

# 荔枝采后果皮褐变过程中差异表达基因的 SSH 分析

王家保<sup>1,2</sup>, 金志强<sup>2,\*</sup>, 李美英<sup>2</sup>, 张新春<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571737; <sup>2</sup>中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101)

**摘要:** 以‘妃子笑’荔枝果实为材料, 采用抑制差减杂交 (SSH) 与 cDNA 微阵列技术相结合, 研究了采后荔枝果皮褐变过程中的基因差异表达。分别以采后 0 h 与 32 h 的果皮总 RNA 为驱动组与检测组, 构建了正向与反向 SSH 文库, 分别获得了 282 个与 76 个阳性克隆。通过 cDNA 微阵列杂交筛选获得了在采后 32 h 果皮中上调表达克隆 17 个, 下调表达克隆 49 个, 分别代表了在采后 32 h 果皮中上调表达基因 16 个和下调表达基因 17 个, 其中有较多的热激蛋白基因、糖代谢相关基因、细胞壁代谢相关基因等。RT-PCR 检测基因表达结果与 cDNA 微阵列杂交结果一致。

**关键词:** 荔枝; 果皮衰老; 抑制差减杂交; cDNA 微阵列; 基因克隆

**中图分类号:** S 667.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 11-2144-09

## Analysis of Genes Differentially Expressed During Pericarp Browning of Postharvest Litchi Fruit Using Suppression Subtractive Hybridization Technology

WANG Jia-bao<sup>1,2</sup>, JIN Zhi-qiang<sup>2,\*</sup>, LI Mei-ying<sup>2</sup>, and ZHANG Xin-chun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; <sup>2</sup>Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101, China)

**Abstract:** The differentially expressed genes between pericarp of ‘Feizixiao’ fruit at 0 h and 32 h after harvest (HAH) were identified by the combination of suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray technology. The reciprocal, forward and reverse, SSH libraries were constructed with RNA extracted from the pericarp at 0 HAH and 32 HAH as tester and driver, respectively. Then 282 and 76 positive clones were obtained from the forward and reverse library. However, only 17 and 49 clones with enhanced or repressed expression at 32 HAH were identified by cDNA microarray hybridization, representing 16 and 17 genes both with enhanced and repressed expression in the pericarp at 32 HAH, respectively. Among the tested genes, genes encoding enzymes involved in carbohydrate metabolism, cell wall metabolism and genes encoding heat shock proteins had higher frequencies than other genes. The results of cDNA microarray hybridization were confirmed by RT-PCR.

**收稿日期:** 2013-06-24; **修回日期:** 2013-09-29

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30460085)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhiqiangjin@sohu.com)

**Key words:** litchi; pericarp browning; suppression subtractive hybridization; cDNA microarray; gene cloning

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 是华南重要的果树作物, 然而, 以褐变为主要标志的采后果皮快速衰老缩短了荔枝货架期, 严重降低了其商品价值 (Wang et al., 2010)。已有的研究集中在果皮褐变相关的生理机制上, 发现酶促褐变是主要原因 (Jiang et al., 2004; Wang et al., 2010)。此外, 病菌侵染 (刘晋 等, 2006)、果皮失水 (Joas et al., 2005, 王家保 等, 2010)、强光 (宋光泉 等, 1999)、高温 (庞学群 等, 2001) 等也可引起果皮褐变。有关果皮褐变的分子机制研究尚未见报道。作者前期研究表明, 室温下 ‘妃子笑’ 荔枝果皮在采后 0 ~ 32 h 褐变指数上升缓慢, 果皮含水量较高, 色素、酚及多酚氧化酶和过氧化物酶活性等较高。但在采后 40 h, 果皮失水超过 20%, 好果率急剧下降, 果皮中脂氧合酶、过氧化物酶、多酚氧化酶、超氧化物歧化酶等酶活性降低, 花色苷、总酚、类黄酮含量显著下降, 果皮相对电导率达到最高。聚类分析将果皮褐变过程以采后 32 ~ 40 h 为界分为两个阶段 (王家保 等, 2010)。作者推测, 这种阶段性的变化可能由采后 32 h 果皮中特异表达的基因调控。因此, 拟在前期研究的基础上, 利用抑制差减杂交技术分析采后 32 h 与 0 h 果皮中的差异表达基因, 以期为阐释果皮褐变的分子机制提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

八成熟 ‘妃子笑’ 荔枝果实采自中国热带农业科学院试验场基地。用清水冲洗树上的果实, 自然晾干, 选取大小相对一致、无病虫害的果实采下, 立即小心剥取果皮, 使之不粘连果肉, 于液氮中冷冻, 作为采后 0 h 样品, 带回实验室贮于 -76 °C 保存备用。另外采收果实, 3 h 内运回实验室, 用清水冲洗干净, 自然晾干。选取大小相对一致、无病虫害的果实, 裸置于有孔塑料筐内, 单层摆放, 果实相互之间无挤靠。于 25 °C ± 1 °C 温度下贮藏, 环境湿度 70% ± 5%, 贮存至采后 32 h, 小心剥取果皮, 使之不粘连果肉, 液氮速冻后贮于 -76 °C 保存备用。每次取样以 30 个为一组作为一次重复。共取 3 组。

### 1.2 SSH 文库的构建

果皮总 RNA 提取参考王家保等 (2006) 的方法进行。取 2.5 μg 荔枝果皮总 RNA, 按照 SMART cDNA Synthesis Kit (Clontech, USA) 合成双链 cDNA, 然后分别以采后 0 和 32 h 总 RNA 反转录的双链 cDNA 互为驱动组 (Driver) 和检测组 (Tester), 按照 PCR-Select™ cDNA Substraction Kit (Clontech, USA) 的说明构建抑制差减杂交文库: 双链 cDNA 经 Chromatin Spin-100 柱层析、*Ras* I 酶切、连接接头后进行两次差减杂交, 对杂交产物进行两次 PCR 扩增。电泳检测后将第二次扩增产物克隆到 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) 载体中, 转染入感受态 *E. coli* DH5α (Tiangen, Beijing) 中, 在含 50 mg · L<sup>-1</sup> 的氨苄青霉素 (Amp)、IPTG 和 X-gal 的 LB 培养基上培养, 进行蓝白斑筛选。

### 1.3 阳性克隆的重组子鉴定

从 LB/Amp 平板上挑取白色克隆在含 50 mg · L<sup>-1</sup> Amp 的 LB 液体培养基中震荡培养 12 h, 取 1 μL 菌液为模板, 用巢式 PCR 引物 (正向引物: 5'-TCGAGCGGCCCGCCCGGCAGGT-3'; 反向引物: 5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') 按照 PCR-Select™ cDNA Substraction Kit (Clontech, USA) 的说明按下述条件扩增: 95 °C 变性 30 s, 66 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 进行 35 个循环, 最后

72 °C 延伸 7 min。PCR 产物取 1  $\mu$ L 电泳检测, 其余用异丙醇沉淀, 70%乙醇洗 2 次, 真空干燥后溶于 15  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 送交北京博奥生物芯片有限公司制作 cDNA 芯片。

#### 1.4 cDNA 芯片的制作及杂交分析

委托北京博奥生物芯片有限公司完成。阳性对照、阴性对照、空白对照均按照该公司说明进行。

每克隆在每张芯片上重复点样 2 次, 荧光互换杂交 1 次, 即第 1 张芯片用荧光染料 cy5 标记 32 h 样品, cy3 标记 0 h 样品进行杂交, 第 2 张芯片反之。每克隆共重复杂交 4 次。仅选取原始杂交信号扣除背景后大于 400 像素的点进行分析。计算各克隆 32 h 与 0 h 的荧光比值 (R), 并对 R 值用 LOWESS 方法归一化, 对归一化的 R 值进行 *t* 检验, 在 5% 水平上 ( $P < 0.05$ ) 检验 R 值的真实性 (*t* 检验的 R 值在 0.5 ~ 2.0 之外的克隆被认为发生了差异表达)。

#### 1.5 序列测定与生物信息学分析

对经 cDNA 微阵列筛选发生差异表达的克隆穿刺培养, 送交北京鼎国生物技术有限公司测序获得表达序列标签 (EST)。去除载体序列后的 EST 用 DNASTar4.0 软件的 Seqman II 模块按默认的条件拼接为单一序列 (uniEST)。对 uniEST 在 NCBI 的蛋白质 Nr 数据库进行 BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 比对, 期望 (E) 值大于 0.01 的 uniEST 视为无匹配基因, 小于 0.01 的按照比对结果中第 1 条基因的功能对其进行注释。根据注释结果在 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 中进行代谢途径分析。

#### 1.6 差异表达基因的 RT-PCR 验证

选取在杂交中差异表达且在 Blastx 中有功能注释的部分基因进行 RT-PCR 验证。引物序列 (表 1) 依据 EST 序列用 DNAMAN5.0 设计, 上海生物工程公司合成。

表 1 RT-PCR 引物序列  
Table 1 The primers used for RT-PCR analysis

克隆编号 Clone No.	正向引物 (5'→3') Forward (5'→3')	反向引物 (5'→3') Reverse (5'→3')	扩增片段长度/bp Fragment length
FHAB1-C9	GCAGAAGAACCAGTGC GTT	TGGCAAATGCTGATGTCTC	220
FHAB1-C8	GCTACTTGACTGGTGAGTTCC	AAGGATGCTTTGTGCGTG	275
FHAB1-B4	TGAGGACATACACCATTAGC	GTTAGTGCTTGGGTTGC	168
FHAB2-A10	GCCAAGAAATGTAGCAG	GCACACACTCTAAGGGT	172
FHAB2-H8	TCCGTGTGGTGATTGTGT	ATCGTTACTGGTCCCTTCG	225
FHAB3-D2	ACACCACCACAGCAACAAG	AAGCCTCTCATCCAAGTCAC	245
FHAB3-E8	GCTACCACTCCCTCTCAATC	GCTCATCTACTGCGTCACTG	207
RCD-B9	GGGACGACCTTGAGAAT	GAGCCTGATAACTGGAGAC	234
RCD-E2	CCGAACGAAAGAAGATGAG	CAAGTCAACCACAATCACAG	246
RCD-G6	CTCTTCTCGCAAGTCTCAAG	AGGTCAAGGAGTCCAAAGTC	253
RCD-G8	ACTACACCTGATGACTCCC	TCCTCCTCCTTTGACTTC	223
RCD-G9	CATCCGAATCTGCCATAG	TCTGGTATTGCTTCCCTG	202
RCD-H2	AGTGTGAACCTGACCTCTTC	TTCTCCACCAACAACGAG	141
RCD-H3	AACACTCCTTGGTCGTATC	GCAGTTCGTAATCCTCCT	298
RCD-H7	CGTGTGCCTTAGTCGTAT	ATTCAGACAAGTTGGTGG	162

取 5  $\mu$ g 采后 0 h 和 32 h 的果皮总 RNA 按照 TranScriptIII (Invitrogen, USA) 的说明反转成为 cDNA 一链, 稀释 10 倍后用作 RT-PCR 的模板。以 ACTIN 基因 (正向引物: 5'-CAGTGGTCG TACAACCTGGTAT-3'; 反向引物: 3'-ATCCTCCAATCCAGACACTGT-5')。扩增片段长度约 600 bp) 为内标, 标定 PCR 体系中的单链 cDNA 用量。按照下述程序进行 PCR 反应: 94 °C 3 min; 然后 94 °C

30 s, 51 °C 1 min, 72 °C 50 s, 进行 32 个循环; 最后 72 °C 7 min。

取 3  $\mu$ L PCR 产物, 在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 照相。对电泳图片用 Scion Image (v.4.03) 软件进行量化分析, 计算 RT-PCR 扩增片段的亮度比值, 以此作为基因表达量比值。

## 2 结果与分析

### 2.1 抑制差减杂交的 PCR 结果

经电泳及紫外比色分析, 所提取的总 RNA 28S 带比 18S 亮两倍以上, 较为完整, 未发生严重降解,  $A_{260}/A_{280}$  都在 1.80 以上, 质量符合实验要求。

果皮总 RNA 反转录为 cDNA 一链后, 经 23 个 PCR 循环合成 cDNA 双链。双链经过柱、酶切、连接和两轮杂交后进行两轮 PCR 扩增。扩增结果表明, 无论正向(以采后 0 h 为 Tester, 32 h 为 Driver) 还是反向(以采后 0 h 为 Driver, 32 h 为 Tester) 抑制差减杂交, 杂交后扩增出的弥散 cDNA 亮度明显低于直接以酶切产物为模板扩增出的 cDNA, 说明 cDNA 数量大量减少。经 SSH 后扩增出的 cDNA 的分布范围均明显缩小, 集中分布在约 300 ~ 750 bp 之间(图 1), 说明样品经过两轮差减杂交和两轮抑制 PCR 后, 待测子中的差异表达基因得到有效富集和扩增。

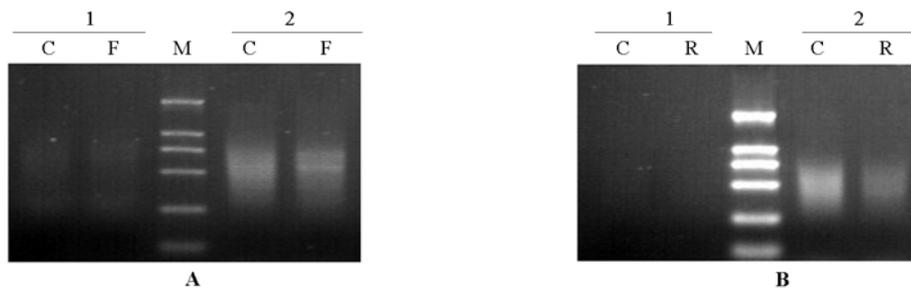


图 1 正向 (A) 和反向 (B) 抑制差减杂交前后的 PCR 结果

1: 第 1 轮 PCR; 2: 第 2 轮 PCR; C: 对照; F: 正向差减杂交; M: DL2000 marker; R: 反向差减杂交。

Fig. 1 PCR results of forward (A) and reverse (B) SSH

1: The first PCR; 2: The second PCR; C: Control; F: The forward SSH;  
M: DL2000 marker; R: The reverse SSH.

### 2.2 抑制差减文库的构建及其插入片段的大小

分别用正向抑制差减杂交和反向抑制差减杂交的 PCR 产物, 以 T/A 克隆法构建质粒载体文库。蓝白斑筛选结果表明正向差减文库包括 286 个白色克隆, 反向差减文库包括 78 个白色克隆。克隆饱满清晰。应用菌落 PCR 方法对正向抑制差减文库的 286 个克隆进行筛选, 获得 252 个重组子, 对反向抑制差减文库的 78 个克隆进行筛选, 获得 75 个重组子。插入片段大小在 200 ~ 1 000 bp 之间, 多在 200 ~ 600 bp 之内(图 2), 符合预期要求。

### 2.3 用 cDNA 微阵列筛选差异表达克隆

经过 cDNA 杂交筛选, 仅 162 个克隆 4 个重复的杂交信号都在 400 像素以上, 其 R 值均通过了  $t$  检验 ( $P < 0.05$ )。其中, 在采后 32 h 上调表达的克隆 17 个, 全部来自于反向 SSH 文库; 下调表达的克隆 49 个, 全部来自于正向 SSH 文库(图 3, 杂交信号值及每克隆 R 值未列出)。

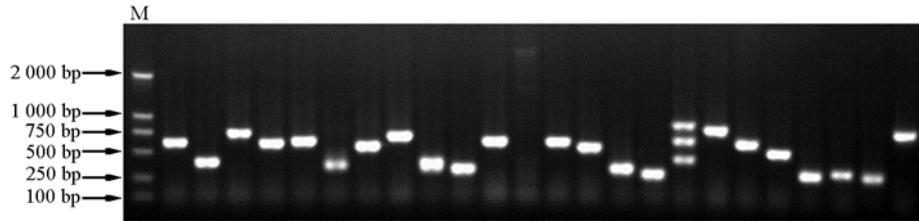


图 2 抑制差减杂交文库中部分菌落 PCR 结果

M: DL2000 marker; 其余泳道为阳性菌落 PCR 结果。

Fig. 2 The PCR results of some clones from SSH libraries

M: DL2000 marker; Others were the PCR results of some positive clones.

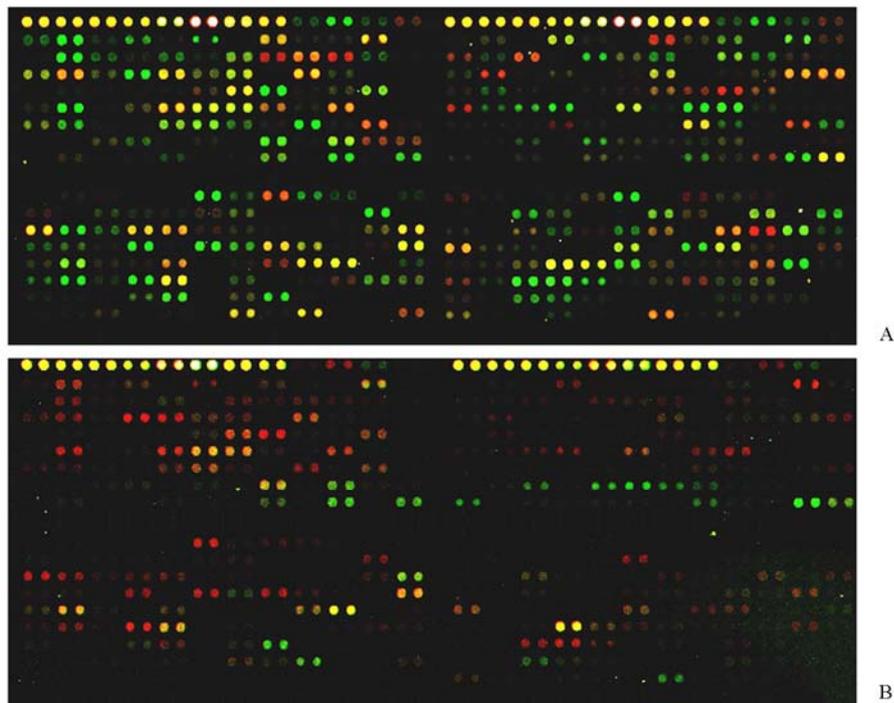


图 3 微阵列杂交的伪色图

A: 0 h 样品用 cy3 标记, 32 h 样品用 cy5 标记; B: 0 h 样品用 cy5 标记, 32 h 样品用 cy3 标记。

Fig. 3 The pseudo-colored image of cDNA microarray hybridization

A: Sample at 0 h marked with cy3 and that at 32 h marked with cy5; B: Sample at 0 h marked with cy5 and that at 32 h marked with cy3.

#### 2.4 差异表达克隆的序列测定及生物信息学分析

对 66 个差异表达克隆进行测序, 仅获得 62 条 EST。在采后 32 h 果皮中下调表达的 45 条 EST 拼接成为 5 个重叠群和 12 个单一序列 (表 2), 代表了 17 条 uniEST, 其中有两条 uniEST 分别由 14 条和 10 条 EST 组成 (代表克隆编号: FHAB1-A1, FHAB1-C9), 说明在 SSH 文库中其出现的频率较高。采后上调表达的 17 条 EST 中有 2 条拼接成为 1 个重叠群, 其余为单一序列, 说明反向 SSH 文库中可能包含了更多的低丰度表达基因。

BLASTx 比对结果表明: 采后 32 h 上调表达的 16 条 uniEST 中, 有 2 个无匹配基因, 3 个未知功能基因。其余 11 个已知功能基因中有 4 个编码的酶参与不同的糖代谢途径, 分别为  $\beta$ -淀粉酶基

因、水苏糖合酶、碱性/中性转化酶及肌醇半乳糖苷合酶基因 (克隆编号: RCD-B9, RCD-G8, RCD-H3, RCD-H5), 3 个可能参与细胞防卫反应基因, 即  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶基因、类 NtPRp27 蛋白基因与甘露糖/葡萄糖特异的凝集素基因 (克隆编号: RCD-G4, RCD-H2, RCD-H7), 3 个信号转导基因 (克隆编号: RCD-D9, RCD-E2, RCD-G6) 和 1 个成熟相关蛋白基因 (RCD-G9) (表 2)。

表 2 cDNA 微阵列筛选 SSH 文库获得的差异表达克隆及其代表基因  
Table 2 cDNA clones isolated from litchi pericarp through suppression subtractive hybridization (SSH) and cDNA microarray screening

克隆编号 <sup>a</sup> Clone No.	同源基因 Homologous gene	得分 <sup>b</sup> Score	期望值 <sup>b</sup> E-value	克隆数量 <sup>c</sup> Number	R 值 <sup>d</sup> R value
<b>FHAB1-A1</b>	<b>hypothetical protein, containing sHSPs region</b> [ <i>Vitis vinifera</i> ]	<b>206 bits (525)</b>	<b>5.00E-52</b>	<b>14</b>	<b>0.2820</b>
FHAB1-A6	heat shock protein 90[ <i>Hevea brasiliensis</i> ]	107 bits (267)	2.00E-22	1	0.4038
<b>FHAB1-A12</b>	<b>No hit</b>			<b>2</b>	<b>0.3673</b>
FHAB1-B4	glutathione S-transferase F1[ <i>Malva pusilla</i> ]	67.4 bits (163)	2.00E-10	1	0.3540
<b>FAHB1-C8</b>	<b>chlorophyll A-B binding protein</b> [ <i>Cucumis sativus</i> ]	<b>213 bits (542)</b>	<b>9.00E-61</b>	<b>3</b>	<b>0.3709</b>
<b>FHAB1-C9</b>	<b>Heat shock protein Hsp20</b> [ <i>Medicago truncatula</i> ]	<b>236 bits (602)</b>	<b>1.00E-60</b>	<b>10</b>	<b>0.2722</b>
FHAB1-F3	No hit			1	0.4843
<b>FHAB1-G2</b>	<b>chlorophyll A-B binding protein</b> [ <i>Musa balbisiana</i> ]	<b>159 bits (403)</b>	<b>3.00E-38</b>	<b>3</b>	<b>0.2951</b>
FHAB2-A5	chloroplast ferredoxin I[ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	123 bits (308)	3.00E-27	1	0.2300
FHAB2-A10	xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase 16 protein	120 bits (302)	2.00E-26	1	0.4395
FHAB2-H8	chalcone isomerase[ <i>Camellia sinensis</i> ]	200 bits (509)	2.00E-50	1	0.3645
FHAB3-D2	expansin 2[ <i>Zinnia elegans</i> ]	91.7 bits (226)	1.00E-17	1	0.3335
FHAB3-D3	17.5 kDa class I heat shock protein[ <i>Carica papaya</i> ]	119 bits (297)	6.00E-26	1	0.2080
FHAB3-D11	heat-shock protein 80[ <i>Euphorbia esula</i> ]	135 bits (341)	5.00E-31	1	0.2423
FHAB3-E2	mitochondrial small heat shock protein[ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	99.0 bits (245)	7.00E-20	1	0.4755
FHAB3-E7	101 kDa heat shock protein[ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	86.3 bits (212)	4.00E-16	1	0.3623
FHAB3-E8	pectinesterase inhibitor[ <i>Vitis vinifera</i> ]	149 bits (375)	8.00E-25	1	0.4335
RCD-A6	unknown protein[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	102 bits (253)	7.00E-21	1	2.7150
<b>RCD-B3</b>	<b>No hit</b>			<b>2</b>	<b>3.2525</b>
RCD-B5	conserved hypothetical protein[ <i>Medicago truncatula</i> ]	54.3 bits (129)	2.00E-06	1	3.6675
RCD-B6	No hit			1	7.3138
<b>RCD-B9</b>	<b>beta-amylase 1</b> [ <i>Nicotiana langsdorffii</i> × <i>Nicotiana sanderae</i> ]	<b>90.9 bits (224)</b>	<b>2.00E-17</b>	<b>2</b>	<b>2.2450</b>
RCD-C8	hypothetical protein[ <i>Medicago truncatula</i> ]	44.7 bits (104)	0.001	1	2.6450
RCD-D9	peripheral-type benzodiazepine receptor[ <i>Solanum tuberosum</i> ]	142 bits (359)	4.00E-33	1	2.9100
RCD-E2	protein phosphatase 2C[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	162 bits (411)	4.00E-39	1	2.4475
RCD-G4	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase[ <i>Solanum lycopersicum</i> ]	165 bits (418)	5.00E-40	1	2.3050
RCD-G6	poly (A) -binding protein C-terminal interacting protein 6	90.5 bits (223)	2.00E-17	1	2.1450
RCD-G8	stachyose synthase[ <i>Pisum sativum</i> ]	167 bits (424)	1.00E-40	1	2.6150
RCD-G9	putative ripening-related protein[ <i>Vitis vinifera</i> ]	187 bits (474)	2.00E-46	1	2.0200
RCD-H2	NtPRp27-like protein[ <i>Solanum tuberosum</i> ]	149 bits (376)	4.00E-35	1	2.7050
RCD-H3	putative alkaline/neutral invertase[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	251 bits (641)	7.00E-66	1	2.4050
RCD-H5	galactinol synthase[ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	47.0 bits (110)	7.00E-08	1	5.3825
RCD-H7	Mannose/glucose-specific lectin[ <i>Parkia platycephala</i> ]	44.3 bits (103)	0.002	1	2.4357

注: a: FHAB 代表克隆来自正向 SSH 文库, RCD 代表克隆来自反向 SSH 文库; b: Scores 和 E-values: BLASTx 注释的结果; c: 某一 uniEST 包含的测序 EST 数量; d: R 值为 32 h 与 0 h 样品的荧光比值。粗体表示由不同克隆拼接而成的重叠群。重叠群荧光比值为拼接该重叠群各克隆的平均值。

Note: a: Clones named as FHAB was from forward SSH library and named as RCD was from reverse SSH library. b: The scores and E-values: Annotated results by BLASTx. c: The total number of homologous clones isolated. d: R value was the ratio of the hybridization fluorescence pixels of sample at 32 h to that at 0 h. Letters in bold indicated that the sequences were assembled by several clones. The R value of certain contig was the average of its assembled clones.

采后 32 h 下调表达的 17 条 uniEST 有 14 个功能基因, 1 个未知功能基因, 2 个无匹配基因。14 个功能基因中有热击蛋白 (HSP) 家族的基因有 6 个, 细胞壁代谢相关基因 3 个, 即木葡聚糖内转糖基酶基因 (XTH)、膨胀素基因 (EXP) 与果胶酯酶抑制剂基因 (克隆编号: FHAB2-A10、FHAB3-D2、FHAB3-E8), 次生代谢相关基因 1 个即儿茶酚合成酶基因 (克隆编号: FHAB2-H8), 叶绿体能量代谢相关基因 3 个, 即 2 个叶绿素结合蛋白基因和 1 个铁氧环蛋白基因 (克隆编号: FHABB1-C8、FHAB1-G2、FHAB2-A5), 另外, 谷胱甘肽转硫酶基因 (克隆编号: FHAB1-B4) 也广泛参与了多种代谢过程 (表 2)。

## 2.5 差异表达基因的 RT-PCR 验证

共选取了 15 条基因进行基因表达的 RT-PCR 验证, 结果与 cDNA 微阵列杂交结果 (表 2) 趋势一致, 证实了其结果的真实性和真实性, 也证实所获基因在采后 0 h 与 32 h 发生了差异表达 (图 4)。

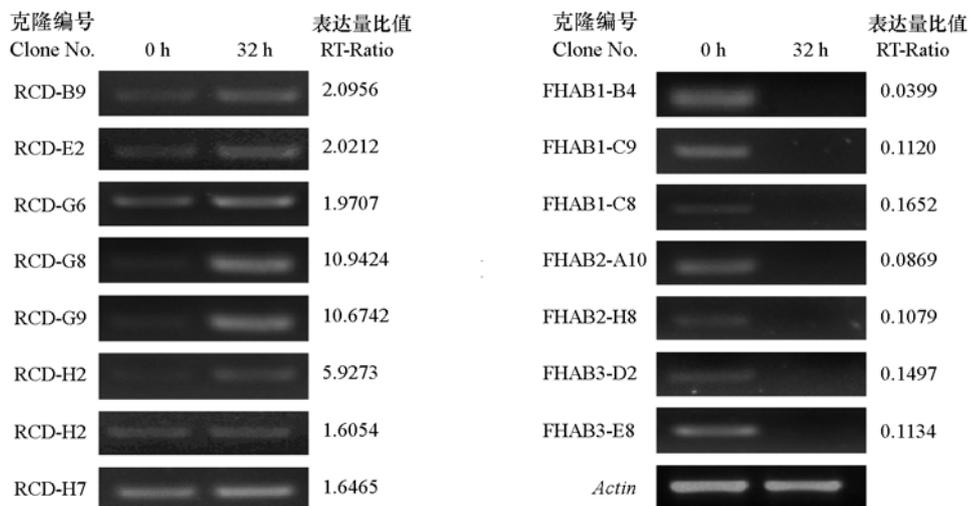


图 4 部分基因表达的 RT-PCR 结果

表达量比值: 电泳图片经量化计算的采后 32 h 与 0 h 基因表达量比值。

Fig. 4 The RT-PCR results of several selected genes

RT-Ratio: The ratio of expression level at 32 h to that at 0 h calculated by Scion Image.

## 3 讨论

### 3.1 关于 SSH 文库构建

Diatchenko 等 (1996) 建立的基于 PCR 技术的 SSH 技术最显著的特点在于应用 2 次差减杂交和 2 次 PCR 扩增, 扣除了处理与对照材料共同表达的基因, 使特异表达基因得到富集, 同时可以分离大量差异表达基因。本试验中应用这一技术研究了采后 0 h 与 32 h 果皮中的差异表达基因, 但无论是正向 SSH 文库还是反向 SSH 文库, 所获得的阳性克隆都较少。这一方面可能因为在进行 T/A 克隆时感受态大肠杆菌转化能力较低所致, 另一方面, 一些低丰度表达基因的片段经过差减杂交后拷贝数极低, 与载体连接过程中发生丢失, 或因 PCR 循环次数不够, 不能充分扩增这些片段, 从而不能进行有效地克隆。

研究表明, 虽然 SSH 技术大大降低了文库的假阳性率, 但仍存在一定的假阳性 (Diatchenko et al., 1996)。本试验中经过 cDNA 微阵列筛选果皮 SSH 文库, 仅从正向和反向 SSH 文库中分别获得了

49 和 17 个阳性克隆, RT-PCR 也验证了 cDNA 微阵列的杂交结果, 说明 SSH 文库的假阳性率较高。这一方面与筛选差异表达克隆时选用的 R 值阈值有关, 另外可能因为在采后 32 h 果皮与新采收果皮之间的基因差异表达较少, 从而获得的阳性克隆较少。

### 3.2 关于果皮褐变过程中的差异表达基因

本研究共获得了 33 个果皮褐变过程中差异表达的基因, 这些基因都可能与果皮采后褐变过程有关。KEGG 数据库注释表明, 在采后 32 h 上调表达的基因中, 有多个基因编码的酶在多种糖代谢中起重要作用, 如  $\beta$ -淀粉酶 ( $\beta$ -amylase, BAMY)、碱性/中性转化酶 (alkaline/neutral invertase, A/Ni)、水苏糖合酶 (stachyose synthase, STS) 和肌醇半乳糖苷合酶 (galactinol synthase, GTS) 等。BAMY 在非还原端降解葡聚糖, 生成麦芽糖 (Fatma & Charles, 2000), A/Ni 分解蔗糖成果糖和葡萄糖 (Agnieszka et al., 2013), GTS 催化合成肌醇半乳糖苷, 然后再在 STS 作用下合成水苏糖 (Bruce et al., 2003)。麦芽糖 (Fatma & Charles, 2000)、肌醇半乳糖苷和水苏糖 (Mi et al., 2008) 等都与逆境胁迫有关, 这可能与响应采后果皮失水及真菌侵染等有关。蔗糖水解可为糖酵解等提供葡萄糖, 产生能量, 与采后的旺盛呼吸有关。另外,  $\beta$ -1,3 葡聚糖苷酶基因 (glucan endo-1,3- $\beta$ -D-glucosidase) (Agnieszka et al., 2013)、类 NtPRp27 蛋白基因 (NtPRp27-like protein) (Ana et al., 2011)、甘露糖/葡萄糖特异的凝集素基因 (Mannose/glucose-specific lectin) (Ma et al., 2011) 都与细胞防卫反应有关, 广泛参与了各种抗病过程。这些基因在采后 32 h 发生上调表达, 可能与采后荔枝果皮受到真菌侵染诱导所致。

在采后 32 h 果皮下调表达的基因中, HSP 类基因多达 6 个, 一个假想蛋白也具有 HSP 的结构域, 测序获得的 EST 数量达 29 条, 占下调表达 EST 总数的约 60%。HSP 是一类分子伴侣, 在细胞内参与蛋白质折叠和去折叠及多聚复合物的装配, 维系蛋白质的正常功能, 防止蛋白质前体积累并协助蛋白质的跨膜运输, 防止蛋白质失活 (Wang et al., 2004)。HSPs 基因的下调表达可能导致果皮 HSP 含量下降, 使果皮细胞的蛋白质不能正常折叠而失去功能, 进而使得各类生理活动紊乱, 加速果皮衰老。木葡聚糖内切转糖基酶 (xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase, XTH)、膨胀素 (expansin, EXP)、果胶酯酶抑制子 (pectinesterase inhibitor, PEI) 等蛋白与细胞壁代谢有关。XTH 可使细胞壁中木葡聚糖—纤维素网络间的键断开, 在此网络的一个新位置再形成同样的键, 因此使细胞壁得以延展 (Vicky et al., 2007)。而 EXP 基因则使纤维素的氢键断裂, 使细胞壁直接伸展 (Li et al., 2003)。果胶酯酶 (pectinesterase, PE) 可水解细胞壁中的原果胶生成可溶性果胶和果胶酸盐, 导致细胞壁降解 (Jiang et al., 2002)。PEI 抑制 PE 的活性。编码这 3 种蛋白质的基因在采后 32 h 时下调表达可能导致细胞壁主要成分降解加快, 降低细胞壁延展性, 使果皮在褐变过程中“变脆”易碎。

除上述基因外, 还有一些功能基因、未知功能基因及无匹配基因发生了差异表达。前期研究表明, 尽管与新采收果实的果皮相比, 采后 32 h 果皮仅失水 12%, 果皮也未表现明显的褐变症状, 但果皮的生理状态却在 32~40 h 之间发生了阶段性变化, 在采后 40 h, 好果率急剧下降, 多种酚氧化酶和活性氧清除相关酶活性显著下降, 质膜透性达到最高 (王家保等, 2010)。这些生理变化可能是上述差异表达基因调控的结果。不同功能基因在采后 0 h 与 32 h 之间发生差异表达说明荔枝果皮的采后褐变是一个多基因调控的复杂过程。对所获差异表达基因进行深入研究, 可望从分子生物学角度阐释荔枝果皮采后褐变的机制。

### References

Agnieszka W, Kamil W, Jacek H, Mariusz J. 2013. Structures of an active-site mutant of a plant 1,3- $\beta$ -glucanase in complex with oligosaccharide

- products of hydrolysis. *Acta Cryst.*, 69: 52 - 62.
- Ana B S J, Lorena A, Sarai B N, Alfonso R B, Maria A P. 2011. Methyl jasmonate induces extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Capsicum chinense*. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (3): 440 - 442.
- Bruce D, Sunitha G, Petambar D, Richard R T, John C S, Hiroyuki N, Kyuock Y, Keith F, Veria A, Kent J B. 2003. Expression of a galactinol synthase gene in tomato seeds is up-regulated before maturation desiccation and again after imbibition whenever radicle protrusion is prevented. *Plant Physiology*, 131: 1347 - 1359.
- Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov Y, Gurskya N, Sverdlov E, Siebert P D. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 6025 - 6030.
- Jiang C M, Li C P, Chang H M. 2002. Influence of pectinesterase inhibitor from jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes on pectinesterases and cloud loss of fruit juices. *Food Engineering and Physical Properties*, 67: 3063 - 3068.
- Jiang Y M, Duan X W, Joyce D, Zhang Z Q, Li J R. 2004. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chemistry*, 88: 443 - 446.
- Joas J, Caro Y, Ducamp N D, Reynes M. 2005. Postharvest control of pericarp browning of litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn cv. Kwai Mi) by treatment with chitosan and organic acids: I. Effect of pH and pericarp dehydration. *Postharvest Biology and Technology*, (38): 128 - 136.
- Li Y, Jones L, McQueen-Mason S. 2003. Expansin and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 603 - 610.
- Liu Jin, Liu Ai-yuan, Chen Wei-xin. 2006. The physiological changes in litchi fruit infected by *Peronophythora litchi*. *Journal of Fruit*, 23 (6): 834 - 837. (in Chinese)
- 刘 晋, 刘爱媛, 陈维信. 2006. 荔枝果实感染霜疫病后的生理变化. *果树学报*, 23 (6): 834 - 837.
- Pang Xue-qun, Zhang Zhao-qi, Duan Xue-wu, Ji Zuo-liang. 2001. Effects of pH value and temperature on the stability of anthocyanin from litchi pericarp. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (1): 25 - 30. (in Chinese)
- 庞学群, 张昭其, 段学武, 季作梁. 2001. pH 值和温度对荔枝果皮花色苷稳定性的影响. *园艺学报*, 28 (1): 25 - 30.
- Ma Q H, Tian B, Li Y L. 2010. Overexpression of a wheat jasmonate-regulated lectin increases pathogen resistance. *Biochimie*, 92 (2): 187 - 193.
- Mi S K, Song M C, Eun Y K, Yang J I, Hoon H B, Young C K, Choong M R, Kwang Y Y, Gap C C, Baik H C. 2008. Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* o6 root colonization. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 21 (12): 1643 - 1653.
- Vicky S T, Van S, Dmitry S, Jean-P V, Kris V. 2007. Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall. *Annals of Botany*, 100: 1467 - 1473.
- Wang J B, Wang X S, Jin Z Q. 2010. Enzymatic browning of postharvest litchi: A review. *Acta Horticulturae*, 863: 613 - 617.
- Wang Jia-bao, Wang Xiang-she, Xu Bi-yu, Jin Zhi-qiang. 2010. Physiological changes during the process of pericarp browning in the postharvest litchi. *Agricultural Science & Technology*, 11 (5): 10 - 16. (in Chinese)
- 王家保, 王向社, 徐碧玉, 金志强. 2010. 采后荔枝果皮褐变过程中的生理变化研究. *农业科学和技术*, 11 (5): 10 - 16.
- Wang X, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Sciences*, 9 (5): 1360 - 1385.
- Wang Jia-bao, Xu Bi-yu, Du Zhong-jun, Lai Jian-xun, Jin Zhi-qiang. 2006. Extracting total RNA from pericarp of postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit by improved CTAB method. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14 (6): 998 - 999. (in Chinese)
- 王家保, 徐碧玉, 杜中军, 赖建勋, 金志强. 2006. 改良 CTAB 法从采后荔枝果皮中提取总 RNA. *农业与生物技术学报*, 14 (6): 998 - 999.