

华细辛苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与生物信息学分析

林懋怡, 郑柳, 刘晋杰, 吉平平, 刘忠*
(上海交通大学药学院, 上海 200240)

[摘要] **目的:**克隆华细辛 *Asarum sieboldii* 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 基因(*AsPAL*), 并进行序列特征分析。**方法:**通过同源克隆的原理, 利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增(RACE)相结合的方法, 以华细辛叶片总 RNA 为模板, 获得了该基因的 cDNA 全长, 并通过 DNAMAN 软件和 ExPASy 在线分析等对其进行了生物信息学分析。**结果:**获得 *AsPAL* 全长 cDNA, Genbank 登录号为 KY428932, 序列分析表明, 所克隆的 cDNA 含有 1 个 2 157 bp 的完整开放阅读框, 编码 718 个氨基酸, 预测蛋白质相对分子质量为 78 758 Da, 理论等电点为 6.24, 没有跨膜区, 含有 PAL 酶活性中心序列 GTITASGDLVPLSYVAG, 不含信号肽; 氨基酸序列多重比较发现, *AsPAL* 与肉桂、葡萄、当归和杏的同源性达到 80% 以上。**结论:**获得了 *AsPAL* cDNA 全长序列, 对其进行初步生物信息学分析, 为进一步探究 *AsPAL* 的功能和华细辛甲基丁香酚生物合成的调控机制奠定了必要的基础。

[关键词] 华细辛; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 生物信息学分析

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0038-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010038

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1133.072.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 11:33

Cloning and Bioinformatics Analysis of Phenylalanine Ammonia-lyase Gene in *Asarum sieboldii*

LIN Mao-yi, ZHENG Liu, LIU Jin-jie, JI Ping-ping, LIU Zhong*
(School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:** This study is aimed to clone the key enzyme phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from *Asarum sieboldii* and analyze the sequence characteristics by bioinformatics tools. **Method:** *AsPAL* gene was cloned by RT-PCR and RACE strategy by using homologous cloning principle, with the RNA extracted from leaves as the template. The bioinformatics of this gene and its corresponding protein was then analyzed by DNAMAN software and ExPASy online analysis tool. **Result:** The ORF of *AsPAL* consisted of 2 157 bp (GenBank accession number: KY428932), encoding 718 amino acid polypeptides. The molecular weight and theoretical isoelectric point of the deduced *AsPAL* protein were 78 758 Da and 6.24 respectively. Bioinformatics prediction and analysis indicated that *AsPAL* protein contained the active center sequence GTITASGDLVPLSYIAG, without transmembrane region and signal peptides. Multiple comparisons of amino acid sequences showed that *AsPAL* had more than 80% homology with PAL of *Cinnamomum osmophloeum*, *Vitis vinifera*, *Angelica sinensis* and *Prunus armeniaca*. **Conclusion:** This study cloned and analyzed PAL from *A. sieboldii*. The preliminary bioinformatic analysis might be used to establish an experimental basis for exploring PAL gene function and further regulation of methyleugenol biosynthesis from *A. sieboldii*.

[Key words] *Asarum sieboldii*; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning; bioinformatics analysis

[收稿日期] 20170620(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373962, 31570325)

[第一作者] 林懋怡, 在读硕士, 从事药用植物次生代谢研究, Tel: 021-34208145, E-mail: lynmaoyi@sjtu.edu.cn

[通信作者] * 刘忠, 博士, 副教授, 从事药用植物次生代谢研究, Tel: 021-34208148, E-mail: liuzhong@sjtu.edu.cn

细辛 (*Asari Radix et Rhizoma*) 是常用中药, 具有解表散寒、祛风止痛、通窍、温肺化饮等功效。华细辛为 2015 年版《中国药典》规定的正品细辛来源之一^[1], 为马兜铃科植物, 主产于我国陕西、重庆、四川等地^[2]。甲基丁香酚是中药细辛的重要活性成分之一^[3], 其生物合成途径属于苯丙素类次生代谢网络的组成部分^[4], 因而, 最初的两步反应与绝大多数苯丙素类生物合成的起始步骤一致, 即先后在苯丙氨酸裂解酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 和肉桂酸脱氢酶 (4-coumarate-CoA ligase, 4CL) 的催化下, 依次生成反式肉桂酸和咖啡酸。之后, 甲基丁香酚以咖啡酸为前体物, 经由阿魏酸、松柏醛、松柏醇、二氢松柏醇等一系列中间产物的衍变后, 在丁香酚合成酶 (EGS) 和丁香酚-O-甲基转移酶 (EOMT) 的作用下最终生成甲基丁香酚^[5]。

PAL 作为植物苯丙素类次生代谢过程的首个关键酶和限速酶, 具有引导代谢流朝苯丙素类次生代谢频道流动的作用^[6], 因此, PAL 基因的表达调控与木质素、木脂素、香豆素、花青素和黄酮类等次生代谢产物的合成紧密相关^[7-8], 而这些次生代谢产物常常是植物抵御环境病虫害和机械损伤的主要物质基础——植保素的前体物, 因此, PAL 基因的表达调控在决定植物抵抗逆境性能强弱变化方面具有重要作用。目前, 已从多种药用植物中克隆得到 PAL 基因并进行了表达分析^[9-12], 但在华细辛中尚未见到相关报道。本研究以华细辛叶片为材料, 通过同源克隆获得了一条 PAL 基因的全长 cDNA, 并对该 cDNA 进行了生物信息学分析, 为后续华细辛 PAL 基因 (*AsPAL*) 功能研究和甲基丁香酚生物合成调控机制的解析, 以及通过基因工程改善华细辛品质奠定了工作基础。

1 材料

Mastercycler 型 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司), ND-2000 型超微量分光光度计 (美国 Nano Drop 公司), Champgel 5000 型凝胶成像分析系统 (北京赛智)。

RNeasy Plant Mini Kit, QIAquick Gel Extraction Kit (德国 Qiagen 公司); Prime ScriptTM RT-PCR Kit, DH5 α 感受态 (大连 TaKaRa 公司); Plasmid DNA Purification Kit (香港 Wolact 公司), SMARTer RACE 5'/3'Kit (美国 Clontech 公司)。各引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

本实验所用华细辛植株采自陕西安强县华细辛种植基地, 经上海交通大学药学院刘忠副教授鉴定

为马兜铃科植物华细辛 *Asarum sieboldii*。选取新鲜叶片洗干净后, 用液氮迅速冷冻并研磨至细粉状, 于 -80 °C 超低温冰箱中保存。

2 方法

2.1 总 RNA 提取与 cDNA 第一链的合成 取适量粉末状盛花期叶片样品 (约 100 mg), 按照 Qiagen RNeasy Plant Mini 试剂盒所示操作步骤, 提取华细辛叶片的总 RNA, 分别利用 Nanodrop 2000 和 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的浓度和纯度。对于检测合格的样品, 取 2 μ g 作为模板, 参照 Prime ScriptTM RT-PCR Kit 说明书, 逆转录合成 cDNA 第一链。

2.2 PAL 基因保守区序列的扩增 首先, 通过 BLAST 搜索引擎从 NCBI 中查找已知物种的 PAL 基因序列, 筛选同源性在 70% 以上的序列, 利用 ClustalOmega 分析软件对这些序列进行排序, 搜索序列保守区。根据保守区序列信息, 应用 DNAMAN 设计简并引物对 PAL-f 和 PAL-r (表 1)。以逆转录合成的 cDNA 第一链为模板, 对 *AsPAL* 保守区片段进行简并扩增。PCR 扩增反应体系为 50 μ L, 具体组分为: 10 \times PCR 缓冲液和 cDNA 各 5 μ L, dNTP Mixture (10 mmol \cdot L⁻¹), PAL-f (10 μ mol \cdot L⁻¹) 和 PAL-r (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 1 μ L, TaKaRa Ex Taq (5 U \cdot μ L⁻¹) 0.5 μ L, 灭菌去离子水 28.5 μ L, 反应程序为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 循环结束后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 1 用于华细辛 PAL 基因克隆的引物序列

Table 1 Primer sequences for PAL gene cloning of *Asarum sieboldii*

引物名称	引物序列 5'-3'
PAL-f	CAN (A/G/C/T) TCN (A/G/C/T) CCN (A/G/C/T) CAR (A/G) TGGCT
PAL-r	ACR (A/G) TCTTGR (A/G) TTR (A/G) TGY (C/T) TGCTC
5'-Gsp	GATTACGCCAAGCTTGAGCGCCGAGCAGCACAACC AAGACGT
5'-Ngsp	GATTACGCCAAGCTTCCTAGCGAATCCGGTCACCA ATCACC
3'-Gsp	GATTACGCCAAGCTTACGTCACCACAGTGGCTTGG ACCCT
3'-Ngsp	GATTACGCCAAGCTTTGGACAACACTCGATTGGCT ATTGGATC
ORF-f	ATGGAAGCTGTACAAGTAGCTCTC
ORF-r	CTAACAGATGGCCAGAGGAGT

2.3 PCR 产物的回收、克隆和测序 按照 DNA 凝胶纯化试剂盒说明书,对目标条带进行回收,测定纯化后 PCR 产物的浓度。以 pMD18-T 质粒为载体,将其与目标基因相连接,构建遗传重组质粒,通过热激法转化大肠埃希菌 DH5 α ,37 °C 培养过夜。通过含有 X-gal, IPTG, Amp 的 LB 培养基进行蓝白斑筛选,随机挑取白色菌落进行 PCR 验证,同时,将阳性克隆接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中进行过夜培养(37 °C, 180 r·min⁻¹),提取质粒,委托上海英骏生物技术有限公司进行序列测定。

2.4 PAL 基因的 5'RACE 和 3'RACE 扩增 根据测序获得的 PAL 基因保守片段序列,分别设计用于 5'和 3'RACE 扩增的基因特异引物(表 1)。按照 SMARTer RACE 5'/3'Kit 试剂盒使用说明进行试验操作,分别进行 2 轮巢式扩增,从而获得华细辛 PAL 基因 5'和 3'端片段。RACE 第一轮扩增体系为 2 × SeqAmp 缓冲液 25 μ L, SeqAmp DNA Polymerase, 5'或 3' GSP(10 μ mol·L⁻¹)各 1 μ L, 3'或 5'-RACE-Ready cDNA 3 μ L, 10 × UPM 5 μ L, 灭菌去离子水 15 μ L, 运用 Touchdown PCR 模式进行扩增,反应程序如下:首先采用 PCR 两步法反应 5 个循环,此后采用 PCR 三步法,94 °C 变性 30 s, 70 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 150 s, 共 5 个循环;之后退火温度降至 68 °C, 进行 25 个循环。第二轮扩增以上一轮扩增产物稀释液(1:50)为模板,反应体系 50 μ L 中包含如下组分:2 × SeqAmp 缓冲液 25 μ L, 5'或 3'RACE 产物稀释液 5 μ L, SeqAmp DNA Polymerase, Universe Prime Short, Ngsp1 或 Ngsp2 各为 1 μ L, 灭菌去离子水 17 μ L, 反应条件为:94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 25 个循环。PCR 产物的回收、克隆和测序方法同 2.3 项。

2.5 PAL 基因 ORF 扩增 利用 DNAMAN 将上面分步得到的 5'RACE 片段、保守序列片段和 3'RACE 片段 3 个 DNA 片段进行基因序列拼接,获得华细辛 PAL 基因的 cDNA 全长序列。根据拼接得到的全长 cDNA, 使用 NCBI-ORF Finder 查找开放阅读框(open reading frame, ORF)序列,并设计序列特异引物 ORF-f 和 ORF-r(表 1)。以逆转录合成的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增,反应体系为:cDNA 模板和 PCR 扩增缓冲液各 5 μ L, Taq plus DNA 聚合酶(2 U· μ L⁻¹), dNTPs(10 mmol·L⁻¹), ORF-f(10 μ mol·L⁻¹), ORF-r(10 μ mol·L⁻¹)各 1 μ L, 灭菌去离子水 36 μ L, 总体积 50 μ L, PCR 反应条件为:94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 30 s, 51 °C 退火 30 s,

72 °C 延伸 150 s, 共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。通过凝胶电泳检测 PCR 产物。

2.6 生物信息学分析 根据得到的 ORF 序列,用 ProtParam 预测该序列所编码蛋白的理论等电点、相对分子质量等理化性质;用 ExPASy 在线工具 ProtScale 进行亲水/疏水性分析;用 PredictProtein 进行亚细胞定位和二硫键分析;用 SignalP 4.1 Serve 进行信号肽分析;用 TMHMM Server v2.0 预测跨膜结构;用 InterPro 分析该蛋白结构域;用 SOPMA 预测蛋白二级结构;用 SWISS-MODEL 进行结构域的三维同源建模;用 DNAMAN 和 Blast 进行氨基酸序列比对;用 MEGA 7.0 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树。

3 结果与分析

3.1 AsPAL 基因的克隆

3.1.1 总 RNA 的提取及检测 取总 RNA 2 μ L, 在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,结果可见 18 S 和 28 S 共 2 条清晰条带,且 28 S RNA 量约为 18 S RNA 的 1.5~2.0 倍(图 1-A)。Nano Drop 2000 测定结果显示,所提总 RNA 质量浓度为 734.1 mg·L⁻¹, A_{260 nm/280 nm} 为 2.08, A_{260 nm/230 nm} 为 1.75, 可以看出总 RNA 完整度较好,稳定性佳,满足后续实验要求。

3.1.2 AsPAL 基因保守片段的扩增 以简并引物 PAL-f 和 PAL-r 进行 PCR 扩增,得到与预期大小(约 400 bp)相符的条带(图 1-B),经纯化、克隆、测序后得到该片段序列,长度为 407 bp。通过 BLAST 比对发现与多个其他物种的 PAL 基因具有较高同源性,推测为华细辛 PAL 基因序列。

3.1.3 AsPAL 基因 5'RACE, 3'RACE 和 ORF 的扩增 采用 RACE 技术进行 cDNA 两端序列的巢式扩增,分别获得了 1 784 bp 的 5'RACE 扩增片段(图 1-C)和 1 236 bp 的 3'RACE 扩增片段(图 1-C)。通过 DNAMAN 将 5'端, 3'端及保守区片段进行拼接,获得 2 738 bp 的全长 cDNA。通过 NCBI-ORF Finder 分析,获得一个完整的 ORF,并最终扩增获得了长度为 2 157 bp 的 ORF 序列(图 1-E)。

3.2 AsPAL 基因全长 cDNA 的生物信息学分析

3.2.1 AsPAL 基因的序列分析 本研究获得华细辛 PAL 基因全长 cDNA 序列共 2 738 bp, 使用在线工具 ORF-finder 分析,发现该序列由 303 bp 的 5'端非翻译区, 278 bp 的 3'端非翻译区(包括 27 bp 的 ploy-A), 以及 1 个 2 157 bp 的 ORF 组成,共编码 718 个氨基酸,鸟嘌呤和胞嘧啶所占质量分数为 52.7%。通过 NCBI 的 BlastN 对 AsPAL 基因 ORF 进

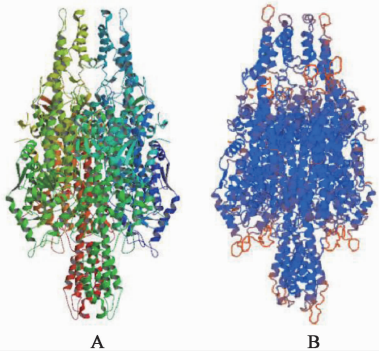


图 3 欧芹 PAL 蛋白 (A) 与华细辛 PAL 蛋白 (B) 三级结构预测
Fig. 3 Predicted tertiary structures of PAL protein from *Petroselinum crispum* (A) and *Asara sieboldii* (B)

比对分析,结果显示 *AsPAL* 与大多数植物有较高的相似性 (> 80%),其中与土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum*, AFG26322) 和葡萄 (*Vitis vinifera*, AEX32784.1) 一致性达到 84%,与当归 (*Angelica sinensis*, AJW77399.1), 胡萝卜 (*Daucus carota*, BAC56977.1), 杏 (*Prunus armeniaca*, AOC97437.1) 的一致性均达到 83%。从中选择 6 条不同物种的 PAL 氨基酸序列与 *AsPAL* 氨基酸序列进行多重比对,并截取了含有典型苯丙氨酸解氨酶活性序列的保守片段(图 4)。比对结果显示,不同物种 PAL 氨基酸序列存在一定差异,N-端的差异最大,但均包含苯丙氨酸解氨酶和组氨酸解氨酶标签序列,在一些序列上具有高度保守性。利用 NCBI 的 CDD 对 *AsPAL* 蛋白进行功能注释,结果显示, *AsPAL* 具有 Lyase_I_Like 超家族酸解氨酶活性位点,能够进行类似 β -消除的催化反应和催化脱氨反应。因此推测 *AsPAL* 可能具有此功能。

本研究从 NCBI 中收集 20 条完整的苯丙氨酸解氨酶蛋白序列,包括蕨类植物,裸子植物,被子植物单子叶植物和双子叶植物,通过 MEGA 7.0 软件构建系统进化树,进行聚类分析。结果发现,可大致将结果分为两类(图 5),A 类为被子植物双子叶植物和单子叶植物,B 类为蕨类植物和裸子植物,本研究克隆的 *AsPAL* 归于 A 类,且与土肉桂的 PAL 氨基酸序列遗传距离最短。

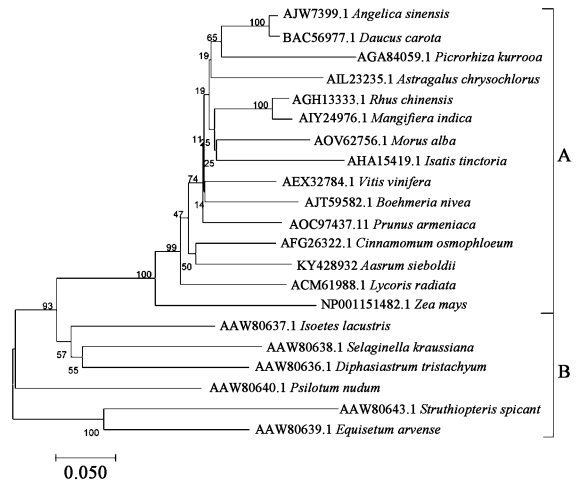
4 讨论

PAL 连接初级代谢和次生代谢,是催化苯丙氨酸脱去氨基生成反式肉桂酸,从而将代谢流引入苯丙素类生物合成途径的首个反应的关键酶和限速酶,在植物的生长发育、抵抗病害、花色形成等方面具有重要作用^[16]。在高等植物中,PAL 基因常以多基因家族的形式存在,不同植物通常在 1 组染色体

盐肤木(AGH13333.1)	SC	TL	PH	SA	RA	AL	VR	NTL	CG	YS	GI	RF	LE	AI	TK	FL	NN	TP	CL	P	186												
杏(AOC97437.1)	SC	TL	PH	SA	RA	AL	VR	NTL	CG	YS	GI	RF	LE	AI	TK	FL	NN	TP	CL	P	196												
当归(AJW77399.1)	AC	NL	PH	SA	RA	AL	VR	NTL	CG	YS	GI	RF	LE	AI	TK	FL	NN	TP	CL	P	197												
胡萝卜(BAC56977.1)	AC	NL	PH	SA	RA	AL	VR	NTL	CG	YS	GI	RF	LE	AI	TK	FL	NN	TP	CL	P	194												
葡萄(AEX32784.1)	SC	TL	PH	SA	RA	AL	VR	NTL	CG	YS	GI	RF	LE	AI	TK	FL	NN	TP	CL	P	189												
土肉桂(AFG26322.1)	SC	TL	PH	SA	RA	AL	VR	NTL	CG	YS	GI	RF	LE	AI	TK	FL	NN	TP	CL	P	187												
华细辛(KY428932)	AG	TL	PH	SA	RA	AL	VR	NTL	CG	YS	GI	RF	LE	AI	TK	FL	NN	TP	CL	P	197												
Consensus		t	i	p	a	r	a	m	r	v	r	i	n	t	l	q	g	y	s	g	i	r	f	i	e	i	i	n	t	p	c	l	p

盐肤木(AGH13333.1)	LR	GT	T	AS	G	L	V	P	L	S	V	AG	L	T	GR	P	N	S	K	A	V	G	P	N	C	V	L	D	A	S	E	A	F	C	L	A	G	I	S	236				
杏(AOC97437.1)	LR	GT	T	AS	G	L	V	P	L	S	V	AG	L	T	GR	P	N	S	K	A	V	G	P	N	C	V	L	D	A	S	E	A	F	C	L	A	G	I	S	246				
当归(AJW77399.1)	LR	GT	T	AS	G	L	V	P	L	S	V	AG	L	T	GR	P	N	S	K	A	V	G	P	N	C	V	L	D	A	S	E	A	F	C	L	A	G	I	S	247				
胡萝卜(BAC56977.1)	LR	GT	T	AS	G	L	V	P	L	S	V	AG	L	T	GR	P	N	S	K	A	V	G	P	N	C	V	L	D	A	S	E	A	F	C	L	A	G	I	S	244				
葡萄(AEX32784.1)	LR	GT	T	AS	G	L	V	P	L	S	V	AG	L	T	GR	P	N	S	K	A	V	G	P	N	C	V	L	D	A	S	E	A	F	C	L	A	G	I	S	239				
土肉桂(AFG26322.1)	LR	GT	T	AS	G	L	V	P	L	S	V	AG	L	T	GR	P	N	S	K	A	V	G	P	N	C	V	L	D	A	S	E	A	F	C	L	A	G	I	S	237				
华细辛(KY428932)	LR	GT	T	AS	G	L	V	P	L	S	V	AG	L	T	GR	P	N	S	K	A	V	G	P	N	C	V	L	D	A	S	E	A	F	C	L	A	G	I	S	247				
Consensus		l	r	g	t	a	s	g	l	v	p	l	s	v	a	g	l	t	g	r	p	n	s	k	a	v	g	p	n	c	v	l	d	a	s	e	a	f	c	l	a	g	i	s

下划线标注出 PAL 的标签序列蛋白 GTI(V)TASGDLVPLSYV(I)AG
图 4 *AsPAL* 与部分植物 PAL 氨基酸序列多重比对
Fig. 4 Multiple alignments of amino acid sequence between *AsPAL* and PAL from other plants



A. 被子植物双子叶植物和单子叶植物; B. 蕨类植物和裸子植物
图 5 *AsPAL* 的系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of *AsPAL* gene

中含有 2~6 个 PAL 基因,如在拟南芥中,PAL 基因家族有 4 个 PAL 基因,它们在各个部位的表达量不同^[17],表明不同的 PAL 基因具有不同生物活性和表达部位特异性。本研究根据同源克隆原理,从常用药用植物华细辛中分离获得了 1 个 PAL 基因,为后续进一步深入研究奠定了有益的基础,但对于华细辛苯丙素类次生代谢过程全面系统的研究来说,仍需进一步深入探究华细辛 PAL 基因家族存在的可能性和具体情形。

本研究通过搜寻其他物种的 PAL 基因序列并经过序列同源性分析,找到 PAL 基因保守区,从而设计简并引物,利用 RT-PCR 和 RACE 技术方法,最终获得华细辛 1 条 PAL 基因的 cDNA 全长序列,该基因共编码 718 个氨基酸。生物信息学分析表明, *AsPAL* 氨基酸序列与已报道的植物 PAL 氨基酸序列有较高的相似性 (> 80%),二级结构也是以 α -螺旋和不规则卷曲为主,三级结构则与欧芹 PAL 蛋白一样,由同源四聚体构成。系统进化分析显示, *AsPAL*

和土肉桂的 *PAL* 聚为一支,并且具有苯丙氨酸解氨酶的活性中心序列 GTITASGDLVPLSYVAG, 包含 *PAL-HAL* 结构域,因此推测 *AsPAL* 蛋白是具有苯丙氨酸解氨酶活性的蛋白。

今后将进一步通过原核表达蛋白明确其催化功能,以及通过同源表达系统了解其在甲基丁香酚生物合成途径中的作用。本研究结果为深入研究 *AsPAL* 蛋白功能,探明华细辛甲基丁香酚生物合成途径的基因调控,通过生物技术提高细辛药材质量奠定了基础。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:230-231.

[2] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1993:18.

[3] Ramalingam M, Kim S J. Phytochemical, toxicological and pharmacological studies of *Asiasari Radix et Rhizoma*; A review [J]. *Trop J Pharm Res*, 2015, 14 (3):545-554.

[4] 刘建福,钟书淳,王明元,等. 姜黄苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析[J]. *中草药*,2014,45(21):3141-3148.

[5] Koeduka T, Fridman E, Gang D R, et al. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized *via* reduction of a coniferyl alcohol ester [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103 (26): 10128-10133.

[6] 张宽朝,金青,蔡永萍,等. 苯丙氨酸解氨酶与其在重要次生代谢产物调控中的作用研究进展[J]. *中国农学通报*, 2008,24(12):59-62.

[7] 侯鹏,梁冬,张卫国,等. 苯丙氨酸解氨酶基因家族在大豆中的时空表达研究[J]. *作物杂志*,2016(2):

57-62.

[8] 何聪芬,刘蕾,董银卯,等. 竹子木质素合成酶基因克隆与分析[J]. *西北植物学报*,2011,31(2):273-279.

[9] YUAN G Y, WANG Z Y, CHAO J, et al. Exploiting genes and functional diversity of chlorogenic acid and luteolin biosyntheses in *Lonicera japonica* and their substitutes [J]. *Gene*,2014,534(2):408-416.

[10] 吴松权,祖元刚,管清杰,等. 膜荚黄芪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.

[11] Yazaki K, Mieko K, Gisho H, et al. cDNA cloning and gene expression of phenylalanine ammonia-lyase in *Lithospermum erythrorhizon* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*,1997,61(12):1995-2003.

[12] 雒军,王引权,温随超,等. 当归苯丙氨酸解氨酶基因片段克隆和组织特异性表达分析[J]. *草业学报*, 2014, 23(4):130-137.

[13] 高杰,谷巍,周娟娟,等. 黑三棱苯丙氨酸解氨酶基因克隆与序列分析[J]. *中草药*,2014,45(3):403-409.

[14] 陈卫卫,唐然,吴昱煜,等. 象草 *PAL* 基因克隆及其蛋白质结构与功能预测[J]. *草地学报*, 2016,24(1):137-145.

[15] Ritter H, Schulz G E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase [J]. *Plant Cell*,2004,16(12):3426-3436.

[16] 崔建东,李艳,牟德华. 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的研究进展[J]. *食品工业科技*,2008,29(7):306-308.

[17] Cochrane F C, Davin L B, Lewis N G. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms [J]. *Phytochemistry*,2004,65(11):1557-1564.

[责任编辑 顾雪竹]