

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201708041

引文格式: 姚远, 孙冲, 陆小花, 等. 木薯己糖激酶 MeH XK5 的催化功能鉴定 [J]. 广西植物, 2017, 37(12):1545–1550
YAO Y, SUN C, LU XH, et al. Catalytic functional identification of cassava hexokinase MeH XK5 [J]. *Guihaia*, 2017, 37(12):1545–1550

木薯己糖激酶 MeH XK5 的催化功能鉴定

姚 远¹, 孙 冲³, 陆小花², 王运林², 耿梦婷², 吴晓慧⁴, 尚 璐²,
李 焜², 符少萍¹, 李瑞梅¹, 段瑞军¹, 刘 姣¹, 胡新文², 郭建春^{1*}

(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101; 2. 海南大学 农学院, 海口 570228; 3. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319; 4. 上海浦灵生物科技有限公司, 上海 201203)

摘 要: 己糖激酶是植物体内催化己糖磷酸化的关键酶, 参与植物的生长发育过程。前期已克隆获得了主要在木薯花中表达的己糖激酶基因 *MeH XK5*。该研究主要利用己糖激酶酵母突变菌株 YSH7.4–3C 进行酵母功能互补实验, 验证 *MeH XK5* 催化己糖磷酸化的功能。结果表明: 转 pDR195–*MeH XK5* 载体的 YSH7.4–3C 酵母可以在以葡萄糖或果糖为唯一碳源的培养基中生长, 表明 *MeH XK5* 能催化己糖磷酸化为酵母的生长提供碳水化合物和能量。该研究结果为进一步研究 *MeH XK5* 参与木薯的开花过程的生理功能奠定了基础。

关键词: 木薯, 己糖激酶, 己糖磷酸化, 功能鉴定

中图分类号: Q946.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)12-1545-06

Catalytic functional identification of cassava hexokinase MeH XK5

YAO Yuan¹, SUN Chong³, LU Xiao-Hua², WANG Yun-Lin², GENG Meng-Ting²,
WU Xiao-Hui⁴, SHANG Lu², LI Zhan², FU Shao-Ping¹, LI Rui-Mei¹,
DUAN Rui-Jun¹, LIU Jiao¹, HU Xin-Wen², GUO Jian-Chun^{1*}

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2. College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; 3. School of Life Sciences and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China; 4. Prisms Biotechnologies Company Limited, Shanghai 201203, China)

Abstract: Hexokinase is a key enzyme in the process of catalyzing the phosphorylation of hexose in plants. It is involved in the process of plant growth and development. We cloned hexokinase gene *MeH XK5*, which is mainly expressed in cas-

收稿日期: 2017-09-28 修回日期: 2017-10-13

基金项目: 国家自然科学基金(31600196, 31671767, 31601359); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-11-HNGJC); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项(1630052016004, 1630052015014) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31600196, 31671767, 31601359); the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-11-HNGJC); Fundamental Research Fund of Central Public-interest Scientific Institution Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (1630052016004, 1630052015014)]。

作者简介: 姚远(1983–), 男, 海南儋州人, 博士, 助理研究员, 主要从事木薯分子育种研究, (E-mail) yaoyuan@itbb.org.cn。

* **通信作者:** 郭建春, 博士, 研究员, 主要从事木薯抗逆材料创制研究, (E-mail) jianchunguo@163.com。

sava flowers. In this study, we used the yeast mutant strain YSH7.4-3C to perform yeast functional complementation experiment to determine whether MeHXK5 had the function of catalyzing the phosphorylation of hexose. It was found that YSH7.4-3C yeast with pDR195-*MeHXK5* vector could be grown in the medium with glucose or fructose as the sole carbon source, indicating that MeHXK5 could catalyze the phosphorylation of hexose to provide carbohydrate and energy for yeast growth. The results provide information for further study of the physiological functions of MeHXK5 in the flowering process of cassava.

Key words: cassava, hexokinase, hexose phosphorylation, function identification

植物叶片中合成的蔗糖被运输到库器官(花、果实、种子、块根等)后,转化酶或蔗糖合成酶可将蔗糖分解成己糖(葡萄糖和果糖)(Aloni et al, 1997; Li et al, 2013; Yao et al, 2014)。己糖需经过己糖激酶的磷酸化,形成磷酸己糖后才能为植物库器官的生长发育或淀粉的积累提供碳源和能量(Granot et al, 2014)。植物己糖激酶具有双重功能,既可催化己糖磷酸化,又可作为细胞内糖传感蛋白参与葡萄糖信号的转导(Granot et al, 2014)。植物己糖激酶基因由多个基因组成基因家族,不同植物己糖激酶基因家族的数量具有明显差异,如拟南芥基因组中有 6 个己糖激酶基因成员,番茄基因组中有 4 个己糖激酶基因成员,玉米基因组中有 9 个己糖激酶基因成员,水稻基因组中有 10 个己糖激酶基因成员(Cho et al, 2006; Granot, 2007; Karve et al, 2008; Zhang et al, 2014)。己糖激酶可定位于线粒体、叶绿体、细胞质和细胞核中,亚细胞定位的多样性预示着己糖激酶具有多种生理功能(Cheng et al, 2011; Nilsson et al, 2011)。相关研究表明己糖激酶参与了植物对逆境胁迫的响应,影响根的发育及叶片的衰老,调节光合作用,控制花粉萌发,调控基因的表达等功能(Swartzberg et al, 2011; Xiang et al, 2011; Zhang et al, 2014)。

木薯是华南地区重要的经济作物,其块根富含淀粉(Jansson et al, 2009)。本实验室前期已从华南 8 号(SC8)木薯品种基因组中克隆获得 7 个己糖激酶基因,利用 qPCR 技术对木薯己糖激酶基因家族进行了表达特性的研究,发现 *MeHXK5* (基因登录号: KJ417437) 在叶片、茎、块根韧皮部、块根木质部、雄花、雌花、果等器官中均有表达,但主

要在雄花和雌花中表达(Geng et al, 2017)。推测 *MeHXK5* 可能在木薯生殖器官的发育过程中起重要作用。为了进一步验证克隆获得的 *MeHXK5* 基因编码的蛋白质是否具有催化己糖磷酸化的功能,我们将利用己糖激酶酵母菌突变株 YSH7.4-3C 进行功能互补实验,鉴定 *MeHXK5* 催化己糖磷酸化的活性,为进一步鉴定 *MeHXK5* 在木薯生殖器官发育过程的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 载体及菌株

菌株:DH5 α 大肠杆菌菌株,己糖激酶酵母突变体菌株 YSH7.4-3C,携带 pDR195 空载体的己糖激酶酵母突变体菌株 YSH7.4-3C。载体:酵母表达载体 pDR195。

1.2 酵母表达载体的构建

利用 Primer Premier 5 软件设计引物带有 *Xho* I 酶切位点的上游引物 MeHXK5-F: 5'-TCGCTCGAGATGCAGAAGAAGGTGGTG-3' 和带有 *Bam*H I 酶切位点的下游引物 MeHXK5-R: 5'-CGCGGATCCTTAACGATAATGCGAATG-3', 在生工生物工程有限公司合成引物。以实验室保存的 pMD18T-*MeHXK5* 质粒为模板,采用宝生物工程有 限公司生产的 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 高保真酶进行 PCR 扩增获得的 *MeHXK5* 的 CDS 区。经过琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果后,采用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收目的片段。利用 Fermentas 公司生产的 *Xho* I 和 *Bam*H I 对 PCR 产物及 pDR195 载体进行双酶切反应,采用 DNA Ligation Kit Ver.2.1 试剂盒连接 *MeHXK5* 基因

和 pDR195 载体并转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞。将菌液涂布于具有氨苄霉素抗性的 LB 平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养至形成单菌落。挑取单菌落进行扩大培养后,利用 Taq DNA 聚合酶进行菌液 PCR 筛选阳性克隆送上海生工生物工程有限公司进行测序。采用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取测序正确的 pDR195-*MeHXK5* 质粒并进行双酶切鉴定(*Xho* I 和 *Bam*H I)。

1.3 pDR195-*MeHXK5* 质粒转化己糖激酶酵母突变株

将 pDR195-*MeHXK5* 质粒转化到 YSH7.4-3C 酵母突变株中。具体方法如下:取 0.3 mL 己糖激酶酵母突变株 YSH7.4-3C 的菌液到含有 30 mL YPDA 培养基的锥形瓶中,200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8;取 1 mL 菌液到 1.5 mL 离心管中,5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集菌体后加入 500 μL PEGmix (50% PEG3350, 1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ LiAC, 1 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.5 Tris-Hcl, 0.5 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.0 EDTA) 和 5 μL pDR195-*MeHXK5* 质粒,充分混匀后常温放置 15 min;45 $^{\circ}\text{C}$ 热激 15 min 后冰上静置 15 min。吸取 100 μL 菌液涂布于缺尿嘧啶的 SD 培养基(半乳糖为碳源)的平板上,30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2 d。待形成单菌落以后,进行菌落 PCR 检测。

1.4 MeHXK5 催化己糖磷酸化的功能分析

将含有 pDR195-*MeHXK5* 质粒和 pDR195 空载体的 YSH7.4-3C 酵母,以及 YSH7.4-3C 酵母分别接种在缺尿嘧啶的 SD 液体培养基(半乳糖为碳源)中,200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至过夜;5 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,3 min 离心收集菌体后,使用无菌 ddH₂O 重悬菌体,再次离心,共洗菌 3 遍;利用无菌 ddH₂O 将菌液分别稀释至 OD₆₀₀ = 0.2;稀释好的菌液分别划线于以葡萄糖或果糖为唯一碳源的 SD 培养基(缺尿嘧啶)上,30 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 4 d,观察菌斑生长情况。

2 结果与分析

2.1 pDR195-*MeHXK5* 酵母表达载体的构建

为了构建 *MeHXK5* 酵母表达载体,本研究设计了带有酶切位点的基因特异性引物 MeHXK5-F (*Xho* I) 和 MeHXK5-R (*Bam*H I),以实验室保存的

pMD18T-*MeHXK5* 质粒为模板进行 PCR 反应,扩增 *MeHXK5* 基因的编码区序列。琼脂糖凝胶电泳检测结果表明,扩增片段大小与预期一致,无杂带,可直接进行 PCR 产物回收(图 1)。回收获得的 *MeHXK5* 经双酶切反应(*Xho* I 和 *Bam*H I)后与 pDR195 酵母表达载体连接转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,获得单菌落并筛选阳性克隆测序。提取测序成功的 pDR195-*MeHXK5* 重组质粒并进行双酶切(*Xho* I 和 *Bam*H I)鉴定,结果获得一条长约 1 842 bp 的目的条带(图 2),与预期大小相吻合。这表明 pDR195-*MeHXK5* 重组质粒已构建成功。

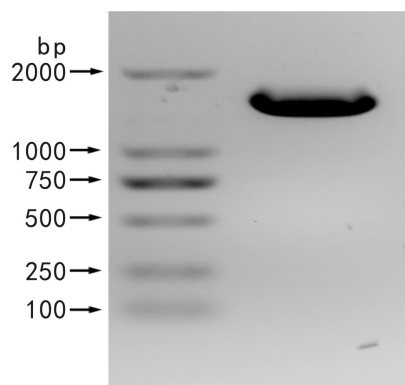


图 1 *MeHXK5* 基因 PCR 电泳鉴定

Fig. 1 Electrophoresis for PCR product of *MeHXK5* gene

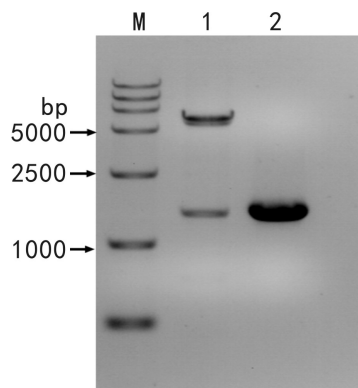


图 2 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切鉴定 pDR195-*MeHXK5* 载体 M. DNA marker DL 15 000; 1. pDR195-*MeHXK5* 载体酶切; 2. *MeHXK5* 基因。

Fig. 2 Electrophoresis of pDR195-*MeHXK5* vector cut by *Xho* I and *Bam*H I restriction enzymes M. DNA marker DL 15 000; 1. Electrophoresis of pDR195-*MeHXK5* vector cut by *Xho* I and *Bam*H I restriction enzymes; 2. *MeHXK5* gene.

2.2 pDR195-MeHXX5 载体转化己糖激酶酵母突变株

通过 LiAC 法将 pDR195-MeHXX5 载体转入己糖激酶酵母突变株 YSH7.4-3C,并在以半乳糖为碳源的 SD 缺尿嘧啶 (Uracil) 培养基上筛选单菌落 (pDR195-MeHXX5 载体上含有合成尿嘧啶的基因,转入该载体的酵母菌株可以在缺乏尿嘧啶的 SD 培养基上生长)。挑取单菌落进行菌落 PCR 检测,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测结果发现,6 个单菌落都扩增出与获得了与 MeHXX5 大小相一致的特异条带 (图 3)。此研究结果证明 pDR195-MeHXX5 载体已成功转化到己糖激酶酵母突变株 YSH7.4-3C。

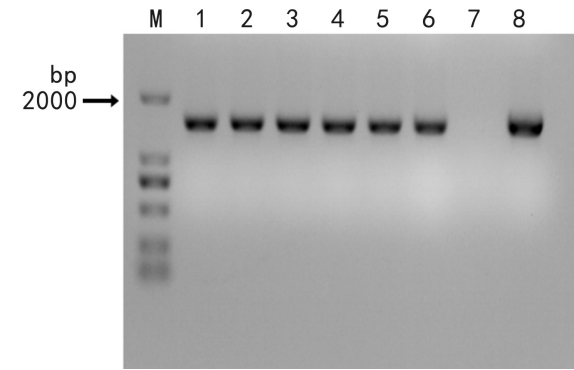


图 3 酵母菌落 PCR 检测 M. Marker DL 2 000; 1-6. 酵母菌落 PCR; 7. 阴性对照; 8. 阳性对照。
Fig. 3 Identification of yeast by PCR M. Marker DL 2 000; 1-6. Yeast colony PCR; 7. Negative control; 8. Positive control.

2.3 MeHXX5 催化葡萄糖磷酸化的功能分析

YSH7.4-3C 酵母菌株是缺失了己糖激酶活性的突变株,故其不可以磷酸化葡萄糖和果糖,不能在以葡萄糖或果糖为唯一碳源的培养基上生长;为验证 MeHXX5 蛋白是否具有催化葡萄糖磷酸化的功能,我们将含有重组质粒 pDR195-MeHXX5 和 pDR195 空载体的 YSH7.4-3C 酵母,以及 YSH7.4-3C 酵母涂布于以葡萄糖为唯一碳源的 SD 培养基 (缺尿嘧啶) 上,观察酵母生长情况。图 4 结果发现,YSH7.4-3C 酵母和携带 pDR195 空载体的 YSH7.4-3C 酵母不能在培养基上生长,而含有 pDR195-MeHXX5 载体的 YSH7.4-3C 酵母能正常生长。这一结果表明 MeHXX5 蛋白具有催化葡萄

糖磷酸化的功能,利用葡萄糖为菌株的生长提供碳源和能量。

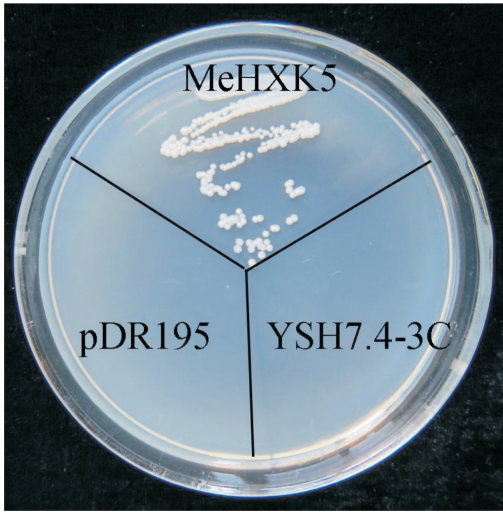


图 4 转基因酵母在葡萄糖为唯一碳源的 SD 培养基 (缺尿嘧啶) 上的生长分析 MeHXX5. 转化 pDR195-MeHXX5 载体的酵母突变株 YSH7.4-3C; pDR195. 转化空载体 pDR195 的酵母突变株 YSH7.4-3C。下同。
Fig. 4 Growth analysis of transgenic yeast on SD medium (-Uracil) with glucose as the only carbon source MeHXX5. YSH7.4-3C was transformed with pDR195-MeHXX5; pDR195. YSH7.4-3C was transformed with pDR195. The same below.

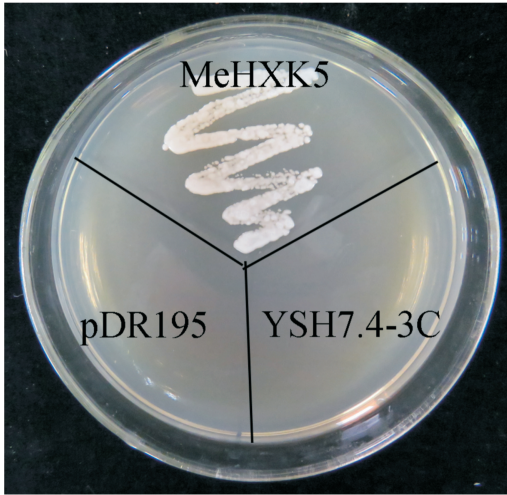


图 5 转基因酵母在果糖为唯一碳源的 SD 培养基 (缺尿嘧啶) 上的生长分析
Fig. 5 Growth analysis of transgenic yeast on SD medium (-Uracil) with fructose as the only carbon source

2.4 MeHXK5 催化果糖磷酸化的功能分析

将含有重组质粒 pDR195-*MeHXK5* 和 pDR195 空载体的 YSH7.4-3C 酵母,以及 YSH7.4-3C 酵母涂布于以果糖为唯一碳源的 SD 培养基(缺尿嘧啶)上,观察酵母生长情况,以验证 MeHXK5 蛋白是否具有催化果糖磷酸化的功能。图 5 结果表明,YSH7.4-3C 酵母和携带 pDR195 空载体的 YSH7.4-3C 酵母不能在培养基上生长,而含有 pDR195-*MeHXK5* 载体的 YSH7.4-3C 酵母能正常生长。这一结果表明 MeHXK5 蛋白具有催化果糖磷酸化的功能,利用果糖为菌株的生长提供碳源和能量。

3 讨论

植物己糖激酶的功能具有多样性,前人的研究发现己糖激酶与花的发育密切相关。拟南芥己糖激酶基因 *AtHXK1* 同时具有催化己糖磷酸化和糖信号转导功能,其突变体(*GIN2-1*)开花延期(Moore et al, 2003)。拟南芥己糖激酶基因 *AtHKL3* 特异在雄花中表达,而该基因编码的蛋白仅具有葡萄糖信号转导功能,不具有催化己糖磷酸化的活性(Karve et al, 2008)。推测 *AtHKL3* 通过糖信号的转导,参与拟南芥花的发育。水稻己糖激酶基因 *OsHXK10* 特异在雄花中表达,RNA 干扰该基因的转基因水稻的一些花药无法开裂和无法释放花粉,导致花粉萌发率明显降低,空粒比例明显增加,表明 *OsHXK10* 在花药发育和花粉萌发起着至关重要的作用(Xu et al, 2008)。木薯新品种的选育主要通过杂交育种的方式,但不是所有木薯品种都能开花,开花期具有差异,且授粉率低(Ceballos et al, 2004)。因此,解析木薯的开花机制,促进木薯开花,提高木薯雌雄胚子体的活力,有利于木薯杂交育种工作。本课题组前期研究发现木薯己糖激酶基因 *MeHXK5* 主要在雄花和雌花中表达,推测该基因与木薯雄配子和雌配子的发育有关。本研究利用己糖激酶酵母突变株 YSH7.4-3C,验证了 MeHXK5 蛋白具有催化葡萄糖磷酸化和果糖磷酸化的能力,表明 MeHXK5 可催化己糖磷酸化为花的发育提供碳水化合物和能

量,此结果为研究 *MeHXK5* 基因的生理功能奠定了基础。未来的研究工作中,我们将利用转基因技术进一步研究 *MeHXK5* 基因与木薯开花的关系。

参考文献:

- ALONI B, KARNI L, ZAIDMAN Z, et al, 1997. The relationship between sucrose supply, sucrose-cleaving enzymes and flower abortion in pepper [J]. *Ann Bot*, 79(6): 601-605.
- CEBALLOS H, IGLESIAS CA, PÉREZ JC, et al, 2004. Cassava breeding: opportunities and challenges [J]. *Plant Mol Biol*, 56(4): 503-516.
- CHENG W, ZHANG H, ZHOU X, et al, 2011. Subcellular localization of rice hexokinase (*OsHXK*) family members in the mesophyll protoplasts of tobacco [J]. *Biol Plant*, 55(1): 173-177.
- CHO JI, RYOO N, KO S, et al, 2006. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Planta*, 224(3): 598-611.
- GENG MT, YAO Y, WANG YL, et al, 2017. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in cassava [J]. *Int J Mol Sci*, 18(5): 1041.
- GRANOT D, 2007. Role of tomato hexose kinases [J]. *Funct Plant Biol*, 34(6): 564-570.
- GRANOT D, KELLY G, STEIN O, et al, 2014. Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development [J]. *J Exp Bot*, 65(3): 809-819.
- JANSSON C, WESTERBERGH A, ZHANG J, et al, 2009. Cassava, a potential biofuel crop in (the) People's Republic of China [J]. *Appl Energy*, 86 (Suppl.1): S95-S99.
- KARVE A, RAUH BL, XIA X, et al, 2008. Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 228(3): 411-425.
- LI J, BAROJA FERNÁNDEZ E, BAHAJI A, et al, 2013. Enhancing sucrose synthase activity results in increased levels of starch and ADP-glucose in maize (*Zea mays* L.) seed endosperms [J]. *Plant Cell Physiol*, 54(2): 282-294.
- MOORE B, ZHOU L, ROLLAND F, et al, 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling [J]. *Science*, 300(5617): 332-336.
- NILSSON A, OLSSON T, ULFSTEDT M, et al, 2011. Two novel types of hexokinases in the moss *Physcomitrella patens* [J]. *BMC Plant Biol*, 11(1): 32.
- SWARTZBERG D, HANAEL R, GRANOT D, 2011. Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination [J]. *Plant Biol*, 13(3): 439-444.
- XIANG L, LI Y, ROLLAND F, et al, 2011. Neutral invertase,

- hexokinase and mitochondrial ROS homeostasis: Emerging links between sugar metabolism, sugar signaling and ascorbate synthesis [J]. *Plant Sign Behav*, 6(10): 1567–1573.
- XU FQ, LI XR, RUAN YL, 2008. RNAi-mediated suppression of hexokinase gene *OsHXX10* in rice leads to non-dehiscent anther and reduction of pollen germination [J]. *Plant Sci*, 175(5): 674–684.
- YAO Y, GENG MT, WU XH, et al, 2014. Genome-wide identification, 3D modeling, expression and enzymatic activity analysis of cell wall invertase gene family from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Int J Mol Sci*, 15(5): 7313–7331.
- ZHANG Y, ZHEN L, TAN X, et al, 2014. The involvement of hexokinase in the coordinated regulation of glucose and gibberellin on cell wall invertase and sucrose synthesis in grape berry [J]. *Mol Biol Rep*, 41(12): 7899–7910.
- ZHANG Z, ZHANG J, CHEN Y, et al, 2014. Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize (*Zea mays* L.) hexokinase gene family [J]. *Mol Biol Rep*, 41(9): 6157–6166.