

苯丙氨酸解氨酶研究进展

徐晓梅^{1,2}, 杨署光^{1*} (1. 中国热带农业科学院橡胶研究所农业部橡胶树生物学重点开放实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南儋州 571737; 2. 海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228)

摘要 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC4.3.1.5)广泛存在于各种植物和少数微生物中。它是连接生物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,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。综述 PAL 的存在与分布、基本特性、在植物和微生物中的研究现状,重点介绍植物 PAL 的基因结构、表达特点以及基因表达调控机制,为 PAL 的深入研究指明了方向。

关键词 PAL; 基本特性; 生理作用; 基因表达与调控

中图分类号 Q946.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)31-15115-05

Advances in the Studies of Phenylalanine Ammonialyase

XU Xiao-mei et al (Ministry of Agriculture Key Laboratory of Rubber Biology/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation and Physiology of Tropical Crops Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract Phenylalanine ammonia-lyase, (PAL, EC4.3.1.5) is widespread in plants and parts of microbe. PAL, which catalyzed the first reaction in phenylpropanoids metabolism, connected biological primary metabolism to phenylpropanoids metabolism. It has been extensively studied and it is key enzyme and rate-limiting enzyme in phenylpropanoids metabolism. The existence and distribution, basic characteristic, research situation in plant and microbe of PAL gene, especially the genetic composition, expression pattern and regulation mechanisms of PAL gene in plants were reviewed. The direction of the further research of PAL was pointed out.

Key words Phenylalanine ammonia-lyase; Basic characteristics; Biological function; Gene expression and regulation

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC4.3.1.5)广泛存在于各种植物和少数微生物中。它是连接生物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,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。苯丙烷类代谢途径是生物特别是植物代谢中一条很重要的途径,一切含苯丙烷骨架的物质都是由这一途径直接或间接生成的。莽草酸途径产生的 L-苯丙氨酸(L-phenylalanine, L-phe),经 PAL 解氨作用生成反式肉桂酸,而进入苯丙烷类代谢途径,苯丙烷类代谢可生成类黄酮、木质素等多种次生代谢产物,这些次生产物在植物的生长发育、抗病、抗逆反应中起着重要的作用。苯丙烷类代谢途径产生的多种次生代谢物是植物中重要的活性成分,在医药、保健和食品工业等领域具有诱人的应用前景。在微生物中, PAL 的主要用途是催化反式肉桂酸转化合成 L-phe。L-phe 是合成阿斯巴甜(aspartame, APM)的主要原料,随着 APM 的全球热销和反式肉桂酸生产成本的降低,利用 PAL 转化反式肉桂酸合成 L-phe 的方法已成为当前生物化工领域研究的热点。为此,笔者就 PAL 的研究进展进行综述。

1 PAL 的存在与分布

PAL 主要存在于高等植物、部分微生物(丝状真菌、酵母及链霉菌)和某些藻类中,动物体内尚未发现。1961 年, Koukol 等首次从绿色植物中发现 PAL, 并进行了分离纯化^[1], 随着 PAL 研究的迅速展开, 在真菌、细菌和藻类中也发现该酶的存在。1966 年, Ogata 等在研究芳香族氨基酸的微生物代谢时, 发现红酵母属中的某些种能以 L-phe 唯一碳、氮源生长, 并在培养基中积累肉桂酸^[2]。随后, 该酶相继在其他微生物中被发现, 主要有霉菌与酵母菌^[3]。Towers 等在

真菌和某些藻类如 *Dunaliella marina* 中提取过 PAL^[4]。近期, Xiang 等在研究一种原核生物 *Streptomyces maritimus* 时发现其含有 PAL^[5]。

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^[6], 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^[7]和一些膜细胞器, 如叶绿体、白色体、线粒体、过氧化酶体、乙醛酸体^[8]; Jin Nakushima 等也进行了 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^[9]; 免疫细胞化学研究显示, PAL 合成于栅栏细胞和海绵细胞, 主要在细胞质和叶绿体内^[10]。高东尧克隆了高山红景天 PAL 的基因 *PALcl1* (GenBank: AY879309), 对推导的氨基酸序列进行跨膜区分析, 发现 *PALcl1* 氨基酸序列不存在跨膜区域, 说明 PAL 是一种典型的基质蛋白^[11], 与 Jin Nakushima 等进行 PAL 的亚细胞定位时发现 PAL 分散在细胞基质中^[9]的结论一致。

2 PAL 的基本特性

PAL 属胞内诱导酶, 是一种酸性蛋白。酶蛋白是一种含有 4 个亚基的寡聚体。多数 PAL 有均一的亚基, 亚基分子量在 55~88 kDa, 酶蛋白分子量一般在 220~330 kDa, 但不同来源稍有差异, 如马铃薯 PAL 分子量为 330 kDa, 玉米为 306 kDa, 小麦和水稻分别为 280、230 kDa^[12]。值得注意的是, PAL 亚基间的结合是非常牢固的, 要把 PAL 的亚基分离开来需要高浓度的尿素、氯化胍或 SDS-巯基乙醇。因此, 生物体内的 PAL 是比较稳定的, PAL 的亚基被破坏后, 进行复性是非常困难的。PAL 的氨基酸组成随不同来源而异, 如水稻 PAL 氨基酸组成中酸性氨基酸成分低于小麦、玉米和马铃薯, 而中性及碱性氨基酸成分则高于后三者^[13]。PAL 在酶活性部位具有脱氢丙氨酰基的亲电中心^[14]。不同来源的 PAL 最适 pH 值在 8.5~9.5, 如甘薯 PAL 最适 pH 值为 8.5~

作者简介 徐晓梅(1984-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向: 植物发育生物学。* 通讯作者, E-mail: yangshuguang198241@163.com。

收稿日期 2009-07-01

9.5, 水稻为 9.2, 小麦为 8.8, 与其氨基酸组成相一致^[15]。除个别生物如粘红酵母的 L-PAL 在底物为 NH_4^+ 时的酶促反应符合经典的米氏方程外, 大多数生物的 PAL 动力学曲线并不遵循米氏方程。但 1985 年, Bolwell 采用 2 次聚焦色谱从菜豆中分离得到的 4 种 *Mr* 相同, *pI* 不同的 PAL 同工酶, 均表现出典型米氏动力学特征, 而未经分离的同工酶混合物却表现为典型的负协同变构酶动力学特征^[16]。各种来源的 PAL *Km* 不同, 在 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ mmol/L, 水稻 PAL 的 *Km* 为 5.94×10^{-4} mmol/L; 且有的存在 2 个 *Km*, 如小麦 PAL 的 *Km* 有 2 个, 为 0.625×10^{-4} 、 3.1×10^{-4} mmol/L^[12-13]。PAL 具有别构酶的特点, 是一种典型的胞内诱导酶, 研究表明, 在培养细胞中加入诱导物时, PAL 基因的转录活性增高^[17]。L-phe 和 L-酪氨酸 (L-tyr) 或某些结构类似物可诱导其从头合成^[18]。

3 PAL 对植物生理代谢的意义

3.1 在细胞分化和木质化中的作用 愈伤组织分化过程中 PAL 活性有所增高, 在许多植物的组培中, 把 PAL 的活性是否跃升作为能否分化的指标。Tubery 等发现, 在多种植物的木质化组织中含有较高的 PAL 活性, 而在这些植物的非木质化组织中不能检测到 PAL 活性^[19]。Jin Nakashima 等用分离的百日草叶肉细胞研究了苯丙烷类代谢酶类与木质素、管状分子形成和细胞分化的关系, 发现在百日草细胞分化过程中, 木质素的合成及管状分子形成与 PAL 活性的增加呈正相关^[20]; 细胞质中的 PAL 活性在木质化之前迅速上升, 而微粒体和细胞壁的 PAL 活性在木质化期间快速增加^[9]。

3.2 在植物色素形成过程中的作用 Neish 证实了 PAL 能催化花青素的合成^[21]。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素、花色素苷等。这些都是植物花朵、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^[22]。觅红素是中央种子目植物所特有的色素, 用白光、蓝光或红光照射尾穗觅黄化苗后, 发现 PAL 活性均有不同程度的上升, 并有觅红素的积累^[23]。

3.3 在植物的根瘤形成过程中的作用 苯丙烷类代谢产物经类黄酮途径可产生黄酮类化合物, 这些化合物对根瘤菌有趋化作用^[24], 有些类黄酮化合物还可作为根瘤菌结瘤基因的诱导物质^[25]。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 PAL 活性常逐渐增加。

3.4 在植物抗逆境中的作用 许多植物在遭受寒冷^[26]、伤害^[27]、紫外辐射^[28]后, 防卫系统特别是苯丙烷类代谢被激活, PAL 活性迅速上升。因此, PAL 活性可以作为植物抗逆境能力的一个生理指标。

3.4.1 与植物抗虫性的关系。关于 PAL 直接参与植物抗虫方面的报道较少, 但关于苯丙烷类代谢途径与植物抗虫性的报道已有很多, 这些研究主要集中在这一代谢途径的产物与植物抗虫性的关系方面。木质素的积累可使细胞壁加厚, 成为食草类动物取食的机械障碍, 而植保素对草食性昆虫具有毒害作用和趋避作用, 这些化合物的生成与 PAL 含量存在着间接的关系。大量试验证明, PAL 活性高低与植物的抗虫性有很大关系, 而且食草类动物的取食也可诱导很高的 PAL 活性^[29]。

3.4.2 在植物抗病中的作用。

(1) 与植物抗病性的关系。1964 年, Minamiauka 和 Urutani 首先发现植物感染病原菌后 PAL 活性有明显增强的现象, 以后陆续发现多种植物受病原菌感染后, PAL 活性明显升高, 并表现出规律性的变化: 感染最初几小时上升比较缓慢, 随后活性急剧上升达到顶峰, 接着活性又急剧下降, 致病菌对 PAL 活性的影响远大于非致病菌, 且病原菌接种后, 抗感品系的 PAL 活性均有所增加, 但病原菌作用于抗病品系植物诱导产生的 PAL 活性远比感病品系高^[30]; 毒素处理与病原菌感染同样能刺激 PAL 活性升高, 而且毒素的作用更强, 反应更早^[31]; 从真菌培养液和菌丝细胞壁制备的激发因子也能诱导 PAL 活性的增加^[32]; 病原菌的侵染、病毒素诱导或真菌培养液的诱导, 所引起的 PAL 活性的增加幅度与这些激发因子的浓度有关, 或者说与植物的受害程度有关, 且在侵染点周围病原菌对酶活性刺激作用高于离侵染点较远的部分, 在最边缘部位 PAL 活性与未感染部位基本相同^[33]。诱导子诱导后, 随着 PAL 活性的升高, 苯丙烷类代谢途径及其下游途径中的某些酶类的活性也升高。

(2) 参与植物抗病的机制。参与木质素与植保素的合成。PAL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶, 也是合成木质素的关键酶。木质素的形成可以增加细胞壁的厚度, 增加组织木质化程度, 形成病原菌入侵的机械屏障^[34]; 植保素是植物受侵染或胁迫而产生的一类低分子量抗微生物的化合物, 主要包括酚类植保素、异黄酮类植保素和萜烯类植保素。其中, 前两类都是苯丙烷类代谢的直接或间接产物, 其生成量与 PAL 活性呈正相关关系^[12,29]。

4 微生物 PAL

1966 年, Ogata 等在研究芳香族氨基酸的微生物代谢时发现, 红酵母属中的某些种能以 L-phe 为唯一碳、氮源生长, 并在培养基中积累肉桂酸^[2,35]。随后, 该酶相继在其他微生物中被发现, 主要有霉菌与酵母菌^[36]。微生物 PAL 的主要用途是催化反式肉桂酸转化合成 L-phe。目前, 对微生物 PAL 的研究主要集中在菌种选育以及提高 PAL 活性和稳定性方面。

4.1 生产 PAL 的微生物选育 在菌种选育方面, 主要有直接筛选法、天然源富集分离筛选、诱变选育、原生质体融合法和 PAL 菌种的基因工程育种。Kupletskeya 等对 417 株产色素酵母和 112 株丝状真菌直接筛选发现, 产色素酵母中所选取的 *Phaffia* 属 11 株, *Bullera*、*Cyatofilobasidium*、*Tillelopsis* 3 属 45 株不具有 PAL 活性^[37]。中国科学院成都生物研究所利用富集筛选技术, 分离出 PAL 的高产菌株——粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) CIBAS A1401, 利用该菌株在国内率先成功生产 L-phe, 产率达到 30 g/L。Evans 等用紫外诱变粘红酵母, 以 L-tyr、对氟-DL-phe (PEP) 和 β -2-噁吩-DL-丙氨酸等弱作用结构类似物进行筛选, 获得了高产 PAL 的活性突变株 FP10M6, 该菌株酶活性比亲本高 5 倍, L-phe 的积累浓度达到 18 g/L^[38]。由于红酵母细胞壁的结构组成主要以葡甘露聚糖为主, 约占细胞壁骨架结构的 50%, 且氨基葡糖含量高, 约占 6%, 导致红酵母原生质体制备难度较大, 原生质体融合法的研究报道相应较少。1993 年, Kaul 等报道了深红酵母及其他几种酵母原生质体制备所需的细胞壁裂解酶活性酶

源微生物的筛选,但效果不明显^[39];1992年,Orum等将圆红冬孢酵母的PAL基因插入表达载体pKK223-3中,得到重组载体pPAL12,转化大肠杆菌JM101和SG1611中表达,该质粒可以合成与预计分子量大小相似的蛋白质,同时具有类似PAL的活性^[40];Faulkner等构建了一种酵母启动子嵌合体(pPGK::PEP2),这种嵌合体可以在酿酒酵母和大肠杆菌中启动PAL高效表达,细胞中PAL的积累量分别占细胞总蛋白的9%和10%,诱导表达的PAL酶活水平是Orum等报道的100倍^[41]。

4.2 PAL活性和稳定性研究 为了提高PAL酶在反式肉桂酸转化过程中的稳定性和重复使用率,有学者利用固定化技术对此进行了研究。王晓华等研究表明,当采用聚丙烯酰胺凝胶(PAG)包埋PAL时,酶活性保护较好^[42];邓旭等研究了固定化PAL酶合成L-phe过程中酶活与稳定性的情况,考察了不同氨基供体、肉桂酸浓度、pH值以及酶的不同固定化量等因素对酶反应过程的影响,确定了维持酶活的最佳保存条件以及最适反应条件^[43]。崔建东等对重组PAL稳定性的研究发现,10%的甘油可以显著提高重组PAL的稳定性,巯基乙醇、蔗糖和镁离子可以提高酶活,但重金属离子却使PAL失活^[44]。为了提高PAL活力,Nakamichi等研究发现,除了L-phe外,L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-甲硫氨酸、L-色氨酸、L-tyr也可以诱导并提高PAL的活力^[45]。此外,为了减少细胞膜对底物的通透性障碍,一些学者通过利用表面活性剂或有机试剂,来改善红酵母细胞通透性,从而提高酶活。Godwin等用葡糖醛酸酶和曲通100联合处理红酵母细胞,结果酶活提高了9倍^[46]。

5 植物PAL

5.1 基因的结构 迄今为止,对植物PAL基因的研究最多,已有多种植物的PAL基因序列已经测定并公布在GenBank中。植物PAL基因结构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个基因^[47]、欧芹有4个基因^[48]、番茄有5个基因^[49]、烟草有4个基因,其中,PAL1和PAL2属于一个亚族,PAL3和PAL4属于另一个亚族^[50]。但是马铃薯和松树却是例外,在马铃薯中,PAL基因估计有40~50个之多,其中,至少有10个或更多的基因具有潜在的活性^[51];而松树中,只报道了1个PAL基因存在^[52]。植物PAL基因一般由2个外显子和1个内含子组成。PAL基因的编码区长度变化不大,一般在200bp左右,菜豆PAL2编码区长2136bp,PAL3编码区长2130bp^[47],水稻PAL编码区长2103bp^[53],樱桃PAL编码区长2151bp,苜蓿PAL1编码区长2175bp^[54]。在多数植物中,PAL基因唯一的内含子位置是保守的,但其长度变化很大。同一植物的不同PAL基因在总体结构上是相同的,但是2个基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列存在相当大的变异,变异程度在不同区段是不同的。菜豆PAL2和PAL3的外显子1表现出59%的序列同源性,外显子2有74%的同源性,而在内含子以及基因的5'端和3'端序列表现出较大的变异^[47]。

微生物PAL基因结构与植物不同。1987年,Anson等报道了*Rhodotorula toruloides*的PAL基因(GeneBank/MI8261),

发现*R. toruloides* PAL基因有6个内含子,结构基因上游有1段富含C+T的序列。这与脉孢菌(*Neurospora*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的某些基因具有相似性,而在*S. cerevisiae*中,这段富含C+T的序列在一些高表达基因的转录中具有重要的作用^[55]。这提示PAL基因中这段富含C+T的序列对表达的意义,有利于PAL基因工程菌的构建。同时,Anson等归纳出了编码*R. toruloides* PAL基因的密码子的使用频率^[56]。这对从cDNA(DNA)中扩增PAL基因时设计PCR引物具有重要的参考价值。

5.2 表达的特点 PAL在植物组织中的表达具有组织特异性,也受发育的调控。同一PAL基因家族中不同PAL成员的表达模式也不相同。在大多数植物中,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,而在成熟的叶片中几乎不表达。菜豆PAL的3个基因PAL1、PAL2和PAL3都能在根部大量表达;芽中PAL1和PAL2均有表达;叶中仅PAL1有表达;花瓣中PAL2大量表达,PAL1表达量很少,PAL3不表达^[47,57]。草莓^[58]、苹果、梨^[59]的果实在发育过程中,PAL活性有2个高峰,一个为幼果期,另一个为果实成熟期。

5.3 表达调控的方式

(1)对苯丙烷类代谢途径的调控受酶的内部调节。一方面受到苯丙烷类代谢途径产物的反馈调节^[60-62];另一方面,植物体内存在一种PAL的内源性抑制物质(PAL-I),参与了PAL活性调节,这已在水稻、马铃薯、萝卜、向日葵中得到证实。从去胚乳的水稻黄化苗中提取并部分纯化PAL-I^[11],发现它是一种非透析蛋白,具有热稳定性;动力学试验表明,PAL-I对PAL的抑制是竞争性的,它不仅能抑制水稻PAL,而且能抑制从玉米、小麦、马铃薯块茎切片中提取的PAL;研究还发现,单子叶植物幼苗胚乳中普遍存在PAL内源抑制物质的调节因子(PAL-inhibitor-regulator, PAL-IR),去胚乳后,内源抑制物质增加,幼苗中PAL活性下降。目前认为胚乳对幼苗PAL活性的调节作用在禾本科植物中具有普遍意义,而双子叶植物子叶对PAL的调节作用不具有普遍性,要比单子叶植物的胚乳复杂得多^[12,63]。

(2)苯丙烷类代谢途径的调控也受外部因子的调节。各种类型的低温、乙烯、机械伤害、光、病原物及病菌诱导物、病菌毒素、抗生素等均能调节PAL基因的表达。一般来说,施用生长素、激动素、PP₃₃₃、外源乙烯后,PAL活性增加,而施用NAA、GA₃后,PAL活性降低。ABA作为GA的拮抗物,能使离体豌豆茎轴中的PAL活性升高,并且使PAL活性高峰期提早出现;乙烯可以诱导植物PAL基因的表达,研究表明,植物在生长发育过程中以及受病原物及其诱导物侵染和伤害等刺激时,PAL常伴随植物体内乙烯生物合成的增加而积累^[64],外源的乙烯也能提高PAL的mRNA水平^[65];植物PAL基因的表达受植物病原物及病菌诱导物的诱导调控,用病原菌毒素处理能刺激PAL活性升高,而且毒素处理的作用强度大于病原菌接种的作用强度;机械伤害也能刺激PAL的表达,引起PAL活性的升高^[48];而且各种因子对PAL的诱导存在互作关系^[66]。

5.4 基因表达调控的机制 PAL的表达调控机制很复杂,PAL基因的表达受生长发育、病菌感染、环境刺激等多种因

素的影响,且不同因素影响下,PAL的表达模式又各不相同。PAL多基因家族在表达上的差异是由于它们的启动子所包含的顺式作用元件不同而引起的,由顺式作用元件和相应的转录因子共同作用,控制PAL基因在不同时间和组织中的表达。因此,研究PAL启动子的结构和PAL转录因子有助于了解PAL的表达调控机制。目前,已报道了多种植物PAL的启动子结构,但有关PAL转录因子的研究报道比较少。

欧芹PAL1的启动子区域有2个核苷酸序列,与紫外辐射和诱导反应有关,这些序列在不同种类的好几个与诱导及光反应有关的基因中的位置是保守的^[48];在小麦的PAL1启动子区也含有与在其他基因启动子中鉴定的调控元件高度相似的区域,这些元件包括其他的苯丙烷代谢途径基因的抗紫外线和在真菌诱导中起作用的序列以及在植物的防御基因转录活化中起作用的序列^[57];番茄PAL5上游调控区使用2个不同的转录起始位点以产生1个长的和1个短的转录产物,每一个转录产物对应不同的TATA序列元件和多个保守的上游调控基序,当番茄受到3种刺激(伤害、光照、真菌感染)时,PAL5以一种组织特异性和对刺激的反应而使用不同的转录起始位点^[67];菜豆PAL2与木质素前体合成有关,其启动子区域起始密码子上游-289~-74bp的顺式作用元件对木质部的表达是必需的,但与在叶原基和茎的表达或在花瓣建立组织特异性无关,在-135~-119bp区域有1个负调控元件,它能抑制1个位于-480~-289bp区域的与韧皮部表达相关的隐藏的顺式作用元件的活性^[62]。将菜豆PAL基因(PAL1、PAL2)的启动子与GUS报告基因融合转移到马铃薯、烟草和拟南芥中的研究表明,PAL的表达受环境刺激因子的诱导调控,也受转基因植物发育阶段调控而表现出不同的时空表达模式^[68];表达的组织化学分析表明,菜豆PAL基因启动子在转基因马铃薯和烟草的特定细胞——因受机械伤害而积累苯丙烷类衍生物的细胞中得到表达,也可在发育中的木质部(射线细胞)和花器中表达^[69-70]。这些结果表明,PAL基因启动子在转基因植物中的表达,也受病原菌、转基因植物的发育阶段及其他环境因子的诱导调控。

2001年,Yang等从烟草(*Nicotiana tabacum* cv. Samsun)花粉cDNA文库中分离到2个与矮牵牛(*Petunia hybrida*)PhMYB3序列高度相似的编码MYB相关蛋白的cDNA克隆NtmybAS1和NtmybAS2;Northern blot和原位杂交表明,NtmybAS转录本在花药孢子体和配子体中(包括绒毡层、花药裂口细胞、维管组织和发育中的划分)特异表达;随机结合位点选择分析表明,NtmybAS1在DNA上的结合区与公认的MYB结合位点MBSI和MBSIIG非常相似,且与MBSI同源性更高;N-端瞬时表达分析证明,NtmybAS1的核定位信号及其cDNA全长能激活烟草叶片原生质体的2个不同的PAL启动子PALA和gPAL1;对NtmybAS1cDNA片段进行相似性分析,鉴定了1个C-端顺式激活结构域,原位杂交进一步证明,NtmybAS和gPAL1在绒毡层和花药裂口联合表达;尽管NtmybAS的转录本在成熟花粉中大量表达,但在花粉中检测不到gPAL1^[71]。这证明NtmybAS1是花粉囊特异的转录因子,它很可能是孢子体中gPAL1表达和苯基合成的调节因子,但不是配子体和花粉囊组织中gPAL1表达和苯基合成的

调节因子。这些结果表明,PAL基因转录因子的表达同样具有组织特异性。

6 PAL研究展望

PAL是催化苯丙烷类代谢第一步反应的酶,是苯丙烷类代谢的关键酶和限速酶,苯丙烷类代谢途径的产物在植物生长发育过程中起着重要的作用,而这些物质的含量总是与PAL的活性密切相关,因此PAL对植物有着非常重要的生理意义。目前,国内外对植物PAL的研究集中在它的提取纯化、抗逆境、抗病虫害、生理作用等方面,关于它的基因表达和调控方面的研究还不多,需要进一步深入研究。目前,PAL的表达调控机理还不清楚,研究PAL基因的表达调控机理,对增强作物抗病性、利用PAL对植物进行改造或是利用基因工程来生产在医学上具有重要价值的生物活性物质具有重大意义。对PAL基因启动子及相关的转录因子进行分析可以进一步阐明PAL基因的表达调控机理。因此,克隆PAL基因启动子,找出有关的顺式作用元件将是今后研究的热点之一;苯丙烷代谢途径的不同去向对次生代谢产物积累及生理作用产生巨大的影响,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,转录因子充当了“分子开关”的作用,当它们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,因此,克隆PAL转录因子,研究它们所编码蛋白的功能,将是今后研究的另一个热点。克隆PAL特异基因,分析其结构特点,开展时空表达模式研究,以便有目的地控制其在植物中的表达,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(如银杏叶黄酮)的含量或是降低某些次生物质(如油菜籽中多酚类、木质素等)的积累,这将是今后PAL研究的重点。另外,虽然现在已有用大肠杆菌表达系统、乳酸乳球菌表达系统构建的PAL基因工程菌的报道,但用于表达PAL蛋白的外源基因表达系统还很少,开发新的高效的PAL表达系统具有很大的研究空间。链霉菌表达系统、芽孢杆菌表达系统、甲醇酵母表达系统等都有自身的特点,有利于PAL表达系统的构建。甲醇酵母中含有非常强的甲醇氧化酶基因(methanol oxidase,MOX或alcohol oxidase,AOX)启动子,具备高密度发酵和分泌表达的能力,比传统的酿酒酵母(*S. cerevisiae*)更具产业化发展潜力,它作为一种新的高效分泌型表达外源基因的宿主,近几年来已成为一个研究热点。

参考文献

- [1] 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.
- [2] OGATA K,UCHIYAMA K,YAMADA H. Microbial formation of cinnamic acid from phenylalanine[J]. Agri Biol Chem,1966,30(3):311-312.
- [3] 冯容宝. 氨基酸的工业生产[J]. 发酵科技通讯,2000,29(1):11-14.
- [4] HANSON K R,HAVIR E A. Phenylalanine ammonia-lyase[J]. The Biochemistry of Plants,1981,7:578-621.
- [5] XIANG L K,MOORE B S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase[J]. J Bacteriol,2005,6:4286-4289.
- [6] 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(*Oryza sativa*) and wheat(*Triticum aestivum*)[J]. Journal of Plant Physiology,1985,11(2):204-214.

- [7] JONES D H. Review article number 3: phenylalanine ammonia-lyase. Regulation of its induction and its role in plant development [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(7): 1349 - 1359.
- [8] HANSON R R, HAVIR E A. Secondary plant products [C]. New York: Academic Press, 1981: 577 - 625.
- [9] NAKASHIMA J, AWANO T, TAKABE K, et al. Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase and cinnamylalcohol dehydrogenase in differentiating tracheary elements derived from *Zinnia mesophyll* cells [J]. *Plant Cell Physiology*, 1997, 38(2): 113 - 123.
- [10] MSANTIAGO L J, LOUROR, DE OLIVEIRA D. Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase in leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their induction by copper sulphate [J]. *Annals of Botany*, 2000, 86(5): 1023.
- [11] 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]. 吉林: 吉林大学, 2006.
- [12] 欧阳光察, 薛应龙. 植物苯丙烷代谢的生理意义及调控[J]. *植物生理学通讯*, 1988, 24(3): 9 - 16.
- [13] 欧阳光察, 应初衍. 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.
- [14] OUYANG G C, XUE Y L. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant [J]. *Plant Physiology Communications*, 1988(3): 9 - 26.
- [15] 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望[J]. *果树学报*, 2003, 20(5): 351 - 357.
- [16] BOLWELL G P. L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*: characterization and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cello suspension cultures [J]. *Eur J Biochem*, 1985, 149: 411 - 419.
- [17] YOON K S. Effect of gamma irradiation on the texture and microstructure of chicken breastmeat [J]. *Meat Sci*, 2003, 63: 273 - 277.
- [18] NAM K C, AHN D U. Effects of ascorbic acid and antioxidants on the color of irradiated ground beef [J]. *Food Sci*, 2003, 68: 1686 - 1690.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] NEISH A C. Biosynthesis pathway of aromatic compounds [J]. *Annual Review of Plant Physiology*, 1960(11): 15.
- [22] 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.
- [23] CAETANO A, CRIST-ESTES G D K, BANER W D. Chemotaxis of rhizobium meliloti to the plant flavone luteolin requires functional nodulation gene [J]. *J Bact*, 1988, 170: 3164 - 3169.
- [24] HARTWING V A, PHILLIPS D A. Release and modification of mod gene inducing flavonoids from alfalfa seeds [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95: 804 - 807.
- [25] KOZUKUE N, KOZUKUE E, KISHIGUCHI M, et al. Change in the contents of phenolic substances, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine ammonia-lyase (TAL) accompanying chilling injury of eggplant fruit [J]. *Scientia Horticulture*, 1979, 11(1): 51 - 59.
- [26] LEYVA A, JOSE A, JULIO S, et al. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia lyase and chalcone synthase mRNA of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner [J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(1): 39 - 46.
- [27] BROWN G E. Changes in phenylalanine ammonia-lyase, soluble phenolics and lignin in injured orange exocarp [J]. *Proceedings of the Annual Meeting of the Florida State Horticulture Society*, 1991, 103: 234 - 237.
- [28] BUFFER G, BANGERTH F. UV- induced peroxidase and phenylalanine ammonia lyase activity and phaseolin accumulation in leaves of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to ethylene [J]. *Plant Science Letters*, 1982, 25(2): 227 - 237.
- [29] HARTLEY S E, FIRN R D. Phenolic biosynthesis leaf damage, and insect herbivory in birch (*Betula pendula*) [J]. *Journal of Chemistry and Ecology*, 1989, 15: 275 - 283.
- [30] 庄炳昌. 抗性不同大豆感染灰斑病后若干生化反应 [J]. *作物学报*, 1994, 20(3): 327 - 333.
- [31] 叶明志, 柯玉琴, 夏怡厚, 等. 水稻幼苗感染白叶病后若干同工酶的变化 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 1991, 20(3): 351 - 356.
- [32] DESA M, SUBRAMANIAM R, WILLIAMS F E, et al. Rapid activation of phenylpropanoid metabolism in elicitor-treated hybrid poplar (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray × *Populus deltoides* Marsh) suspension-cultured cells [J]. *Plant Physiology*, 1992, 98: 728 - 737.
- [33] SUBRAMANIAM R, REINOLD S, MOLITOR E K, et al. Structure, inheritance and expression of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*) phenylalanine ammonia 21 lyase genes [J]. *Plant Physiology*, 1993, 102: 71 - 83.
- [34] LEGRAND M, FRITING B, HIRTH L. Enzymes of the phenylpropanoid pathway and the necrotic reaction of hypersensitive tobacco to tobacco mosaicvirus [J]. *Phytochemistry*, 1976, 15: 1353 - 1359.
- [35] BENKERROUM N, DAOUDI A, HAMRAOUI T, et al. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98(1): 56 - 63.
- [36] 周家春. 食品工艺学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 280 - 287.
- [37] LUCORE L A, SHELLHAMMER T H, YOUSEF A E. Inactivation [J]. *Prkl Biokhim Microbiol (Rums)*, 1992, 28(1): 50 - 54.
- [38] EVANS C T, PAYNE C, CONARD D, et al. Isolation of various hyperactive mutants of phenylalanine ammonia lyase containing yeasts [J]. *Can J Microbiol*, 1987, 33(7): 636 - 641.
- [39] KAUL W, ROSSOW U. Screening for microorganisms with cell wall lytic activity to produce protoplase-forming enzyme [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 39(4): 574 - 576.
- [40] ORUM H, RASMUSSEN O F. Expression in *E. coli* of the gene encoding phenylalanine ammonia lyase from *Rhodospirium toruloides* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 36(6): 745 - 748.
- [41] FAULKNER J D B, ANSON J G, TUIITE M F, et al. High level expression of the phenylalanine ammonia lyase encoding gene from *Rhodospirium toruloides* in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* using a bifunctional expression system [J]. *Gene*, 1994, 143(1): 13 - 20.
- [42] 王晓华, 苏海翔. 几种固定化苯丙氨酸解氨酶方法的比较 [J]. *肿瘤防治研究*, 2001, 28(2): 121 - 123.
- [43] 邓旭, 卢英华, 李清彪. 固定化细胞合成 L-苯丙氨酸的酶活及稳定性 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 1997, 36(4): 430 - 435.
- [44] 崔建东, 黄皓, 乔长晟, 等. 重组大肠杆菌苯丙氨酸解氨酶稳定性和反式肉桂酸的转化 [J]. *化学反应工程与工艺*, 2007, 23(4): 25 - 30.
- [45] NAKAMICHI K K, SYAMADA N, CHIBATA I. Induction and stabilization of L-Phenylalanine ammonia lyase activity in *Rhodotorula glutinis* [J]. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1983, 18: 158 - 162.
- [46] CUNHA G B D. Enrichment of phenylalanine ammonia lyase activity of *Rhodotorula yeast* [J]. *Enzyme Microbiol Technol*, 2005, 36: 498 - 502.
- [47] CRAMER C L, EDWARDS K, DRON M, et al. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure [J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 12(4): 367 - 383.
- [48] LOIS R, DIETRICH A, HAHLBROCK K, et al. A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements [J]. *EMBO Journal*, 1989, 8(6): 1641 - 1648.
- [49] YEO Y S, LEE S W, KIM Y H, et al. Restriction mapping of phenylalanine ammonia-lyase gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. *RDA Journal of Agricultural Science*, 1994, 36(2): 187 - 192.
- [50] FUKAZAWA - AKADA T, KUNG S D, WATSON J C. Phenylalanine ammonia-lyase gene, structure, expression, and evolution in Nicotiana [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 711 - 722.
- [51] JOOS H J, HAHLBROCK K. Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.): genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 204(2): 621 - 629.
- [52] 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(1): 380 - 386.
- [53] MINAMI E, OZEKI Y, MATSUOKA M. Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia-lyase from rice plants [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 185: 19 - 25.
- [54] GOWRI G, PAIVA N L, DIXON R A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones and appearance of PAL transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing plants [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(3): 415 - 429.
- [55] NSON J G, GILBERT H J, JOHN O D, et al. Complete nucleotide sequence of the *Rhodospirium toruloides* gene coding for Phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Gene*, 1987, 58: 189 - 199.
- [56] IANG X, DRON M, SCHMID J, et al. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(24): 14486 - 14492.

氰胺计算得到的最低振动频率为 186 cm^{-1} ,且振动强度很弱,与文献^[9]报道一致,为环平面外的弯曲振动。在固态三聚氰胺分子中,分子间氢键是构筑单斜晶系的主要作用力^[10]。三聚氰酸有醇式和酮式互相转化的异构体,计算得到的最低振动频率远远大于实验的范围,酮式三聚氰酸晶体的最低振动频率为 99 cm^{-1} (3.00 THz),为晶格振动^[11]。X射线结果表明,在三聚氰酸晶体存在 N—H—O 氢键^[12]。理论值与实验值的差别主要是与晶体场的效应有关,理论计算的模型是单分子,分子间的相互作用以及氢键的作用等都没有计入,而实验样品是晶体。因此,综上所述,三聚氰胺和三聚氰酸在太赫兹波段的吸收不是分子内的相互作用,而是与分子间氢键相关的集体振动模式或晶格振动。

3 结论

利用 THz-TDS 技术测量了三聚氰胺和三聚氰酸在 $0.30\sim 2.50\text{ THz}$ 波段的特征吸收谱和折射率谱,三聚氰胺和三聚氰酸吸收峰分别在 1.98 、 2.24 和 1.27 、 2.37 THz 。样品在实验测量范围内明显的特征吸收峰,可以作为太赫兹时域光谱技术进行鉴别的基础。理论计算和实验结果表明,三聚氰胺和三聚氰酸的 THz 吸收光谱主要来源于分子间的与氢键相关的集体振动模式。同时,三聚氰胺在该波段的吸收谱,可用于奶粉中不同含量三聚氰胺的定量分析,也可用于研究三聚氰胺和三聚氰酸形成的 1:1 网状结构。总之,该研究结果为鉴别三聚氰胺提供了重要的方法和参数,在将来食品检测

领域的应用具有较大前景。

参考文献

- [1] 石向群,刘建云.三聚氰胺检测方法的研究进展[J].卫生职业教育,2009,27(1):157-159.
 - [2] 沈昊宇,赵永纲,王乐屏,等.三聚氰胺及其相关物质的性质、危害与检测技术[J].化学通报,2009,72(4):341-349.
 - [3] BIELEJEWSKA A G, MARJO C E, PRINS L J, et al. Thermodynamic stabilities of linear and crinkled tapes and cyclic rosettes in melamine-cyanurate assemblies; a model description[J]. J Am Chem Soc, 2001, 123: 7518-7533.
 - [4] YAN Z K, YING Y B, ZHANG H Q, et al. Research progress of terahertz wave technology in food inspection[C]. Proc of SPIE. Bellingham WA: [s. n.], 2006: 6373.
 - [5] 闫战科,张宏建,应义斌. THz 技术在农产品/食品品质检测中的应用[J].光谱学与光谱分析, 2007, 27(1): 2228-2234.
 - [6] 朱莉,张光新,曹丙花,等.苏丹红I号的太赫兹光谱研究[J].传感技术学报, 2008, 21(1): 83-87.
 - [7] DUVILLARET L, GARET F, COUTAZ J L. A reliable method for extraction of material parameters interahertz time-domain spectroscopy[J]. IEEE J Select Topict Quantum Electron, 1996, 2: 739-746.
 - [8] 徐慧,韩家广,余寒寒,等.固态多环芳烃化合物的 THz 时域光谱研究[J].化学通报, 2005, 68(3): 220-225.
 - [9] WANG Y L, MEBEL A M, WUC J, et al. IR spectroscopy and theoretical vibrational calculation of the melamine molecule[J]. J Chem Soc Faraday Trans, 1997, 93: 3445-3451.
 - [10] LARSON A C, CROMER D T. Crystal structure refinements with generalized scattering factors. II. Melamine, 2,4,6-triamino-s-triazine[J]. J Chem Phys, 1974, 60: 185-192.
 - [11] SHIMANOUCI T, HARADA I. Far-infrared spectra of cyanuric acid, uracil, and diketopiperazine[J]. J Chem Phys, 1964, 41: 2651-2655.
 - [12] NEWMAN R, BADAGER M. Infrared spectra of cyanuric acid and deuterio cyanuric acid[J]. J Am Chem Soc, 1952, 74: 3545-3548.
- (上接第 15119 页)
- [57] CHENG G W, BREEN P J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit[J]. J Am Soc Hortic Sci, 1991, 116(5): 865-869.
 - [58] VILJOEN M M, HUYSAMER M. Biochemical and regulatory aspects of anthocyanin synthesis in apples and pears[J]. J S Af Soc Hort Sci, 1995, 5(1): 1-6.
 - [59] 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(3): 373-379.
 - [60] MARANDAD M, DIXON R. Modulation of plant defense gene transcripts by trans-cinnamic acid[J]. Plant Physiology, 1989, 89: 66.
 - [61] BOLWELL G P, MAVANDAD M, MILLAR D J, et al. Inhibition of mRNA levels and activities by trans-cinnamic acid in elicitor-induced bean cells[J]. Phytochemistry, 1988, 27(7): 2109-2117.
 - [62] 初衍.胚乳对幼苗中苯丙氨酸解氨酶活性的影响[J].植物生理学报, 1987, 13(2): 122-128.
 - [63] DIALLINAS G, KANELIS A K. A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26(1): 473-479.
 - [64] RICKEY T M, BELKNAP W R. Comparison of the expression of several stress-responsive genes in potato tubers[J]. Plant Mol Biol, 1991, 16(6): 1009-1018.
 - [65] 艳珍.植物苯丙氨酸解氨酶基因的研究进展[J].生物技术通报, 2006(S1): 31-33.
 - [66] LEE S W, HEINZ R, ROBB J, et al. Differential utilization of alternate initiation sites in a plant defense gene responding to environmental stimuli[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 226(1): 109-114.
 - [67] LEYVA A, LIANG X, PINTOR-TORO J A, et al. Cis-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns[J]. Plant Cell, 1992, 4(3): 263-271.
 - [68] SHUFFLEBOTTOM D, EDWARDS K, SCHUCH W, et al. Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns[J]. Plant J, 1993, 3(6): 835-845.
 - [69] BEVAN M, SHUFFLEBOTTOM D, EDWARDS K, et al. Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants[J]. EMBO J, 1989, 8(7): 1899-1906.
 - [70] ICHAEI B, SHUFFLEBOTTOM D, EDWARDS K, et al. Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants[J]. EMBO Journal, 1989, 8(7): 1899-1906.
 - [71] YANG S, SWEETMAN J P, AMIRSADEGHI S, et al. Novel anther-specific myb genes from tobacco as putative regulators of phenylalanine ammonia-lyase expression[J]. Plant Physiology, 2001, 126: 1738-1753.