

## 杜仲肉桂醇脱氢酶基因克隆及序列分析

刘卫平<sup>1</sup> 韩玉珍<sup>1</sup> 赵德刚<sup>2</sup>

(1. 中国农业大学 植物生理学与生物化学国家重点实验室,北京 100094;

2. 贵州大学 农业生物工程重点实验室,贵阳 550025)

**摘要** 以杜仲一叶一心期幼叶为材料,提取总 RNA,采用 RT-PCR 技术分离得到 498 bp 核苷酸片段,此核苷酸片段与 GenBank 中的苹果树肉桂醇脱氢酶(CAD)基因序列有 64.1%的同源性,与桉树 mRNA CAD 有 63.9%的同源性。所克隆的 cDNA 编码 165 个氨基酸残基,其序列与苹果树 CAD 相应片段有 68.5%的同源性,与桉树 mRNA CAD 相应片段有 66.1%的同源性。推测克隆的核苷酸片段为杜仲 CAD 的基因片段。

**关键词** 杜仲;肉桂醇脱氢酶;木质素;序列分析

中图分类号 Q 943.2

文章编号 1007-4333(2003)01-0027-04

文献标识码 A

### Cloning of cDNA encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucommia ulmoides* Oliv

Liu Weiping<sup>1</sup>, Han Yuzhen<sup>1</sup>, Zhao Degang<sup>2</sup>

(1. State Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, China Agricultural University; Beijing 100094, China;

2. Agricultural Bioengineering Laboratory, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

**Abstract** Cinnamyl alcohol dehydrogenase catalyses the conversion of p-hydroxy-cinnamaldehydes to the corresponding alcohols and is considered as a key enzyme in lignin biosynthesis. In this study, a cDNA fragment of cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) was cloned from *Eucommia ulmoides* Oliv by RT-PCR. As deduced from the 498 bp cDNA nucleotide sequence, it presented 68.5% identity with *Malus domestica* putative CAD and 66.1% identity with *E. gunnii* mRNA for CAD. These results suggest that the cDNA fragment is from CAD gene of *Eucommia ulmoides* Oliv.

**Key words** *Eucommia ulmoides* Oliv; cinnamyl alcohol dehydrogenase; lignin; DNA sequence

肉桂醇脱氢酶(CAD)是催化木质素前体合成的最后一步的酶,催化对香豆醛转变为对香豆醇的反应<sup>[1,2]</sup>,因此通过降低或提高 CAD 活性,可减少或增加木质素的合成<sup>[3,4]</sup>。

木质素是以苯丙烷衍生物为单位以醚键或碳碳键连接构成的高分子物质,它不仅增强细胞的机械支持力或抗压强度,而且与富含羟脯氨酸糖蛋白(HRGP)一起作为结构屏障物保护细胞免受病原菌的侵害<sup>[5]</sup>。生产上,木质素含量高的木材有利于能源获取和获得高品质的木材,但在造纸工业中,木质素的存在不利于生产纸浆,必须进行木质素降解<sup>[6]</sup>。因此,克隆 CAD 基因并研究其表达调控机理,可以为调控木质素的生物合成机理奠定基础,具有重要的应用价值。本研究以杜仲为材料,通过

RT-PCR 技术克隆了杜仲 CAD 片段,为进一步克隆全长 CAD 基因和研究其表达特性奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

杜仲幼叶(一叶一心期)于4月中下旬取自中国农业大学校园成年树,置液氮中保存备用。

#### 1.2 总 RNA 的提取和 cDNA 第一条链合成

所有试剂和容器均作无 Rnase 处理,玻璃容器在 180 °C 烘箱中烘烤 4 h 以上,然后与塑料器皿一起用 0.1% DEPC 水在 37 °C 处理过夜,高温高压灭菌。称取液氮处理的 2 g 杜仲幼叶,冰浴条件下在研钵中加液氮研磨成粉末,用小量 GIBCO BRL (Trizol Kit) 提取 RNA,用 MBI 公司的 RevertAid™ First Strand

收稿日期:2002-06-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870644);农业生物技术国家重点实验室基金开放课题资助项目(991004-2)

作者简介:刘卫平,硕士研究生;韩玉珍,副教授,导师,主要从事植物发育生物学研究,E-mail:hyzhen@mail.cau.edu.cn

cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 第一条链。

### 1.3 引物设计与 PCR 扩增

我们根据已知植物肉桂醇脱氢酶基因序列保守性分析的数据,设计简并引物 CAD1:5' AYT CAT TTT A YC TBC CDG TKG C 3'; CAD2:5' CTC GAG CTA CTT YTG CCA CTT RTA 3'。其中 R = A, G; Y = T, C; B = C, G, T; K = G, T; V = A, C, G; D = A, G, T。引物由上海生工公司合成。

在灭菌的  $E_p$  管中建立 20  $\mu$ L 反应体系,依次加入下列组分:无菌水 10  $\mu$ L, 10 $\times$ 扩增缓冲液 2  $\mu$ L, dNTP(10 mmol L<sup>-1</sup>)0.4  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> (25 mmol L<sup>-1</sup>)1.2  $\mu$ L, CAD1 2  $\mu$ L, CAD2 2  $\mu$ L, 模板 cDNA 2  $\mu$ L, 94 $^\circ$ C 预变性 3 min, 加入 0.4  $\mu$ L (2.5 U) Taq DNA 聚合酶, 按以下程序进行扩增反应: 94 $^\circ$ C 1 min, 42 $^\circ$ C 1 min, 72 $^\circ$ C 1 min, 共 30 个循环, 72 $^\circ$ C 延伸 10 min。经 1% 琼脂糖电泳分离后回收所需 DNA 片段。

### 1.4 CAD 基因片段的克隆、鉴定及序列分析

参照 pGEM<sup>R</sup>-T easy Vector Systems 说明书,将回收的片段克隆到 pGEM<sup>R</sup>-T easy 载体上,转化大肠杆菌,通过蓝、白斑筛选方法筛选阳性菌落,用接种针将白色阳性菌落转移到新的含 Amp 的 LB 平板上划线培养,37 $^\circ$ C 倒置培养过夜。样品由上海博亚生物工程有限公司用 ABI Prism 377 测序仪进行序列分析。

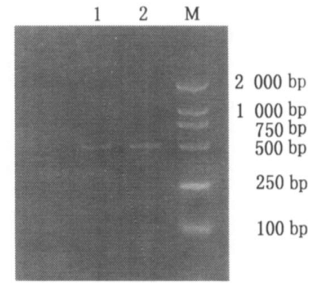
## 2 结果与分析

### 2.1 杜仲幼叶总 RNA 的提取

提取的杜仲幼叶总 RNA,经 1.0% 琼脂糖甲醛变性电泳检测,28S、18SrRNA 条带完整,宽度与亮度前者约为后者的 2 倍。紫外分光光度计测定其  $OD_{260}/OD_{280} = 1.90$ ,表明提取的总 RNA 完整性及纯度均良好,符合进一步实验要求。

### 2.2 PCR 扩增目的片段

以 CAD1 和 CAD2 为引物,以杜仲叶片 mRNA 反转录合成的 cDNA 第一链为模板,PCR 扩增 30 个循环,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,以 DNA Marker DL 2000 为分子量标准,电泳结果如图 1 所示,在 500 bp 左右有一明显的扩增条带,初步确定该条带为目的片段。



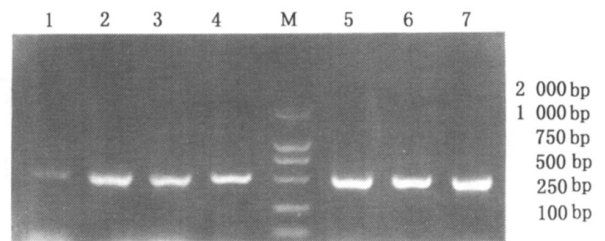
1, 2. PCR products;  
M DL 2 000 DNA markers

图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agrose electrophoresis of product of PCR

### 2.3 PCR 产物的克隆、阳性克隆的酶切鉴定和 PCR 分析

将 PCR 的产物经电泳回收后克隆到 pGEM<sup>R</sup>-T easy 载体上,转化 *E. coli* JM101。转化后将细菌在涂有 IPTG 和 X-gal 的 Amp LB 平板上 37 $^\circ$ C 培养。由于重组质粒中 -半乳糖苷酶基因已破坏,已转化的 JM101 细菌不能分解 X-gal,因而含重组质粒的菌落在培养板上呈白色。转化后获得 80 个白色克隆,随机选择 7 个菌落抽提质粒 DNA,以质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经电泳分析,产生 500 bp 左右的片段(图 2),证明这 7 个克隆可能是含有目的片段质粒的阳性克隆。其中任选 2 个质粒,用 *EcoR* 单酶切,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果产生 500 bp 左右的一个条带,进一步证明阳性克隆插入了目的片段。将此克隆命名为 pGCAD, 插入片段称为 CAD。



1~4, 6~7 为 recombinant PCR production;  
M 为 DL 2 000 DNA markers

图 2 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig. 2 Agrose electrophoresis of PCR product of recombinant

### 2.4 测序分析结果

对 pGCAD 质粒插入片段 CAD 的序列分析结果见图 3。通过与 GenBank 中已知基因序列比较表明,该核苷酸片段与苹果树肉桂醇脱氢酶(CAD)基因序列有 64.1% 的同源性,与桉树 mRNA CAD 有 63.9% 的同源性。所克隆的 cDNA 编码 165 个氨基酸残基,氨基酸序列与苹果属 CAD 相应片段有 68.5%

的同源性,与桉树 mRNA CAD 相应片段有 66.1% 的同源性(图 4),说明我们克隆的核苷酸片段为杜仲 CAD 的基因片段。

```

CT CGA GCT ACT TTT GCC ACT TGT AAC CCA CAG AAA GAT TTG ATT GAT CCT GCA 53
GTG AAG GGA TCA GTT AAT GIT CTT GGA TCA TGT GCT AAA TCC CCT TCT GTC AAA 107
AGG GIT GTC TTG ACA TCT TCA GTT GCT GCA GTT GCG ATC AAT TCC AGG CCA AAG 161
AAC CCT GAT GTG GTT GIT GAC GAG ACC TGG CAT TCT GAT GTC GAG TTT TGC ACG 215
CAA AGG AAG CTG TGG TAT GTG CTT TCA AAG ACA TTG GCT GAG GAT GCT GCC TGG 269
AAA TTC GCT AAA GAG AAA GGA CTT GAC TTG GTG ACT ATC AAC CCT GCA ATG GTT 323
ATC GGT CCT TTA TTG CAG CCA TCT CTC AAC ACA AGT GCT AGT GCA ATT CTT AAC 377
TTC CTA AAT GGG GCA AAG ACG TAT CCA AAT TCC TCG ATG GGG TGG ATC GAC GTG 431
AGGAAT GTT GCC AAT GCA CAT ATT CAG GCA TTC GAG ATT CCT TCG GCC ACC GGG 485
AGA TAA AAT GAG T                                     498

```

图 3 pGCAD 质粒插入片段 CAD 碱基序列

Fig 3 Nucleotide sequence of cinnamyl alcohol dehydrogenase gene-like from *Eucommia ulmoides* Oliv

<i>E. ulmoides</i>	.....R	1
<i>M. domestica</i>	.MSSGAGKVVCVTGASGYIASWLVKLLLRGQYTVKASIRDPNDPTKTEHLHALDGAQDR	58
<i>E. gunnii</i>	MSAAGGAGKVVCVTGASRYIASWLVKLLLRGQYTVKASVSRDPNDPKTEHLI.GLGDGAKDR	60
Consensus	.....r	
<i>E. ulmoides</i>	.....ATFATCNFQKDLIDFAVKGSVNVLGSCAKS	31
<i>M. domestica</i>	LQLFKANLLEEGSFDSAVEGCEGVFHTASPFYHDVTDPKAEILEPAVKGTILNVLNSCAKS	118
<i>E. gunnii</i>	LQLFKANLLEEGSFDPIVEGCAGVFHTASPFYHDVKDPPQAEILEPAVKGTILNVLKSCSKA	120
Consensus	.....p l pavkg nvl sc k	
<i>E. ulmoides</i>	FSVKRVVLTSSVAAVAINSRKNEDVVDETWHSVEVEFCTQRKLVWVLSKTLAEDA <del>AWKF</del>	91
<i>M. domestica</i>	PSIKRVVLTSSIAAVAYNGKERTEDVVDETWFTDPDVCKESKLVWVLSKTLAEDA <del>AWKF</del>	178
<i>E. gunnii</i>	PSLQRVVLTSSMAAVAYNRQERTFEVVVDES <del>WFS</del> DPDLQRQTNAWVLSKTLAEDA <del>AWKF</del>	180
Consensus	ps rvlvtss aava n p p vvde w d c wvlsktlaedaawkf	
<i>E. ulmoides</i>	AKKGLDVTINPAMVIGPLLQFSLN <del>TS</del> SAILN <del>FL</del> NGAKTYFNSSMGWIDVRI <del>VANAHI</del>	151
<i>M. domestica</i>	VKEKGLDVTINPAMVIGPLLQFTLN <del>TS</del> A <del>AVL</del> NVIK <del>CA</del> RTFN <del>AS</del> FGW <del>IN</del> KD <del>VANAHI</del>	238
<i>E. gunnii</i>	VKEKGLDVTINPAMVIGPLLQFTLN <del>TS</del> A <del>AVL</del> IGN <del>L</del> INGAP <del>TF</del> FN <del>AS</del> FGW <del>IN</del> KD <del>VANAHI</del>	240
Consensus	kek g d vtinpanvigpllqp lntsa a n ga t pn s gw v vanahi	
<i>E. ulmoides</i>	QAF <del>FI</del> PSATG.....R	162
<i>M. domestica</i>	QAF <del>FR</del> PTASGRYCLVERVAHFSEVVRILRELYPTLQLPEKCADDKPFVPTYQVSKEKAKS	298
<i>E. gunnii</i>	LAF <del>EV</del> PSASGRYCLVERIAHYSEIVRILRELYPSAQLPEKSADDKPFVPIYQVSKEKVKSS	300
Consensus	afe p a g	
<i>E. ulmoides</i>		
<i>M. domestica</i>	LGVEFIPLDVSLKETVESLKEKGFVN	324
<i>E. gunnii</i>	LGINYIPLQNLKETVESLKEKGFVK	326
Consensus		

图 4 杜仲与苹果树和桉树肉桂醇脱氢酶的氨基酸序列同源性比较

Fig. 4 Comparison of deduced amino acid sequence of CAD from *Eucommia ulmoides* Oliv with those from *Malus domestica* and *E. gunnii*

### 3 讨论

杜仲是我国特有的经济价值的树种,药用和胶用价值都很高,而且是优质木材<sup>[7]</sup>。关于杜仲 CAD 木质素合成调控机理未见报道。本研究根据苹果树、桉树、烟草等植物的 CAD 基因的保守域<sup>[8~10]</sup>设计相应的简并引物,利用 RT-PCR 技术克隆了杜仲 CAD 基因的 498 bp 片段,为进一步从杜仲 cDNA 文库中分离 CAD 全长基因并研究其表达特征及木质素合成的代谢调控提供了基础。

### 参 考 文 献

[1] Whetten R W, MacKay J J, Sederoff R R. Recent advances in understanding lignin biosynthesis [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 585 ~ 609

[2] Whetten R, Sederoff R. Lignin biosynthesis [J]. Plant Cell, 1995, 7: 1001 ~ 1013

[3] Vailhe B M A, Besle J M, Maillot M P, et al. Effect of downregulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase on cell wall composition and on degradability of tobacco stems [J]. J

- Sci Food Agric, 1998, 76:505 ~ 514
- [4] Halpin C, Knight ME, Foxon GA, et al. Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase [J]. Plant J, 1994, 6:339 ~ 350
- [5] 胡景江, 朱玮, 文建雷. 杨树细胞壁 HRGP 和木质素的诱导积累与其对溃疡病抗性的关系 [J]. 植物病理学报, 1999, 29:151 ~ 156
- [6] 胡新生, 韩一凡, 邱德有. 树木木质素含量的遗传变异研究进展 [J]. 林业科学研究, 1999, 12(6):563 ~ 571
- [7] 崔克明. 杜仲研究的历史、现状和展望 [J]. 西北林学院学报, 1994, 9:51 ~ 57
- [8] Knight M E, Halpin C, Schuch W. Identification and characterisation of cDNA clones encoding cinnamyl alcohol dehydrogenase from tobacco [J]. Plant Mol Biol, 1992, 19:793 ~ 801
- [9] Goffner D, Van Doorselaere J, Yahiaoui N, et al. A novel aromatic alcohol dehydrogenase in higher plants: molecular cloning and expression [J]. Plant Mol Biol, 1998, 36: 755 ~ 765
- [10] MacKay J J, Liu W, Whetten R, et al. Genetic analysis of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine: single gene inheritance, molecular characterization and evolution [J]. Mol Gen Genet, 1995, 247:537 ~ 545

## 科研简讯

### 我校在玉米基因改良领域创一项国际领先成果

2003年1月8日,农业生物技术国家重点实验室敖光明教授为首的课题组承担的“高蛋白质、高赖氨酸转基因玉米自交系和杂交组合的选育”通过北京市科委主持召开的课题成果鉴定,认为在玉米基因工程改良品质方面达到国际领先水平。该项研究在国家高技术研究发展计划和国家转基因研究与产业化专项资助下经7年研究,在国内外首次采用基因工程手段育成了18个转基因优质玉米自交系,其蛋白质含量占种子干重的13.2%~17.2%,赖氨酸含量占种子干重0.38%~0.46%。该项研究成果克服了常规育种中存在的赖氨酸和蛋白质不能同时提高的难题,所培育的优质玉米,主要性能指标已超过优质蛋白玉米,为优质玉米的培育探索了一条新途径。

### “仔猪益生乳酸杆菌菌种分离选育及其复合制剂的研制”达国际先进水平

2002年12月20日农业部组织有关专家对“仔猪益生乳酸杆菌菌种分离选育及其复合制剂的研制”项目成果进行了鉴定,认为总体达到国际先进水平。该项目是由中国农业大学农业部饲料工业中心李德发教授主持完成。项目以防治仔猪腹泻和促进生长性能为指标,采用均匀设计法优化不同部位乳酸杆菌的数量组合,确定了发酵条件,研制出生益复合乳酸菌制剂,对防治仔猪断奶腹泻和促进生长性能具有重要作用。以乳酸杆菌作为益生菌的生产菌种具有天然安全性。

### “高产奶牛高能高蛋白特种核心补充料——乳倍利”达国际先进水平

2002年12月20日农业部组织有关专家对“高产奶牛高能高蛋白特种核心补充料——乳倍利”项目进行了鉴定,该成果填补了我国奶牛养殖中功能性饲料的空白,达到国际先进水平。乳倍利在吸收和集成中国农业大学养牛教研室“八五”和“九五”期间主持的科技攻关项目“反刍动物非蛋白氮降解缓释技术”、国家自然科学基金重点项目“反刍动物能量转化规律及营养调控”等部分研究成果的基础上,利用中国农业大学农业部饲料工业中心饲料中试车间,经多次试验筛选,研制成功了一种高能高蛋白核心补充料。乳倍利综合考虑高产奶牛泌乳初期需要增加能量摄入的生产实际,创造性地将过瘤胃蛋白质、瘤胃降解氮和过瘤胃脂肪组合在一种产品中,为泌乳高峰期高产奶牛贮备和补充营养,有效地弥补奶牛产后的能量负平衡,维持较好体况,进一步延长奶牛的泌乳高峰期、提高产奶量。

(科技处供稿)