

苯丙氨酸羟化酶在日本刺沙蚕脑内的表达分析

任桂敏¹, 董哲¹, 刘超², 刘乙蒙², 栾治东², 刘琪³, 暴学祥³, 王顺¹

1 辽宁医学院 生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 锦州 121000

2 辽宁医学院 发育生物学教研室, 辽宁 锦州 121000

3 东北师范大学 昆虫脑神经生物学实验室, 吉林 长春 130024

任桂敏, 董哲, 刘超, 等. 苯丙氨酸羟化酶在日本刺沙蚕脑内的表达分析. 生物工程学报, 2016, 32(4): 518–526.

Ren GM, Dong Z, Liu C, et al. The expression of phenylalanine hydroxylase in the brain of ragworm *Neanthes japonica* (Polychaeta, Annelida). Chin J Biotech, 2016, 32(4): 518–526.

摘要: 苯丙氨酸羟化酶 (PAH) 是芳香族氨基酸羟化酶家族 (AAAHs) 的一员, 催化苯丙氨酸 (Phe) 转化为酪氨酸 (Tyr)。运用 Western blotting 技术检测沙蚕 PAH 免疫原性。制作沙蚕头部石蜡切片, 运用免疫组织化学技术, 检测 PAH 蛋白表达定位情况。解剖剥离沙蚕脑组织, 提取总 RNA, 运用 RT-PCR 技术克隆 *pah* 基因片段, 构建质粒并转化入大肠杆菌中扩增, 挑单一均匀菌落培养, 双酶切鉴定后测序并比对同源性。Western blotting 结果表明 *pah* 表达的蛋白存在于沙蚕脑内, 免疫组化标记技术结果表明苯丙氨酸羟化酶主要分布在日本刺沙蚕前脑中腹侧、中脑背侧和两侧。RT-PCR 结果表明沙蚕脑内存在苯丙氨酸羟化酶基因, 且与多种动物 *pah* 具有同源性。在蛋白质和核酸水平鉴定了低等环节动物日本刺沙蚕脑组织内苯丙氨酸羟化酶的存在, 为进一步研究无脊椎动物中枢神经系统内芳香族氨基酸羟化酶的基因分化奠定基础。

关键词: 日本刺沙蚕, 苯丙氨酸羟化酶, 免疫组织化学, RT-PCR

Received: December 24, 2015; **Accepted:** March 3, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31071912), College Students' Innovative Training Program Foundation of Liaoning Province (No. 201210160015).

Corresponding author: Shun Wang. Tel: +86-416-4673253; E-mail: 284476696@qq.com

国家自然科学基金 (No. 31071912), 辽宁省大学生创新训练计划项目 (No. 201210160015) 资助。

The expression of phenylalanine hydroxylase in the brain of ragworm *Neanthes japonica* (Polychaeta, Annelida)

Guimin Ren¹, Zhe Dong¹, Chao Liu², Yimeng Liu², Zhidong Luan², Qi Liu³,
Xuexiang Bao³, and Shun Wang¹

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China

² Department of Developmental Biology, School of Basic Medical Sciences, Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China

³ Laboratory of Insect Brain Biology, Northeast Normal University, Changchun 130024, Jilin, China

Abstract: Phenylalanine hydroxylase (PAH) is a member of aromatic amino acid hydroxylase (AAAHs) family, and catalyze phenylalanine (Phe) into tyrosine (Tyr). Using immunological and RT-PCR methods to prove the existence of phenylalanine hydroxylase (PAH) gene in the brain of *Neanthes japonica* in protein and nucleic acid level. Using Western blotting to detect the *pah* immunogenicity of *Neanthes japonica*. Making paraffin sections and using immunohistochemical technique to identify the presence and distribution of the phenylalanine hydroxylase gene in the brain of *Neanthes japonica*. Clone *pah* gene from the brain of *Neanthes japonica* by RT-PCR, constructing plasmid and transferring into *E. coli* to amplification, picking a single homogeneous colony, double digesting then making sequence and comparing homology. Western blotting results showed that the expression of the protein is present in *Neanthes japonica* brain, immunohistochemistry technique results showed that phenylalanine hydroxylase mainly expressed in abdominal of forebrain, dorsal and sides of midbrain. RT-PCR technique results showed that the phenylalanine hydroxylase exist in the brain of *Neanthes japonica* and has a high homology with others animals. PAH is present in the lower organisms *Neanthes japonica*, in protein and nucleic acid level. Which provide the foundation for further study the evolution of aromatic amino acid hydroxylase genes in invertebrate.

Keywords: *Neanthes japonica*, phenylalanine hydroxylase, immunohistochemistry, RT-PCR

含有芳香环的酪氨酸 (Tyrosine, Tyr)、苯丙氨酸 (Phenylalanine, Phe) 和色氨酸 (Tryptophan, Trp) 统称作芳香族氨基酸^[1], 对芳香族氨基酸具有羟化活力的酶通称作芳香族氨基酸羟化酶^[2]。依据羟化作用底物的不同将芳香族氨基酸羟化酶分为 3 种, 即苯丙氨酸羟化酶 (Phenylalanine hydroxylase, PAH)、色氨酸羟化酶 (Tryptophan hydroxylase, TPH) 和酪氨酸羟化酶 (Tyrosine hydroxylase, TH), 这 3 种酶组成芳香族氨基酸羟化酶家族^[3-5] (Aromatic amino acid hydroxylases, AAAHs)。苯丙氨酸羟化酶作为芳香族氨基酸羟化酶家族的一员, 主

要催化苯丙氨酸转化为酪氨酸^[6], 是苯丙氨酸代谢过程中的关键酶和限速酶。人类 (Human) PAH 基因与重要代谢疾病苯丙酮尿症 (Phenylketonuria, PKU) 等疾病密切相关^[7-10], 线虫 *Nematode* 的 PAH 基因与表皮黑色素合成有关^[11], 果蝇 *Drosophila melanogaster* PAH 基因与表皮硬化、眼色素合成以及神经活动有关^[12-13], 埃及伊蚊 *Aedes aegypti* PAH 基因与防御免疫黑化有关^[14]。研究结果表明苯丙氨酸羟化酶在人体及动物中具有重要作用。

在对无脊椎动物芳香族氨基酸羟化酶基因进化的研究中, 目前认为酪氨酸羟化酶首先从

芳香族氨基酸羟化酶基因家族中分化出来^[15], 而后苯丙氨酸羟化酶才与色氨酸羟化酶分化开, 形成 3 种具有独立功能的酶^[16]。目前研究表明 PAH 和 TPH 在节肢动物门已经分化成各自独立的酶^[17], 但两者是否在更低等生物中分化成独立的酶, 还没有明确的证据。本课题采用 Western blotting 技术、免疫组化标记技术和 RT-PCR 技术, 对在进化上比节肢动物更低等的环节动物的典型代表动物日本刺沙蚕 *Neathes japonica* 脑内 PAH 的存在、表达定位和克隆进行分析, 以期在蛋白质和核酸水平上证明在环节动物中存在独立的 PAH 基因, 为芳香族氨基酸羟化酶基因的分化研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

兔抗 PAH 多克隆抗体、 β -actin 兔抗多克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自南京恩晶生物公司, 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福建迈新生物公司, 树脂石蜡 (Colophony-Paraffin, CP) 包埋剂为东北师范大学暴学祥教授提供, 3' RACE PCR 试剂盒、大肠杆菌 *Escherichia coli* Competent Cell DH5 α 、LA *Tap* 酶、pHSG396 载体、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xba* I 和 *Xho* I 均购自 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒、小剂量质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。引物由北京鼎国生物公司合成。基因序列由上海杰李生物公司测序完成。

1.2 方法

1.2.1 Western blotting 检测沙蚕脑内苯丙氨酸羟化酶的表达

剥离日本刺沙蚕脑组织置于 EP 管中剪碎, 加

入裂解液超声振碎制成匀浆, 冰上静置 30 min, 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min, 使用 BCA 法蛋白定量, 制得标准曲线后, 经计算得样品蛋白浓度, 最后将蛋白样品制成约 2 μ g/ μ L, 沸水煮 5 min 使蛋白变性。

制胶后电泳槽加足量 SDS-PAGE 电泳液, 将上述制备好的蛋白样品缓慢加入上样孔, 先 80 V 电泳 20 min, 样品通过浓缩胶后, 再 120 V 电泳 100 min。电泳后轻轻撬下凝胶, 放入装有转膜液的平皿中, 按阳极、滤纸、PVDF 膜、胶、滤纸、阴极的顺序放在转膜仪 20 V 转膜 20 min, 转好的 PVDF 膜放入 5%脱脂奶粉的封闭液中, 室温封闭 2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min。一抗 (TBST 稀释 1 : 200) 孵育 4 °C 过夜, 洗膜 3 次后二抗室温孵育 2 h, 用新配置的发光液浸没室温孵育 1 min, 去除多余发光液后显影照相。同样的方法用 β -actin 兔抗多克隆抗体代替一抗同步进行上述实验过程, 作为阳性对照。

1.2.2 免疫组化检测沙蚕脑内苯丙氨酸羟化酶的表达定位

将日本刺沙蚕的头和躯干分离后, 快速将头放入 4%多聚甲醛中室温固定 4 h, 然后用 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 洗 3 次, 15 min/次, 之后用梯度酒精脱水 (70%、80%、90%、95%、100%, 每次 1 h), 用二甲苯透明 3 次, 每次 1 h, CP 包埋剂整体定向包埋, 旋转切片机上制作连续额状切片, 片厚 6 μ m, 裱于涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 晾干备用。

切片经二甲苯脱蜡, 梯度酒精复水, 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 冲洗, 用内源性过氧化物酶室温孵育 10 min, 再用 0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次, 兔抗 PAH 多克隆抗体 (0.1 mol/L PBS 稀释 1 : 100) 室温孵育 3 h, 继而用生物素标记的二抗孵育

10 min, PBS 冲洗, 最后用 DAB 显色 10 min。连接数字显示的显微镜观察拍照。用 0.1 mol/L PBS 和兔抗 β -actin 多克隆抗体代替兔抗 PAH 多克隆抗体同步进行上述免疫组织化学染色过程, 作为阴性对照和阳性对照。

1.2.3 RT-PCR 核酸水平检测沙蚕脑内苯丙氨酸羟化酶

用 Trizol 试剂提取沙蚕脑总 RNA, 再反转录成 cDNA 并以此为模板, β -actin 引物为内参进行 RT-PCR 检测 PAH, 引物见表 1。按照试剂盒的操作方法进行两轮巢式 PCR。反应体系中包括 cDNA 模板 1 μ L、引物各 2 μ L、LA *Tap* 酶 0.5 μ L、缓冲液 5 μ L 等 (50 μ L 体系), 混匀离心后进行 PCR 扩增, 首轮 PCR 产物稀释 100 倍后取 1 μ L 作为第二轮 PCR 的模板。反应程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 32 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。以 β -actin 作为内对照。

巢式 PCR 产物在 1% 的琼脂糖上电泳鉴定并拍照。按照胶回收试剂盒操作流程进行胶回收。T4 DNA 连接酶 1 μ L、载体 1 μ L、胶回收产物 16 μ L、T4 DNA 连接酶缓冲液 2 μ L (20 μ L 体系) 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化到感受态大肠杆菌 DH5 α , 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 菌液涂于涂有 IPTG 和 X-gal 的氨苄青霉素抗性的 LB 平皿上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取大小均匀的白斑菌落培养,

参照小剂量质粒提取试剂盒提取质粒, 限制性内切酶 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 阳性克隆质粒送交测序后进行 Blast 对比。

2 结果与分析

2.1 Western blotting 检测苯丙氨酸羟化酶在沙蚕脑内的表达

Western blotting 结果表明, 应用兔抗 PAH 多克隆抗体能够在日本刺沙蚕头提取液中标记出一条明显的分子量大约为 52 kDa 的条带 (图 1), 其结果与抗体使用说明书所表述的 52 kDa 标准分子量大小相一致。 β -actin 为阳性对照标记出一条 44 kDa 的条带 (图 1)。结果表明苯丙氨酸羟化酶基因在日本刺沙蚕脑内有相应的蛋白表达产物存在, 为进一步应用免疫组化切片标记技术进行 PAH 的表达分布研究提供了依据和可能。

2.2 免疫组化检测苯丙氨酸羟化酶在沙蚕脑区的表达分布

低倍镜下可以看出, 在视野范围内日本刺沙蚕的脑区确实有被染色的褐色颗粒的存在, 呈现出明显、稳定的 PAH 免疫组织化学阳性反应, 说明苯丙氨酸羟化酶在日本刺沙蚕脑内有表达 (图 2A-2F)。阴性对照实验无阳性染色胞体 (图 2G 和图 2H), 阳性对照实验显示出明显的阳性反应结果 (图 2I 和图 2J)。

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
Gene specific outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT	23
3'RACE outter primer	CTGGAYKCDGAYCAYCCWGGHTT	23
Gene specific inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	32
3' RACE inner primer	CTNGGNGCHCCTGATGA	17

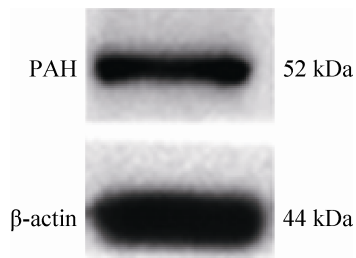


图 1 苯丙氨酸羟化酶在沙蚕头的蛋白表达

Fig. 1 Western blotting analysis of the immunogenicity of phenylalanine hydroxylase and β -actin in the brain of ragworm *Neanthes japonica*.

切片免疫组化染色实验结果显示这些 PAH 阳性神经元在前脑和中脑均有表达，只是在前脑分布较集中，胞体小，分布较少；在中脑分布相对分散，胞体大，表达量较大；这些胞体均染色显著，呈深褐色，在局部聚集成群。根据胞体在脑中的分布位置的不同，可以大体区分为 3 群。第一群主要集中在前脑区域，染色细胞主要分布在中腹侧，胞体相对较小，大约包含 40 个神经元胞体 (图 2A、2B)。第二群主要集中在一对后眼之间的中脑区域，染色细胞主要分布在两侧部，右侧胞体较集中，大约包含 15 个神经元胞体 (图 2B、2C)。第三群主要集中在中后脑区域，染色细胞在背方和两侧边部均有分布，两侧分布相对较少，背方分布较多，但较分散，相对集中区域大约包含 20 个神经元胞体 (图 2E、2F)。苯丙氨酸羟化酶主要存在于神经元的细胞质中，且这些神经元细胞无突触，没有远端的投射 (图 2B、2D、2F)。在整个脑区未见静脉曲张状纤维投射的存在。

2.3 RT-PCR 检测苯丙氨酸羟化酶在沙蚕脑中的存在

巢式 PCR 的第一轮产物可以增加目的模板的浓度，第二轮 PCR 产物的特异性更高，两轮

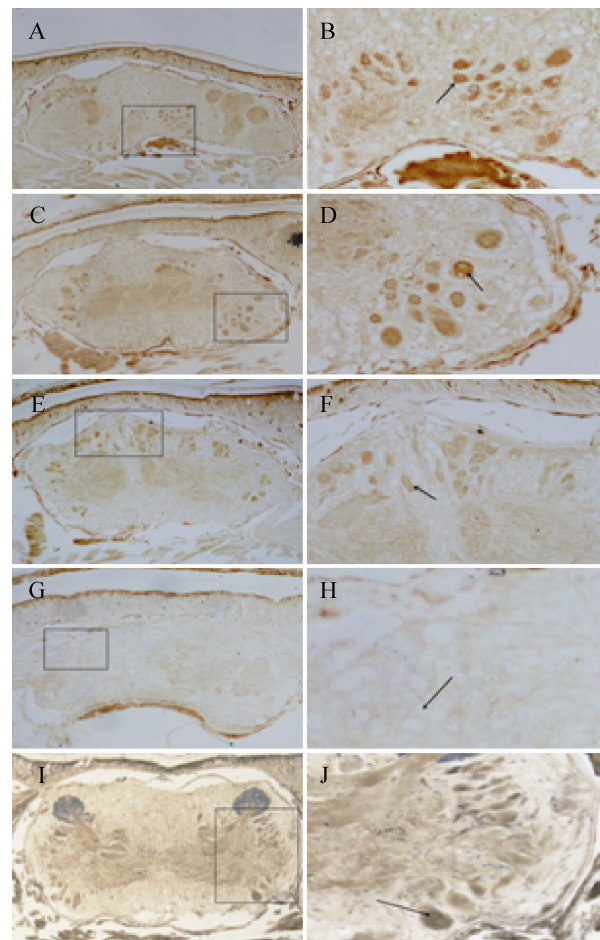


图 2 沙蚕脑区免疫组化染色图 (A、C、E、G、I 为 20 \times ，B、D、F、H、J 为 40 \times ，A、B 为前脑，C、D、E、F、G、H、I、J 为中脑)

Fig. 2 Immunolocalization of phenylalanine hydroxylase in the brain of ragworm *Neanthes japonica*. A, C, E, G, I is 20 times under a microscope; B, D, F, H, J is 40 times under a microscope, A, B is the forebrain, C, D, E, F, G, H, I, J is the midbrain. The arrow pointing in the direction of positive cells. A, B, C, D, E, F is the experimental group. G, H is the negative control group. I, J is the positive control group.

PCR 之后的扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，由于是简并性引物，电泳条带会有多条，如图 3A 所示，在 750 bp 和 320 bp 左右有两条明亮的条带，上面的条带与预期的更相近，将大的条带切下回收，T4 DNA 连接酶连接，连接产物转化

入大肠杆菌 DH5 α ,挑取 4 个大小均匀的白斑菌落,提取质粒双酶切鉴定后电泳如图 3B 所示,1 号、3 号和 4 号为阳性克隆,将 1 号、3 号和 4 号送交测序。经测序 3 号片段得到一段长度为 757 bp 带有 PolyA 尾巴的一段 cDNA 序列,NCBI 网站上 Blast 之后结果如表 2 所示,发现此基因序列与栉孔扇贝 *Azumaecten farreri* PAH (GenBank 登录号 AEE60803.1)具有 71%的同源性,与白腹丛蚊 *Armigeres subalbatus* PAH

(GenBank 登录号 AAT78350.1) 具有 70%的同源性,与囊舌虫 *SaccoGLOSSUS kowalevskii* PAH (GenBank 登录号 NP_001161629.1) 具有 70%的同源性,与家蚕 *Bombyx mori* PAH (GenBank 登录号 NP_001274766.1) 具有 69%的同源性,与拟黑多刺蚁 *Polyrhachis vicina* PAH (GenBank 登录号 AFL02790.1) 具有 65%的同源性,与大红斑蝶 *Danaus plexippus* PAH (GenBank 登录号 EHJ64587.1) 具有 66%的同源性。

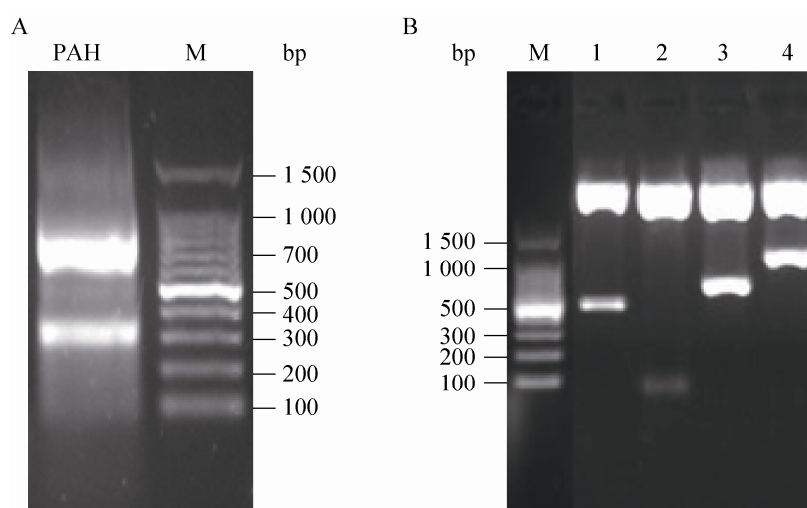


图 3 沙蚕神经索 PAH 的克隆

Fig. 3 Clone of phenylalanine hydroxylase in the nerve cord of ragworm *Neanthes japonica*. (A) Electrophoresis images of PAH. (B) Identification of pHSG-PAH plasmid using restriction endonuclease digestion, 1, 3, and 4 were positive clone; 2 was negative clone; M: DL100 DNA ladder.

表 2 测序片段 Blast 结果

Table 2 Blast result of segment sequence

Species	Max score	Total score	Query cover (%)	Ident (%)	Accession No.
<i>Azumaecten farreri</i> (PAH)	189	189	55	71	AEE60803.1
<i>Armigeres subalbatus</i> (PAH)	183	183	55	70	AAT78350.1
<i>SaccoGLOSSUS kowalevskii</i> (PAH)	181	181	55	70	NP_001161629.1
<i>Bombyx mori</i> (PAH)	179	179	55	69	NP_001274766.1
<i>Polyrhachis vicina</i> (PAH)	175	175	56	65	AFL02790.1
<i>Danaus plexippus</i> (PAH)	174	174	55	66	EHJ64587.1

3 讨论

历经漫长的选择进化, *PAH* 基因在脊椎动物乃至人类仍被保留。1983年 Woo 等^[18]从人肝脏中成功克隆出了苯丙氨酸羟化酶基因, *PAH* 在肝脏合成, 定位于第 12 号染色体 12q24.1, 大约由 1.5 Mb 碱基组成, 包含 13 个外显子和 12 个内含子, 转录时剪切掉内含子形成了仅包含 1 353 bp 外显子的单链, 即包含 451 个密码子的可译框, mRNA 翻译成 451 个氨基酸的酶单体, 单体再聚合成有功能的 *PAH* 酶^[19-20]。

目前对于芳香族氨基酸羟化酶的研究大多集中于高等生物, 人类苯丙氨酸羟化酶基因的突变致人患苯丙酮酸尿症^[21], 动物体内的苯丙氨酸羟化酶基因突变也导致了一系列的疾病, 而目前对于低等生物苯丙氨酸羟化酶的研究则相对较少。在基因进化研究方面, 低等生物中芳香族氨基酸羟化酶是否像哺乳动物一样进行了功能基因的分化还是未知, 尤其是苯丙氨酸羟化酶和色氨酸羟化酶基因是否也进行了相应地分化, 是在哪一进化中的低等生物物种中进行了分化, 即分化的节点到底在哪儿, 一直没有定论。

实验中对日本刺沙蚕体内的 *PAH* 蛋白进行了免疫学标记, 对 *pah* 基因进行了克隆。Western blotting 实验结果表明, 在日本刺沙蚕体内有明确的 *pah* 基因表达的蛋白存在。免疫组化实验结果明确了其在蛋白水平的组织分布情况, 在日本刺沙蚕脑内 *PAH* 神经元细胞内, *PAH* 充满细胞液, 细胞无投射, 说明被合成的苯丙氨酸羟化酶在细胞液中使苯丙氨酸转变为酪氨酸, 而不需要分泌到胞外到远端去发挥作用。分布的这种差别, 应该与苯丙氨酸羟化酶所具有的

相应的功能有关, 研究表明, 苯丙氨酸羟化酶是生物体内苯丙氨酸转化为酪氨酸的关键限速酶^[22-24], 一旦此酶缺乏, 苯丙氨酸就会在体内堆积, 酪氨酸量就会减少, 进而影响酪氨酸转化为多巴胺或酪胺的量^[25-26], 引起一系列的连环反应, 即影响多巴胺、去甲肾上腺素、肾上腺素这些儿茶酚胺^[27]类神经递质的功能, 或影响酪胺和章鱼胺的功能, 这些单胺类神经递质都是以苯丙氨酸和酪氨酸为前体物质合成的, 若以苯丙氨酸为前体物质, 则 *PAH* 的存在显得尤为重要。从分布来看, 有 *PAH* 神经元细胞分布的脑区域可能与儿茶酚胺、酪胺和章鱼胺类神经递质的合成相关, 具体在沙蚕体内会引起什么样的变化还有待下一步通过对酪氨酸羟化酶及相应单胺类神经递质在沙蚕脑内的存在及分布模式的研究去进行深入地讨论。

应用分子克隆技术克隆出了 *PAH* 的一段 757 bp 带有 PolyA 尾巴的 cDNA 序列, NCBI 网站上 Blast 结果与多个物种 *PAH* 高度的同源性, 从核酸水平上证明了在日本刺沙蚕脑中确有独立的 *PAH* 的存在。

综上所述, 低等的环节动物日本刺沙蚕脑内存在独立的苯丙氨酸羟化酶, 在蛋白质水平和核酸水平上为芳香族氨基酸羟化酶中苯丙氨酸羟化酶和色氨酸羟化酶的基因分化提供了证据, 为两种羟化酶基因的分化节点在已有的节肢动物门基础上向前推进到环节动物门提供了依据。

REFERENCES

- [1] Cao J, Shi F, Liu XG, et al. Phylogenetic analysis and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *FEBS Lett*, 2010, 584(23): 4775-4782.

- [2] Tu GW, Zou X. Structure and catalytic characters of aromatic amino acid hydroxylase. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2014, 30(1): 14–22 (in Chinese).
涂光伟, 邹祥. 芳香族氨基酸羟化酶家族结构与催化功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(1): 14–22.
- [3] Fitzpatrick PF. Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry*, 2003, 42(48): 14083–14091.
- [4] Fitzpatrick PF. The aromatic amino acid hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 2000, 74: 235–294.
- [5] Grenett HE, Ledley FD, Reed LL, et al. Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(16): 5530–5534.
- [6] Daubner SC, Le T, Wang SZ. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 508(1): 1–12.
- [7] Kaufman S. 16-Hepatic phenylalanine hydroxylase and PKU. *Brain Mech Mental Retard*, 2013: 445–458.
- [8] Ho G, Reichardt J, Christodoulou J. *In vitro* read-through of phenylalanine hydroxylase (PAH) nonsense mutations using amino glycosides: a potential therapy for phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis*, 2013, 36(6): 955–959.
- [9] Bratland E, Magitta NF, Wolff ASB, et al. Autoantibodies against aromatic amino acid hydroxylases in patients with autoimmune polyendocrine syndrome type 1 target multiple antigenic determinants and reveal regulatory regions crucial for enzymatic activity. *Immunobiology*, 2013, 218(6): 899–909.
- [10] Nakashima A, Ota A, Kaneko YS, et al. A possible pathophysiological role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease suggested by postmortem brain biochemistry: a contribution for the special 70th birthday symposium in honor of Prof. Peter Riederer. *J Neural Transm*, 2013, 120(1): 49–54.
- [11] Loer CM, Davidson B, McKerrow J. A phenylalanine hydroxylase gene from the nematode *C. elegans* is expressed in the hypodermis. *J Neurogenet*, 1999, 13(3): 157–180.
- [12] Kutch IC, Sevgili H, Wittman T, et al. Thermoregulatory strategy may shape immune investment in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol*, 2014, 217(Pt 20): 3664–3669.
- [13] Alcañiz S, Silva FJ. Phenylalanine hydroxylase participation in the synthesis of serotonin and pteridines in *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol Part C*, 1997, 116(3): 205–212.
- [14] Johnson JK, Rocheleau TA, Hillyer JF, et al. A potential role for phenylalanine hydroxylase in mosquito immune responses. *Insect Biochem Mol Biol*, 2003, 33(3): 345–354.
- [15] Zhang SN, Huang T, Ilangovan U, et al. The solution structure of the regulatory domain of tyrosine hydroxylase. *J Mol Biol*, 2014, 426(7): 1483–1497.
- [16] Chen GL, Miller GM. Tryptophan hydroxylase. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(9): 1227–1233.
- [17] Ledley FD, Grenett HE, Bartos DP, et al. Assignment of human tryptophan hydroxylase locus to chromosome 11: gene duplication and translocation in evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Somat Cell Mol Genet*, 1987, 13(5): 575–580.
- [18] Woo SLC, Lidsky AS, Güttler F, et al. Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature*, 1983, 306(5939): 151–155.
- [19] Zhang Z, Huang ZQ, Shen Q, et al. Cloning of human phenylalanine hydroxylase gene and construction of prokaryotic expression plasmid. *J Sun Yat-Sen Univ: Med Sci*, 2007, 28(3): 288–291 (in Chinese).
张志, 黄宗青, 沈琪, 等. 人苯丙氨酸羟化酶基因克隆及其原核表达质粒的构建. *山东大学学报: 医学科学版*, 2007, 28(3): 288–291.
- [20] Flydal MI, Martinez A. Phenylalanine hydroxylase: function, structure, and regulation. *IUBMB Life*,

- 2013, 65(4): 341–349.
- [21] He J, Wang HZ, Xu FL, et al. Mutation analysis of the PAH gene in children with phenylketonuria from the Qinghai area of China. *Chin J Contemp Pediatr*, 2015, 17(11): 1221–1227 (in Chinese).
何江, 王惠珍, 徐发亮, 等. 青海地区苯丙酮尿症患者苯丙氨酸羟化酶基因突变分析. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(11): 1221–1227.
- [22] Zhang SN, Hinck AP, Fitzpatrick PF. The amino acid specificity for activation of phenylalanine hydroxylase matches the specificity for stabilization of regulatory domain dimers. *Biochemistry*, 2015, 54(33): 5167–5174.
- [23] Geisler S, Gostner JM, Becker K, et al. Immune activation and inflammation increase the plasma phenylalanine-to-tyrosine ratio. *Pteridines*, 2013, 24(1): 27–31.
- [24] Teraishi T, Sasayama D, Hori H, et al. Possible association between common variants of the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene and memory performance in healthy adults. *Behav Brain Funct*, 2013, 9(1): 125–133.
- [25] Dilmukhametova LK, Pronina TS, Volina EV, et al. The regulation of compensatory dopamine synthesis in the arcuate nucleus of rats. *Neurochem J*, 2014, 8(3): 168–177.
- [26] Harding CO, Winn SR, Gibson KM, et al. Pharmacologic inhibition of L-tyrosine degradation ameliorates cerebral dopamine deficiency in murine phenylketonuria (PKU). *J Inherit Metab Dis*, 2014, 37(5): 735–743.
- [27] Daigo H, Setsuko K, Hirofumi T, et al. The role of tetrahydrobiopterin and catecholamines in the developmental regulation of tyrosine hydroxylase level in the brain. *J Neurochem*, 2013, 126(1): 70–81.

(本文责编 郝丽芳)