

红肉火龙果果糖激酶基因 *HpFRK2* 的克隆、表达与酶活性分析

罗冬兰¹, 巴良杰¹, 王红林^{2,3}, 郑乾明^{2,3*}

1. 贵阳学院生物与环境工程学院, 贵州贵阳 550005; 2. 贵州省农业科学院贵州省果树科学研究所, 贵州贵阳 550006; 3. 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: 植物果糖激酶 (fructokinase, FRK) 特异性催化果糖磷酸化进入糖酵解途径, 是果糖代谢和可溶性糖积累的关键酶。阐明红肉火龙果果实 *HpFRK2* 基因的表达模式及酶特性, 为了解果实可溶性糖积累的分子机制并改良果实品质提供理论基础。本研究从红肉火龙果紫红龙品种中克隆 *HpFRK2* 基因, 采用实时荧光定量 PCR 分析该基因表达模式, 采用烟草叶肉细胞瞬时表达检测其亚细胞定位, 通过原核表达获得重组蛋白并检测其酶活性。结果表明: *HpFRK2* 基因的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 1026 bp, 编码 341 个氨基酸。*HpFRK2* 蛋白相对分子质量为 36.95 kDa, 理论等电点为 5.94。系统进化分析表明 *HpFRK2* 与木薯 MeFRK2、番茄 SlFRK1、苹果 MdFRK1 和拟南芥 AtFRK1 具有较近的亲缘关系。蛋白序列分析表明其含有磷酸果糖激酶 B (phosphofructokinase type B, pfkB) 家族保守结构域。*HpFRK2* 在果实发育 20 d 时的表达量最高, 随着果实发育逐渐降低表达, 30 d 时表达量最低; 此外, *HpFRK2* 在茎中的表达显著低于果实。亚细胞定位检测表明 *HpFRK2* 主要位于细胞质。构建原核表达载体在大肠杆菌表达, 成功诱导获得 *HpFRK2* 重组蛋白。酶活性检测表明 *HpFRK2* 特异性催化果糖磷酸化, 果糖对酶活性不具有底物抑制性, 催化果糖磷酸化的 *K_m* 值为 1.84 mmol/L。本研究结果表明, 红肉火龙果 *HpFRK2* 蛋白位于细胞质, 特异催化果糖磷酸化, 主要在果实转色期 (花后 20~23 d) 表达, 可能负调控果实的果糖积累。

关键词: 红肉火龙果; 果糖激酶; 基因克隆; 蛋白表达; 酶活

中图分类号: S667.9

文献标志码: A

Cloning, Expression and Enzymatic Activity Analysis of the Fructokinase Gene *HpFRK2* in Red Pitaya (*Hylocereus polyrhizus*)

LUO Donglan¹, BA Liangjie¹, WANG Honglin^{2,3}, ZHENG Qianming^{2,3*}

1. School of Biology and Environmental Engineering, Guiyang University, Guiyang, Guizhou 550005, China; 2. Guizhou Institute of Pomology Science, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006, China; 3. Key Laboratory of Crop Gene Genetic Resources and Germplasm Innovation in Karst Mountainous Area, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006, China

Abstract: Plant fructokinase (FRK) specifically catalyzes fructose phosphorylation into glycolysis pathway, which is a key enzyme for fructose metabolism and soluble sugar accumulation. This study elucidated the expression pattern and enzyme characteristics of red pitaya *HpFRK2* gene, which would provide a theoretical basis for understanding the molecular mechanism of fruit soluble sugar accumulation and improving fruit quality. *HpFRK2* was cloned from red pitaya 'Zihonglong', and its expression pattern was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. Subcellular localization was performed by transiently expressing in tobacco mesophyll cells, and the recombinant protein was obtained by prokaryotic expression and its enzyme activity was detected. The open reading frame (ORF) was 1026 bp, encoding 341 amino acids. The relative molecular weight of *HpFRK2* was 36.95 kDa, and the theoretical isoelectric point was 5.94. Phylogenetic analysis showed that *HpFRK2* was closely related to cassava MeFRK2, tomato SlFRK1, apple MdFRK1 and Arabidopsis AtFRK1. *HpFRK2* contained a conserved domain of the phosphofructokinase type B (pfkB) family. The

收稿日期 2024-12-31; 接受日期 2025-02-12

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32302624, No. 32160595, No. 32060674)。

作者简介 罗冬兰 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品贮藏与加工。*通信作者 (Corresponding author): 郑乾明 (ZHENG Qianming), E-mail: zqm851015@163.com。

expression level of *HpFRK2* was the highest at 20 days of fruit development, gradually decreased with fruit development, and the expression level was the lowest at 30 days. In addition, the expression of *HpFRK2* in stems was significantly lower than that in fruits. Subcellular localization results showed that *HpFRK2* was mainly located in the cytoplasm. A prokaryotic expression vector was constructed and expressed in *Escherichia coli*, and recombinant protein was successfully induced. The results of enzyme activity characteristics showed that *HpFRK2* specifically catalyzed fructose phosphorylation, fructose did not have the substrate inhibition on its enzyme activity, and the K_m value for fructose phosphorylation was 1.84 mmol/L. The results showed that *HpFRK2* was located in the cytoplasm, specifically catalyzed fructose phosphorylation, was mainly expressed during the veraison period (20–23 d after flowering) of red pitaya fruit, and may negatively regulate fructose accumulation in fruit.

Keywords: red pitaya; fructokinase; gene cloning; protein expression; enzyme activity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.07.002

红肉火龙果 (*Hylocereus polyrhizus*) 属于仙人掌科 (Cactaceae) 量天尺属 (*Hylocereus*) 植物, 其果肉清甜多汁, 深受消费者喜爱。红肉火龙果成熟果实积累的可溶性糖主要有葡萄糖和果糖, 其含量和组成是衡量果实内在品质的重要因素^[1-2]。解析红肉火龙果果实发育期间可溶性糖积累的分子机制, 能为改善果实品质提供理论依据。

果糖激酶 (fructokinase, FRK) 属于 pfkB 碳水化合物激酶家族, 是植物糖代谢途径上游环节的关键酶^[3]。果糖经 FRK 或己糖激酶催化生成果糖-6-磷酸进入糖酵解途径, 为植物生长发育提供底物、能量和信号^[4]。FRK 对果糖的亲和力远大于葡萄糖, 因此是催化果糖磷酸化的关键酶^[5]。FRK 也作为糖信号感受器, 控制果糖的利用和碳源再分配, 参与调控植株维管束发育^[6]。植物 FRK 常以多基因家族的形式存在, 在拟南芥^[7]、番茄^[8-9]、马铃薯^[10]、水稻^[11]和苹果^[12]等物种相继分离。拟南芥 *AtFRK1* 和 *AtFRK3* 双突变体表现严重的种子发育缺陷, 脂肪酸积累减少, 重量减小且形态异常, 说明 *AtFRK1* 和 *AtFRK3* 正向调节种子发育^[13]。水稻 *OsFRK3* 被敲除后种子粒重下降, 胚乳灌浆率和淀粉含量降低, 蔗糖和果糖含量升高, 表明 *OsFRK3* 可能通过糖代谢正向调节淀粉积累^[14]。番茄 *SIFRK1*、*SIFRK2* 和 *SIFRK3* 参与维管束发育, 干涉 *SIFRK1* 和 *SIFRK2* 表达严重抑制韧皮部发育和植株生长, 干涉 *SIFRK2* 和 *SIFRK3* 还导致叶片枯萎, 影响坐果和结实^[15-16]。过表达苹果 *MdFRK2* 降低幼龄植株的蔗糖和果糖含量, 上调叶片的山梨醇代谢, 促进茎的纤维素积累^[12, 17]; 成年植株中钙结合蛋白 MdCacyBP 与 MdFRK2 互作, 促进 MdFRK2 泛素化并被蛋白酶降解, 降低 FRK 酶活性导致果糖积累^[18]。因此, FRK 通过影响糖代谢, 参与植物的叶、茎、种子和果实等多种组织的生

长发育。

研究表明, 植物 FRK 家族成员表现出不同的表达模式。如苹果 *MdFRK1* 主要在果实表达, *MdFRK2* 主要在茎尖表达^[12]。木薯 *MeFRK5* 仅在花特异表达, *MeFRK1*、*MeFRK3* 和 *MeFRK4* 在叶、茎、块根、花和果实中表现出差异的表达模式; *MeFRK3* 和 *MeFRK4* 在块根的表达远高于其他 FRKs, 且在块根发育早期表达, 在成熟期较低^[19]。杨梅 *MrFRK2*、枸杞 *LbFRK7* 和梨 *PpyFRK5* 均在果实发育早期表达, 并随果实发育成熟逐渐降低^[20-22]。FRK 家族的亚细胞定位也存在差异, 如拟南芥 *AtFRK3* 和番茄 *SIFRK3* 蛋白定位于质体, 其余成员均定位于细胞质^[7, 23]。FRK 蛋白的催化活性也存在差异, 如 *MdFRK1*、*MdFRK2* 和 *AtFRK2-6* 酶活性均在果糖浓度较高时被明显抑制, *AtFRK1* 酶活性则不受果糖浓度抑制^[7, 12]。由此可见, 不同 FRKs 的表达模式、亚细胞定位和酶特性存在明显差异, 表明其发挥的生理功能也存在较大差异。

此前从红肉火龙果果实转录组测序数据中分离 *HpFRK1*, 证明其在果实发育期间负调控可溶性糖积累^[24]。同时在转录组测序数据也获得其他 FRK 相关转录本 (命名为 *HpFRK2*), 与 *HpFRK1* 序列存在较大的差异。本研究克隆 *HpFRK2* 的基因全长, 分析其表达模式、亚细胞定位和酶催化活性, 比较其与 *HpFRK1* 的差异, 进一步探讨 FRKs 在红肉火龙果果实可溶性糖积累过程中的生理功能。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料采集地为贵州省罗甸县火龙果种植园, 选取长势一致、无病虫害的红肉火龙果品种紫红龙的成年结果植株, 采集成熟的茎组织。参考此前对红肉火龙果果实发育阶段的描述^[25], 于

花后 20、23、25、27、30 d 共计 5 个时期采集果实。每份样品均设置 3 个生物学重复，每个重复均含有 5 个果实。将茎和去皮后的果肉切成薄片，液氮速冻并研磨成粉末，于 -80°C 储存备用。

1.2 方法

1.2.1 *HpFRK2* 基因克隆 采用总 RNA 快速抽提试剂盒（北京艾德莱生物科技有限公司）提取红肉火龙果紫红龙植株茎和花后 5 个时期的果实总 RNA，使用微量分光光度计（德国 Implen 公司）检测其浓度和纯度，琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。使用反转录 PCR 试剂盒（TaKaRa 公司）将合格的总 RNA 样品反转录成 cDNA。基于红肉火龙果紫红龙转录组测序数据获得的 *FRK* 序列^[25]，使用 Primer Premier 5.0 软件设计全长引物 *HpFRK2*-F/R（表 1）。PCR 反应体系为：cDNA 2 μL ，*HpFRK2*-F/R 引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）各 1 μL ，高保真 DNA 聚合酶（南京诺维赞生物科技股份有限公司）12.5 μL ，ddH₂O 补齐至 25 μL 。PCR 反应条件：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物使用 DNA 纯化试剂盒（天根生化科技有限公司）纯化回收，回收产物按 pMDTM19-T 克隆载体（TaKaRa 公司）说明书进行 T 载体连接，转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，经菌液 PCR 鉴定阳性克隆，送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

1.2.2 生物信息学分析 使用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 在线软件预测蛋白质结构、氨基酸组成、蛋白质相对分子质量和理论等电点，利用 PSORT Prediction (<http://psort1.hgc.jp/form.html>) 在线软件预测蛋白质亚细胞定位情况，利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM2.0/>) 在线软件预测蛋白跨膜区结构。使用 Clustal W 软件进行氨基酸序列比对，利用 MEGA 7.0 软件基于邻接法构建系统进化树，Bootstrap 重复次数为 1000 次。

1.2.3 基因表达分析 基于 *HpFRK2* 序列设计荧光定量 PCR 引物 *HpFRK2*-qRT-F/R（表 1），并在火龙果基因组数据库 (<http://www.pitayagenomic.com/index.php>) 比对确保特异性扩增。以 β -ACT-F/R 作为内参基因（表 1），使用荧光定量 PCR 仪（美国 BIO-RAD 公司）进行检测。反应体系为：cDNA 1 μL ，*HpFRK2*-qRT-F/R 引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）各 1 μL ，2 $\times$ SYBR Green Fast qPCR

Mix（北京百迈客生物科技有限公司）10 μL ，ddH₂O 补齐至 20 μL 。PCR 反应条件为：95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，40 个循环。每个样品设置 3 次技术重复，采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算该基因的相对表达量。

1.2.4 亚细胞定位 使用引物 *HpFRK2*-GFP-F/R（表 1）扩增不含终止密码子的 *HpFRK2* 基因，利用单片段无缝克隆试剂盒（南京诺维赞生物科技股份有限公司）连接至 1300-GFP 载体。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，挑选转化子培养并进行 PCR 鉴定和测序。测序结果经比对并确认正确后，使用质粒抽提试剂盒（上海迈跟生物科技有限公司）提取重组质粒。将重组质粒 *HpFRK2*-GFP 和载体对照 1300-GFP 分别转化农杆菌 GV3101 感受态细胞（上海唯地生物技术有限公司），采用注射法转化烟草叶片，培养 72 h，取样，通过激光共聚焦荧光显微镜（德国 ZEISS 公司）检测其荧光信号并拍照。

表 1 本研究引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Usage
<i>HpFRK2</i> -F	CTCCATATTCAAAGTTTCTC	ORF 克隆
<i>HpFRK2</i> -R	AGACTTTGTACTATTACAC	
<i>HpFRK2</i> -qRT-F	TTGATAGACGAACCCGTGTAG	基因表达
<i>HpFRK2</i> -qRT-R	CATTATGCCATCTCGAGCAG	
β -ACT-F	CTTCCATACCAATGAATGAGG	内参基因
β -ACT-R	AACCGCCAAGAGTAGTTCTG	
<i>HpFRK2</i> -GFP-F	GAACACGGGGGACGAGCTCGG TACCATGGCTCAGCCTCACAAT	亚细胞定位
<i>HpFRK2</i> -GFP-R	CCTTGCTCACCATGTCTGACTCT AGAGCCAGAGGCCTTCTGC	

1.2.5 原核表达 参考大肠杆菌密码子偏爱性，人工合成 *HpFRK2* 的 ORF 并插入原核表达载体 pGEX-4T-1 载体。将重组质粒转入 BL21 (DE3) 感受态细胞中，选取单克隆于 LB 培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌体 OD₆₀₀=0.6~0.8，加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h。诱导产生的融合 His 标签重组蛋白使用 SDS-PAGE 电泳检测可溶性，然后使用镍柱纯化重组蛋白。

1.2.6 重组蛋白酶活性检测 参考 RENZ 等^[26] 的方法分析 *HpFRK2* 重组蛋白的酶活特性，反应体系总体积为 1 mL，包含 25 μL 重组蛋白、50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液、4 mmol/L MgCl₂、2.5 mmol/L ATP、0.33 mmol/L NAD⁺、1 U 葡萄糖-

6 磷酸脱氢酶和 1 U 磷酸葡萄糖异构酶。加入 200 μ L 不同浓度 (0~80 mmol/L) 的果糖, 30 $^{\circ}$ C 条件下反应 5 min。使用酶标仪 (美国赛默飞世尔科技公司) 检测 340 nm 处的吸光度值 A_{340} 。酶活性定义为: 1 U 即 1 min 内 1.0 mg 重组蛋白的 A_{340} 值增加 0.01。

2 结果与分析

2.1 *HpFRK2* 基因克隆及生物信息学分析

PCR 扩增和测序结果表明, *HpFRK2* 的 ORF 为 1026 bp, 编码 341 个氨基酸。预测 *HpFRK2* 蛋白的相对分子质量为 36.95 kDa, 理论等电点为 5.94。蛋白跨膜结构预测表明 *HpFRK2* 蛋白不含

有跨膜区, 亚细胞预测表明 *HpFRK2* 蛋白定位于细胞质。

HpFRK2 的氨基酸序列与此前报道的 *HpFRK1* 具有 74.30% 的一致率。氨基酸序列比对和结构域分析 (图 1) 表明: *HpFRK2* 与拟南芥 *AtFRK1*、*AtFRK2*、番茄 *SIFRK1* 和 *SIFRK2* 类似, 均具有底物糖结合位点、ATP 结合位点和 pfkB 家族特异性区域。系统进化显示 *HpFRK2* 与木薯 *MeFRK2*、番茄 *SIFRK1*、苹果 *MdFRK1* 和拟南芥 *AtFRK1* 聚为一类, 而 *HpFRK1* 与甜菜 *BvFRK*、拟南芥 *AtFRK2*、*AtFRK4-7*、木薯 *MeFRK3*、4 和番茄 *SIFRK2* 聚为另一类 (图 2), 说明 *HpFRK2* 与 *HpFRK1* 属于不同的类别。

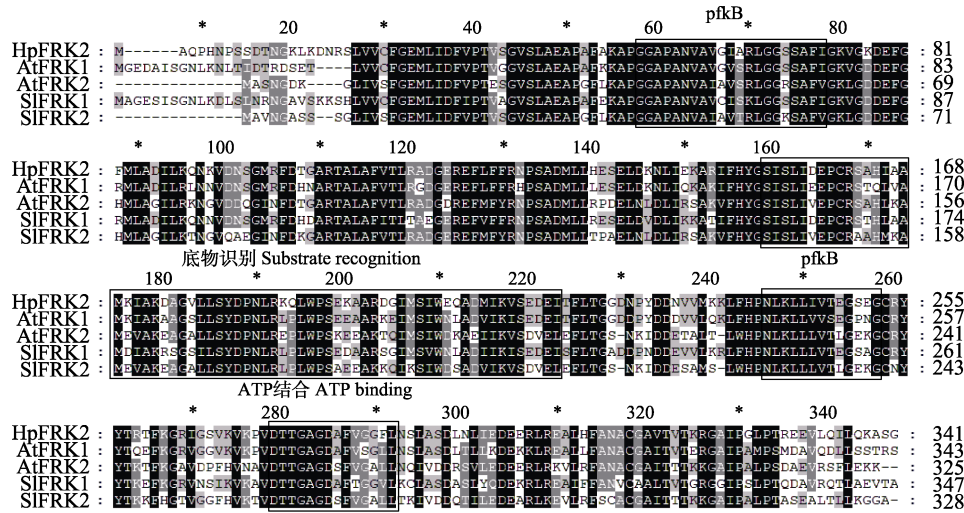


图 1 *HpFRK2* 与其他 FRKs 的氨基酸序列比对和结构域分析

Fig. 1 Amino acid sequence alignment and motif analysis of *HpFRK2* and other FRKs

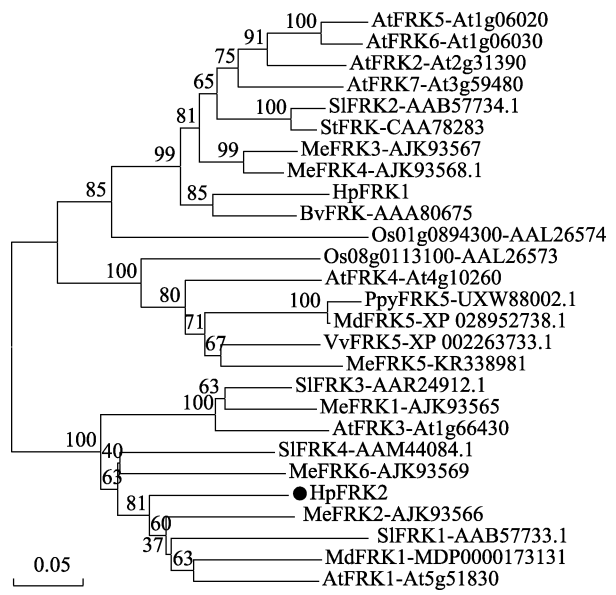


图 2 *HpFRK2* 与其他 FRKs 的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *HpFRK2* and other FRKs

2.2 *HpFRK2* 蛋白的亚细胞定位

在烟草叶肉细胞的亚细胞定位结果表明: 对照 1300-GFP 的荧光信号广泛分布于细胞核、细胞质和细胞膜; *HpFRK2*-GFP 融合蛋白荧光信号主要分布在细胞质和细胞膜, 且未见分布于细胞核和叶绿体 (图 3)。因此, *HpFRK2* 主要定位于细胞质和细胞膜。

2.3 *HpFRK2* 在不同组织中的表达分析

荧光定量 PCR 检测表明: *HpFRK2* 在茎的表达量显著低于 5 个时期的果实; *HpFRK2* 在花后 20 d 的表达量最高, 23 d 时表达量下降; 此后随着果实的发育和成熟显著下降, 30 d 时表达量最低 (图 4)。

2.4 *HpFRK2* 原核表达

SDS-PAGE 电泳结果表明, 经 IPTG 诱导后在接近 66.2 kDa 位置出现明显的单一条带, 未诱导

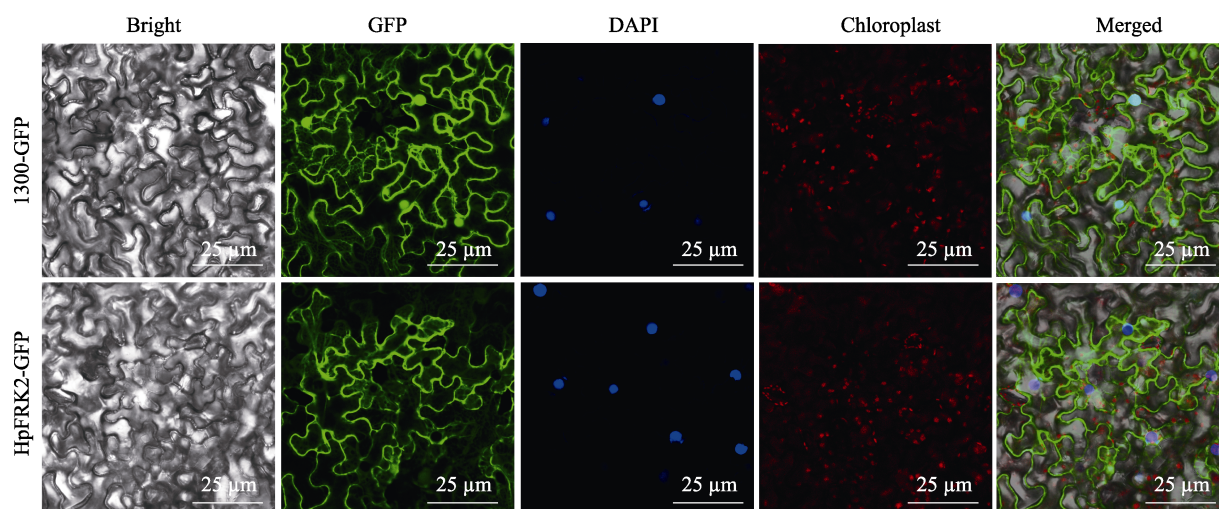
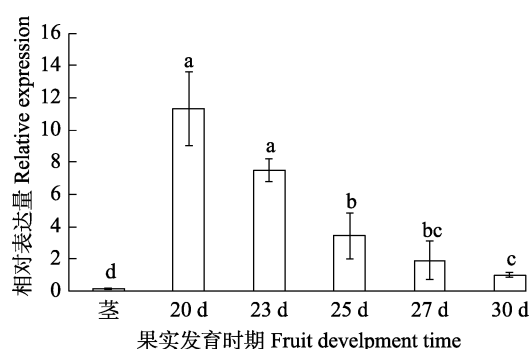


图 3 HpFRK2 蛋白的亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of HpFRK2

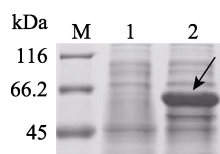


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 4 HpFRK2 在红肉火龙果茎和果实不同发育时期的表达模式

Fig. 4 Expression patterns of HpFRK2 in stem and different period fruit of red pitaya

样品则无明显条带 (图 5)。由于标签蛋白约为 27 kDa, 重组蛋白的实际分子量略小于 39.2 kDa, 与预测基本一致。因此, 原核表达实验成功诱导获得 HpFRK2 重组蛋白。



M: 蛋白分子质量标准; 1: 未诱导样品; 2: 诱导后样品。
M: Protein marker; 1: Uninduced sample; 2: Induced sample.

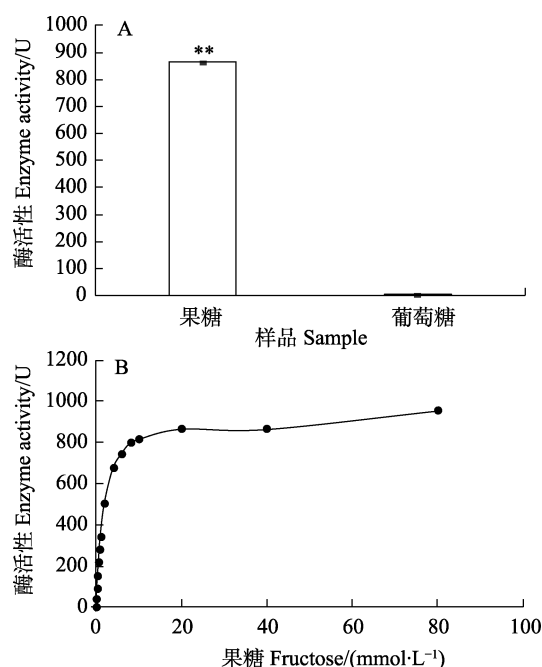
图 5 HpFRK2 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 5 SDS-PAGE detection of HpFRK2 recombinant protein

2.5 HpFRK2 重组蛋白的酶学性质

不同底物下的酶活性检测表明, HpFRK2 重组蛋白对果糖具有明显的催化活性, 对葡萄糖无

催化活性 (图 6A)。以不同浓度果糖为底物的酶活性检测表明, 底物浓度为 0.1~10 mmol/L 时, HpFRK2 重组蛋白的酶活性随浓度增加呈现快速增加的趋势; 此后酶活性随底物浓度的增加仅缓慢增加, 当底物浓度大于 20 mmol/L 后的酶活性随底物浓度增加仅呈现略增加的趋势 (图 6B)。因此, 果糖对 HpFRK2 酶活性不具有底物抑制性, HpFRK2 催化果糖磷酸化的 K_m 值为 1.84 mmol/L。



A 图中所用底物浓度为 100 mmol/L, **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

The substrate concentrations used in A were 100 mmol/L, ** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 6 HpFRK2 重组蛋白的酶活性分析

Fig. 6 Enzyme activity assay of HpFRK2 recombinant protein

3 讨论

本研究基于果实转录组测序数据和 RT-PCR 扩增, 获得红肉火龙果 *HpFRK2* 基因。氨基酸序列比对和结构域分析表明, *HpFRK2* 与其他 FRK 类似, 具有 pfkB 碳水化合物激酶家族的保守特征结构域^[3]。*HpFRK2* 与 *HpFRK1* 的氨基酸序列一致率较低, 系统进化分析也表明 *HpFRK2* 与 *HpFRK1* 分属于不同的类别。因此推测 *HpFRK2* 也属于 FRK 家族, 但与 *HpFRK1* 的生理功能存在差异。

亚细胞定位预测 *HpFRK2* 蛋白定位于细胞质, 跨膜结构预测该蛋白不含有跨膜区, 不属于膜蛋白。利用烟草叶片开展亚细胞定位检测, 结果表明 *HpFRK2* 主要定位于细胞质和细胞膜。综合预测和亚细胞定位实验结果证明 *HpFRK2* 与 *HpFRK1* 类似^[24], 均定位于细胞质。已有研究表明, 植物 FRKs 主要定位于细胞质和质体^[27]。大部分成员如拟南芥 *AtFRK1*、*AtFRK2* 和 *AtFRK4-7*^[7], 苹果 *MdFRK1* 和 *MdFRK2*^[12]、枇杷 *EjFRK*^[28] 均定位于细胞质, 仅 *AtFRK3*^[7] 和番茄 *SIFRK3*^[23] 定位于质体。*HpFRK2* 与 *AtFRK1*、*MdFRK1* 具有较近的亲缘关系, 也显示出相同的亚细胞定位模式。因此推测 *HpFRK2* 与 *HpFRK1* 均在细胞质发挥果糖磷酸化的功能。

植物 FRK 家族不同成员的酶催化活性存在底物抑制性的差异, 如拟南芥 *AtFRK1*、*AtFRK7* 和番茄 *SIFRK1* 酶活性不受高浓度果糖抑制, *AtFRK2*、*SIFRK2*、*AtFRK3* 和 *AtFRK4-6* 却受到明显的抑制^[7, 29]; 玉米 *ZmFRK1* 和 *ZmFRK2* 酶活性均受高浓度果糖抑制, *ZmFRK1* 对果糖较不敏感, *ZmFRK2* 对果糖更敏感^[30]; 苹果 *MdFRK1* 和 *MdFRK2* 酶活性均具有底物抑制性, 且 *MdFRK2* 对果糖敏感^[12]。随着果糖浓度的增加, *HpFRK2* 酶活性未受到明显的抑制, 与 *AtFRK1*、*AtFRK7*、*SIFRK1* 和 *HpFRK1* 的酶活性一致。FRK 家族不同成员对果糖的亲合力也存在差异, 如 *AtFRK7* (0.012 mmol/L)^[7]、*SIFRK2* (0.054 mmol/L)^[29] 和 *MdFRK2* (0.1 mmol/L)^[12] 亲合力高; *AtFRK1* (0.47 mmol/L)^[7]、*AtFRK3* (0.48 mmol/L)^[7]、*MdFRK1* (0.62 mmol/L)^[12] 和 *SIFRK1* (1.3 mmol/L)^[29] 亲合力次之; *HpFRK1* (11.01 mmol/L)^[24] 亲合力较低。*HpFRK2* 催化果糖的 K_m 值为 1.84 mmol/L, 其亲合力与 *SIFRK1* 相似, 远大于 *HpFRK1*。因此推测 *HpFRK1* 主要

在相对较高浓度条件下参与果糖代谢, *HpFRK2* 则主要在低浓度条件下参与果糖代谢。

园艺作物如杨梅、枇杷、梨、枸杞的 FRKs 主要在果实发育早期表达, 伴随着旺盛的代谢和较低的果糖积累; FRKs 表达随果实成熟逐渐降低, 伴随着各类代谢活动减缓, 有利于果糖等可溶性糖积累^[20-22, 28]。基因表达分析表明 *HpFRK2* 主要在红肉火龙果果实发育 20~23 d 表达, 该时期为果肉的转色期^[25]。转色期的果肉合成大量的甜菜色素, 果糖积累较少, 推测 *HpFRK2* 介导的糖代谢为甜菜色素合成提供前体和能量。随着果实发育和成熟, 果糖含量快速增加并在 30 d (成熟) 时达到最高, 而 *HpFRK2* 表达持续降低并在 30 d (成熟) 时达到最低。由此可见, *HpFRK2* 与 *HpFRK1*^[24] 类似, 对红肉火龙果果实的果糖积累也具有负调控作用。考虑到亲和力的明显差异, 推测 *HpFRK2* 与 *HpFRK1* 分别负责红肉火龙果果实转色期低浓度和高浓度下的果糖代谢。

4 结论

本研究分离克隆红肉火龙果 *HpFRK2* 基因, 其蛋白定位于细胞质。*HpFRK2* 蛋白特异性催化果糖磷酸化, 果糖对酶活性不具有抑制性。*HpFRK2* 蛋白催化果糖磷酸化的 K_m 值为 1.84 mmol/L, 对果糖具有较高的亲合力。*HpFRK2* 主要在花后 20~23 d 果实表达, 并随果实成熟逐渐降低表达, 可能参与负调控果实的果糖积累。

参考文献

- [1] MOU Z L, ZENG R X, CHEN N H, LIU Z L, ZENG Z X, QIN Y H, SHAN W, KUANG J F, LU W J, CHEN J Y, ZHAO Y T. The association of *HpDof1.7* and *HpDof5.4* with soluble sugar accumulation in pitaya fruit by transcriptionally activating sugar metabolic genes[J]. Food Quality and Safety, 2022, 6: 1-10.
- [2] 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.
- [3] ROLLAND F, BAENA-GONZALEZ E, SHEEN J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms[J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57(1): 675-709.

- [4] GRANOT D. Role of tomato hexose kinases[J]. Functional Plant Biology, 2007, 34(6): 564-570.
- [5] GRANOT D, DAVID-SCHWARTZ R, KELLY G. Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development[J]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 44.
- [6] PEGO J V, SMEEKENS S. Plant fructokinases: a sweet family get-together[J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(12): 531-536.
- [7] RIGGS J W, CAVALES P C, CHAPIRO S M, CALLIS J. Identification and biochemical characterization of the fructokinase gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 83.
- [8] MARTINEZ-BARAJAS E, LUETHY M H, RANDALL D D. Molecular cloning and analysis of fructokinase expression in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.)[J]. Plant Science, 1997, 125(1): 13-20.
- [9] GERMAN M A, ASHER I, PETREIKOV M, DAI N, SCHAFFER A A, GRANOT D. Cloning, expression and characterization of *LeFRK3*, the fourth tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gene encoding fructokinase[J]. Plant Science, 2004, 166(2): 285-291.
- [10] TAYLOR M A, ROSS H A, GARDNER A, DAVIES H V. Characterisation of a cDNA encoding fructokinase from potato (*Solanum tuberosum*)[J]. Journal of Plant Physiology, 1995, 145(3): 253-256.
- [11] JIANG H W, DIAN W M, LIU F Y, WU P. Isolation and characterization of two fructokinase cDNA clones from rice[J]. Phytochemistry, 2003, 62(1): 47-52.
- [12] YANG J J, ZHU L C, CUI W F, ZHANG C, LI D X, MA B Q, CHENG L L, RUAN Y L, MA F W, LI M J. Increased activity of MdFRK2, a high-affinity fructokinase, leads to upregulation of sorbitol metabolism and downregulation of sucrose metabolism in apple leaves[J]. Horticulture Research, 2018, 5: 71.
- [13] STEIN O, AVIN-WITTENBERG T, KRAHNERT I, ZEMACH H, BOGOL V, DARON O, ALONI R, FERNIE AR, GRANOT D. Arabidopsis fructokinases are important for seed oil accumulation and vascular development[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 7: 2047.
- [14] ZHANG Z, TAN J, CHEN Y, SUN Z, YAN X, OUYANG J, LI S, WANG X. New fructokinase, OsFRK3, regulates starch accumulation and grain filling in rice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(2): 1056-1066.
- [15] STEIN O, DAMARI-WEISSLER H, SECCHI F, RACHMILEVITCH S, GERMAN M A, YESELSON Y, AMIR R, SCHAFFER A, HOLBROOK N M, ALONI R, ZWIENIECKI M A, GRANOT D. The tomato plastidic fructokinase *SIFRK3* plays a role in xylem development[J]. New Phytologist, 2016, 209(4): 1484-1495.
- [16] STEIN O, SECCHI F, GERMAN M A, DAMARI-WEISSLER H, ALONI R, HOLBROOK N M, ZWIENIECKY M A, GRANOT D. The tomato cytosolic fructokinase FRK1 is important for phloem fiber development[J]. Biologia Plantarum, 2018, 62(2): 353-361.
- [17] SU J, ZHANG C X, ZHU L C, YANG N X, YANG J J, MA B Q, MA F W, LI M J. MdFRK2-mediated sugar metabolism accelerates cellulose accumulation in apple and poplar[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 137.
- [18] SU J, JIAO T T, LIU X, ZHU L C, MA B Q, MA F W, LI M J. Calyculin-binding protein-promoted degradation of MdFRUCTOKINASE2 regulates sugar homeostasis in apple[J]. Plant Physiology, 2023, 191(2): 1052-1065.
- [19] YAO Y, GENG M T, WU X H, SUN C, WANG Y L, CHEN X, SHANG L, LU X H, LI Z, LI R M, FU S P, DUAN R J, LIU J, HU X W, GUO J C. Identification, expression, and functional analysis of the fructokinase gene family in Cassava[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(11): 2398.
- [20] 陈馨, 施丽愉, 邵佳蓉, 陈伟, 郑永华, 杨震峰. 杨梅果糖激酶基因 *MrFRK2* 的克隆及在成熟期果实中的表达分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(8): 1585-1592.
- CHEN X, SHI L Y, SHAO J R, CHEN W, ZHENG Y H, YANG Z F. Molecular cloning and expression analysis of *MrFRK2* in Chinese bayberry during fruit ripening[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(8): 1585-1592. (in Chinese)
- [21] 赵建华, 尹跃, 李浩霞, 王亚军, 李彦龙, 安巍. 枸杞果糖激酶基因 *LbFRK7* 的克隆及表达分析[J]. 西北植物学报, 2018, 38(5): 816-822.
- ZHAO J H, YIN Y, LI H X, WANG Y J, LI Y L, AN W. Cloning and expression analysis of fructokinase gene (*LbFRK7*) from wolfberry (*Lycium barbarum* Lin.)[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38(5): 816-822. (in Chinese)
- [22] 陶鑫, 朱荣香, 贡鑫, 吴磊, 张绍铃, 赵建荣, 张虎平. 梨果糖激酶基因 *PpyFRK5* 在果实蔗糖积累中的作用[J]. 园艺学报, 2022, 49(7): 1429-1440.
- TAO X, ZHU R X, GONG X, WU L, ZHANG S L, ZHAO J R, ZHANG H P. Fructokinase gene *PpyFRK5* plays an important role in sucrose accumulation of pear fruit[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(7): 1429-1440. (in Chinese)
- [23] DAMARI-WEISSLER H, KANDEL-KFIR M, GIDONI D, METT A, BELAUOV E, GRANOT D. Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants[J]. Planta, 2006, 224: 1495-1502.
- [24] 解璞, 晏霜, 王红林, 郑乾明. 红肉火龙果果糖激酶基因

- HpFRK1* 克隆、表达与酶学活性分析[J]. 西北植物学报, 2024, 44(10): 1589-1596.
- XIE P, YAN S, WANG H L, ZHENG Q M. Cloning, expression and enzymatic activity analysis of the fructokinase gene *HpFRK1* in red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*)[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2024, 44(10): 1589-1596. (in Chinese)
- [25] ZHENG Q M, WANG X K, QI Y, MA Y H. Selection and validation of reference genes for qRT-PCR analysis during fruit ripening of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*)[J]. FEBS Open Bio, 2021, 11(11): 3142-3152.
- [26] RENZ A, STITT M. Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers[J]. Planta, 1993, 190(2): 166-175.
- [27] 叶香媛, 周文彬. 植物果糖激酶研究进展[J]. 科学通报, 2021, 66(22): 2820-2831.
- YE X Y, ZHOU W B. Research advances in plant fructokinases[J]. Chinese Science Bulletin, 2021, 66(22): 2820-2831. (in Chinese)
- [28] QIN Q P, CUI Y Y, ZHANG L L, LIN F F, LAI Q X. Isolation and induced expression of a fructokinase gene from loquat[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2014, 61(3): 289-297.
- [29] KANAYAMA Y, GRANOT D, DAI N, PETREIKOV M, SCHAFFER A, POWELL A, BENNETT A B. Tomato fructokinases exhibit differential expression and substrate regulation[J]. Plant Physiology, 1998, 117(1): 85-90.
- [30] ZHANG S R, NICHOLS S E, DONG J G. Cloning and characterization of two fructokinases from maize[J]. Plant Science, 2003, 165(5): 1051-1058.