

大豆 AK 基因的克隆与序列多样性分析

于妍¹, 唐敬仙¹, 姜威², 蒋洪蔚³, 邱红梅⁴, 刘春燕³, 陈庆山², 胡国华³

(1. 长春科技学院 生物食品学院, 吉林 长春 130600; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150090; 4. 吉林省农业科学院 大豆研究所, 吉林 长春 130033)

摘要: 基于 NCBI 网站下载获得的大豆 AK 基因 cDNA 序列设计特异引物, 以大豆品种东农 42 总 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 获得约 1 690 bp cDNA 片段, 经序列比对认定为 AK 基因序列。以 19 个赖氨酸和蛋氨酸含量特殊的大豆品种为材料, 采用相同方法在 RNA 中进行扩增, 并对产物测序, 利用软件对所得序列进行分析。结果显示: 在不同的大豆品种中 AK 基因的核酸序列存在两种变异方式, 第一种是在 336 bp 产生 1 个 T 碱基突变的基因序列, 第二种是在 1 369 ~ 1 374 bp 处出现“CAAGTG”6 个碱基插入的序列; 在蛋白质水平上, 主要是在 456 ~ 457 个氨基酸处存在 A 和 S 两个氨基酸插入突变。AK 基因结构完整, 其编码的蛋白产物具有 AA_kinase、Carbamate kinase-like、Aspartate kinase 和 ACT 保守结构域。本研究首次对大豆中 AK 基因多样性进行了分析, 为大豆天冬氨酸代谢途径其它相关酶基因的研究提供了理论依据, 也为大豆 AK 基因在植物基因工程等领域的研究和应用奠定了良好的基础。

关键词: 大豆; 天冬氨酸代谢; 天冬氨酸激酶(AK); 基因多样性

中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0574

Molecular Cloning and Gene Diversity Analysis of Gene AK in Soybean

YU Yan¹, TANG Jing-xian¹, JIANG Wei², JIANG Hong-wei³, QIU Hong-mei⁴, LIU Chun-yan³, CHEN Qing-shan², HU Guo-hua³

(1. College of Biology and Food, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130600, China; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 3. The Crop Research and Breeding Center of Heilongjiang Land Reclamation, Harbin 150090, China; 4. Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: AK gene was cloned from soybean, a cDNA product about 1 690 bp was amplified from the total RNA of soybean leaves by reverse transcription PCR(RT-PCR) with specific primers designed with the full length sequence of AK gene from NCBI. The cDNA of 19 varieties were amplified with the same way. The PCR products were cloned, sequenced, and analyzed with bioinformatics software. The results showed that there were two mutant alleles of nucleotide sequences in different soybean varieties, the first was the sequence which had a nucleotide substitution, the second was the sequence which had an insertion of 6 nucleotides between 1 369 and 1 374 bp. There were only one mutant allele of amino acid sequences in protein level, which was an insertion of 2 amino acids at 456–457 amino acid residue. The structure of AK was completed, the conserved domains of AA_kinase, Carbamate kinase-like, Aspartate kinase, and ACT were found in protein of AK. The gene diversity analysis of gene AK in soybean was studied for the first time in this research. The results provided a theoretical basis for the study of other related enzymes in the aspartate pathway of soybean, and also laid a good foundation for the research and application of AK gene in plant genetic engineering and other fields.

Keywords: Soybean; Aspartic acid metabolism; Aspartate kinase(AK); Gene diversity

大豆是世界上重要的经济作物之一, 其蛋白质是植物性蛋白质的重要来源, 具有很高的营养价值。大豆中含有人体所必需的氨基酸, 而其营养价值主要体现在以天冬氨酸为前体的必需氨基酸含量上。在植物中, 天冬氨酸经新陈代谢产生赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸和异亮氨酸^[1-2], 这些氨基酸对于人类都非常重要^[3]。天冬氨酸代谢途径中, 天冬氨酸激酶(AK)是第一个关键酶^[4], 天冬氨酸盐在其催化下, 经磷酸化生成 β -天门冬酰磷酸

(ASA)。后经天冬氨酸半醛脱氢酶催化转变为 β -天门冬酰半醛^[5]。此后该途径可分为两个分支, 一条是赖氨酸的生物合成, 而另一条分支在形成 O-磷酸高丝氨酸后又分为两个亚类, 一个是在苏氨酸合酶(TS)催化下合成苏氨酸, 再经苏氨酸脱氢酶(TD)以及支链氨基酸转氨酶(BCAT)催化合成异亮氨酸的途径; 另一个是在胱硫醚 γ -合酶(CGS)、胱硫醚 β -裂解酶(CBL)以及蛋氨酸合酶(MS)共同

收稿日期: 2015-10-20

基金项目: 长春科技学院校内科研启动基金项目; 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD201213); 教育部新世纪优秀人才支持计划(NECT-1207-01)。

第一作者简介: 于妍(1984-), 女, 硕士, 讲师, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: 35789362@qq.com。

通讯作者: 陈庆山(1973-), 教授, 博导, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: qshchen@126.com;

胡国华(1951-), 研究员, 博导, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: hugh757@vip.163.com。

催化下合成蛋氨酸的途径^[6]。目前对于 AK 基因的研究大多集中在细菌中^[7-11],在植物中的研究很少,仅拟南芥中有相关报道^[11-14]。

本课题组在前期工作中利用 EST 数据库已经电子克隆(in silico cloning)了大豆天冬氨酸代谢途径的关键酶基因^[15],并对其进行了电子定位与结构分析^[16],但 AK 基因在大豆上的研究目前仍未见报道。由于 AK 基因是天冬氨酸代谢途径的第一个关键酶基因,控制蛋氨酸和赖氨酸的合成,若蛋氨酸、赖氨酸含量很高或很低的大豆品种中存在 AK 基因碱基或氨基酸序列的某种特定突变,则认为这种突变可影响蛋氨酸和赖氨酸的合成。基于以上原因,本试验克隆了大豆全长 AK 基因,并利用测序的方法获得多个蛋氨酸和赖氨酸含量特异品种的 AK 基

因序列,利用生物信息学软件分析 AK 基因的序列多样性,为氨基酸含量特殊大豆品种的选育提供了有利的理论基础,也为大豆天冬氨酸代谢途径其它相关酶基因的研究提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

依据吉林农业科学院作物科学研究所测得的大豆种质资源蛋氨酸和赖氨酸含量数据,从中选取赖氨酸含量 $<0.100\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $>0.300\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 以及蛋氨酸含量 $<0.003\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $>0.050\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 的大豆品种,共 19 份(表 1),大豆材料由吉林农业科学院杨春明老师馈赠。

表 1 蛋氨酸、赖氨酸含量特殊的大豆品种
Table 1 Soybean varieties with special methionine or lysine content

编号 Code	全国统一编号 No.	品种名称 Variety	蛋氨酸含量 Methionine content/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	赖氨酸含量 Lysine content/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	0924	满仓金	—	0.000560467
2	0890	黄脐	—	0.000949201
3	0778	压破车	—	0.00386904
4	0534	白脐子	—	0.004899181
5	0468	紫花矬子	—	0.00579825
6	0917	白脐	—	0.007529263
7	0755	大黄豆	—	0.087429028
8	0754	大白眉	—	0.01417929
9	1066	黄脐	—	0.34926894
10	7187	双城黑豆	—	0.35333887
11	1147	丰地黄	—	0.361122974
12	0144	李玉珍	—	0.36638387
13	—	紫脐	—	0.388314779
14	1176	小鹦哥豆	—	0.407421986
15	7163	黑豆	—	0.380348676
16	17784	小黄榕	0.001742351	—
17	0018	黑农 23	0.002780607	—
18	7278	前郭小褐毛	0.057510205	—
19	6828	北丰 2 号	0.056427644	—

—表示全国统一编号不明; ———表示该大豆品种对应氨基酸含量不作为品种选择的标准。
— denoted ZDD was unknown; ——— denoted the corresponding amino acid content of the soybean variety was not standard for variety selection.

将 19 个大豆品种的种子用自来水浸泡过夜, 种植于直径 30 cm 高 25 cm 的盆钵中, 待长出三出复叶后, 取幼嫩新鲜叶片放于 -80°C 冰箱保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 以 AK 基因序列为模版, 利用 DNAMan 设计引物, 序列如下: AK1F 5'-ATGGCAA-GCGCGTTGCAGC-3'; AK1R, 5'-CTAAGATAACT-CATCAACAG-3'。引物由上海生工合成。

1.2.2 大豆叶片总 RNA 提取及第一链 cDNA 合成 采用 Trizol (Invitrogen) 方法提取大豆叶片总 RNA。使用 M-MLV (Invitrogen) 反转录合成 cDNA 的第一链, 直接用做 PCR 扩增模板。

1.2.3 AK 基因克隆及测序 以东农 42 大豆品种 cDNA 为模板, AK1F/AK1R 为引物对, 扩增全长基因特异片段。反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 35 s, 58°C 35 s, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。反应完毕后取 10 μL 于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。回收目的片段并连接到 pGEM T-easy Vector 上, 转化 DH5 α 感受态细胞, 对重组质粒进行 PCR 扩增, 将验证为阳性的重组质粒送交测序。19 个供试大豆品种的 AK 基因的克隆及测序方法同上。

1.2.4 序列多样性分析 利用 DNAMan 查找引物序列并去除冗余序列; 运行 DNAMan \rightarrow Sequence \rightarrow Multiple Alignment Sequence 对目标序列进行比对; 运行 DNAMan \rightarrow Protein \rightarrow Translation Overview 分析目标序列是否能通读; 运行 DNAMan \rightarrow Protein \rightarrow Translation 翻译得到目标序列的氨基酸序列; 运行 EBI \rightarrow Clustaw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 对多个基因序列进行比对; 利用 EBI \rightarrow InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) 预测 AK-1 编码蛋白的保守结构域; 利用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 对蛋白质的三级结构进行分析; 利用 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/>) 的三级结

构预测功能对蛋白质进行三级结构预测; 利用 DNAMan \rightarrow Protein \rightarrow Hydrophobicity Profile (Hydrophilicity Profile) 分析基因的疏水性和亲水性。

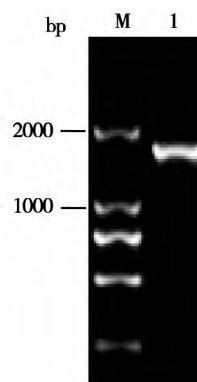
2 结果与分析

2.1 大豆 AK 基因的克隆

以东农 42 叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。扩增得到一条特异性 cDNA 条带, 与预期大小相一致 (图 1)。利用 DNAMan 将克隆序列与 NCBI 网站下载序列进行比对, 两序列在核酸水平上相似性达 99.6%, 可认定为 AK 基因序列。测序结果验证 AK 基因全长 1 689 bp, 编码 562 个通读的蛋白质氨基酸序列和一个终止密码子序列。

2.2 AK 基因在 RNA 中的扩增

以 19 个大豆品种 cDNA 为模版, 利用引物 AK1F/AK1R 进行 AK 基因的扩增, 产物利用琼脂糖凝胶检测。从图中 Marker 可知在这些大豆品种中扩增得到的产物长度均符合 1 690 bp 左右, 变化不明显 (图 2)。

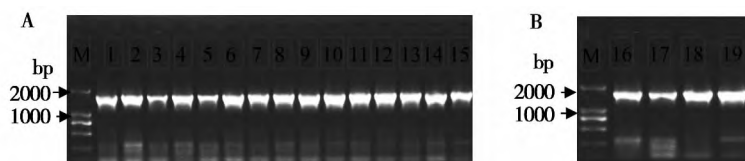


M: 标准 DNA 分子量 Marker; 1: RT-PCR 产物。

M: DNA molecular mass marker; 1: RT-PCR product.

图 1 大豆 AK 基因的 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR of AK in soybean



A: 赖氨酸含量特殊品种; B: 蛋氨酸含量特殊品种; M: 标准 DNA 分子量 Marker; 1~19 为大豆品种编号。

A: The varieties with special methionine content; B: The varieties with special lysine content; M: DNA molecular mass marker; 1-19: Serial number of soybeans.

图 2 不同大豆品种 AK 基因在 cDNA 中的扩增结果

Fig. 2 PCR results of AK amplification from cDNA of different soybeans

去除测序拼接结果的冗余序列后, 小黄榕、北丰 2 号、压迫车、李玉珍和紫脐的 AK 基因序列为 1 695 bp, 而其它 14 个品种的 AK 基因序列为 1 689 bp。利用 DNAMAN→Multiple Alignment Sequence 将所得序列与 AK 基因序列多序列比对, 结果显示各序列的同源性很高, 可以认定这些序列为 AK 基因序列。

2.3 不同品种中 AK 基因的相似度

不同品种 AK 基因序列在核酸水平比对结果显

```

1 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
2 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
3 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
4 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
5 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
6 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
7 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
8 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
18 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
19 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
17 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
16 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
15 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
14 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
13 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
12 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
9 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
10 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
11 ATGAAAGAGGTGGCTACCCCTTATATTGAGTTTCCCGAGGAGAGGCCTATTGTTGTTCTC 360
*****

1 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
2 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
3 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
4 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
5 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
6 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
7 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
8 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
18 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
19 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
17 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
16 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
15 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
14 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
13 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
12 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
9 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
10 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
11 TTGACACTGGATCCATCAAAGCTATGGAGCAGAGAGCTAATTCAGCAGC-----AACTT 1374
*****

```

图 3 19 个基因序列的 Clustaw2 比对结果

Fig. 3 Alignment result of 19 genes by Clustaw2

用相同方法将两个基因突变序列翻译的氨基酸进行比对, 结果如图 4 所示: AK-1 基因序列较正常序列在 456 ~ 457 氨基酸处多丙氨酸和丝氨酸 2 个氨基酸; 而 AK-2 基因序列虽然在 356 bp 发生了 1 个碱基的突变, 但是由于氨基酸密码子具有摆动性, 所翻译的氨基酸与其它两个基因序列一致, 且无氨基酸序列的插入, 因此该突变为无意突变。由该结果可以看出在不同大豆品种中, AK 基因编码的氨基酸序列的突变形式仅有 1 种, 即在 456 ~ 457 氨基酸处存在丙氨酸和丝氨酸 2 个氨基酸的插入。

AK-1 编码的蛋白保守结构域预测结果显示(图

示(图 3): 各序列的相似度(identify) 很高, 而编号为 9、10 和 11 的 3 个蛋氨酸含量特殊的品种黄脐、双城黑豆和丰地黄的 AK 基因序列在 336 bp 均出现 1 个 T 碱基的突变, 小黄榕、北丰 2 号、压迫车、李玉珍和紫脐的 AK 基因序列在 1 369 ~ 1 374 bp 处都出现“CAAGTG”6 个碱基的插入。在本研究将与小黄榕等品种中的扩增相同的产物命名为 AK-1; 与双城黑豆等品种中的扩增相同的产物命名为 AK-2。

5): AK-1 编码 565 个氨基酸, 其编码氨基酸序列在 84 ~ 367 氨基酸区为 AA_kinase 保守结构域, 85 ~ 380 氨基酸区为 Carbamate kinase-like 保守结构域, 401 ~ 472 氨基酸与 480 ~ 542 氨基酸区为 ACT 保守结构域, 83 ~ 556 氨基酸区为 Aspartate kinase 保守结构域。由以上数据可以看出 AK-1 蛋白序列由于存在丙氨酸和丝氨酸 2 个氨基酸的插入, 使其与正常基因序列相比, 除 ACT 保守结构域和 Aspartate kinase 保守结构域的位置存在差别外, 其它结构域的位置完全相同, 说明 AK 基因在此区域容易发生碱基的插入。

```

AK-1 MASALQQLQGVQGKLAIVMSVRRSLHHCKSQIGFAALGAPVCARRVWGNRVAFSVTTCKA
AK-2 MASALQQLQGVQGKLAIVMSVRRSLHHCKSQIGFAALGAPVCARRVWGNRVAFSVTTCKA
*****

AK-1 STSDVIEKNATENGMSSEGETSFICVMKFGGSSVASADRMKEVATLILSFPEERPIVVL
AK-2 STSDVIEKNATENGMSSEGETSFICVMKFGGSSVASADRMKEVATLILSFPEERPIVVL
*****

AK-1 SAMGKTTNKLLLAGKAVSCGVINVSSIEELCFIKDLHLRTVDQLGVDGSSVSKHLEELE
AK-2 SAMGKTTNKLLLAGKAVSCGVINVSSIEELCFIKDLHLRTVDQLGVDGSSVSKHLEELE
*****

AK-1 QLLKGIAMMKELIKRTQDYLVSFGECSIRIFAAYLNKIGVKARQYDAFEIGFITDDFT
AK-2 QLLKGIAMMKELIKRTQDYLVSFGECSIRIFAAYLNKIGVKARQYDAFEIGFITDDFT
*****

AK-1 NADILEATYPAAKRLHGDWLSIPAIAIVTGFLGKARKSCAVTTLGRGGSDLTATTIGKA
AK-2 NADILEATYPAAKRLHGDWLSIPAIAIVTGFLGKARKSCAVTTLGRGGSDLTATTIGKA
*****

AK-1 LGLPEIQVWKDVGVLICDENIYPKAEFVPYLTIDEAAELAYFGAQLHPQSMRPARESD
AK-2 LGLPEIQVWKDVGVLICDENIYPKAEFVPYLTIDEAAELAYFGAQLHPQSMRPARESD
*****

AK-1 IPVRVKNSYNPKAPGTLITKARDMSKAVLTSIVLKRNVIMLDIASTRMLGQYGFIAKVFS
AK-2 IPVRVKNSYNPKAPGTLITKARDMSKAVLTSIVLKRNVIMLDIASTRMLGQYGFIAKVFS
*****

AK-1 IFEELGISVDVATSEVSVSLTLDPSKLWSRELIIQQASELDHVVEELEKIAVNVLLQNR
AK-2 IFEELGISVDVATSEVSVSLTLDPSKLWSRELIIQQ--ELDHVVEELEKIAVNVLLQNR
*****

AK-1 IISLIGNVQRSSILRLSRVLRITLGVTVQMISQGASKVNISLVNDSEAEQCVRALHSA
AK-2 IISLIGNVQRSSILRLSRVLRITLGVTVQMISQGASKVNISLVNDSEAEQCVRALHSA
*****

AK-1 FFESELESEMDYKNGNGSVDELS*
AK-2 FFESELESEMDYKNGNGSVDELS*
*****

```

图4 AK-1 和 AK-2 蛋白序列比对结果

Fig. 4 Aligment result of protein sequence of AK-1 and AK-2

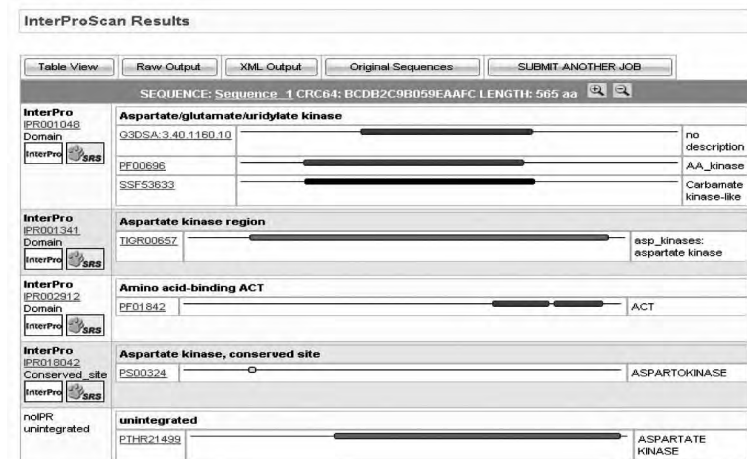


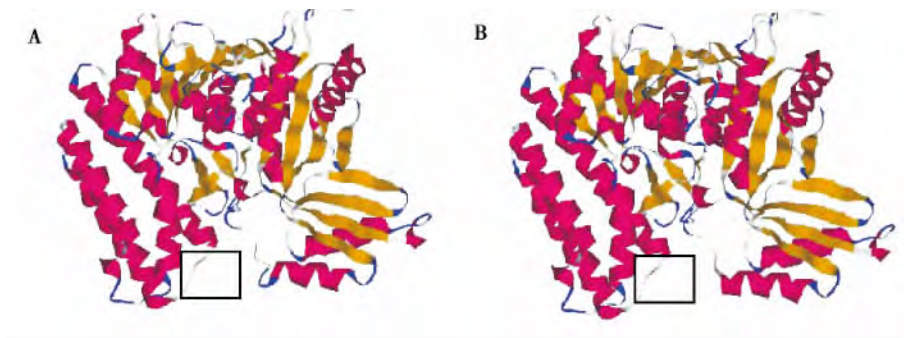
图5 AK-1 基因编码的蛋白的保守结构域

Fig. 5 Conservative domains of protein encoded by AK-1

如图6所示,比较AK-1基因与正常AK基因编码的蛋白质的三级结构,AK-1蛋白质三级结构中的1个 α -螺旋在长度上比正常基因序列编码的蛋白质(AK-2)稍短一些,但原有短的部分 α -螺旋转变成1个 β -转角,其余部位结构一致。由这两个三维结构示意图可以得出AK-1具有18个 α -螺旋;25个 β -折叠;38个 β -转角;AK-2具有18个 α -螺旋;25个 β -折叠;37个 β -转角。说明在456~457氨基酸处的丙氨酸和丝氨酸2个氨基酸的插入形成了1个 β -转角的结构。结果也表明在赖氨酸与蛋氨酸含量

特殊的大豆品种中AK基因存在两种三维结构。

蛋白质结构疏水性和亲水性的分析结果显示(图7):AK-1与AK-2两个基因编码蛋白的疏水性与亲水性完全一致,说明赖氨酸与蛋氨酸两个氨基酸的缺失并未对AK基因编码蛋白的疏水性亲水性造成影响。可以看出整个AK基因编码蛋白的疏水性很强,疏水性区域可能形成该蛋白的活性功能区。而相比较而言AK基因编码蛋白的亲水性较弱。



A: AK-1; B: AK-2; 图中带有方框区域为结构不同区域。

A: AK-1; B: AK-2; the area with frames were the different structure.

图 6 AK-1 与 AK-2 基因编码蛋白质的三维结构示意图

Fig. 6 Protein three-dimensional structure of proteins encoded by AK-1 and AK-2

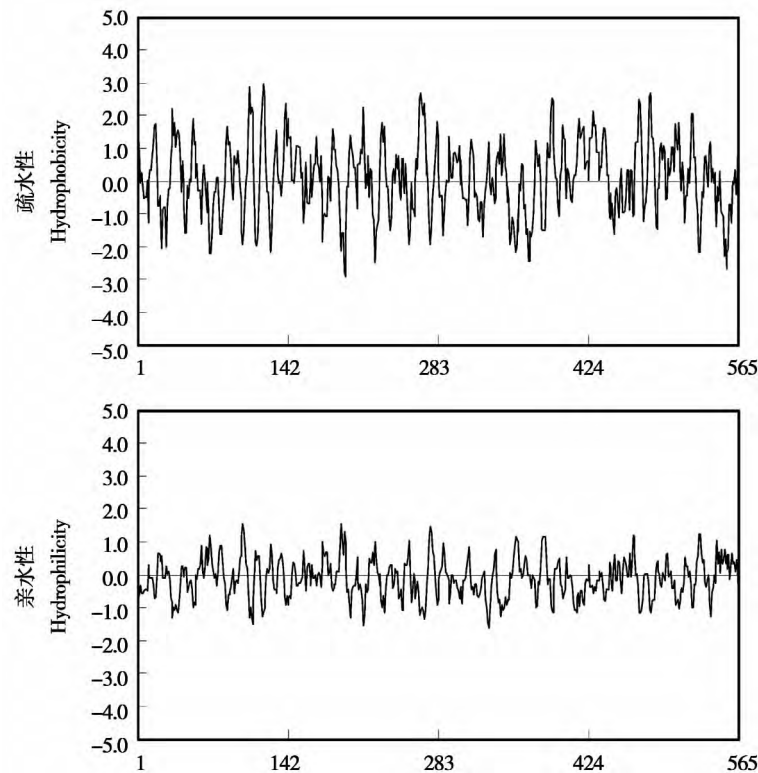


图 7 大豆 AK 基因编码蛋白的疏水性和亲水性分布图

Fig. 7 Hydrophobicity and Hydrophilicity of soybean AK gene Product

3 结论与讨论

基因多样性是生命进化和物种分化的基础,目前对于大豆^[17-19]、水稻^[20]、玉米^[21]等作物基因多样性的研究已取得了相应的进展,但大多停留在基因组 DNA 水平。由于其许多多态性标记在非编码区,与基因表达与否无关,所以对于基因多态性的研究是间接的,不能检出基因位点内部的碱基变异。本研究经 RT-PCR 克隆了大豆的 AK 基因,并以种质资源中赖氨酸、蛋氨酸含量特殊的 19 个大豆品种的 cDNA 为模版,对 AK 基因序列进行扩增、测序和分析。材料的特殊性利于比较氨基酸合成代谢途径中关键酶基因的差异,因此对 AK 基因序列多样性

的分析得到了更为确切的研究结果。

由结果可以看出,在这些赖氨酸和蛋氨酸含量特殊的大豆品种中,AK 基因存在 2 种核酸序列突变以及 1 种氨基酸序列突变,3 个蛋氨酸含量特殊的品种的 AK-2 基因序列存在的核酸序列突变为无义突变,AK-1 基因序列存在的核酸序列突变导致 1 种氨基酸序列突变。不同的 AK 基因编码的蛋白质产物具有相同的保守结构域,存在 2 种三维结构,AK-2 基因和正常 AK 基因编码蛋白的三维结构相同,AK-1 基因和正常 AK 基因编码蛋白的三维结构不同。不同基因序列仅与部分氨基酸含量特殊的大豆品种相对应,原因可能是 AK 基因是天冬氨酸代谢中的第一个关键酶基因,它调控了 3 个代谢分支,

而且这 3 个分支又由多种其它酶参与调控,生成多种中间产物,所以 AK 基因编码蛋白主要控制的氨基酸并不显而易见,在今后的研究中需要对该途径中每个基因进行较为细致的研究才有可能获得更加准确的结论。本研究首次对大豆中 AK 基因的多样性进行了分析,为大豆天冬氨酸代谢途径其它相关酶基因的研究提供了参考依据,也为大豆 AK 基因在植物基因工程等领域的研究和应用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Cohen G N, Hermann K M, Somerville R L, et al. The common pathway to lysine, methionine, and threonine[J]. Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation, 1983, 147-171.
- [2] Viola R E. The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis[J]. Accounts of Chemical Research, 2001, 34: 339-349.
- [3] 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(SI): 7-11. (Yu Y, Song W K, Liu C Y, et al. Research development of key enzymes gene on aspartic acid metabolic pathway in plants[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(SI): 7-11.)
- [4] 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]. Molecular Breeding, 2003, 11: 187-201.
- [5] Karsten W E, Viola R E. Chemical and kinetic mechanism of aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase from *Escherichia coli* [J]. Biochimica et Biophysica ACTA-Biomembranes, 1991, 1077: 209-219.
- [6] David C B, Ishac N, Geard D W. Simultaneous *in vitro* assay of the first four enzymes in the fungal aspartate kinase inhibitor[J]. Chemistry & Biology, 2003(10): 967-973.
- [7] Ferreira R R, Varisi V A, Meinhardt L W, et al. Are high-lysine cereal crops still a challenge? [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2005, 38: 985-994.
- [8] Ferreira R R, Vendemiatti A, Gratão P L, et al. Determination of aspartate kinase in maize tissues [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 62: 184-189.
- [9] Paris S, Viemon C, Curien G, et al. Mechanism of control of *Arabidopsis thaliana* aspartate kinase-homoserine dehydrogenase by threonine [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278: 5361-5366.
- [10] Paris S, Wessel P M, Dumas R. Overproduction, purification, and characterization of recombinant bifunctional threonine-sensitive aspartate kinase-homoserine dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Protein Expression and Purification, 2002, 24: 105-110.
- [11] Paris S, Wessel P M, Dumas R. Overproduction, purification, and characterization of recombinant aspartate semialdehyde dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Protein Expression and Purification, 2002, 24: 99-104.
- [12] Frankard V, Vauterin M, Jacobs M. Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA coding for a monofunctional aspartate kinase [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 34: 233-242.
- [13] Tang G L, Zhu J X, Amir R, et al. Cloning and expression of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a monofunctional aspartate kinase homologous to the lysine-sensitive enzyme of *Escherichia coli* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 34: 287-293.
- [14] Yoshioka Y, Kurei S, Machida Y. Identification of a monofunctional aspartate kinase gene of *Arabidopsis thaliana* with spatially and temporally regulated expression [J]. Genes & Genetic Systems, 2001, 76: 189-198.
- [15] 于妍,姜威,唐敬仙,等.利用 EST 数据克隆大豆天冬氨酸代谢途径关键酶基因[J].基因组学与应用生物学,2009,28(4): 651-658. (Yu Y, Jiang W, Tang Y X, et al. Cloning of key enzyme genes on aspartic acid metabolic pathway in soybean based on EST data [J]. Genomics and Applied Biology, 2009, 28(4): 651-658.)
- [16] 于妍,姜威,唐敬仙,等.大豆天冬氨酸代谢途径关键酶基因的电子定位与结构分析[J].大豆科学,2010,29(1): 22-27. (Yu Y, Jiang W, Tang Y X, et al. Electronic mapping and structure analysis of key enzyme genes on aspartic acid metabolic pathway in soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 22-27.)
- [17] Zhu Y L, Song Q J, Hyten D L, et al. Single-nucleotide polymorphisms in soybean [J]. Genetics, 2003, 163: 1123-1134.
- [18] Choi I Y, Hyten D L, Matukumalli L K, et al. A soybean transcript map: Gene distribution, haplotype and SNP analysis [J]. Genetics, 2007, 176: 685-696.
- [19] 陈丽华,刘丽君,刘页丽,等.不同基因型大豆 GS₁ 基因的克隆与分析[J].东北农业大学学报,2011,42(7): 101-106. (Chen L H, Liu L J, Liu Y L, et al. Cloning and analysis of GS₁ genes from different Soybean varieties [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(7): 101-106.)
- [20] 刘传光,张桂权.水稻单核苷酸多态性及其应用现状[J].遗传,2006,28(6): 737-744. (Liu C G, Zhang G Q. Single nucleotide polymorphism(SNP) and its application in rice [J]. Hereditas, 2006, 28(6): 737-744.)
- [21] Guillet-Claude C, Birolleau-Touchard C, Manicacci D, et al. Nucleotide diversity of the *ZmPox3* maize peroxidase gene: Relationships between a MITE insertion in exon 2 and variation in forage maize digestibility [J]. BMC Genetics, 2004, 5(1): 1-11.