

• 药材与资源 •

人參中核黃素激酶基因的克隆与原核表达

别枫桥^{1,2}, 韩怡来^{1,2}, 刘铁鹰^{1,2}, 陈 静^{1,2}, 王艳芳^{1,3}, 王康宇^{1,2}, 赵明珠^{1,2}, 尹 锐^{1,2}, 李 俐^{1,2}, 姜 悦^{1,2}, 孙春玉^{1,2}, 张美萍^{1,2*}, 王 义^{1,2*}

1. 吉林农业大学 人參基因资源工程研究中心, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

3. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要:目的 从人參中克隆出核黃素激酶基因, 进行相关的生物信息学分析, 构建原核表达载体并在大肠杆菌诱导表达。方法 根据人參转录组数据库筛选出序列 comp61599_c0_seq12, 经相关软件对其进行序列分析; 该序列 3'末端缺失, 利用 3'RACE 技术获得 3'端序列; 通过 PCR 技术获得人參核黃素激酶基因的全长 cDNA 序列, 并构建原核表达载体 pET-32a-PgRfK, 通过热激法转化到大肠杆菌 BL-21 中进行诱导表达。结果 从人參中成功克隆出 1 条长度为 1 200 bp 的核黃素激酶基因, 其编码 399 个氨基酸, 同时成功构建该基因的原核表达载体, SDS-PAGE 电泳结果显示该蛋白大小与预测蛋白相对分子质量一致。结论 成功克隆了人參核黃素激酶基因, 并在大肠杆菌中成功表达。

关键词: 人參; 核黃素激酶; 3'RACE; 生物信息学; 原核表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)08-1884-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.08.023

Cloning and prokaryotic expression of riboflavin kinase gene in *Panax ginseng*

BIE Feng-qiao^{1,2}, HAN Yi-lai^{1,2}, LIU Tie-ying^{1,2}, CHEN Jing^{1,2}, WANG Yan-fang^{1,3}, WANG Kang-yu^{1,2}, ZHAO Ming-zhu^{1,2}, YIN Rui^{1,2}, LI Li^{1,2}, JIANG Yue^{1,2}, SUN Chun-yu^{1,2}, ZHANG Mei-ping^{1,2}, WANG Yi^{1,2}

1. Research Center for Ginseng Genetic Resources, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To clone the riboflavin kinase gene of *Panax ginseng* and perform bioinformatics analysis to construct the prokaryotic expression vector and induce its expression in *Escherichia coli*. **Methods** The sequences of comp61599_c0_seq12 were screened from transcriptome database in *P. ginseng*, and software and online resources were used for its bioinformatics analysis. The 3' end of sequence was lost and the full-length of 3' end sequence was obtained by 3' RACE technology. The complete sequences of cDNA of riboflavin kinase in ginseng was obtained by PCR amplification, and the prokaryotic expression vector of pET-32a-PgRfK was constructed and transformed into *E. coli* BL-21 for inducing expression. **Results** A riboflavin kinase gene with length of 1 200 bp was successfully cloned from *P. ginseng* which encoded 399 amino acid and its prokaryotic expression vector was successfully constructed. The molecular weight of SDS-PAGE electrophoresis results was consistent with prediction. **Conclusion** The PgRfK gene was successfully cloned and expressed in *E. coli*.

Key words: *Panax ginseng* C. A. Mey.; riboflavin kinase; 3'RACE; bioinformatics; prokaryotic expression

核黄素(riboflavin, VB2)是一种多功能维生素, 在各物种的生命活动中发挥着重要作用。在自然界中, 植物能自身合成核黄素, 对于植物来说, 当外源添加适量的核黄素时, 不仅可以在一定程度上促进生长, 还可以促进有关次生代谢产物的生物合成^[1-2],

如糖苷类、酚类物质等, 以及介导活性氧(reactive oxygen species, ROS)信号, 增强植物的防卫反应^[3]。对于哺乳动物来说, 其自身不能合成核黄素, 虽然在肠道中的有些微生物可以合成核黄素, 但其生产的量远不足以满足机体的需要, 且当核黄素缺乏时,

收稿日期: 2018-01-29

基金项目: 国家“863”计划项目(2013AA102604); 吉林省发改委-吉林省农产业创新专项资金项目(2016C04); 吉林省科技厅自然科学基金项目(20180101027JC); 吉林省教育厅科学技术研究项目(JJKH20170310KJ)

作者简介: 别枫桥(1993—), 男, 在读硕士, 研究方向为功能基因组学。

*通信作者 王 义(1964—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物细胞工程、药用植物种质资源创新和开发方面的研究。

张美萍(1964—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事植物系统基因组学与系统生物学研究。

常常会表现为某些炎症^[4]或神经疾病^[5]。

核黄素是黄素酶辅基的主要组成部分,是黄素辅酶黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)和腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)的前体,在细胞内核黄素主要是以这2种黄素形式存在,参与机体复杂的生物氧化代谢和其他过程,具有重要的药理作用^[6],而核黄素激酶(riboflavin kinase, RFK, EC2.7.1.26)在此过程中发挥着重要作用。核黄素代谢为 FMN 与 FAD 分别由 RFK 与 FAD 合酶(FAD synthase, EC2.7.7.2)催化。RFK 催化的反应是在核黄素的核糖醇基链上的 5 位特异磷酸化,形成 FMN。此后在 FAD 合酶催化下,催化 ATP 上的腺苷部分转移到 FMN,形成 FAD^[7]。与这 2 种酶的有关基因已经在一些生物中被克隆^[8-10],而对其特性做出相应的研究后发现,除了存在分别编码发挥单一功能的 RFK 和 FAD 合酶外,自然界中还存在同时发挥这 2 种功能的双功能 RFK/FAD 合酶,该种酶最早在真细菌^[11]中发现,后来在植物中也有发现具有双功能作用的 RFK^[12-13],并在植物的呼吸作用、光合作用等基础代谢中发挥着重要作用。

近年来,发现一些与 RFK 有关的新的调节功能,例如,在一定处理条件下,死亡受体(death receptors)4 和 5 能直接与 RFK 结合形成信号复合体,直接激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶 NOX1(NADPH oxidases 1)产生的活性氧(ROS)积累,进而发挥促细胞凋亡作用^[14];在脑卒中的研究中提出,RFK 可以作为该病基因诊断的靶点^[15];在无乳链球菌中的 RFK 还具有抗大环内酯类抗生素的功能^[16]。

人参中的相关基因还未被研究,本研究以实验室前期获得的吉林省内 42 个不同农家品种的人参转录组数据库为基础,通过对序列提取分析,选取 comp61599_c0_seq12 序列,利用 RT-PCR 和 3'RACE 技术克隆出人参 RFK 基因(PgRFK),对该基因进行相关的生物信息学分析及原核表达,为进一步研究 RFK 的生物学功能奠定基础,同时也为人参皂苷合成生物学研究提供重要合成元件,为解析人参皂苷次生代谢调控机制提供新思路。

1 材料

样品取自吉林农业大学人参基因资源开发与利用工程研究中心,由吉林农业大学王义教授鉴定为人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. “大马牙”品种。

2 方法

2.1 RNA 提取与 cDNA 的获得

将人参样品于液氮中研碎,按照 Trizol 试剂盒方法提取总 RNA,参照 TaKaRa 公司 3'RACE 试剂盒中的操作说明,进行反转录,获得 cDNA,保存至 -20 °C 冰箱备用。

2.2 PgRFK 基因的 3'末端的获得

根据实验室前期的工作,在人参转录组数据库中,筛选出 1 条 PgRFK,根据与其他植物中的 RFK 基因的序列比较,发现其 3'末端缺失。以 TaKaRa 3'RACE 试剂盒中的 3'RACE outer 与 3'RACE inner 2 条引物,在已知序列的相对保守区域上设计 GSP 1 out 与 GSP 2 inner 2 条引物。以反转录的 cDNA 为模板,利用试剂盒中的 3'RACE Outer Primer 与 GSP 1 out 2 条引物进行第 1 轮 PCR,然后以第 1 轮的 PCR 产物为模板,利用试剂盒中 3'RACE Inner Primer 的与 GSP 2 inner 引物,进行第 2 轮 PCR,收集第 2 轮的 PCR 产物,连接到 T 载体,得到阳性克隆后送往测序。

2.3 PgRFK 基因的全长序列克隆

将 3'段测序结果合并到原序列中,得到理论上的基因全长序列,根据基因的编码区设计 2 条特异性引物 RFK-S 与 RFK-A,以人参 14 个组织部位的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应程序为:95 °C、5 min,预变性;95 °C、30 s,56 °C、30 s,72 °C、90 s 循环 30 次。72 °C、10 min 后延伸,4 °C 终止。将得到的序列送至测序,分析该片段序列与理论上全长序列的一致性。

2.4 PgRFK 基因的相关生物信息学分析

将克隆得到的人参中 RFK 的氨基酸序列与其他植物中的 RFK 氨基酸序列进行同源性分析。并对其进行相关的单基因生物信息学分析,以下是相关的在线网站资源:ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>); SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html); WoLFPSORT II (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>); NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>); SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); SWISS-MODEL (<http://www.swissmodel.expasy.org/>)。

2.5 PgRFK 原核表达载体的构建

分别提取测序结果与目的序列一致的人参中 RFK 克隆载体与含有 pET-32a 的大肠杆菌的质粒,

以 *Bam*HI 限制性内切酶分别酶切, 获得目的片段与载体片段, T4 连接酶 16 °C 过夜, 转化到大肠杆菌 DH5a 中挑取单克隆菌液 PCR, 将有目的片段的菌株扩播, 提质粒, 以 *Nco*I 内切酶做酶切, 切出正确片段大小的质粒为目的片段正向连接的原核表达载体。

2.6 PgRFK 基因的原核表达及检测

将连接正确的原核表达转化至 BL-21 大肠杆菌中, 利用通用引物 T-S 与 T-A 进行菌液 PCR, 挑取阳性克隆, 扩播后, 取 1 mL 加入至含有 50 µg/mL 氨苄青霉素的 50 mL LB 培养基中, 37 °C 摇床 170 r/min 培养至吸光度值 (365 nm) 为 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷, 继续培养 4 h。4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 加入 4 mL PBS 缓冲液, 破碎后取 160 µL 至 1.5 mL EP 管中, 并加入 40 µL SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 冷却后取 10 µL 样品上样, SDS-PAGE 电泳检测。

3 结果与分析

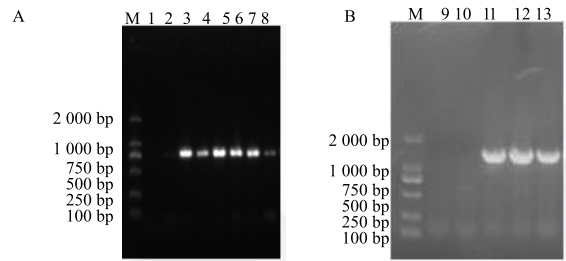
3.1 RFK 的全长 cDNA 的获得

利用 Trizol 的方法提取 RNA, 所提取的 RNA 满足反转录的条件, 利用 TaKaRa 3'-RACE 试剂盒反转录出 cDNA, 得到约 750 bp 的条带, 如图 1 所示, 经过克隆载体的构建与测序, 获得了 RFK 的 3' 末端, 合并到原序列后, 根据 NCBI 的开放阅读框 (ORF) 在线比对, 该基因内包含一个长度为 1 200 bp 的 ORF, 编码氨基酸长度 399 aa。根据所得序列设计人参中 RFK 的特异性引物 RFK-S 与 RFK-A, 得到一条长度为 1 263 bp 的序列如图 1, 引物序列信息见表 1。

3.2 PgRFK 相关生物信息学分析

根据 ProParam 预测其所包含 ORF 所翻译的蛋白理化性质, 该序列所翻译的 399 氨基酸的分子式为 $C_{2000}H_{3111}N_{517}O_{580}S_{13}$, 相对分子质量为 44 095.6, 等电点 (pI) 为 5.71, 不稳定指数为 41.32, 判定为不稳定蛋白, 亲水指数为 -0.127, 为亲水性蛋白。

NPS@网站中的 SOPMA 工具预测表明, PgRSK 蛋白 α 螺旋所占比例为 34.84%、 β 转角为 11.53%、延伸链为 19.80%、无规卷曲为 33.83%。GenScript 网站中的 WoLFPSORT II 在线预测表明, 该蛋白主要定位到叶绿体中。SignalP 网站的预测表明, 该蛋白不具有信号肽活性。CBS 网站 NetPhos 2.0 Server 中的预测表明, PgRFK 蛋白的磷酸化位点预测值超过 0.5 的丝氨酸有 20 个, 苏氨酸有 7 个、酪氨酸有 10 个, 其中位于氨基酸序列的 85、129、163 位的丝氨酸, 以及位于 149、280、335、386 位



M-Marker 1、9-空白对照 3~8-3'RACE PCR
10~13-全长片段连接 pGM-T 的菌液 PCR
M-Marker 1 和 9-blank control 3~8-the result of 3'RACE PCR
10~13-the result of PgRFK full sequence PCR

图 1 3'末端菌液 (A) 和 PgRFK (B) 全长菌液基因的 PCR

Fig. 1 PCR amplification result of 3'RACE (A) and PgRFK full sequence (B)

表 1 扩增 PgRFK 基因所需引物

Table 1 Primers used for amplification of PgRFK gene

引物名称	序列 (5'→3')
GSP 1 out	GTATGGCATTGGCTTCAAACCTC
GSP 2 inner	CTCGTCATTGAAGATTCACTAC
RFK-S	CGGGATCCGATGCTTTGGTTACTCAGTTTAT
RFK-A	CGGGATCCAATTATATAAATGACTATTCTCCCC
T-S (载体 5 833 bp 处)	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG
T-A (载体 5 631 bp 处)	CGAACGCCAGCACATGGACA

的酪氨酸的预测分值最为接近 1, 为最有可能的磷酸化位点。见图 2。

根据 SWISS-MODEL 网站对 PgRFK 蛋白的三级结构进行预测分析表明 (图 3), 其核黄素激酶部分结构与拟南芥中基本相似, 与其他物种一样^[17]具有 L 型螺旋。

目前在 NCBI 数据库中, 未发现与人参同科属的 RFK 序列, 在与其他植物中的同源性比较中发现, PgRFK 与芝麻中的该序列同源性较近 (图 4)。选取模式植物拟南芥、烟草和番茄, 以及在上步同源性比对中, 关系较为接近的芝麻中 RFK 蛋白序列与通过 RACE 获得的 PgRFK 全长蛋白序列进行比对 (图 5), 发现核黄素激酶在这些植物中相对保守, 且与原核生物^[18]中不同, 具有与酵母相同的 PTAN 保守域结构^[9]。

3.3 PgRFK 的原核表达载体构建

以 *Nco*I 内切酶做酶切, 根据 pET-32a 的载体信息 (图 6-A), 当酶切片段为 1 000 bp 的载体为正向连接载体, 250 bp 左右的为反向连接载体, 根据图 (6-B), 可以得出, 3、4 和 5 泳道的载体为正向连

GGATCCGATGCTTTGTTACTCAGTTTATTCAAGCTAAACAACTTGTGAGGAAATT
 BamHI RFK-S
 AATTTTCAATCCCAATCCCAACAGAGCTCAAATTCACGTGTCAATGGCAAATCTCT
 起始子
 TGGAGAAGTTAGTTTCTTGTTTACTTGTGACTTGGATGGTACTCTTCTTAACACAGATG
 GCATTGTGAGTGACGTTTAAAGTTTACTTGGTGAAGCATGGGAAGCAATGGGATGG
 GAGAGGAGCTCATAGAATAGTAGGAAAACACCGGCAGAAAGCTGCAGCTGCAATGTG
 GGAAGATTATGCGCTTTCATATCTGTGGAAGAATTACTTTCAGAGATCACCCCAATGT
 TCTCCGATCAGTGTGCACTATCAAAAGCTCTTCCAGGTGCCAATGGTTGATTAAACAT
 TTAGGGCCAAAGGTGTCTGTATGGCATTGGCTTCAAACCTCTCCAGGGACAACATTG
 AATCTAAATCTCTTATCAACAGGCTGGAAAGAATCTTCTATGTCATAATTGGGGT
 GATGAAGTTTCAGCTGGAAGCCATCTCTGAAATATCTTGAAGCAGCTAAAAAGC
 TTAATAATTGACCTTCTAATCTCTCGTCATTGAAGATTCACTACAGGTGTTATGGCTG
 GTAAAGGCTGCTGGAATGAATGTTGTGCGTACCATCTCTTCCAAACAGTCCCATCTT
 GSP1 out
 TACACTTCAGCAGATGAGGTGATCAATCTCTTCTGATCTAAGGCTGAAAAGTGGG
 GSP2 inner
 CTTACCTCCATTCAAGATTGATATATAGTACATTACCAATAGAACCTTGGTATATTGT
 GGTCTGTATCAAAAGGATTGGACGTGGCTCAAAGGTGCTTGGAAATACCTACAGCTAA
 TCTATCCGCAAGAAAGCTACTCAACATCTTTCAGAACCCCTCAGGTGTATATTTG
 GTTGGGCTGGATTATCAATGAGAGGTGTTTACAAGATGGTCAATGATGATGTTGGAAT
 CCTTATTTTGACAACACCAAGAAGAAGATTGAGCCATGCTTACTACACGACTTTGAGG
 AGGATTTCTATGTTGAAGAATTACGTCTTGTCTATTGTTGGATACATACGGCTGAGGCTA
 NCOI
 ATTTCCCATCCCTTGAGAGGCTGGTAGCAAAATTCATGAAGACAGGAAAGTCCGAGA
 AACGGCCCTTGAACCTCTTGTATTCAAAATTATAGGGATGACAAATATCTGAAAAGCT
 CCTTGCATGGGGAGATAGTCATTATAAATTGATCC
 RFX-A 终止子 BamHI

图 2 PgRFK 基因全长序列及序列信息

Fig. 2 Sequence information of PgRFK

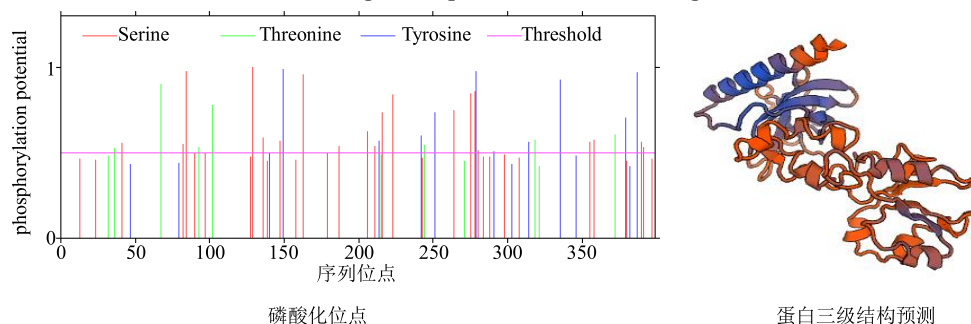


图 3 PgRFK 相关结构预测

Fig. 3 Related structure prediction of PgRFK

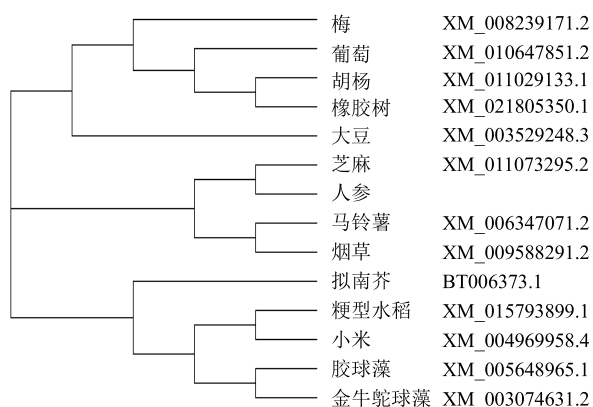


图 4 PgRFK 与其他植物中 RFK 的同源性分析

Fig. 4 Homology analysis of protein PgRFK amino acids in *P. ginseng* and other plants

接载体。以将正向连接载体转化到 BL-21 大肠杆菌中, 挑取单克隆菌株以通用引物 T-S 与 T-A 进行菌液 PCR, 200 bp 左右的为空载体, 1 500 bp 左右的为正向连接的人参中核黄素激酶的原核表达载体, 如图 (6-C), 共有 6 条泳道为构建成功的 pET-32a-PgRFK 原核表达载体。

3.4 PgRFK 蛋白的原核诱导表达

通过 SDS-PAGE 电泳可知, 相较于其他情况中的菌, IPTG 诱导的 pET-32a-PgRFK 的重组菌在 62 000 左右出现了条带, PgRFK 蛋白的相对分子质量为 44 000, 且利用 pET-32a 载体进行原核表达时, 其标签大小约为 18 000^[19], 所以重组后表达的蛋白与电泳结果一致, 说明含有 PgRFK 基因的重组菌已经成功表达, 见图 7。

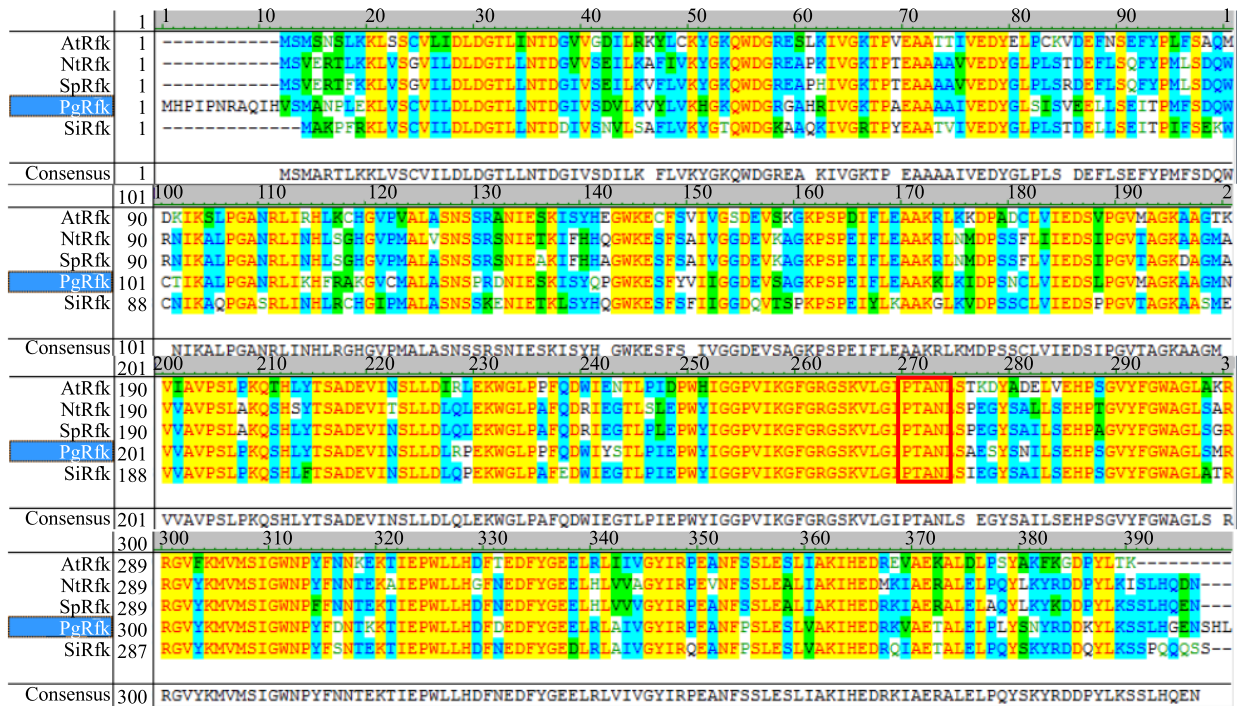
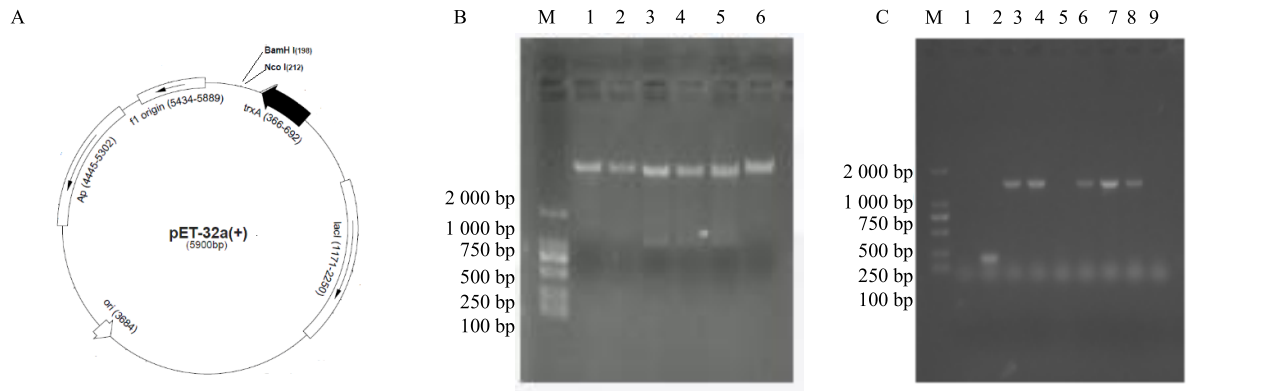


图 5 PgRFK 与其他植物中 PFK 的氨基酸序列比对

Fig. 5 Alignment of protein PgRFK amino acids in *P. ginseng* and other plants

A-pET-32a 载体信息 B-pET-32a-PgRFK 酶切结果 (M-Marker, 1、5、6-基因的反向连接酶切结果, 2~4-目的基因正向连接结果) C-BL-21 (M-Marker, 1-空白对照, 2-pET-32a 空载体, 3、4、6~9-正确连接的 pET-32a-PgRFK)

A-information of vector pET-32a B-enzyme digestion results of pET-32a-PgRFK (M-Marker, 1, 5, 6-reverse linkage results of target gene, 2~4-forward linkage results of target gene) C-PCR results of BL-21 (M-Marker, 1-blank control, 2-empty vector of pET-32a, 3, 4, 6~9-correct connection of pET-32a-PgRFK)

图 6 PgRFK 原核表达载体的构建

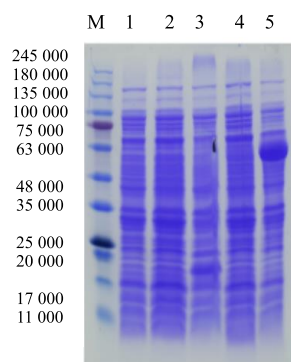
Fig. 6 Construction of prokaryotic expression vector of PgRFK

4 讨论

在药用植物的研究中, 次生代谢的研究往往是重点, 例如三萜类物质生物合成中, 在其甲羟戊酸合成途径上的关键酶基因已有广泛研究, 而在单个基因对整体影响的研究中发现, 次级代谢途径上的某个关键酶基因的超表达, 可能不足以对整体产生显著影响^[20]。而对其上游代谢途径的促进, 可能

会对整体产生有益的影响。RFK 参与的反应为黄素代谢反应, 作为基础的代谢反应之一, 在三羧酸循环与光合作用中发挥重要作用, 并可能在植物防卫反应中起到重要的调节作用。RFK 作为参与基础代谢的关键酶, 与次生代谢合成的关系有待进一步研究。

植物中有关 RFK 已有相关的克隆研究, 对于其



M-PR1920 1-BL-2 原菌 2-pET-32a 空载体不加 IPTG 诱导
3-pET-32a 空载体加 IPTG 诱导 4-pET-32a-PgRFK 不加 IPTG 诱导
5-pET-32a-PgRFK 加 IPTG 诱导
M-PR1920 1-*E. coli* BL-21 2-pET-32a empty vector without IPTG
induction 3-pET-32a empty vector with IPTG induction 4-pET-32a-
PgRFK without IPTG induction 5-pET-32a-PgRFK with IPTG induction

图 7 PgRFK 的原核表达

Fig. 7 Prokaryotic expression of PgRFK

蛋白研究表明, 植物中的双功能 RFK/FAD 合酶蛋白的 N-末端与 C-末端的结构域分别对应于 FAD 合酶与 RFK, 且位于双功能蛋白酶的 N-末端结构域中的 FAD 合酶属于卤酸脱卤酶家族^[21]。根据有关生物信息学分析, 本研究中克隆出的 PgRFK 蛋白具有与其他植物中类似的结构, 并已在大肠杆菌中成功表达。为了研究植物中 RFK 可能涉及到的其他的代谢调控过程。后续将通过测定相应的酶活与蛋白结合反应等, 来鉴定其可能涉及的酶学功能以及其他蛋白结合功能, 进而为揭示 PgRFK 除降解核黄素以外的功能, 以及对次生代谢影响的研究奠定基础。

参考文献

- [1] Tsukasa M, Sakurai M. Riboflavin affects anthocyanin synthesis in nitrogen culture using strawberriesuspended cells [J]. *J Food Sci*, 1996, 61(4): 698-702.
- [2] 刘 菲, 刘 辉, 梁元存, 等. 核黄素诱导烟草悬浮细胞酚类物质和木质素的积累 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(9): 3230-3235.
- [3] 杨 雪. 核黄素调节的活性氧信号影响植物防卫反应的初步研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [4] Michael S, Katja W, Sandra S, *et al.* Riboflavin (vitamin B2) deficiency impairs NADPH oxidase 2 (Nox2) priming and defense against *Listeria monocytogenes* [J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(3): 728-741.
- [5] Udhayabanu T, Manole A, Rajeshwari M, *et al.* Riboflavin responsive mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases [J]. *J Clin Med*, 2017, 6(5): 52-65.
- [6] 童朝阳, 徐琪寿. 核黄素的药理作用及应用前景 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2003(3): 223-226.
- [7] Ana S, Maria S, Sonia A L, *et al.* Quaternary organization in a bifunctional prokaryotic FAD synthetase:

Involvement of an arginine at its adenylyltransferase module on the riboflavin kinase activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854(8): 897-906.

- [8] Mashhadi Z, Zhang H, Xu H, *et al.* Identification and characterization of an archaeon-specific riboflavin kinase [J]. *J Bacterio*, 2008, 190(7): 2615-2618.
- [9] Santos M A, Jimenez A, Revuelta J L. Molecular characterization of FMN1, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(37): 28618-28624.
- [10] Solovieva I M, Kreneva R A, Leak D J, *et al.* The ribR gene encodes a monofunctional riboflavin kinase which is involved in regulation of the *Bacillus subtilis* riboflavin operon [J]. *Microbiology*, 1999, 145(1): 67-73.
- [11] Dietmar J, Manstein L, Emil F P. Purification and characterization of FAD synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes* [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261(34): 16169-16173.
- [12] Sandoval F J, Roje S. An FMN hydrolase is fused to a riboflavin kinase homolog in plants [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(34): 16169-16173.
- [13] Inmaculada Y, Sonia A L, Medina M, *et al.* Evolutionary divergence of chloroplast FAD synthetase proteins [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 311-324.
- [14] Park K J, Lee C H, Kim A, *et al.* Death receptors 4 and 5 activate nox1 NADPH oxidase through riboflavin kinase to induce reactive oxygen species-mediated apoptotic cell death [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(5): 3313-3325.
- [15] 邹赢铤. 核黄素激酶对脑卒中发生的影响 [D]. 上海: 第二军医大学, 2011.
- [16] Gervais C, Corinne V, Roland L. Macrolide resistance gene mreA of streptococcus agalactiae encodes a flavokinase [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(8): 2280-2286.
- [17] Bauer S, Kemter K, Bacher A, *et al.* Crystal structure of *Schizosaccharomyces pombe* riboflavin kinase reveals a novel ATP and riboflavin-binding fold [J]. *J Mol Biol*, 2003, 326(5): 1463-1473.
- [18] Ananth K, Kumaraswamy S, Narayanaswamy S, *et al.* A conserved domain in prokaryotic bifunctional FAD synthetases can potentially catalyze nucleotide transfer [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(1): 9-12.
- [19] 黄宪章, 张战锋, 陈炜烨, 等. PET32a-CDK2 重组质粒的构建与表达 [J]. *广东医学*, 2011, 32(6): 681-684.
- [20] Xu J W, Zhong J J. Genetic engineering of *Ganoderma lucidum* for the efficient production of ganoderic acids [J]. *Bioengineered*, 2015, 6(6): 357-360.
- [21] Ana S, Susana F, Beatriz H, *et al.* Key residues at the riboflavin kinase catalytic site of the bifunctional riboflavin kinase/FMN adenylyltransferase from *corynebacterium ammoniagenes* [J]. *Cell Bioch Biophys*, 2013, 65(1): 57-58.