

苦瓜果实 β -半乳糖苷酶基因的克隆、 表达及亚细胞定位

高山^{1,2}, 陈桂信¹, 许端祥², 林碧英², 林义章³, 潘东明¹

(¹ 福建农林大学园艺产品贮藏保鲜研究所, 福州 350002; ² 福州市蔬菜科学研究所, 福州 350111; ³ 福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

摘要: 根据已构建苦瓜果实均一化文库中获得的 1 个与 β -Gal 基因相关的 EST 序列, 采用经 3'RACE 技术, 克隆获得 1 个苦瓜 β -Gal 基因的 cDNA 序列 *McGAL*, 全长为 2261 bp, 开放阅读框 2160 bp, 编码 719 个氨基酸。该基因在 GenBank 基因数据库的登录号为 AFD54987.1。应用生物信息学软件对 *McGAL* 氨基酸序列分析表明, *McGAL* 含有糖苷水解酶家族 35 的保守结构域 G-G-P-[LIVM]-x-Q-x-E-N-E-[FY], C 端不含凝集素结构域。二级结构显示, 该酶含有 α -螺旋 (19.89%)、伸展链 (26.98%)、 β -转角 (6.54%) 和无规卷曲 (46.59%)。McGAL 氨基酸序列与鹰嘴豆、苜蓿、绿豆、大豆、羽扇豆的氨基酸序列的同源性分别达到 73%、73%、73%、72% 和 71%。亚细胞定位结果表明, *McGAL* 定位在线粒体膜上。荧光定量结果表明, *McGAL* 在果实绿熟期表达量最高并随之下降, 该基因可能与果实成熟软化初期相关。

关键词: 苦瓜; β -半乳糖苷酶; 亚细胞定位; 实时荧光定量 PCR

Cloning, Expression, and Subcellular Localization of β -galactosidase Gene from *Momordica charantia* L. Fruit

GAO Shan^{1,2}, CHEN Gui-xin¹, XU Duan-xiang², LIN Bi-ying², LIN Yi-zhang³, PAN Dong-ming^{1,2}

(¹ Institute of Postharvest Science and Technology of Horticultural Products, Fuzhou 350002; ² Fuzhou Institute of Vegetable Crops, Fuzhou 350111; ³ College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: The cDNA sequence of β -galactosidase gene named *McGAL* was cloned by 3'RACE technique based on the related EST sequence from the normalized full-length cDNA library of bitter gourd fruit. The full length of cDNA sequence was 2261 bp, including a 2160 bp open reading frame (ORF) that encoded 719 amino acids. The sequence had been deposited in GenBank database with the accession number of AFD54987.1. Sequence analysis showed that the gene contained the putative active site-containing consensus sequence pattern G-G-P-[LIVM]-x-Q-x-E-N-E-[FY] belonged to glycosyl hydrolase family 35 without lectin domain at their C-termini. In the secondary structure, α -helix, extended strand, β -turn, and random coil were 19.89%, 26.98%, 6.54% and 46.59%, respectively. Amino acid sequence alignment indicated the *McGAL* had higher identity with *Cicer arietinum*, *Medicago sativa*, *Vigna radiata*, *Glycine max*, and *Lupinus angustifolius* of 73%, 73%, 73%, 72% and 71%, respectively. Subcellular localization revealed the *McGAL* was located in mitochondrial inner membrane. Fluorescent quantitative PCR analysis displayed the *McGAL* gene expressed the highest levels at the mature green stage and decreased thereafter, which meant the gene may be related to early ripening stage.

Key words: *Momordica charantia* L.; β -galactosidase; subcellular localization; quantitative PCR

收稿日期: 2013-03-17 修回日期: 2013-05-07 网络出版日期: 2013-10-22

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131022.1548.030.html>

基金项目: 福建省重大专项 (2012NZ0003-4); 福州市科技项目 (2012-N-59); 福建省农业科学院科技创新团队-瓜类育种科技创新团队 (CXTD-1-04)

第一作者主要从事蔬菜遗传与育种研究。E-mail: vegsum@gmail.com

通信作者: 林义章, 研究方向为蔬菜栽培生理与育种。E-mail: lyz2003007@163.com

潘东明, 主要从事园艺产品采后贮藏保鲜研究。E-mail: pdm666@126.com

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 是葫芦科苦瓜属的一个栽培种, 以鲜食嫩瓜为主, 在我国、日本、印度和东南亚各国均有种植, 是夏季重要的瓜类蔬菜之一^[1]。但是苦瓜为呼吸跃变型果实^[2], 果实采收后极易发生软化、果肉变黄并迅速腐烂的现象, 从而丧失商品价值, 成为制约苦瓜产业发展的一个大难题。因此, 延缓苦瓜果实的成熟软化, 提高苦瓜采后货架期是十分必要的。

β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, β -Gal, EC 3.2.1.23) 是一个与细胞壁降解相关的酶, 能够从 β -半乳糖聚糖支链非还原末端切除 β -半乳糖残基^[3], 既能降解果胶和半纤维素, 又能降解糖蛋白和糖脂, 使细胞壁中一些组分变得不稳定, 促使细胞壁膨胀进而软化^[4]。不仅为植物的快速生长发育释放储存的能量, 还参与衰老进程中细胞壁降解, 以及多糖和细胞壁组分的代谢循环过程中多糖、糖蛋白以及半乳糖脂末端半乳糖残基的水解, 释放游离半乳糖。在种子、幼苗、花粉和果实等植物生长发育各阶段均可以检测出 β -半乳糖苷酶的活性和基因的表达。研究表明, β -Gal 基因表达量随着苹果的软化而增加^[4], 并与日本梨的软化密切相关^[5], 至少有 7 个番茄 β -半乳糖苷酶基因在果实发育过程中表达^[6], 其中 *TBG4* 可能对果实软化起重要作用, 在转基因番茄中, 通过反义 RNA 技术抑制 β -半乳糖苷酶 (*TBG4*) 的表达, 番茄的果实硬度增加^[7]。人们还相继从草莓^[8]、脐橙^[9]、猕猴桃^[10]、桃^[11]、番木瓜^[12]、香蕉^[13]和枣^[14]等果实中克隆出与软化相关的 β -Gal 基因并进行了相关的研究, 但目前苦瓜中未见该基因的相关报道。

本试验从已构建的苦瓜果实均一化文库中获得目标基因 EST 序列, 以此为基础, 通过 3'RACE 克隆该基因的全长, 通过对其序列、亚细胞定位和表达模型的分析, 旨在从分子水平阐明苦瓜果实成熟软化机制, 为控制苦瓜采后软化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验以福州市蔬菜科学研究所的苦瓜强雌性系 24-K 为材料, 于 2011 年 3 月 7 日种植于福州市闽侯南通镇试验地, 6 月 2 日采收苦瓜结果盛期授粉后 1 d 果实、授粉后 5 d 果实、授粉后 10 d 果实和授粉后 18 d 果实。

RNA 提取剂 Trizol 购自 TaKaRa 公司; 试验中

均一化文库构建的试剂盒 SmartTM cDNA Library Construction Kit 和 LA Taq 购自 Clontech 公司; 逆转录酶、菌株 DH10B 购自 Invitrogen 公司; DSN 酶购自 Evorgen 公司。PCR 引物由华大生物公司合成; 目的基因片段回收与 Real Master Mix (SYBR Green) PCR 试剂盒购自天根生化科技有限公司。菌株 DH5 α , 亚细胞定位载体 p-super1300 + GFP, 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 果实成熟软化处理 采收同一时期人工授粉、相同生长节位、大小一致的商品瓜 (授粉至采收 18 d) 放在保鲜盒中室温放置, 进行成熟软化处理。设置 4 个处理, (1) 对照: 授粉 18 d 后果实, 即商品成熟绿果期; (2) 1/4 果实转黄: 瓜蒂端颜色由翠绿色转为浅黄间绿色, 转色面积达 1/4 果面, 即软化初期; (3) 1/2 果实转黄; (4) 果实全部转黄。将上述样品, 切成 0.5 ~ 0.8 cm³ 的小块, 用液氮速冻, 放置 -80 °C 冰箱备用。

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 合成 采用 Trizol 法分别提取不同成熟软化处理、以及授粉后 1 d、5 d、10 d 和 18 d 果实总 RNA, 利用紫外分光光度计检测 RNA 浓度和质量, 按照 TaKaRa 第 1 链合成试剂盒说明, 使用 oligo (dT) 引物合成单链 cDNA 用于荧光定量 PCR, 单链 cDNA 置 -80 °C 保存备用。

1.2.3 苦瓜果实均一化 cDNA 文库的构建 参照郑鸿昌^[15]方法, 以苦瓜 1/4 转黄时的果实为材料, 采用 DSN 均一化与 SMART 技术相结合, 构建苦瓜果实均一化全长 cDNA 文库。经检测, 该文库的转化效率为 360 万个菌落/ μ L 连接产物, 其平均插入片段大小为 1.4 kb, 重组率为 98.0%。经菌落检测后, 随机挑取 768 个 cDNA 克隆, 提取质粒 DNA, 送上海英骏生物技术公司以 M13F 测序引物进行单次测序^[16]。

1.2.4 McGAL 基因克隆 测序完成后, 对获得的 EST 序列在 NCBI 数据库中进行同源核苷酸和蛋白质序列对比, 并进行注释及功能分析。根据测序结果, 获得 1 个可能与 β -Gal 基因相关的 EST 序列。对该 EST 在 NCBI 数据库中进行核苷酸的同源比对发现, 该 EST 的 3' 端不完整, 根据获得的 5' 端序列设计了一条正向的 3'RACE 引物 McGAL-5-P, 与文库构建的 3' 接头引物 3DSH2 进行 PCR 扩增, 将获得的目的条带进行胶回收, 克隆到 TAKARA 的 pMD18-T, 筛选出阳性克隆, 再由上海英骏生物技术公司测序。

1.2.5 *McGAL* 基因生物信息学分析 用 DNA-MAN 软件拼接序列,利用 DNASTar 的 EditSeq 程序分析克隆序列,由在线软件 ORF Finder 寻找最大开放阅读框,设计 cDNA 全长引物 *McGAL*-ORF-F 和 *McGAL*-ORF-F,进行 cDNA 全长 PCR 扩增,将获得的目的条带进行胶回收、测序及验证。根据 Blastn 和 Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对核苷酸和蛋白质序列进行同源性分析;采用 Mega 5.01 软件绘制系统进化树;利用在线软件 SOSUI、Signal 3.0、TMHMM、TargetP 1.1、SOPMA 等 (<http://www.expasy.org/tools>),分析 *McGAL* 的蛋白结构、疏水性、跨膜结构、磷酸化位点以及二级结构。

1.2.6 *McGAL* 基因亚细胞定位 根据获得的全长序列,用 Primer 3 软件设计引物 *McGAL*-GFP-F 和 *McGAL*-GFP-R 分别带有酶切位点 *Xba* I / *Kpn* I 的引物,扩增 *McGAL* 基因完整的开放阅读框,将扩增产物回收纯化后,连接到 pMD19-T 载体上,用 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切处理,回收目的片段,克隆到瞬时表达载体 p-super1300 + GFP 上,并转化到农杆菌 GV3101 中,接着 PCR 扩增以及酶切检测,筛选阳性克隆,并对阳性克隆进行测序验证。测序无误后,挑取经 PCR 检测含有目的质粒的单克隆农杆菌,28 ℃、10 mL 摇菌 12 h;分光光度计检测菌液的 OD₆₀₀,用渗透培养基(10 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L MES,200 μmol/L AS,pH 5.4)将 OD 值调至 0.8,然后将调好 OD 值的菌液用不带针头的注射器注入本氏烟草(*N. benthamiana*)叶片下表皮;将注射过的烟草放在温室正常生长 3 d;在激光扫描共聚焦显微镜(Zeiss LSM 510 META confocal microscope)下观察发光情况^[17]。

1.2.7 *McGAL* 基因的表达分析 分别提取苦瓜强雌系 24K 的不同成熟期的果实等组织的总 RNA,以反转录的 cDNA 为模板,设计引物 *McGAL*-RT-F 和 *McGAL*-RT-R,以苦瓜环素基因^[18](GenBank 登录号 HQ171897),作为内参基因,其引物为 *McCYP*-RT-F 和 *McCYP*-RT-R,研究 *GAL* 基因在果实不同发育时期以及不同成熟软化期的表达情况。RT-qPCR 分析在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行,每个样品 3 次重复。20 μL PCR 扩增体系为:10 μL 2 × Real Master Mix 混合液,5 ~ 10 ng cDNA、上下游引物各为 0.5 μL,ddH₂O 调至 20 μL。反应程序为:95 ℃ 预变性 10 min,94 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 34 s,40 次循环。采用 2^{-ΔΔC_t}(Livak)法计算相对表达量。

表 1 用于基因克隆和表达分析的特异性引物
Table 1 Sequence of the primers used in the gene clone and expression analysis

编号 Code	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>McGAL</i> -5-P	CCAAGGATGGGTTAGTGGAGCAA
3DSH2	GTAATACGACTCACTATAGGGCGTCATCTATGT CGGGTGGCCGAGCGCGCTT5VN
<i>McGAL</i> -ORF-F	ATGTCAAAGTGTGTGCTGTT
<i>McGAL</i> -ORF-R	CTATGGGGACCTCTTAACCA
<i>McGAL</i> -GFP-F	TCGATAATGTCAAAGTGTGTGCTGTT
<i>McGAL</i> -GFP-R	ACTAGTCTATGGGACCTCTTAACCA
<i>McGAL</i> -RT-F	TGGAATACCCAATATGACCTACCAC
<i>McGAL</i> -RT-R	GAAAGCCACCAAAATGAACTAACC
<i>McCYP</i> -RT-F	GGCAAACCTAAAGTTTCTTCG
<i>McCYP</i> -RT-R	GATGAGCCCTTGTAAATGAAGTG

2 结果与分析

2.1 苦瓜 *McGAL* 基因 cDNA 全长的获得
从已构建的成熟软化期苦瓜果实均一化文库中,随机选取 768 个克隆进行了 5'端测序,获得 684 条有效序列,EST 平均长度为 726 bp。通过注释及功能分析,发现有 1 个 EST 序列,与 *β-Gal* 基因存在 61.2% 同源性。以 *McGal*-5-P 和 3DSH2 为引物,该质粒为模板进行 PCR 扩增,经测序、拼接和序列分析,得到苦瓜果实的 *β*-半乳糖苷酶基因 cDNA 全长序列。该序列全长为 2261 bp,其 5'端有 130 bp 的非翻译区(5'UTR);3'端有 324 bp 的非翻译区(3'UTR),在终止子 TAG 后含非常保守的 AATAAA 序列区域,片段末端含有 poly(A)序列(图 1)。根据上述特征判断,获得了苦瓜 *β*-半乳糖苷酶基因的完整 cDNA 序列,命名为 *McGAL*,其序列在 GenBank 登记号为 AFD54987.1。

2.2 苦瓜 *McGAL* 氨基酸序列的生物信息学分析
经在线软件 ORF Finder 分析,*McGAL* 的开放阅读框为 2160 bp,编码 719 个氨基酸。用 ProtParam 软件预测所编码的蛋白质分子式为 C₃₆₆₄H₅₅₂₆N₉₄₄O₁₀₃₅S₃₁,相对分子量为 80.35 kD,理论 pI 值为 8.34,属碱性蛋白。

经 SOSUI 分析发现,*McGAL* 是膜蛋白,有 1 个跨膜螺旋。用 Signal 3.0 预测该蛋白的跨膜区识别信号肽的可信度达 0.918。利用 TMHMM 分析表明,距 N 端 1 ~ 4 位氨基酸位于膜内,5 ~ 24 位氨基酸位于跨膜螺旋区,25 ~ 719 位氨基酸位于膜外。

1 ATAAGAAATCCATCCTCTTTCCACTGCTTTCTACTGACTGAAATGAAATATATGTTATC
61 TATGACGAGAGATGAGATACGGTACAAATGCATTGAGGAGCAGAGAGCTGGGTTGC
121 AATTTTCAGAAATGTCAAGTGTGTGCTGTTGTTTGGGTTTGGCTTTCATGGGTTTGTTA
M S K C V L L F L G L L S W V C Y
181 TGCGATGGCCACTGTGACTTATGACCAAGAAAGCCATCATTAATGGCAAGAGAAGAT
61 A M A T V T Y D Q K A I I I N G K R R I
21 TTTGGTTTCTGGCTATTATACCACCAAGAACACACCCAGATGTGGCCAGGCCATTAT
81 L V S G S I H Y P R S T P Q M W P S L I
301 ACAAAATGCCAAGATGGAGGGTTGGATATTATAGACATATGTTCTGGAAATGGCCA
101 Q N A K A D G G L D I E T Y V F W N G H
361 TGAACCTACTCAGGCGAAGTATTATTGGAGATAGATACGATTGGTGGATTTATAAA
121 E P T Q G K Y Y F E D R Y D L V R F I K
421 GCTGGTTCAACAAGCAGGCTTATATGTTTCATCTCCGATGGTCCATATGCTGTGCAGA
141 L V Q Q A G L Y V H L R I G A C T G Y V C A E
481 ATGGAATATGGTGGATTTCGAATTGGCTAAAGCATGTCTGGCATGCTCTTTAGGAC
161 W N Y G G F P I W L K H V P G I V F R T
541 AGAAATGAACCTTCAAGCGGCTATGCAAAAATTCATGAGAGATTTGTTGGTATGAT
181 E N E F F K A A M Q K F T E K I V G M M
601 GAAGTCGGAGAAATGATGAAAGCAAGGAGGACCCATTATTTGCTCAGATTGAGAA
201 K S E K L Y E S Q G G P I I L S Q I E N
661 TGAATATGGACCCGTGGAATGGGAATAGTGCCCTGGTAAATTTACACCAATGGGC
221 E Y G P V E W E I G A P G K S Y T K W A
721 TGCTCAATGGCATTAGCTTGACATCGGCTCCCATGGGTGATGCGAAGCAAGAGGA
241 A Q M A L G L D T G V P V W M C K Q E D
781 TGCCCTGACCCCTGTGATGACACCTGCAATGGGTTTACTGTGAAAATCTCAACACCAA
261 A P D E V I D T C N G F Y C E N E F K R I
841 CCGGGAATAAACCACCAATATGACAGAGAATTTGCTGTGTTGTCACATGCGTTGG
281 R E N K F P K I W T E V W G W Y T A F G
901 TGCGCGAGTCTCTTATAGGCGAGCTGAAGATTAGGCTTTTCAGTGGCAAGTTTGTACA
301 G A V P Y R P A E D L A F S V A R F V Q
961 GAATGGTGGTCTTTTATTATATATATATGATGACGAGGAACTAAGTCTGGCCGATC
321 N G G S L F F N Y Y M Y H G G T N F G R S
1021 CAGTGGACTTTTCTAGCCCAATAGCTATGACTGTGCTCCGATCGATGAATATGGCCT
341 S G L F I A N S Y D F D A P I D E Y G L
1081 TAAAGGGAACCAAAATGGGAACCTGAGAGATTGACCAAGCATTCAGATTGTGCGA
361 K R E P K W E H L R D L H K A I K L C E
1141 ACCTGCTTTAGTATCAGGAGATCCTACGTCACATGGTTAGGAAAAATCTAGAGGCTCG
381 P A L V S A D P N V T W L G K N L E A R
1201 TGCTCTCAAGTCAAGTTCCAGGGCATGTGCTGCTTTCCTAGCAAAATATGATATCAAC
401 V F K S S S G A C A A L F A N Y D I S T
1261 TTCTTCCAAAGTCAGCTTTTGAATACCCAAATGACCTACACCTTGGTCCATCAGTAT
421 S S K V S F F W N T Q Y D L P P W S I S I
1321 TCTCTGACTCGAATCTGCAATTTTCAACACTGCAAGAATTTGGGCTCAAGAGTGGGCC
441 L S D C K S A I F N T A R I G A Q S A P
1381 GATGACATGATGCTGTAGTTCATTTTGGTGGCTTCGTAACAAGAGAAGTTGCGTC
461 M K M M L V S S F W W L S Y K E E V A S
1441 TGGTGTACTGACCAACAACCAAGGATGGGTAGTGAGGCAAGTAATTTCACTTG
481 G Y A T D T T T T K D G L V E N F N T W
1501 GGATTGACAGATTACCTGTGGTACATGACAGATATACAGATTGATCCGACGAGCGCTT
1521 D S T D Y L W Y M T D I Q I D P N E A F
1561 CATAAAGGCGGACAGTGGCTCTTCTCAACATCTCTCAGCAGGTCAATGCTTGTGATG
521 I K S G Q W P L L N I S S A G H V L H V
1621 TTTTGAATGGCCAACTATCCGGAATCTATATGGGTCGTTGGAGAAATCCCAAGTAGC
541 F V N G Q L L S G T V Y G S L E N P K V A
1681 ATTCAGTAATATGTTAACTTAAAGCGAGGAGTTAAACAAGCTTTCCATGCTGAGTGTAC
561 F S K Y V N L K A G V N K L S M L S V T
1741 TGTCGGCTTCCGAATGTTGGCTGCACTTTGAGCTTCGTAACAAGAGAAGTTTGGGCC
581 V G L P N V G L H F E S W N A G V L G P
1801 TGTCAGCTTGAGGCTCTGAACGAGGGTATTAGAGCATGTCGATATGAATGGTCTTA
601 V T L K G G L N E G I R D M S G Y K W S
1861 CAAGCTTGGCTTGAAGAGGAAACATGAATCTTCATACCTTGGTGAAGTAATCTGT
621 K V G L K G E N M N L T I G G S N S V
1921 TCAATGGGCGAAGGCTCAGGCTTGGTTCAAAACACCCCTCACATGGTCAAGAGCAA
641 Q W A K G S G L V Q K Q P L T W Y K T N
1981 TTTCAATCCCGGCGAGGAGGCTTAGCTTTAGATATGACGAGTATGGGTAAGG
661 F N T P A G N E P L A L D M S S M G K G
2041 TCAAAATGGAATTAATGGTGGAGCATCGGGCGCTATTGGCTGCATATGCTGCAAGCGG
681 Q I W I N G R S I G R Y W P A Y A A S
2101 CAGCTGTGGCAATGCAATGCTGGAATCTTACCGGAGAAAGATGTCTTCTCAATG
701 S C G K C S Y A G I F T E K K C L S N C
2161 TGGACAGCCCTCCCAAGAAATGGTATCATGTTCCCGCGAATGGCTCGAATCGAAGGCGAA
721 G Q P S Q K W Y H V P R E W L E S K G N
2221 CTTCTGGTATGTTTGAAGAGTTGGGTGGCACTCGTGGGATTTCTTGTGAAGAG
741 F L V V F E E L G G N P G G I S L V K R
2281 GTCCCCATAGGACTATTTCAAACGAGGAGGAAAAATGAATGAATGACGACACCGAG
761 S P *
2341 AAGCTTTTGGTTGAGCAGAGAAAATGAAAAATACCCCTCATAGGGATTTGTTGTGCAAGA
2401 AAATTTTGTATGATAGCTAGTGTATAGTAAAGATTATTCGGATATGATGATTATTTA
2461 AATGTTGTGTTGATTTTTCTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
2521 AAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
2581 AAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

阴影表示糖苷水解酶家族35的保守结构域
The domain of glycosyl hydrolase family 35 was painted with shadow

图1 苦瓜β-半乳糖苷酶基因(McGAL)
全长cDNA序列及预测氨基酸序列
Fig.1 The full-length cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of Momordica charantia L. β-galactosidase

采用TargetP 1.1 预测 McGAL 氨基酸序列导肽表明,该序列无叶绿体转运肽(0.017)、线粒体目标肽(0.080),可能含有分泌途径信号肽(0.879)。利用

NetPhos 2.0 分析表明,该基因共有 33 个磷酸化位点,其中 15 个丝氨酸位点、10 个酪氨酸位点、8 个苏氨酸位点。

用 SOPMA 软件对 McGAL 蛋白二级结构预测,结果有 143 个氨基酸参与了 α-螺旋,占有氨基酸的 19.89%;有 194 个氨基酸参与形成伸展链,占 26.98%;有 47 个氨基酸参与 β-转角,占 6.54%;有 335 个氨基酸参与形成无规卷曲,占 46.59%。

NCBI 保守域分析表明,McGAL 属于糖基水解酶的 35 基因家族(Glycoside hydrolase family 35)成员,保守序列为 G-G-P-[LIVM](2)-x(2)-Q-X-E-N-E-[FY]^[9](图1 灰色方框部分)。将 McGAL 与来自 12 个物种的 29 个氨基酸序列比对,结果表明它们之间存在较高的同源性,β-Gal 氨基酸序列间的 N 端序列相对较保守,而 C 端序列存在有无 lectin 结构域差异。系统进化分析显示,β-Gal 被聚为 3 大类群(图2),McGAL 氨基酸序列与豆科植物 β-Gal 在进化树中聚在第Ⅲ类中的一个分支中,这个分支中的氨基酸序列 C 端不含 lectin 结构域。McGAL 氨基酸序列与鹰嘴豆、苜蓿、绿豆、大豆、羽扇豆的氨基酸序列的同源性分别达到 73%、73%、73%、72% 和 71%。

2.3 苦瓜 McGAL 基因的亚细胞定位

将 McGAL 的 cDNA 克隆到瞬时表达载体 p-super1300 + GFP 上,经测序无误后,将 p-super1300 + McGAL-GFP 载体与 p-super1300 + GFP 空载体分别转化到农杆菌中并注射至本氏烟草叶片表皮中,通过激光共聚焦显微镜观察。结果如图3所示,转 p-super1300 + GFP 空载体(对照)的烟草叶片表皮细胞内,由 super promoter 驱动的 GFP 在细胞各个部位均有表达;而转 McGAL + p-super1300 + GFP 的烟草表皮细胞内绿色荧光呈现较均匀的点状分布,从定位结果中可以看出,McGAL 可能定位在线粒体中。

2.4 苦瓜 McGAL 基因的表达差异分析

荧光定量 PCR 分析表明,在不同时期苦瓜果实中均检测到苦瓜 McGAL 基因的表达,但表达量存在显著性差异。苦瓜果实在幼果期(授粉后 1 d)、果实膨大初期(授粉后 5 d) McGAL 基因的表达量较低,果实膨大中期(授粉后 10 d)表达量较高。苦瓜 McGAL 基因在商品成熟绿果期(授粉后 18 d,CK)表达量最高,显著高于果实的其他阶段,差异有统计学意义。苦瓜 McGAL 基因随着果实成熟表达量逐渐降低,在 1/4 转黄的果实(成熟软化前期)中表达量较高,显著高于成熟软化中后期的表达量,差异有统计学意义。

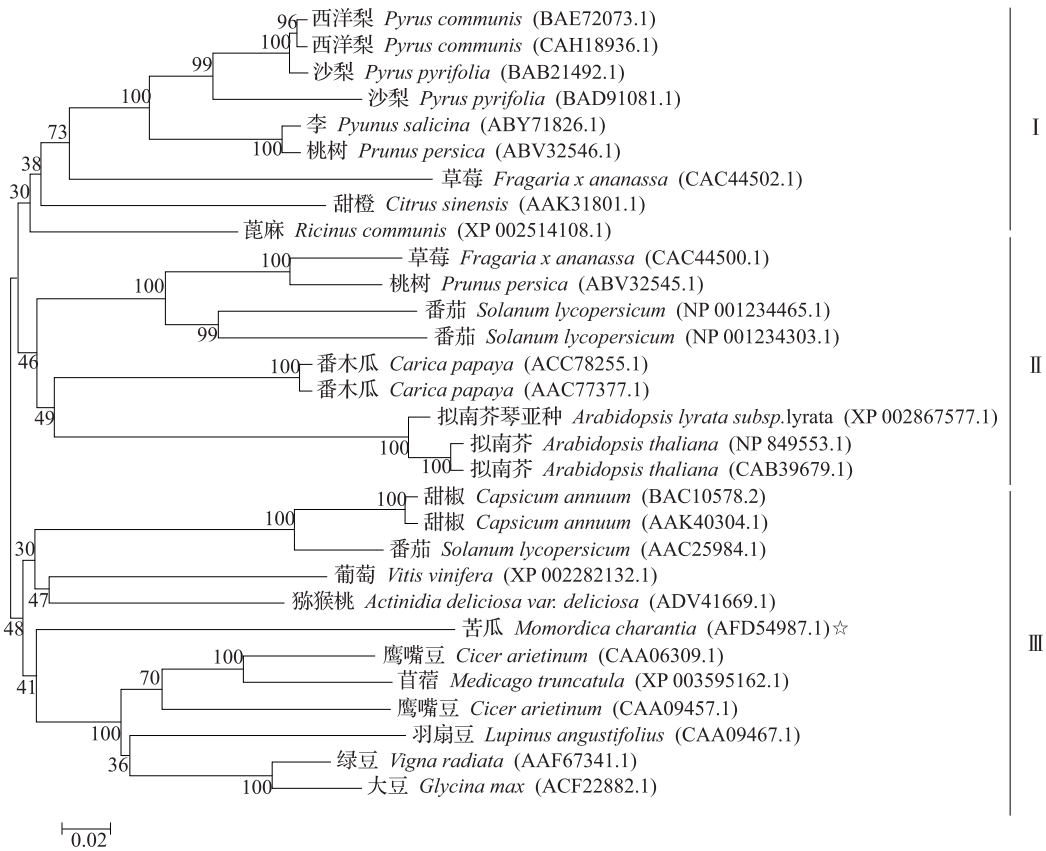
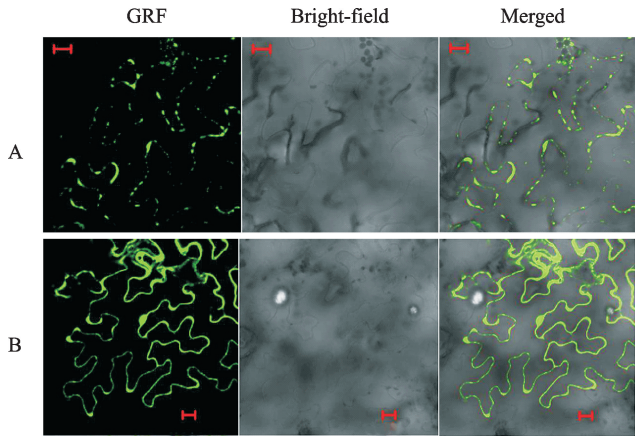


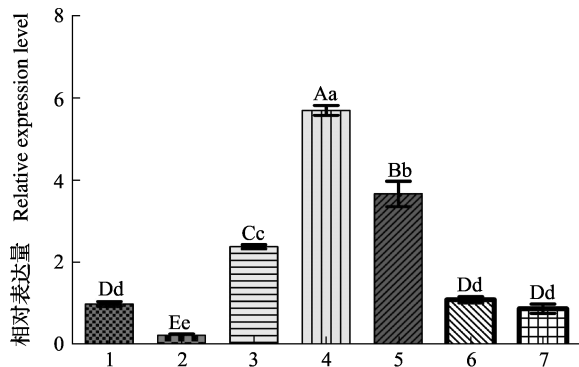
图 2 苦瓜 *McGAL* 与其他 β -Gal 同源基因的聚类分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of the predicted *McGAL* homologous proteins from different species



A: 融合蛋白 *McGAL* + p-super1300 + GFP 在烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位; Bar: 20 μ mol/L
B: 融合蛋白 p-super1300 + GFP 在烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位; Bar: 20 μ mol/L
A: Subcellular localization of *McGAL* + p-super1300 + GFP in epidermal cells of tobacco leaves. Bar: 20 μ mol/L
B: Subcellular localization of p-super1300 + GFP in epidermal cells of tobacco leaves. Bar: 20 μ mol/L

图 3 苦瓜 *McGAL* 在烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位
Fig. 3 Subcellular localization of *McGAL* in epidermal cells of tobacco leaves



1: 授粉后 1 d 果实; 2: 授粉后 5 d 果实; 3: 授粉后 10 d 果实; 4: 授粉后 18 d 果实; 5: 1/4 黄果实; 6: 1/2 黄果实; 7: 全黄果实。大、小写字母分别表示差异达显著水平 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)

1: Fruits of 1 day after pollination, 2: Fruits of 5 days after pollination, 3: Fruit of 10 days after pollination, 4: Fruits of 18 days after pollination, 5: Fruit during a quarter yellow stage, 6: Fruit during half yellow stage, 7: Fruit during yellow stage. Different capital and small letters indicate different significance at $P < 0.01$ and $P < 0.05$ levels, respectively

图 4 *McGAL* 在苦瓜果实不同成熟时期的定量表达
Fig. 4 Expression of *McGAL* in different mature stage of fruits

3 讨论

本试验从课题组前期已构建苦瓜果实均一化文库中获得的 1 个与 β -Gal 基因相关的 EST 序列, 通过 3'RACE 技术从苦瓜果实中克隆到 *McGAL* 基因, 氨基酸序列比对表明, 该基因与已登录的其他物种的同源性在 70% 以上, 说明该基因在物种进化上具有较高的保守性。

研究表明, β -Gal 基因属于多基因家族。植物 β -Gal 基因分为 2 个类群, 其中类群 I 的氨基酸序列 712 ~ 731 个, C 端不含凝集素结构域 (lectin-like domain), 类群 II 氨基酸序列 832 ~ 888 个, C 端含凝集素结构域。*McGAL* 基因编码 719 个氨基酸, 包含有该基因含有糖苷水解酶家族 35 的保守结构域, 但 C 端不包含凝集素结构域, 结果表明 *McGAL* 基因属植物 β -Gal 基因的类群 I。氨基酸序列的同源性 & 系统进化分析结果表明, *McGAL* 基因与豆科植物的 β -Gal 基因具有较高的同源性。本试验采用烟草瞬时表达法发现 *McGAL* 定位在线粒体膜上。

荧光定量 PCR 分析表明, *McGAL* 基因在果实膨大中期表达较高, 绿熟期表达量最高, 软化初期表达量次之, 说明该基因与果实的早期成熟软化有关。这个结果与番木瓜中同样缺乏 C 端凝集素结构域的果实特异 β -Gal 基因 pBG(b)^[19] 相似。这也暗示了在苦瓜成熟软化过程中, 应该还有其他的 β -Gal 家族成员发挥降解细胞壁的作用, 值得进一步研究。

参考文献

[1] 中国农业百科全书总编辑委员会蔬菜卷编辑委员会. 中国农业百科全书: 蔬菜卷 [M]. 北京: 农业出版社, 1990: 131

[2] 颜敏华, 张继澍, 颜建明. 苦瓜采后某些生理生化变化与其衰败的关系 [J]. 西北植物学报, 2004, 24 (4): 716-719

[3] Smith D L, Starrett D A, Gross K C. A gene coding for tomato fruit β -galactosidase II is expressed during fruit ripening, cloning, characterization, and expression pattern [J]. Plant Physiol, 1998, 117 (2): 417-423

[21] Jiang H F, Liao B S, Ren X P, et al. Comparative assessment of genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes with various levels of resistance to bacterial wilt through SSR and AFLP analyses [J]. J. geneti. geno, 2007, 34 (6): 544-554

[22] 黄莉, 任小平, 张晓杰, 等. ICRISAT 花生微核心种质农艺性状和黄曲霉抗性关联分析 [J]. 作物学报, 2012, 38 (6): 935-946

[23] Zhao Y L, Prakash C S, He G H. Characterization and compilation of polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers of peanut

[4] Ross G S, Wagrzyn T, MacRae E A, et al. Apple β -galactosidase: activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone [J]. Plant Physiol, 1994, 106: 521-528

[5] Tateishi A, Inoue H, Yamaki S. Cloning and expression of β -galactosidase cDNA related to softening of avocado (*Persea americana*) [J]. J. Jpn Soc Hortic Sci, 2002, 71: 48-55

[6] Smith D L, Gross K C. A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development [J]. Plant Physiol, 2000, 123 (3): 1173-1183

[7] Smith D L, Abbott J A, Gross K C. Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening [J]. Plant Physiol, 2002, 129 (4): 1755-1762

[8] Trainotti L, Spinello R, Piovano A. β -galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry [J]. J. Exp Bot, 2004, 52 (361): 1635-1645

[9] Wu Z, Burns J K. A beta-galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis*) [J]. J. Exp Bot, 2004, 55 (402): 1483-1490

[10] Lazan H, Ng S Y, Goh L Y, et al. Papaya β -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening [J]. Plant Physiol Biochem, 2004, 42: 847-853

[11] 卞伟华, 江昌俊, 王朝霞. 桃叶片 β -半乳糖苷酶基因全长 cDNA 克隆及原核表达 [J]. 园艺学报, 2006, 33 (4): 721-724

[12] 庄军平, 苏菁, 李雪萍, 等. 香蕉果实软化相关 β -半乳糖苷酶基因的克隆及其表达分析 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32 (4): 411-419

[13] Tavarina S, Degl'Innocentia E, Remorini D, et al. Polygalacturonase and β -galactosidase activities in Hayward kiwifruit as affected by light exposure, maturity stage and storage time [J]. Sci Hort, 2009, 120 (3): 342-347

[14] 吕燕荣, 任小林, 周会玲. 枣果实 β -半乳糖苷酶基因的克隆及表达分析 [J]. 西北植物学报, 2011, 31 (7): 1318-1325

[15] 郑鸿昌. 夜来香均一化全长 cDNA 文库的构建与花香相关基因的遗传转化 [D]. 福建: 福建农林大学, 2011: 7

[16] 高山, 陈桂信, 许端祥, 等. 成熟软化期苦瓜果实均一化全长 cDNA 文库的构建与 EST 分析 [J]. 分子植物育种, 2013, 11 (2): 211-216

[17] Kumar K R, Kirti P B. A mitogen-activated protein kinase, AhMPK6 from peanut localizes to the nucleus and also induces defense responses upon transient expression in tobacco [J]. Plant Physiol Biochem, 2010, 48 (6): 481-486

[18] Tuan P A, Kim J K, Park N I, et al. Carotenoid content and expression of phytoene synthase and phytoene desaturase genes in bitter melon (*Momordica charantia*) [J]. Food Chem, 2011, 126 (4): 1686-1692

[19] Othman R, Chong H L, Choo T S, et al. Three β -galactosidase cDNA clones related to fruit ripening in papaya (*Carica papaya*) [J]. Acta Physiol Plant, 2011, 33 (6): 2301-2310

(上接第 1122 页)

from public database. [J]. BMC Research Notes 2012, 5: 362-369

[24] Shirasawa K, Koilkonda P, Aoki K, et al. In silico polymorphism analysis for the development of simple sequence repeat and transposon markers and construction of linkage map in cultivated peanut [J]. BMC Plant Biol, 2012, doi: 10. 1186/1471-2229-12-80

[25] Shirasawa K, Bertoli D J, Varshney R K, et al. Integrated consensus map of cultivated peanut and wild relatives reveals structures of the A and B genomes of *Arachis* and divergence of the Legume genomes [J]. DNA Res, 2013, doi: 10. 1093/dnares/dss042