

## 红花单功能反馈抑制敏感型 CtAK1 基因克隆、序列分析及表达载体构建

王艳芳<sup>1,2,3</sup>, 张 玲<sup>1,3#</sup>, 张 娜<sup>2</sup>, 张 娟<sup>2</sup>, 李红群<sup>2</sup>, 杨 晶<sup>1,2</sup>, 杜林娜<sup>2</sup>, 官丽莉<sup>1,2</sup>, 李海燕<sup>1,2\*</sup>, 李校堃<sup>1,2,3\*</sup>

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 分离红花天冬氨酸代谢途径关键酶天冬氨酸激酶(AK)基因的全长 cDNA 序列, 进行植物超表达载体构建。方法 根据红花种子转录组文库注释和 qRT-PCR 鉴定的 AK 基因核心片段及表达分析数据, 采用 RACE 技术获得红花 AK (CtAK) 基因的全长 cDNA, 利用 DNA 重组技术构建植物超表达载体。结果 生物信息学分析表明, CtAK 基因全长 1 703 bp, ORF 区为 1 626 bp, 编码 541 个氨基酸残基, 功能结构域分析推测, 该基因可能为单功能反馈抑制敏感植物 AK1。通过 DNA 重组技术成功构建以 35 S 为启动子和 Bar 抗性基因并含有叶绿体转运肽的 pCambia3301-CTP-AK1 植物超表达载体。结论 获得 CtAK1 基因的编码序列并构建植物超表达载体, 为进一步研究其生物学功能及其在红花氨基酸代谢调控中的作用机制奠定基础。

**关键词:** 红花; 天冬氨酸激酶; RACE; 生物信息学; 植物表达载体

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)24-3740-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.022

## Molecular cloning, sequence analysis, and construction of expression vector of monofunction feedback inhibition sensitive CtAK1 gene in *Carthamus tinctorius*

WANG Yan-fang<sup>1, 2, 3</sup>, ZHANG Ling<sup>1, 3</sup>, ZHANG Na<sup>2</sup>, ZHANG Juan<sup>2</sup>, LI Hong-qun<sup>2</sup>, YANG Jing<sup>1,2</sup>, DU Lin-na<sup>2</sup>, GUAN Li-li<sup>2</sup>, LI Hai-yan<sup>1,2</sup>, LI Xiao-kun<sup>1,2,3</sup>

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 separate the full length cDNA of gene encoding the key enzyme AK in aspartate metabolic pathways of *Carthamus tinctorius* and to construct plant overexpression vector. **Methods** According to annotation on transcriptome library of *C. tinctorius* and core fragments and expression analysis data of CtAK identified by qRT-PCR, we separated the full length cDNA of AK gene of *C. tinctorius* (CtAK) using RACE technology and constructed plant expression vector using recombinant DNA technology. **Results** Bioinformatics analysis showed the full length CtAK was 1 703 bp and ORF area was 1 626 bp, encoding 541 amino acid residues. The function structure domain analysis showed the gene might be a monofunction feedback inhibition sensitive AK1 from plant. We successfully constructed plant expression vector pCambia3301-CTP-AK1 which contained 35 S promoter and Bar resistance genes and chloroplast transit peptide by recombinant DNA technology. **Conclusion** The gene encoding CtAK1 is obtained and the plant overexpression vector is constructed, which lays the foundation for researching on biological function and mechanism of action in amino acid metabolism regulation of *C. tinctorius*.

**Key words:** *Carthamus tinctorius* L.; monofunction aspartokinase gene; RACE; bioinformatics; plant overexpression vector

收稿日期: 2015-05-19

基金项目: 国家高技术研究“863”发展计划(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 E-mail: hyli99@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 E-mail: xiaokunli@163.net

#共同第一作者

红花是我国传统中药材,自印度引种到中国已有2100余年的栽培历史<sup>[1]</sup>,主产于新疆、四川、云南等地。目前红花的研究多集中在花冠的色素及种子油脂,对于红花种子氨基酸的研究国内外极少见报道。在红花主产区,红花去油籽粕被当作一种废料弃去,没有得到充分利用<sup>[2]</sup>。研究表明,红花籽粕含有丰富的蛋白质和微量氨基酸<sup>[3]</sup>,可以作为一种动物饲料,目前国外已将红花种子作为鸟类食物得到广泛应用。红花种子中赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸等必需氨基酸含量甚微,人类和动物必须通过额外摄取才能满足营养需求。为了提高红花种子中必需氨基酸的量,通过代谢工程技术超表达正调控关键基因和RNA阻断负调控关键基因有可能会显著提高必需氨基酸量,大大增加红花籽粕的经济价值,但是,由于赖氨酸的合成受多基因控制,且与一些不良性状紧密连锁,常规育种方法很难获得高赖氨酸量的红花新品种<sup>[4]</sup>。因此,结合现代基因挖掘手段(包括转录组测序和基因表达谱分析技术),在分子水平深度挖掘红花种子赖氨酸合成途径的关键基因资源,是提高红花种子赖氨酸量的品质改良分子育种领域迫切需要的基础性工作。目前,在基因水平上调控红花氨基酸量的研究国内外尚未见报道。本研究在获得红花天冬氨酸激酶(CtAK)基因核心片段并进行表达模式分析的基础上,通过RACE技术获得该基因的全长cDNA序列,利用生物信息学技术预测该基因的基本理化性质及功能结构域,同时运用DNA重组技术构建该基因的植物超表达载体。为阐明该基因的生物学功能及其在红花氨基酸代谢调控中的作用分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

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川红1号红花 *Carthamus tinctorius* L. 品种,种植于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,于初花期开始采集种子,液氮速冻后,存于-80℃冰箱备用。

RNAisoPLUS 提取试剂盒(Takara 公司),DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒(Axygen 公司),反转录酶、Smarter™ RACE cDNA Amplification kit(Clontech),pEASY-T1 Vector、限制性内切酶、T4

DNA 连接酶(promega)和其他工具酶(TaKaRa 公司),PCR 引物由北京金唯智生物技术有限公司合成。

### 1.2 方法

**1.2.1 红花种子总 RNA 的提取** 取出在-80℃冰箱中保存的红花种子,按照RNAisoPLUS说明,提取红花种子总RNA,NanoDrop2000微量核酸蛋白检测仪检测RNA的纯度及浓度;甲醛变性电泳检测RNA的完整性,-80℃贮存备用。

**1.2.2 CtAK 基因全长 cDNA 的分离** 以反转录获得的cDNA为模版,利用Vector11.5和DNASTar软件设计3'-RACE和5'-RACE引物,分别为3ak1:5'-GGGTCAATTTGGATTCCTGGC-3'和3ak2:5'-TGGGTATATCTGTAGATGTC-3';5ak1:5'-GGTTGCGAGAAATTCAGGT-3'和5ak2:5'-TACCTGAATTCTCGCAAACC-3'。按照Smarter™ RACE cDNA Amplification kit说明书操作进行两轮巢式PCR反应,扩增CtAK基因的3'末端和5'末端,根据3'端和5'端序列设计全长cDNA引物AKP1:5'-ATGGCTGCATACCTATGTGGGGTTG-3',AKP2:5'-GCCTTTCCATAATCCCCAATCTTAC-3',以红花种子cDNA为模板进行全长cDNA扩增,扩增产物经T/A克隆后,送北京金唯智生物科技公司测序。

**1.2.3 CtAK 基因编码产物生物信息学分析** 根据CtAK基因编码蛋白的氨基酸序列,利用在线软件ExPasy ProtParam进行理化性质分析,利用InterProScan、NCBI Conserved Domains和ExPasy Prosite进行蛋白质结构域和功能位点分析,利用SOPMA进行蛋白质二级结构分析。SignalIP4.0 Server进行分泌蛋白分析、WOLF PSORT进行亚细胞定位、TMHMMServer进行跨膜区分析,ExPasy ProScale进行疏水性预测。利用SWISS-MODEL进行蛋白三维结构预测。

**1.2.4 红花 CtAK 基因植物超表达载体构建** 以植物双元表达载体pCambia3301为骨架结构,以CaMV35S为启动子,Bar作为安全筛选标记基因,在含有叶绿体转运肽的基因两端设计含有NcoI和BglII酶切位点的引物,对克隆载体和pCambia3301进行双酶切,回收目的片段,通过T4 DNA连接酶将基因片段插入到表达载体上,通过菌液PCR和双酶切鉴定,确定超表达载体是否构建成功。

## 2 结果与分析

### 2.1 红花种子总 RNA 的提取

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

## 2.2 CtAK 基因全长 cDNA 的分离

根据在红花转录组中验证的 CtAK 基因核心片段序列, 设计 RACE 特异引物。

根据分别扩增红花 CtAK 基因的 3' 末端序列 (图 1-A) 和 5' 末端序列 (图 1-B), 将测序后的 3'、5' 末端序列及核心序列拼接后得到全长为 1 703 bp 的红花 CtAK 基因 cDNA 序列, 将该基因命名为 CtAK, 在基因两端设计全长引物, 经 PCR 扩增后得到全长 1 703 bp 的目的基因 (图 2), 测序结果表明所得序列与上述拼接结果一致。

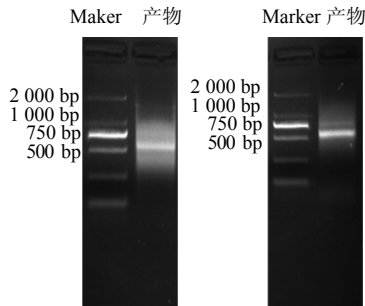
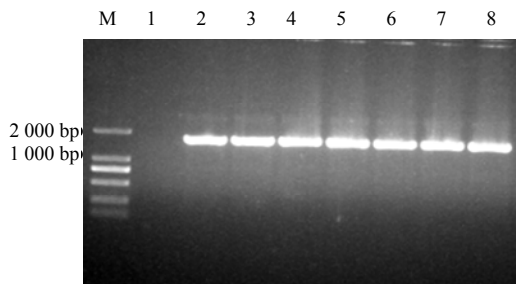


图 1 CtAK 基因 3' 端 (A) 和 5' 端 (B) RACE 扩增电泳图

Fig. 1 RACE electrophoresis of 3' (A) and 5' (B) terminals



M-Marker 1-阴性对照 2~8-PCR 扩增 CtAK 基因

M-Marker 1-negative control 2~8 Amplified by PCR full length of gene encoding CtAK

图 2 CtAK 基因全长 cDNA PCR 扩增电泳图

Fig. 2 PCR electrophoresis of full-length cDNA of CtAK

## 2.3 CtAK 基因编码产物生物信息学分析

**2.3.1 CtAK 基因理化性质分析** 利用 Vector11.5 软件将 cDNA 翻译为氨基酸序列发现, CtAK 基因编码蛋白由 541 个氨基酸组成, 利用在线软件 ExPasy 分析发现: CtAK 分子式  $C_{2641}H_{4258}N_{720}O_{786}S_{24}$ , 总原子数 8 429。相对分子质量 59 442.6, 理论等电点 6.41,

带正电残基 (Asp+Glu)<sub>60</sub>, 带负电残基 (Asp+Lys)<sub>56</sub>。不稳定系数 32.24 (不稳定系数小于 40, 表示 CtAK 基因编码蛋白稳定)。脂肪系数 99.98, 总平均疏水指数 0.011, 负值表示亲水性, 正值表示疏水性, 总平均疏水性介于 -0.5~0.5 为两性氨基酸<sup>[5]</sup>, 所以 CtAK 基因编码蛋白为两性氨基酸。通过 ProtParam 工具分析氨基酸组成发现, 其氨基酸组成中亮氨酸的量最多, 占总数的 10.7%, 其次为缬氨酸, 占总数的 8.7% (表 1)。

表 1 CtAK 蛋白氨基酸组成分析

Table 1 Analysis on amino acid sequence for CtAK

| 氨基酸  | 数量 | 比例/% | 氨基酸    | 数量 | 比例/% |
|------|----|------|--------|----|------|
| 丙氨酸  | 39 | 7.2  | 赖氨酸    | 30 | 5.5  |
| 精氨酸  | 26 | 4.8  | 甲硫氨酸   | 14 | 2.6  |
| 天冬酰胺 | 23 | 4.3  | 苯丙氨酸   | 20 | 3.7  |
| 天冬氨酸 | 27 | 5.0  | 脯氨酸    | 25 | 4.6  |
| 半胱氨酸 | 10 | 1.8  | 丝氨酸    | 41 | 7.6  |
| 谷氨酰胺 | 16 | 3.0  | 苏氨酸    | 35 | 6.5  |
| 谷氨酸  | 33 | 6.1  | 色氨酸    | 4  | 0.7  |
| 甘氨酸  | 34 | 6.3  | 酪氨酸    | 9  | 1.7  |
| 组氨酸  | 14 | 2.6  | 缬氨酸    | 48 | 8.9  |
| 异亮氨酸 | 35 | 6.5  | 吡咯赖氨酸  | 0  | 0.0  |
| 亮氨酸  | 58 | 10.7 | 含硒半胱氨酸 | 0  | 0.0  |

**2.3.2 CtAK 基因编码蛋白的二级结构及功能位点分析** 采用 SOPMA 预测 CtAK 编码蛋白的二级结构如图 3 所示, 结果表明 CtAK 编码蛋白二级结构中  $\alpha$ -螺旋(alpha helix)占 39.00%、延伸链(extended strand)占 21.07%、 $\beta$ -折叠(beta turn)占 8.32%、无规卷曲(random coil)占 31.61%。利用在线软件 InterProScan 和 Conserved Domains 进行保守结构域分析, 结果表明该蛋白序列含有 1 个 AAK superfamily 和 2 个 ACT superfamily 保守的结构域, 以上结构域分别位于 76~368 位、387~464 位和 466~530 位氨基酸残基。通过进一步分析 ACT-Like domain 发现, ACT-AK1-AT-1 位于 C 端, 是单功能赖氨酸敏感型植物 AK1 的催化域, 因此本实验将 CtAK 基因命名为 CtAK1。利用 ExPasy Prosite 分析 CtAK1 的功能位点, 结果表明, 天冬氨酸激酶保守功能位点位于 77~85 位, 氨基酸序列为 VMKFGGSSL, 3 种分析工具预测的结果一致, 推测该基因为天冬氨酸激酶家族基因。如图 4-A~C 所示。

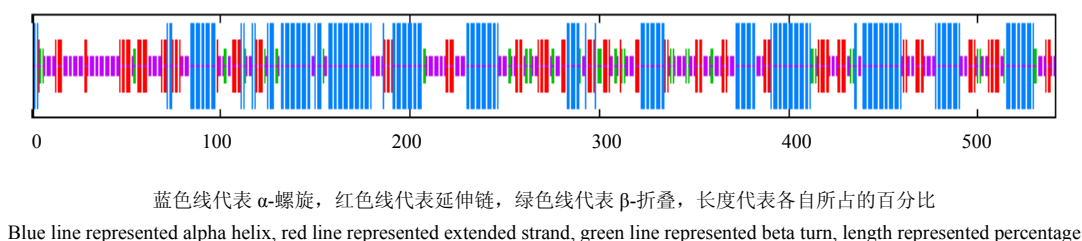
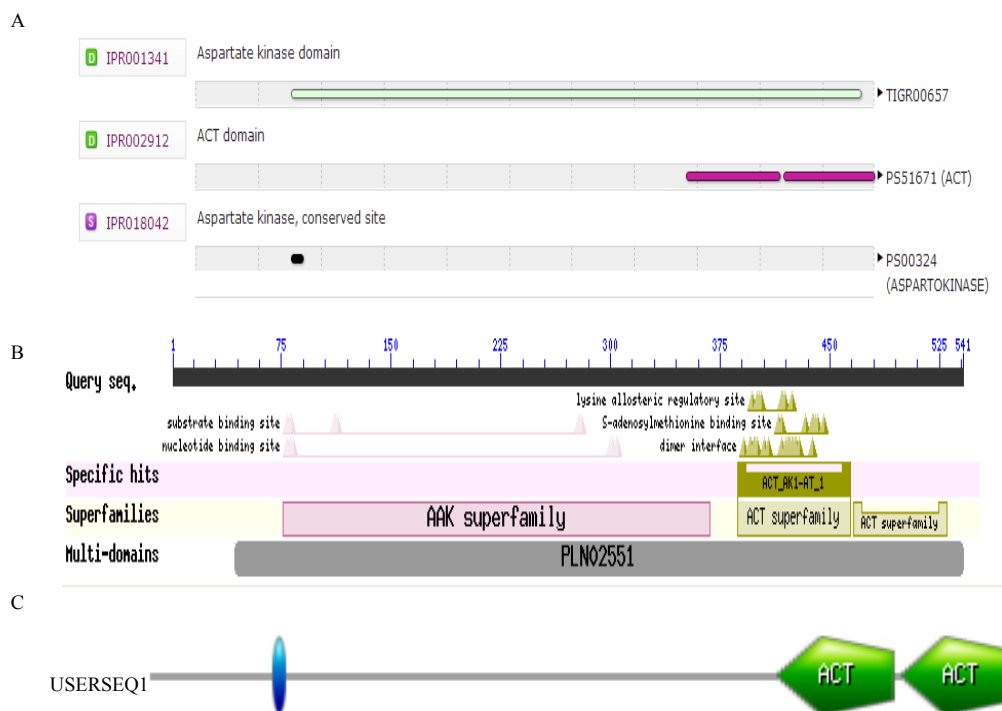


图 3 CtAK 编码蛋白的二级结构

Fig. 3 Secondary structure of protein encoded by CtAK

图 4 CtAK 基因编码蛋白保守结构域 Conserved Domains (A)、Blast (B) 和 InterProScan (C) 分析结果  
Fig. 4 Analysis on Conserved Domains (A), Blast (B), and InterProScan (C) of protein encoded by CtAK

**2.3.3 CtAK1 编码蛋白跨膜区、信号肽、亚细胞定位预测分析** 利用 TMHMM 预测 CtAK1 编码蛋白的跨膜区, 结果显示该蛋白不具有跨膜区, 由此推断该蛋白不经过跨膜转运。利用 SignalP4.1<sup>[6]</sup>工具预测 CtAK1 编码蛋白没有信号肽, 与跨膜区分析相一致。利用在线工具 WOLF PSORT 预测该蛋白的亚细胞定位情况: 叶绿体的定位系数为 12.5 (chlo: 12.5), 叶绿体和线粒体定位系数为 7.5 (chlo\_mito: 7.5)。因此, 该蛋白最可能定位于叶绿体上。

**2.3.4 CtAK1 基因编码蛋白亲疏水性分析** 利用 ExPASy ProtScale 程序对 CtAK1 基因编码的蛋白做亲疏水性预测, 负值表示亲水性, 正值表示疏水性。结果显示该蛋白的疏水性最大值 2.5, 最小值-2.5。从图 5 可以看出, CtAK1 基因编码蛋白的疏水性区

域与亲水性区域交替出现, 没有典型的疏水性区域, 属于两性氨基酸, 与 Protparam 预测结果一致。

**2.3.5 CtAK1 基因编码蛋白三维结构预测** 通过 SWISS-MODEL<sup>[7-8]</sup>进行同源建模, ACT 结构域中主要以  $\alpha$ -螺旋的形式存在 (图 6)。

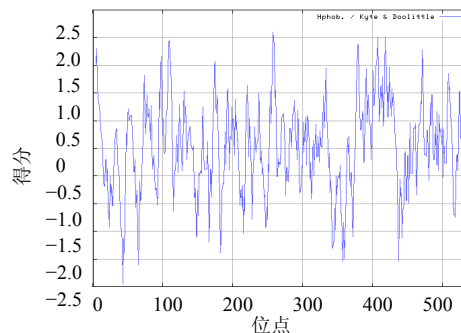


图 5 CtAK1 编码蛋白亲疏水性分析

Fig. 5 Hydrophobicity analysis on CtAK1 encoding protein

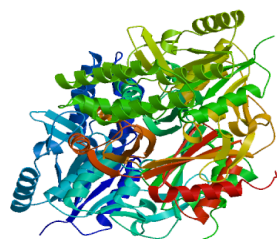


图 6 CtAK1 蛋白 3 维结构

Fig. 6 3D structure of CtAK1 protein

|                              |                                            |     |
|------------------------------|--------------------------------------------|-----|
| SeAK                         | MAATTLHSCGVKTP...YLSFSKASCCQSRSEQQRLH      | 35  |
| CtAK                         | MAAYLCGVGVKTP...CMQLHSRSFCFRHHHNLNLTPL     | 34  |
| EgAK                         | MATAMHLTSVKTSGSDLLAPRSSSRQRCVLQQLHFAFVS    | 40  |
| SeAK                         | FAASLPGSSISSPSGKLAIRLRDAAGKVDVLEKNDTONQ    | 75  |
| CtAK                         | STPIQFPNNPTRP...LKVVCNVQNVDVVTTRTEP...     | 65  |
| EgAK                         | GSSLLLSRSVKKSCRSRGVFKVCCAGANVDVLEKSSAVTQ   | 79  |
| SeAK                         | DSDQIAEELTCVMKFGGSSVASADRMKEVADTILSFFEEER  | 115 |
| CtAK                         | NSHGLIKHFS CVMKFGGSSLASAERMKEVACILISFFFOET | 105 |
| EgAK                         | GFGDSENQLNCVMKFGGSSVASAERMKEVADTIVLSFFNER  | 119 |
| <b>KFGG motif</b>            |                                            |     |
| SeAK                         | EVIVLSAMGKTTNLTLCAGEKSVTCCVSNVSDLEELTTFIK  | 155 |
| CtAK                         | EVIVLSAMGKTTNLTLCAGEKAASCCSAVTEIDELSEFIK   | 144 |
| EgAK                         | EVIVLSAMGKTTNLTLCAGEKAVSCCVTNVSCIDEELSEFIK | 159 |
| SeAK                         | DLHLRTADELGVERSVTSKHLFELEQLNGIAMMKEMTFR    | 195 |
| CtAK                         | ELHHRTVDELGLEKTLTIDHLEKLERLLNGIAVLKEFTFR   | 184 |
| EgAK                         | ELHLRTVKELCVDESLTATHLEELDCLKGIAMMKELTLR    | 199 |
| SeAK                         | TKDYLVSFGECEMSTRIFAAYLNKIGVKAROYDAFEICFIT  | 235 |
| CtAK                         | AKDYLVSFGECEMSTRIFAAYLNKIGVKAROYDAFDMCIIT  | 224 |
| EgAK                         | TRDYLVSFGECEMSTRIFAAYLNKIGVKAROYDAFEICFIT  | 239 |
| <b>T-DN</b>                  |                                            |     |
| SeAK                         | TDDETNADILEATYPAAVKRLHGDWISDEPAIPVTGFLGR   | 275 |
| CtAK                         | TDDETNADILEATYPAAVKRLHGDWISDEPAIPVTGFLGR   | 264 |
| EgAK                         | TDDETNADILEATYPAAVKRLHGDWISDEPAIPVTGFLGR   | 279 |
| SeAK                         | GWRS CAVTTTLGRGGSDDLTTATTIGKALGLREIQVWKDVG | 315 |
| CtAK                         | GWRT CAVTTTLGRGGSDDLTTATTIGKALGLREIQVWKDVG | 304 |
| EgAK                         | GWRT CAVTTTLGRGGSDDLTTATTIGKALGLREIQVWKDVG | 319 |
| <b>Monofunctional AK box</b> |                                            |     |
| SeAK                         | LTCDENIYPRAAPEVELTFDEAAELAYFGAQLVHPOSMRE   | 335 |
| CtAK                         | LTCDENIYSGAPEVELTFDEAAELAYFGAQLVHPOSMRE    | 344 |
| EgAK                         | LTCDENIYTRAPEVELTFDEAAELAYFGAQLVHPOSMRE    | 339 |
| <b>DRP motif</b>             |                                            |     |
| SeAK                         | AREGDIPVRVKNSYNEKAPGTLITRTDRMSEAVLTSIVLK   | 395 |
| CtAK                         | AREGDIPVRVKNSYNEKAPGTLITRTDRMSEAVLTSIVLK   | 384 |
| EgAK                         | AREGDIPVRVKNSYNEKAPGTLITRTDRMSEAVLTSIVLK   | 399 |
| SeAK                         | RNVTMLDIVSTRMLGQFGFLAKVFSIFEDLGISVDVVATS   | 435 |
| CtAK                         | RNVTMLDIVSTRMLGQFGFLAKVFSIFEDLGISVDVVATS   | 424 |
| EgAK                         | RNVTMLDIVSTRMLGQFGFLAKVFSIFEDLGISVDVVATS   | 439 |
| <b>ACT-Like domain</b>       |                                            |     |
| SeAK                         | EVSIISLTLDPSKLWRELIQCASELDHVVEELEKIAVNVN   | 475 |
| CtAK                         | EVSIISLTLDPSKLWRELIQCASELDHVVEELEKIAVNVN   | 462 |
| EgAK                         | EVSIISLTLDPSKLWRELIQCASELDHVVEELEKIAVNVN   | 477 |
| SeAK                         | LCHRSIISLIGNVORSSIILEKAFHVLRTNGVNVQMISQ    | 515 |
| CtAK                         | LCHRSIISLIGNVORSSIILEKAFHVLRTNGVNVQMISQ    | 502 |
| EgAK                         | LCHRSIISLIGNVORSSIILEKAFHVLRTNGVNVQMISQ    | 517 |
| <b>ACT-domain</b>            |                                            |     |
| SeAK                         | ASKVNISLIVNDEAECCVRAALHSAFFE               | 543 |
| CtAK                         | ASKVNISLIVNDEAECCVRAALHSAFFE               | 530 |
| EgAK                         | ASKVNISLIVNDEAECCVRAALHSAFFE               | 545 |

图 7 CtAK1 蛋白的多重序列比对

Fig. 7 Alignment of CtAK1 proteins from different plants

## 2.5 红花 CtAK1 基因植物超表达载体构建

将目的基因与叶绿体转运肽融合后, 将植物表达载体 pCAMBIA3301 和带有含有叶绿体转运肽的目的基因分别用 NcoI 和 BgI II 进行双酶切, 将目的片段与酶切后的 pCAMBIA3301 载体用 T4 DNA 连接酶连接后, 得到植物表达载体 pCAMBIA3301-CTP-CtAK1, 载体构建过程如图 8 所示。将重组载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 对重组质粒进行菌液 PCR

## 2.4 CtAK1 氨基酸序列同源性分析

在前期研究中, 将核心序列构建系统发育树发现: 红花 CtAK 与芝麻 AK 和巨桉 AK 亲缘关系较近, 初步判断 CtAK1 基因属于 AK 家族基因。利用 DNAMAN 软件分析 CtAK1 与芝麻 (SeAK)、巨桉 (EgAK) 的同源性, 结果显示其同源性分别为 81.63% 与 75.76%。如图 7 所示。3 个蛋白均具有 2 个 ACT 结构域和天冬氨酸激酶功能位点, 这说明所克隆的 CtAK1 基因属于天冬氨酸激酶家族。

和酶切验证, 获得预期大小约为 1 785 bp 的融合基因, 证明该植物超表达载体构建成功, 见图 9、10。

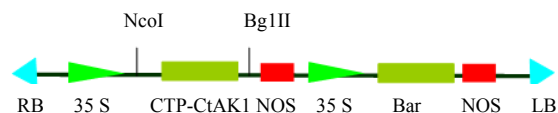


图 8 pCAMBIA3301-CTP-CtAK1 重组载体构建示意图

Fig. 8 Constructed recombinant vector of pCAMBIA3301-CTP-CtAK1

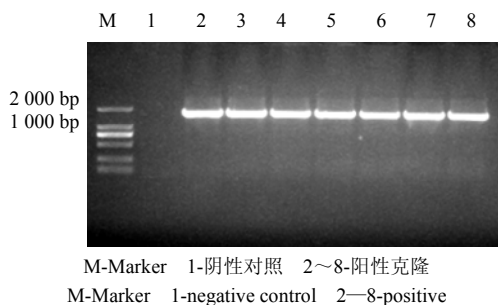


图 9 pCambia3301-CTP-CtAK1 重组质粒菌液 PCR 鉴定  
Fig. 9 PCR identification of pCambia3301-CTP-CtAK1 recombinant plasmid

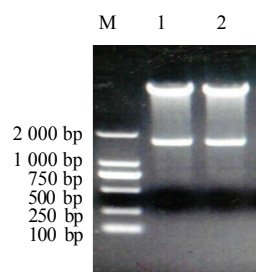


图 10 pCambia3301-CTP-CtAK1 重组质粒酶切鉴定  
Fig. 10 Enzyme digestion identification of pCambia3301-CTP-CtAK1 recombinant plasmid

### 3 讨论

天冬氨酸激酶在高等植物中是控制氨基酸代谢的主要限速酶之一，功能结构域分析推测该酶的活性受末端产物的反馈抑制，为进一步证实 CtAK1 的酶活性，本研究在获得红花转录组测序分析数据等前期工作基础上<sup>[9]</sup>，运用 RACE 技术克隆了红花 CtAK1 基因的全长 cDNA 序列，功能结构域分析发现该基因为单功能反馈抑制敏感 CtAK1，并成功构建植物超表达载体，为进一步实验研究提供了参考依据，为红花在氨基酸代谢调控方面的深入研究提供理论依据。

AK 基因在植物体内存在复杂的作用机制，其中 AK 基因以单功能 Lys 敏感型和双功能苏氨酸敏感型形式存在，均受到代谢终产物的协同反馈抑制<sup>[10]</sup>。通过超表达细菌源反馈抑制不敏感天冬氨酸激酶基因 AK，在苜蓿中赖氨酸的量显著提高，证实 AK 基因在赖氨酸合成代谢中起着决定性的调控作用<sup>[5-11]</sup>。通过在水稻中表达细菌源赖氨酸反馈抑制不敏感 AK，并干扰其分解代谢，发现赖氨酸的量在叶片中提高 12 倍，在种子中提高 60 倍，并且植株的生长无异常表现<sup>[12]</sup>。孟山都公司通过超表

达细菌源反馈抑制不敏感 AK 突变体，导致大豆种子赖氨酸量提高 100 倍，达到了动物饲料要求水平<sup>[13]</sup>。因此，AK 基因对植物种子赖氨酸生物合成具有重要调控作用。但是，目前有关天冬氨酸激酶基因 AK 在红花种子赖氨酸合成途径中的作用机制研究国内外尚未见报道。本研究一方面为探明红花天冬氨酸激酶基因的生物学功能奠定基础，另一方面为利用分子育种技术培育高赖氨酸量的红花新品种奠定基础。

### 参考文献

- [1] 杨玉霞, 吴卫, 郑有良. 红花研究进展 [J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(4): 365-369.
- [2] 赵钢, 王安虎. 红花的资源及药用价值 [J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(3): 25-26.
- [3] 钱学射, 黄奇碧. 红花种子氨基酸分析 [J]. 氨基酸杂志, 1994(2): 33-34.
- [4] 朱军. 遗传学 [M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- [5] Amy C S, Zhu C M, Yanamadala S R, et al. Threonine-insensitive homoserine dehydrogenase from *Soybean genomic organization*, kinetic mechanism, and *in vivo* activity [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 827-834.
- [6] Karsten W E, Viola R E. Chemical and kinetic mechanism of SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions Petersen TN., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H [J]. *Nat Methods*, 2011, 8: 785-786.
- [7] Marco B, Stefan B, Andrew W, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information [J]. *Nucl Acids Res*, 2014, 42(1): W252-W258.
- [8] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2008, 22: 195-201.
- [9] 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.
- [10] Ayse O U, Sami D A F. Biotechnology for enhanced nutritional quality in plants [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2013, 32(5): 321-343.
- [11] Gad G. The aspartate-family pathway of plants Linking production of essential amino acids with energy and stress regulation [J]. *Plant Sig Behavior*, 2011, 6(2): 192-195.
- [12] Long X, Liu Q, Chan M, et al. Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine [J]. *Plant Biotechnol J May*, 2013, 11(4): 490-501.
- [13] Qi Q G, Huang J T, James C, et al. Metabolically engineered soybean seed with enhanced threonine levels: biochemical characterization and seed-specific expression of lysine-insensitive variant so faspartate kinases from the enteric bacterium *Xenorhabdus bovienii* [J]. *Plant Biotechnol*, 2011, 19: 193-204.