



帅 良, 李 静, 韩冬梅, 等. 龙眼己糖激酶基因的克隆及原核表达[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 91-97.

龙眼己糖激酶基因的克隆及原核表达

帅 良¹, 李 静¹, 韩冬梅², 吴振先¹

(1 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院 果树研究所, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】克隆龙眼 *Dimocarpus longan* 己糖激酶 (Hexokinase, HKX) 基因, 并对其进行生物信息学分析及原核表达分析。【方法】以龙眼总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 结合 RACE 法获得基因全长 cDNA 序列, 构建 pET-32a-*DIHXX* 原核表达载体, 转化到大肠埃希菌 *Escherichia coli* Rosetta (DE3) 中诱导表达。【结果和结论】成功克隆龙眼己糖激酶基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *DIHXX*, 登录号为 KF776906.1。龙眼 *DIHXX* 序列全长 2 101 bp, 包括 1 个 1 488 bp 的开放阅读框, 预测编码 495 个氨基酸; 进化树和相似性分析发现, 该基因与温州蜜柑 *Citrus unshiu* 的相似性最高, 达到了 82%; 荧光定量表达分析表明, *DIHXX* 基因随着果实的发育成熟表达量逐渐上升; 经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 检测, 所构建的原核表达载体表达的融合蛋白与预期蛋白大小相吻合。由此可见, 利用 RT-PCR 结合 RACE 方法成功克隆了龙眼的己糖激酶基因, 构建原核表达载体, 并在大肠埃希菌 Rosetta (DE3) 中获得高效表达。

关键词: 龙眼; 己糖激酶; 基因克隆; 荧光定量 PCR; 原核表达

中图分类号: S667.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2015)03-0091-07

Cloning and prokaryotic expression of hexokinase gene from *Dimocarpus longan*

SHUAI Liang¹, LI Jing¹, HAN Dongmei², WU Zhenxian¹

(1 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract:【Objective】Hexokinase gene (named *DIHXX*) was cloned from longan, *Dimocarpus longan* cv. Shixia, fruit. The bioinformatics and prokaryotic expression of *DIHXX* were analyzed.【Method】Total RNA extracted from longan fruit was used as a template. The full length cDNA of the gene was cloned using a combination of RT-PCR and RACE-PCR. Prokaryotic expression vector pET-32a-*DIHXX* was constructed and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) to induce expression.【Result and conclusion】The full length cDNA of *DIHXX* was cloned and its NCBI GeneBank accession number was KF776906.1, which has 2 101 bp nucleotides including a 1 488 bp ORF. It was predicted to encode 495 amino acids. It had the highest homology with the *Citrus unshiu* (82%) through the NCBI and evolutionary tree analysis. The results of quantitative RT-PCR showed that *DIHXX* gene expression increased gradually during the longan fruit maturation. Induced by IPTG and determined by SDS-PAGE, the inducing expressed recombinant protein from prokaryotic expression vector was consistent with the putative protein of *DIHXX*. Therefore, the full length of *DIHXX* has been cloned and its prokaryotic expression vector has been constructed successfully. It was induced to express effectively in *E. coli* Rosetta (DE3).

Key words: *Dimocarpus longan*; hexokinase; gene cloning; quantitative RT-PCR; prokaryotic expression

收稿日期: 2014-03-10 优先出版时间: 2015-04-14

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150414.0945.019.html>

作者简介: 帅 良 (1986—), 男, 博士研究生, E-mail: 107206202@qq.com; 通信作者: 吴振先 (1971—), 男, 教授, 博士, E-mail: litchi2008@126.com

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (荔枝龙眼) 资助 (CARS-33-14)

龙眼 *Dimocarpus longan* 属于无患子科 Sapindaceae 龙眼属,是我国南方主要的亚热带果树之一,产区主要分布在广东、广西、福建、海南等省. 龙眼果实属于糖直接积累型,果实发育前期只有极少数的淀粉积累,果实发育后期均以可溶性糖的形式贮藏于液泡中^[1]. 龙眼果实成熟时期假种皮中可溶性固形物质量分数可达 22%~24%,在龙眼果实的可溶性固形物中,糖是主要组成成分,因此糖组分及其含量在一定程度上已经成为衡量龙眼品种好坏的一个重要指标^[2]. 大多数高等植物通过光合作用在叶片中产生以蔗糖为主的碳水化合物,并通过韧皮部运输分配到不同的库组织中^[3]. 蔗糖进入库器官后,在蔗糖合成酶或转化酶作用下分解为果糖和葡萄糖,果糖和葡萄糖均为己糖^[4-6]. 己糖经过磷酸化后才能进入糖酵解途径,从而为植物的生理活动提供能量和中间代谢产物,因而己糖磷酸化对维持植物的呼吸作用是必不可少的^[3]. 己糖磷酸化的催化酶统称为己糖激酶(Hexokinase, HXK). HXK 是一种双功能酶,不仅催化己糖磷酸化,而且在糖信号感受和传达方面有很重要的作用,同时它也是植物体呼吸代谢过程中的关键酶之一^[7]. 因此,探明龙眼果实中 HXK 的生化性质对其糖信号调控机制和人工调控龙眼果实中糖含量,提高龙眼果实品质有非常重要的意义.

自从 Minet 等^[8]通过功能互补表达文库从拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中鉴定出第一个植物 HXK 基因. 目前 GenBank 已登录多种高等植物 HXK 基因全长或片段序列. 但是关于无患子科的 HXK 基因至今鲜见报道. 本论文以龙眼为研究材料,分离克隆出龙眼果实 HXK 基因的 cDNA 全长序列,通过荧光定量技术分析了该基因在果实不同发育期间表达变化情况,并且构建了该基因的原核表达载体,在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中进行表达,为深入探索 HXK 基因在龙眼果实糖代谢过程中所起作用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为石硤龙眼 *D. longan* cv. Shixia,采自广东省农业科学院果树研究所.

参照韩冬梅等^[9]对龙眼果实发育进程的研究,分别于花后 59、73、87、94、101 和 110 d 摘取不同发育阶段龙眼果实,其中花后 110 d 为果实成熟采收时期. 摘取的果实立即运回实验室,去梗,选取发育正

常、外观良好的果实作为试验材料.

采集的假种皮样品于液氮中速冻,置于 -80 ℃ 超低温冰箱中保存.

1.2 龙眼果实总 RNA 的提取及反转录 cDNA 的合成

从龙眼各发育阶段假种皮中分别提取总 RNA,参照热硼酸方法^[10],并稍作改动. 使用纯度合格且已经去除基因组 DNA 的混合果皮和果肉的 RNA 为模板,采用 TaKaRa cDNA 合成试剂盒进行反转录,反转录酶为 Reverse Transcriptase M-MLV,使用 Random Primer 引物,严格按照说明书的方法进行 cDNA 的合成,产物于 -40 ℃ 条件下保存备用.

1.3 龙眼果糖激酶基因(DIHXX)的克隆

根据 GenBank 上登录的其他物种 HXK 基因序列,重点关注亚热带果树,经过比对保守区域序列设计特异引物 P1 和 P2. 以龙眼 cDNA 为模板进行片段扩增:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min. 反应产物于 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测后,切胶回收,连接至 pMD18-T 载体,转化大肠埃希菌 DH5α,菌液鉴定后送上海生工生物工程公司测序.

根据克隆得到的 HXK 基因片段序列设计 3' RACE 的 P3、P4 引物以及 5' RACE 的 P5 引物;3'端的获得使用 TaKaRa 3'-Full RACE Core Set 试剂盒,方法按照说明书步骤进行,5'端的获得通过 TaKaRa 的 Clontech Smart 试剂盒,方法按照说明书步骤进行. 扩增产物进行回收转化后测序. 根据所得的拼接序列,在起始密码子处和终止密码子处设计引物 P6 和 P7,进行 PCR 扩增,得到全长序列;引物设计、序列分析使用 DNAMAN 和 Primer 5. 本试验中使用的引物序列见表 1,引物均委托上海捷瑞生物工程有限公司合成.

1.4 生物信息学分析

使用 GenBank 的 BLAST 工具进行序列检索;引物设计、序列拼接及分析采用 DNAMAN 6.0 软件;使用 NCBI 中的 ORF Finder 工具寻找基因的开放阅读框(ORF);使用 ExPASy ProtParam 进行蛋白质的理化性质分析;使用 TMHMM 2.0 进行跨膜结构预测与分析;亚细胞定位使用 PSORT;使用 ClustalX 1.83 软件对氨基酸序列进行多重比对;使用 MEGA 5.0 软件中的 Neighbor-Joining 法(邻位相连法, NJ)建树,并进行编辑和测试.

表 1 引物序列及用途

Tab. 1 Sequence of primers and their usage

引物编号	序列(5'→3') ¹⁾	用途
P1	AACTTCGCTCCTGCGAGTA	HXK 片段扩增
P2	GCTCCAATGCCTGATCCAT	
P3	GTTTGCTGCTGTAATCTTGGG	DIH XK-3'RACE Outer
P4	AGATACCGTAAGGGATGGGA	DIH XK-3'RACE Inner
P5	GATGCGATGACCTGAAATTACCCCA	DIH XK-5'RACE
P6	AAAAGTGGTGGGGCGATGGG	DIH XK-ORF 扩增-For
P7	TGGCACAAACTCTTGATAAGGGTA	DIH XK-ORF 扩增-Rev
P9	GGCTGATATC <u>GGATCC</u> ATGGGGAAAGTAGCAGTGGG	pET-32a-DIH XK 载体构建
P10	CCGCAAGCTT <u>GTCGAC</u> TCATGATGCAGCCACAAGTT	
P11	TGGGTGACAACAGGTCAAGTATC	扩增 GAPDH
P12	TTATAGGCAGCCAAGCGACTT	
P13	TTACTGGGAGAGGAACTGGCT	定量 RT-PCR
P14	AACAAAATAAAAAATCGTTATGGC	

1) 下划线为载体上的酶切位点, *Bam*H I (GGATCC)和 *Sal* I (GTCGAC)。

1.5 龙眼果糖激酶基因 (*DIH XK*) 的表达

选用 *DIH XK* 基因作为内参基因进行龙眼果实 RT-PCR 分析. 20 μL 扩增体系: cDNA 模板 1 μL, 上游引物 P13 和下游引物 P14 各 1 μL, 反应 SYBR Green MIX 10 μL (Toyobo), ddH₂O 7 μL. RT-qPCR 反应程序: 50 ℃ 2 min; 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 25 s, 72 ℃ 35 s, 40 个循环. PCR 扩增程序之后添加溶解程序, 得到溶解曲线. 内参基因扩增体系使用引物为 P11 和 P12.

1.6 原核表达载体的构建

使用 Clontech 发明的 In-Fusion 技术, 于 Clontech 网上设计带 *Bam*H I (GGATCC) 和 *Sal* I (GTCGAC) 酶切位点的上下游引物 P9 和 P10, PCR 反应体系为 20 μL: 10 × LA *Taq* PCR buffer 2 μL, 引物 P9 和 P10 各 1 μL (10 μmol · L⁻¹), LA-*Taq* 酶 0.2 μL, dNTP Mixture 2 μL (2.5 mmol · L⁻¹), cDNA 2 μL, ddH₂O 补至 20 μL. PCR 程序: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 1.5 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min. PCR 产物使用 12 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测. 目前条带经切胶、纯化、回收, 所获得的片段在 In-Fusion HD Enzyme Premix 酶的作用下连接到经过 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切回收后的 pET-32a 载体上, 50 ℃ 条件下连接 15 min. 连接产物转入 DH5α 感受态细胞, 涂板于含氨苄抗性的 LB 平板上, 37 ℃ 条件下培养 16 h 以上, 选取重组质粒, 通过 PCR、双酶切筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行正确性验证. 将构建成功的表达质粒命名为 pET-32a-*DIH XK*, 将测序完全

正确的重组质粒转化到大肠埃希菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞中, 以验证单克隆的正确性.

1.7 重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

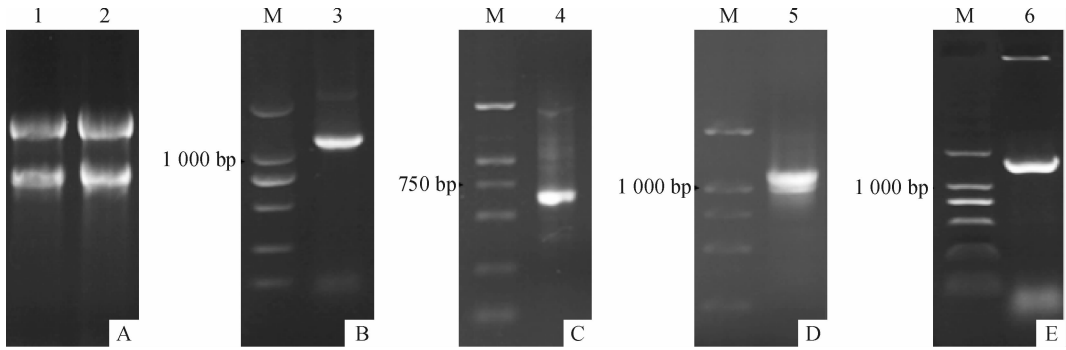
选取正确的单克隆细胞接种到 5 mL 含 50 μg · mL⁻¹ 氨苄的 LB 培养基中, 恒温振荡培养 12 h, 然后将菌液按体积比 1: 100 的比例加入到 5 mL 含 50 μg · mL⁻¹ 氨苄的 LB 培养基中, 37 ℃ 条件下 200 r · min⁻¹ 振荡培养, 期间不断测定 *D*_{600 nm} 的变化, 至 *D*_{600 nm} 为 0.5 ~ 0.6 时, 加入 IPTG 诱导剂进行诱导表达, IPTG 的终浓度为 0.4 mmol · L⁻¹, 于诱导表达后的 1、3、5 和 7 h 时离心收集菌体, -20 ℃ 条件下保存菌体. 使用未经 IPTG 诱导的菌液作为空白对照, 同时以 pET-32a 质粒转化菌加 IPTG 和不加 IPTG 分别诱导 3 h 后收集菌体作为正对照.

取 10 μL 菌体沉淀与等体积的上样缓冲液混匀, 进行 SDS-PAGE 胶的电泳检测, 凝胶使用 R-250 染色并脱色至背景清晰.

2 结果与分析

2.1 龙眼果实总 RNA 的提取

从植物组织中提取 RNA 是进行分子生物学研究的前提, 进行下一步试验需要高质量的 RNA, 而纯度和完整性是评价 RNA 质量品质的 2 个关键指标. 经过测定, 本试验提取的 RNA 的 *D*_{260 nm}/*D*_{280 nm} 均在 1.8 ~ 2.0 之间, 由图 1A 可以确定所提取 RNA 纯度较高, 可以进行下一步试验.



M; DNA maker DL2000; 1、2: 总 RNA; 3: 保守区扩增; 4: 3'RACE 的第 2 轮扩增; 5: 5'RACE 的扩增; 6: ORF 扩增.

图 1 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Results of agarose gel electrophoresis

2.2 龙眼果实 HXK 基因全长的 cDNA 克隆

根据 GenBank 已有序列设计特异性引物 P1 和 P2,以提取的总 RNA 直接反转录获得的 cDNA 为模板,经过 PCR 扩增出 1 条与预期目标片段相符、约 1 100 bp 的 DNA 片段,经测序分析为 HXK 基因片段(图 1B).采用 3'RACE 方法扩增 HXK 基因的 3'端,经 2 轮扩增后得到长度 600 bp 的 DNA 片段(图 1C),采用 5'RACE 方法扩增获得 HXK 基因的 5'端,产物长度约 1 000 bp(图 1D).最后将所得片段和 3'端及 5'端进行拼接,得到 HXK 基因的全长 cDNA 序列,找到起始密码子 ATG,终止密码子 TGA,并设计 ORF 引物进行序列全长准确性验证(图 1E).

2.3 DIHXK 生物信息学分析

经分析对比发现,获得了 HXK 基因的全长,命名为 DIHXK,其全长 cDNA 序列约 2 101 bp,包括 1 个 1 488 bp 的 ORF,1 个长 249 bp 的 5'非翻译区序列和 1 个长 361 bp 的 3'非翻译区,后面带着 1 个长 12 bp 的 poly (A) 尾,编码 495 个氨基酸. 经过 ExPASy ProtParam 推测,该蛋白相对分子质量为 53 700,等电点为 6. 20,说明该蛋白呈酸性,该蛋白含 Leu (L) 最多,达 10. 1%,不含 Sec (U) 和 Pyl (O). 总的带正电残基(Arg + Lys) 为 56,负电残基(Asp + Glu) 为 62,不稳定系数 35. 02,为稳定蛋白,其脂溶指数为 96. 15, GRAVY (Grand average of hydropathicity) 值为 - 0. 007,属亲水蛋白. 经 TM-HMM2. 0 推测,该蛋白具有跨膜区域,是膜蛋白. 由此可知, DIHXK 是跨膜的亲水稳定性蛋白. 经过 PSORT 推测,该蛋白亚细胞定位在叶绿体中的可能性最大.

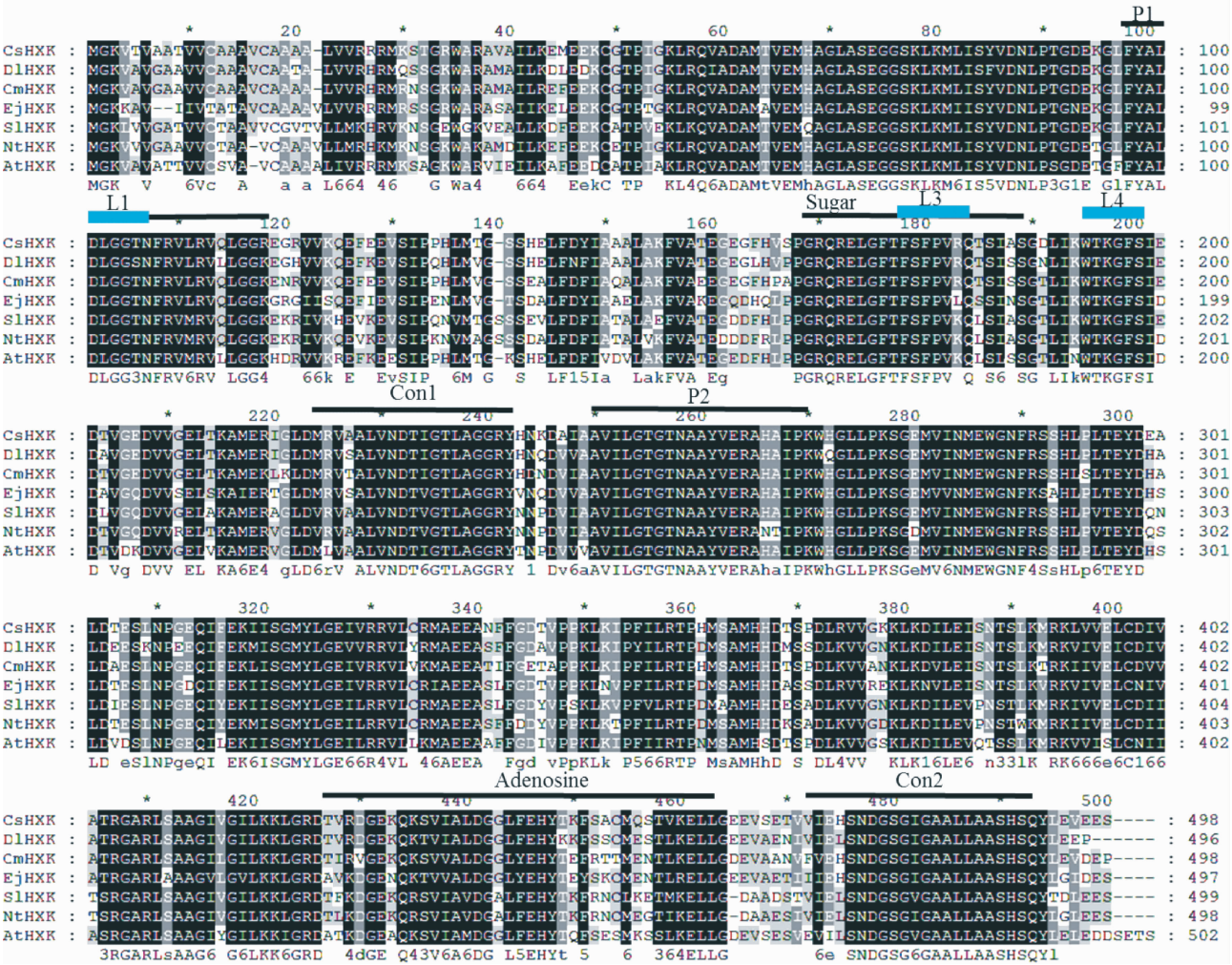
直接对获得的碱基序列在 NCBI 网站上 BLAST,分析其与其他物种 HXK 基因的相似性发现,与甜橙

Citrus sinensis (AF196966. 1) 的相似性达到了 86%,与向日葵 *Helianthus annuus* (DQ835563. 2) 的相似性达到了 77%,与拟南芥 (NM _ 119057. 3、AK230265. 1、U18754. 2、U28214. 1、) 的相似性达到 76% 以上. 通过对其预测编码的氨基酸序列与其他植物中 HXK 基因的相似性分析发现,与温州蜜柑 *Citrus unshiu* (AAG28503. 1) 相似性达到了 82%,与甜瓜 *Cucumis melo* (ACJ04704. 1)、番茄 *Lycopersicon esculentum* (NP_001234710. 1)、枇杷 *Eriobotrya japonica* (ADZ96378. 1)、甘蓝 *Brassica oleracea* (AAL60584. 1)、烟草 *Nicotiana tabacum* (AAS60195. 1) 等物种相似性分别达到了 79%、71%、74%、73%、74%. 与拟南芥 (NP_179576. 1) 的相似性也达到了 72%. 使用 ClustalX 1. 83 软件将其与其他植物 HXK 基因编码的氨基酸序列做相似性比对(图 2),HXK 蛋白含有核心糖结合域 (Sugar: LGFTFSFP-Q-L/I),并含有 4 个肽段 (L 1-4) 其中 L2 是不保守的肽段区域,2 个磷酸化点 (P1, P2), 2 个结合位点 (Con1, Con2) 和 1 个腺苷酸 (Adenosine) ^[11].

进行相似性进化分析后,进一步用 MEGA5 构建系统进化树(图 3). 结果显示 DIHXK 与温州蜜柑 AAG28503. 1 的相似性最高,这与相似性分析结果相一致.

2.4 龙眼 DIHXK 基因的表达分析

运用实时荧光定量 PCR 技术,以龙眼 GAPDH 基因为内参,检测龙眼果实发育期间的 DIHXK 基因的表达情况(图 4). 结果发现, DIHXK 基因的表达量随着果实的发育逐渐增加,在果实成熟采收时期达到表达的最大值,这与果实在盛夏采收时期温、湿度较高导致的生理活动旺盛和呼吸强度较高有一定关系.



P1:Phosphate 1;Con 1;Connect 1; P2:Phosphate 2; Con2;Connect 2; L1 :Loop1; L3:Loop3;L4:Loop4. 基因序列登录号 *CsHXK*:温州蜜柑 *Citrus unshiu* AAG28503.1; *CmHXK*:甜瓜 *Cucumis melo* ACJ04704.1; *SlHXK*:番茄 *Solanum lycopersicum* NP_001234710.1; *NtHXK*:烟草 *Nicotiana tabacum* AAS60195.1; *AtHXK*:拟南芥 *Arabidopsis thaliana* NP_179576.1; *EjHXK*:枇杷 *Eriobotrya japonica* ADZ96378.1; *DlHXK*:本文克隆.

图2 *DIHXK* 基因与其他植物中 *HXK* 基因编码的氨基酸序列相似性比较
Fig.2 The amino acid sequence alignment of *DIHXK* compared with *HXK* genes of other species

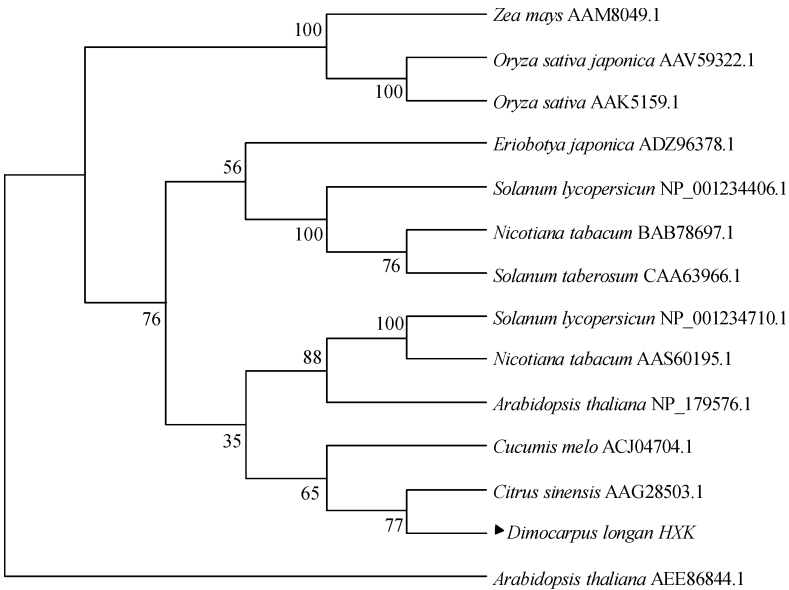


图3 *DIHXK* 与其他物种 *HXK* 基因编码的氨基酸序列进化树分析
Fig.3 The phylogenetic tree of amino acid sequences based on *DIHXK* and other species with *HXK* gene

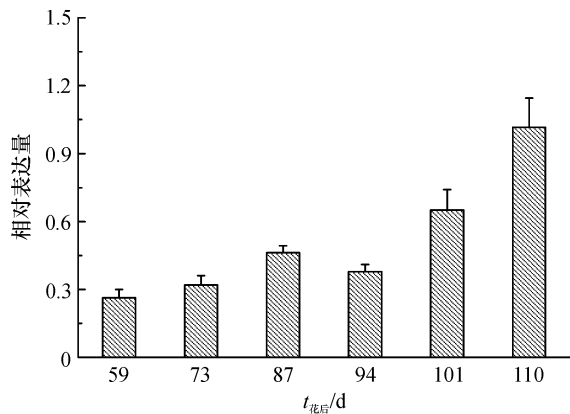


图4 龙眼果实发育期间假种皮 *DiHXK* 基因表达的变化
Fig.4 Changes on *DiHXK* gene expression during the development of longan aril

2.5 原核表达载体构建及鉴定

原核表达载体 pET-32a 的质粒使用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切(图 5A)后回收产物片段,使用 In-Fusion HD Enzyme Premix 与带有 In-Fusion 连接片段的 *DiHXK* 基因的 ORF 片段连接(图 5B),获得原核表达载体 pET-32a-*DiHXK*,转化进入 DH5 α 感受态细胞中. 挑选阳性克隆菌株进行菌液 PCR 和测序鉴定. 菌液 PCR 分析发现能获得 1 条约 1 500 bp 的条带(图 5C),测序结果经比对与 *DiHXK* 基因一致,并且未出现碱基突变及移码现象,表明 pET-32a-*DiHXK* 原核表达载体构建成功. 提取质粒,将 pET-32a-*DiHXK* 质粒转入到 Rosetta (DE3)中,进行蛋白的诱导表达.

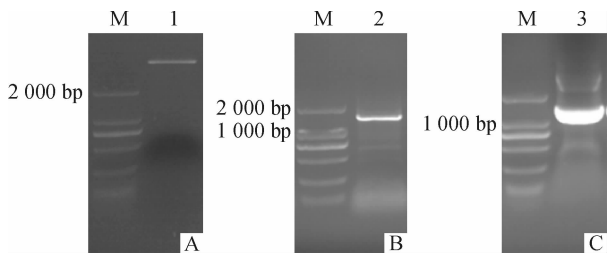


图5 PCR 扩增及 pET-32a 载体双酶切电泳图
Fig.5 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification and pET-32a digested by *Bam*H I and *Sal* I

2.6 原核表达产物的检测

重组质粒 pET-32a-*DiHXK* 转入到 Rosetta (DE3)中后,使用 0.4 mmol $\cdot$ L⁻¹ IPTG 诱导重组蛋白表达,结果(图 6)表明,在相对分子质量 71 700 (含 His 标签 18 000)左右位置有目的蛋白的融合表达条带,表达的融合蛋白分子与理论预测值相符,这表明融合蛋白在 Rosetta (DE3)中成功表达. 未诱导的 pET-32a-*DiHXK* 则没有在 71 700 左右出现条带.

不同诱导时间(1、3、5 和 7 h)结果表明,随着诱导时间的延长融合蛋白的表达量逐渐增大,但 5 和 7 h 表达量相差不大,由此推测,经过 5 h 的诱导,融合蛋白的表达量可以达到最大值.

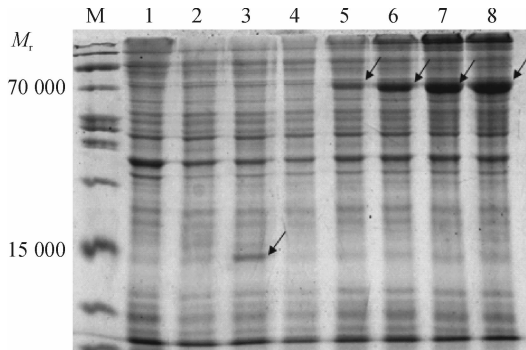


图6 龙眼 *DiHXK* 基因重组蛋白在大肠埃希菌中的表达
Fig.6 Expression of recombinant pET-32a-*DiHXK* protein in Rosetta (DE3)

3 讨论

自 Minet 等^[8]利用酵母 *hxx1*、*hxx2* 双突变体,通过功能互补表达文库从拟南芥中鉴定出植物的第 1 个 *HXX* 基因后,现今已证实 *HXX* 基因几乎存在于所有生物体中^[12],现在 GenBank 上已经有多达 28 种高等植物的 *HXX* 基因全长或者片段^[7]. 然而在无患子科的龙眼上至今没有相关报道. 本文采用 RT-PCR 结合 RACE 技术扩增获得了 1 个长度为 2 101 bp 的龙眼 *HXX* 全长 cDNA 序列,该序列包括 1 个 1 488 bp 的 ORF,249 bp 的 5'非翻译区序列和 361 bp 的 3'非翻译区,推测该基因编码 495 个氨基酸. 通过 NCBI 比对和同源进化分析,发现该基因与温州蜜桔 (AAG28503.1) 的 *HXX* 基因具有很高的相似性,达到了 82%,可见本文克隆出了龙眼 *HXX* 基因. 通过对部分植物 *HXX* 基因的深入研究发现,植物 *HXX* 基因以多基因家族的形式存在^[13],且不同物种家族成员数不同,水稻中含有 10 个 *HXX* 家族成员^[14],拟南芥中含有 6 个该家族成员^[15],番茄中含有 4 个该家族成员^[11],本研究克隆得到 1 个 *HXX* 基因,推测可能是该基因的器官表达特异、时空表达差异、转录水平和翻译水平差异等原因造成的.

HXX 是一种双功能酶,不仅催化己糖磷酸化,并且在糖信号感受和转导方面有很重要的作用^[16],同时它也是植物体呼吸代谢过程中的关键酶之一^[7].

定量分析表明,*DIHXK* 基因的表达量随着龙眼果实的发育逐渐增加,在果实成熟采收时期达到表达的最大值,这与果实在盛夏采收时期,由于温度湿度较高导致的生理活动旺盛和呼吸强度较高有一定关系。马凤凰^[17]研究发现,龙眼果实在发育过程中,己糖含量随着果实的发育逐渐增加,与本文己糖激酶表达活性变化表现出较高的一致性。

原核表达系统具有易操作、稳定性好、产量高、经济实惠等优点^[18],为研究蛋白功能和基因表达提供了一条高效可行的途径。本研究将 *DIHXK* 基因与原核表达载体 pET-32a 重组构建为 pET-32a-*DIHXK*,经 IPTG 诱导表达后发现 *DIHXK* 蛋白能够与载体中的 His 标签蛋白形成融合蛋白,并且在原核表达体系中成功表达。pET-32a-*DIHXK* 在 Rosetta (DE3) 中表达,获得了 1 个相对分子质量为 71 700 左右的表达蛋白,除去 pET-32a 上自带的相对分子质量 18 000 的 His 标签蛋白,可知 *DIHXK* 表达蛋白相对分子质量大约在 53 700 左右,与前文经过核苷酸推测编码蛋白质大小结果相吻合。因此可知龙眼假种皮中 *DIHXK* 基因在大肠埃希菌中能够成功表达,为深入研究己糖激酶的功能奠定了基础,但其可溶性及酶学特性还有待进一步验证。

参考文献:

[1] 陈俊伟,张上隆,张良诚. 果实中糖的运输、代谢与积累及其调控[J]. 植物生理与分子生物学学报,2004,30(1):1-10.

[2] 胡志群,李建光,王惠聪. 不同龙眼品种果实品质和糖酸组分分析[J]. 果树学报,2006,23(4):568-571.

[3] 秦巧平,张上隆,徐昌杰. 己糖激酶与植物生长发育[J]. 植物生理学通讯,2003,39(1):1-8.

[4] OFFLER C E, PATRICK J W. Cellular pathway and hormonal control of short distance transfer in sink regions[J]. Plant Biol,1986(1):295-306.

[5] 齐红岩,李天来,刘海涛. 番茄不同部位中糖含量和相关酶活性的研究[J]. 园艺学报,2005,32(2):239-243.

[6] 崔娜,李天来,赵聚勇. 外源生长素 PCPA 对番茄果实蔗糖代谢的影响[J]. 北方园艺,2008,32(5):8-12.

[7] 张超,王彦杰,付建新,等. 高等植物己糖激酶基因研究进展[J]. 生物技术通报,2012,(4):19-26.

[8] MINET M, DUFOUR M E, LACROUTE F. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs[J]. Plant J,1992,2(3):417-422.

[9] 韩冬梅,郭栋梁,潘学文,等. 不同品种龙眼果实发育进程对其生理落果和熟性的影响[J]. 广东农业科学,2011,38(7):59-62.

[10] WAN C Y, WILKINS T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Anal Biochem,1994,223(1):7-12.

[11] KANDEL-KFIR M, DAMARI-WEISSLER H, GERMAN M A, et al. Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: Characteristics, predicted structure and intracellular localization [J]. Planta,2006,224(6):1341-1352.

[12] CÁRDENAS M L, CORNISH-BOWDEN A, URETA T. Evolution and regulatory role of the hexokinases [J]. Biochim Biophys Acta,1998,1401(3):242-264.

[13] KARVE R, LAURIA M, VIRNIG A, et al. Evolutionary lineages and functional diversification of plant hexokinases [J]. Mol Plant,2010,3(2):334-346.

[14] CHO J, RYOO N, KO S, et al. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Planta,2006,224(3):598-611.

[15] KARVE A, RAUH B L, XIA X X, et al. Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis* [J]. Planta,2008,228(3):411-425.

[16] 秦巧平,张上隆,徐昌杰. 己糖激酶与植物生长发育[J]. 植物生理学通讯,2003,39(1):1-8.

[17] 马凤凰. 龙眼果实发育过程中糖代谢的研究[D]. 福州:福建农林大学,2009.

[18] WAUGH D S. Making the most of affinity tags[J]. Trends Biotechnol,2005,23(6):316-320.

【责任编辑 李晓卉】