

白花泡桐羟基肉桂酰辅酶 A 还原酶 mRNA 全序列克隆及序列分析

陈占宽¹, 杨艳坤², 叶金山^{1,3}, 李荣幸¹, 刘志刚¹, 王军军¹

(1. 河南省绿士达林业新技术研究所, 河南 郑州 450008; 2. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450052;
3. 国家林业局 泡桐研究开发中心, 河南 郑州 450003)

摘 要:经过对其他物种 CCR mRNA 序列的对比分析后,设计保守区兼并引物,首先用 RT-PCR 方法得到 229 bp CCR mRNA 部分序列,之后通过 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 方法,成功克隆得到包括 5'UTR 和 3'UTR 在内的 CCR 全部 mRNA 序列,并进行了分析,所得 CCR mRNA 全序列共 1 243 个碱基,CDS 共 999 个碱基(103—1 101),编码氨基酸 332,和其他多个物种的 CCR 序列比对结果显示相似度均在 80% 以上。此序列成功克隆之前,尚未见到白花泡桐木质素代谢关键酶基因的报道,这对丰富白花泡桐基因资源、有针对性的进行白花泡桐品质或材质改良有巨大的意义。

关键词:白花泡桐;木质素代谢;羟基肉桂酰辅酶 A 还原酶;全序列克隆;材质改良

中图分类号:Q78;S792.43 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2011)04-099-05

Cloning and Analysis of Cinnamoyl-CoA Reductase mRNA of *Paulownia fortunei*

CHEN Zhan-kuan¹, YANG Yan-kun², YE Jin-shan^{1,3}, LI Rong-xing¹, LIU Zhi-gang¹, WANG Jun-jun¹

(1. Henan Province Green Star Forestry Institute, Zhengzhou, Henan 450008, China;
2. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China;
3. Paulownia Research and Development Center of State Forestry Administration, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: The CCR mRNA sequence alignment was analyzed between several species of *Paulownia fortunei*, and the degenerated primers were designed. The partial sequence was amplified with RT-PCR, and then the 5'UTR and 3'UTR sequences were cloned with rapid amplification of cDNA Ends (RACE) method. The complete sequence was 1 243 bp, including 999 bp CDS, and 332 amino acids were coded. Before the CCR mRNA complete sequence was published, no any sequence was substrate in GenBank nucleotide sequence database about *P. fortunei* lignin metabolism. The further work could be done about quality improvement of *P. fortunei* based on this sequence.

Key words: *Paulownia fortunei*; lignin metabolism; cinnamoyl-CoA reductase; mRNA; complete sequence cloning; quality improvement

白花泡桐(*Paulownia fortunei*)是一种速生优质用材落叶树种,生长快,成材早,繁殖容易,材质好,用途广,经济价值高。白花泡桐是泡桐属中的重

要树种,对泡桐遗传育种研究有重大影响^[1]。木材的材质是由其组分纤维素、木质素等的结构、性质、二者的总量及比率决定的^[2]。羟基肉桂酰辅酶

A 还原酶(cinnamoyl-CoA reductase,CCR)是木质素特异途径的第一个关键酶,催化羟基肉桂酰一辅酶 A 硫酯还原成相应的肉桂醛,是木质素合成途径的碳向木质素分配的控制关节点,对木质素单体的生物合成起着重要作用^[3-5]。目前,多种植物中的 CCR 序列已被克隆^[6-9]。

在本序列发布之前,登录 GenBanK 的泡桐 mRNA 只有 8 个,且无一与泡桐纤维素、木质素生物合成有关。这意味着目前研究泡桐木质素生物合成代谢的表达调控尚无基础,搞清这些基因的结构、序列是研究泡桐木质素生物合成代谢的基础与前提。克隆、分析这些代谢关键酶基因序列,对丰富白

花泡桐基因资源、有针对性的进行植物品质或材质改良有重要意义。本文在对其他物种相关基因序列分析的基础上,采用 RT-PCR 及 RACE 方法,成功克隆了 CCR mRNA 全序列。

1 材料与方法

1.1 材料

白花泡桐由叶金山博士与李荣幸教授提供。RNA 提取试剂盒、AMV、高保真 LA Taq、相关限制性核酸内切酶等试剂购买于宝生物工程(大连)有限公司(TAKARA)。表 1 为所用引物。

表 1 本文所涉及的引物
Table 1 Relative primers

引物		序列
简并引物	BCF	5'-ATHCARMGNATHGGNATHGCGNATGG-3'
	BCR	5'-GNARNGTYTTNARCATRAACAT-3'
5' RACE 引物	Outer 引物	5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3'
	Inner 引物	5'-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3'
	C. 5GSP1	5'-GAAGCAGTGGGCCAAGAACCAACAC-3'
	C. 5GSP2	5'-CCCATGCTGCTTGTTTCAGCCACAGC-3'
3' RACE 引物	Outer 引物	5'-TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT-3'
	Inner 引物	5'-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3'
	C. 3GSP1	5'-GTTGGTTCTTGGCCCACTG-3'
	C. 3GSP2	5'-ATGCCAACTCCGTCCAAGC-3'

1.2 方法

1.2.1 白花泡桐总 RNA 的提取 取生长旺盛的幼嫩白花泡桐枝条,剥去韧皮部,用清洁刀片刮取木质部外周形成层部分的细胞,液氮研磨成粉,加入 TaKaRa 公司生产的总 RNA 提取试剂 RNAiso Reagent(D312),按照其说明书提取 RNA。

1.2.2 CCR 部分片段的获得 RT-PCR:以提取的总 RNA 为模板,Oligo dT 为引物,TAKARA 公司生产的反转录酶 XL(Reverse Transcriptase XL AMV)反转录,程序如下:37 ℃保温 15 min,42 ℃ 1 h,70 ℃ 15 min,冰浴 5 min。得到 cDNA。以兼并引物 BCF、BCR 为引物,cDNA 为模板,TAKARA 高保真 Taq LA 进行 RT-PCR,扩增 CCR 部分序列。反应条件如下:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,53 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。反应结束后于琼脂糖凝胶中电泳检测结果。

序列测定:凝胶回收试剂盒回收目的片段。回收后的 PCR 产物送宝生物工程(大连)有限公司进

行序列测定。

1.2.3 CCR mRNA 5'上游未知序列的获得 使用 TaKaRa 公司出品的 5'-FULL RACE kit(Code No: D315)。依据获得的简并引物 RT-PCR 获得泡桐 CCR 部分编码序列,优选了 2 条特异的嵌套式 PCR 引物 C. 5GSP1、C. 5GSP2(表 1)。克隆程序包括:(1)泡桐总 RNA 的提取;同以上“白花泡桐总 RNA 的提取”方法;(2)泡桐总 RNA 去磷酸化处理;(3)去帽子反应;(4)5'RACE 接头的连接;(5)反转录反应;(6)以外侧的特异性引物 GSP1 与 5'RACE Outer 引物进行 PCR 反应;(7)以内侧的特异性引物 GSP2 与 5'RACE Inner 引物进行 PCR 反应。具体参数参照 5'-FULL RACE kit 产品说明书。琼脂糖凝胶电泳检测结果。凝胶回收扩增的片段,克隆于 pMD20-T 载体(具体操作步骤参照产品说明书),转化 *E. coli* JM109,菌落 PCR 鉴定的阳性克隆送样测序。

1.2.4 CCR mRNA 3'下游未知序列的获得 使用 TaKaRa 公司出品的 3'-FULL RACE Core Set Ver.

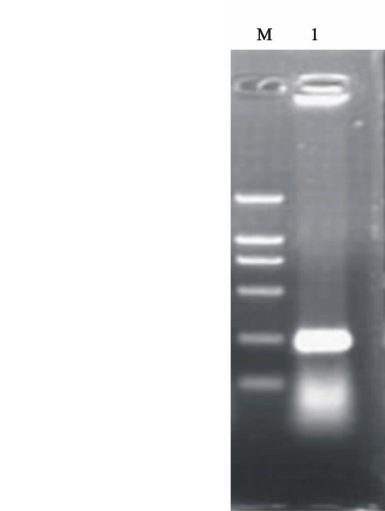
20(Code No: D314)。依据获得的简并引物 RT-PCR 获得泡桐 CCR 部分编码序列,优选了 2 条特异的嵌套式 PCR 引物(表 1)。具体的克隆程序包括:(1)泡桐总 RNA 的提取:同上;(2)套式 PCR 反应:先以外侧的特异性引物 C. 3GSP1 与 3'RACE Outer 引物,进行 PCR 反应,再以内侧的特异性引物 C. 3GSP2 与 3'RACE Inner 引物进行 PCR 反应。具体参数参照 3'-FULL RACE kit 产品说明书。琼脂糖凝胶电泳检测结果。凝胶回收扩增的片段,克隆于 pMD20-T 载体(具体操作步骤参照产品说明书),转化 *E. coli* JM109,菌落 PCR 鉴定的阳性克隆送样测序。

1.2.5 CCR mRNA 全序列的获得及分析 经过以上步骤,分别获得了 CCR mRNA 的部分序列、5'上游未知序列、3'下游未知序列,且 3 个序列互有重叠,经 Lasergene 软件拼接、分析,得到 CCR mRNA 全序列,提交 GenBank。

2 结果与分析

2.1 白花泡桐部分序列的获得

提取白花泡桐的总 RNA,经电泳检测其浓度,反转录后 BCF,BCR 为引物,TAKARA 高保真 Taq LA RT-PCR(图 1)。将此片段回收,插入 pMD19-T vector、转化,挑单菌落鉴定、测序。扩增片段长 229 bp,与预期相符。以此 DNA 片段序列推测可编码 75 个氨基酸,其 mRNA 序列与美洲山杨(*Populus tremuloides*)、加杨(*Populus canadensis* Moench)、山杨(*Populus davidiana* Dode)的 CCR 序列同源性均达到 81%,可以确认这个序列为泡桐 CCR 基因的部分 mRNA 序列。



M: DL2000 DNA Marker, 1: The result of RT-PCR

图 1 CCR RT-PCR 电泳图

Fig. 1 The PCR of RT-PCR

2.2 CCR mRNA 5'上游未知序列的获得

扩增的片段长 650 bp 左右,凝胶回收扩增的片段,克隆于 pMD20-T 载体,转化 *E. coli* JM109,菌落 PCR 鉴定的阳性克隆送样测序(图 2)。序列中有效序列长 610 bp。该序列与简并引物扩增重叠部分为 54 bp。

2.3 CCR mRNA 3'下游未知序列的获得

RACE 法得到 CCR mRNA 3'上游片段,经琼脂糖凝胶电泳检测结果。结果显示,扩增的片段长 500 bp 左右,凝胶回收扩增的片段,克隆于 pMD20-T 载体,转化 *E. coli* JM109,菌落 PCR 鉴定的阳性克隆送样测序(图 2)。序列中有效序列长 501 bp。该序列与简并引物扩增重叠部分为 43 bp。

2.4 CCR mRNA 全序列的获得及分析

经过以上步骤,分别获得了 CCR mRNA 的部分序列、5'上游未知序列、3'下游未知序列,且 3 个序列互有重叠,经 Lasergene 软件拼接、分析,得到 CCR mRNA 全序列(图 2)。CCR mRNA 共 1 243 个碱基,CDS 共 999 个碱基(103~1101),编码氨基酸 332。

利用 GenBanK BLAST 软件对泡桐 CCR 酶氨基酸序列分析比对的结果显示,与番茄(*Lycopersicon esculentum*)相似性为 87%,与马铃薯(*Solanum tuberosum*)的相似性为 86%,与毛果杨(*Populus trichocarpa*)的相似性为 84%并用 GeneDoc 软件做了同源性分析(图 3)。

3 结论与讨论

3.1 结论

本文采用 RACE 技术得到了白花泡桐 CCR mRNA 全序列。

CCR 氨基酸序列同源性分析显示与现有多个物种 CCR 序列相似性高,并显示多个保守区序列。氨基酸链最长的保守区序列在所有 CCR 序列中保守。

RACE 技术系统基于真核生物 mRNA 的序列特点,同时采用了嵌套 PCR 等技术,使之可以高灵敏度、高特异性地扩增 cDNA 的末端的全长序列。笔者克隆得到的 CCR 序列分子进化与系统发育分析结果显示同经典分类一致。

3.2 讨论

木质素、纤维素是木材的主要成分,并决定着木材的材质与性能。木质素生物合成是一个极其复杂过程,涉及苯丙氨酸裂解酶(PAL)、4-肉桂酸 CoA 连接酶(4CL)、肉桂酸 CoA 还原酶(CCR)等多个基

因。CCR 是将苯丙烷类代谢途径形成的产物还原为香豆醛、阿魏醛、5-羟基阿魏醛和芥子醛再经肉桂酸醇脱氢酶(CAD)作用,生成相应的木质素单体——香豆醇、松柏醇和芥子醇。最后,在过氧化物酶(POX)和漆酶(LAC)等催化下,各种木质素单体聚合成为高分子木质素。

为了研究 CCR,笔者首先利用 RACE 技术得到

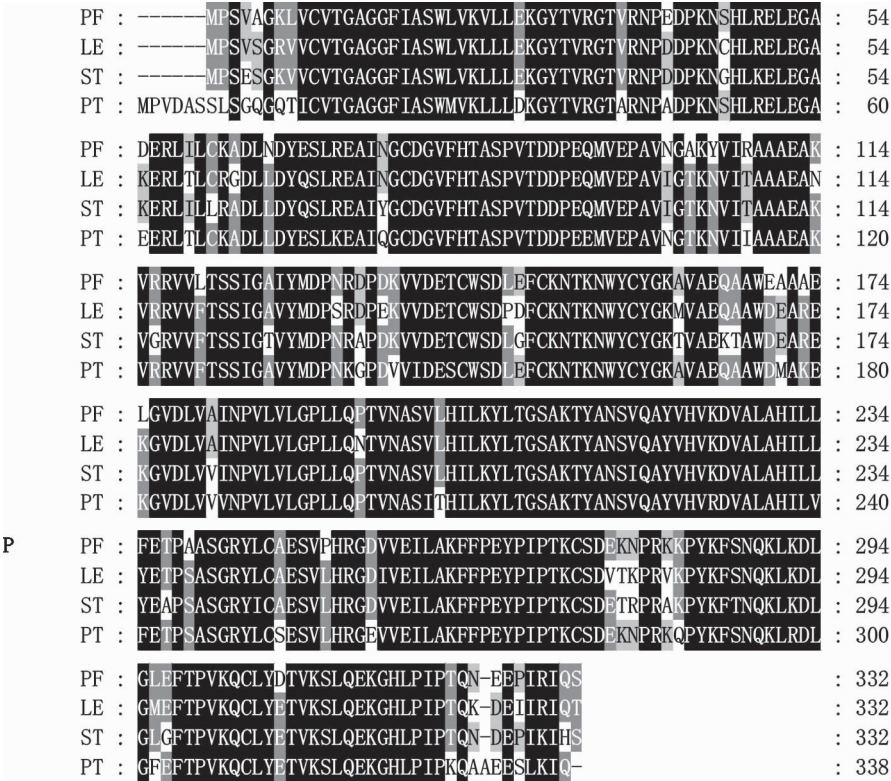
白花泡桐中 CCR 的全长 mRNA 序列,并对其序列进行的初步分析,为白花泡桐这一优质树种的材质改良研究奠定了基础。对序列中最长保守区序列的进一步分析将有助于揭示 CCR 的作用机理。而且该保守区的确立,有助于利用同源克隆的方法得到更多物种中的 CCR 全长序列,丰富木质素代谢相关基因库,并基因的进一步开发奠定基础。

GAAAAATATCATTCCCTCGTACCCACCTTGTTCTCTCACGCACTATACATACATATATATA :	60
CGTACACACAGTATCAGCATCCGCAGCCAACCTCCACCATGCCGTGGTTGCCGGC :	120
M P S V A G :	6
AAACTCGTGTGCGTCACCGCGCCGAGGCTTCATTGCTTCGTGGCTGGTTAAAGTACTC :	180
K L V C V T G A G G F I A S W L V K V L :	26
CTTGAAAAGGGCTACACAGTCAGAGGCACCGTCAGAAATCCAGAGGATCCGAAGAATTCA :	240
L E K G Y T V R G T V R N P E D P K N S :	46
CATTGAGAGAGCTTGAAGGAGCAGATGAGAGGCTGATTCTGTGCAAGGCTGATCTTAAC :	300
H L R E L E G A D E R L I L C K A D L N :	66
GATTATGAGAGTTTACGGAAGCCATTAATGGCTGCGACGGTGTTTTCCACACTGCCTCG :	360
D Y E S L R E A I N G C D G V F H T A S :	86
CCTGTCACTGATGATCCAGAACAATGGTGGAGCCGCAGTGAATGGGGCCAAATATGTT :	420
P V T D D P E Q M V E P A V N G A K Y V :	106
ATACGTGCAGCGCAGAAGCCAAGGTCGCCGTGTGGTGTAACTCTCTCAATTGGTGCA :	480
I R A A A E A K V R R V V L T S S I G A :	126
ATATACATGGATCCCAACAGAGACCTGATAAAGTTGTAGACGAGACTTGTGGAGTGAT :	540
I Y M D P N R D P D K V V D E T C W S D :	146
CTTGAATTCTGCAAAAATACAAAGAATTGGTATTGCTATGGAAAGGCTGTGGCTGAACAA :	600
L E F C K N T K N W Y C Y G K A V A E Q :	166
GCAGCATGGGAAGCAGCTGCGGAGTTGGGGTGGACTTGGTGGCGATCAACCCAGTGTG :	660
A A W E A A A E L G V D L V A I N P V L :	186
GTTCTTGGCCCACTGCTTCAGCCAACGTGAATGCCAGTGTCTTCACATACTCAAGTAC :	720
V L G P L L Q P T V N A S V L H I L K Y :	206
TTGACTGGCTCTGCAAAGACTTATGCCAACTCCGTCCAAGCCTATGTCCATGTCAAGGAT :	780
L T G S A K T Y A N S V Q A Y V H V K D :	226
GTGGC ATTGGCACACATACTCTTGTTGAGACACCGGCTGCGTCGGGGCGGTACCTCTGC :	840
V A L A H I L L F E T P A A S G R Y L C :	246
GCTGAGAGCGTACCCACCGCGCGATGTGGTGGAGATTCTTGCCAAGTTCTTCCCGGAA :	900
A E S V P H R G D V V E I L A K F F P E :	266
TATCCCATCCCTACCAAGTGCTCAGATGAAAAGAACCAAGAAAGAAACCTTACAAGTTC :	960
Y P I P T K C S D E K N P R K K P Y K F :	286
TCAAACCAAAAGCTAAAGGACTTGGGCTTGGAGTTCACACCAGTGAAGCAGTGTGTGAT :	1020
S N Q K L K D L G L E F T P V K Q C L Y :	306
GATACAGTGAAAAGCCTTCAGGAAAAAGGCCATCTTCCAATCCCAACTCAGAATGAGGAG :	1080
D T V K S L Q E K G H L P I P T Q N E E :	326
CCCATTGCTATTCACTTAGCCTTTGTTGTCCATTGGGCTGCTCAACAATAAAAGCTTTT :	1140
P I R I Q S *	PolyA Signal site : 332
AAAATCTGGGCCCCATCTACTATATGGGTCACCAATAGTATCAAGTTAGCAAGAGAACA :	1200
ATTCTTCTCCTTGTCTTTTAAAAAAAAGAAAAAAA	: 1243
PolyA	

* The ORF of CCR was translated and shown under the codon, the PolyA signal site "AATAAA"and PolyA were indicated with underline, the degeneration primer were indicated with bold.

图 2 白花泡桐 CCR mRNA 全序列

Fig. 2 The complete sequence of CCR mRNA



* PF, *Paulownia fortunei* (Seem.) Hemsl. (gi|187609478) LE, *Lycopersicon esculentum*. (gi|65306612) ST, *Solanum tuberosum*. (gi|25140434) PT, *Populus trichocarpa*. (gi|9998901)

图 3 白花泡桐 CCR 氨基酸序列同其他物种的比较

Fig. 3 The amino acid sequence alignment of CCR between some species

参考文献:

[1] 叶金山,胡伟华,谢青,等. 白花泡桐无性系自然接干性状的遗传变异研究[J]. 西北林学院学报,2008, 23(5): 74-78.
YE J S, HU W H, XIE Q, *et al.* Genetic variation of natural Stem-join characters of *Paulownia fortunei* clones[J]. Journal of Northwest Forestry University,2008, 23(5): 74-78.

[2] ANTEROLA A M, LEWIS N G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity [J]. Phytochemistry, 2002 , 61(3):221-294.

[3] KAWASAKI T, KOITA H, NAKATSUBO T, *et al.* Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2006 ,103(1):230-235.

[4] BALTAS M, LAPEYRE C, BEDOS-BELVAL F, *et al.* Kinetic and inhibition studies of cinnamoyl-CoA reductase 1 from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiol. Biochem, 2005, 43 (8):746-753.

[5] MA Q H, TIAN B. Biochemical characterization of a cinnamoyl-CoA reductase from wheat [J]. Biol. Chem, 2005,386 (6):553-560.

[6] KNUD L. Department of crop molecular cloning and characterization of cDNAs encoding cinnamoyl CoA reductase (CCR) from barley (*Hordeum vulgare*) and potato (*Solanum tuberosum*). [J]. J. Plant Physiol, 2004, 161(1):105-112.

[7] LAUVERGEAT V, LACOMME C, LACOMBE E, *et al.* Two cinnamoyl-CoA reductase (CCR) genes from *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during development and in response to infection with pathogenic bacteria [J]. Phytochemistry, 2001, 57(7):1187-1195.

[8] PICHON M, COURBOUL, BECKERT M, *et al.* Cloning and characterization of two maize cDNAs encoding cinnamoyl-CoA reductase (CCR) and differential expression of the corresponding genes[J]. Plant Mol. Biol, 1998,38(4):671-676.

[9] MA Q H. Characterization of a cinnamoyl-CoA reductase that is associated with stem development in wheat[J]. J. Exp. Bot, 2007,58(8):2011-2021.

[10] 薛永常,赵一玲,赵文超,等. 欧美杨 107 木质素生物合成酶 CCR 基因的克隆及其鉴定[J]. 辽宁林业科技, 2008(5): 18-21.
XUE Y C,ZHAO Y L,ZHAO W C, *et al.* Cloning and Identification of lignin biosynthesis CCR gene from *Populus×euramericana* cv. "74/76"[J]. Liaoning Forestry Science and Technology, 2008 (5):18-21.

[11] 姜春艳,黄峰. 木质素的研究进展 [J]. 山东林业科技,2006 (4):78-81.
JIANG C Y, HUANG F. Presence situation of research on lignin [J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2006(4):78-81.

[12] 李璐滨,刘蕾,何聪芬,等. 木质素生物合成关键酶基因的研究进展[J]. 分子植物育种, 2007,5(6):45-51.
LI L B, LIU L, HE C F, *et al.* Research progresses on the genes encoding the key enzymes in biosyn-thetic pathway of lignin [J]. Molecular Plant Breeding,2007,5(6):45-51.