

研究报告 Original Papers

巴西橡胶树的脂酰辅酶A还原酶cDNA克隆及其序列分析

罗明武¹, 邓柳红^{2,*}¹海南大学材料与化工学院, 海口570228; ²中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口571101

摘要:从巴西橡胶树差减cDNA文库中筛选到一个与脂酰辅酶A还原酶同源性较高的基因片段, 根据该基因片段序列信息, 设计特异引物, 采用RACE进行差异片段的5'和3'端的扩增, 获得长度为1365 bp的cDNA克隆R28 (GenBank登陆号: AY461413)。序列分析表明, 该基因包含1149 bp的开放阅读框, 5'-UTR为96 bp, 3'-UTR为128 bp, 编码382个氨基酸, 推测其蛋白质的分子量为43.5 kDa, 等电点为8.97, 有一个跨膜螺旋区(187至215位氨基酸)和1个由17个氨基酸组成的信号肽(1至17位氨基酸)。R28含有脂酰辅酶A还原酶的保守区(NADP结合蛋白保守区), 推测该基因是一个脂酰辅酶A还原酶基因。
关键词: 巴西橡胶树; 胶乳; 酰基辅酶A还原酶

Cloning and Sequence Analysis of Acyl-CoA Reductase cDNA from *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

LUO Ming-Wu¹, DENG Liu-Hong^{2,*}¹College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China; ²Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: A cDNA clone related to lipid transportation and metabolism was isolated by screening subtracted latex cDNA library. According to its sequences information, a novel full-length cDNA termed R28 (GenBank number: AY461413) was obtained by using rapid amplification of cDNA ends (RACE). R28 was 1365 bp long containing a 1149-bp ORF, flanked by a 96-bp 5'-UTR and a 128-bp 3'-UTR. It encoded 382 amino acids with a theoretical molecular weight of 43.5 kDa and an isoelectric point of 8.97. Hydropathy and transmembrane motif analysis of deduced amino acid sequences indicated that R28 possessed a transmembrane spanning domain (185–215 aa), and contained a cleaved signal peptide (1–17 aa). The result of the conserved domains analysis indicated that R28 not only has a highly conserved region of acyl-CoA reductase, but also contains a male sterility protein C-terminal region. Multialignment revealed that R28 is the most closely related to the joboba acyl CoA reductase.

Key words: *Hevea brasiliensis*; latex; acyl-CoA reductase

巴西橡胶树因产胶量高, 胶质好而成为天然橡胶最主要的商业来源。巴西橡胶树胶乳的干物质主要是橡胶烃, 从乙酰辅酶A到橡胶烃的生物合成过程需要3种组分: 乙酰辅酶A、NADPH还原剂和ATP (何康和黄宗道1987)。脂酰辅酶A还原酶(fatty acyl-coenzyme A reductase, FAR)可以催化NADP⁺生成NADPH还原剂。植物中已发现的脂酰辅酶A还原酶均具有相同的NADP结合蛋白保守区, 其中希蒙得木(*Simmondsia chinensis*)脂酰辅酶A还原酶定位在内质网中, 与特定的脂酰CoA-脂肪醇酰基转移酶共同作用, 合成发育种子中的蜡质前体(Metz等2000); 白杨(*Populus trichocarpa*)酰基辅酶A还原酶与控制细胞壁-酰基的结合有关(Tuskan等2006); 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的雄性不育

相关蛋白(male sterility 2-like protein, ms2)可能是脂酰辅酶A还原酶, 在花粉壁物质形成中起作用(Aarts等1997)。

迄今, 脂酰辅酶A还原酶基因在橡胶树中还没有报道。本文从巴西橡胶树胶乳特异表达差减cDNA文库中筛选到一个与脂酰辅酶A还原酶有较高同源性的cDNA片段, 并通过cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)获得一个包含完整ORF的cDNA, 该基因的克隆将有

收稿 2009-08-31 修定 2009-12-09

资助 中国热带农业科学院科技基金和华南热带农业大学科技基金。

* 通讯作者(E-mail: dengliuhong168@163.com; Tel: 0898-66892946)。

助于了解橡胶烃生物合成的主要组分——NADPH还原剂的来源途径,进而更深入了解橡胶烃的生物合成过程。

材料与方法

试验材料为生长10年的巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)优良品系‘热研73397’,于2007年8月从中国热带农业科学院试验场采集,割胶后流出的胶乳直接滴入液氮中保存,叶片采集后立即放入液氮中保存备用。

胶乳总RNA提取参照Kush等(1990)文中的方法。叶片中总RNA提取采用CTAB法和异硫氰酸胍法结合进行。获得的RNA产物进行吸光值 A_{230} 、 A_{260} 和 A_{280} 的测定,判断其纯度和浓度;并进行2%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性。纯度及完整性好的胶乳及叶片总RNA即用于差减cDNA文库构建及RT-PCR模板,其余样品加入3倍体积的无水乙醇于 -70°C 下保存。

采用RACE克隆巴西橡胶树胶乳中脂酰辅酶A还原酶cDNA,从抑制消减杂交获得的橡胶树差减cDNA文库中分离到一个与脂酰辅酶A还原酶高度同源的基因片段R28,根据该基因片段序列信息,设计5'和3'端特异引物5'-RACE-GSP(5'TGGCATTACACCATGTCACCT3')和3'-RACE-GSP(5'CCTACCATGCTCAATTGCGTCTCCA3'),进行5'和3'cDNA末端的快速扩增,方法按Clontech公司的SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit说明书进行。PCR条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,共35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。采用上海华舜生物工程公司的小量胶回收试剂盒进行目的片段回收,与pMD18-T克隆载体连接后转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)XL1-Blue受体菌,经酶切鉴定后送去上海生物工程有限公司测序。将通过测序获得的5'-RACE序列和3'-RACE序列去掉插入位点两侧的载体序列后,进行组装拼接,得到拼接好的全长的cDNA序列。

cDNA序列及其编码氨基酸分析,用NCBI的Blast、ORF finder和BankIt服务器进行核酸和蛋白质序列比较、阅读框架确定及序列在线提交。蛋白质疏水/亲水性、分子量及等电点预测等基本性质分析在公用数据库Workbench上进行。前导肽、功能位点分析和序列同源比较及进化关系分析分别采用SignalP、Motif Scan和Clustal W程序进行。

结果与讨论

1 橡胶树叶片和胶乳总RNA的提取

取5 μg 橡胶树叶片和胶乳总RNA样品进行凝胶电泳,28S rRNA、18S rRNA等分带明显清晰,且28S rRNA的量是18S rRNA的2倍,紫外分光光度计检测RNA的 A_{260}/A_{280} 比值介于1.8~2.0之间,表明总RNA中2种RNA的完整性和纯度好,适合用于差减cDNA文库构建及RT-PCR模板。

2 巴西橡胶树的脂酰辅酶A还原酶cDNA克隆及其序列同源比较

通过5'-和3'-RACE和RT-PCR获得的cDNA长度1365 bp,命名为R28。该序列中最大的1个阅读框(ORF)长度为1149 bp,编码382个氨基酸残基。该cDNA的起始密码子ATG的-3位和+4位核苷酸均为嘌呤,符合Kozak规律;在其阅读框终止密码子TAA下游同一读框内含有多个终止密码子,这些都符合有效翻译的基因的全长cDNA的特征(张庆华等2000)。因此断定克隆到的R28包含一个完整的阅读框,其5'-UTR有96个核苷酸,3'-UTR有128个核苷酸。该cDNA序列在GenBank的登录号为AY461413。

根据该基因编码的氨基酸序列进行蛋白质基本性质推测分析认为,该蛋白质的理论分子量为43.5 kDa,等电点为8.97。该基因编码的蛋白质有疏水性区域,有1个推测的跨膜螺旋区(187至215位氨基酸)(图1)。蛋白质氨基酸序列信号肽分析结果表明,该cDNA编码的蛋白可能包含有1个

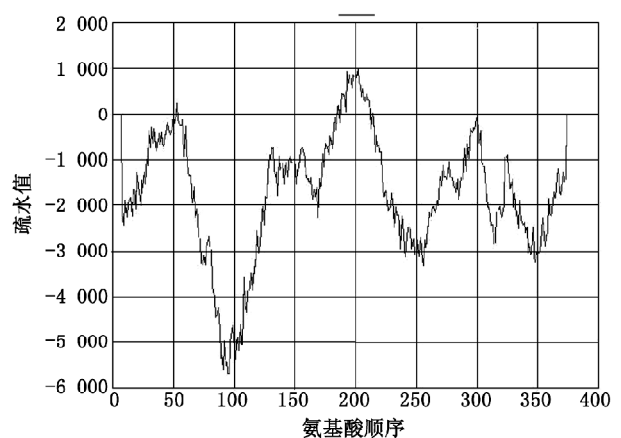


图1 R28 cDNA编码的蛋白质疏水性分析

Fig.1 Hydropathy profiles of the deduced protein of R28
图上横线表示跨膜结构域。

它与脂酰辅酶A还原酶家族的同源性很高,在进化上,它与植物的脂酰辅酶A还原酶亲缘关系较近,它与白杨、希蒙得木和小麦的脂酰辅酶A还原酶及拟南芥雄性不育相关蛋白的同源性分别为64%、56%、46%和57%,而与细菌类的辅酶A还原酶亲缘关系最远,同源性仅9%。GenBank数据库中比较R28核苷酸及蛋白质同源性,在橡胶树中没有发现与R28有显著相关的同源序列,因此,认为该基因在在橡胶树中是一个新基因。

功能保守区分析结果表明,R28含有2个保守区,1个是NADP结合蛋白保守区(rossmann-fold NADP⁺-binding proteins domain),1个是C端的雄性不育相关蛋白保守区,前者可催化(脂肪醛+辅酶A+NADP⁺=脂乙酰辅酶A+NADPH)反应进行。

据此,我们推测R28基因是一个脂酰辅酶A还原酶基因。由于R28基因是从胶乳特异表达cDNA文库中筛选得到,在胶乳中特异表达,我们推断该基因催化生成的NADPH可能是提供给橡胶烃生物合成必须的组分之一。

参考文献

- 何康,黄宗道(1987). 热带北缘橡胶树栽培. 广州:广东科技出版社, 407~411
- 张庆华,茅矛,陈竺(2000). 基因组研究中全长cDNA克隆的策略. 生物工程进展, 20 (4): 3~5
- Aarts MG, Hodge R, Kalantidis K, Florack D, Wilson ZA, Mulligan BJ, Stiekema WJ, Scott R, Pereira A (1997). The *Arabidopsis* *MALE STERILITY 2* protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. *Plant J*, 12 (3): 615~623
- Kush A, Goyvaerts E, Chye ML, Chua NH (1990). Laticifer-specific gene expression in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 1787~1790
- Metz JG, Pollard MR, Anderson L, Hayes TR, Lassner MW (2000). Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme a reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed. *Plant Physiol*, 122: 635~644
- Tuskan GA, Difazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A et al (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313 (5793): 1596~1604