

文章编号: 1001-1498(2007)05-0722-04

绿竹咖啡酸-O-甲基转移酶基因 (COMT) 的克隆及相关分析

李雪平¹, 高志民¹, 彭镇华^{2*}, 岳永德¹, 高健¹, 蔡春菊¹, 牟少华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, 北京 100091)

摘要:采用 RT-PCR 及 RACE 方法从绿竹中分离了 COMT 基因家族的一个基因, 命名为 *BoCOMT1*。*BoCOMT1* 全长 1 377 bp, 编码一个 361 aa 的蛋白, 估计分子量为 39 kDa。*BoCOMT1* 与小麦的 TaCOMT、甘蔗的 SoCOMT、玉米的 ZnCOMT 和毛白杨的 PiCOMT 的氨基酸序列比对结果表明, *BoCOMT1* 与 TaCOMT 的氨基酸同源性最高, 达到 86.7%, 系统进化树的分析表明, *BoCOMT1* 与 TaCOMT 亲缘关系较近。RT-PCR 结果显示, *BoCOMT1* 在茎中的表达量约为叶中的 2 倍。

关键词:绿竹; 咖啡酸-O-甲基转移酶; 克隆

中图分类号: S795.5

文献标识码: A

Cloning and Characterization of COMT Gene from *Bambusa oldhamii*

LI Xue-ping¹, GAO Zhim-in¹, PENG Zhen-hua^{2*}, YUE Yong-de¹, GAO Jian¹, CAI Chun-ju¹, MU Shao-hua¹

(1. International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology,

State Forestry Administration, Beijing 100102, China; 2 Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China)

Abstract: A gene of COMT family was cloned by RT-PCR and RACE from *Bambusa oldhamii* and named *BoCOMT1*. *BoCOMT1*, with a full length of 1 377 bp, encoded a polypeptide of 361 amino acids with predicted molecular mass of 39 kDa. The results of amino acid sequence analysis showed that *BoCOMT1* had the highest similarity of 86.7% with TaCOMT, phylogenetic analysis showed that *BoCOMT1* is more related to TaCOMT. The expression level of *BoCOMT1* in stem is about two times as in leaf.

Key words: *Bambusa oldhamii*; Caffeic acid-3-O-methyltransferase; Clone

木质素是植物体中仅次于纤维素的一种重要的芳香族化合物, 通常占木材干质量的 15% ~ 36%^[1]。在造纸工业中, 除去木质素的化学处理对环境造成了极大的污染, 因此, 目前很重视利用生物技术来降低木材中的木质素含量及培育木质素含量低的植物新品种。目前, 科研人员对于木质素合成调控方面的研究集中在其合成过程中的各种生物酶上, 以单个基因的调控为主, 也有少数对 2 个或多个基因的调控进行研究^[2~4]。杨雪萍等^[2]将 4CL1 基因反向导入烟草

中, 获得了木质素含量较低的转基因植株; 赵华燕等^[3]将 COMT 和 CCoAOMT 同时反向导入烟草中发现, 反义抑制 COMT 与 CCoAOMT 的表达均使转基因植株的木质素含量下降, 2 个基因同时被抑制时, 降低幅度更大。据不完全统计, 至今已在杨树等 20 余种植物中克隆出了 100 多个不同的基因或 cDNA, 包括 CAD、C4H、CCR、COMT、CCoAOMT、PAL、4CL 等多个类别^[1]。COMT 是木质素合成过程中的关键酶之一, 在苯丙氨酸途径中, COMT 催化咖啡酸、5 羟基松柏醛和 5 羟基松柏醇甲基化分别生成阿魏酸、芥子醛和芥

收稿日期: 2007-04-09

基金项目: 国家林业局 948 项目 (2005-4-38, 2004-4-60), 国际竹藤网络中心青年基金项目 (115)

作者简介: 李雪平 (1975—), 女, 河北任丘人, 助研, 博士。

* 通讯作者。

子醇,参与 S 木质素的合成。COMT 已在很多植物中被分离和鉴定^[5,6],抑制 COMT 基因的表达导致了木质素含量的下降和成分的改变^[7-10]。绿竹属丛生竹类,是我国原产的造纸原料竹种之一,以此为材料进行木质素合成调节基因的研究具有重要的现实意义。本文作者从竹子中克隆了 COMT 基因并对其序列进行了相关分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2005 年 11 月从浙江温州取回绿竹 (*Bambusa oldhamii* Munro) 插穗,长约 60 cm,扦插在直径为 20 cm 塑料盆中,培养介质为混合土 (腐殖质土 蛭石 = 7 : 3),在国际竹藤网络中心温室中于 25 °C 培养,每天光暗培养时间为 16 h/8 h。

1.2 试剂

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自 Promega 公司,引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司完成,PCR 聚合酶购自 Takara 公司,RACE 试剂盒购自 Clontech 公司,回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司,测序由北京六合通经贸有限公司完成。

1.3 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取绿竹幼嫩的叶片和茎 0.1 g,液氮研磨,转入 Trizol 液中提取,然后以氯仿去掉蛋白,加异丙醇沉淀,以 75% 乙醇洗沉淀 1 次,最后溶于适量不含 RNA 酶的水中^[11]。然后以总 RNA 为模板,逆转录合成 cDNA。

1.4 简并引物的设计及 PCR 产物的克隆

根据玉米 (*Zea mays* Linn., Q06509)、水稻 (*Oryza sativa* Linn., AB122056) 和甘蔗 (*Saccharum officinarum* Linn., O82054) 中 COMT 基因的序列,利用 CODEHOP 软件设计简并引物。

正向引物: 5' - CGCCCCGGTGTGCAARTGGYT-NAC - 3',

反向引物: 5' - GATGAACTCGATGGCCANGCRTT - 3', PCR 反应体系为: cDNA (0.04 μg · μL⁻¹) 1 μL, 正向引物 (10 μmol · L⁻¹) 1 μL, 反向引物 (10 μmol · L⁻¹) 1 μL, dNTP (各 2.5 mmol) 3 μL, 2xBuffer 10 μL, Taq 酶 (5 U · μL⁻¹) 0.2 μL, 总体积为 20 μL。反应条件: 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 s, 共 35 个循环。将 PCR 产物克隆到 pGEM-T Easy 载体上并测序。

1.5 RACE 扩增

5' RACE 引物: GSP1 5' - GCTCTCCATGAGGAC-CTTGTCCTGG - 3'

NGSP1 5' - GAGGGCCAGGGCCGCCATGAGACG - 3'

3' RACE 引物: GSP2 5' - CACGGCAGGGTGA TCA TCGTGGAGT - 3'

NGSP2 5' - GGTGGCAAAGAGAGGTACGAGAGGG - 3'

通过巢式 PCR 进行 RACE 扩增。GSP1/2 与 URM 配对的第 1 轮 PCR 反应的条件为: 94 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 25 个循环。NGSP1/2 与 NURM 配对的第 2 轮 PCR 反应的条件为: 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 25 个循环。PCR 产物回收后连接到 pGEM-T Easy 载体上测序。

1.6 氨基酸序列比对与系统进化树的构建

以 BoCOMT1 的氨基酸序列为询问对象,通过 BLAST 程序,从 GenBank 中挑选出小麦 (*Triticum aestivum* Linn., AAP23942)、甘蔗、玉米和毛白杨 (*Populus tomentosa* Carr., AAF63200) 中的 COMT 基因序列,并通过 DNASTAR 软件 MegAlign 将这 4 个基因与 BoCOMT1 基因的氨基酸序列进行多序列比对分析。

1.7 RT-PCR 检测 BoCOMT1 基因的组织特异性表达

提取叶和茎的总 RNA,然后逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,用 actin 引物进行 PCR 反应,将模板用量调成一致。改用 BoCOMT1 基因的引物,用一致的模板量再进行 PCR 反应,所用引物为:

正向引物: 5' - ATGGGTTCACCCGCCGCGAC - 3'

反向引物: 5' - C TACTTGATGAACTCGATGCCCC - 3'

PCR 反应条件: 94 °C 1 min, 65 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环数为 30 个。

2 结果与分析

2.1 BoCOMT1 基因的克隆

通过简并引物 PCR 获得了一个约 750 bp 的片段,与预期的基因片段大小一致,回收后与 T 载体连接进行测序,测序结果通过 BLAST 程序在 GenBank 中进行对比。结果表明其 3' 和 5' 端都不完整,因此根据它的序列设计 3' 和 5' 端 RACE 引物,进行巢式 PCR,分别得到 1 个片段 (图 1)。将这 2 个片段测序后与通过简并引物扩增获得的片段拼接,去掉重叠部分,得到一个全长为 1 377 bp 的基因序列。在 GenBank 中的注册号为 EF495248。

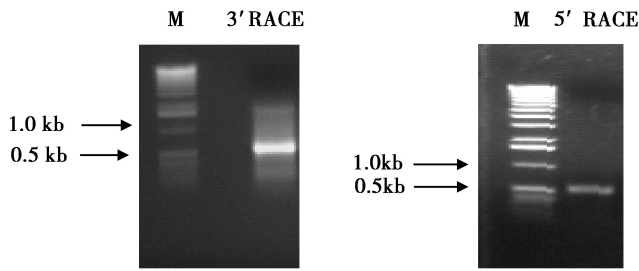


图 1 3'RACE和 5'RACE电泳分析图

2.2 *BoCOMT1* 基因的序列分析

BoCOMT1 基因序列如图 2 所示。基因全长 1 377 bp, 包含一个 1 083 bp 的读码框, 编码一个 361 aa 的蛋白, 分子量约为 39 kDa, 推测的等电点为 5.228。 *BoCOMT1* 的读码框中 (G+C) 的含量较高, 为 65.84%, 这是禾本科单子叶植物基因序列的特点^[10]。

```

1  GCTCACACCAAGAACACCCACTTCCTCCACACCACCAGCCGCGGAGAGATGGGTTC
                                     M G S
61  ACCGCCCGGATATGGCCGCGCGCGGACGAGGAGGCGTGCATGTACGCGATGCAGCTG
   T A A D M A A A A D E E A C M Y A M Q L
121  GCGTCGTCGTCGATCCTGCCGATGACGCTCAAGAACGCCATCGAGCTGGGCTGCTGGAG
   A S S S I L P M T L K N A I E L G L L E
181  ATCCTGGTGGGCGCGCGGGAACGCGTGTGCGCGCGGAGGTGGCGGCGCTGCTGCCG
   I L V G A G G N A L S P A E V A A L L P
241  TCCACGGCAACCCGGACGCGCGGCCATGGTGGACCGCATGTGCGGCTCCTGGCCTCG
   S T A N P D A P A M V D R M L R L L A S
301  TACAACGTCGTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG
   Y N V V S C V V E E G K D G R L S R R Y
361  GGCCCCGCGCGGTCGTGCAAGTGGCTCACCCCAACGAGGATGGCGTCTCCATGGCCGCC
   G P A P V C K W L T P N E D G V S M A A
421  CTCTGCCCTCATGAACCAGGACAAGGTCTCATGGAGAGCTGGTACTACCTGAAGGACGG
   L A L M N Q D K V L M E S W Y Y L K D A
481  GTCCTTGACGGCGCATCCCGTTCAACAAGGCGTACGGGATGACGGCGTTCGAGTACCGC
   V L D G G I P F N K A Y G M T A F E Y R
541  GGCACGGACCCGCGCTTCAACCGCGTCTTCAACGAGGGCATGAAGAACCACTCCATCATC
   G T D P R F N R V F N E G M K N H S I I
601  ATCACCAAGAAGCTCCTCGAATTCTACACCGGCTTCGACGGCGTCGGCACCCTCATCGAC
   I T K K L L E F Y T G F D G V G T L I D
661  GTCGGCGCGGCATCGGCGCCACCCTCTACGCCATCACCTCCAAGTACCACAAATAAAA
   V G G G I G A T L Y A I T S K Y P Q I K
721  GGCATCAACTTTGACCTCCCCACGTATCTCCGAGGCGCGCGGTTCCCGGGCGTGCAG
   G I N F D L P H V I S E A P P F P G V Q
781  CACGTCGGTGGCAACATGTTGAGAAGGTGCCCTCCGGCGACGCCATCCTCATGAAGTGG
   H V G G N M F E K V P S G D A I L M K W
841  ATCTCCACGACTGGAGTGACGAGCACTGCGCGACGCTGCTCAAGAAGTCTACGACGCG
   I L H D W S D E H C A T L L K N C Y D A
901  CTCCCGGCCACGGCAAGGTGATCATCGTGGAGTGCATCCTGCCGTTGAACCCGGAGCG
   L P A H G K V I I V E C I L P V N P E A
961  ACGCCAAAGGCGCAGGGGTGTTCCACGTCGACATGATCATGCTCGCACACAACCCGGC
   T P K A Q G V F H V D M I M L A H N P G
1021  GGCAAAGAGAGGTACGAGAGGGAGTTCGAGGAGCTCGCCGGGGCGCGGGTTCGCCAGC
   G K E R Y E R E F E E L A R G A G F A S
1081  GTCAAGCCACCTACATCTACGCCACCGGTGGGCCATCGAGTTCATCAAGTAGATCAAT
   V K A T Y I Y A T A W A I E F I K
1141  CCATCGATCAAGTCTCATCCTCCGAGGATGTGTGCGTTCGATCCAACAATGCTATGTCT
1201  TCTAGCACCTGAGAATTCCTCTTGTGTGCTGCTCCTGGCCGATTTGTACTTTAGCTTGGT
1261  TTCTGCTGGTCTCTCCTCCTAATTTCTCTGGTCTGAAGTATTGTTATTCTGAGTTC
1321  AATGGTTGTGTTAGTCTCGATATGTATCATAATAACTCAAGTTACATAAAT

```

图 2 *BoCOMT1* 的核酸序列及其推导出的氨基酸序列 (加框部分为 RACE 引物)

2.3 氨基酸序列比较与系统进化树分析

BoCOMT1 基因与其它 4 个 *COMT* 基因的氨基酸

序列比对分析发现, *BoCOMT1* 与 *TaCOMT* 的氨基酸同源性最高, 达到 86.7%, 而与 *PtCOMT* 的氨基酸同

源性最低,为 62.5%。从整个氨基酸序列来看,5 端的保守性较 3 端要低一些。从图 3 看出,*B oCOM T1* 与禾本科的 *COM T* 基因亲缘关系较近,而与杨柳科的亲缘关系较远,这符合它在分类学上的地位。

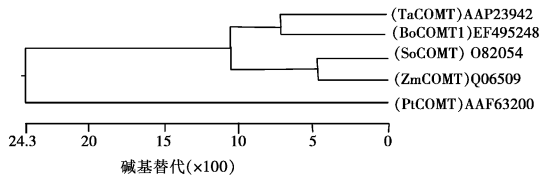


图 3 *B oCOM T1* 与其它植物的 *COM T* 基因氨基酸序列的系统进化树分析

2.4 *B oCOM T1* 基因的组织表达特异性分析

从绿竹的叶和茎中分别提取总 RNA,逆转录成 cDNA,用于 RT-PCR 扩增。以 cDNA 为模板,用 *actin* 引物进行 PCR 反应,将模板用量调成一致,茎和叶的 cDNA 用量分别为 1 μ L 和 4 μ L。在 cDNA 模板用量一致的基础上,以 *B oCOM T1* 的引物再进行 RT-PCR,结果如图 4 所示,*B oCOM T1* 在茎中的表达量较叶中高,大约是叶的 2 倍。

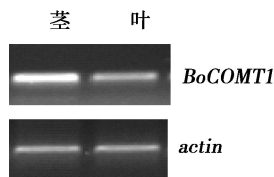


图 4 *B oCOM T1* 在不同组织中的表达特性

3 结论

COMT 是植物木质素合成过程中一个重要的甲基转移酶。研究已表明,抑制 *COM T* 基因的表达能改善转基因植株中木质素的组成或含量。在转基因烟草中,*COM T* 基因的抑制表达导致木质素下降了 35%^[7]。作者从竹子中克隆到了 *COM T* 基因,无论从核酸水平还是氨基酸水平来看,*B oCOM T1* 与已知的禾本科植物中的 *COM T* 基因有很高的同源性,而这些基因都不同程度地参与了木质素生物合成的调控,这说明 *B oCOM T1* 基因也可能参与了竹子木质素的生物合成过程,为研究竹子木质素的生物合成调控提供了可能。

B oCOM T1 基因在叶和茎中都有表达,且茎中的表达量要高于叶片。与叶片相比,茎需要更多的木质素来维持机械强度。从这个意义上说,*B oCOM T1* 基因在茎中的表达量高,这进一步说明了其参与木质素合成的可能性。基因表达与植物的发育期密切

相关,同一基因在不同的发育期表达量有显著差异,魏建华等^[12]发现毛白杨 *COM T* 基因的表达有明显的季节性,在晚材形成时有峰量表达,这与 *COM T* 基因的功能是一致的。据此推测,*B oCOM T1* 基因在不同季节的表达量可能有很大变化,这有待进一步的研究来证明。

总之,本文研究证明,*B oCOM T1* 基因可能是竹子 *COM T* 基因家族中的一个成员,且有可能参与了竹木质素的生物合成过程,但其作用底物或具体的功能尚不明确,有待深入研究。

参考文献:

- [1] Baucher M, Monties B, VanMontagu M, et al. Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1998, 12 (2): 125 ~ 197
- [2] 杨雪萍,陆海,陈雪梅,等. 反义 4CL1 基因转化烟草调控木质素生物合成 [J]. 北京林业大学学报, 2003, 25 (3): 1 ~ 5
- [3] 赵华燕,魏建华,张景昱,等. 抑制 *COM T* 与 *CCoAOM T* 调控植物木质素的生物合成 [J]. 科学通报, 2002, 47 (6): 604 ~ 607
- [4] 赵华燕,沈庆喜,吕世友,等. 水稻咖啡酰辅酶 A-O-甲基转移酶基因 (*CCoAOM T*) 表达特性分析 [J]. 科学通报, 2004, 49 (14): 1390 ~ 1394
- [5] Bugos R C, Chiang V L, Campell W H. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin bispecific caffeic acid 5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen [J]. Plant Mol Biol, 1991, 17 (6): 1203 ~ 1215
- [6] Dumas B, van Doorselaere J, Legrand M, et al. Nucleotide sequence of a complementary DNA encoding O-methyltransferase from poplar [J]. Plant Physiol, 1992, 98 (2): 796 ~ 797
- [7] Sewalt V, Ni W, Bount J H, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. Plant Physiol, 1997, 115 (1): 41 ~ 50
- [8] Lapierre C, Pollet B, Petit-Coril M, 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 Physiol, 1999, 119 (1): 153 ~ 164
- [9] Jouanin L, Goujon T, de Nadai V, et al. Lignification in transgenic poplars with extremely reduced caffeic acid O-methyltransferase activity [J]. Plant Physiol, 2000, 123 (4): 1363 ~ 1374
- [10] Campbell W H, Gowri G. Codon usage in higher plants, green algae and cyanobacteria [J]. Plant Physiol, 1990, 92 (1): 1 ~ 11
- [11] Gao Zhimin, Li Xueping, Li Lubin, et al. An Effective Method for Total RNA Isolation from Bamboo [J]. Chinese Forestry Science and Technology, 2006, 5 (3): 52 ~ 54
- [12] 魏建华,赵华燕,卢善发,等. 毛白杨 *COM T* 基因 cDNA 的克隆、序列与特异表达分析 [J]. 植物学报, 2001, 43 (3): 326 ~ 328