

延边苹果梨苯丙氨酸解氨酶基因克隆及植物表达载体的构建

王 旭, 曲柏宏, 刘振坤

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘 要:以苹果梨果皮为试材,根据 Genbank 上已经登录的蔷薇科植物的 PAL 核酸序列,利用 DNAStar-MegAlign 软件进行多序列比对确定它们的保守区,参照西洋梨 PAL 序列 (GenBank:DQ230992.2)设计了 1 对苹果梨特异的 PAL 引物,运用 RT-PCR 技术对苹果梨的苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因进行了克隆、序列分析及分子进化方面的研究。结果表明:试验成功获得了苹果梨 PAL 基因的全长 cDNA 序列,命名为 PyPAL,GenBank 登录号为 JQ247318.1。序列分析表明,苹果梨 PAL cDNA 全长 2 160 bp,为完整的开放阅读框,推测其编码 719 个氨基酸,与鸭梨和西洋梨 PAL 基因的同源性均高达 95%以上,所编码氨基酸序列同源性达 95%以上。成功构建了含有 PAL 基因的重组质粒 PBI121-PyPAL 的植物表达载体,转化到根瘤农杆菌 LBA4404 菌种中形成工程菌株,为进一步研究苹果梨果实着色调控基因及其遗传改良奠定了基础。

关键词:苹果梨;苯丙氨酸解氨酶(PAL);基因克隆;植物表达载体

中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0106-07

近年来红色梨品种备受人们青睐,在果实成熟时能否充分着色会直接影响其在市场上的竞争力。生产上栽培的红色梨品种多数是秋子梨、西洋梨及其杂交品种,虽然色泽艳丽,香味浓郁,但果实较小,肉质绵软,不耐贮藏,而苹果梨是罕见的能自然着色的抗寒、大果优良品种。果实色泽主要由其所含花青苷、叶绿素和类胡萝卜素的种类和含量决定,其中花青苷主要影响果实着色^[1]。杨林先^[2]、李伟^[3]研究发现苹果梨果实着色过程中主要受苯丙氨酸解氨酶(PAL)的影响,PAL 是连接初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶,也是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,它能阻止戊糖代谢中形成的苯丙酮酸与氨结合生成苯丙氨酸向形成蛋白质方向发展,从而促进该途径朝着合成花色苷方向进行^[4]。目前梨属植物中,对 PAL 基因的研究报道较少,仅在砀山酥梨^[5]、鸭梨^[6]等有报道,孙百灵等^[7]报道了苹果梨 PAL 基因片段的克隆。因此,对苹果梨 PAL 基因的全长克隆与序列分析显得尤为重要。这对进一步研究 PAL 功能,从基因的理化成分、功能、结构领域方面更准确揭示苹果梨果实着色的分子机理具有重要意义。

第一作者简介:王旭(1988-),男,在读硕士,研究方向为植物生理学。

责任作者:曲柏宏(1963-),男,博士,教授,现主要从事园艺植物栽培与生理方面的研究工作。E-mail:bhqu@ybu.edu.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160389)。

收稿日期:2012-12-14

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苹果采自延边华龙集团果树场绿色苹果梨示范基地,于果实解袋 3 d 以后采摘充分着色的苹果梨果实,带回实验室,取下果皮迅速用液氮速冻,-80℃保存备用。

Ex Taq DNA 聚合酶,DNA 限制性内切酶 XbaI、SmaI,T₄ DNA 连接酶,PMD18-T 质粒,反转录酶(M-MLV),dNTPs,凝胶回收试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara);质粒小抽提取试剂盒 I 型购自 Omega 公司;氨苄青霉素、卡那霉素、利福平,均为北京索莱宝科技有限公司产品;质粒 PBI121、根瘤农杆菌 LBA4404,为北京天恩泽生物技术有限公司产品。引物的合成及测序均由上海英骏生物技术有限公司完成。大肠杆菌 DH5α 由延边大学应用真菌实验室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 苹果梨果皮总 RNA 的提取及 cDNA 合成 采用 CTAB 法^[8]提取果皮总 RNA 并检测其完整性,置于-80℃冰箱中保存备用。采用宝生物工程(大连)有限公司(Takara)M-MLV(RNase H-)反转录酶合成 cDNA 第 1 链,以 Oligo(dT)₁₈ 为反转录引物,起始 RNA 为 3 μL。

1.2.2 PAL 目的基因全长的获取 根据 Genbank 上已经登录的苹果梨近缘种的西洋梨(GenBank:DQ230992.2) PAL 全长核酸序列,利用 Oligo 6 软件设计了 1 对苹果梨特异的 PAL 引物:上游引物 C1:5'-ATGGAGGCG-

GAGACCATCA-3',下游引物 C2:5'-CTAACAGATAG-GAAGAGGTGCG-3'。以苹果梨果皮总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,采用引物 C1、C2 进行 PCR,25 μ L 反应体系:模板第 1 链 cDNA 1 μ L,上下游引物各 1 μ L (20 μ mol/L),dNTP Mixture 1.5 μ L (2.5 mmol/L each),10 \times Ex Taq buffer 2.5 μ L,Ex Taq DNA 聚合酶 0.25 μ L (5 U/ μ L),其余用重蒸馏水补充。按照如下反应程序进行 PCR 扩增:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,54.2 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 12 s,共进行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶中检测,按照胶回收试剂盒(Takara)说明回收产物,与 PMD-18T 载体 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,将其转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,挑取白色菌落加入到含 Amp 50 μ g/mL 的 LB 液体培养基中过夜培养,进行菌液 PCR 鉴定,PCR 反应体系如前,选取阳性克隆测序。

1.2.3 高效表达载体 PBI121-PAL 的构建及鉴定 根据克隆测序的 PAL 基因序列,设计 1 对引物。为了便于构建植物表达载体,分别在 5'端和 3'端引物中引入了 Xba I、Sma I 限制酶切位点,设计合成的引物如下:上游引物 M1 (Xba I):5'-TCTAGAATGGAGGCGGAGAC-CATCA-3',下游引物 M2 (Sma I):5'-CCCGGGCTAA-CAGATAGGAAGAGG-3'。PCR 反应体系总体积为 25 μ L,反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,59.4 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 12 s,共进行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物电泳后切胶回收,连接转化到大肠杆菌 DH5 α 中,经提取获得重组质粒 pMD18-T-PAL。对重组质粒 pMD18-T-PAL 与 PBI121 质粒分别进行双酶切鉴定,双酶切反应体系为:2 μ L 10 \times T Buffer,2 μ L 0.1% BSA,10 μ L DNA,1 μ L Sma I,1 μ L Xba I,4 μ L ddH₂O,37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h,切胶回收后在 T₄ DNA 连接酶作用下进行连接,连接反应体系为:3 μ L 酶切的 pBI121 质粒,8 μ L 酶切的 PAL 基因片段,2 μ L 10 \times T₄ DNA Ligase buffer,1 μ L T₄ DNA Ligase,6 μ L ddH₂O,16 $^{\circ}$ C 过夜。

1.2.4 重组质粒转化根瘤农杆菌 LBA4404 受体细胞 将 10 μ L 连接产物与 200 μ L 大肠杆菌感受态 DH5 α 细胞混合,转化涂板(含 Kan 50 μ g/mL)后挑取单菌落进行菌液培养,并用质粒小抽提取试剂盒 1 型提取质粒并进行鉴定。将 10 μ L 鉴定后的质粒与 200 μ L 农杆菌感受态细胞 LBA4404 混合,冰浴 30 min,置于液氮中 1 min,迅速转入 37 $^{\circ}$ C 水浴热激 5 min,加入 1 mL YEB 液体培养基于 28 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 3 h,3 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 4 min,弃部分上清液,重悬菌液,吸取涂布于 YEB+Rif(50 μ g/mL)+Kan(50 μ g/mL)的培养基上,待液体被吸收后,倒置培养在 28 $^{\circ}$ C 培养箱中 2 d。

1.2.5 重组根瘤农杆菌的 PCR 检测 随机挑取转化菌落,接种于 5 mL YEB 液体培养基中,在 28 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 24~28 h。用质粒小量提试剂盒提取质粒。

分别以质粒 DNA 转化菌和未转化菌为模板进行 PCR 鉴定,反应体系同 1.2.3。

2 结果与分析

2.1 苹果梨果皮总 RNA 的提取与检测

取 3 μ L 提取后的总 RNA,在 1.2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。由图 1 可以看出,提取的苹果梨果皮总 RNA 完整性好,可以进行后续反转录试验。

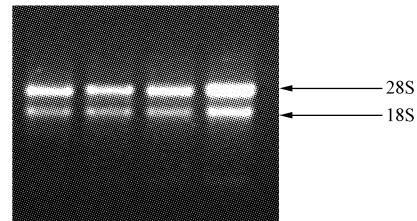


图 1 苹果梨果皮总 RNA

Fig. 1 Total RNA of *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli

2.2 PAL 产物的鉴定结果及测序

以苹果梨果皮提取的总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,结合引物 C1、C2,经 PCR 扩增后得到 cDNA 片段长度大致在 1 900~2 300 bp 之间,与预期片段 2 160 bp 吻合(图 2)。对其切胶回收,并与 PMD18-T 载体连接后转入 DH5 α 感受态细胞中,在含有氨苄青霉素的平板上筛选单菌落,送至上海英骏生物技术有限公司对目的基因 PAL 进行测序。测序结果为 2 160 bp,命名为 *PyPAL*,序列已上传 GenBank 数据库,登录号为 JQ247318.1。

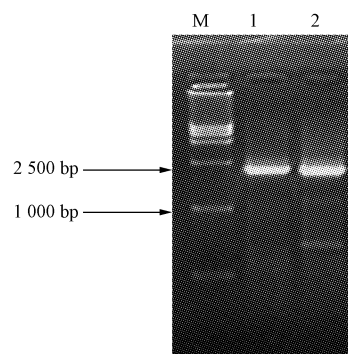


图 2 苹果梨 PAL 基因 RT-PCR 结果

注:M:分子量标准(DL 15 000);1,2:RT-PCR 扩增产物。

Fig. 2 Results of RT-PCR of *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli PAL gene

Note: M: DL 15 000 marker; 1,2: Product of RT-PCR.

2.3 苹果梨 PAL 基因全长 cDNA 的序列分析

登录 NCBI 主页(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),利用 Blast 在线工具将 *PyPAL* 序列与蔷薇科其它植物的 PAL 基因序列进行比较。由表 1 可以看出,*PyPAL* 与一些蔷薇科植物序列高度同源,如与鸭梨、西洋梨、甜樱桃、覆盆子的相似性分别为 99%、96%、88%、84%,特别是与同属于梨属白梨种的鸭梨相似性最高(99%),说明 *PyPAL* 序列是苹果梨的 PAL 基因序列。

表 1 *PyPAL* 与其它蔷薇科植物
PAL 基因的相似性

Table 1 Nucleotide sequence identity of
PyPAL to the *PAL* gene of other Rosaceae plant

基因登录号 Accession No.	物种 Species	碱基相似性 Identity/%	相似碱基数 No. of overlap/bp	E 值 E value
GU906268.1	鸭梨 <i>Pyrus bretschneideri</i>	99	2 142	0.0
DQ230992.2	西洋梨 <i>Pyrus communis</i>	96	2 077	0.0
AF036948.1	甜樱桃 <i>Prunus avium</i>	88	1 861	0.0
AF237955.1	覆盆子 <i>Rubus idaeus</i>	84	1 742	0.0
HMO64433.1	桑树 <i>Morus alba</i>	83	1 721	0.0

2.4 苹果梨 *PAL* 基因的氨基酸序列分析

利用 DNASTAR 软件对 *PyPAL* 与一些代表性的

蔷薇科植物和模式植物烟草、拟南芥的 *PAL* 基因编码的氨基酸序列进行同源性的多重比较分析。由图 3 可以看出, *PyPAL* 与这些蔷薇科植物、烟草和拟南芥之间同源, 而且相似性比较高, 分布在 81.2%~99.3% 之间(图 4), 特别是与同属于梨属鸭梨的相似性最高, 达到 99%。尤其是功能性区域的氨基酸序列同源性更高(图 3 方框中), 这说明 *PAL* 基因在系统进化上具有相当高的保守性。应用 DNAMAN 软件对苹果梨 *PyPAL* 基因编码的氨基酸序列与其它科属的植物已发表的 *PAL* 基因进行同源性比较, 结果表明, 它们的相似性都在 90% 以上, 进一步说明 *PyPAL* 正是苹果梨的 *PAL* 基因。



图 3 *PyPAL* 与其它植物苯丙氨酸解氨酶氨基酸序列的多重比较

注: YL(鸭梨, 登录号: ADF59061.1); XYL(西洋梨, 登录号: ABB70117.2); FPZ(覆盆子, 登录号: AAF40224.1); YC(烟草, 登录号: ABG75911.1); NNJ(拟南芥, 登录号: NP181241.1)。图 4 同。

Fig. 3 Multiple alignment of amino-acid sequences for *PyPAL* and *PAL* of other plants

Note: YL (Yali pear, GeneBank: ADF59061.1); XYL (Western pear, GeneBank: ABB70117.2); FPZ (Raspberry, GeneBank: AAF40224.1); YC (Tobacco, GeneBank: ABG75911.1); NNJ (Arabidopsis, GeneBank: NP181241.1). The same Fig. 4.

Divergence	Percent Identity							
	1	2	3	4	5	6		
1		99.3	97.8	89.2	83.0	81.8	1	PyPAL
2	0.7		98.1	89.4	83.3	81.8	2	YL
3	2.1	2.0		89.7	83.0	81.8	3	XYL
4	10.3	10.3	10.3		83.8	81.5	4	FPZ
5	18.3	17.9	17.9	17.6		81.2	5	YC
6	19.3	18.9	18.4	20.8	20.0		6	NNJS
	1	2	3	4	5	6		

图4 PyPAL 氨基酸序列与其它科植物
PAL 氨基酸序列相似性的比较

Fig.4 Alignment comparison of amino acids of
PyPAL and PAL amino acids of other plants

为了进一步研究 PyPAL 和其它植物 PAL 之间的进化关系,以氨基酸序列作为分析对象,利用 DNASTAR 软件构建了 PAL 分析进化树。由图 5 可知,该试验所获得的苹果梨 PAL 与 NCBI 已发表的蔷薇科梨属的鸭梨和西洋梨亲缘关系最近;与蔷薇科覆盆子、桑科的桑树、豆科中的百脉根和蒙古黄芪等亲缘关系也较近;与其它被子植物如丹参、烟草、葡萄等亲缘关系则较远;与拟南芥的亲缘关系最远。这说明 PAL 蛋白在进化中出现较大差异。从图 5 还可以看出,PAL 蛋白序列在蔷薇科植物中保守性很高,尤其是在同为梨属的植物中,其同源性高达 90%以上。

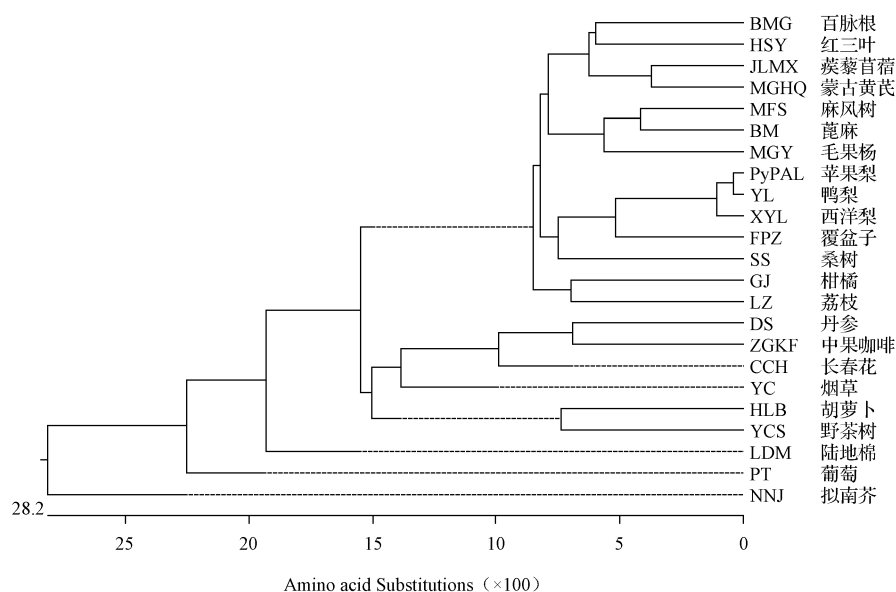


图5 植物 PAL 的系统进化树

注:苹果梨(JQ 247318.1)、百脉根(BAF36970.1)、红三叶(AAZ29732.1)、蒺藜苜蓿(XP_003590471.1)、蒙古黄芪(AAX84839.1)、麻风树(ABI133979.1)、蓖麻(XP_002519521.1)、毛果杨(ACC63887.1)、鸭梨(ADF59061.1)、西洋梨(ABB70117.2)、覆盆子(AAF40224.1)、桑树(ADI40166.1)、柑橘(CAB42793.1)、荔枝(ACR15762.1)、丹参(ABD73282.1)、中果咖啡(AEQ94540.1)、长春花(BAA95629.1)、烟草(ABG75911.1)、胡萝卜(BAC56977.1)、野茶树(AAU08174.1)、陆地棉(AER12109.1)、葡萄(ABM67591.1)、拟南芥(NP_181241.1)。

Fig.5 System evolutionary tree of PAL amino acid sequence in plant

Note: Pingguoli (JQ 247318.1), Crowtoe (BAF36970.1), Red clover (AAZ29732.1), *Tribulus alfa* (XP_003590471.1), Mongholicus (AAX84839.1), Jatropha (ABI133979.1), Castor oil plant (XP_002519521.1), Populus trichocarpa (ACC63887.1), Yali pear (ADF59061.1), Western pear (ABB70117.2), Raspberry (AAF40224.1), Mulberry (ADI40166.1), Citrus (CAB42793.1), Litchi (ACR15762.1), Salvia (ABD73282.1), In fruit coffee (AEQ94540.1), Periwinkle (BAA95629.1), Tobacco (ABG75911.1), Carrot (BAC56977.1), Wild tea (AAU08174.1), Upland cotton (AER12109.1), Grape (ABM67591.1), Arabidopsis (NP_181241.1).

2.5 苹果梨 PAL 基因编码蛋白序列的基本性质分析

2.5.1 氨基酸组成分析 利用 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) 在线预测了 PyPAL 基因编码氨基酸序列(图 6)。推测其编码 719 个氨基酸,其中亮氨酸含量最多(10.6%),色氨酸含量最少(0.6%)。分子量为 77 910.6 Da,等电点为 6.18,分子式为 $C_{3437}H_{5498}N_{956}O_{1058}S_{24}$,总共由 10 973 个原子组成,消化系数为 45 100(280 nm),估计的半衰期是 30 h,脂溶指数(Aliphatic index)90.50,热稳定指数(II)为 34.43,表明其为稳定的蛋白质。PyPAL 的负电荷氨基

酸残基(Asp+Glu)的数目共有 79 个,正电荷氨基酸残基(Arg+Lys)的数目共有 71 个。

2.5.2 疏水性与跨膜结构域预测与分析 用 ProtParam 程序(<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)在线分析了 PyPAL 蛋白质的疏水曲线(图 7),图中横坐标为序列位置,纵坐标为氨基酸的标度值(>0 为疏水,<0 为亲水)。多肽链具有最低分值为 -2.778(第 12 位的 N),亲水性最强;而最高分值为 2.700(第 285 位的 L),疏水性最强。整条多肽链中亲水氨基酸 416 个,疏水氨基酸 295 个,整条多肽链表现为亲水性(整体数值之

和为-0.179),所以苹果梨 PAL 是亲水性蛋白。用 TMHMM Server v. 2.0 软件在线分析 PyPAL 蛋白的跨膜区(图 8),PyPAL 蛋白整条肽链都位于细胞膜外,即苹果梨 PAL 不存在跨膜结构域。可以推断,苹果梨 PAL 在细胞质基质中合成后,不经蛋白转运,直接定位于细胞质基质中的特定部位行使催化功能。

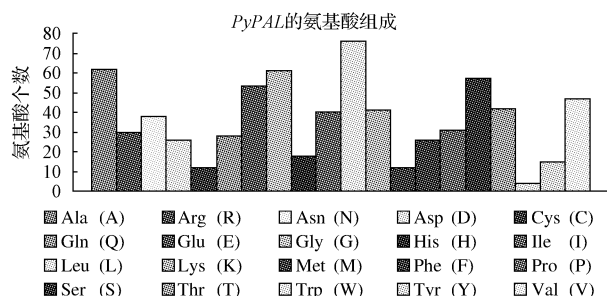


图 6 PyPAL 的氨基酸组成

Fig. 6 Amino acid composition of PyPAL

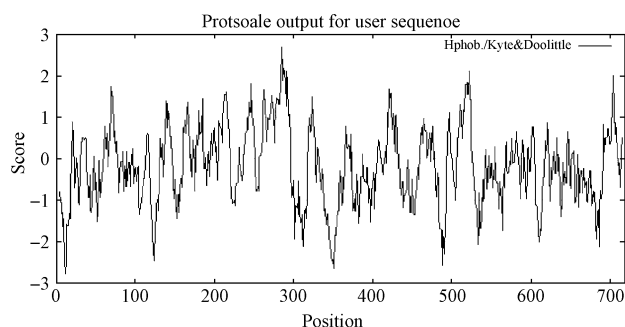


图 7 用 ProtScale 分析了 PyPAL 蛋白序列的疏水曲线

Fig. 7 Hydrophobicity profile of PyPAL by ProtScale

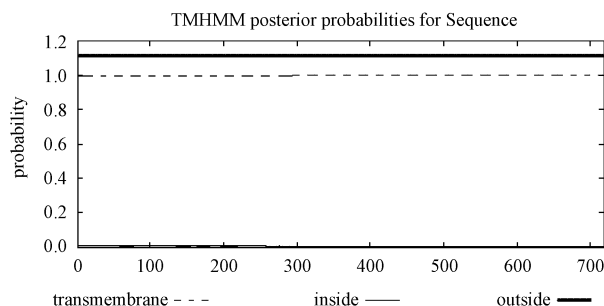


图 8 用 TMHMM 软件分析 PyPAL 蛋白的跨膜区分析结果

Fig. 8 Across the area Analysis profile of PyPAL by TMHMM

2.5.3 苹果梨 PAL 基因编码蛋白的二级结构预测

蛋白质二级结构预测不仅是联系其一级结构和三级空间结构的桥梁和纽带,而且也是从一级结构预测三级空间结构的关键步骤。通过网上资源 PORTER (<http://distill.ucd.ie/porter/>)分析,PyPAL 各个氨基酸残基对应的二级结构如图 9 所示,图中 C 表示 coil (无规卷曲),H 表示 helix(α -螺旋),E 表示 extended(β -折叠)。从预测结果中可知,PyPAL 蛋白二级结构以 α -螺旋和无规卷曲为主, α -螺旋(H)和无规卷曲(C)各占 50.49%和 47.15%, β -折叠(E)仅占 2.36%。

2.6 重组质粒 pMD18-T-PAL 的构建及酶切鉴定

根据图 2 的测序结果,设计合成了特异引物 M1, M2。以苹果梨果皮提取的总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板,经 PCR 扩增,切胶回收,连接转化测序等步骤,得

```

CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHCCCCCEEE
MEATTITQNGQNGHQNVSSEPLCIKCDPLNWGLVADSLKGSGLDEVKRMVAEYRKPVVK
ECCCCCHHHHHHHHHCCCCCEEECHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCEEECCCCCCC
LGGESLTISQVAAIATHDTGVKVELSESARAGVKASSDWVMDSMGKGTDSTYGVTTGFGAT
CCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHH
SHRRTNKGAALQKELIRFLNAGVFGSATESGHTLPHQATRAAMLVRINTFLQGYSGIRFE
HHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCECHHHH
ILEAITKFLNNNVTPCLPLRGTTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPNKAVGPTGGTLSASEA
HHHCCCCCCCCCCCCCHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCC
FELVGINGGFELQPKGLALVNGTAVGSGLASTVLFETNIALALLAEILSAIFAEVMOGK
CCCCCHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCC
PEFTDHLTHKLKHHPGQIEAAAIMHILDGSSYVKAACKLHGQDPLQPKQDRYALRTSP
CCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCEEECCCCCEEECCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHH
QWLGPOQIEVIRFSTKSIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMNDTRLAIA
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHH
SIGKLMFAQFSELVNDYFNGLPSNLSGGRNPGLDYGFKGAEIAMASYCSELQFLANPVT
CCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
NHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTAEAVDILKLMSSSTFLVALCQSIDLRHLEENLRNTVK
HHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
NTVSQVAKRTLTTGVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAIYDDPCSATYPLMQKLREVL
HHHHHHHHCCCCCCCCCHHCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
VEHALTNGESENKASTSIFQKIGAFEEELKALLPKEVESARSAIESGNAAVPNRIAECRS
CHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
YPLYKFVREELGGEYLTGEKVRSPGEECDKVFQAICQGGKIIDPILGCLGWNGAPLPIC

```

图 9 PyPAL 基因编码蛋白的二级结构预测

Fig. 9 Secondary structure forecast of PyPAL gene

到与图 2 相同的测序结果,进一步说明成功克隆得到了 *PAL* 基因。对重组质粒 PMD18-T-*PAL* 进行双酶切鉴定,结果如图 10 所示,表明成功的构建了重组质粒 PMD18-T-*PAL*,并且双酶切成功。

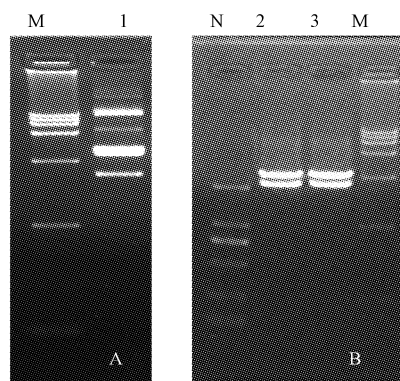


图 10 克隆载体 PMD18-T-*PAL* 双酶切鉴定

注: M: DL 15 000, N: DL 2 000, A: 克隆载体 pMD18-T-*PAL*, B: 双酶切片段。

Fig. 10 Identification of the recombinant PMD18-T-*PAL* plasmid

Note: M: DL 15 000, N: DL 2 000, A: pMD18-T-*PAL* plasmid, B: pMD18-T-*PAL* plasmid digested with *Sma*I and *Xba*I.

2.7 表达载体 PBI121-*PAL* 的构建及鉴定

采用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Sma*I 对 PBI121 质粒进行双酶切,酶切体系如前,将酶切回收的产物与 *PAL* 酶切回收后的产物经 *T₄* NDA 连接酶在 16℃ 连接过夜后,将所得表达载体 PBI121-*PAL* 转入大肠杆菌 DH5 α 中,选取单克隆提取质粒,用特异引物 M1、M2 进行 PCR 扩增验证,以检测 *PAL* 基因是否连入 PBI121 中,电泳结果显示有 2 160 bp 预期片段。同时用 *Xba*I 和 *Sma*I 双酶切 PBI121-*PAL* 质粒(图 11),结果表明 *PAL* 基因已连入 PBI121 质粒中,插入到 PBI121 表达载体的 *PAL* 序列的长度为 2 160 bp。

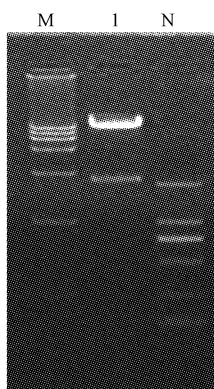


图 11 植物表达载体 PBI121-*PAL* 双酶切鉴定

注: M: DL 15 000, N: DL 2 000。

Fig. 11 Identification of the recombinant PBI121-*PAL* plasmid

Note: M: DL 15 000, N: DL 2 000.

2.8 表达载体 PBI121-*PAL* 对农杆菌的转化及鉴定

挑取转化菌菌落提取质粒 PBI121-*PAL* 转入农杆菌 LBA4404 中,以转化菌质粒 DNA 为模板进行 PCR,未转化农杆菌 LBA4404 为阴性对照,检测 *PAL* 基因是否导入农杆菌中。由图 12 可知,转化菌质粒能特异地扩增出 2 160 bp 的片段,阴性对照未扩增出来,说明 PBI121-*PAL* 已转入农杆菌中。

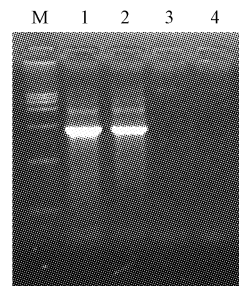


图 12 农杆菌转化的 PCR 鉴定

注: 1, 2: 农杆菌 LBA4404 重组质粒 DNA, 3, 4: 未转化的农杆菌质粒 DNA。

Fig. 12 PCR analysis of *Agrobacterium tumefaciens*

Note: 1, 2: Recombinant plasmid DNA of *Agrobacterium tumefaciens*, 3, 4: DNA of unconverted *Agrobacterium tumefaciens*.

3 讨论

苯丙氨酸解氨酶(*PAL*)是植物次级代谢的第 1 个关键酶,编码该酶的同源基因在许多物种中得到了克隆和描述。GenBank 数据库中所报道物种的 *PAL* 同源基因全长 cDNA 序列及其推定的氨基酸序列的长度分别为 2 096~2 650 bp 和 628~730 个氨基酸^[9]。该试验采用已知的西洋梨(GenBank: DQ230992.2) *PAL* 序列,设计了 1 对特异引物,对苹果梨进行 PCR 克隆,首次从苹果梨中克隆得到了 *PAL* 基因的全长序列,并将其命名为 *PyPAL*。薛永常^[10]根据白杨杂种 *PAL* 的 cDNA 序列(D30656)设计合成了特异引物,并扩增得到了目的片段;黄胤怡^[11]参照发表其它植物的 *CHS-A* 基因序列设计特异引物,扩增得到 1.2 kb 目的条带,这说明通过近缘相似性对未知片段进行克隆具有可行性。

用生物信息学软件进行多序列比对分析,结果显示 *PyPAL* 在核苷酸和氨基酸水平上的大小与其它物种的差异不大,具有非常高的同源性,特别是与同属于梨属鸭梨的相似性最高,达到 99%,这更进一步说明,可以将苹果梨归类于同属于白梨系统,这与曲柏宏等^[12]、鲁凤娟等^[13]的观点趋于一致。同时在推测的 *PyPAL* 第 204、205 和 206 个氨基酸位置上有丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸残基(图 3 方框),它们被认为是各物种 *PAL* 蛋白中高度保守的氨基酸基序^[14],说明 *PyPAL* 是 *PAL* 基因家族中的新成员。

用生物信息学的方法,通过计算机模拟和计算来

“预测”出未知蛋白质信息或提供与之相关的辅助信息,可以用较低的成本和较快的时间就能获得可靠的结果^[15]。该试验对苹果梨 *PAL* 蛋白质分子结构进行了预测分析,预测其为亲水性蛋白,定位于细胞质基质中,不存在跨膜结构域,这与高东尧^[16]、Nakushmia 等^[17]进行 *PAL* 的亚细胞定位时发现 *PAL* 分散在细胞基质中的结论一致。

参考文献

- [1] 李跃,刘延吉.果实花青苷代谢机制及调控技术研究[J].安徽农业科学,2007,35(16):4755-4756,4759.
- [2] 杨林先.套袋苹果梨果实着色与色素及相关酶的研究[D].延吉:延边大学,2010.
- [3] 李伟.套袋及外源物质处理对苹果梨果实着色影响的研究[D].延吉:延边大学,2011.
- [4] 徐晓梅,杨曙光.苯丙氨酸解氨酶研究进展[J].安徽农业科学,2009,37(31):15115-15119,15122.
- [5] 张士鸿,金青,樊洪泓,等.杨山酥梨果实苯丙氨酸解氨酶基因 cDNA 克隆及序列分析[J].激光生物学报,2010,19(1):97-103.
- [6] 刘志浩,张玉星,申连英,等.鸭梨苯丙氨酸解氨酶基因 cDNA 片断的克隆与序列分析[C].梨科研与生产进展(五),2011:102-105.
- [7] 孙百灵,王旭,曲柏宏.苹果梨果实着色相关 *PAL* 基因片段克隆及表达分析[J].延边大学农学报,2012,34(1):1-5.

- [8] 宗成文.葡萄花发育相关基因的克隆与表达特性研究[D].南京:南京农业大学,2007.
- [9] 周生茂,王玲平,向珣,等.山药 *PAL* 基因全长 cDNA 序列的克隆、表达与分析[J].核农学报,2008,22(6):781-788.
- [10] 薛永常.杨树木质素合成酶 *PAL* 基因的克隆、鉴定及其表达载体的构建[D].北京:中国林业科学研究院,2001.
- [11] 黄胤怡.查尔酮合酶基因 cDNA 的克隆及对茛苳的遗传转化[D].厦门:厦门大学,2002.
- [12] 曲柏宏,金香兰,陈艳秋,等.苹果梨分类地位的 RAPD 鉴定[J].吉林农业大学学报,2003,25(3):292-295.
- [13] 鲁凤娟,张宇星.利用 AFLP 分子标记鉴定苹果梨的分类地位[J].安徽农业科学,2009,37(5):1937-1938.
- [14] 吴松权,祖元刚,管清杰,等.膜荚黄茛苳苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析[J].中草药,2010,41(3):456-460.
- [15] 史梦远,王海涛,张芳琳.应用生物信息学网络资源分析预测融合蛋白的二级结构及其理化性质[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(9):1685-1688.
- [16] 高东尧.高山红景天苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及遗传转化[D].长春:吉林大学,2006.
- [17] Nakashima J, Awano T, Takabe K, et al. Immunocyto chemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamyl alcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia* mesophyll cells[J]. Plant Cell Physiology,1997,38(2):113-123.

Clone and Construction of Plant Expression Vector of Phenylalanine Ammonia Lyase Gene of *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli in Yanbian Area

WANG Xu, QU Bai-hong, LIU Zhen-kun

(Department of Agriculture, Yanbian University, Yanji, Jilin 133002)

Abstract: Taking *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli in Yanbian as material, based on the nucleic acid sequences of Rosaceae plants logged in Genbank, a pair of *PAL* primers specific for *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli was designed through determination of their conserved region by the alignment of multiple sequences using DNASTar-MegAlign software with the reference to *Pyrus communis* sequence (GenBank: DQ230992.2), and the *PAL* gene cloning, sequence analysis and molecular evolution were studied. The results showed that the full-length cDNA sequence of *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli *PAL* gene named PyPAL with registry number of JQ247318.1 was obtained by RT-PCR. Sequence analysis showed that the full-length cDNA of *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli *PAL* was a complete open reading frame of 2 160 bp and speculated to encode 719 amino acids, and it had a homology over 95% with those of *Pyrus bretschneideri* and *Pyrus communis* while the homology of the encoded amino acid sequences reached over 95%. And a plant expression vector contained *PAL* gene recombinant plasmid PBI121 - PyPAL was successfully constructed and transformed into agrobacterium tumefaciens LBA4404 forming an engineering strain, laying the foundations for further study on coloring regulatory genes and genetic improvement for fruit coloring of *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli.

Key words: *Pyrus pyrifolia* cv. Pingguoli; Phenylalanine Ammonia Lyase(PAL); gene cloning; plant expression vector