

宋慕波, 帅 良, 方 方, 等. 荸荠多酚氧化酶基因的克隆及其在鲜切荸荠贮藏过程中的表达分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(17): 46–50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.011

荸荠多酚氧化酶基因的克隆及其在鲜切荸荠贮藏过程中的表达分析

宋慕波^{1,2}, 帅 良^{1,2}, 方 方^{1,2}, 陈振林^{1,2}, 张 志¹, 段振华^{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:利用 RACE 技术首次从荸荠中克隆得到 *PPO* 基因全长 cDNA 序列, 并分析其在鲜切荸荠贮藏过程中的表达变化。克隆得到的荸荠 *PPO* 基因 cDNA 序列全长为 2 006 bp, 开放阅读框长度为 1 734 bp, 编码 577 个氨基酸, 命名为 *CwPPO* (登录号: MG702489)。预测分析表明, *CwPPO* 编码蛋白质的分子量为 64.86 ku, 分子式为 $C_{2891}H_{4417}N_{795}O_{873}S_{18}$, 理论等电点为 6.50, 属亲水性蛋白。*CwPPO* 蛋白可能定位于线粒体基质空间, 具有 3 个典型的保守结构域和 2 个铜离子结合域。此外, 预测发现 *CwPPO* 有 20 个丝氨酸磷酸化位点、7 个苏氨酸磷酸化位点及 6 个酪氨酸磷酸化位点, 其二级结构以不规则卷曲为主。系统发育分析显示, *CwPPO* 蛋白与菠萝、油棕有较近的亲缘关系。荧光定量分析发现, *CwPPO* 在鲜切荸荠中的初始表达水平较低, 但在贮藏后期表达量快速提高。

关键词: 鲜切荸荠; 多酚氧化酶; 基因克隆; 表达分析

中图分类号: TS255.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)17-0046-04

荸荠 (*Eleocharis tuberosa*) 别称马蹄、地栗, 属莎草科多年生浅水草本植物, 其球茎风味独特并有较高的药用价值^[1]。随着中国经济的发展, 鲜切果蔬产品越来越受到消费者的喜爱。荸荠洗净和削皮不易, 残留果肉的表皮寄生病菌容易进入人体而引发疾病, 加之一般荸荠加工产品难以保持荸荠口感爽脆、清甜可口的特点, 因此, 卫生和方便的鲜切荸荠产品有较好的市场前景。然而, 鲜切荸荠保鲜难度大、货架期短, 特别是色泽劣变问题严重影响了鲜切荸荠产业的持续健康发展^[2]。

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, 简称 PPO) 是植物体内普遍存在的一种末端氧化酶, 可催化酚类物质氧化, 形成黑色高聚物, 其在果蔬褐变过程中起到的关键作用已经在苹果、梨和姜等果蔬的研究中得到证实^[3-5]。一些研究表明, 鲜切荸荠表面黄化可能与 PPO 活性相关, 例如, 壳聚糖、柠檬酸和水杨酸处理在抑制 PPO 活性上升的同时改善了鲜切荸荠的黄化^[6-8]。然而, Pan 等研究发现, 导致荸荠黄化的物质是柚皮素和圣草酚而不是 PPO 参与的氧化反应产物^[9]。因此, PPO 在鲜切荸荠黄化过程中的作用仍不明确。

由于 PPO 是参与果蔬褐变的关键酶, 其编码基因已在菠萝、甘薯、茶树、香蕉等多种植物中克隆得到^[10-12]。荸荠分子生物学方面的研究较少, 关于荸荠 *PPO* 基因的克隆和相关分子生物学研究未见报道。鉴于此, 本研究拟利用前期获得的

荸荠转录组数据进行荸荠果肉的 *PPO* 基因全长 cDNA 的克隆, 研究鲜切荸荠贮藏过程中 *PPO* 基因的表达变化, 可为多酚氧化酶的研究、鲜切荸荠黄化机制研究以及完善鲜切荸荠贮藏方案提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料及处理

荸荠 (*Eleocharis tuberosa*) 于 2016 年 12 月 10 日购自广西壮族自治区贺州市八步区农产品市场。购买后运回实验室清洗, 挑选大小均一和无机械损伤、无病虫害的荸荠, 去皮后横切成厚度为 0.5 cm 的圆片, 然后用 0.1% (w/V) 次氯酸钠溶液杀菌 10 min, 将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 下贮藏。

1.2 试剂

植物 RNA 提取试剂盒, 华越洋生物科技 (北京) 有限公司; SMARTer RACE 5'/3' Kit RACE 试剂盒, LA Taq DNA 聚合酶、PMD-19T 载体、感受态细胞 DH5 α 、感受态细胞 Stellar、DNA Marker, SYBR Green qPCR Master Mix 荧光定量酶、6 \times Loading buffer、PrimeScriptTM RT reagent Kit 反转录去基因组试剂盒, 日本 TaKaRa 公司; 溴化乙锭, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DNA 凝胶回收试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; 琼脂糖, 西班牙 Biowest 公司; Tris、乙醇、EDTA-Na₂ 均为分析纯, 国药集团药业股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 荸荠果肉总 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 后利用 K5600 超微量分光光度计测定其纯度和含量, RNA 样品保存于 -80 °C 超低温冰箱中, 用于反转录等后续试验。

1.3.2 荸荠果肉 *PPO* 基因克隆 3' RACE-cDNA 和 5'

收稿日期: 2018-05-31

基金项目: 广西自然科学基金 (编号: 2017GXNSFAA198082、2015GXNSFBA139082); 贺州学院博士启动基金 (编号: HZUBS201402、HZUBS201405); 广西特聘专家专项经费。

作者简介: 宋慕波 (1986—), 男, 河南洛阳人, 博士, 副研究员, 主要从事果蔬保鲜研究。E-mail: songmubol@163.com。

通信作者: 段振华, 博士, 教授, 主要从事果蔬加工与保鲜研究。

E-mail: dzh65@163.com。

RACE - cDNA 的合成具体操作按照 SMARTer RACE 5'/3' Kit RACE 试剂盒进行。根据之前从荸荠转录组数据中得到的 *PPO* 基因片段设计 3'RACE 和 5'RACE 引物(表 1)。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 1.5 min;94 ℃ 变性 30 s,68 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 2 min,25 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,产物于 4 ℃ 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。应用 DNAMAN 软件和 NCBI 在线工具对荸荠 *PPO* 基因进行序列基本结构和特征分析。

表 1 荸荠 *PPO* 基因克隆和表达所用引物

引物名称	引物序列(5'→3')
CwPPO 3' RACE	CCCCTAGAGACTTGCCCGCCACTGC
CwPPO 5' RACE	TGCGTGATCATCAGCCGACAGTCC
全长 CwPPO 正向	CAAATCATTTTCATCAACTAATTCC
全长 CwPPO 反向	GAAACAAAGTAAATTATAACAATAA
qPCR 引物正向	CTGTTGAGCTGATGAAAGGACTGTC
qPCR 引物反向	AATCTGCAACTCAAGATCTGGAAAT

根据拼接得到的基因全长核苷酸序列设计引物(表 1)。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。

1.3.3 荸荠 *PPO* 基因生物信息学分析 采用 NCBI 中的 BLASTN、BLASTP 程序进行核苷酸序列及其推导的氨基酸序列的同源性比较;ORF Finder 程序寻找开放阅读框;采用 ProtParam Tool 分析蛋白质理化性质;采用 Conserved Domains 分析氨基酸序列的保守区域;采用 Post Prediction 和 SubLocv 1.0 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 ExPaSy - SOPMA 软件分析蛋白质的二级结构;使用 Clustal X2 软件进行多重序列比对;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;采用 Swiss - PdbViewer 构建蛋白模型的拉氏构象图。

1.3.4 荸荠 *PPO* 基因的表达分析 根据获得的荸荠 *PPO* 基因 cDNA 序列利用 Primer 5.0 设计 Q - PCR 特异引物(表 1)。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit 去除基因组和反转录试剂盒合成 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 *PPO* 基因在贮藏过程中的表达量。各样品的表达量均为 3 次生物重复的平均值。

2 结果与分析

2.1 荸荠果肉 *PPO* 基因 cDNA 全长序列克隆

荸荠转录组测序筛选得到与其他植物 *PPO* 基因同源性较高的基因片段,利用 NCBI 的 BLAST 程序进行比对,结果显示,与其他植物的 *PPO* 基因核苷酸序列相似度为 62% ~ 73%,其中与菠萝(*Ananas comosus*, XM_020246795.1) *PPO* 基因核苷酸序列相似性最高,为 73%。根据该序列设计 3'RACE 和 5'RACE 引物,进行 PCR 获得 3'和 5'端序列分别约为 1 700 bp 和 600 bp(图 1 - A,图 1 - B)。将片段回收后进

行测序分析发现 3'端序列长度为 1 663 bp,包含了 3'非翻译区(3'UTR)及 poly A 结构;5'端序列长度为 547 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 *PPO* 的 cDNA 全长序列(图 1 - C),测序结果显示,该序列与拼接结果一致。

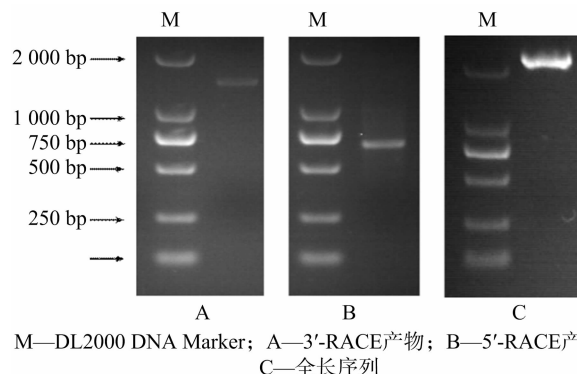


图 1 荸荠果肉 *CwPPO* 全长序列的扩增

将克隆得到的全长序列使用 NCBI 中 ORF Finder 软件进行分析。该序列长度为 2 006 bp,含有 1 个 1 734 bp 的最大开放阅读框(ORF)、57 bp 的 5'UTR 区、188 bp 的 3'UTR 区及 27 bp 的 polyA 结构,起始密码子 ATG 位于第 58 ~ 60 位,终止密码子为 TGA(图 2)。将该 cDNA 序列在 NCBI 上进行比对,发现该序列与油棕(*Elaeis guineensis*; XM_010912626.2, XM_010928464.2)、海枣(*Phoenix dactylifera*; XM_008779971.1)和菠萝(*Ananas comosus*; XM_020246795.1)的 *PPO* 基因相似度较高,均大于 68%。因此,可证明已经克隆获得荸荠 *PPO* 基因,将此基因命名为 *CwPPO*,并在 GenBank 上登录,登录号为 MG702489。

2.2 *CwPPO* 基因生物信息学分析

经预测分析,*CwPPO* 编码蛋白质的分子量为 64.86 ku;分子式为 $C_{2891}H_{4417}N_{795}O_{873}S_{18}$;理论等电点为 6.50;利用 ProtScale 软件预测其属于亲水性蛋白,亲水指数(GRAVY)为 -0.572。

CwPPO 蛋白存在跨膜结构,属于跨膜蛋白,可能存在由内到外或由外到内的双向跨膜的 2 个跨膜螺旋结构域。采用 NCBI 的 Conserved domains 数据库预测 *CwPPO* 的保守结构域,发现了 3 个典型的保守结构域,分别为未知功能的保守结构域(446 ~ 575, PPO1_KFDV, pfam12143)及酪氨酸普通中心区域(162 ~ 372, Tyrosinase, pfam00264)、多酚氧化酶中间保守域(379 ~ 429, PPO1_DWL, pfam12142)(图 3)。使用 SignalP 3.0 和 Post Prediction 预测显示 *CwPPO* 为非分泌蛋白,定位于线粒体基质空间的可能性最大。

蛋白质的磷酸化是最普遍和重要的蛋白翻译后修饰方式。经磷酸化预测发现,*CwPPO* 编码的蛋白可在 20 个 Ser、7 个 Thr 和 6 个 Tyr 氨基酸位点进行磷酸化修饰。在这 33 个磷酸化位点分值最高的是 S467,为 0.997。磷酸化位点能够影响 *CwPPO* 蛋白的分子构象和活性,其位点预测能够为今后基因表达调控,蛋白修饰提供参考。

采用 SOPMA 软件预测 *CwPPO* 蛋白的二级结构,结果显示,该蛋白最主要的结构是无规则卷曲占 64.52%,其次 α - 螺旋占 19.83%,延伸链占 15.65%。 α - 螺旋和延伸链

1 ATATCCACTC CAAATCATTT CATCAACTAA TTCTGCTTG AGCACAACCC AGACATCATG TCAAGCCTGT TTAAGTCAA TTCTCTACC ACATCCTCCT TTCACTCCTC TGCATGCAAGC
121 TTCCAGCCCC ATAAGTTCTC TTCTCATCTC TACTTCCCTA GAAGAACAGA CAACCTACT ATTGCTTGCA AGGGCAGCTC CGACGATAAC CAAAAACCTA ACTCCAGCCG GCGTGAGGTT
241 TTAATCGGCC TTGGTGGATT ATATGGCGTC TCGACCAGCC TTGGCATGAA TCATAGTGCA TCAGCCTCAC CGATTCAAGC GCCTGATATC TCCAAGTGTG AGGCCCTAG AGACTTGCCC
361 GCCACTGCAG CAAAGACCAA TTGCTGCCA CCGTTTAAAG GCCAAGTAT TGTAGACTTT AAACCTCCGC GCAAGTCAGA GCCACTCCGT GTGAGAGCCG CAGCTCATGC AGTGATATAA
481 GAATATATAG CCAAATATAC AAAAGCTGTT GAGCTGATGA AAGGACTGTC GGCTGATGAT CCACGCAATT TCACACAACA GGCAGAACGTG CACTGTGCAT ACTGCGATGG TGCCTACGAC
601 CAAGTCGGAT TTCCAGATCT TGAGTTGCAG ATTCACTAATC CTGCGCTTTT TTTCCTTTGG CACAGGTTTT ACCTCTACTT TAACGAGCGC ATATTGGGTA AGTTGATCGG AGATGATACT
721 TTTGCGCTTC CATTTCTGAA CTGGGATGCA CCGGCTGGAA TGCAGATCCC AGCAATGTAC ACAACACAT CATCCTCGCT ATATGACAAA TTACGTAATC CAAACCACCA ACCACCTCAC
841 CTAATTAACC TCGATTATAA CGGACGGAG CCAACATATA CTCGAGATCA ACAGATTGAT CATAACCTGA AGATAATGTA TCGTCAGGTG ATATCAATG GTAAACAGC AGAGCTTTTC
961 ATGGGATCCA CATATCGTGC TGGTGACAAA CCAATCCTG GTGAGGGTGC ACTGGAGAAC GTGCCCGATG GAAACGTGCA TTTTGGACA GGGGATACTG TGAACCAGCC GAATGGAGAG
1081 GACATGGGAA ATTTCTACTC TGTGAGAGG GACCCGATCT TCTTTGCACA CCATGCAAAAT GTCGATCGGA TGTGATATG CTGGAAGAGG CTTGGAGGGA AACACCAAGA TTTCACTGAC
1201 TCAGACTGGC TCAATACAAG CTCTATTTC TATGATGAGA ACGCCCACT GGTAAAGATT CAAGTCAAGG ATTGCTTAGA CAATGAGGCC ATGCGATTTA CGTACCAAGA TGTAGACATT
1321 CCTTGGCGCA ATTCCAGACC TACACCGACA AGCAGCGGGA AGACTCTGCA AACTGCTTCT ACCGTAACCA GTTTTCCGGT AACTCTCGAC AAGCCTGTTA CTACAACATAT TTCACGTCCC
1441 AAGGTGTCAA GAAGCAGCAC GGATAAGGAG GATGAAGAGG AAGTGCTCAT TATTGAAGGC ATTAAGCTGG AGCACACCAA ATTCATCAAG TTTGACGTGT ACATAAATGC GACAGAAGAT
1561 GATGATATTA CACCGAATGC TAGTGAATTT GCGGGCAGTT TCGTGCACCT GCCGCACAAG CACAATAAGG GGAATAAGGC GCCACAGCAC GAAACTGTTC TCAAGCTCGC CATCTCCGAT
1681 TTGTTGGAGG ATATCAAGGC CGAGGATGAC CCCACCATAC TTGTACGCTG TGTGCCCGCT TCCAAGGCCA CGGCCTCCAT TGGAAAGCATC AAAATTGGTT TTTCTAAGTG AACATGAAGG
1801 GGCATAATAC AGTATTATA TGCATGTTTG AACATTTTCA TTTATTTTAT TTGAGCTATG TTCTTGAGTT GAAAGGAATT GTTGTGTCGG AAGTAAATAA ATGCAAGGTA GATGCAGGAA
1921 AGATAGAGGT CATATGATCG TTGCTCAACA TTATTGTTAT AATTACTTTT GTTCTTTTCA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

下划线处为起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA

图2 CwPPO 全长核苷酸序列

分散于整个蛋白质中,且 N - 末端多以无规则卷曲形式存在, C - 末端主要为延伸链形式。

利用 Swiss - model 预测 CwPPO 蛋白的三级结构,由软件自动匹配模板(PDB No. 4z11.1)进行参照建模,CwPPO 蛋白三维结构中的 α - 螺旋、延伸链和无规则卷曲呈均匀分布,中

间有 2 个铜离子结合域,位于 172 ~ 202 和 324 ~ 359 处(图 4)。采用 Swiss - Pdb Viewer 软件分析上述同源建模结果,通过拉氏构象可以看出蛋白质残基的二面角(ψ 和 φ)位于核心区域,表明其空间结构稳定,故上述利用同源建模的方法对 CwPPO 蛋白进行建模的结果较为可靠(图 5)。

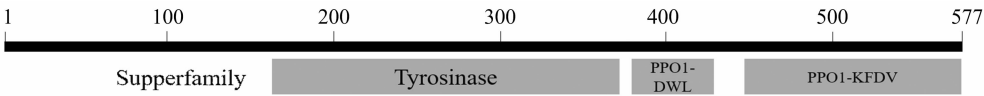


图3 CwPPO 编码氨基酸保守结构域预测

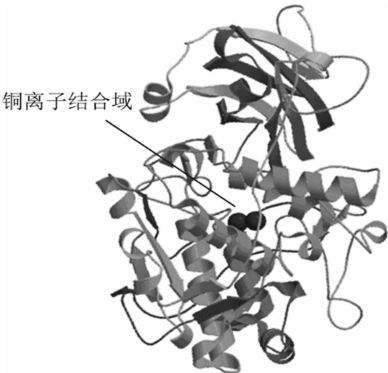


图4 CwPPO 编码蛋白的三级结构

2.3 CwPPO 蛋白序列多重比对和进化树构建

通过与其他植物 PPO 蛋白比对发现,不同 PPO 功能区域的氨基酸序列较为保守,而 C - 端、N - 端区域的差异较大,尤其 C - 端的差异最大。为了解 CwPPO 蛋白与其他植物 PPO 蛋白的进化关系,对 CwPPO 蛋白进行多序列比对并建立系统进化树(图 6)。结果发现,CwPPO 与油棕(*Elaeis guineensis*)、菠萝(*Ananas comosus*)的 PPO 蛋白亲缘关系较近。

2.4 CwPPO 在鲜切荸荠贮藏过程中的表达分析

通过荧光定量 PCR 分析鲜切荸荠贮藏过程中 CwPPO 的表达变化。结果表明,荸荠果肉中 CwPPO 的初始表达水平较低,切分后随着贮藏时间的延长,CwPPO 表达水平逐渐升高,与鲜切荸荠的颜色变化表现出一定的相关性(图 7)。

3 讨论与结论

多酚氧化酶(PPO)能够氧化植物中的酚类物质形成黑色高聚物,是导致鲜切果蔬褐变的关键酶^[13]。其编码基因 PPO 在多种植物中属于多基因家族,如番茄、马铃薯中都发现了多个不同的编码基因^[14-15]。但并非所有植物的 PPO 都属于多基因家族,例如葡萄藤中仅发现了 1 个 PPO 基因^[16]。笔者前期在荸荠转录组数据中只发现了 1 个与其他植物 PPO 同源性较高的基因片段。本试验克隆得到的荸荠果肉 PPO 基因序列长度为 2 006 bp,编码 577 个氨基酸,命名为 CwPPO。CwPPO 蛋白保守结构域预测显示其含有 3 个典型的保守结构域,这与以往报道的 PPO 蛋白的保守结构域^[17]吻合。植物多酚氧化酶基因序列的 2 个铜离子结合域的同源性都很高,这是多酚氧化酶的主要功能区^[18]。通过对蛋白序列进行保

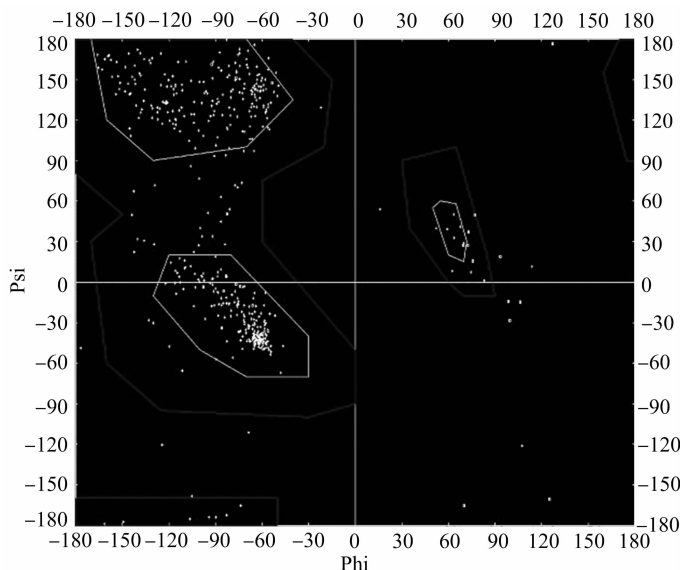


图5 CwPPO 蛋白模型的拉氏构象

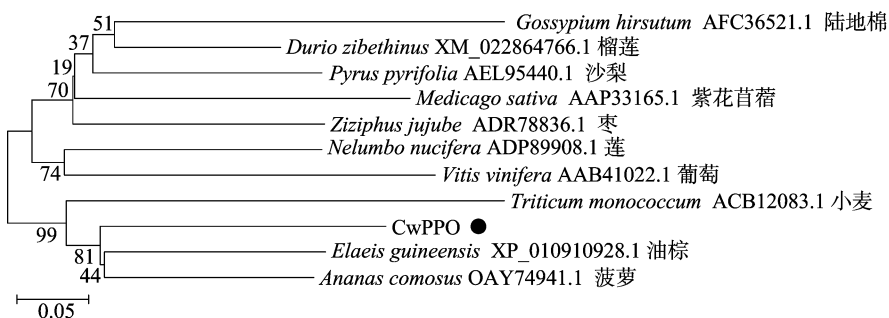


图6 CwPPO 与其他植物 PPO 蛋白的系统进化树

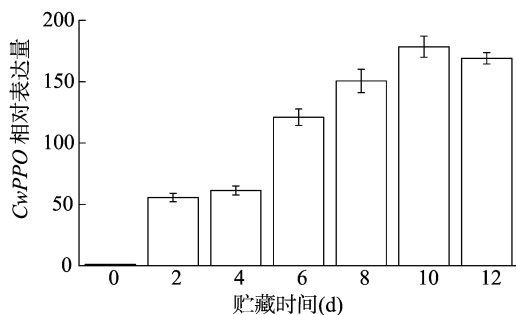


图7 CwPPO 在鲜切荸荠贮藏过程中的表达变化

保守结构域分析,发现 *CwPPO* 基因包含 2 个含铜的高度保守区 (CuA、CuB),在同源构建 *CwPPO* 蛋白的三维模型中也可以看到 2 个铜离子结合域,分别是位于 172 ~ 202 和 324 ~ 359 处,这些功能域是植物 PPO 的主要功能区。系统进化树分析结果显示,*CwPPO* 编码的氨基酸与油棕 (*Elaeis guineensis*)、菠萝 (*Ananas comosus*) 有较近的亲缘关系。

鲜切荸荠 10 ℃ 下贮藏前 2 d 基本没有颜色变化,之后荸荠表面组织才均匀黄化,与传统酶促褐变相比有明显的“启动”期。同时,贮藏期间荸荠 PPO 活性也较低,表明荸荠果肉中可能预先并不存在大量的 PPO,而且鲜切荸荠贮藏过程中 PPO 的底物含量也较低^[19-20]。因此,研究者推测荸荠的黄化与 PPO 参与的酶促褐变不同。本研究发现鲜切荸荠贮藏过程中 *CwPPO* 的表达水平逐渐升高,与荸荠黄化进程表现出

了一定的相关性。切割伤害可以诱导植物 PPO 表达,增加酶的合成量,从而导致鲜切果蔬和外植体的褐变^[21]。随着贮藏时间的延长,荸荠完全黄化后还会出现明显的褐变。因此,PPO 可能没有参与荸荠贮藏前期的黄化过程,但贮藏后期逐渐积累的 PPO 是否参与了鲜切荸荠黄化后的褐变有待进一步研究。

参考文献:

- [1]何风平,潘永贵,张伟敏. 鲜切荸荠类黄酮 3'-羟化酶分离纯化及其动力学性质[J]. 食品科学,2017,38(8):17-23.
- [2]邓丽莉,明建,田维娜,等. 乙醛熏蒸处理对鲜切荸荠品质变化的影响[J]. 食品科学,2010,31(2):233-236.
- [3]He Q, Lou Y G. Enzymatic browning and its control in fresh-cut produce[J]. Stewart Postharvest Review, 2007, 3(6):1-7.
- [4]Li J, Bao X L, Xu Y C, et al. Hypobaric storage reduced core browning of Yali pear fruits[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 225: 547-552.
- [5]Queiroz C, Da Silva A J, Lopes M L, et al. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) after processing[J]. Food Chemistry, 2011, 125(1):128-132.
- [6]Pen L T, Jiang Y M. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut[J]. LWT - Food Science and Technology, 2003, 36(3):359-364.

徐 君,江 君,王 欢,等. 荷花淹水胁迫下实时定量 PCR 内参基因的验证[J]. 江苏农业科学,2019,47(17):50–53.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.17.012

荷花淹水胁迫下实时定量 PCR 内参基因的验证

徐 君,江 君,王 欢,姜红卫

(江苏太湖地区农业科学研究所,江苏苏州 215155)

摘要:旨在筛选荷花淹水胁迫过程中表达稳定的内参基因,使不同胁迫处理下荷花目标基因的定量更为准确。以不同淹水胁迫时间的荷花叶片为材料,利用实时定量 PCR 技术验证 5 个植物常用内参基因,包括 18S rRNA(18S)、actin(*ACT*)、elongation factor 1 α (*EFL* α)、Histone H3(*HIS*)及 β -tubulin(*TUB*)的表达水平,结合 GeNorm、NormFinder 和 BestKeeper 软件对结果进行分析,对其表达稳定性进行评价。将优选的 2 个内参基因(18S 和 *ACT*)应用于荷花转录因子基因 *ERFB2-1*(ethylene responsive factor B2-1)和 *ERFB2-2*的淹水胁迫表达,结果显示表达趋势一致,验证了可靠性。本研究对荷花淹水胁迫过程中关键基因表达的 qRT-PCR 分析有重要的应用价值。

关键词:荷花;淹水胁迫;qRT-PCR;内参基因

中图分类号: S682.320.1

文献标志码: A

文章编号: 1002–1302(2019)17–0050–04

荷花(*Nelumbo nucifera*)是莲科莲属的多年生挺水植物,是我国十大名花之一^[1]。荷花原产我国,具有分布范围广、种质资源丰富、群体花期时间长及叶色碧绿等特点,深受人们的喜爱,加上经济用途广泛,文化底蕴深厚,因而成为极好的水景美化植物和家庭园艺常用植物^[2]。荷花是一种水生花卉,环境的变化使荷花时常要面对淹水胁迫影响^[3],因此,耐

淹水胁迫资源和基因的挖掘是荷花育种目标之一。

随着分子生物学的不断发展,功能基因研究已成为植物耐胁迫育种的重要辅助手段,而基因的表达分析则是植物功能基因研究的基础^[4–5]。在比较耐淹荷花品种和淹水敏感型荷花品种功能基因差异表达的研究过程中,较多的涉及到应用实时定量 PCR (quantitative real-time PCR,简称 qRT-PCR)验证和分析基因的表达模式和水平,为了校正不同样本 RNA 提取效率、质量、反转录及扩增效率上的差异,试验中需要用到在实验条件下细胞中能够恒定表达的基因也就是内参基因作为标准^[6–7],因此,筛选淹水胁迫条件下稳定表达的内参基因对 qRT-PCR 试验结果的可靠性有着关键的作用。

迄今,国内外对黄花蒿^[8]、天蓝苜蓿^[9]、牡丹^[10]等多种植物在不同试验条件下进行了内参基因的筛选,对荷花花瓣着色过程中内参基因的稳定性也有研究报道^[11],但对荷花在淹

收稿日期:2018–05–23

基金项目:江苏省林业科技创新与推广项目(编号:LYKJ[2017]09);
苏州市农业应用基础研究项目(编号:SNG201620)。

作者简介:徐 君(1982—),男,江苏苏州人,硕士,副研究员,主要从事观赏植物分子生物学研究。Tel:(0512) 68787381;E-mail:sacxujun@163.com。

通信作者:姜红卫,硕士,副研究员,主要从事观赏植物育种研究。
Tel:(0512)68787381;E-mail:sacjhw@163.com。

[7]Jiang Y M, Pen L T, Li J R. Use of citric acid for shelf Life and quality maintenance of fresh-cut Chinese water chestnut[J]. Journal of Food Engineering,2004,63(3):325–328.

[8]Peng L T, Jiang Y M. Exogenous salicylic acid inhibits browning of fresh-cut Chinese water chestnut[J]. Food Chemistry,2006,94(4):535–540.

[9]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 Chemistry,2015,186:119–122.

[10]荣 霞,赖钟雄,林玉玲,等. 橄榄多酚氧化酶基因(*PPO*)克隆及其试管苗离体保存过程中的表达分析[J]. 热带作物学报,2014,35(4):738–745.

[11]陈 娇,袁德保,谭 琳,等. 香蕉 *PPO* 基因的克隆及原核表达[J]. 贵州农业科学,2015,43(7):14–18.

[12]雷东锋,冯 怡,蒋大宗. 植物中多酚氧化酶的特征[J]. 自然科学进展,2004,14(6):606–614.

[13]Yoruk R, Marshall M R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review [J]. Journal of Food Biochemistry,2003,27(5):361–422.

[14]Newman S M, Eannetta N T, Yu H, et al. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family[J]. Plant Molecular Biology,1993,21(6):1035–1051.

[15]Hunt M D, Eannetta N T, Yu H, et al. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase[J]. Plant Molecular Biology,1993,21(1):59–68.

[16]Dry I B, Robinson S P. Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase[J]. Plant Molecular Biology,1994,26(1):495–502.

[17]田奇琳,林玉玲,郑庆游,等. 龙眼 *DIPPO1* 基因的克隆及其表达调控分析[J]. 西北植物学报,2016,36(6):1098–1104.

[18]You Y, Duan X, Wei X, et al. Identification of major phenolic compounds of Chinese water chestnut and their antioxidant activity [J]. Molecules (Basel, Switzerland),2007,12(4):842–852.

[19]庞学群,张昭其. 防褐处理对切分马蹄、马铃薯低温贮藏期间褐变的影响[J]. 食品科学,2002,23(4):126–129.

[20]Ru Z W, Lai Y Y, Xu C J, et al. In early stage of browning of phalaenopsis leaf explants [J]. Journal of Agricultural Science,2013,5(9):57–64.