

凯氏拟小球藻己糖激酶基因的克隆及其在不同培养条件下的表达分析

陈 军^{1,2}, 崔红利³, 赵佳琳^{1,2}, 秦 松¹

(1. 中国科学院 烟台海岸带研究所 海岸带生物学与生物资源利用重点实验室, 山东 烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 101418; 3. 大连大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116622)

摘要: 为研究凯氏拟小球藻(*Parachlorella kessleri*)糖代谢分子机制, 本研究采用 RT-PCR 和 RACE 技术从凯氏拟小球藻中克隆了己糖激酶基因 *CkeHK* (GenBank ID: AHF54566), 并对其自养、异养、混养条件下的转录表达进行分析。结果表明, 该序列的 cDNA 全长为 1 844 bp, 开放阅读框 1 389 bp, 编码 462 个氨基酸。该蛋白的相对分子质量为 49.73, 等电点为 6.98。实时荧光定量 PCR 结果显示, 以自养培养条件为对照, 异养培养和混养培养条件下, *CkeHK* 均能够发生明显上调, 且混养条件下上调量比异养条件下上调量更多, 说明 *CkeHK* 可能在凯氏拟小球藻利用外源糖的过程发挥重要作用, 并且光信号对于凯氏拟小球藻利用外源糖可能存在调控作用。这些研究结果为进一步阐明 *CkeHK* 的功能及其作用机制奠定了分子基础。

关键词: 凯氏拟小球藻(*Parachlorella kessleri*); 己糖激酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2017)07-0001-08
DOI: 10.11759/hyhx20170225001

凯氏拟小球藻(*Parachlorella kessleri*)属于绿藻门, 颤藻目, 小球藻科。Huss 等^[1]基于形态学特征、DNA 碱基组成以及利用分子标记 18S rRNA 和 SSU rRNA 进行系统发育分析等多种手段, 认为 *Chlorella kessleri* Fott et Nova'kova 应属于小球藻属。Krienitz 等(2004)通过克隆 18S 和 ITS2 序列, 分别用 18S rRNA、ITS2 以及 18S rRNA 和 ITS2 联合分子标记, 构建系统发育树, 结合形态学特征认为其应属于一个新属——拟小球藻属(*Parachlorella*), 也是目前较为公认的划分方法^[2-3]。凯氏拟小球藻能够利用光合作用进行自养, 也可利用外源葡萄糖进行异养, 以及在光和外源葡萄糖的作用下进行混养。它生长速率快, 含有丰富的脂肪酸, 目前广泛应用在废水处理^[4-5], 生物能源^[6], 生物固碳^[7]等领域。

Wang 等^[8]模拟有机废水培养凯氏拟小球藻生产微藻油脂, 发现以自养培养为对照, 混养条件下小球藻能够积累更多的脂肪酸以及更多以 C16 和 C18 为主的中性脂。Wang 等^[9]通过分别或同时添加外源葡萄糖和硝酸盐, 发现凯氏拟小球藻能够明显提高脂肪酸含量。Li 等^[4]发现不同光强可影响凯氏拟小球藻去除废水中有机质的效果, 且相对于自养条件下, 加入光照后混养条件下均能高效去除有机质。基

于以上报道, 可见添加外源葡萄糖会促进凯氏拟小球藻生长及脂肪酸合成, 且添加光照和不添加光照情况下, 凯氏拟小球藻生长及脂肪酸代谢也不相同, 说明凯氏拟小球藻利用外源葡萄糖的代谢机制并不相同。而且凯氏拟小球藻代谢外源葡萄糖的分子机制尚不清晰。

己糖激酶是一类能够催化己糖发生磷酸化作用的酶类, 既能够调控植物体内贮存糖和游离糖的速率, 也能够调控糖酵解和氧化戊糖磷酸途径的代谢速率, 对于植物碳流分配具有重要作用。同时, 己糖激酶也可以作为细胞葡萄糖感受器感知糖信号, 从而触发糖信号传递, 即具有催化功能和调节功能^[10-11]。在生物体内, 己糖经己糖激酶磷酸化后可进入糖酵解

收稿日期: 2016-12-22; 修回日期: 2017-03-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFF0202304); 国家自然科学基金面上项目(41376139); 烟台市科技计划项目(2016JHZB007)

[Foundation: National Key Research and Development Program-China, No.2016YFF0202304; National Natural Science Foundation of China, No.41376139; Science and Technology Program of Yantai City, No.2016JHZB007]

作者简介: 陈军(1989-), 男, 安徽阜阳人, 博士生, 主要从事微藻功能基因组学研究, E-mail: junchen@yic.ac.cn; 秦松(1968-), 通信作者, 男, 山东莱州人, 研究员, 博士生导师, 主要从事分子藻类学研究, E-mail: sqin@yic.ac.cn

途径,进而为植物的生理活动提供能量和中间代谢产物^[12]。目前,己糖激酶已在拟南芥、水稻等生物中被克隆鉴定^[13-14],但仍未在藻类中被同源克隆、鉴定。作者通过利用已经被功能鉴定的己糖激酶序列作为源序列,利用同源比对的方法在莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、团藻(*Volvox carteri*)、胶球藻 C-169(*Coccomyxa subellipsoidea* C-169)、可变小球藻(*Chlorella variabilis* NC64A)、蓝隐藻(*Guillardia theta*)、海洋球石藻(*Emiliania huxleyi*)、裂殖壶藻(*Aurantiochytrium limacinum*)等微藻基因组序列进行搜索,发现编码己糖激酶的基因序列广泛存在。

本研究利用聚合酶链式扩增(PCR)和cDNA末端快速扩增技术(RACE, rapid-amplification of cDNA ends)克隆获得凯氏拟小球藻己糖激酶的基因编码序列,并运用实时荧光定量表达技术对不同培养(自养、异养、混养)条件下凯氏拟小球藻转录水平的表达情况进行了分析,以期探讨凯氏拟小球藻利用外源葡萄糖代谢分子机制提供参考,为通过代谢工程手段构建优良藻株奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料及培养条件

本研究所用凯氏拟小球藻(*P. kessleri*)保存于中国科学院烟台海岸带研究所海岸带生物学与生物资源利用重点实验室。凯氏拟小球藻接种于 f/2 培养基,于 25℃ 光照条件下静置培养,光照强度为 2 000 lx,光/暗周期为 12 h/12 h。异养培养葡萄糖质量浓度为 10.0 g/L, 24 h 黑暗培养;混养培养葡萄糖质量浓度为 10.0 g/L,于 25℃ 光照条件下静置培养,光照强度为 2000 lx,持续给光。

1.2 凯氏拟小球藻己糖激酶基因的克隆

取处于对数生长期的凯氏拟小球藻细胞,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,使用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测,并利用超微量分光光度计测定 RNA 浓度和纯度(A_{260}/A_{280})。随后,参照 TaKaRa 公司的 PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒说明书合成 cDNA,用作克隆己糖激酶 cDNA 的模板。从 GenBank 中下载莱茵衣藻(*C. reinhardtii*)、团藻(*V. carteri*)、胶球藻 C-169(*C. subellipsoidea* C-169)、可变小球藻(*C. variabilis* NC64A)编码己糖激酶基因的 cDNA 序列进行比对分

析,设计简并引物,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

以 cDNA 为模板,用合成的简并引物进行 RT-PCR 扩增 *CkeHK* 基因的 cDNA 片段。反应程序为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 45 s,55℃ 30 s,72℃ 130 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 终止。反应结束后,PCR 反应产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测。对目的片段进行胶回收后连接于 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取阳性菌落,菌液 PCR 鉴定正确后由上海生工生物工程有限公司测序。

根据简并引物扩增得到的已知序列,分别设计 *CkeHK* 的 3'RACE 和 5'RACE 引物(*CkeHK31/CkeHK32* 和 *CkeHK51/CkeHK52*)。利用 Clontech 公司的 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒,按照说明书分别扩增 *CkeHK* 的 3'端和 5'端。扩增获得的结果经过连接、转化后,挑取阳性菌落由上海生工生物工程有限公司测序。根据同源克隆片段和 RACE 测序结果,拼接获得目的基因全长。

1.3 己糖激酶基因的生物信息学分析

将测序获得的片段,利用软件 DNASTar7.1 (DNASTAR Inc. USA)进行拼接得到目的基因 cDNA 全长序列。利用序列处理在线工具包(<http://www.bio-soft.net/sms/>)将得到的 cDNA 序列翻译成氨基酸序列,并用 ORF 查找器找到目的基因的 ORF。通过在线 BLAST 程序对目的基因进行鉴定,然后下载同源性相似序列,利用本地 ClustaW 软件与目的基因进行多序列比对。利用软件 ExPASy Compute pI/Mw tool^[15]用来检测目的基因编码的蛋白相对分子质量(Mw)和等电点(pI)。最后,基于多序列比对结果选择保守区,利用 jModelTest 软件选择进化模型,然后利用 phyML 软件中的最大似然法(Maximum likelihood)构建进化树。

1.4 不同培养条件下,己糖激酶基因表达量分析

根据 *CkeHK* 的 cDNA 序列设计荧光定量表达特异性引物(*CkeHKQF/CkeHKQR*),同时选择凯氏拟小球藻 18s rRNA 序列作为内参,设计荧光定量表达特异性引物(*Cke18SF/Cke18SR*),引物序列见表 1。设计引物后,利用普通 PCR 对其进行验证,确保没有引物二聚体出现以及引物的特异性。采用 SYBR Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒进行荧光定量 PCR。每个样品设置 3 个平行,荧光定量 PCR 数据采用相对定

量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析, 最后利用 Origin 8.0 进行标准 偏差计算和作图。

表 1 本研究所用的引物

Tab. 1 Primers used in this study

引物名称	核苷酸序列(5'-3')	序列长度 (bp)
cDNA 中间片段		
HKF	TGTGGACATGGGAGGCACAAAC	237
HKR	ACGGGGAAGCTGAAGCAGAAGCC	
5' RACE		
<i>Cke</i> HK51	GGAAGCTGAAGCAGAAGCCAATG	564
<i>Cke</i> HK52	AGCCTGCCGTTGTCCTGTCGTA	463
3' RACE		
<i>Cke</i> HK31	AGCAGCATCAGGGAGTGGCTTATC	1440
<i>Cke</i> HK32	TGGCTTATCCCAGAGGAGTGTACG	1425
CDS 全长		
<i>Cke</i> HKCF	<u>GAATTC</u> AAGATGGCAGCACCGCTGGGTTTCG	1389
<i>Cke</i> HKCR	<u>CTCGAGCTAGCT</u> ACCACTGCTTGCTCGGC	
荧光定量 PCR		
<i>Cke</i> HKQF	GGGCATGGGTTGTTTGAAGAAGAT	247
<i>Cke</i> HKQR	GCTGGTCTAGGGAGGACTTGGTGAT	
<i>Cke</i> 18SF	ATCCGAACACTTCACCAGCAC	395
<i>Cke</i> 18SR	TGACTCAACACGGGGAAACTTA	

2 结果与分析

2.1 凯氏拟小球藻己糖激酶全长 cDNA 克隆

本研究以凯氏拟小球藻总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 设计引物 HXF/HKR(表 1), 进行 PCR 扩增, 获得 cDNA 中间片段, 长度为 237 bp。将该片段氨基酸序列与胶球藻(*C. subellipsoidea* C-169)的 HK 序列比对发现同源性的 57%、与微囊藻(*Micromonas pusilla* CCMP1545)的同源性为 68%、与莱茵衣藻(*C. reinhardtii*)的同源性为 58%。根据中间片段, 分别设计特异性引物(*Cke*HK51/*Cke*HK52 和 *Cke*HK31/*Cke*HK32), 通过 cDNA 末端快速扩增技术扩增, 获得该序列 5'端和 3'端, 长度分别为 311 bp 和 1 404 bp。利用所获得的中间片段、5'端和 3'端序列进行拼接, 获得己糖激酶基因的 cDNA 全长。该基因 cDNA 全长 1 844 bp(NCBI 注册号: AHF54566.1), 包含 1 389 bp 的开放阅读框, 编码 462 个氨基酸, 5'非编码区(5'-UTR)序列长 39 bp, 3'非编码区(3'-UTR)序列长 436 bp(图 1)。利用 ExPASy Compute pI/Mw tool 软件分析显示, 该序列的相对分子质量为 49.73 ku, 等电点为 6.98。

2.2 凯氏拟小球藻己糖激酶氨基酸序列比对及蛋白结构分析

利用翻译获得的己糖激酶氨基酸序列, 与来自其他 9 种藻类的己糖激酶氨基酸序列(图 1)进行比对分析, 发现序列间同源性较高。功能结构域分析表明, *Cke*HK 蛋白含有 ATP 结合位点(CD1: ADLGGTNRV; CD4: IGTGIN; CD7: XDGXF), 己糖激酶结合位点(CD2: LGFFSF), 葡萄糖激酶结合位点(NDEE), 详见图 2。由此, 提示凯氏拟小球藻己糖激酶基因序列不仅仅可以催化葡萄糖, 也可以催化其他己糖。利用软件 SOPMA^[16]对 *Cke*HK 基因编码蛋白的二级结构预测, 预测结果显示, α 螺旋占的比例最高, 为 38.1%, 其次为无规卷曲, 占比 31.82%, 延伸链和 β -折叠分别为 18.83%和 11.26%。由此, 说明己糖激酶主要由 α 螺旋和无规卷曲组成, 属于混合型蛋白。

2.3 凯氏拟小球藻己糖激酶基因进化分析

本文比对了来自细菌、藻类和拟南芥等不同物种共 24 个己糖激酶基因的氨基酸序列, 并利用 mega5 和 Phyml 软件构建进化树, 分析了凯氏拟小球藻 *Cke*HK 基因的分类归属以及该基因与其他物种之间的基因进化关系(图 3)。从图中可以看出, 25 个物

的 13.69 倍, 随后出现下降。由此可见, 相比较自养, 在异养和混养培养下, 己糖激酶 *CkeHK* 可能在凯氏拟小球藻利用外源糖方面发挥重要作用。同时, 混养培养

过程中, *CkeHK* 的转录上调表达量远高于异养培养过程中的上调表达量, 可见混养培养过程中光信号的参与, 对己糖激酶代谢外源糖可能也具有调控作用。

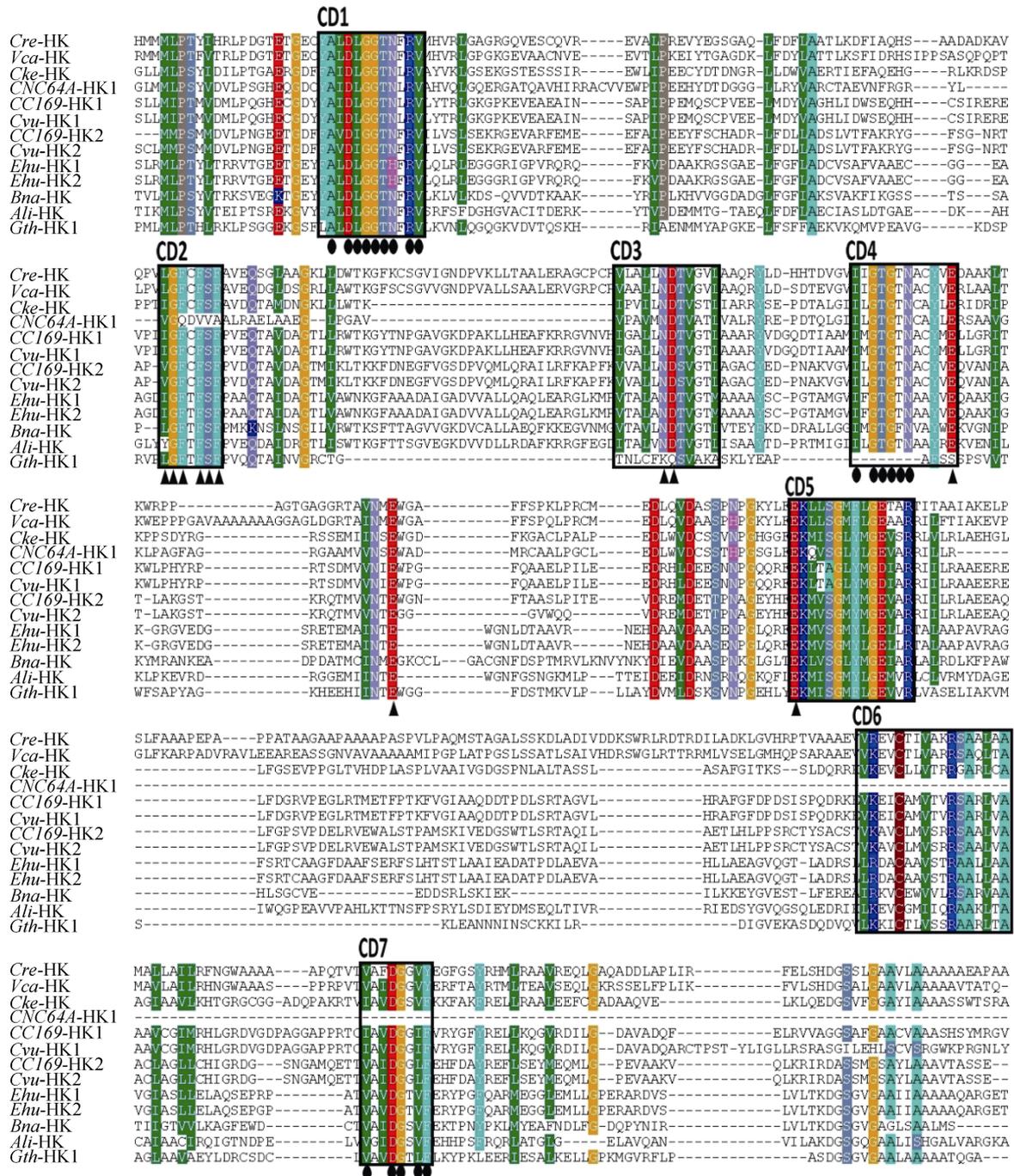


图 2 凯氏拟小球藻 *CkeHK* 的序列比对及结构域分析

Fig. 2 Multiple alignment of the deduced amino acids of the *CkeHK* from *Parachlorella kessleri* and other predicted HKs from nine green algae with available genome database

代表 ATP 结合位点 代表己糖激酶结合位点

Crucial residues of the ATP and glucose-binding sites are highlighted by black circles and black triangles

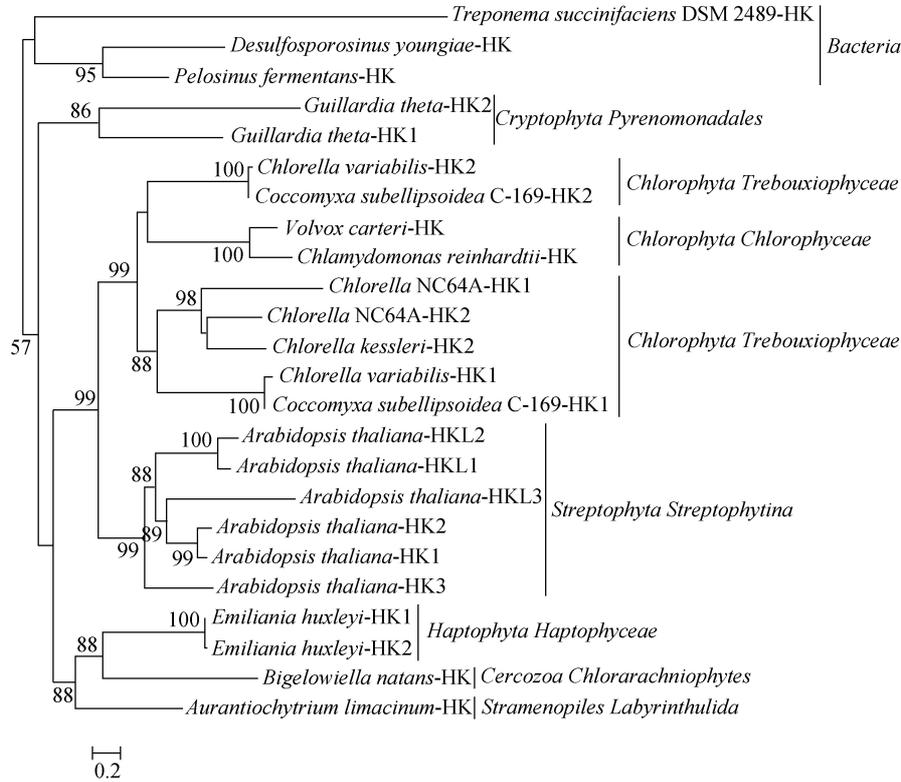


图 3 不同物种来源的己糖激酶序列系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of HK homologs from algae, higher plants, and archaea

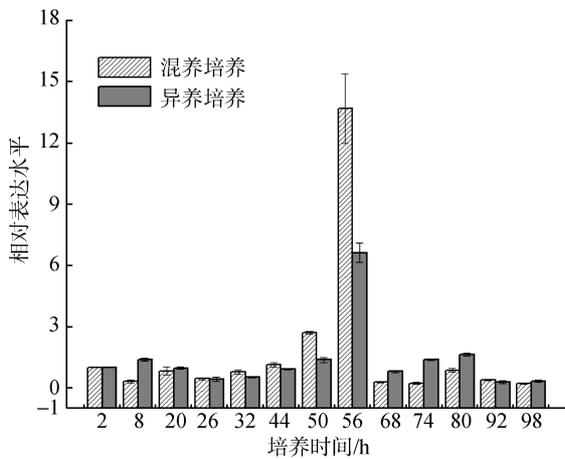


图 4 不同培养条件下 CkeHK 的转录表达情况

Fig. 4 CkeHK expression of *Parachlorella kessleri* cultured under different cultural trophic modes

3 讨论

糖类物质对微藻及植物的生长、发育、胁迫应激等方面有重要作用，它不仅作为呼吸底物为微藻及植物提供生长发育所需要的能量，也是合成氨基酸、脂肪酸、淀粉等重要物质的碳库。同时，糖类还

被认定为具有类似植物激素作用的信号分子，参与植物的糖信号转导过程，对于合成脂肪酸等代谢产物具有重要调控作用^[17]。己糖激酶是植物体呼吸代谢过程中的关键酶，可通过磷酸化作用催化外源糖类物质。同时，通过添加己糖激酶抑制剂 D-甘露酮糖可阻断 2-脱氧葡萄糖介导的对光合基因表达的抑制作用，说明己糖激酶是植物糖信号感知的感受器^[18-19]。最近，通过解析拟南芥中己糖激酶结构，也证明己糖激酶既具有催化作用也具有感知作用^[20]。

本研究以能够进行自养、异养、混养的凯氏拟小球藻为研究材料，克隆获得己糖激酶基因的 cDNA 序列，同源性分析显示，其与莱茵衣藻中己糖激酶序列相似性较高。结构分析发现，该基因编码氨基酸序列氮端具有多样性，这些特点与在拟南芥和酵母中发现的己糖激酶具有相似性。同时，依据己糖激酶序列构建的系统发育树可见，各物种的聚类关系与传统经典分类较为一致，说明己糖激酶基因在各个物种中是相对保守的，也提示己糖激酶在凯氏拟小球藻的糖代谢过程中发挥重要作用。该基因是首次从微藻中被克隆获得，也将为研究其他微藻糖代谢提供参考。

Chen 等^[21]通过异养、混养培养小球藻(*Chlorella zofingiensis*), 观测细胞分裂及淀粉合成、脂肪酸合成, 提示混养培养小球藻过程相较于异养培养, 光可能发挥两方面的作用: (1)光能够促进细胞增殖和生物量提高; (2)加光照后, 小球藻细胞合成脂肪酸含量减少, 淀粉合成量增加。由此, 说明光照对于小球藻如何利用外源葡萄糖具有调控作用, 但具体调控机制目前尚不清晰。该结果与本研究中发现的光信号能够调控凯氏拟小球藻利用外源葡萄糖较为一致。此外, Jang 等^[12, 22]发现拟南芥中己糖激酶能够抑制编码光合作用相关蛋白(核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶和捕光叶绿素 a/b 结合蛋白)基因的表达, 提示己糖激酶是拟南芥中光信号与糖信号协同调控网络的关键元件。光照和外源葡萄糖都具有双重作用, 一方面都可以为藻株提供能量, 另一方面也都是具有调控作用的信号因子。开展光和糖如何协同调控小球藻生长及脂肪酸合成研究, 将对于创新培养工艺提高小球藻生物量及脂肪酸合成, 以及构建性能优良的藻株等都具有重要意义, 这也是日后工作将继续深入的重点。

4 结论

本研究报道了凯氏拟小球藻己糖激酶基因的 cDNA 序列及其在不同培养条件下的表达特点, 将有助于阐明凯氏拟小球藻利用外源葡萄糖的分子机制, 为揭示光照如何调控凯氏拟小球藻代谢外源葡萄糖, 以及碳流分配等关键科学问题提供基础。同时, 本研究首次从绿藻门中克隆获得己糖激酶, 也为从其他真核微藻中克隆己糖激酶, 探讨异养微藻代谢特点等提供参考。

参考文献:

- [1] Huss V A R, Frank C, Hartmann E C, et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella sensulato* (Chlorophyta)[J]. *Journal of Phycology*, 1999, 35: 587-598.
- [2] Yamamoto M, Kurihara I, Kawano S. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)[J]. *Planta*, 2005, 221: 766-775.
- [3] Krienitz L, Hegewald E H, Hepperle D, et al. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)[J]. *Phycologia*, 2004, 43: 529-542.
- [4] Li Y C, Zhou W G, Hu B, et al. Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109: 2222-2229.
- [5] Ruan M, Li Y, Cheng Y. 模拟自然光周期下外源性 CO₂ 对城市污水藻类生长和污水处理的影响(摘选)[J]. *农业工程*, 2013, 3(1): 101-104.
Ruan Megan, Li Yecong, Cheng Yanling. Effect of exogenous CO₂ on algae growth and wastewater treatment under simulated natural light/dark cycle using municipal wastewater as feedstock (Extracts)[J]. *Agricultural Engineering*, 2013, 3(1): 101-104.
- [6] 江丽丽, 温小斌, 耿亚洪, 等. 一株产油微藻的筛选及分子鉴定[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(4): 606-612.
Jiang Lili, Wen Xiaobin, Geng Yahong, et al. A newly selected lipid-rich microalgae strain and its molecular identification[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(4): 606-612.
- [7] 李林, 王帅, 郑立. 海洋微藻固碳及其培养技术的研究进展[J]. *海洋科学*, 2015, 39(3): 135-140.
Li lin, Wang Shuai, Zheng Li. Research progress of marine microalgae on carbon dioxide biofixation and its cultivation technology[J]. *Marine Sciences*, 2015, 39(3): 135-140.
- [8] Wang Y, Chen T, Qin S. Differential fatty acid profiles of *Chlorella kessleri* grown with organic materials[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2013, 88: 651-657.
- [9] Wang Y, Chen T, Qin S. Heterotrophic cultivation of *Chlorella kessleri* for fatty acids production by carbon and nitrogen supplements[J]. *Biomass & Bioenergy*, 2013, 47: 402-409.
- [10] Moore B D, Sheen J. Plant sugar sensing and signaling - a complex reality[J]. *Trends in Plant Science*, 1999, 4: 250-250.
- [11] Moore B, Zhou L, Rolland F, et al. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling[J]. *Science*, 2003, 300: 332-336.
- [12] Claeysen E, Rivoal J. Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions[J]. *Phytochemistry*, 2007, 68, 6: 709-731.
- [13] 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: 411-425.
- [14] Cho J I, 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: 598-611.
- [15] Bjellqvist B, Hughes G J, Pasquali C, et al. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino-acid-sequences[J]. *Electrophoresis*, 1993, 14: 1023-1031.

- [16] Geourjon C, Deleage G. SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1995, 11: 681-684.
- [17] Koch K E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants[J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 509-540.
- [18] Loreti E, De Bellis L, Alpi A, et al. Why and how do plant cells sense sugars[J]. *Annals of Botany*, 2001, 88: 803-812.
- [19] Jang J C, Sheen J. Sugar sensing in higher plants[J]. *Trends in Plant Science*, 1997, 2: 208-214.
- [20] Feng J, Zhao S, Chen X M, et al. Biochemical and structural study of *Arabidopsis* hexokinase 1[J]. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, 2015, 71: 367-375.
- [21] Chen T P, Liu J, Guo B B, et al. Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14936.
- [22] Jang J C, Sheen J. Sugar sensing in higher plants[J]. *Plant Cell*, 1994, 6: 1665-1679.

Molecular cloning of hexokinase from *Parachlorella kessleri* and its expression analysis under different trophic modes

CHEN Jun^{1, 2}, CUI Hong-li³, ZHAO Jia-lin^{1, 2}, QIN Song¹

(1. Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101418, China; 3. College of Life Science, Dalian University, Dalian 116622, China)

Received: Dec. 22, 2016

Key words: *Parachlorella kessleri*; hexokinase; molecular clone; transcript expression

Abstract: cDNA (GenBank ID: AHF54566) encoding hexokinase (termed *CkeHK*) from the green alga *Parachlorella kessleri* was cloned and sequenced to understand the response to the presence and uptake of glucose at the molecular level. The transcriptional expression patterns of *CkeHK* were observed under phototrophic, heterotrophic, and mixotrophic culture conditions. The results indicated that the *CkeHk* cDNA was 1, 844 base pairs (bp) long, with an open reading frame (ORF) of 1 389 bp encoding 462 amino acids, with a calculated molecular mass of 49.73 kDa and an estimated isoelectric point of 6.98. Under the phototrophic condition as control, the transcriptional profiles of *CkeHk* showed that it could be upregulated under the heterotrophic and mixotrophic culture conditions. The mRNA level of *CkeHK* under the mixotrophic culture condition could be upregulated more than that under the heterotrophic culture condition. These results suggest that light may play an important role in regulating the role of hexokinase in metabolizing exogenous glucose. These findings provide us valuable information for exploring the mechanism of metabolizing glucose in *P. kessleri*.

(本文编辑: 梁德海)