

棕肉桂酸-4-羟化酶基因及其启动子克隆与表达分析

王玉珍^{1,2}, 陈桂信^{1,2}, 赵利^{1,2}, 吕恃衡¹, 潘东明^{1,2}, 姜翠翠³

(1. 福建农林大学 园艺学院, 福建 福州 350002; 2. 福建农林大学 园艺产品贮运保鲜研究所, 福建 福州 350002;

3. 福建省农业科学院 果树研究所, 福建 福州 350013)

摘要:以不同发育时期的棕果实为试材, 采用两步法逆转录与抑制 PCR 技术相结合的方法构建均一化全长 cDNA 文库, 筛选出一条编码肉桂酸-4-羟化酶的全长 cDNA (命名为 *PsC4H*); 采用 APA-Walking 技术, 分离获得该基因的启动子序列; 采用实时荧光定量 PCR 技术, 检测该基因在棕果实不同发育时期的表达动态。结果表明: *PsC4H* 基因全长为 1 772 bp, ORF (Open Reading Frame) 为 1 515 bp, 编码 504 个氨基酸, 相对分子量为 145 719.6, 等电点为 4.94, 经序列同源性分析发现, *PsC4H* 氨基酸序列与李属果树高度同源; 经 PlantCare 软件预测, 棕 *PsC4H* 基因的启动子除具有 TATA/CAAT-box 外, 还含有 G-box、HSE 等特异作用元件; 实时荧光定量结果显示, *PsC4H* 在棕果实整个生长发育过程中呈下调-上调的表达趋势, 其中在成熟果中表达量最高。

关键词:棕; 肉桂酸-4-羟化酶; 启动子; 实时荧光定量 PCR

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0122-06

苯丙烷代谢途径是从莽草酸途径衍生的植物特有次生代谢途径, 是植物最重要的次生代谢途径之一。苯丙烷代谢途径包括木质素合成途径、黄酮类物质合成途径和原花青素特异合成途径, 可以产生多种具有重要生理功能的多酚类次生物质。苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和肉桂酸-4-羟化酶 (C4H) 分别催化苯丙烷代谢途径中的第 1 步和第 2 步反应。C4H 的底物和产物包括反式肉桂酸和 p -香豆酸都受到苯丙烷代谢途径中 PAL 和其它酶的调控。PAL 和 C4H 这 2 种酶通常以协同方式表达, 但是协同机理还不确定。

C4H 是细胞色素 P450 (CYP450) 单加氧酶超家族的一员, 它是第一个被鉴定的植物 CYP450 单加氧酶, 也是第一个既被克隆、又确定了功能的植物 CYP450 酶^[1-3]。植物受到辐射、机械损伤、诱导子诱导和真菌感染等刺激时, C4H 活性及基因表达发生变化, 使其在苯丙烷代谢途径中扮演着不同的角色^[4]。目前, 多种植物编码合成肉桂酸-4-羟化酶的基因已被克隆, 如拟南芥^[5-7]、大豆^[8]、杨树^[9-11]、油菜^[12]、杏、李^[13]、柑橘^[14]等。

该研究从已构建好的含不同发育时期的棕果实均一化 cDNA 文库中筛选得到一个 C4H 全长基因, 对该基因进行生物信息学分析及启动子克隆, 了解棕果实 C4H 基因的结构与功能, 这对从分子水平上探讨棕苯丙烷类次生代谢途径具有重要意义; 采用荧光定量 PCR 技术, 分析 *PsC4H* 基因在棕果实不同发育时期的表达模式, 以期为进一步研究该基因的表达调控机理、改变表达活性奠定工作基础。

第一作者简介:王玉珍 (1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向为果树生物技术。E-mail: wyzhenabcde@163.com.

责任作者:陈桂信 (1967-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为分子生物学与生物技术。E-mail: guixinchen@126.com.

收稿日期:2014-04-25

Abstract: The orthogonal design was used to optimize ISSR-PCR amplification system on *Anoectochilus roxburghii* in four levels of five factors (DNA template, *Taq* DNA polymerase, primer, Mg^{2+} , and dNTP) respectively. The results showed that a suitable ISSR-PCR reaction system was established, namely 25 μ L reaction system containing 40 ng DNA template, 1.60 U *Taq* DNA polymerase, 0.80 mmol/L primer, 0.96 mmol/L dNTP, 2.40 mmol/L Mg^{2+} . In conclusion, this established ISSR-PCR reaction system provide an available and reliable method for genetic diversity analysis and germplasm classification of *Anoectochilus roxburghii*.

Keywords: *Anoectochilus roxburghii*; ISSR-PCR; orthogonal design

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料采自福建省古田县一油棕果园,从幼果期到成熟期按大小将其分5个不同发育时期取样,分别标记为I(<20 g)、II(20~40 g)、III(40~60 g)、IV(60~90 g)、V(>90 g)。

1.2 试验方法

1.2.1 棕果实不同发育时期全长均一化 cDNA 文库的构建 采用郑鸿昌^[15] 两步法逆转录和抑制 PCR 技术,进行扩增棕果实不同发育时期的全长 cDNA,采用杂交与 DSN 处理相结合的方法构建均一化全长 cDNA 文库。

1.2.2 棕果实 *PsC4H* 基因筛选 通过 NCBI-BLAST 软件与 DNAMAN 软件对蔷薇科植物 *C4H* 基因的同源性进行比较,设计保守区引物,引物序列为:上游引物 C4HF;5'-CG(G/C/T)ATCATGAC(C/G)GT(C/T)CC(G/G/C/T)TTCTTCAC-3';下游引物 C4HR;5'-GGTTCAC(T/A)AGCTC(G/A/T)GCAAT(G/T)CCCCACTC-3'。采用稀释池 PCR 法,以 C4HF 和 C4HR 为上、下游引物,对文库逐步稀释、筛选获得一个阳性克隆。用全长通用引物 M13R(5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3')和 M13F(5'-GTAAAACGACGCCAGT-3')对筛选到的阳性克隆进行 PCR 扩增验证,并将对应的菌液送交上海博尚生物技术有限公司进行测序。

1.2.3 序列比对及生物信息学分析 将该序列通过在线 NCBI 的 blast 功能进行氨基酸序列同源性比较;通过在线软件 ProtParam、SOPMA 等进行生物信息学分析。启动子序列通过在线 PlantCARE 软件预测其顺式作用元件^[16]。

1.2.4 *PsC4H* 基因启动子的分离 根据棕果实 *C4H* 的 cDNA 序列设计3条巢式引物。GSPa-C4H;5'-CAGGATATGGTTCGATGGCGCACTTCAG-3';GSPb-C4H;5'-CTTCACATCCTCAACCACCGCCGCTG-3';GSPc-C4H;5'-AATAGTGATTGCGACGATGACGGC-3'。以棕叶为材料,采用改良 CTAB 法^[17],提取棕基因组 DNA。按照 Bio S&T Inc. 的 APA-walking 试剂盒的方法进行3轮 PCR 扩增。

1.2.5 PCR 产物纯化回收及克隆 将所得 PCR 产物纯化回收并克隆至 pMD18-T 载体(TaKaRa),16℃连接过夜后进行转化、测序。

1.2.6 荧光定量 PCR 表达分析 以棕不同发育时期果实总 RNA 为材料,分别提取不同时期的棕果肉 RNA,3个重复。参照 TaKaRa 公司 PrimerScript RT reagent Kit 逆转录成 cDNA,将反转录的单链 cDNA 稀释 10

倍,取 1 μL 作为模板,以棕 *tubulin* 基因作内参基因,参照 2×SYBR Prime Script™ RT-PCR Kit(TaKaRa)荧光定量试剂盒说明书进行荧光定量试验。内参基因引物:Nai-tubulinF 5'-TCGGATGATGATGACCTTCTCTGTG-3';Nai-tubulinR 5'-CATACACTCGTCTGCGT-TCTCCA-3'。目的基因引物:YG-C4HF 5'-TTCGGCT-GTTCAAGGACTACT-3';YG-C4HR 5'-TGGATCT-CAGGGTGGTTTCAACAAG-3'。

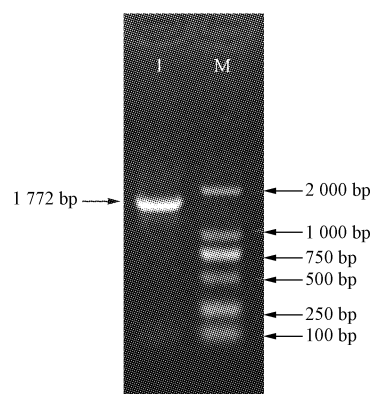
1.3 数据分析

试验数据通过 Bio-Rad Manager™(Version 1.1) 软件进行分析,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量,应用 SPSS 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *PsC4H* 的分离

根据蔷薇科物种的 *C4H* 基因序列设计引物。采用稀释池 PCR 筛选法从含棕果实不同发育时期的均一化全长 cDNA 文库中得到1个阳性克隆,对该阳性克隆用全长通用引物 M13R 和 M13F 鉴定,片段大小在 1 772 bp 左右(图 1)。



注:M;DL 2 000 Marker,下同;1. *PsC4H* 全长引物扩增。

Note:M;DL 2 000 Marker, the same below;1. Total length primer amplification of *PsC4H*.

图 1 棕 *PsC4H* cDNA 阳性克隆 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Amplification product of *PsC4H* cDNA positive clone of *Prunus salicina*

2.2 *PsC4H* 的序列分析

PsC4H 全长 cDNA 为 1 772 bp,其中 ORF(Open Reading Frame)为 1 515 bp,编码 504 个氨基酸,包括 1 个起始密码子(ATG)和 1 个终止密码子(TGA),有明显的 polyA 尾巴(图 2)。*PsC4H* 通过在线 ProParam 预测其相对分子量为 145 719.6,分子式为 $C_{527}H_{878}N_{177}O_{198}S_{421}$,等电点为 4.94,不稳定系数为 44.67,属于不稳定蛋白。SPOMA 分析结果表明,*PsC4H* 二级结构中,49.01%

```

1      AGTTCAACACTCGTTTACTTTCCACCCATAACTCATTTTCTCTCATCCGATTTTTCAT
61     CTGCCCACCGCCAAATCACTCGCCACACCCACAAAACCGGAATGACACTACTCTCT
1      M D L L L L
121    GGAAAAGACCTCCTGGGTCTCTTCATCGCGTCATCGTCGAATCACTATTTCGAAGCT
7      E K T L L G L F I A V I V A I T I S K L
181    CCGTGGCAAGCGGTTCAAGCTCCCGCCCGGTCCGATACCGTACCAGTTTTCGAAACTG
27     R G K R F K L P P G P I P V P V F G N W
241    GCTCCAGGTCGGCGACGACCTCAACCACCGGAACCTCACGACCTCGCGAAAAAGTTCGG
47     L Q V G D D L N H R N L T D L A K K F G
301    CGACATCTTCTCCTCCGATGGGCGAGCGCAATTGGTTGGTCTCGTCCCTGACCT
67     D I F L L R M G Q R N L V V V S S P D L
361    CGCCAAGGAGGTCTCCACACCCAGGCGTGAATTGGGTCGAGGACAGAAACGTCGT
87     A K E V L H T Q G V E F G S R T R N V V
421    GTTCGATATTTACCGGGGAGGGCCAGGATATGGTGTTCACGGTCTACGGTGAGCACTG
107    F D I F T G E G Q D M V F T V Y G E H W
481    GAGGAAGATGAGGCGGATCATGACCGTCTCTTCTCACTAACAAGTTCGTCAGCAGTA
127    R K M R R I M T V P F F T N K V V Q Q Y
541    TAGGCACGGCTGGGAATCGGAGGAGCGGCGTGGTTGAGGATGTGAAGAAGTACCGGG
147    R H G W E S E A A A V V E D V K K Y P G
601    GTCGCGACCAATGGGATGGTGTGCGGAGGCGGTGCAGCTGATGTACAACAACAT
167    S A T N G M V L R R R L Q L M M Y N N M
661    GTACCGGATTATGTCGATCGGAGGTTTCGAGAGGAGGAGGATCCTCTGTTTATGAAGCT
187    Y R I M F D R R F E S E E D P L F M K L
721    CAAGGGGTGAATGGGAGAGGAGCGGATGGCTCAGAGCTTCGATTACAATTATGGAGA
207    K G L N G E R S R L A Q S F D Y N Y G D
781    TTTTATCCCATTTTGAGGCCCTTCTTGAGAGGCTACTTGAAGATCTGCAAGAGGTCAA
227    F I P I L R P F L R G Y L K I C K E V K
841    GGAGAAGAGAATTCGGCTGTTCAAGGACTACTTGTGTGATGAACGGAAGAACTTTCAAG
247    E K R I R L F K D Y F V D E R K K L S S
901    CACAAAACGACAACAAATGAAGGACTGAAGTGCGCCATCGACCATCTCGGACGCTCA
267    T K T T T N E G L K C A I D H I L D A Q
961    GCAGAAGGAGAGATCAACGAGGACAACGTTCTTACATCGTCGAGAATATCAACGTGC
287    Q K G E I N E D N V L Y I V E N I N V A
1 021  TGCAATTGAAACAACACTATGGTCAATTGAGTGGGGGATTGCAGAGCTTGTGAACCAACC
307    A I E T T L W S I E W G I A E L V N H P
1 081  TGAGATCAAAAAGAGCTGAGGGATGAGCTTGACTCAGTGTGTCCTGGCCCTGGTGTCAAAT
327    E I Q K K L R D E L D S V L G P G V Q I
1 141  CACAGAGCCAGACATTCAGAAGCTTCCCTACCTCAAGCTGTGATCAAGAGACTCTCAG
347    T E P D I Q K L P Y L Q A V I K E T L R
1 201  GCTTCGCATGGCAATCCCATTTGCTTGCCACATATGAACCTCAACGATGCAAGGCTGGG
367    L R M A I P L L V P H M N L N D A K L G
1 261  CAGCTACGACATTCGCGCGAGAGCAAGATCCTGGTGAATGCATGGTGGCTGGCGAACA
387    S Y D I P A E S K I L V N A W W L A N N
1 321  CCCGCGCTCTGGAAGAAGCTGAGGATTTAGGCCAGAGAGGTTTTTGAGGAAGAGGC
407    P A L W K K P E E F R P E R F L E E E A
1 381  CAAGGTTGAGCCAATGGCAATGACTTTAGGTACCTTCCATTTGGTGTGGGAGAAGAAG
427    K V E A N G N D F R Y L P F G V G R R S
1 441  CTGTCCCGGATTATTTTGGCCCTGCCAATCCTTGGGATCACTTTGGGACGTTTAGTCCA
447    C P G I I L A L P I L G I T L G R L V Q
1 501  GAACTTTGAGCTCTTGCTCTCCAGGACAGTCCAGCTTGACACCACAGAGAAGGTGG
467    N F E L L P P P G Q S Q L D T T E K G G
1 561  GCAGTTGACCTGCACATTTGAAGCACTCCACCATTTGTGTTGAAGCCAAGGTCTAGAT
487    Q F S L H I L K H S T I V L K P R S
1 621  GTAATTGGTGAGGATGATGATTTTATTATGTCATAAGTGGATGGAATATGATAATT
1 681  AAAATGTGGGTTTGTGTGACAAATGAAATTTAGTGAAGCTTTTAAGACTTTTCAATAAA
1 741  GTATTTTCATTCTCTCCAAAAAAAAAAAAA

```

注:黑框标注的是起始密码子和终止密码子;下划线所标注的是 poly A。

Note: The black box marked the start codon and termination codon; the underline is marked by poly A.

图2 棕果实 *PsC4H* 全长 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 *PsC4H* full length cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *Prunus salicina* fruit

为 α 螺旋(247), 12.30% 为延伸链(62), 4.96% 为 β 转角(25), 33.73% 为无规则卷曲(170)。

根据得到的棕果实 *PsC4H* 的全氨基酸序列进

行 blast 分析比对, 其与杏 (*Prunus armeniaca*, GI: AEA02458.1) 和李 (*Prunus cerasifera* \times *Prunus munsoniana*, GI: AEA02459.1) 的相似度均高达 99%, 与苹

果 (*Malus domestica*, GI: AAY87450.1)、西洋梨 (*Pyrus × bretschneideri*, GI: AEK94316.1)、覆盆子 (*Rubus coreanus*, GI: ABX74779.1) 的相似度也非常高, 分别达到 94%、93%、93%。结果表明, 棕 *PsC4H* 与蔷薇科物种间的 *C4H* 基因同源性极高, 是一个高度保守的基因(图 3)。

2.3 启动子分离及顺式作用元件分析

第 2 轮巢式 PCR 电泳结果表明(图 4), 使用 DRT 随机引物 D 的扩增结果较好(约 750 bp), 将其克隆测

序, 结果得到上游启动子调控序列 779 bp。利用生物学数据库 PlantCARE 对该序列进行预测分析, 发现存在大量顺式作用元件。其中含有启动子基本作用元件 TATA-box 和增强子基本作用元件 CAAT-box, 还存在着一些光响应元件如 G-Box、G-box、GT1-motif、Gap-box、I-box、Sp1、rbcS-CMA7a, 胚乳表达相关元件 Skn-1 motif, 脱落酸相关元件 ABRE 及热激相关元件 HSE 等(图 5)。

<i>R. coreanus</i>	MDLLLEKTLGLFAAVVAITVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLQVGDDLNRNLTDMAKKF	65
pear	MDLLLEKTLGLFAAVVAITVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLQVGDDLNRNLTDMAKKF	65
apple	MDLLLEKTLGLFAAVVAITVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLQVGDDLNRNLTDMAKKF	65
apricot	MDLLLEKTLGLFAAVVAITVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLQVGDDLNRNLTDMAKKF	65
plum	MDLLLEKTLGLFAAVVAITVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLQVGDDLNRNLTDMAKKF	65
<i>PsC4H</i>	MDLLLEKTLGLFAAVVAITVSKLRGKFKLPPGPIPVVFGNWLQVGDDLNRNLTDMAKKF	65
<i>R. coreanus</i>	GEYFRLRMGQRNLVVVSSPLAKEVLHTQGVEFGSRTNRNVDFIFTGGQDMVFTVYGEHWRKMR	130
pear	GEYFRLRMGQRNLVVVSSPLAKEVLHTQGVEFGSRTNRNVDFIFTGGQDMVFTVYGEHWRKMR	130
apple	GEYFRLRMGQRNLVVVSSPLAKEVLHTQGVEFGSRTNRNVDFIFTGGQDMVFTVYGEHWRKMR	130
apricot	GEYFRLRMGQRNLVVVSSPLAKEVLHTQGVEFGSRTNRNVDFIFTGGQDMVFTVYGEHWRKMR	130
plum	GEYFRLRMGQRNLVVVSSPLAKEVLHTQGVEFGSRTNRNVDFIFTGGQDMVFTVYGEHWRKMR	130
<i>PsC4H</i>	GEYFRLRMGQRNLVVVSSPLAKEVLHTQGVEFGSRTNRNVDFIFTGGQDMVFTVYGEHWRKMR	130
<i>R. coreanus</i>	RIMTVPFFTNNKVVQYRYGWESEAAAVVEDVKKIPGATSGMVLRRRLQLMMYNNMYRIMFDRRF	195
pear	RIMTVPFFTNNKVVQYRYGWESEAAAVVEDVKKIPGATSGMVLRRRLQLMMYNNMYRIMFDRRF	195
apple	RIMTVPFFTNNKVVQYRYGWESEAAAVVEDVKKIPGATSGMVLRRRLQLMMYNNMYRIMFDRRF	195
apricot	RIMTVPFFTNNKVVQYRYGWESEAAAVVEDVKKIPGATSGMVLRRRLQLMMYNNMYRIMFDRRF	195
plum	RIMTVPFFTNNKVVQYRYGWESEAAAVVEDVKKIPGATSGMVLRRRLQLMMYNNMYRIMFDRRF	195
<i>PsC4H</i>	RIMTVPFFTNNKVVQYRYGWESEAAAVVEDVKKIPGATSGMVLRRRLQLMMYNNMYRIMFDRRF	195
<i>R. coreanus</i>	ESEEDPLFKLKLNGERSRLAQSFDYNYGDFIPLRPFLRGYLIKCEVKEKRIQLFKDYFVDE	260
pear	ESEEDPLFKLKLNGERSRLAQSFDYNYGDFIPLRPFLRGYLIKCEVKEKRIQLFKDYFVDE	260
apple	ESEEDPLFKLKLNGERSRLAQSFDYNYGDFIPLRPFLRGYLIKCEVKEKRIQLFKDYFVDE	260
apricot	ESEEDPLFKLKLNGERSRLAQSFDYNYGDFIPLRPFLRGYLIKCEVKEKRIQLFKDYFVDE	260
plum	ESEEDPLFKLKLNGERSRLAQSFDYNYGDFIPLRPFLRGYLIKCEVKEKRIQLFKDYFVDE	260
<i>PsC4H</i>	ESEEDPLFKLKLNGERSRLAQSFDYNYGDFIPLRPFLRGYLIKCEVKEKRIQLFKDYFVDE	260
<i>R. coreanus</i>	RKKLSSTKATTNEGLKCAIDHILDAQQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNH	325
pear	RKKLSSTKATTNEGLKCAIDHILDAQQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNH	325
apple	RKKLSSTKATTNEGLKCAIDHILDAQQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNH	325
apricot	RKKLSSTKATTNEGLKCAIDHILDAQQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNH	325
plum	RKKLSSTKATTNEGLKCAIDHILDAQQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNH	325
<i>PsC4H</i>	RKKLSSTKATTNEGLKCAIDHILDAQQKGEINEDNVLYIVENINVAAIETTLWSIEWGIAELVNH	325
<i>R. coreanus</i>	PEIQKKLRDELDTVLGRGVQTEPDVVKLPYLQAVVKETLRLMAIPLLVPHMNLDAKLGSGYDI	390
pear	PEIQKKLRDELDTVLGRGVQTEPDVVKLPYLQAVVKETLRLMAIPLLVPHMNLDAKLGSGYDI	390
apple	PEIQKKLRDELDTVLGRGVQTEPDVVKLPYLQAVVKETLRLMAIPLLVPHMNLDAKLGSGYDI	390
apricot	PEIQKKLRDELDTVLGRGVQTEPDVVKLPYLQAVVKETLRLMAIPLLVPHMNLDAKLGSGYDI	390
plum	PEIQKKLRDELDTVLGRGVQTEPDVVKLPYLQAVVKETLRLMAIPLLVPHMNLDAKLGSGYDI	390
<i>PsC4H</i>	PEIQKKLRDELDTVLGRGVQTEPDVVKLPYLQAVVKETLRLMAIPLLVPHMNLDAKLGSGYDI	390
<i>R. coreanus</i>	PAESKILVNAMLANNPALWKKPEEFRPERFLEESKVEANGNDFRYLPFGVGRRCSPGIILALP	455
pear	PAESKILVNAMLANNPALWKKPEEFRPERFLEESKVEANGNDFRYLPFGVGRRCSPGIILALP	455
apple	PAESKILVNAMLANNPALWKKPEEFRPERFLEESKVEANGNDFRYLPFGVGRRCSPGIILALP	455
apricot	PAESKILVNAMLANNPALWKKPEEFRPERFLEESKVEANGNDFRYLPFGVGRRCSPGIILALP	455
plum	PAESKILVNAMLANNPALWKKPEEFRPERFLEESKVEANGNDFRYLPFGVGRRCSPGIILALP	455
<i>PsC4H</i>	PAESKILVNAMLANNPALWKKPEEFRPERFLEESKVEANGNDFRYLPFGVGRRCSPGIILALP	455
<i>R. coreanus</i>	ILGITGRLVQNFELLPPPGQSLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVKPR	503
pear	ILGITGRLVQNFELLPPPGQSLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVKPR	503
apple	ILGITGRLVQNFELLPPPGQSLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVKPR	503
apricot	ILGITGRLVQNFELLPPPGQSLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVKPR	503
plum	ILGITGRLVQNFELLPPPGQSLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVKPR	503
<i>PsC4H</i>	ILGITGRLVQNFELLPPPGQSLDTTEKGGQFSLHILKHSTIVKPR	503

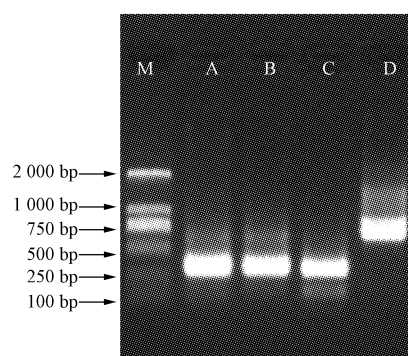
图 3 棕果实 *PsC4H* 与蔷薇科其它果树 *C4H* 氨基酸序列同源性比对分析

Fig. 3 Homology alignment of deduced amino acid sequences of *PsC4H* and that of other Rosaceae fruit trees

2.4 相对荧光定量 PCR 表达分析

为研究 *PsC4H* 基因在棕果实不同发育时期的表达模式, 该试验按果实大小将棕果实从幼果期到成熟期分成 5 个不同发育时期(I、II、III、IV、V)。以油棕果实 *tubulin* 基因作内参, 通过实时荧光定量 PCR 技术对棕果实

5 个时期的 *PsC4H* 基因的表达进行分析, 由图 6 可知, 棕果实表达量在时期 V 最高, 极显著高于其它时期, 时期 I 与时期 IV 的表达量较高且无显著差异, 而在时期 II 的表达量极显著低于其它时期。在果实不同发育时期中, 除幼果期(I)外, 果实的表达量随着果实的发育呈现上升



注:A,B,C,D:分别使用了 Genome walking 试剂盒中的 4 种 DRT 随机引物(A,B,C,D)的第 2 轮巢式 PCR 结果。
Note:A,B,C,D:Results of second nested PCR related to four different DRT (A,B,C,D) contained in the genome walking kit.

图 4 *PsC4H* 基因启动子分离电泳图

Fig. 4 Electrophoretogram of isolation of the promoter of *PsC4H*

```

-779 AATCAACGCAGAAGTGGGCCATTACGGCCGAACACGCGTCGTTTACCTCCGGGGCGTAGT
      I-box
-719 AGGTTTATTGAATTGAAAGGAAGAGTAATTGGCGATAAGGCTAGAGGAGTTTGTTT
      TATA-box
-659 TTTCTAAACTTAAATGAAAAGTGATGGGTATGTGTATGGATGACTAGGATTAAGTA
      TATA-box
-599 TTAAGTTGGATAATCTTTTTGTCTTTTATATAATAATAAACTTAAAGTTAAATAAT
      TATA-box
-539 TTAAGTATTATGATGAAAAAAGTGATGTTTAAATAGAAAACTTAAATGTTT
      TATA-box
-479 TAAGGATGATTCAGAACCCAAAAAAGAAAAAACTTCTGAATGAATCAAATTGTGC
      HSE CAAT-box
-419 GGTGCTGGTGAGGCGAGCAGCATCATAGCATTGTGATCCTGAAGCAACCACGACAC
-359 AGAATAACAAACGTACACTTGCAAGTTGAGCCTTGTAGGCCATCAGCCGAAGCCGGT
-299 GAGGTATCGAAATACCACTGGTGAGCCCCACGAGGACAGTTGAGAGGGCTCCACACCGA
-239 TTCAAAACAAAACATTTGACACCTTCGTCCACCTACTCGCTCGTTACCTACCCCCAC
      TGA-element
-179 ACGCCAGAGTTCTCAACCTCCTTACTTCGGTAAATCTACGACGTTAATCTCCATT
      G-Box
-119 CCTCGCTTCACTACGCTTCTCCACCCCAACCCACAGCCACAGCCACATGACCAC
      G-Box
-59 ATGACCACGTAACCCGTTACTTCTTCTATAAATCCCTCGCCAAATCCACAAACACC
      TATA-box GT1-motif
    
```

图 5 棕 *PsC4H* 基因启动子序列及部分顺式作用元件

Fig. 5 The promoter sequence of *PsC4H* and partial cis-acting elements *Prunus salicina*

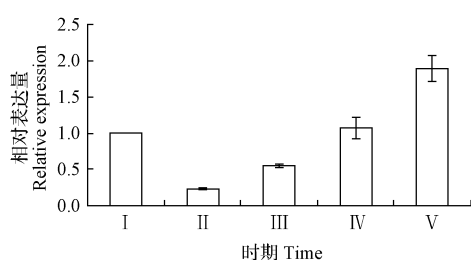


图 6 不同时期下棕果 *PsC4H* 基因的表达分析

Fig. 6 Express analysis of *PsC4H* during different development periods of *Prunus salicina* fruit

趋势,到果实发育完成后(V)表达量最高。

3 讨论

该试验成功地从已构建的油棕果实均一化 cDNA 文库中筛选出一个 *C4H* 全长基因,命名为 *PsC4H*。基因全长共 1 772 bp,开放阅读框为 1 515 bp,编码 504 个氨基酸,相对分子量为 145 719.6,等电点为 4.94。经 BLAST 同源性比较,*PsC4H* 在蛋白质和核苷酸水平上

高度保守。*PsC4H* 与一些蔷薇科植物的序列高度同源,特别是与李属果树相似性高达 97% 以上,说明 *PsC4H* 基因是李属棕果实的 *C4H* 基因序列。应用 DNASTar 软件对棕果实 *PsC4H* 基因编码的氨基酸序列与其它已发表的蔷薇科植物 *C4H* 基因进行同源性比较,相似性都在 90% 以上,表明不同植物间的 *C4H* 基因序列差异不大,在进化过程中比较保守。荧光定量结果表明,除幼果外,棕果实随着果实的成熟而表达量增加。该研究通过与已知 *C4H* 基因序列的比较分析,能够从分子水平上揭示其结构特点,从而为更好的改造 *C4H* 基因以及改变其表达活性提供更多的基础资料。研究表明,*C4H* 在转录水平上的丰度和蛋白质水平上的活性能有效影响植物中黄酮类化合物和木质素的生物合成量^[18-20]。开展对 *C4H* 酶基因作用机制及表达模式的研究,可通过调控酚类物质代谢影响果实色泽发育,进而利用分子生物学技术来改良植物的品质,提高经济效益。

参考文献

[1] Fahrendorf T, Dixon R A. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa*

- L.). XVIII; Molecular cloning and expression of the elicitor-inducible cinnamic acid 4-hydroxylase cytochrome P450[J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 305(2):509-15.
- [2] Mizutani M, Ward E, DiMaio J, et al. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding mung bean cytochrome P450(P450C4H) possessing cinnamate 4-hydroxylase activity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 190(3):875-80.
- [3] Teutsch H G, Hasenfratz M P, Lesot A, et al. Isolation and sequence of a cDNA encoding the *Jerusalem artichoke* cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenyl propanoid pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(9):4102-4106.
- [4] Chapple C. Molecular genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases[J]. Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol, 1998, 49:311-343.
- [5] Bell-Lelong D A, Cusumano J C, Meyer K, et al. Cinnamate-4-hydroxylase expression in Arabidopsis-regulation in response to development and the environment[J]. Plant Physiol, 1997, 113:729-738.
- [6] Mizutani M, Ohta D, Sato R. Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from Arabidopsis and its expression manner in planta[J]. Plant Physiol, 1997, 113:755-763.
- [7] Raes J, Rohde A, Christensen J H, et al. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2003, 133:1051-1071.
- [8] Mizutani M, Ward E, Dimao J, et al. Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding mung bean cytochrome-P450 (P450 C4H) possessing cinnamate 4-hydroxylase activity[J]. Biochem Biophys Res Comm, 1993, 190:875-880.
- [9] Ge L, Chiang V L. A full length cDNA encoding transcinnamate 4-hydroxylase from developing xylem of *Populus tremuloides*[J]. Plant Physiology, 1996, 112:861-864.
- [10] Kawai S, Mori A, Shiokawa T, et al. Isolation and analysis of cinnamic acid 4-hydroxylase homologous genes from a hybrid aspen, *Populus kitata-miensis*[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60:1586-1597.
- [11] Lu S F, Zhou Y H, Li L G, et al. Distinct roles of cinnamate 4-hydroxylase genes in *Populus*[J]. Plant Cell Physiol, 2006, 47:905-914.
- [12] Chen A H, Chai Y R, Li J N, et al. Molecular cloning of two genes encoding cinnamate 4-hydroxylase (C4H) from oilseed rape (*Brassica napus*)[J]. J Biochem Mol Biol, 2007, 40:247-260.
- [13] Pina A, Zhebentyayeva T, Errea P, et al. Isolation and molecular characterization of cinnamate 4-hydroxylase from apricot and plum[J]. Biologia Plantarum, 2012, 56(3):441-450.
- [14] Betz C, Mc Collum T G, Mayer R T. Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylases in 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* Osbeck)[J]. Plant Mol Biol, 2001, 46:741-748.
- [15] 郑鸿昌. 夜来香均一化全长 cDN 文库的构建与花香相关基因的遗传转化[D]. 福州:福建农林大学, 2012.
- [16] 刘志钦, 杨晨, 蔡金森, 等. 辣椒 *CaWRKY5* 启动子的分离及其调控元件分析[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(3):389-394.
- [17] 陈桂信, 吕柳新, 赖钟雄, 等. 棕基因组 DNA 的提取与纯化[J]. 江西农业大学学报(自然科学版), 2005, 26(3):330-333.
- [18] Millar D J, Long M, Donovan G, et al. Introduction of sense constructs of cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A24) in transgenic tomato plants shows opposite effects on flux into stem lignin and fruit flavonoids[J]. Phytochemistry, 2007, 68(11):1497-1509.
- [19] Ryan K G, Swinney E E, Markham K R, et al. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant leaves[J]. Phytochemistry, 2002, 59(1):23-32.
- [20] 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 Physiology, 1997, 115(1):41-50.

Cloning and Expression Analysis of Cinnamate 4-hydroxylase Gene from *Prunus salicina* and Isolation of Its Promoter

WANG Yu-zhen^{1,2}, CHEN Gui-xin^{1,2}, ZHAO Li^{1,2}, LYU Shi-heng¹, PAN Dong-ming^{1,2}, JIANG Cui-cui³

(1. College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. Institute of Storage Science and Technology of Horticultural Products, Fuzhou, Fujian 350002; 3. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013)

Abstract: Taking the fruits of different development stages of *Prunus salicina* as materials, a normalized full-length cDNA library was built combining with two step method of reverse transcription and inhibit PCR technology, a full length cDNA encoded Cinnamate 4-hydroxylase (C4H) (named *PsC4H*) was separated; the promoter was isolated by genome walking technology, changes of expression of the gene was detected by Real-time PCR at different development stages fruits. The results showed that the full-length *PsC4H* was 1 772 bp with an open reading frame 1 515 bp and encoding 504 amino acids with a calculated molecular weight of 145 719.6 and theoretical pI of 4.94. Sequence homology analysis indicated that the amino acid sequence of *PsC4H* exhibit high homology to prunus plants. By PlantCare Software predict that in addition to TATA/CAAT-box, still contained some specific regulatory elements such as G-box, HSE and etc. Real time PCR experiment showed that the expression of *PsC4H* gene was down-up regulation through the entire developmental periods and was the highest at mature fruit stage.

Keywords: *Prunus salicina*; Cinnamate 4-hydroxylase; promoter; real time PCR