮具有多重保健与药理作用^[7]。

该研究利用已知的大豆 *PAL*mRNA(s46988)片段在 GeneBank 和大豆基因库中进行 BLAST 比对,获得 1 条同源性较高的序列,设计引物后进行 RT-PCR 扩增,得到 1 条完整的大豆 *PAL2*cDNA 序列。

```

1 CATCTCCCTCCTCACTCACCATAAC
24 atggcatcagaagcaaatgctgccaacaccaactctgtgtaaat
M A S E A N A A N T N F C V N
69 gtttagcaacaatggctacatttagtgcattacccttgaaatgg
V S N N G Y I S A N D P L N W
114 ggtgcggctgcggaggctatggctggggaccactgcagcagggtc
G A A A E A M A G S H L D E V
159 aagcgcatgtagaggagtagccggaggccgctgcgaagctcgggt
K R M L E E Y R R P V V K L G
204 ggagagaccctgaccatctcgcaggctcggcgatcgccggccac
G E T L T I S Q V A A I A A H
249 gaccagggggtgaagtgaggctgcggagctcctccaggccgggt
D Q G V K V E L A A I S R A G
294 gtttaagccagcagtgactgggtgtagggagagcagaacagggc
V K A S S D W V M E S M N K G
339 actgacagctacggcgtcaccaccgggttcgggtgctacctccac
T D S Y G V T T G F G A T S H
384 cggagaccaaacaggcgctgcctgcagaaggagctaatagg
R R T K Q G A A L Q K E L I R
429 tttttgaatgctggaatatttggcaatggtacagagtcgaatgic
F L N A G F G N G T F S N C
474 accctaccaccacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
T L P H T A T R A A M L V R I
519 aacacactctccaaggctactcaggaaacacacatttgaattttg
N T L L Q G Y S G I R F E I L
564 gaggcaatcacaaagcttctgaacacacacatttgaattttg
E A I T K L L N N N I T P C L
609 ccacttaggggaacacacagcagcagcagcagcagcagcagc
P L R G T I T A S G D L V P L
654 tctgacattgctggtttgctaacctgtagcagaacacacagc
S Y I A G L L T G R P N S K A
699 gttggaccctctggtgagattctgtagcagaacacacagc
V G P S G E I L N A K E A F E
744 ttggcaacacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
L A N I G A E F F E L Q P K E
789 ggccttgccttgcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
G L A L V N G T A V G S G L A
834 tcaattgtcttatttgaagcagcagcagcagcagcagcagc
S I V L F E A N I I A V L S E
879 gttatttcagcaatttttgcagcagcagcagcagcagcagc
V I S A I F A E V M Q G K P E
924 ttcactgaccatttgactataaactaaagcagcagcagcagc
F T D H L T H K L K H H P G Q
969 attgaagctgctctattatgaacacatttgaaggaagcctct
I E A A A I M E H I L E G S S
1014 tacgtgaagctgtagaagttgtagagattgactcctttacaa
Y V K A A K K L H E I D P L Q
1059 aagcctaaacaggaccgttatgctcttagcagcagcagcagc
K P K Q D R Y A L R T S P Q W
1104 ctgtgctctaatgtaggtgattgctctaccagcagcagc
L G P L I E V I R F S T K S I
1149 gagaggagattaacctcagtcagtcagcagcagcagcagc
E R E I N S V N D N P L I D V
1194 tcaaggaacaaggcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
S R N K A L H G G N F Q G T P
1239 attgagctcctcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
I G V S M D N T R L A L A S I
1284 ggtaaacctcagcttgcctcagcagcagcagcagcagcagc
G K L M F A Q F S E L V N D Y
1329 tacaacaatggtttgcctcagcagcagcagcagcagcagc
Y N N G L P S N L T A S R N P
1374 agcttgagattgagtcagcagcagcagcagcagcagcagc
S L D Y G F K G A E I A M A S
1419 tatgttgcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
Y C S E L Q Y L A N P V T S H
1464 gtgcaaacgcggagcagcagcagcagcagcagcagcagc
V Q S A E Q H N Q D V N S L G
1509 ctgatttcacagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
L I S S R K T H E A I E I L K
1554 ctcagtcctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
L M S S T F L V A L C Q A I D
1599 ttgagcatttggagagagattgagagagagagagagagag
L R H L E E N L K N T V K N V
1644 gtgagtcagcttgcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
V S Q V A K R T L T T G V N G
1689 gagcttcaccctcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
E L H P S R F C E K D L L K V
1734 gttgataggagtagacatttgcacacattgtagcagcagcagc
V D R E Y T F A Y I D D P C S
1779 ggaacatacccttgcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
G T Y P L M Q K L R Q V L V D
1824 tatgcattggccaatggagagagagagagagagagagagac
Y A L A N G E N E K N T S T S
1869 atcttccaaaagattgcaacatttggagagagagagagagag
I F Q K I A T F E E E L K T L
1914 ttgcctaaaggaagtggagagagagagagagagagagagag
L P K E V E G A R V A Y E N D
1959 caatgtgcaattccaaacagagcagcagcagcagcagcagc
Q C A I P N K I K E C R S Y P
2004 ttgtacaagtttgcagagagagagagagagagagagagag
L Y K F V R E E L G T A L L T
2049 ggtgaaagggttatctcaccgggtgaaagagtgtagacaaagt
G E R V I S P G E E C D K V F
2094 actgctttgtgccaagggaagcagcagcagcagcagcagcagc
T A L C Q G K I I D P L L E C
2139 ctggggagtggaatggggcagcagcagcagcagcagcagcagc
L G E W N G A P L P I C *
2178 TTTTCTTATTTCTGTTTCTTGAAGAGTGGTTCTTTCTGTACA
CGTGTGTTGTGATTAAGCATTTGGTTTGTCTATATAGGCTGTGGCA
AATCAATCC 2284

```

图 3 *GmPAL2* cDNA 测序结果及其推导的蛋白质序列

Fig. 3 Sequencing result of *GmPAL2* and sequence of protein was predicted by *PAL2*

- 究进展[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1058-1061. (Zhang B X, Li W, Lai Y C, et al. Advances of studies on soybean phenylalanine ammonia-lyase and its gene[J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1058-1061.)
- [6] 宋婕. 丹参苯丙氨酸解氨酶(SmPAL)的克隆及其功能初探[D]. 西安: 陕西师范大学, 2007. (Song J. Molecular cloning of a Phenylalanine ammonia-lyase gene(SmPAL) from *Salvia miltiorrhiza* and the primary study on its function[D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2007.)
- [7] 宋束, 马会勤, 郝佳, 等. 大豆苯丙氨酸解氨酶(PAL)在大肠杆菌中的重组表达及活性鉴定[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 29-35. (Song J, Ma H Q, Hao J, et al. Expression and activity assay of recombinant phenylalanine ammonia lyase of *Glycine max* L. in *E. coli*[J]. Food Science, 2006, 27(7): 29-35)
- [8] 崔建东, 李艳, 牟德华. 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的研究进展[J]. 食品工业科技, 2008(7): 306-308. (Cui J D, Li Y, Mou D H. Research progress of phenylalanine ammonia lyase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008(7): 306-308.)
- [9] Frank R L, Vodkin L O. Sequence and structure of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Glycine max*[J]. DNA Sequence, 1991, 1(5): 335-46.
- [10] Estabrook E M, Sengupta- Gopalan C. Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during soybean nodule development[J]. The Plant Cell, 1991, 3: 299-308.
- [11] Ni Y, Jiang H L, Lei B, et al. Molecular cloning, characterization and expression of two rapeseed(*Brassica napus* L.) cDNAs orthologous to *Arabidopsis thaliana* phenylalanine ammonia-lyase 1[J]. Euphytica, 2008, 159: 1-16.
- [12] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著; 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 597-618. (Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning III[M]. Beijing: Science Press, 2002: 597-618.)
- [13] 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.)
-
- (上接第6页)
- [12] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. (Gai J Y. Methods of experimental statistics[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000.)
- [13] 孔繁玲. 植物数量遗传学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006. (Kong F L. Quantitative genetics in plant[M]. Beijing: China Agriculture University Press, 2006.)
- [14] Valliyodan B, Nguyen H T. Genomics of abiotic stress in soybean[M]//G. Stacey. Genetics and Genomics of Soybean, Springer Science Business Media, LLC 2008, 352-354.
- [15] 张秀荣, 冯祥运, 肖唐华. 国家芝麻种质资源耐渍性鉴定研究[J]. 作物杂志, 1992(3): 20-21. (Zhang X R, Feng X Y, Xiao T H. Identification of waterlogging tolerance in national sesame germplasm[J]. Plant Journal, 1992(3): 20-21.)
- [16] 周广生, 梅芳竹, 周竹青, 等. 小麦不同品种耐湿性生理指标综合评价及其预测[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1378-1382. (Zhou G S, Mei F Z, Zhou Z Q, et al. Comprehensive evaluation and forecast on physiological indices of waterlogging resistance of different wheat varieties[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(11): 1378-1382.)
- [17] 王军, 周美学, 许如根, 等. 大麦耐湿性鉴定指标和评价方法研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2145-2152. (Wang J, Zhou M X, Xu R G, et al. Studies on selecting indices and evaluation methods for barley's(*Hordeum vulgare* L.) waterlogging tolerance[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(10): 2145-2152.)
- [18] Helms T C, Werk B J, Nelson B D, et al. Soybean tolerance to water-saturated soil and role of resistance to *Phytophthora sojae*[J]. Crop Science, 2007, 47: 2295-2302
- [19] Jackson M B. Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress[J]. Annals of Botany, 2008, 101: 229-248.
- [20] Das K K, Panda D, Sarkar R K, et al. Submergence tolerance in relation to variable floodwater conditions in rice[J]. Environmental and Experimental Botany, 2009, 66: 425-434.
-

启事

《大豆科学》编辑部现有少量 2006~2009 年过刊及精装合订本, 其中期刊每本 10.00 元, 邮费 5.00 元; 合订本每册 90.00 元, 邮费 10.00 元, 合计 100.00 元。数量有限, 欲购从速。

汇款请寄: 哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部。

邮编: 150086

电话: 0451-86668735

E-mail: dadoukx@sina.com