树莓 *RiPAL1* 基因克隆及生物信息学分析

孙华军，刘盈，李雪静，杨斯琪，钱丽丽，李跃*

（黑龙江八一农垦大学食品学院，黑龙江大庆 163316）

摘要：苯丙氨酸解氨酶（Phenylalanine Ammonia Lyase，PAL）是苯丙烷类代谢的关键酶，能调节树莓中黄酮类的生物合成。为了深入研究树莓中 *RiPAL1* 基因的功能与调控机制，以树莓果实为材料提取总 RNA，合成 cDNA 第一链，然后成功克隆出树莓果实 *RiPAL1* 基因，并对其进行了相关的生物信息学分析。结果表明，*RiPAL1* 基因的编码序列（Coding Sequence，CDS）全长为 2 133 bp，编码 710 个氨基酸，分子量为 77.50 ku，等电点为 6.21。RiPAL1 蛋白疏水性最大值为 4.50，最小值为-4.50，平均疏水指数为-0.49，为亲水性蛋白，无跨膜结构，无信号肽。含有 4 个 N 糖基化位点和 67 个特异性激酶位点，二级结构以 α 螺旋为主，三级结构为同型四聚体。多序列比对显示 RiPAL1 蛋白具有典型的苯丙氨酸解氨酶保守结构域，系统进化分析表明 RiPAL1 蛋白与同科植物草莓亲缘关系最近。该研究可为深入研究 *RiPAL1* 基因参与树莓果实黄酮类物质生物合成的分子机制提供参考。

关键词：树莓；苯丙氨酸解氨酶（PAL）；基因克隆；生信分析；黄酮

文章编号：1673-9078(2023)09-88-95 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.9.1190

Cloning and Bioinformatics Analysis of *RiPAL1* Gene of Raspberry

SUN Huajun, LIU Ying, LI Xuejing, YANG Siqi, QIAN Lili, LI Yue*

(College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163316, China)

Abstract: Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is a key enzyme in the metabolism of phenylpropane that regulates the biosynthesis of flavonoids in raspberry. To elucidate the function and regulation mechanism of the *RiPAL1* gene in raspberry, total RNA was extracted from raspberry fruits to synthesize first-strand cDNA. The gene was successfully cloned, and related bioinformatics analyses were carried out. Our results showed that the coding sequence (CDS) of the *RiPAL1* gene was 2 133 bp in length, encoding 710 amino acids, with a molecular weight of 77.5 ku and an isoelectric point of 6.21. The maximum hydrophobicity of RiPAL1 protein was 4.50, its minimum hydrophobicity was -4.50, and its average hydrophobicity index was -0.49. Based on these, it was determined that it is a hydrophilic protein with no transmembrane structure and no signal peptide. The RiPAL1 protein contained 4 N-glycosylation sites and 67 specific kinase sites. Its secondary structure was mainly composed of α-helices, while its tertiary structure was a homotetramer. Multiple sequence alignment showed that the RiPAL1 protein has a typical conserved domain of phenylalanine ammonia-lyase. Phylogenetic analysis indicated that the RiPAL1 protein is closely related to that of strawberry. This study provides a reference for further research on the molecular mechanism of the *RiPAL1* gene in the biosynthesis of flavonoids in raspberry fruit.

Key words: raspberry; phenylalanine ammonia-lyase (PAL); gene cloning; bioinformatics analysis; flavonoids

引文格式：

孙华军,刘盈,李雪静,等.树莓 *RiPAL1* 基因克隆及生物信息学分析[J].现代食品科技,2023,39(9):88-95

SUN Huajun, LIU Ying, LI Xuejing, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *RiPAL1* gene of raspberry [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(9): 88-95

树莓（*Rubus idaeus* L.）属于蔷薇科（Rosaceae）悬钩子属多年生小灌木，又称覆盆子、托盘、木莓等[1]。成熟的树莓果实色泽宜人、酸甜适口、软嫩多汁，富含多酚、类黄酮和花青素等多种有益活性成分及人体必需的氨基酸，具有增强免疫力和抗癌的功效[2-4]。由于富有极高的营养价值，树莓也被誉为“第三代黄金水果”[5,6]。苯丙烷代谢途径是植物重要的次级代谢途径之一，该途径会产生多种活性成分，如黄酮、多酚和花青素等[7]。苯丙氨酸解氨酶（Phenylalanine Ammonia-Lyase，PAL）是苯丙烷代谢途径的关键酶和

收稿日期：2022-09-19

基金项目：黑龙江省自然科学基金联合引导项目（LH2021C067）；黑龙江八一农垦大学引进人才科研启动基金（XYB202102）；黑龙江八一农垦大学大学生创新创业训练计划项目（S202210223002）

作者简介：孙华军（1992-），女，博士，讲师，研究方向：果蔬采后贮藏保鲜及加工，E-mail：958826636@qq.com

通讯作者：李跃（1992-），男，博士，讲师，研究方向：果蔬采后贮藏保鲜及加工，E-mail：1149664501@qq.com

限速酶，通过催化 L-苯丙氨酸产生反式肉桂酸，反式肉桂酸是植物合成黄酮类等次级代谢产物的前体物质，是调控下游黄酮类成分合成信号通路的关键成员[8]。黄酮类化合物是一类重要的次生代谢天然有机化合物，具有抗氧化等生物学功能，可清除体内的自由基和毒素，能抗菌、消炎、抗肿瘤，对人体健康大有裨益[9]。树莓中含有丰富的黄酮类和花色苷等酚类物质，对预防心血管疾病和肿瘤等有良好效果[10,11]。FAO 推荐其为“生命之果”[12]。

研究表明，PAL 与黄酮积累有关，刘金福等[13]研究发现，苦荞黄酮的产生与 PAL 活性呈正相关。赵则海等[14]对攀援型和矮生型四棱豆的苯丙氨酸解氨酶活性和黄酮含量进行了比较，发现在两种不同类型的四棱豆中，PAL 活性和总黄酮含量之间均呈显著正相关。在树莓中，一氧化氮处理能通过增强 PAL 和其他相关酶活性，加快黄酮和总酚的积累速率，提升果实的抗氧化能力[15]。目前，已对云锦杜鹃[16]、百蕊草[17]、牛大力[18]和陆地棉[19]等多种植物的 PAL 基因进行了克隆、序列分析以及蛋白质的功能研究，而有关树莓 PAL 基因的研究报道仍较少。关于树莓中黄酮类次生代谢物的代谢机制和调控机理尚未深入研究，研究调控树莓黄酮类代谢的关键基因的序列和结构等信息，对于阐明树莓类黄酮的代谢机理至关重要。

因此，本研究根据前期树莓转录组数据，采用逆转录多聚酶链反应（Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction，RT-PCR）法克隆获得 *RiPAL1* 基因序列，利用生物信息学分析软件对该基因进行生物信息学分析，明确 *RiPAL1* 基因的序列、结构和亲缘信息，以期为研究树莓 *RiPAL1* 基因在黄酮类物质生物合成中的转录调控作用机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 原料

树莓果实采自于黑龙江省尚志县浆果基地，采摘后立即运回实验室，用液氮快速冷冻后于-80 ℃保存。

1.2 主要仪器设备

RNA 提取试剂盒，康为世纪生物科技有限公司；cDNA 逆转录试剂盒和 2×3 G Taq Master Mix，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；引物合成和测序技术服务由金唯智生物科技有限公司提供。

1.3 试验方法

1.3.1 树莓果实 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成

从-80 ℃冰箱中取出树莓果实样品，于液氮中迅速研磨成粉末状，参照 CWBIO OminiPlant RNA Kit（DNAse I，适用于多糖多酚）试剂盒说明书提取总 RNA。再参照 HiScript® II 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。

1.3.2 树莓 *RiPAL1* 基因的克隆

从本实验室已有的树莓转录组数据中获得 *RiPAL1* 基因序列，用 primer premier 6.0 软件设计 *RiPAL1* 基因的特异性引物（F：ATGGAGTTTAATAAAAACGGC；R：TTAAGATATAGGCAGGGG）。PCR 扩增反应体系为 50 μL，包含 25 μL 的 2×3G Taq Master Mix，2 μL 上游引物，2 μL 下游引物，1 μL 树莓果实 cDNA，20 μL 灭菌水。PCR 反应的条件为：95 ℃预变性 3 min；95 ℃变性 15 s，55 ℃退火 15 s，72 ℃延伸 3 min；共 33 个循环，72 ℃彻底延伸 5 min，4 ℃保存。PCR 产物用 1%（*m/m*）的琼脂糖凝胶电泳检测。目的条带单一且明亮则送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.3.3 树莓 *RiPAL1* 基因的生物信息学分析

测序无误的树莓 *RiPAL1* 基因序列用 ORF finder 软件预测其完整开放阅读框（Open Reading Frame，ORF）。在线预测树莓 *RiPAL1* 基因编码氨基酸的蛋白保守结构域及超家族。利用在线软件预测树莓 *RiPAL1* 基因编码蛋白理化性质（ExpasyProtParam）、信号肽（SignalP 4.1）、跨膜结构（TMHMM 2.0）、糖基化位点（NetNGlyc 1.0）、磷酸化位点（NetPhos 3.1）和亲疏水性（ExPasy-ProtScale）并进行分析。使用 SOPMA 软件（http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html）预测蛋白二级结构，使用 SWISS-MODEL 软件预测蛋白三级结构。通过 DNAMAN 软件进行氨基酸多序列比对，采用 MEGA 7 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.3.4 数据分析

在 NCBI blastn 中比对 PCR 产物测序后得到的基因序列，并命名为树莓 *RiPAL1* 基因。使用 NCBI 中的 BlastP 工具查找与树莓 RiPAL1 同源性较高的蛋白。

2 结果与分析

2.1 树莓 *RiPAL1* 基因的克隆及序列分析

提取树莓果实 RNA 后，将其逆转录为 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板，F（ATGGAGTTTAATAAAAACGGCAAC）和 R（TTAAGATATAGGCAGGGGGGCAC）为引物进行 *RiPAL1* 基因的全长扩增，电泳结果显示在 2 000 bp 偏上处有条带单一的高亮度目标条带（图 1）。将剩余的 PCR 产物进行测序，得到全长为 2 133 bp 的基因序列，经 NCBI blastn 比对后命名为树莓 *RiPAL1* 基因。

利用 ORF finder 确定 *RiPAL1* 基因的开放阅读框为 2 133 bp（图 2a），编码 710 个氨基酸（图 2b）。

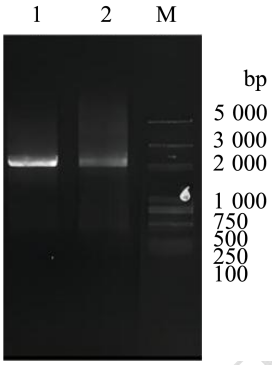


图 1 树莓 *RiPAL1* 基因 PCR 扩增产物电泳

Fig.1 Electrophoretogram of PCR products of *RiPAL1* gene in respberry

a

```
1     ATGGAGTTTA ATAAAAACGG CAACGGGGCA GTCGAGTCAT TTTGCGAAGG GCACGACCCT
61    CTGAACTGGA ACATGGCCGC GGAGTCGCTC AAGGGGAGCC ACGTGGACGA GCTGAAGAGG
121   ATGGTCAGTG ATTACCGGAA GCCGGTGGTC AAGCTGGGAG GTGAGACCCT CACGATAGGG
181   CAGGTGGCGG CAATTGCGAG CCACGACGGA GGGGTGCGCG TGGAGCTGTC GGAGGAGAAG
241   CGGGCTGGGG TGAAGGCCAG CAGTGACTGG GTCATGGATT CAATGGGGAA GGGTACAGAC
301   AGCTACGGTG TCACCACCGG CTTCGGTGCA ACCTCGCACA GGAGGACCAA AAACGGAGGA
361   GCTCTTCAGA GAGAGCTGAT TAGATTCTTG AATGCCGGAA TCTTTGGCAG CAGCCTAGAC
421   TCTACCCACA AATTGCCTCA CACCGCCACG AGAGCAGCGA TGCTAGTGAG GATCAACACC
481   CTTCTCCAAG GCTACTCCGG CATCAGGTTC GAAATCCTGG AAGCCATAAC CAAATTCCTC
541   AACGGCAACA TTACCCCATG CCTTCCTCTT CGGGGTACCA TCACTGCGTC CGGGGACTTG
601   GTCCCCCTCT CATACATTGC GGGGCTTTTA ATAGGCAGGC CCAATTCAAA GTCCGTGGGG
661   CCCAAGGGAG AGACCCTAAG CCCAGCTGAG GCCTTTAAGC TAGCTGGGAT TGATGGTGGT
721   TTCTTTGAGT TGCAACCCAA GGAAGGCCTT GCTTTGGTCA ATGGCACTGC CGTTGGGTCT
781   GGTATGGCTT CTATGGTGCT GTTTGATGCC AACACTCTAG CTGTTCTCTC CGAAATCATG
841   TCAGCAATTT TCGCCGAAGT TATGCAAGGA AAGCCGGAGT TTACAGACCA CTTGACCCAC
901   AAACTGAAGC ACCACCCTGG CCAGATTGAA GCAGCAGCCA TAATGGAACA TATTCTTGAA
961   GGAAGCTCTT ACGTGAAAGA AGCGAAAAAG GTTCATGAAA TGGACCCTCT TCAAAAGCCT
1021  AAGCAAGACC GATATGCTCT AAGAACCTCC CCACAATGGC TAGGTCCACA GATCGAAGTG
1081  ATCAGGGCAG CAACCAAAAT GATTGAGAGG GAGATCAACT CTGTCAACGA CAACCCATTG
1141  ATCGATGTCT CCAGGAACAA GGCGTTACAT GGTGGAAATT TTCAAGGAAC TCCAATTGGT
1201  GTTGCCATGG ATAACACCAG ACTTGCCATT GCCTCAATTG GGAAGCTCAT GTTTGCCCAA
1261  TTCTCTGAGC TTGTCAATGA CTACTACAAC AATGGCTTGC CTTCGAATCT CACAGGTAGC
1321  AGCAACCCGA GTTTGGACTA CGGGTTCAAA GGTGCTGAAA TCGCAATGGC ATCTTACTGC
1381  TCAGAGCTTC AGTTCCTGC CAACCCTGTG ACCAACCATG TCCAAAGTGC TGAGCAACAC
1441  AACCAAGATG TTAACTCCTT GGGATTGATC TCCTCTAGGA AGACATCAGA GGCTGTCGAC
1501  ATTTTGAAGC TGATGTCATC CACATTCCTA GTTGCATTGT GCCAAGCTAT TGATCTGAGG
1561  CATTTGGAGG AGAACTTGAA GATCGTTGTC AAGACTACTG TAAGTAATGT GGCCAAGAGG
1621  ACCCTGACTG TTTCCCCCAA CGGCGAGCTT CACCCCTCTA GATTCTCCGA GAAAGACTTG
1681  CTCACAGTCG TGGACCGCGA GTACCTTTTC TCCTACATCG ACGACCCCTG CCTTGCTACC
1741  TACCCACTGA TGCAGAAACT GAGGGCAGAG CTAGTCGAAC ATGCTCTGAA AAATGGTGAG
1801  AGAGAGCGGA GTGCAAACAC TTCCATCTTC CACAAGATTT CTGCTTTTGA AGAGGAGCTG
1861  AAGACCCTCT TGCCCAAAGA AGTCGACAAT GCCAGGATCG AAATCGAGAA TGGGAAATCA
1921  GAAATCCCAA ACAGGATCAA GGAATGCAGG TCTTATCCAT TGTACAGGTT TGTGAGGGAG
1981  GAGTTGGGGA CTAGAAAGTT GACCGGTGAG AAGATCAAGT CACCTGGTAG AGAATGTGAC
2041  AAGGTGTTCA ATGCAATCTG TGCCGGAAAG CTGGTTGATC CTCTGCTGGAA GTGTTTGAAG
2101  GAGTGGAATG GTGCCCCCCT GCCTATATCT TAA
```

b

```
6     MEFNKNGNGA VESFCEGHDP LNWNMAAESL KGSHVDELKR MVSDYRKPVV KLGGETLTIG
61    QVAAIASHDG GVRVELSEEK RAGVKASSDW VMDSMGKGTD SYGVTTGFGA TSHRRTKNGG
121   ALQRELIRFL NAGIFGSSLD STHKLPHTAT RAAMLVRINT LLQGYSGIRF EILEAITKFL
181   NGNITPCLPL RGTITASGDL VPLSYIAGLL IGRPNSKSVG PKGETLSPAE AFKLAGIDGG
241   FFELQPKEGL ALVNGTAVGS GMASMVLFDA NTLAVLSEIM SAIFAEVMQG KPEFTDHLTH
301   KLKHHPGQIE AAAIMEHILE GSSYVKEAKK VHEMDPLQKP KQDRYALRTS PQWLGPQIEV
361   IRAATKMIER EINSVNDNPL IDVSRNKALH GGNFQGTPIG VAMDNTRLAI ASIGKLMFAQ
421   FSELVNDYYN NGLPSNLTHS SNPSLDYGFK GAEIAMASYC SELQFLANPV TNHVQSAEQH
481   NQDVNSLGLI SSRKTSEAVD ILKLMSSTFL VALCQAIDLR HLEENLKIVV KTTVSNVAKR
541   TLTVSPNGEL HPSRFSEKDL LTVVDREYLF SYIDDPCLAT YPLMQKLRAE LVEHALKNGE
601   RERSANTSIF HKISAFEEEL KTLLPKEVDN ARIEIENGKS EIPNRIKECR SYPLYRFVRE
661   ELGTSLLTGE KIKSPGEECD KVFNAICAGK LVDPLLECLK EWNGAPLPIS
```

图 2 *RiPAL1* 开放阅读框（a）及编码区氨基酸序列（b）

Fig.2 Open reading frame (a) and coding amino acid sequences of *RiPAL1* (b)

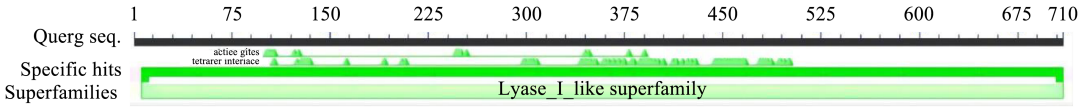


图 3 RiPAL1 蛋白的功能结构域分析

Fig.3 Analysis of functional domain of RiPAL1 protein

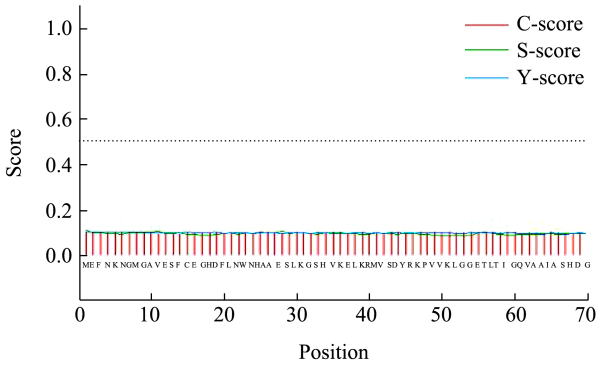


图 4 RiPAL1 蛋白的信号肽预测

Fig.4 Prediction of signal peptides of RiPAL1 protein

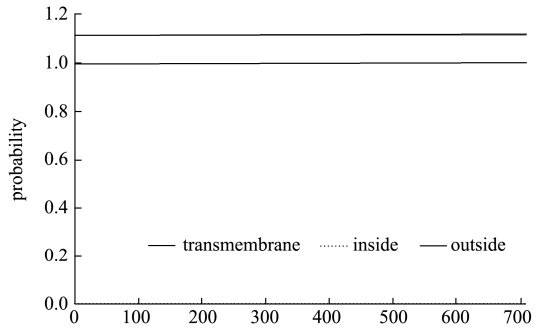


图 5 RiPAL1 蛋白的跨膜结构域预测

Fig.5 Prediction of potential transmembrane domains of RiPAL1 protein

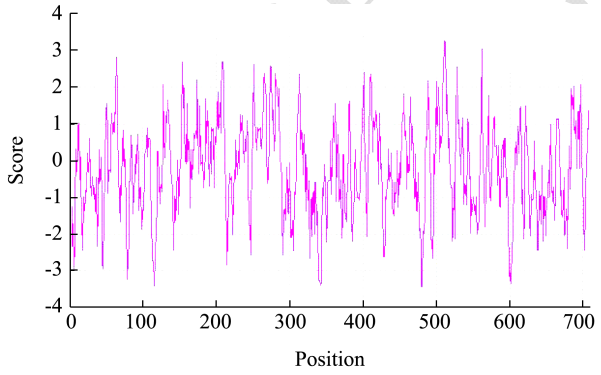


图 6 RiPAL1 蛋白的亲疏水性预测

Fig.6 Prediction of hydrophobicity of RiPAL1 protein

2.2 RiPAL1 编码蛋白的理化性质分析

关键保守结构域是蛋白发挥催化功能的基础。对树莓 RiPAL1 编码蛋白的保守结构域分析表明，RiPAL1 蛋白包含 PLN02457 结构域，属于 Lyase_I_Like 超家族（图 3）。在 RiPAL1 蛋白的 192~208 位氨基酸处是苯丙氨酸解氨酶典型的酶活性中心，序列为 GTITASGDLVPLSYIAG（图 2b）。利用 ExPASy-ProtParam 在线软件对 RiPAL1 蛋白的理化性质进行分析，预测其分子式为 $C_{3422}H_{5491}N_{949}O_{1045}S_{27}$，相对分子量为 77.50 ku，总原子数为 10 934，理论等电点为 6.21，不稳定系数为 35.00（＜40.00），推测为稳定蛋白。半衰期约为 30 h，在构成树莓 RiPAL1 蛋白的 20 种氨基酸中亮氨酸（Leu）的比例最高，为 10.80%；色氨酸（Trp）的比例最低，为 0.60%。脂肪族氨基酸 616 个，占 86.80%；芳香族氨基酸 39 个，占 5.50%；酸性氨基酸 85 个，占 12.00%。对 RiPAL1 蛋白的信号肽预测分析结果表明，RiPAL1 是一种无信号肽蛋白，从而推测其可能是非分泌蛋白（图 4）。TMHMM 2.0 在线软件预测结果显示，RiPAL1 蛋白不存在跨膜结构（图 5）。利用 ExPasy-ProtScale 软件在线预测编码蛋白的亲疏水性，结果显示 RiPAL1 蛋白疏水性最大值为 4.50，最小值为-4.50，平均疏水指数为-0.49，故推测该蛋白为亲水性蛋白（图 6）。

2.3 RiPAL1 蛋白的糖基化位点和磷酸化位点分析

生命活动中离不开蛋白质，在细胞中信号转导包括磷酸化和去磷酸化两个主要部分，其中蛋白质磷酸化是调节酶活性的关键环节[20]，并影响蛋白质活性和亚细胞鉴定[21]。蛋白质磷酸化是蛋白质翻译后修饰的主要方式之一，直接或间接影响蛋白质自身的活性、稳定性以及亚细胞定位[22]，指由蛋白激酶（Protein Kinases，PKs）催化的，将三磷酸腺苷（ATP）的磷酸基团转移到底物蛋白特定氨基酸残基上的过程，广泛参与植物生命过程的调节[23]。蛋白质磷酸化主要发生在丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸 3 类氨基酸残基上[24]。通过 NetNHlyc 1.0 软件在线预测 RiPAL 蛋白的糖基化位点，发现在 RiPAL1 蛋白中存在 4 个潜在 N 糖基位点，分别为 NGTA254、NLTG436、NPSL442 和 NTSI606（图 7）。通过 NetPhos 3.1 软件在线预测 RiPAL1 蛋白的磷酸化位点，共发现 105 个可能存在的磷酸化位点，其中共分析出 67 个特异性激酶位点，包括 38 个丝氨酸（S）、22 个苏氨酸（T）、7 个酪氨酸（Y），其中酪氨酸主要分布在第 102、324、345、428、429、447、

572 氨基酸处（图 8）。

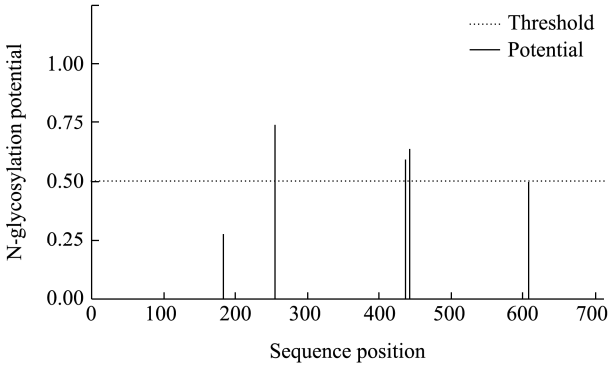


图 7 RiPAL1 蛋白的糖基化位点分析

Fig.7 Analysis of glycosylation sites of RiPAL1 protein

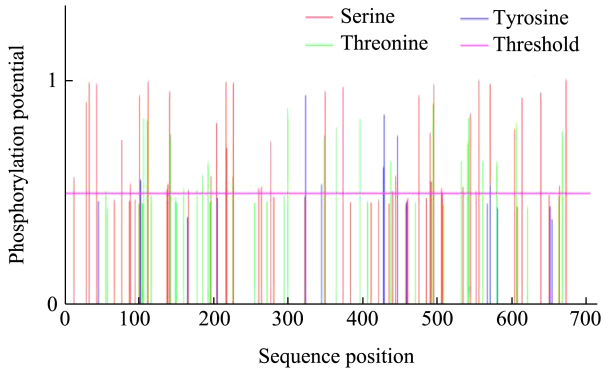


图 8 RiPAL1 蛋白的磷酸化位点预测

Fig.8 Prediction of phosphorylation sites of RiPAL1 protein

2.4 RiPAL1 蛋白的二级结构和三级结构预测

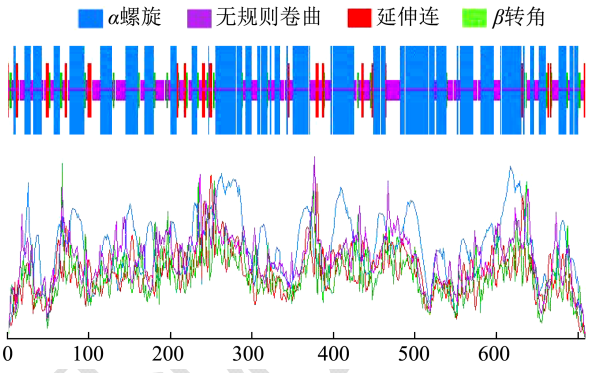


图 9 RiPAL1 蛋白二级结构预测

Fig.9 Prediction of secondary structure of RiPAL protein

通过 SOPMA 软件在线预测 RiPAL1 蛋白的二级结构，分析发现 RiPAL1 蛋白中的氨基酸主要参与形成了 α 螺旋（Hh）、无规则卷曲（Cc）、延伸链（Ee）和 β 折叠（Tt）结构，占比分别为 54.93%、31.13%、7.61%和 6.34%（图 9）。利用 Phyre 2 在线软件，以欧芹（*Petroselinum crispum*）PAL 酶（PDB：1W27）的晶体结构为模板对树莓 RiPAL1 的三级结构进行预测，其预测部分的可信度为 100%，两者序列相似性高达 84%，RiPAL1 蛋白以 α-螺旋结构为主，由四个同型蛋白单体组成四聚体（图 10）。

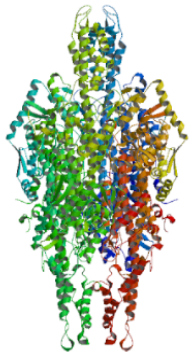


图 10 RiPAL1 蛋白三级结构预测

Fig.10 Prediction of tertiary structure of RiPAL1 protein

2.5 RiPAL1 蛋白的同源性分析及系统发育树构建

使用 NCBI 中的 BlastP 工具查找与树莓 RiPAL1 同源性较高的蛋白，利用 DNAMAN 中的多序列比对对包括树莓 RiPAL1 蛋白在内的 13 种植物的 PAL 蛋白氨基酸序列进行同源性比对，结果发现不同植物的 PAL 蛋白长度存在一定的差异性，但序列一致性高达 91.83%，RiPAL1 和其他物种 PAL 氨基酸序列中均含包含一段典型的 PAL 酶家族保守结构域（GTITASG DLVPLSYIAG），表明 PAL 氨基酸序列在不同物种中高度保守（图 11）。利用 MEGA7 对树莓 RiPAL1 和其它植物 PAL 的氨基酸序列进行系统进化树分析，结果表明树莓 RiPAL1 与草莓 FaPAL1、月季 RcPAL1 和玫瑰 RrPAL 亲缘关系最近，它们都属于蔷薇科植物，该聚类结果基本符合植物形态学分类规律（图 12）。

2.6 其他植物 PAL 分析

研究表明，PAL 与黄酮积累有关，刘金福等[13]在研究苦荞中的黄酮发现，苦荞中黄酮的产生与 PAL 活性呈正相关。赵则海等[14]在研究攀援型和矮生型四棱豆中的黄酮发现，在两种不同类型的四棱豆中，总黄酮含量和 PAL 活性之间均呈显著正相关。王俊文等[15]在研究树莓中的黄酮发现，NO 处理能显著提高苯丙烷代谢中的 PAL 和 SKDH 等关键酶活性，加快了苯丙烷代谢能力，从而促进下游产物如黄酮类物质的积累。在蓝莓和苹果中也有类似的结果[25,26]。目前，在对多种植物的 PAL 基因克隆、序列分析以及蛋白质的功能研究中，吕思佳等[16]发现云锦杜鹃组织中的苯丙氨酸含量与 *RhPAL* 基因表达量呈高度相关。张文香等[17]发现 PAL 是百蕊草中黄酮类成分合成调节的关键。耿晓姗等[18]发现 PAL 是苯丙烷代谢途径的关键

酶，在植物的类黄酮类物质的合成中起着重要作用。杨郁文等[19]发现 PAL 是苯丙烷类代谢途径的关键酶，与植物抗病性密切相关。表明 PAL 基因对调控黄酮代谢有重要作用，因此展开对树莓黄酮代谢中 PAL 基因的解析，是揭示影响树莓黄酮类活性物质生物合成机制的关键环节。

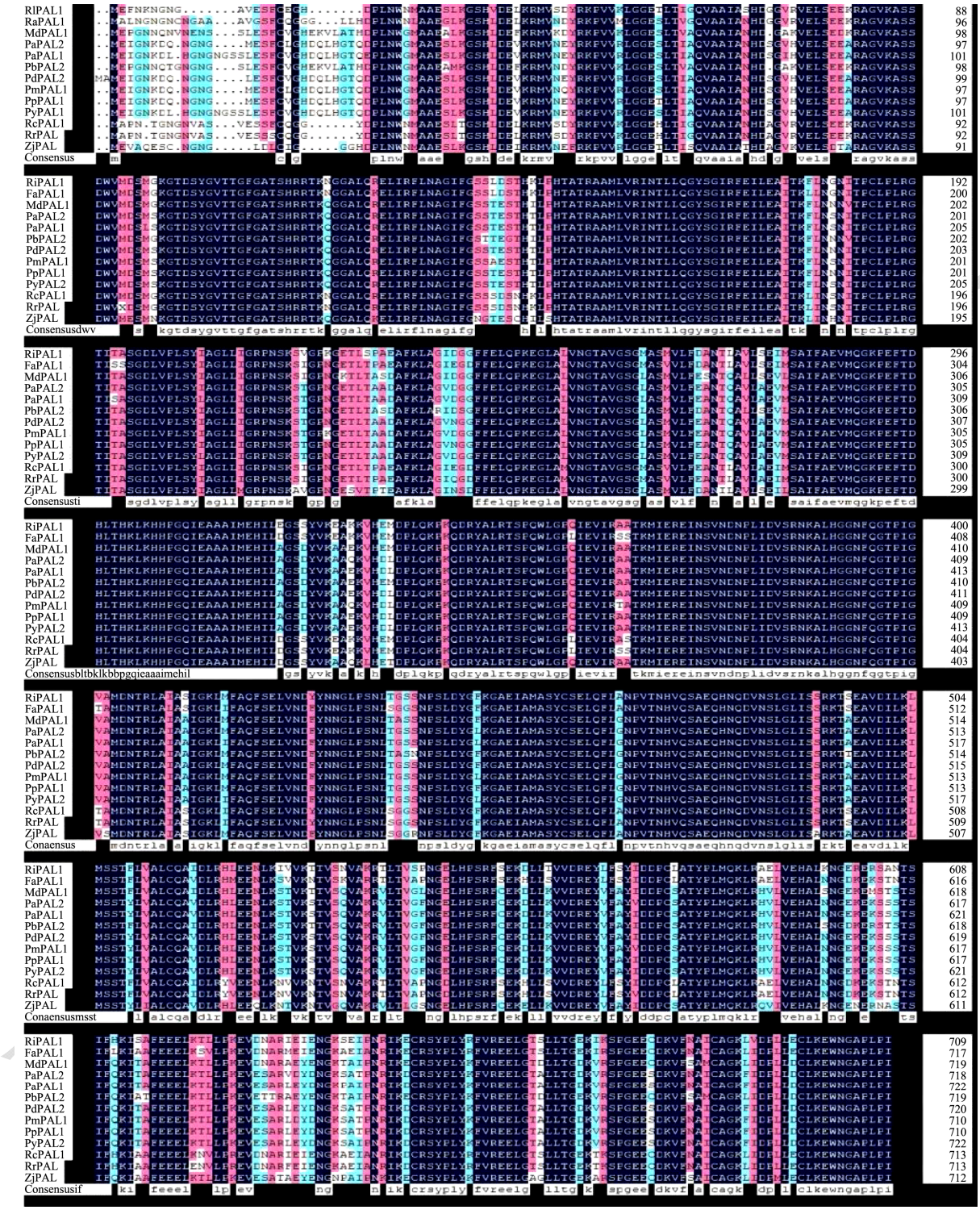


图 11 RiPAL 与其他植物 PAL 的多序列比对

Fig.11 Multiple alignment of the RiPAL protein with other plant PAL proteins

注：与 RiPAL1 多序列比对的其他物种基因注册号如下：草莓（FaPAL1，APB87287.1），苹果（MdPAL1，XP_028961654.1），杏（PaPAL2，AOC97438.1），甜樱桃（PaPAL1，XP_021826706.1），白梨（PbPAL2，ADF59062.1），扁桃（PdPAL2，BBG97806.1），梅花（PmPAL1，XP_008233304.1），桃花（PpPAL1，XP_007220630.2），樱花（PyPAL2，PQQ06086.1），月季（RcPAL1，XP_024176620.1），玫瑰（RrPAL，ACZ44834.1），酸枣（ZjPAL，XP_015877186.1）。

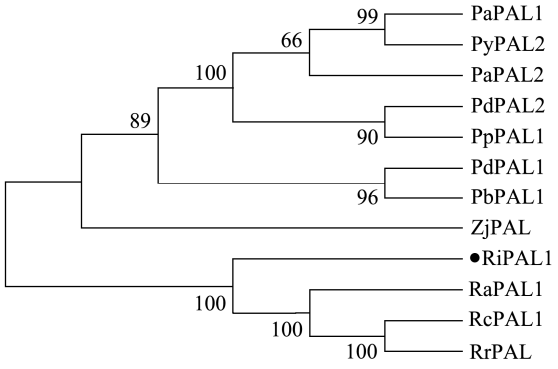


图 12 RiPAL 与其他植物 PAL 的系统进化树分析

Fig.12 A phylogenetic tree between RiPAL and other plant PAL

3 结论

本研究基于树莓转录组测序结果，从树莓中克隆了 *RiPAL1* 基因，该基因编码 710 个氨基酸组成蛋白，该蛋白属于苯丙氨酸解氨酶家族成员。通过对树莓 *RiPAL1* 基因进行生物信息学分析，结果显示，RiPAL1 蛋白为无跨膜结构和信号肽的亲水性蛋白，相对分子量为 77.50 ku，总原子数为 10 934，理论等电点为 6.21，半衰期约为 30 h。在构成树莓 RiPAL1 蛋白的 20 种氨基酸中亮氨酸（Leu）的比例最高，为 10.80%；色氨酸（Trp）的比例最低，为 0.60%。脂肪族氨基酸 616 个，占 86.80%；芳香族氨基酸 39 个，占 5.50%；酸性氨基酸 85 个，占 12.00%。RiPAL1 蛋白中发现 105 个可能存在的磷酸化位点，其中共分析出 67 个特异性激酶位点，其中丝氨酸和苏氨酸残基的磷酸化位点较多，酪氨酸残基的磷酸化位点较少，此外 RiPAL1 蛋白还存在 4 个潜在 N 糖基位点，所预测出的磷酸化和糖基化位点可为研究树莓 RiPAL1 蛋白的翻译后修饰提供参考。RiPAL1 蛋白以 α-螺旋结构为主，由四个同型蛋白单体组成四聚体。多序列比对表明 RiPAL1 蛋白具有较强的保守性。系统发育树分析表明树莓 RiPAL1 蛋白与同为蔷薇科的草莓、月季和玫瑰聚为一支，推测 RiPAL1 蛋白可能在蔷薇科植物的进化过程中高度保守，为今后深入研究蔷薇科植物的进化提供参考。

本研究利用 RT-PCR 法成功克隆出树莓 *RiPAL1* 基因，并利用生物信息学方法对 RiPAL1 蛋白进行了理化性质、二级和三级结构预测，以及同源性分析和系统进化树构建，阐明了该基因重要的分子特征，试验结果为进一步深入研究树莓黄酮类化合物的合成和基因调控奠定了理论基础。

参考文献

[1] 张海军,王彦辉,张清华,等.国内外树莓产业发展现状研究[J].林业实用技术,2010,10:54-56.

[2] 肖军霞,黄国清,仇宏伟,等.红树莓花色苷的提取及抗氧化活性研究[J].食品科学,2011,32(8):15-18.

[3] 赵文琦,曲长福,王翠华,等.树莓的营养保健价值与市场前景浅析[J].北方园艺,2007,6:114-115.

[4] Gonzalez, Agrasar, Castro, et al. Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus ideaus* L.) and arbutus berry (*Arbutus unedo* L.) and characterization of their distillates [J]. Food Research International, 2011, 44(5): 1419-1426.

[5] 阴芳冉,李颖,于宏伟,等.不同产地红树莓果实营养成分分析及综合评价[J].河北农业大学学报,2019,42(4):44-48,62.

[6] 武林芝,郝秀萍.红树莓果醋的制作工艺及香气成分分析[J].中国调味品,2021,46(10):129-132.

[7] Deng Y X, Lu S F. Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2017, 36(4): 1-34.

[8] Kumar Shashank, Pandey Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview [J]. The Scientific World Journal, 2013, 29: 1-16.

[9] Paul, Jorma, Ritva, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2002, 76: 560-568.

[10] Hui, Fang, Lin, et al. Red raspberry and its anthocyanins: bioactivity beyond antioxidant capacity [J]. Trends in Food Science and Technology, 2017, 66: 153-165.

[11] 黄琼林.高良姜 PAL 基因的序列和表达模式分析[J].现代中药研究与实践,2021,35(6):13-16.

[12] 姜莹.红树莓栽培技术及发展前景[J].北方园艺,2010,16:84-85.

[13] 刘金福,李晓雁,孟蕊.苦荞发芽过程中促进黄酮合成的因素初探[J].食品工业科技,2006,27(10):106-108.

[14] 赵则海,邱卓荣,陈雄伟,等.攀援型和矮生型四棱豆苯丙氨酸解氨酶活性和黄酮含量的研究[J].生态环境学报,2011,20(11):1670-1673.

[15] 王俊文.NO 对采后树莓贮藏品质及苯丙烷和花青素代谢的影响[D].山东:山东农业大学,2020:50-53.

[16] 吕思佳,吴月燕,贾永红,等.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.

[17] 张文香,杨再琴,潘柔柔,等.百蕊草苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与表达分析[J/OL].分子植物育种,2021.

[18] 耿晓姗,朱宇林,蒙柳密,等.牛大力苯丙氨酸解氨酶的克隆和生物信息分析[J].分子植物育种,2022,20(5):1514-1521.

[19] 杨郁文,李双,黄俊宇,等.陆地棉苯丙氨酸解氨酶家族基因的鉴定及分析[J].分子植物育种,2017,15(4):1184-1191.

[20] 白牡丹,王彩虹,田义轲,等.苹果茎尖组织中 GA2ox 基因的

结构特征及蛋白序列的生物信息学分析[J].华北农学报, 2012,27(5):55-59.

[21] 谢兴斌.苹果 bHLH 转录因子 MdTTL1 对低温诱导花青苷合成和果实着色的多途径调控[D].泰安:山东农业大学, 2011.

[22] Bigeard, Rayapuram, Pflieger, et al. Phosphorylation-dependent regulation of plant chromatin and chromatin-associated proteins [J]. Proteomics, 2014, 14(19): 2127-2140.

[23] Humphrey, James, Mann. Protein phosphorylation: A major switch mechanism for metabolic regulation [J]. Trends in Endocrinology and Metabolism, 2015, 26: 676-687.

[24] Schwartz, Murray. Protein kinase biochemistry and drug discovery [J]. Bioorganic Chemistry, 2011, 39: 192-210.

[25] Ge, Li, Li, et al. Effect of sodium nitroprusside on antioxidative enzymes and the phenylpropanoid pathway in blueberry fruit [J]. Food Chemistry, 2019, 295: 607-612.

[26] Ge, Chen, Li, et al. Effect of sodium nitroprusside treatment on shikimate and phenylpropanoid pathways of apple fruit [J]. Food Chemistry, 2019, 290: 263-269.

现代食品科技