

• 药材与资源 •

红花天冬氨酸激酶基因片段的分离及表达分析

王艳芳^{1,2,3}, 张娜^{2#}, 张玲^{1,3}, 张伟², 李喜明², 刘伟灿², 杨晶^{1,2}, 姚娜^{1,2}, 李海燕^{1,2*}, 李校堃^{1,2,3*}

1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 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 克隆红花种子中的天冬氨酸激酶 (aspartokinase, AK) 基因并研究其在种子不同发育时期的表达量。方法 根据红花转录组文库注释信息筛选与红花天冬氨酸激酶 (CtAK) 基因相关的 Unigenes, 设计引物, 以红花种子总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 的方法扩增 CtAK 基因片段并连接到克隆载体上, 经 PCR 及酶切鉴定, 筛选阳性克隆进行测序。同时利用荧光定量 PCR 技术对其进行基因表达量的分析。结果 克隆了红花 CtAK 基因的核心片段, 分离到 486 bp 的基因序列。根据 CtAK 基因片段设计引物, 对不同品种不同发育时期红花种子进行荧光定量 PCR 分析, CtAK 基因在红花品种川红 1 号初花后 13 d 表达量最高。结论 系统发育树分析表明, 该基因与其他物种的 AK 基因具有较高的同源性。

关键词: 红花; 天冬氨酸激酶; 基因克隆; 同源性; 基因表达

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)20-3065-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.20.018

Isolation and expression analysis of aspartokinase gene fragment from *Carthamus tinctorius*

WANG Yan-fang^{1,2,3}, ZHANG Na², ZHANG Ling^{1,3}, ZHANG Wei², LI Xi-ming², LIU Wei-can², YANG Jing^{1,2}, YAO Na^{1,2}, LI Hai-yan^{1,2}, LI Xiao-kun^{1,2,3}

1. Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China
2. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China
3. College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To clone the aspartatokinase (AK) gene from the seeds of *Carthamus tinctorius* (Ct, safflower) and study its expression in different developmental stages of seeds. **Methods** Primers were designed according to CtAK gene segment which was selected from transcriptome sequencing results of safflower. Taking total RNA of safflower seed as template, CtAK gene was amplified by RT-PCR and connected to pEASY-T1 carrier, identified by PCR and enzyme digestion, and positive cloning was screened and sequenced. **Results** The fragment of AK gene is cloned from safflower, and PCR primers of safflower are designed based on CtAK gene fragment. PCR analysis is performed in the safflower seeds of different developmental stages. The sequence of 486 bp was isolated. The expression of CtAK gene in DAF 13 in Chuan-hong 1 line is the highest. **Conclusion** The gene has higher homology compared with the AK from other species.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; aspartokinase; gene cloning; homology; gene expression

收稿日期: 2015-06-19

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (“863”) (2011AA100606); 国家自然科学基金资助项目 (31401445); 吉林省科技厅医药产业推进计划项目 (20140311034YY); 教育部博士点基金 (20122223120002)

作者简介: 王艳芳 (1982—), 女, 吉林人, 在读博士, 研究方向为植物生物反应器。

*通信作者 李海燕 (1971—), 女, 吉林人, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物反应器。Tel: (0431)84533427 Fax: (0431)84533347 E-mail: hyl99@163.com

李校堃 (1964—), 男, 吉林人, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物反应器。Tel: (0431)84533348 Fax: (0431)84533347 E-mail: xiaokunli@163.net

#共同第一作者

天冬氨酸代谢途径是植物体内合成赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸等必需氨基酸的主要途径。这 3 种必需氨基酸在人类和单胃动物的日常饮食中至关重要。但是目前在一些粮食作物中, 这几种氨基酸的量甚微, 不能满足日益增长的社会需求, 因此, 向“非粮”植物要氨基酸是解决这一关键问题的有效途径。红花 *Carthamus tinctorius* L. 是菊科(Asteraceae) 红花属 *Carthamus* L. 双子叶植物, 是一种集药材、油料、饲料为一身的新型经济作物。在我国, 对红花种子的油脂及花冠的色素已经进行了广泛深入的研究, 而对红花饲用价值的基础研究极少见报道。红花种子饲用的营养价值主要体现在以天冬氨酸为前体的赖氨酸等必需氨基酸量上。但是, 目前有关红花氨基酸代谢调控的研究国内外尚未见报道。

在该途径中, 首先以天冬氨酸为底物, 在天冬氨酸激酶 (aspartate kinase, AK) 催化下形成 β -天冬氨酰磷酸 (ASA), 随后在天冬氨酸半醛脱氢酶 (ASADH) 催化下转变成 β -天冬氨酸半醛 (ASD), 从而进入合成赖氨酸等必需氨基酸的代谢途径。AK 控制整条代谢途径的代谢流, 是主要的限速酶。AK 基因是多基因家族, 在细菌中研究的比较清楚, 目前已从拟南芥、玉米、大豆、棉花等植物中分离出来^[1-4], 而在红花中尚未见研究报道。通过调节 AK 的活性可以甚至显著增加植物体内必需氨基酸的量^[5-9]。

本研究从不同红花组织高通量测序获得的红花转录组文库中, 筛选到红花种子特异表达的 158 条 Unigenes 序列, 从这 158 条序列注释信息中挖掘出 3

条红花天冬氨酸激酶 (CtAK) 基因相关序列, 通过 BlastP 比对确定 CtAK 的 Unigenes 序列, 设计引物, 采用 RT-PCR 方法克隆红花 CtAK 基因的核心片段, 并利用荧光定量 PCR 技术进行基因表达量分析, 为阐明该基因在红花氨基酸代谢调控中的分子作用机制奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

红花种子购自新疆红花缘科技有限公司, 经吉林农业大学中药材学院杨世海教授鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L., 品种分别为吉红早熟、云红 1 号、吉红 1 号、川红 1 号。在吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程中心基地种植, 5 月初进行播种, 于花蕾期开始采集不同品种、不同发育时期种子于液氮速冻, 放入 -80 °C 冰箱中冻存备用。

1.2 酶及生化试剂

限制性内切酶、DNA Marker DL2000、LA Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自百奥生物有限公司; 荧光定量试剂盒 (货号 RR420A) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; PCR 清洗试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Axygen 生物技术 (杭州) 有限公司; pEASY-T1 克隆载体、大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; RT-PCR 反转录试剂盒购自北京百泰克生物技术公司。

1.3 所用引物

所用引物均由北京金唯智生物科技有限公司合成, 具体引物见表 1。

表 1 所用引物

Table 1 Primers of experiment

引物名称	上游引物	下游引物
核心片段引物	5'-TTCCTTGAAAGGGTTGGAG-3'	5'-AATCGAAAACACCTTAGCC-3'
荧光定量引物	5'-AGAGGTGGCAGTGACTTAAC-3'	5'-CTTACTCATATCTCTTGATT-3'
内参基因引物	5'-CTATTCTGCGTTTGGACCTTG-3'	5'-TCCATTCCCACCAAAGACA-3'

2 方法

2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取出在 -80 °C 冰箱中保存的红花种子, 按照 RNAisoPLUS 说明书, 提取红花种子总 RNA, 使用 NanoDrop2000 微量核酸蛋白检测仪, 检测所提 RNA 的纯度及浓度; 甲醛变性电泳检测 RNA 的完整性, 并依据 RNA 产量计算下一步实验中合成 cDNA 第一链所需模板的用量。

2.2 CtAK 基因的分离

cDNA 第一链合成按照反转录试剂盒说明书进行。以反转录后 cDNA 为模版, 克隆 CtAK 基因, PCR 反应体系: 在 200 μ L PCR 管中加入下列组分, LA Taq 酶 0.5 μ L、10 $\times$ pfu Taq 缓冲液 5 μ L、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 8 μ L、AKmF (10 μ mol/L) 0.5 μ L、AKmR (10 μ mol/L) 0.5 μ L、cDNA 模版 1 μ L、ddH₂O 38.75 μ L, 总体积为 50 μ L。PCR 反应:

94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 25 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖进行凝胶电泳, 经凝胶成像仪观察确定目的片段, 利用胶回收试剂盒对目的片段进行回收和纯化, 具体操作步骤按照说明书进行。

2.3 筛选并鉴定阳性克隆

将 pEASY-T1 克隆载体与目的片段按照物质的量比 1:4 混合, 轻轻吹打均匀, 室温反应 10 min。将连接产物加入到 50 μ L Trans-T1 大肠杆菌感受态细胞中, 冰浴 30 min; 42 °C 热激 40 s; 冰浴 2 min。加入 250 μ L B 液体培养基, 轻轻混匀, 37 °C, 180 r/min, 振荡培养 1 h。将菌液加入含有氨苄西林钠 (Amp)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养。次日选取白色单菌落, 经 PCR 鉴定, 选取阳性克隆提取重组质粒, 酶切鉴定正确后, 送北京金唯智生物科技有限公司测序。

2.4 CtAK 基因片段的序列分析

将测序正确的 CtAK 基因在 NCBI 网站上进行 Blast 分析, 并与其他物种的 AK 进行同源性比较。

2.5 不同品种及不同发育时期 CtAK 基因的表达分析

以红花 4 个品种吉红早熟、云红 1 号、吉红 1 号、川红 1 号 and 不同发育时期的红花种子 (花后 1、3、5、7、9、11、13 d 的种胚) 为研究对象, 分析 CtAK 基因的表达量。提取不同品种、不同发育时期红花种子的总 RNA, 根据总 RNA 产量, 反转录成 cDNA。以 β -Actin 作为内参, 根据 CtAK 基因片段设计荧光定量 PCR 引物, AKF: 5'-TTCCTTG-GAAAGGGTTGGAG-3', AKR: 5'-AATCGAAAA-CACCTTAGCC-3'。按下述组成配制 PCR 反应液: SYBRPremix Ex TaqTM (2 $\times$) 12.5 μ L; AKF (10 μ mol/L) 0.5 μ L; AKR (10 μ mol/L) 0.5 μ L; cDNA 模版 2 μ L; ddH₂O 9.5 μ L。采用 2 步法, 样本和内参分别设 3 个重复, ROX 作为校正荧光, β -Actin 为内参。2 步法 PCR 扩增标准程序: 预变性 95 °C、30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。

3 结果与分析

3.1 红花种子总 RNA 的提取及检定

从川红 1 号红花种子中提取总 RNA, 经凝胶电泳检测, 结果显示 28 S rRNA 和 18 S rRNA 条带清晰 (图 1), 前者亮度约是后者的 2 倍, 说明所提取的 RNA 完整性较好; 经微量核酸蛋白检测仪测得

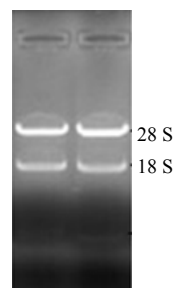


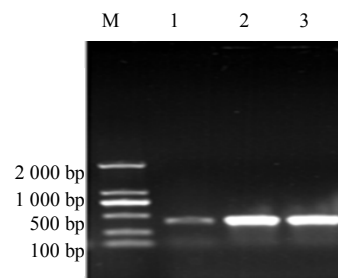
图 1 红花种子总 RNA 提取电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA in safflower of seeds

$A_{260}/A_{280}=1.99$, $A_{260}/A_{230}=2.02$, 表明 RNA 纯度较高, 可用于 RT-PCR 扩增。

3.2 RT-PCR 扩增

以红花种子总 RNA 反转录得到的第一链 cDNA 为模板, 用 AK 基因引物 AKmF 和 AKmR 进行 PCR 扩增。扩增产物经检测发现在 486 bp 左右有 1 条特异性条带 (图 2), 且上下无杂带, 这与红花转录物组拼接得到的目的片段长度一致。



M-Marker 1, 2, 3-RT-PCR 扩增 CtAK 基因核心片段

M-Marker 1, 2, 3-amplified by RT-PCR core fragment of gene encoding CtAK in safflower

图 2 CtAK 基因核心片段 RT-PCR 电泳图

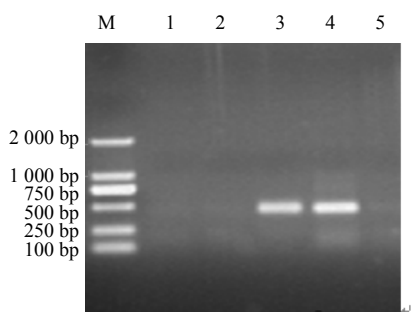
Fig. 2 RT-PCR electrophoresis of core fragment of CtAK gene

3.3 目的片段连接、转化及测序分析

对目的片段进行切胶回收, 将纯化的片段与 pEASY-T1 克隆载体连接, 转化 *E. coli* DH5a, 从转化平板中随机挑取 5 个克隆进行菌液 PCR 鉴定 (图 3), 结果有 2 个菌落显示目的条带, 提取质粒进行酶切鉴定, 酶切后的小片段与目的片段大小基本一致 (图 4), 将菌液送去测序。

3.4 CtAK 基因片段的序列分析

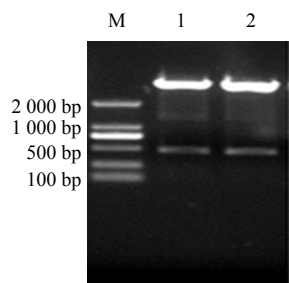
利用 Vector11.5 软件将 CtAK 基因片段测序得到的序列与红花转录物组中筛选到的 Unigene 序列进行比对, 没有碱基突变, 表明测序结果完全正确。



M-Marker 1, 2, 5-假阳性克隆 3, 4-阳性克隆
M-Marker 1, 2, 5-false positive clone 3, 4-positive clone

图 3 pEASY-T1-CtAK 重组质粒菌液 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of pEASY-T1-CtAK recombinant plasmid



M-Marker 1, 2-SpeI/XbaI 双酶切鉴定
M-Marker 1, 2-Double digestion of SpeI/XbaI

图 4 pEASY-T1-CtAK 重组质粒酶切鉴定

Fig. 4 Enzyme digestion identification of pEASY-T1-CtAK recombinant plasmid

TTCTTGGAAGGGTTGGAGAACTTGTGCTGTGACTACATTGGGCAGAGGTGGCA
GTGACTTAAGTCCACAACCATTTGGTAAAGCACTTGGTTTTCGAGAAATTCAGGTATG
GAAAGATGTGGATGGTGTCTTGACATGTGACCCTAATATATATTCAGGTGCAGAACCTG
TGCCATATTTGACTTTCGATGAAGCAGCTGAACCTGCATATTTGGTGCACAGGTCCTA
CATCCACAGTCTATGAGGCCTGCAAGAGAGGGTGATATACCTGTCAGGGTTAAAAATTC
TTACAACCTAATGCTCCTGGTACCCTAATCACTAAATCAAGAGATATGAGTAAGGCAG
TTTTAACCAGCATTGTTTTGAAACGTAATGTAACCATGTTAGACATTGTTAGTACTCGCA
TGCTGGGTCAATTTGGATTCTGGCTAAGGTGTTTTTCGATTTTCGAGGATCTGGGTATAT
CTGTAGATGTCGTAGCT

FLGKGWRTCAVTTLGRGGSDDLTTATTIGKALGLREIQVWKDVGVLTCDPNIYSGAEP
VPYLTDFDEAAELAYFGAQLVHPQSMRPAREGDIPVRVKNSYNPNAPGTLITKSRDMSKAV
LTSIVLKRNVMTLDIVSTRMLGQFGLAKVFSI FEDLGISVDVVA

图 5 红花 CtAK 基因核心片段序列及氨基酸序列

Fig. 5 Core fragment of CtAK gene sequence and amino acid sequence in safflower

4 讨论

CtAK 是赖氨酸等必需氨基酸生物合成的关键酶。目前, 在无参考基因组信息的物种中挖掘重要

CtAK 基因片段长度为 486 bp (图 5), 经 Blastn 分析表明: CtAK 与其他物种的 AK 基因具有较高的相似性, 说明该基因片段确实存在于红花种子中, 将 CtAK 与其他物种的 AK 进行氨基酸序列同源性比较分析, 利用 MEGA6.0 构建系统发育树 (图 6), 发现 CtAK 与芝麻亲缘关系较近, 与拟南芥和黄瓜亲缘关系较远。

3.5 红花种子不同发育时期 CtAK 基因的表达分析

提取红花不同品种、不同发育时期红花种子总 RNA, 反转录 cDNA, 以 β -Actin 作为内参, 采用荧光定量 PCR 技术检测 CtAK 基因在红花不同品种和种子不同发育时期的表达量, 结果见图 7、8。从相对表达量分析发现, 在开花后川红 1 号品种的 CtAK 基因表达量最高, 是云红 1 号的 2 倍以上, 其次为吉红 1 号品种, 云红 1 号的表达量最低, 根据不同品种的生物量分析, 川红 1 号和吉红早熟花期一致, 花盘大, 生物产量相当, 均大于吉红 1 号和云红 1 号, 因此综合考虑生物量和基因表达量 2 个因素, 选取川红 1 号作为进一步研究该基因时空表达的实验材料。采集花后不同时间点的种子, 通过荧光定量分析发现在花后第 13 天, CtAK 基因表达量最高, 是花后 7 d 的近 6 倍, 随着种子不断发育, 基因表达量的表现出先下降后升高的趋势, 开花后第 7 天达到最低, 变化幅度明显。

基因的方法主要是通过转录组文库的构建并进行测序分析。本研究在红花转录组测序分析数据的基础上^[10-12], 运用分子克隆技术分离到 CtAK 基因的

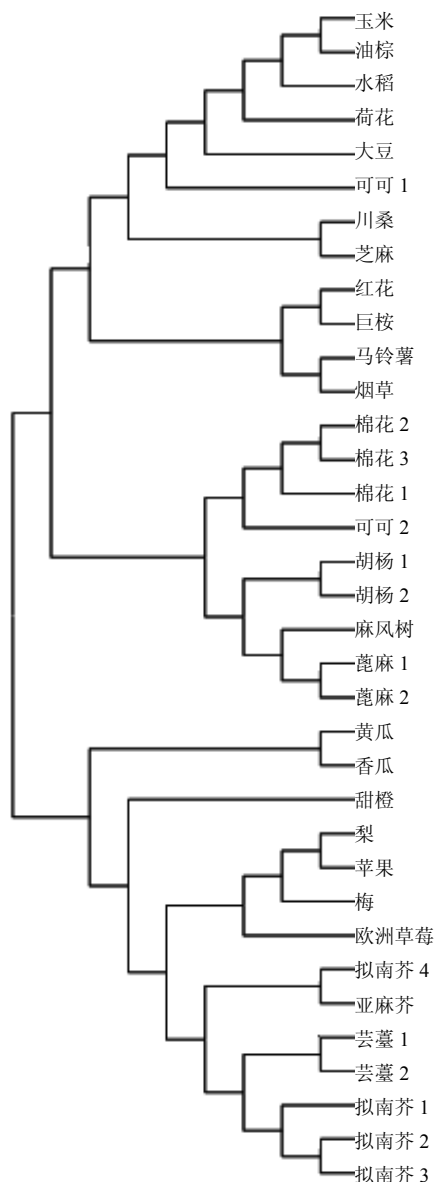


图 6 AK 基因编码蛋白系统发育树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of AK gene encoding protein in safflower

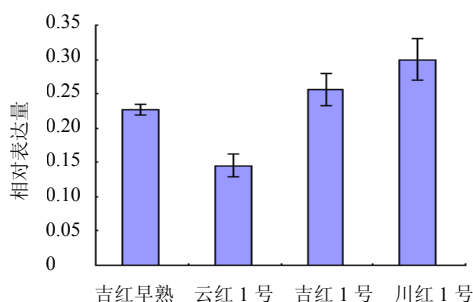


图 7 不同品种红花中 CtAK 基因的相对表达量分析

Fig. 7 Relative expression analysis of CtAK gene in different safflower varieties

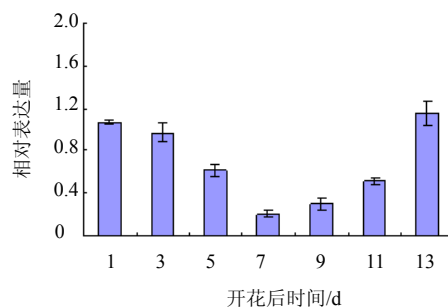


图 8 不同发育时期红花种子(川红 1 号)中 CtAK 基因的相对表达量分析

Fig. 8 Relative expression analysis of CtAK gene in different development periods of safflower seeds (Chuanhong 1 line)

核心片段,在 NCBI 搜索 34 条不同物种的 AK 基因序列进行系统发育树分析发现,红花 AK 与芝麻 AK 亲缘关系最近,它们同属于菊亚纲,表明该基因在进化上具有一定的保守性,推断红花 AK 与其他植物 AK 属于同一基因家族,可能具有类似的生物学功能。

荧光定量 PCR 技术被广泛应用于基因的定量分析^[13],本研究对红花不同品种和不同发育时期红花种子的 CtAK 基因的相对表达量进行分析,结果表明,不同品种表达量差异较大,CtAK 基因在川红 1 号中的表达量最高,而在云红 1 号中表达量最低,结合生物量,选择川红 1 号作为研究 CtAK 基因时空表达的品种,在不同发育时期红花种子中 CtAK 基因的表达量呈现先下降后升高的趋势,这与文献报道相一致^[14],这些数据为进一步克隆 CtAK 基因全长序列,研究其生物学功能及其在红花氨基酸代谢调控机制中的作用奠定基础。

参考文献

- [1] Bochaute PV, Novoa A, Ballet S, *et al.* Regulatory mechanisms after short- and long-term perturbed lysine biosynthesis in the aspartate pathway: the need for isogenes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Physiol Plant*, 2013, 149: 449-460.
- [2] Müntz K, Christov V, Saalbach G, *et al.* Genetic engineering for high me-threonine grain legumes [J]. *Nahrung*, 1998, 42: 125-127.
- [3] Gad G. The aspartate-family pathway of plants Linking production of essential amino acids with energy and stress regulation [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 62: 192-198.
- [4] Stiller I, Dancs G, Hesse H, *et al.* Improving the nutritive value of tubers: elevation of cysteine and glutathione

- contents in the potato cultivar White Lady by marker-free transformation [J]. *J Biotechnol*, 2007, 128: 335-343.
- [5] Ufaz S, Galili G. Improving the content of essential amino acids in crop plants: goals and opportunities [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147: 954-961.
- [6] Curien, G, Laurencin, M, Robert-Genthon, M, *et al*. Allosteric monofunctional aspartate kinases from *Arabidopsis* [J]. *Febs J*, 2007, 274: 164-176.
- [7] 姜 威, 陈庆山, 胡国华, 等. 大豆天冬氨酸途径关键酶基因 GmASADH 的克隆与分析 [J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(3): 221-225.
- [8] 于 妍, 宋万坤, 刘春燕, 等. 植物天冬氨酸代谢途径关键酶基因研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2008(S1): 7-11.
- [9] Demidov D, Horstmann C, Meixner M, *et al*. Additive effects of the feed-back insensitive bacterial aspartate kinase and the Brazil nut 2S albumin on the methionine content of transgenic narbon bean (*Vicia narbonensis* L.) [J]. *Mol Breeding*, 2003, 11: 187-201.
- [10] Li H Y, Dong Y Y, Yang J, *et al*. De novo transcriptome of safflower and the identification of putative genes for oleosin and the biosynthesis of flavonoids [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): 1-10.
- [11] 代斯宁, 王文玲, 韩怡来, 等. 红花 2-甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌甲基转移酶基因的克隆及表达分析 [J]. *中草药*, 2015, 46(18): 2774-2780.
- [12] 官丽莉, 张 雪, 韩怡来, 等. 红花转录因子 CtMYB1 基因的克隆及原核表达 [J]. *中草药*, 2015, 46(17): 2603-2609.
- [13] Teresa J, Clark, Lu Y. Analysis of loss-of-function mutants in Aspartate kinase and homoserine dehydrogenase genes points to complexity in the regulation of aspartate-derived amino acid contents 1 [J]. *Plant Physiol*, 2015, 168: 1512-1526.
- [14] 管康林. 种子生理生态学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009