

宋慕波, 帅良, 段振华, 等. 荸荠苯丙氨酸解氨酶基因的克隆和表达[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 77-83.

SONG Mubo, SHUAI Liang, DUAN Zhenhua, et al. Cloning and expression of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) gene in Chinese water chestnut[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(1): 77-83.

荸荠苯丙氨酸解氨酶基因的克隆和表达

宋慕波^{1,2}, 帅良^{1,2}, 段振华^{1,2}, 覃丽¹, 李淋¹, 陈振林¹, 方方^{1,2}

(1 贺州学院 食品科学与工程技术研究院, 广西贺州 542899; 2 广西果蔬保鲜和深加工人才小高地, 广西贺州 542899)

摘要:【目的】克隆荸荠 *Eleocharis tuberosa* 苯丙氨酸解氨酶基因 (*PAL*), 分析其序列特征及其在荸荠不同组织和鲜切荸荠贮藏过程中的表达情况, 为揭示鲜切荸荠黄化机理提供理论依据。【方法】通过 RT-PCR 和 RACE 技术从荸荠中克隆 *PAL* 基因的 cDNA 全长, 采用生物信息学方法对其序列和所编码的蛋白进行预测分析, 利用荧光定量 PCR 技术分析 *PAL* 基因在荸荠不同组织和鲜切荸荠贮藏过程中的表达情况。【结果】克隆得到荸荠 *PAL* 基因全长 cDNA, 将其命名为 *CwPAL*, 该序列长度为 2 485 bp, 含有 1 个 2 142 bp 的完整开放阅读框, 共编码 713 个氨基酸。*CwPAL* 蛋白分子式为 $C_{3437}H_{5514}N_{944}O_{1058}S_{34}$, 相对分子质量为 78 079, 等电点为 5.97, 原子总数为 10 987 个。*CwPAL* 包含 *PAL*-*HAL* 和 *PLN02457* 结构域及典型的 *PAL* 酶活性中心序列 (GTITASGDLVPLSYIAG)。*CwPAL* 的二级结构以 α -螺旋为主, 其三维结构模型呈典型的“海马状”结构。系统进化分析表明, *CwPAL* 与菠萝 *Ananas comosus* 和海枣 *Phoenix dactylifera* 的 *PAL* 蛋白亲缘关系较近。荧光定量 PCR 分析表明, *CwPAL* 基因在荸荠皮中的表达量最高, 鲜切荸荠贮藏过程中 *CwPAL* 基因表达量快速上升, 水杨酸处理显著抑制了 *CwPAL* 基因的表达。【结论】*CwPAL* 属于典型的苯丙氨酸解氨酶家族, 该基因可能通过调控苯丙烷代谢从而影响鲜切荸荠的黄化。

关键词: 荸荠; 苯丙氨酸解氨酶; 基因克隆; 表达分析; 黄化; 水杨酸

中图分类号: S645.3; TS255.36

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)01-0077-07

Cloning and expression of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) gene in Chinese water chestnut

SONG Mubo^{1,2}, SHUAI Liang^{1,2}, DUAN Zhenhua^{1,2}, QIN Li¹, LI Lin¹, CHEN Zhenlin¹, FANG Fang^{1,2}

(1 Institute of Food Science and Engineering Technology, Hezhou University, Hezhou 542899, China; 2 Guangxi Talent Highland of Preservation and Deep Processing Research in Fruit and Vegetables, Hezhou 542899, China)

Abstract: 【Objective】To clone full-length cDNA of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) in Chinese water chestnut (*Eleocharis tuberosa*), investigate its sequence characteristics, analyze its expressions in different organs and during storage of fresh-cut *E. tuberosa*, and provide theoretical references for revealing the mechanism of *E. tuberosa* etiolation. 【Method】The full sequence of *PAL* gene was cloned from *E. tuberosa* by RT-PCR and RACE techniques. Bioinformatics method was used to analyze the cDNA sequence and the encoded amino acid sequence. Real-time PCR was used to analyze the expression profile of *PAL* gene in different organs and in fresh-cut *E. tuberosa* during storage. 【Result】The full-length cDNA of *PAL* gene in *E. tuberosa* was cloned and named *CwPAL*. The sequence consists of 2 485 bp with an intact open reading frame of 2 142 bp, encoding a polypeptide of 713 amino acids. The formula of *CwPAL* protein is

收稿日期: 2018-04-09 网络首发时间: 2018-12-28 14:38:00

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20181227.1104.006.html>

作者简介: 宋慕波 (1986—), 男, 副研究员, 博士, E-mail: songmubol@163.com; 通信作者: 方方 (1985—), 女, 讲师, 博士, E-mail: Hellenff@163.com

基金项目: 广西自然科学基金 (2017GXNSFAA198082, 2015GXNSFBA139082); 广西特聘专家专项经费资助 (厅发 [2016]21 号)

C₃₄₃₇H₅₅₁₄N₉₄₄O₁₀₅₈S₃₄, the relative molecular weight is 78 079, pI is 5.97, and the total number of atoms is 10 987. CwPAL protein contains two functional domains including PAL-HAL and PLN02457, and the typical PAL active site sequence (GTITASGDLVPLSYIAG). The main structural element in CwPAL secondary structure is α -Helix, the three-dimension structure of CwPAL protein shows a typical “sea horse” shape. The phylogenetic analysis showed that CwPAL was very closely related to PAL proteins of *Ananas comosus* and *Phoenix dactylifera*. The Q-PCR analysis showed that the expression level of CwPAL gene was the highest in peel, CwPAL gene expression quickly increased during storage of fresh-cut *E. tuberosa*, and salicylic acid treatment significantly inhibited CwPAL gene expression. 【Conclusion】 The cloned CwPAL gene is a typical member of PAL family, and CwPAL gene may affect *E. tuberosa* etiolation by regulating the phenylpropanoid pathway.

Key words: *Eleocharis tuberosa*; phenylalanine ammonia-lyase; gene cloning; expression analysis; etiolation; salicylic acid

荸荠 *Eleocharis tuberosa* 别名马蹄、地栗、乌芋等,是非常受欢迎的莎草科水生蔬菜^[1]。荸荠的肉质球茎去皮后可食用,肉质清甜,口感爽脆。荸荠皮比较坚硬,洗净和削皮不易,因此卫生、方便的鲜切荸荠产品更易被消费者接受。然而,荸荠去皮后出现的黄化现象,严重影响了鲜切荸荠的品质^[2]。鲜切荸荠表面黄化与传统的果蔬褐变不同,黄色物质主要由苯丙烷代谢中间产物柚皮素和圣草酚组成,而不是醌类物质^[3]。因此,控制鲜切荸荠贮藏过程中的苯丙烷代谢是控制其黄化的关键。苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 位于苯丙烷代谢途径的入口,是该代谢途径重要的限速酶,与植物组织中黄酮类物质的积累密切相关^[4]。鉴于此,从荸荠中克隆 PAL 基因,分析其结构特征、功能及其在荸荠不同组织中的表达特征,对研究鲜切荸荠黄化机制有重要意义。

PAL 最早在大麦幼苗中被分离得到^[5]。随后的大量研究表明 PAL 活性的提高与果蔬黄酮类物质积累密切相关,同时参与了对干旱、强光、冷害、病害、机械损伤等逆境的响应,在水杨酸和乙烯信号转导途径中受到复杂的调控^[6-7]。果蔬机械损伤后,受伤组织的 PAL 活性会迅速升高,促进伤口的木质化及愈合^[8-9]。机械伤诱导 PAL 酶活力很可能是通过调控其编码基因合成新酶实现的。伤害信号可诱导生菜 PAL 基因表达,增加酶的合成量,导致其酶活力的提高,从而导致酚类物质的积累^[10]。Campos 等^[11]研究发现,机械伤可诱导莴苣 PAL 基因表达上调,热处理抑制 PAL 活性是通过抑制其编码基因的表达实现的,认为机械伤信号通过转录水平的调控来影响 PAL 活性。在组织培养过程中,切割伤害也可诱导 PAL 基因表达,从而导致叶片外植体的黄化^[12-13]。因此,鲜切荸荠黄化可能与机械伤诱导对 PAL 基因转录水平的调控密切相关。目前, PAL 基

因已经从龙眼^[14]、水稻^[15]、甘蔗^[16]、黄瓜^[17]和南瓜^[18]等植物中克隆得到,并对其表达特性进行了分析,但尚未在荸荠中克隆得到 PAL 基因。

PAL 是苯丙烷代谢的限速酶,在鲜切荸荠黄化过程中可能起到关键作用,但荸荠中尚未见 PAL 基因的相关研究报道。本研究通过克隆荸荠 PAL 基因全长,并对其蛋白结构和功能进行生物信息学预测分析,运用荧光定量 PCR 分析其在荸荠不同组织及其在鲜切荸荠贮藏过程中的表达特征,为后续该基因的功能机制研究和鲜切荸荠黄化机理研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

荸荠在 2016 年 12 月 10 日购于广西壮族自治区贺州市八步区农产品市场。原料运回实验室经清洗,挑选大小均一和无机械损伤、无病虫害的果实,去皮后横切成厚度为 0.5 cm 的圆片,然后用 10 g·L⁻¹ 次氯酸钠溶液杀菌 10 min,样品分成 2 组,对照组在清水中浸泡 10 min,处理组在 10 mmol·L⁻¹ 水杨酸水溶液中浸泡 10 min,样品晾干后置于塑料托盘中用 0.02 mm 聚乙烯保鲜膜包装,于 10 °C 条件下贮藏。在贮藏 0(处理前)、2、4、6、8、10、12 d 后分别取样,将样品放入 -80 °C 超低温冰箱保存,用于后续基因克隆和表达分析。另取未做处理的健康荸荠植株的根、叶、皮和肉各组织样品用液氮速冻,置于 -80 °C 条件下保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 荸荠总 RNA 提取 采用华越洋植物 RNA 提取试剂盒提取荸荠果肉总 RNA,具体方法按照说明书进行。得到 RNA 后通过 10 g·L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳和 K5600 超微量分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司)测定其纯度和含量, RNA 样品保存于

-80 °C 超低温冰箱中, 用于反转录等后续试验。

1.2.2 荸荠果肉 PAL 基因克隆 3' RACE-cDNA 和 5' RACE-cDNA 的合成具体操作按照 SMARTer RACE 5'/3' Kit RACE(TaKaRa) 试剂盒说明书进行。根据之前从荸荠转录组数据中得到的 PAL 基因片段设计 3' RACE 引物 (5'-AGTTAATGACAA TCCTCTGATCGATG-3') 和 5' RACE 引物 (5'-TTGTAGAAATCATTGACAAGCTCAGA-3')。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 1.5 min; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2.5 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 产物于 4 °C 条件下保存。PCR 产物经回收、连接 (pRACE vector)、转化 (Stellar 感受态细胞)、重组子筛选及菌液 PCR 鉴定后, 测序委托华大基因科技股份有限公司进行。测序结果应用 DNAMAN 软件和 NCBI 在线工具对荸荠 PAL 基因进行序列基本结构和特征分析。

根据拼接得到的基因全长核苷酸序列设计全长 PAL 基因正向引物 5'-CATCGCCGCTAAATTA GTTTACAA-3', 反向引物 5'-AAACAAGAAAGG AATTTATTCTA-3'。以反转录 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 经检测和测序获得全长序列。

1.2.3 荸荠 PAL 基因生物信息学分析 采用 NCBI 中的 BLASTn 和 BLASTp 程序进行核苷酸及氨基酸序列的比对; 采用 NCBI ORF finder 程序寻找开放阅读框; 利用 ProtParam Tool 分析蛋白质理化性质; 采用 NCBI 的 Conserved Domains 和 BLASTp 分析氨基酸序列的保守区域; 采用 TargetP 1.1 Server 进行氨基酸序列导肽的分析; 采用 SignalP 4.0 Server 预测蛋白的信号肽; 采用 TMHMM Server v.2.0 分析氨基酸跨膜结构域; 采用 Post Prediction 和 WOLF PSORT 进行蛋白亚细胞定位信号预测; ProtScale 以 Hphob./Kyte& Doolittle 算法进行亲疏水性预测; 使用 NetPhos 2.0 Server 预测蛋白质序列的磷酸化位点; 使用 Motif Scan 软件分析蛋白质功能结构域; 使用 ExPaSy-SOPMA 软件分析蛋白质的二级结构; 使用 Clustal X 软件进行多重比对分析; 采用 Mega 5 软件进行系统进化树构建; 采用 SWISS-MODEL 预测蛋白质三级结构。

1.2.4 荸荠 PAL 基因的表达分析 根据获得的荸荠 PAL 基因序列利用 Primer 5.0 设计 Q-PCR 正向引物 5'-AGTTAATGACAATCCTCTGATCGATG-3' 和 Q-PCR 反向引物 5'-TTGTAGAAATCATT GACAAGCTCAGA-3'。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit 去除基因组和反转录试剂盒 (TaKaRa) 合成各样品 Q-PCR 的模板 cDNA, 操作方法见说明

书。参考 TaKaRa 公司的 SYBR Green qPCR Master Mix 说明书进行 Real-time PCR 扩增。以 18s rRNA (登录号: MG742686) 为内参。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算鲜切荸荠 PAL 基因在贮藏过程中的相对表达量。各样品的基因相对表达量均为 3 次生物重复的平均值。

1.2.5 数据分析 利用 SPSS23 软件 Duncan's 法对数据进行差异显著性分析, 利用 Origin8.5.1 进行图表制作。

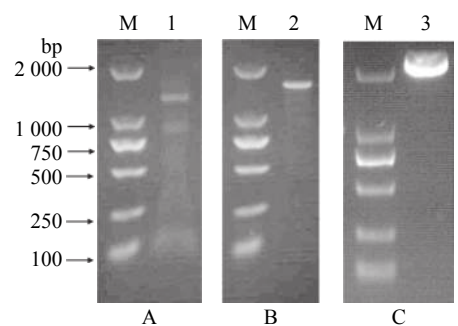
2 结果与分析

2.1 荸荠 PAL 基因全长 cDNA 的克隆

在荸荠转录组数据库中筛选得到与其他植物 PAL 基因相似性较高的荸荠序列片段 642 bp。利用 NCBI 的 BLASTn 进行比对, 结果显示, 该序列与其他植物 PAL 基因序列的相似度较高, 其中与芭蕉 *Musa acuminata*(KF594428.1) 的相似度最高, 为 81%。因此, 初步判断该序列为荸荠 PAL 基因的片段。

根据上述片段设计 3'RACE 和 5'RACE 引物, 以荸荠果肉总 RNA 反转录的 cDNA 为模板进行 PCR。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 获得了 3'RACE 产物约 1 400 bp(图 1A), 5' RACE 产物约 1 600 bp(图 1B)。将片段回收并进行测序分析发现 3'端序列长度为 1 224 bp, 包含了 3'非翻译区 (3' UTR) 及 poly A 结构; 5'端序列长度为 1 429 bp 包含了 5'非翻译区 (5' UTR)。将 3'和 5'端序列拼接后得到基因全长序列, 在拼接序列的 5'端和 3'端设计引物扩增 PAL 的全长序列 (图 1C), 测序结果显示, 该序列与拼接结果一致。

利用 ORF Finder 软件对克隆得到的全长序列进行分析。该序列长度为 2 485 bp, 含有 1 个 2 142 bp



M: DL2000 DNA marker; 1: 3'-RACE 产物; 2: 5'-RACE 产物; 3: 全长序列

M: DL2000 DNA marker; 1: 3'-RACE product; 2: 5'-RACE product; 3: full-length product

图 1 荸荠果肉 *CwPAL* 基因序列扩增产物的电泳图
Fig. 1 Electrophoresis of amplified products of *CwPAL* gene sequence from *Eleocharis tuberosa* pulp

的最大开放阅读框 (ORF)、131 bp 的 5' UTR 区、184 bp 的 3' UTR 区及 28 bp 的 polyA 结构。序列的起始密码子 ATG 位于第 132~134 位, 终止密码子为 TAG, 其终止密码子之后有保守序列 AATAAA, 为链的切断和多聚腺苷酸化提供信号。将该基因编码区全长序列在 NCBI 上进行比对, 发现该序列与海枣 *Phoenix dactylifera* (XM_008787032.2, XM_008806995.2)、芭蕉 *M. acuminata* (EU856393.1) 和菠萝 *Ananas comosus* (XM_020257858.1) 的 PAL 基因相似度较高, 均大于 73%。因此, 可证明已经克隆获得荸荠 PAL 基因, 将此基因命名为 CwPAL, 在 GenBank 上的登录号为 MG719236。

2.2 CwPAL 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 CwPAL 蛋白的理化性质

CwPAL 基因编码的蛋白由 713 个氨基酸组成。利用 ProtParam 在线软件预测 CwPAL 蛋白的理论等电点为 5.97, 相对分子量为 78 079, 总原子数为 10 987 个, 分子式为 $C_{3437}H_{5514}N_{944}O_{1058}S_{34}$ 。组成蛋白质所用的氨基酸占比较高的为亮氨酸 (Leu)、丙氨酸 (Ala)、丝氨酸 (Ser) 和谷氨酸 (Glu), 分别占比为 10.4%、8.1%、7.9% 和 7.6%。蛋白的亲水性平均系数为 -0.187, 脂溶指数为 89.19。

2.2.2 CwPAL 蛋白的功能结构域

CwPAL 基因编码氨基酸序列包含 PLN02457、PAL-HAL 结构域, 属于 Lyase_I_Like 超家族。CwPAL 蛋白含有苯丙氨酸和组氨酸解氨酶的酶活中心, 位于 195~211 aa, 序列为 GTITASGDLVPLSYIAG。此外, 还含有 9 个酪蛋白激酶 II 识别位点, 位于 11~14、18~21、35~38、82~85、140~143、377~380、600~603、417~620 和 677~680 aa, 10 个蛋白激酶 C 识别位点位于 18~20、51~53、82~84、115~117、140~142、214~216、302~304、494~496、532~534 和 633~635 aa, 12 个 N-豆蔻酰化位点位于 106~111、136~141、195~200、211~216、239~244、258~263、310~315、395~400、435~440、454~459、470~475 和 491~496 aa, 以及 2 个糖基化位点位于 257~260 和 439~442 aa。利用 TMHMM Server 2.0 预测显示 CwPAL 没有跨膜区域, 为非跨膜蛋白。

2.2.3 CwPAL 蛋白的磷酸化位点

蛋白质的磷酸化是一种重要的蛋白翻译后修饰方式。利用 NetPhos 软件预测 CwPAL 蛋白的磷酸化位点。结果显示, CwPAL 蛋白以丝氨酸磷酸化占主导地位, 共有 25 个丝氨酸 (Ser)、12 个苏氨酸 (Thr) 和 7 个酪氨酸 (Tyr) 磷酸化位点, 其中 S_{18} 预测得分最高, 为 0.996。

2.2.4 CwPAL 蛋白导肽、信号肽及亚细胞定位

预测结果显示, CwPAL 属于非分泌蛋白, 其中不含有叶绿体转运肽、线粒体目标肽及分泌途径信号肽。利用 WOLF PSORT 和 Post Prediction 对 CwPAL 进行亚细胞定位预测, 发现 CwPAL 蛋白定位于内质网和细胞质的可能性最大。

2.2.5 CwPAL 蛋白的二级和三级结构预测

CwPAL 蛋白的二级结构中最主要的结构是 α -螺旋占 48.11%, 其分散于整个蛋白质中。其他结构中无规则卷曲占 28.75%, 延伸链占 13.46%, β -折叠占 9.68%。利用 Swiss-model 对 CwPAL 蛋白的三级结构进行预测, CwPAL 蛋白三级结构由软件自动匹配以香芹 *Petroselinum crispum* 的 PcPAL 蛋白 (PDB No. 1W27.1) 为参照进行构建, 与参考模板相似性为 80.65%。CwPAL 蛋白的三级结构具有典型的“海马状”结构, 包含 MIO domain、Core domain 和 Shielding domain 3 个结构域。

2.2.6 CwPAL 蛋白的多重比对和系统进化树的构建

通过与其他植物 CwPAL 蛋白比对发现不同 PAL 蛋白功能区域的氨基酸序列较为保守, 酶活性中心位点序列高度保守, 均为 GTITASGDLVPLSYIAG。可见苯丙氨酸解氨酶作为植物苯丙烷类化合物生物合成途径中的限速酶, 在进化的过程中保持了较高的遗传稳定性。为了了解 CwPAL 蛋白与其他植物 PAL 蛋白的进化关系, 用 ClustalX 软件进行氨基酸序列比对, 采用 MEGA 5 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树 (图 2)。结果表明, CwPAL 蛋白与海枣 (XP_008805217.1) 和菠萝 (OAY76951.1) 的 PAL 蛋白亲缘关系较近。

2.3 CwPAL 基因在荸荠不同组织中的表达

采用荧光定量 PCR 技术分析 CwPAL 基因在根、叶、荸荠皮和荸荠肉中的表达特征。结果表明, CwPAL 基因在 4 个组织中均有表达, 但表达量有显著差异 ($P < 0.05$), 其中荸荠皮中的表达水平最高, 其次是根, 而在荸荠肉中的表达最低 (图 3)。

2.4 CwPAL 基因在鲜切荸荠贮藏过程中的表达

鲜切荸荠在贮藏过程中, 对照组 CwPAL 基因在贮藏 2 d 后比贮藏 0 d 的表达量提高了 145.6 倍, 之后表达量继续升高, 贮藏 6 d 后表达量逐渐下降, 但在 12 d 后 CwPAL 基因的表达水平仍显著高于 0 d ($P < 0.05$) (图 4)。10 mmol·L⁻¹ 水杨酸处理能够显著抑制荸荠黄化, 通过表达分析发现, 水杨酸处理组 CwPAL 基因的表达量在贮藏过程中呈先上升后下降的趋势, 在贮藏过程中各时间点均显著低于对照组 ($P < 0.05$) (图 4)。

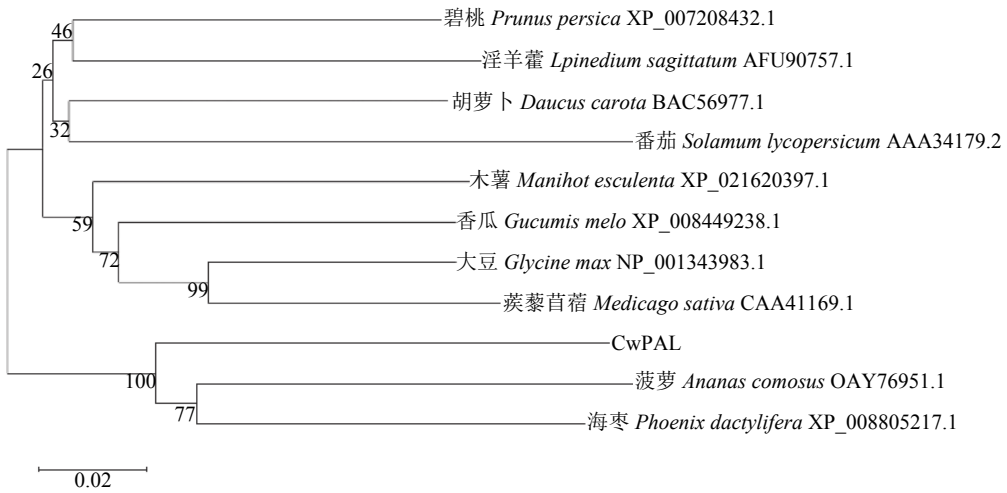


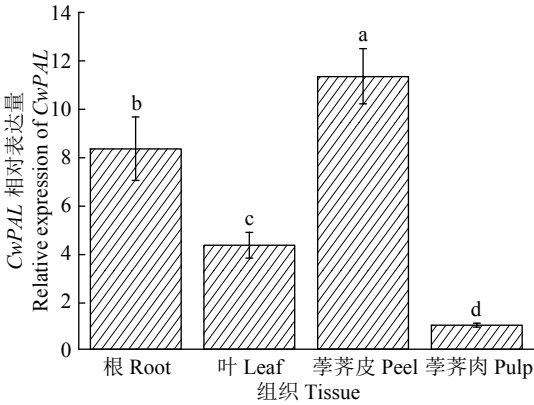
图 2 CwPAL 蛋白与其他植物 PAL 蛋白的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of CwPAL protein and PAL proteins from other plants

3 讨论与结论

表面黄化是影响鲜切荸荠贮藏品质的关键因素。鲜切荸荠的黄化现象与传统多酚氧化酶 (Polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶 (Peroxidase, POD) 参与的酶促褐变不同, 苯丙烷代谢途径中间产物柚皮素和圣草酚的积累可能是导致鲜切荸荠黄化的原因^[3]。苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是苯丙烷代谢的关键酶, 其活性的高低直接影响下游黄酮类物质的合成^[19]。但在荸荠中对 PAL 的研究主要集中在不同处理对鲜切荸荠贮藏过程中 PAL 酶活性的影响, 未见有荸荠 PAL 基因全长克隆及其表达特性研究的报道。本研究在荸荠转录组数据库发现了 1 个与其他植物中 PAL 相似性较高的基因片段, 通过比对初步推测其为荸荠的 PAL 基因, 随后通过 RACE 技术从荸荠中克隆得到了 PAL 全长序列。该序列全长为 2 485 bp, 含有 1 个 2 142 bp 的 ORF, 可编码 713 个氨基酸, 相对分子质量为 78 079, 将其命名为 CwPAL。其编码的氨基酸长度与尾叶桉^[20]、象草^[21]相似, 而明显长于南瓜中的 PAL 蛋白^[18]。PAL 基因在高等植物中多以基因家族形式出现, 淫羊藿中有 3 个 PAL 基因, 分别涉及木质素、花青素和黄酮的合成^[22]。拟南芥中的 4 个 PAL 基因在不同器官中的表达量不同^[23]。然而, 在象草中只克隆得到了 1 个 PAL 基因^[21]。本研究在荸荠转录组数据中只筛选得到了 1 个 PAL 基因片段, 因此, 荸荠中是否存在 PAL 基因家族, 仍需进一步研究。

对 CwPAL 编码蛋白进行生物信息学分析发现其含有苯丙氨酸和组氨酸解氨酶的保守酶活性位点 (GTITASGDLVPLSYIAG), 此外还含有 9 个酪蛋白激酶 II 识别位点, 10 个蛋白激酶 C 识别位点, 12 个 N-豆蔻酰化位点, 及 2 个糖基化位点。CwPAL

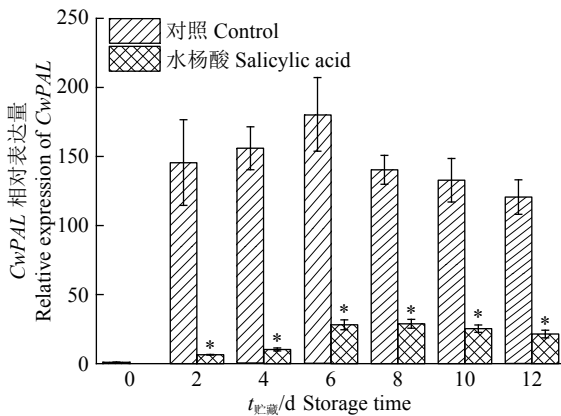


图中数据为 3 次重复的平均值±标准差, 柱子上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's s 法)

The data were $\bar{x} \pm SD$, and different lowercase letters on bars indicated significant difference ($P < 0.05$, Duncan's test)

图 3 CwPAL 基因在荸荠中的组织特异性表达

Fig. 3 Tissue-specific expression of CwPAL gene in *Eleocharis tuberosa*



图中数据为 3 次重复的平均值±标准差, “*”表示与相同贮藏时间的对照差异显著 ($P < 0.05$, t 检验)

The data were $\bar{x} \pm SD$, and bar with “*” was significantly different from control at the same storage time ($P < 0.05$, t test)

图 4 鲜切荸荠在贮藏过程中 CwPAL 基因表达的变化

Fig. 4 Changes of CwPAL gene expression during the storage process of fresh-cut *Eleocharis tuberosa*

蛋白中这些保守位点及其分布情况与甘蔗^[16]和玉米^[24]的 PAL 非常相似。CwPAL 同源建模结果与 Calabrese 等^[25]利用射线晶体分析法得到的 PAL 三维结构相似,均为四聚体结构,形成典型“海马状”结构。植物的 PAL 为同源四聚体,每个亚基与另外 2 个亚基头尾相连,增强了邻近亚基的相互作用^[26]。蛋白多重比对结果显示,荸荠 CwPAL 编码的氨基酸序列与其他物种 PAL 蛋白具有较高的相似性,特别是苯丙氨酸解氨酶和组氨酸解氨酶标签序列有高度的保守性。进化树分析发现,CwPAL 与菠萝和海枣 PAL 蛋白亲缘关系最近,同时发现不同植物的 PAL 间也有很高的相似性,表明 PAL 作为苯丙烷代谢途径的第 1 个关键酶在进化过程中保持了较高的遗传稳定性。

PAL 基因在植物中的表达水平与木质素的合成和黄酮类物质的积累密切相关。本试验利用荧光定量分析 CwPAL 基因在不同组织中的表达特性发现,其在荸荠皮中的表达量最高,而在荸荠肉中的表达量最低。荸荠皮中含有大量的黄酮类物质,如柚皮素、圣草酚、木犀草素等^[27]。因此,推测 CwPAL 可能参与了荸荠皮中黄酮类物质的合成过程。本试验发现,经切分处理后 PAL 基因的表达量迅速提高,与荸荠表面黄化表现出了明显的相关性。这表明切分处理可能快速诱导 PAL 基因的表达,从而增加了 PAL 新酶的合成,导致苯丙烷代谢途径下游黄色产物的积累。以往研究发现,红花在损伤 3 h 后即可诱导 CiPAL 的表达^[28]。PAL 基因对伤害信号的响应在鸭梨^[8]、甜瓜^[29]和萝卜^[30]等植物的研究中也得到证实。水杨酸 (Salicylic acid, SA) 可以诱导植物苯丙烷途径中 PAL 和 C4H 等关键酶编码基因的表达和激发新酶合成,提高果蔬抗性^[31]。然而,在采后竹笋^[32]、菠萝^[33]和石榴^[34]的研究中发现外源施用水杨酸可以抑制 PAL 活性的上升和酚类物质的积累,并延缓褐变的发生。因此,水杨酸对植物 PAL 酶活的影响较为复杂。Peng 等^[35]利用水杨酸处理有效地抑制了鲜切荸荠贮藏过程中的 PAL 酶活力上升和表面黄化,但并不清楚水杨酸抑制 PAL 酶活力的机理。本试验发现,10 mmol·L⁻¹ 水杨酸处理显著抑制了鲜切荸荠的黄化和贮藏过程中 CwPAL 基因的表达。可见,切分处理造成的机械损伤诱导 PAL 基因表达可能是鲜切荸荠黄化的主要原因。

参考文献:

- [1] 潘永贵,陈维信. 鲜切荸荠中黄化物质研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(2): 33-36.
- [2] PENG L T, JIANG Y M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut[J]. LWT-Food Sci Technol, 2003, 36(3): 359-364.
- [3] PAN Y G, Li Y X, YUAN M Q. Isolation, purification and identification of etiolation substrate from fresh-cut Chinese water-chestnut (*Eleocharis tuberosa*)[J]. Food Chem, 2015, 186: 119-122.
- [4] HUANG J, GU M, LAI Z, et al. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress[J]. Plant Physiol, 2010, 153(4): 1526-1538.
- [5] KOUKOL J, CONNE E. The metabolism of aromatic compounds in higher plants[J]. J Bio Chem, 1961, 236(10): 2692-2698.
- [6] ZHANG X, LIU C J. Multifaceted regulations of gateway enzyme phenylalanine ammonia-lyase in the biosynthesis of phenylpropanoids[J]. Mol Plant, 2015, 8(1): 17-27.
- [7] DIXON R A, PAIVAN L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism[J]. Plant Cell, 1995, 7(7): 1085-1097.
- [8] 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.
- [9] SALTVEIT M E. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock[J]. Postharvest Biol Tec, 2000, 21(1): 61-69.
- [10] LOPEZ G, SALTVEIT M E, CANTWELL M. Wound-induced phenylalanine ammonia lyase activity: Factors affecting its induction and correlation with the quality of minimally processed lettuce[J]. Postharvest Biol Tec, 1996, 9(2): 223-233.
- [11] CAMPOS-VARGAS R, NONOGAKI H, SUSLOW T, et al. Heat shock treatments delay the increase in wound-induced phenylalanine ammonia-lyase activity by altering its expression, not its induction in Romaine lettuce (*Lactuca sativa*) tissue[J]. Physiol Plantarum, 2005, 123(1): 82-91.
- [12] RU Z W, LAI Y Y, XU C J, et al. Polyphenol oxidase (PPO) in early stage of browning of phalaenopsis leaf explants[J]. J Agr Sci, 2013, 5(9): 57-64.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] GIBERTI S, BERTEA C M, NARAYANA R, et al. Two phenylalanine ammonia lyase isoforms are involved in the elicitor-induced response of rice to the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*[J]. J Plant Physiol, 2012, 169(3): 249-254.
- [16] 宋修鹏,黄杏,莫凤连,等. 甘蔗苯丙氨酸解氨酶基因 (PAL) 的克隆和表达分析[J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2856-2868.
- [17] SHANG Q M, LI L, DONG C J. Multiple tandem duplic-

- ation of the phenylalanine ammonia-lyase genes in *Cucumis sativus*, L[J]. *Planta*, 2012, 236(4): 1093-1105.
- [18] 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.
- [19] YIN R, MESSNER B, FAUSKESSLER T, et al. Feedback inhibition of the general phenylpropanoid and flavonol biosynthetic pathways upon a compromised flavonol-3-O-glycosylation[J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(7): 2465-2478.
- [20] 潘文, 张卫华, 杨会肖, 等. 尾叶桉苯丙氨酸解氨酶基因的克隆、表达与单核苷酸多态性分析[J]. *华南农业大学学报*, 2018, 39(2): 89-94.
- [21] 陈卫卫, 唐然, 吴昱煜, 等. 象草 PAL 基因克隆及其蛋白质结构与功能预测[J]. *草地学报*, 2016, 24(1): 137-145.
- [22] 郭新红, 喻达时, 王婕, 等. 6 种植物中木质纤维素含量的比较研究[J]. *湖南大学学报(自科版)*, 2008, 35(9): 76-78.
- [23] COCHRANEF C, DAVINL B, LEWISN G. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: Kinetic characterization of the four PAL isoforms[J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(11): 1557-1564.
- [24] RÖSLER J, SCHMID J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity[J]. *Plant Physiol*, 1997, 113(1): 175-179.
- [25] CALABRESEJ C, JORDAN D B, BOODHOO A, et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: Multiple helix dipoles implicated incatalysis[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(36): 11403-11416.
- [26] RITTER H, SCHULZG E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(12): 3426-3436.
- [27] LUO Y, LI X, HE J, et al. Isolation, characterisation, and antioxidant activities of flavonoids from chufa (*Eleocharis tuberosa*) peels[J]. *Food Chem*, 2014, 164(3): 30-35.
- [28] DEGHAN S, SADEGHI M, PÖPPEL A, et al. Differential inductions of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase during wounding, salicylic acid treatment, and salinity stress in safflower, *Carthamus tinctorius*[J]. *Bioscience Rep*, 2014, 34(3): 689-699.
- [29] 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.
- [30] BECERRA-MORENO A, REDONDO-GIL M, BENAVIDES J, et al. Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot[J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 836-837.
- [31] CHEN J Y, WEN P F, KONG W F, et al. Effect of salicylic acid on phenylpropanoids and phenylalanine ammonia-lyase in harvested grape berries[J]. *Postharvest Biol Tech*, 2006, 40(1): 64-72.
- [32] LUO Z, WU X, XIE Y, et al. Alleviation of chilling injury and browning of postharvest bamboo shoot by salicylic acid treatment[J]. *Food Chem*, 2012, 131(2): 456-461.
- [33] LU X, SUN D, LI Y, et al. Pre- and post-harvest salicylic acid treatments alleviate internal browning and maintain quality of winter pineapple fruit[J]. *Sci Hortic-Ams-terdam*, 2011, 130(1): 97-101.
- [34] SAYYARI M, BABALAR M, KALANTARI S, et al. Effect of salicylic acid treatment on reducing chilling injury in stored pomegranates[J]. *Postharvest Biol Tec*, 2009, 53(3): 152-154.
- [35] PENG L T, JIANG Y M. Exogenous salicylic acid inhibits browning of fresh-cut Chinese water chestnut[J]. *Food Chem*, 2006, 94(4): 535-540.

【责任编辑 庄 延】