

红肉火龙果液泡转化酶基因 *HpVIN1* 的克隆、表达和酶活性鉴定

郑乾明^{1,2}, 晏霜¹, 王红林^{1,2}, 解璞¹, 马玉华^{2*}

1. 贵州省农业科学院贵州省果树科学研究所, 贵州贵阳 550006; 2. 贵州省农业科学院农业农村部喀斯特山区作物基因资源与种质创新重点实验室, 贵州贵阳 550006

摘要: 液泡转化酶 (vacuolar invertase, VIN) 不可逆地分解蔗糖生成葡萄糖和果糖, 是可溶性糖代谢的关键酶, 参与植物的生长发育、产量品质形成和抵御逆境。为探讨 *VIN* 基因在红肉火龙果 (*Hylocereus polyrhizus*) 可溶性糖代谢中的生理功能, 从果实中克隆 *HpVIN1* 基因, 开展序列比对、系统进化、基因表达、亚细胞定位、酵母生长互补分析和蔗糖分解活性检测。基于 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 扩增获得 *HpVIN1* 基因, 其开放阅读框 (open reading frame, ORF) 长度为 1935 bp, 编码 644 个氨基酸。序列分析表明, *HpVIN1* 含有转化酶催化蔗糖分解的关键结构域, 且在 N 端含有液泡定位的相关序列。系统进化分析表明 *HpVIN1* 与猕猴桃、枇杷、苹果和葡萄的 *VINs* 具有较近的亲缘关系。实时荧光定量 PCR 检测表明, *HpVIN1* 在茎和果实转色期 (花后 20~25 d) 的表达量较高, 果实成熟期 (花后 30 d) 表达微弱。*HpVIN1* 融合绿色荧光蛋白在拟南芥叶肉原生质体瞬时表达表明 *HpVIN1* 定位于液泡膜和液泡。*HpVIN1* 在蔗糖利用缺陷的酵母菌株过表达, 恢复酵母以蔗糖为唯一碳源的生长, 证明 *HpVIN1* 具有蔗糖分解活性。酵母总蛋白的离体催化实验表明, *HpVIN1* 分解蔗糖产生葡萄糖和果糖, 蔗糖分解活性在 pH 4.0 时最大, 并随 pH 的升高快速降低。研究结果表明, 位于液泡内的 *HpVIN1* 具有分解蔗糖产生葡萄糖和果糖的酶活性, 参与红肉火龙果茎和果实转色期的可溶性糖代谢。

关键词: 火龙果; 液泡转化酶基因; 蔗糖分解; 亚细胞定位; 酵母表达

中图分类号: S667.9 文献标志码: A

Cloning, Expression and Enzyme Activity Identification of the Vacuolar Invertase Gene *HpVIN1* from Red Pitaya

ZHENG Qianming^{1,2}, YAN Shuang¹, WANG Honglin^{1,2}, XIE Pu¹, MA Yuhua^{2*}

1. Guizhou Institute of Pomology Science, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006, China; 2. Key Laboratory of Crop Genetic Resources and Germplasm Innovation in Karst Region, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006, China

Abstract: Vacuolar invertase (VIN), degrading sucrose to produce glucose and fructose irreversibly, is a key enzyme in soluble sugar metabolism, and involved in plant growth and development, yield and quality formation, and stress resistance. To investigate the physiological functions of *VIN* genes in soluble sugar metabolism of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*), *HpVIN1* gene was cloned from the fruit, and sequence comparison, phylogenetic relationship, gene expression, subcellular localization, yeast growth complementation and sucrose degradation activity were analyzed. Based on RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) amplification, the ORF (open reading frame) of *HpVIN1* gene with a length of 1935 bp was isolated, which encoded 644 amino acids. Sequence analysis showed that *HpVIN1* con-

收稿日期 2024-03-25; 修回日期 2024-04-25

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32060674); 贵州省农业科学院国家自然科学基金后补助项目 (黔农科院国基后补助[2021]61); 贵州省科技计划项目 (黔科合中引地[2023]033)。

作者简介 郑乾明 (1985—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 园艺果实品质形成机理。*通信作者 (Corresponding author): 马玉华 (MA Yuhua), E-mail: m_yh79@163.com。

tained key domains related to sucrose degradation activity of invertase, as well as vacuole localization sequences in the N terminal. Phylogenetic analysis suggested that *HpVIN1* was closely related to *VIN* genes from kiwifruit, loquat, apple and grape. Real time fluorescence quantitative PCR detection revealed that *HpVIN1* was highly expressed in stems and fruits during the veraison stage (20~25 days after flowering), and weakly expressed in ripen fruits (30 days after flowering). The transient expression of *HpVIN1* fused by green fluorescent protein in *Arabidopsis thaliana* mesophyll protoplasts demonstrated that *HpVIN1* protein was localized in the tonoplast and vacuole. By over-expressing in the yeast strain with sucrose utilization defects, *HpVIN1* could restore the yeast growth using sucrose as the sole carbon source, which proved that *HpVIN1* had the sucrose degradation activity. *In vitro* catalytic experiment using the yeast total protein suggested that *HpVIN1* could degrade sucrose into glucose and fructose. The sucrose degradation activity was the highest at pH 4.0, and rapidly decreased as pH value increasing. The results show that *HpVIN1* that locates in the vacuole, has the enzyme activity of degrading sucrose to produce glucose and fructose, and participates in sucrose catabolism of stems and fruits during the veraison stage.

Keywords: pitaya; vacuolar invertase gene; sucrose degradation; subcellular localization; yeast expression

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.12.004

火龙果 (*Hylocereus*. spp) 属仙人掌科 (Cactaceae) 量天尺属 (*Hylocereus*), 近年来作为多年生果树在我国西南和南方等省迅速发展, 产生良好的经济效益。火龙果植株的叶片退化为刺, 进行光合作用的主要源组织是肉质化的茎。红肉火龙果 (*Hylocereus polyrhizus*) 果实色泽鲜艳、风味浓郁, 深受消费者喜爱, 是贵州喀斯特石漠化地区的特色经济作物。红肉火龙果果实积累丰富的可溶性糖, 主要包括葡萄糖、果糖和蔗糖^[1], 其含量和比例是决定风味和品质的最关键指标。研究红肉火龙果果实可溶性糖积累的分子机制, 对调控和改良果实风味和品质具有重要意义。

蔗糖是高等植物源组织光合作用的主要产物和光合产物在韧皮部长距离运输的主要形式, 运输到根、花、种子或果实等库组织的质外体或胞质分解, 或转运入液泡贮藏或分解^[2]。转化酶又称为 β -呋喃果糖苷酶, 属于糖苷水解酶家族 32 类 (glycoside hydrolase family 32 enzymes, GH32) 或 100 类 (GH100)^[3-4], 是植物蔗糖分解酶的重要组成成员。转化酶催化蔗糖不可逆地分解为葡萄糖和果糖, 可作为底物、能量或信号分子, 参与植物的生长发育、产量品质形成和抵御逆境等^[4]。根据转化酶催化蔗糖分解的适宜 pH 值, pH 为 3.5~5.0 具有最高活性的称为酸性转化酶 (acid invertase, AIN), pH 为 6.8~9.0 具有最高活性的称为中性/碱性转化酶 (alkaline/neutral invertase, NIN)^[5]。根据亚细胞定位差异, AIN 可分为定位于液泡的液泡转化酶 (vacuole invertase, VIN) 和定位于细胞壁的细胞壁转化酶 (cell wall invertase, CWIN)^[4-5]。

高等植物 VIN 在细胞内分解蔗糖形成浓度梯度, 促进蔗糖从源组织向库组织的运输。研究表明, VIN 酶活性与植物组织的生长发育, 以及产量性状密切相关。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) VIN1 的酶活性正向调控根系的生物量^[6]; 不同生态型 *VIN1* 序列的多态性影响酶活性, 进而决定胚根长度^[7]。水稻 (*Oryza sativa* L.) OsVIN2 和 OsVIN3 位于液泡, 正向调节籽粒的糖代谢以及籽粒大小和粒重等重要性状^[8-10]。棉花 (*Gossypium hirsutum*) VIN 酶活性与棉纤维生长、花器官和种子发育密切相关, *GhVIN1* 表达水平决定纤维伸长速率^[11]以及花药和胚囊发育、授粉和种子发育^[12]。高粱 (*Sorghum bicolor*) 的 VIN 成员 *SbVIN1* 和 *SbVIN2* 与茎长、粗、节间数、鲜重和水溶性碳水化合物含量等性状, 以及粒重、粒宽等籽粒性状显著相关^[13]。低温和干旱等非生物逆境诱导 VINs 表达, 表明其也参与植物抵御逆境胁迫。马铃薯 (*Solanum tuberosum*) *StvacINV1* 受低温诱导, 参与低温下块茎蔗糖分解为还原糖的低温糖化^[14], 干涉表达, 大幅降低还原糖含量^[15]。茶树 (*Camellia sinensis* L.) *CsINV5* 表达受低温和糖诱导, 过表达增强根系生长和耐寒性^[16]; 毛竹 (*Phyllostachys edulis*) *PeVIN2* 受干旱诱导, 促进干旱胁迫下葡萄糖等已糖含量的增加^[17]。

VIN 酶活性是园艺作物果实等库组织强度的标志, 直接决定果实产量和可溶性糖积累。干涉甜瓜 (*Cucumis melo* L.) VIN 基因 *MAII* 表达, 植株长势变弱, 果实变小且加速成熟, 蔗糖含量增加^[18]。枇杷 [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.] *EjVIN* 在幼叶、幼果和成熟果实中表达, 在

成熟果实中的酶活性最高, 过表达降低蔗糖含量^[19]。桃 (*Prunus persica*) *PpVIN2* 表达受到低温诱导, 分解蔗糖促进还原糖积累^[20]。基于椰枣 (*Phoenix dactylifera*) 群体的代谢组与基因型关联分析发现, 果实低蔗糖含量品种有 3 个串联拷贝的 *VIN* 基因, 高蔗糖含量品种有 2 个 *VIN* 基因发生缺失, 表明蔗糖含量与 *VIN* 基因的拷贝数成反比关系^[21]。

近年来对红肉火龙果种质资源评价以及品种选育的深入开展, 推动了果实可溶性糖积累机制的研究。例如, 对 3 个火龙果品种果实发育和成熟期间主要代谢物检测表明, 葡萄糖和果糖等可溶性糖含量随果实成熟逐渐增加^[1]。红肉火龙果转录因子 *HpWRKY3* 具有转录激活活性, 随果实成熟上调表达, 激活 *HpSuSy1* 等蔗糖代谢酶基因的表达^[22]。基于火龙果果实转录组测序分离 *VIN* 等大量可溶性糖代谢相关基因, 分析基因表达和酶活性的相关性, 获得与酶活性高度相关的候选 *VIN* 基因^[23]。基于基因组序列分离火龙果 *VIN* 和 *CWIN* 共计 11 个成员, 仅 2 个 *VIN* 基因在果实表达, 表明其可能参与可溶性糖的积累^[24]。前期对红肉火龙果果实发育和成熟关键时期进行转录组测序, 获得大量与可溶性糖积累相关的候选基因^[25]。本研究拟对红肉火龙果 1 个 *VIN* 候选基因开展基因克隆、基因表达、亚细胞定位和酶活性鉴定等分析, 探讨其在果实发育期间的生理功能。

1 材料与方法

1.1 材料

从贵州省镇宁县的火龙果种植园选取处于结果期的健壮成年植株, 栽培品种为红肉火龙果紫红龙 (*Hylocereus polyrhizus* cv. Zihonglong)。于 2021 年 9 月 15 日选取一批同时开花的植株标记, 采集成熟的茎组织, 分别于 2021 年 10 月 5 日、8 日、10 日、12 日和 15 日 (即: 花后 20 d, F_{20} ; 花后 23 d, F_{23} ; 花后 25 d, F_{25} ; 花后 27 d, F_{27} ; 花后 30 d, F_{30}) 共计 5 个时期采集果实。每个时期采集 15 个果实, 随机分为 3 组, 作为 3 次生物学重复。取茎和果肉分别切成薄片, 在液氮中研磨并速冻, 保存于 -80°C 备用。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 哥伦比亚型、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 SEY2102 (*MATa*; *ura3-52*; *leu2-3,112*; *his4-519*; *suc2- Δ 9*; *gal2*) 均为

本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 *HpVIN1* 基因克隆 果实总 RNA 提取使用复杂植物 RNA 快速提取试剂盒 (RN53, Aidlab, 中国)。使用琼脂糖凝胶电泳和微量分光光度计 (NanoPhotometer, IMPLLEN, 德国) 分别检测总 RNA 的质量和浓度。合格的总 RNA 样品使用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (6110A, TaKaRa, 中国) 反转录合成 cDNA 第一链。使用高保真 DNA 聚合酶 (P515, Vazyme, 中国) 利用目标基因特异引物 (5'-ATATTCCATC-GTCGTAATTC-3'/5'-TTATGCATCACATACATTAC-3') 进行 RT-PCR 扩增。扩增产物经回收、连接并转化至大肠杆菌感受态 DH5 α , 将阳性克隆后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.2.2 序列分析 使用 ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 在线软件预测 ORF。使用 ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) 在线软件预测氨基酸序列理论等电点和相对分子量。使用 HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) 在线软件预测氨基酸序列的保守结构域。使用 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 在线软件预测跨膜结构。使用 Clustal W 软件进行氨基酸序列多重比对, 结果展示使用 GENDOC 软件。使用 MEGA 7.0 软件进行系统进化分析, 使用邻接法构建系统进化树, 进行 1000 次重复的 Bootstrap 值检测。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 使用 Primer Premier 5.0 软件设计目标基因的特异扩增引物 (5'-CCGGATTGGATGTGGGTATC-3'/5'-AATCCTCCTCCCTCTCTTATGG-3'), 为确保扩增的特异性, 预期扩增产物在火龙果基因组数据库 (<http://pitayagenomic.com/>) 进行 BLASTn 检索。使用荧光定量 PCR 仪 (CFX96, BIO-RAD, 美国) 进行 PCR 反应, 扩增体系总体积为 10.0 μL , 包含 cDNA 模板 0.5 μL , 上/下游引物各 0.2 μL , 2 $\times$ SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂 (RK02001, Biomarker, 中国) 5 μL , 无菌水 4.1 μL 。反应程序: 95°C 变性 3 min; 95°C 变性 5 s, 60°C 退火和延伸共 30 s, 40 个循环。内参基因校准使用 β -ACT (5'-CTTCCATACCAATGAATGAGG-3'/5'-AACCGCC AAGAGTAGTTCTG-3'), 每个反应设置 3 次技术重复。基因的相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值计算, 将花后 30 d 果实中的基因表达量设为 “1”。

1.2.4 亚细胞定位 使用引物 (5'-ACAGCCC-AAGCTTGCATGCCTGCAGATGGCCTCCGTCA-TTT-3'/5'-CCTCGCCCTTGCTCACCATTGGATCC-AGAATCAATTTTAAAGGTC-3') 扩增 *HpVIN1* 基因 ORF 序列, 同时去除终止密码子。使用回收试剂盒 (9761, TaKaRa, 日本) 回收 PCR 扩增产物, 16318-hGFP 载体使用 *Pst* II 和 *Bam*H I (NEB, 美国) 酶切并回收, 混合后利用单片段快速克隆试剂盒 (C112, Vazyme, 中国) 连接, 转化至大肠杆菌感受态 DH5 α , 经测序确认后提取质粒。目标质粒 *HpVIN1*-hGFP 和空载体 16318-hGFP 分别与液泡膜 Marker 拟南芥 VAMP711-RFP 质粒^[26] 混合。利用 PEG 介导瞬时转化至拟南芥叶肉原生质体, 具体步骤参考文献[27], 利用激光共聚焦显微镜观察荧光信号。

1.2.5 酵母表达载体构建和酵母转化 PCR 扩增目标基因的 ORF 序列, 使用特异引物 (5'-GTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGGC-CTCCGTCATTTTCC-3'/5'-AATTGGGTACCGGG-CCCCCCTCGAGTCAAGAATCAATTTTAAAA-3') 回收并纯化扩增产物, 酵母表达载体 pDR196 使用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Xho* I (NEB, 美国) 酶切后回收纯化。将 PCR 片段插入至载体多克隆位点后测序, 提取质粒备用。酵母利用液体 YPDA 培养基 (以葡萄糖为碳源) 培养至对数期, 使用酵母转化试剂盒 (SK2400, 酷来搏, 中国) 分别转化 *HpVIN1*-pDR196 和载体 pDR196, 涂布在 SC/-ura 固体筛选培养基 (葡萄糖为碳源) 上, 30 °C 倒置培养 48 h, 挑选单克隆振荡培养并进行菌落 PCR 鉴定。

1.2.6 酵母生长互补检测 分别选取含有 *HpVIN1*-pDR196 和 pDR196 的酵母单克隆, 接种于液体 SC/-ura 培养基 (以葡萄糖为碳源), 30 °C 振荡培养至对数期 ($OD_{600}=0.6\sim 1.0$)。离心收集酵母细胞, 使用无菌水重悬, 离心去上清, 重复 1 次, 并以无菌水调节 OD_{600} 值至 1.0。使用无菌水 10 倍梯度依次稀释, 将 OD_{600} 值分别调节至 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 。分别取 1.0 μ L 上述酵母液, 接种于 SC/-ura 固体培养基 (葡萄糖或蔗糖为碳源), 30 °C 倒置培养, 定期观察并拍照。目的基因或载体对照均选取至少 4 个独立的单克隆, 选取代表性的单克隆菌落拍照。同时收集上述对数期的酵母细胞 2 mL, 使用无菌水清洗 2 次, 使用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 5.0) 450 μ L 重悬, 加入质量分数为 20% 的蔗糖溶液 50 μ L, 30 °C 振荡培养 12 h,

离心取上清 200 μ L, 加入二硝基水杨酸 (3,5-Dinitro-2-hydroxybenzoic acid, DNS) 150 μ L, 80 °C 水浴 5 min, 冷却后利用酶标仪 (Multiskan GO, Thermo Fisher, 美国) 检测 540 nm 下的吸光值。

1.2.7 重组蛋白提取和酶活性检测 收集上述培养至对数期的酵母细胞, 使用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 5.0) 清洗 2 次。利用钢珠涡流破碎酵母细胞, 采用 Bradford 法测定试剂盒 (PC0010, Solarbio, 中国) 检测酵母总蛋白浓度。利用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 检测, 反应体系总体积为 200 μ L, 蔗糖终浓度为质量分数 0.5%, 20 μ L 酵母总蛋白溶液 (约 1.0 μ g 总蛋白)。37 °C 水浴 12 h, 80 °C 水浴 5 min 终止, 离心取上清。利用 HPLC (Agilent-1200, 美国) 检测反应产物, 色谱柱为糖分析柱 (Zorbax Carbohydrate, Agilent, 美国)。检测条件: 柱温 40 °C, 流动相 70% 乙腈, 检测器为示差折光检测器, 温度 35 °C。分别以葡萄糖、果糖和蔗糖为标准品确定保留时间和鉴定产物类别。分别使用不同 pH (3.0~8.0) 的磷酸盐缓冲液检测不同 pH 值下 *HpVIN1* 重组蛋白的酶活性。反应总体积 500 μ L, 蔗糖终浓度为质量分数 1.0%, 酵母总蛋白为 1.0 μ g。37 °C 水浴 1 h, 80 °C 水浴 5 min 终止, 离心取上清, 使用 DNS 法检测葡萄糖含量。

1.3 数据处理

使用 Microsoft Excel 2007 软件作图, 利用 SPSS 软件采用 Duncan's 法对不同样本之间的差异进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 *HpVIN1* 基因克隆和序列分析

以红肉火龙果果实 cDNA 为模板, 根据转录组测序获得的 *VIN* 相关转录本, RT-PCR 扩增获得的产物长度约 2 kb。扩增产物经过回收、克隆和测序, 获得目的片段的 ORF 长度为 1935 bp, 命名为 *HpVIN1*。*HpVIN1* 编码 644 个氨基酸残基, 预测相对分子量为 71.12 kDa, 理论等电点为 5.82。

序列比对表明 (图 1), *HpVIN1* 的氨基酸序列与拟南芥 *AtvacINV1* 类似, 含有复杂的 N 端前体肽 (N-terminal propeptide, NTPP) 区域, 包含酸性的二亮氨酸 (Di-leucine) 区域、基础区域 (basic region, BR) 和跨膜结构域 (transmembrane domain, TMD)。保守结构预测显示, *HpVIN1* 的氨基酸序列含有 β -呋喃果糖苷酶的 N 末端结构域

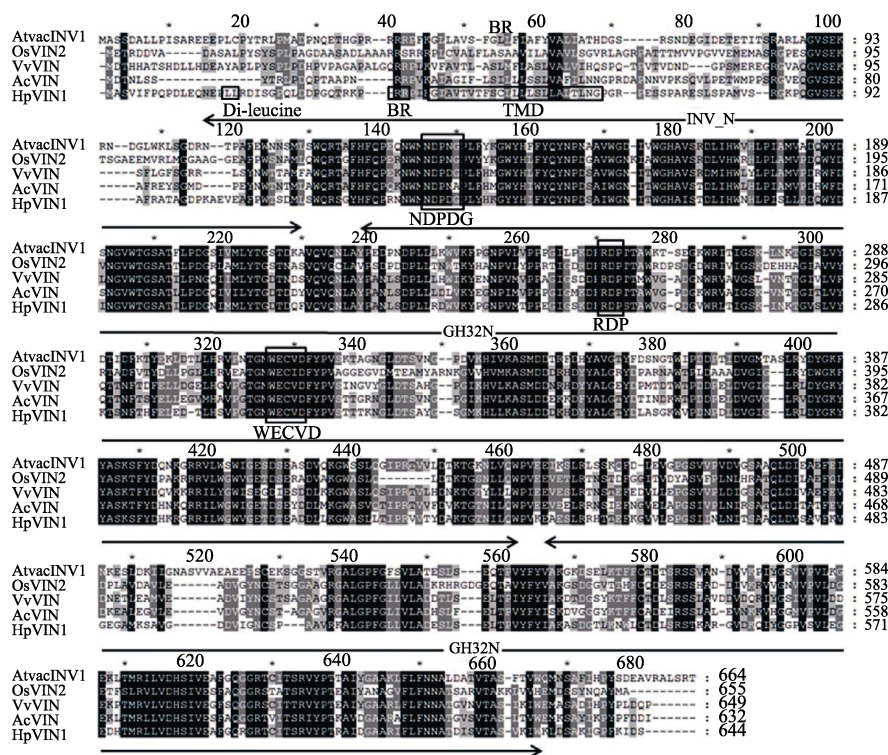


图 1 HpVIN1 氨基酸序列比对及结构域预测

Fig. 1 Sequence alignment and domain prediction of HpVIN1 amino acid

(INV_N, PF11837.11), 位于 14~115 aa; GH32 家族的 N 端结构域 Glyco_hydro_32N (GH32N, PF00251.23), 位于 123~440 aa; GH32 家族的 C 端结构域 Glyco_hydro_32C (GH32C, PF08244.15), 位于 443~631 aa。进一步比对, 查找转化酶活性直接相关的结构域, HpVIN1 含有典型的 β -呋喃果糖苷酶结构域 NDPDG、催化结构域 WECVD 以及 RDP 结构域。

将 HpVIN1 与拟南芥、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、水稻、葡萄 (*Vitis vinifera*)、枇杷、苹果 (*Malus domestica*) 和猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 等的 VINs, 以及拟南芥 AtcwINVs 进行系统进化分析, 利用邻接法构建系统进化树 (图 2)。HpVIN1 与上述物种的 VINs 聚为一类, 与拟南芥 CWINs 明显分开。同时, VINs 明显分为 2 组, HpVIN1 与猕猴桃 AcVIN、枇杷 EjVIN、苹果 MdVIN 和葡萄 VvVIN 聚为一组, 与拟南芥和水稻的 VINs 明显分开。

2.2 HpVIN1 基因的表达分析

实时荧光定量 PCR 检测 HpVIN1 基因在红肉火龙果的茎 (源组织) 和果实 (库组织) 的表达模式 (图 3) 发现, 相比花后 20 d 的果实, HpVIN1 的表达量在 23 d 明显升高且达到最大值。此后

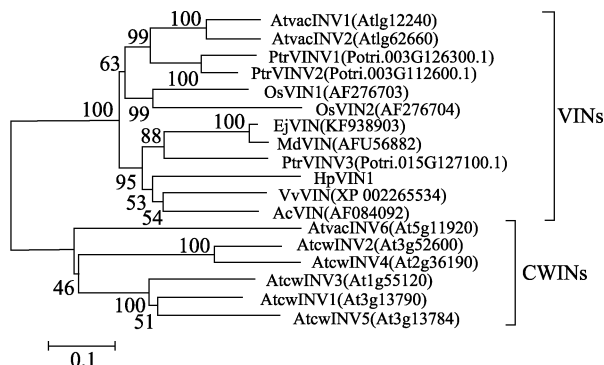
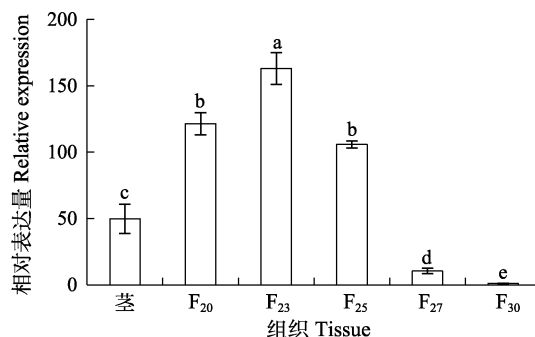


图 2 HpVIN1 与其他 VINs 及 CWINs 的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of HpVIN1, other VINs and CWINs



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 3 HpVIN1 在红肉火龙果茎和果实的表达模式

Fig. 3 Expression patterns of HpVIN1 in stem and fruit of red pitaya

HpVIN1 的表达量随果实发育明显下降，在花后 27 d 和 30 d 果实中的表达量微弱。*HpVIN1* 在茎中的表达量远高于花后 27 d 和 30 d 果实，约为花后 23 d 果实的 0.3 倍。因此，*HpVIN1* 主要在茎和花后 20~25 d 的果实表达，随果实发育迅速下降，果实成熟时（30 d）的表达极其微弱。

2.3 *HpVIN1* 蛋白的亚细胞定位

将 GFP 对照、融合表达载体 *HpVIN1*-GFP 分别与液泡膜 Marker 基因融合表达载体 *AtVAMP711*-RFP 在拟南芥叶肉原生质体共表达，显微观察结果如图 4 所示。未融合 *HpVIN1* 的 GFP 绿色荧光广泛分布于胞质，与 *AtVAMP711* 的 RFP 红色荧光仅在液泡膜有重叠。融合 *HpVIN1* 的 GFP 绿色荧光主要在细胞内形成环状，与 *AtVAMP711* 的 RFP 红色荧光标识的液泡膜完全重叠，产生明显的黄色荧光。同时，液泡内存在若干集中分布形成的点状，以及大范围弥散分布的绿色荧光。因

此，亚细胞定位结果证明 *HpVIN1* 蛋白定位于液泡膜和液泡内。

2.4 *HpVIN1* 互补酵母生长检测

HpVIN1 在蔗糖利用缺陷的酵母株系 SEY2102 中表达，观察酵母以蔗糖或葡萄糖为唯一碳源的生长情况（图 5）。以葡萄糖为唯一碳源，表达载体对照 pDR196 或 *HpVIN1* 的酵母均能正常生长。以蔗糖为唯一碳源，表达 pDR196 的酵母生长微弱，表达 *HpVIN1* 的酵母生长明显。进一步利用酵母活体细胞在含有蔗糖的缓冲液中孵育，取上清液利用 DNS 显色检测是否生成葡萄糖。表达 *HpVIN1* 的上清液与葡萄糖溶液类似，反应后呈现棕红色，载体对照无颜色变化（结果未展示）。表达 *HpVIN1* 的上清液 A_{540} 值显著高于载体对照（图 6）。因此，*HpVIN1* 在酵母蔗糖利用缺陷株系 SEY2102 表达，可介导细胞外蔗糖分解为葡萄糖等单糖，恢复酵母的生长。

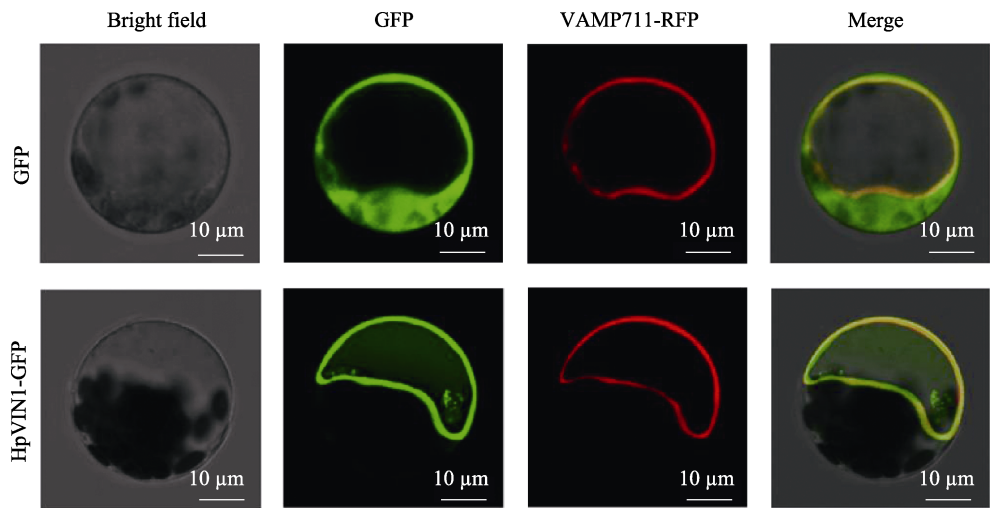


图 4 *HpVIN1* 蛋白的亚细胞定位
Fig. 4 Subcellular localization of *HpVIN1*

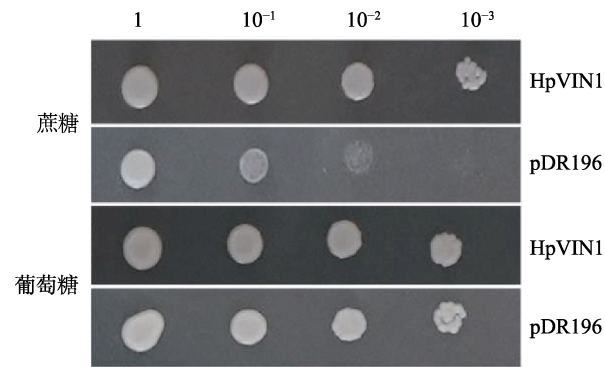
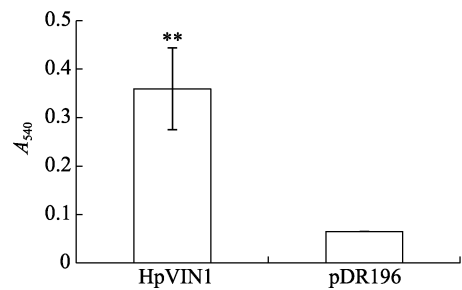


图 5 表达 *HpVIN1* 互补酵母细胞生长的检测
Fig. 5 Growth complementation test of yeast cells by expressing *HpVIN1*



**表示差异极显著 ($P<0.01$)。
** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).
图 6 表达 *HpVIN1* 的酵母细胞孵育蔗糖产生葡萄糖的检测

Fig. 6 Detection of glucose produced from sucrose incubated by yeast cells expressing *HpVIN1*

2.5 HpVIN1 重组蛋白酶活性检测

以表达 HpVIN1 的酵母总蛋白孵育蔗糖, 利用 HPLC 检测反应产物。使用载体对照 pDR196 的酵母总蛋白孵育, 仅检测到蔗糖, 未检测到葡萄糖和果糖。使用 HpVIN1 重组蛋白孵育后蔗糖含量明显降低, 且生成葡萄糖和果糖 (图 7)。在 pH 3.0~8.0 范围内, HpVIN1 重组蛋白的蔗糖分解活性在 pH 4.0 最高 (图 8)。蔗糖分解活性随缓冲液 pH 的增加快速下降, 在 $\text{pH} \geq 7.0$ 时的酶活性极低。

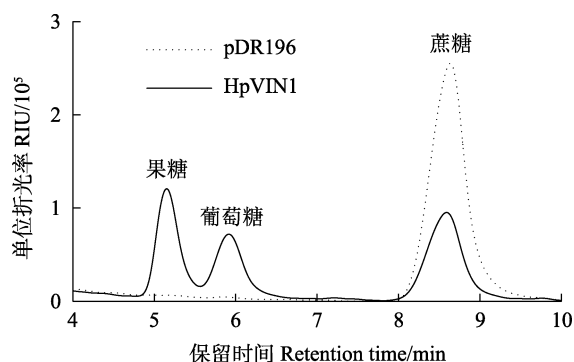


图 7 利用 HPLC 鉴定 HpVIN1 重组蛋白的蔗糖分解活性

Fig. 7 Sucrose degradation activity identification of HpVIN1 recombinant protein by HPLC

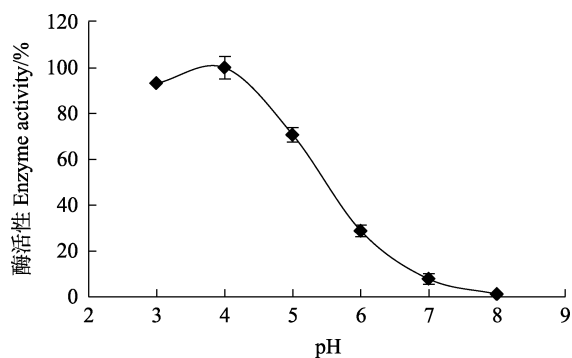


图 8 HpVIN1 重组蛋白在不同 pH 下的蔗糖分解活性
Fig. 8 Sucrose degradation activity of HpVIN1 recombinant protein under different pH values

3 讨论

植物细胞的成熟液泡是多功能细胞器, 在植物生长发育、果实品质形成和抵御逆境胁迫中具有重要作用^[28]。成熟液泡占据植物细胞体积的 90% 以上, 是可溶性糖和有机酸等重要代谢物的主要贮藏场所, 在园艺作物果实的风味形成过程中起重要作用^[29]。VIN 介导液泡蔗糖分解为葡萄糖和果糖, 对果实可溶性糖积累有决定性的作用^[18-21]。

本研究对红肉火龙果 *HpVIN1* 基因开展基因表达、亚细胞定位和酶活性鉴定分析, 探讨其在果实发育期间可溶性糖积累过程中的生理功能。

HpVIN1 含有保守的 INV_N、GH32N 和 GH32C 结构域, 与猕猴桃、枇杷、苹果和葡萄的 VINs 聚为一组, 说明 HpVIN1 是属于 GH32 家族的 VIN 成员。VIN 的亚细胞定位决定其生理功能, 目前仅报道了拟南芥和水稻若干成员的亚细胞定位^[9, 30]。拟南芥 AtVI2 (即 AtvacINV2) 通过“内质网-高尔基体-液泡”途径定位于液泡, 首先由内质网衍生的囊泡携带并插入到液泡膜, 然后由液泡蛋白酶介导完成 N 末端加工, 最后释放成熟的 AtVI2 至液泡^[30]。AtVI2 的 N 端含有复杂的 NTPP 区域, 包含 Di-leucine、BR 和 TMD 结构域, 决定蛋白正确定位至液泡。序列比对表明, HpVIN1 蛋白含有上述 Di-leucine、BR 和 TMD 结构域, 推测其与拟南芥 AtVI2 和水稻 OsVIN2 类似^[9, 30], 具有液泡定位的特性。在拟南芥叶肉原生质体瞬时表达的 HpVIN1 蛋白大部分定位于液泡膜, 推测是拟南芥液泡蛋白酶对 HpVIN1 蛋白的 N 末端加工不彻底导致其聚集在液泡膜。尽管仅有少量荧光信号分布于液泡内, 仍证明 HpVIN1 蛋白定位于液泡内。

研究报道表明, NDPDG、RDP 和 WECVD 结构域在 VIN 家族高度保守, NDPDG 和 RDP 上的天冬氨酸残基 (aspartate, D)、WECVD 的谷氨酸残基 (glutamate, E) 和半胱氨酸残基 (cysteine, C) 是催化蔗糖分解的关键位点^[31-32]。序列比对表明 HpVIN1 含有上述结构域且关键氨基酸残基保持一致, 推测其可能具有蔗糖分解活性, 需进一步验证其酶活性。酿酒酵母内源转化酶缺陷株系 SEY2102 或 SEY6210 是普遍使用的表达宿主, 可通过酵母生长互补或提取总蛋白离体催化验证候选 VIN 的蔗糖分解活性。如, 辣椒 (*Capsicum annuum* L.) CaVINV1 和甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] Ib β fruct2 均能互补酵母 SEY2102 或 SEY6210 株系以蔗糖为唯一碳源的生长^[33-34]。进一步提取总蛋白检测发现, CaVINV1 催化蔗糖分解的最适宜 pH 为 4.5^[33]。HpVIN1 互补酵母 SEY2102 株系以蔗糖为唯一碳源生长, 经酵母细胞孵育后检测到葡萄糖等还原糖的生成。进一步利用酵母总蛋白离体孵育蔗糖和 HPLC 检测, 证明 HpVIN1 具有将蔗糖分解为葡萄糖和果糖的酶活性。HpVIN1 的蔗糖分解活性在 pH 4.0

时最高, 在 $\text{pH} \geq 7.0$ 时的酶活性极低, 与 VINs 的特性一致^[13, 33]。因此, *HpVIN1* 是典型的酸性转化酶, 具有分解蔗糖生成葡萄糖和果糖的酶活性。

植物 VIN 基因家族成员的规模较小, 成员间的表达模式存在较大差异。如辣椒和马铃薯 VIN 家族均含有 2 个成员, 辣椒 *CaVIN1* 和马铃薯 *StVIN1* 在根、茎、叶、芽、花和果实等组织均表达, *CaVIN1* 表达随果实发育和成熟显著增加; *CaVIN2* 和 *StVIN1* 仅在花芽、花和果实发育早期表达^[33, 35]。枳 (*Poncirus trifoliata*) VIN 家族也含有 2 个成员, *PtrVIN1* 在根、茎、叶、花和果实中均有较高的表达, *PtrVIN2* 表达微弱^[36]。砂梨 VIN 家族均有 8 个成员, *PbrvacInv1* 和 *PbrvacInv4* 在果实发育早期表达, *PbrvacInv6* 和 *PbrvacInv8* 在果实成熟前表达, 在果实中瞬时过表达 *PbrvacInv1* 改变可溶性糖构成和含量^[37]。因此, 植物 VIN 家族不同成员间的功能发生分化, 其差异表达模式表明它们在不同的组织或发育时期发挥作用。目前分离的火龙果 VIN 基因家族可能含有 3~4 个成员, 其不同成员也表现出差异表达模式。如受 *HpWRKY3* 转录激活的 VIN 基因 *HpINV2*, 其表达随果实可溶性糖积累逐渐上调^[22], 说明与 *HpVIN1* 为不同的基因。基于果实转录组测序获得的 *HpVAIL1*~3, 其中 *HpVAIL1* 随果实可溶性糖积累上调表达, *HpVAIL2* 和 *HpVAIL3* 均在可溶性糖未明显积累时表达, 在果实成熟时表达微弱^[23]。基于全基因组分离火龙果 VIN 基因家族, 其中 2 个成员在果实不表达, 仅 *HuAI07* 在花后 23 d 的果实表达, 果实成熟时未检测到^[24]。序列比对结果表明 *HuAI7*、*HpVAIL3* 和 *HpVIN1* 为同一基因, 均在果实转色期 (约花后 20~25 d) 大量表达。葡萄糖和果糖在红肉火龙果的果实转色期少量积累, 此后随果实发育和成熟快速积累, 蔗糖含量较低且未发生明显变化^[1]。*HpVIN1* 表达随果实葡萄糖和果糖的快速积累而逐渐降低, 而 *HpVAIL1* 和 (或) *HpINV2* 的表达呈现显著增加的趋势^[22-23]。因此推测, *HpVIN1* 和 *HpVAIL1* 分别在红肉火龙果果实的不同发育时期发挥作用。在果实转色期, *HpVIN1* 的大量表达促进蔗糖分解产生葡萄糖和果糖并输出液泡, 可能参与转色期的甜菜苷色素和黄酮类等代谢^[1]; 随着果实的成熟, *HpINV2* 的上调表达促进葡萄糖和果糖的快速积累^[22]。下一步需要分析 *HpVIN1* 在红肉火龙果果实不同部位的表达模式, 并通过过表达或干扰表达阐明其在果实发育

和成熟中的作用, 深入探讨 *HpVIN1* 的生理功能。

本研究分离红肉火龙果 VIN 基因 *HpVIN1*, 其蛋白定位于液泡, 具有分解蔗糖产生葡萄糖和果糖的酶活性。*HpVIN1* 主要在茎和花后 20~25 d 的果实中表达, 参与茎和果实转色期的可溶性糖代谢。

参考文献

- [1] HUA Q Z, CHEN C B, ZUR N T, WANG H C, WU J Y, CHEN J Y, ZHANG Z K, ZHAO J T, HU G B, QIN Y H. Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 126: 117-125.
- [2] RUAN Y L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65: 33-67.
- [3] ENDE W, LAMMENS W, LAERE A, SCHROEVEN L, ROY K L. Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes[J]. The FEBS Journal, 2009, 276: 5788-5798.
- [4] WAN H J, WU L M, YANG Y J, ZHOU G Z, RUAN Y L. Evolution of sucrose metabolism: the dichotomy of invertases and beyond[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(2): 163-177.
- [5] MORIN A, KADI F, PORCHERON B, VRIET C, MAUROUSSET L, LEMOINE R, POURTAU N, DOIDY J. Genome-wide identification of invertases in Fabaceae, focusing on transcriptional regulation of *Pisum sativum* invertases in seed subjected to drought[J]. Physiologia Plantarum, 2022, 174(2): e13673.
- [6] SERGEEVA L I, KEURENTJES J J, BENTSINK L, VONK J, PLAS L H, KOORNNEEF M, VREUGDENHIL D. Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006, 103(8): 2994-2999.
- [7] LESKOW C C, KAMENETZKY L, DOMINGUEZ P G, DIAZ ZIRPOLO J A, OBATA T, COSTA H, MARTI M, TABOGA O, KEURENTJES J, SULPICE R, ISHIHARA H, STITT M, FERNIE A R, CARRARI F. Allelic differences in a vacuolar invertase affect *Arabidopsis* growth at early plant development[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(14): 4091-4103.
- [8] MOREY S R, HIROSE T, HASHIDA Y, MIYAO A, HIROCHIKA H, OHSUGI R, YAMAGISHI J, AOKI N. Genetic evidence for the role of a rice vacuolar invertase as a molecular sink strength determinant[J]. Rice, 2018, 11(1): 6.

- [9] XU X Y, REN Y L, WANG C M, ZHANG H, WANG F, CHEN J, LIU X, ZHENG T H, CAI M H, ZENG Z Q, ZHOU L, ZHU S S, TANG W J, WANG J L, GUO X P, JIANG L, CHEN S H, WAN J M. OsVIN2 encodes a vacuolar acid invertase that affects grain size by altering sugar metabolism in rice[J]. *Plant Cell Reports*, 2019, 38(10): 1273-1290.
- [10] DENG X S, HAN X H, YU S C, LIU Z J, GUO D M, HE Y, LI W Y, TAO Y, SUN C W, XU P Z, LIAO Y X, CHEN X Q, ZHANG H Y, WU X J. OsINV3 and its homolog, OsINV2, control grain size in rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 2199.
- [11] WANG L, LI X R, LIAN H, NI D A, HE Y K, CHEN X Y, RUAN Y L. Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and *Arabidopsis* root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(2): 744-756.
- [12] WANG L, RUAN Y L. Critical roles of vacuolar invertase in floral organ development and male and female fertilities are revealed through characterization of GhVIN1-RNAi cotton plants[J]. *Plant Physiology*, 2016, 171(1): 405-423.
- [13] CHI Y H, WILSON K, LIU Z Q, WU X Y, SHANG L, ZHANG L M, JING H C, HAO H Q. Vacuolar invertase genes SbVIN1 and SbVIN2 are differently associated with stem and grain traits in sorghum (*Sorghum bicolor*)[J]. *Crop Journal*, 2020, 8(2): 299-312.
- [14] LIU X, ZHANG C, OU Y B, LIN Y, SONG B T, XIE C H, LIU J, LI X Q. Systematic analysis of potato acid invertase genes reveals that a cold-responsive member, StvacINV1, regulates cold-induced sweetening of tubers[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2011, 286(2): 109-118.
- [15] YASMEEN A, SHAKOOR S, AZAM S, BAKHSH A, SHAHID N, LATIF A, SHAHID A A, HUSNAIN T, RAO A Q. CRISPR/Cas-mediated knockdown of vacuolar invertase gene expression lowers the cold-induced sweetening in potatoes[J]. *Planta*, 2022, 256(6): 107.
- [16] QIAN W J, XIAO B, WANG L, HAO X Y, YUE C, CAO H L, WANG Y C, LI N N, YU Y B, ZENG J M, YANG Y J, WANG X C. CsINV5, a tea vacuolar invertase gene enhances cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18(1): 228.
- [17] ZHU C L, YANG K B, LI G Z, LI Y, GAO Z M. Identification and expression analyses of invertase genes in moso bamboo reveal their potential drought stress functions[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 696300.
- [18] YU X Y, WANG X F, ZHANG W Q, QIAN T T, TANG G M, GUO Y K, ZHENG C C. Antisense suppression of an acid invertase gene (MAI1) in muskmelon alters plant growth and fruit development[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(11): 2969-2977.
- [19] WANG Y P, CHEN J W, FENG J J, QIAO Q P, HUANG J Q. Overexpression of a loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) vacuolar invertase affects sucrose levels and growth[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2015, 123: 99-108.
- [20] HE X X, WEI Y Y, KOU J Y, XU F, CHEN Z H, SHAO X F. PpVIN2, an acid invertase gene family member, is sensitive to chilling temperature and affects sucrose metabolism in postharvest peach fruit[J]. *Plant Growth Regulation*, 2018, 86: 169-180.
- [21] MALEK J A, MATHEW S, MATHEW L S, YOUNUS-KUNJU S, MOHAMOUD Y A, SUHRE K. Deletion of beta-fructofuranosidase (invertase) genes is associated with sucrose content in date palm fruit[J]. *Plant Direct*, 2020, 4(5): e00214.
- [22] WEI W, CHENG M N, BA L J, ZENG R X, LUO D L, QIN Y H, LIU Z L, KUANG J F, LU W J, CHEN J Y, SU X G, SHAN W. Pitaya HpWRKY3 is associated with fruit sugar accumulation by transcriptionally modulating sucrose metabolic genes *HpINV2* and *HpSuSy1*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(8): 1890.
- [23] ZHANG Z K, XING Y M, RAMAKRISHNAN M, CHEN C B, XIE F F, HUA Q Z, CHEN J Y, ZHANG R, ZHAO J T, HU G B, QIN Y H. Transcriptomics-based identification and characterization of genes related to sugar metabolism in 'Hongshuijing' pitaya[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2022, 8(4): 450-460.
- [24] 杨器, 李广泽, 杨成坤, 陈其福, 秦永华. 火龙果酸性转化酶基因家族 HuAI 的鉴定及生物信息学分析[J]. *分子植物育种*, (2022-05-10)[2024-03-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220509.1551.012.html>.
YANG Q, LI G Z, YANG C K, CHEN Q F, QIN Y H. Identification and bioinformatics analysis of acid invertase gene family in pitaya[J]. *Molecular Plant Breeding*, (2022-05-10)[2024-03-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220509.1551.012.html>. (in Chinese)
- [25] 郑乾明, 王壮, 蔡永强, 马玉华. 红肉火龙果 (*Hylocereus polyrhizus*) 果实与茎转录组测序分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(1): 55-64.
ZHENG Q M, WANG Z, CAI Y Q, MA Y H. Transcriptome sequencing analysis of the fruit and stem from the red flesh pitaya (*Hylocereus polyrhizus*)[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(1): 55-64. (in Chinese)
- [26] UEMURA T, UEDA T, OHNIWA R L, NAKANO A, TAKEYASU K, SATO M H. Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells[J]. *Cell Structure and Function*, 2004, 29(2): 49-65.

- [27] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. Nature Protocols, 2007, 2(7): 1565-1572.
- [28] JIANG Y T, YANG L H, FERJANI A, LIN W H. Multiple functions of the vacuole in plant growth and fruit quality[J]. Molecular Horticulture, 2021, 1: 4.
- [29] 张绍铃, 贾璐婷, 王利斌, 张臻. 园艺作物果实液泡糖、酸转运与转化研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(4): 583-593.
- ZHANG S L, JIA L T, WANG L B, ZHANG Z. Recent advance on vacuolar sugar and acid transportation and conversion in horticultural fruit[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2019, 42(4): 583-593. (in Chinese)
- [30] XIANG L, ENDE W V. Trafficking of plant vacuolar invertases: from a membrane-anchored to a soluble status. Understanding sorting information in their complex N-terminal motifs[J]. Plant and Cell Physiology, 2013, 54(8): 1263-1277.
- [31] ROITSCH T, GONZALEZ M C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(12): 606-613.
- [32] CHEN T H, HUANG Y C, YANG C S, YANG C C, WANG A Y, SUNG H Y. Insights into the catalytic properties of bamboo vacuolar invertase through mutational analysis of active site residues[J]. Phytochemistry, 2009, 70(1): 25-31.
- [33] SHEN L B, QIN Y L, QI Z Q, NIU Y, LIU Z J, LIU W X, HE H, CAO Z M, YANG Y. Genome-wide analysis, expression profile, and characterization of the acid invertase gene family in pepper[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 20(1): 15.
- [34] ZHANG K, WU Z D, WU X L, HAN H H, JU X S, FAN Y H, YANG C B, TANG D B, CAO Q H, WANG J C, LYU C W. Regulatory and functional divergence among members of Ib β fruct2, a sweet potato vacuolar invertase gene controlling starch and glucose content[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1192417.
- [35] ABBAS A, SHAH A N, SHAH A A, NADEEM M A, ALSALEH A, JAVED T, ALOTAIBI S S, ABDELSALAM N R. Genome-wide analysis of invertase gene family, and expression profiling under abiotic stress conditions in potato[J]. Biology, 2022, 11(4): 539.
- [36] DAHRO B, WANG Y, ALHAG A, LI C L, GUO D L, LIU J H. Genome-wide identification and expression profiling of invertase gene family for abiotic stresses tolerance in *Poncirus trifoliata*[J]. BMC Plant Biology, 2021, 21(1): 559.
- [37] ZHANG S L, ZHANG Z, SUN X, LIU Z Q, MA M, FAN J B, LUO W Q, WANG L B, ZHANG S L. Identification and characterization of invertase family genes reveal their roles in vacuolar sucrose metabolism during *Pyrus bretschneideri* Rehd. fruit development[J]. Genomics, 2021, 113(3): 1087-1097.