



4 种竹子木质素合成酶 PAL 的基因克隆和序列分析

李潞滨¹, 刘 蕾², 张淑萍^{2,3}, 何聪芬², 胡 桃¹, 庄彩云¹

1. 中国林业科学研究院林业研究所; 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091
2. 北京工商大学化学与环境工程学院; 植物资源研究开发北京市重点实验室, 北京 100048
3. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100048

摘要 苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine Ammonia-Lyase, PAL; EC 4.3.1.5) 是木质素生物合成过程的关键酶和限速酶。应用 RACE (Rapid-Amplification of cDNA Ends) 方法, 获得了白哺鸡竹 (*Phyllostachys dulcis*)、高节竹 (*Phyllostachys prominens*)、龙鳞竹 (*Phyllostachys pubescens heterocycla*)、丽水苦竹 (*Pleioblastus maculosoides* Wen) 等 4 种竹子 PAL 基因的全长序列, 并进行了生物信息学分析。结果表明, PAL 基因的开放读码框长度为 2 136 bp, 共编码 712 个氨基酸, 具有 2 个外显子和 1 个内含子。其中高节竹、龙鳞竹、丽水苦竹 PAL 基因内含子长度为 121 bp, 白哺鸡竹 PAL 基因内含子长度为 84 bp。推测其氨基酸序列, 并分析 PAL 蛋白单体的三维结构, 结果显示 PAL 蛋白均含有大量的 α 螺旋和 β 折叠结构。基于邻接法的进化树对 31 个物种的 PAL 基因的氨基酸序列分析表明, 竹类植物 PAL 基因的保守性较高, 与禾本科植物玉米、甘蔗的亲缘关系较近, 与双子叶植物辣椒等的亲缘关系较远。

关键词 竹; 木质素; 苯丙氨酸解氨酶; RACE

中图分类号 Q783

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)22-0019-07

Gene Cloning and Sequence Analysis of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Bamboo Lignin Synthase

LI Lubin¹, LIU Lei², ZHANG Shuping^{2,3}, HE Congfen², HU Tao¹, ZHUANG Caiyun¹

1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation; Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China
2. Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development; School of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China
3. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China

Abstract Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5) is one of the key enzymes in the process of lignin synthesis. In this paper, PAL gene sequences from four varieties of bamboo: *Phyllostachys dulcis*, *Phyllostachys prominens*, *Phyllostachys pubescens heterocycla* and *Pleioblastus maculosoides* Wen, were obtained by Rapid-Amplification of cDNA Ends (RACE). The results show that each PAL gene has two exons and an intron and every Open Reading Frame (ORF) is 2 136 bp in length, encoding 712 amino acids. The bamboo PAL amino acid sequences and three-dimensional structures were then analyzed and inferred. The results indicate that all of the PAL proteins contain a large number of α -helix and β plated sheet structure. The neighbor-joining phylogenetic tree based on PAL sequences of bamboo and other 27 plants indicates that PAL gene sequence in bamboo is relatively conservative, and bamboo has a very close relationship with that of *Zea may* and *Saccharum officinarum*, and a remote relationship with that of *Capsicum annum et al.*

Keywords bamboo; lignin; phenylalanine ammonia-lyase; rapid-amplification of cDNA ends

收稿日期: 2009-10-11

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目 (2006BAD01A18); 引进国际先进农业科学技术计划 (948 计划) 项目 (2006-4-C08)

作者简介: 李潞滨, 副研究员, 研究方向为园林植物遗传育种, 电子信箱: lilubin@126.com; 何聪芬 (通信作者), 教授, 研究方向为植物分子生物学, 电子信箱: congfenhe@126.com



化、加 A 尾后作为后续 PCR 反应的模板进行两轮巢式 PCR 反应,反应条件均为:94℃,5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 10 min。反应结束后用 1%的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定,回收片段,连接 T 载体,转化涂板,蓝白斑筛选得到阳性克隆菌液后,送 Invitrogen 生物公司测序,将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST。

1.4.3 DNA 和 cDNA 中基因全长的获得

根据拼接的 cDNA 序列 5'端和 3'端设计引物 All-sense (5'-GCGTCCGTTGCTGCATATTCGATGG-3')和 All-antisense (5'-CTTTAGCAAATGGGCAGGG-3')。分别以基因组 DNA 及反转录后的 cDNA 为模板扩增基因的全长,反应体系如下:反应条件为 94℃,5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 7 min;电泳检测,回收所得片段并克隆、测序。

1.4.4 序列拼接与分析

序列测定委托上海英骏生物技术公司完成,测序结果用 Contig Express 序列拼接软件进行全长序列拼接,序列分析则采用 DNAMAN 软件进行。

1.5 PAL 基因的生物信息学分析

通过 NCBI 对 cDNA 序列和氨基酸序列进行 Blast 分析,采用生物学软件 DNAMAN 对 PAL 基因的 cDNA 序列和氨基酸序列进行生物信息学分析;使用软件 MEGA 4.0^[6]对 NCBI 已经发表的部分物种的 PAL 基因及本文所获得的 PAL 基因的蛋白质序列进行序列同源性分析和进化分析;应用 SOPMA 工具 (<http://www.expasy.org/tools/>) 分析各二级结构在 PAL 蛋白质中的比例,以及应用 CPHmodels 2.0 Server (http://genome.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels-2_0_Server-3D.htm) 进行蛋白质三级结构的预测,并使用 RasMol 程序展示其空间结构。

2 结果与分析

2.1 PAL 基因 3'RACE 结果

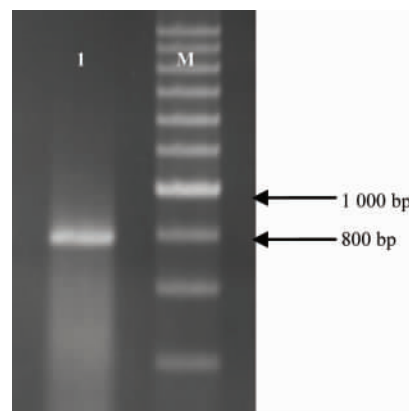
以 4 种竹子反转录产物作为模板,使用引物 Z760、Z1040 分别与 Adaptor dT 进行两轮巢式 PCR 后均获得了一个约 800 bp 的片段,与预期的基因片段大小一致,回收后与 T 载体连接进行测序,测序结果通过 BLAST 程序在 GenBank 中进行对比,结果表明与禾本科植物 PAL 基因同源性较高,证明其确实为 PAL 3'端序列。图 1 为以高节竹为例的 PAL 基因 3'端电泳结果。

2.2 PAL 基因 5'RACE 结果

根据已获得的 PAL 基因的 3'序列,在靠近 5'端处重新设计引物,使用特异性引物进行反转录后,进行两轮巢式 PCR 扩增 PAL 基因 5'未知序列。图 2 为以高节竹为例的 PAL 基因 5'端电泳结果。

2.3 PAL 基因全长序列的获得

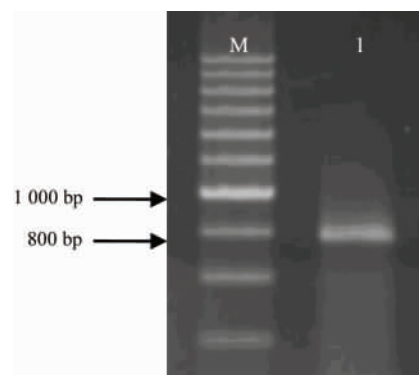
将 3'RACE 和 5'RACE 的结果进行拼接,在拼接的 cDNA 序列的 5'端和 3'端设计引物,分别以基因组 DNA 和反转录后的 cDNA 为模板扩增基因的全长。图 3 为以高节竹为例的 PAL 基因全长序列的电泳结果图。图的左边是以基因



1—高节竹 PAL 基因;M—200 bp DNA Ladder

图 1 高节竹 PAL 基因 3'端片段的电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *Phyllostachys prominens* PAL 3' DNA



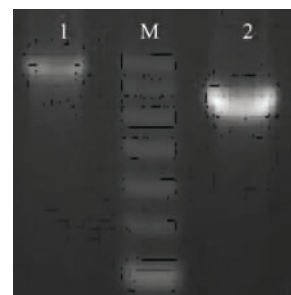
1—高节竹 PAL 基因;M—200 bp Ladder

图 2 高节竹 PAL 基因 5'端片段的电泳结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of *Phyllostachys prominens* PAL 5' DNA PCR

组 DNA 序列为模板进行 PCR 扩增结果,右边是以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增结果。

分析结果表明,以 cDNA 为模板的 PAL 基因全长片段扩



1—以 DNA 为模板;2—以 cDNA 为模板;M—200 bp Ladder

图 3 高节竹 PAL 基因全长序列的获得

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of *Phyllostachys prominens* PAL DNA PCR



增结果比以 DNA 为模版的扩增结果短 100~150 bp, 表明 PAL 基因内部存在有内含子, 这与 NCBI 中其他物种 PAL 基因的分析结果一致。

2.4 PAL 基因的生物信息学分析

2.4.1 PAL 基因序列分析

使用生物学软件 DNAMAN 对 PAL 基因的 cDNA 序列和氨基酸序列进行生物信息学分析(表 3)。4 种竹子 PAL 基因的开放读码框长度均为 2 136 bp, 共编码 712 个氨基酸。所得

到 PAL 基因序列均由两个外显子和一个内含子组成。内含子的位置为起始密码子后第 391 bp 处, 所有的内含子两端均具有 GT/AG 的特征性保守序列(图 4 中的阴影)。白哺鸡竹、高节竹、龙鳞竹、丽水苦竹 PAL 基因的内含子长度不一, 序列略有差异(如表 3 所示), 推测是内含子受外界选择压力小, 物种长期进化的结果。序列分析结果以高节竹为例进行说明。结果表明, 4 种竹子的 PAL 基因都具有一个保守的 PAL 活性位点 Ala-Ser-Gly (A-S-G)(图 4 中的黑框), 这说明本试验所

表 3 4 种竹子 PAL 基因序列分析结果

Table 3 Results of analysis of PAL gene sequences for four species of bamboo

竹种	内含子长度/bp	开放阅读框架长度/bp	编码氨基酸数目	预测蛋白分子量/kD	预测蛋白质等电点
白哺鸡竹	84	2 136	712	76.811	6.03
丽水苦竹	121	2 136	712	76.720	6.36
高节竹	121	2 136	712	76.736	6.36
龙鳞竹	121	2 136	712	76.829	6.25

获得的 4 种 PAL 蛋白均与其他物种的 PAL 蛋白具有相同的催化功能。

将所获得的基因在 NCBI 上进行注册, 注册序列号分别为: FJ594738(白哺鸡竹 PAL DNA 序列); FJ593634(白哺鸡竹 PAL cDNA 序列); FJ596642(丽水苦竹 PAL DNA 序列); FJ596641(丽水苦竹 PAL cDNA 序列); FJ593637(高节竹 PAL DNA 序列); FJ593635(高节竹 PAL cDNA 序列); FJ594468(龙鳞竹 PAL DNA 序列); FJ594467(龙鳞竹 PAL cDNA 序列)。

2.4.2 PAL 基因蛋白质二级结构分析

目前, 对蛋白质的二级结构预测方法有多种, 本试验采用 SOPMA 工具分析各二级结构在 PAL 蛋白质中的比例。结果如表 4 所示。

表 4 PAL 蛋白各二级结构所占的比例(单位: %)
Table 4 Proportion of secondary structure (unit: %)

竹种	α 螺旋	β 折叠片	β 转角	螺旋卷曲
丽水苦竹	55.06	8.57	6.60	29.78
龙鳞竹	56.46	7.44	6.46	29.63
白哺鸡竹	55.20	8.01	6.46	30.34
高节竹	55.34	8.15	6.74	29.78
麻风树	53.72	8.42	4.77	33.10
毛白杨	54.34	7.14	4.48	34.03

由表 4 可以看出, 试验中所获得的 4 种竹子的 PAL 蛋白的二级结构均具有丰富的 α 螺旋 (alpha helix) 和螺旋卷曲 (random coil), 而 β 折叠片层结构 (beta sheet) 和 β 转角结构 (beta turn) 存在比例相对较低。以麻风树 (*Jatropha curcas*) 和毛白杨 (*Populus tomentosa*) 作为对照, 说明不同物种的 PAL

基因同源性较高^[7]。

2.4.3 竹子 PAL 的蛋白质三级结构预测

使用 CPHmodels 2.0 Server 服务器预测 PAL 的蛋白质空间结构。分析结果如图 5 所示, 4 种 PAL 蛋白三维结构相似, 与丹参 smPAL1 蛋白的三维结构同源建模获得的结构也相近, 均呈“海马”状, 各个 PAL 均具有 3 个结构域, 这与其他植物中的 PAL 蛋白结构类似^[8]。但蛋白质的真实结构还有待于应用 X-ray 晶体衍射方法进一步分析, 各个结构域的具体功能也还有待鉴定。

2.4.4 PAL 氨基酸序列的同源性分析

使用软件 MEGA 4.0^[9]对 27 种美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 已经发表的植物 PAL 氨基酸序列与本试验所获得的 4 种竹子的 PAL 氨基酸序列进行比对, 经过 Clustal 进行同源序列间的配比后, 用 Neighbor Joining (NJ) 邻接法法构建共 31 种植物同源氨基酸序列的进化树。结果如图 6 所示。从图中可知, 本试验中所获得的 4 种竹子与 NCBI 已发表的禾本科竹亚科植物毛竹、绿竹亲缘关系最近。另外, 与单子叶植物禾本科除竹亚科植物外的玉米 (*Zea mays*), 甘蔗 (*Saccharum officinarum*) 等的亲缘关系较近。而与双子叶植物的辣椒 (*Capsicum annuum*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、红参 (*Salvia miltiorrhiza*)、莴笋 (*Lactuca sativa*) 等亲缘关系较远。这说明 PAL 基因在进化中出现较大差异。另外, 从图中可以看出, PAL 基因序列在竹类植物中保守性很高, 虽然丽水苦竹 (苦竹属) 与绿竹 (*Bambusa oldhamii*, 竹属) 不属于刚竹属, 但却与刚竹属的竹种亲缘关系较近在一起, 因此, PAL 基因的同源性关系与竹种的进化关系并不呈严格的一致性, 需用更多的竹种进行进一步分析, 以确定个竹种之间 PAL 基因的关系。

```

1  ATCGAGTGGGAGAACGGGCACGTTGCTGCCAATGGCAACGGTCTCTGCATGGCAACGCCCCGCGCCGACCCGCTTAAGTGGGGGAAGCG
1  M E C E N G H V A A N G N G L C M A T P R A D P L N W G K A
91  GCGGAGGAAGTATGGGGTGCCACTTGGATGAGGTGAAGAGGATGGTCACGGAGTACCGCAACCCGTTGGTGAAGATCGAGGGCGCCAGC
31  A E E L M G C H L D E V K R M V T E Y R Q P V V K I E G A S
181  CTGAGGATCGCGCAGTTCGCGCAGTGGCCGCGCCGCGAGGCCAAGGTGGAGCTCGACGAGTCGGCTCGCAACCGCTCAAGGCCAGT
61  L R I A Q V A A V A A A G E A K V E L D E S A R E R V K A S
271  AGCGACTGGGTATGAACAGCATGATGAACGGCACCGACGCTACGGTGTACCAACCGGCTTCGGTGCCACATCCACCGGAGGACCAAG
91  S D W V M N S M M N G T D S Y G V T T G F G A T S H R R T K
361  GAGGGTGGTGCTCTCAAAGGGAGCTCATCAGTACGAATTAAGCTTCCTAACAGTAGAGTCATTGGTTTGATCAGTGTGCTTTAGGT
121  E G G A L Q R E L I R
451  TACGATTATGCAAGTTGACCTTGCTCTAATTAACGTGGTGAAATGCTTGTCTTCTCGACAGATTCTCAATGCCGGCGGCTTTGGCAC
132  F L N A G A F G T
541  TGGCACGACAGCCATGTTCTGCTGTGCGGCAACCCGTGCGGCCATGCTCGTCCGATCAACACTCTCTTCAAGGATACTCTGGAAT
141  G T D S H V L P A A A T R A A M L V R I N T L L Q G Y S G I
631  CCGGTTGAGATCCTCGAGGCGATTGCCAAGCTGCTCAATGCCAATGTACGCGCTGCCACCGCTCCGGGACGATACCGCGTCCGG
171  R F E I L E A I A K L L N A N V T P C L P L R E T I T A S G
721  TGACCTGGTCCCGCTGCTACATTGCTGGCTCGTACCGGCGCGAGAACTCTGTTGCTGTACCCCTGATGGCAGGAAGGTGAACGC
201  D L V P L S Y I A G L V T G R E N S V A V T P D G R K V N A
811  CGCCGAGGCGTTCAAGATTGCCGGCATCCAGGGCGGCTTCTTCGAGTTGACGCCAAGGAAGGTCTTGCCATGGTGAACGGTACAGCTGT
231  A E A F K I A G I Q G G F F E L Q P K E G L A M V N G T A V
901  GGGCTCCGTTCTCGCATCGACCGTGTCTTTGAGGCGAATCTTGGCCATCTTCCGAGGTCTGTCCGCGGTGTTCTCGGAGGTAT
261  G S G L A S T V L F E A N I L A I L A E V L S A V F C E V M
991  GAACGGCAAGCCGAGTACACTGACCCTGACCCCAAGCTGAAGCACCACCGGACAAATCGAGGCTGCTGCTATCATGGAGCAT
291  N G K P E Y T D H L T H K L K H H P G Q I E A A I M E H I
1081  CTGGAGGGAAGCTCTACATGAAGCTTGCTAAGAAGCTTGGCGAGCTCGACCCACTGATGAAGCCAAAGCAAGACCGGTACGCGCTCAG
321  L E G S S Y M K L A K K L G E L D P L M K P K Q D R Y A L R
1171  AACATCCCCGAGTGGCTCGGCCGCAAAATTGAGGTTATCCGTGCGACCCACCAAGTCCATTGAGCGGAGATCAACTCCGTCAATGACAA
351  T S P Q W L G P Q I E V I R A A T K S I E R E I N S V N D N
1261  CCCACTCATGATGTCTCCGCGGCAAGGCGATTACGGTGGCACTTCCAGGGTACGCCCATCGGCGTTTCCATGGACAACACCGCGCT
381  P L I D V S R G K A I H G G N F Q G T P I G V S M D N T R L
1351  CGCCATTGCCGCATCGGCAAGCTTATGTTCCGCGAGTCTCAGAACTCGTAACGACTTCTACAACAACCGCTGCTTCCAACCTGTC
411  A I A A I G K L M F A Q F S E L V N D F Y N N G L P S N L S
1441  CGGCGGCGCAACCCGAGCTTGACTACGGCTTCAAGGCGCGAGATCGCCATGGCCTCGTACTGCTCTGAGCTGCAAGTCTTGGGCAA
441  G G 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 L G N
1531  CCCGTTGACTAACACGTCAGAGCGCGGAGCAGCAACACGAGCGTGAATCTCTTGGCCTCATCTTCCAGGAAGACCGCGAGGC
471  P V T N H V Q S A E Q H N Q D V N S L G L I S S R K T A E A
1621  CATCGACATCTTGAAGCTCATGTCTCGACCTTCTTGGTTGCCCTGTGCGAGGCCATCGACCTTCGCCACATCGAGGAGAATGTCAAGAG
501  I D I L K L M S S T F L V A L C Q A I D L R H I E E N V K S
1711  CGCCGTCAAGAGCTGCGTCATGACAGTGGCCAAGAAGACTCTGAGCACCAACTCCACCGGTGATCTTACGTGGTGGCTTCTGCGAGAA
531  A V K S C V M T V A K K T L S T N S T G D L H V G R F C E K
1801  GGACCTGCTCAAGGAGATCGACTGTGAGCGGTGTTCCGCTACGCCGACGCCGTGACGCCCAACTACCCACTGATGAAGAAGATGCG
561  D L L K E I D C E A V F A Y A D D P C S P N Y P L M K K M R
1891  CAATGTCTGCTGGAGCGCGCCCTTGCTAACGCATGGCTGAGTTCAATGCAGAGACCTCCGTGTTTGGCAAGGTTGCCAGTTCGAGGA
591  N V L V E R A L A N G M A E F N A E T S V F A K V A Q F E E
1981  GGAGTTGCGCGCGGCTGCCAGGGCGGTTGAGGCCGACGGCAGCTGTGGAAGACGGCAGCAGCATTACCCAACAGAATCACTGA
621  E L R A A L P R A V E A A R A A V E N G T A A L P N R I T E
2071  GGGCCGCTCGTACCGCTCTACCGGTTTGTGCGTGAGGAGCTCGGAGCCGCATACCTACCGGCGAGAAGACACGGTCGCCGCGAGGA
651  G R S Y P L Y R F V R E E L G A A Y L T G E K T R S P G E E
2161  GCTGAACAAGGTGCTGTTGCCATCAACAGGGCAAGCACATCGACCCGCTGCTCGAGTGCCTCAAGGAGTGAACGGCGAGCCCTGCC
681  L N K V L V A I N Q G K H I D P L L E C L K E W N G E P L P
2251  CATTTGCTAA
711  I C *

```

图 4 高节竹 DNA 序列及推测的蛋白质序列

Fig. 4 Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of PAL from *Phyllostachys prominens*

注:双下划线为起始密码子(ATG)和终止密码子(TAA);下划线部分为内含子;

阴影部分为内含子特征结构(GT/AG);黑框部分推测为苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性位点

Notes: Double underline denotes initiation codon (ATG) and termination codon (TAA); single underline denotes the intron; GT/AG splicing site is shaded; the possible active site consensus sequence is boxed

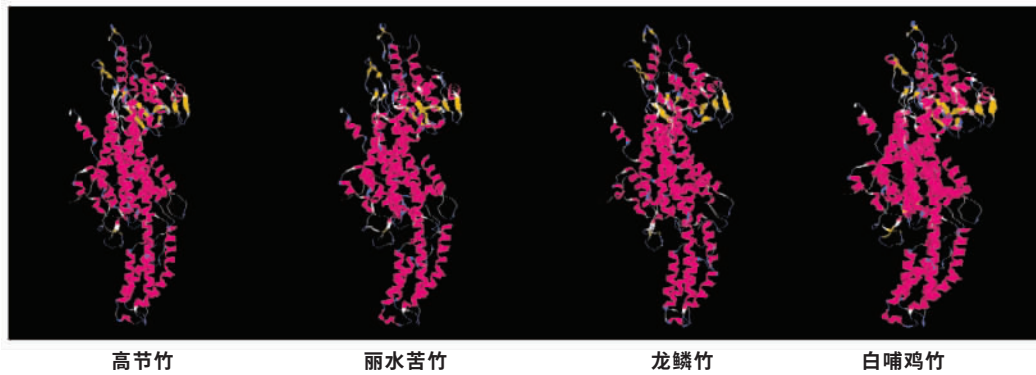


图 5 4 种竹子的 PAL 的预测三级结构

Fig. 5 Predicted dimensional structure of PAL protein of four kinds of bamboo

注:红色部分为 α 螺旋;黄色部分为 β 折叠片;蓝色部分为无规则卷曲

Notes: red, alpha helix; yellow, beta sheet; blue, reundom coil

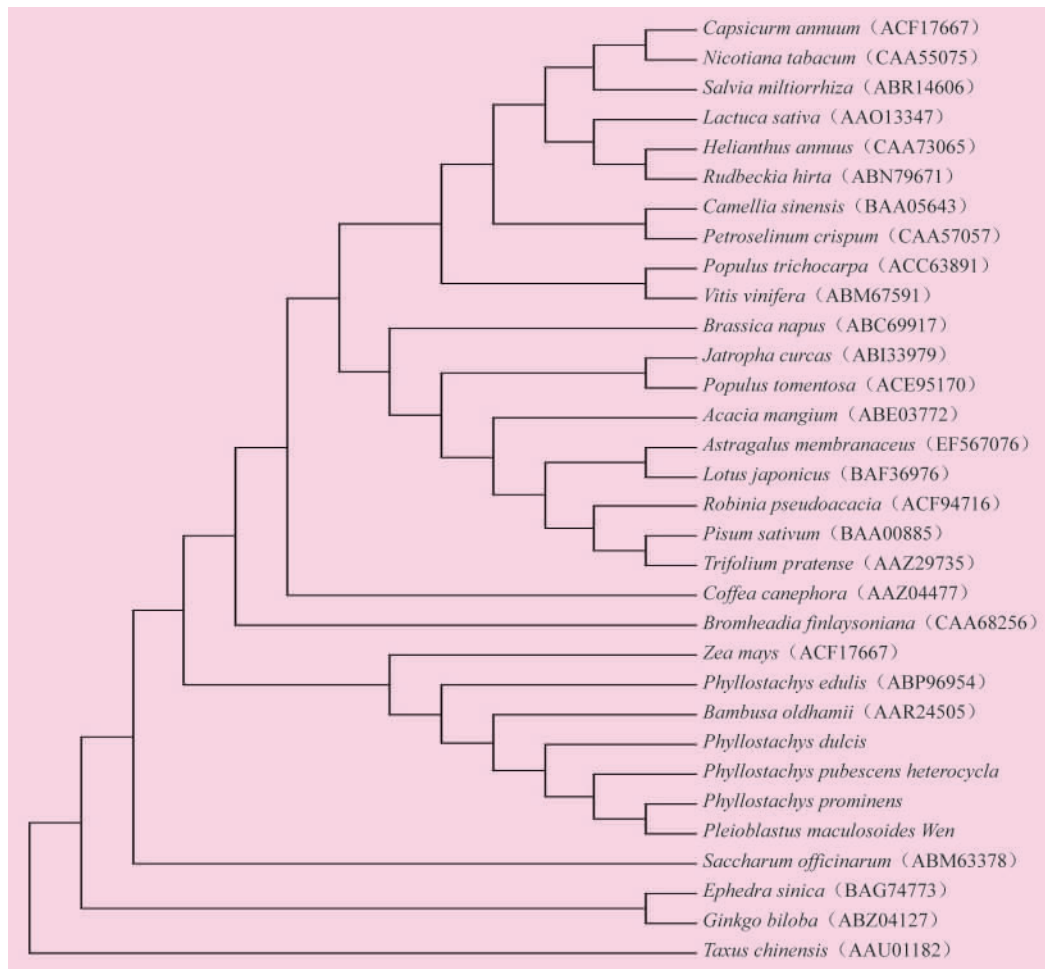


图 6 PAL 氨基酸序列的同源性分析

Fig. 6 Homology analysis of PAL amino acid sequence

3 讨论和结论

PAL 广泛存在于高等植物中,是木质素合成的关键酶和限速酶。竹子作为一种重要的经济作物,是造纸工业的重要原材料。然而,竹材中的木质素成分含量较高,影响造纸工艺和纸张质量。本试验使用 RACE 方法分别从白哺鸡竹、高节

竹、龙鳞竹和丽水苦竹 4 个竹种的 RNA 和 DNA 中成功克隆了 *PAL* 基因的序列,获得了全长,并对序列进行了生物信息学分析。结果表明,*PAL* 基因的开放读码框长度均为 2 136 bp,共编码 712 个氨基酸,具有两个外显子和一个内含子的结构,这与目前所报道的许多 *PAL* 基因相似^[10]。本试验使用服



务器对 PAL 的三维结构进行预测,结果显示呈“海马”状,这与使用 X 射线晶体衍射对红冬孢酵母菌 (*Rhodospiridium toruloides*)^[11]和欧芹 (*Petroselinum crispum*)^[12]的 PAL 的空间结构进行鉴定的结果相一致。序列分析表明,4 种竹子的 PAL 基因都具有一个保守的 PAL 活性位点 Ala-Ser-Gly (A-S-G) (如图 4 所示),这说明本试验所获得的 4 种 PAL 蛋白均与其他物种的 PAL 蛋白具有相同的催化功能。

然而,PAL 基因的普遍特点是由小的多基因家族组成,在 1 组染色体中,一般含有 2~6 个 PAL 基因,并且可以分为 2~3 个不同的类群或亚族。如菜豆有 3 个^[13],番茄有 5 个^[14],而松树仅有一个 PAL 基因^[15]。PAL 基因在植物中的表达具有组织特异性,且同一物种 PAL 基因的不同家族成员的表达也不同。如菜豆 PAL 的 3 个基因 PAL1、PAL2 和 PAL3 都能在根部大量表达,而叶中仅 PAL1 表达,花瓣中 PAL2 表达量最高,PAL1 表达量相对较少,PAL3 则不表达^[16]。因此,竹子中的 PAL 是否存在同源基因尚有待应用 Southern 杂交等方法进一步分析。

鉴于苯丙氨酸解氨酶在植物次生代谢过程中的重要作用,其功能已被广泛研究。利用反义核酸技术降低苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 中苯丙氨酸解氨酶基因的表达^[17],植株表现出生长延缓等异常表型,说明苯丙氨酸解氨酶基因在植物的生长发育过程中起着极为重要的作用。此外,苯丙氨酸解氨酶还是多种植物主要次生代谢物合成的关键控制点,如咖啡 (*Coffea canephora*) 中奎宁酸的合成^[18]及黄芪 (*Astragalus membranaceus* var. *Mongholicus*) 中栲精的积累等均与苯丙氨酸解氨酶基因的表达密切相关^[19]。

另外,构建 RNA 干扰表达载体,转化至竹类植物的再生体系中,观察竹子的生理生化变化可进一步研究 PAL 基因在竹类植物中的作用,探明竹类植物木质素合成过程及次生代谢物合成过程中 PAL 基因的作用机制。

参考文献 (References)

- [1] Zhong R Q, Morrison W H, Himmelsbach D S, *et al.* Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124: 563-578.
- [2] 陈建荣, 张学文, 郭清泉, 等. CCoAOMT 基因反义表达载体的构建及转化苕麻的研究[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2005, 28(1): 75-78.
Chen Jianrong, Zhang Xuewen, Guo Qingquan, *et al.* *Journal of Natural Science of Hunan Normal University*, 2005, 28(1): 75-78.
- [3] Sewalt V J H, Ni W, Blount J W, *et al.* Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115(1): 41-50.
- [4] 刘晓娜, 刘雪梅, 杨传平, 等. 木质素合成研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(3): 120-126.
Liu Xiaona, Liu Xuemei, Yang Chuanping, *et al.* *China Biotechnology*, 2007, 27(3): 120-126.

- [5] 文兰, 高健, 李雪平, 等. 快速微量提取竹子叶片 DNA 的方法[J]. 世界竹藤通讯, 2005, 3(4): 18-20.
Wen Lan, Gao Jian, Li Xueping, *et al.* *World Bamboo and Rattan*, 2005, 3(4): 18-20.
- [6] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150-163.
- [7] Minami E, Ozeki Y, Matsuoka M, *et al.* Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 185: 19-25.
- [8] Song J, Wang Z. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(5): 939-952.
- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [10] Cramer C L, Edwards K, Dron M, *et al.* Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure [J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 12: 367-383.
- [11] Calabrese J C, Jordan D B, Boodhoo A, *et al.* Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: Multiple helix dipoles implicated in catalysis[J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 11403-11416.
- [12] Ritter H, Schulz G E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 3426-3436.
- [13] Cramer C L, Edwards K, Dron M, *et al.* Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure [J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 12: 367-383.
- [14] Fukasawa-Akada T, Kung S D, Watson J C. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 30: 711-722.
- [15] Whetten R W, Sederoff R R. Phenylalanine ammonia-lyase from loblolly pine: Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones[J]. *Plant Physiology*, 1992, 98: 380-386.
- [16] Hahlbrock K, Scheel D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1989, 40: 347-369.
- [17] Chen F, Reddy M S S, Temple S, *et al.* Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wallbound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. *The Plant Journal*, 2006, 48(1): 113-124.
- [18] Mahesh V, Rakotomalala J J, Le Gal L, *et al.* Isolation and genetic mapping of *Coffea canephora* phenylalanine ammonia-lyase gene (CcPAL1) and its involvement in the accumulation of caffeoyl quinic acids[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(9): 986-992.
- [19] Liu R R, Xu S H, Li J L, *et al.* Expression profile of a PAL gene from *Astragalus membranaceus* var. *Mongholicus* and its crucial role in flux into flavonoid biosynthesis[J]. *Plant Cell Reports*, 2006, 25(7): 705-710.

(责任编辑 王芷)