

· 农业生物技术 ·

番木瓜果糖-2,6-二磷酸酶 *CpF2KP* 基因克隆和蛋白表达纯化

左丽萍¹, 曾秋霞¹, 赵晓兵², 杨丽媛¹, 徐良伟¹, 赖娟¹, 岳晶晶^{1*}

1 福建农林大学基因组与生物技术研究中心 福建省海峡植物应用系统生物学重点实验室,
福建 福州 350002

2 福建农林大学园艺学院, 福建 福州 350002

左丽萍, 曾秋霞, 赵晓兵, 杨丽媛, 徐良伟, 赖娟, 岳晶晶. 番木瓜果糖-2,6-二磷酸酶 *CpF2KP* 基因克隆和蛋白表达纯化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 614-624.

ZUO Liping, ZENG Qiuxia, ZHAO Xiaobing, YANG Liyuan, XU Liangwei, LAI Juan, YUE Jingjing. Cloning, expression and purification of fructose-2,6-bisphosphatase gene *CpF2KP* in papaya[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 614-624.

摘 要: 番木瓜是岭南四大名果之一, 在我国东南部地区广泛种植, 因其具有食用和药用双重价值, 因此深受人们的青睐。果糖-6-磷酸,2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酯酶(fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, F2KP)是一个独特的双功能酶, 具有激酶功能域和酯酶功能域, 能催化生物体内糖代谢的重要调节物果糖-2,6-二磷酸(Fru-2,6-P₂)的合成和降解。为了研究番木瓜中编码该酶的基因 *CpF2KP* 的功能, 得到目的蛋白尤为重要。本研究从番木瓜基因组中提取到 *CpF2KP* 基因的编码序列(coding sequence, CDS)序列, 该基因 CDS 全长 2 274 bp。将该基因 CDS 全长扩增之后选用 pGEX-4T-1 载体进行原核表达。对载体 pGEX-4T-1 用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 进行双酶切, 利用基因重组的方式将扩增序列构建到原核表达载体上。经过诱导条件探索, SDS-PAGE 结果显示 GST-CpF2KP 重组蛋白的大小约为 110 kDa, 诱导 CpF2KP 蛋白表达的最适条件为: 异丙基 β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG)浓度为 0.5 mmol/L, 温度 28 °C。对诱导后的 CpF2KP 蛋白进行纯化, 得到了纯化的单一目的蛋白。此外, 检测了该基因的组织表达特性发现该基因在种子中表达量最高, 在果肉中表达量最低。该研究为进一步深入揭示番木瓜 CpF2KP 蛋白的功能及研究该基因参与的生物学过程提供了重要基础。

关键词: 番木瓜; *CpF2KP*; 原核表达; 蛋白纯化

资助项目: 福建省科技厅对外合作项目(2021I0009); 福建农林大学科技创新专项基金项目(CXZX2020091A); 泉州市科技计划项目(2021N044)

This work was supported by the Foreign Cooperation Project of Fujian Provincial Department of Science and Technology (2021I0009), the Fujian Agriculture and Forestry University Science and Technology Innovation Special Fund Project (CXZX2020091A), and the Quanzhou Science and Technology Plan Project (2021N044).

*Corresponding author. E-mail: jingjingyue11@126.com

Received: 2022-08-15; Accepted: 2022-10-08

Cloning, expression and purification of fructose-2,6-bisphosphatase gene *CpF2KP* in papaya

ZUO Liping¹, ZENG Qiuxia¹, ZHAO Xiaobing², YANG Liyuan¹, XU Liangwei¹, LAI Juan¹, YUE Jingjing^{1*}

¹ Genomics and Biotechnology Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fujian Province Key Laboratory of Haixia Applied Plant Systems Biology, Fuzhou 350002, Fujian, China

² College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: Papaya, which is mainly cultivated in the southeastern region of China, is one of the four famous fruits in Lingnan. It is favored by people because of its edible and medicinal value. Fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (F2KP) is a unique bifunctional enzyme with a kinase domain and an esterase domain that catalyzes the synthesis and degradation of fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂), an important regulator of glucose metabolism in organisms. In order to study the function of the gene *CpF2KP* encoding the enzyme in papaya, it is particularly important to obtain the target protein. In this study, the coding sequence (CDS) of *CpF2KP*, with a full-length of 2 274 bp, was got from the papaya genome. The amplified sequence of full-length CDS was cloned into the vector PGEX-4T-1 which was double digested with *EcoR* I and *Bam*H I. The amplified sequence was constructed into a prokaryotic expression vector by genetic recombination. After exploring the induction conditions, the results of SDS-PAGE showed that the size of the recombinant GST-CpF2KP protein was about 110 kDa. The optimum IPTG concentration and temperature for CpF2KP induction were 0.5 mmol/L and 28 °C, respectively. The purified single target protein was obtained after purifying the induced CpF2KP protein. In addition, the expression level of this gene was detected in different tissues, and showed that the gene was expressed at the highest level in seeds and the lowest in pulp. This study provides an important basis for further revealing the function of CpF2KP protein and studying the involved biological processes of this gene in papaya.

Keywords: papaya; *CpF2KP*; prokaryotic expression; protein purification

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 是番木瓜科 (Caricaceae) 番木瓜属 (*Carica*) 植物, 原产墨西哥南部及中美洲。番木瓜科包含 6 个属 35 个种, 分布在世界各地, 我国的主要产区为广东、广西、海南、福建、台湾等地。番木瓜既可以作为食品, 又在传统医药中具有广泛用途, 深受人们青睐^[1]。

在光合作用过程中, 碳的同化、储存和利用之间的平衡取决于淀粉和蔗糖之间光同化物的分配, 果糖-2,6-二磷酸 (Fru-2,6-P₂) 是生物体内糖代谢的重要调节物, 在这其中发挥重要作用^[2-4]。果糖-6-磷酸,2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酯酶 (fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, F2KP) 是一个独特的双功能酶, 具

有激酶和酯酶双功能域,能通过催化果糖-2,6-二磷酸(Fru-2,6-P₂)的合成和降解来控制其含量,由此可见 F2KP 对参与植物淀粉和蔗糖之间的分配平衡有重要关系^[5-6]。众多 F2KP 的转基因植物研究结果表明,在光合组织中 F2KP 通过调控 Fru-2,6-P₂ 的含量,从而协调生物体内碳分配。2001 年,有报道证明 F2KP 的活性与 Fru-2,6-P₂ 含量成正相关。在 F2KP 活性降低的转基因拟南芥中, Fru-2,6-P₂ 含量大大降低,并且碳分配发生了变化,这为 Fru-2,6-P₂ 是光合作用碳代谢的主要调节剂提供了直接证据^[7]。在 Fru-2,6-P₂ 的含量高于野生型 2 倍的烟草中,蔗糖的含量相对于野生型显著降低,而淀粉的含量则增加。相反,在 Fru-2,6-P₂ 含量低于野生型水平一半的烟草中,蔗糖合成速率增加,而淀粉合成速率下降^[8]。马铃薯和草莓对 Fru-2,6-P₂ 含量的改变也具有相同的反应^[9-12]。在非光合作用的组织中, Fru-2,6-P₂ 含量还跟许多非生物胁迫应答反应相关。目前诸多研究的真核生物中都已经克隆到编码 F2KP 的基因序列,其蛋白大小预测约为 83 kDa。

目前,在番木瓜中 *CpF2KP* 的基因功能及其在碳同化过程中是否发挥调控淀粉-蔗糖分配平衡的功能均尚未见报道。本研究对番木瓜的重要基因 *CpF2KP* 初步开展了分子生物学研究。首先从番木瓜的基因组序列中提取该基因的 CDS 序列,全长 2 274 bp,序列分析发现其具有 F6P₂-K 的保守结构域。根据序列设计 CDS 全长的引物,克隆得到 *CpF2KP* 全长片段;随后将其构建到原核表达载体上,探索诱导蛋白表达的最适条件,得到 *CpF2KP* 的纯化蛋白。此外,利用实时荧光定量 PCR 技术检测了该基因的组织表达特性,我们的研究结果将为进一步研究 *CpF2KP* 蛋白的生物学功能奠定坚实基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及载体

大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3)、原核表达载体 pGEX-4T-1 (该载体由福建农林大学免疫中心赠送)、番木瓜中白品种(取自于福建农林大学试验基地)。

1.1.2 主要试剂及仪器

DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;限制性内切酶 (*Bam*H I 和 *Eco*R I) 购自 Thermo Fisher 公司; DNA 连接实验使用南京诺唯赞生物科技有限公司的非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒;高保真酶(PrimeSTAR)及蛋白质 Marker (M) 均购自 TaKaRa 公司;异丙基 β -D 硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、Tris、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、Mag-Beads GST 融合蛋白纯化磁珠均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;RNA 提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit、反转录试剂盒 PrimeScriptTM RT Master Mix (Perfect Real Time) 和实时荧光定量 PCR 试剂 TB Green[®] Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) 均购自 TaKaRa 公司;一抗 GST-Tag (12 G8) Mouse mAb 和二抗 Goat Anti-Mouse IgG HRP 均购自 Abmart 公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增和原核表达载体构建

提取番木瓜(*Carica Papaya* L.) SunUp 品种的总 RNA,反转录获得 cDNA,用含有目的载体同源的引物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,引物序列为 F: 5'-CTGGTTCCGCGTGGATCCATGGGGA CGGGTGTGTCAAAG-3'; R: 5'-CTCGAGTCGA CCCGGGAATTCTCAGTCCATGAGCTTGTATC

TTTTC-3' (下划线部分表示包含 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点和部分载体序列的接头序列), PCR 扩增反应程序为: 95 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环。该引物由福州尚亚生物技术有限公司合成。用琼脂糖凝胶电泳检测扩增基因符合目的条带, 进行扩增基因的纯化回收。用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切载体 pGEX-4T-1, 连接目的基因片段转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 对重组质粒进行 PCR 和测序鉴定, 测序由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.2.2 小量诱导 GST-F2KP 重组蛋白的表达条件探索

为找到重组蛋白 GST-F2KP 的最佳诱导条件, 从诱导温度和诱导剂 IPTG 浓度方面设置 3 个不同条件。首先将测序成功的重组质粒转化大肠杆菌感受态 BL21(DE3), 在平板上培养过夜, 挑取单克隆在 5 mL 的含氨苄青霉素(50 μ g/mL) 的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 培养至 OD_{600} 值为 0.6 左右, 加诱导剂 IPTG, 分别设置 3 个 IPTG 的浓度为(0.1、0.3、0.5 mmol/L), 分别置于 3 个温度条件(16 °C、28 °C、37 °C) 的摇床中, 设置 28 °C 和 37 °C 在 200 r/min 振荡培养 3 h, 设置 16 °C 在 200 r/min 振荡培养过夜, 富集菌体, 用灭菌双蒸水完全重悬, 加上样缓冲液, 99 °C 煮沸 10 min 蛋白变性后取 5 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.3 大量诱导 GST-F2KP 重组蛋白的表达和纯化

参照最佳的诱导条件扩大细菌培养, 诱导完成后 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min, 富集菌体, 用 20 mL 的 GBB 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 120 mmol/L NaCl, 用前加入 1 mmol/L 二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)重悬, 用超声破碎仪进行破碎, 超声开 3 s, 关 8 s, 工作时间 5 min, 重复破碎 4 次。破碎裂解后在 4 °C、

15 000 r/min 离心 20 min, 同时用 GBB 缓冲液洗 GST Beads 3 次, 每次 2 000 r/min, 2 min。将平衡好的 Beads 加入离心好的待纯化的蛋白上清中, 于 4 °C 结合约 2 h。取出 3 000 r/min 离心 5 min。将上清吸出, 留管底 1 mL 左右重悬吸到 1.5 mL 预冷的离心管里。用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗涤, 2 000 r/min 离心 2 min, 重复 4 次, 立刻加洗脱缓冲液。于 4 °C 孵育 60 min 左右, 取出后 2 000 r/min 离心 2 min, 吸出上清, 即为纯化后的蛋白溶液, 取 10 μ L 加上样缓冲液, 99 °C 煮沸 10 min 变性后进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 Western blotting 检测

将 GST-F2KP 重组蛋白转膜至 PVDF 上; 将膜置于封闭液(用 TBST 缓冲液配制 5% 脱脂奶粉) 4 °C 封闭 12 h; 然后与一抗 GST 抗体 [GST-Tag (12 G8) mouse mAb] 室温孵育 2 h, 用 TBST 洗涤缓冲液洗涤 4 次。再在室温条件下与二抗(goat anti-mouse IgG HRP) 孵育 1 h, 再以 TBST 洗涤缓冲液洗涤 4 次, 膜经 ECL 显影后拍照。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 分析

选取番木瓜中白品种的根、茎、叶、花、果肉和种子, 利用实时荧光定量 PCR 技术检测 *CpF2KP* 基因在番木瓜不同组织中的表达量。RNA 提取参照 TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit 说明书进行, 反转录参照 PrimeScript™ RT Master Mix 说明书进行。选择番木瓜 *actin-2* 作为内参基因对样品进行均一化, 设计靶基因 *CpF2KP* 的定量引物序列为: RT-F: 5'-CAGGATTGGTGGGGACAGTG-3'; RT-R: 5'-CGCACGCCATTGTATCTTGG-3'。采用 TaKaRa 公司试剂盒 TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 在 Bio-Rad/伯乐 CFX96 荧光定量 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 检测, 基因的相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

2 结果与分析

2.1 番木瓜果糖 2,6-二磷酸酶 *CpF2KP* 基因结构分析

从番木瓜转录组注释的基因序列中提取该基因 *CpF2KP* 的序列信息,全长 2 274 bp,编码 757 个氨基酸。利用 NCBI 数据库里面的 CD-search 功能对 *CpF2KP* 蛋白序列进行注释发现,该基因编码一个果糖 2,6-二磷酸酶。在氨基酸序列的第 345 到 563 位有一个 6PF2K 结构域,能催化果糖 2,6-二磷酸酶的合成和降解(图 1)。为验证 *CpF2KP* 的蛋白功能,首先要做的就是得到 *CpF2KP* 的纯化蛋白。

2.2 番木瓜果糖 2,6-二磷酸酶 *CpF2KP* 基因克隆

根据基因 *CpF2KP* 序列设计扩增全长的引物,以番木瓜品种 SunUp 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后,发现条带大小在 2 000 bp 以上(图 2),与 *CpF2KP* 原始序列 2 274 bp 大小相符合,表明扩增的条带为目的基因条带。

2.3 番木瓜 *F2KP* 原核表达载体构建

将原核表达的质粒载体 pGEX-4T-1 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切,酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,发现条带大小约 5 000 bp (图 3),与原始载体基因序列 4 969 bp 相一致。纯化回收后用基因重组的方式连接目的基因,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取单克隆进行菌落 PCR 验证,将检测条带与目的基因大

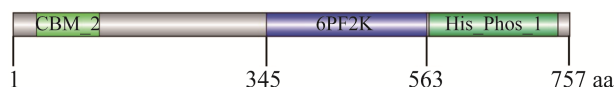


图 1 番木瓜 *CpF2KP* 蛋白的保守结构域

Figure 1 Conserved domains of papaya *CpF2KP* protein.

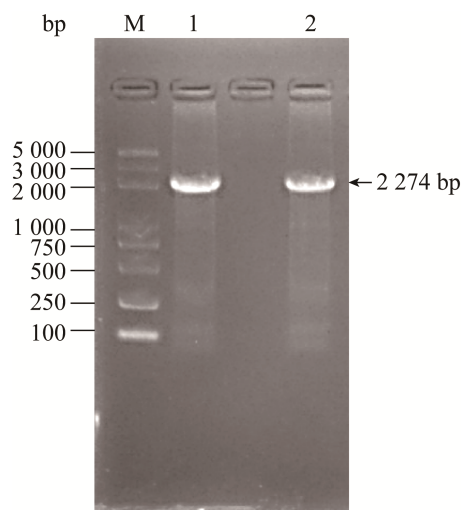


图 2 番木瓜 *CpF2KP* 基因全长的克隆 M: BM5000 DNA marker; 泳道 1 和 2: PCR 扩增产物
Figure 2 Cloning of *CpF2K* gene from papaya. M: BM5000 DNA marker; Lane 1 and lane 2: PCR products.

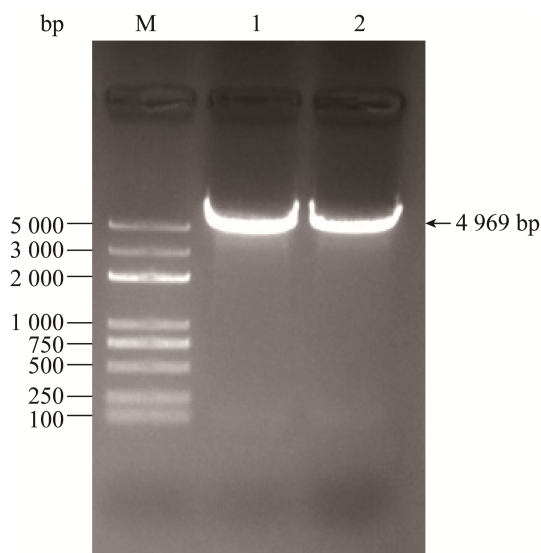


图 3 载体 pGEX-4T-1 酶切电泳图 M: BM5000 DNA marker; 泳道 1 和 2: pGEX-4T-1 经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 进行双酶切后电泳图

Figure 3 Electrophoresis of the double enzyme-digested pGEX-4T-1. M: BM5000 DNA marker; Lane 1 and lane 2: Electrophoresis of pGEX-4T-1 digested by *Eco*R I and *Bam*H I.

小相一致的单克隆提取质粒并测序(图 4), 测序结果与原序列完全匹配, 表明 *CpF2KP* 的原核表达载体构建成功, 得到 GST-F2KP 重组质粒(图 5)。

2.4 重组蛋白 GST-F2KP 诱导表达及最佳条件初探

将测序成功的 GST-F2KP 重组质粒转入 BL21(DE3)感受态, 设置不同诱导条件进行蛋白诱导表达, 分别设置 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L、0.3 mmol/L 和 0.5 mmol/L, 温度为 16 °C、28 °C 和 37 °C。经预测 GST- F2KP 重组蛋白的大小为 110 kDa 左右, 其中 *CpF2KP* 经网站 ProtParam 预测大小为 83.98 kDa, GST 标签的大小为 26 kDa。诱导表达的产物经 10%的 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色, 脱色后进行结果分析发现, 未融合 *CpF2KP* 的空载质粒无论有无添加 IPTG 均不能诱导出目的条带, 重组 GST-F2KP 的融合蛋白在未添加 IPTG 的情况下也不能诱导出目的条带。在经 IPTG 诱导以后 Marker 100 kDa 和 140 kDa 之间有明显条带, 大小与预测目的

蛋白相一致(图 6)。但是在 28 °C条件下诱导的蛋白浓度要明显高于 16 °C和 37 °C条件下诱导的蛋白浓度。IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 和 0.5 mmol/L 的条件下蛋白诱导量高于 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 条件下蛋白诱导量(图 6)。根据电泳结果, 在温度 28 °C和 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 的条件下电泳条带最亮(图 6)。表明在此实验设置的变量条件下, IPTG 浓度为 0.5 mmol/L、温度为 28 °C是 GST-F2KP 重组蛋白的最佳诱导条件。

2.5 重组蛋白 GST-F2KP 大量诱导和蛋白纯化

参照上述最佳诱导条件, 对 GST-F2KP 重组蛋白进行大量诱导和纯化, 经 10%的 SDS-PAGE 电泳后进行结果分析发现, 纯化后的蛋白检测出单一目的条带, 证明 GST-F2KP 纯化成功(图 7); 对照空载质粒在加 IPTG 前后, 不能诱导出蛋白条带; GST-F2KP 重组质粒在未加 IPTG 的条件下也不能诱导出目的蛋白; GST-F2KP 重组质粒在浓度 0.5 mmol/L IPTG、

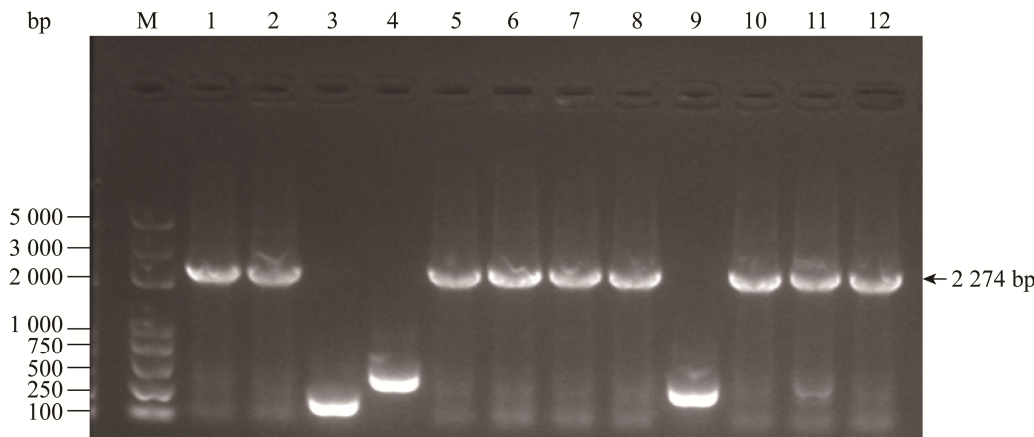


图 4 重组质粒 GST-F2KP 阳性鉴定 M: BM5000 DNA marker; 泳道 1、2、5、6、7、8、10、11、12: 阳性克隆 PCR 产物; 泳道 3、4、9: 阴性克隆 PCR 产物

Figure 4 Identification of GST-F2KP recombinant plasmid. M: BM5000 DNA marker; Swimming lanes 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10, 11 and 12: PCR products of positive clones; lanes 3, 4, 9: PCR products of negative clones.

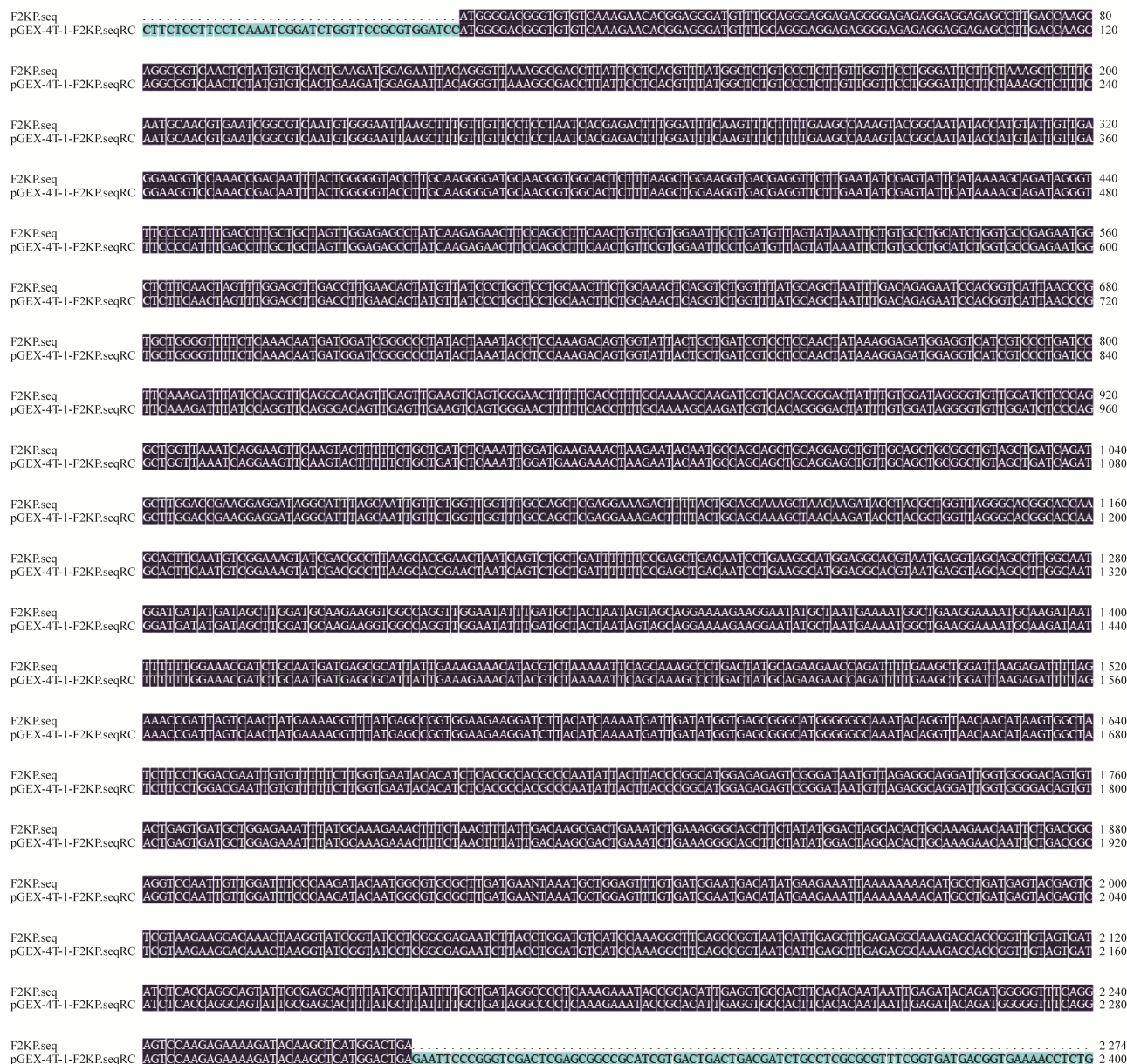


图5 重组质粒 GST-F2KP 测序结果比对

Figure 5 Comparison of sequencing results of recombinant plasmid GST-F2KP.

28 °C 的条件下, 大量诱导出与目的条带大小相一致的蛋白。超声破碎后上清和沉淀中都检测到目的蛋白条带, 说明该蛋白在上清和包涵体中均存在目的蛋白, 并且包涵体中的蛋白量多于上清液。在结合完 GST 磁珠后的上清中几乎检测不到目的条带, 说明此时目的蛋白已经结

合到 GST 的磁珠上面(图 7)。洗脱结束后的磁珠上未检测到明显目的条带, 说明磁珠上结合的重组蛋白被洗脱下来。值得注意的是, 若磁珠上有重组蛋白未洗脱完全, 可延长孵育时间或者提高还原型谷胱甘肽的浓度来更高效地洗脱蛋白。

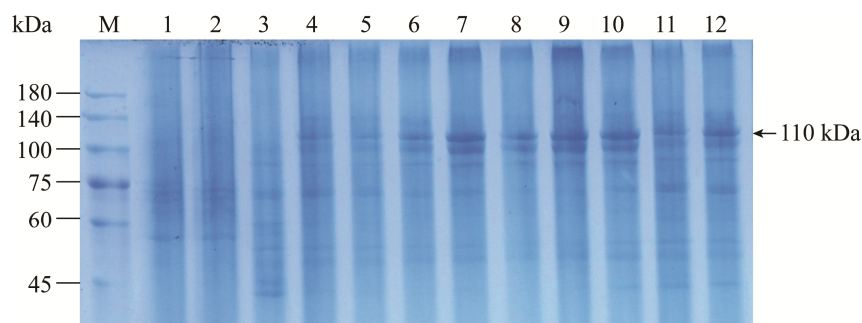


图 6 GST-F2KP 重组蛋白表达的最佳诱导温度和 IPTG 浓度的筛选 M: 蛋白 marker PM2510; 1: pGEX-4T-1 诱导前; 2: pGEX-4T-1 37 °C IPTG 0.5 mmol/L 诱导后; 3: GST-F2KP 诱导前; 4: GST-F2KP 16 °C IPTG 0.1 mmol/L 诱导后; 5: GST-F2KP 16 °C IPTG 0.3 mmol/L 诱导后; 6: GST-F2KP 16 °C IPTG 0.5 mmol/L 诱导后; 7: GST-F2KP 28 °C IPTG 0.1 mmol/L 诱导后; 8: GST-F2KP 28 °C IPTG 0.3 mmol/L 诱导后; 9: GST-F2KP 28 °C IPTG 0.5 mmol/L 诱导后; 10: GST-F2KP 37 °C IPTG 0.1 mmol/L 诱导后; 11: GST-F2KP 37 °C IPTG 0.3 mmol/L 诱导后; 12: GST-F2KP 37 °C IPTG 0.5 mmol/L 诱导后

Figure 6 Optimization of expression temperature and IPTG concentration for GST-F2KP recombinant protein. M: Protein marker PM2510; 1: Before pGEX-4T-1 induction; 2: pGEX-4T-1 was induced by 0.5 mmol/L IPTG at 37 °C; 3: Before GST-F2KP induction; 4: GST-F2KP was induced by IPTG 0.1 mmol/L at 16 °C; 5: GST-F2KP was induced by IPTG 0.3 mmol/L at 16 °C; 6: GST-F2KP was induced by IPTG 0.5 mmol/L at 16 °C; 7: GST-F2KP was induced by IPTG 0.1 mmol/L at 28 °C; 8: GST-F2KP was induced by IPTG 0.3 mmol/L at 28 °C; 9: GST-F2KP was induced by IPTG 0.5 mmol/L at 28 °C; 10: GST-F2KP was induced by IPTG 0.1 mmol/L at 37 °C; 11: GST-F2KP was induced by IPTG 0.3 mmol/L at 37 °C; 12: GST-F2KP p induced by IPTG 0.5 mmol/L at 37 °C.

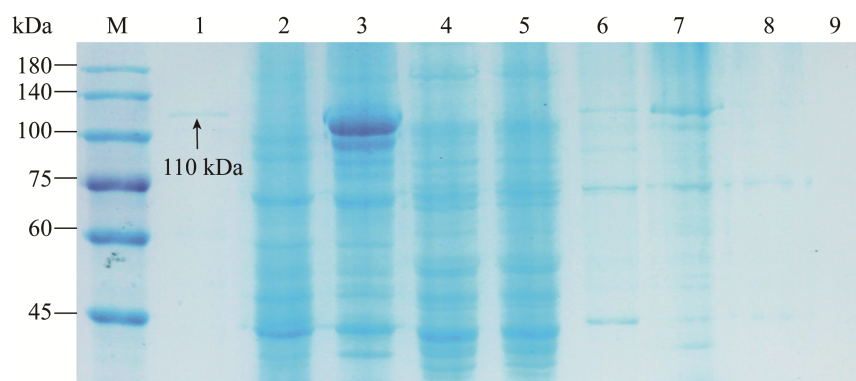


图 7 GST-F2KP 重组蛋白的纯化 M: 蛋白 marker PM2510; 1: GST-F2KP 纯化蛋白; 2: GST-F2KP 诱导前; 3: GST-F2KP 诱导后原液; 4: 空载体诱导前; 5: 空载体诱导后; 6: 超声破碎后上清液; 7: 超声破碎后沉淀; 8: GST 磁珠孵育之后上清; 9: 洗脱之后的磁珠

Figure 7 Purification of GST-F2KP recombinant protein. M: Protein marker PM2510; 1: Purified GST-F2KP; 2: Before GST-F2KP induction; 3: After GST-F2KP induction, the stock solution was obtained; 4: Before induction of empty plasmid; 5: After induction of empty plasmid; 6: The supernatant after ultrasonic crushing; 7: The precipitates after ultrasonic crushing; 8: The supernatant after incubation with GST magnetic beads; 9: Magnetic beads after elution.

为进一步检测上述纯化的蛋白是 GST-F2KP 的重组蛋白,用 GST 抗体免疫纯化的蛋白,发现在 100 kDa 和 140 kDa 之间有明显条带,与考马斯亮蓝的结果一致,进一步说明纯化的蛋白是 GST-F2KP 目的蛋白(图 8)。

2.6 *CpF2KP* 基因表达分析

在番木瓜中白品种中,检测 *CpF2KP* 基因在不同组织中的表达水平,发现该基因在根、茎、叶、花、果肉和种子中均有表达,没有组织表达特异性。该基因在种子中的表达量最高,其次是茎和根,在果肉中的表达量最低(图 9)。

3 讨论与结论

果糖-6-磷酸,2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酯酶(F6P,2K/F26BPase)是一个独特的双功能酶,该酶具有激酶和酯酶 2 个功能域^[6-7,11-12]。在植物和动物中分别简称为 F2KP 与 PFKFB。目前已证明动物中 PFKFB 同工酶由多种不同基因编码^[13-15],而每种植物只有一个基因编码一个双功能 F2KP 蛋白^[16],并且动物、植物和酵母等多种真核生物中已经克隆到编码该基因的序列^[17-18]。植物胞浆中果糖-2,6-二磷酸(Fru-2,6-P₂)的含量就由 F2KP 来决定。多篇文章已经报道通过超

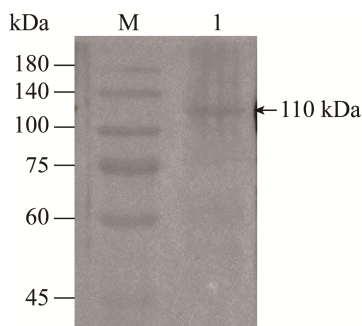


图 8 Western blotting 检测 GST-F2KP 纯化蛋白
M: 蛋白 marker PM2510; 1: GST-F2KP 纯化蛋白
Figure 8 Western blotting detection of purified protein. M: Protein marker PM2510; 1: GST-F2KP was purified.

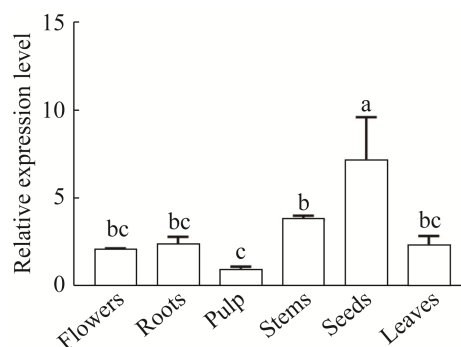


图 9 *CpF2KP* 基因在不同组织中的表达特性 不同小写字母表示显著差异($P<0.05$),误差线代表标准差
Figure 9 Expression characteristics of *CpF2KP* gene in different tissues. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$), bars indicate standard deviation.

量表达或者抑制表达 F2KP 来调节 Fru-2,6-P₂ 的水平,影响蔗糖和淀粉之间碳的分配^[7-12]。

为响应光合速率的增加,基质中甘油酸-3-磷酸(3-PGA)和磷酸丙糖(triose-P)运输到胞质中交换 Pi,胞质中 3-PGA 和 triose-P 的增加、Pi 的减少能通过抑制 F6P2K 的活性,激活 F26BPase 的活性降低 Fru-2,6-P₂ 的水平。低水平的 Fru-2,6-P₂ 可以减轻对胞质果糖-1,6-二磷酸酯酶(FBPase)活性的抑制,增加向蔗糖合成的通量。当蔗糖的合成速率超过出口速率时,胞浆中 Fru-2,6-P₂ 的增加激活 F6P2K 活性抑制 F26BPase 活性,增加的 Fru-2,6-P₂ 水平抑制胞质 FBPase 并限制蔗糖的合成,由此导致 3-PGA 的增加和基质中 Pi 的减少,激活 ADPglc 焦磷酸化酶来刺激淀粉合成。植物 F2KP 的活性影响细胞中 Fru-2,6-P₂ 的水平,从而控制蔗糖和淀粉的碳分配^[6]。

据文献报道,目前已经从多种生物中克隆到 F2KP 的基因序列^[5],其中有些物种通过原核表达和蛋白纯化得到了单一的 F2KP 蛋白,例如拟南芥和玉米,但是不同的物种诱导条件是不同的。拟南芥基因 *AtF2KP* 选用 pThioHisC 载

体, 在温度为 37 °C、IPTG 浓度为 1 mmol/L 的条件下诱导 16 h 可诱导出 AtF2KP 蛋白^[19]; 玉米基因 *mF2KP* 选用 pET-30 载体, 在温度为 25 °C、IPTG 浓度为 1 mmol/L 的条件下诱导 5 h 可诱导出 *mF2KP* 蛋白^[20]。

长期以来, 研究者较为关注 *F2KP* 在光合组织中的表达, 例如在橡胶树中 *HbF2KP* 基因在叶片中表达最高, 推测该基因在橡胶树叶片的光合细胞蔗糖合成过程中发挥着重要的调控作用^[21]。*F2KP* 在非光合组织中也有表达, 例如在玉米中, *F2KP* 除在茎和叶中表达, 在雄花序和未成熟的种子中也有较低的表达^[22]。

关于番木瓜中 *CpF2KP* 的基因功能至今未见报道, 猜测 *CpF2KP* 可能跟其他植物中的 *F2KP* 有相似功能。因此对番木瓜的基因 *CpF2KP* 展开分子生物学研究。为验证 *CpF2KP* 的蛋白功能, 首先要做的就是得到 *CpF2KP* 的纯化蛋白, 检测其 F6P₂-K 和 F26BPase 的酶活。本研究首次从番木瓜的转录组序列中提取该基因的 cDNA 序列, 全长 2 274 bp, 序列分析发现其具有 F6P₂-K 的保守结构域。扩增 *CpF2KP* 的 cDNA 全长, 克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 确定该基因编码的蛋白最佳诱导条件为 IPTG 浓度 0.5 mmol/L、温度 28 °C。并且根据福建农林大学免疫中心的蛋白纯化方法, 纯化到单一蛋白。此外还发现该基因在种子中高度表达, 推测该基因可能在番木瓜种子发育过程的蔗糖淀粉代谢通路中发挥重要功能。为后续研究 *CpF2KP* 的酶活特性及其作用物 Fru-2,6-P₂ 对蔗糖和淀粉之间碳分配的分子调控机制提供了基础, 为番木瓜的分子育种提供重要的基因资源。

REFERENCES

- [1] 廖建良. 广东番木瓜产业发展的对策与建议[J]. 吉林农业科学, 2011, 36(3): 53-57.
- [2] van SCHAFTINGEN E, HUE L, HERS HG. Fructose 2,6-bisphosphate, the probably structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase[J]. Journal of Cancer Prevention, 1980, 192(3): 897-901.
- [3] OKAR DA, LANGE AJ. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes[J]. BioFactors: Oxford, England, 1999, 10(1): 1-14.
- [4] MCCORMICK AJ, KRUGER NJ. Lack of fructose 2,6-bisphosphate compromises photosynthesis and growth in *Arabidopsis* in fluctuating environments[J]. The Plant Journal, 2015, 81(5): 670-683.
- [5] 何伟, 周平, 张建福, 逯平杰, 苏轶, 叶冰莹, 雷美华, 陈由强, 陈如凯. 甘蔗果糖-6-磷酸,2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酯酶基因(F2KP)的克隆及其功能研究[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(4): 347-355.
- [6] HE W, ZHOU P, ZHANG JF, LU PJ, SU Y, YE BY, LEI MH, CHEN YQ, CHEN RK. Cloning and function analysis of the fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (F2KP) from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(4): 347-355 (in Chinese).
- [7] DRABORG H, VILLADSEN D, NIELSEN TH. Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(11): 556-563.
- [8] DRABORG H, VILLADSEN D, NIELSEN TH. Transgenic *Arabidopsis* plants with decreased activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase have altered carbon partitioning[J]. Plant Physiology, 2001, 126(2): 750-758.
- [9] SCOTT P, LANGE AJ, PILKIS SJ, KRUGER NJ. Carbon metabolism in leaves of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) containing elevated fructose 2,6-bisphosphate levels[J]. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 1995, 7(3): 461-469.
- [10] RUNG JH, DRABORG HH, JØRGENSEN K, NIELSEN TH. Carbon partitioning in leaves and tubers of transgenic potato plants with reduced activity of fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase[J]. Plant Physiology, 2004, 121(2): 204-214.
- [11] TREVANION SJ, KRUGER NJ. Effect of temperature on the kinetic properties of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase from potato tuber[J].

- Journal of Plant Physiology, 1991, 137(6): 753-759.
- [11] STITT M. Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1990, 41: 153-185.
- [12] MARKHAM JE, KRUGER NJ. Kinetic properties of bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from spinach leaves[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(4): 1267-1277.
- [13] EL-MAGHRABI MR, NOTO F, WU N, MANES N. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: suiting structure to need, in a family of tissue-specific enzymes[J]. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 2001, 4(5): 411-418.
- [14] RIDER MH, BERTRAND L, VERTOMMEN D, MICHELS PA, ROUSSEAU GG, HUE L. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis[J]. Journal of the American Heart Association, 2004, 381(pt 3): 561-579.
- [15] MINCHENKO O, OPENTANOVA I, CARO J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression *in vivo*[J]. FEBS Letters, 2003, 554(3): 264-270.
- [16] DRABORG H, VILLADSEN D, NIELSEN TH. Cloning, characterization and expression of a bifunctional fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from potato[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 39(4): 709-720.
- [17] DARVILLE MI, CREPIN KM, HUE L, ROUSSEAU GG. 5' flanking sequence and structure of a gene encoding rat 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase[J]. Journal of Immunology Research, 1989, 86(17): 6543-6547.
- [18] KRETSCHMER M, FRAENKEL DG. Yeast 6-phosphofructo-2-kinase: sequence and mutant[J]. Biochemistry, 1991, 30(44): 10663-10672.
- [19] VILLADSEN D, RUNG JH, DRABORG H, NIELSEN TH. Structure and heterologous expression of a gene encoding fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*¹[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Gene Structure and Expression, 2000, 1492(2/3): 406-413.
- [20] WANG D, DU XL, ZHANG HS, QIAN XY, YANG JS, ZHAI HQ. Structure and expression analyses of a gene encoding fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from Maize[J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(4): 466-471.
- [21] 龙翔宇, 何斌, 曹冰, 梁启福, 方永军, 阳江华, 唐朝荣. 橡胶树糖代谢调控基因 *HbF2KP* 的克隆及表达[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(4): 23-28.
- LONG XY, HE B, CAO B, LIANG QF, FANG YJ, YANG JH, TANG CR. Molecular cloning and expression analysis of *HbF2KP* from *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2014, 38(4): 23-28 (in Chinese).
- [22] 王东, 杜喜玲, 胡建广, 张红生, 杨金水, 翟虎渠. 玉米果糖-6-磷酸,2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶基因的全长 cDNA 克隆及表达[J]. 遗传学报, 2003, 30(2): 163-168.
- WANG D, DU XL, HU JG, ZHANG HS, YANG JS, ZHAI HQ. Cloning and expression of maize fructose-6-phosphate,2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (mF2KP)[J]. Acta Genetica Sinica, 2003, 30(2): 163-168 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)