

板栗 *PPO* 基因家族鉴定及生物信息学分析

程丽莉^{1,2a}, 程运河^{1,2a}, 曹庆昌^{1,2}, 胡广隆¹, 兰彦平^{1,2*}

(¹北京市林业果树科学研究院, 北京 100093; ²国家林草局板栗工程技术研究中心, 北京 100093)

摘要:【目的】褐变过程与多酚氧化酶(Polyphenol oxidases, PPO)密切相关,通过板栗 *PPO* 基因家族鉴定及生物信息学分析,为深入阐明 PPO 蛋白质的功能提供依据。【方法】从最新发布的板栗基因组数据库中鉴定到 3 个 *PPO* 基因: *CmPPO1* (BUA.CMHBY222345)、*CmPPO2* (BUA.CMHBY216654)、*CmPPO3* (BUA.CMHBY216989), 并利用生物信息学方法,对其序列和基因编码蛋白的理化性质、结构功能等进行预测。【结果】(1)3 个基因的 CDS 全长分别是 1 794、1 809 和 1 809 bp, 分别编码氨基酸序列 597、602 和 602 aa, 属于亲水酸性蛋白质, 不存在跨膜区, 为非分泌蛋白。(2) *CmPPOs* 蛋白酶的二级结构无规则卷曲比例最高, 三级空间结构模型分析与蔷薇科苹果酪氨酸酶结构(*MdPPO1*) 序列同源性超过 70%。(3)对苹果、马铃薯和板栗 3 个易褐变物种的 23 个 *PPO* 基因编码蛋白进行多序列比对和保守结构域分析, 明确板栗 PPO 和蔷薇科苹果有较高同源性。(4)对不同品种板栗仁中的 *PPO* 基因进行表达分析, 只检测到 *CmPPO1*, 且表达量与酶活性相关性不显著, 表明板栗仁中 PPO 活性不能直接影响褐变程度, 不同品种褐变程度与 *PPO* 表达量呈显著相关。【结论】板栗 *PPO* 基因家族 3 个成员中, 不同品种 *CmPPO1* 表达量与果实受热褐变程度呈显著相关。本研究为板栗抗褐变育种提供了新的基因资源, 但鉴于 PPO 存在同工酶, 表达调控机制比较复杂, 特异表达和时空差异性有待进一步研究。

关键词: 板栗; 果实; *PPO* 基因家族; 生物信息学

中图分类号: S664.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2020)09-1305-09

Identification and bioinformatics analysis of *PPO* gene family in Chinese chestnut (*Castanea mollissima*)

CHENG Lili^{1,2a}, CHENG Yunhe^{1,2a}, CAO Qingchang^{1,2}, HU Guanglong¹, LAN Yanping^{1,2*}

(¹Beijing Academy of Forestry and Pomology Sciences, Beijing 100093, China; ²Chestnut Engineering & Technology Research Center State Forestry Administration, Beijing 100093, China)

Abstract: 【Objective】Polyphenol oxidases (PPOs) are oxidative enzymes that convert monophenols and o-diphenols to o-quinones using molecular oxygen. The quinone products are highly reactive following tissue damage and can interact with cellular constituents and cause oxidative browning and cross-linking. The browning of kernel occurs in chestnut processing, the metabolism of browning substances is closely related to PPO. However, little is known about the molecular mechanisms regulating this process, by the identification of *PPOs* gene family in Chinese chestnut and bioinformatics analysis, the present study attempts to establish some basic features of the function of PPO protein that have not been previously described. 【Methods】Three *PPO* genes, *CmPPO1* (BUA.CMHBY222345), *CmPPO2* (BUA.CMHBY216654), *CmPPO3* (BUA.CMHBY216989), were collected from the latest published database of Chinese chestnut genome. The bioinformatic analysis of these three genes was carried out for further understanding of their putative functions. ORF regions of *PPO* gene sequences were founded by ORF finder program in NCBI. The basic physicochemical properties of the PPO proteins were analyzed by ExPASy ProtParam. The secondary structure analysis about the content of α -helix, random

收稿日期: 2019-12-05 接受日期: 2020-06-11

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划(2018YFD1000605); 北京市农林科学院青年科研基金(QNJJ201703)

作者简介: 程丽莉, 女, 副研究员, 主要从事经济林育种研究。Tel: 010-82590742, E-mail: lily980101@126.com。a 为共同第一作者。

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 010-82596103, E-mail: lanyanping2000@126.com

coil, extended strand, beta turn in PPO proteins were fulfilled by SOPMA online software. The distribution of curl and the homology modeling of the tertiary structure of *PPO* genes were performed using Swiss-Model online software. Neighbor-joining phylogenetic tree of *BUA*, *MDP* and *PGSC* based on these edited alignments were generated using MEGA version 6.0 software, pairwise deletion, distance matrix, and 1 000 bootstrap replicates were applied to the tree. Furthermore, expression patterns of *CmPPO1* in three chestnut cultivars with different enzymatic activity were analyzed by Quantitative Real-time PCR. The total RNA of chestnut fruit was extracted using EASYspin Plus Plant RNA Kit (Aidlab, China) according to manufacturer's instructions. First-strand cDNA was synthesized from 200ng of total RNA using the Prime Script RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa, China). The qRT-PCR was performed using the SuperReal PreMix Plus (SYBR Green) (TianGen, China) in a total volume of 20 μL in each well containing 10 μL of 2 \times SuperReal PreMix Plus, 1 μL of cDNA, and 0.6 μL 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ primers. The qPCR conditions were 15 min at 95 $^{\circ}\text{C}$, followed by 40 cycles of 15s at 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s at 60 $^{\circ}\text{C}$. Actin gene (ev253704) was used as the reference. 【Results】The full-length CDs of the three genes was 1 794-1 809 bp in length and they encoded 509-539 amino acid sequences with an apparent molecular weight of 66.4 -67.4 ku and a theoretical pI of 6.47-6.94, which contained the conservative domains of tyrosinase (PF00264), PPO1_DWL (PF12142), PPO1_KFDV (PF12143). The *CmPPOs* belonged to hydrophilic acid protein without transmembrane region and were not secretory protein. The secondary structure of the proteins included the form of α -helix, random coil, extended strand and beta turn mainly. It showed the highest ratio of random coil, which has been reported to be affected by the chain interaction and closely related to the composition of the active part of the protein. And analysis of the tertiary structure of the deduced amino acid sequence showed that it had the same template of the sequence of *MdPPO1* (*Malus pumila* Mill.) in Rosaceae. The homology of the deduced amino acid sequence to the *PPO* sequence of apple was over 70%. The location signals of *CmPPO1* in mitochondria and cytoplasm were 39.1% and 34.8% respectively, which were much higher than that in endoplasmic reticulum and other regions. The *CmPPO2* and *CmPPO3* were mainly located in the nucleus, and the signal proportion was 69.6%. Twenty-three *PPO* gene coding proteins of apple, potato and chestnut, were analyzed by multiple sequence alignment and the conserved domains among these *PPOs* were analyzed, the searched motifs were annotater on Pfam with regard to phylogenetic relationship and domain analysis of *PPO* family encoding proteins, with 6 motifs being founded and being located in conservation domain. Phylogenetic tree showed that genetic relationship was not related to species, but mainly related to the structure and the function of PPO enzymes. The expression patterns of *PPO* genes in different varieties of chestnut were analyzed, only *CmPPO1* was detected. The results showed that PPO activity in chestnut kernel could not directly affect the browning degree, and the browning difference of different varieties would be possibly induced by the *PPO* expression. 【Conclusion】In Chinese chestnut, there were three *PPO* genes. Their expression was enhanced in three chestnut cultivars with different enzymatic activity.

Key words: Chestnut; Kernels; *PPO* genes; Bioinformatics

板栗 (*Castanea mollissima* Bl.) 起源于中国, 栽培历史悠久, 经济栽培遍及我国 22 个省(自治区、直辖市), 品种约为 300 个^[1], 其果实品质、营养价值、适应性和抗逆性均优于世界栗属其他栽培种, 在国际上被誉为“中国甘栗”。在金黄色鲜栗仁加工过程

中, 伴随酚类物质的酶促褐变及糖、蛋白质的非酶促褐变^[2], 严重影响产品的感官质量和经济价值, 阻碍了后续深加工产品的开发, 是板栗加工产业发展的瓶颈之一。

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 是由核

基因编码的铜结合金属蛋白酶^[3],表现多基因家族性,在果蔬等农产品酶促褐变中起到重要的作用,在植物体内色素合成过程中也起到关键性作用。经过多年研究,对PPO引起植物组织发生褐变的机制已经初步了解,随着分子生物学的发展,马铃薯^[4-5]、甘薯^[6]、烟草^[7]、香蕉^[8]、葡萄^[9]、苹果^[10-11]、中国梨^[12]、杏^[13]、茶树^[14]等植物的PPO基因已被克隆鉴定,为其在植物体内表达模式分析及功能研究提供了方便。结果表明PPO基因在不同植物中主要以多基因家族、串联的形式存在,且由于其组织特异性及表达模式的差异暗示其功能多样性,分子水平的研究还停留在外界胁迫的转录响应上,对其生理功能及调控机制少有深入研究。目前国内外许多学者都围绕该酶在基因工程技术方面开展系列研究,试图通过调控植株中的褐变相关酶类基因的表达^[15-16],为控制酶促褐变提供可行途径。板栗作为经济林树种,分子遗传研究基础薄弱,对于酶促褐变分子机制更是鲜见研究。为此,笔者利用PPO基因在高等植物中的高度保守性,应用生物信息学分析方法,对板栗PPO基因家族成员进行鉴定,并预测和分析基因编码蛋白的序列、理化性质、跨膜区结构特性及保守结构域;选取易褐变植物苹果、马铃薯的PPO基因家族,研究其与板栗的亲缘关系;同时以板栗仁胚乳组织为试验材料,展开不同褐变度板栗品种酶活性和PPO基因表达量的相关性分析。研究结果将为克隆板栗PPO基因提供重要的序列信息,为深入研究板栗褐变发生机制奠定基础,对今后选育适用于加工的不(弱)褐变板栗品种具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 RNA提取和cDNA合成

热处理后褐变度从轻到重的‘YG’‘5H’和‘YH’3个品种(图1)的鲜栗仁,取表层1~2 mm组



图1 不同板栗品种栗仁褐变度

Fig. 1 Browning degrees of three cultivars in Chinese chestnut seeds

织立即用液氮冷冻,置于-80℃超低温冰箱保存,采用植物RNA提取试剂盒(R6827-01, Omega)提取RNA,紫外分光光度计及凝胶电泳检测质量,达到合格标准,采用cDNA第一链反转录试剂盒(KR106, 天根)完成反转录,获得cDNA。

1.2 板栗PPO基因家族获得

根据PPO基因序列结构域特征,分别利用结构域Tyrosinase (PF00264)、PPO1_DWL (PF12142)、PPO1_KFDV (PF12143),在最新发布的板栗基因组数据库进行比对搜索,收集同时含有3个结构域(Tyrosinase、PPO1_DWL、PPO1_KFDV)的蛋白,再通过Pfam网站验证这些候选蛋白的结构域,搜索得到3个含有上述结构域的基因。

1.3 生物信息学分析

核酸及氨基酸序列组成分析、理化性质分析、开放阅读框(Open reading frame, ORF)的查找和翻译利用软件及Prot-Param、pI/Mw、ORF Finder等在线工具进行;核酸和氨基酸序列的同源性比对及多序列比对利用Blast和Clustal W在线工具完成;亲水性/疏水性的分析利用在线工具ProtScale完成;蛋白质二级及三级结构的预测利用SOPMA^[17]和Swiss-Model^[18]等在线工具完成。利用MEGA 6.0软件^[19],采用Neighborjoining法(bootstrap值设定为1 000)生成系统进化树。

1.4 不同板栗品种PPO基因的表达与PPO活性间的关系

利用荧光定量检测PPO基因在不同褐变程度板栗仁中的表达情况,以Actin(ev253704)为内参基因引物^[20],使用Primer 5.0设计荧光定量引物PeP-PO3F(5'-CACGCCAACCACCATCTCTA-3')和PePPO3R(5'-TTTTTGCTAGACCCTCGCCA-3')。利用SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒(FP205, 天根)扩增,扩增体系为25 μL:cDNA模板1.0 μL, 2×SuperReal PreMix Plus 12.5 μL, 正向引物0.75 μL, 反向引物0.75 μL, 50×ROX×Reference Dye 0.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。Real-time PCR条件:95℃ 15 min;95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 40个循环。利用实时荧光定量PCR仪(Mx3005P, 安捷伦)检测PPO基因在板栗不同品种中的相对表达量。

PPO酶活性采用比色法测定,以邻苯二酚为对照,按多酚氧化酶试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司)的使用说明进行,在525 nm处测定OD值,每30

s 记录1次,共记录3 min;以每 min OD 值变化 0.01 作为1个酶活单位,3次重复。

2 结果与分析

2.1 板栗 PPO 家族基因的鉴定及核酸序列的基本分析

利用 HMM3.0 软件,在板栗基因组数据库中搜索到 3 个基因(BUA.CMHBY222345、BUA.CMH-

BY216989 和 BUA.CMHBY216654)同时包含 Tyrosinase (PF00264)、PPO1_DWL (PF12142)、PPO1_KFDV (PF12143)保守结构域(图 2)。利用 SMS 对所得板栗 PPOs 基因核酸序列进行在线分析,结果显示,CmPPOs 序列 CDS 全长分别为 1 794、1 809 和 1809 bp,3 个 PPOs 基因碱基 G+C 含量最大值为 45.65%,碱基 A+T 含量最大值为 56.50%(表 1)。

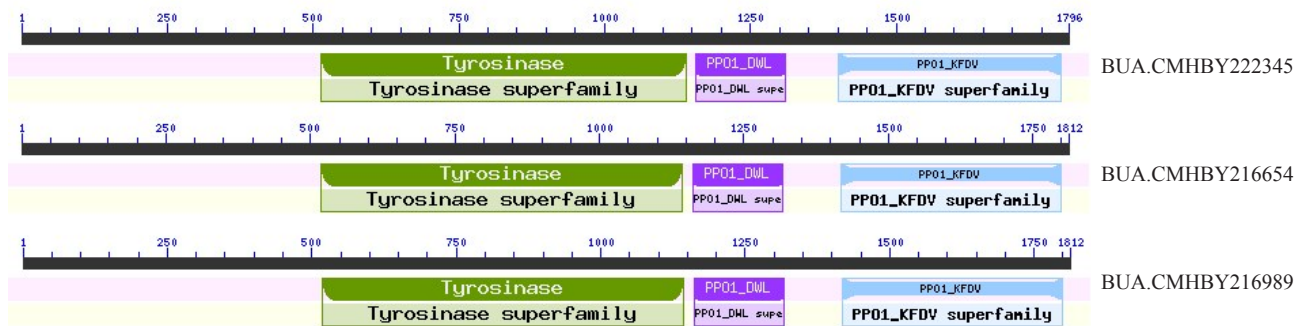


图 2 PPO 基因家族编码蛋白的保守结构域

Fig. 2 The conserved domain of proteins encoded by PPO gene family

表 1 板栗 PPO 家族基因核酸序列分析

Table 1 PPO gene sequences information in Chestnut

基因 ID Gene ID	基因全长 CDs length/bp	碱基含量 Base content/%		PPO1_KFDV		Tyrosinase		PPO1_DWL	
		C+G	A+T	起点 Starting	终止 Terminal	起点 Starting	终止 Terminal	起点 Starting	终止 Terminal
BUA.CMHBY222345	1 794	45.65	54.35	1 402	1 782	514	1 140	1 156	1 311
BUA.CMHBY216654	1 809	43.50	56.50	1 417	1 800	517	1 143	1 162	1 317
BUA.CMHBY216989	1 809	43.78	56.22	1 417	1 800	517	1 143	1 162	1 317

2.2 板栗 PPO 家族基因编码蛋白的理化性质

利用在线软件 ExPASy 预测板栗 PPO 基因家族 3 个编码蛋白质理化性质(表 2),相对分子质量最大是 67.4 ku,最小 66.4 ku,理论等电点(pI)为 6.47~6.94,酸性蛋白总负电荷残基(Asp+Glu)数为 73~74,总正电荷残基(Arg+Lys)数为 68~72。不稳定系数均>40,为不稳定蛋白。脂肪系数为 71.58~77.96,总平均疏水指数(GRAVY)均为负值,说明基因家族编码蛋白为亲水性蛋白,含量最丰富的氨基酸是亮氨酸和脯氨酸(图 3)。TMHMM 软件在线分析板栗 CmPPOs 蛋白跨膜区结构显示该蛋白质全部在膜外,不存在跨膜区,不属于膜结合蛋白。

利用在线二级结构预测软件 SOPMA 对板栗 PPO 基因家族各成员编码蛋白的二级结构进行分析。结果表明,板栗 3 个 PPO 蛋白均由 α -螺旋、延伸

主链、无规则卷曲和 β -转角 4 种结构元件组成(表 3),其中含有无规则卷曲 353~364 个,比例较高,为 58.64%~60.97%,该结构常受侧链相互作用的影响,与蛋白质的活性部位构成密切相关。其次为 α -螺旋(20.10%~21.10%),再者为延伸主链(15.91%~16.28%),最低的是 β -转角(3.02%~3.99%)。

蛋白质三级结构是在二级结构的基础上,借助各种次级键卷曲折叠成特定的球状分子结构的构象,采用 Swiss-Model 对板栗 PPO 基因编码蛋白进行同源建模,模板为苹果酪氨酸酶(MdPPO1, 6els.1. A),同源率为 70.69%~73.75%,推测它们具有类似功能。图 4 表明,板栗 PPO 基因编码蛋白最终形成的三级结构在空间结构上非常相似,无规则卷曲的比例最高,暗示不同板栗 PPO 基因编码蛋白在生物学功能上存在很高的保守性,不过特定的 PPO 基因

表2 PPO 基因转录的氨基酸序列组成及理化性质
Table2 PPO amino acid sequence and physicochemical properties in chestnut

项目 Item	基因 Gene ID		
	BUA.CMHBY222345	BUA.CMHBY216654	BUA.CMHBY216989
分子式 Molecular formula	C ₂₉₉₃ H ₄₆₁₄ N ₈₀₄ O ₈₇₅ S ₁₈	C ₃₀₂₃ H ₄₆₆₄ N ₈₁₀ O ₉₀₂ S ₂₀	C ₃₀₁₅ H ₄₆₅₈ N ₈₁₀ O ₉₀₁ S ₂₀
氨基酸数 Amino acids number	597	602	602
分子质量 Molecular weight/ku	66.438	67.428	67.310
理论等电点 Theoretical pI	6.47	6.74	6.94
含量最丰富的氨基酸 Rich amino acid	Leu 9.2% Pro 8.4% Ala 8.2% Asp 8.2%	Leu 8.3% Pro 8.1% Lys 8.1% Asp 8.1%	Leu 8.3% Pro 8.1% Lys 8.1% Asp 8.0%
带负电荷氨基酸总数 Total number of negatively charged residues	73	74	73
带正电荷氨基酸总数 Total number of positively charged residues	68	72	72
蛋白质不稳定指数 Instability index	41.82	46.38	47.64
脂类结合蛋白质指数 Aliphatic index	77.96	71.58	71.58
总平均疏水指数 GRAVY	-0.436	-0.533	-0.534
最大亲水分值 Maximum hydrophilic value	-3.633	-3.589	-3.589
最大疏水分值 Maximum hydrophobic value	2.011	1.956	1.956
结论 Conclusion	亲水蛋白 Hydrophilic protein	亲水蛋白 Hydrophilic protein	亲水蛋白 Hydrophilic Protein

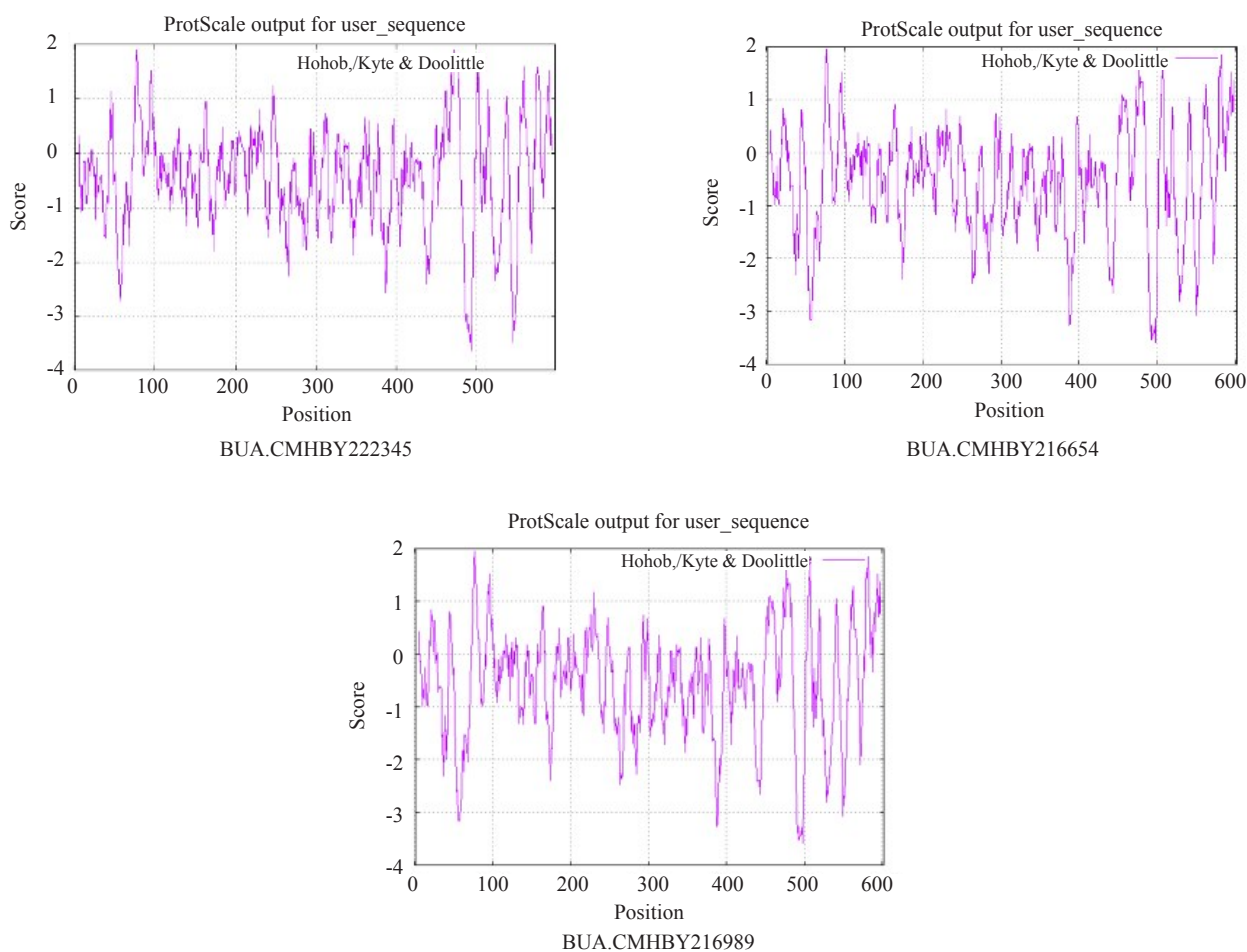
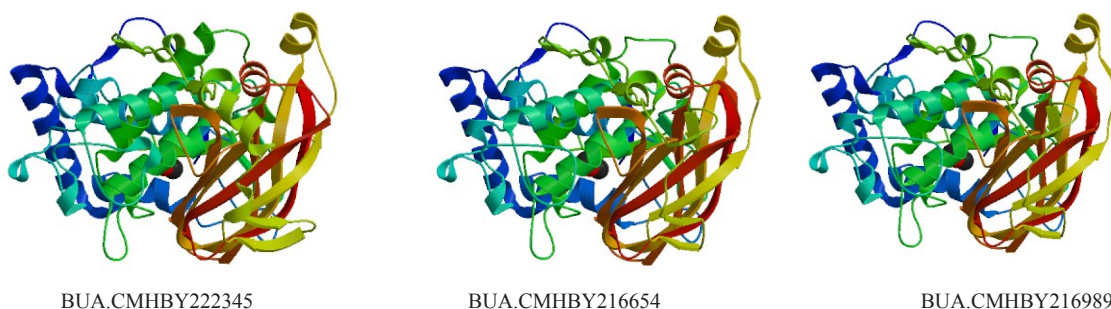


图3 板栗 PPO 基因家族编码蛋白亲水性/疏水性预测
Fig. 3 Hydrophobic analysis on amino acids in the PPO sequence of chestnut

表3 *PPO* 基因家族二级结构基本特征Table 3 Secondary structures of *CmPPO* proteins

蛋白名称 Protein name	α -螺旋 α -helix		无规则卷曲 Random coil		延伸主链 Extended strand		β -转角 Beta turn	
	氨基酸长度 Number of amino acid/aa	占比 Proportion/%	氨基酸长度 Number of amino acid/aa	占比 Proportion/%	氨基酸长度 Number of amino acid/aa	占比 Proportion/%	氨基酸长度 Number of amino acid/aa	占比 Proportion/%
BUA.CMHBY222345	120	20.10	365	60.97	95	15.91	18	3.02
BUA.CMHBY216654	127	21.10	353	58.64	98	16.28	24	3.99
BUA.CMHBY216989	127	21.10	354	58.80	97	16.11	24	3.99

图4 板栗 *PPO* 基因编码蛋白空间构象Fig. 4 The conformation simulated maps of *CmPPOs* protein

编码蛋白在特定的环境及时空中又具有各自的特异性。

Signal P4.1 Server 在线软件对板栗 *PPO* 基因编码氨基酸序列进行信号肽分析,信号肽分值(S)、剪切位点值(C)和综合剪切位点分值(Y)均小于 0.5,表明 *PPO* 蛋白不含信号肽,为非分泌蛋白,合成后直接释放于细胞质中,不进入内质网和高尔基体中^[21]。

利用 PSORT 在线预测分析 *CmPPOs* 编码蛋白的氨基酸序列,预测其在内质网、线粒体、胞质、细胞核和过氧化物酶体 5 个部位的定位信号所占比例。预测结果(表 4)表明, *CmPPO1* 编码蛋白位于线粒

体和胞质的定位信号分别为 39.1%和 34.8%,远高于内质网等其他部位,表明 *PPO* 呈游离态和束缚态两种形式存在。而 *CmPPO2* 和 *CmPPO3* 编码蛋白主要定位于细胞核,定位信号强度为 69.6%。由于 N 端的特殊结构,该酶的定位在不同植物中也不尽相同,含有叶绿体转运肽的定位在叶绿体中,含有分泌信号肽的定位在液泡中^[22],而板栗仁的 *PPO* 酶亚细胞定位与其他物种不同,可能发挥的功能也有所区别。

2.3 板栗 *PPO* 家族编码蛋白系统进化关系及结构域分析

使用在线保守结构域预测软件 MEME 对苹果、马铃薯和板栗 3 个易褐变物种的 23 个 *PPOs* 基因编码蛋白的保守基序进行分析,并将查找的基序在 Pfam 网站进行注释(表 5)。将 6 个基序命名为 motif 1~motif 6,其中基序 1、基序 2、基序 3 和基序 5 位于酪氨酸中心区,基序 4 位于多酚氧化酶中间保守域,基序 6 位于 *PPO* 未知功能保守结构域(图 5)。每个 *PPO* 蛋白序列都含有 Tyrosinase、*PPO_DWL* 和 *PPO_KFDV* 结构域。利用 Mega 6.0 软件生成系统进化树,采用 neighbor-joining (NJ) 法,校正参数 Bootstrap=1 000,发现板栗和蔷薇科苹果的 *PPO* 基因亲缘关系较近,而与茄科马铃薯的 *PPO* 基因亲缘

表 4 板栗 *PPO* 基因编码蛋白亚细胞定位预测Table 4 Subcellular localization of *PPO* coding protein

位置 Location	in chestnut		
	定位强度占比 Positioning intensity ratio/%		
	BUA.CMH BY222345	BUA.CMH BY216654	BUA.CMH BY216989
内质网 Endoplasmic reticulum	4.3		
线粒体 Mitochondrial	39.1	17.4	17.4
胞质 Cytoplasmic	34.8	13.0	13.0
细胞核 Nuclear	17.4	69.6	69.6
过氧化物酶体 Peroxisomal	4.3		

表5 Motif序列及 Pfam 注释信息
Table 5 The sequences and anotations of motifs

基序 Motif	长度 Length/aa	序列 Sequence	保守区域 Pfam domain	描述 Description
1	37	HRWYLYFYERILGKLIDDPTFALPFWNWDAPAGMRJP	PF00264	Common central domain of tyrosinase
2	41	DDDDDDATQISENLTIMYRQMVSNAKCPRLFFGEPYRAGDE		
3	28	DWLBAEFLFYDENKNLVRVKVRDCLDTK	PF12142	Polyphenol oxidase middle domain
4	31	EDMGNFYSAGRPIFYSHHSNVDRMWNWIKWT	PF00264	Common central domain of tyrosinase
5	40	RTKKEKDEZEEVLVIKGFEDGBEAVKFDVYVNDDDDSNA	PF12143	Protein of unknown function (DUF_B2219)
6	22	DPRSFKQQANVHCAYCBGAYPQ		

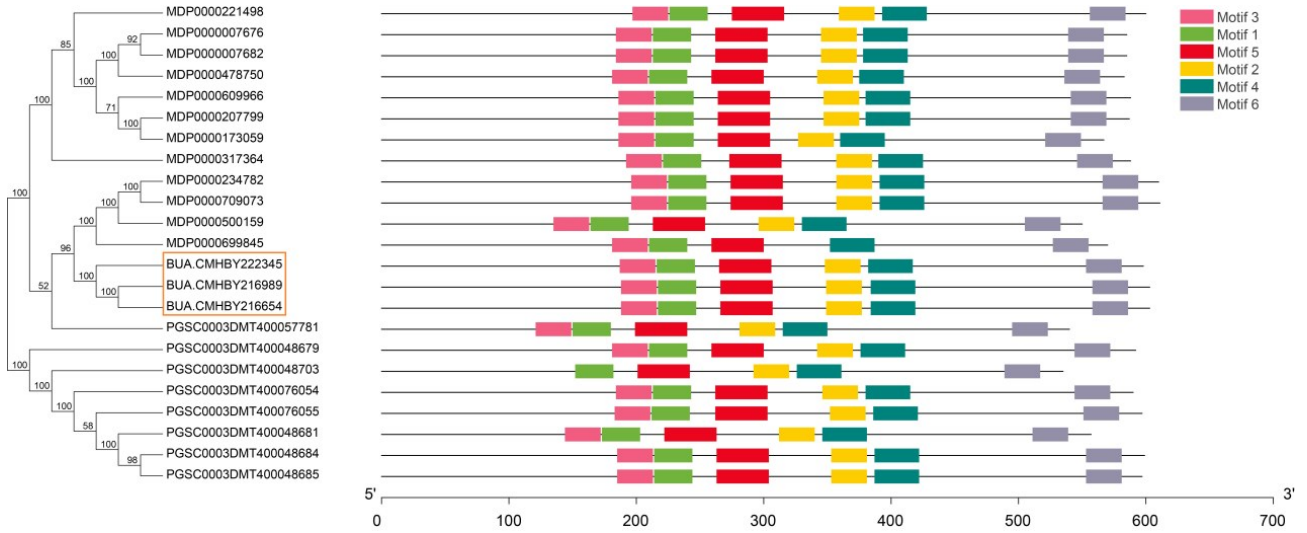


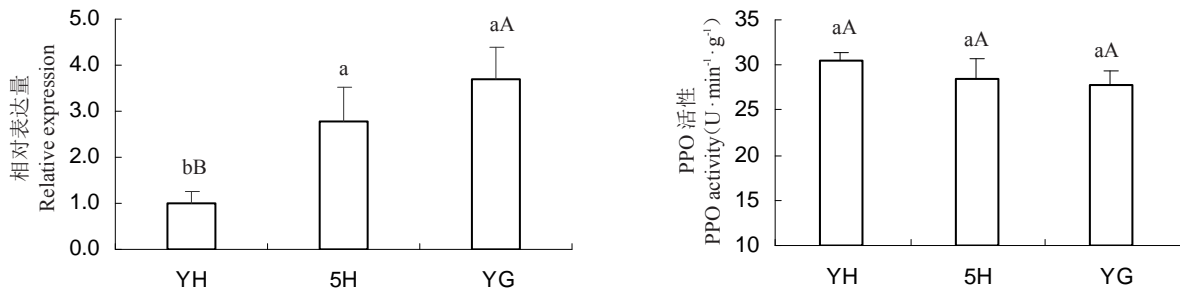
图5 板栗、苹果和马铃薯 23 个 PPO 编码蛋白系统进化关系及结构域分析
Fig. 5 Phylogenetic and domain analysis of BUA, MDP and PGSC PPO

关系较远。

2.4 不同板栗品种 PPO 基因表达差异及其与酶活性关系分析

为分析 PPO 基因在板栗不同品种中的表达模式,选取褐变度从高到低的‘YH’‘5H’和‘YG’3 个品种的栗仁进行基因定量分析及 PPO 酶活性测定。未在板栗果实中检测到 CmPPO2 和 CmPPO3 的表达,而 CmPPO1 表达量与 PPO 酶活性也无明显

关联(图6);3 个品种栗仁的多酚氧化酶活性无显著差异,相对表达量差异极显著($p = 0.004\ 394\ 681 < 0.01$),多重比对显示‘YH’和‘YG’差异极显著($p < 0.01$),‘YH’和‘5H’差异显著($p < 0.05$)。预测栗仁多酚氧化酶存在于线粒体和胞质中,线粒体中的 PPO 和处于叶绿体中的状态相似,作为酚类物质的氧化剂并不具有活性,其活性可能受制于潜伏状态和底物的多少^[23-24]。当受到刺激时,潜伏态向活性态



不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平上差异显著,不同大写字母表示在 $p < 0.01$ 水平上差异极显著。

Different small letters indicate significant difference at $p < 0.05$, different capital letters indicate significant difference at $p < 0.01$.

图6 不同品种栗仁 PPO 基因 CmPPO1 表达及 PPO 活性分析

Fig. 6 Expression level of PPO gene CmPPO1 and PPO activity in different cultivars of chestnut seed

转化,PPO活性被进一步激活^[25],所以栗仁褐变与PPO基因表达相关,与PPO酶活性间接相关,褐变可能是多种代谢途径共同参与作用的复杂过程。

3 讨 论

PPO广泛存在于各种动植物和微生物中,是果蔬加工过程中酶促褐变发生的关键作用酶。随着分子生物技术的不断发展,PPO基因家族陆续被克隆鉴定,苹果有16个PPOs基因,桃有6个,梨有8个^[26]。本研究在板栗全基因组水平上鉴定了3个PPOs基因,均属于酪氨酸酶基因家族蛋白,是一种单酚单氧化酶,具有PPO蛋白典型特征,包含PPO1_KFDV保守结构域(pfam12143)、酪氨酸普通中心区域(pfam00264)和多酚氧化酶中间保守域(pfam12142)。

采用生物信息学方法对板栗PPO基因家族编码蛋白的理化性质、结构和功能等方面进行分析预测。结果表明,3个PPO基因编码蛋白均属于亲水不稳定脂类结合蛋白,无跨膜区,与茶树^[27]、梨^[12]等PPO性质一致。PPO在组织细胞中的具体部位尚不明确,在过氧化物酶体^[28]、叶绿体^[29]、线粒体^[26]中都被发现过,且PPO在不同时期发挥作用的位置也会发生改变。笔者对板栗PPO基因家族编码蛋白的亚细胞定位进行预测,发现CmPPO1主要在线粒体和胞质中,CmPPO2、CmPPO3主要在细胞核中,而后两者在栗仁中未检测到表达,推测栗仁褐变可能主要与CmPPO1编码蛋白相关,这为研究板栗仁PPO蛋白功能提供了参考。

板栗3个PPOs基因编码蛋白均由 α -螺旋、延伸主链、无规则卷曲和 β -转角4种结构元件组成,其中含有大量无规则卷曲,该结构常受侧链影响,与蛋白质的活性部位构成密切相关,PPO蛋白中 α -螺旋可能包含活性位点^[30]。3个编码蛋白二级结构和三级结构具有较高的相似度,这揭示板栗的PPOs基因在功能方面可能也具有高相似度。

对苹果、马铃薯和板栗3个易褐变物种的23个PPOs基因编码蛋白的保守结构域进行基序分析,每个序列都含有Tyrosinase、PPO_DWL和PPO_KFDV结构域,对照系统进化树图发现,板栗3个PPOs基因聚在一起,与蔷薇科部分苹果的PPO基因亲缘关系较近,可见基因进化亲缘关系与PPO酶的结构相关性较明显,高度保守的结构域是判断不同物种亲

缘关系的重要依据。

不同褐变程度板栗品种PPO基因表达分析结果显示,褐变度与表达量呈负相关。可见,植物组织中PPO酶活性是影响褐变的原因之一,但不是绝对因素,由于众多的外界刺激和内在限制因素,PPO处在十分复杂的环境中,一定活性的PPO、催化的底物及氧气三者共存才能产生褐变^[31]。而板栗果实多酚氧化酶处于线粒体和胞质中可能性较大,推测与处于叶绿体中的功能相似,作为酚类物质的氧化剂并不具有活性,其活性可能还受制于潜伏状态和底物的多少,PPO基因表达量和酶活性无明显相关性。栗仁褐变过程是多基因、多种代谢途径共同参与作用的复杂过程,而且PPO基因功能与其代谢活跃程度、发育阶段、抗逆性等也存在密切关系,对于单个PPO基因褐变生理功能及调控机制有待更深入研究,以便为分子遗传改良获得不(弱)褐变品种奠定基础。

4 结 论

(1)在板栗基因组数据库中共搜索到3个PPOs基因(BUA.CMHBY222345、BUA.CMHBY216989和BUA.CMHBY216654),同时包含Tyrosinase(PF00264)、PPO1_DWL(PF12142)、PPO1_KFDV(PF12143)保守结构域。3个基因的CDS全长为1794~1809 bp,编码氨基酸序列509~539,属于亲水性蛋白质,不存在跨膜区,为非分泌蛋白。

(2)CmPPOs编码蛋白的二级结构中无规则卷曲比例最高;三级空间结构与蔷薇科苹果酪氨酸酶结构(MdPPO1)序列一致度超过70%。

(3)对苹果、马铃薯和板栗3个易褐变物种的23个PPOs基因编码蛋白进行多序列比对和保守结构域分析,每个PPO编码蛋白序列都含有Tyrosinase、PPO_DWL和PPO_KFDV结构域;聚类分析结果明确板栗PPO和蔷薇科苹果有较高同源性。

(4)对不同品种板栗仁中的PPO基因进行表达分析,只检测到CmPPO1,且表达量与酶活性的相关性不明显,说明板栗仁中PPO酶活性不能直接影响褐变程度,不同品种褐变差异性与PPO基因表达显著相关。

参考文献 References:

- [1] 张宇和,柳 鉴,梁维坚. 中国果树志-板栗榛子卷[M]. 北京: 中国林业出版社,2005: 8-17.

- ZHANG Yuhe, LIU Liu, LIANG Weijian. Chinese Fruit-chestnut and hazelnut[M]. Beijing: Chinese Forestry Publishing House, 2005: 8-17.
- [2] 茅林春. 板栗加工的技术难题及其对策[J]. 食品科技, 2000(1): 24-25.
MAO Linchun. Technical problems and countermeasures of chestnut processing[J]. Food Science and Technology, 2000(1): 24-25.
- [3] NICOLAS J, RICHARDd-FORGET F, GOUPY P, AMIOT M, AUBERT S. Enzymatic browning reactions in apple and apple products[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994, 34: 109-157.
- [4] HUNT M D, EANNETTA N T, YU H. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase[J]. Plant Molecular Biology, 1993, 21(1): 59-68.
- [5] THYGESEN P W, DYR I B, ROBINSON S P. Polyphenol oxidase in potato-A multigene family that exhibits differential expression patterns[J]. Plant Physiology, 1995, 109: 525-531.
- [6] 彭世清, 陈守才. 甘薯多酚氧化酶 cDNA 的克隆及序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 241-245.
PENG Shiqing, CHEN Shoucai. Cloning and sequence analysis of sweet potato polyphenol oxidase cDNA[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2002, 10(3): 241-245.
- [7] GOLDMAN M H, SEURINCK J, MARINS M. A tobacco flower-specific gene encodes a polyphenol oxidase[J]. Plant Molecular Biology, 1998, 36(3): 479-485.
- [8] GOODING P S, BRID C, ROBINSON S P. Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase[J]. Planta, 2001, 213(5): 747-757.
- [9] DRY J B, ROBINSON S P. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase[J]. Plant Molecular Biology, 1994, 26(1): 495-502.
- [10] BOSS P K, GARDNER R C, JANSSEN B J. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27(2): 429-433.
- [11] HARUTA M, MURATA M, HIRAIDE A. Cloning genomic DNA encoding apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in *Escherichia coli* and in apple[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1998, 62(2): 358-362.
- [12] 陈东生, 王昆博, 李勤, 李娟, 黄建安, 刘仲华. 丰水梨多酚氧化酶基因的克隆和原核表达[J]. 茶叶科学, 2015, 35(1): 17-23.
CHEN Dongsheng, WANG Kunbo, LI Qin, LI Juan, HUANG Jian'an, LIU Zhonghua. The cloning and prokaryotic expression of polyphenol oxidase gene in pear (*Pyrus Pyrifolia* Nakai)[J]. Journal of Tea Science, 2015, 35(1): 17-23.
- [13] CHEVALIER T, RIGAL D, Mbégué A. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase[J]. Plant Physiology, 1999, 119: 1261-1269.
- [14] 赵东, 刘祖生, 奚彪. 茶树多酚氧化酶基因的克隆及其序列比较[J]. 茶树科学, 2001, 21(2): 94-98.
ZHAO Dong, LIU Zusheng, XI Biao. Cloning and alignment of polyphenol oxidase cDNA of tea plant[J]. Journal of Tea Science, 2001, 21(2): 94-98.
- [15] BECHEM C W B, SPECHMANN G J, VANDER L P C G. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers[J]. BioTechnology, 1994, 12(11): 1101-1105.
- [16] COETZER C, CORSINI D, LOVE S. Control of enzymatic browning potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(2): 652-657.
- [17] GEOURJON C, DELEAGE G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Bioinformatics, 1995, 11(6): 681-684.
- [18] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J T. The SWISS-MODEL-workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22(2): 195-201.
- [19] TAMURAK, STECHER G, PET E, Terson D. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [20] 李兴亮, 郭献平, 沈元月, 曹庆芹, 冯永庆, 秦岭. 板栗赤霉素缺陷型短雄花序芽变的初步鉴定及 *CmGIDI* 基因的表达分析[J]. 园艺学报, 2011, 38(7): 1251-1258.
LI Xingliang, GUO Xianping, SHEN Yuanyue, CAO Qingqin, FENG Yongqing, QIN Ling. Preliminary identification of gas-deficient short male catkin mutant and expression analysis of *CmGIDI* in *Castanea mollissima*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(7): 1251-1258.
- [21] SOMMER A, NEEman E, STEFFENS J C. Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase[J]. Plant Physiology, 1994, 105(4): 1301-1311.
- [22] LAN T T, CONSTABEL C P. The polyphenol oxidase gene family in poplar: phylogeny, differential expression and identification of a novel, vacuolar isoform[J]. Planta, 2011, 234(4): 799-813.
- [23] SATÔ M, HASEGAWA M. The latency of spinach chloroplast of phenolase[J]. Phytochemistry, 1976, 15(1): 61-65.
- [24] GOLBECK J H, CAMMARATA K V. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme[J]. Plant Physiology, 1981, 67(5): 977-984.
- [25] PARTINGTON J C, SMITH C, BOLWELL G. Changes in location of polyphenol oxidase in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber during cell death in response to impact injury comparison with wound tissue [J]. Planta, 1999, 207(3): 449-460.
- [26] 闰洪波, 李桂琴, 宋亚伟, 孟钰玉, 王云松. 5 种蔷薇科树种多酚氧化酶比较基因组学分析[J]. 热带作物学报, 2017, 38(2): 320-327.
YAN Hongbo, LI Guiqin, SONG Yawei, MENG Yuyu, WANG Yunsong. Comparative genomics analysis of the polyphenol oxidase genes among five Rosaceae species[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(2): 320-327.
- [27] 王乃栋, 张丽霞, 向勤铨, 李巍巍. 茶树多酚氧化酶的生物信息学分析及原核表达[J]. 茶叶科学, 2011, 31(1): 33-39.
WANG Naidong, ZHANG Lixia, XIANG Qinzeng, LI Weiwei. Bioinformatic analysis and prokaryotic expression of polyphenol oxidase gene in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. Journal of Tea Science, 2011, 31(1): 33-39.
- [28] 母洪娜, 王良桂, 孙陶泽. 桂花多酚氧化酶基因克隆及表达分析[J]. 分子植物育种, 2017, 15(2): 441-446.
MU Hongna, WANG Lianggui, SUN Taoze. Cloning and expression analysis of *PPO* gene from sweet osmanthus (*Osmanthus fragrans* Lour.)[J]. Molecular Plant Breeding, 2017, 15(2): 441-446.
- [29] 刘芳, 韩倩云, 倪元颖. 膜结合态多酚氧化酶生物信息分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(9): 237-244.
LIU Fang, HAN Qianyun, NI Yuanying. Bioinformatics information analysis of membrane-bound polyphenol oxidase[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(9): 237-244.
- [30] 李春美, 胡婉峰, 杨立, 杨杰. 莲藕多酚氧化酶与底物或抑制剂相互作用的光谱学研究[J]. 分析试验室, 2010, 29(8): 13-17.
LI Chunmei, HU Wanfeng, YANG Li, YANG Jie. Spectroscopic study on the interaction of substrates or inhibitors and polyphenol lotus roots[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2010, 29(8): 13-17.
- [31] KEVIN C V, STEPHEN O D. Function of polyphenol oxidase in higher plant[J]. Plant Physiology, 1984, 60: 106-112.