

番木瓜果实软化相关 *CpEXPA2* 基因的克隆与表达分析

赵湾湾¹, 冯 力¹, 胡绍彬¹, 代亚兰¹, 李春侠¹,
赵秋月¹, 郑小华¹, 吴 迪¹, 王 平^{1*}, 申艳红^{2*}

(¹福建农林大学园艺学院园艺植物遗传育种研究所, 福州 350002; ²河北科技师范学院园艺科技学院, 河北秦皇岛 066604)

摘要:【目的】克隆一个与番木瓜果实软化相关的扩展蛋白基因, 分析其功能, 明确其在不同组织器官和不同成熟时期果实的表达模式。【方法】基于对番木瓜果实转录组学的研究, 筛选并克隆了一个与果实软化相关的扩展蛋白基因 *CpEXPA2*。采用同源序列对比和系统进化树分析对该基因进行序列分析; 运用生物信息学的方法对该基因编码的蛋白进行结构分析; 使用 RT-qPCR 方法分析 *CpEXPA2* 基因在不同组织器官、不同成熟时期果实中的表达量; 采用 GY-4 硬度计测定不同成熟时期番木瓜果实的硬度。【结果】*CpEXPA2* 基因的开放阅读框(ORF)为 780 bp(GeneBank 登录号为 MF662209), 编码 259 个氨基酸。该基因编码的氨基酸序列具有典型的扩展蛋白保守结构:N 端富含 8 个半胱氨酸、C 端富含 4 个色氨酸和中间 1 个组氨酸功能域(His-Phe-Asp, HFD)。同源序列比对分析发现该扩展蛋白与山木瓜 (ABF48653.1)、番茄 (AAC64201.1)、草莓 (AAF21101.1)、拟南芥 (AAB38073.1) 等扩展蛋白氨基酸序列有较高的同源性, 分别为 66.15%、64.86%、66.80%、65.00%。进化树分析表明, *CpEXPA2* 蛋白与拟南芥 AtEXPA6 (U30480)、AtEXPA16 (NM_115407) 关系最近。*CpEXPA2* 在不同组织器官中的表达量依次为成熟果实 > 叶 > 花 > 茎 > 根; 在不同发育时期的果实中, *CpEXPA2* 在果皮的表达量相对高于果肉, 且随着果实成熟软化程度提高, 其表达量也相应提高。番木瓜果实的硬度随着果实的成熟呈逐渐下降趋势, 在破色期开始硬度急剧下降, 果实迅速软化。【结论】*CpEXPA2* 基因的扩展蛋白家族高度保守, 且该基因编码的蛋白与山木瓜、番茄、草莓、拟南芥等扩展蛋白的氨基酸序列有较高的同源性。系统进化树分析发现番木瓜 *CpEXPA2* 与拟南芥 AtEXPA6 和 AtEXPA16 亲缘关系较近。*CpEXPA2* 受乙烯诱导, 且与果实发育进程有关, 因此推测该基因可能在番木瓜果实成熟软化过程中发挥着重要的作用。

关键词: 番木瓜; 扩展蛋白; 表达模式; 果实成熟软化

中图分类号: S667.9

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)07-0785-09

Cloning and expression analysis of *CpEXPA2* gene related to softening of papaya fruit

ZHAO Wanwan¹, FENG Li¹, HU Shaobin¹, DAI Yalan¹, LI Chunxia¹, ZHAO Qiuyue¹, ZHENG Xiaohua¹, WU Di¹, WANG Ping^{1*}, SHEN Yanhong^{2*}

(¹Institute of Genetics and Breeding in Horticultural Plants, College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; ²College of Horticultural Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066604, Hebei, China)

Abstract:【Objective】Expansins are a special group of plant cell wall proteins with no catalytic activity and are associated with several processes during plant growth and development. In particular, expansins play a role in fruit softening. Since a fruit-specific expansin gene *LeEXPA1* was found from tomato fruit, ripening-related expansins had been identified in tomato, strawberry, banana, and a range of other fruit species. Papaya (*Carica papaya* L.) is an important fruit crop with high economic and nutritional value. ‘Da Qing No. 10’ is a red-fleshed papaya. The red-fleshed papaya softens faster than the yellow-

收稿日期: 2018-03-28 接受日期: 2018-05-22

基金项目: 福建农林大学科技发展基金项目 (KFA17355A)

作者简介: 赵湾湾, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为果树遗传育种。Tel: 15659021063, E-mail: 2509903699@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13950203256, E-mail: 745433249@qq.com; Tel: 18332568958, E-mail: papayacrazy@aliyun.com

fleshed papaya and has a shorter shelf life. However, some consumers prefer red-fleshed papaya. Therefore, it is of great importance to explore the roles of expansins in fruit softening of papaya. An expansin gene was cloned and its function and expression patterns in different tissues and different fruit development and ripening stages were analyzed in this study. **【Methods】**Nineteen expansin candidate genes were selected according to gene annotation in the papaya transcriptome data. Then the heat map analysis was carried out using the relative expression of gene FPKM value and a gene related to the softening of papaya fruit was found. Total RNA was extracted from papaya pulp using General RNA the kit R1051 of Guangzhou Dongsheng Biotechnology Co. Ltd. Referring to BD Biosciences Clontech, Super SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit manual, double-stranded cDNA was synthesized by using papaya RNA (200 ng) as a template. And amplification was carried out as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C (30 s), 56.4 °C (30 s), and 72 °C (2 min), and then a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were gel purified. The purified products were cloned into a pMD18-T vector (TaKaRa) and transformed into *E. coli* DH5α competent cells, then the bacteria were spread onto LB Plates and incubated at 37 °C overnight. The positive clones were selected for PCR identification and sequenced by Shanghai Boshang Biotechnology Co. Ltd. Protein translation and homologous sequence analysis were taken by using DNAMAN software. Protein homology search was taken using NCBI Blastp. The NJ (neighbor-joining) phylogenetic tree was constructed by MEGA 5.0 software. Basic physicochemical properties of the amino acid were predicted by using online ProtParam. Signal peptide and transmembrane structure of amino acid were predicted using SignalP 4.1 Server and TMHMM online. The secondary structure of the amino acid sequence was analyzed using SOPM, and the tertiary structure of the amino acid sequence was analyzed using SWISS-MODEL online. The analysis of subcellular localization was performed using Cell-PLoc 2.0 online. Finally, the Real-Time quantitative PCR was performed using a CFX manager (Bio-Rad, USA) and the SYBR Premix ExTaqTM kit (Takala, Japan). RT-qPCR were used to analyze the quantitative expressions of *CpEXPA2* in different tissues and the peels and the fleshes of different maturity fruits of papaya. Amplification conditions were 95 °C for 30 s, followed by 40 cycles of amplification (95 °C for 5 s, 60 °C for 30 s) and plate reading after each cycle. Relative expressions of all replicates of each sample were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Then, Excel 2003 software was used to analyze the results of the experiment. **【Results】***CpEXPA2* gene contained a 780 bp open reading frame, which encoded 259 amino acids. The sequence structure analysis revealed that *CpEXPA2* gene contained a typical expansin structure features, belonging to α-expansin subfamily. The sequence alignment showed that the similarity between *CpEXPA2* and mountain papaya (ABF48653.1), tomato (AAC64201.1), strawberry (AAF21101.1) and *Arabidopsis thaliana* (AAB38073.1) homologues exhibited 66.15%, 64.86%, 66.80% and 65% identities in amino acid sequences, respectively. Meanwhile, the phylogenetic analysis illustrated that *CpEXPA2* was mostly closed to *AtEXPA6* (U30480) and *AtEXPA16* (NM_115407) in *Arabidopsis thaliana*. The ProtParam tool predicted that *CpEXPA2* had a molecular weight of 28095.15 Ku, a theoretical pI of 9.53, and a formula of C₂₅₅H₉₁₃N₃₅₁O₃₅₂S₁₇. Analysis of subcellular localization showed that *CpEXPA2* gene was located in cell wall in papaya. The secondary structure of *CpEXPA2* amino acids possessed α-helical (15.83%), β-rotation (12.74%), extension chains (25.87%) and irregular curls (45.56%). The main component of the secondary structure of *CpEXPA2* protein was irregular curls. RT-qPCR revealed that the expression of *CpEXPA2* in different tissues exhibited different patterns, the expression level of *CpEXPA2* in fruit was higher than that in the leaf, flower and stem. In the fruits with different maturity, the expression of *CpEXPA2* in the peel was significantly higher than that in the pulp. The expression in the

green period was very low, and the expression in the period of color break and the half yellow period increased sharply, and the expression in the full yellow period decreased. The fruit firmness of papaya decreased gradually with the maturity of fruit, and decreased rapidly in the color break stage and the fruit softened rapidly. As the firmness gradually decreased, papaya fruit softened and the expression of *CpEXP42* gene decreased relatively.【Conclusion】*CpEXP42* gene may be associated with the ripening and softening of papaya fruit, and it may be a suitable candidate gene to manipulate fruit ripening in order to increase the shelf life of papaya. The study of this gene provides a new idea for the molecular regulation of papaya fruit softening.

Key words: *Carica papaya*; Expansin; Expression patterns; Fruit ripening and softening

番木瓜(*Carica papaya* L.)是番木瓜科(Caricaceae)番木瓜属多年生草本植物,是热带、亚热带重要果树,具有很高的经济价值。而且番木瓜果实营养丰富,含有多种有机酸、维生素和氨基酸等,具有很好的保健功效,有增强免疫力、清除自由基、抗菌、抗病原体等功效,深受广大消费者的喜爱^[1]。番木瓜属于典型的呼吸跃变型果实,在采后极易软化腐烂,在运输和贮藏过程中会造成大量损失,在台湾番木瓜采后损失高达23.7%^[2]。因此对于番木瓜果实快速软化问题的研究具有重要的意义。

扩展蛋白(expansin, EXP)又称膨胀素、扩张素或扩张蛋白,是一类不具有水解酶和糖基转移酶等酶结构特征和功能的植物细胞壁蛋白^[3],它能缓释细胞壁结构网中的张力,使细胞壁变得松弛^[4]。Mcqueen-Mason等^[3]和Cosgrove等^[5]在黄瓜下胚轴伸长的研究中发现了第一个扩展蛋白(Expansin1, *Cs-EXP1*),随后大量的扩展蛋白基因被不断发现。很多研究表明,扩展蛋白在果实成熟软化中发挥着重要作用。Trivedi等^[6]发现香蕉 *MaEXP41* 仅在果实中表达,受乙烯调控,而且该基因表达量随着果实硬度的降低而增加,表明该基因与果实软化密切相关。杨绍兰等^[7]在布鲁诺猕猴桃成熟果实中克隆出扩展蛋白基因 *AdEXP41*,发现该基因的表达丰度与乙烯生成、果实软化程度相一致。所以推测该基因在猕猴桃果实后熟软化进程中起着重要作用。Gaete-Eastman等^[8]发现山木瓜(*Vasconcellea pubescens*)扩展蛋白基因 *VpEXP42* 在果实成熟期表达,且受乙烯的诱导,可能参与山木瓜果实的成熟软化。孙振营等^[9]推测柿果实中与成熟有关的 *DkEXP3* 和 *DkEXP4* 主要在果实成熟软化前期起作用,其表达有组织特异性,且受到乙烯的调控。

笔者在番木瓜果实转录组数据中筛选了一个可

能与番木瓜果实软化有关的扩展蛋白基因 *CpEXP42*,对 *CpEXP42* 进行了 cDNA 克隆,序列特征分析和生物信息学分析,并利用实时荧光定量 PCR 技术检测该基因在不同组织器官和不同成熟期果实中的表达情况,以期更深入地了解 *CpEXP42* 基因在番木瓜果实成熟软化中的作用,为培育耐贮藏、长货架期的番木瓜新品种提供理论基础和基因资源。

1 材料和方法

1.1 植物材料与取样

选用福建省漳州市的‘大庆十号’番木瓜为试验材料,采集番木瓜幼嫩的根、茎、完全伸展的叶片、盛开的花朵,以及表面完好、无机械损伤的番木瓜果实。参考 Miller 等^[10]的分级标准,将番木瓜果实划分为 4 个成熟时期:果皮表面全绿时为绿色期(green stage, GS),果皮出现一线黄时为破色期(break color stage, BC),黄色占果皮表面约 1/2 时为半黄期(half yellow stage, HY),黄色占果皮表面大于等于 3/4 时为全黄期(full yellow stage, FY)。每个阶段取 5 个果实,采用 GY-4 硬度计测定番木瓜果肉硬度,将硬度计垂直于已去果皮的番木瓜果实,均匀压入果肉至 10 mm 处,记录读数,每个样品 3 次重复。然后,将这 5 个果实去除皮和种子,把果皮和果肉分别混匀称重,用液氮快速冷冻,置 -80 °C 保存。共得到 8 种类型的样品:F1(绿色期果肉)、F2(破色期果肉)、F3(半黄期果肉)、F4(全黄期果肉);P1(绿色期果皮)、P2(破色期果皮)、P3(半黄期果皮)、P4(全黄期果皮)。番木瓜果实的处理参照 Shen 等^[11]的方法,乙烯利(0.5 g·L⁻¹)、1-MCP(1 μL·L⁻¹)及清水对照处理绿色期番木瓜果实,将处理后 24 h 的番木瓜果实去除果皮和种子,果肉切成小块,用液氮速冻后于 -80 °C 贮存备用。最后将 F1、F2、F3、P1、P2、

P3、乙烯(ETH)、1-MCP和对照(CG)的番木瓜果实样品送广州基迪奥生物公司进行转录组测序。

1.2 番木瓜 *CpEXPA2* 基因的克隆

使用广州东盛生物科技有限公司的通用RNA提取试剂盒R1051提取番木瓜果肉总RNA，并利用紫外分光光度计Q-5000和琼脂糖凝胶电泳检测浓度和纯度后，参照BD Biosciences Clontech公司，Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit试剂盒说明书，以番木瓜果肉RNA(200 ng)为模板合成双链cDNA，于-20 °C保存备用。

在实验室已有的番木瓜果实转录组中，参照基因注释筛选了19个扩展蛋白基因，利用基因相对表达量FPKM值做热图，筛选与番木瓜果实软化相关的扩展蛋白基因，并在番木瓜基因组数据库[*Carica papaya* Version1.181:CpG DB181(JGI)]中搜索该基因的基因组DNA序列，利用Primer 5.0软件在开放阅读框(ORF)的两侧设计特异引物(表1)，引物合成由上海铂尚生物技术有限公司完成。

表1 引物及其序列

Table 1 The sequence of primers used in this study

引物名称	Primer name	序列	Sequence (5'-3')
<i>CpEXPA2</i> -F		TCAACATCCCTCATGGCAATTCTC	
<i>CpEXPA2</i> -R		GTATTGATTGGGTCTAACAAAGAGAGC	
<i>qCpEXPA2</i> -F		CGTGAAGGTGAGCGTTAAGG	
<i>qCpEXPA2</i> -R		TGACCGAACTGCCAATTAGC	
<i>qCpActin</i> -F		AGGCAGGCAAGAGAAGAT	
<i>qCpActin</i> -R		TTCATACCGAGTAGCGATT	

然后以番木瓜果肉cDNA为模板，利用引物*CpEXPA2*-F、*CpEXPA2*-R进行PCR扩增。PCR反应体系为25 μL: ddH₂O 18.3 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, cDNA 1 μL, 上游和下游引物各0.5 μL, Taq DNA聚合酶0.2 μL。PCR反应程序为: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 56.4 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35次循环；最后72 °C延伸7 min。扩增PCR产物经1%(ω)琼脂糖凝胶电泳检测，将目的条带割胶，采用琼脂糖胶回收试剂盒对其进行回收，连接PMD18-T载体并转化DH5 α 大肠杆菌，将转化产物均匀涂于LB平板上培养12 h，挑取单菌落进行菌液PCR验证，将阳性菌液送上海铂尚生物技术有限公司测序。

1.3 生物信息学分析

利用DNAMAN软件进行蛋白质翻译和同源序列分析，NCBI Blastp进行蛋白质同源性搜索；利用MEGA 5.0软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建

分子进化树；利用ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)、SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)等在线工具对氨基酸基本理化性质、信号肽、跨膜结构进行预测；利用SOPM (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)分别进行蛋白质二级结构和三级结构分析；利用Cell-PLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>)在线对蛋白质进行亚细胞定位预测。

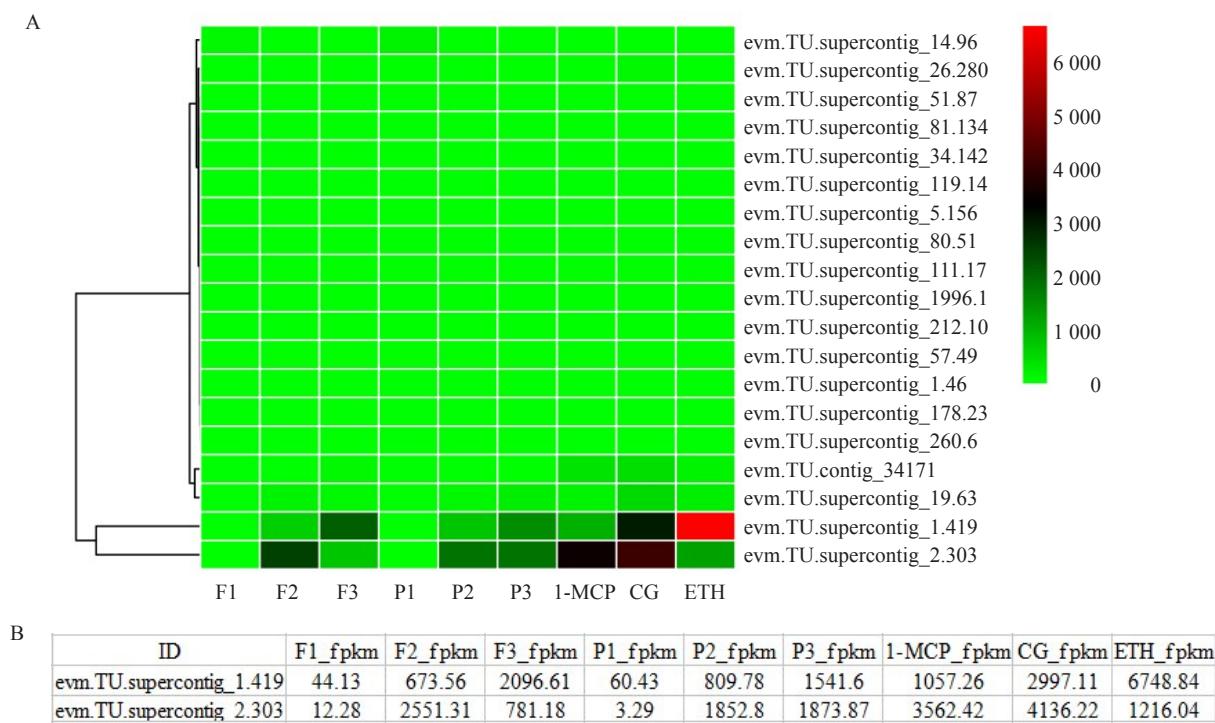
1.4 番木瓜 *CpEXPA2* 基因的表达分析

利用Primer 5.0软件在基因的非保守区设计*CpEXPA2*基因和番木瓜肌动蛋白基因*CpActin*的实时荧光定量引物(表1)，引物合成由上海铂尚生物技术有限公司完成。提取不同成熟时期的果皮和果肉RNA，以及根、茎、叶、花的RNA，分别将其逆转录为cDNA，然后以稀释10倍的cDNA作为RT-qPCR的模板，使用购自美国伯乐(Bio-Rad)有限公司的Bio-Rad CFX96 Real-Time System荧光定量PCR仪检测*CpEXPA2*基因的表达量。以*CpActin*为内参，RT-qPCR反应体系为25 μL体系：SYBR Mix 12.5 μL, 上、下游引物各0.5 μL, cDNA 2 μL, ddH₂O 9.5 μL。两步法扩增：95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40次循环。采用相对定量法 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 法^[12]进行3次生物学重复测定，然后利用Excel 2003软件对试验结果统计分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 番木瓜果实软化相关的扩展蛋白基因的筛选和克隆

将从番木瓜果实转录组数据库中检测到的扩展蛋白基因进行热图分析，结果(图1-A)显示，发现其中有2个基因(ev.m.TU.supercontig_1.419和ev.m.TU.supercontig_2.303)在番木瓜果实中表达量较高，这2个基因的具体表达量结果(图1-B)所示。其中ev.m.TU.supercontig_2.303是牛艳梅等^[13]克隆的*CpEXP1*基因，在果皮和果肉中均有表达；另一个ev.m.TU.supercontig_1.419基因的表达量随着果实成熟不断提高，并且乙烯处理诱导该基因表达量剧增。由于ev.m.TU.supercontig_1.419基因的表达模式与番木瓜果实成熟进程相关，并且乙烯诱导其表达量升高，



A. 番木瓜果实转录组中的扩展蛋白热图分析; B. evm.TU.supercontig_1.419 和 evm.TU.supercontig_2.303 的表达量。
A. Analysis of expansins heat map in papaya transcriptome; B. Expression of evm.TU.supercontig_1.419 and evm.TU.supercontig_2.303.

图1 番木瓜果实软化相关扩展蛋白基因的筛选
Fig. 1 Screening expansin genes related to softening of papaya

因此选择该基因作为番木瓜果实软化候选基因并做进一步研究。

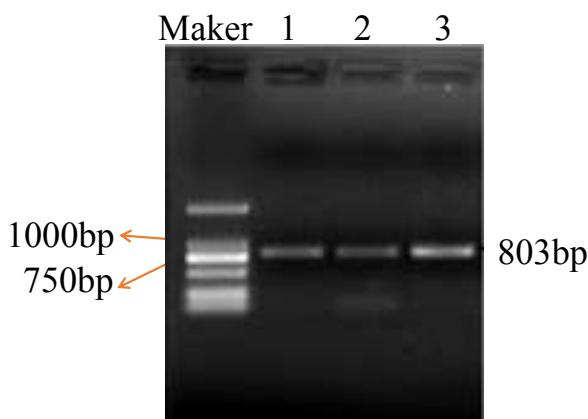
以番木瓜果肉 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增获得与预期目的基因大小一致的条带,结果(图2)显示,将目的条带回收并测序获得长度为 803 bp 的序列。该基因开放阅读框(ORF)为 780 bp, GenBank

登录号为 MF662209,共编码 259 个氨基酸,命名为 *CpEXPA2*。对其序列特征分析,发现 *CpEXPA2* 蛋白序列与 EXPA 亚家族蛋白序列有共同的结构特征,即在 N-末端有 8 个保守的半胱氨酸残基的丰富域,C-末端有 4 个保守的色氨酸残基的丰富域,中间有一个组氨酸(His-Phe-Asp, HFD)功能域(图3),确定其属于 EXPA 亚家族(α -expansin)。

2.2 *CpEXPA2* 基因的同源分析和系统进化分析

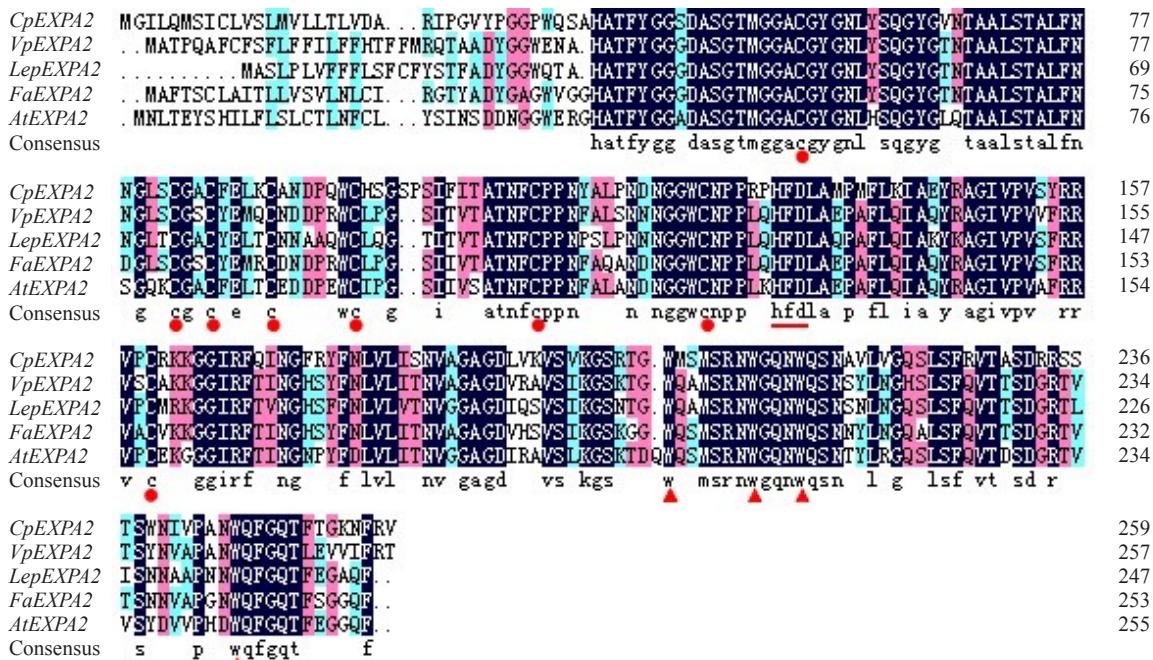
利用 DNAMAN 软件将 *CpEXPA2* 基因的开放阅读框翻译成氨基酸序列,然后在 NCBI 网站上进行 BLASP 同源检索,发现 *CpEXPA2* 编码的氨基酸序列与很多植物都具有较高的同源性。通过 DNAMAN 6.0 软件进行同源序列对比,发现 *CpEXPA2* 编码的氨基酸序列与山木瓜 (ABF48653.1)、番茄 (AAC64201.1)、草莓 (AAF21101.1)、拟南芥 (AAB38073.1) 扩展蛋白氨基酸序列有较高的同源性,分别为 66.15%、64.86%、66.80%、65.00%,这说明扩展蛋白 EXPA 亚家族基因高度保守(图3)。

通过在拟南芥信息数据库 (<http://www.personal.psu.edu/fsl/ExpCentral/arabidopsis.htm>) 中检索,获得



M. DL2000 DNA Marker; 1, 2, 3. *CpEXPA2* 的 PCR 扩增产物。
M. DL2000 DNA Marker; 1, 2, 3. The PCR products of *CpEXPA2*.

图2 番木瓜 *CpEXPA2* 基因的克隆
Fig. 2 Cloning of *CpEXPA2* gene from papaya



8个保守的半胱氨酸(cysteine,C)、4个色氨酸(tryptophane,W)、1个组氨酸域(His-Phe-Asp,HFD)分别用红色的实心圆、三角形和红色下划线突出显示。

Eight conservative cysteines, four tryptophan, and one histidine domains are highlighted in red solid circles, triangles and red underlines, respectively.

图3 CpEXPA2 与其同源蛋白序列的氨基酸聚类分析

Fig. 3 Amino acid sequence alignment between CpEXPA2 and its homologous proteins from other plant species

拟南芥26个 α -expansins的氨基酸序列,用MEGA 5.0软件构建番木瓜CpEXPA2与拟南芥扩展蛋白EXPA亚家族的系统进化树。结果发现番木瓜CpEXPA2与AtEXPA6(U30480)亲缘关系最近,序列相似程度最高,相似率为82.24%,其次为AtEXPA16(NM_115407),相似率为77.31%(图4)。

2.3 番木瓜CpEXPA2基因编码的蛋白结构分析

番木瓜CpEXPA2基因编码259个氨基酸。ProtParam分析可知,番木瓜CpEXPA2蛋白质分子式为 $C_{1255}H_{1913}N_{351}O_{352}S_{17}$,等电点为9.53,分子质量约为28 095.15 ku。CpEXPA2蛋白总的负电荷残基数(Asp+Glu)为9个,正电荷残基数(Arg+Lys)为21个。该蛋白含量最丰富的氨基酸分别为甘氨酸Gly(11.6%)、丝氨酸Ser(9.3%)、丙氨酸Ala(7.7%)、天冬酰胺Asn(7.3%)、亮氨酸Leu(7.3%)和缬氨酸Val(6.9%)。蛋白的不稳定系数为42.04,属于不稳定蛋白。该蛋白亲水性较强,氨基酸残基疏水性总和(GRAVY)是-0.020。采用SignalP 4.1 Server在线预测CpEXPA2蛋白信号肽,发现C-score=0.806,Y-score=0.879和S-score=0.986,由此得知CpEXPA2蛋白存在1个信号肽,为分泌蛋白,裂解位点的位置22

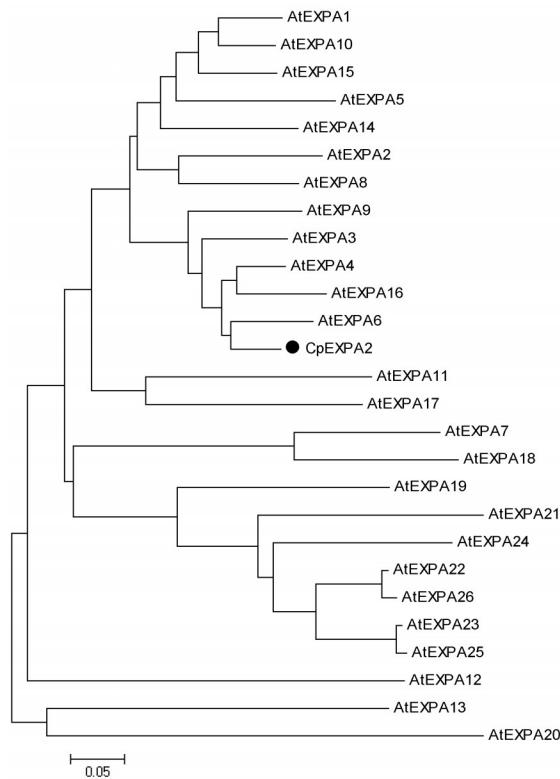


图4 番木瓜CpEXPA2和拟南芥 α -expansins的系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of papaya CpEXPA2 and *Arabidopsis thaliana* α -expansins

和23之间。TMHMM Server v.2.0在线分析结果表明, *CpEXPA2* 蛋白属于非跨膜蛋白。使用 Cell-PLoc 2.0 在线软件进行亚细胞定位预测分析可知, 番木瓜 *CpEXPA2* 蛋白主要位于细胞壁中。

用 SOPM 法对 *CpEXPA2* 蛋白进行二级结构分析, 发现该蛋白主要由 15.83% 的 α -螺旋、12.74% 的 β -转角、25.87% 的延伸链和 45.56% 的无规则卷曲构成, 且无规则卷曲所占比例最高。以 SWISS-MODEL 工具同源建模法预测番木瓜 *CpEXPA2* 蛋白的三级结构, 结果(图 5)显示, 可以看出 α -螺旋、 β -转角、延伸链和随机卷曲的二级结构折叠方式, 预测的结果与二级结构的结论相符。

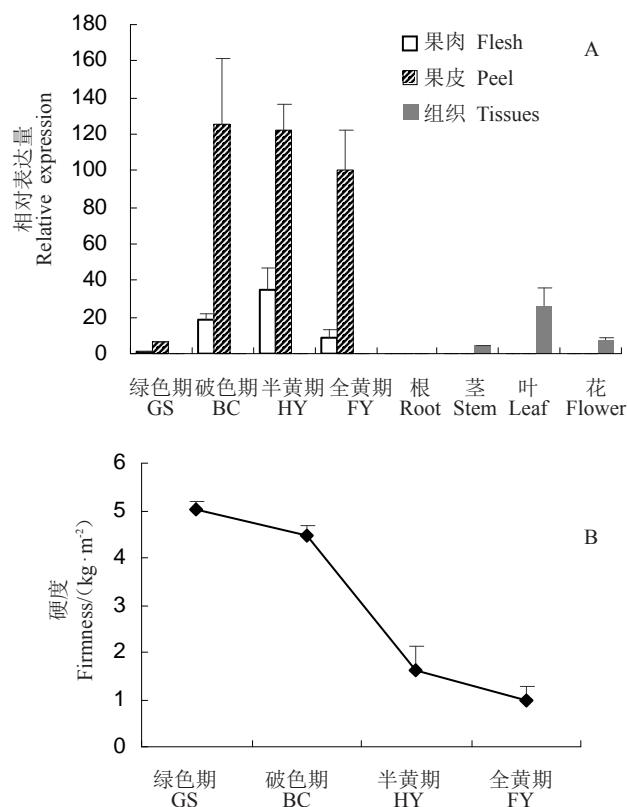


图 5 *CpEXPA2* 蛋白质三级结构预测

Fig. 5 Prediction of tertiary structure of *CpEXPA2* protein

2.4 *CpEXPA2* 基因的表达分析与番木瓜果实硬度的变化

CpEXPA2 在番木瓜果实(果皮和果肉)、根、茎、叶、花中的表达量结果(图 6-A)显示, 在不同组织器官中, *CpEXPA2* 基因在成熟的果实中表达量最高, 在叶中表达量较高, 在花和茎中有少量表达, 而在根中基本检测不到表达。在不同成熟期的果实中, *CpEXPA2* 在果皮中的表达量明显高于果肉。在绿色期表达量很低, 在破色期和半黄期表达量急剧升高, 在全黄期表达量下降。番木瓜果实的硬度随着果实的成熟呈逐渐下降趋势, 在破色期开始硬度急剧下降, 果实迅速软化(图 6-B)。番木瓜果实的硬度逐渐下降, 番木瓜也不断软化, *CpEXPA2* 基因的表达也相对降低。综上所述, *CpEXPA2* 基因主要在成熟果实中大量表达, 并且在果实中的基因表达模式与果实成熟软化进程相一致, 因此推测该基因可能与番木瓜果实软化有关。



A. *CpEXPA2* 基因的表达分析; B. 番木瓜果实成熟软化过程中硬度的变化。

A. Expression of *CpEXPA2* in different tissues of papaya; B. Changes of firmness during the ripening of papaya fruit.

图 6 *CpEXPA2* 基因的表达分析与番木瓜果实硬度的变化

Fig. 6 Expression analysis of *CpEXPA2* gene and the change of firmness of papaya fruit

3 讨 论

果实软化是果实成熟的标志, 它决定果实成熟的品质、果实的货架寿命和果实采后处理的特性^[14-15]。一直以来, 人们以为果实软化是细胞壁的水解酶降解导致的, 由于伴随果实成熟衰老, 一些细胞水解酶的活性也增加, 与果实软化进程相一致。果实软化水解酶的研究较多的主要有多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲酯酶(PE)和纤维素酶(CX)等。例如, PG 参与果胶的降解, 在果实软化中起着重要的作用。番木瓜果实软化过程中, PG 发挥着重要的作用, Shen 等^[11]在番木瓜转录组中检测到了 3 个 PG 基因, 3 个基因的表达模式相同, 在乙烯处理下上调, 在 1-MCP 处理下下调, 与果实成熟软化密切相关。但是 Smith 等^[16]通过对番茄中反义 PG RNA 植株的获得, 发现 PG 并不是果实成熟软化的唯一基因。

随后,扩展蛋白的出现更是打破了这样的常规,扩展蛋白本身不具有水解酶的特性,但却在果实成熟软化中起着举足轻重的作用。自从 Rose 等^[17]从番茄果实中克隆出第 1 个果实成熟特异的扩展蛋白之后,人们对扩展蛋白在果实成熟中的作用研究地越来越多,已先后从草莓^[18-19]、桃^[20]、杏^[21]、猕猴桃^[7]、枇杷^[22]等果实中证明扩展蛋白与果实的成熟软化有关。

扩展蛋白是一个庞大的多基因家族,目前,植物扩展蛋白主要分为 4 类^[23],包括 α -expansin(EXPA)、 β -expansin(EXPB)、类 α -expansin(EXLA)和类 β -expansin(EXLB)。目前研究较多的是 α -expansin 和 β -expansin,并且已经发现 α -expansin 在植物营养生长、生殖生长,以及胁迫反应中有着非常重要的作用。目前在多种植物中已经克隆得到扩展蛋白的基因,如拟南芥中获得 26 个 AtEXPA 基因、6 个 AtEXPB 基因、3 个 AtEXLA 基因和 1 个 AtEXLB 基因^[24]。番木瓜基因组中至少包含 15 个 CpEXPA、3 个 CpEXPB 和 1 个 CpEXPLA^[25]。本研究是在本实验室已有的番木瓜果实转录组中,参照基因注释筛选了 19 个扩展蛋白基因,从中发现 evm.TU.supercontig_1.419 和 evm.TU.supercontig_2.303 在番木瓜果实中表达量较高。其中 evm.TU.supercontig_2.303 是牛艳梅等^[13, 26]之前报道的 CpEXPI 基因,该基因在破色期表达量最高,但是在乙烯处理番木瓜果实中表达量较低,不受乙烯诱导,与牛艳梅等研究结果不相符。另一个 evm.TU.supercontig_1.419 基因的表达量随着果实成熟不断提高,并且乙烯处理诱导该基因表达量剧增。于是,本研究获得了 1 个新的候选番木瓜扩展蛋白基因 CpEXPA2(emv.TU.supercontig_1.419),对其展开了一系列的序列特征分析和生物信息学分析,发现该基因属于 α -expansin(EXPA)扩展蛋白亚家族,符合 α -expansin 的结构特征,且该家族高度保守。RT-qPCR 分析表明 CpEXPA2 基因在番木瓜果实中的表达量最高,且表达模式与果实成熟软化进程有关,因此推测该基因可能参与番木瓜果实的成熟软化。该研究为探讨扩展蛋白在番木瓜果实软化中的作用提供一定的参考依据。

4 结 论

从已有的番木瓜果实转录组筛选并克隆了一个与果实软化有关的扩展蛋白基因,命名为 CpEX-

P2。研究发现 CpEXPA2 基因的扩展蛋白家族高度保守,且该基因编码的蛋白与山木瓜、番茄、草莓、拟南芥等扩展蛋白的氨基酸序列有较高的同源性。系统进化树分析发现番木瓜 CpEXPA2 与拟南芥 At-EXPA6 和 AtEXPA16 亲缘关系较近。CpEXPA2 受乙烯诱导,且与果实发育进程有关,因此是番木瓜果实成熟软化中一个关键基因,该基因的研究为番木瓜果实软化的分子调控提供了新的思路,为后续该基因的功能验证奠定了基础。

参 考 文 献 References:

- [1] 冯力,杨云,杨菲颖,耿皎皎,李科,申艳红.番木瓜成熟衰老蛋白基因 CpSSA 的克隆与表达分析[J].分子植物育种,2017,15(4):1212-1217.
FENG Li, YANG Yun, YANG Feiying, GENG Jiaojiao, LI Ke, SHEN Yanhong. Analysis and cloning of fruit ripening-related protein gene CpSSA from papaya (*Carica papaya* L.)[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(4): 1212-1217.
- [2] 李雪萍,陈维信.番木瓜采后生理及品质控制研究综述[J].中国农学通报,2005,21(3):211-214.
LI Xueping, CHEN Weixin. Progress of postharvest physico-chemical changes and storage research of papaya fruit [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(3): 211-214.
- [3] MCQUEEN-MASON S, DURACHKO D M, COSGROVE D J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants[J]. Plant Cell, 1992, 4(11): 1425-1433.
- [4] COSGROVE D J. How do plant cell walls extend?[J]. Plant Physiology, 1993, 102(1): 1-6.
- [5] COSGROVE D J. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls[J]. Plantata, 1989, 177(1): 121-130.
- [6] TRIVEDI P K, NATH P. *MaExpi*, an ethylene-induced expansin from ripening banana fruit[J]. Plant Science, 2004, 167(6): 1351-1358.
- [7] 杨绍兰,陈妙金,张波,李鲜,徐昌杰,陈昆松.乙酰水杨酸调控猕猴桃果实时熟软化进程中 Ad-EXPI 基因表达[J].果树学报,2007,24(6):778-782.
YANG Shaolan, CHEN Miaojin, ZHANG Bo, LI Xian, XU Changjie, CHEN Kunsong. Expression pattern and regulation of *Ad-Expi* gene in kiwifruit treated with ASA[J]. Journal of Fruit Science, 2007, 24(6), 778-782.
- [8] GAETE-EASTMAN C, FIGUEROA C R, BALBONTÍN C, MOYA M, ATKINSON R G, HERRERA R, MOYA-LEÓN M A. Expression of an ethylene-related expansin gene during softening of mountain papaya fruit (*Vasconcellea pubescens*) [J]. Postharvest Biology and Technology, 2009, 53(1), 58-65.
- [9] 孙振营,韩叶,李秀芳,马秋诗,饶景萍.柿采后丙烯和 1-甲基环丙烯处理对两个扩展蛋白基因表达的影响[J].园艺学报,

- 2014,41(6):1089-1095.
- SUN Zhenying, HAN Ye, LI Xiufang, MA Qiushi, RAO Jing-ping. Effects of propylene and 1-methylcyclopropene on expression of two EXP genes in persimmon fruits[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(6): 1089-1095.
- [10] MILLER W R, MCDONALD R E. Irradiation, stage of maturity at harvest, and storage temperature during ripening affect papaya fruit quality[J]. *HortScience*, 1999, 34(6): 1112-1115.
- [11] SHEN Y H, LU B G, FENG L, YANG F Y, GENG J J, MING R, CHEN X J. Isolation of ripening-related genes from ethylene/1-MCP treated papaya through RNA-seq[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 671-683.
- [12] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] 牛艳梅, 沈文涛, 卢雅薇, 周鹏. 番木瓜果实扩展蛋白Cp-EXP1基因表达的荧光定量PCR分析[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(1): 84-86.
- NIU Yanmei, SHEN Wentao, LU Yawei, ZHOU Peng. Analysis of expansin Cp-EXP1 gene expression in papaya fruit by real-time quantitative PCR[J]. *Letters in Biotechnology*, 2008, 19(1): 84-86.
- [14] BRUMMELL D A. Cell wall disassembly in ripening fruit[J]. *Functional Plant Biology*, 2006, 33(2): 103-119.
- [15] BRUMMELL D A, HARPSTER M H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants[J]. *Plant Molecular Biology*, 2001, 47(1/2): 311-339.
- [16] SMITH C J S, WATSON C F, RAY J, BIRD C R, MORRIS P C, SCHUCH W, GRIERSON D. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes[J]. *Nature*, 1988, 334(6184): 724-726.
- [17] ROSE J K C, LEE H H, BENNETT A B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(11): 5955-5960.
- [18] HARRISON E P, MCQUEEN-MASON S J, MANNING K. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(360): 1437-1446.
- [19] CIVELLO P M, POWELL A L T, SABEHAT A, BENNETT A B. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit[J]. *Plant Physiology*, 1999, 121(4): 1273-1279.
- [20] HAYAMA H, SHIMADA T, HAJI T, ITO A, KASHIMURA Y, YOSHIOKA H. Molecular cloning of a ripening-related expansin cDNA in peach: evidence for no relationship between expansin accumulation and change in fruit firmness during storage[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 157(5): 567-573.
- [21] MBÉGUIÉ-A-MBÉGUIÉ D, GOUBLE B, GOMEZ R, AUDERGON J, ALBAGNAC G, FILS-LYCAON B. Two expansin cDNAs from *Prunus armeniaca* expressed during fruit ripening are differently regulated by ethylene[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2002, 40(5): 445-452.
- [22] YANG S L, SUN C D, WANG P, SHAN L L, CAI C, ZHANG B, ZHANG W S, LI X, FERGUSON I, CHEN K S. Expression of expansin genes during postharvest lignification and softening of 'Luoyangqing' and 'Baisha' loquat fruit under different storage conditions[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 49(1): 46-53.
- [23] KENDE H, BRADFORD K J, BRUMMELL D A, CHO H, COSGROVE D J, FLEMING A J, GEHRING C, LEE Y, MSQUEEN-MASON S, ROSE J K C, VOESENEK L A C J. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(3): 311-314.
- [24] LEE Y, CHOI D, KENDE H. Expansins: ever-expanding numbers and functions[J]. *Plant Biology*, 2001, 4(6): 527-532.
- [25] PAULL R E, IRIKURA B, WU P F, TURANO H, CHEN N J, BLAS A, FELLMAN J K, GSCHWEND A R, WAI C M, YU Q Y, PRESTING G, ALAM M, MING R. Fruit development, ripening and quality related genes in the papaya genome[J]. *Tropical Plant Biology*, 2008, 1(3/4): 246-277.
- [26] 牛艳梅, 沈文涛, 卢雅薇, 周鹏. 番木瓜果实膨胀素基因部分序列的克隆及分析[J]. 热带作物学报, 2007, 28(4): 47-50.
- NIU Yanmei, SHEN Wentao, LU Yawei, ZHOU Peng. Cloning and analysis of the partial sequence of expansin gene in fruit of papaya [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2007, 28(4): 47-50.