

红肉火龙果 α -淀粉酶基因 *HpAMY3* 的克隆及功能鉴定

郑乾明^{a,b}, 王红林^{a,b}, 王小柯^a, 解 璞^a, 马玉华^{b,①}

(贵州省农业科学院: a. 贵州省果树科学研究所; b. 农业农村部喀斯特山区作物基因资源与种质创新重点实验室, 贵州 贵阳 550006)

摘要: 为了解 α -淀粉酶在红肉火龙果 [*Hylocereus polyrhizus* (F. A. C. Weber) Britton et Rose] 果实淀粉降解中的作用, 对红肉火龙果 α -淀粉酶基因 *HpAMY3* 进行克隆和生物信息学分析, 检测果实发育期间该酶的活性及其编码基因的表达式, 同时对 *HpAMY3* 重组蛋白的淀粉降解活性进行分析。结果表明: *HpAMY3* 基因的开放阅读框长度为 2 742 bp, 编码 913 个氨基酸; *HpAMY3* 蛋白的理论相对分子质量为 102 370, 理论等电点为 pI 6.02, 预测此蛋白位于叶绿体, 且为亲水性蛋白。系统进化分析表明 *HpAMY3* 与拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] *AtAMY3* 的亲缘关系最近, 均属于 AMY III 类。亚细胞定位实验结果显示 *HpAMY3* 定位于本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana* Domin) 叶片的叶绿体, 表明 *HpAMY3* 具有质体定位的特点。在授粉后 20 和 23 d, 红肉火龙果果实的 α -淀粉酶活性较低; 在授粉后 25 d, α -淀粉酶活性显著 ($P < 0.05$) 升高; 在授粉后 27 和 30 d, α -淀粉酶活性保持在较高水平。红肉火龙果果实的 *HpAMY3* 基因相对表达量在授粉后 20 和 23 d 较低, 在授粉后 25 和 27 d 持续升高, 在授粉后 30 d 略有降低。红肉火龙果果实发育期间 α -淀粉酶活性与 *HpAMY3* 基因相对表达量的相关性较高 ($R^2 = 0.94$)。体外淀粉降解活性实验结果显示: 在含有 *HpAMY3* 重组蛋白的反应体系中均检测到麦芽糖和麦芽三糖, 且二者含量极显著 ($P < 0.01$) 高于含有载体对照 pDR196 的反应体系。综合上述结果, *HpAMY3* 蛋白可能定位于红肉火龙果果实的淀粉体; 在果实发育期间, *HpAMY3* 基因上调表达, *HpAMY3* 具有淀粉降解活性。

关键词: 红肉火龙果; α -淀粉酶; 果实发育; 亚细胞定位; 酵母表达; 酶活

中图分类号: Q946-33; S667.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)02-0022-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.02.03

Cloning and functional identification of α -amylase gene *HpAMY3* in *Hylocereus polyrhizus*
ZHENG Qianming^{a,b}, WANG Honglin^{a,b}, WANG Xiaoke^a, XIE Pu^a, MA Yuhua^{b,①} (Guizhou Academy of Agricultural Science; a. Guizhou Institute of Pomology Science; b. Key Laboratory of Crop Genetic Resources and Germplasm Innovation in Karst Region, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guiyang 550006, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2024, 33(2): 22-29

Abstract: To understand the effect of α -amylase in the starch degradation of *Hylocereus polyrhizus* (F. A. C. Weber) Britton et Rose fruits, the α -amylase gene *HpAMY3* in *H. polyrhizus* was cloned and the bioinformatics analysis was conducted, the activity of this enzyme and the expression of its encoding gene during fruit development were detected, meanwhile, the starch degradation activity of *HpAMY3* recombinant protein was analyzed. The results show that the length of the open reading frame of *HpAMY3* gene is 2 742 bp, encoding 913 amino acids; the theoretical relative molecular mass of *HpAMY3* protein is 102 370, and its theoretical isoelectric point is pI 6.02; it is predicted that *HpAMY3* is located in chloroplast, and it is a hydrophilic protein. The phylogenetic analysis shows that *HpAMY3* is most closely related to *AtAMY3* in *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh., and both of them belong to AMY III class. The subcellular localization experiment result shows that *HpAMY3* is localized in chloroplast of *Nicotiana*

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 贵州省农业科学院国家自然科学基金后补助项目(黔农科院国基后补助[2021]61); 国家自然科学基金项目(32060674); 贵州省科研机构创新能力建设专项(黔科合服企[2021]8号)

作者简介: 郑乾明(1985—), 男, 湖北荆门人, 博士, 副研究员, 主要从事园艺果实品质形成机制研究。

①通信作者 E-mail: m_yh79@163.com

引用格式: 郑乾明, 王红林, 王小柯, 等. 红肉火龙果 α -淀粉酶基因 *HpAMY3* 的克隆及功能鉴定[J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(2): 22-29.

benthamiana Domin leaves, indicating that *HpAMY3* has the characteristic of plastid localization. At 20 and 23 d of post-pollination, the α -amylase activities in *H. polyrhizus* fruits are relatively low; at 25 d of post-pollination, the α -amylase activity significantly ($P < 0.05$) increases; at 27 and 30 d of post-pollination, the α -amylase activities maintain at a relatively high level. At 20 and 23 d of post-pollination, the relative expressions of *HpAMY3* gene in *H. polyrhizus* fruits are relatively low; at 25 and 27 d of post-pollination, the relative expressions of *HpAMY3* gene continuously increase; at 30 d of post-pollination, the relative expression of *HpAMY3* gene slightly decreases. There is a relatively high correlation ($R^2 = 0.94$) between the α -amylase activity and the relative expression of *HpAMY3* gene during fruit development of *H. polyrhizus*. The *in vitro* starch degradation activity experiment result shows that maltose and maltotriose are detected in the reaction system containing the *HpAMY3* recombinant protein, and their contents are extremely significantly ($P < 0.01$) higher than those in the reaction system containing the vector control pDR196. It is suggested that the *HpAMY3* protein may be localized in the amyloplast of *H. polyrhizus* fruits; during fruit development, the expression of *HpAMY3* gene is up-regulated, and *HpAMY3* has starch degradation activity.

Key words: *Hylocereus polyrhizus* (F. A. C. Weber) Britton et Rose; α -amylase; fruit development; subcellular localization; yeast expression; enzyme activity

火龙果(*Hylocereus* spp.)为仙人掌科(Cactaceae)量天尺属[*Hylocereus* (A. Berger) Britton et Rose]多年生果树,主要包括白肉火龙果[*H. undatus* (Haworth) Britton et Rose]和红肉火龙果[*H. polyrhizus* (F. A. C. Weber) Britton et Rose]^[1]。近年来,火龙果在中国南方和西南地区大量种植,具有良好的经济价值和生态效益。火龙果果实含有丰富的可溶性糖、有机酸、维生素C、低聚糖、多酚和黄酮类成分^[1-2],酸甜可口,营养丰富,深受消费者喜爱。与白肉火龙果相比,红肉火龙果还含有丰富的甜菜苷色素,具有抗氧化和消炎等功效^[2]。红肉火龙果果实发育期间可溶性糖和甜菜苷色素含量快速增加,淀粉含量迅速降低^[3-4],以达到果实成熟时的风味和口感。

淀粉是植物体内非结构性糖类的主要储存形态,普遍存在于叶、根、茎、种子和果实等器官中。种子和果实等库器官中积累的淀粉来源于叶片可溶性糖输入后的再合成,在种子萌发和果实成熟时可降解为葡萄糖和麦芽糖等可溶性糖^[5]。植物体内淀粉降解主要包括磷酸化和去磷酸化、水解及跨膜转运等环节,其中,水解环节主要由 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、淀粉脱支酶和歧化酶等共同介导^[6-7]。 α -淀粉酶的作用是水解 α -1,4-糖苷键,将淀粉水解成可溶性的葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖和少量大分子极限糊精^[8]。 α -淀粉酶基因(*AMY*)参与植物的生长发育过程,如水稻(*Oryza sativa* Linn.)和谷子[*Setaria italica* var. *germanica* (Mill.) Schred.]部分*AMY*参与开花、种子萌发和籽粒成熟过程^[9-11]。一些*AMY*也参与植物抵

御逆境胁迫过程,如茶树[*Camellia sinensis* (Linn.) O. Ktze.]、甘薯[*Ipomoea batatas* (Linn.) Lamarck]和木薯(*Manihot esculenta* Crantz)若干*AMY*的表达受脱落酸、低温、盐或干旱诱导^[12-14]。

园艺作物果实发育期间积累大量淀粉,在特定阶段降解为可溶性糖,促使果实成熟时形成独特的风味、口感和品质。番茄(*Solanum lycopersicum* Linn.)和苹果(*Malus pumila* Mill.)果实在发育期间积累淀粉并于成熟前快速降解^[15-16],香蕉(*Musa acuminata* Colla)和猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)果实在采摘前仍含有大量淀粉,于采摘后快速降解为可溶性糖^[17-18]。*AMY*的表达使 α -淀粉酶活性增加,在果实淀粉降解中发挥重要作用。例如:低温处理下苹果果实 α -淀粉酶活性增加促进淀粉降解,该酶活性增加是由于1个*AMY*基因的表达受低温显著诱导^[19];芒果(*Mangifera indica* Linn.)果实采后淀粉降解伴随着*AMY*基因表达和 α -淀粉酶活性增加^[20];香蕉果实采后成熟过程中淀粉降解为可溶性糖,伴随着 α -淀粉酶活性快速升高以及多个*AMY*基因表达明显上调^[21-22]。

红肉火龙果果实与番茄和苹果类似,在发育前期会积累大量淀粉,在发育后期淀粉快速降解以促进可溶性糖的积累^[23]。Xie等^[24]对黄龙果[*Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran]果实发育多个时期开展转录组测序,获得一系列淀粉水解酶基因的转录本,结果表明*AMY*基因可能参与淀粉降解。本课题组基于红肉火龙果多组织转录组测序获得3个*AMY*基因,基因数字表达结果表明*HpAMY3*基因

可能参与果实发育期间的淀粉降解(结果未发表)。本文以 *HpAMY3* 为研究对象,对其进行克隆和生物信息学分析,并开展 *HpAMY3* 亚细胞定位、 α -淀粉酶活性、*HpAMY3* 基因表达和重组蛋白淀粉降解活性分析,以期了解红肉火龙果果实发育期间 α -淀粉酶活性变化,探讨 *HpAMY3* 基因在红肉火龙果果实发育期间淀粉降解过程中的生理功能。

1 材料和方法

1.1 材料

供试红肉火龙果果实采集自贵州省镇宁县的红肉火龙果种植园(东经 105°47'18"、北纬 25°28'09",海拔 470 m),品种为‘紫红龙’(‘Zihonglong’)。于 2020 年 8 月至 9 月,选择处于盛果期健壮、无病虫害的红肉火龙果植株,分别在授粉后(授粉当天记为 0 d)20、23、25、27 和 30 d 各采集 15 个果实,将每个时间采集的果实平均分成 3 组,视为 3 个生物学重复。将果肉切成薄片,液氮速冻后研磨成粉末,置于 -80 °C 保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆 使用 EASYspin Plus 多糖多酚/复杂植物 RNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)提取果肉总 RNA,利用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]反转录合成 cDNA。以授粉后 30 d 的果肉 cDNA 为模板,根据 *HpAMY3* 基因的转录本序列设计特异引物(正向引物序列为 5'-ATGTCTGGCGTGGCA TTCGA-3',反向引物序列为 5'-TCACAATGCTTCC CAGACCTTG-3'),使用高保真聚合酶(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)按照说明书进行 PCR 扩增;扩增产物经回收、连接和转化后挑取阳性克隆送通用生物(安徽)股份有限公司测序。

1.2.2 序列分析 使用 ORF Finder 在线程序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)预测开放阅读框(open reading frame, ORF)及其编码的氨基酸序列。使用 ExPASy 在线程序(https://web.expasy.org/compute_pi/)计算蛋白质的理论相对分子质量和理论等电点;使用在线程序 WoLF PSORT(<https://wolfsort.hgc.jp/>)、ProtComp 9.0(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc>)和 Plant-PLoc(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant/>)

预测蛋白质的亚细胞定位;使用 ProtParam 在线程序(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质的亲水性;使用 HMMER 在线程序(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>)预测蛋白质结构域;使用 Clustal W 软件进行氨基酸序列多重比对;使用 MEGA7.0 软件,采用 Neighbor-joining 法构建系统进化树,Bootstrap 值检验设置为 1 000 次重复。

1.2.3 亚细胞定位 去除 *HpAMY3* 基因 ORF 序列的终止密码子,使用特异性引物(正向引物序列为 5'-AACACGGGGGACGAGCTCGGTACCATGTCTGGCGTGCAT-3',反向引物序列为 5'-CTTGCTCACCATGTCGACTCTAGACAATGCTTCCCAGACCTT-3')和高保真聚合酶按照说明书进行 PCR 扩增。使用 ClonExpress® II One Step 克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),将 PCR 扩增产物插入线性化 1300-GFP 载体的多克隆位点。重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 TOP10,挑选阳性克隆送通用生物(安徽)股份有限公司测序。将构建的融合表达载体(*HpAMY3*-GFP)和空载体(1300-GFP)分别转化至根癌农杆菌菌株 GV3101,挑选阳性单克隆于 28 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值约 1.0;将根癌农杆菌注射至株龄 4~5 周的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana* Domin)叶片下表皮^[25]。在注射后 3 d,利用 LSM510 激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司)观察叶片中的荧光信号。

1.2.4 淀粉提取和 α -淀粉酶活性检测 参考文献[3]中的方法提取红肉火龙果果实淀粉。以授粉后 20 d 的红肉火龙果果肉为材料,称取约 1 g 粉末,加入 10 mL 体积分数 80% 乙醇溶液,80 °C 水浴 30 min 提取可溶性糖,过滤后收集残渣,重复操作 2 次,加入 20 mL 90 °C 蒸馏水,加热糊化 15 min,置于 -80 °C 保存、备用。使用 α -淀粉酶测试盒(苏州科铭生物技术有限公司)检测授粉后不同时间果肉中的 α -淀粉酶活性。

1.2.5 基因表达分析 使用 Primer Premier 5.0 软件设计 *HpAMY3* 基因荧光定量 PCR 特异性引物(正向引物序列为 5'-GCCCAACAAATCTCTCTCTGT-3',反向引物序列为 5'-CTGGAACGTCTCGCTGTAAAT-3'),在红肉火龙果基因组数据库(<http://pitayagenomic.com/>)进行 Blastn 检索,确保特异性扩增。使用 2×SYBR Green Fast qPCR Mix 试剂(北京百迈客生物技术有限公司)在荧光定量 PCR 仪(美国

Bio-Rad 公司)上进行基因表达定量检测。反应体系总体积为 10.0 μL , 包含 cDNA 模板 0.5 μL , SYBR Mix 5.0 μL , 正向、反向引物各 0.2 μL , 无菌水 4.1 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火并延伸 30 s, 共 40 个循环。内参基因为 β -ACT(正向引物序列为 5'-CTTCCATACCAATGAATGAGG-3', 反向引物序列为 5'-AACCGCCAAGAGTAGTTCTG-3')。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算相对表达量。

1.2.6 HpAMY3 体外淀粉降解活性检测

1.2.6.1 HpAMY3 在酵母中的表达及总蛋白质提取 使用特异性引物(正向引物序列为 5'-TGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCATGTCTGGCGTGGCAT-3', 反向引物序列为 5'-TTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAGTCACAATGCTTCCCAGA-3') 和高保真聚合酶按照说明书扩增 HpAMY3 基因的 ORF 序列, 扩增产物插入双酶切线性化的酵母表达载体 pDR196, 经测序确认后, 利用酵母转化试剂盒(北京酷来博科技有限公司)将融合表达载体 pDR196-HpAMY3 和载体对照 pDR196 分别转化至酿酒酵母菌株 W303a(W303-1A)。酵母阳性单克隆在 SC/-Ura 液体培养基中 30 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6~1.0, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集沉淀, 使用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)清洗 2 次; 利用玻璃珠涡流破碎酵母细胞壁, 加入磷酸盐缓冲液(pH 7.0)溶解; 采用 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定酵母总蛋白质含量。

1.2.6.2 HpAMY3 淀粉降解活性检测 反应体系总体积为 200 μL , 含有 50 μL 红肉火龙果果实糊化淀粉溶液(约 50 μg 淀粉)、130 μL 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)和 20 μL 酵母总蛋白质溶液(约 4 μg 蛋白质)。待测液于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h 后, 于 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min 以终止反应, 于室温下 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 吸取上清液, 利用 Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)检测反应产物, 色谱柱为 Zorbax Carbohydrate 糖分析柱(美国 Agilent 公司), 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为体积分数 70% 乙腈溶液, 流速为 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测器为示差折光检测器, 检测温度为 35 $^{\circ}\text{C}$; 分别以质谱纯级的葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖和麦芽四糖(北京索莱宝科技有限公司, 纯度均大于或等于 98%) 为标准品确定保留时间, 计算峰面积与不同糖含量的相关性, 获得一元线性回归方程, 从而计算反应产物的含量。

2 结果和分析

2.1 HpAMY3 基因克隆及生物信息学分析

HpAMY3 基因的 ORF 长度为 2 742 bp, 编码 913 个氨基酸。预测 HpAMY3 蛋白的理论相对分子质量为 102 370, 理论等电点为 pI 6.02。3 种程序预测的亚细胞定位结果均表明 HpAMY3 位于叶绿体。HpAMY3 的总平均亲水性系数为 -0.465, 表明其为亲水性蛋白。

2.2 氨基酸序列比对和系统进化分析

将预测的红肉火龙果 HpAMY3 氨基酸序列与拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] AtAMY1、AtAMY2 和 AtAMY3(拟南芥数据库登录号分别为 AT4G25000、AT1G76130、AT1G69830) 氨基酸序列进行比对, 结果(图 1)显示: HpAMY3 与 AtAMY3 的序列一致性最高, 达 64.21%, 与 AtAMY2 和 AtAMY1 的序列一致性分别为 47.45% 和 46.02%。HpAMY3 与 AtAMY1、AtAMY2 和 AtAMY3 具有相同的结构域, 此外, HpAMY3 与 AtAMY3 均具有较长的 N 端。HpAMY3 含有 α -淀粉酶的催化结构域(Alpha-amylase, PF00128.27), 位于氨基酸序列的 542~834 位; 该结构域中还含有 4 个保守的氨基酸区域, 分别为 R1(DVVLNHR)、R2(GWRLDFVRG)、R3(FAVGE)和 R4(FIENHD); HpAMY3 的 C 端还含有 α -淀粉酶 C 末端的 β -折叠结构域(Alpha-amyl_C2, PF07821.15), 位于氨基酸序列的 853~911 位。

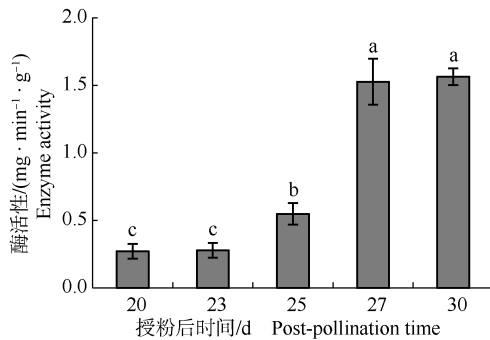
将红肉火龙果 HpAMY3 与另 4 个物种的 AMY 成员进行基于氨基酸序列的系统进化分析, 结果(图 2)显示: 红肉火龙果 HpAMY3 与拟南芥 AtAMY3 亲缘关系最近, 与木薯 MeAMY1.1、MeAMY2.1, 番茄 Solyc05g007070 和茶树 CsAMY3 亲缘关系较近, 以上 AMY 蛋白与番茄 Solyc04g082090 同属于 AMY III 类。

2.3 HpAMY3 的亚细胞定位

红肉火龙果 HpAMY3 在本氏烟草叶片表达的荧光显微观察结果(图 3)显示: 对照(1300-GFP)的绿色荧光分布在细胞质、细胞核和细胞膜上, 与叶绿体红色自发荧光未有明显重叠; 融合 HpAMY3 蛋白后的 GFP 绿色荧光在本氏烟草叶片中呈现点状分布, 与叶绿体红色自发荧光几乎完全重叠, 呈现明显的黄色荧光。说明 HpAMY3 在本氏烟草叶片中定位于叶绿体。

红肉火龙果果实发育期间 α -淀粉酶活性检测结果(图4)显示:授粉后 20 和 23 d, α -淀粉酶活性较低

且基本一致;授粉后 25 d, α -淀粉酶活性显著 ($P < 0.05$) 升高;授粉后 27 d, α -淀粉酶活性大幅升高, 授粉后 30 d (果实成熟) α -淀粉酶活性与授粉后 27 d 基本一致。

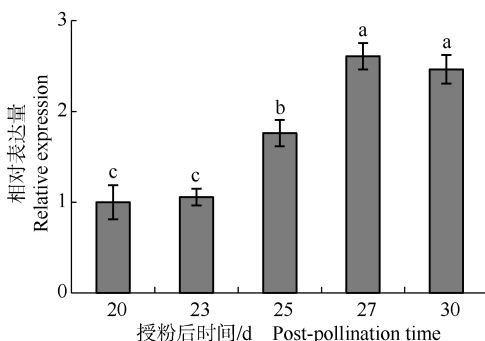


不同小写字母表示在不同授粉后时间间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different post-pollination times.

图 4 红肉火龙果果实发育期间 α -淀粉酶活性变化
Fig. 4 Change of α -amylase activity during fruit development of *Hylocereus polyrhizus* (F. A. C. Weber) Britton et Rose

2.5 *HpAMY3* 基因表达分析

红肉火龙果果实发育期间 *HpAMY3* 表达分析结果(图 5)显示:授粉后 20 和 23 d, *HpAMY3* 的相对表达量较低且基本一致;授粉后 25 d, *HpAMY3* 的相对表达量显著 ($P < 0.05$) 升高;授粉后 27 d, *HpAMY3* 的相对表达量最高, 授粉后 30 d, *HpAMY3* 的相对表达量略有降低, 但与授粉后 27 d 差异不显著。



不同小写字母表示在不同授粉后时间间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different post-pollination times.

图 5 红肉火龙果果实发育期间 *HpAMY3* 基因表达变化
Fig. 5 Change of *HpAMY3* gene expression during fruit development of *Hylocereus polyrhizus* (F. A. C. Weber) Britton et Rose

HpAMY3 基因相对表达量与 α -淀粉酶活性间的相关性分析结果显示:二者相关性较高 ($R^2 = 0.94$), 推测 *HpAMY3* 基因表达对果实发育期间的 α -淀粉酶活性具有较大影响。

2.6 *HpAMY3* 重组蛋白的体外淀粉降解活性

结果(图 6)显示:含有 *HpAMY3* 重组蛋白或载体对照 pDR196 的反应体系中均检测到麦芽糖, 但含有 *HpAMY3* 重组蛋白的反应体系中的麦芽糖含量极显著 ($P < 0.01$) 高于含有载体对照 pDR196 的反应体系, 且在含有 *HpAMY3* 重组蛋白反应体系中检测到麦芽三糖, 而含有载体对照 pDR196 的反应体系中无麦芽三糖。以上结果表明 *HpAMY3* 重组蛋白具有将淀粉降解为二糖和三糖等低聚合度糖的活性。

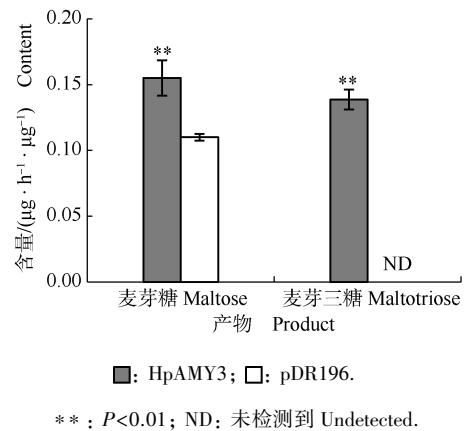


图 6 红肉火龙果 *HpAMY3* 重组蛋白的淀粉降解活性
Fig. 6 Starch degradation activity of *HpAMY3* recombinant protein of *Hylocereus polyrhizus* (F. A. C. Weber) Britton et Rose

3 讨论和结论

红肉火龙果果实发育期间 α -淀粉酶活性快速升高, 与芒果和香蕉类似^[20-21], 说明 α -淀粉酶在淀粉降解中具有重要功能。本研究基于果实转录组测序和 RT-PCR 克隆获得红肉火龙果编码 α -淀粉酶的候选基因 *HpAMY3*, *HpAMY3* 蛋白含有 α -淀粉酶的催化结构域和 C 末端的 β -折叠结构域, 推测 *HpAMY3* 是 AMY 家族成员。以拟南芥 *AtAMY1*、*AtAMY2*、*AtAMY3* 为代表, 双子叶植物 AMY 家族分为 AMY I、II 和 III 类^[26]。系统进化分析表明: *HpAMY3* 属于 AMY III 类, 且与拟南芥、茶树和木薯 AMY III 类成员的氨基酸数量和理论相对分子质量基本一致^[12, 14]。有研究表明: 香蕉 *MaAMY12* 和猕猴桃 *AdAMY3* 属于

AMY Ⅲ类成员,其编码基因均随果实后熟和淀粉降解呈上调表达趋势^[26-27]。另有研究表明:香蕉 MaAMY3 蛋白结合在淀粉体表面,其基因和蛋白的表达量均随淀粉降解明显上调^[22]。由此可见,AMY Ⅲ类成员在果实中的表达模式与淀粉含量变化呈负相关关系,推测其参与淀粉降解。*HpAMY3* 的表达模式与上述基因类似,并与 α -淀粉酶活性具有较高的相关性,推测该基因在红肉火龙果果实发育期间上调表达以促进淀粉降解。

亚细胞定位预测和实验验证均证明 AMY Ⅲ类成员与 I 类和 II 类成员的亚细胞定位存在明显差异^[12,14,28-30]。例如:AMY I 类成员拟南芥 *AtAMY1* 和茶树 *CsAMY1* 均含有信号肽,经实验验证 *AtAMY1* 定位于细胞外^[12,28];AMY II 类成员不含有信号肽,定位尚不清楚,目前仅报道马铃薯 (*Solanum tuberosum* Linn.) *StAMY23* 定位于细胞质^[29]。AMY Ⅲ类成员如拟南芥 *AtAMY3* 和茶树 *CsAMY3* 均含有信号肽^[12,30],可能定位于叶绿体等质体,经实验验证表明 *AtAMY3* 定位于叶绿体^[30]。红肉火龙果 *HpAMY3* 在本氏烟草叶片中的瞬时表达结果证明其定位于叶绿体,与拟南芥 *AtAMY3* 同样具有质体定位的特点^[30]。香蕉和火龙果等果实含有的质体类型通常为淀粉体^[3,22]。类似于香蕉 MaAMY3 蛋白结合在淀粉体表面^[22],红肉火龙果 *HpAMY3* 可能也结合于红肉火龙果果实的淀粉体。

研究结果表明: α -淀粉酶家族氨基酸序列的一级结构具有 4 个保守区域,包含催化位点和底物结合位点,共同决定 α -淀粉酶活性^[13,31]。红肉火龙果 *HpAMY3* 氨基酸序列含有上述 α -淀粉酶家族的 4 个保守区域,推测其可能具有 α -淀粉酶的催化活性,但仍需要进一步实验验证。目前针对 AMY 开展的异源表达和酶催化活性检测较少,仅报道了香蕉 AMY 家族 1 个成员和拟南芥 *AtAMY3*^[30,32]。Junior 等^[32]从香蕉果实中分离获得 AMY 家族成员 MAmy,其氨基酸数量和理论相对分子质量均远小于 *HpAMY3*,推测其并不属于 AMY Ⅲ类;通过毕赤酵母表达获得香蕉 MAmy 的重组蛋白,以提取自马铃薯的可溶性淀粉为底物,检测到该重组蛋白的淀粉降解活性。Seung 等^[30]通过大肠杆菌表达获得拟南芥 *AtAMY3* 重组蛋白,作用于拟南芥叶片中的淀粉颗粒可释放出低聚合度的线状和支链葡聚糖。利用酿酒酵母表达获得重组蛋白并离体检测酶催化活性,也是检测植物代谢酶

的常见策略^[33-34]。本研究获得基于酿酒酵母表达的 *HpAMY3* 重组蛋白,使用红肉火龙果果实淀粉为底物,检测到 *HpAMY3* 重组蛋白的淀粉降解活性。*HpAMY3* 重组蛋白催化淀粉降解产生麦芽糖和麦芽三糖,其产物的聚合度分别为 2 和 3,与 *AtAMY3* 催化产生线状和支链葡聚糖(聚合度为 3~5)类似^[30]。因此,*HpAMY3* 在红肉火龙果果实发育期间可催化淀粉降解为麦芽糖和麦芽三糖。

综合上述研究结果,*HpAMY3* 可能定位于红肉火龙果果实的淀粉体,具有将淀粉降解为麦芽糖和麦芽三糖的活性。*HpAMY3* 在红肉火龙果果实发育期间的表达快速上调可促进 α -淀粉酶活性的快速升高,参与果实发育期间的淀粉降解过程。

参考文献:

- [1] SHAH K, CHEN J Y, QIN Y H, et al. Pitaya nutrition, biology, and biotechnology: a review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(18): 13986.
- [2] SUH D H, LEE S, HEO D Y, et al. Metabolite profiling of red and white pitayas (*Hylocereus polyrhizus* and *Hylocereus undatus*) for comparing betalain biosynthesis and antioxidant activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(34): 8764-8771.
- [3] HUA Q Z, CHEN C B, ZUR N T, et al. Metabolomic characterization of pitaya fruit from three red-skinned cultivars with different pulp colors[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2018, 126: 117-125.
- [4] WU Y W, XU J, HE Y Z, et al. Metabolic profiling of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) during fruit development and maturation[J]. Molecules, 2019, 24(6): 1114.
- [5] STANLEY D, FARNDEN K J F, MACRAE E A. Plant α -amylases: functions and roles in carbohydrate metabolism[J]. Biologia-Section Cellular and Molecular Biology, 2005, 16: 65-71.
- [6] LLOYD J R, KOSSMANN J, RITTE G. Leaf starch degradation comes out of the shadows[J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(3): 130-137.
- [7] ZEEMAN S C, KOSSMANN J, SMITH A M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 209-234.
- [8] SAUER J, SIGURSKJOLD B W, SVEBSSON B, et al. Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, 1543(2): 275-293.
- [9] DAMARIS R N, LIN Z Y, YANG P F, et al. The rice alpha-amylase, conserved regulator of seed maturation and germination[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(2): 450.
- [10] 张 绩,周上铃,何 发,等. 水稻 α -淀粉酶基因的表达模式

- 与颖花开放的关系[J]. 中国农业科学, 2023, 56(7): 1275–1282.
- [11] 马荣博, 杨宇球, 张丽玲, 等. 谷子 α -淀粉酶家族基因的全基因组鉴定与表达分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2022, 42(6): 66–71.
- [12] YUE C, CAO H L, LIN H Z, et al. Expression patterns of alpha-amylase and beta-amylase genes provide insights into the molecular mechanisms underlying the responses of tea plants (*Camellia sinensis*) to stress and postharvest processing treatments [J]. *Planta*, 2019, 250(1): 281–298.
- [13] 黄小芳, 毕楚韵, 林世强, 等. 甘薯 α -淀粉酶基因的全基因组鉴定和分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(24): 8035–8042.
- [14] YANG T Y, LI H R, LI L W, et al. Genome-wide characterization and expression analysis of α -amylase and β -amylase genes underlying drought tolerance in cassava [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24: 190.
- [15] LUENGWILAI K, BECKLES D M. Starch granules in tomato fruit show a complex pattern of degradation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(18): 8480–8487.
- [16] LI M J, FENG F J, CHENG L L. Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e33055.
- [17] GARCIA E, LAJOLO F M. Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior [J]. *Journal of Food Science*, 1988, 53(4): 1181–1186.
- [18] RICHARDSON A C, BOLDINGH H L, MCATEE P A, et al. Fruit development of the diploid kiwifruit, *Actinidia chinensis* ‘Hort16A’ [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 182.
- [19] WEGRZYŃ T, REILLY K, CIPRIANI G, et al. A novel α -amylase gene is transiently up-regulated during low temperature exposure in apple fruit [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(5): 1313–1322.
- [20] PERONI F H G, KOIKE C, LOURO R P, et al. Mango starch degradation. II. The binding of α -amylase and β -amylase to the starch granule [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(16): 7416–7421.
- [21] 黄俊豪, 段承煜, 邓英毅, 等. 6个香蕉品种果实后熟过程中品质的变化规律比较[J]. 热带作物学报, 2021, 42(10): 2993–3000.
- [22] XIAO Y Y, KUANG J F, QI X N, et al. A comprehensive investigation of starch degradation process and identification of a transcriptional activator MabHLH6 during banana fruit ripening [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 151–164.
- [23] 孙佩光, 程志号, 孙长君, 等. 火龙果果实发育过程中淀粉与可溶性糖含量变化及其相关性分析[J]. 中国果树, 2022, 227(9): 51–54.
- [24] XIE F F, CHEN C B, CHEN J X, et al. Metabolic profiling of sugars and organic acids, and expression analyses of metabolism-associated genes in two yellow-peel pitaya species [J]. *Plants*, 2022, 11(5): 694.
- [25] CHENG J T, WEN S Y, XIAO S, et al. Overexpression of the tonoplast sugar transporter CmTST2 in melon fruit increases sugar accumulation [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(3): 511–523.
- [26] JOURDA C, CARDI C, GIBERT O, et al. Lineage-specific evolutionary histories and regulation of major starch metabolism genes during banana ripening [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1778.
- [27] HU X, KUANG S, ZHANG A D, et al. Characterization of starch degradation related genes in postharvest kiwifruit [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(12): 2112.
- [28] DOYLE E A, LANE A M, SIDES J M, et al. An α -amylase (At4g25000) in *Arabidopsis* leaves is secreted and induced by biotic and abiotic stress [J]. *Plant Cell and Environment*, 2007, 30(4): 388–398.
- [29] HOU J, ZHANG H L, LIU J, et al. Amylases StAmy23, StBAM1 and StBAM9 regulate cold-induced sweetening of potato tubers in distinct ways [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(9): 2317–2331.
- [30] SEUNG D, THALMANN M, SPARLA F, et al. *Arabidopsis thaliana* AMY3 is a unique redox-regulated chloroplastic α -amylase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(47): 33620–33633.
- [31] KURIKI T, IMANAKA T. The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87(5): 557–565.
- [32] JUNIOR A V, DO NASCIMENTO J R O, LAJOLO F M. Molecular cloning and characterization of an α -amylase occurring in the pulp of ripening bananas and its expression in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(21): 8222–8228.
- [33] LIU J, HAN L N, HUAI B Y, et al. Down-regulation of a wheat alkaline/neutral invertase correlates with reduced host susceptibility to wheat stripe rust caused by *Puccinia striiformis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(22): 7325–7338.
- [34] SHEN L B, QIN Y L, QI Z Q, et al. Genome-wide analysis, expression profile, and characterization of the acid invertase gene family in pepper [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(1): 15.

(责任编辑: 吴蕊夷)