

• 农业生物技术 •

桃儿七苯丙氨酸解氨酶的基因克隆及其酶活分析

胡迪[#], 罗晓伟[#], 王宇贤, 龚明, 邹竹荣^{*}

云南师范大学生命科学学院 教育部生物质能源持续发展和应用工程研究中心, 云南 昆明 650500

胡迪, 罗晓伟, 王宇贤, 龚明, 邹竹荣. 桃儿七苯丙氨酸解氨酶的基因克隆及其酶活分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2818-2838.

HU Di, LUO Xiaowei, WANG Yuxian, GONG Ming, ZOU Zhurong. Gene cloning and enzymatic activity analysis of phenylalanine ammonia-lyase from *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2818-2838.

摘要: 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)作为植物苯丙烷类途径的入口关键酶, 对抗肿瘤木脂素——鬼臼毒素的生物合成具有重要影响。桃儿七[*Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying]是鬼臼毒素的主要天然来源, 以四川阿坝地区桃儿七植株的根为材料, 基于桃儿七公共 SRA 转录组数据包, 通过反转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)克隆其苯丙氨酸解氨酶基因 *ShPAL*。生物信息学分析表明, *ShPAL* 编码蛋白由 711 个氨基酸组成, 包含 PAL 保守结构域, 有芳香族氨基酸解氨酶活性中心的特征性基序, 二级结构主要由 α -螺旋和无规则卷曲组成, 单体三级结构呈现典型的“海马状”, Swiss 建模空间结构为同源四聚体, 在系统发育谱系上与同属小檗科(Berberidaceae)的三枝九叶草(*Epimedium sagittatum*) PAL 序列相似度最高、进化距离最短。亚细胞定位实验结果显示 *ShPAL* 蛋白主要定位于细胞质中、少量定位于内质网膜上。*ShPAL* 蛋白通过大肠杆菌(*Escherichia coli*)重组表达和组氨酸标签亲和纯化, 其酶活高达 20.91 U/mg, 最适温度为 41 °C, 最适 pH 为 9.0; 其 F130H 突变体酶活降低约 23.6%, 但随温度、pH 变化的趋势不变, 证实该位置的苯丙氨酸确为影响 PAL 底物特异性的残基; 两者的热稳定性均较差, 但 pH 稳定性较好。这些结果将有助于进一步分析 *ShPAL* 在鬼臼毒素生物合成过程中的调控作用, 以及促进鬼臼毒素异源合成, 从而保护桃儿七种质资源, 同时也表明 *ShPAL* 可在生物化工和生物医学方面具有潜在应用价值。

关键词: 桃儿七; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 酶活分析

资助项目: 国家自然科学基金(31760077, 32260230)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31760077, 32260230).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: zxr09@ynnu.edu.cn

Received: 2023-02-05; Accepted: 2023-04-05; Published online: 2023-04-20

Gene cloning and enzymatic activity analysis of phenylalanine ammonia-lyase from *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying

HU Di[#], LUO Xiaowei[#], WANG Yuxian, GONG Ming, ZOU Zhurong^{*}

Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is the key entry enzyme of plant phenylpropanoid pathway. It plays an important role in the biosynthesis of podophyllotoxin, an anti-tumor lignan that is currently produced from its main natural source *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying. In this study, we cloned the gene *ShPAL* encoding phenylalanine ammonia-lyase by RT-PCR from the root of *S. hexandrum* ecotype inhabited in the Aba' district, Sichuan, based on its public SRA transcriptome data-package. Bioinformatics analyses showed that the *ShPAL*-encoded protein is composed of 711 amino acids, contains the conserved domains of PAL, and has the signature motif within the active center of aromatic ammonia-lyases. Moreover, ShPAL protein was predicted to have a secondary structure mainly composed of α -helix and random coil, a typical 'seahorse' shape monomer tertiary structure, and a homologous tetramer three-dimensional structure by Swiss-Modelling. The phylogenetic lineage analysis indicated ShPAL was of the highest sequence identity and the shortest evolutionary distance with the PAL of *Epimedium sagittatum* from the same Berberidaceae family. Subcellular localization experiments showed that ShPAL protein was mainly distributed in the cytoplasm, despite of a minority on the endoplasmic reticulum membrane. Furthermore, ShPAL protein was recombinantly expressed in *Escherichia coli* and purified by histidine-tag affinity chromatography. Its enzymatic activity was determined up to 20.91 U/mg, with the optimum temperature of 41 °C and pH of 9.0. In contrast, the enzyme activity of its F130H mutant decreased by about 23.6%, yet with the same trends of change with temperature and pH, confirming that phenylalanine at this position does affect the substrate specificity of PAL. Both the wild type and the mutant have relatively poor thermostability, but good pH-stability. These results may help to further investigate the regulatory role of PAL in the process of podophyllotoxin biosynthesis and advance the heterologous synthesis of podophyllotoxin to protect the germplasm resource of *S. hexandrum*. They also demonstrate that ShPAL has a potential application in biochemical industry and biomedicine.

Keywords: *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) Ying; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning; bioinformatic analysis; enzymatic activity analysis

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC 4.3.1.5)催化氨从 L-苯丙氨酸中非氧化消除生成反式肉桂酸^[1], 主要存在于植物、真菌和少数细菌中。该酶属于氨基酸氨裂解酶/氨基

变位酶超家族, 在系统发育上可能由细菌组氨酸氨裂解酶(histidine ammonia-lyase, HAL)和酪氨酸氨裂解酶类(tyrosine ammonia-lyases, TAL)演化而来, 它们共同含有一种催化辅基——由活性

中心特征性基序内部三肽段(Ala-Ser-Gly, ASG)自催化环化和脱水形成的 4-甲基二烯基咪唑-5-酮(4-methyldienylimidazol-5-one, MIO)^[2-4]。目前,以欧芹、高粱、球形红杆菌和鱼腥藻 PAL 蛋白为代表的三维结构、酶活性位点、底物结合和特异性决定残基以及酶反应机制均已基本阐明^[5-8]。通过定点突变和定向进化手段改进目标 PAL 酶的一些特性(如活性、最适温度、最适 pH、可溶性、稳定性和底物选择性等),可推进其在生物化工和生物医学方面的应用^[9-12]。

在植物中 PAL 是苯丙烷类途径的入口关键酶,将 L-Phe 从莽草酸途径引导至反式肉桂酸的合成并进一步转化为成千上万种多酚类次生代谢物,包括苯醌、黄酮/花青素、香豆素、羟基肉桂酸酯、木脂素、单木酚及其聚合物木质素等许多亚类^[1,13]。这些多酚类物质作为结构支撑成分、病原菌防御素、抗氧化或抗紫外吸收化合物、植物与微生物相互作用的信号分子或传粉吸引色素,对植物的生长发育和适应环境(生物和非生物胁迫)起着重要作用,对植物从水生向陆生的演化以及垂直向上发展也具有显著促进作用^[3,13]。事实上,这些广泛生理功能都与关键酶 PAL 有关,同时 PAL 活性受到多方面调节以适应动态需要^[2,14-15],包括基因表达的转录调控^[16]、代谢产物的反馈抑制调节^[17]、翻译后共价修饰调节(泛素化降解、磷酸化降低酶活和稳定性)^[18-19]、同工酶调节(基因家族编码多个亚型)^[20]以及多酶复合物形式调节(与同一途径其他可溶性酶跟膜连细胞色素 P450 酶类互作,附在内质网膜上构成高效底物通道)^[21-23]。目前, PAL 已在许多不同种类的植物中得到基因克隆以及酶活和功能分析,如欧芹^[5]、拟南芥^[20,24]、玉米^[25]、高粱^[8]、绿竹^[26]、五彩苏^[27]、盐肤木^[28]、杜鹃^[29]、黄芪^[30]和生菜^[31]等。

鬼臼毒素是由部分植物或其内生真菌合成

的芳基四氢木酚天然木脂素,具有显著的抗肿瘤、抗病毒、抗虫、抗风湿、抗疟疾和免疫调节活性、已被广泛用作合成各种抗肿瘤药物(如临床用的依托泊苷、替尼泊苷)的前体。鬼臼毒素已发现存在于美洲鬼臼、西藏鬼臼、八角莲、峨参、亚麻、圆柏、连翘特别是桃儿七等植物中,它的生物合成途径目前已基本得到解析,由单木酚前体松柏醇历经至少 10 步酶促反应合成^[32]。

鬼臼毒素合成与积累受环境因子、激素以及营养条件等因素的影响^[32],也与苯丙烷类途径密切相关,因为前体松柏醇合成可以视为鬼臼毒素合成的早期阶段。红光^[33]、茉莉酸甲酯^[34]、水杨酸^[35]和真菌(如印度梨形孢)提取物^[36]处理都能显著提高亚麻培养细胞或发根组织的鬼臼毒素产量,桃儿七根组织培养物中鬼臼毒素积累还与 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 营养元素水平呈正相关^[37],这些都是因为增强了苯丙烷类分支——松柏醇合成途径的一些关键酶(特别是入口酶 PAL)的基因表达和酶活性,从而增大了前体松柏醇的合成和供应。这点随后被进一步充分证实, Schultz 等^[38]将西藏鬼臼的松柏醇合成主要途径(包括 PAL 在内的 8 个酶)连同脱氧鬼臼毒素(deoxypodophyllotoxin, DPT)合成途径(8 个酶)一同在本氏烟草叶片中瞬时过表达,突破性地实现了 DPT 在烟草中的毫克级异源合成, PAL 在其中也贡献显著。

鉴于 PAL 在苯丙烷类途径及对鬼臼毒素合成的重要性,本研究以鬼臼毒素含量目前最高的桃儿七根为材料,利用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站上桃儿七 SRA 核酸数据包设计引物,通过 RT-PCR 克隆桃儿七苯丙氨酸解氨酶基因 *ShPAL*,并对其进行系统的生物信息学分析,然后对大肠杆菌(*Escherichia coli*)重组表达并纯化的 ShPAL 蛋白进行酶活性和稳定性分析,确定其

酶活最适温度和 pH, 以期为进一步探究 PAL 在鬼白毒素生物合成过程中的调控作用及在其他方面的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

桃儿七种苗购于其国内主要分布区之一——四川省阿坝藏族羌族自治州, 移栽到基质土培养一个月左右获得生长状态正常的植株。大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3)以及 pET32a(+)、pBI(EcBAP)、pCAMBIA-1302 等载体均为实验室保存。TRIGene 总 RNA 提取试剂盒购自北京 GenStar 公司; 反转录试剂盒 EasyScript[®] cDNA Synthesis SuperMix、DNA 和蛋白分子量 Marker 购自北京 Transgen 公司; Phanta Max 超保真 DNA 聚合酶和 ClonExpress[®] II 无缝克隆试剂盒购于南京 Vazyme 公司; His 标签亲和层析柱 HisTrap FF crude 为 GE Healthcare 公司产品; 限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I、*Xba* I、*Hind* III 为北京 NEB 公司产品; 常用生化试剂为国产分析纯; 引物(表 1)合成和测序由北京 Tsingke 公司

完成。

1.2 方法

1.2.1 桃儿七 *ShPAL* 基因的克隆及突变体构建

取 0.1 g 桃儿七根为材料提取总 RNA, 将其反转录成 cDNA 作为模板; 分别利用引物对 ShPAL-uFw/ShPAL-dRv、ShPAL-5Nd/ShPAL-3Xh 进行 2 轮巢式 PCR 扩增, 得到 *ShPAL* 基因片段; 纯化后与 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切的载体 pET32a(+) 无缝重组连接, 转化 DH5 α 大肠杆菌, 并经菌落 PCR (使用引物 Pt7UP-Fw、ShPAL-3Xh) 鉴定出重组表达载体 pET(ShPAL) 的阳性转化子, 最后通过测序验证。

ShPAL 突变体 F130H 基因通过重叠延伸拼接法^[39]构建。以载体 pET(ShPAL) 为模板, 分别利用引物对 Pt7UP-Fw/ShPAL-mR、ShPAL-mF/PetHis-dRv 扩增出 *ShPAL* 的 2 个分段, 纯化后通过重叠区序列(由两引物 ShPAL-mR、ShPAL-mF 引入)互补退火合并为模板, 然后加引物 ShPAL-5Nd、ShPAL-3Xh 扩增出全长片段, 再如上所述克隆到 pET32a(+) 中, 获得测序验证的突变体表达载体 pET(F130H)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Size (bp)
ShPAL-uFw	ACCTCATTGGCTCTTCTTAAC	22
ShPAL-dRv	TCTAGTGTACTAAGTTGCCTTC	22
ShPAL-5Nd	AAGAAGGAGATATACATATGGGAAGTTTAGTGCAAG	36
ShPAL-3Xh	TGGTGGTGGTGGTGGCTCGAGACAGATAGGAAGAGGGCTAC	40
ShPAL-mF	GCTCATTAGACATTTGAACGCCGGAGTCTTTG	32
ShPAL-mR	GCGTTCAAATGTCTAATGAGCTCCTTCTGAAGTG	34
Pt7UP-Fw	ACCGCGAAATTAATACGACTCAC	23
PetHis-dRv	GCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAG	24
ShPAL-5F	GACACGCTGGAATTCTAGTATACTAAACCATGGGATCCTTAGTGCAAGAAACTCGAA	58
ShPALgf-R	TTTGGATCCGCCACCACCACAGATAGGAAGAGGGCTAC	38
ShPALgf-F	GGTGGTGGCGGATCCAAAGGAGAAGAACTTTTCACTG	37
NosT-Sq	GACCGGCAACAGGATTCAATC	21
VccEn-5Xb	GAGAACACGGGGGACTCTAGACACGCTGGAATTCTAGTATAC	42
mGFP5-3X	AGCTCAGTAGCAATTCTCGAGTCATTTGTATAGTTCATCCATGCCA	46

1.2.2 ShPAL 蛋白的亚细胞定位分析

分别以 pET(ShPAL)、pCambia-1302 质粒为模板, 用引物对 ShPAL-5F/ShPALgf-R、ShPALgf-F/NosT-Sq 扩增出 *ShPAL* 和 *GFP* 片段, 然后利用引物对 VecEn-5Xb/mGFP5-3X 将 2 片段通过重叠延伸拼接法融合, 并经重组克隆法插入到植物表达载体 pBI(EcBAP)^[40] 的 *Xba* I 和 *Xho* I 位点之间(替代 *EcBAP* 片段), 获得 *ShPAL-GFP* 融合表达的植物双元载体 pBI(ShPAL-GFP)。

通过北京 Tsingke 公司合成 *Pd35s:mCherry-AtCytB5B_c33:T35s* 的 DNA 片段[两端带 *Hind* III 位点; *Pd35s* 为双 CAMV 35S 启动子, *T35s* 为 CAMV 35S 终止子, 均来源于 pCambia-1302 质粒; *mCherry* 红色荧光蛋白基因根据烟草密码子偏爱性优化; *AtCytB5B_c33* 为拟南芥细胞色素 CytB5B 羧基末端 33 个氨基酸(102–134 aa)的编码序列^[41]], 经 *Hind* III 酶切插入到 pBI(ShPAL-GFP) 质粒中, 构建含 *ShPAL-GFP*、*mCherry-AtCytB5B_c33* 双表达盒的植物双元载体 pBI(RPG)。

将 pBI(RPG)载体通过冻融法转入根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 中, 然后参照 Sharma 等^[42] 描述的详细步骤对本氏烟草叶片实施农杆菌侵染, 3 d 后通过 Olympus 公司的激光共聚焦显微镜(confocal) FV10-ASW 进行观察和拍照, 分析 ShPAL 蛋白在细胞中的定位情况。

1.2.3 ShPAL 及其突变体重组蛋白的表达纯化和电泳分析

将载体 pET(ShPAL)、pET(F130H)分别转化大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3), 挑单克隆摇菌至 OD_{600} 为 0.5, 加终浓度为 0.5 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)于 37 °C 诱导表达 4 h。诱导菌经超声裂解后, 用 His 标签亲和层析柱进行重组蛋白的纯化。蛋白诱导表达情况及纯化过程通过 12% 十

二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测, 样品包括诱导前、后的细菌总蛋白(UI、T)、T 离心后的沉淀(P)和上清(S)组分、上清经纯化柱的穿透液(FT)以及 100 mmol/L 咪唑洗脱流出液(E), 详细步骤参照 Yuan 等^[40]。依照蛋白分子量 Marker 的上样量, 通过 Quantity One 软件(Bio-Rad 公司)对凝胶蛋白条带的灰度定量法估算纯化后重组蛋白的浓度。

1.2.4 ShPAL 及其突变体的酶活和稳定性分析

参照张健慧等^[43] 所述的分光光度法测定 ShPAL 的酶活性。将纯化后的 ShPAL 或其突变体酶液加入 2.5 mL 的反应体系[含 0.5 mL 的 0.01 mol/L L-Phe 底物、2 mL 的 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.5)缓冲液]中, 于 37–57 °C 范围(取 6 个温度点, 间隔 4 °C)分别反应 1 h, 加入 0.3 mL 的 6 mol/L 盐酸终止反应。用分光光度计测定反应液在 290 nm 紫外波长下的吸光值, 并通过标准曲线确定生成反式肉桂酸的量以计算 PAL 酶活(1 U 相当于生成肉桂酸 1 μ g/mL), 再根据所用酶液的蛋白含量计算出它的比活性(U/mg), 然后通过 SigmaPlot 15 软件对温度点进行作图并确定酶的最适反应温度。另外, 通过类似方法确定酶的最适 pH, 只是将反应温度固定为 37 °C, 而将反应缓冲液的 pH 在 6–10 范围内变动, 从中选 9 个 pH 点(间隔 0.5)进行测试。

同时, 将 ShPAL 及其突变体的纯化酶液分别进行梯度温度(40–70 °C, 间隔 10 °C)和梯度 pH (6–10, 间隔 1)处理 2 h, 然后在标准反应条件(37 °C、pH 8.5)下按上述方法测定残留酶活, 以评价它们各自的热稳定性和 pH 稳定性。

1.2.5 ShPAL 基因及其编码蛋白的生物信息学分析

对 *ShPAL* 基因: 利用 BLASTN 程序比对分析 NCBI 的 SRA 核酸数据库。对 *ShPAL* 编码

蛋白: 利用 ExPASy 在线工具 ProtParam 预测分子量和等电点, ProtScale 以默认算法进行亲疏水性预测; 利用 DTU 在线工具 TMHMM 2.0 预测跨膜结构, SignalP 6.0 进行信号肽分析, NetNGlyc 1.0 预测 N-糖基化位点, NetPhos 3.1 预测磷酸化位点, DeepLoc 2.0 进行亚细胞定位信号分析; 通过 STRING Server 在线分析蛋白相互作用; 利用 SOPMA 和 Jpred4 Server 进行二级结构预测; 采用 Phyre2 和 Swiss-Model Server 进行三维结构同源建模, 并用 PyMOL 2.5 完成绘图; 利用 InterPro 和 NCBI 的 Conserved Domain Search 分析保守结构域和功能位点; 通过 ClustaW 1.83 软件进行多重序列比对; 利用 BLASTP 程序比对 NCBI 的蛋白数据库, 并通过 MEGA 7.0 软件以邻近 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统进化树。另外, 基因和蛋白序列的两两比对分析通过 Vector NT Suite 11.0 软件完成。

2 结果与分析

2.1 桃儿七 *ShPAL* 基因的克隆和序列分析

桃儿七 *ShPAL* 在西藏鬼臼植物中对应的参照基因已有编码区序列 (coding sequence, CDS) 公布^[38], 由于相同物种不同生态型的基因序列也可能存在差异, 本研究首先选取该 CDS 的 5' 和 3' 末端各 40 bp 作为检索序列, 通过 BLASTN 程序比对甘肃农业大学栗孟飞课题组^[37] 发表在 NCBI 网站的桃儿七 SRA 转录组数据包 SRX4112555, 分别得到最佳匹配项 SRR7196729.11763625.2、SRR7196729.28847720.1 (每条 SRA 序列长 125 bp), 并依据它们设计编码区上游侧翼引物 *ShPAL*-uFw 和下游侧翼引物 *ShPAL*-dRv (图 1A, 表 1) 以及一对分别匹配编码区 5' 末端和 3' 末端的内嵌式引物 *ShPAL*-5Nd 和 *ShPAL*-3Xh

(表 1), 用于重组克隆。

鬼臼毒素在桃儿七根中的有效成分含量最高, 推测其合成途径的酶基因在根中有较高的表达水平, 因而选取植株的幼嫩根为材料提取总 RNA, 经电泳检测有 3 个标志性的 rRNA 条带 (28S、18S、5.8S), 未有明显降解 (图 1B.a)。以桃儿七根 RNA 反转录产物为模板, 用引物 *ShPAL*-uFw、*ShPAL*-dRv 进行第一轮扩增, 得到与预期大小 (2 188 bp) 一致的 PCR 产物 *ShPAL*-1st (图 1B.b), 稀释后作为第二轮巢式 PCR 的模板, 用引物 *ShPAL*-5Nd、*ShPAL*-3Xh 扩增得到大小约 2 170 bp 的基因片段 *ShPAL* (图 1B.c)。然后通过无缝重组克隆法和菌落 PCR 鉴定, 得到 *ShPAL* 基因表达载体 pET(*ShPAL*) 的大肠杆菌重组克隆 (图 1B.d), 并经测序验证。

将克隆的 *ShPAL* 基因完整 CDS 与桃儿七 SRA 数据包 SRX4112555 再用 BLASTN 程序比对, 结果显示有许多 100% 同源匹配项, 且能组装成含全长 CDS 的重叠群 (contig) (图 1C), 其序列信息现已提交 GenBank 数据库 (序列号为 MW531745)。将 *ShPAL* 与来自西藏鬼臼的参照基因^[38] 进行比对, 发现 CDS 共 2 136 个核苷酸 (Nt) 中有 88 个不同, 差异度为 4.12%, 而其推导蛋白 (Pt) 共 711 个氨基酸中有 9 个不同, 差异度为 1.266% (图 1D)。

2.2 桃儿七 *ShPAL* 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 *ShPAL* 蛋白的基本属性分析

桃儿七 *ShPAL* 编码蛋白由 711 个氨基酸组成。ProtParam 预测 *ShPAL* 蛋白的理论等电点为 5.97, 相对分子量为 77.44 kDa, 不稳定指数为 44.93; ProtScale 预测 *ShPAL* 的亲水区间较疏水区多, 亲水性平均值为 0.780, 推测它属于一类亲水偏酸性的略稳定蛋白。SignalP 信号肽、

TMHMM 跨膜结构和 DeepLoc 亚细胞定位预测分析表明, *ShPAL* 蛋白可能是一种无信号肽和

跨膜结构的非分泌型胞质蛋白。另外, NetNGlyc 预测显示 *ShPAL* 蛋白含有 3 个 N-糖基化位点,

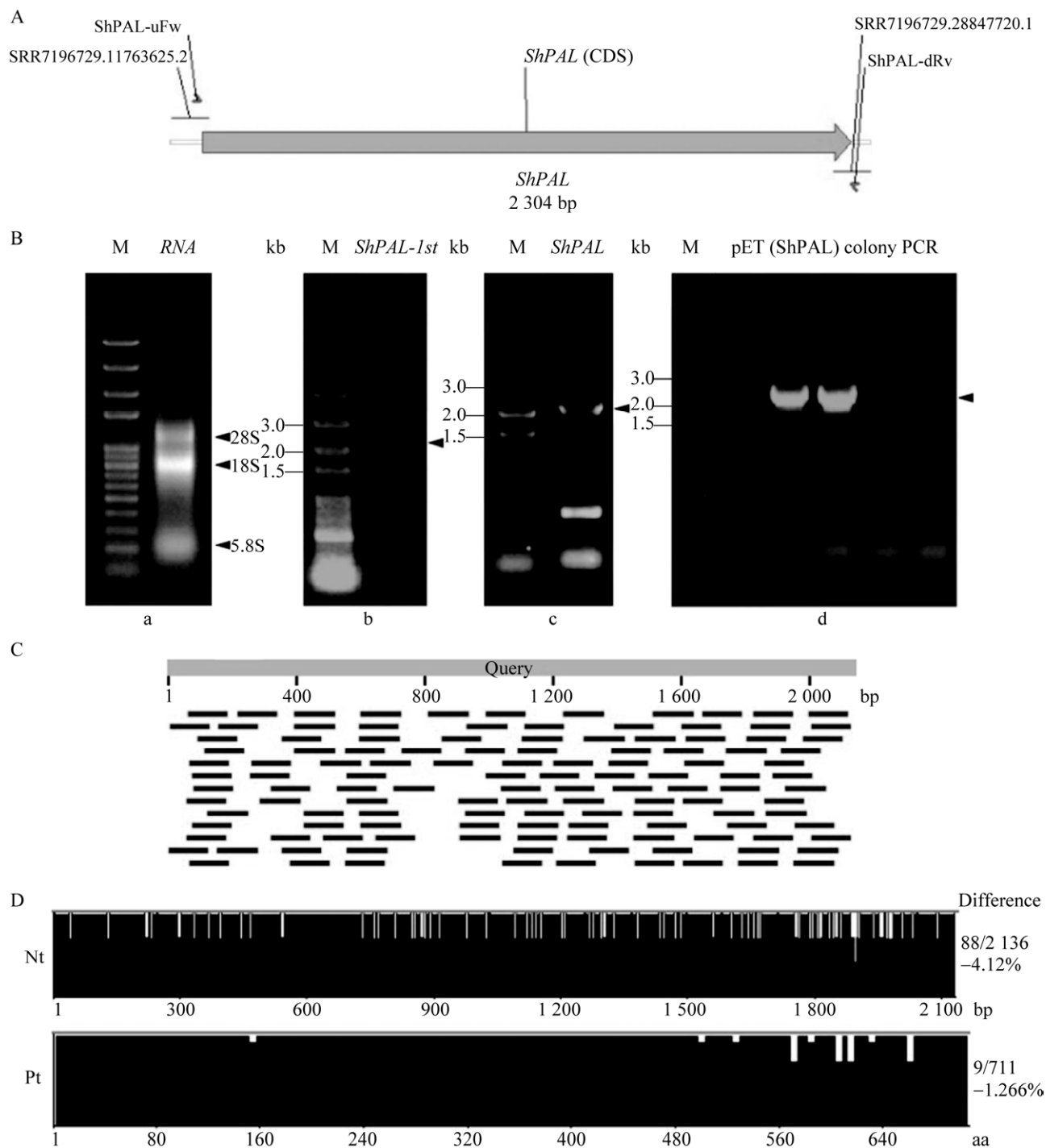


图1 *ShPAL* 基因的克隆

Figure 1 Gene cloning of *ShPAL*. A: Schematic diagram of *ShPAL* primer design. B: *ShPAL* gene cloning process. C: Alignment of *ShPAL* CDS against SRA data-package SRX4112555. D: Pairwise alignment of *ShPAL* CDS with its reference gene on both sequences of DNA (Nt) and deduced protein (Pt).

其中 N255 预测分最高(为 0.730)。NetPhos 预测发现 ShPAL 蛋白存在 64 个磷酸化修饰位点(38 个丝氨酸、18 个苏氨酸、8 个酪氨酸,图 2A)。其中,丝氨酸磷酸化占主导地位,而且几处(S113、S365、S368、S675)预测得分非常高,均超过 0.99;另外, T544 磷酸化位点(预测分 0.785)在菜豆中已被实验证实^[19]。通过 STRING 预测还发现, ShPAL 在拟南芥中的同源酶蛋白 PAL1 与苯丙烷类代谢途径一些相关酶(特别是 C4H、4CL1)之间的相互作用分值很高(接近最大值 1,图 2B),推测它们能形成一个酶复合体,提供一个底物通道形式有利于代谢进行^[21]。

2.2.2 ShPAL 蛋白的结构特征分析

比对搜索 InterPro 数据库,结果显示桃儿七 ShPAL 蛋白的一级结构包含 N-端 MIO 域(MIO domain, 13–257)、核心域(core domain, 258–523、

646–705)和 C-端嵌入的屏蔽域(inserted shielding domain, 524–645), MIO 域中有苯丙氨酸/组氨酸解氨酶(PAL/HAL)活性中心的特征性基序(193–209),基序内有形成 MIO 辅助基团的 ASG 三联体(197–199)(图 3A)。通过 SOPMA 预测发现, ShPAL 蛋白的二级结构主要由 α -螺旋(56.54%)和无规则卷曲(30.10%)组成,另外两种结构元件——延伸 β 链和 β 转角分别仅为 8.02%和 5.34%(图 3B)。利用 BLASTP 程序搜索 NCBI 的 PDB 蛋白结构数据库,发现与 ShPAL (序列号 UGB90594)有效匹配、具有三维结构模型的模板蛋白并不多,但覆盖了双/单子叶植物、裸子植物、真菌和蓝细菌,其中最佳匹配项为欧芹(*Petroselinum crispum*) 1W27_A,两者的序列相似度为 86.12%(图 3C)。以 1W27_A 为参考模板通过 Phyre2 同源建模,结果显示 ShPAL 蛋白单体的三级结构具有典型的“海马状”结构,各个

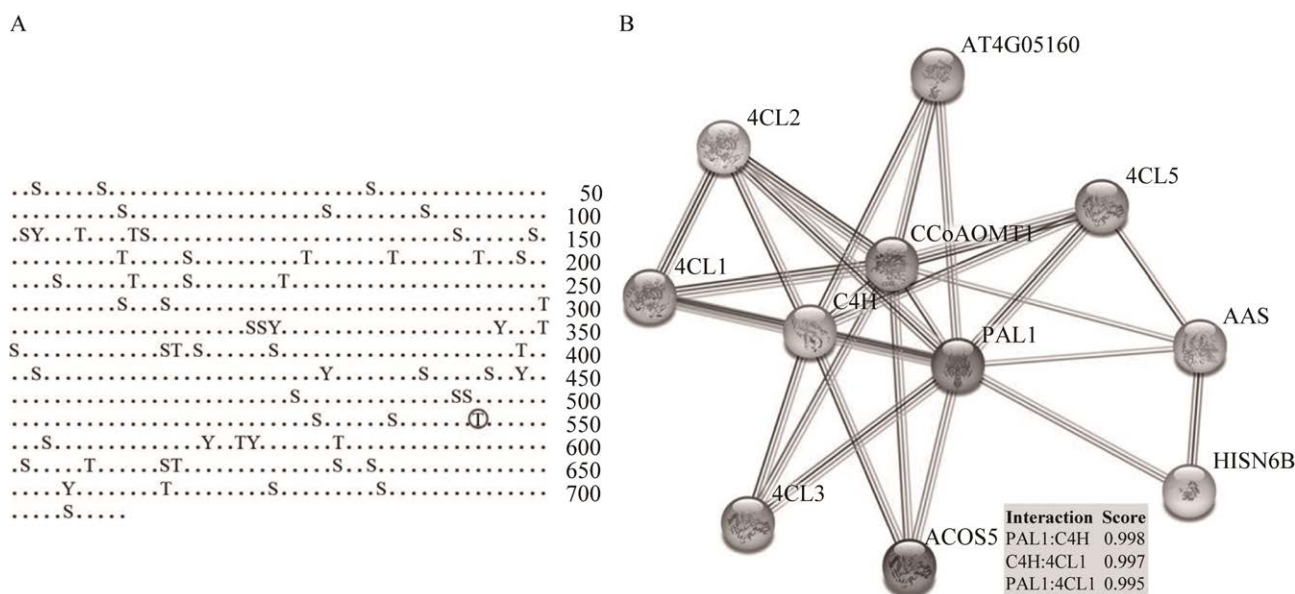


图 2 ShPAL 的磷酸化修饰位点和蛋白相互作用预测

Figure 2 Prediction of phosphorylation modification site (A) and protein interaction (B) of ShPAL. The circled is the T544 residue of ShPAL, corresponding to the phosphorylation site identified in bean PAL. PAL: Phenylalanine ammonia-lyase; C4H: Cinnamate 4-hydroxylase; 4CL: 4-coumarate-CoA ligase.

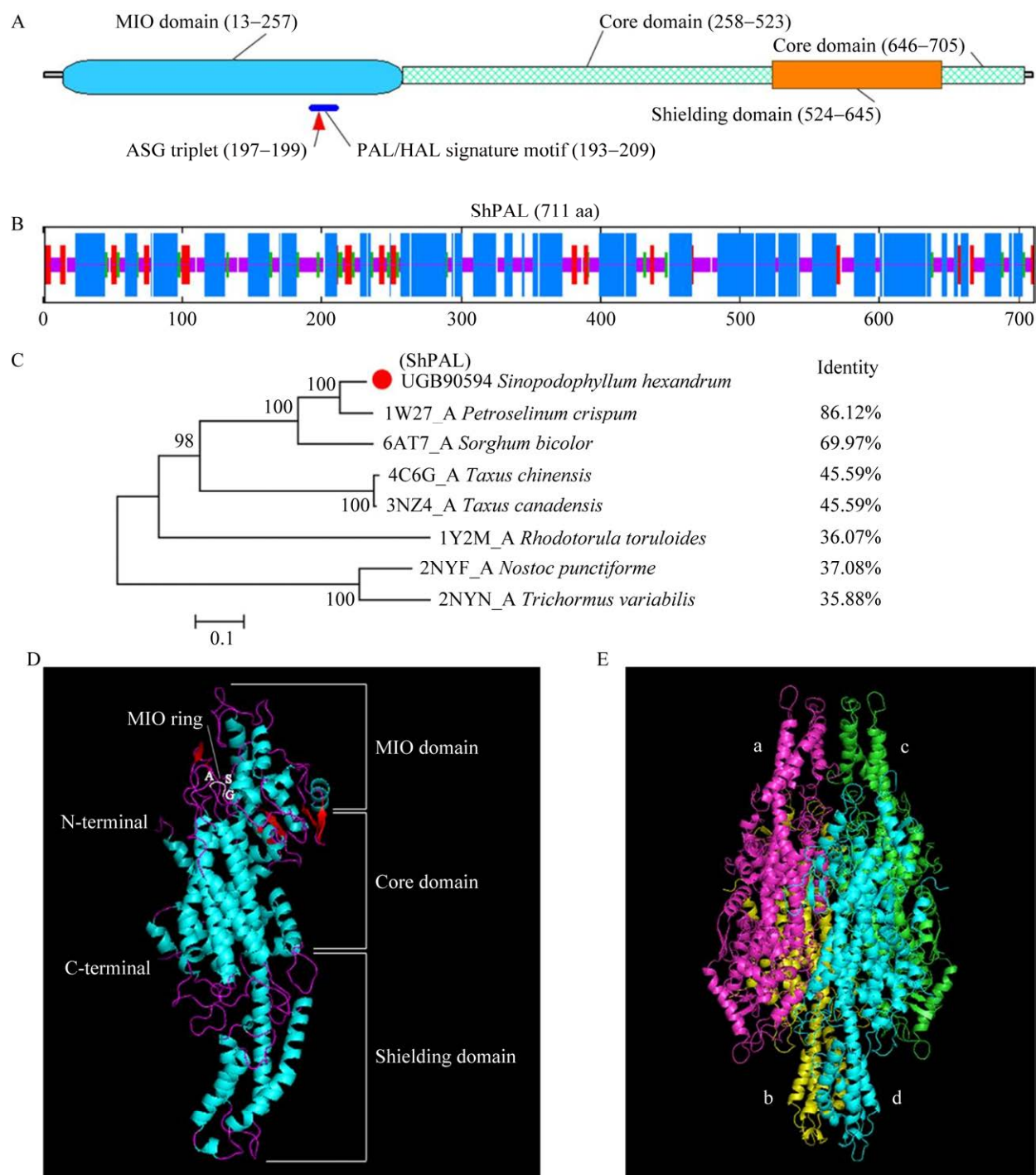


图3 ShPAL 蛋白的结构特征

Figure 3 Structural characteristics of ShPAL protein. A: Domain composition. B: Secondary structure prediction. C: BLAST against PDB database. D: Monomer tertiary structure by modeling. E: Three-dimensional structure by modeling.

结构域(MIO 域、核心域和屏蔽域)由上而下分段清晰, ASG 三联体位于 MIO 环上(图 3D)。

同时, Swiss-Model 同源建模结果表明, ShPAL 蛋白的空间结构(即四级结构)模型为同

源四聚体,与使用 X 射线晶体衍射得到的欧芹 PAL 三维结构相一致(图 3E);该模型的拉氏图(Ramachandran plot)数值为 93.52%,说明该蛋白绝大多数残基的二面角(ψ 和 ϕ)位于核心区域,空间结构稳定,因此该建模结果置信度高。

2.2.3 ShPAL 蛋白的保守结构域分析

将 ShPAL 蛋白比对搜索 NCBI 的保守域数据库(conserved domain database, CDD),结果显示该蛋白具有严格保守的酶活性位点(17 个存在于 103–391 区域)和形成四聚体界面的残基,能够高度特异(E-value: 0e+00)地匹配 PLN02457 (9–711)、phe_am_lyase (20–701)、Lyase_aromatic (58–527)、PAL-HAL (56–521) 4 个结构域条目,并且归于 Lyase_I_Like 超家族,推测 ShPAL 具备芳香族氨基酸解氨酶活性,以同源四聚体形式催化 L-苯丙氨酸转化为肉桂酸。

2.2.4 ShPAL 蛋白的多重序列比对和系统进化树的构建

选取几种已完成活性和/或结构分析的代表性高等植物 PAL (双子叶:欧芹 PcPAL1、拟南芥 AtPAL2,单子叶:玉米 ZmPAL1、高粱 SbPAL1)以及数据库中与 ShPAL 同源性最高的三枝九叶草 EsPAL,通过 ClustaW 进行多重序列比对,结果(图 4)显示这些不同 PAL 蛋白的序列相似度较高,差异主要出现在末端(尤其是 N-端);在功能区域则较为保守,特别是酶活性中心位点序列高度一致,均为 GTITASGDLVPLSYIAG (ShPAL 的 193–209 位),包含形成 MIO 基团的 ASG 三联体(197–199 位,位于 MIO 环上),符合 PAL/HAL 活性中心的共有基序特征(G-[STG]-[LIVM]-[STG]-[AC]-S-G-[DH]-L-X-P-L-[SA]-X(2)-[SAV])。ShPAL 也有典型的 Tyr-环(97–120 位),其上有保守催化残基 Tyr103,该结构的柔韧性可能与酶的活性和稳定性有关。

ShPAL 还存在形成疏水性底物结合口袋的保守残基 L127、F130、L131、L201、L251、V254、I455,其中 F130 可能是酶底物特异性的标志残基。另外,邻近 ShPAL 最长 α -螺旋尾端的苏氨酸残基(T544)在其他植物 PAL 中也是十分保守,该位点在菜豆 PAL 中已被证实容易发生磷酸化修饰,可能影响屏蔽域的构象从而限制底物进入和降低酶活性^[19]。

通过 BLASTP 工具将 ShPAL 与 NCBI 的非冗余(non-redundant, nr)蛋白数据库进行同源比对分析,结果显示 ShPAL 与不同类植物 PAL 均有较高的序列相似性,在检索序列覆盖率(query coverage)大于 90%情况下,与双子叶植物、单子叶植物、裸子植物、苔藓植物和蕨类植物 PAL 的普遍相似度依次为 75%–91%、70%–84%、65%–72%、61%–69%、56%–67%,但与真菌 PAL 的相似度较低(32%–38%)。另外,细菌 PAL 相对较小,其中蓝细菌 PAL 偏大一些(为 550–600 aa),但与 ShPAL 的检索序列覆盖率仅在 65%–70% 范围,而且相似度也不高(32%–40%)。

从比对项中收集 75 条代表性 PAL 蛋白序列(表 2),包括被子植物——双子叶植物(39 条)和单子叶植物(14 条)、裸子植物(6 条)、苔藓植物/蕨类植物/真菌/蓝细菌(各 4 条),通过 MEGA 软件构建系统进化树,发现结果完全能反映物种亲缘关系的远近(图 5)。不同来源的 PAL 能够分纲、分目和分科聚类(在被子植物中非常明显),没有出现生物类别偏离,这与生物进化趋势总体一致,也符合传统分类。而且,还可以将结果进一步统分为 4 大类: A 类为被子植物(双子叶植物和单子叶植物), B 类为裸子植物、苔藓植物和蕨类植物, C 类为真菌, D 类为蓝细菌代表的细菌。桃儿七 ShPAL

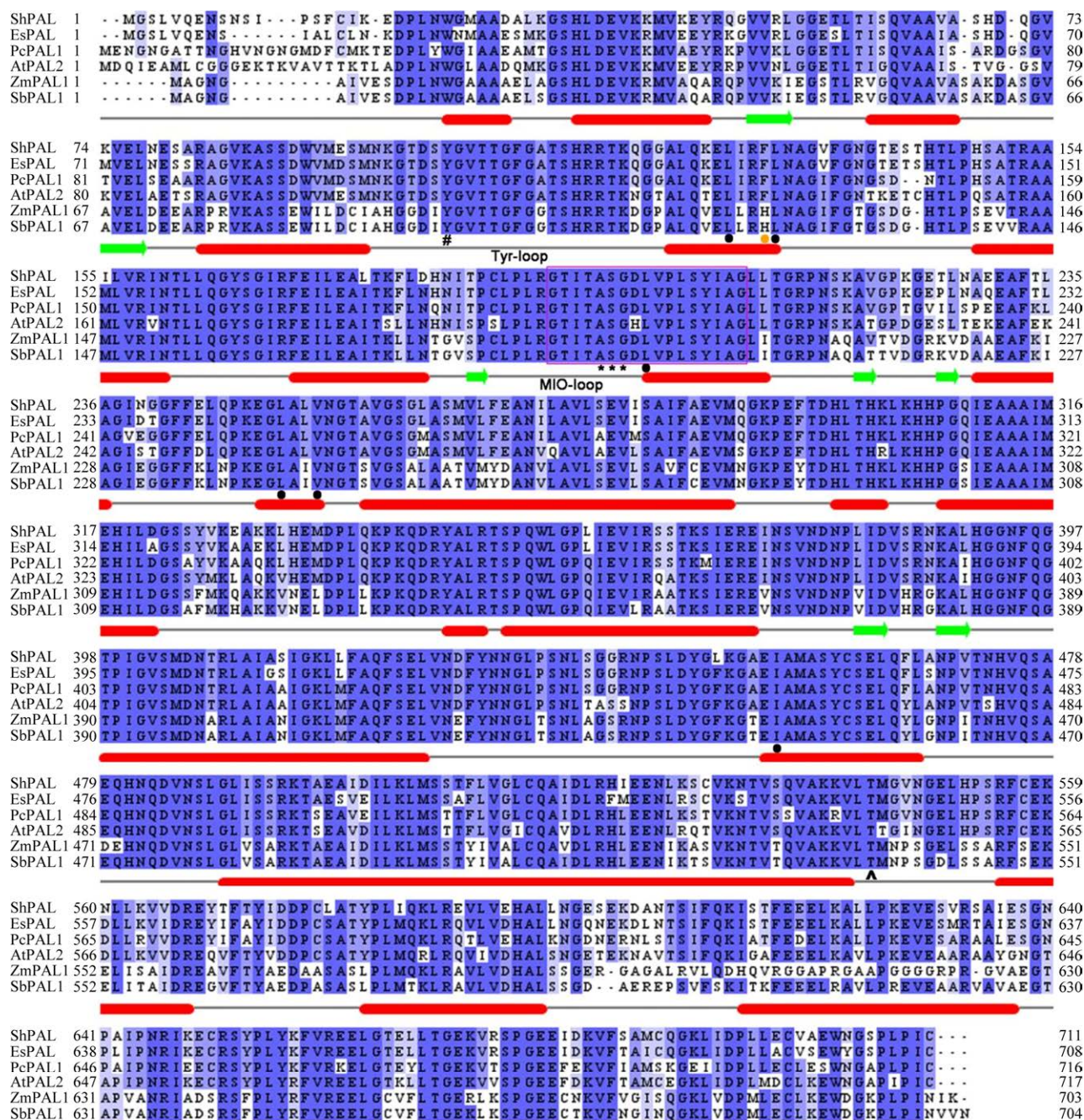


图4 ShPAL与其他植物PAL的多重序列比对

Figure 4 Multiple sequence alignments between ShPAL and other plant PALs. ShPAL: *Sinopodophyllum hexandrum* PAL (UGB90594); EsPAL: *Epimedium sagittatum* PAL (ADO64252); PcPAL1: *Petroselinum crispum* PAL (CAA68938); AtPAL2: *Arabidopsis thaliana* PAL (AAC18871); ZmPAL1: *Zea mays* PAL (AAL40137); SbPAL1: *Sorghum bicolor* PAL (XP_002454198). Purple box shows the signature motif of PAL/HAL; * indicates the ASG triplet forming MIO group; # indicates the catalytic residue Y103 located on Tyr-loop; ^ indicates T544, corresponding to the phosphorylation site identified in bean PAL; Solid dots mark the conserved residues forming the hydrophobic substrate binding pocket, of which an orange dot marks the determinant residue for substrate specificity. Below the sequence block is the secondary structure generated by ShPAL homologous modeling (shown by Jpred4): The red column, green arrow, and grey line indicate α -helix, extended β -strand, and random coil, respectively.

表 2 系统进化树分析所用 PAL 序列号及其物种名

Table 2 The accession numbers and source species of PALs used in phylogenetic tree analysis

Accession numbers	Source species	Accession numbers	Source species
Dicotyledonidae		Monocotyledonidae	
AAA34176	<i>Solanum lycopersicum</i>	ADO24189	<i>Allium sativum</i>
AGT63063	<i>Solanum tuberosum</i>	AWW24969	<i>Lycoris radiata</i>
AIA66448	<i>Capsicum annuum</i>	XP_042468687	<i>Zingiber officinale</i>
BAA22947	<i>Nicotiana tabacum</i>	BAG70982	<i>Musa balbisiana</i>
AAL55242	<i>Lactuca sativa</i>	ACX31738	<i>Bambusa oldhamii</i>
XP_022024406	<i>Helianthus annuus</i>	XP_015633749	<i>Oryza sativa</i>
ABD73282	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	XP_004976241	<i>Setaria italica</i>
AFZ94859	<i>Coleus scutellarioides</i>	XP_034606006	<i>Setaria viridis</i>
P45729	<i>Petroselinum crispum</i>	QJS40207	<i>Hordeum vulgare</i>
BAA23367	<i>Daucus carota</i>	QAT18627	<i>Triticum aestivum</i>
OVA18049	<i>Macleaya cordata</i>	AFY17067	<i>Panicum virgatum</i>
XP_026403210	<i>Papaver somniferum</i>	XP_021319560	<i>Sorghum bicolor</i>
QSL83319	<i>Nigella sativa</i>	ABM63378	<i>Saccharum officinarum</i>
KAF9594775	<i>Coptis chinensis</i>	PWZ41108	<i>Zea mays</i>
PIA26823	<i>Aquilegia coerulea</i>	Gymnospermae	
KAF5189873	<i>Thalictrum thalictroides</i>	AFX98070	<i>Cunninghamia lanceolata</i>
KAF6166260	<i>Kingdonia uniflora</i>	ABU49842	<i>Ginkgo biloba</i>
ADO64252	<i>Epimedium sagittatum</i>	ACS28225	<i>Pinus massoniana</i>
UGB90594 (ShPAL)	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	AHX74218	<i>Pinus taeda</i>
AAC78457	<i>Prunus avium</i>	ABK24709	<i>Picea sitchensis</i>
XP_024187208	<i>Rosa chinensis</i>	QFI56873	<i>Picea asperata</i>
ACC63889	<i>Populus trichocarpa</i>	Bryophyta	
AKM21231	<i>Salix viminalis</i>	QCF46618	<i>Pohlia nutans</i>
AEX32784	<i>Vitis vinifera</i>	PNR62392	<i>Physcomitrium patens</i>
QDE09458	<i>Vitis amurensis</i>	WAB23842	<i>Syntrichia caninervis</i>
XP_031743814	<i>Cucumis sativus</i>	KAG0587727	<i>Ceratodon purpureus</i>
AKN08993	<i>Luffa aegyptiaca</i>	Pteridophyta	
BAO01110	<i>Vigna radiata</i>	AAW80643	<i>Struthiopteris spicant</i>
NP_001343987	<i>Glycine max</i>	AAW80642	<i>Ophioglossum reticulatum</i>
CAA41169	<i>Medicago sativa</i>	AAW80641	<i>Botrypus virginianus</i>
XP_050910588	<i>Pisum sativum</i>	AAW80640	<i>Psilotum nudum</i>
EOY07856	<i>Theobroma cacao</i>	Fungi	
AER12109	<i>Gossypium hirsutum</i>	AHD25301	<i>Flammulina velutipes</i>
AQD20651	<i>Hevea brasiliensis</i>	PRQ72538	<i>Rhodotorula toruloides</i>
AGY49231	<i>Ricinus communis</i>	KAF5593867	<i>Fusarium subglutinans</i>
ADL09136	<i>Brassica oleracea</i>	PLB41347	<i>Aspergillus candidus</i>
NP_181241	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cyanobacteria	
XP_021856773	<i>Spinacia oleracea</i>	BAU64849	<i>Stanieria</i> sp. NIES-3757
CAH17686	<i>Beta vulgaris</i>	GAX45609	<i>Tolypothrix</i> sp. NIES-4075
		B2J528	<i>Nostoc punctiforme</i>
		Q3M5Z3	<i>Trichormus variabilis</i>

Different modules alternately separated by light grey and medium grey mainly represent different families in Angiospermae plants.

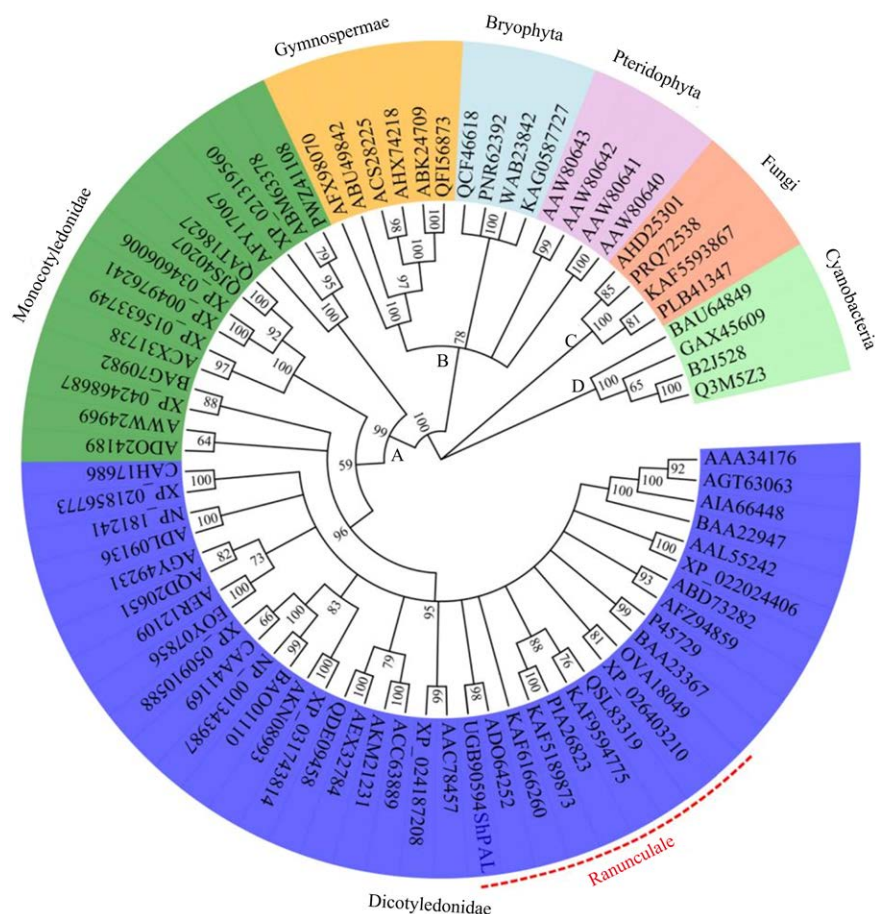


图 5 ShPAL 与其他物种 PAL 的系统进化树

Figure 5 The phylogenetic tree of ShPAL and PALs from other species. The source species of PALs with different accession numbers are listed in Table 2. A: Angiospermae (Dicotyledonidae (blue) and Monocotyledonidae (green)). B: Gymnospermae (orange), Bryophyta (light blue), and Pteridophyta (plum). C: Fungi (coral). D: Cyanobacteria (light green). The dotted red line indicates the Ranunculale plants.

(UGB90594)可归于 A 类双子叶植物,与三枝九叶草 EsPAL (ADO64252)的序列相似度最高(91.14%),两者的进化距离最短,均来源于小蘗科,而且与同属毛茛超目的其他几种植物(独叶草、黄连、唐松草、黑种草、罂粟和博落回等)PAL 都邻近聚集,目前许多具重要功效的木脂素或生物碱类型的天然产物都来源于该超目下的植物物种。

2.3 ShPAL 蛋白的亚细胞定位

本研究构建的植物双元载体 pBI(RPG)整合了 *ShPAL-GFP*、*mCherry-AtCytB5B_c33* 两个融合基因表达盒(图 6A), 分别受 *P35s* (CAMV 35S

启动子)、*Pd35s* (双 CAMV 35S 启动子) 组成型控制表达, 基因融合处都有柔性连接(linker)序列隔开, 有力保证了表达的荧光蛋白(GFP、mCherry)不会因空间位阻而活性受损。另外, 红色荧光蛋白与拟南芥细胞色素 CytB5B 羧基末端 33 个氨基酸(102–134 aa)融合已被证明为一种非常特异的内质网膜蛋白定位标志物^[41]。

通过激光共聚焦显微镜观察农杆菌侵染后的本氏烟草叶片,发现 pBI(RPG)瞬时表达的 ShPAL-GFP 融合蛋白在细胞中的分布情况与对照 pCambia-1302 表达的 GFP 相似,大都在细胞质中,但有少部分绿色荧光信号与其表达的

mCherry-AtCytB5B_c33 红色荧光(内质网膜特异性 marker)重叠,呈现黄色,说明 ShPAL 在细胞中的定位以胞质为主,少量也会定位到内质网膜上(图 6B)。

2.4 ShPAL 及其突变体 F130H 在大肠杆菌中的重组表达

将 ShPAL 在大肠杆菌 BL21(DE3)中重组表

达并通过 SDS-PAGE 检测。结果显示, ShPAL 在 37 °C 诱导下能够高效表达, 并且可溶性表达水平超过 50%, 经 His 标签亲和层析纯化的得率也较高(图 7A)。将纯化的 ShPAL 蛋白经梯度温度(37–50.5 °C)处理后电泳分析发现, ShPAL 具有一定的耐热性, 在 50.5 °C 高温处理后的可溶性无变化(图 7B)。

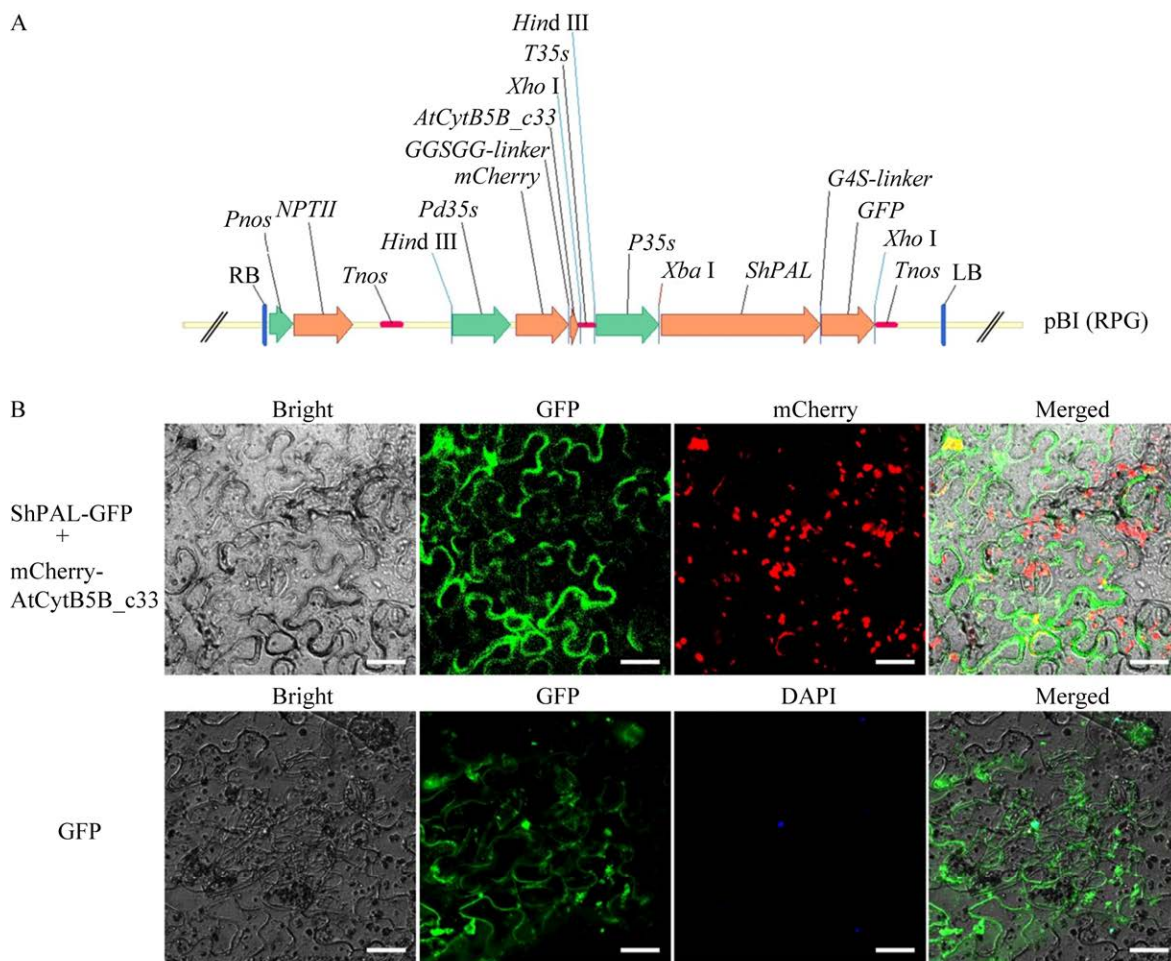


图 6 ShPAL 蛋白的亚细胞定位

Figure 6 Subcellular localization of ShPAL protein. A: Diagram of plant binary vector pBI(RPG). *Pnos*: *nos* promoter; *P35s*: CAMV 35S promoter; *Pd35s*: Duplicated CAMV 35S promoter; *Tnos*: *nos* terminator; *T35s*: CAMV 35S terminator; LB: Left border of T-DNA; RB: Right border of T-DNA. B: Upper panel: Confocal images (bright, GFP, mCherry, and merged) of tobacco leaves infiltrated with pBI(RPG)-harbored *Agrobacterium*; Lower panel: Confocal images (bright, GFP, DAPI, and merged) of tobacco leaves infiltrated with *Agrobacterium* of the GFP control vector pCambia-1302; Bar=50 μm.

目前,不同来源 PAL 上邻近 Tyr-环右侧的保守 Phe 残基(即 ShPAL 的第 130 位)已被认为是 Phe 底物特异性的决定因子^[8,26,28],将其突变为 His 残基不仅大大降低了 PAL 酶活性,而且显著新增了 Tyr 解氨酶(TAL)的活性。事实上,不少单子叶植物 PAL 亚型在此位置上天然存在 His 残基(图 4),表现出 PAL/TAL 双功能酶活性^[2]。为了验证 ShPAL 的 F130 残基与其底物特异性的关系,通过重叠延伸拼接法构建了 F130H 突变体基因,它的重组表达和纯化结果类似于 ShPAL。

2.5 ShPAL 及其突变体 F130H 的酶活分析

根据目前已知 PAL 酶活的最适温度^[24-31],本研究设定从 37–57 °C 范围内间隔 4 °C 选取 6 个温度点测定酶活。结果显示,ShPAL 及其突变体 F130H 的酶活性随温度变化的趋势基本一致:在 41 °C 都达到最大值(各为 20.91、15.98 U/mg),在 49 °C 分别下降到其最大值的 62.6%、73.8%,在 57 °C 进一步下降至 42.1%、37.3% (图 8A),说明

ShPAL 酶活的最适温度为 41 °C。

同样,根据目前已知 PAL 酶活的最适 pH^[24-31],本研究设定从 6.0–10.0 范围内间隔 0.5 选取 9 个 pH 点测定酶活。结果显示,ShPAL 及其突变体 F130H 的酶活性随 pH 变化的趋势也基本一致: pH < 6.5 时几乎为零,然后随 pH 增加而增加,到 pH 9.0 时达到最大值(各为 19.18、15.26 U/mg),接着开始下降,不过到 pH 10 时仍保持接近于 pH 8.0 时的水平(约为最大值的一半),说明 ShPAL 酶活的合适 pH 范围为 8.0–10.0,最适 pH 为 9.0 (图 8B)。

另外,从图 8 还可以看出,在大多数温度、pH 点情况下,突变体 F130H 的酶活都显著低于 ShPAL。例如,在最适温度、最适 pH 条件下,突变体 F130H 酶活都不及 ShPAL 的 80% (分别为 76.4%、79.6%),说明 ShPAL 第 130 位的苯丙氨酸突变为组氨酸确实使其酶活性下降,可能是影响了其底物特异性的缘故。

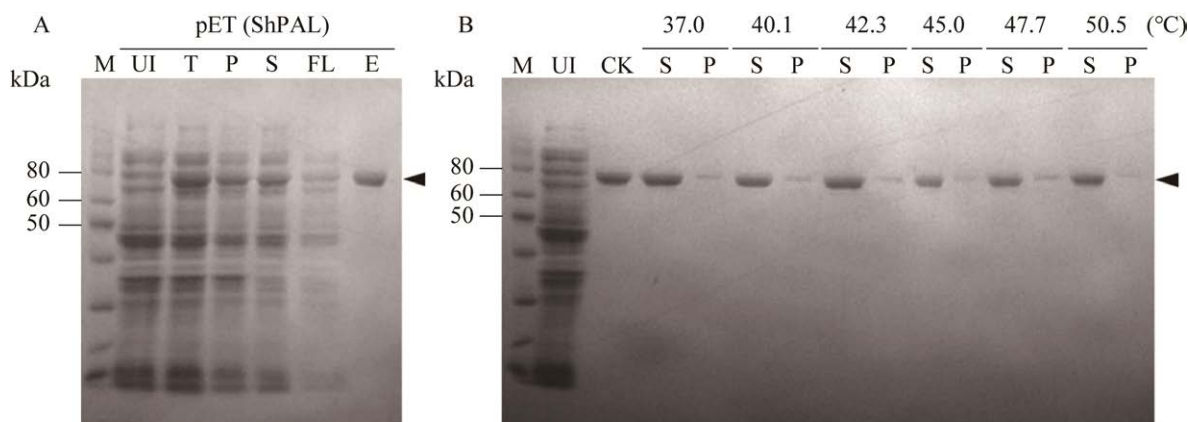


图 7 SHPAL 在大肠杆菌中的重组表达

Figure 7 Recombinant expression of ShPAL in *Escherichia coli*. A: *E. coli* BL21(DE3) strain harboring pET(ShPAL) was induced by IPTG, the expressed proteins of which were analyzed by SDS-PAGE. M: Protein marker; UI, T: The total bacterial protein before and after induction, respectively; P, S: The pellet and supernatant after centrifugation, respectively; FL: The flow-out of S through the purification column; E: The elute of 100 mmol/L imidazole through the column. B: SDS-PAGE appraisal of the solubility change with temperature on the purified ShPAL protein. Arrows indicate the recombinant target proteins.

2.6 ShPAL 及其突变体 F130H 的稳定性分析

进一步将 ShPAL 及突变体 F130H 的纯化酶液分别进行不同温度和 pH 的处理, 2 h 后在标准反应条件下测定酶活, 结果发现 2 种处理情况下 ShPAL 及突变体 F130H 残留酶活的变化曲线都非常相似, 而且在任何一个处理点, 前者酶活

均高于后者(图 9)。无论是 ShPAL 还是突变体 F130H, 在所选择的温度处理范围(40–70 °C)内, 残留酶活随温度升高而降低, 在 40 °C (近似于其最适温度 41 °C)稳定性最好, 达到各自相对酶活的最大值(定义此时 ShPAL 相对酶活为 100, 实际约为未处理酶活的 48%; 其他(含突变体 F130H)都以此校准计算相对酶活), 在 50 °C 分别

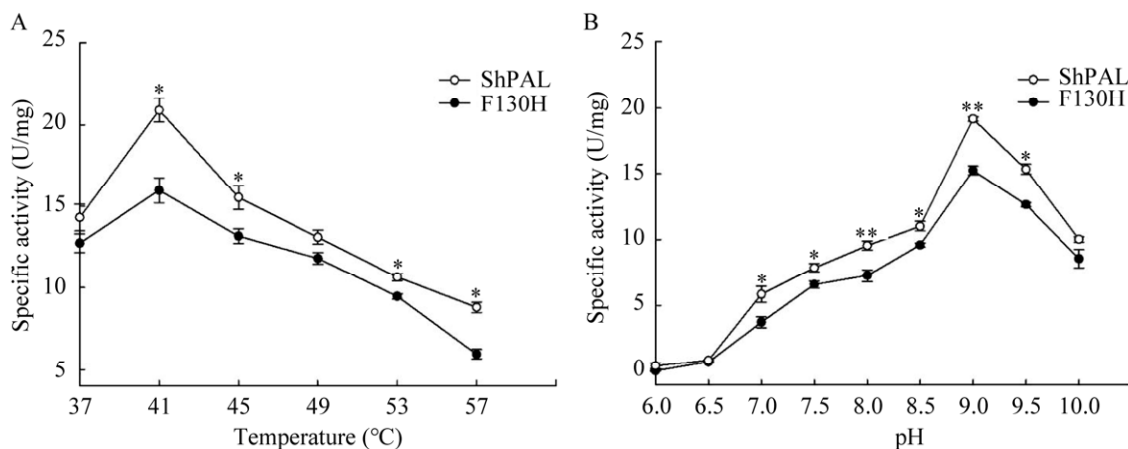


图 8 温度(A)和 pH (B)对 ShPAL 及其突变体 F130H 酶活的影响

Figure 8 Effects of temperature (A) and pH (B) on the enzymatic activities of ShPAL and its mutant F130H. Data represents the $\bar{x} \pm s$ of three repetitive experiments. Difference significance was analyzed by one-way ANOVA test, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

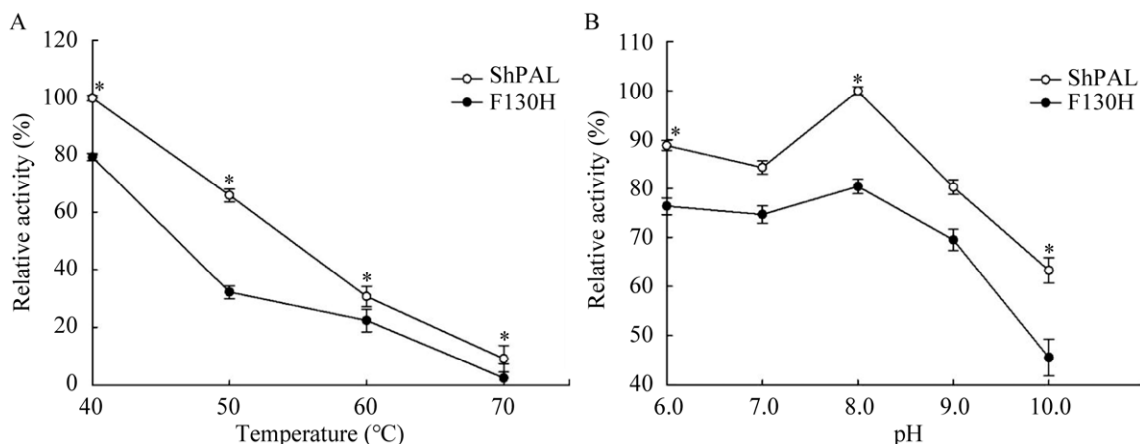


图 9 ShPAL 及其突变体 F130H 的稳定性分析

Figure 9 Analysis on the stability of ShPAL and its mutant F130H. A: Thermostability was determined by the changes of ShPAL (or F130H) activity with temperature. B: pH-stability was evaluated by the changes of ShPAL (or F130H) activity with pH. Data represents the $\bar{x} \pm s$ of three repetitive experiments. Difference significance was analyzed by one-way ANOVA test, *: $P < 0.05$.

下降到其各自最大值的 70%、40%左右, 在 60 °C 均下降到其各自最大值的 30%左右, 到 70 °C 均低于 10% (图 9A)。在所选择的 pH 处理范围(6.0–10.0)内, pH 8.0 时酶活稳定性最好, 达到各自相对酶活的最大值(定义此时 ShPAL 相对酶活为 100, 实际约为未处理酶活的 65%; 其他(含突变体 F130H)都以此校准计算相对酶活), pH 6.0 时为各自最大值的 90%左右, pH 7.0 时稍次, pH 9.0 (其最适 pH)时又稍次, 但仍能维持在各自最大值的 80%以上, 到 pH 10 时才下降到 60%左右(图 9B)。这些结果说明 ShPAL 及其突变体 F130H 对高温较为敏感, 热稳定性较差, 但有较好的 pH 稳定性, 能耐受一定范围的酸碱度。

3 讨论

鬼臼毒素及其衍生物目前仍是临床广泛使用的抗肿瘤木脂素类药物。通过苯丙烷类途径合成松柏醇前体是生产鬼臼毒素的早期阶段, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)作为该途径的入口关键酶, 与鬼臼毒素的合成和积累密切相关, 调控 PAL 的基因表达水平和酶活性可以改变鬼臼毒素的产量。因此, 本工作对桃儿七 ShPAL 的研究将有助于进一步分析 PAL 在鬼臼毒素生物合成中的关键作用, 特别是能为鬼臼毒素的高效异源合成以保护因过度开发而濒危的桃儿七种质资源提供有益参考。

本研究首先完成了桃儿七 ShPAL 基因的克隆(图 1), 其全长 CDS 共 2 136 bp (编码 711 个氨基酸), 与甘肃农业大学发布的桃儿七 SRA 转录组数据包 SRX4112555 有很多完全同源匹配项, 并且能组装成一个覆盖 CDS 全域的重叠群, 说明该基因确实来源于我国桃儿七的主要生态品种。本研究的植物材料来源地四川省阿坝地区与甘肃省南部地区接壤, 这两个区域的

桃儿七植株很大概率上应属同一个品种。另外, 该基因与来自西藏鬼臼的参照基因^[38]在 CDS 序列和推导蛋白序列上的差异度各有 4.120%、1.266%, 说明同一物种的不同生态型也可能存在较明显的遗传多样性。

ShPAL 蛋白经预测是一种无信号肽和跨膜结构的胞质蛋白, 但也可能与同一代谢途径其他可溶性酶(如 4CL、HCT)一起通过蛋白互作被膜连细胞色素 P450 酶类(如 C4H、C3H)间接集结到内质网上, 从而构成具底物通道特性的酶复合物形式高效运作^[21–23]。本研究通过 STRING 预测的结果与这观点一致: ShPAL 在拟南芥中的同源蛋白 PAL1 与苯丙烷类基本途径另外 2 个酶(C4H、4CL1)之间的相互作用分值都很高(接近最大值 1, 图 2B)。亚细胞定位实验结果表明 ShPAL 蛋白主要定位于细胞质中、少量定位于内质网膜上(图 6), 这与拟南芥 PAL1 在细胞内的分布情况基本相符^[21], 也在一定程度上支持 STRING 对 ShPAL 的模拟结果。另外, 预测还显示 ShPAL 蛋白可能含有多 N-糖基化位点和几十个磷酸化修饰位点(图 2A, 包括被证实的 T544 保守残基^[19]), 这些可能与上述酶复合物形式一起构成了 PAL 酶活多样化调节的某些重要方面^[2,14–15]。

与其他已具有结构分析的植物(如欧芹、高粱) PAL^[5,8]类似, 桃儿七 ShPAL 蛋白预测由 MIO 域、核心域和屏蔽域组成, 二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 单体呈现典型的“海马状”三级结构, 基于欧芹 PAL 高置信度建模的空间结构为同源四聚体形式(图 3)。另外, ShPAL 与其他植物 PAL 的序列相似度都较高, 均包含 PAL/HAL 酶活性中心的特征性基序及位于其内、形成 MIO 基团的 ASG 三联体, 而且形成疏水性底物结合口袋的残基均十分保守, 其中位于第 130 位的苯丙氨酸(F130)推测是决定 ShPAL

酶底物特异性的关键位点(图 4)。在系统发育谱系上,不同物种来源的 PAL 可以归集为被子植物、裸子/蕨类/苔藓植物、真菌和细菌 4 大类,能够分纲、分目和分科进行子类集聚,总体上与传统分类结果一致(图 5)。其中,ShPAL 与同属小蘗科的三枝九叶草 PAL 的亲缘关系最近,序列相似性达到 91.14%,与同属毛茛超目的其他几种植物 PAL 也邻近聚集。另外,蕨类和苔藓植物的 PAL 在进化谱系上似乎处于平行关系,符合它们同在泥盆纪时代从藻类登陆演化形成 2 个分支的主流学说^[44]。总之,该结果有力支持了 PAL 在生物进化上的定位^[2,45]。由于苯丙烷类途径与植物进化关系密切,该途径的首要关键酶 PAL 完全可以成为植物由水生向陆生以及垂直向上发展这一整个演化过程的重要线索,也可以作为植物分子生物学分类的典型标志^[2-3,13]。

本研究还进一步对大肠杆菌重组表达和纯化的 ShPAL 蛋白开展了酶活分析。从酶反应条件来看,ShPAL 酶活的最适温度为 41 °C (图 8A),明显低于欧芹、玉米、高粱、五彩苏等植物的 PAL (55–60 °C)^[5,8,25,27]、但与拟南芥 PAL (31–48 °C)^[20]等接近,这符合酶活最适温度与生物体生境相一致的普遍认识。桃儿七与拟南芥一样为喜冷植物,它主要生长于高海拔(2 000–3 000 m)地区的山地荫蔽处(草丛中或林下)。鬼臼毒素在桃儿七植株中的积累与低温、高海拔等环境因子呈正相关^[32],其合成酶系的特性自然是获得了对所处环境的进化适应。除此之外,ShPAL 酶活的最适 pH 为 9 (图 8B),与玉米、盐肤木 PAL 一样^[25,28],都在已知植物 PAL 最适 pH 的范围内^[24-31]。

另外,研究还发现 ShPAL 蛋白的热稳定性较差(图 9A),这与桃儿七植株的生境要求(不耐高温)是一致的。虽然 ShPAL 蛋白在一定范围内

经热处理后仍能保持较原本下降不多的可溶性(图 7B),但实际上可能已经发生变性导致部分酶活性丧失(图 9A)。不过,ShPAL 蛋白的 pH 稳定性较好(图 9B),能耐受一定范围(6–10)的酸碱度,这在一定程度上说明桃儿七植株对土壤 pH 的要求不严格,但考虑到 pH 对 ShPAL 酶活性的影响(图 8B),建议桃儿七种植选择偏碱性土壤。

此外,本研究将 ShPAL 第 130 位的苯丙氨酸突变为组氨酸,得到突变体 F130H 的酶活性较 ShPAL 下降了至少 20%,但受温度和 pH 的影响趋势并未改变(图 8),在热稳定性和 pH 稳定性方面也与 ShPAL 趋于一致(图 9),因此该突变可能是仅仅影响了 ShPAL 的底物特异性从而导致对 Phe 的酶活性下降^[6]。但需要指出的是,这种下降程度远不如其他植物 PAL^[8,26,28],其内在原因有待进一步核实,或许会得出如此解释——F130H 突变使 ShPAL 变成在单子叶植物中发现的那种 PAL/TAL 双功能酶^[2]。

目前, PAL 酶在生物化工和生物学方面的应用分别以欧芹 PAL、鱼腥藻 PAL 为主要代表,通过突变和定向进化手段改进酶的某些相关特性来实现^[9-12]。ShPAL 因其潜在的高活性及最适温度本身较低(接近于鱼腥藻 PAL 的 40 °C^[46]),相信可以成为它们的替代候选,但需要对一些局限特性做相应分子改良(如拓宽底物选择性、提高热稳定性、或使最适 pH 向中性偏移),这也是下一步工作考虑的方向。

REFERENCES

- [1] VOGT T. Phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(1): 2-20.
- [2] BARROS J, DIXON RA. Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases[J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(1): 66-79.
- [3] de VRIES S, FÜRST-JANSEN JMR, IRISARRI I,

- ASHOK AD, ISCHEBECK T, FEUSSNER K, ABREU IN, PETERSEN M, FEUSSNER I, de VRIES J. The evolution of the phenylpropanoid pathway entailed pronounced radiations and divergences of enzyme families[J]. *The Plant Journal*, 2021, 107(4): 975-1002.
- [4] PENG F, ENGEL U, ALIYU H, RUDAT J. Origin and evolution of enzymes with MIO prosthetic group: microbial coevolution after the mass extinction event[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 851738.
- [5] RITTER H, SCHULZ GE. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(12): 3426-3436.
- [6] LOUIE GV, BOWMAN ME, MOFFITT MC, BAIGA TJ, MOORE BS, NOEL JP. Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(12): 1327-1338.
- [7] WANG L, GAMEZ A, ARCHER H, ABOLA EE, SARKISSIAN CN, FITZPATRICK P, WENDT D, ZHANG YH, VELLARD M, BLIESATH J, BELL SM, LEMONTT JF, SCRIVER CR, STEVENS RC. Structural and biochemical characterization of the therapeutic *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(4): 623-635.
- [8] JUN SY, SATTLER SA, CORTEZ GS, VERMERRIS W, SATTLER SE, KANG C. Biochemical and structural analysis of substrate specificity of a phenylalanine ammonia-lyase[J]. *Plant Physiology*, 2018, 176(2): 1452-1468.
- [9] PARMEGGIANI F, WEISE NJ, AHMED ST, TURNER NJ. Synthetic and therapeutic applications of ammonia-lyases and aminomutases[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(1): 73-118.
- [10] KAWATRA A, DHANKHAR R, MOHANTY A, GULATI P. Biomedical applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: current status and future prospects[J]. *Biochimie*, 2020, 177: 142-152.
- [11] 魏西羽, 冯翠月, 吕瑞杰, 樊帅, 杨兆勇, 张志斐. 半理性设计提高 *Anabaena variabilis* 来源的苯丙氨酸解氨酶的催化活性[J]. *药学报*, 2022, 57(12): 3669-3674.
- WEI XY, FENG CY, LV RJ, FAN S, YANG ZY, ZHANG ZF. Semi-rational design improves the catalytic activity of phenylalanine ammonia lyase from *Anabaena variabilis*[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2022, 57(12): 3669-3674 (in Chinese).
- [12] TOMOIAGĂ RB, TORK SD, FILIP A, NAGY LC, BENCZE LC. Phenylalanine ammonia-lyases: combining protein engineering and natural diversity[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(4): 1243-1256.
- [13] DONG NQ, LIN HX. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 180-209.
- [14] ZHANG X, LIU CJ. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(1): 17-27.
- [15] SULIS DB, WANG JP. Regulation of lignin biosynthesis by post-translational protein modifications[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 914.
- [16] OHTANI M, DEMURA T. The quest for transcriptional hubs of lignin biosynthesis: beyond the *NAC-MYB*-gene regulatory network model[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 82-87.
- [17] YIN RH, MESSNER B, FAUS-KESSLER T, HOFFMANN T, SCHWAB W, HAJIREZAEI MR, von SAINT PAUL V, HELLER W, SCHÄFFNER AR. Feedback inhibition of the general phenylpropanoid and flavonol biosynthetic pathways upon a compromised flavonol-3-O-glycosylation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(7): 2465-2478.
- [18] ZHANG XB, GOU MY, LIU CJ. *Arabidopsis* Kelch repeat F-box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(12): 4994-5010.
- [19] ALLWOOD EG, DAVIES DR, GERRISH C, ELLIS BE, BOLWELL GP. Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue[J]. *FEBS Letters*, 1999, 457(1): 47-52.
- [20] COCHRANE FC, DAVIN LB, LEWIS NG. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(11): 1557-1564.
- [21] ACHNINE L, BLANCAFLOR EB, RASMUSSEN S, DIXON RA. Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(11): 3098-3109.

- [22] BASSARD JE, RICHERT L, GEERINCK J, RENAULT H, DUVAL F, ULLMANN P, SCHMITT M, MEYER E, MUTTERER J, BOERJAN W, de JAEGER G, MELY Y, GOOSSENS A, WERCK-REICHHART D. Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(11): 4465-4482.
- [23] WANG J, LIU BG, SUN Y, CHIANG V, SEDEROFF R. Enzyme-enzyme interactions in monolignol biosynthesis[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 9: 1942.
- [24] DREßEN A, HILBERATH T, MACKFELD U, BILLMEIER A, RUDAT J, POHL M. Phenylalanine ammonia lyase from *Arabidopsis thaliana* (AtPAL2): a potent MIO-enzyme for the synthesis of non-canonical aromatic alpha-amino acids.: part I: comparative characterization to the enzymes from *Petroselinum crispum* (PcPAL1) and *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL)[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 258: 148-157.
- [25] ZANG Y, JIANG T, CONG Y, ZHENG ZJ, OUYANG J. Molecular characterization of a recombinant *Zea mays* phenylalanine ammonia-lyase (ZmPAL2) and its application in trans-cinnamic acid production from L-phenylalanine[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 176(3): 924-937.
- [26] HSIEH LS, MA GJ, YANG CC, LEE PD. Cloning, expression, site-directed mutagenesis and immunolocalization of phenylalanine ammonia-lyase in *Bambusa oldhamii*[J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(17/18): 1999-2009.
- [27] ZHU QL, XIE XR, LIN HX, SUI SZ, SHEN RX, YANG ZF, LU K, LI MY, LIU YG. Isolation and functional characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (*SsPAL1*) from *Coleus* (*Solenostemon scutellarioides* (L.) codd)[J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 16833-16851.
- [28] MA WL, WU M, WU Y, REN ZM, ZHONG Y. Cloning and characterisation of a phenylalanine ammonia-lyase gene from *Rhus chinensis*[J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32(8): 1179-1190.
- [29] 吕思佳, 吴月燕, 贾永红, 何凡, 蒋宝鑫, 杨国霞, 谢晓鸿. 云锦杜鹃苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及功能分析[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(1): 374-385.
- LÜ SJ, WU YY, JIA YH, HE F, JIANG BX, YANG GX, XIE XH. Cloning and functional analysis of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Rhododendron fortunei*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(1): 374-385 (in Chinese).
- [30] FAN LJ, SHI GF, YANG J, LIU GL, NIU ZQ, YE WB, WU SQ, WANG L, GUAN QJ. A protective role of phenylalanine ammonia-lyase from *Astragalus membranaceus* against saline-alkali stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(24): 15686.
- [31] ZHU BF, LIU Y, PEI XQ, WU ZL. Characterization of phenylalanine ammonia lyases from lettuce (*Lactuca sativa* L.) as robust biocatalysts for the production of D- and L-amino acids[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(6): 2935-2942.
- [32] KUMARI A, SINGH D, KUMAR S. Biotechnological interventions for harnessing podophyllotoxin from plant and fungal species: current status, challenges, and opportunities for its commercialization[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(6): 739-753.
- [33] YOUSEFZADI M, SHARIFI M, BEHMANESH M, GHASEMPOUR A, MOYANO E, PALAZON J. The effect of light on gene expression and podophyllotoxin biosynthesis in *Linum album* cell culture[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 56: 41-46.
- [34] van FÜRDEN B, HUMBURG A, FUSS E. Influence of methyl jasmonate on podophyllotoxin and 6-methoxypodophyllotoxin accumulation in *Linum album* cell suspension cultures[J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 24(5): 312-317.
- [35] YOUSEFZADI M, SHARIFI M, BEHMANESH M, GHASEMPOUR A, MOYANO E, PALAZON J. Salicylic acid improves podophyllotoxin production in cell cultures of *Linum album* by increasing the expression of genes related with its biosynthesis[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(11): 1739-1743.
- [36] TASHACKORI H, SHARIFI M, AHMADIAN CHASHMI N, BEHMANESH M, SAFAIE N. *Piriformospora indica* cell wall modulates gene expression and metabolite profile in *Linum album* hairy roots[J]. *Planta*, 2018, 248(5): 1289-1306.
- [37] LI MF, LI W, YANG DL, ZHOU LL, LI TT, SU XM. Relationship between podophyllotoxin accumulation and soil nutrients and the influence of Fe^{2+} and Mn^{2+} on podophyllotoxin biosynthesis in *Podophyllum hexandrum* tissue culture[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2013, 71: 96-102.
- [38] SCHULTZ BJ, KIM SY, LAU W, SATTELY ES. Total biosynthesis for milligram-scale production of etoposide intermediates in a plant chassis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(49): 15350-15358.

- 19231-19235.
- [39] HECKMAN KL, PEASE LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension[J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 924-932.
- [40] YUAN H, WANG YX, LIU YJ, ZHANG MR, ZOU ZR. A novel dominant selection system for plant transgenics based on phosphite metabolism catalyzed by bacterial alkaline phosphatase[J]. PLoS One, 2021, 16(11): e0259600.
- [41] NAGANO M, UEDA H, FUKAO Y, KAWAI-YAMADA M, HARA-NISHIMURA I. Generation of *Arabidopsis* lines with a red fluorescent marker for endoplasmic reticulum using a tail-anchored protein cytochrome *b₅*-B[J]. Plant Signaling & Behavior, 2020, 15(9): 1790196.
- [42] SHARMA M, KLÖSGEN RB, BENNEWITZ B. Fluorescent protein-based approaches for subcellular protein localization in Plants[M]//Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2022: 203-211.
- [43] 张健慧, 王首锋. 膜荚黄芪苯丙氨酸解氨酶基因在毕赤酵母中的分泌表达[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2014, 40(1): 1-8.
- ZHANG JH, WANG SF. Expression of *Astragalus membranaceus* phenylalanine ammonia-lyase gene in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences Edition), 2014, 40(1): 1-8 (in Chinese).
- [44] SCHREIBER M, RENSING SA, GOULD SB. The greening ashore[J]. Trends in Plant Science, 2022, 27(9): 847-857.
- [45] 盛超雷, 原野, 庞力豪, 卢宝荣. 氨基酸序列分析揭示苯丙氨酸/酪氨酸解氨酶在陆生植物中的演化[J]. 复旦学报(自然科学版), 2023, 62(3). 2022-11-01. DOI: 10.15943/j.cnki.fdx-b-jns.20221031.001.
- SHENG CL, YUAN Y, PANG LH, LU BR. Amino acid sequence-based evolution of phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase in terrestrial plants[J]. Journal of Fudan University (Natural Science Edition), 2023, 62(3). 2022-11-01. DOI: 10.15943/j.cnki.fdx-b-jns.20221031.001 (in Chinese).
- [46] MOFFITT MC, LOUIE GV, BOWMAN ME, PENCE J, NOEL JP, MOORE BS. Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: kinetic and structural characterization[J]. Biochemistry, 2007, 46(4): 1004-1012.

(本文责编 郝丽芳)