

文章编号: 1001-1498(2010)03-0319-07

毛竹木质素合成相关基因 *CAH* 的克隆及组织表达分析

金顺玉¹, 卢孟柱^{1,2*}, 高健¹

(1. 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102;
2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局森林培育重点实验室, 北京 100091)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE 技术, 从毛竹中克隆了 *CAH* 基因 cDNA 全长序列。该基因包含 1 506 bp 开放读码框, 编码 502 个氨基酸。与 NCBI 核酸和蛋白数据库中序列进行比对, 结果表明该基因与单子叶植物高粱、水稻和玉米中的 *CAH* 基因同源性较高, 分别达到 88%、88% 和 87%。经过荧光定量 PCR 分析, 该基因在毛竹不同发育时期和不同组织中表达丰度不同, 在冬笋中表达量最高, 其次为春笋顶部、中部、叶、3 年生茎、根、叶鞘、2 年生茎、春笋、1 年生茎, 而在春笋基部中表达最低。在笋顶部、中部的高水平表达表明本文克隆的 *CAH* 基因与发育时期维管组织的细胞壁加厚相关, 可以作为调控木质素合成的目标基因用于竹子基因工程改良。

关键词: 毛竹; 木质素; *CAH*; 荧光定量 PCR

中图分类号: S795 文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of the *CAH* Gene Involved in the Lignin Biosynthesis in *Phyllostachys edulis*

JIN Shun-yu¹, LU Meng-zhu^{1,2}, GAO Jian¹

(1. International Center of Bamboo and Rattan; Key Open Laboratory on Bamboo and Rattan Science and Technology, State Forestry Administration, Beijing 100102, China; 2. Institute of Forestry Research, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The full-length cDNA encoding *CAH* gene was cloned from 1-year-old moso bamboo seedlings cDNAs using RT-PCR and RACE methods. The whole open reading frame *CAH* gene was 1 506 bp encoding 502 amino acids. The amino acid sequence shared high similarity with the corresponding genes in monocots *Sorghum vulgare*, *Oryza sativa* and *Zea mays* at 88%, 88% and 87% level, respectively. Real time quantitative PCR showed that expression of *CAH* was the highest in winter-shoot, moderate in top-spring shoot, mid-spring shoot, leaf, 3-year-old stem, root, leaf sheath, 2-year-old stem, whole spring shoot and 1-year-old stem, the lowest in base-shoot. This indicated that the cloned *CAH* was involved in the cell wall deposition during the development of vascular tissues, thus could be used in modulation of bamboo lignin biosynthesis through genetic engineering.

Key word: *Phyllostachys edulis*; *CAH*; lignin; Real-time quantitative PCR

毛竹 (*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie) 在中国竹林中分布范围最广, 经济价值最高^[1], 它从出笋到成竹只需两个月左右, 其纤维含量达 30% ~ 35%, 纤维长度达 2 000 μm ^[2]。目前, 对竹子木质素

的化学结构及合成途径研究积累的数据较少。尽管竹子在亚热带地区被广泛用作造纸原材料, 但由于无法有效的去除木质素, 不仅降低了竹纤维素在造纸中的利用率^[3], 还影响纸浆的品质。采用基因工程方法

收稿日期: 2009-07-08

基金项目: 十一五国家科技支撑项目 2006BAD19B0203 和 863 项目 2006AA100109

作者简介: 金顺玉 (1980—), 女, 朝鲜族, 博士生, 主要研究方向: 竹子生物技术, E-mail: jinshunyu@icbr.ac.cn

* 通讯作者: 卢孟柱, 研究员, 博士生导师, 分子生物学方向, E-mail: lumz@caf.ac.cn

可以有效地对木质素含量加以改良,但分离木质素合成过程中的关键酶的编码基因是首要前提。

肉桂酸 4-羟基化酶 (cinnamate-4-hydroxylase, C4H) 与细胞色素 P₄₅₀ 单氧化酶相关,属于 CYP73 亚家族,是木质素单体合成的苯丙烷类代谢途径中的催化第二步反应的关键酶,其反应生成对-羟基香豆酸,与咖啡酸、阿魏酸、5-羟基阿魏酸和芥子酸以及 3 种木质素单体的合成及类型密切相关^[4-9]。目前已报道从杨树 (*Populus sp.*)、亚洲棉 (*Goss. pium arboretum* Linn.)、羽衣甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* f. *tricolor* Hort.) 等植物中克隆了 C4H 基因。通过调控 C4H 基因的表达,发现其受抑制后转基因植物的木质素含量、单体数量均显著减少,并对植物的正常生长、抗倒伏、抗病没有显著影响,是改良造纸植物制浆材性的有效途径^[10-15]。

本研究以毛竹为材料,克隆了 C4H 全长基因,并通过荧光定量 PCR 技术研究了不同发育时期、不同组织该基因的表达情况,为将来通过抑制竹材中 C4H 基因的表达,减少竹材中木质素的含量,造纸工业的高效生产,减少环境污染和能量消耗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 材料 克隆基因所用实验材料取自国际竹藤网络温室 1 年生毛竹实生苗;研究基因在不同竹子组织表达毛竹叶片、叶鞘、茎、根样品取自国际竹藤网络中心温室 1 年生实生苗,2 年和 3 年生茎段、春笋、冬笋取自中国林业科学研究院温室毛竹实生苗。

1.1.2 试剂 RNATrizol reagent 提取试剂购自 Invitrogen 公司;AMV 酶反转录试剂盒购自 Promega 公司;SMARTTM RACE 试剂盒购自 Clontech 公司;TaKaRa LA-Taq 酶购自 TaKaRa 公司;DNA 片段快速纯化/回收试剂盒购自北京鼎国生物公司;pGEM-T Easy 载体快速连接试剂盒购自 Promega 公司;Roche SYB Green 荧光定量 PCR 试剂盒购自罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成 采用 Trizol reagent 试剂盒提取毛竹实生苗的总 RNA,用 AMV 酶反转录试剂盒合成 cDNA。采用 SMARTTM RACE 试剂盒合成 5' 和 3' 末端 cDNA 片段。操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.2 基因的克隆与测序 通过 NCBI 数据库获得玉米 (*Zea mays* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.)、高粱

(*Sorghum vulgare* Pers.) 等禾本科 (Gramineae) 单子叶植物的 C4H 基因序列,根据该基因的保守序列设计 PCR 引物(表 1)。

表 1 实验中设计的引物

引物名称	引物碱基序列(5'-3')
PCR 上游引物	CCGGGAAGGGGAGGACATGGT
PCR 下游引物	GGCGTCGATGGGCTTGCAGACG
5' RACE GSP1 引物	CCGACGCATCTTGCGCCAGTGGTCCG
5' RACE GSP2 引物	CGAACACCA CGTTGCGGGTGC GGGAGCC
3' RACE GSP1 引物	CTCGCCGGCTACGACATCCCCGCGAGT
3' RACE GSP2 引物	AGCAGTGGGTGCGCCCCGACGAGTTCCG
Real-Time 上游引物	GCGCCGGCTGCAGCTGATGATGT
Real-Time 下游引物	AGGGGGCGGAGGACGGGGATGA

以毛竹实生苗 cDNA 为模板,采用 PCR 上游和下游引物配对进行扩增。PCR 反应体系 20 μ L: MQW 3.6 μ L, 2 \times GC-Buffer 10 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 3.2 μ L, cDNA 1 μ L, Forward Primer(10 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L, Reverse Primer(10 μ mol \cdot L⁻¹) 1 μ L, TaKaRa LA Taq(5U \cdot μ L) 0.2 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

5' 和 3' RACE 的反应体系和反应程序相同。初次 PCR 反应体系 20 μ L: 超纯水 3.2 μ L, 2 \times GC-Buffer 10 μ L, dNTP Mixture(各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 3.2 μ L, cDNA 1.4 μ L, 5' / 3' RACE GSP1 (10 mmol \cdot L⁻¹) 1 μ L, UPM(10 mmol \cdot L⁻¹) 1 μ L, TaKaRa LA Taq(5U \cdot μ L) 0.2 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环。接着 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环。然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 第二次 PCR 反应体系为 50 μ L: 超纯水 11.5 μ L, 2 \times GC-Buffer 25 μ L, dNTP Mixture(各 2.5 mmol \cdot L⁻¹) 8 μ L, 1 次 PCR 产物 1 μ L, 5' / 3' GSP2 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 2 μ L, NPM(10 μ mol \cdot L⁻¹) 2 μ L, TaKaRa LA Taq(5U \cdot μ L) 0.5 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

PCR 产物电泳分析后经 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒回收,按照 pGEM-T Easy 载体快速连接试剂盒操作流程,将回收的 DNA 片段连接到 T 载体上,转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers) DH5 菌株。经蓝白斑筛选,提取阳性克隆质粒并酶切分析后,进行单克隆测序。

1.2.3 荧光定量 PCR 选取 *-actin* 管家基因为内参,分别以毛竹 1 年生实生苗的根、茎、叶、叶鞘、2 年生茎、3 年生茎、春笋、冬笋的 cDNA 为模板,采用罗氏荧光定量 PCR 试剂盒并按照说明书中的 PCR 体系和程序在 LightCycler480 仪器中进行 PCR 扩增。定量 PCR 的反应体系 18 μL , 为:超纯水 4 μL , cDNA 1 μL , Real-Time 上游引物 ($2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , Real-Time 下游引物 ($2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , Mixer 9 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 69 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 10 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 69 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 45 个循环;最后 65 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

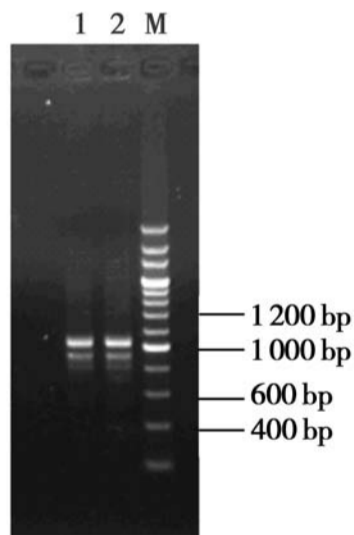
1.3 序列的生物信息学分析

利用 DNASTAR、SMART 等生物信息学软件分析 cDNA 序列及其编码蛋白质序列的结构特点,并与核酸和蛋白质数据库联网进行 blast 分析。

2 结果与分析

2.1 基因保守区片段的克隆与分析

用合成的 cDNA 作模板,采用设计的 *CAH* 基因特异引物扩增保守片段。将 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳后 EB 染色。结果如图 1 所示,PCR 产物在 1 000 bp 以上处有一条亮带,与预测的基因片段相符,初步确定为目的基因片段。



1, 2: PCR 产物; M: 200 bp DNA Ladder Marker

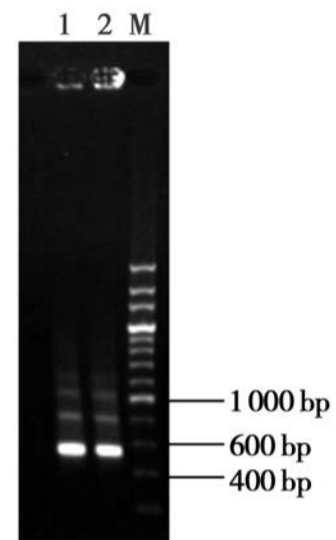
图 1 PCR 扩增产物电泳检测

用胶回收试剂盒回收 PCR 产物,并与 pGEM-T Easy 载体连接,转化后得到阳性克隆进行测序,结果表明插入片段为 1 089 bp。应用 DNASTAR 软件和 Blast 在线软件,对该序列在 NCBI 数据库中与已经报道的基因序列进行同源性比较,表明与 *CAH* 基因家族有着较高的同源性,确定该基因为毛竹 *CAH* 基因片段。

2.2 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增基因全长

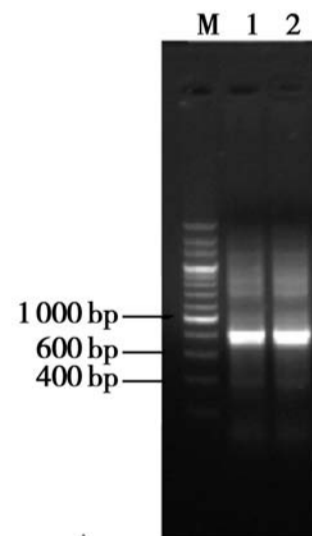
利用 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增来获得包括基

因全长的 cDNA。根据测序克隆片段的序列设计了该序列上游 5' 和下游 3' RACE 引物(表 1),分别与 SMARTTM 试剂盒通用引物 (UPM) 和巢式引物 (NPM) 配对进行扩增。5' RACE 引物和 UPM 的 PCR 产物在 500 bp 位置有一条亮带(图 2)。将该 PCR 产物回收并与载体连接后转化,经蓝白斑筛选,挑单克隆摇菌后测序,得到 464 bp 的插入片段。与 NCBI 数据库中 *CAH* 基因序列比对结果表明是该基因序列的一部分,并含有起始密码子。3' RACE 引物和 UPM 的 PCR 产物在 800 bp 位置有一条亮带(图 3),将 PCR 产物回收并与载体连接后转化,经蓝白斑筛选,挑单克隆摇菌后测序。插入片段为 907 bp,与 NCBI 数据库中 *CAH* 基因序列 Blast 亦表明是 *CAH* 基因序列的一部分,并含有终止密码子。



1, 2: PCR 产物; M: 200 bp DNA Ladder Marker

图 2 通用引物和 5' RACE 引物 PCR 产物电泳检测



1, 2: PCR 产物; M: 200 bp DNA Ladder Marker

图 3 通用引物和 3' RACE 引物 PCR 产物电泳检测

2.3 *CAH* 基因的核苷酸序列分析

将 *CAH* 基因的核酸和氨基酸序列输入到 MatchCode 软件中,得到该基因的核酸和编码氨基酸的对应关系(图 4)。毛竹 *CAH* 基因 cDNA 序列全长 1 746 bp,从第 71 bp 开始有一个开放读码框,第 1 577 bp 处有终止密码子,共编码了 502 个氨基酸。

```

1  ACGCAGAGTACGCGGGACAGCGCAACACACGAGAGAGTGAAGAGGCGGTTTCACACCOCCGGCGOCATGGACCTTCTCTTCTG
                                                                M D L L F L
90  GAGAAGCTCCTCCTCGGCCTCTTOGCGTCGCGGTGGTOGCGATGOGG TGTOCAAGATCOGCGGCOGTAAGCTOOGGCTGOCGCOGGA
    E K L L L G L F A S A V V A I A V S K I R G R K L R L P P G
180  CCOCTCGOCGTGOCATCTTCGGCAACTGGCTGCAGGTGGGOGAOGAOC TCAACCAOCGGAGCCTGACGGCGCTGGCOGCAAGTTOGGA
    P L A V P I F G N W L Q V G D D L N H R S L T A L A R K F G
270  GAGATCTTCTCCTCOGCATGGGOCAGCGCAAOCTGGTGGTGG TGTOCTOCCOCCOCTGGOGOGCGAGGTGCTCCACACGCAGGGOGTG
    E I F L L R M G Q R N L V V V S S P P L A R E V L H T Q G V
360  GAGTTCGGCTCCOGCACCOGCAAOCTGGTGTTOGACATCTTCAO GGGCAAGGGCCAGGACATGGTGTTCACOGTGTACGGOGACCACTGG
    E F G S R T R N V V F D I F T G K G Q D M V F T V Y G D H W
450  CGCAAGATGOGTOGGATCATGACGGTGOCCCTTCTTCACGAACAAGG TGGTGGOGCAGAACOGCGOCCGGCTGGGAGGAGGAGGCOGGCTG
    R K M R R I M T V P F F T N K V V A Q N R A G W E E E A R L
540  GTGGTGAAGGACGTGOGGOGCAAOCCGGCGGGCGACGGAGGGOG TOG TGATCOGGOGCOGGCTGCAGCTGATGATGTACAAOGACATG
    V V K D V R R N P A A A T E G V V I R R R L Q L M M Y N D M
630  TTCCGGATCATGTTGACOGGOGGTTGAGAGOGAGGAOGAOCOC TCTTCAACAAGCTCAAGGOGCTCAAOCCGAGOGCAGCOGCTC
    F R I M F D R R F E S E D D P L F N K L K A L N A E R S R L
720  TOGCAGAGCTTCGAGTACAATAOGGTACTTCATOCOCGTCTOCGOC COCTCCCTCCGCOCTTACCTCAAOCCGTGOCACOCAGCTCAAG
    S Q S F E Y N Y G D F I P V L R P L L R R Y L N R C H Q L K
810  AOCGGAGGATGAAGGCTTCGAGGATCACTTOGTOCAGGAGCGCAGGAAGCTGATGACAGAGAGTGGTGAGATCAGGTGOGCCATGGAC
    T R R M K V F E D H F V Q E R R K L M T E S G E I R C A M D
900  CACATCCTGAGGOCGAGAGGAAGGGOGAGATCAAOCAOGACAAGCOOCTTACATOGTCGAGAACATCAAOCTGGCAGCCATOGAGACG
    H I L E A E R K G E I N H D N A L Y I V E N I N V A A I E T
990  AOCGTG TGG TOGATCGAG TGGGGCATOGCGGAGCTGGTGAACCAOCCOGGOCATCCAG TOG AAGCTCOGCGAOGAGCTOGCGGCOGTGCTG
    T L W S I E W G I A E L V N H P A I Q S K L R D E L A A V L
1080  GGCCCCGGCGOGGCGGTGAOGGAGOCGGAOCTGGAAOCCOCTCOCTAOC TGCAGGOGG TGGTGAAGGAGACGCTCOGOCTOCCATGGCG
    G P G A A V T E P D L E R L P Y L Q A V V K E T L R L R M A
1170  ATCCCTCTCCTCGTCCOGCACATGAAOCTCAAOAGGCTAAGCTOGCOGGCTACGACATCOCCGOCGAGTCCAAGATOCTOCTCAAOGCC
    I P L L V P H M N L N E A K L A G Y D I P A E S K I L V N A
1260  TGGTTCCTCGOCAAACGACOOCAAGCAGTGGGTGOGOOCCOAGAGTTOCGGCOGGAGCGATTCTTGAGGAGGAGAAGGCOGTCAAGGCG
    W F L A N D P K Q W V R P D E F R P E R F L E E E K A V K A
1350  GACGGCAACGACTTCOCTTCGTGOCCTTOGGOGTOGGCOGGCGGAGCTGOCOGGGGATCATCTGGOGCTGOCATCATOGGCATCACG
    D G N D F R F V P F G V G R R S C P G I I L A L P I I G I T
1440  CTGGCAGCCTGGTTCAGAGCTTOCAGCTGCTGOCGOCGOCGGGGCAGGACAAGATOGACAOCAOCCGAGAAGOOCCGACAGTTCAGCAAC
    L G S L V Q S F Q L L P P P G Q D K I D T T E K P G Q F S N
1530  CAGATCCTCAAGCACGCCAOCCGTOGTTCGCAAGOCGCTOGAGGOGTAGAATCTTACCTAAOAGAGGTTGCCTGCATACAGAGAGATOGA
    Q I L K H A T V V C K P L E A
1620  TOCAAGCTCTCTGTAGTTTGCATTTTGTGTTTTOGTACGTATGTTGCATTTTGTGTTGATGTTGAGTGTGGGGTATGTGCCTGTGAGACA
1710  TGCTGTTGTAGATGTACTTAATTGGTGTGTTGGTGAACCTTCTTGGTAATTTATAATG TGG TAGCATTTTCATTTAAAAAAAAAAAAA

```

图 4 毛竹 *CH* 基因的序列

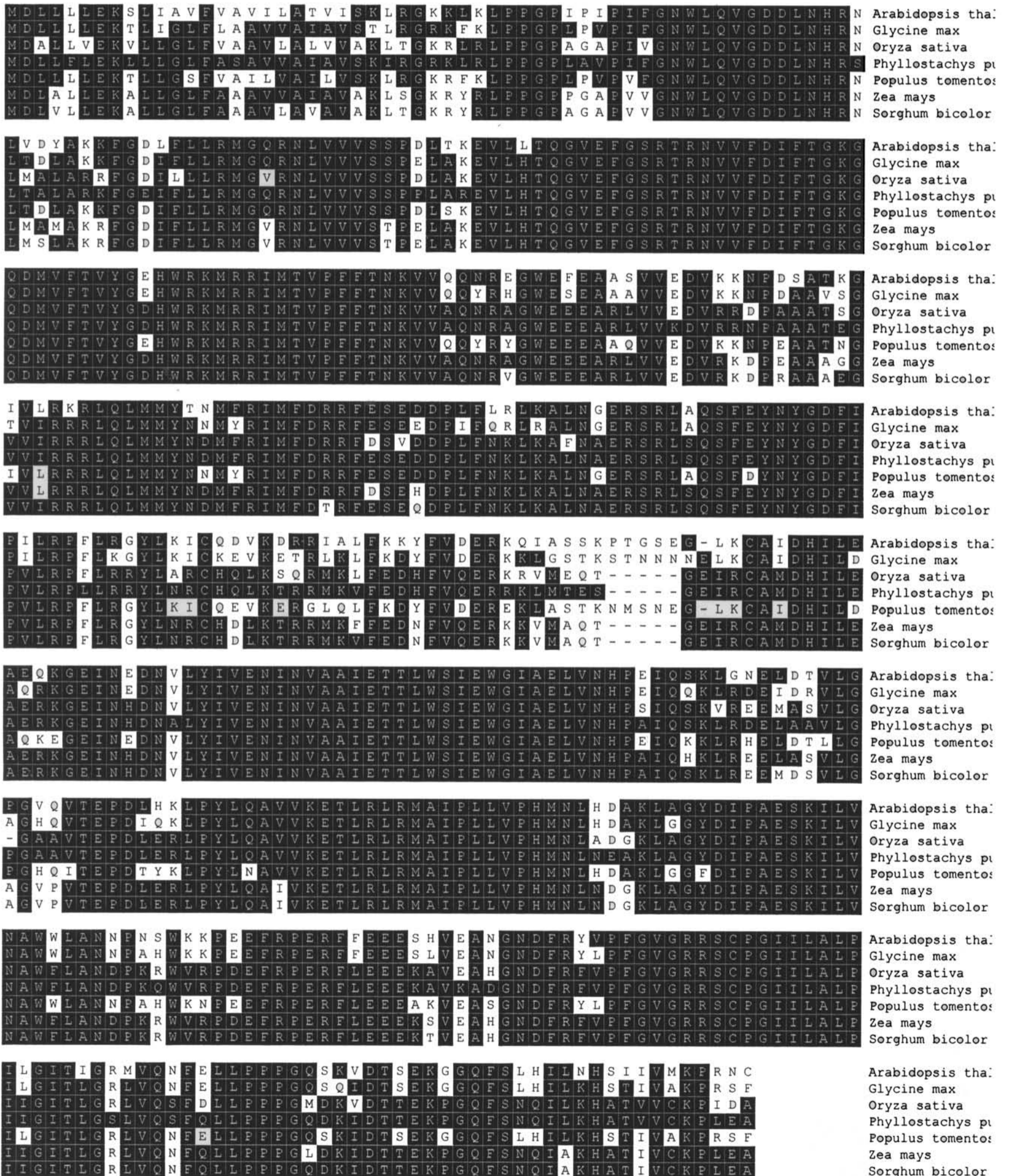
将本文克隆的毛竹 *CH* 基因核酸序列与 NCBI 核酸数据库中的其他物种的 *CH* 基因核酸序列进行比对, 结果表明与高粱中 *CH* 基因 ([bj|AK251894.1](#)) 序列一致性最高, 为 88%; 其次是水

稻 ([bj|AB207105.1](#)), 为 88%; 再次是玉米 ([b|EU962294.1](#)), 序列一致性为 87%; 与大豆 (*Glycine max* (Linn.) Merr.) ([mb|X92437.1|GMCYP73](#)) 序列一致性为 74%。

2.4 *CAH* 基因氨基酸的序列分析

将该基因的蛋白序列通过在 SMART 网站进行分析,表明该基因属于细胞色素 p450 酶, CYP73 亚家族中一员。通过 DNASTar 软件将 NCBI 蛋白质数据库中拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)、大豆、水稻、毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr.)、玉米、高粱的 *CAH* 氨基酸序列与本实验所得到的毛竹 *CAH* 氨基酸序列进行比对(图 5), 得到该基因与其他物

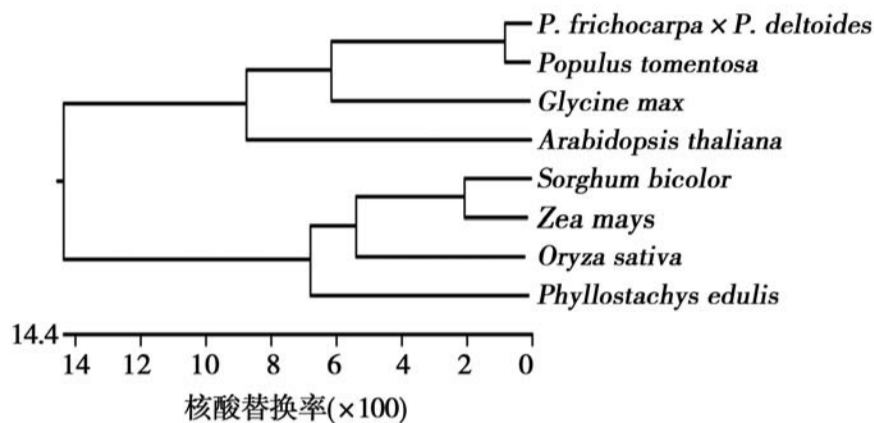
种的氨基酸序列一致性比较得分在 438 ~ 904 之间, 得分最高的是高粱 (b|AAK54447.1), 与毛竹基因序列一致性为 87%; 其次是水稻 (b|AAV44089.1) 和玉米 (b|ACG34412.1), 序列一致性均为 87%; 再次是大豆 (mb|CAA63172.1) 序列一致性为 78.4%; 而与毛白杨 (b|EEE95897.1) 的一致性为 77%; 与拟南芥 (mb|CAP08828.1) 一致性为 76%; 与烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) (b|



阴影部分为氨基酸保守区域, 白色部分为差异区

图 5 毛竹 *CAH* 基因编码的氨基酸与其他植物 *CAH* 编码的氨基酸序列的比较

AAK62344.1)的序列一致性为65%。从构建的不同物种 *CAH* 基因的系统进化树(图6)可看出与毛竹 *CAH* 基因亲缘最近的是单子叶同科的水稻,其次是高粱和玉米;与模式植物拟南芥、双子叶的大豆、木本的杨树还是有较大的差异。这与核酸比对的结果基本一致(图6)。图中显示虽然单、双子叶物种该基因序列有很大的不同,但在单子叶植物中竹子与水稻等单子叶植物有很高的同源性。



系统树每一分支由上至下顺序是:毛果杨 x 美洲黑杨;毛白杨;大豆;拟南芥;高粱;玉米;水稻;毛竹

图6 基于不同植物 *CAH* 基因编码氨基酸序列构建的系统树

2.5 毛竹 *CAH* 基因组织特异表达分析

根据已知序列设计并合成荧光定量 PCR 反应所需引物,配对进行 PCR 扩增,获得 PCR 产物约为 200 bp(图7)。将 PCR 产物回收并与载体连接后转化,经蓝白斑筛选,挑单克隆测序,得到 177 bp 的插

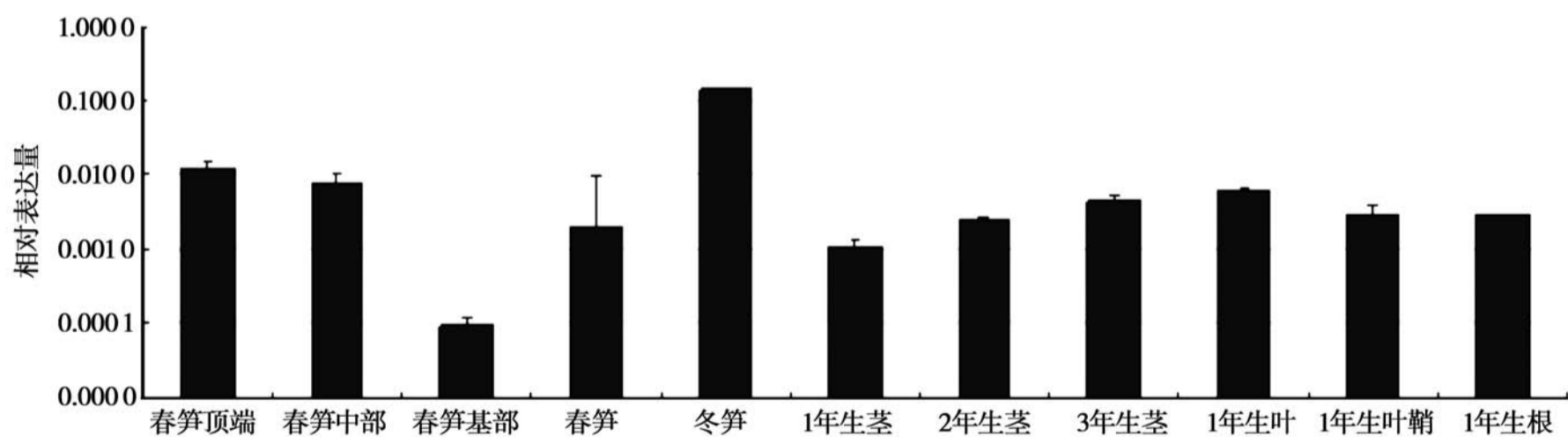
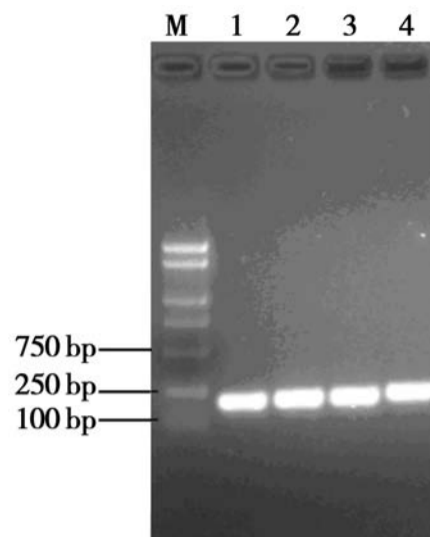


图8 *CAH* 基因 RT-PCR 相对定量分析

定量分析结果表明,1年生组织中 *CAH* 基因在笋中表达量最高,其次是叶片、叶鞘和根,表达量最少的是茎;随着竹龄的增加,茎中 *CAH* 的表达有所增加。在笋的不同部位 *CAH* 也有所不同,顶端和中部表达量较高,但基部的表达要比前两者低很多(图8)。*CAH* 的表达量相差最大的是冬笋和春笋的基部,前者为后者的 1 000 倍(图8),这可能是在温室中采集的冬笋实际上仍处于旺盛生长期。上述结果表明在笋处于高速生长时期 *CAH* 基因出现高表达。

入片段,与 NCBI 数据库中 *CAH* 基因序列 Blast 分析结果表明,是该基因的一部分序列。



1, 2, 3, 4: PCR 产物; M: 100 bp DNA Ladder Marker

图7 RT-PCR 引物扩增产物电泳检测

分别取国际竹藤网络中心温室前两年盆栽毛竹实生苗的叶片、叶鞘、茎、根,以及同盆前年毛竹实生苗的茎和同盆当年毛竹实生苗的茎段、当年的冬笋、当年的春笋作为样品。进行荧光定量 PCR 检测 *CAH* 基因的表达。上样时每个样品重复 3 次以增加数据的准确性。数据经仪器自带软件进行分析,得到了不同时期、不同组织的相对表达量(图8)。扩增峰值单一,产物的解链温度值均一,为 93.43 ,说明产物扩增具有特异性。

3 讨论

无论是核酸还是氨基酸序列的比对结果都显示,与毛竹 *CAH* 基因相似性最高的均是单子叶禾本科的高粱、水稻、玉米中的 *CAH* 基因,而与双子叶及木本等植物亲缘关系较远。可见禾本科内该基因比较保守,同源性可达到 87% 以上。由此为利用禾本科特别是水稻的基因组序列数据库来分离竹子基因提供了理论和技术途径,即先采用禾本科植物基因

的保守区设计引物,扩增保守片段,再利用 RACE 方法获得全长序列。虽然在禾本科内很保守,但在不同科之间,该基因的保守性并不高,同源性只有 50% 左右。这为利用该同源基因的进化来推断不同科属进化关系提供了依据。

木质素和纤维素是植物细胞壁的重要组成成分,植物木质化是木质素在植物细胞壁中积累的结果^[16-17]。竹笋处于竹子生命活动初期阶段,是快速生长中的茎。其居间分生组织经过细胞分裂、分化、伸长和木质化,实现竹笋的快速节间生长和加粗,短时间内完成竹的早期生长。紧随着笋下部细胞的增殖和伸长停止,细胞转为以细胞壁的沉积为主,而处于下部的细胞木质化减弱。在本实验中,*CAH* 基因在竹笋的上部与中部表达量相似而明显高于竹笋基部的表达量与竹笋顶部细胞壁加厚过程中伴随着木质素和纤维素的大量合成相一致。实验中还发现在 1 年生竹叶、叶鞘、根中的表达量高于茎,推测后者木质素合成较少。

木质素单体甲基化程度不同,产生不同类型木质素单体,拥有不同类型的连接键,使得在制浆造纸处理中断裂的难易程度不同,从而影响制浆造纸的脱木质素^[18]。紫丁香基木质素(S)与愈创木基木质素(G)单体数目的比值越高越有利于木质素与纤维素分离^[19]。有研究认为 *CAH* 可能与其它的酶形成多酶复合体来控制 S 型木质素的生成^[11-12]。因此,本研究采用 PCR 扩增结合 RACE 方法从竹子中分离了 *CAH* 基因,为应用基因工程技术,培育出木质素含量低、S/G 高,适于制浆造纸的新型竹种奠定了基础。

参考文献:

[1] 江泽慧. 世界竹藤[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社. 2002

[2] 马乃训, 张文燕. 竹材制浆造纸述评[J]. 林业科学研究, 1995, 8(3): 329 - 333

[3] 蒋身学. 竹材工业化利用研究与开发[J]. 林业科技开发, 2002, 16(3): 5 - 6

[4] Baucher M, Halpin C, Petit Conil M, et al. Lignin: genetic engineering and impact on pulping[J]. Critical in Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 38: 305 - 350

[5] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 519 - 546

[6] 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 Physiol, 2002, 128(2): 428 - 438

[7] Catherine L, Brigatte P, Michel P, et al. Structural alteration of lignin in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping[J]. Plant Physiology, 1999, 119: 153 - 163

[8] Franke R, McMichael C M, Meyer K. Modified lignin in tobacco and poplar plants overexpressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase[J]. Plant J, 2000, 22: 223 - 224

[9] Hugo M, Kris M, Catherinela P, et al. Modifications in lignin and accumulation of Phenolic Glucosides in poplar xylem upon down-regulation of Caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(47): 36899 - 36909

[10] Lotze M, Schroder G, Schroder J. Cinnamate 4-hydroxylase from *Catharanthus roseus*, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P₄₅₀ proteins as translational fusions with P₄₅₀ reductase in *Escherichia coli*[J]. FEBS Letters, 1995, 374, 345 - 350

[11] Blee K, Choi J W, O'Connell A P, et al. Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco[J]. Phytochemistry, 2001, 57: 1159 - 1166

[12] Sewalt V J H, Ni W, Blount J W, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase[J]. Plant Physiol, 1997, 115: 41 - 50

[13] Lu Shanfa, Zhou Yihua, Li Laigeng, et al. Distinct Roles of Cinnamate 4-hydroxylase Genes in *Populus*[J]. Plant and Cell Physiology, 2006, (47): 905 - 914

[14] 骆萍, 王国栋, 陈晓亚, 等. 亚洲棉 *CAH* 同源 cDNA 的分离和表达特征分析[J]. 植物学报, 2001, 43(1): 77 - 81

[15] 陈安和, 李加纳, 柴友荣. 羽衣甘蓝中一个突变型肉桂酸-4-羟化酶基因的克隆及分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(4): 915 - 922

[16] 丛斌, 杨茂成, 栗波, 等. 小麦根尖细胞分化过程中木质素合成及其相关酶的活性变化[J]. 复旦学报: 自然科学版, 1997, 36(5): 550 - 554

[17] Li J X, He X Q, Hu Y X, et al. Lignification and lignin heterogeneity for various age classes of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) stems[J]. Physiologia Plantarum, 2002, 114(2): 296 - 302

[18] 郭晓艺, 胡尚连, 曹颖, 等. 调控 S 木质素合成基因 F5H1 研究进展及对竹遗传改良的展望[J]. 福建林业科技, 2007, 34(3): 234 - 237, 243

[19] 王文久, 辉朝茂, 刘翠, 等. 云南 14 种主要材用竹化学成分研究[J]. 竹子研究汇刊, 1999, 18(2): 74 - 78