

孙新菊. 低温处理下白玉菇丝氨酸蛋白酶的活性及分子特征[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 270–272.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.090

低温处理下白玉菇丝氨酸蛋白酶的活性及分子特征

孙新菊

(南京特殊教育师范学院, 江苏南京 210038)

摘要:白玉菇(*Hypsizygus marmoreus*)是真姬菇的白色品种,其营养价值丰富,具有独特的蟹香味。为延长白玉菇的货架期,对其进行低温处理,并研究在贮藏过程中丝氨酸蛋白酶活性及分子特征的变化。研究结果显示,白玉菇在低温(4℃)处理下可保鲜 5 d,而在常温(25~28℃)下保鲜时间则很短(1~2 d);对白玉菇贮藏过程中丝氨酸蛋白酶的活性及 *Spr* 基因表达的研究表明:低温处理下丝氨酸蛋白酶的活性及基因的表达都明显低于对照。研究结果说明,白玉菇的货架期与丝氨酸蛋白酶活性密切相关。

关键词:白玉菇;低温处理;丝氨酸蛋白酶;*Spr* 基因表达;分子特征

中图分类号: S646.909⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0270-03

白玉菇味比平菇鲜,肉比滑菇厚,质比香菇韧,口感极佳,还具有独特的蟹香味。白玉菇的蛋白质中氨基酸种类齐全,包括 8 种人体必需氨基酸,其菇体洁白如玉,质地细腻,是一种低热量、低脂肪的保健食品^[1]。

在食用菌贮藏过程中,会受到温度、水分、采收时期、气体环境、病原菌感染及有氧呼吸等的影响而出现失重、菌柄生长、菌伞开张、菌褶发育、菌盖伸展、孢子形成与弹射、纤维素化、组织呈水浸状、褐变以及品质下降等现象^[2],这些症状的产生与食用菌的生理代谢及其分子机理密切相关。食用菌储藏过程中,蛋白质的降解会引起细胞结构及生理功能的变化,还会引起氨基酸含量的升高,正是氨基酸含量及组成的变化造成了食用菌风味的变化^[3]。丝氨酸蛋白酶是一类以丝氨酸为活性中心的重要蛋白水解酶,广泛分布于植物中,在生物有机体中起着重要而广泛的生理作用^[4-5]。目前已经从茺荂、欧芹、双孢菇等植物中分离到了不同类型的丝氨酸蛋白酶,其活性随着植物生长发育阶段的不同而变化。Azeez 等研究发现,在唐菖蒲的衰老过程中丝氨酸蛋白酶的活性不断提高^[6];Roberts 等采用蛋白酶单一抑制剂的检测方法在衰老的大麦叶片中和暗诱导衰老的大麦叶片中发现 2 种丝氨酸蛋白酶^[7]。多种植物的衰老过程都与丝氨酸蛋白酶活性的不断提高相关,如大麦、鸢尾、欧芹、月季、木樨和双孢菇等^[4-11]。

为延长白玉菇的货架期,本研究对其进行低温处理,并研究在贮藏过程中丝氨酸蛋白酶活性及分子特征的变化。通过对白玉菇丝氨酸蛋白酶活性的测定及 *Spr* 基因表达的研究,不仅有助于揭示白玉菇采后品质变化的分子机制,并可为调控白玉菇采后保鲜提供新途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料来自当地超市刚刚上架的白玉菇,并在 1 h 内

拿到实验室,选择没有机械损伤、疾病以及形状、颜色均匀的作为试验材料(图 1-a)。试验材料分为 2 组,每组 10 个,一组放在 4℃冰箱,另一组常温放置(25~28℃);分别放置 5 d,每组 3 次重复。每组的 3 个重复每天分别取样(菌柄、菌盖、菌褶)后立即用液氮速冻,−80℃保存备用。



a、b、c 分别为贮藏 0 d、低温贮藏 5 d、常温贮藏 5 d 处理
图 1 白玉菇贮藏 0 d、低温贮藏 5 d 及常温贮藏 5 d 的感官特征

1.2 试验方法

1.2.1 丝氨酸蛋白酶活性的测定 白玉菇丝氨酸蛋白酶活性的测定具体步骤参照丝氨酸蛋白酶(PRSS)ELISA 试剂盒说明。

1.2.2 基因组 DNA 提取 采用改良的 CTAB-氯仿-异戊醇法进行白玉菇基因组 DNA 提取^[12]。

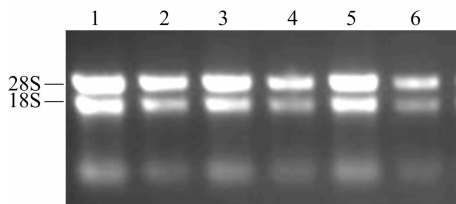
1.2.3 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 本试验提取 RNA 所用的离心管、枪头等塑料制品先用 0.1% 的 DEPC 水浸泡 12 h,再高压蒸汽灭菌 20 min(120~126℃),烘干。研钵、研棒用三氯甲烷浸泡 2 h,用干净手套装好并放入 80℃烘箱中 2 h,烘干。具体步骤参照 BioFlux RNA 提取试剂盒说明。

取 1 μL RNA,加入 2 μL 溴酚蓝,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果出现 28S、18S 2 条带,说明 RNA 完整,5S 带有时也会出现。28S 带的浓度是 18S 带的 2 倍,说明 RNA 质量很好(图 2)。第 1 链 cDNA 合成的具体步骤参照 TaKaRa 提取试剂盒说明。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 用 DNASTAR 软件设计特异引物 ActinF、ActinR、SprF、SprR(表 1)。PCR 反应体系(25 μL)参照 TaKaRa RT-PCR 反应体系说明书。在 Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪上进行实时定量 PCR,PCR 反应程

收稿日期:2014-09-16

作者简介:孙新菊(1984—),女,山西大同人,博士,讲师,主要从事园艺植物分子生物学研究。E-mail:sunxinju84@163.com。



1~6分别为贮藏0 d的菌柄、菌盖、菌褶,低温贮藏5 d的菌柄、菌盖、菌褶
图2 提取白玉菇 RNA 的质量检测结果

序为:95℃预变性3 min;94℃10 s,58℃30 s,72℃30 s,40个循环。每个样品3次重复,Actin基因为表达分析内标参照,使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算待测基因相对表达量,用Excel 2003整理试验数据并作图。

表1 特异引物名称及信息

引物	碱基序列(5'→3')
ActinF	TACTCCGTCTGGATTGGTG
ActinR	GACTCGTCTGATTCTTGCTT
SprF	GCAAGCGCAGATGGAAATGGACA
SprR	CTGGCGCCGACCGTGATGACT

2 结果与分析

2.1 白玉菇货架期

白玉菇在低温(4℃)处理下可保鲜5 d;在常温(25~28℃)下保鲜时间则很短,为1~2 d(图1-e),之后出现菌伞开张、组织失水、褐变及营养物质流失等现象。

2.2 丝氨酸蛋白酶的活性

由图3可知,白玉菇在常温贮藏过程中,丝氨酸蛋白酶的活性与贮藏0 d相比,一直处于上升趋势并在贮藏4 d升到最高,之后又下降;在低温贮藏过程中,丝氨酸蛋白酶的活性一直处于下降趋势,直到在贮藏5 d时降到最低点。另外,在整个贮藏过程中,常温处理下白玉菇丝氨酸蛋白酶的活性明显高于低温处理,可见低温处理可以抑制丝氨酸蛋白酶的活性。

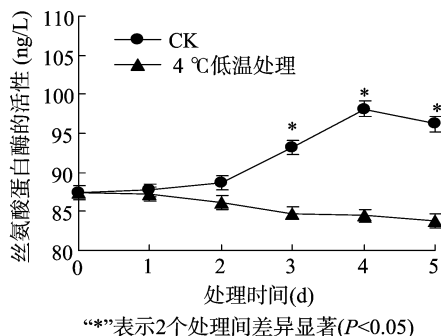


图3 常温、低温处理0~5 d白玉菇丝氨酸蛋白酶的活性

2.3 丝氨酸蛋白酶基因的表达

应用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)分析表明,丝氨酸蛋白酶基因在贮藏0 d的白玉菇菌柄中的表达量最大,其次是菌盖,菌褶中的表达量最低(图4)。丝氨酸蛋白酶基因在常温贮藏5 d的白玉菇菌柄中的表达量最大,在菌盖、菌褶中的表达量很低;在低温贮藏5 d的白玉菇菌柄中有少量表达,在菌盖、菌褶中不表达(图5)。丝氨酸蛋白酶基因在常温贮藏的白玉菇菌柄中的表达一直处于上升趋势并在贮藏4 d时

升到最高,之后又下降;而在低温贮藏的白玉菇菌柄中一直处于下降趋势;丝氨酸蛋白酶基因在常温贮藏的白玉菇菌柄中的表达量明显高于低温贮藏的(图6)。总体看出,低温处理下,丝氨酸蛋白酶基因的表达受到抑制,这个结果与丝氨酸蛋白酶的活性变化相一致。

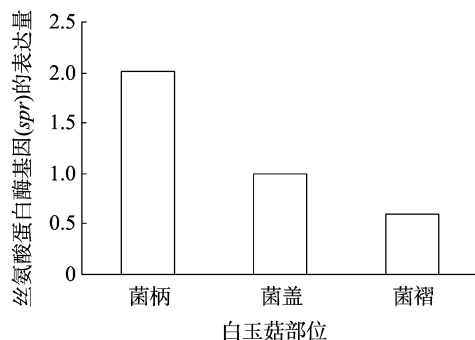


图4 丝氨酸蛋白酶基因在贮藏0 d白玉菇的菌柄、菌盖、菌褶3个部位的实时荧光定量表达情况

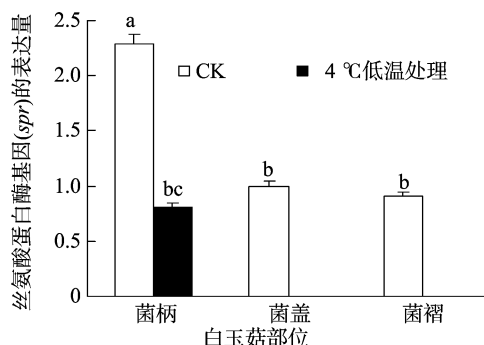


图5 低温、常温贮藏5 d时白玉菇菌柄、菌盖、菌褶中丝氨酸蛋白酶基因的实时荧光定量表达情况

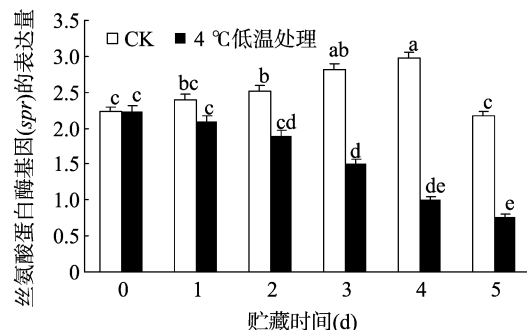


图6 丝氨酸蛋白酶基因在低温、常温贮藏0~5 d白玉菇菌柄中的实时荧光定量表达情况

3 讨论

由于食用菌贮藏过程中极易变质,薄膜气调包装^[13]、化学处理方法^[14]、辐照处理^[15]、温度处理及CO₂气调处理^[16]等采后处理技术已被广泛用于各种食用菌,以解决其采后腐烂、货架期短及品质劣变的问题。蛋白酶在植物细胞程序性死亡(PCD)及衰老过程中均起重要作用^[17-19],白玉菇采收后,蛋白质会因为蛋白酶或肽酶的作用分解成氨基酸而降解,在一定程度上导致菇体衰老、品质及商品性急剧下降,因此研究白玉菇采后安全、有效的保鲜技术显得尤为重要。

丝氨酸蛋白酶广泛分布于植物中,多种植物的衰老过程

都与其活性的不断提高相关联^[4-10]。丝氨酸蛋白酶不仅用于蛋白质的降解,还常常作为一种信号涉及细胞程序性死亡(PCD)或调控细胞自噬^[6,20-23]。在贮藏 0、1 d 的双孢菇菌柄中,丝氨酸蛋白酶的活性比较低;而从贮藏 2 d 开始,其活性快速升高直到贮藏 4 d,到贮藏 5 d 又下降^[10]。在本研究中,白玉菇在常温贮藏过程中,丝氨酸蛋白酶活性的变化与 Burton 等研究双孢菇的结论^[10] 基本一致;本研究讨论在低温贮藏过程中,丝氨酸蛋白酶的活性一直处于下降趋势,并且在整个贮藏过程中,低温处理下白玉菇丝氨酸蛋白酶的活性明显低于常温处理,低温能够抑制丝氨酸蛋白酶的活性,从而延长货架期。

Kingsnorth 等研究发现,丝氨酸蛋白酶基因在刚采收的双孢菇中不表达,而在采后贮藏 1 d 的双孢菇中开始表达,并在第 3 天达到最大值,之后又下降;Kingsnorth 等还对双孢菇不同组织中丝氨酸蛋白酶基因的表达进行研究,发现在贮藏 2 d 的双孢菇菌柄中的表达量最大^[24]。Heneghan 等应用绿色荧光蛋白和双孢菇 *Spr1* 基因启动子技术对该基因在双孢菇中的表达进行了研究,发现在双孢菇子实体中,*Spr1* 基因活动定位于采后衰老的子实体菌柄中^[11]。本研究中,在白玉菇 3 个不同部位(菌柄、菌盖、菌褶),丝氨酸蛋白酶基因在菌柄中的表达量最大;与低温处理相比较,丝氨酸蛋白酶在常温贮藏 4 d 的白玉菇菌柄中的表达量最大,这些结果与 Heneghan 等的研究结果^[11,24] 基本一致。从本研究结果可以看出,低温处理下,丝氨酸蛋白酶的活性和基因的表达均受到抑制,表明丝氨酸蛋白酶的高活性及高表达量在一定程度上导致白玉菇的衰老、品质及商品性急剧下降。本研究有助于阐明白玉菇衰老的分子机制,并可为调控白玉菇采后保鲜以及延长货架期提供重要的理论与实践意义。

参考文献:

- [1] 李挺,宋斌,林群英,等. 白玉菇的研究进展[J]. 贵州科学, 2011,29(2):48-52.
- [2] Braaksma A, Schaap D J, De Vrije T, et al. Ageing of the mushroom (*Agaricus bisporus*) under post-harvest conditions[J]. Postharvest Biology and Technology, 1994,4(1/2):99-110.
- [3] 秦俊哲,吕嘉彬. 食用菌贮藏保鲜与加工新技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003:51-55.
- [4] 赵喜亭,丛日晨,刘晓静,等. 失水胁迫对月季花瓣内肽酶活性的诱导及对花朵衰老进程的影响[J]. 中国农业科学,2008,41(2):516-524.
- [5] 阳韶昆,蔡璇,邹晶晶,等. 桂花开放与衰老过程中花瓣蛋白酶活性与种类的变化[J]. 园艺学报,2012,39(10):1967-1974.
- [6] Azeez A, Sane A P, Bhatnagar D, et al. Enhanced expression of serine proteases during floral senescence in *Gladiolus*[J]. Phytochemistry, 2007,68(10):1352-1357.
- [7] Roberts I N, Passeron S, Barneix A J. The two main endoproteases present in dark-induced senescent wheat leaves are distinct subtilisin-like proteases[J]. Planta, 2006,224(6):1437-1447.
- [8] Antão C M, Malcata F X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005,43(7):637-650.
- [9] Arora A, Singh V P. Cysteine protease gene expression and proteolytic activity during floral development and senescence in ethylene-insensitive *Gladiolus grandiflora* [J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2004,13(2):123-126.
- [10] Burton K S, Partis M D, Wood D A, et al. Accumulation of serine proteinase in senescent sporophores of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* [J]. Mycological Research, 1997,101(2):146-152.
- [11] Heneghan M N, Porta C, Zhang C, et al. Characterization of serine proteinase expression in *Agaricus bisporus* and *Coprinopsis cinerea* by using green fluorescent protein and the *A. bisporus SPRI* promoter [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009,75(3):792-801.
- [12] Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers [J]. Scientia Horticulturae, 2008,116(3):240-247.
- [13] Wang C T, Wang C T, Cao Y P, et al. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) with low and superatmospheric oxygen on the quality and antioxidant enzyme system of golden needle mushrooms (*Flammulina velutipes*) during postharvest storage [J]. European Food Research and Technology, 2011,232(5):851-860.
- [14] Brennan M, Le Port G, Gormley R. Post-harvest treatment with citric acid or hydrogen peroxide to extend the shelf life of fresh sliced mushrooms [J]. LWT - Food Science and Technology, 2000,33(4):285-289.
- [15] Akram K, Ahn J J, Yoon S R, et al. Quality attributes of *Pleurotus eryngii* following gamma irradiation [J]. Postharvest Biology and Technology, 2012,66:42-47.
- [16] Singh S P, Pal R K. Controlled atmosphere storage of guava (*Psidium guajava* L.) fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2008,47(3):296-306.
- [17] Distefano S, Palma J M, McCarthy I, et al. Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent pea leaves [J]. Planta, 1999,209(3):308-313.
- [18] Wagstaff C, Malcolm P, Rafiq A, et al. Programmed cell death (PCD) processes begin extremely early in *Alstroemeria* petal senescence [J]. New Phytologist, 2003,160(1):49-59.
- [19] Xu X, Gookin T, Jiang C Z, et al. Genes associated with opening and senescence of *Mirabilis jalapa* flowers [J]. Journal of Experimental Botany, 2007,58(8):2193-2201.
- [20] 张鹏,王飞,张列峰,等. 丝氨酸内肽酶在黄瓜叶片衰老中的作用[J]. 植物生理与分子生物学报,2006,32(5):593-599.
- [21] Ueda T, Seo S, Ohashi Y, et al. Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene [J]. Plant Molecular Biology, 2000,44(5):649-657.
- [22] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003,35(5):553-561.
- [23] Van Doorn W G, Woltering E J. Physiology and molecular biology of petal senescence [J]. Journal of Experimental Botany, 2008,59(3):453-480.
- [24] Kingsnorth C S, Eastwood D C, Burton K S. Cloning and postharvest expression of serine proteinase transcripts in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2001,32(3):135-144.