

丝瓜苯丙氨酸解氨酶基因 *PAL* 克隆及表达分析

朱海生, 温文旭, 刘建汀, 叶新如, 陈敏东, 王彬, 张前荣, 李永平, 温庆放

(福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013)

摘要: 苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase)是苯丙烷途径代谢的关键酶,在果蔬褐变中发挥着重要作用。为了探究丝瓜中 *PAL* 基因的功能,本研究以丝瓜果实为材料,采用 RACE 和 RT-PCR 技术从丝瓜果肉中分离获得丝瓜 *PAL* 基因,命名为 *LcPAL*, GenBank 登录号为: KP341758。该基因全长 2406 bp, 具有完整的开放阅读框(ORF), 共 2145 个碱基; 预测编码 715 个氨基酸, 理论分子量(Mw)为 77.69 kD, 等电点(pI)为 6.11, 编码的蛋白与黄瓜和香瓜的同源蛋白相似性均在 93% 以上, 显示其高度的保守性。系统进化树分析显示, 丝瓜与同为葫芦科的黄瓜、香瓜的 *PAL* 蛋白的亲缘关系较近, 聚为同一类。Motif Scan 分析显示, *LcPAL* 编码的蛋白包含有 PAL-HAL(60~525 位)、PLN02457(8~715 位)及 phe_aml_yase(24~705 位)3 个保守结构域和 1 个酶活性中心序列(197~212 位), 属于典型的 Lyase_I_Like 超家族。Wolf Psort 预测其亚细胞定位于叶绿体或内质网中。实时荧光定量 PCR 分析显示, *LcPAL* 基因在普通丝瓜果实、花、茎、叶和根中均有表达。*LcPAL* 在所选的 8 个丝瓜品种中表达存在一定差异, 在普通丝瓜中的表达量均高于有棱丝瓜; 在普通丝瓜品种闽丝 3 号鲜切及采收后储藏褐变过程中, *LcPAL* 初期表达上调, 后期表达量受到抑制, 且与其酶活性的变化趋势基本一致。普通丝瓜 *LcPAL* 表达与果肉褐变的发生过程高度相关, 表明 *LcPAL* 在普通丝瓜果肉褐变中发挥着作用。

关键词: 丝瓜; 褐变; 过氧化物酶(PAL); 表达分析; PAL 活性

Cloning and Expression Analysis of Phenylalanine Ammonia-Lyase *PAL* Gene from *Luffa cylindrical*

ZHU Hai-sheng, WEN Wen-xu, LIU Jian-ting, YE Xin-ru, CHEN Min-dong,
WANG Bin, ZHANG Qian-rong, LI Yong-ping, WEN Qing-fang

(Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013)

Abstract: Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) is a key enzyme of the phenyl propanoid pathway and plays important roles in browning of fruits and vegetables. To investigate the function of *PAL* in *Luffa*, the full-length cDNA was cloned from luffa fruit by using rapid-amplification of cDNA ends (RACE) and reverse transcription-PCR (RT-PCR) techniques. This gene was named *LcPAL* and the GenBank accession was KP341758. The full length cDNA of *LcPAL* was 2406 bp, with a 2145 bp open reading frame (ORF) that encoded 715 amino acids. The predicted molecular weight is 77.69 kD and the hypothetical isoelectric point is 6.11. *LcPAL* was highly conservative, sharing over 93% identity with the homologous proteins from *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L. Phylogenetic analysis indicated that *LcPAL* and *PAL* of *Cucumis sativus* L. and *Cucumis melo* L. was grouped. Wolf Psort protection indicated that *LcPAL* protein was located in chloroplast or endoplasmic reticulum, and Motif Scan analysis showed that *LcPAL* protein had three conserved domain databases (i. e., PAL-HAL, PLN02457 and phe_aml_yase) and an en-

收稿日期: 2017-05-31 修回日期: 2017-06-28 网络出版日期: 2018-02-09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180209.0847.002.html>

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2017R1026-6, 2015R1026-9); 福建省自然科学基金项目(2017J01062); 福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”(YC2017-5); 福建省农业科学院创新项目(2015QC-6, PC2017-7); 福建省农业科学院蔬菜科技创新团队(STIT2017-1-2)

第一作者主要从事园艺植物生物技术与育种研究。E-mail: zhs0246@163.com

通信作者: 李永平, 研究方向为蔬菜生物技术与育种研究。E-mail: 248937256@qq.com

温庆放, 研究方向为蔬菜育种与栽培研究。E-mail: fjvrc@163.com

zyme active center sequences in the position of 60-525, 8-715, 24-705 and 197-212 sites, respectively, which suggested that LcPAL protein was one of typical Lyase_I_Like superfamily. Real-time PCR analysis revealed that LcPAL could be expressed in different tissues of *Luffa cylindrical* Roem., including roots, stems, leaves, flowers and fruits. The levels of LcPAL were different among eight luffa varieties, and the expression in *Luffa cylindrical* Roem. was higher than that in *Luffa acutangula* Roxb. What is more, the expression level of LcPAL in 'Minsi 3' was up-regulated in the early, and then decreased during fresh-cut and post-harvest storage browning processes, which was consistent with the changes observed in peroxidase activity, suggesting that LcPAL gene might play a regulation role in luffa browning process.

Key words: *Luffa cylindrical* Roem.; browning; polyphenol oxidase (PAL); expression analysis; activity of PAL

丝瓜为葫芦科 (Cucurbitaceae) 丝瓜属 (*Luffa* Mill.) 一年生攀援藤本植物, 起源于印度, 主要分布于温带、热带和亚热带地区, 在亚洲和拉丁美洲种植最为广泛, 在我国各地均有大面积栽培, 是我国重要的蔬菜之一^[1-3]。丝瓜属约有 8 个种, 只有普通丝瓜 (*Luffa cylindrica* Roem.) 和有棱丝瓜 (*Luffa acutangula* Roxb.) 2 个种经过驯化作为栽培种推广^[4], 其中普通丝瓜在储藏、运输、加工和烹饪过程中果肉及汤汁容易产生褐变, 极大影响了丝瓜的加工和贮藏性能, 降低了丝瓜产品的商品价值, 造成巨大经济损失, 因此了解丝瓜酶促褐变发生机理已成为当前丝瓜遗传育种和采后加工的研究热点^[5-7]。

果蔬褐变主要是酶促褐变, 酶促褐变是植物组织或器官中的酚类物质在酶的作用下氧化成醌类和水, 醌类再非酶促聚合, 形成褐色或黑色物质而引起组织变色^[8-10]。酚类物质、多酚氧化酶和氧是酶促褐变形成的 3 个物质条件。酚类物质是酶促褐变过程中多酚氧化酶 (PPO, polyphenol oxidase) 主要的作用底物, 对果蔬褐变特性起着至关重要的作用^[11]。苯丙氨酸解氨酶 (PAL, phenylalanine ammonia-lyase) 是植物次生代谢特别是苯丙烷途径代谢的关键酶和限速酶, 是连接初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类代谢的第一步反应酶, 参与酚类物质合成, 并影响植物酶促褐变^[12-13], 研究表明 PAL 基因的表达、PAL 活性与果蔬酶促褐变息息相关^[14-15]。目前关于丝瓜 PAL 基因及其在褐变中的作用尚未见报道。本研究前期已经建立了丝瓜总酚和酚类物质提取和测定体系^[16-17], 明确了丝瓜褐变和总酚相关性^[18], 在此基础上, 克隆获得丝瓜一个 PAL 基因, 分析 PAL 基因表达、PAL 活性与丝瓜褐变的相关性, 为进一步阐明丝瓜褐变机理奠定基础, 对丝瓜生产、贮运、加工和品种选育均具有重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

试验于 2015 年 10 月至 2016 年 8 月在福建省农业科学院作物研究所进行。共设置 4 个试验, (1) 不同品种: 试验材料为 8 个丝瓜品种的果实, 闽丝 1 号、闽丝 2 号、闽丝 3 号为普通丝瓜, 瓜呈长筒状、瓜皮绿色, 闽丝 4 号、闽丝 5 号、闽丝 6 号为普通丝瓜, 瓜呈短圆筒状、瓜皮浅绿色, 闽丝 7 号为有棱丝瓜, 短棍棒形、瓜皮绿色; 闽丝 8 号为有棱丝瓜, 长棍棒形、瓜皮绿色; (2) 不同组织: 选取福丝 3 号的根、果实、花、幼茎、老茎、幼叶和老叶; (3) 丝瓜采后不同储藏时间: 以闽丝 3 号果实为材料, 果实恒温 4 °C 放置 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 和 6 d 后分别取样; (4) 采后鲜切处理: 以闽丝 3 号果实为材料, 果实鲜切恒温 (25 ± 1) °C 放置 0 h、2 h、4 h、6 h 和 8 h 后取样。试验均设置 3 次重复, 样品采集后用液氮速冻, 贮藏在超低温冰箱 (-80 °C) 中备用。

1.2 丝瓜 LcPAL 基因引物的设计及 PCR 扩增

利用百泰克通用植物总 RNA 提取试剂盒提取闽丝 3 号丝瓜果肉总 RNA, 使用大连宝生物工程有 限公司生产的 MMLV 反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 条链。

丝瓜 PAL 基因序列保守区: 从 GenBank 搜索其他植物 PAL 基因序列, 设计 1 对保守区简并引物 F1、R1, 序列为 F1: 5'-AAGCACCA YCCWGGYCARATT-3', R1: 5'-GAGCAGTAWGAYGCCATKGC-3'。PCR 扩增反应体系为: 包含 25 ng 模板 cDNA 1 μL, 0.2 mmol/L dNTP 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 0.4 μmol/L 的上下游引物各 1 μL, 2.5 μL 10 × Buffer, 加入灭菌的超纯水至 25 μL。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火

30 s, 72 °C 延伸 30 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

3'端序列: 根据同源克隆获得的 *LcPAL* 保守区, 设计 3' RACE 引物 *LcPAL-F2*, 引物序列为: 5'-CA-CATTTTGGATGGGAGCTC-3', 与通用引物 AUAP (5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTAC-3') 配对扩增 *LcPAL* 基因 3' 端序列。PCR 扩增反应体系同上。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

5'端序列: 根据已获得的 *LcPAL* 序列, 设计了 2 个 5' RACE 引物 R2: 5'-GCCAAATATTGAAGCTCAG AGCAATAGGA-3' 和 R3: 5'-AGCACCTTTGAATC-CATAATCC-3'。以 R2 为逆转录引物, 利用大连宝生物有限公司的 MMLV 反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链, 同聚物尾后合成 cDNA 的第 2 链, 以 R3 和 AUAP 为引物, 以 cDNA 第 2 链为模板, 进行 *LcPAL* 基因 5' 端序列扩增。PCR 扩增反应体系同上。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 min, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

根据保守区序列、3' 端、5' 端序列结果, 拼接 *LcPAL* 基因 cDNA 全长, 设计 ORF 正向引物 *LcPAL-F* 和反向引物 *LcPAL-R*, 测序验证 ORF。2 个引物序列为, *LcPAL-F*: 5'-ATGGCGGAAACCTGCGAGCA-3' 和 *LcPAL-R*: 5'-TTAGCAAATGGGGATCGGAGC-3'。

1.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 6.0 进行基因和氨基酸序列比对; 利用 NCBI 的 BLAST 检索分析基因序列; 采用 Clustal W2 软件和 MEGA 4.0 软件构建进化树; 采用 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 软件进行蛋白一级结构分析; 采用 CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>) 软件进行蛋白二级结构分析; 采用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 软件进行蛋白三级结构分析; 采用 Wolf Psort Prediction (http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html) 软件进行亚细胞定位分析; 采用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 软件进行蛋白跨膜结构分析; 采用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 软件进行蛋白信号肽分析; 采用 MotifScan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan) 软件进行翻译后蛋白修饰位点分析。

1.4 丝瓜 *LcPAL* 基因表达分析

利用荧光定量 PCR 技术检测 *LcPAL* 基因在丝瓜不同组织、不同品种果实、果实采后不同储藏时间、果实采后鲜切处理中的表达情况, 每个试验重复 3 次。*LcPAL* 基因荧光定量引物为 *LcPAL-Fq*: 5'-GCTCAATTTTCTGAGCTTGT-3', *LcPAL-Rq*: 5'-GGACGTGGCTTGTACTT-3', 内参基因为本课题组克隆获得的 *Lc18S rRNA*^[19]。参照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒 (ABI 公司, 美国) 说明书, 在荧光定量 PCR 仪 (ABI 7500, 美国) 上进行扩增, 每个反应 3 次重复, 反应体系为 25 μL: 10 μL SYBR[®] Premix, 4 μL cDNA 模板, 0.4 μL 正向引物 *LcPAL-Fq* (10 μmol/L), 0.4 μL 反向引物 *LcPAL-Rq* (10 μmol/L), 0.4 μL Rox, 加超纯水至 25 μL。荧光定量 PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性 30 s, 接下来进行 40 个循环: 95 °C 变性 5 s, 58 °C 退火 30 s。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出基因的相对表达量。

1.5 丝瓜总酚和 PAL 活性的测定

丝瓜 PAL 酶活性测定: 移取 3 mL Tris-HCL 缓冲溶液 (0.1 mol/L, pH 8.4)、1 mL L-苯丙氨酸 (0.02 mol/L) 和 1.4 mL 酶液加入 10 mL 离心管中, 置于 40 °C 恒温反应 60 min, 加入 0.3 mL HCL (0.2 mmol/L) 以终止反应, 测定波长为 290 nm, 以每分钟吸光度变化 0.01 作为一个酶活力单位 (U/g · min), 每个试验设 3 次重复。丝瓜总酚测定采用本课题组建立的方法^[16]。

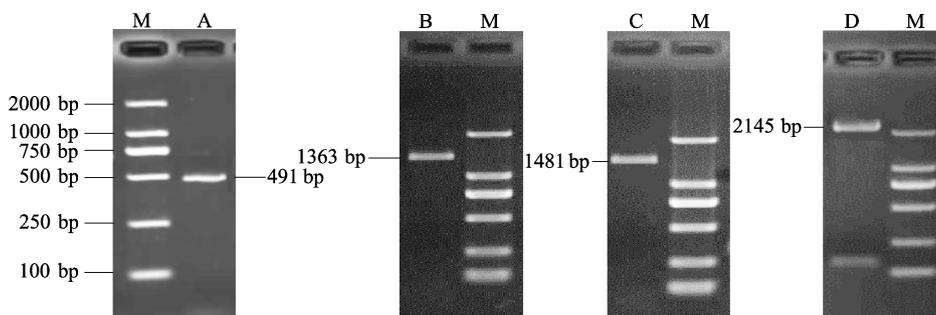
2 结果与分析

2.1 丝瓜 *PAL* 基因克隆

以丝瓜果肉总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 利用简并引物 F1、R1 进行 PCR 扩增, 得到一条 500 bp 左右的条带 (图 1A), 经测序, 测得该片段实际为 491 bp。经 NCBI 网站上 BLAST 检索, 证实该序列为丝瓜 *PAL* 基因的保守序列。

利用 3' RACE 技术, 扩增得到 3' 端约 1360 bp (图 1B)。经测序, 所得序列的实际大小为 1363 bp, 在终止密码子后有长为 163 bp 的 3' 端非翻译区, 经 NCBI 网站上 BLAST 检索, 证实其为丝瓜 *PAL* 基因的 3' 端序列。

利用 5' RACE 技术, 扩增得到 5' 端约 1500 bp (图 1C)。经测序, 所得序列的实际大小为 1481 bp, 在启动密码子前有长为 95 bp 的 5' 非编码区, 经 NCBI 网站上 BLAST 检索, 证实其为丝瓜 *PAL* 基因的 5' 端序列。



M: DNA 标准分子量 DL2000; A: *PAL* 基因保守区扩增产物; B: *PAL* 基因 3'RACE 扩增产物;
C: *PAL* 基因 5'RACE 扩增产物; D: *PAL* 基因 ORF 扩增产物

M: DL2000 marker, A: Conserved region product of *PAL* gene, B: 3'RACE product of *PAL* gene,
C: 5'RACE product of *PAL* gene, D: ORF product of *PAL* gene

图 1 普通丝瓜 *LcPAL* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *PAL* gene in *Luffa cylindrical* Roem.

扣除重叠序列和加同聚物尾序列,将 *PAL* 基因 5' 端序列、保守区序列、3'端序列拼接,得到丝瓜 *PAL* 全长 cDNA,设计丝瓜 *PAL* 基因 ORF 引物,经测序扩增丝瓜 *PAL* 基因 ORF 序列实际长度为 2145 bp(图 1D)。

2.2 基因序列的生物信息学分析

2.2.1 *LcPAL* 基因及其编码蛋白的一级结构分析

LcPAL 基因序列分析表明,该 cDNA 全长 2406 bp, 含 1 个长达 2145 bp 的 ORF,其编码区的 GC 含量为 44.83%,预测编码 715 个氨基酸,理论分子量(Mw) 为 77.69 kD,等电点(pI) 为 6.11, pH = 7.0 时的带点荷数(ch) 为 -6.359;就氨基酸组成而言,在构成该蛋白的 20 种氨基酸中,亮氨酸(Leu) 含量最高(10.6%),丙氨酸(Ala) 次之(8.7%),色氨酸(Trp) 含量最低,为 0.6%;氨基酸的特性方面,该蛋白包含 81 个强酸性氨基酸(D, E), 72 个强碱性氨基酸(K, R), 254 个疏水氨基酸(A, I, L, F, W, V) 和 189 个极性氨基酸(N, C, Q, S, T, Y), 脂肪族指数(AI) 为 91.83, 不稳定系数(II) 为 34.52;该蛋白的总平均疏水性(GRAVY) 为 -0.189, 预测为亲水性蛋白。

2.2.2 *LcPAL* 蛋白翻译后修饰、亚细胞定位及跨膜结构域分析

Motif Scan 分析显示,13 ~ 18、19 ~ 24、87 ~ 92、108 ~ 113、138 ~ 143、197 ~ 202、213 ~ 218、241 ~ 246、260、265、312 ~ 317、397 ~ 402、437 ~ 442、456 ~ 461、493 ~ 498 和 550 ~ 555 位为 N-豆蔻酰化位点;38 ~ 41、379 ~ 382 和 679 ~ 682 位为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点;34 ~ 36、84 ~ 86、117 ~ 119、216 ~ 218、304 ~ 306、332 ~ 334、369 ~ 371、496 ~ 498、534 ~ 536 和 635 ~ 637 位为蛋白激酶 C 磷酸化位点;567 ~ 573 位为酪氨酸磷酸化位点;259 ~ 262、441 ~ 444、611 ~ 614 和 644 ~ 647 位为 N 糖基化位点。

Motif Scan 分析显示,*LcPAL* 编码的蛋白包含有 PAL-HAL(60 ~ 525 位)、PLN02457(8 ~ 715 位) 及 phe_aml_yase(24 ~ 705 位) 3 个保守结构域和 1 个酶活性中心序列(GTITASGDLVPLSYIA, 197 ~ 212 位),属于典型的 Lyase_I_Like 超家族。

SignalP 分析显示,*LcPAL* 不含信号肽序列。TMHMM 分析表明,*LcPAL* 属于非跨膜蛋白,不含跨膜螺旋区。采用 Wolf Psort 预测表明,其亚细胞定位于叶绿体(chlo) 或内质网(E. R) 可能性较大。

2.2.3 *LcPAL* 蛋白的二级、三级结构分析

LcPAL 蛋白二级结构分析显示,序列中 α 螺旋、 β 折叠和 β 转角分别占 65.9%、63.8% 和 13.1%。利用 SWISS-MODEL 对丝瓜 *LcPAL* 蛋白的三级结构进行在线预测,结果如图 2 所示。

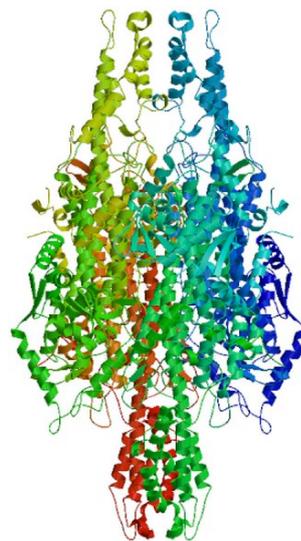


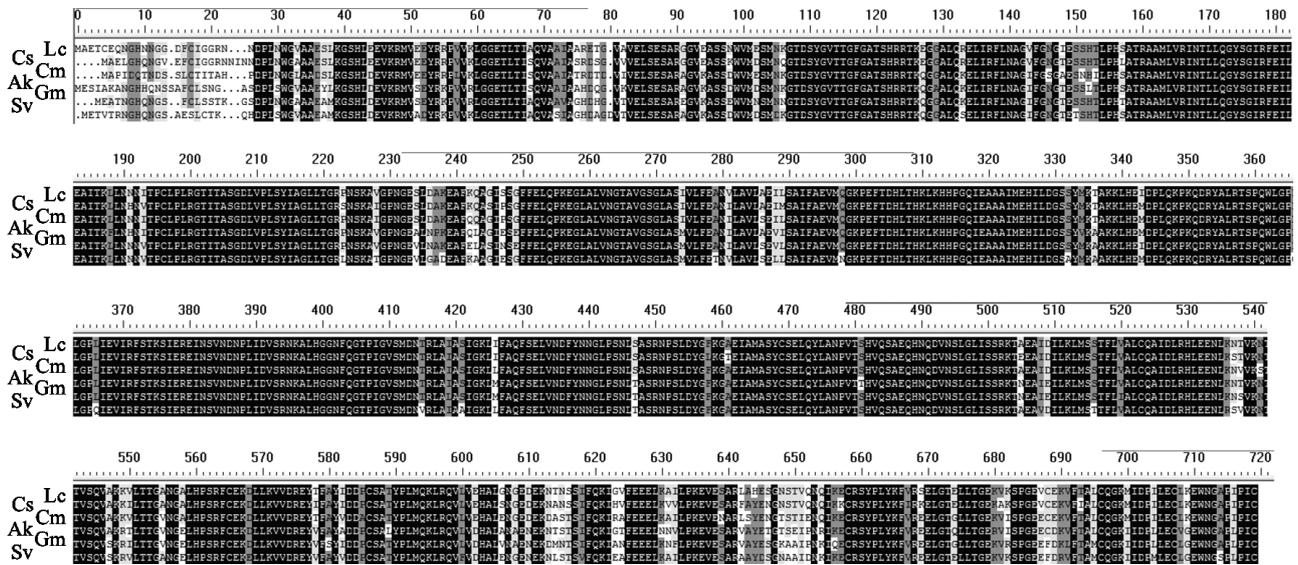
图 2 *LcPAL* 三级结构预测

Fig. 2 Predicted three-dimensional structure of *LcPAL*

2.2.4 LcPAL 蛋白的同源比对与进化分析 根据测序结果,将 LcPAL 编码的氨基酸序列与 GenBank 中其他植物 PAL 比对(图 3),显示 LcPAL 与其他 PAL 氨基酸序列具有较高同源性,其中与黄瓜(XP_004143255.1)、香瓜(XP_00844 9239.1)、大豆(XP_003554382.1)和蒿柳(AKM21232.1)氨基酸序列编码的同源蛋白相似性分别为 94%、93%、87%

和 86%。因此确认所获得的 cDNA 序列为丝瓜 PAL 基因,命名为 *LcPAL*,GenBank 登录号为:KP341758。

利用 Clustal W2 和 MEGA 4.0 软件对丝瓜和其他 15 个植物的 PAL 蛋白序列做系统进化分析(图 4),发现丝瓜 PAL 与同为葫芦科的黄瓜、香瓜的 PAL 蛋白的亲缘关系较近,聚为同一类,与水稻、番茄等的 PAL 蛋白亲缘关系比较远。



Lc: 丝瓜; Cs: 黄瓜; Cm: 香瓜; Ak: 相思树; Gm: 大豆; Sv: 蒿柳

Lc: *Luffa cylindrical* Roem. , Cs: *Cucumis sativus* L. , Cm: *Cucumis melo* L. , Ak: *Acacia koa* Merr. , Gm: *Glycine max* (Linn.) Merr. , Sv: *Salix viminalis* L.

图 3 丝瓜 LcPAL 氨基酸同源性分析

Fig. 3 Homology analysis of LcPAL in *Luffa cylindrical* Roem.

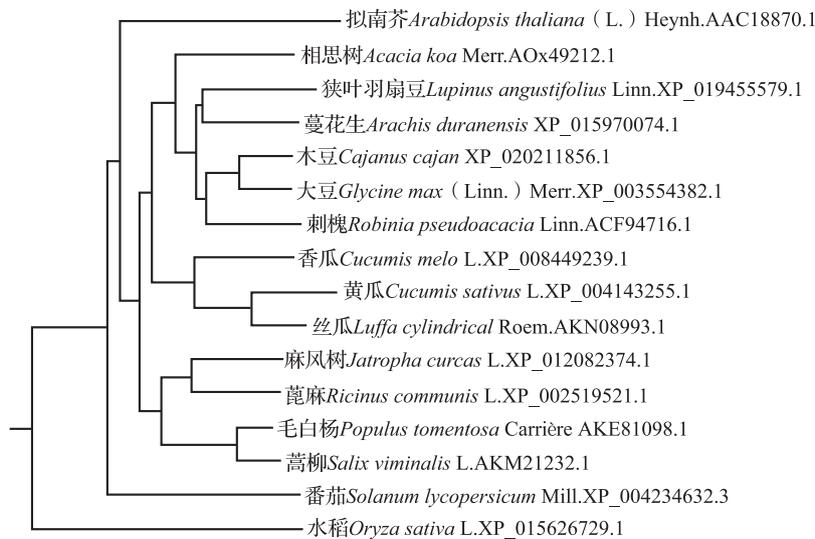


图 4 16 个植物 PAL 蛋白的系统进化分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of PAL from 16 plant species

2.3 *LcPAL* 基因的表达分析

2.3.1 *LcPAL* 基因在丝瓜不同组织中的表达分析

以丝瓜 *18S rRNA* 为内参,利用荧光定量 PCR 技术分析 *LcPAL* 基因在丝瓜不同组织中的表达情况,结果表明(图 5),*LcPAL* 基因在丝瓜根、茎、叶、花和果实中均有表达,但表达量存在明显差异,在叶中的表达量最高,其次为根和果实,在花和茎中的表达量最低,在幼嫩叶和茎中的表达量高于成熟叶和茎,即幼叶 > 老叶 > 根 > 果实 > 花 > 幼茎 > 老茎。

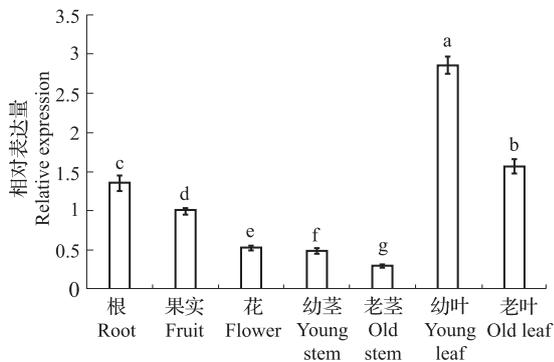


图 5 丝瓜不同组织中 *LcPAL* 基因的表达情况
Fig. 5 Expression level of *LcPAL* in different tissues of *Luffa cylindrical* Roem.

2.3.2 *LcPAL* 基因在丝瓜不同品种中的表达分析

在不同品种果实间,*LcPAL* 基因表达差异较大,在普通丝瓜中,闽丝 3 号表达量最高,其次为闽丝 2 号、闽丝 4 号、闽丝 5 号、闽丝 1 号、闽丝 6 号,6 个普通丝瓜的 *PAL* 基因表达量均高于闽丝 7 号、闽丝 8 号 2 个有棱丝瓜(图 6)。PAL 酶活性总体变化趋势和 *LcPAL* 的表达基本一致(图 7)。

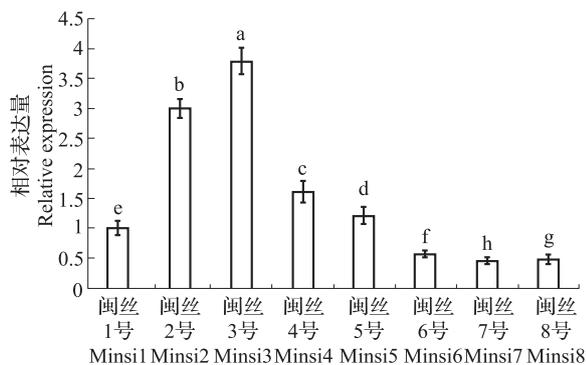


图 6 *LcPAL* 基因在丝瓜不同品种中的表达情况
Fig. 6 *LcPAL* expression level in different cultivars of *Luffa cylindrical* Roem.

2.3.3 *LcPAL* 基因在丝瓜采后不同时间中的表达分析 以闽丝 3 号丝瓜果实为材料,利用荧光定量 PCR 分析在 4 °C 冷藏 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 和 6 d 时

LcPAL 基因表达情况,在采后前 2 d,*LcPAL* 基因的表达量逐渐上升,且比采后当时(0 d)高,并在采后 2 d 时表达量达到峰值,之后基因表达量总体呈下调趋势,均比采后当时(0 d)低(图 8)。

随着采后储藏时间的增加丝瓜出现褐变,丝瓜总酚含量呈逐步上升趋势,在 3 d 时达到峰值,4 d 后变化减缓,较 3 d 时有小幅度的下降(图 9)。LcPAL 酶活性总体变化趋势与 *LcPAL* 基因的表达基本一致(图 10),LcPAL 酶活性在采后前 2 d 也逐渐增加,在 2 d 时酶活性达到最大值。

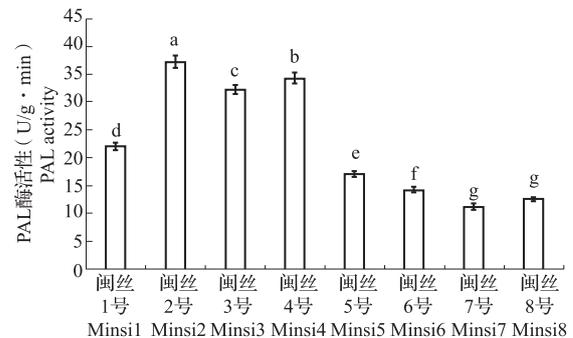


图 7 丝瓜不同品种的 PAL 酶活性变化
Fig. 7 The PAL activity in different cultivars of *Luffa cylindrical* Roem.

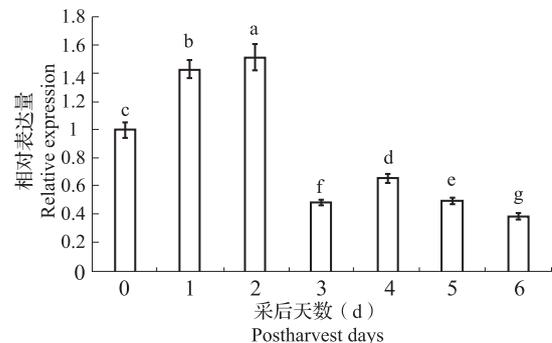


图 8 采后储藏不同天数丝瓜中 *LcPAL* 的表达分析
Fig. 8 *LcPAL* expression level of *Luffa cylindrical* Roem. in different postharvest storage days

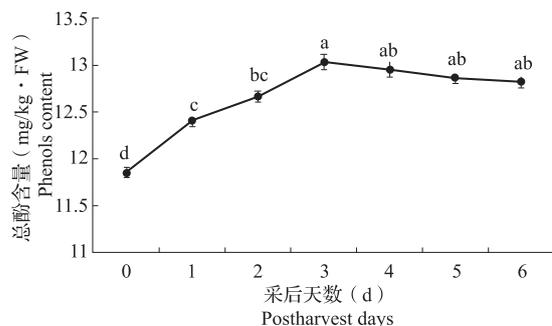


图 9 采后储藏不同天数丝瓜中的总酚含量
Fig. 9 The total phenols content of *Luffa cylindrical* Roem. in different postharvest storage days

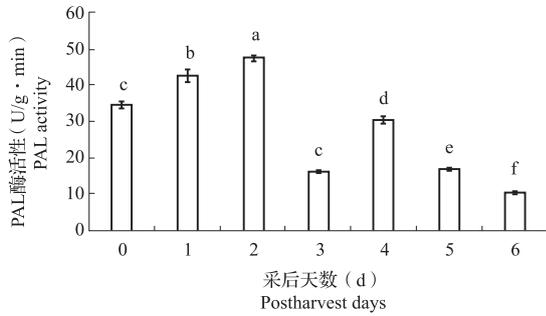


图 10 采后储藏不同天数丝瓜中的 PAL 酶活性
Fig. 10 The PAL activity of *Luffa cylindrical* Roem. in different postharvest storage days

2.3.4 *LcPAL* 基因在丝瓜不同鲜切处理中的表达分析 闽丝 3 号丝瓜鲜切并常温放置 2 h、4 h、6 h 和 8 h 后分析 *LcPAL* 基因表达情况(图 11),结果表明,丝瓜在鲜切后常温放置 2 h 时,*LcPAL* 基因表达上调,表达量高于采后当时(0 h),4~8 h 呈现逐渐下调的趋势,且表达量均比采后当时(0 h)低。

丝瓜果实鲜切后,随着褐变的发生(图 12),总

酚含量呈逐渐上升趋势,在 4 h 达到峰值,4 h 后变化减小,趋于稳定(图 13)。*LcPAL* 酶活性显著增加,其变化趋势和 *LcPAL* 基因的表达大体一致,2 h、4 h 和 6 h 时 *LcPAL* 酶活性均高于采后当时(0 h),2 h 时达到最高值(图 14)。

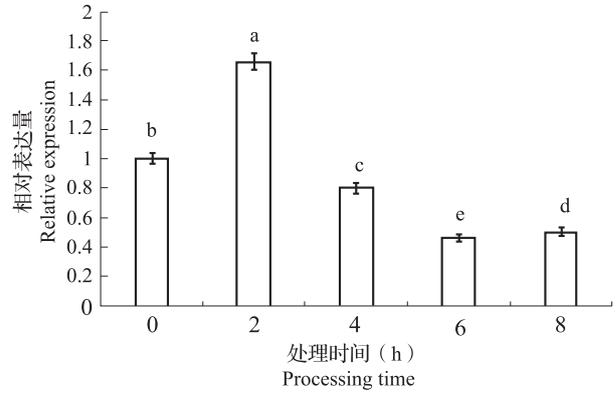
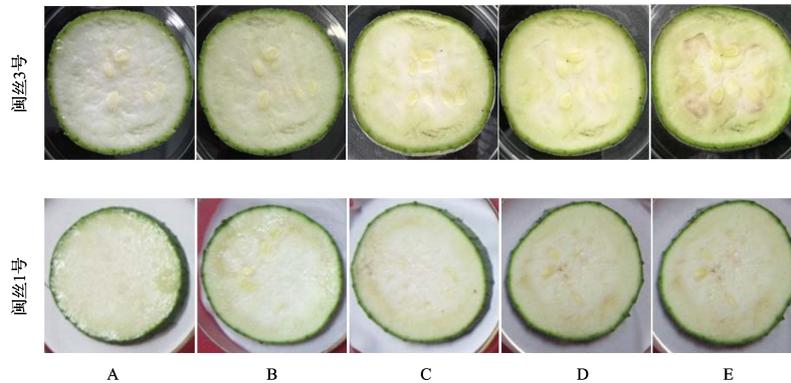


图 11 鲜切后不同放置时间丝瓜中 *LcPAL* 的表达分析
Fig. 11 *LcPAL* expression level of *Luffa cylindrical* Roem. in different placement time after fresh-cut



A: 采后 0 h; B: 采后 2 h; C: 采后 4 h; D: 采后 6 h; E: 采后 8 h

A: 0 hour after postharvest, B: 2 hours after postharvest, C: 4 hours after postharvest, D: 6 hours after postharvest, E: 8 hours after postharvest

图 12 鲜切后不同放置时间丝瓜褐变情况

Fig. 12 The browning of *Luffa cylindrical* Roem. in different placement time after fresh-cut

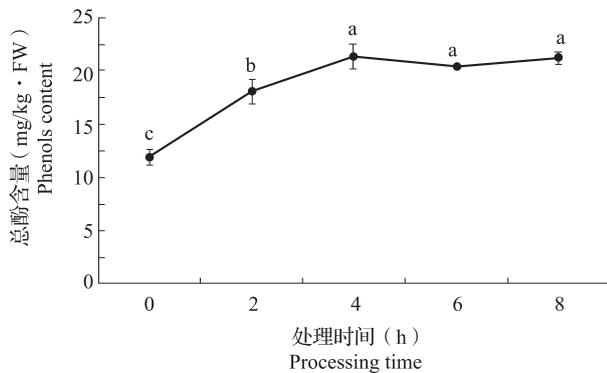


图 13 鲜切后不同放置时间丝瓜中的总酚含量
Fig. 13 The total phenols content of *Luffa cylindrical* Roem. in different placement time after fresh-cut

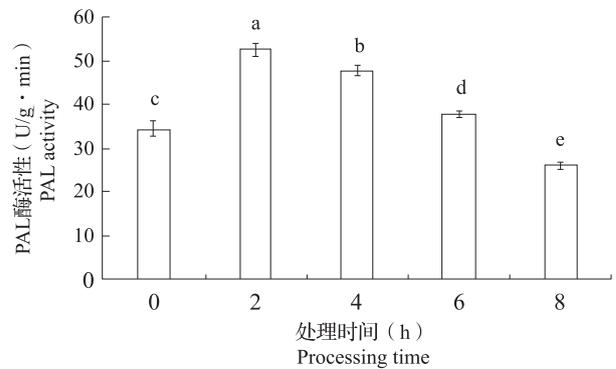


图 14 鲜切后不同放置时间丝瓜中的 PAL 酶活性
Fig. 14 The PAL activity of *Luffa cylindrical* Roem. in different placement time after fresh-cut

3 讨论

褐变的发生不仅对产品的外观、风味、营养和加工性能产生不利影响,而且还大大降低耐贮性,给果蔬产品的常规运输、贮藏及销售带来一系列的困难并造成严重的经济损失^[7,20],这种损失在个别易腐果蔬以及鲜切果蔬上高达50%^[21]。酚类物质是酶促褐变发生的必备条件之一,在高等植物中,酚类物质主要通过莽草酸途径进行生物合成,PAL催化苯丙氨酸脱氨形成肉桂酸等中间产物,随后转化形成各种酚类物质^[22]。目前,PAL基因的cDNA序列也已从黄瓜、蓖麻、花椰菜、龙眼、菜心、美洲南瓜等中成功获得^[23-28]。本研究利用RT-PCR和RACE技术,从丝瓜果实中获得一个*LcPAL*基因,其全长为2406 bp,具有完整的开放阅读框,共2145 bp,编码715个氨基酸。同源性分析发现*LcPAL*基因编码的蛋白具有较高的保守性,与黄瓜、香瓜等葫芦科蔬菜蛋白的相似性均在90%以上,与大豆、蒿柳等物种中氨基酸编码的蛋白相似性也均在80%以上。蛋白进化系统分析表明,丝瓜*LcPAL*与黄瓜和香瓜等葫芦科植物的PAL处于同一分支。Motif Scan分析显示,*LcPAL*编码的蛋白包含有PAL-HAL(60~525位)、PLN02457(8~715位)及phe_aml_yase(24~705位)3个保守结构域和1个酶活性中心序列(197~212位),属于典型的Lyase_I_Like超家族。Wolf Psort预测其亚细胞定位于叶绿体或内质网中。

有大量研究表明,PAL基因表达、PAL酶活性与果蔬褐变之间存在紧密的相关性^[29-31]。Z. G. Li等^[15]发现脐橙果实PAL活性变化以及*PAL2*基因的表达与果皮褐变具有非常密切的关系。闫洪波等^[12]对鸭梨PAL基因研究表明,PAL基因参与了鸭梨果实机械损伤造成的褐变。许传俊等^[14]研究表明蝴蝶兰外植体的PAL基因表达与蝴蝶兰外植体褐变过程相关。李义红^[32]发现大果水晶梨中PAL基因表达增强,是导致褐色果皮形成的原因之一。本研究中对普通丝瓜中PAL基因表达、PAL活性、总酚与丝瓜褐变的相关性进行了分析。不同品种中,*LcPAL*基因表达和PAL活性存在较大差异,6个普通丝瓜品种中的基因表达量和酶活性均高于2个有棱丝瓜品种,这可能是有棱丝瓜不易褐变的原因之一。普通丝瓜在采后储藏和鲜切后果肉易产生褐变,在4℃冷藏条件下,*LcPAL*基因表达在2d内呈持续升高趋势,其编码PAL酶的活性变化趋

势也基本一致,总酚含量也逐渐上升;在鲜切后25℃条件下,丝瓜褐变发生明显,*LcPAL*基因表达和PAL活性总体趋势呈先上升后下降趋势,2h时达到最大值,推测鲜切后*LcPAL*基因快速响应,在短时间PAL活性和总酚含量上升,促进褐变发生;褐变发生后,PAL活性逐渐降低,总酚消耗变缓,相关代谢达到平衡状态。以上研究表明,普通丝瓜*LcPAL*表达与果肉褐变的发生过程高度相关,*LcPAL*可能在普通丝瓜果肉褐变过程中发挥着重要作用。

参考文献

- [1] 李程斌,李恩,郑艳,等. 丝瓜藤和叶营养成分分析[J]. 安徽师范大学学报:自然科学版,2009,32(1):69-71
- [2] 颜国纲,郑振佳,时新刚,等. 丝瓜的营养价值及其综合利用研究进展[J]. 中国果菜,2011(7):35-36
- [3] 崔俊杰,宋建文,汪国平,等. 丝瓜种质资源亲缘关系的SRAP分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(6):1061-1066
- [4] 娄丽娜,刘哲,苏小俊. 普通丝瓜耐褐变研究进展[J]. 长江蔬菜,2015(4):1-4
- [5] 王成,王辉,娄丽娜,等. 普通丝瓜果肉褐变的鉴定方法[J]. 江苏农业科学,2012,40(11):137-138
- [6] 黄树苹,徐长城,谈杰,等. 不同影响因素下普通丝瓜果肉褐变度、多酚氧化酶活性及多酚质量比变化研究[J]. 西南大学学报,2015,37(9):31-36
- [7] Bustos M C, Mazzobre M F, Buera M P. Stabilization of refrigerated avocado pulp: effect of *Allium* and *Brassica* extracts on enzymatic browning[J]. Food Sci Technol, 2015, 61(1):89-97
- [8] Queiroz C, Lopes M M, Fialho E, et al. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control[J]. Food Rev Int, 2008, 24:361-375
- [9] Constabel C P, Barbehenn R. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. Induced plant resistance to herbivory[M]. Netherlands: Springer Science Business Media BV, 2008:253-270
- [10] Chang T S. An updated review of tyrosinase inhibitors[J]. Int J Mol Sci, 2009, 10:2440-2475
- [11] Ceymann M, Arrigoni E, Scharer H, et al. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile[J]. J Food Compos Anal, 2012, 26:128-135
- [12] 闫洪波,程玉豆,何近刚,等. 鸭梨PAL克隆及其在果实发育和机械伤害过程中的表达[J]. 中国农业科学,2014,47(21):4341-4348
- [13] 虞光辉,王桂平,王亮,等. 小麦PAL基因的克隆及赤霉菌诱导下的表达分析[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(5):1055-1061
- [14] 许传俊,李红,李玲. 蝴蝶兰叶片外植体褐变过程中PAL基因的表达变化[J]. 热带亚热带植物学报,2007,15(1):50-54
- [15] Li Z G, Gao X, Fan J, et al. The relationship between activity and gene expression of phenylalanine ammonia-lyase and peel pitting in 'Fengjie' navel orange fruits[J]. J Plant Physiol Mol Biol, 2006, 32(3):381-386
- [16] 温文旭,朱海生,温庆放,等. 超高效液相色谱法分析丝瓜酚类物质组分及其含量[J]. 园艺学报,2016,43(7):

- 1391-1401
- [17] 朱海生,庄尹宏,刘建汀,等. 丝瓜总酚提取和测定方法的优化[J]. 福建农业学报,2016,31(11):1204-1209
- [18] 庄尹宏. 丝瓜褐变分级与总酚及相关酶活性分析[D]. 福州:福建农林大学,2016
- [19] 朱海生,陈敏氢,温庆放,等. 丝瓜 18S *rRNA* 基因克隆及其作为内参基因的应用[J]. 核农学报,2016,30(1):35-41
- [20] Toivonen P M A, Brummell D A. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables[J]. *Postharvest Biol Technol*,2008,48:1-14
- [21] Yoruk R, Marshall M R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review[J]. *J Food Biochem*,2003,27(5):361-422
- [22] Diallinas G, Kanellis A K. A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit; cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding [J]. *Plant Mol Biol*,1994,26(1):473-479
- [23] Shang Q M, Li L, Dong C J. Multiple tandem duplication of the phenylalanine ammonia-lyase genes in *Cucumis sativus* L. [J]. *Planta*,2012,236(4):1093-1105
- [24] 江汉民,王楠,赵换,等. 花椰菜苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及黑腐病菌胁迫下的表达分析[J]. 南开大学学报:自然科学版,2012,45(4):87-92
- [25] 郑洁红,邱栋梁. 龙眼叶片 *PAL* 基因的克隆与表达研究[J]. 热带作物学报,2012,33(1):79-83
- [26] 高颖,李梦竹,冯紫洲,等. 蓖麻 *PAL* 基因片段的克隆与序列分析[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2013,28(2):179-182
- [27] 张鲁斌,朱世江,刘建双,等. 菜心苯丙氨酸解氨酶基因克隆与序列分析[J]. 西北植物学报,2010,30(12):2379-2384
- [28] 刘佳,徐秉良,薛应钰,等. 美洲南瓜 (*Cucurbita pepo*) 种皮苯丙氨酸解氨酶基因克隆与表达分析[J]. 中国农业科学,2014,47(6):1216-1226
- [29] 魏敏,周会玲,陈小利,等. 低温贮藏对鲜切富士苹果褐变的影响[J]. 西北林学院学报,2011,26(5):131-134
- [30] Nguyen T B T, Ketsa S, Van Doorn W G. Relationship between browning and the activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage [J]. *Postharvest Biol Technol*,2003,30(2):187-193
- [31] Kato M, Hayakawa Y, Hyodo H, et al. Wound induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima* [J]. *Plant Cell Physiol*,2000,41(4):440-447
- [32] 李义红. 大果水晶梨及其褐色果皮突变体 *pal* 基因克隆及表达分析[D]. 秦皇岛:河北师范科技学院,2013