林业科学研究 2013,26(5):542～547
Forest Research

文章编号:1001-1498(2013)05-0542-06

毛白杨4-香豆酸:辅酶A连接酶(4CL3)的酶学特征研究

饶国栋[1,2], 张永卓[2], 魏弘宜[2], 蒋湘宁[2], 陆 海[2], 张建国[1*]

(1. 国家林业局林木培育重点实验室,中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091; 2. 北京林业大学,北京 100083)

摘要:为了进一步研究杨树4*CL*基因,以毛白杨为材料克隆到一个新的毛白杨4*CL3*基因。生物信息学分析结果显示:该基因和其他4*CL*基因一样含有4*CL*基因家族2个保守框Box I和Box II。将4*CL3*基因连接至原核表达载体pQE30,表达纯化后测定其蛋白的比活力,结果显示:4*CL3*基因对不同底物表现出了不同的催化效率。对该基因的最适温度和最适pH值测定后发现:4CL蛋白的最适温度为40 ℃,最适pH值为8.5,且在pH=9.0时有60%的活力。采用HPLC-MS的方法,分析了4CL3蛋白对混合底物的催化情况,结果显示:在混合底物下,4CL3蛋白对4-香豆酸、阿魏酸和肉桂酸都表现较高的活力,而对芥子酸和咖啡酸没有活力。

关键词:4-香豆酸:辅酶A连接酶;HPLC-MS; 原核表达;毛白杨

中图分类号:S718.46 **文献标识码**:A

Enzymatic Characteristics of 4-coumarate: coenzyme A Ligase (4CL3) from *Populus tomentosa*

RAO Guo-dong[1,2], *ZHANG Yong-zhuo*[2], *WEI Hong-yi*[2], *JIANG Xiang-ning*[2], *LU Hai*[2], *ZHANG Jian-guo*[1]

(1. Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China; 2. Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: A new 4*CL* gene from *Populus tomentosa* Carr. was cloned and named as 4*CL3*. Bioinformatics method was used to analysis the protein sequence of this 4*CL3* gene aligning with two other 4CL proteins. The authors found the conserved sequence Box I and Box II exist in the 4*CL* gene family. Prokaryotic expression way was used to research the enzyme function of this 4CL3 protein, the result showed that the 4CL protein had different enzymatic activity towards the different substrate. The 4CL3 protein had the biggest enzymatic activity at the temperature of 40 ℃, and it had the biggest enzymatic activity at pH 8.5, this enzyme has the ability of resisting alkaline environment. The 5 substrates of 4CL were mixed and the method of HPLC-MS was used to survey the consumption of the substrate after putting 4CL enzyme to start the reaction. It was found that besides sinapic there was no consumption of caffeic either.

Key words: 4CL; HPLC-MS; prokaryotic expression; *Populus tomentosa*

木质素含植物干质量的30%以上,在植物生长发育过程中起着至关重要的作用。它能加固细胞壁的机械强度[1],改善畜草的营养成分而有利于食草类牲畜消化和吸收,并在抵御病虫类侵害中起着重要作用[2]。4-香豆酸:辅酶A连接酶(4CL)为木质素合成途径中的限速酶,它催化羟基肉桂酸及其衍

收稿日期: 2012-03-19
基金项目: 北京市教育委员会科学研究与研究生培养共建项目-学科建设-森林培育(20120618)
作者简介: 饶国栋(1983—),男,助理研究员,博士. E-mail:raoguodong02@163.com.
* 通讯作者:男,研究员,博士,博士生导师. E-mail:zhangjg@caf.ac.cn.

生物到相应的硫酯化合物转化的反应[3]。由于 4*CL* 基因在木质素合成途径中的关键作用,现阶段对 4CL 的研究已经成为国内外的热点。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana* Heynh.)[4-5]、大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)[6]、杂交杨(*Populus trichocarpa* × *Populus deltoides*)[7-8]、桉树(*Eucalyptus robusta* smith)[9]、棉花(*Gossypium arboretum* linn.)[10]、烟草(*Nicotiana tabacum* linn.)[11]、番茄(*Lycopersicon esculentum* mill.)[12]、慈竹(*Neosinocalamus affinis* ken.)[13]、象草(*Pennisetum purpureum* Schumach)[14]、水稻(*Oryza sativa* L.)[15-17]等双子叶和单子叶植物中,都分离鉴定了不同功能的 4*CL* 基因;而在所研究的物种中,4*CL* 基因家族的大小以及成员间的功能差异尚不完全明确。

近 15 年来,4*CL* 基因调控木本植物木质素的合成成为研究的热点。之前的研究主要集中在 4*CL*1 上,而随着研究的深入,发现 4*CL* 基因是以基因家族的形式调控木质素、类黄酮等次生代谢物质的形成[18-19]。Costa 等[5]在拟南芥中已经发现有活性的 4*CL* 有 4 个,李来根等[15]在水稻中发现了 5 个功能上存在分化的 4*CL* 基因,Lindermayr 等[6,20]在大豆中也发现了 4 个有活性的 4*CL* 基因。现在,已经分离鉴定的杨树 4*CL* 基因只有 2 个,这 2 个基因序列的同源性很高,但功能各异[21]。杨树作为高等植物中的乔木,其维管系统发达,木质素含量高,而 4CL 为木质素合成中的关键酶。不难推测,杨树 4*CL* 基因家族的大小应该不会小于拟南芥、大豆、水稻等 1 年生草本和单子叶植物。木本植物,如杨树中应该还存在其他的除 4*CL*1 和 4*CL*2 的基因。

毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)作为我国特有的乡土树种,是重要的绿化和造纸用材树种。为了进一步研究毛白杨 4*CL* 基因在木质素合成以及其他代谢途径中的作用,对毛白杨 4*CL* 其他基因进行了挖掘,最终得到了一个异于之前所有报道的 4*CL* 基因,将该基因命名为毛白杨 4*CL*3 基因,并对该基因的酶学特征进行了研究。

1　材料与方法

1.1　材料、主要试剂、仪器

741 毛白杨采自北京林业大学苗圃,组培苗由北京林业大学生物学院提供;M-MLV 反转录试剂盒购买自 Promega 公司;植物总 RNA 提取试剂盒、TRIzol Rragent 购买于 invitrogen 公司;PVPP、氯仿、异丙醇、无水乙醇和 DEPC 为国产分析纯;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购买自 TIANGEN 公司;pMD18-T、pQE30 载体试剂盒、Ni^{2+}-NTA 试剂盒、*E. cori*、*M*15(pREP4)试剂盒购买自 QIAGEN 公司。4-香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、肉桂酸、芥子酸购自 Sigma 公司。Agilent 公司的 HP1100 高效液相色谱仪,色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱;热电公司的 HPLC-MS,真空干燥器,微量取样器,玻璃毛细管。

1.2　方法

1.2.1　*毛白杨 4CL3 基因的获得与鉴定*　本实验所用材料为毛白杨的全株组培苗。采用 Trizol 法提取植物总 RNA。利用 M-MLV 反转录 mRNA 获得杨树总 cDNA 第一链,操作方法按照说明书常规操作。同时,利用电子克隆和毛果杨基因组数据库[7]比对分析,设计引物(上游引物:5-CCAGAGAAACAATGGAGGCGG-3;下游引物:5-CATGTCCTACAATACCCTGAGC-3)PCR 克隆了杨树 4*CL* 基因全长 cDNA 并测序。将上述序列经过生物信息学分析和数据库比对最终鉴定该序列为尚未发表的新的毛白杨 4*CL* 基因。

1.2.2　*毛白杨 4CL3 基因的原核表达与蛋白纯化*　采用 pQE30 原核表达载体和所克隆得到的 4*CL* 全长 cDNA 相连接的方法构建重组原核表达载体,通过阳离子亲和层析的方法纯化原核表达蛋白。具体操作如下:首先将凝胶回收的 PCR 产物与克隆载体 pMD18-T 相连,并通过转化感受态细胞(*JM*109)、蓝白斑筛选、测序获得含 4*CL* 全长基因的克隆载体;其次,通过设计酶切位点 *Pst* I 和 *BamH* I 分别双酶切 pQE30 原核表达载体和含 4*CL*3 基因的克隆载体,电泳回收片段,并利用 T4 连接酶将 4*CL*3 基因和原核表达载体 pQE30 相连构建重组 4*CL*3 原核表达载体,同时转化感受态细胞 *M*15 而获得含重组毛白杨 4*CL*3 基因的原核表达菌株;最后,利用 IPTG 诱导原核表达菌株的方法将 4CL3 蛋白原核表达,并通过阳离子亲和层析的方法纯化表达蛋白(操作方法见 Ni^{2+}-NTA 试剂盒说明书)。

1.2.3　*毛白杨 4CL3 酶活性分析*　4CL 是以肉桂酸、咖啡酸、香豆酸、芥子酸和阿魏酸这 5 种酚酸为底物,按 Knobloch 法[22]测定 4CL 酶活性,略有修改。酶反应体系含有 2.5 mmol · L^{-1} ATP、0.2 mmol · L^{-1} CoA 和 5 mmol · L^{-1} Mg^{2+},0.2 mol · L^{-1} Tris-HCl,一定量的底物,pH 值 7.8,加入适量的 4CL1 蛋白。空白对照为变性的酶,其他同上。pH 值 7.8,

反应温度均为室温;而羟基肉桂酸辅酶 A 的吸收波长[23]见表1。

表1 羟基肉桂酸 CoA 衍生物的紫外吸收数据

CoA 衍生物	波长/nm	消光系数/(L · mol^{-1} · cm^{-1})
4-香豆酸 CoA	333	21 000
阿魏酸 CoA	345	19 000
咖啡酸 CoA	346	18 000
肉桂酸 CoA	311	22 000
芥子酸 CoA	352	20 000

1.2.4 毛白杨4CL3酶的最适温度和最适pH值的测定 对毛白杨4CL酶的最适反应温度和最适反应pH值进行了测定。最适温度操作:温度设定为20、25、30、35、37、40、45、50、55、60、65 ℃。酶反应体系为2.5 mmol · L^{-1} ATP,0.2 mmol · L^{-1} CoA,5 mmol · L^{-1} Mg^{2+},0.2 mol · L^{-1} Tris-HCl,一定量的底物(4-香豆酸),pH值7.8,加入适量的4CL3蛋白开始反应。在反应开始前将除酶以外的反应缓冲液、底物、CoA和ATP都放入水浴锅中预热(或冰浴中预冷)。测定 OD_{333} 的变化,确定酶的最适反应温度。最适pH值测定操作:用盐酸调节反应缓冲液的pH值分别为6.5、7.0、7.5、7.7、8.0、8.2、8.5、8.8、9.0。酶反应体系:2.5 mmol · L^{-1} ATP,0.2 mmol · L^{-1} CoA,5 mmol · L^{-1} Mg^{2+},0.2 mol · L^{-1} Tris-HCl,一定量的底物(4-香豆酸)加入适量的4CL3蛋白开始反应。测定 OD_{333} 的变化,确定酶的最适反应pH值。

1.2.5 毛白杨4CL3蛋白对混合底物的反应 本实验采用HPLC-MS的方法测定4CL3对混合底物的反应。分别配制1 mmol的物种底物(芥子酸、阿魏酸、咖啡酸、肉桂酸、4-香豆酸),加入至1.5 mL的离心管,于旋转真空干燥器上干燥至干粉,注意避光;然后用色谱纯的甲醇50 μL溶解,再依次加入适量的ATP、CoA、酶反应缓冲液,最后加入相同量的酶,37 ℃反应15 min。

色谱条件:Agilent公司的HP1100高效液相色谱仪,色谱柱为ZORBAX Eclipse XDB-C18柱,规格为4.6 mm×250 mm,5 μm,柱温为30 ℃,检测波长为302 nm,谱带宽度为16 nm,参比波长为460 nm,参比谱带宽度为100 nm。二极管阵列检测器记录光谱范围为190～100 nm,自动进样器进样每次为10 μL。洗脱条件为:V(甲醇):V(1%醋酸)分别为3∶97,0 min;36∶64,30 min;45∶55,50 min;2∶28,60 min;100∶0,61min;100∶0,71 min;3∶97,72 min。流速为1 mL · min^{-1}。热电公司的HPLC-MS条件为:样品分离柱为ZORBAX Eclipse XDB-C18(150 mm×2.1 mm,3.5 μm(Agilent Technologic),其他条件同上述。

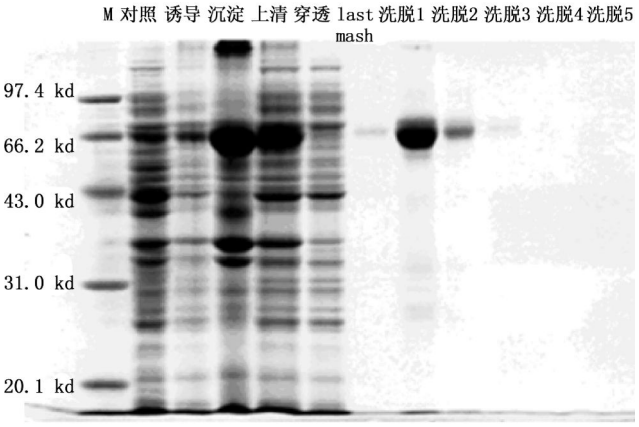
2 结果与分析

2.1 毛白杨4*CL3*基因的鉴定

将获得的毛白杨全长cDNA序列通过软件(BioEdit)翻译成蛋白,并以翻译蛋白和杨树4CL1和4CL2进行比对[24]。图2所示:所克隆基因*Pto*4*CL3*和杨树的4*CL*1、4*CL*2的同源性较高(在80%以上),而Box I和Box II为4*CL*基因的2个保守序列[23],这2个保守序列为4*CL*基因所特有,也是鉴定4*CL*基因的重要依据,所克隆的4*CL3*基因含有这2个保守序列,所以初步断定该基因为毛白杨4*CL*基因,之后的酶活性分析也证明该基因确为4*CL*基因。

2.2 毛白杨4CL3蛋白的比活力测定

为研究毛白杨的比活力,首先将重组毛白杨蛋白进行了原核表达并纯化,图1为4CL3蛋白表达纯化的SDS-PAGE电泳图。对照为未诱导表达的原始表达菌株,上清和沉淀分别为菌液富集、破碎、离心后的上清液和沉淀,而洗脱则为利用阳离子亲和层析方法纯化蛋白的洗脱液。从图1可以看出:上清泳道的蛋白表达量大,经富集可以作为活性测定的酶蛋白;而经蛋白纯度分析软件Quantity One测定后,纯化泳道4CL3蛋白的总量占总蛋白的95%以上,符合酶活性分析纯度。



M:蛋白标准;对照:未诱导菌株总蛋白;诱导:诱导菌株总蛋白;沉淀:诱导菌株中不容于buffer的蛋白;上清:诱导菌株中溶于buffer的蛋白;穿透:纯化过程中的穿透液;lastwash:最后洗完杂蛋白的收集液;洗脱1～洗脱5:分别收集5次洗脱

图1 毛白杨4CL3的原核表达(SDS-PAGE电泳和纯化)

将上述纯化得到的 4CL3 蛋白于 30% 甘油中保存,取适量的酶测定其比活力。表 2 所示:香豆酸的比活力最大,其次是阿魏酸,香豆酸和阿魏酸的比活力是咖啡酸和肉桂酸 2 倍以上,咖啡酸和肉桂酸的比活力相对较小,芥子酸没有活性。

表 2　毛白杨 4CL3 蛋白的比活性和底物偏好性

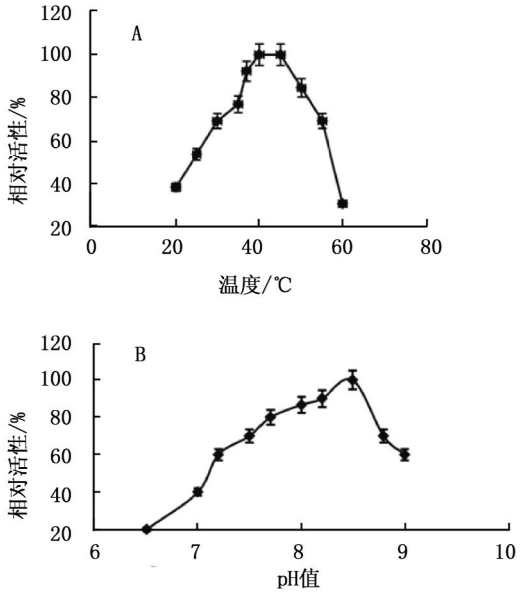
项目	肉桂酸	香豆酸	阿魏酸	咖啡酸	芥子酸
比活力/($nkat \cdot mg^{-1}$)	38.6 ±0.0	83.3 ±0.1	73.7 ±0.1	30.6 ±0.2	0
底物减少量/mmol	123 ±29.4	177 ±1.9	149 ±2.2	0 ±0.0	0

```
4CL1   --------------------------MNPQEEFIFRSKLPDIYIPKNLPLHSYVLENLSNHSS
4CL2   MMSVATVEPPKPELSPPQNQNAPSSHETDHIFRSKLPDITISNHLPLHAYCEENLSDFSD
4CL3   --------------------MEAVNDQAQEFIFRSKLPDIHIPNHLPLHTYCFENLSRFKD
                                 . ********* *  .****.*  ****

4CL1   KPCLINGANGDVYTYADVELTARRVASGLNKIGIQQGDVIMLFLPSSPEFVLAFLGASHR
4CL2   RPCLISGSTGKTYSFAETHLISRKVAAGLSNLGIKKGDVIMTLLQNCPEFVFSFMGASMI
4CL3   NPCLINGPTGEIHTYAEVELTSRKVASGLSKLGIKQGDVILLLLQNSPEFVFAFLGASII
        **** * .*   ..*.  * .*.**.**  .**..****.  *  .**** .*.***

4CL1   GAIITAANPFSTPAELAKHAKASRAKLLITQACYYEKVKD------FARESD-VKVMCVD
4CL2   GAVTTTANPFYTQSEIFKQFSASRAKLIITQSQYVNKLGDSDCHENNQKPGEDFIVITTD
4CL3   GAISTTANPFYTPAEVAKQATASKAKLIITQAVYAEKVQQ------FVKENDHVKIVTVD
       **. *.**** * .*. *.  **.***.***. *  *.          .  .   ....*
                                          Box Ⅰ
4CL1   SAPDGCLHFSELTQADENEAPQVDISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQ
4CL2   DPPENCRHFNVLVEANESEMPTISILPDDPVALPFSSGTTGLPKGVILTHKSLITSVAQQ
4CL3   SPPENYLHFSELTNSDEDDIPAVEINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQ
         *..  **  *  . * . * . * *** ****.***********.**** *.******

4CL1   VDGDNPNLYFHSEDVILCVLPMFHIYALNSIMLCGLRVGASILIMPKFEIGSLLGLIEKY
4CL2   VDGEIPNLYLKQDDVVLCVLPLFHIFSLNSVLLCSLRAGSAVLLMQKFEIGSLLELIQKH
4CL3   VDGENPNLYFHEKDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGSAILLMQKFEIVTLMELVQKY
       ***. **** .  **.*****.***..***..** ** *...*.* **** .*. *..*

4CL1   KVSIAPVVPPVMMSIAKSPDLDKHDLSSLRMIKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGY
4CL2   NVSVAAVVPPLVLALAKNPLVANFDLSSIRVVLSGAAPLGKELEDALRSRVPQAILGQGY
4CL3   KVTIAPFVPPVVLAVAKCPVVDKYDLSSIRTVMSGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGY
        *..*  ***.....** * .   ****.* . ** **.******..*..  *.* *****
                                                          Box Ⅱ
4CL1   GMTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQFGEICIRGD
4CL2   GMTEAGPVLSMCLAFSKQPFPTKSGSCGTVVRNAELKVIDPETGGSLGYNQFGEICIRGS
4CL3   GMTEAGPVLSMCLAFAREPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGRSLPRNQAGEICIRGS
       *********.*****...**  * *.*********.*..**.** **  ** *******

4CL1   QIMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFIVDRLKELIKYKGFQVAPAELE
4CL2   QIMKGYLNDAEATANTIDVEGWLHTGDIGYVDDDDEIFIVDRVKEIIKFKGFQVPPAELE
4CL3   QIMKGYLNDPEATERTIDNDGWLHTGDIGYIDDDDELFIVDRLKELIKYKGFQVAPAELE
       ********* ***  *** .**********.*****.*****.**.**.***** *****

4CL1   ALLIAHPEISDAAVVGLKDEDAGEVPVAFVVKSEKSQATEDEIKQYISKQVIFYKRIKRV
4CL2   ALLVNHPSIADAAVVPQKDEVAGEVPVAFVVRSDDLDLSEEAVKDYIAKQVVFYKKLHKV
4CL3   AMLIAHPDISDCAVVPMKDEAAGEVPVAFVVRANGSKITEDEIKQYISKQVVFYKRISRV
       *.*. ** *.*.***  *** **********..     .*. .* **.***.***.. .*

4CL1   FFIEAIPKAPSGKILRKNLKEKLAGI----
4CL2   FFVHSIPKSASGKILRKDLRAKLATSTTMS
4CL3   FFTESIPKAPSGKILRKDLRARLATGDLPH
       **  .***. ******* *. .**
```

图 2　毛白杨 4*CL* 基因与家族成员的蛋白比对(BOX Ⅰ和 BOX Ⅱ为 4CL 蛋白的保守序列,均用方框标注。)

2.3　毛白杨 4CL3 蛋白的最适温度和最适 pH 值

毛白杨 4CL3 蛋白的最适温度曲线为典型的钟形曲线,图 3A 所示:在 40 ℃时其活性最大,在低于 20 ℃和高于 60 ℃时其活力不足最大活力的 30%;在 40 ℃以前,4CL 蛋白随着反应温度的增加其活力逐渐增加;而在高于 40 ℃后,随着温度的升高,4CL 蛋白的活力逐渐减小。与最适温度相似,毛白杨 4CL3 蛋白的最适 pH 值曲线也表现为钟形,但不是“均匀”的钟形,这种不均匀主要体现在,当 pH 值达到 9.0 时,毛白杨 4CL 蛋白仍然保持 60% 左右的活性,而其最适 pH 值为 8.5(图 3B)。图 3B 所示:在 pH 值为 6.5 ～8.5 时,随着 pH 值的增加,4CL 蛋白活性逐渐增强,而 pH 值为 8.5 ～9.0 时,4CL 蛋白表现出随着 pH 值增加而其活性减小的趋势。

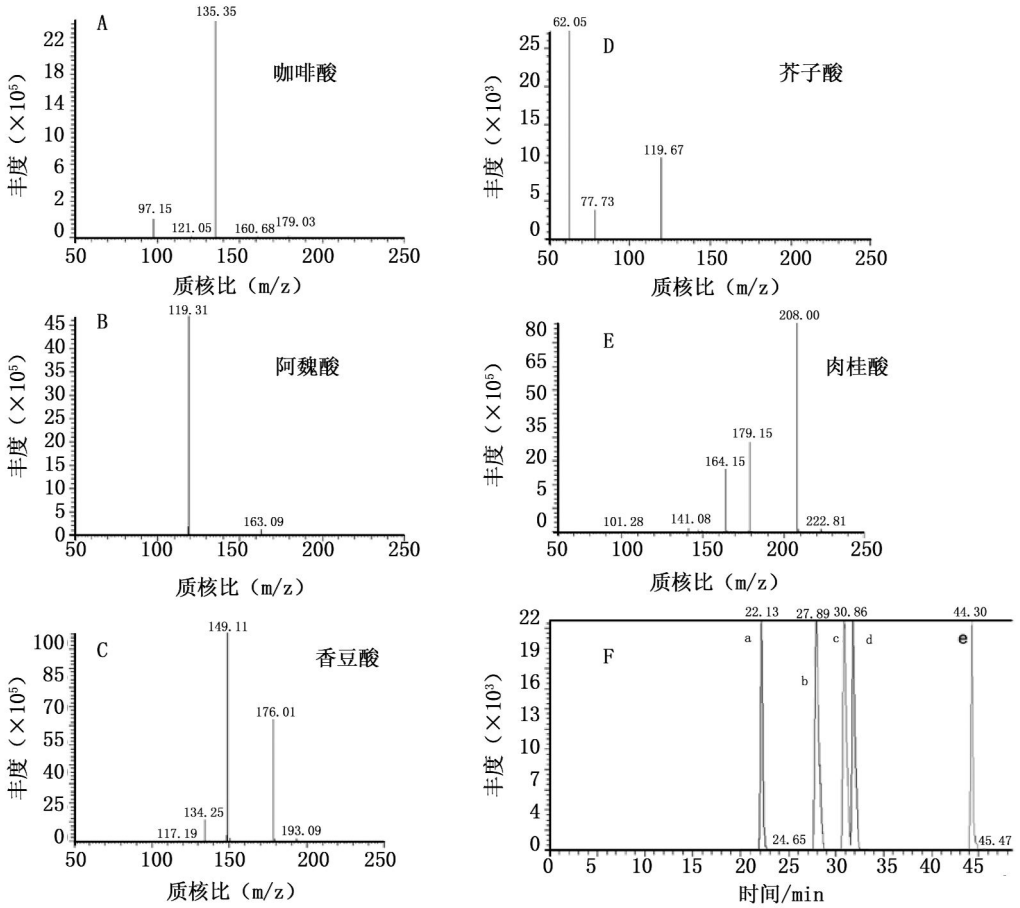


A:最适温度;B:最适 pH

图3 毛白杨4CL3的最适温度和最适pH值

2.4 毛白杨4CL3蛋白对底物的偏好性

从上述比活力的结果可以看出:4CL3蛋白对香豆酸的比活力最强,阿魏酸次之,其对咖啡酸和肉桂酸的比活力低于前二者,对芥子酸没有活性。这说明4CL3蛋白对不同底物有不同的催化效率。在自然环境下,杨树各个组织中不可能只含有1种或2种酚酸,而是多种酚酸共同存在于不同组织中,为了研究4CL蛋白会优先催化某一种底物或某几种底物,还是均匀的把所有能催化的酚酸作为底物,将4CL蛋白的5种底物(4-香豆酸、阿魏酸、咖啡酸、肉桂酸、芥子酸)混合,采用HPLS-MS的方法测定混合底物在一定量的酶作用下的减少量。图4表明:咖啡酸、阿魏酸、4-香豆酸、芥子酸和肉桂酸的裂解离子(m/z)分别约为135,97;119,163;149,176;120,78;208,179;F为5种酚酸的色谱图,a为咖啡酸,b为4-香豆酸,c为阿魏酸,d为芥子酸,e为肉桂酸。这5种酚酸都得到了很好的分离。由表2可以看出:香豆酸的减少量最大,其次是阿魏酸和肉桂酸,而咖啡酸和芥子酸没有减少,在混合底物的情况下,4CL3选择性的选取了4-香豆酸,肉桂酸和阿魏酸为底物,而对咖啡酸和芥子酸完全没有反应。



A～E:5种酚酸质谱图;F:5种酚酸色谱图,a为咖啡酸,b为4-香豆酸,c为阿魏酸,d为芥子酸,e为肉桂酸

图4 毛白杨4CL3的5种底物的色谱图和质谱图

3　结论与讨论

本实验克隆得到的 4*CL*3 基因是异于之前所报道的 4*CL*1 和 4*CL*2,如图 2 所示,和所有其他 4*CL* 基因一样,该基因也存在保守序列 Box I 和 Box II,这进一步证明这两序列在 4*CL* 基因家族中是保守的。4CL3 蛋白的比活力分析结果显示:4CL3 对香豆酸表现出较高的活性,而对芥子酸没有活性,这也与 4CL1 和 4CL2 相一致,但 4CL3 蛋白的比活力有其自身的特征,表现在对阿魏酸的比活性为咖啡酸和肉桂酸的 2 倍以上,且阿魏酸的活性和香豆酸的活性相当。这证明 4*CL*3 基因是异于 4*CL*1 和 4*CL*2 的新基因成员,且对不同的底物表现出不同的活性。

在对该 4CL3 蛋白进行最适温度和最适 pH 值测定后发现,4CL3 表现出和之前报道的 4CL 存在相似的最适温度特性[25]。二者在 40 ℃左右达到最大催化效率;但值得注意的是 4CL3 蛋白对碱性环境似乎存在一定的耐受性,在 pH 值为 8.5 时达到了活性的最大值,而在 pH 值为 9 的情况下仍存在 60% 的活性,这说明 4*CL*3 基因在抵御高碱环境中起到一定的作用。

利用 HPLC-MS 的方法,研究了 4CL3 在混合 5 种底物时对底物的偏好性,从表 2 中可以看出,在混合底物经 4CL3 反应后,咖啡酸完全没有变化,这说明在模拟的多底物环境下 4CL3 会优先催化 4-香豆酸和阿魏酸而不会去催化咖啡酸。4CL3 在多底物条件下没有催化咖啡酸,说明 4CL3 在自然环境下会选择性的催化某几种底物,并最终生成相应的木质素单体或类黄酮。

参考文献:

[1] 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成途径及调控的研究进展[J]. 植物学报,2001, 43(8):771 – 779

[2] 赵华燕, 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成及其基因工程研究进展[J]. 植物生理与分子生物学报,2004(4):361 – 370

[3] Ledbetter M C, Porter K R. A "Microtubule" in Plant Cell Fine Structure[J]. Journal of cell biology, 1963, 19(1):239 – 250

[4] Hamberger B, Hahlbrock K. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(7):2209 – 2214

[5] Costa M A, Bedgar D L, Moinuddin S G, *et al*. Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in *Arabidopsis*: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation[J]. Phytochemistry, 2005, 66(17):2072 – 2091

[6] Lindermayr C, Mollers B, Fliegmann J, *et al*. Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family[J]. European journal of biochemistry FEBS, 2002, 269(4):1304 – 1315

[7] Harding S A, Leshkevich J, Chiang V L, *et al*. Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate:coenzyme a ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen[J]. Plant physiology, 2002, 128(2):428 – 438

[8] Pan X, Li H, Wei H, *et al*. Analysis of the spatial and temporal expression pattern directed by the *Populus* tomentosa 4-coumarate:CoA ligase Pto4CL2 promoter in transgenic tobacco[J]. Molecular biology reports, 2012,12(1):231 – 239

[9] 孔　华, 郭安平, 郭运玲, 等. 尾叶桉 U6 4*CL* 基因 cDNA 克隆及反义表达载体的构建[J]. 安徽农业学报,2008, 38(20):8466 – 8469

[10] 倪志勇, 王　娟, 吕　萌, 等. 棉花 4-香豆酸辅酶 A 连接酶基因克隆及原核表达[J]. 西北植物学报, 2010,30(3):429 – 436

[11] 范丙友, 陆　海, 蒋湘宁. 烟草 4CL 蛋白免疫荧光定位研究[J]. 西北植物学报, 2007,27(6):1073 – 1077

[12] Alberstein M, Eisenstein M, Abeliovich H. Removing allosteric feedback inhibition of tomato 4-coumarate:CoA ligase by directed evolution[J]. The Plant journal: for cell and molecular biology, 2012, 69(1):57 – 69

[13] 胡尚连, 曹　颖, 黄胜雄, 等. 慈竹 4*CL* 基因的克隆及其生物信息学分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2009, 37(8):204 – 210

[14] 霍　松, 陈　慧, 朱琼华, 等. 象草 4*CL* 基因片段的克隆及 RNAi 表达载体构建[J]. 草业学报,2012, 21(1):296 – 301

[15] Gui J, Shen J, Li L. Functional characterization of evolutionarily divergent 4-coumarate:coenzyme a ligases in rice[J]. Plant physiology, 2011, 157(2):574 – 586

[16] 沈桂芳, 赵　衍. 水稻香豆酸:辅酶 A 连接酶基因的分子克隆及一级结构分析[J]. 中国农业科学,1991, 24(4):1 – 7

[17] 王念捷, 程　奇. 水稻 4*CL* 基因启动子引导的 GUS 在紫外诱导下的组织特异性表达[J]. 中国农业科学,1996, 29(1):73 – 77

[18] 饶国栋, 陆　海. 毛白杨 4*CL* 基因家族的克隆与进化分析[J]. 广东农业科学,2012, 39(8):141 – 144

[19] 贾彩红, 王宏芝, 杜克久, 等. 抑制 4*CL* 基因表达的转基因毛白杨中木质素含量与茎杆颜色的关系[J]. 农业生物技术学报,2004, 12(6):621 – 624

[20] Lindermayr C, Fliegmann J, Ebel J. Deletion of a single amino acid residue from different 4-coumarate:CoA ligases from soybean results in the generation of new substrate specificities[J]. Journal of biological chemistry, 2003, 278(5):2781 – 2786

[21] Allina S M, Pri-Hadash A, Theilmann D A, *et al*. 4-Coumarate:coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes[J]. Plant physiology, 1998, 116(2):743 – 754

[22] Knobloch K H, Hahlbrock K. 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. Partial purification, substrate specificity, and further properties[J]. Archives of biochemistry and biophysics, 1977, 184(1):237 – 248

[23] Lee D, Douglas C J. Two divergent members of a tobacco 4-coumarate:coenzyme A ligase (4*CL*) gene family. cDNA structure, gene inheritance and expression, and properties of recombinant proteins[J]. Plant physiology, 1996, 112(1):193 – 205

[24] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al*. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 2007, 23(21):2947 – 2948

[25] 范丙友, 陆　海, 蒋湘宁. 重组毛白杨 4 香豆酸:CoA 连接酶的酶学特征研究[J]. 北京林业大学学报, 2007, 5(29):62 – 66