

• 药材与资源 •

红花 DHDPS 基因全长 cDNA 的克隆及植物表达载体构建

王艳芳^{1,2}, 张玲^{1,2#}, 韩红祥¹, 于洋⁴, 臧埔¹, 毛欣欣¹, 马吉胜¹, 买地努尔·买合木提^{2,3}, 方阔¹, 丁玲¹, 杨小萍¹, 蒋杰¹, 雷锋杰¹, 包京姍¹, 王壮¹, 尹春梅¹, 李海燕^{2,3*}, 李校堃^{1,2,3*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 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

3. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

4. 吉林农业大学 科技管理处, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 克隆红花赖氨酸生物合成途径关键酶二氢吡啶二羧酸合酶(dihydrodipicolinate synthase DHDPS)基因的全长 cDNA 序列, 构建植物超表达载体。方法 根据红花转录组文库注释信息获得红花 DHDPS (CtDHDPS) 基因的中间序列, 通过 RT-PCR 与 RACE 技术从红花种子中克隆 CtDHDPS 基因全长 cDNA 序列。采用 DNA 重组技术构建 pBASTA-CtDHDPS 植物超表达载体。结果 分离 CtDHDPS 基因全长 1 309 bp, 开放阅读框 954 bp, 编码 317 个氨基酸, 编码蛋白理论等电点为 5.93, 相对分子质量约为 34 750.79。通过 DNA 重组技术成功构建了植物超表达载体 pBASTA-CtDHDPS。结论 获得 CtDHDPS 基因全长 cDNA 序列并成功构建植物超表达载体, 为阐明 CtDHDPS 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机制提供科学依据。

关键词: 红花; 二氢吡啶二羧酸合酶; RACE; 生物信息学分析; 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(2017)08-1629-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.023

Cloning of full-length cDNA of gene encoding dihydrodipicolinate synthase from *Carthamus tinctorius* and construction of plant expression vector

WANG Yan-fang^{1,2}, ZHANG Ling^{1,2}, HAN Hong-xiang¹, YU Yang⁴, ZANG Pu¹, MA Ji-sheng¹, MAO Xin-xin¹, MAI Dinuer·MAI Hemuti^{2,3}, FANG Kuo¹, DING Ling¹, YANG Xiao-ping¹, JIANG Jie¹, LEI Feng-jie¹, BAO Jing-shan¹, WANG Zhuang¹, YIN Chun-mei¹, LI Hai-yan^{2,3}, 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

4. Department of Science and Technology Management, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA sequence of DHDPS gene encoding the key enzyme DHDPS in lysine biosynthesis pathway of *Carthamus tinctorius*, and to construct the plant expression vector. **Methods** The dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) gene fragment was acquired according to the sequence of transcriptome in *C. tinctorius*, and the full-length cDNA sequence of CtDHDPS gene from *C. tinctorius* seeds was cloned by RT-PCR and RACE technologies. The pBasta-DHDPS plant expression vector was constructed using traditional molecular cloning and recombination technique. **Results** Bioinformatics analysis showed that the full-length cDNA of CtDHDPS was 1309 bp, open reading frame was 954 bp, encoding a polypeptide of 317 amino

收稿日期: 2016-11-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31401445); 吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20170310KJ); 吉林省科技厅医药产业推进计划项目(20140311034YY); 国家高技术研究发展计划(“863”)项目(2011AA100606); 2017年吉林农业大学大学生创新创业训练计划项目

作者简介: 王艳芳(1982—), 女, 吉林人, 讲师, 研究方向为中药资源与开发。

***通信作者** 李海燕(1971—), 女, 吉林人, 教授, 博士生导师, 研究方向为基因工程。Tel: (0431)84533427 Fax: (0431)84533347 E-mail: hyl99@163.com
李校堃(1964—), 男, 陕西人, 教授, 博士生导师, 研究方向为生物反应器与生物制药。Tel: (0431)84533348 Fax: (0431)84533347 E-mail: xiaokunli@163.net

#并列第一作者 张玲(1990—), 女, 吉林人, 研究方向为生药学。

acids, the theoretical isoelectric point of the coded protein was 5.93, and the molecular weight was about 34 750.79. The plant expression vector pBasta-DHDPS was successfully constructed by traditional molecular cloning and recombinant technique. **Conclusion** The full-length sequence of CtDHDPS gene is obtained and the plant expression vector is successfully constructed, which lays a foundation for the further study on the mechanism of CtDHDPS in regulation of essential amino acid metabolism.

Key words: *Carthamus tinctorius* L.; DHDPS; RACE; bioinformatics analysis; plant expression vector

红花 *Carthamus tinctorius* L. 为菊科红花属一年生草本植物, 在我国已有 2 100 多年的栽培历史。近年来, 红花作为药材、油料、饲料和染料于一身的多功能特种经济作物, 受到国内外研究学者和企业家的广泛关注。现代药理学研究表明, 红花具有活血化瘀、改善微循环、消炎镇痛、抗氧化等作用^[1-3]。而且, 红花具有耐寒、耐旱、耐盐碱等优良特性^[4], 对生长环境要求较低, 在贫瘠的土地也能生长, 因此, 红花具有不与粮争肥沃土地的优势。研究表明, 去油去壳后红花籽粕中赖氨酸等必需氨基酸量甚微^[5], 将其作为动物饲料使用还远远达不到饲料要求标准, 因此, 如何提高红花籽粕中必需氨基酸量是实现红花籽粕饲料化应用亟需解决的关键问题。

赖氨酸作为必需氨基酸的一种, 是十分重要的营养物质, 在人类和单胃动物体内自身不能合成, 必须从食物中额外摄取才能满足自身的营养需求。而且赖氨酸缺乏会导致生长矮小甚至侏儒症。在植物体内, 赖氨酸的生物合成仍然依赖于天冬氨酸代谢途径, 天冬氨酸激酶是整条代谢途径的限速酶^[6-7]。二氢吡啶二羧酸合酶 (dihydrodipicolinate synthase, DHDPS) 是赖氨酸生物合成途径中最关键的限速酶^[8-9], 它通过丙酮酸和赖氨酸残基之间形成的席夫碱, 催化 *L*-天冬氨酸- β -半醛与丙酮酸进行羟醛缩合反应形成羟基吡啶甲酸后直接进入赖氨酸的生物合成途径^[10]。超表达 DHDPS 基因可以提高苏氨酸、异亮氨酸的表达量, 对甲硫氨酸的表达也有一定的影响^[11]。DHDPS 基因在大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌、病原体^[12-14]等微生物中与葡萄、苜蓿、大米、大麦、拟南芥^[15-19]等植物中均具有一定的研究。但是在红花中很少见相关研究报道。

本研究在前期工作基础上, 利用 RACE 技术分离红花 DHDPS (CtDHDPS) 基因的全长 cDNA 序列, 并进行生物信息学分析, 同时构建植物超表达载体, 本研究一方面为明确 CtDHDPS 的生物学功能奠定基础, 另一方面为探索红花赖氨酸生物合成的分子机制, 创新红花种质资源提供重要的遗传信息和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

红花种子购自于新疆红花缘科技有限公司, 经吉林农业大学杨世海教授鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L., 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, 并于开花后挂牌, 采集不同发育时期种子, 经液氮处理, 于 -80 °C 冰箱冻存备用。

RNAisoPLUS 提取试剂盒、反转录试剂盒、限制性内切酶及其他工具酶 (TaKaRa 公司); T4 DNA 连接酶 (Promega 公司); 质粒提取试剂盒、DNA Gel 回收试剂盒 (Axygen 公司); SmarterTM RACE cDNA Amplification kit (Clontech 公司); pEASY-T1 Vector (全式金生物技术有限公司公司); PCR 引物 (上海生物工程技术服务有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 CtDHDPS 基因全长 cDNA 的克隆 根据 RNAisoPLUS 试剂盒提取红花种子总 RNA, 反转录成 cDNA, 以此为模板, 根据 Vector 11.5 软件设计 3'-RACE 和 5'-RACE 引物, dHDPS31: 5'-CCGTATGTGCCCCCTCCCTTTGGC-3', dHDPS32: 5'-GAACGAGATTGGGCGGGAGAAT-3', dHDPS51: 5'-GCCTCTAGATCAAACCTCCCATC-3', dHDPS52: 5'-TCTTAACCTCAGAACTGCGCATCGG-3'。根据 SmarterTM RACE cDNA Amplification kit 试剂盒所提供的说明书进行巢式 PCR 反应扩增出 3' 和 5' 序列, 结合中间片段获得 cDNA 全长序列, 根据所得 cDNA 全长序列设计 DHDPS 基因全长序列扩增引物 DHF: 5'-AGGAGCTGTAGTTCATGGCGAGAG-3' 与 DHR: 5'-CGTGAATCTTTTTCGTTATCGGG-3'。以红花种子总 RNA 反转录成的 cDNA 为模板进行扩增, 将扩增产物进行凝胶回收, 连接 pEASY-T1 克隆载体, 经 PCR 和酶切鉴定后送往苏州金唯智生物科技公司进行测序。

1.2.2 CtDHDPS 基因生物信息学分析 利用 ExPasy Translate 软件推导出 CtDHDPS 全长 cDNA 的氨基酸序列, 使用 ExPasy ProtParam 软件分析其理化性质。使用 InterProScan、Conserved Domains、

ExPasy Prosite 软件进行 CtDHDPS 蛋白质结构域及功能位点分析；使用 PHDsec program 软件进行 CtDHDPS 蛋白的二级结构预测分析，并与拟南芥 AtDHDPS 基因的蛋白质结构域及功能位点进行比较。SWISS-MODEL 软件进行 CtDHDPS 蛋白的三级结构预测分析。

1.2.3 CtDHDPS 基因植物表达载体构建 以 CaMV35S 为启动子，pBasta 载体为骨架，在 CtDHDPS 基因两侧设计含有 Spe I 和 EcoR I 双酶切位点的引物，将 pBasta 载体与 CtDHDPS 基因均用 Spe I 和 EcoR I 进行双酶切并切胶回收，使用 T4 DNA 连接酶进行连接，通过菌液 PCR 及质粒双酶切验证载体是否构建成功。

2 结果与分析

2.1 红花种子总 RNA 的提取

提取新疆裕民无刺红花种子 RNA，经琼脂糖凝胶电泳检测，由结果可知，28 S 与 18 S 条带清晰，无明显拖尾现象，且前者亮度约为后者的 2 倍，说明所提 RNA 完整性比较好，可以用于后续实验。

2.2 CtDHDPS 基因全长 cDNA 的克隆

以红花转录组为基础获得 CtDHDPS 基因中间片段序列，根据 CtDHDPS 基因中间片段序列设计 3'-RACE 引物与 5'-RACE 引物。分别扩增出红花 3' 端序列和 5' 端序列（图 1），与中间片段进行拼接获得全长为 1 309 bp 的 cDNA 序列，将该基因命名为 CtDHDPS。根据获得的基因全长序列在基因两端设计引物，经过 RT-PCR 扩增 CtDHDPS 基因全长（图 2）并构建克隆载体。经测序公司测序，结果表明所得序列与拼接结果一致。

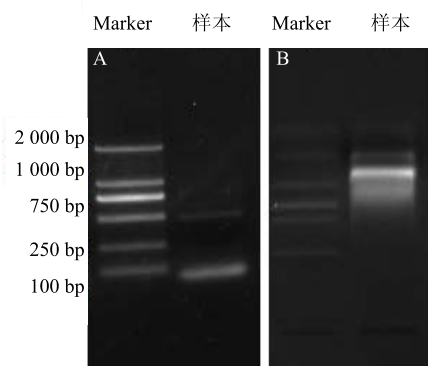


图 1 CtDHDPS 基因 3'-RACE (A) 和 5'-RACE (B) 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoresis RACE of 3' (A) and 5' (B) terminal CtDHDPS

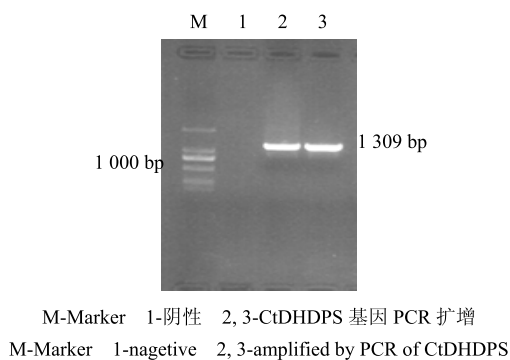


图 2 CtDHDPS 基因全长扩增电泳图
Fig. 2 Electrophoresis PCR of full-length CtDHDPS

2.3 CtDHDPS 基因生物信息学分析

2.3.1 CtDHDPS 基因理化性质分析 利用在线软件 ExPasy Translate 将 CtDHDPS 基因的核苷酸序列翻译成氨基酸序列，结果显示该基因编码 317 个氨基酸。经过 ExPasy ProtParam 软件分析得出，CtDHDPS 分子式为 $C_{1550}H_{2449}N_{425}O_{458}S_{12}$ ，理论等电点为 5.93，相对分子质量为 34 750.79，带正电残基 (Arg+Lys): 29，带负电残基 (Asp+Glu): 35，不稳定系数为 34.19（不稳定系数小于 40，表示该基因所编码蛋白稳定），脂肪系数为 95.27，总平均疏水系数为 -0.071（数值在 +0.5~-0.5，表示该基因所编码蛋白为两性氨基酸，负值表示亲水性，正值表示疏水性），所以 CtDHDPS 基因所编码蛋白稳定，为两性氨基酸，且具有疏水性。在所编码的 317 个氨基酸中，甘氨酸 (Gly) 量最多，为总数的 9.8%，半胱氨酸 (Cys) 与色氨酸 (Trp) 量最低，为总数的 1.3%。

2.3.2 CtDHDPS 基因所编码蛋白亲疏水性分析 利用软件 ExPasy protscale 对 CtDHDPS 编码蛋白进行了亲疏水性分析。结果显示 CtDHDPS 最大值为 1.833，在第 244 个氨基酸残基处，最小值为 -2.611，在第 200 个氨基酸残基处，由图 3 可知，CtDHDPS 没有明显的亲疏水性区域，为两性氨基酸，与上述理化性质分析结果一致。

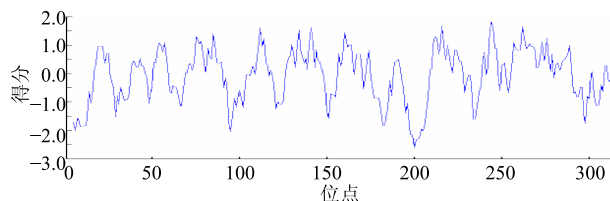


图 3 CtDHDPS 基因所编码蛋白亲疏水性分析
Fig. 3 Hydrophobicity analysis of CtDHDPS encoding protein

2.3.3 CtDHDPS 基因所编码蛋白二级结构与功能域分析 利用 PRABI Lyon Gerland 软件进行 CtDHDPS 编码蛋白二级结构预测, 如图 4 所示, 蓝色代表 α -螺旋 (alpha helix), 红色代表延伸链 (extended strand), 橙色代表无规卷曲 (random coil)。其中 CtDHDPS 中 α -螺旋占 25.87%, 延伸链占 20.19%, 无规卷曲占 52.37%, 无 β -折叠。利用在线软件 ScanProsite 与 Conserved domains 对 CtDHDPS 进行功能域与保守域分析, 均含有 1

个活性位点, 1 个催化域和 1 个 TIM-phosphate-binding superfamily。使用 ExPasy Prosite 进行功能位点分析, 结果显示, CtDHDPS 功能位点位于 53~70 位, 氨基酸序列为 GVIVGGTTGEGQLMS WDE。

2.3.4 CtDHDPS 编码蛋白的三级结构分析 利用 SWISS-MODEL 软件对 CtDHDPS 编码蛋白进行了同源建模, 结果如图 5 所示。

2.3.5 CtDHDPS 同源性分析 经过前期的研究, 发现 CtDHDPS 与葡萄 DHDPS 和烟草 DHDPS 亲缘关

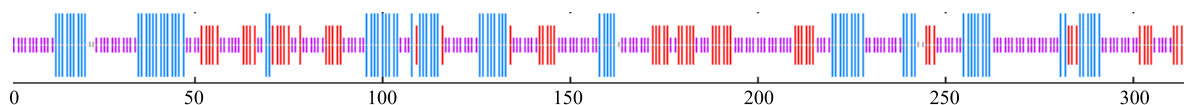


图 4 CtDHDPS 编码蛋白二级结构

Fig. 4 Secondary structure of gene encoding CtDHDPS

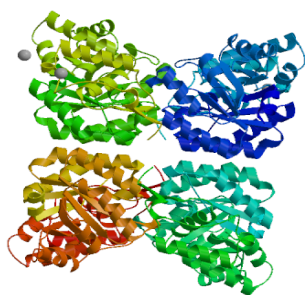


图 5 CtDHDPS 编码蛋白三级结构

Fig. 5 3D Structure of CtDHDPS encoding protein

系较近, 使用 DNAMAN 软件进行了同源性分析, 结果如图 6 所示, CtDHDPS 与葡萄的同源性达到 78.16%, 与烟草的同源性达到 72.85%。

2.4 CtDHDPS 基因超表达载体构建

将植物超表达载体 pBasta 与重组载体 pEASY-T1-CtDHDPS 分别用 Spe I 和 EcoR I 进行双酶切, 将切胶回收后的片段使用 T4 DNA 连接酶进行连接, 获得植物超表达载体 pBasta-CtDHDPS 并转化 Trans-T1 大肠杆菌感受态。对重组质粒进行菌液 PCR 验证 (图 7) 及双酶切验证 (图 8), 均得到

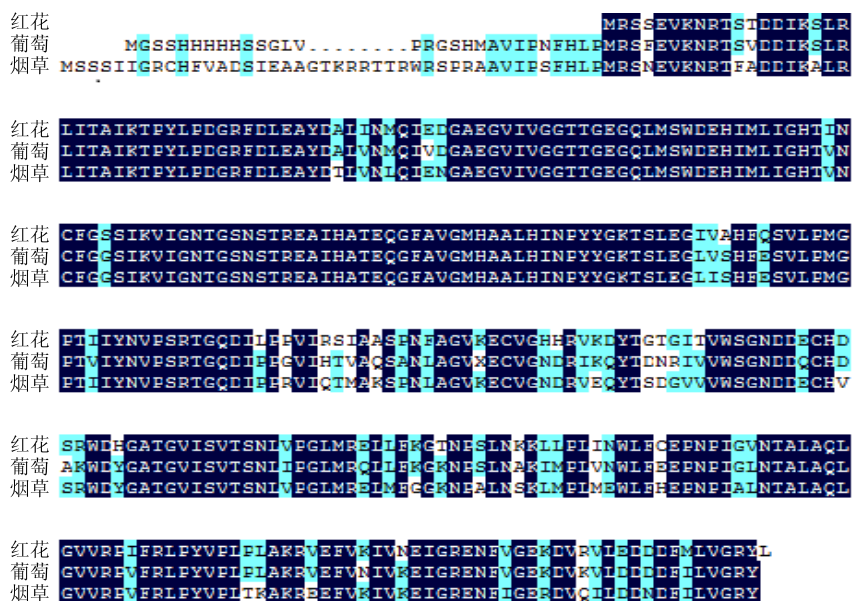
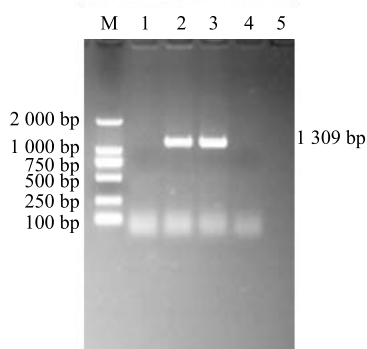


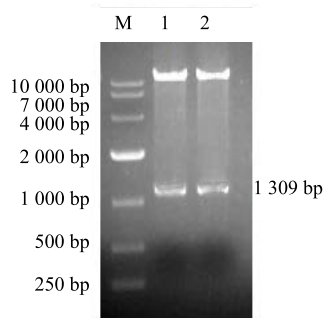
图 6 CtDHDPS 同源性分析

Fig. 6 Alignment of CtDHDPS proteins from different plants



M-Marker 1-阴性 2~4-pBasta-CtDHDPS 菌液 PCR
M-Marker 1-negative 2~4-PCR identification of pBasta-CtDHDPS

图 7 植物表达载体 pBasta-CtDHDPS 菌液 PCR 验证
Fig. 7 PCR identification of pBasta-CtDHDPS



M-Marker 1, 2-pBasta-CtDHDPS 双酶切验证
M-Marke 1, 2-double-enzyme (Spe I/EcoR I) digestion identification of pBasta-CtDHDPS

图 8 pBasta-CtDHDPS 重组质粒双酶切验证
Fig. 8 Double-enzyme digestion identification of pBasta-CtDHDPS

预期大小约为 1 309 bp 的基因片段,说明该植物超表达载体构建正确。经测序验证,目的基因无突变等错误,可以用于后续实验。

3 讨论

DHDPS 是赖氨酸生物合成途径的关键酶之一,目前,DHDPS 基因已从拟南芥、玉米、大豆等植物中分离出来,DHDPS 在植物体内存在复杂的作用机制,DHDPS 包括 DHDPSI 和 DHDPSII 2 种亚型,在进化上非常保守。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 基因起关键作用^[20]。因此,DHDPS 基因对植物种子赖氨酸的生物合成具有重要调控作用。本研究在红花转录组文库注释信息的基础上首次克隆了 CtDHDPS 基因的全长 cDNA 序列,并在生物信息学分析的基础上对比了 CtDHDPS 基因与拟南芥 DHDPS 基因,结果表明二者的预测结果基本一致,说明本研究克隆的 CtDHDPS 基因可能属于 DHDPS

基因家族,具有类似的生物学功能。

赖氨酸是一种非常重要的营养物质,其量的高低是衡量农作物种子营养品质的关键因素之一。据最新的动物营养市场报告显示,预计 2019 年,动物饲料添加剂市场的规模将达到 172.8 亿美元,这一数据中就包括氨基酸、脂肪酸和维生素等成分。但是,在红花、玉米、大豆等饲料作物中赖氨酸量很低,是主要限制性氨基酸。目前,尽管很多国家都开展了以提高农作物种子必需氨基酸量,尤其是赖氨酸量为主要目的的品质改良工作。但是这些作物中赖氨酸量仍然不能满足动物的需求。因此,提高农作物种子赖氨酸量,培育高赖氨酸作物新品系迫在眉睫。本研究采用传统 DNA 重组技术构建了 CtDHDPS 基因植物超表达载体,为明确 CtDHDPS 基因的生物学功能奠定基础,同时为阐明 CtDHDPS 在红花赖氨酸生物合成途径中的作用机制,创新红花种质资源提供重要基因和科学依据。

参考文献

- [1] Zhang L L, Tian K, Tang Z H, *et al.* Phytochemistry and pharmacology of *Carthamus tinctorius* L. [J]. *Amer J Chin Med*, 2016, 44(2): 197-226.
- [2] 魏桂芳,徐磊,姚宏.红花的鉴定标准与药理研究[J].*陕西中医*,2010,31(6):736-737.
- [3] 薛晓珍,张敏.新疆红花的主要营养成分及利用价值[J].*中国食物与营养*,2012(12):40-42.
- [4] 赵钢,王虎安.红花的栽培及其开发利用[J].*药用植物*,2003(8):28-29.
- [5] 王磊,谭勇,王恒,等.新疆不同产地红花中氨基酸含量的测定[J].*食品科技*,2011,36(8):277-278.
- [6] 王艳芳,张娜,张玲,等.红花天冬氨酸激酶基因片段的分离及表达分析[J].*中草药*,2015,46(20):3065-3070.
- [7] 王艳芳,张玲,张娜,等.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[J].*中草药*,2015,46(24):3740-3745.
- [8] Georg J, Vijay J R. Progress in deciphering the biosynthesis of aspartate-derived amino acids in plants [J]. *Mol Plant*, 2010, 3(1): 54-65.
- [9] Feng G, Zhen C, Ping Z, *et al.* Exploring the allosteric mechanism of dihydrodipicolinate synthase by reverse engineering of the allosteric inhibitor binding sites and its application for lysine production [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 1963-1971.
- [10] Georg J, Vijay J. Aspartate-derived amino acid

- biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Arabido Book*, 2009, 7: e0121.
- [11] 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(15): 449-460.
- [12] Belinda B B G, Sean R A D, Renwick C J D, *et al.* The C-terminal domain of *Escherichia coli* dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) is essential for maintenance of quaternary structure and efficient catalysis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 380: 802-806.
- [13] Stefanie K, Judith B, Christoph W. Increased lysine production by flux coupling of the tricarboxylic acid cycle and the lysine biosynthetic pathway-metabolic engineering of the availability of succinyl-CoA in *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Met Eng*, 2013, 15(19): 184-195.
- [14] Sarah C A, Lilian H, Con D, *et al.* PeruginiIdentification of the bona fide DHDPS from a common plant pathogen [J]. *PROTEINS*, 2014, 82(26): 1869-1883.
- [15] Atkinson S C, Doqovski C, Downton M T, *et al.* Structural, kinetic and computational investigation of vitis vinifera DHDPS reveals new insight into the mechanism of lysine-mediated allosteric inhibition [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 81(4/5): 431-446.
- [16] Erzeel E, van Bochaute P, Thu T T, *et al.* Medicago truncatula dihydrodipicolinate synthase (DHDPS) enzymes display novel regulatory properties [J]. *Plant Mol Biol*, 2013, 81(4/5): 401-415.
- [17] Long X, Liu Q, Chan M, *et al.* Metabolic engineering and profiling of rice with increased lysine [J]. *Plant Biot J*, 2013, 11(4): 490-501.
- [18] Ohnoutkora L, Zitka O, Mrizora K, *et al.* Electrophoretic and chromatographic evaluation of transgenic barley expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(15): 2365-2373.
- [19] Griffin M D, Billakanti J M, Wason A, *et al.* Characterisation of the first enzymes committed to lysine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38318.
- [20] 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, doi: 10.1111/ppl.12053.