

# Extraction, Purification and Activity Determination of Wheat PAL Protein

Feifan Guan, Xiaochen Liu, Zhijing Xiu, Xianglin Zhuge, Hailing Yang\*

Beijing Forestry University, Beijing  
Email: feifan\_guan@163.com, \*yhailing77@163.com

Received: Mar. 1<sup>st</sup>, 2018; accepted: Mar. 14<sup>th</sup>, 2018; published: Mar. 21<sup>st</sup>, 2018

---

## Abstract

In this study, we constructed the phylogenetic tree of PAL gene family in nine land plants, and found that a significant gene expansion occurred in the wheat PAL gene family. Among these nine land plants, the number of wheat PAL genes was the largest, reaching twenty-six. The gene expression pattern showed that the expression level of PAL genes was higher in young tissues than mature tissues. The high purity wheat PAL protein was extracted and purified from young leaves of wheat, and the activity of wheat PAL protein as determined. This study provides technical support for further research on the wheat PAL gene family.

## Keywords

PAL, Phylogenetic Tree, Expression Pattern, Protein Extraction, SDS-PAGE Electrophoresis, Activity Determination

---

# 小麦PAL蛋白的提取、纯化及活性测定

管非凡, 刘孝晨, 修志静, 诸葛祥林, 杨海灵\*

北京林业大学, 北京  
Email: feifan\_guan@163.com, \*yhailing77@163.com

收稿日期: 2018年3月1日; 录用日期: 2018年3月14日; 发布日期: 2018年3月21日

---

## 摘要

在本研究中, 我们构建了PAL基因家族在9种陆地植物中的系统发育树, 发现小麦PAL基因家族发生了明显的基因扩张: 在这9种陆地植物中, 小麦PAL基因家族成员数量最多, 达到26个。基因表达模式热图

\*通讯作者。

显示, 相对于成熟组织, 小麦PAL基因在幼嫩组织中的表达量较高。高纯度的小麦PAL蛋白从小麦嫩叶中提取和纯化, 并对其进行了活性测定。本研究为小麦PAL基因家族的进一步研究提供了技术支持。

## 关键词

苯丙氨酸解氨酶, 系统进化树, 表达模式, 蛋白提取, SDS-PAGE电泳, 活性测定

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC 4.3.1.24)催化苯丙氨酸非氧化性脱氨生成反式肉桂酸, 是一个连接初级代谢和次级代谢的酶。1961年, Koukol J 和 Conn E E 首次在大麦中发现 PAL, 并进行了分离纯化[1]。随后, 关于 PAL 的研究迅速展开, 目前已经在水稻、大豆等多种高等植物及藻类、真菌、细菌中发现 PAL 的存在, 且已经对美国南瓜[2]、枸杞[3]、梨[4]等多种植物的 PAL 基因进行了分子克隆及序列分析[5]。

研究发现, PAL 是一种由 4 个亚基构成的寡聚酶, 不同来源的 PAL 分子量略有差异, 但一般在 270~330 KDa 之间。不同植物的 PAL 氨基酸组成不同, 如玉米、马铃薯两种植物 PAL 中的酸性氨基酸含量高于水稻, 而中性氨基酸含量则低于水稻[5]。不同来源的 PAL 最适 pH 不同, 通常为 8.0~9.5, 如菜豆 PAL 最适 pH 为 8.8~9.2, 甘薯 PAL 最适 pH 为 8.5~9.5, 水稻 PAL 最适 pH 为 9.2 [6]。不同物种 PAL 基因家族成员的数量有明显差异, 如拟南芥含有 4 个 PAL 基因、大豆含有 7 个 PAL 基因[7]。

PAL 对植物生理代谢具有重要意义, 参与植物的木质化、色素合成、根瘤形成等生理过程[8]; 对植物抗逆境也有重要作用, 与植物抗病性密切相关。小麦是三大农作物之一, 在人类的日常生活中发挥重要作用, 对其进行科学研究具有重要意义。本实验中首先挖掘了小麦 PAL 基因的序列, 随后进行了小麦 PAL 的提取、纯化、活性测定[9], 最后进行了 SDS-PAGE 电泳, 希望为小麦 PAL 的研究提供新的数据支持。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 数据库及软件

使用在线 BLAST 服务在植物基因组学资源数据库(Phytozome v12.1.5, <https://phytozome.jgi.doe.gov>)和裸子植物基因组资源数据库(ConGenIE, <http://congenie.org>)中搜索不同物种的 PAL 基因序列。使用 MUSCLE 多序列比对在线服务网站(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>)和 BioEdit v7.0.5.3 软件(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)对搜索得到的 PAL 序列进行多序列比对, 然后使用 Model Generator v0.85 软件计算多序列比对后 PAL 序列的最佳氨基酸替代模型, 最后使用 PhyML v 3.1 软件(<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>)构建最大似然法(Maximum Likelihood, ML)系统进化树。在 PLEXdb 网站(<http://www.plexdb.org>)的数据库中搜索小麦 PAL 基因的表达模式数据, 并使用 Hemi v1.0.3.7 软件(<http://hemi.biocuckoo.org>)绘制基因表达模式热图。

### 2.2. 植物材料

普通小麦, 浸种 12 h, 光照时间 12 h/day, 20℃培养 8 天。

## 2.3. 仪器及试剂

### 2.3.1. 主要仪器

光照培养箱、水浴锅、紫外检测仪、紫外分光光度计、层析柱、电泳仪。

### 2.3.2. 主要试剂

酶提取液: 0.1 mol/L Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 缓冲液(pH 8.3), 1 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 5% 甘油, 7 mmol/L β-巯基乙醇;

洗脱液 A: 50 mmol/L Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 缓冲液(pH 8.3), 1 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 5% 甘油, 2% β-巯基乙醇;

洗脱液 B: 50 mmol/L Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 缓冲液(pH 8.3), 1 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 5% 甘油, 2% β-巯基乙醇;

0.6 mol/L NaCl;

透析液: 50 mmol/L Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 缓冲液(pH 8.3), 1 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub>, 50% 甘油, 2% β-巯基乙醇。

## 2.4. 实验方法

### 2.4.1. 小麦 PAL 蛋白的粗提取

称取 10 g 小麦幼叶, 剪碎, 加入 20 mL 酶提取液在冰上低温研磨; 过滤, 4℃ 冷冻离心 30 min, 取上清并量取该粗提取液体积(样品 1)。

### 2.4.2. 小麦 PAL 蛋白的分级沉淀

按所得体积称量 2 份(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 分别使粗提取液达到 40%、70% 饱和度; 将第一份(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 加入粗提液中缓慢搅拌, 全部溶解后再持续搅拌 10 min, 静置 20 min, 4℃ 冷冻离心 15 min, 取上清; 再将第二份(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 按同样方式加入, 离心后取沉淀; 用 5 mL 酶提取液溶解沉淀(样品 2)。

### 2.4.3. 小麦 PAL 蛋白的分子筛层析及透析

用 0.02 M 磷酸盐缓冲液处理 Sephadex G-25 凝胶柱料, 装柱并连接到检测系统, 用 0.02 M 磷酸盐缓冲液和洗脱液 A 进行平衡并校正系统示数, 上样后用洗脱液 A 洗脱, 收集洗脱液。再用 200,000 MD 的透析袋和甘油浓度 50% 的透析液进行透析, 至终体积约 5 mL (样品 4)。

### 2.4.4. 小麦 PAL 蛋白的阴离子交换层析及透析

参照《高级生物化学实验》([10], p.84)的处理方法对 DEAE-葡聚糖柱料进行预处理, 装柱后连接到检测系统, 用洗脱液 A 进行平衡及校正系统读数, 上样, 用洗脱液 A 洗杂, 当检测仪示数稳定后加入洗脱液 B 进行洗脱, 收集洗脱液。最后用相同的透析袋和透析液进行透析, 至终体积约 5 mL。

### 2.4.5. PAL 蛋白的浓度及活性测定

使用考马斯亮蓝染色法测定蛋白质浓度, 用表 1 方法进行 PAL 蛋白的活性测定。

**Table 1.** Sample protein activity determination method

**表 1.** 样品活性测定方法

管号	0 (对照)	1 (样品 1)	2 (样品 2)	3 (样品 3)	4 (样品 4)
0.05 M Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , pH8.8(mL)	3.0	总体积补至 4 mL	总体积补至 4 mL	总体积补至 4 mL	总体积补至 4 mL
粗提液(mL)	0	0.1~0.3	0.1~0.3	0.1~0.3	0.1~0.3
0.02 M 苯丙氨酸(mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	混匀, 37℃ 水浴 60 min, 加 0.5 mL 6 M HCl 终止反应				
	混匀, 4000 g 冷冻离心 5 min, 取上清测吸光值				
A290nm					

### 2.4.6. PAL 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 凝胶制备配方如下:

浓缩胶: 30% Acrylamide 0.63 mL, 1.5% AP0.25 mL, 浓缩胶缓冲液 1.25 mL, ddH<sub>2</sub>O 2.87 mL, TEMED 20 ul;

分离胶: 30% Acrylamide 4.0 mL, 1.5% AP 0.5 mL, 浓缩胶缓冲液 1.25 mL, ddH<sub>2</sub>O 4.25 mL, TEMED 40 ul。

## 3. 结果与分析

### 3.1. PAL 基因家族的基因搜索及系统进化分析

我们以已经发表的 4 条拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) PAL 基因序列为模板, 在 Phytozome 数据库中搜索得到 6 个物种的 71 条 PAL 基因序列, 其中小麦(*Triticum aestivum*) 26 条、玉米(*Zea mays*) 10 条、水稻(*Oryza sativa*) 9 条、毛果杨(*Populus trichocarpa*) 5 条、江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*) 9 条、小立碗藓(*Physcomitrella patens*) 12 条; 同时在 ConGenIE 数据库中搜索得到 2 个裸子植物的 16 条 PAL 基因序列, 包括挪威云杉(*Picea abies*) 5 条、火炬松(*Pinus taeda*) 11 条。使用 MUSCLE 软件对这 91 条 PAL 基因序列进行多序列比对, 使用 BioEdit 软件对对比后的序列进行手动调整和校正, 然后使用 Model Generator 软件计算出最适氨基酸替换模型为 JTT + G + F。最后使用 PhyML 软件对这 91 个基因构建最大似然法系统进化树(图 1)。进化树显示小麦 PAL 基因发生了明显的基因扩张, 预示着 PAL 基因可能对小麦的生长和发育等具有重要的作用和意义。

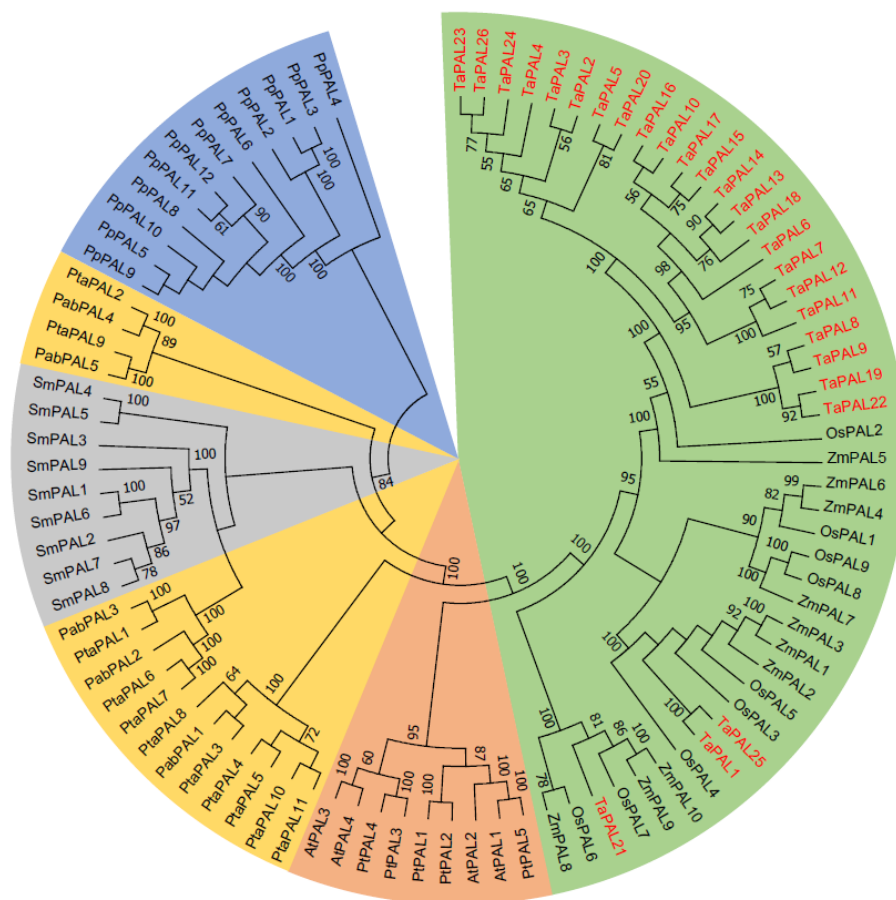


Figure 1. Phylogenetic tree of 91 PAL genes

图 1. PAL 基因系统进化树

### 3.2. 小麦 PAL 基因家族的表达模式分析

基于 PLEXdb 网站的数据, 我们搜索得到小麦 PAL 基因的基因表达数据, 使用 HemI 软件绘制基因表达模式热图(图 2)。结果显示, 70%以上的小麦 PAL 基因在幼嫩组织中的表达量均高于成熟组织。其中, TaPAL1、5、7、11、12 这 5 个基因在各组织部位中的表达量较低, 而 TaPAL21、25 这两个基因在各个组织中均有较高的表达量。

### 3.3. 小麦 PAL 基因的提取及活性测定

将小麦幼苗按 2.4 所述方法进行 PAL 蛋白的粗提取, 取 1mL 留样(样品 1)进行蛋白浓度及活性测定; 盐析后得到 5 mL 的粗提液, 留样(样品 2), 再用 Sephadex G-25 凝胶为柱料的分子筛进行脱盐处理, 所得层析图谱如图 3 所示。查阅文献可知, 小麦 PAL 的分子量约为 280 kDa [9], 进行分子筛时会因分子量较大而先被洗脱, 因此判断层析图谱的第一个峰为目标蛋白的洗脱峰(预实验中对 2 个洗脱峰进行测活, 峰 1 具有 PAL 蛋白酶活性)。

将洗脱液透析浓缩后得到 6 mL 的蛋白粗提液, 取 1 mL 留样(样品 3)。剩余粗提液用 DEAE-葡聚糖凝胶进行阴离子交换层析, 得到图 4 所示层析图谱。从图上可以看出, 46 min 开始出现洗脱峰, 且分为 2 个小峰, 将这前后两个峰分别进行收集, 透析浓缩后分别留样(样品 4、5)。

### 3.4. 小麦 PAL 基因的 SDS-PAGE 电泳

本次 SDS-PAGE 电泳结果如图 5 所示, 查阅文献资料得知, 小麦 PAL 是由 4 个相同亚基构成的蛋白, 单一亚基的分子量大小约 70 kDa [5]。商品 PAL 来自于粘红酵母, 单一亚基的分子量大小约 78 kDa。图中的样品 1~3 不能清晰的看到 PAL 蛋白条带, 但是经过高度浓缩的样品 4 中出现了清晰的 PAL 蛋白条

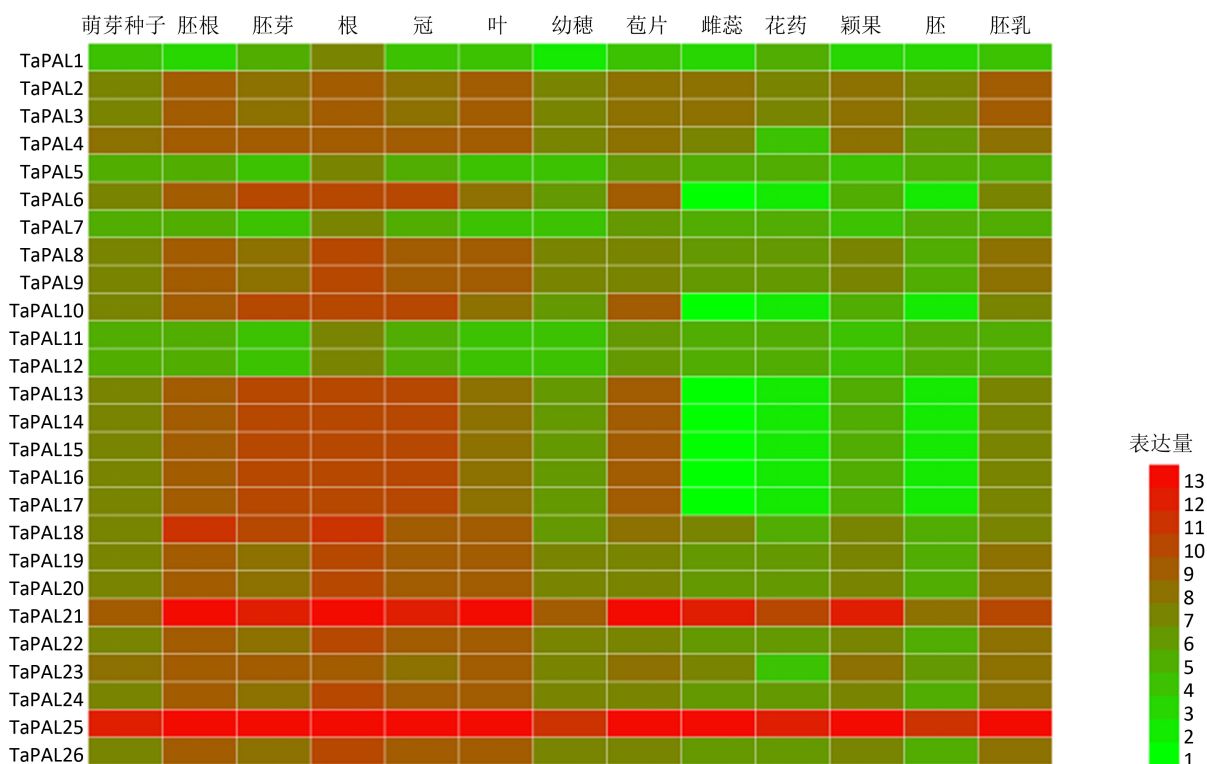


Figure 2. Heat map of wheat PAL genes expression pattern

图 2. 小麦 PAL 基因的表达模式热图

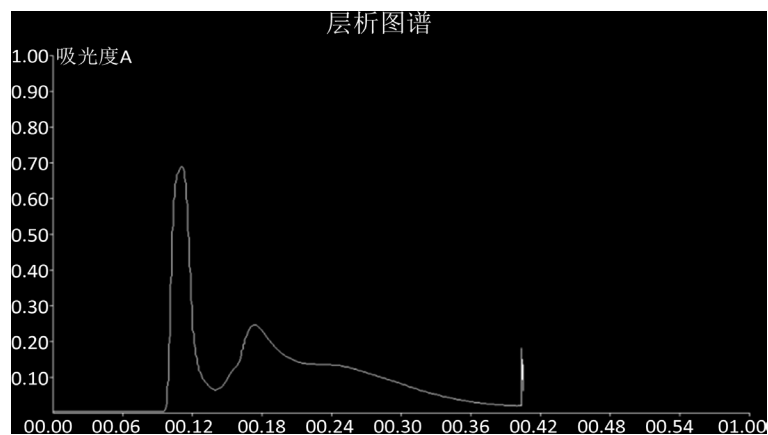


Figure 3. Molecular mapping of wheat PAL protein extraction

图3. 小麦 PAL 蛋白提取的分子筛图谱

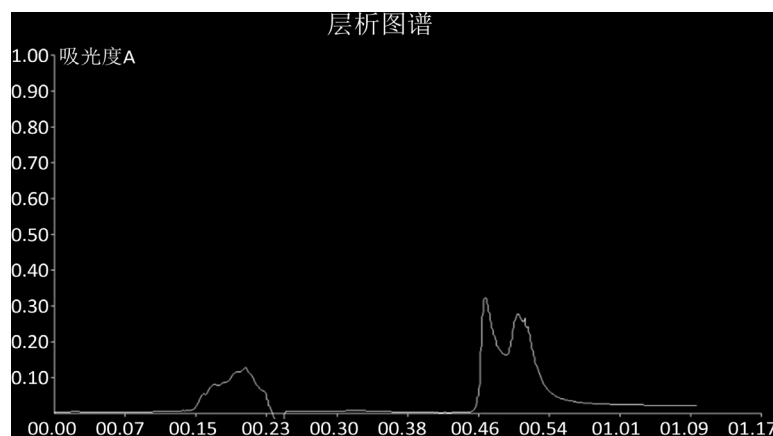
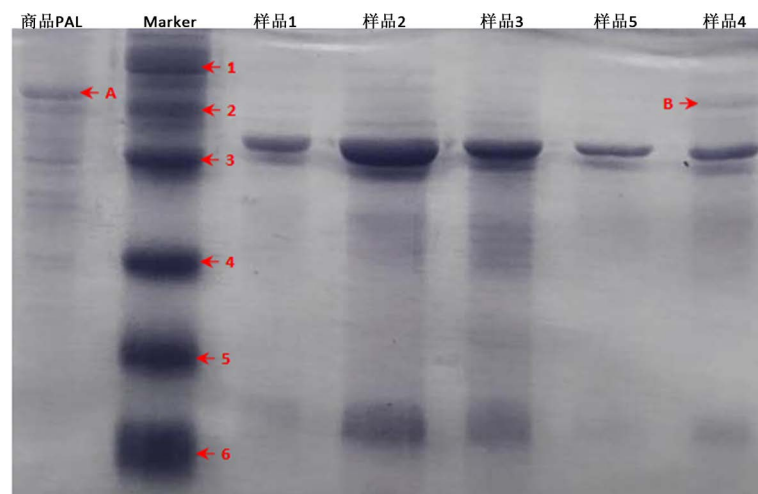


Figure 4. Anion exchange chromatography of wheat PAL protein extraction

图4. 小麦 PAL 蛋白提取的阴离子交换层析图谱



注: 1. 分子量 97.4 kDa; 2. 分子量 66.2 kDa; 3. 分子量 43.0 kDa; 4. 分子量 31.0 kDa; 5. 分子量 22.0 kDa; 6. 分子量 14.4 kDa; A. 商品 PAL 蛋白的位置, 大小约 78 kDa; B. 样品 4 中 PAL 蛋白的位置, 大小约 70 kDa

Figure 5. Wheat PAL protein SDS-PAGE electrophoresis results

图5. 小麦 PAL 蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

**Table 2.** Wheat PAL protein extraction results**表 2.** 小麦 PAL 蛋白提取结果

样品编号	体积(mL)	A <sub>595</sub>	蛋白浓度(mg/mL)	总蛋白(mg)	A <sub>290</sub>	活力(U/mL)	总活力 U	比活力(U/mg)	提纯倍数	回收率(%)
样品 1	15	0.443	4.820	72.307	0.335	335	5025	69.502	1	100
样品 2	5	0.595	6.474	32.372	0.472	472	2360	72.907	1.049	46.97
样品 3	6	0.428	4.657	27.943	0.368	368	2208	79.021	1.137	43.94
样品 4	6	0.102	1.109	6.654	0.097	97	582	87.466	1.258	11.58
样品 5	7	0.270	2.938	20.566	0.136	136	952	46.290	0.666	18.95

注：① 提纯倍数 = 每次纯化后比活力(U/mg)/第一次比活力(U/mg)；② 回收率 = 提纯后总活力(U)/提纯前总活力(U)。

带，其大小与文献所述相吻合，而同样经过高度浓缩的样品 5 中却不能清楚看到 PAL 蛋白条带。

### 3.5. 小麦 PAL 蛋白的活性分析

参照《高级生物化学实验》([10], p.37)所列方法制作蛋白标准曲线，再按 2.4.5 方法分别测定样品 1~5 的蛋白浓度及活性，计算并填写表 2。

从表 2 中可以看出，样品 1~4 的比活力、提纯倍数都呈现逐渐递增的趋势，总蛋白、回收率则出现了递减的趋势，说明 PAL 蛋白经过粗提、盐析、分子筛、阴离子交换之后确实得到了纯化，且随着纯化步骤的进行，不断有杂蛋白被分离出去，最后获得了纯度较高的小麦 PAL 蛋白。而样品 5 虽然有 PAL 蛋白的活性，但是比活力和纯化倍数都较低，推测该样品中有较大比例的杂蛋白存在，而 PAL 蛋白含量较少。

本研究以 9 种陆地植物的 91 个 PAL 基因为对象进行系统进化分析，发现小麦 PAL 基因的数量远多于其他物种，预示着该基因家族在小麦中可能经历了基因扩张事件；随后对小麦 PAL 基因进行表达模式的分析，发现幼嫩组织中具有较高的表达量；最后进行了小麦嫩叶组织中的 PAL 蛋白提取实验，结合亲和层析、SDS-PAGE 电泳及 PAL 活性测定等实验的结果可知，此次实验提取到的样品 4 为纯度较高的小麦 PAL 蛋白。

## 4. 讨论

本研究利用 Phytozome、ConGenIE 和 PLEXdb 数据库，MUSCLE、BioEdit、ModelGenerator、PhyML 和 HemI 等软件完成了小麦 PAL 基因家族的挖掘、进化树的构建、表达模式数据的收集及热图的绘制，对苔藓植物、石松类植物、裸子植物和被子植物 9 个代表物种的 PAL 基因的系统发生关系进行了初步的计算。实验提取部分包含粗提、盐析、分子筛、阴离子交换、SDS-PAGE 电泳等几个主要步骤，通过 PAL 蛋白的活性测定、SDS 电泳的实验结果证明了小麦 PAL 蛋白的成功提取。在预实验中，直接使用样品 4、5 进行 SDS 电泳，并未得到正确的目的条带，随后对样品 4、5 分别进行高度浓缩，至终体积约 100  $\mu$ l，并再次电泳，最后得到了图 5 所示电泳图。从 SDS-PAGE 电泳图中可以看到，样品 1~5 中都含有一种分子量大小在 46 kDa 左右的蛋白，经过几种纯化方式都没有被除去，可能是一种性质与 PAL 蛋白相似的组成型蛋白，在后期的研究中，可以针对这种蛋白再展开研究，进一步确定其具体情况。

其他学者的研究结果表明，PAL 是一种诱导型蛋白，低温、机械损伤、病原菌感染、毒素处理等多种因素都能诱导 PAL 表达，赤霉素等植物激素的刺激亦能导致 PAL 活性的上升，进而影响植物的生理和生化功能。在后续的研究中，可以采用激素诱导表达的方式探究不同植物激素浓度对 PAL 表达量及活性的影响，从而为优化植物生长提供理论支持。

## 基金项目

国家自然科学基金“杨树赤霉素代谢途径的解析及相关基因家族的功能分化机制研究”。

## 参考文献

- [1] Koukol, J. and Conn, E.E. (1961) The Metabolism of Aromatic compounds in Higher Plants. IV. Purification and Properties of the Phenylalanine Deaminase of *Herdeum vulgare*. *Journal of Biology and Chemistry*, **236**, 2692-2698.
- [2] 刘佳. 美洲南瓜苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因克隆、表达分析及品种抗灰霉病研究[D]: [博士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [3] 邹彩云, 刘永亮, 曾少华, 等. 宁夏枸杞苯丙氨酸解氨酶基因的 cDNA 克隆及其表达分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2014, 22(2): 155-164.
- [4] 李义红, 于凤鸣, 张立彬. 梨苯丙氨酸解氨酶基因的生物信息学分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(32): 15569-15574.
- [5] 马俊彦, 杨汝德, 敖利刚. 植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展[J]. 现代食品科技, 2007, 23(7): 71-74.
- [6] 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 等. 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.
- [7] 盖江涛, 沈建凯, 王鹏. 主要作物中 PAL 基因家族的鉴定和序列分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 45-49.
- [8] 高雪. 植物苯丙氨酸解氨酶研究进展[J]. 现代农业科技, 2009(1): 30-33.
- [9] 欧阳光察, 应初衍, 沃绍根, 等. 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.
- [10] 汪晓峰, 杨志敏. 高级生物化学实验[M]. 北京: 北京高等教育出版社, 2010.

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2164-5507, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)