

芽胞角苔苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及功能分析

于海娜[#], 莫键[#], 杨佳艺, 秦晓春^{*}

济南大学 生物科学与技术学院, 山东 济南 250022

于海娜, 莫键, 杨佳艺, 秦晓春. 芽胞角苔苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及功能分析[J]. 生物工程学报, 2025, 41(7): 2855-2870.

YU Haina, MO Jian, YANG Jiayi, QIN Xiaochun. Cloning and functional analysis of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Anthoceros angustus*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(7): 2855-2870.

摘要: 苔藓植物芽胞角苔(*Anthoceros angustus* Steph.)中含有丰富的迷迭香酸等酚酸类化合物。苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是植物苯丙烷代谢途径的入口酶,对迷迭香酸的生物合成具有重要作用。为研究芽胞角苔 PAL 对迷迭香酸合成的重要作用,从芽胞角苔中克隆到 2 个苯丙氨酸解氨酶基因 *AanPAL1* 和 *AanPAL2*, 分别编码 755 个和 753 个氨基酸,均包含 PAL 保守结构域和核心活性氨基酸残基 Ala-Ser-Gly。在系统进化树上与苔藓、蕨类植物 PALs 聚在一个分支,与小立碗藓的进化距离最近。实时荧光定量 PCR 分析表明, *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 基因的表达受外源茉莉酸甲酯的诱导。高效液相色谱分析显示,迷迭香酸的含量在茉莉酸甲酯处理后也显著增加。利用大肠杆菌进行异源表达,纯化后进行功能表征发现, *AanPALs* 可高效催化 L-苯丙氨酸(L-phenylalanine, L-Phe)生成反式肉桂酸,最适温度和 pH 分别为 50 °C、pH 8.0。 *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 的 K_m 、 k_{cat} 分别为 0.062 mmol/L、4.35 s⁻¹ 和 0.198 mmol/L、14.48 s⁻¹; 比酶活分别为 2.61 U/mg 和 8.76 U/mg。两者热稳定性较差,但 pH 稳定性较好。全细胞催化结果显示, *AanPAL2* 在 10 h 内可催化 1 g/L 的 L-Phe 转化成反式肉桂酸。本研究结果为深入分析 *AanPAL* 在芽胞角苔迷迭香酸生物合成中的调控作用奠定了基础,同时为生物合成肉桂酸提供了重要的候选酶基因。

关键词: 芽胞角苔; 苯丙氨酸解氨酶; 迷迭香酸; 基因克隆; 表达分析; 酶动力学分析; 全细胞催化

资助项目: 国家自然科学基金(31800257, 32270260, 32070267); 山东省自然科学基金(ZR2019ZD48, ZR2019BC063); 泰山学者项目(tsqn20240516)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31800257, 32270260, 32070267), the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2019ZD48, ZR2019BC063), and the Taishan Scholars Project (tsqn20240516).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: bio_qinx@ujn.edu.cn

Received: 2025-01-22; Accepted: 2025-03-28; Published online: 2025-03-31

Cloning and functional analysis of the phenylalanine ammonia-lyase gene from *Anthoceros angustus*

YU Haina[#], MO Jian[#], YANG Jiayi, QIN Xiaochun^{*}

School of Biological Science and Technology, University of Jinan, Jinan 250022, Shandong, China

Abstract: *Anthoceros angustus* Steph. is rich in phenolic acids such as rosmarinic acid (RA). Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is an entry enzyme in the phenylpropanoid pathway of plants, playing an important role in the biosynthesis of RA. To investigate the important role of PAL in rosmarinic acid synthesis, two *PAL* genes (designated as *AanPAL1* and *AanPAL2*) were cloned from *A. angustus*, encoding 755 and 753 amino acid residues, respectively. The *AanPAL* deduced amino acid sequences contain the conserved domains of PAL and the core active amino acid residues Ala-Ser-Gly. The phylogenetic analysis indicated that *AanPAL1* and *AanPAL2* were clustered with PALs from bryophytes and ferns and had the shortest evolutionary distance with the PALs from *Physcomitrella patens*. Quantitative real-time PCR results showed that the expression of *AanPAL1* and *AanPAL2* was induced by exogenous methyl jasmonate (MeJA). HPLC results showed that the MeJA treatment significantly increased the accumulation of RA. *AanPAL1* and *AanPAL2* were expressed in *Escherichia coli* and purified by histidine-tag affinity chromatography. The recombinant proteins catalyzed the conversion of L-phenylalanine to generate *trans*-cinnamic acid with high efficiency, with the best performance at 50 °C and pH 8.0. The K_m and k_{cat} of *AanPAL1* were 0.062 mmol/L and 4.35 s⁻¹, and those of *AanPAL2* were 0.198 mmol/L and 14.48 s⁻¹, respectively. The specific activities of *AanPAL1* and *AanPAL2* were 2.61 U/mg and 8.76 U/mg, respectively. The two enzymes had relatively poor thermostability but good pH stability. The high activity of *AanPAL2* was further confirmed *via* whole-cell catalysis with recombinant *E. coli*, which could convert 1 g/L L-phenylalanine into *trans*-cinnamic acid with a yield of 100% within 10 h. These results give insights into the regulatory role of *AanPAL* in the biosynthesis of RA in *A. angustus* and provide candidate enzymes for the biosynthesis of cinnamic acid.

Keywords: *Anthoceros angustus*; phenylalanine ammonia-lyase; rosmarinic acid; gene cloning; expression analysis; kinetics analysis of enzymes; whole-cell catalysis

苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL, EC 4.3.1.5)是植物苯丙烷代谢途径的第一个酶,催化 L-苯丙氨酸(L-phenylalanine, L-Phe)生成反式肉桂酸(*trans*-cinnamic acid, *t*-CA),再进一步代谢生成一系列苯丙烷类化合物,包括类黄酮、木质素、酚酸类等^[1-2]。PAL普遍存在于高等植物中,某些植物还具有苯丙氨酸/酪氨酸解氨酶双功能酶(phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases, PTAL)^[3],例如单子叶

植物二穗短柄草、玉米^[4]、毛竹^[5]和苔藓植物田园角苔^[6]等。自1961年研究人员首次在大麦中发现 *PAL* 基因后^[7],陆续从多种植物组织器官中分离到 *PAL* 基因^[3-10]。目前,在多种植物中针对 *PAL* 的结构、功能和表达调控均从多个维度进行了研究。*PAL* 基因在植物中通常以基因家族形式存在,其数量在不同物种中差异较大,而且 *PAL* 基因的表达具有组织特异性。例如,拟南芥中有4个 *PAL* 基因^[8],银杏中鉴定出11个

PAL 基因^[9], 苔藓植物地钱基因组有 10 个 *PAL* 基因^[10], 田园角苔中鉴定出 2 个 *PAL* 基因^[6]。多数植物的 *PAL* 序列具有较高的同源性。*PAL* 的活性形式通常是同源四聚体蛋白, 蛋白亚基分子量约为 70–80 kDa, 每个亚基包含 1 个 MIO 基因, MIO 基因由邻近的 3 个氨基酸残基(即 Ala-Ser-Gly)自身环化形成, 是 *PAL* 蛋白的反应中心^[1,11]。目前, 已经获得了多种 *PAL* 蛋白的晶体结构, 以伞形科植物欧芹的 *PAL* 晶体结构最具代表性^[12]。晶体结构为四聚体, *PAL* 亚基主要由 α 螺旋(占比 50%以上)和不规则卷曲(30%以上)组成, 包括 3 个结构域: MIO 结构域、屏蔽区和核心结构域。此外, *PAL* 在生物工程和生物医学领域具有重要的应用价值。例如, Boros 等^[13]使用固定化的 *PAL* 蛋白合成多种高价值的 L-苯丙氨酸类似物。*PAL* 被美国食品药品监督管理局和欧洲药品管理局批准作为酶替代疗法用于成人苯丙酮尿症患者的治疗^[14]。另外, 由于癌细胞不能合成苯丙氨酸, 也不能利用苯丙酮酸作为生长的替代品, *PAL* 可以通过耗尽癌细胞中苯丙氨酸的供给来抑制肿瘤生长, 从而用于癌症治疗^[15]。

PAL 处于植物初级代谢与次级代谢的关键节点, 是植物参与应激反应的关键酶, *PAL* 基因的表达受到各种刺激因子的调控, 通过调控 *PAL* 的活性可对下游次级产物的生物合成产生调控作用^[2]。例如, 玉米丝黑穗病菌导致玉米 *PAL* 的活性增加^[16]; 机械损伤导致地钱 *PALs* 表达量增加, 几种主要的多酚类物质合成增加^[10]; 外源喷施植物激素茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)导致水稻 *PAL* 表达量和活性增加, 而且显著提高了酚类物质的积累^[17]。

迷迭香酸(rosmarinic acid, RA)是一种水溶性的天然酚酸类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤活性以及对创伤后应激障碍的治疗作用等。RA 主要分布于唇形科、紫草科、葫芦科、椴树科和伞形科等多种植物中, 传统中药如紫苏、丹参和冬凌草中含量较丰富^[18], 而

且角苔属植物也含有丰富的迷迭香酸及其衍生物^[6,19]。RA 由苯丙烷代谢和酪氨酸代谢途径这 2 个分支产生的前体物质再经过一系列的酶促反应合成。其中, *PAL* 催化 L-Phe 生成 *t*-CA, *t*-CA 再通过 2 步酶促反应生成 4-香豆酰辅酶 A, 进入 RA 合成通路。RA 的合成与苯丙烷代谢途径密切相关, 受环境因子、病原菌和激素等因素的调节。其中, 病原菌、臭氧、植物激素(如水杨酸、脱落酸、MeJA)等均能诱导 RA 的合成^[20]。例如, MeJA 处理显著提高了藿香细胞培养物的 RA 合成^[21]。

苔藓植物包括苔类、藓类和角苔类这 3 个分支, 是现存最早的陆生植物。苯丙烷代谢途径是与植物的登陆进程密切相关的标志性途径, 其产生的苯丙烷类物质在植物适应陆生环境过程中具有重要的作用^[2]。芽胞角苔(*Anthoceros angustus*)属于角苔植物, 其叶状体含有丰富的羟基肉桂酸衍生物, 包括 RA 及其糖苷衍生物等。2020 年, Zhang 等^[22]发布了芽胞角苔的高质量全基因组, 为深入解析芽胞角苔适应陆生环境的调控机制提供了基础。由于 *PAL* 在苯丙烷代谢途径中具有关键作用, 本研究从芽胞角苔叶状体分离到 2 个 *PAL* 基因, 对其响应植物激素的表达特征及体外酶促反应特征进行了探究, 以期为进一步研究 *PAL* 在苯丙烷代谢途径中的调控作用及应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料、菌株和质粒

植物材料为芽胞角苔的配子体, 其为叶状体, 边缘呈锯齿状, 由中国科学院植物研究所陈之端教授惠赠。采用 KnopII 液体培养基浇灌灭菌的蛭石作为培养基质, 剪刀分段扦插至基质进行培养, 每个培养盒种植 16 株。培养条件: 光照强度 $30 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 温度 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, 湿度 40%, 光照周期 16 h 光照/8 h 黑暗。

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)感受态细胞和

pEASY-Blunt 克隆载体均购自北京全式金生物技术股份有限公司。*pET32a(+)*质粒为本实验室保存。引物合成和测序委托北京擎科生物科技股份有限公司完成, 本研究所用引物见表 1。

1.1.2 主要试剂

植物总 RNA 提取试剂盒、ReScript™II RT All-in-One Mix 反转录试剂盒购自诺贝莱生物科技有限公司; 2×Primer STAR Max 高保真 DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 和色谱纯甲醇、乙腈、乙酸均为 Thermo Fisher 产品; ClonExpress® II 无缝克隆试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DNA、蛋白分子量 Marker、qRT-PCR DNA 聚合酶、2×M5 HiPer SYBR Premix *EsTaq* 购自北京聚合美生物科技有限公司; MeJA 为 Sigma-Aldrich 产品; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Ni Bestarose FF 购自浙江博格隆生物技术有限公司; 超滤浓缩管为 Millipore 产品; 化合物标准品 L-Phe、反式肉桂酸、迷迭香酸等均购自北京索莱宝科技有限公司; 其他常用生化试剂购自国药试剂。

1.2 方法

1.2.1 芽胞角苔 PAL 基因的克隆

取温室培养的角苔叶状体, 用液氮研磨成粉末, 取约 0.1 g 用于总 RNA 提取。采用反转录试剂盒合成 cDNA 作为模板。通过查询角苔基因组和转录组(SRA 数据库编号: SRR9662965), 以拟南芥 PAL 蛋白序列为参考, 筛选到 2 个注释为苯丙氨酸解氨酶(PAL)的序列, 命名为 *AanPAL1*、*AanPAL2*。设计扩增全长的引物 *AanPALs-F/R* (表 1), 利用高保真酶, 以角苔 cDNA 为模板扩增全长。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测、切胶、试剂盒纯化后, 连接至 *pEASY-Blunt* 载体, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 经阳性筛选及菌液 PCR 检测后, 送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。

1.2.2 芽胞角苔 PAL 基因生物信息学预测分析

采用 DNAMAN 软件进行同源蛋白序列比对; 采用 MEGA 7.1 软件以邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树; 采用 SWISS-MODEL 在线工具预测蛋白质的三级结构, 以 PyMOL 软件对预测的结构进行可视化分析; 采用 ExPasy 在线工具 ProtParam 和 ProtScale 预测蛋白质的理化性质和疏水性/亲水性。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>AanPAL1-F</i>	ATGGTGGCCAACAAGCGCGTC
<i>AanPAL1-R</i>	TCATTGCTCGAACGGGCCAG
<i>AanPAL1-petF</i>	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGGTGGCCAACAAGCGC
<i>AanPAL1-petR</i>	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTCATTGCTCGAACGGGCC
<i>AanPAL1-RTF</i>	AAGCTTGGACTACGGCTTCA
<i>AanPAL1-RTR</i>	TCCTCCAGATGCCTCAAATC
<i>AanPAL2-F</i>	ATGATGAGCAATAAGCGGGTG
<i>AanPAL2-R</i>	TCAACCAGTAAAGGGGCCAG
<i>AanPAL2-petF</i>	GCCATGGCTGATATCGGATCCATGATGAGCAATAAGCGGGTG
<i>AanPAL2-petR</i>	GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTCAACCAGTAAAGGGGCCAG
<i>AanPAL2-RTF</i>	ACTTACCTGGTGGCCTTGTG
<i>AanPAL2-RTR</i>	CAACTCCTTCTCGAGAACC
<i>AaEF1A-F</i>	AGGAGCAAACCTTACCAGC
<i>AaEF1A-R</i>	ACCTGCATCTCCGTTCTTCA

1.2.3 AanPALs 实时荧光定量表达分析

芽胞角苔在温室培养8周,采用500 $\mu\text{mol/L}$ 的MeJA喷洒处理,以喷洒溶剂的芽胞角苔作为对照;处理后在0、6、12、24和48 h取样。提取对照组和处理组植物材料的总RNA,反转录合成cDNA,并进行实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR),每个样品设3个重复。根据AanPAL1、AanPAL2基因的编码区序列(coding sequence, CDS),用Primer 3的Web版设计引物(AanPALs-RTF/R),以芽胞角苔延伸因子AanEF1A (GenBank 登录号: PP033753)作为内参基因。使用Bio-Rad CFX96实时荧光定量PCR仪进行扩增检测,根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析基因的相对表达量,采用GraphPad Prism 5.01软件分析显著性并绘图。

1.2.4 芽胞角苔中迷迭香酸含量测定

参考Saltas等^[23]提取RA的方法,提取芽胞角苔的RA。取温室培养的芽胞角苔约0.1 g,样品经过液氮速冻、使用组织研磨机研磨成粉末,加入0.5 mL 80%甲醇,超声浴中孵育30 min,3 000 $\times g$ 离心10 min后,取出0.4 mL上清液获得RA提取物;上清液使用50%甲醇/50%水(含0.01% H_3PO_4)按照1:10稀释后用0.22 μm 有机系滤膜过滤。迷迭香酸的检测根据Soriano等^[24]的方法加以改进,采用HPLC进行定性定量测定。使用YMC-Triart C18反式色谱柱(5 μm , 4.6 mm \times 250 mm),流动相为50%的甲醇溶液和50%水(含0.01% H_3PO_4)溶液,流速设置为1.0 mL/min,检测波长设为333 nm。利用RA标准品制作标准曲线定量RA的含量。按照1.2.3的方法,采用MeJA处理芽胞角苔后,在不同时间点称取植物样品,提取并测定RA的含量。每个时间点设置3个生物学重复。

1.2.5 芽胞角苔PAL重组蛋白的表达和纯化

采用重组连接的方式构建表达载体。设计引物AanPALs-petF/R,扩增得到AanPALs基因全长片段,表达载体pET32a(+)用BamH I和Xho I双酶切,无缝重组连接,转化大肠杆菌

DH5 α ,挑选阳性克隆并测序验证。将测序正确的重组质粒分别转入大肠杆菌BL21(DE3)进行诱导表达。挑取单菌落接种到10 mL含有100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素的LB培养基中,在37 $^\circ\text{C}$ 、220 r/min的摇床中培养过夜,次日按照1:100的比例转接,继续培养至 OD_{600} 值为0.6左右,添加0.5 mmol/L的IPTG,18 $^\circ\text{C}$ 诱导16 h。诱导结束后,4 000 $\times g$ 离心15 min收集菌体。

以下蛋白纯化步骤均在低温条件下进行。菌体用结合缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 500 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑和5%甘油(体积比)]重悬,采用高压均质机(功率1 500 bar)破菌,将细胞裂解液以10 000 $\times g$ 离心30 min获得上清液。采用Ni Bestarose FF填料进行蛋白亲和层析纯化,其中洗涤缓冲液、洗脱缓冲液分别在结合缓冲液中添加50 mmol/L 咪唑和250 mmol/L 咪唑。最后使用超滤浓缩管换液脱盐,获得不含咪唑的蛋白溶液。将细胞破碎后的上清和纯化后的蛋白使用SDS-PAGE检测蛋白表达情况及纯度。

1.2.6 芽胞角苔PAL重组蛋白的酶活性测定

PAL蛋白的酶活检测根据Yu等^[25]的方法加以改进,标准反应体系包括:1 mL的硼酸缓冲液(50 mmol/L 硼酸,1 mmol/L EDTA,5 mmol/L β -巯基乙醇,pH 8.5)、0.5 mL的20 mmol/L L-Phe底物(溶解于硼酸缓冲液),纯化的重组蛋白5–10 μg 。将上述各个组分混合均匀后,35 $^\circ\text{C}$ 温浴30 min后,加入150 μL 25%的三氯乙酸终止反应。反应液14 000 $\times g$ 离心10 min,取上清液,用紫外分光光度计测定290 nm处的紫外吸收值,通过标准曲线确定生成 t -CA的量计算PAL酶活。以纯化的含有空载体菌株表达的蛋白作为空白对照。苯丙氨酸解氨酶活力单位(U)定义为:1 min转化L-Phe生成1 μmol t -CA所需的酶量。另外,为探究AanPAL重组蛋白能否催化L-酪氨酸(L-tyrosine, L-Tyr)生成对香豆酸,按照标准反应体系进行酶活反应,乙酸乙酯萃取

2次后,合并上清,吹干后用甲醇溶解,HPLC检测是否有对香豆酸生成。

在 pH 8.5 的条件下,测定 40–60 °C 范围内苯丙氨酸解氨酶的酶活,将测得的最高酶活作为 100%,比较其他温度下的相对酶活,确定最适反应温度。然后在最适温度下,测定 pH 7.0–10.5 范围内重组蛋白的酶活,确定酶催化的最适 pH。在 50 mmol/L 硼酸缓冲液(pH 8.0)中,加入不同浓度的 L-Phe (终浓度 0.005–6.400 mmol/L) 底物、1 μg 重组蛋白,50 °C 反应 10 min,测其初始反应速率。利用 GraphPad Prism 5.01 软件,根据 Michaelis-Menten 方程进行非线性回归分析,获得 K_m 和 V_{max} 值,并计算出 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 值。以上反应均进行 3 组平行实验。

1.2.7 芽胞角苔 PAL 重组蛋白稳定性分析

将纯化的芽胞角苔 PAL 重组蛋白酶液用 pH 8.0 的硼酸溶液稀释至 0.1 μg/μL,分别置梯度温度(40–70 °C,间隔 10 °C,以 4 °C 作为对照)孵育 2 h;同时将 PAL 重组蛋白采用不同梯度 pH 缓冲液稀释(7.0–11.0,间隔 1.0),置于 4 °C 处理 2 h;然后分别在最适反应条件(50 °C, pH 8.0)下按标准反应体系测定酶活,以分析 PAL 的热稳定性和 pH 稳定性。

1.2.8 全细胞催化

参考黄雅文等^[26]的实验方法,用含有 *AanPAL* 基因的重组大肠杆菌 BL21(DE3)作为全细胞催化剂生产 *t*-CA。诱导、收集菌体后,用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)清洗菌体 2 次,置于–20 °C 冰箱冷冻 24 h;接着,用 50 mmol/L 硼酸缓冲液(pH 8.0)洗涤、重悬菌体,调节 OD_{600} 值为 1,加入 1 g/L (6.054 mmol/L) L-Phe;将上述混合物置于 37 °C、220 r/min 的摇床中孵育,在 1、2、4、6、8、10 h 取样,以上反应进行 3 组平行实验。取 20 μL 样品,加入 980 μL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),充分混匀,0.22 μm 有机滤膜过滤后,HPLC 检测 *t*-CA 的产量。计算转化率:转化率(%)=生成反式肉桂酸浓度/初始 L-Phe 浓度×100%。

2 结果与分析

2.1 芽胞角苔 PAL 基因的克隆和序列分析

以芽胞角苔 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获得 *AanPAL1*、*AanPAL2* 的全长 CDS 序列(GenBank 登录号分别为 PQ818233 和 PQ818234)。*AanPAL1* 基因 CDS 长度为 2 268 bp,编码 755 个氨基酸;*AanPAL2* 基因 CDS 长度为 2 262 bp,编码 753 个氨基酸;*AanPAL1* 和 *AanPAL2* 的氨基酸序列相似度为 81%。根据 ProtParam 软件预测结果,*AanPAL1* 和 *AanPAL2* 的蛋白质理论分子量分别为 82.22 kDa 和 81.42 kDa;理论等电点分别为 5.82、5.89,均为酸性蛋白;总亲水性平均值为分别为–0.133、–0.067,表明两者均为亲水性蛋白;不稳定系数分别为 32.83、34.22,表明 2 个蛋白均为稳定蛋白。

通过 SOPMA 预测发现,*AanPAL1* 和 *AanPAL2* 蛋白的二级结构主要由 α-螺旋(分别为 54.17%、54.18%)和无规则卷曲(39.60%、38.91%)组成,另外一种结构元件延伸 β 链仅分别占比 6.23%和 8.91%。选择欧芹(*Petroselinum crispum*) PAL 的晶体结构(PDB 登录号:1W27)作为模板,使用 SWISS-MODEL 在线工具对芽胞角苔 PAL 蛋白进行同源建模,得到 *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 蛋白的三级结构模型(图 1)。以 *AanPAL1* 的结构模型为例:*AanPAL1* 的结构模型呈现出类似 PcPAL 的 X-射线衍射结构,为同源四聚体结构,覆盖 62–754 位氨基酸序列,每个单体包括 3 个主要结构域:MIO 结构域(62–298 位残基)、核心结构域(299–560 和 688–754 位残基)和屏蔽结构域(561–687 位残基)。

2.2 芽胞角苔 PAL 蛋白的多重序列比对与进化树分析

使用 DNAMAN 软件,将芽胞角苔 PAL 蛋白序列和钝鳞紫背苔、小立碗藓、欧芹和玉米的 PAL 序列进行多重比较,结果显示,*AanPALs* 与这些 PALs 的相似度在 60%–70%之间;N-端序

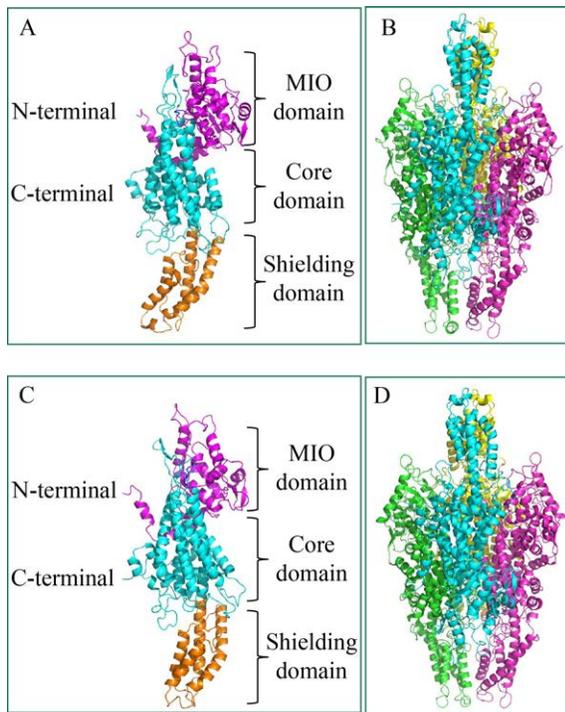


图 1 芽胞角苔 PAL 蛋白三维结构预测

Figure 1 Deduced protein structures of AanPAL1 and AanPAL2. A, C: Monomer of AanPAL1 and AanPAL2. The chains corresponding to the three domains are labeled with different colors. The MIO domain with magenta, core domain with cyan and the shielding domain with orange. The MIO residues are colored as blue. B, D: The three-dimensional structures of AanPAL1 and AanPAL2, the four monomers are shown in different colors. The structural models were built using the SWISS MODEL server^[27], and visualized with PyMOL software (DeLano Scientific).

列变异程度较高, AanPALs 具有较长的 N-端。这些序列在功能区域非常保守, 酶活性中心位点序列高度一致, 均为 RGTITASGDLVPLSY [LI]AG (AanPAL1 的 234–251 位, 其中 ASG 代表催化三联体氨基酸, [LI]表示此位点为 L 或 I), 都包含形成 MIO 基团的 Ala-Ser-Gly 催化三联体; 与酶活性和稳定性相关的氨基酸残基, 包括 Y147、N296、Q384、Y387、R390、N420、F436 和 E520、N523、Q524 等都非常保守; 另外, 据报道, 决定底物特异性的 F¹⁷⁴L¹⁷⁵ 残基在

PAL 单功能酶中是保守的, 而在 PATL 双功能酶中变为 HL (例如 ZmPAL)^[12,28] (图 2)。此外, Thr549 (按照 PcPAL 序列编号)参与翻译后磷酸化并对 PAL 活性有一定调控作用, 在高等植物的 PALs 中这个氨基酸比较保守, 例如欧芹和玉米的 PAL 蛋白中都是苏氨酸(threonine, Thr), 但是在苔藓植物钝鳞紫背苔和小立碗藓的 PAL 蛋白中被 Phe 取代, 在芽胞角苔中被丝氨酸 (serine, Ser)取代。这也从一定程度上提示在不同物种中 PAL 的活性调控存在不同之处^[12]。

从 GenBank 数据库中收集 22 条完整的 PAL 氨基酸序列, 分别来自被子植物、裸子植物、苔藓植物、蕨类植物等, 并包括 1 条来自轮藻克氏藻(*Klebsormidium nitens*)的 PAL 序列作为进化树的外群。应用 MEGA 7.1 软件构建系统进化树, 结果显示, PALs 序列聚成 2 大分支, 第 1 个分支包括被子植物, 又进一步分为单子叶植物和双子叶植物分支; 第 2 个分支包括裸子植物、苔藓植物及蕨类植物的序列, 其中, 裸子植物的序列单独聚成 1 个分支, 而苔藓植物与蕨类植物的 PALs 聚类, 角苔植物的 AanPAL1、AanPAL2 与藓类植物的 PALs 距离更近(图 3)。

2.3 芽胞角苔 PAL 基因响应 MeJA 的表达分析

利用 qRT-PCR 技术, 以角苔 *AaEF1A* 作为内参, 对 AanPALs 在 MeJA 喷洒后的表达变化进行分析(图 4)。结果表明, AanPAL1 和 AanPAL2 基因的表达都受到 MeJA 的诱导。其中, AanPAL1 基因的表达呈现先升高后降低的趋势, 在 6 h 其表达水平约为 0 h 的 4 倍, 在 12 h 达到最高值, 约为 0 h 的 8 倍; 然后在 24 h 约为 0 h 的 4 倍, 在 48 h 降低至 0 h 的 2 倍。AanPAL2 的表达在 6 h 时先下降到最低, 约为 0 h 的 30%; 之后开始迅速上升, 在 24 h 时达到最高表达量, 约为 0 h 的 8 倍, 之后开始下降, 到 48 h 时约为 0 h 的 6 倍。

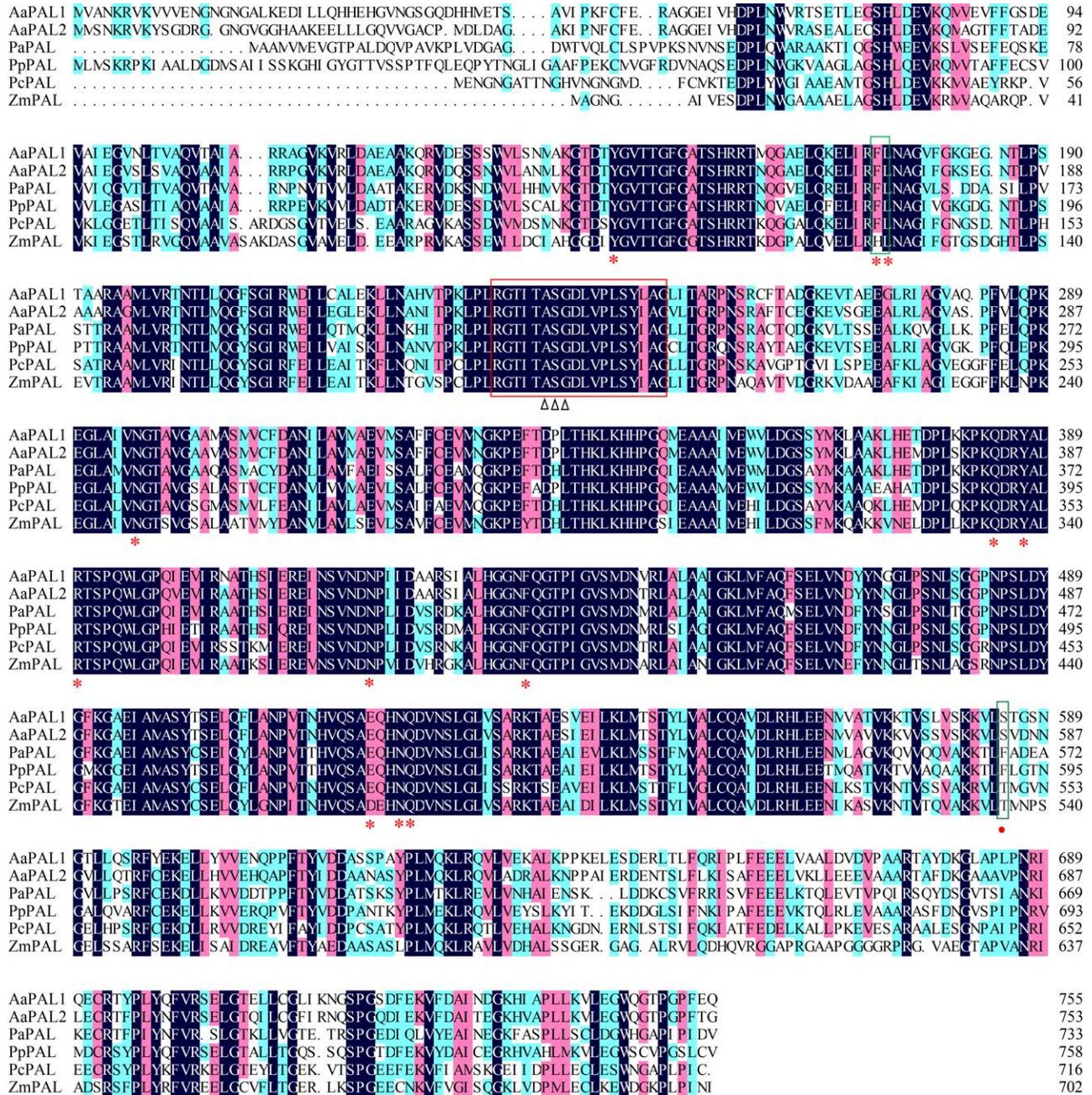


图 2 芽胞角苔与其他植物 PAL 氨基酸序列的多重比较

Figure 2 Sequence alignment of *Anthoceros angustus* PALs with other characterized plant PALs. PaPAL: *Plagiochasma appendiculatum* PAL (GenBank accession number: AIU99853); PpPAL: *Physcomitrium patens* PAL (GenBank accession number: XP_024394373); PcPAL: *Petroselinum crispum* PAL (GenBank accession number: CAA68938); ZmPAL: *Zea mays* PAL (GenBank accession number: AAL40137). Black background shows amino acid identities, red and blue shading show different amino acid similarity. The conserved catalytic domain is marked with a red square and the ASG triplet is indicated by triangles (Δ). The other conserved catalytic residues are marked with asterisk (*). The phosphorylation site identified in *P. crispum* PAL is indicated with a red circle (●).

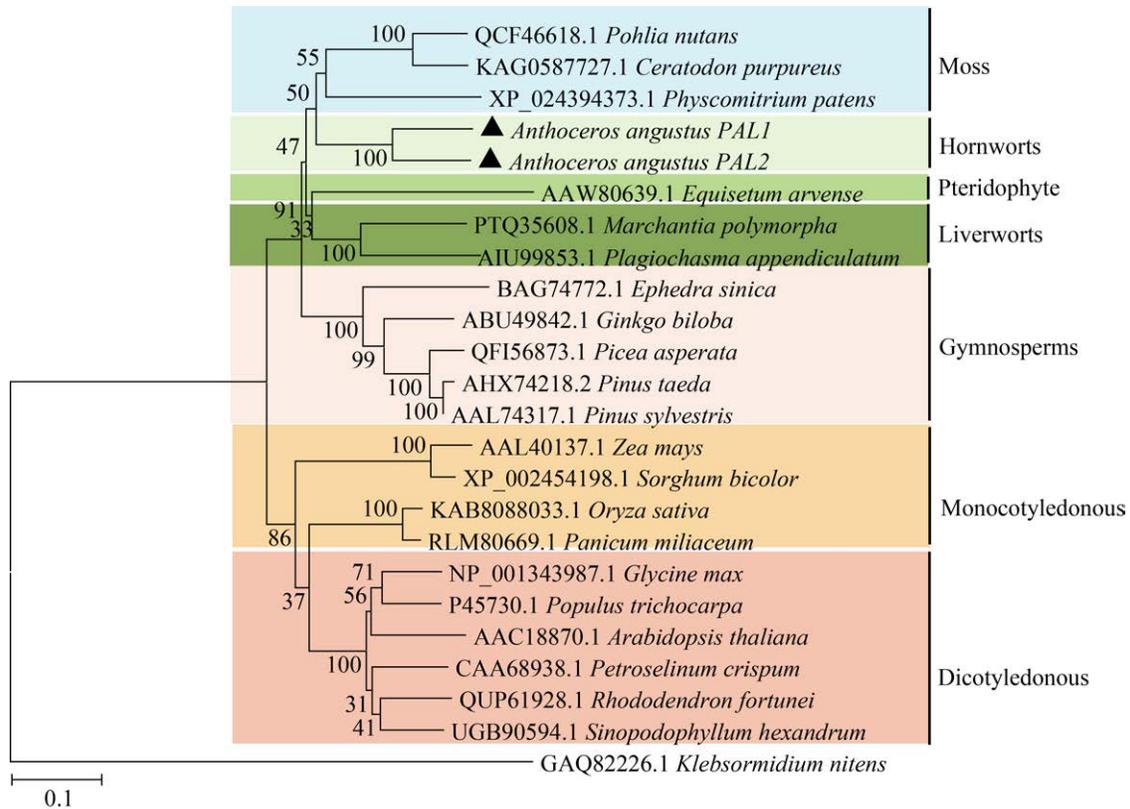


图 3 芽胞角苔与其他植物 PALs 的进化树

Figure 3 The phylogenetic tree of *A. angustus* PALs and PAL from other plants. The tree was constructed using the MEGA 7.1 program using the neighbor-joining method. The *A. angustus* PALs are indicated with a triangle (▲). The bootstrap values (%) are shown at the branch points.

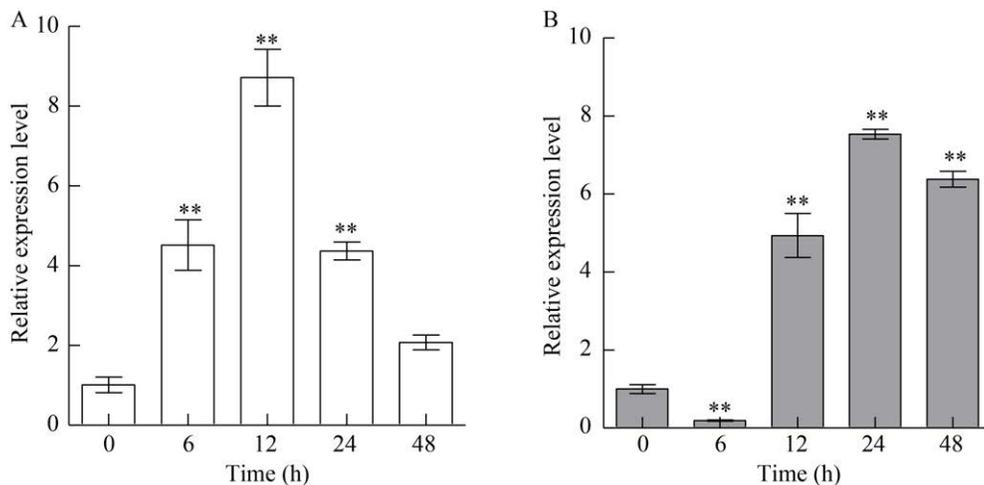


图 4 MeJA 处理对 *AanPAL1* (A) 和 *AanPAL2* (B) 基因表达水平的影响

Figure 4 Expression pattern of *AanPAL1* (A) and *AanPAL2* (B) at different time points (0, 6, 12, 24 and 48 h) relative to corresponding controls in response to MeJA. The expression value at 0 h was set to 1.0. The results are shown as the mean of three replicates with standard deviations. The asterisk represents statistically significant differences compared to the corresponding controls (**: $P < 0.01$).

2.4 芽胞角苔叶状体中迷迭香酸含量测定分析

提取芽胞角苔叶状体的 RA, 利用 HPLC 检测分析。结果如图 5 所示, 通过与 RA 标准品保留时间、紫外吸收光谱比较, 确定芽胞角苔 RA 的分析条件。同时, 根据绘制的 RA 标准曲线, 计算芽胞角苔中 RA 的含量。生长至 8 周的芽胞角苔每 g 鲜重约含 RA 0.88 mg。采用 MeJA 处理后, 芽胞角苔中 RA 的积累增加, 在处理 24 h 达到最高值, 约为 1.10 mg/g 鲜重, 但在 48 h 后 RA 含量略有降低, 约为 0.85 mg/g (图 5E)。

2.5 芽胞角苔 PAL 重组蛋白的表达和纯化结果

将角苔 AanPAL1 和 AanPAL2 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达, 采用 pET32a(+) 作为表达载体, 融合表达 Trx-S-6×His 标签蛋白, 表达的重组蛋白分子量分别为 99.93 kDa 和 99.13 kDa。

利用亲和层析纯化得到重组蛋白, 并通过 SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达情况(图 6)。结果显示, AanPAL1 和 AanPAL2 在大肠杆菌中可溶性表达, 且条带大小接近 100 kDa, 与理论分子量一致。纯化后的样品中, 重组蛋白约占 90% 以上, 说明纯化效果较好。

2.6 芽胞角苔 PAL 重组蛋白的活性鉴定及酶学性质分析

将纯化的 PAL 重组蛋白用于酶活性检测, 通过测定 290 nm 处吸收值变化对酶活性进行定量检测。另外, 体外酶活检测结果表明, AanPAL 重组蛋白不能催化 L-Tyr 生成对香豆酸(图 7)。为探究 AanPAL 重组蛋白催化反应的最适条件, 在 40–60 °C 范围内间隔 5 °C 选取 5 个温度测定酶活, 并在 pH 7.0–10.5 范围内设置 7 个点, 分别测定重组蛋白的酶活。结果显示, AanPAL1 和 AanPAL2 的酶活性随温度变化的趋势类似: 温度在 40–50 °C 之间时, 两者活性

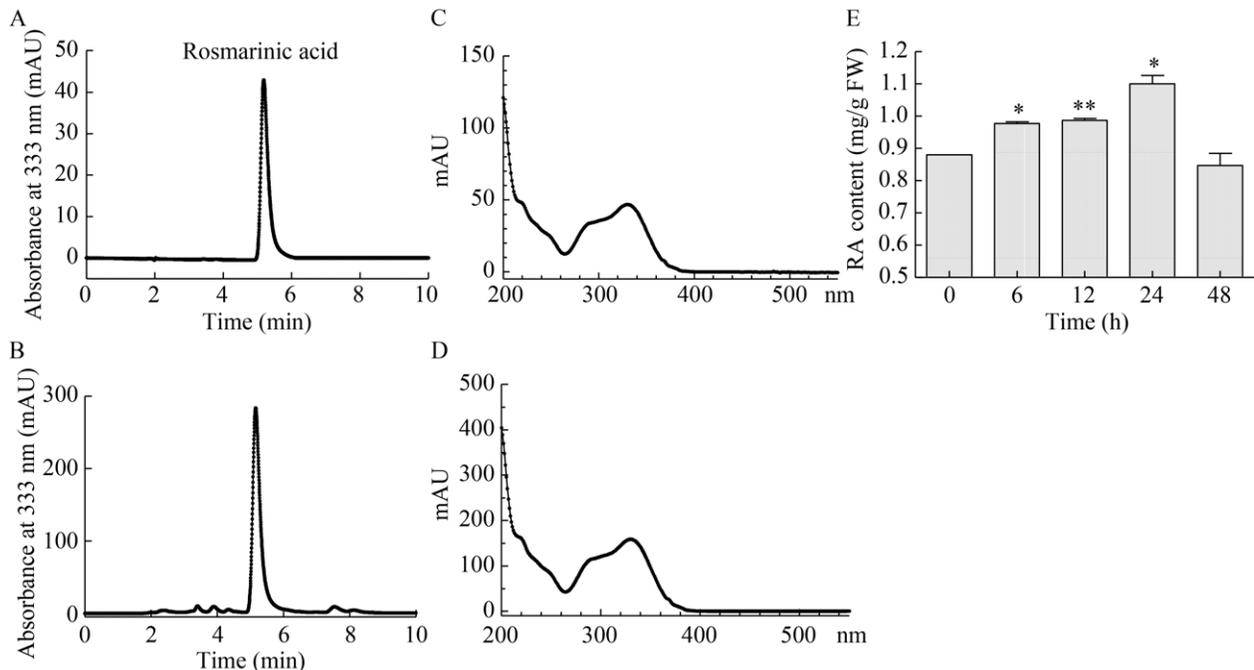


图 5 芽胞角苔迷迭香酸的检测

Figure 5 Analysis of rosmarinic acid (RA) in *A. angustus*. Representative HPLC-UV chromatograms of RA standard (A) and 2-month-old *A. angustus* thallus crude extracts (B). The UV absorption spectrums of RA standard (C) and RA in the crude extracts (D). E: RA content analysis after MeJA treatment. The RA content is expressed as milligrams per gram of fresh weight (mg/g FW). Error bars represent the mean±SD of three biological replicates. Significance is indicated by ** ($P<0.01$) and * ($P<0.05$).

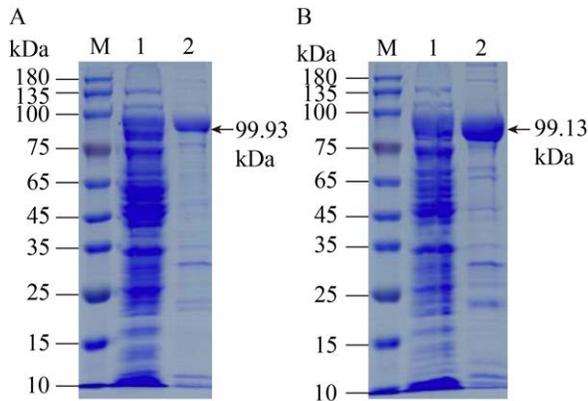


图 6 SDS-PAGE 分析 AanPAL 重组蛋白的表达及纯化

Figure 6 SDS-PAGE analysis of expression and purification of AanPAL proteins. A: AanPAL1; B: AanPAL2. M: Protein molecular weight standards; Lane 1: Soluble fractions; Lane 2: Purified recombinant AanPAL protein.

逐渐升高;在 50 °C 达到最高值;温度高于 50 °C 时,酶活性逐渐降低(图 8A、8B)。AanPAL1 和 AanPAL2 的酶活性在 pH 为 7.0–10.5 范围内先迅速升高,后逐渐下降;当 pH 为 8.0 时,催化活性最高,即为最适 pH(图 8C、8D)。

分别在最适反应温度和 pH 条件下,测定 AanPAL1 和 AanPAL2 对 L-Phe 的酶动力学参数(图 8E、8F)。AanPAL1 对 L-Phe 的 K_m 值(0.062 mmol/L)小于 AanPAL2 对 L-Phe 的 K_m 值(0.198 mmol/L),即 AanPAL1 对苯丙氨酸具有较高的亲和力。AanPAL1 和 AanPAL2 的 k_{cat} 值分别是 4.35 s^{-1} 和 14.48 s^{-1} , AanPAL2 催化速率

高于 AanPAL1(表 2)。同时,在最适反应条件下, AanPAL1 和 AanPAL2 蛋白的比酶活分别为 2.61 U/mg 和 8.76 U/mg。

2.7 芽胞角苔 PAL 重组蛋白在不同温度和 pH 条件下的稳定性分析结果

将 AanPAL1 和 AanPAL2 重组蛋白分别用不同温度和 pH 处理 2 h,并在最适反应条件下测定酶活。结果发现,在设置的温度处理条件下,2 种重组蛋白的酶活随温度升高而降低,其中 40 °C 时稳定性最好,分别为对照组(4 °C)酶活的 86%、89%,在 50 °C 时分别保持对照组的 50% 以上,而 60 °C 时下降至各自对照组的 11% 和 36%,到 70 °C 时均低于检测值(图 9A、9B)。

在设置的 pH 处理范围内,pH 8.0 时酶活达到各自相对酶活的最大值,此时两者的稳定性最好,这与两者最适反应温度一致。pH 7.0 时仅为各自最大值的 24%、30%;pH 9.0 时两者酶活约为各自最大值的 80%、70% 以上,在 pH 10.0 时下降至 60%、55%,到 pH 11.0 时均下降至 30% 以下(图 9C、9D)。以上结果说明, AanPALs 蛋白对高温较为敏感,其中 AanPAL2 蛋白热稳定性优于 AanPAL1;而 2 种蛋白在 pH 8.0–10.0 范围内稳定性较好,对碱性环境偏好度较高。

2.8 芽胞角苔 PAL 全细胞催化结果分析

从以上研究结果可以看出, AanPAL1 和 AanPAL2 的催化底物特异性高,而且酶活力较高,特别是 AanPAL2 蛋白具有较高的酶活力(比

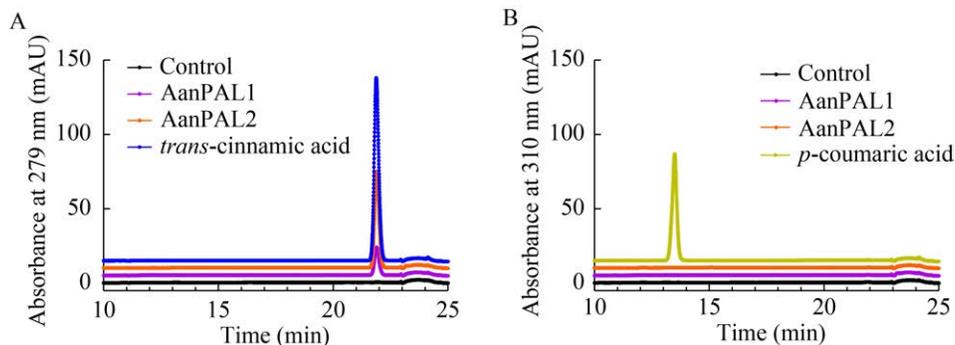


图 7 AanPAL 重组蛋白体外酶活反应

Figure 7 Enzyme activities of recombinant AanPAL proteins *in vitro*. Representative HPLC chromatograms of *in vitro* PAL assays with L-Phe (A) and L-Tyr (B).

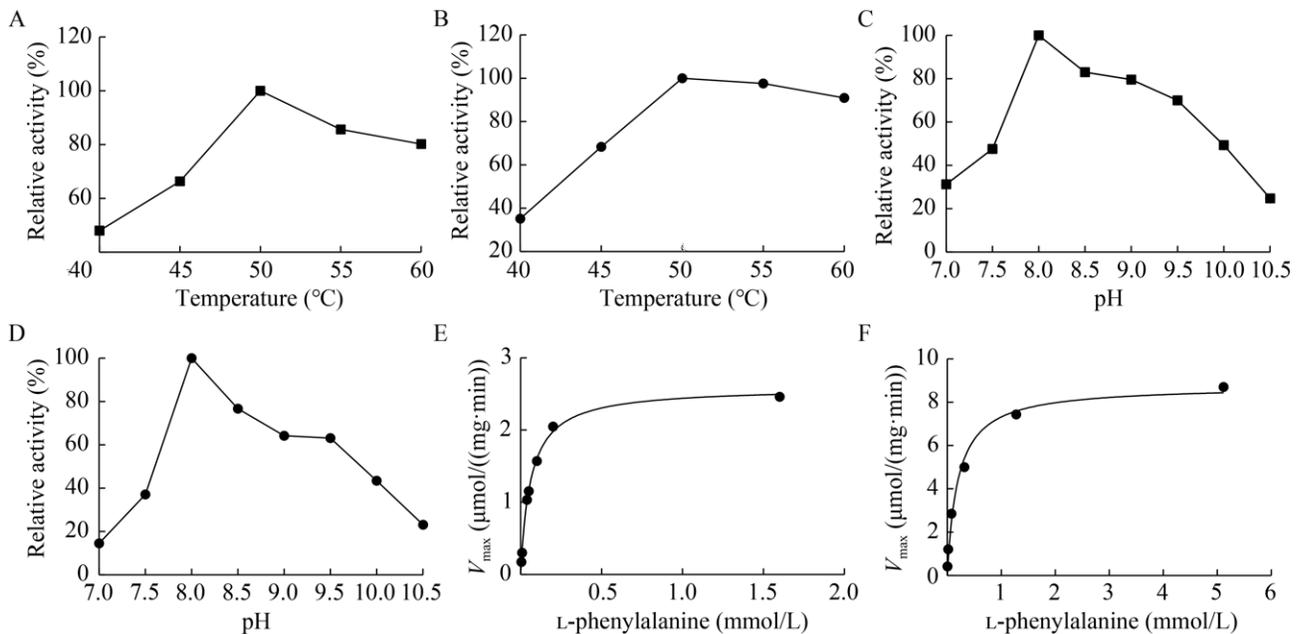


图8 AanPAL 催化反应的性质

Figure 8 The catalytic properties of the recombinant AanPAL proteins. Effects of temperature (A, B) and pH (C, D) on recombinant AanPAL1 and AanPAL2. E, F: Michaelis-Menten curves for the velocity of AanPAL1 and AanPAL2. The results are presented as the mean of three replicates with standard deviations.

表2 不同植物 PALs 的酶学动力学参数比较

Table 2 The catalytic parameters of PALs in different plants

Plant	Enzyme	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))	Specific activity (U/mg)	References
<i>Anthoceros angustus</i>	AanPAL1	0.062	4.35	72.56	2.61	This study
	AanPAL2	0.198	14.48	73.27	8.76	
<i>Anthoceros agrestis</i>	AaPAL1	0.039	0.35	9.05	0.25	[6]
	AaPAL2	0.018	0.29	16.01	0.20	
<i>Schisandra chinensis</i>	ScPAL1	0.174	0.85	4.87	0.66	[29]
	ScPAL2	0.253	0.67	2.65	0.52	
	ScPAL3	0.212	0.99	4.65	0.77	
<i>Bambusa oldhamii</i>	BoPAL1	0.230	16.29	70.83	—	[30]
	BoPAL1	0.993	21.30	21.45	—	
	BoPAL4	2.072	16.32	7.88	—	
<i>Camellia sinensis</i>	CsPALc	0.128	0.32	2.48	0.25	[31]
	CsPALd	0.084	0.17	3.15	0.13	
<i>Pinellia ternate</i>	PtPAL	0.890	6.56	7.37	3.84	[32]

The specific activity was carried out at 50 °C, pH 8.0. Enzyme activity unit (U) was defined as the amount of enzyme required to convert L-Phe to 1 μ mol *t*-CA in 1 min.

酶活 8.76 U/mg)。接下来, 利用 AanPAL 重组蛋白表达菌株进行全细胞催化的探究, 探求更方便高效的体外催化体系, 为应用于高效生产 *t*-CA 提供有效的候选酶基因和催化条件。根据酶反应性质的测定结果, 选用 pH 8.0 的反应缓冲液将大肠杆菌的浓度调至 OD_{600} 为 1, 选择较

温和的反应温度(37 °C)进行反应。结果发现, 含有 AanPAL2 的重组大肠杆菌在反应 1 h 后, 反式肉桂酸产率即可达到 60%, 反应 10 h 后, 能将 1 g/L 的 L-Phe 完全转化为反式肉桂酸; AanPAL1 重组大肠杆菌反应速度较缓慢, 反应 10 h 后反式肉桂酸产率仅为 38%左右(图 10)。

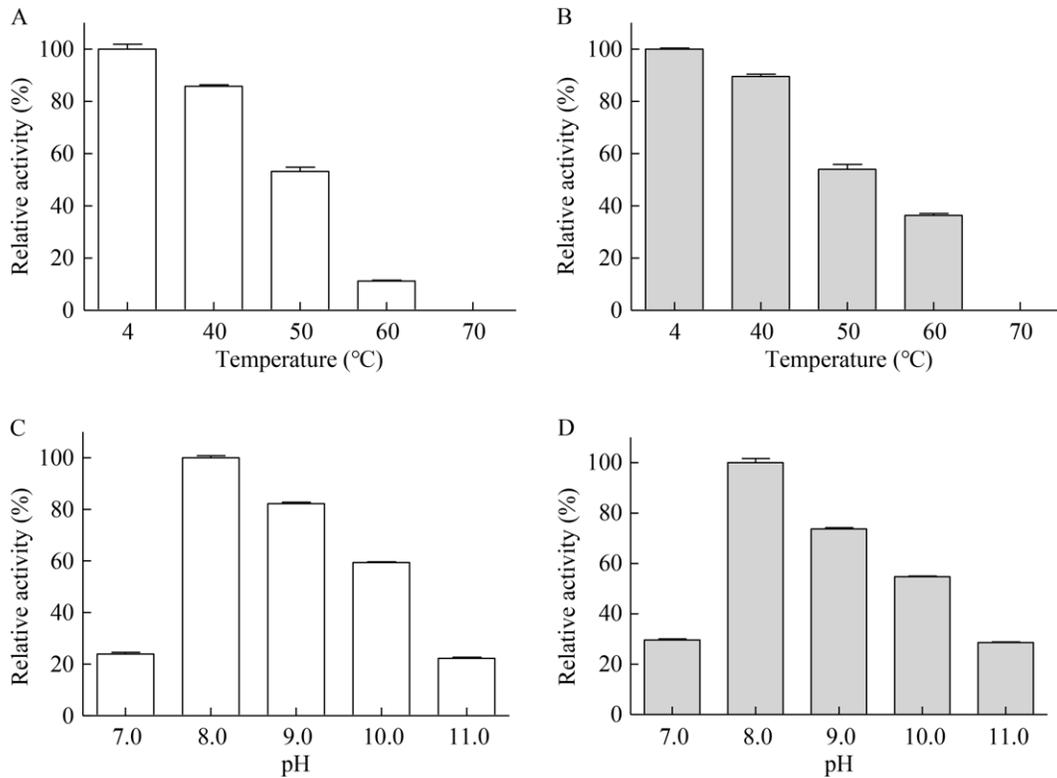


图9 AanPAL 重组蛋白的温度和 pH 稳定性分析

Figure 9 The stability of AanPAL1 and AanPAL2. A, B: Thermostability was determined by the changes of AanPAL1 and AanPAL2 activity with temperature. C, D: pH-stability was evaluated by the changes of AanPAL1 and AanPAL2 activity with pH. The data are presented as the means of three replicates with standard deviations.

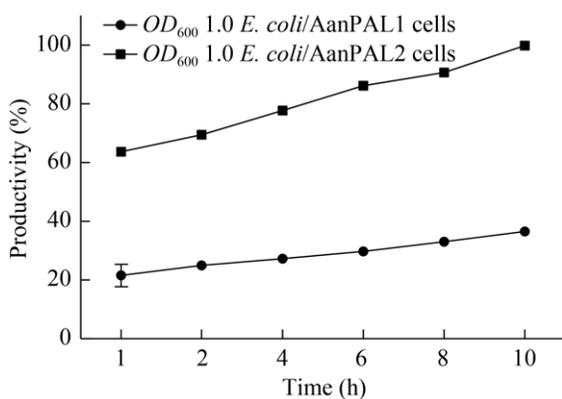


图10 重组 AanPAL1 和 AanPAL2 大肠杆菌全细胞催化

Figure 10 Whole-cell catalysis of recombinant *Escherichia coli* with AanPAL1 and AanPAL2 at different reaction time points.

3 讨论与结论

苯丙烷代谢途径伴随植物登陆过程起源,产生的一系列酚类物质在植物适应陆生环境过程中发挥着重要作用,例如抵御 UV 辐射、抗氧化、增加植物机械支撑、适应干旱环境及响应生物与非生物胁迫等^[2]。植物苯丙烷合成途径上的关键酶基因(包括 *PAL*、*C4H*、*4CL* 等重要酶基因)的表达受到非生物与生物胁迫因子的调控,进而影响植物苯丙烷类物质的合成^[2]。其中, *PAL* 基因作为苯丙烷途径的入口酶基因,其表达水平受多种刺激因子的调控,表现出不同的表达模式。例如,外源添加 MeJA 导致西蓝花菜 *PAL* 基因的表达升高,并且酚类物质积累显著提高^[33];用 SA 处理猕猴桃后,增强了

PAL 基因的表达和活性并导致其体内酚含量增加,帮助其减少冷害的胁迫^[34]。另一方面,Sang等^[35]利用脱落酸(abscisic acid, ABA)处理冬枣,抑制了 *PAL* 的活性,从而使冬枣的软化和红化变慢,延缓了冬枣的成熟和衰老,用以保证冬枣的贮藏品质。迷迭香酸是苯丙烷代谢途径产生的酚类物质, *PAL* 作为 RA 合成的关键酶,通过对 *PAL* 基因的表达调控,对 RA 的合成和积累产生调控作用。例如, Kim 等^[21]用 MeJA 处理藿香细胞培养物后, *PAL* 基因的表达水平迅速增加,在 6 h 时达到对照组的 8 倍,而且 RA 的含量也显著提高;另外 ABA 处理导致柠檬香蜂草中的迷迭香酸含量显著提高^[36]。本研究采用 MeJA 喷洒芽胞角苔后, *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 基因的表达量显著增加,而且芽胞角苔叶状体中 RA 的含量也增加(图 5)。

近些年,基因组学和转录组学发展迅速,对苔藓植物的 *PAL* 基因的研究也逐步增多。苔藓植物的 3 个类群中都已证明有 *PAL* 基因的存在,例如小立碗藓、地钱和田园角苔等^[6,10-11]。本研究发现,芽胞角苔的 *PAL* 基因与已报道的其他物种 *PAL* 基因具有较高的同源性,具有 *PAL* 蛋白的核心结构域和保守残基^[12,28],基于同源建模获得的蛋白三维结构与欧芹的 *PAL* 晶体结构类似,而且具有 *PAL* 家族成员的结构特征,表明 *PAL* 蛋白在进化时非常保守。另外,系统进化分析发现,不同来源的 *PAL* 的进化关系大致符合分类学关系,角苔的 *PAL* 与苔藓植物聚在一个分支,与小立碗藓的 *PAL* 亲缘关系最近。

大多数植物的 *PAL* 是单功能酶,仅能催化 L-Phe 生成 *t*-CA,少数植物具有 *PTAL* 双功能酶,如田园角苔、玉米等的 *PAL* 能高效催化 L-Phe 和 L-Tyr 的脱氨基反应^[4,6]。本研究中芽胞角苔的 *PAL* 蛋白能够高效地催化 L-Phe 生成 *t*-CA,但不能催化 L-Tyr 生成对香豆酸。*AanPAL1* 和 *AanPAL2* 的最适催化温度为 50 °C,与其他植物的 *PAL* 蛋白接近。例如,五味子的 *ScPAL3*^[29]、绿竹的 *BoPAL4*^[30]、山茶的 6 个 *PAL*

蛋白^[31]等的最适反应温度都是 50 °C,而低于玉米^[4]、半夏^[32]、钝鳞紫背苔^[25]与田园角苔^[6]等植物的最适温度(55–60 °C)。另外, *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 蛋白的热稳定性较差(图 9A、9B),在最适反应温度 50 °C 处理后,酶活性下降至原来的 50%。因此,在应用过程中,需充分考虑酶的催化效率与稳定性的平衡,设置合适的反应条件。此外, *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 催化反应的最适 pH 为 8.0。而且, *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 蛋白的 pH 稳定性较好,在 pH 8.0–10.0 的范围内,能保持接近 60% 的酶活力。酶动力学分析表明, *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 的 K_m 分别为 0.062、0.198 mmol/L,对底物 L-Phe 的亲合力较高,高于已报道的半夏 *PtPAL* 和绿竹 *BoPAL4*,但低于田园角苔的 *AaPAL1* 和 *AaPAL2*。从 k_{cat}/K_m 来看, *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 对 L-Phe 的催化效率较高,显著高于田园角苔、半夏、五味子(*ScPAL1*、*ScPAL2* 和 *ScPAL3*)等植物的 *PAL*,与绿竹的 *BoPAL1* 的催化效率接近。而且, *AanPAL1* 和 *AanPAL2* 具有较高的比酶活,高于大多数已报道的 *PAL* 活性(表 2)。通过全细胞催化的方法对 2 个蛋白的催化效率进行了进一步探究,其中, *AanPAL2* 重组菌株表现出较高的催化效率, *t*-CA 的产率接近 100%。因此,本研究获得的芽胞角苔 *PAL* 蛋白是具有高底物特异性、较高催化效率的苯丙氨酸解氨酶,可以作为生物合成 *t*-CA 及其衍生物的理想候选酶基因。

致谢

感谢中国科学院植物研究所陈之端教授惠赠芽胞角苔组培材料。

作者贡献声明

于海娜: 方案设计、实验操作、数据管理、稿件润色修改、经费支持; 莫键: 方案设计、实验操作、数据管理、初稿写作; 杨佳艺: 数据管理、实验操作; 秦晓春: 数据管理、监督指导、经费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] BARROS J, DIXON RA. Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases[J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(1): 66-79.
- [2] DONG NQ, LIN HX. Contribution of phenylpropanoid metabolism to plant development and plant-environment interactions[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(1): 180-209.
- [3] BARROS J, SERRANI-YARCE JC, CHEN F, BAXTER D, VENABLES BJ, DIXON RA. Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis[J]. Nature Plants, 2016, 2(6): 16050.
- [4] RÖSLER J, KREKEL F, AMRHEIN N, SCHMID J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity[J]. Plant Physiology, 1997, 113(1): 175-179.
- [5] GAO ZM, WANG XC, PENG ZH, ZHENG B, LIU Q. Characterization and primary functional analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Phyllostachys edulis*[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(7): 1345-1356.
- [6] PEZESHKI S, WARMBIER I, BUSCH T, BAUERBACH E, SZÖVENYI P, PETERSEN M. The first step into phenolic metabolism in the hornwort *Anthoceros agrestis*: molecular and biochemical characterization of two phenylalanine ammonia-lyase isoforms[J]. Planta, 2022, 256(2): 33.
- [7] KOUKOL J, CONN EE. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1961, 236: 2692-2698.
- [8] COCHRANE FC, DAVIN LB, LEWIS NG. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms[J]. Phytochemistry, 2004, 65(11): 1557-1564.
- [9] GAO XG, HU YP, XU ZB, PENG DQ, GUO QR. Expression profiling of the phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene family in *Ginkgo biloba* L[J]. Plant Signaling & Behavior, 2023, 18(1): 2271807.
- [10] YOSHIKAWA M, LUO WF, TANAKA G, KONISHI Y, MATSUURA H, TAKAHASHI K. Wounding stress induces phenylalanine ammonia lyases, leading to the accumulation of phenylpropanoids in the model liverwort *Marchantia polymorpha*[J]. Phytochemistry, 2018, 155: 30-36.
- [11] SCHWARZE CM, PETERSEN M. Phenylalanine ammonia-lyases and 4-coumaric acid coenzyme A ligases in *Chara braunii*, *Marchantia polymorpha*, and *Physcomitrium patens* as extant model organisms for plant terrestrialization[J]. The Plant Journal, 2024, 119(6): 2797-2815.
- [12] RITTER H, SCHULZ GE. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase[J]. The Plant Cell, 2004, 16(12): 3426-3436.
- [13] BOROS K, MOISÁ ME, NAGY CL, PAIZS C, TOŞA MI, BENCZE LC. Robust, site-specifically immobilized phenylalanine ammonia-lyases for the enantioselective ammonia addition of cinnamic acids[J]. Catalysis Science & Technology, 2021, 11(16): 5553-5563.
- [14] KAWATRA A, DHANKHAR R, MOHANTY A, GULATI P. Biomedical applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: current status and future prospects[J]. Biochimie, 2020, 177: 142-152.
- [15] ALBOGAMI A, NAGUIB DM. Agricultural wastes: a new promising source for phenylalanine ammonia-lyase as anticancer agent[J]. 3 Biotech, 2024, 14(1): 22.
- [16] 贺字典, 高增贵, 庄敬华, 陈捷, 郑俊强, 唐树戈. 玉米丝黑穗病菌对寄主防御相关酶活性的影响[J]. 玉米科学, 2006, 14(2): 150-151, 155.
HE ZD, GAO ZG, ZHUANG JH, CHEN J, ZHENG JQ, TANG SG. Effect of maize head smut pathology (*Sphacelotheca reiliana*) on the major defensive enzymes of host[J]. Journal of Maize Sciences, 2006, 14(2): 150-151, 155 (in Chinese).
- [17] BI HH, ZENG RS, SU LM, AN M, LUO SM. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate[J]. Journal of Chemical Ecology, 2007, 33(5): 1089-1103.
- [18] PETERSEN M, ABDULLAH Y, BENNER J, EBERLE D, GEHLEN K, HÜCHERIG S, JANIÁK V, KIM KH, SANDER M, WEITZEL C, WOLTERS S. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis[J]. Phytochemistry, 2009, 70(15/16): 1663-1679.
- [19] TAKEDA R, HASEGAWA J, SHINOZAKI M. The first isolation of lignans, megacerotonic acid and anthocerotonic acid, from non-vascular plants, *Anthocerotae* (hornworts)[J]. Tetrahedron Letters, 1990, 31(29): 4159-4162.
- [20] TRÓCSÁNYI E, GYÖRGY Z, ZÁMBORINÉ-NÉMETH É. New insights into rosmarinic acid biosynthesis based on molecular studies[J]. Current Plant Biology, 2020, 23: 100162.
- [21] KIM YB, KIM JK, UDDIN MR, XU H, PARK WT, TUAN PA, LI XH, CHUNG E, LEE JH, PARK SU. Metabolomics analysis and biosynthesis of rosmarinic acid in *Agastache rugosa* Kuntze treated with methyl jasmonate[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64199.
- [22] ZHANG J, FU XX, LI RQ, ZHAO X, LIU Y, LI MH, ZWAENEPOEL A, MA H, GOFFINET B, GUAN YL, XUE JY, LIAO YY, WANG QF, WANG QH, WANG JY, ZHANG GQ, WANG ZW, JIA Y, WANG MZ, DONG SS, et al. The hornwort genome and early land plant evolution[J]. Nature Plants, 2020, 6(2): 107-118.
- [23] SALTAS D, PAPPAS CS, DAFERERA D, TARANTILIS PA, POLISSIOU MG. Direct determination of rosmarinic acid in *Lamiaceae* herbs using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) and chemometrics[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(13): 3235-3241.
- [24] SORIANO G, DEL-CASTILLO-ALONSO MÁ, MONFORTE L, NÚÑEZ-OLIVERA E, MARTÍNEZ-ABAIGAR J. First data on the effects of ultraviolet radiation on phenolic compounds in the model

- hornwort *Anthoceros agrestis*[J]. Cryptogamic, Bryologie, 2018, 39(2): 201-211.
- [25] YU HN, LIU XY, GAO S, HAN XJ, CHENG AX, LOU HX. Molecular cloning and functional characterization of a phenylalanine ammonia-lyase from liverwort *Plagiochasma appendiculatum*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2014, 117(2): 265-277.
- [26] 黄雅文, 江小龙, 陈五九, 张桂敏, 王钦宏. 高活性酪氨酸解氨酶的特征及其在对香豆酸生物合成中应用[J]. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4553-4566.
- HUANG YW, JIANG XL, CHEN WJ, ZHANG GM, WANG QH. Characterization of highly active tyrosine ammonia lyase and its application in biosynthesis of *p*-coumaric acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(12): 4553-4566 (in Chinese).
- [27] WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER FT, de BEER TAP, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [28] LOUIE GV, BOWMAN ME, MOFFITT MC, BAIGA TJ, MOORE BS, NOEL JP. Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases[J]. Chemistry & Biology, 2006, 13(12): 1327-1338.
- [29] FAN SP, CHEN W, WEI JC, GAO XX, YANG YC, WANG AH, HU GS, JIA JM. Molecular cloning and characterization of three phenylalanine ammonia-lyase genes from *Schisandra chinensis*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2022, 20(7): 527-536.
- [30] HSIEH CY, HUANG YH, YEH HH, HONG PY, HSIAO CJ, HSIEH LS. Phenylalanine, tyrosine, and DOPA are bona fide substrates for *Bambusa oldhamii* BoPAL4[J]. Catalysts, 2021, 11(11): 1263.
- [31] WU YL, WANG WZ, LI YZ, DAI XL, MA GL, XING DW, ZHU MQ, GAO LP, XIA T. Six phenylalanine ammonia-lyases from *Camellia sinensis*: evolution, expression, and kinetics[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2017, 118: 413-421.
- [32] 何潇, 刘兴, 辛正琦, 谢海艳, 辛余凤, 吴能表. 半夏 PtPAL 基因的克隆、表达与酶动力学分析[J]. 作物学报, 2021, 47(10): 1941-1952.
- HE X, LIU X, XIN ZQ, XIE HY, XIN YF, WU NB. Molecular cloning, expression, and enzyme kinetic analysis of a phenylalanine ammonia-lyase gene in *Pinellia ternate*[J]. Acta Agronomica Sinica, 2021, 47(10): 1941-1952 (in Chinese).
- [33] GUAN YG, HU WZ, JIANG AL, XU YP, SA R, FENG K, ZHAO MR, YU JX, JI YR, HOU MY, YANG XZ. Effect of methyl jasmonate on phenolic accumulation in wounded broccoli[J]. Molecules, 2019, 24(19): 3537.
- [34] NIU YX, YE LX, WANG Y, SHI YB, LIU YJ, LUO AW. Transcriptome analysis reveals salicylic acid treatment mitigates chilling injury in kiwifruit by enhancing phenolic synthesis and regulating phytohormone signaling pathways[J]. Postharvest Biology and Technology, 2023, 205: 112483.
- [35] SANG YY, YANG WT, ZHANG WD, GUO MR, CHENG SB, YU XH, CHEN GG. Abscisic acid enhances storability of winter jujube by regulating cell wall and phenylpropane metabolisms during cold storage[J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2023, 14: 100859.
- [36] MOUSAVI SM, SHABANI L. Rosmarinic acid accumulation in *Melissa officinalis* shoot cultures is mediated by ABA[J]. Biologia Plantarum, 2019, 63: 418-424.