

## 红花二氢吡啶二羧酸合酶基因片段的分离及表达分析

张玲<sup>1,3</sup>, 王艳芳<sup>1,2,3#</sup>, 麦迪<sup>2</sup>, 张伟<sup>2</sup>, 胡振林<sup>2</sup>, 杨晶<sup>1,2</sup>, 杜林娜<sup>1,2</sup>, 孙天旭<sup>1,2</sup>, 雷锋杰<sup>3</sup>, 姚娜<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 克隆红花 *Carthamus tinctorius* 赖氨酸合成途径关键酶二氢吡啶二羧酸合酶 (dihydrodipicolinate synthase, DHDPS) 基因并研究其在不同发育时期红花籽粒中的表达量。方法 根据红花转录组文库注释信息筛选出与红花 DHDPS (CtDHDPS) 基因相关的 Unigenes, 设计引物, 以红花总 RNA 的反转录产物为模板, 采用 RT-PCR 技术克隆 CtDHDPS 基因片段, 连接 pEASY-T1 克隆载体, 经 PCR 和酶切鉴定, 筛选阳性克隆并测序。同时利用荧光定量 PCR 技术对其在红花籽粒不同发育时期基因表达量进行分析。结果 分离到长度为 396 bp 的 CtDHDPS 基因片段, 系统发育树分析表明该基因与其他物种的 DHDPS 基因具有较高的同源性。结论 克隆了 CtDHDPS 基因的核心片段, 根据 CtDHDPS 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基因表达量分析, CtDHDPS 基因在红花品种川红 1 号初花后 14 d 表达量最高。

**关键词:** 红花; 二氢吡啶二羧酸合酶; 基因克隆; 同源性; 荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)02-0351-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.022

## Cloning and expression analysis on gene encoding dihydrodipicolinate synthase from *Carthamus tinctorius*

ZHANG Ling<sup>1,3</sup>, WANG Yan-fang<sup>1,2,3</sup>, MAI Di<sup>2</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, HU Zhen-lin<sup>2</sup>, YANG Jing<sup>1,2</sup>, DU Lin-na<sup>1,2</sup>, SUN Tian-xu<sup>1,2</sup>, LEI Feng-jie<sup>3</sup>, YAO Na<sup>1,2</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 clone the dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) gene from *Carthamus tinctorius* (safflower) seeds and study its expression in different developmental stages of seed. **Methods** Primers were designed according to CtDHDPS gene segment which was selected from transcriptome sequencing results of safflower. Taking total RNA of safflower seed as template, CtDHDPS genes were amplified by RT-PCR and connected to pEASY-T1 carrier, and positive cloning was detected by PCR and then sequenced. **Results** Sequencing results showed that 396 bp sequence was acquired. The gene had high homology compared with DHDPS from other species. **Conclusion** The fragment of CtDHDPS gene is cloned from safflower, and PCR primers of safflower are designed based on CtDHDPS gene for Real-time PCR in different developmental stages of safflower seed. The results show that the expression of CtDHDPS genes in DAF 14 in Chuan-hong1 line is the highest.

**Key words:** safflower; dihydrodipicolinate synthase; gene cloning; homology; real-time PCR

收稿日期: 2016-09-13

基金项目: 国家高技术研究发展 (“863”) 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: 张玲 (1990—), 吉林人, 研究方向生药学。

\*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)84533334 E-mail: xiaokunli@163.net

#并列第一作者 王艳芳 (1982—), 女, 吉林人, 讲师, 研究方向为中药资源与开发。

红花 *Carthamus tinctorius* L. 是我国传统大宗中药材之一,为菊科(Compositae)红花属 *Carthamus* L. 一年生或二年生草本植物,又名红兰花、刺红花、草红花等<sup>[1-2]</sup>。我国红花的主产区主要在新疆、四川、云南、河南等省区<sup>[3-4]</sup>。自古以来,红花以活血通经、散瘀止痛等功效而得到广泛使用,在心血管、神经系统及免疫系统等方面均具有一定的药理活性。红花籽粒中含有丰富的不饱和脂肪酸、蛋白质和氨基酸等活性物质,通常用来榨取红花油作为食用油,剩余的红花籽粕作为废料弃之,十分可惜。据文献报道,去壳去油后的红花籽粕中还含有丰富的蛋白质和痕量的氨基酸等物质,并已被认定为非常规饲料。但是由于赖氨酸、蛋氨酸等必需氨基酸的量极低,远远不能满足动物饲料的要求。因此,利用现代分子育种技术来提高红花籽粒中必需氨基酸的量,是将红花籽粕开发成具有科技含量和高经济附加值产品的可行途径,也将进一步扩其应用范围。

赖氨酸、苏氨酸、蛋氨酸和异亮氨酸这 4 种必需氨基酸的生物合成依赖于天冬氨酸代谢途径。赖氨酸合成有多个关键酶的参与,其中二氢吡啶二羧酸合酶(dihydrodipicolinate synthase, DHDPS)是催化赖氨酸合成的第 1 个关键酶<sup>[5-6]</sup>。该基因在 20 世纪 90 年代就已经在小麦、玉米、大豆、拟南芥、烟草等植物中克隆出来<sup>[7-11]</sup>。DHDPS 包括 2 种亚型 DHDPSI 和 DHDPSII,在进化上非常保守。DHDPSI 基因最早从拟南芥中分离出来<sup>[12]</sup>,其中 DHDPSI 中含有 1 个内含子,DHDPSII 中含有 2 个内含子且内含子位置与 DHDPSI 中该内含子的位置相似,2 种基因亚型的表达也相似,核苷酸序列同源率为 84%<sup>[13-14]</sup>。通过在拟南芥中干扰 DHDPS 的表达,发现在控制赖氨酸合成过程中 DHDPS 起着关键的作用。目前有关 DHDPS 基因在红花种子赖氨酸合成途径中的作用机制研究,国内外尚未见相关研究报道。

本实验以红花不同发育时期籽粒转录组分析数据为基础,设计特异性引物,分离红花 DHDPS (CtDHDPS) 基因片段并研究其在红花不同发育时

期籽粒中的表达量,旨在为研究该基因的生物学功能及其在红花赖氨酸生物合成途径中作用的分子机制提供理论依据。

## 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.,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 7 月中旬红花头状花序抽出花丝开始挂牌标记,此时子房尚未开始发育,每隔 1 d 采集 1 次,液氮速冻,存于-80 °C 冰箱中,备用。

### 1.2 试剂

反转录试剂盒(RP6601)购于北京百泰克生物技术有限公司;限制性内切酶、LA Tap、DNA 聚合酶购于百奥生物有限公司;pEASY-T1 Cloning Kit 购于北京全式金生物技术有限公司;胶回收试剂盒与质粒提取试剂盒购于 Axygen 生物技术有限公司;荧光定量试剂盒(RP420A)购于大连宝生物工程有限公司。

### 1.3 引物

本实验所用引物由北京金唯智生物科技有限公司合成,见表 1。

## 2 方法

### 2.1 红花种子总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

采集红花种子于液氮中速冻,存于-80 °C 冰箱中备用。根据 RNAisoPlus 试剂说明书提取红花种子总 RNA,利用微量核酸蛋白检测仪检测总 RNA 的浓度及纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性。根据反转录试剂盒说明书进行 cDNA 的反转录,所得 cDNA 于-20 °C 冰箱中保存备用。

### 2.2 CtDHDPS 基因片段的分离

以反转录获得的 cDNA 为模板,利用核心片段引物(表 1),按照表 2 所示的 RT-PCR 反应体系与反应条件进行 CtDHDPS 基因的克隆。PCR 产物使用 1%琼脂糖凝胶进行凝胶电泳,按照胶回收试剂盒说明书操作步骤进行切胶回收。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物名称	上游序列 (5'→3')	下游序列 (5'→3')
核心片段	GAACCGGCCAAGACATCCTG	CTTTTGGCCAAACCCAGG
荧光定量	GATCTAGAGGCTTTACGATG	GTGTGGCCAATAAGCATG
内参 EF1A	CCAAGAGACCATCAGACAA	GGCACAGTTCCAATACCA
内参 60 S	CATCCATTATCCAACAATC	AAGAGTAATCAGTCTCCA

表 2 RT-PCR 反应体系与条件  
Table 2 RT-PCR reaction system and conditions

PCR 反应体系	PCR 反应条件
LA Tap 0.5 μL	
LA Tap Buffer 5.0 μL	94 °C 预变性, 3 min
dNTP Mixture 8.0 μL	94 °C 变性, 30 s
DHmF (10 μmol/L) 0.5 μL	55 °C 退火, 30 s, 25 个循环
DHmR (10 μmol/L) 0.5 μL	72 °C 延伸, 30 s
cDNA 1.0 μL	72 °C 延伸, 10 min
ddH <sub>2</sub> O 34.5 μL	4 °C 保存
总量 50.0 μL	

### 2.3 阳性克隆的筛选与鉴定

取 4 μL 胶回收产物与 1 μL pEASY-T1 载体混合, 于 PCR 仪中 25 °C 反应 10 min。将连接产物加到 50 μL Trans-T1 感受态中, 冰浴 30 min, 42 °C 热激 30 s, 冰浴 2 min, 加入 250 μL 不含抗生素的液体 LB 培养基, 37 °C, 200 r/min 振荡培养 1 h 后均匀涂在含有卡那霉素的固体 LB 培养皿中, 37 °C 培养过夜。次日挑取单菌落, 将经过 PCR 验证为阳性的样品, 提取质粒, 双酶切鉴定正确后送到上海生工生物技术有限公司测序。

### 2.4 CtDHDPS 基因片段的序列分析

将测序正确的 CtDHDPS 基因在 NCBI 网站上进行 BLAST 分析, 并与其他物种的 DHDPS 基因进行同源性比较。

### 2.5 红花不同发育时期种子中 CtDHDPS 基因的表达分析

提取红花不同发育时期籽粒总 RNA, 反转录成 cDNA。以 EF1A 和 60 S 作为内参基因, 根据 CtDHDPS 基因片段设计荧光定量分析所需的引物, 见表 1。采用 2 步法, 分析 CtDHDPS 在不同发育时期红花籽粒中的表达量, 内参与样品设置 3 个复孔, 根据表 3 所示的反应体系与反应条件进行 RT-PCR。

表 3 RT-PCR 反应体系与反应条件  
Table 3 RT-PCR reaction systems and conditions

PCR 反应体系	PCR 反应条件
SYBR Premix Ex Taq TM 10.0 μL	
DHF (10 μmol/L) 0.4 μL	95 °C、30 s
DHF (10 μmol/L) 0.4 μL	95 °C、5 s
ROX 0.4 μL	58 °C、20 s, 40 个循环
cDNA 2.0 μL	95 °C, 20 s
dH <sub>2</sub> O 6.8 μL	58 °C, 30 s
总量 20.0 μL	95 °C, 20 s

## 3 结果与分析

### 3.1 红花种子总 RNA 的提取

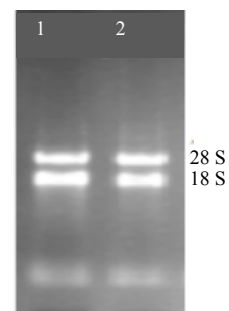
按照 RNAisoPLUS 提取试剂盒说明书提取红花种子总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果 (图 1), 红花种子总 RNA 有 28 S 与 18 S 2 条带, 且 28 S 带的亮度大概是 18 S 带的 2 倍, 说明所提红花 RNA 无降解, 完整性较好, 可以用于后续实验。经微量核酸检测仪检测红花种子总 RNA 质量浓度均在 1 μg/μL 左右, 可以满足后续实验的要求。

### 3.2 目的片段的 RT-PCR 扩增

根据上述步骤提取的红花种子总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 cDNA 为模板, 利用核心片段引物进行 RT-PCR 扩增。经琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物在 396 bp 处有 1 条特异性条带 (图 2)。

### 3.3 目的片段克隆载体构建及测序检测

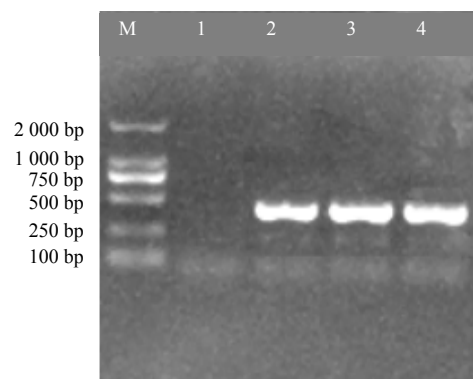
通过胶回收纯化目的片段, 并连接 pEASY-T1 克隆载体, 将连接产物转化 Trans-T1 感受态细胞,



1~2-红花种子总 RNA  
1—2-Total RNA in safflower seed

图 1 红花种子总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA in safflower seed

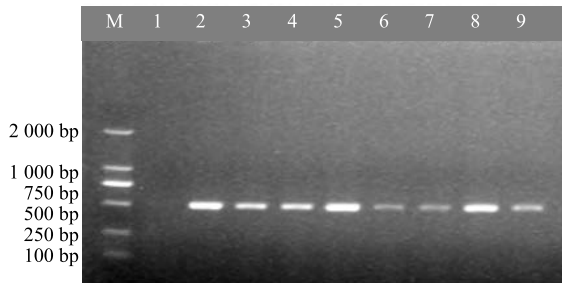


M-Marker 1-阴性对照 2~4-CtDHDPS 核心片段  
M-Marker 1-NC 2—4-core fragment of gene encoding CtDHDPS

图 2 CtDHDPS 基因核心片段 RT-PCR 电泳图

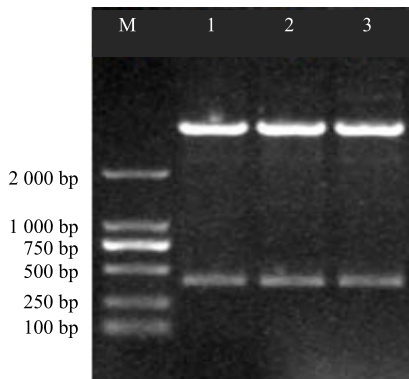
Fig. 2 Core fragment of gene encoding CtDHDPS in safflower amplified by RT-PCR

随机挑取 9 个单克隆进行菌液 PCR 验证, 全部为阳性克隆 (图 3), 提取质粒酶切验证 (图 4), 小片段与目的条带大小一致, 送至苏州金唯智有限公司进行测序。



M-Marker 1-阴性对照 2~9-CtDHDPS 核心片段  
M-Marker 1-negative control 2—9-core fragment of gene encoding CtDHDPS

图 3 pEASY-T1-CtDHDPS 重组质粒菌液 PCR 鉴定  
Fig. 3 PCR identification of recombinant plasmid of pEASY-T1-CtDHDPS



M-Marker 1—3-SpeI/XbaI double-enzyme digestion of pEASY-T1-CtDHDPS

图 4 pEASY-T1-CtDHDPS 重组质粒酶切鉴定  
Fig. 4 Double-enzyme digestion identification of recombinant plasmid

### 3.4 CtDHDPS 基因片段的序列分析

利用 DNAMAN5.0 软件将 CtDHDPS 基因片段测序结果与红花转录物组中筛选得到的 Unigene 序列进行比对, 无碱基突变, 表明测序结果完全正确。将 CtDHDPS 片段进行 Blastn 分析表明, CtDHDPS 基因片段长度为 396 bp (图 5), 与其他物种的 DHDPS 基因具有较高的相似性, 说明 CtDHDPS 基因片段确实存在于红花种子中, 利用 Mega6.0 软件将 CtDHDPS 基因与其他植物中 DHDPS 基因进行氨基酸序列同源性分析并构建系统发育树(图 5), 结果表明 CtDHDPS 基因与葡萄亲缘性较近, 与蓖麻等植物亲缘性较远。

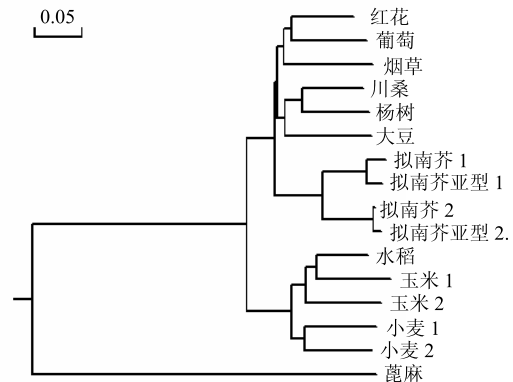


图 5 CtDHDPS 氨基酸序列系统发育树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of gene encoding CtDHDPS in safflower

### 3.5 红花不同发育时期种子中 CtDHDPS 基因的表达分析

提取新疆裕民无刺红花不同发育时期种子总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 EF1A 与 60 S 为内参, 采用 qRT-PCR 技术检测 CtDHDPS 基因在红花不同发育时期种子中的表达量, 结果见图 6。根据相对表达量分析所示, CtDHDPS 基因在红花不同发育时期种子中表达量呈现先升高后降低, 然后骤然上升又下降的趋势, 且在开花后 14 d 种子中表达量最高, 开花后 12 d 种子中表达量最低。

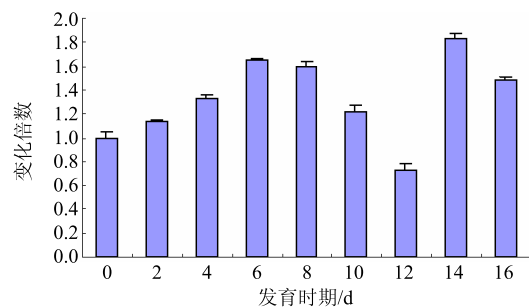


图 6 不同发育时期红花种子中 CtDHDPS 基因的相对表达量  
Fig. 6 Relative expression analysis of CtDHDPS in different development periods of safflower seeds

### 4 讨论

DHDPS 是控制高等植物赖氨酸生物合成最为关键的限速酶, 目前对 DHDPS 基因的研究主要集中在如何调控该酶的活性以最大限度地减少终产物对其的负反馈调节作用, 进而提高终产物的含量<sup>[15]</sup>。本实验在红花转录组测序分析结果的基础上, 运用分子克隆技术分离得到 CtDHDPS 的基因

片段, 长度为 396 bp, 为进一步获得该基因的全长序列奠定基础。经红花转录组数据分析发现, DHDPS 在红花中也存在 2 个亚型。同时在 NCBI 数据库中搜索出 16 条不同物种中 DHDPS 氨基酸序列并进行系统发育树的分析, 发现红花 CtDHDPS 与葡萄 DHDPS 亲缘关系最近, 红花与葡萄均属于双子叶植物纲, 表明该基因在进化上具有一定的保守性。

随着科学的进步, 荧光定量技术已成为用于基因定量分析的主要手段<sup>[16]</sup>, 本研究采用荧光定量技术进行了 CtDHDPS 基因在红花不同发育时期种子中的表达量分析, 结果表明随着种子的逐渐发育, 该基因的表达量呈先升高后降低, 又骤然上升再下降的趋势, 在开花后 14 d 表达量最高, 说明该时期为 CtDHDPS 基因研究的最佳时期。本实验一方面为阐明 CtDHDPS 基因的生物学功能奠定基础, 另一方面为解析 CtDHDPS 基因在红花赖氨酸生物合成途径中作用的分子机制提供科学依据, 同时也为红花的分子育种工作提供重要候选基因。

#### 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] 王兆木, 陈跃华. 红花及其开发利用 [J]. 新疆农业科学, 1995(5): 203-205.
- [3] Zhou X, Tang L, Xu Y, et al. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review [J]. *Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 27-43.
- [4] 扈晓佳, 殷莎, 袁婷婷, 等. 红花的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31(3): 161-168.
- [5] Jander G, Joshi V. Recent progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants Molecular plant [J]. *Molecular Plant*, 2010, 3(1): 54-65.
- [6] Azevedo R A, Arruda P, Turner W L, et al. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in high plants [J]. *Phytochemistry*, 1997, 46(3): 395-419.
- [7] Kaneko Y, Hashimoto T, Kumpaisal R. Molecular cloning of wheat dihydropicolinate synthase [J]. *Biol Chem*, 1990, 265(29): 17451-17455.
- [8] Frisch D A, Tommey A M, Gengenbach B G, et al. Direct genetic selection of a maize cDNA for dihydropicolinate synthase in an *Escherichia coli* *dapA*-auxotroph [J]. *Mol Gen Genet*, 1991, 228(1): 287-293.
- [9] Silk G W, Matthews B F, Somers D A, et al. Cloning and expression of the soybean *DapA* gene encoding dihydrodipicolinate synthase [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 26(3): 989-993.
- [10] Vauterin M, Jacobs M. Isolation of a poplar and an *Arabidopsis thaliana* dihydrodipicolinate synthase cDNA clone [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 25(3): 545-550.
- [11] Ghislain M, Frankard V, Jacobs M. A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction [J]. *Plant J*, 1995, 8(5): 733-743.
- [12] Vauterin M, Frankard V, Jacobs M. The *Arabidopsis thaliana* *dhdps* gene encoding dihydrodipicolinate synthase, key enzyme of lysine biosynthesis, is expressed in a cell-specific manner [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(4): 695-708.
- [13] Craciun A, Jacobs M, Vauterin M. *Arabidopsis* loss-of-function mutant in the lysine pathway points out complex regulation mechanisms [J]. *Febs Lett*, 2000, 487(2): 234-238.
- [14] Sarrobert C, Thibaud M C, Contard-David P, et al. Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutant accumulating threonine resulting from mutation in a new dihydrodipicolinate synthase gene [J]. *Plant J*, 2000, 24(3): 357-367.
- [15] Bochaute P V, 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.
- [16] Pucci M, D'Addario C. Assessing gene expression of the endocannabinoid system [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1412: 237-246.