

龙眼采后果肉劣变的差异表达蛋白分析

王晓艳^{1a,2*}, 潘德灼^{1a,1b*}, 钟灿钰^{1a,1b}, 黄榕辉^{1a}, 黄春梅^{1a}, 梁文裕^{3**},
陈伟^{1a,1b**}

(1. 福建农林大学, a. 生命科学学院; b. 福建省作物分子与细胞生物学重点实验室, 福州 350002; 2. 山西天骄生物集团有限公司, 太原 030000; 3. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

摘要: 为探索龙眼(*Dimocarpus longan*)果肉常温劣变过程中蛋白质的变化, 采用蛋白质组学的方法, 在‘福眼’龙眼果肉常温劣变过程中发现共有 24 个 2 倍差异表达蛋白, 其中 21 个蛋白被成功鉴定。这些蛋白参与了应激反应与防御(56%)、能量与碳代谢(19%)、初级代谢(5%)、蛋白转运(5%)和细胞骨架(5%)等细胞代谢活动。大多数与抗氧化作用密切相关的蛋白质都下调表达, 说明龙眼采后果肉的抗氧化能力有所下降, 不能有效地缓解 ROS 积累引起的毒性作用, 从而使果肉劣变。此外, 与能量代谢相关的蛋白全部下调表达, 表明龙眼果实采后果肉劣变可能与能量供应不足有关。这些结果为龙眼采后保鲜技术研究提供科学依据。

关键词: 龙眼; 果肉; 劣变; 双向电泳; 差异蛋白; 质谱

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.04.005

Analysis of Differential Expression Proteins during Postharvest Deterioration Process of Longan Aril

WANG Xiao-yan^{1a,2*}, PAN De-zhuo^{1a,1b*}, ZHONG Can-yu^{1a,1b}, HUANG Rong-hui^{1a}, HUANG Chun-mei^{1a},
LIANG Wen-yu^{3**}, CHEN Wei^{1a,1b**}

(1a. College of Life Sciences; 1b. Fujian Provincial Key Laboratory of Crop Molecular and Cell Biology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Shanxi Tianjiao Biology Group Co., LTD, Taiyuan 030000, China; 3. College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: The aim was to investigate the changes in proteins during postharvest deterioration process of longan (*Dimocarpus longan*) under normal temperature. The results showed that twenty-four differentially expressed proteins in longan aril were detected from cultivar ‘Fuyan’ by using proteomics technique during deteriorating process, of which 21 proteins were successfully identified. Based on their physiological functions, all identified proteins could be involved in stress response and defense (accounting for 56%), energy and carbon metabolism (19%), primary metabolites pathway (5%), protein transport (5%), cytoskeleton (5%) and some other metabolic processes. Among them, most proteins related to antioxidant system were down-regulated. It was implied that the ability of antioxidant of longan aril was decreased in postharvest, which could not effectively alleviate the toxicity

收稿日期: 2014-12-01 接受日期: 2015-02-14

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2012J01078, 2013J01076)资助

作者简介: 王晓艳(1986~), 女, 硕士, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: wangxiaoyan5011@163.com;

潘德灼(1982~), 男, 博士研究生, 研究方向: 植物生理与分子生物学, E-mail: pdz_006@163.com

* 同为第一作者。

** 通信作者 Corresponding author. E-mail: weichen909@163.com; liangwy209@163.com

caused by ROS accumulation. In addition, the enzymes associated with energy metabolism were also down-regulated, suggesting that the deterioration of postharvest longan aril might be related to the insufficient of energy supply. So, these results will provide a scientific basis for studying preservation technology of postharvest longan.

Key words: Longan; Aril; Deterioration; Two-dimensional electrophoresis; Differential expression protein; Mass spectrometry

龙眼(*Dimocarpus longan*)又名桂园,为无患子科(Sapindaceae)龙眼属常绿乔木,起源于我国亚热带地区。龙眼果实香气十足,果肉肉质爽脆,清甜,营养丰富,具有较高的营养价值和保健价值。2006年,我国龙眼的种植面积为 4.03×10^5 hm²,产量为 1.11×10^6 t,分别占世界的70%和50%以上,是最大的龙眼生产国,其中福建省的龙眼产量占全国产量的20%以上^[1]。然而,由于我国龙眼成熟期在8-9月高温季节,采后生理代谢旺盛,鲜果易变色、变质,28℃下7 d左右全部变质腐烂^[2],导致龙眼果实的贮藏和运输十分困难。我国在龙眼保鲜方面的研究相对滞后,贮运技术传统,造成鲜果销售受到限制,难以大批量远销和出口,因此龙眼采后延缓果实劣变的问题亟待解决。

目前,有关果肉衰败、软化的研究多集中于生理生化方面。林河通等^[3]探讨了龙眼果肉劣变过程中细胞壁组分含量及其细胞壁降解酶活性的变化。有学者对甜樱桃(*Prunus avium*)、草莓(*Fragaria ananassa*)、甜橙(*Citrus sinensis*)等非呼吸跃变型果实成熟和软化过程中细胞壁降解酶活性的变化规律进行了研究^[4-6]。魏建梅等^[7]分析了京白梨(*Pyrus ussuriensis* 'Jingbaili')果实软化过程中细胞代谢及其调控过程。曾秀丽等报道了脐橙(又称甜橙)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)等果实细胞壁水解酶的活性^[8-9]。另外,曾有研究报道了龙眼果肉劣变过程相关基因,其中有果肉细胞壁内切-1,4-β-葡聚糖酶基因以及扩张蛋白和木葡聚糖内糖基转移酶(XET)基因^[10-11]。要解释果肉劣变问题,仅仅从生理生化和基因方面进行探讨是不够的,本研究从蛋白组学入手,应用蛋白质组学的技术,分析龙眼果肉劣变过程中的相关代谢蛋白(酶)的变化,对于深入探讨果肉劣变发生的分子机理有着重要意义,为龙眼采后保鲜技术研究提供科学依据,并为龙眼抗果肉劣变品种育种奠定分子生物学研究基础。

1 材料和方法

1.1 材料

‘福眼’龙眼(*Dimocarpus longan* ‘Fuyan’)果实采自福建省泉州市,成熟度一致、大小均一、色泽一致、无病虫害及残次果,采收当天立即运回实验室,于常温(30±1)℃下分别贮藏0、1、2、3 d,处理后的龙眼果肉保存于-80℃冰箱。

1.2 果肉蛋白质的提取及定量

果肉蛋白的提取参照 Saravanan 等^[12]的方法,略微修改。取4 g 龙眼果肉在液氮中研磨成粉末,加入16 mL 酚提取液[100 mmol L⁻¹ Tris, 50 mmol L⁻¹ 抗坏血酸, 100 mmol L⁻¹ KCl, 50 mmol L⁻¹ 硼砂, 1% (V/V) Triton X-100, 2% (V/V) β-巯基乙醇, 0.7 mol L⁻¹ 蔗糖],再加入等体积 Tris-饱和酚(pH 8.0),涡旋混匀,于4℃下5000×g离心10 min,取酚层溶液,加入6倍体积0.1 mol L⁻¹ 乙酸铵甲醇溶液,-20℃下过夜沉淀蛋白质。4℃下20000×g离心20 min,弃上清液后用-20℃预冷的甲醇洗涤蛋白沉淀,-20℃静置1 h,在4℃下20000×g离心20 min,弃上清液,用丙酮[含0.07% (V/V) β-巯基乙醇]洗涤沉淀2次。沉淀于-20℃真空干燥,所得干粉置于-20℃保存。取10 mg 干粉溶解于250 μL 样品裂解液[7 mol L⁻¹ 尿素, 2 mol L⁻¹ 硫脲, 4% (W/V) CHAPS, 2% (V/V)两性电解质载体 pH 4~6.5, 40 mmol L⁻¹ DTT],参照 Bradford^[13]法进行定量分析,定量好的蛋白质用于双向电泳分析。

1.3 蛋白质双向电泳

第一向固相 pH 梯度等电聚焦(IEF): 仪器为 IPGphorTM 等电聚焦系统, IPG 预制干胶条为 24 cm, pH 4~7(线性),蛋白质上样量 1.3 mg, 蛋白样品裂解液与水化液[7 mol L⁻¹ 尿素, 2 mol L⁻¹ 硫脲, 2% (W/V) CHAPS, 40 mmol L⁻¹ DTT, 0.5% (V/V) IPG buffer]终体积为 450 μL。IEF 参数设定

为 20℃、50 $\mu\text{A trip}^{-1}$ 、30 V (12 h)、200 V (1 h)、500 V (1 h)、1000 V (1 h)、1000~8000 V (梯度 30 min)、8000 V (6 h)、1000 V (2 h)。

等电聚焦完成后胶条用新配制的平衡液 I [50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 6 mol L⁻¹ 尿素, 30% (V/V)甘油, 2% (W/V) SDS, 0.002% (W/V)溴酚蓝, 10 mg mL⁻¹ DTT]和平衡液 II [50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 6 mol L⁻¹ 尿素, 30% (V/V)甘油, 2% (W/V) SDS, 0.002% (W/V)溴酚蓝, 25 mg mL⁻¹ 碘乙酰胺]分别平衡 15 min。IPG 胶条平衡后转移至浓度为 12% (W/V)聚丙烯酰胺凝胶上,用 0.5% (W/V)琼脂糖封顶。第二向 SDS-PAGE 垂直板电泳采用 Ettan™ DALT II 垂直板电泳系统,先设置 15 mA trip⁻¹ 电泳 30 min,待示踪的溴酚蓝跑出胶条成为一条直线后改为 30 mA trip⁻¹,直至溴酚蓝前沿到达凝胶底部边缘 0.5 cm 处时停止电泳。电泳结束后,凝胶被考马斯亮蓝 R-250 染色。经脱色后的凝胶用 GE Image Scanner III 扫描仪进行扫描。凝胶图像用 ImageMaster 2D platinum 软件分析。

1.4 蛋白质酶解及质谱分析

蛋白质酶解参考 Wang 等^[14]的方法。差异表达蛋白胶点分别用 100 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ 和 100 μL 乙腈(ACN)脱色, 56℃~60℃真空干燥,加入 10 ng μL^{-1} Trypsin 溶液和等体积的 50 mmol L⁻¹ NH₄HCO₃ 缓冲液,于 37℃反应 12 h,加入 50% (V/V) ACN/0.5% (V/V)三氟乙酸(TFA),超声 10 min 后抽提酶解产物,真空干燥后用于质谱分析。

酶解产物采用 4700 串联飞行时间质谱仪 (Applied Bio-systems, Foster City, CA, USA)进行质谱分析。光源为氮:氩激光,波长为 355 nm,激光强度为 4000 W cm⁻²,激发时间为 3~7 ns,频率为 200 Hz,加速电压为 20 kV,采用正离子发射模式和自动获取数据的模式采集数据。PMF 质量扫描范围为 700~3500 Da,质谱图用胰蛋白酶酶解肽段进行外标校正。所得结果用 GPS (Applied Biosystems, USA)-MASCOT (Matrix Science, London, UK)软件进行数据库检索。检索的数据库为 NCBI nr (发布时间 2010-07-01),检索种属为绿色植物,检索的方式为 combined,酶为胰蛋白酶,最大允许漏切位点为 1, PMF 质量误差为 100 ppm, MS/MS 质量误差为 0.6 Da。

1.5 数据分析

所有试验均生物学重复 3 次,数据均以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,并采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析,以 $P < 0.05$ 表示显著差异。

2 结果和分析

2.1 果肉蛋白的2-DE分析

图 1 为贮藏不同天数(0 d、1 d、2 d、3 d)的‘福眼’龙眼果肉蛋白的双向电泳图谱。应用 ImageMaster 2D platinum Software 分析软件分析,在每张图谱上均至少检测到 1000 个蛋白点,匹配率为 80.2%,共获得 24 个差异达到 2 倍以上的蛋白点。

2.2 果肉差异蛋白的质谱鉴定

采用基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)鉴定出了 21 个差异表达蛋白(表 1),其中有 1 个蛋白上调表达,17 个下调表达,2 个先上调后下调表达,1 个先下调后上调表达。此外,有 2 个蛋白点(No. 5、18)为假定蛋白质。鉴定结果中,有几个蛋白鉴定为同一种蛋白,如蛋白点 2、9、22、23 和 24 均为过氧化物酶,蛋白点 7 和 8 均为热休克蛋白 70-4,每组都有相同的等电点和分子量,说明它们是同工酶或者是同一个蛋白的不同形式,具有不同的翻译后修饰。大部分蛋白质的理论分子量与实际分子量相近,少数蛋白的理论分子量与实际分子量相差较大,这表明蛋白质的翻译后修饰会导致蛋白质理论分子量与实际分子量相差较大。

2.3 龙眼果肉差异表达蛋白的功能分类

对鉴定的蛋白质在 MIPS 数据库(<http://mips.gsf.de/projects/funcat>)检索和查阅相关文献,对其功能进行了分类。结果表明,这些蛋白质的功能包括:(1) 应激反应及防御(Stress response and defense)占 56%,(2) 能量与碳代谢(Energy and carbon metabolism)占 19%,(3) 初级代谢途径(Primary metabolism pathway)占 5%,(4) 蛋白转运(Protein transport)占 5%,(5) 细胞骨架(Cytoskeleton)占 5%,(6) 假定蛋白(Predicted protein)占 10%。因此,在‘福眼’龙眼果肉常温劣变过程中主要是应激及防御相关蛋白,以及能量与碳代谢相关蛋白参与其中。

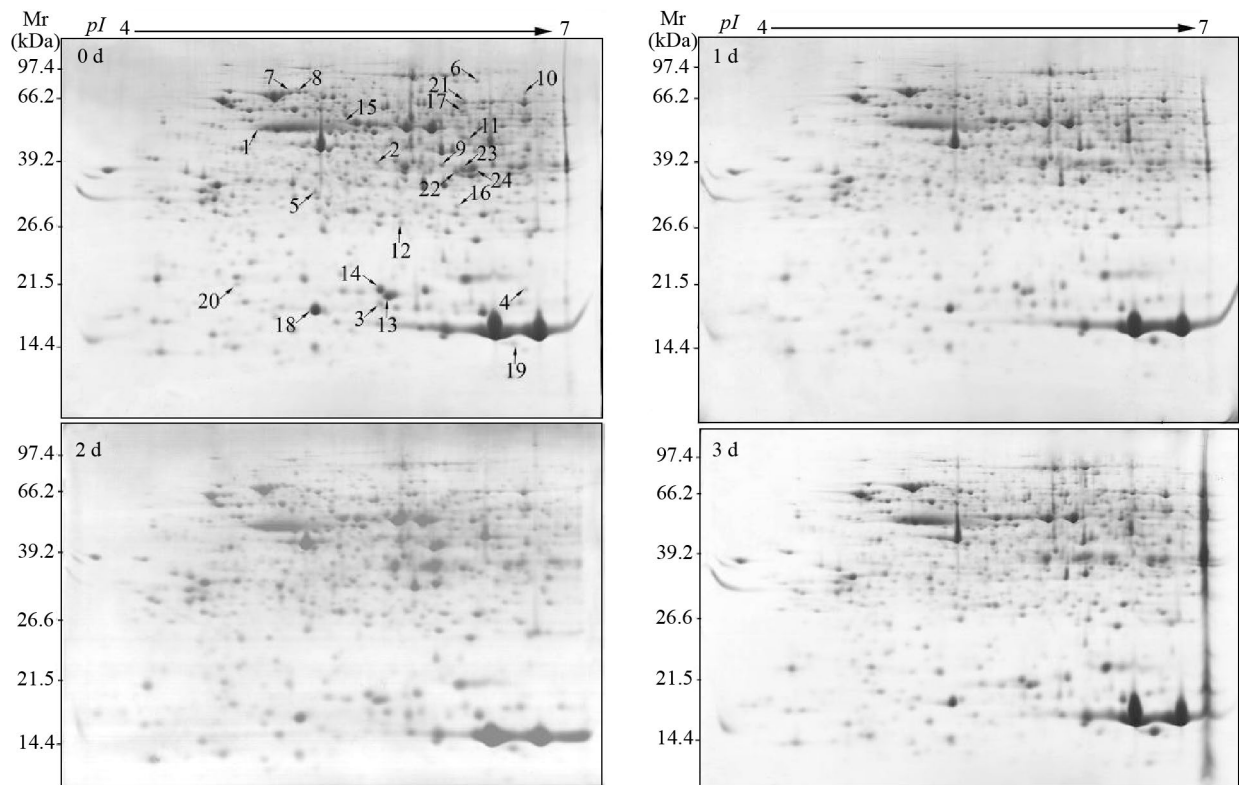


图1 不同贮藏天数‘福眼’龙眼果肉蛋白的2-DE图谱

Fig. 1 2-DE gel electrophoretogram of proteins in ‘Fuyan’ aril with different storage days

表1 龙眼果肉差异表达蛋白的MALDI-TOF/TOF-MS鉴定

Table 1 Identification of differential expression proteins in longan aril by MALDI-TOF/TOF-MS

| 序号 No. | 名称 Name | GI号 GI No. | 物种 Species | 覆盖率 Coverage (%) | 理论分子量/等电点 Theor. Mr (kDa)/pI | 实际分子量/等电点 Actual Mr (kDa)/pI |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 应激反应与防御 Stress response and defense | | | | | | |
| 2 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 218138216 | 荔枝 <i>Litchi chinensis</i> | 23 | 39.3/5.53 | 39.5/5.58 |
| 3 | 热休克蛋白 Heat shock protein | 320090070 | 陆地棉花 <i>Gossypium hirsutum</i> | 31 | 18.3/6.77 | 17.2/5.58 |
| 4 | 热休克蛋白(假定) Heat-shock protein, putative | 255560519 | 蓖麻 <i>Ricinus communis</i> | 11 | 21.7/ 6.45 | 19.9/6.55 |
| 7 | 热休克蛋白70-4 Heat-shock protein70-4 | 332641697 | 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 16 | 71.1/5.14 | 71.1/5.11 |
| 8 | 热休克蛋白70-4 Heat-shock protein70-4 | 332641697 | 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 15 | 71.1/5.14 | 71.4/5.17 |
| 9 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 218138216 | 荔枝 <i>Litchi chinensis</i> | 25 | 39.3/5.53 | 39.4/5.53 |
| 13 | 热休克蛋白20.1 Heat-shock protein 20.1 | 3341464 | 秘鲁番茄 <i>Lycopersicon peruvianum</i> | 35 | 17.7/5.83 | 17.4/5.58 |
| 14 | 细胞溶质I类小热休克蛋白1A Cytosolic class I small heat shock protein 1A | 37704401 | 烟草 <i>Nicotiana tabacum</i> | 45 | 15.8/5.25 | 19.4/5.58 |
| 19 | 谷氧还蛋白 Glutaredoxin | 281485058 | 荔枝 <i>Litchi chinensis</i> | 28 | 14.6/6.41 | 14.5/6.38 |

续表(Continued)

| 序号 No. | 名称 Name | GI号 GI No. | 物种 Species | 覆盖率 Coverage (%) | 理论分子量/等电点 Theor. Mr (kDa)/pI | 实际分子量/等电点 Actual Mr (kDa)/pI |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 22 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 218138216 | 荔枝 <i>Litchi chinensis</i> | 21 | 39.3/5.53 | 37.9/5.82 |
| 23 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 218138216 | 荔枝 <i>Litchi chinensis</i> | 25 | 39.3/5.53 | 37.0/5.92 |
| 24 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 218138216 | 荔枝 <i>Litchi chinensis</i> | 26 | 39.3/5.53 | 38.8/5.99 |
| 能量与碳代谢 Energy and carbon metabolism | | | | | | |
| 6 | 蔗糖合成酶 Sucrose synthase | 6682841 | 蜜桔 <i>Citrus unshiu</i> | 9 | 92.6/6.04 | 90.3/5.95 |
| 10 | 苹果酸酶(假定) Malic enzyme, putative | 255546341 | 蓖麻 <i>Ricinus communis</i> | 33 | 65.1/5.98 | 71.1/6.56 |
| 11 | 假定二氢硫辛酰胺琥珀酰转移酶 Putative dihydrolipoamide succinyltransferase | 21618217 | 拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> | 8 | 49.8/9.07 | 47.1/5.98 |
| 12 | 6-磷酸-2-脱氧葡萄糖磷酸酶 2-Deoxyglucose-6-phosphate phosphatase | 255577544 | 蓖麻 <i>Ricinus communis</i> | 46 | 20.1/6.50 | 28.6/5.63 |
| 初级代谢途径 Primary metabolism pathway | | | | | | |
| 21 | 天门冬氨酰-tRNA合成酶(假定) Aspartyl-tRNA synthetase, putative | 255564914 | 蓖麻 <i>Ricinus communis</i> | 33 | 61.0/6.06 | 62.4/5.87 |
| 蛋白转运 Protein transport | | | | | | |
| 15 | 线粒体的F1-ATP酶β亚基 Mitochondrial F1-ATPase β subunit | 269914683 | 龙眼 <i>Dimocarpus longan</i> | 35 | 59.8/6.18 | 51.7/5.48 |
| 细胞骨架 Cytoskeleton | | | | | | |
| 1 | 微管蛋白β链(假定) Tubulin β chain, putative | 255564502 | 蓖麻 <i>Ricinus communis</i> | 41 | 50.0/4.78 | 48.9/4.88 |
| 假定蛋白 Predicted protein | | | | | | |
| 5 | 假定蛋白 Predicted protein | 224143607 | 大叶杨 <i>Populus trichocarpa</i> | 19 | 31.6/5.26 | 33.7/5.26 |
| 18 | 假定蛋白 Predicted: hypothetical protein | 225429614 | 葡萄 <i>Vitis vinifera</i> | 15 | 17.3/5.94 | 17.3/5.27 |

表 2 龙眼果肉差异表达蛋白的体积变化

Table 2 Volume changes of differential expression proteins in longan aril

| 序号 No. | 名称 Name | 贮藏天数 Storage days | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 应激反应与防御 Stress response and defense | | | | | |
| 2 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 0.16±0.02 | 0.06±0.01 | 0.11±0.01 | 0.06±0.01 |
| 3 | 热休克蛋白 Heat shock protein | 0.23±0.01 | 0.16±0.01 | 0.09±0.01 | 0.10±0.02 |
| 4 | 热休克蛋白(假定) Heat-shock protein, putative | 0.08±0.01 | 0.02±0.01 | 0.00±0.00 | 0.02±0.01 |
| 7 | 热休克蛋白70-4 Heat-shock protein 70-4 | 0.20±0.01 | 0.09±0.02 | 0.08±0.01 | 0.08±0.03 |
| 8 | 热休克蛋白70-4 Heat-shock protein 70-4 | 0.14±0.01 | 0.03±0.01 | 0.06±0.01 | 0.04±0.01 |
| 9 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 0.13±0.01 | 0.37±0.02 | 0.92±0.02 | 0.10±0.01 |
| 13 | 热休克蛋白20.1 Heat-shock protein 20.1 | 0.82±0.02 | 0.39±0.06 | 0.37±0.02 | 0.32±0.03 |
| 14 | 细胞溶质I类小热休克蛋白1A Cytosolic class I small heat shock protein 1A | 0.59±0.02 | 0.33±0.05 | 0.39±0.02 | 0.29±0.03 |

续表(Continued)

| 序号 No. | 名称 Name | 贮藏天数 Storage days | | | |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 19 | 谷氧还蛋白 Glutaredoxin | 0.10±0.01 | 0.45±0.02 | 0.41±0.01 | 0.77±0.10 |
| 22 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 0.24±0.02 | 0.13±0.01 | 0.03±0.01 | 0.08±0.02 |
| 23 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 0.44±0.01 | 0.21±0.02 | 0.14±0.03 | 0.22±0.01 |
| 24 | 过氧化物酶4 Peroxidase 4 | 0.72±0.01 | 0.29±0.01 | 0.00±0.00 | 0.32±0.01 |
| 能量与碳代谢 Energy and carbon metabolism | | | | | |
| 6 | 蔗糖合成酶 Sucrose synthase | 0.07±0.01 | 0.03±0.01 | 0.05±0.01 | 0.02±0.01 |
| 10 | 苹果酸酶(假定) Malic enzyme, putative | 0.08±0.01 | 0.03±0.01 | 0.02±0.01 | 0.04±0.01 |
| 11 | 假定二氢硫辛酰胺琥珀酰转移酶 Putative dihydrolipoamide succinyltransferase | 0.05±0.01 | 0.09±0.01 | 0.08±0.01 | 0.03±0.01 |
| 12 | 6-磷酸-2-脱氧葡萄糖磷酸酶 2-Deoxyglucose-6-phosphate phosphatase | 0.11±0.01 | 0.05±0.01 | 0.06±0.01 | 0.05±0.01 |
| 初级代谢途径 Primary metabolisms and pathways | | | | | |
| 21 | 天门冬氨酰-tRNA合成酶(假定) Aspartyl-tRNA synthetase, putative | 0.26±0.04 | 0.16±0.02 | 0.16±0.04 | 0.13±0.02 |
| 蛋白转运 Protein transport | | | | | |
| 15 | 线粒体的F1-ATP酶β亚基 Mitochondrial F1-ATPase β subunit | 0.09±0.01 | 0.04±0.01 | 0.07±0.02 | 0.05±0.01 |
| 细胞骨架 Cytoskeleton | | | | | |
| 1 | 微管蛋白β链(假定) Tubulin β chain, putative | 0.04±0.01 | 0.10±0.01 | 0.05±0.01 | 0.08±0.01 |
| 假定蛋白 Predicted protein | | | | | |
| 5 | 假定蛋白 Predicted protein | 0.14±0.01 | 0.04±0.01 | 0.03±0.01 | 0.03±0.01 |
| 18 | 假定蛋白 Predicted: hypothetical protein | 1.33±0.10 | 0.78±0.13 | 0.82±0.02 | 0.65±0.06 |

3 讨论

本研究应用蛋白质组学的方法探讨了‘福眼’龙眼采后不同贮藏天数果肉蛋白表达量的变化,共成功鉴定出 21 个显著差异表达的蛋白质。这些蛋白分别参与了应激反应与防御、能量与碳代谢、初级代谢等过程。

3.1 与应激反应及防御相关的蛋白

采后龙眼果实的成熟和衰老是一个复杂的生理过程,由于氧自由基(活性氧, ROS)的存在而引起的果实劣变现象可被视为一种氧化现象^[15]。在桉叶唐棣(*Amelanchier alnifolia*)和番茄等果实在劣变过程中伴随着 H₂O₂ 的积累和膜脂过氧化作用的发生^[16-17],因此,抗氧化系统在清除 ROS、保护细胞膜、延缓果实衰老进程,特别是对延长软果贮藏寿命方面发挥着关键性作用。抗氧化酶是一种能够控制生物体内生成 ROS 的重要酶,本研究共鉴定出 5 个过氧化物酶(POD; No. 2、9、22、23、24)

在龙眼采后贮藏过程均下调表达,这表明内源的防御活性氧系统的功能减弱, H₂O₂ 的积累增加,使膜脂的不饱和脂肪酸受到自由基的进攻,这与前人的研究结果一致^[16-17]。

越来越多的研究表明在果实的成熟软化过程中,热激蛋白(Heat shock protein, HSPs)可以作为分子伴侣和膜稳定剂起作用^[18-20]。低分子量热激蛋白(sHSPs)一般在各种环境胁迫后进行生物调节^[21],更多时候是通过谷氨酰胺依赖的途径减少细胞内 ROS 含量直接参与细胞免疫过程以对抗氧化胁迫^[22-23];sHSPs 还能够应对由于蛋白质错误折叠速率加快的氧化胁迫^[24-25]。sHSPs 还可以与其它 HSPs,如 HSP70 (No. 7、8)相互作用,帮助暂时错误折叠的蛋白重新折叠,避免进一步的错误折叠^[26-27]。本研究共鉴定出 6 个热休克蛋白(No. 3、4、7、8、13、14),在龙眼采后贮藏过程中均下调表达,这说明龙眼采后果肉氧化胁迫增强,错误折叠的蛋白也不断增加,从而促进果肉的劣变。

3.2 与能量和物质代谢相关的蛋白

能量和物质代谢是生物体的基本生命活动现象。大量的研究表明植物的衰老与能量代谢有关,采后苹果(*Malus pumila*)^[28]、荔枝^[29]、梨(*Pyrus communis*)^[30]等果实的衰老与能量值呈负相关。本研究共鉴定出4个参与能量和碳代谢的蛋白。这类酶主要参与糖酵解三羧酸循环(EMP-TCA)、磷酸戊糖(HMP)等途径。其中苹果酸酶(No. 10)参与能量代谢途径,催化苹果酸在胞质内脱羧生成丙酮酸盐,产生的NADPH大部分用于脂肪酸的合成。随着贮藏天数的增加,‘福眼’龙眼苹果酸酶的相对表达量下降。蔗糖是植物体内用于运输的主要糖类,植物体内与蔗糖代谢和积累密切相关的酶主要有3类:蔗糖合成酶(Sucrose synthase)、蔗糖磷酸合成酶(Sucrose phosphate synthase)和酸性转化酶(Invertase)。本研究与能量代谢相关蛋白中蔗糖合成酶(No. 6)和6-磷酸-2-脱氧葡萄糖磷酸酶(No. 12)在龙眼果肉劣变过程中都是下调表达的。能量与碳代谢相关蛋白的下调表达,表明龙眼果肉在劣变发生过程中呼吸速率下降,产生的ATP量减少,细胞合成过程中所需的能量不足,促进了果实的衰老劣变。本研究结果进一步表明果实采后衰老和褐变的发生与能量供应不足和能量形成速率下降有密切联系。

参考文献

- [1] Zheng G M, Xu L X, Xie H H, et al. Chemical constituents from the pulps of *Dimocarpus longan* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2010, 18(1): 82–86.
郑公铭, 徐良雄, 谢海辉, 等. 龙眼果肉化学成分的研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2010, 18(1): 82–86.
- [2] Lin H T, Xi Y F, Chen S J, et al. Review of postharvest physiology, pathology and transportation in longan aril [J]. *Trans Chin Soc Agri Engin*, 2002, 18(1): 185–190.
林河通, 席琦芳, 陈绍军, 等. 龙眼采后生理和病理及贮运技术研究进展 [J]. *农业工程学报*, 2002, 18(1): 185–190.
- [3] Lin H T, Zhao Y F, Xi Y F, et al. Changes in cell wall components and cell wall-degrading enzyme activities of postharvest longan fruit during aril breakdown [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2007, 33(2): 137–145.
林河通, 赵云峰, 席琦芳. 龙眼果实采后果肉自溶过程中细胞壁组分及其降解酶活性的变化 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2007, 33(2): 137–145.
- [4] Andrews P K, Li S L. Cell wall hydrolytic enzyme activity during development of nonclimacteric sweet cherry (*Prunus avium* L.) fruit [J]. *J Hort Sci Biotechn*, 1995, 70(4): 561–568.
- [5] Li C Y, Zhang G L, Zeng X L, et al. The relationship between the activity of enzyme in cell wall and sweet orange [*Citrus sinensi* (L.) Osbeck] fruit texture [J]. *J Sichuan Agri Univ*, 2006, 24(1): 73–76.
李春燕, 张光伦, 曾秀丽, 等. 细胞壁酶活性与甜橙果实质地的相关性研究 [J]. *四川农业大学学报*, 2006, 24(1): 73–76.
- [6] Xue B Y, Mao Z Q, Shu H R, et al. Changes in Glycosidases and cellulase activities, and cell wall composition in strawberry fruits during development and ripening [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2006, 32(3): 363–368.
薛炳焯, 毛志泉, 束怀瑞. 草莓果实发育成熟过程中糖苷酶和纤维素酶活性及细胞壁组成变化 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2006, 32(3): 363–368.
- [7] Wei J M, Ma F W, Guan J F, et al. Cell wall metabolism and its regulation in harvested *Pyrus ussuriensis* Maxim. cv. Jingbaili fruit during ripening [J]. *Sci Agri Sin*, 2009, 42(8): 2987–2996.
魏建梅, 马锋旺, 关军锋, 等. 京白梨果实后熟软化过程中细胞壁代谢及其调控 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(8): 2987–2996.
- [8] Zeng X L, Zhang G L, Feng M S, et al. The change of hydrolysis enzymes on fruit texture during development and maturation of navel oranges [J]. *J Sichuan Agri Univ*, 2009, 27(1): 60–68.
曾秀丽, 张光伦, 冯茂松, 等. 脐橙果实发育过程中果肉质地与水解酶活性的变化 [J]. *四川农业大学学报*, 2009, 27(1): 60–68.
- [9] Zhang B X, Wang A X, Li J F. Progress on cell wall hydrolase of tomato fruit [J]. *J NE Agri Univ*, 2009, 40(1): 128–132.
张丙秀, 王傲雪, 李景富. 番茄果实细胞壁水解酶研究进展 [J]. *东北农业大学学报*, 2009, 40(1): 128–132.
- [10] Chen J Y, Xiao R, Lin H T, et al. Characterization and regulation of multiple forms of endo-1,4- β -glucanase genes during longan fruit growth and development [J]. *Sci Hort*, 2009, 122(4): 550–555.
- [11] Feng H L, Zhong Y X, Xie H, et al. Differential expression and regulation of longan *XET* genes in relation to fruit growth [J]. *Plant Sci*, 2008, 174(1): 32–37.
- [12] Saravanan R S, Rose J K C. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. *Proteomics*, 2004, 4(9): 2522–2532.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [14] Wang L X, Liu X, Liang M, et al. Proteomic analysis of salt-responsive proteins in the leaves of mangrove *Kandelia candel* during short-term stress [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e83141.
- [15] Qin G Z, Meng X H, Wang Q, et al. Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: A redox proteomics analysis [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(5): 2449–2462.
- [16] Rogiers S Y, Kumar G N M, Knowles N R. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied

- by increasing oxidative stress [J]. *Ann Bot*, 1998, 81(2): 203–211.
- [17] Jimenez A, Creissen G, Kular B, et al. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening [J]. *Planta*, 2002, 214(5): 751–758.
- [18] Faurobert M, Mihr C, Bertin N, et al. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143(3): 1327–1346.
- [19] Bianco L, Lopez L, Scalone A G, et al. Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes [J]. *J Proteom*, 2009, 72(4): 586–607.
- [20] Nilo R, Saffie C, Lilley K, et al. Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE) [J]. *BMC Genom*, 2010, 11(1): 43.
- [21] Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(5): 244–252.
- [22] Arrigo A P. Small stress proteins: Chaperones that act as regulators of intracellular redox state and programmed cell death [J]. *Biol Chem*, 1998, 379(1): 19–26.
- [23] Sun W N, Van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA) Gene Struct Expr*, 2002, 1577(1): 1–9.
- [24] Qin G Z, Meng X H, Wang Q, et al. Oxidative damage of mitochondrial proteins contributes to fruit senescence: A redox proteomics analysis [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(5): 2449–2462.
- [25] Neta-Sharir I, Isaacson T, Lurie S, et al. Dual role for tomato heat shock protein 21: Protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(6): 1829–1838.
- [26] Page D, Gouble B, Valot B, et al. Protective proteins are differentially expressed in tomato genotypes differing for their tolerance to low-temperature storage [J]. *Planta*, 2010, 232(2): 483–500.
- [27] Hartl F U. Molecular chaperones in cellular protein folding [J]. *Nature*, 1996, 381(6583): 571–580.
- [28] Saquet A A, Streif J, Bangerth F. Changes in ATP, ADP and pyridine nucleotide levels related to the incidence of physiological disorders in ‘Conference’ pears and ‘Jonagold’ apples during controlled atmosphere storage [J]. *J Hort Sci Biotechn*, 2000, 75(2): 243–249.
- [29] Duan X W, Jiang Y M, Su X G, et al. Role of pure oxygen treatment in browning of litchi fruit after harvest [J]. *Plant Sci*, 2004, 167(3): 665–668.
- [30] Veltman R H, Lenthéric I, van der Plas L H W, et al. Internal browning in pear fruit (*Pyrus communis* L. cv. Conference) may be a result of a limited availability of energy and antioxidants [J]. *Postharv Biol Techn*, 2003, 28(2): 295–302.