

丝瓜果实发育过程的蛋白质差异表达分析

陈敏氢 王彬 朱海生* 李永平 刘建汀 温庆放*

(福建省农业科学院作物研究所, 福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要 丝瓜果实发育过程伴随着明显的形态转变和复杂的生理生化变化, 这些变化均影响着果实的采后寿命和品质。为阐明丝瓜果实发育过程中重要蛋白质的功能与调控作用, 该研究以同位素标记相对定量联合液相色谱串联质谱(iTRAQ-LC-MS/MS)技术测定丝瓜果实发育过程三个时期(花后5天、花后15天、花后30天)蛋白的表达水平, 鉴定差异蛋白, 并对它们进行亚细胞定位、GO(gene ontology)和KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)途径分析。共鉴定到差异蛋白709个, 其中在丝瓜果实不同发育时期共同存在的差异蛋白有229个, 上调蛋白有118个, 下调蛋白有111个。亚细胞定位显示, 差异蛋白的亚细胞主要定位于叶绿体、细胞质和细胞核。GO分析发现, 四吡咯结合、过氧化物酶活性、氧化还原酶活性、血红素结合和抗氧化活性是差异蛋白5种主要的分子功能, 过氧化氢代谢过程、应激反应和防御反应是差异蛋白3种主要参与的生物过程。代谢途径分析显示, 丝瓜果实发育过程的差异蛋白主要富集在3个代谢途径, 分别为次生代谢产物生物合成、糖代谢和DNA复制途径, 从中筛选出36个在丝瓜果实发育过程发挥重要作用的目标差异蛋白。其中, PAL、C4H、4-CL、COMT和CAD可能是调控果实内酚类物质和木质素合成的5种关键蛋白。PAL、POD、PPO、CAT、APX 5种差异蛋白可能协同参与果实发育后期的酶促褐变。SS和 α -AL可能在丝瓜果实蔗糖的累积和淀粉的降解过程中起着重要作用。以上研究结果为进一步阐明丝瓜的发育调控, 进而指导丝瓜品种选育和生产栽培提供了理论支持。

关键词 丝瓜; 果实发育; iTRAQ-LC-MS/MS; 蛋白组学; 蛋白功能

Proteomic Analysis of Differentially Expressed Proteins in *Luffa cylindrica* During Fruit Development

Chen Mindong, Wang Bin, Zhu Haisheng*, Li Yongping, Liu Jianting, Wen Qingfang*

(Crops Research Institute, Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China)

Abstract The fruit development of *Luffa cylindrica* is accompanied by obvious morphological transitions and complex physiological and biochemical changes, which all affect the fruit postharvest life and quality. To explore the function and regulation of important proteins during the fruit development of *Luffa cylindrica*, the

收稿日期: 2018-08-03 接受日期: 2018-09-13

福建省自然科学基金(批准号: 2017J01062)、福建省农业科学院蔬菜科技创新团队项目(批准号: STIT2017-1-2)、福建省农科院“青年科技英才百人计划”(批准号: YC2017-5)、国家大宗蔬菜产业技术体系福州综合试验站(批准号: CARS-23-G-53)、福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2018R1026-5)和福建省农业科学院科技创新项目(批准号: PC2017-7)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-87572110, E-mail: zhs0246@163.com; fjvrc@163.com

Received: August 3, 2018

Accepted: September 13, 2018

This work was supported by Fujian Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2017J01062), Fujian Academy of Agricultural Sciences Project of Vegetable Science and Technology Innovation Team (Grant No.STIT2017-1-2), Fujian Academy of Agricultural Sciences Hundreds of Young People in Science and Technology (Grant No.YC2017-5), the National Comprehensive Vegetable Industry Technology System Fuzhou Comprehensive Experimental Station (Grant No.CARS-23-G-53), Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2018R1026-5) and Science and Technology Innovation Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.PC2017-7)

*Corresponding authors. Tel: +86-591-87572110, E-mail: zhs0246@163.com; fjvrc@163.com

网络出版时间: 2018-10-23 17:59:20

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181023.1759.002.html>

protein expression level of three different fruit development stages (5 days after flowering, 15 days after flowering and 30 days after flowering) was determined by using isobaric tag for relative and absolute quantification-liquid chromatograph-mass spectrometer (iTRAQ-LC-MS/MS) methods, and the differentially expressed proteins were identified, then the subcellular localization, GO (gene ontology) and KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) pathway of them were analyzed. A total of 709 proteins significantly differentially expressed were detected, among them, 209 proteins were coexisting in different fruit development stages, of which 118 proteins were up-regulated and 111 were down-regulated. The results of subcellular localization showed that the differentially expressed proteins were mainly localized in the chloroplast, cytoplasm and nucleus. GO analysis founded that tetrapyrrole binding, peroxidase activity, oxidoreductase activity, heme binding and antioxidant activity were the five main molecular functions of differential proteins, and hydrogen peroxide metabolism, stress response and defense response are the three main biological processes involved in differential proteins. KEGG pathway analysis showed that the differential proteins were mainly enriched in three metabolic pathways, which were biosynthesis of secondary metabolites, sugar metabolism and DNA replication, respectively. In this study, 36 target differentially expressed proteins were screened, which might play an important role in the fruit development of *Luffa cylindrica*. Among them, PAL, C4H, 4-CL, COMT and CAD were the key proteins to regulate the phenolics and lignin biosynthesis in fruits. PAL, POD, PPO, CAT and APX were involved in enzymatic browning during the later development stage of fruit. SS and α -AL played an important role in sucrose accumulation and starch degradation of *Luffa cylindrica* fruit. The above results will help to further clarify the regulation of *Luffa cylindrica* fruit development, and provide theoretical support for guiding the selection and cultivation of *Luffa cylindrica*.

Keywords *Luffa cylindrica*; fruit development; iTRAQ-LC-MS/MS; proteomics; protein function

丝瓜(*Luffa cylindrica*)是葫芦科丝瓜属一年生攀援植物, 营养丰富且兼具医疗保健功能^[1]。生产上, 丝瓜适应性、抗病性强, 高产, 耐高温栽培, 是我国高温季节市场主要供应蔬菜之一。丝瓜果实发育呈S曲线型, 可分为生长前期(花后6天)、生长中期(花后6~24天)和生长后期(花后24~55天)三个时期^[2]。在丝瓜果实发育过程中伴随着明显的形态转变和复杂的生理生化变化, 包括果实的伸长、增粗、纤维化以及多糖、木质素、酚类、黄酮类的合成等, 这些变化均影响着果实的采后寿命和品质^[3]。目前, 相对于基因组学, 蛋白质组学对生命现象的诠释更直接、更准确。近年来, 蛋白质组学技术已在番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)、葡萄(*Vitis vinifera* L.)、草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)、荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)和香蕉(*Musa nana* Lour.)等多种果实发育过程研究中得到应用, 为阐明果实发育机制提供了许多有用的线索^[4]。因此, 有必要在蛋白质组学水平上研究丝瓜果实发育过程重要蛋白质的功能及其潜在的调控作用。以往的研究表明, 丝瓜果实发育过程受相关酶活性的调控。朱海英等^[5]的

研究证实, 过氧化物酶(peroxidase, POD)参与丝瓜果实木质化进程, 苯丙氨酸解氨酶(phenylalaninammonialyase, PAL)和肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)是丝瓜果实发育过程中导管分子分化的标志酶; 王隆华等^[6-7]随后发现, 4-香豆酸辅酶A酶(4-coumarate coenzyme A ligase, 4-CL)活性也与丝瓜发育过程木质素的合成和导管分子分化相关, 并且其热稳定性有利于丝瓜果实在8~9月高温季节迅速成熟并木质化。此外, 丝瓜果实在发育后期果肉组织易发生褐变, 而褐变的产生与多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶(POD)及苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性密切相关^[8-12]。目前对于丝瓜果实发育的研究还是主要集中在生理指标的测定上, 对于更深层次的分子遗传机制及蛋白质组学的研究几乎是空白的^[3,13]。因此, 丝瓜发育调控方面还有很多内容需要探索。

同位素标记相对定量和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)技术是近年来新开发的一种蛋白质组学定量技术, 它利用同位素标签标记多肽结合液相色谱串联质谱

(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS/MS)分析的方法, 实现多达8种不同样品中蛋白质的定性定量, 具有良好的重复性、可信性及敏感性, 广泛应用于医学、药学、食品科学及微生物学等诸多领域^[14-17]。相对于以往凝胶双向电泳技术, iTRAQ技术更具优势, 表现为检测的蛋白范围更广, 并且可进行多个时间点、细胞周期、细胞信号传导整个过程蛋白质组的动态监测^[18]。目前, 国内外未见利用iTRAQ技术研究丝瓜果实发育过程的报道。本研究将利用iTRAQ-LC-MS/MS技术分析丝瓜生长发育过程中蛋白的表达水平, 鉴定差异蛋白并预测蛋白功能, 进而阐明这些重要蛋白质在丝瓜生长发育过程中的调控作用, 这对丝瓜品种选育和生产栽培具有一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 试材与取样

供试丝瓜品种‘福丝3号’种植于福建省农科院作物研究所福清东张基地, 田间常规管理, 营养生长期肥水供应充足, 及时预防病虫害, 开花期进行人工授粉。在花后5天、15天、30天分别取3个大小均等的丝瓜果实作为生物学重复, 取果实中部并切除果皮, 用锡箔纸裹住后置液氮速冻, 于-80℃冰箱保存。

1.2 蛋白提取

称取适量组织样品至液氮预冷的研钵中, 加液氮充分研磨至粉末。各组样品分别加入粉末4倍体积裂解缓冲液(8 mol/L尿素, 1% TritonX-100, 10 mmol/L二硫苏糖醇, 1%蛋白酶抑制剂), 超声裂解。4℃, 20 000 ×g离心10 min, 取上清并加入终浓度为20%的三氯乙酸, 4℃静置2 h。4℃, 12 000 ×g离心3 min, 弃上清, 沉淀用预冷的丙酮洗涤3次。最后沉淀用8 mol/L尿素复溶, 利用BCA试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)进行蛋白浓度测定。

1.3 iTRAQ标记

蛋白溶液中加入二硫苏糖醇, 使其终浓度为5 mmol/L, 56℃还原30 min, 之后加入碘代乙酰胺, 使其终浓度为11 mmol/L, 室温避光孵育15 min, 最后将样品的尿素浓度稀释至低于2 mol/L。以1:50的质量比例(胰酶:蛋白)加入胰酶, 37℃酶解过夜。再以1:100的质量比例(胰酶:蛋白)加入胰酶, 继续酶解4 h。胰酶酶解的肽段用Strata X C18(美国Phenomenex公

司)除盐后真空冷冻干燥。以0.5 mol/L TEAB溶解肽段, 根据iTRAQ4plex试剂盒(美国Applied Biosystems公司)操作说明标记肽段。简单操作如下: 标记试剂解冻后用乙腈溶解, 与肽段混合后室温孵育2 h, 标记后的肽段混合后除盐, 真空冷冻干燥。

1.4 HPLC分级

将混合肽段用高pH反向HPLC分级, 色谱柱为Agilent 300 Extend C18(5 μm粒径, 4.6 mm内径, 250 mm长)。操作如下: 肽段分级梯度为8%~32%乙腈、pH9, 60 min分离60个组分, 随后肽段合并为9个组分, 合并后的组分经真空冷冻干燥后进行后续操作。

1.5 液相色谱-质谱联用分析

将肽段用液相色谱流动相A[0.1%(v/v)甲酸水溶液]溶解后使用EASY-nLC 1000(美国Thermo Fisher Scientific公司)超高效液相系统进行分离。流动相A为含0.1%甲酸和2%乙腈的水溶液; 流动相B为含0.1%甲酸和90%乙腈的水溶液。液相梯度设置: 0~26 min, 9%~24% B; 26~34 min, 24%~36% B; 34~37 min, 36%~80% B; 37~40 min, 80% B; 流速维持在400 nL/min。

肽段经由超高效液相系统分离后被注入NSI离子源中进行电离, 然后利用Q Exactive™(美国ThermoFisher Scientific公司)质谱进行分析。离子源电压设置为2.1 kV, 肽段母离子及其二级碎片都使用高分辨的Orbitrap进行检测和分析。一级质谱扫描范围设置为350~1 800 m/z, 扫描分辨率设置为70 000; 二级质谱扫描范围则固定起点为100 m/z, 扫描分辨率设置为17 500。数据采集模式使用数据依赖型扫描(DDA)程序, 即在一级扫描后选择信号强度最高的前20肽段母离子依次进入HCD碰撞池, 使用31%的碎裂能量进行碎裂, 同样依次进行二级质谱分析。为了提高质谱的有效利用率, 自动增益控制(AGC)设置为5E4, 信号阈值设置为10 000 ions/s, 最大注入时间设置为200 ms, 串联质谱扫描的动态排除时间设置为30 s, 避免母离子的重复扫描。

1.6 蛋白质鉴定及相对定量

二级质谱数据使用Maxquant(v1.5.2.8)进行检索。检索参数设置: 数据库为丝瓜转录组库(34 739条序列); 酶切方式设置为Trypsin/P; 漏切位点数设为2; 肽段最小长度设置为7个氨基酸残基; 肽段最大修饰数设为5; First search和Main search的一级母离子质量误差容忍度分别设为20 ppm和5 ppm, 二级碎

片离子的质量误差容忍度为0.02 Da。将半胱氨酸烷基化设置为固定修饰, 可变修饰为甲硫氨酸的氧化, 蛋白N-端的乙酰化。定量方法设置为iTRAQ4plex, 蛋白鉴定、PSM鉴定的FDR都设置为1%。在每一个生物学重复中以花后第5天的果肉样品为参考, 将后续的花后15天和30天两个时期的样品分别与之比对。以3次生物学重复的平均值作为最终蛋白表达倍率, 以1.3倍为变化阈值定义平均相对表达水平上调或下调的蛋白, 并且在 t 检验上以 $P<0.05$ 的蛋白为显著差异表达的蛋白。

1.7 生物信息学分析

将鉴定及量化的差异蛋白进行亚细胞定位分析, 按照生物过程(biological process)、分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component)进行GO分析和GO富集分析, 随后对这些蛋白进行KEGG途径富集分析。

2 结果

2.1 差异蛋白统计结果

利用iTRAQ-LC-MS/MS技术在丝瓜生长发育3个时期(花后5天、花后15天、花后30天)果实样品中共鉴定到5 864个蛋白质, 其中4 953个蛋白质具有定

量信息。以花后第5天的样品蛋白量为参考, 以差异倍数数值变化超过1.3倍作为显著上调、小于1/1.3作为显著下调的变化标准, 对花后15天和花后30天2个时期的差异蛋白进行统计。共鉴定到差异蛋白709个, 其中在丝瓜果实不同发育时期共同存在的差异蛋白有229个, 上调蛋白118个, 下调蛋白111个。花后15天有357个蛋白差异表达, 185个蛋白表达上调, 172个蛋白表达下调; 花后30天有581个蛋白差异表达, 300个蛋白表达上调, 281个蛋白表达下调(表1)。

2.2 差异蛋白的亚细胞定位

利用wolfpsort软件对于差异表达蛋白进行了亚细胞结构的预测和分类统计。如图1所示, 丝瓜果实发育过程差异表达蛋白的亚细胞定位于多个位置, 包括细胞质、细胞核、叶绿体、质膜、液泡膜、线粒体、内质网等, 其中叶绿体、细胞质和细胞核定位的差异蛋白较多, 花后15天有更多细胞核定位的差异蛋白, 而花后30天有更多细胞质定位的差异蛋白。

2.3 差异蛋白的GO注释

对差异蛋白质的细胞组分、分子功能和生物过程进行分析(图2)。结果表明, 差异蛋白主要的细胞组分共有7个, 花后15天和花后30天两个时期共同存在的有6个, 均以细胞中的蛋白居多; 差异蛋白具备

表1 不同时期差异表达蛋白个数

Table 1 Number of differential expressed proteins in different periods

差异蛋白 Differential protein	样品时期 Sample stage	
	B/A	C/A
Up-regulation (>1.3)	185	300
Down-regulation (<1/1.3)	172	281
Total	357	581

A: 花后5天; B: 花后15天; C: 花后30天。下同。

A: 5 days after flowering; B: 15 days after flowering; C: 30 days after flowering. The same as below.

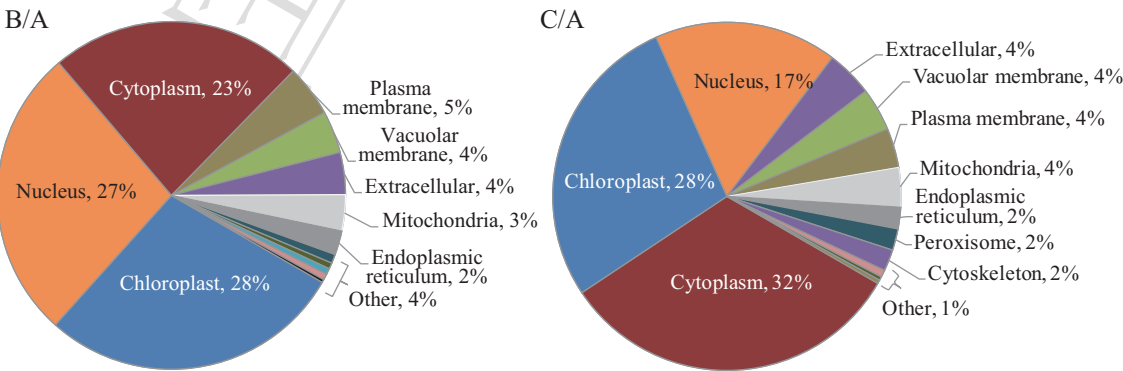
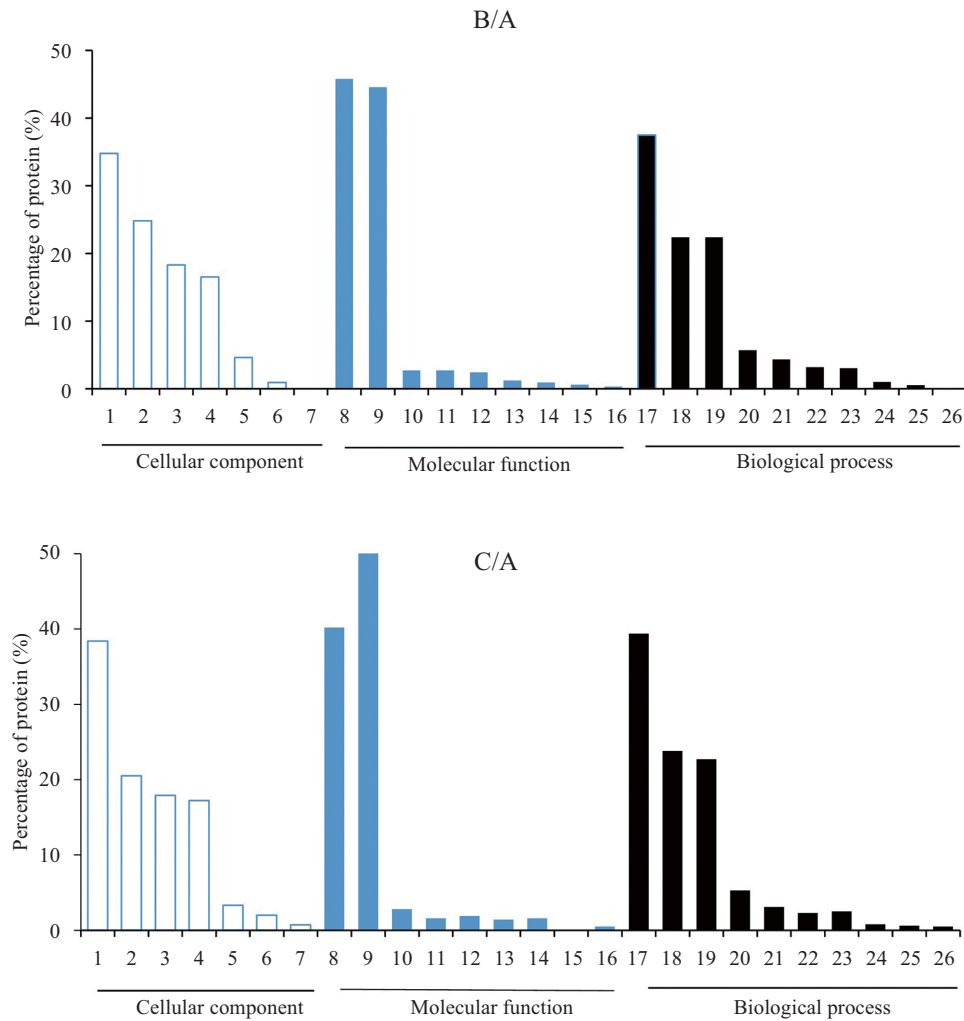


图1 丝瓜果实发育过程差异蛋白的亚细胞定位

Fig.1 Subcellular localization of differential expressed proteins during luffa fruit development



1~7: 细胞组分。1: 细胞; 2: 细胞器; 3: 细胞膜; 4: 大分子复合物; 5: 胞外区; 6: 超分子复合物; 7: 膜结合腔体。8~16: 分子功能。8: 结合; 9: 催化活性; 10: 抗氧化活性; 11: 转运因子活性; 12: 结构分子活性; 13: 电荷载体活性; 14: 分子功能调控; 15: 核酸结合转录因子活性; 16: 营养受体活性。17~26: 生物过程。17: 代谢过程; 18: 分子过程; 19: 单一生物过程; 20: 刺激应答; 21: 定位; 22: 生物过程调控; 23: 细胞成分组织; 24: 多细胞组织过程; 25: 信号; 26: 发育过程。

1-7: cellular component. 1: cell; 2: organelle; 3: membrane; 4: macromolecular complex; 5: extracellular region; 6: supramolecular complex; 7: membrane-enclosed lumen. 8-16: molecular function. 8: binding; 9: catalytic activity; 10: antioxidant activity; 11: transporter activity; 12: structural molecule activity; 13: electron carrier activity; 14: molecular function regulator; 15: nucleic acid binding transcription factor activity; 16: nutrient reservoir activity. 17-26: biological process. 17: metabolic process; 18: cellular process; 19: single-organism process; 20: response to stimulus; 21: localization; 22: biological regulation; 23: cellular component organization or biogenesis; 24: multi-organism process; 25: signaling; 26: developmental process.

图2 丝瓜果实发育过程差异蛋白GO分析

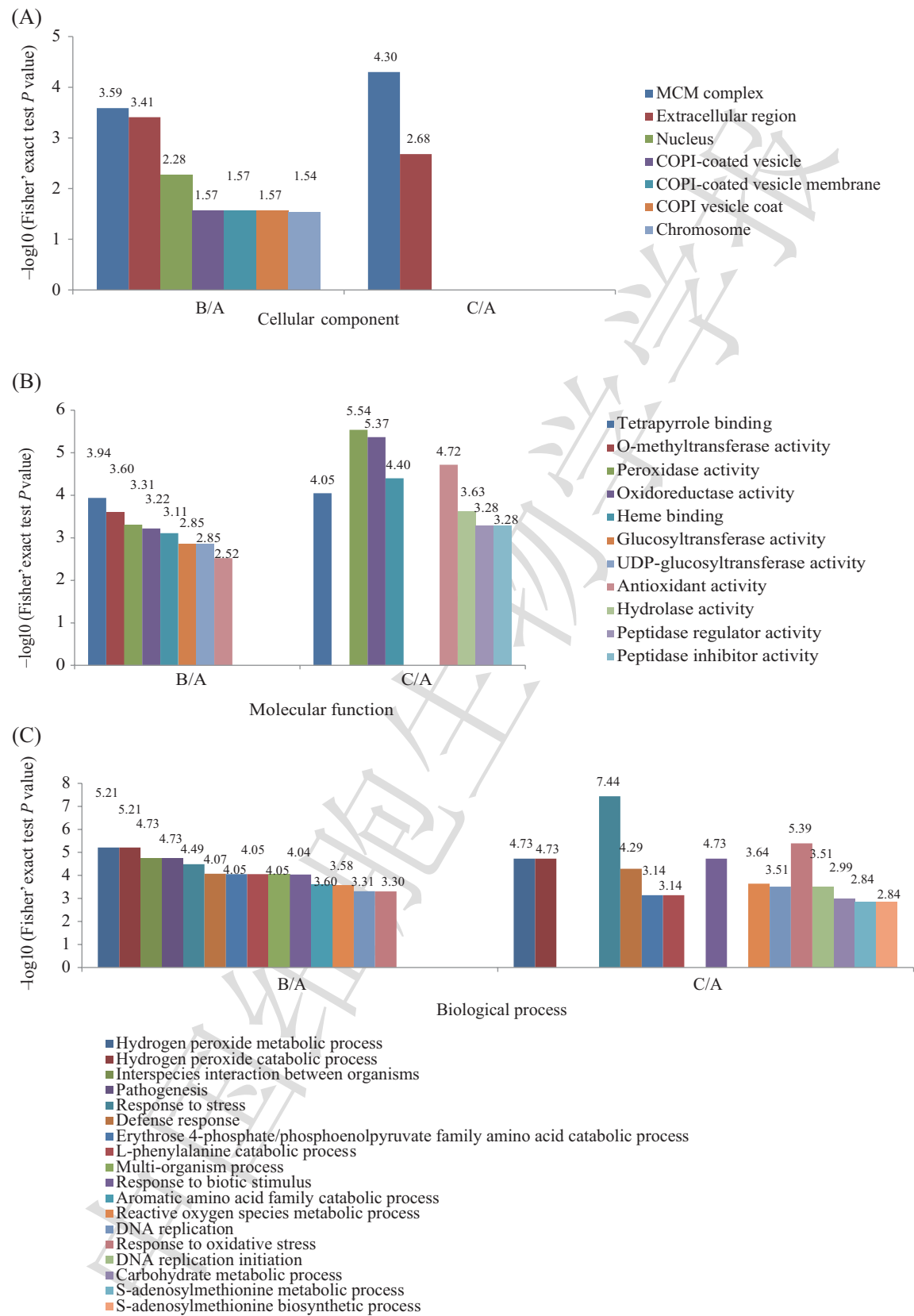
Fig.2 Gene Ontology analysis of differential proteins during luffa fruit development

的主要分子功能共有9个, 两个时期共同具备的有8个, 其中花后15天具有结合功能的差异蛋白最多, 其次为催化功能蛋白, 而花后30天以具有催化功能的差异蛋白居多, 其次为结合功能蛋白。差异蛋白主要参与的生物过程共有10个, 两个时期共同参与的有9个, 比例较高的前3个均为代谢过程、单一生物过程和分子过程。

2.4 差异蛋白的GO富集分析

进一步对差异蛋白质进行生物学过程、分子

功能和细胞组分的GO富集分析(图3)。细胞组分上, 花后15天和花后30天两个时期共有7种类别的显著性富集, 微小染色体维持蛋白(minichromosome maintenance, MCM)复合体和胞外区的富集程度在两个时期均较高, 其中MCM复合体主要富集下调蛋白, 而胞外区主要富集上调蛋白。分子功能上, 两个时期共有11种类别的显著性富集, 共同富集的包括四吡咯结合、过氧化物酶活性、氧化还原酶活性、血红素结合和抗氧化活性, 这些蛋白主要为上调蛋



A: 差异蛋白在细胞组分的富集; B: 差异蛋白在分子功能的富集; C: 差异蛋白在生物学过程的富集。
A: enrichment of differential proteins in cellular component; B: enrichment of differential proteins in molecular function; C: enrichment of differential proteins in biological process.

图3 丝瓜果实发育阶段差异蛋白GO富集分析
Fig.3 Gene Ontology enrichment analysis of differential proteins during luffa fruit development

白。花后15天, 四吡咯结合、O-甲基转移酶活性和过氧化物酶活性蛋白富集程度较高; 花后30天, 过氧化物酶活性、氧化还原酶活性和抗氧化活性蛋白富集程度较高; 生物过程上, 两个时期共有18个类别的显著性富集, 共同富集的包括过氧化氢代谢过程、过氧化氢分解过程、应激反应、防御反应、4-磷酸红/磷酸烯醇式丙酮酸家族氨基酸代谢过程、L-苯丙氨酸分解代谢过程、生物刺激反应、活性氧代谢过程、DNA复制和氧化应激反应, DNA复制过程主要富集下调蛋白, 余下过程主要富集上调蛋白。花后15天参与过氧化氢代谢过程、过氧化氢分解过程、生物体间的相互作用、发病机制、应激反应和防御反应的差异蛋白居多, 花后30天参与应激反应、氧化应激反应、生物刺激反应、过氧化氢代谢过程、

过氧化氢分解过程和防御反应蛋白居多。

2.5 差异蛋白的代谢途径富集分析

运用KEGG数据库对差异蛋白进行代谢途径富集分析。如图4所示, 丝瓜果实在花后15天差异表达蛋白富集在8个代谢途径, 下调蛋白主要富集在DNA复制途径, 余下7个代谢途径主要富集上调蛋白, 其中苯丙烷类生物合成途径富集度最高; 到花后30天差异表达蛋白富集的代谢途径明显增多, 达到24个, 下调蛋白主要富集在DNA复制、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢途径, 丙酮酸代谢中有上调和下调蛋白的富集, 余下20个代谢途径主要富集上调蛋白, 其中苯丙烷类生物合成和次生代谢产物生物合成两个途径所占比例最高。差异蛋白在两个时期共同富集的途径包括: 苯丙烷类代谢、次生代谢产物

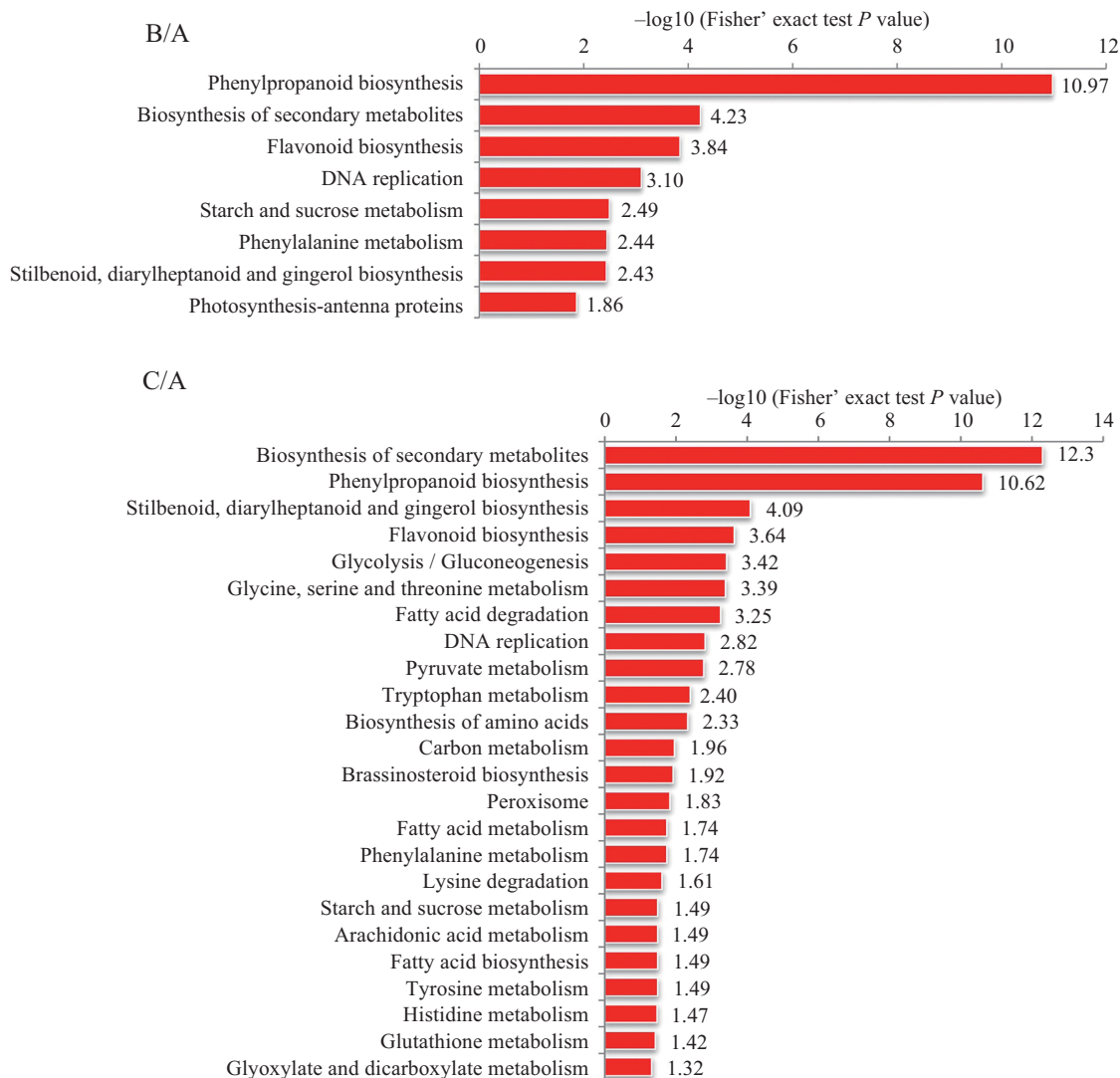


图4 丝瓜果实在发育过程差异蛋白KEGG途径富集分析

Fig.4 KEGG pathway enrichment analysis of differential proteins during luffa fruit development

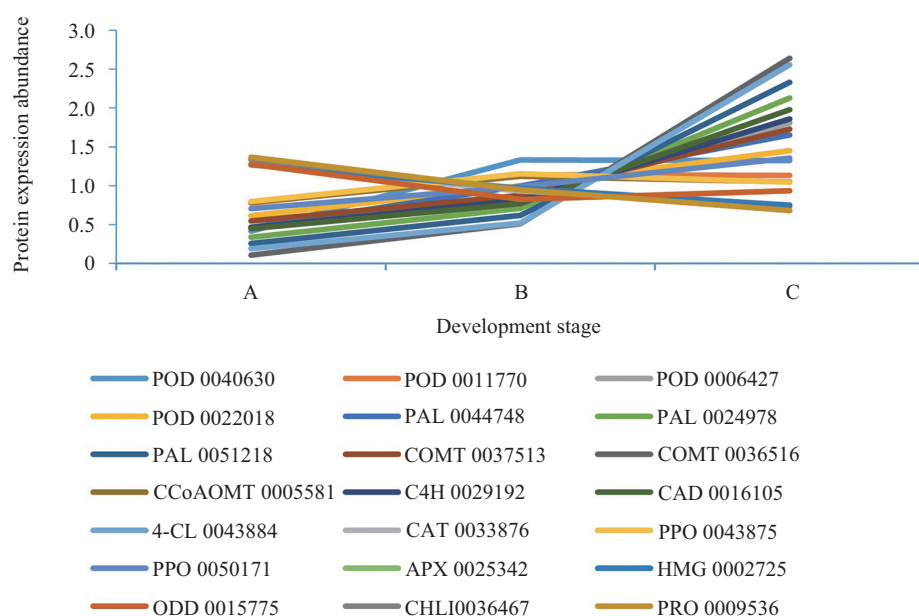


图5 丝瓜果实发育过程参与次生代谢产物生物合成途径差异蛋白的表达丰度
Fig.5 Protein abundance of differential proteins involved in secondary metabolite biosynthesis pathway during luffa fruit development

生物合成、类黄酮生物合成、DNA复制、淀粉与蔗糖代谢、苯丙氨酸代谢和芪类化合物、二芳基庚烷和姜辣素生物合成。

2.6 目标差异蛋白

根据差异蛋白GO富集和KEGG途径富集结果,从丝瓜果实发育过程参与的次生代谢产物生物合成、糖代谢和DNA复制3个主要代谢途径中筛选出36个目标差异蛋白。

2.6.1 参与次生代谢产物生物合成途径的差异蛋白 本研究共获得21个差异蛋白参与丝瓜果肉的次生代谢产物生物合成途径,包括4个过氧化物酶(POD)(0040630、0011770、0006427和0022018)、3个苯丙氨酸解氨酶(PAL)(0044748、0024978和0051218)、1个4-香豆酸CoA连接酶(4-CL)(0043884)、1个肉桂酸4-羟化酶(cinnamate 4-hydroxylase, C4H)(0029192)、1个肉桂酸脱氢酶(CAD)(0016105)、2个咖啡酸3-O-甲基转移酶(caffeic acid-3-O-methyltransferase, COMT)(0037513和0036516)、1个咖啡酰辅酶A氧甲基转移酶(caffeoyl CoA O-methyltransferase, CCoAOMT)(0005581)、1个抗坏血酸过氧化物酶(peroxisomal ascorbate peroxidase, APX)(0025343)、2个多酚氧化酶(PPO)(0043875和0050171)、1个过氧化氢酶(catalase, CAT)(0033876)、1个酮戊二酸3-双加氧酶

(2-Oxoglutarate 3-dioxygenase, ODD)(0015775)、1个羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, HMGS)(0002725)、1个镁螯合酶I亚基(magnesium-chelatase subunit, CHLI)(0036467)和1个NADPH原叶绿素酸酯氧化还原酶(NADPH protochlorophyllide reductase, POR)(0009536)(图5)。上调表达蛋白包括PAL、C4H、4-CL、CAD、COMT、CCoAOMT、POD和PPO,下调表达蛋白包括CAT、APX、ODD、HMGS、CHLI和POR,其中PAL、C4H、4-CL、COMT和CAD 5种差异蛋白水平在丝瓜果实生长发育过程出现显著升高;POD的4个差异蛋白和PPO的2个差异蛋白的表达水平在果实发育过程均出现两种变化规律,POD(0040630和0011770)和PPO(0043875)在花后15天表达水平升高,之后到花后30天表达水平基本不变;POD(0006427和0022018)和PPO(0050171)在花后15天和30天两个时期均表现为表达量升高。CCoAOMT差异蛋白在花后15天表达水平升高,之后到花后30天表达水平基本不变。CAT、APX、ODD、HMGS、CHLI和POR 6种差异蛋白下调表达,其中,ODD和HMGS在花后15天表达水平下降,之后到花后30天表达水平基本不变。CAT、APX、CHLI和POR的表达水平在花后两个时期逐渐下降,

至花后30天降到最低。

2.6.2 参与糖代谢的差异蛋白 本研究共获得9个差异蛋白参与丝瓜果肉的糖代谢途径, 包括2个 β -葡萄糖苷酶(beta-Glucosidase, BLG)(0040270和0035113)、1个内切葡聚糖酶(cyanogenic beta-glucosidase, ENG)(0000012)、2个蔗糖合成酶(sucrose synthase, SS)(0006822和0043861)、2个颗粒结合淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)(0010385和0008834)、1个 α -淀粉酶(alpha-amylase, α -AL)(0040106)和1个丙酮酸激酶同工酶G(pyruvate kinase isozyme G, PKG)(0012076)(图6)。上调表达蛋白包括BLG、SS和 α -AL, 下调的蛋白包括ENG、GBSS和PKG, 其中, α -AL和SS(0043861)的表达水

平在丝瓜果实生长发育过程出现显著升高; BLG和SS(0006822)在花后15天表达水平明显升高, 之后到花后30天表达水平基本不变; ENG、GBSS和PKG在花后15天表达水平明显下降, 之后到花后30天表达水平基本不变。

2.6.3 参与DNA复制的差异蛋白 本研究共获得6个差异蛋白参与丝瓜果肉的DNA复制途径, 包括3个微小染色体维持蛋白(MCM)(0046934、0009864和0032580)和3个复制因子(replication factor, RF)(0056256、0034528和0010283)(图7)。MCM和RF蛋白均为下调表达, MCM差异蛋白水平随丝瓜果实生长发育逐渐下降; RF差异蛋白在花后15天表达水平明显下降, 之后到花后30天表达水平基本不变。

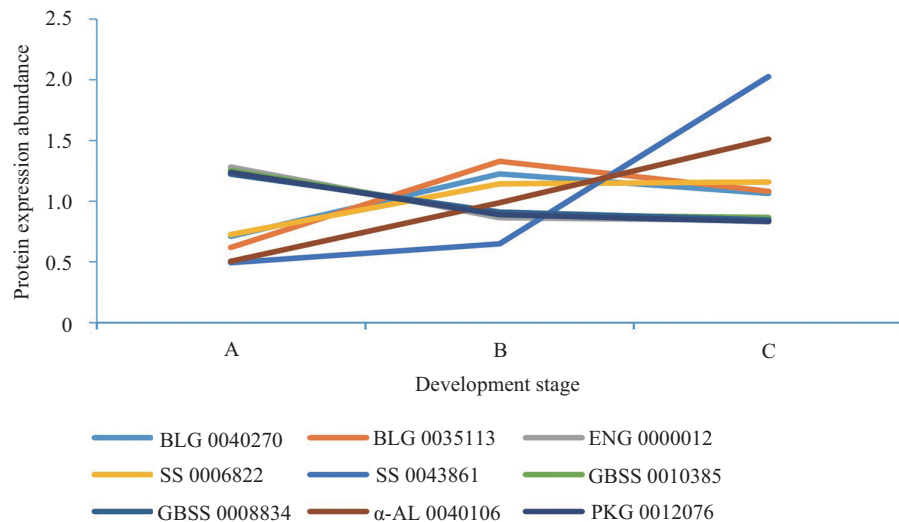


图6 丝瓜果实发育过程参与糖代谢途径差异蛋白的表达丰度

Fig.6 Protein abundance of differential proteins involved in glycometabolism pathway during luffa fruit development

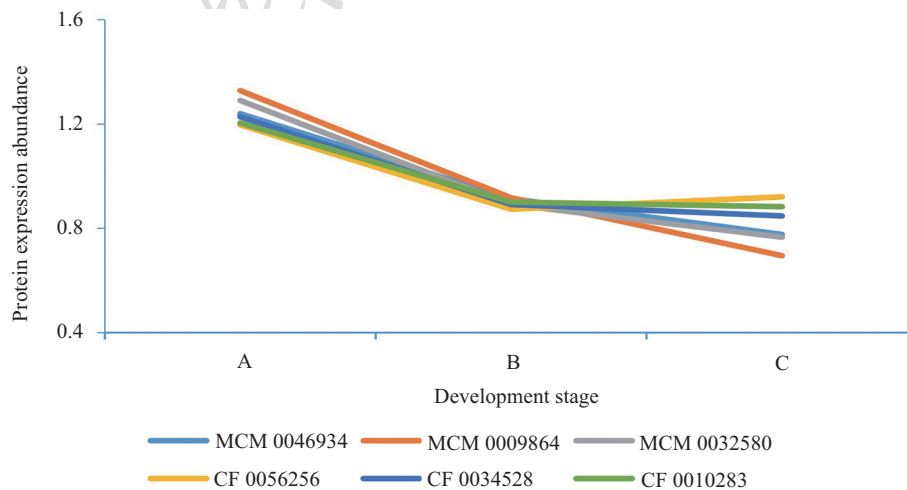


图7 丝瓜果实发育过程参与DNA复制途径差异蛋白的表达丰度

Fig.7 Protein abundance of differential proteins involved in DNA replication during luffa fruit development

3 讨论

果实的生长发育是一个复杂的生物学过程, 涉及大量基因表达和生理生化等代谢。蛋白质是基因功能的主要体现者和执行者, 应用蛋白质组学能够更好地描述生化网络并全面理解果实生长发育过程的分子生理^[19]。本研究采用iTraQ-LC-MS/MS技术分析丝瓜果实不同发育时期蛋白的表达水平, 共鉴定到差异蛋白709个, 其中, 在丝瓜果实不同发育时期共同存在的差异蛋白有229个, 上调蛋白有118个, 下调蛋白有111个。通过生物信息学分析, 从中筛选出36个在丝瓜果实发育过程发挥重要作用的目标差异蛋白。这些差异蛋白质参与3个重要的代谢途径, 即次生代谢产物生物合成、糖代谢和DNA复制途径。

次生代谢是植物重要的生命活动。植物次生代谢产物种类繁多, 包括酚类、木质素、醌类和萜类等, 这些次生代谢物在植物生长发育的许多方面均起着重要作用^[20-21]。本研究共获得14种参与丝瓜果实次生代谢产物生物合成的差异蛋白, 包括PAL、C4H、4-CL、CAD、COMT、CCoAOMT、POD、PPO、CAT、APX、ODD、HMGS、CHLI和POR, 其中, 上调表达蛋白包括PAL、C4H、4-CL、CAD、COMT、CCoAOMT、POD和PPO, 下调表达蛋白包括CAT、APX、ODD、HMGS、CHLI和POR。PAL、C4H、4-CL、COMT、CAD、POD和CCoAOMT 7种差异蛋白与植物酚类和木质素的合成相关^[22-27]。本研究中, PAL、C4H、4-CL、COMT和CAD 5种差异蛋白的表达水平显著升高, 说明丝瓜果实发育过程苯丙烷生物合成活跃, 酚类、木质素等物质大量合成。温文旭等^[11,28]利用超高效液相色谱技术检测了丝瓜果肉中酚类的组分, 发现丝瓜果肉中含有包括龙胆酸、绿原酸和多巴胺等多种酚类, 并且这些酚类的含量与PAL活性密切相关。朱海英等^[5]和王隆华等^[6-7]研究发现, PAL、CAD和4-CL是丝瓜果实发育过程中导管分子分化的标志酶, 在木质素的合成中起关键作用。蒋淑磊等^[29]分析了毛白杨(*Populus tomentosa* Carr.)次生维管系统的蛋白质表达谱, 结果表明, PtCAD、PtCOMT和PtPAL参与其木质素的合成过程。此外, 在蕨菜(*Pteridium aquilinum*)^[30]、桃(*Amygdalus persica* L.)内果皮^[31]的生长发育过程木质素含量的升高也与PAL、4-CL、CAD、POD和CCoAOMT的高表达有关。由此推测, PAL、C4H、

4-CL、COMT和CAD可能是调控丝瓜果实内酚类和木质素合成的5种关键蛋白。酚类在有氧条件下会被氧化成醌类, 进一步生成黑褐色物质, 从而引起果蔬组织褐变。研究表明, 参与果实褐变的酶类主要包括PAL、PPO、POD、超氧化物歧化酶(*Superoxide dismutase*, SOD)、CAT和APX^[32-33]。在蛋白质水平, 鲜切莲藕(*Nelumbo nucifera*)的褐变与SOD和硫氧还蛋白过氧化物酶(*thioredoxin peroxidase*, TPx)下调表达有关^[34]。POD上调表达可能引起酚类物质反应生成褐色物质, 致使龙眼(*Ferocactus viridescens*)果皮发生褐变^[35]。南果梨(*Pyrus spp.*)果皮的褐变过程可能是PPO和POD上调表达共同作用的结果^[36]。本研究共鉴定到5种差异蛋白可能参与丝瓜褐变, 分别为PAL、POD、PPO、CAT和APX, 涉及次生代谢产物生物合成、过氧化物酶体和苯丙烷生物合成3种代谢途径, 其中PAL、POD和PPO为上调表达, CAT和APX为下调表达, 与前人的研究结果相同^[34-36]。此外, 本课题组在研究前期进行了普通丝瓜鲜切褐变的转录组差异分析并获得了PAL、PPO、POD、SOD和CAT家族基因, 这些基因所参与的代谢途径以及它们的表达情况也与本研究的结果相一致^[11-12,37-40]。由此推测, PAL、POD、PPO、CAT、APX 5种差异蛋白可能协同参与丝瓜果实发育后期的酶促褐变, 即随着丝瓜果实的成熟, PAL上调表达促进酚类合成, CAT和APX下调表达, 导致细胞内活性氧累积, 膜透性增加, 接着PPO和POD与酚类反应, 生成醌类, 从而引起果肉褐变。萜类包括赤霉素、类胡萝卜素、叶绿素、皂苷等, 是植物次生代谢产物的一个重要类别。本研究获得4种差异蛋白参与丝瓜萜类的代谢, 即ODD、HMGS、CHLI和POR。ODD参与多种萜类物质的合成过程。刘文超等^[41]分析了丹参中ODD基因的表达, 发现该基因可能调控丹参萜类代谢的下游途径。HMGS被认为是萜类合成途径中的关键酶。CHLI和POR主要参与植物叶绿素的合成。ODD、HMGS、CHLI和POR 4种差异蛋白在丝瓜果实发育过程下调表达, 说明在丝瓜果实的发育后期萜类物质减少, 叶绿素合成受阻, 而果皮褪绿是丝瓜果实衰老的典型特征。

糖类物质的累积是果实品质形成的关键。本研究鉴定得到6种差异蛋白参与丝瓜果实生长过程的糖代谢, 包括BLG、SS、 α -AL、ENG、GBSS和PKG, 上调表达蛋白包括BLG、SS和 α -AL, 下

调的蛋白包括ENG、GBSS和PKG, 其中, α -AL和SS(0043861)两种差异蛋白水平在丝瓜果实生长发育过程出现显著升高。 α -AL是普遍分布在动物、植物和微生物中的一种重要淀粉水解酶。前人在苹果(*Malus pumila*)^[42]、番木瓜(*Carica papaya* L.)^[43]的研究中发现, 果实的成熟过程伴随着 α -AL的上调表达, 并且其活性会随着淀粉含量的降低而持续升高。本研究中, 丝瓜 α -AL显著上调表达, 而淀粉合成酶GBSS下调表达, 这一结果说明, 丝瓜果实的发育过程可能存在淀粉的降解。SS是蔗糖合成途径的关键酶。蔗糖含量在果实发育后期显著升高, 这与SS表达量的变化紧密相关。在丝瓜果实发育过程中, SS明显上调表达, 说明果实发育后期可能有蔗糖的累积。研究发现, 在碰柑(*Citrus reticulata*)^[44]、薄皮甜瓜(*Cucumis melo* L.)^[45]等多种果实的生长过程中, SS都具有相同的表达模式。由此推测, SS和 α -AL可能在丝瓜果实蔗糖的累积和淀粉的降解过程起着重要作用, 即 α -AL的上调表达了丝瓜果实中淀粉的水解作用, 形成的水解产物在SS的作用下合成蔗糖。BLG、ENG和PKG 3种蛋白与果实中葡萄糖的累积相关, BLG和ENG属于纤维素酶, 主要的功能是将纤维素降解成葡萄糖。PKG是糖酵解过程中的主要限速酶之一, 糖酵解是将葡萄糖或糖原在无氧或缺氧条件下进行分解。BLG在丝瓜果实发育过程上调表达, ENG和PKG下调表达, 推测丝瓜果实发育中、后期应该有葡萄糖的累积。

果实的发育涉及细胞的生长与增殖过程。本研究鉴定得到MCM和RF 2种差异蛋白参与细胞的生长与增殖。MCM的水平代表着细胞不同的增殖状态。实验发现, MCM在增殖细胞中表达水平高, 在静止期细胞和分化细胞中不表达或水平很低, 因此常用于一些肿瘤细胞的早期检测^[46]。RF在DNA复制和修复及细胞分裂增殖与抗逆生长中都具有重要功能。在丝瓜果实的生长过程中, MCM和RF 2种蛋白在生长前期水平较高, 说明这个时期细胞生长、增殖快速。同样地, 在薄皮甜瓜的品质形成过程中, 生长前期的差异蛋白也主要参与DNA复制、rRNA处理和细胞周期等生物学过程^[45]。

此外, 本研究还发现, 部分差异蛋白在丝瓜果实发育过程发挥重要作用。乙醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase, ALDH)(0009719)是一种重要的逆境响应蛋白, 参与植物多种逆境胁迫防御过程。ALDH

在丝瓜生长发育过程中上调表达可能与其响应逆境胁迫有关。在Xu等^[47]研究的苹果果实成熟过程中, ALDH基因家族的表达模式与本研究结果一致。细胞色素P450(cytochromeP450, CYP450)(0023188)是药物和其他内、外源物的主要代谢酶, 丝瓜果实生长发育中CYP450表达水平逐渐升高, 推测CYP450可能参与丝瓜果实药用功能的形成过程。

综上, 丝瓜果实发育过程的差异蛋白主要参与次生代谢产物生物合成、糖代谢和DNA复制3个代谢过程, 其中, PAL、C4H、4-CL、COMT和CAD可能是调控果实内酚类物质和木质素合成的5种关键蛋白, PAL、POD、PPO、CAT、APX 5种差异蛋白可能协同参与果实发育后期的酶促褐变, SS和 α -AL可能在丝瓜果实蔗糖的累积和淀粉的降解过程起着重要作用。

参考文献 (References)

- 1 颜国纲, 郑振佳, 时新刚, 葛长军. 丝瓜的营养价值及其综合利用研究进展. 中国果菜(Yan Guogang, Zheng Zhenjia, Shi Xingang, Ge Changjun. Research progress on nutritive value and comprehensive utilization of towel gourd. China Fruit and Vegetable) 2011; 7: 35-6.
- 2 杨寅桂, 张宁珍, 谢建春, 徐维杰, 刘克琦, 陈拥军, 等. 络用丝瓜果实发育研究. 江西农业大学学报(Yang Yinggui, Zhang Ningzhen, Xie Jianchun, Xu Weijie, Liu Keqi, Chen Yongjun, et al. A study on the fruit growth of Loofah. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis) 2000; 22(1): 66-9.
- 3 何晓莉, 罗剑宁, 罗少波, 张长远, 郑晓明, 龚浩. 丝瓜主要生理特性研究进展. 广东农业科学(He Xiaoli, Luo Jianing, Luo Shaobo, Zhang Changyuan, Zheng Xiaoming, Gong Hao. Research Progress on main physiological characteristics of towel gourd. Guangdong Agricultural Sciences) 2006; 8: 114-6.
- 4 李欣, 毕阳, 王军节, 龚迪. 蛋白质组学在果实成熟衰老机理方面的研究进展. 食品科学(Li Xin, Bi Yang, Wang Junjie, Gong Di. Advances in the application of proteomics in researching the mechanisms of fruit ripening and senescence. Food Science) 2014; 35(7): 234-46.
- 5 朱海英, 李人圭, 王隆华, 黄祥辉, 颜季琼. 丝瓜果实发育中木质素代谢及有关导管分化的生理生化研究. 华东师范大学学报(自然科学版)[Zhu Haiying, Li Rengui, Wang Longhua, Huang Xianghui, Yan Jiqiong. Physiological and biochemical studies on lignin metabolism and its treachary element differentiation of fruit of *Luffa cylindrica*. Journal of Eastchina Normal University (Natural Science)] 1997; 1: 87-94.
- 6 王隆华, 姜宁, 黄祥辉, 李人圭, 颜季琼. 丝瓜果实发育过程中4-CL连接酶的特性研究. 华东师范大学学报(自然科学版)[Wang Longhua, Jiang Ning, Huang Xianghui, Li Rengui, Yan Jiqiong. Study on properties of 4-cl ligase during the fruits development of *Luffa cylindrica* roem. Journal of Eastchina Normal University (natural science)] 1997; 2: 83-9.
- 7 王隆华, 姜宁, 颜季琼. 丝瓜果实发育过程中4-香豆酰辅酶A连

- 接酶在管状分子分化中的作用. 中山大学学报(自然科学版) [Wang Ronghua, Jiang Ning, Yan Jiqiong. Role of 4-coumarin coenzyme A ligase in tube like molecular differentiation during loofah fruit development. Journal of Zhongshan University (Natural Science)] 1997; 36(S1): 149-53.
- 8 黄树苹, 谈太明, 徐长城, 谈杰. 丝瓜多酚氧化酶的酶学特性初步研究. 中国蔬菜(Huang Shuping, Tan Taiming, Xu Changcheng, Tan Jie. Primary studies on characteristics of polyphenol oxidase in luffa. China Vegetables) 2009; 1(10): 17-22.
- 9 花秀凤, 陈锐, 黄斌斌. 普通丝瓜果肉褐变的变异及低褐变品种的筛选. 中国农学通报(Hua Xiufeng, Chen Xian, Binbin. *Luffa cylindrica* Roem flesh browning variation and low browning varieties selection. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2013; 29(19): 103-6.
- 10 康娟, 庄尹宏, 林碧英, 温庆放, 温文旭, 朱海生. 丝瓜多酚氧化酶及过氧化物酶酶学特性的研究. 福建农业学报(Kang Juan, Zhuang Yinhong, Lin Biying, Wen Qingfang, Wen Wenxu, Zhu Haisheng. Polyphenol oxidase and peroxidase in *Luffa cylindrica*. Fujian Journal of Agricultural Sciences) 2017; 32(8): 854-58.
- 11 朱海生, 温文旭, 刘建汀, 叶新如, 陈敏氢, 王彬, 等. 丝瓜苯丙氨酸解氨酶基因PAL克隆及表达分析. 植物遗传资源学报(Zhu Haisheng, Wen Wenxu, Liu Jianting, Ye Xinru, Chen Mindong, Wang Bin, *et al.* Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia lyase gene PAL from *Luffa*. Journal of Plant Genetic Resources) 2018; 19(2): 305-13.
- 12 朱海生, 刘建汀, 王彬, 陈敏氢, 张前荣, 叶新如, 等. 丝瓜过氧化物酶基因的克隆及其在果实褐变中的表达分析. 农业生物技术学报(Zhu Haisheng, Liu Jianting, Wang Bin, Chen Mindong, Zhang Qianrong, Ye Xinru, *et al.* Cloning of peroxidase gene from luffa (*Luffa cylindrica*) and its expression analysis in fruit browning. Journal of Agricultural Biotechnology) 2018; 26(1): 43-52.
- 13 罗少波, 罗剑宁, 郑晓明. 我国丝瓜育种研究进展与展望. 广东农业科学(Luo Shaobo, Luo Jianing, Zhen Xiaoming. Progress and prospect of loofah breeding in China. Guangdong Agricultural Sciences) 2006; 1: 15-7.
- 14 Lei T, Jin S, Meng Q, Zhou H, Zhang M. Discovery of potential bladder cancer biomarkers by comparative urine proteomics and analysis. Clin Genitourin Cancer 2013; 11(1): 56-62.
- 15 Kambiranda D, Katam R, Basha SM, Siebert S. iTRAQ-Based quantitative proteomics of developing and ripening muscadine grape berry. J Proteome Res 2014; 13(2): 555-69.
- 16 Lin ST, Chou HC, Chang SJ, Chen YW, Lyu PC, Wang WC, *et al.* Proteomic analysis of proteins responsible for the development of doxorubicin resistance in human uterine cancer cells. J Proteomics 2012; 75(18): 5822-47.
- 17 Fang X, Chen W, Xin Y, Zhang HM, Yan CQ, Yu H, *et al.* Proteomic analysis of strawberry leaves infected with *Colletotrichum fragariae*. J Proteomics 2012; 75(13): 4074-90.
- 18 潘三强, 宿宝贵, 吕来清. 二维电泳和iTRAQ的实验比较. 神经解剖学杂志(Pan Sanqiang, Su Baogui, Lü Laiqing. A comparative study between the two dimensional gel electrophoresis and iTRAQ method. Chinese Journal of Neuroanatomy) 2008; 24(5): 538-42.
- 19 Palma JM, Corpas FJ, del Río LA. Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. J Proteomics 2011; 74 (8): 1230-43.
- 20 王莉, 史玲玲, 张艳霞, 刘玉军. 植物次生代谢物途径及其研究进展. 武汉植物学研究(Wang Li, Shi Lingling, Zhang Yanxia, Liu Yujun. Biosynthesis and regulation of the secondary metabolites in plants. Journal of Wuhan Botanical Research) 2007; 25(5): 500-8.
- 21 孙立影, 于志晶, 李海云, 李俊波, 刘洪章, 林秀峰, 等. 植物次生代谢物研究进展. 吉林农业科学(Sun Liying, Yu Zhijing, Li Haiyun, Li Junbo, Liu Hongzhang, Lin Xiufeng, *et al.* Advances in secondary metabolites of medicinal plant. Journal of Jilin Agricultural Sciences) 2009; 34(4): 4-10.
- 22 崔建东, 李艳, 牟德华. 苯丙氨酸解氨酶(PAL)的研究进展. 食品工业科技(Cui Jiandong Li Yan, Mou Dehua. Research progress of phenylalanine ammonia lyase. Science and Technology of Food Industry) 2008; 29(7): 306-8.
- 23 李莉, 赵越, 马君兰. 苯丙氨酸代谢途径关键酶: PAL、C4H、4CL研究新进展. 生物信息学(Li Li, Zhao Yue, Ma Junlan. Key enzymes in phenylalanine metabolism pathway: new progress in PAL, C4H and 4CL research. Bioinformatics) 2007; 5(4): 187-9.
- 24 刘晓娜, 刘雪梅, 杨传平, 吴迪, 王瑞, 韩进. 木质素合成研究进展. 中国生物工程杂志(Liu Xiaona, Liu Xuemei, Yang Chuanping, Wu Di, Wang Rui, Han Jin. Advance in the synthesis of lignin. China Biotechnology) 2007; 27(3): 120-6.
- 25 石海燕, 张玉星. 木质素生物合成途径中关键酶基因的分子特征. 中国农学通报(Shi Haiyan, Zhang Yuxing. Molecular characterization of key enzyme genes related to the pathway of lignin biosynthesis. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2011; 27(5): 288-91.
- 26 李璐滨, 刘蕾, 何聪芬, 董银卯, 彭镇华. 木质素生物合成关键酶基因的研究进展. 分子植物育种(Li Lubin, Liu Lei, He Congfen, Dong Yinmao, Peng Zhenhua. Research progresses on the genes encoding the key enzymes in biosynthetic pathway of lignin. Molecular Plant Breeding) 2007; 5(11): 45-51.
- 27 李伟, 熊谨, 陈晓阳. 木质素代谢的生理意义及其遗传控制研究进展. 西北植物学报(Li Wei, Xiong Jin, Chen Xiaoyang. Advances in the research of physiological significances and genetic regulation of lignin metabolism. Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica) 2003; 23(4): 675-81.
- 28 温文旭, 朱海生, 温庆放, 陈敏氢, 林碧英, 薛珠政. 超高效液相色谱法分析丝瓜酚类物质组分及其含量. 园艺学报(Wen Wenxu, Zhu Haisheng, Wen Qingfang, Chen Mindong, Lin Biying, Xue Zhuzheng. Determination of polyphenols in luffa by ultra- performance liquid chromatography. Acta Horticulturae Sinica) 2016; 43(7): 1391-401.
- 29 蒋淑磊, 陈加飞, 赵树堂, 卢孟柱. 应用nanoLC-MS/MS分析毛白杨次生维管系统的蛋白质表达谱. 林业科学(Jiang Shulei, Chen Jiafei, Zhao Shutang, Lu Mengzhu. Proteome profile in secondary vascular system of populus tomentosa by nanoLC-MS/MS. Scientia Silvae Sinicae) 2013; 49(5): 43-53.
- 30 Huang JS, Zhang Y, Li J, Wang LB, Yu ZF. Proteomic changes in the stem of wild *Pteridium aquilinum* during development. J Plant Growth Regul 2016; 35(2): 504-17.
- 31 Hu H, Liu Y, Shi GL, Liu YP, Wu RJ, Yang AZ, *et al.* Proteomic analysis of peach endocarp and mesocarp during early fruit development. Physiol Plantarum 2011; 142(4): 390-406.
- 32 蔡惠, 王同坤, 齐永顺, 张京政. 抗褐变梨果实的部分酶活性研究. 果树学报(Cai Hui, Wang Tongkun, Qi Yongshun, Zhang

- Jingzheng. Study on the enzymes related to the anti-browning fruits of anti pear. *Journal of Fruit Science* 2010; 27(5): 694-97.
- 33 姜翠翠, 陈桂信, 潘东明, 潘腾飞. 油(木奈)果实苯丙氨酸解氨酶基因的分离与表达分析. *西北植物学报*(Jiang Cuicui, Chen Guixin, Pan Dongming, Pan Tengfei. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*) 2013; 33(3): 465-71.
 - 34 Jiang J, Jiang L, Zhang L, Luo H, Opiyo AM, Yu Z. Changes of protein profile in fresh-cut lotus tuber before and after browning. *J Agric Food Chem* 2012; 60(15): 3955-65.
 - 35 潘德灼, 盖永红, 吕晓杰, 蒋雨露, 邱智敏, 宋晓敏, 等. 龙眼果实采后果皮褐变过程差异表达蛋白分析. *果树学报*(Pan Dezhuo, Gai Yonghong, Lü Xiaojie, Jiang Yulu, Qiu Zhimin, Song Xiaomin, *et al.* Analysis of differentially expressed proteins during the pericarp browning of postharvest longan fruit. *Journal of Fruit Science*) 2016; 33(5): 542-51.
 - 36 Wang JW, Zhou X, Zhou Q, Liu ZY, Sheng L, Wang L, *et al.* Proteomic analysis of peel browning of 'Nanguo' pears after low-temperature storage. *J Sci Food Agric* 2017; 97(8): 2460-7.
 - 37 温庆放, 刘建汀, 朱海生, 陈敏敏, 王彬, 张前荣. 丝瓜过氧化氢酶基因CAT1的克隆及表达分析. *园艺学报*(Wen Qingfang, Liu Jianting, Zhu Haisheng, Chen Mindong, Wang Bin, Zhang Qianrong. Cloning and expression analysis of catalase CAT1 gene from *Luffa cylindrica*. *Acta Horticulturae Sinica*) 2016; 43(10): 2039-48.
 - 38 刘建汀, 朱海生, 温庆放, 王彬, 张前荣, 陈敏敏, 等. 丝瓜过氧化氢酶CAT2基因的分离及表达分析. *中国细胞生物学学报*(Liu Jianting, Zhu Haisheng, Wen Qingfang, Wang Bin, Zhang Qianrong, Chen Mindong, *et al.* Isolation and expression analysis of catalase CAT2 gene from *Luffa*. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2017; 39(8): 1076-83.
 - 39 朱海生, 刘建汀, 陈敏敏, 李永平, 王彬, 张前荣, 等. 丝瓜铜锌超氧化物歧化酶Cu/Zn-SOD基因家族的克隆与表达分析. *中国农业科学*(Zhu Haisheng, Liu Jianting, Chen Mindong, Li Yongping, Wang Bin, Zhang Qianrong, *et al.* Cloning and expression analysis of copper and zinc superoxide dismutase Cu/Zn-SOD gene family from *Luffa cylindrica*. *Scientia Agricultura Sinica*) 2017; 50(17): 3386-99.
 - 40 Zhu HS, Liu JT, Wen QF, Chen MD, Wang B, Zhang QR, *et al.* De novo sequencing and analysis of the transcriptome during the browning of fresh-cut *Luffa cylindrica* 'Fusi-3' fruits. *PLoS One* 2017; 12(11): e0187117.
 - 41 刘文超, 王东浩, 王喆之, 李翠芹. 丹参2-酮戊二酸依赖性双加氧酶基因克隆及表达分析. *西北植物学报*(Liu Wenchao, Wang Donghao, Wang Zhezhi, Li Cuiqin. Cloning and expression analysis of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *salvia miltiorrhiza* bnge. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*) 2012; 32(2): 1289-94.
 - 42 Wang YZ, Zhang DP. Activities, quantitative changes and subcellular localization of α -amylase during development of apple fruit. *J Integr Plant Biol* 2002; 44(1): 34-41.
 - 43 Nogueira SB, Labate CA, Gozzo FC, Pilau EJ, Lajolo FM, do Nascimento JRO. Proteomic analysis of papaya fruit ripening using 2DE-DIGE. *J Proteomics* 2012; 75(4): 1428-39.
 - 44 Lin Q, Wang C, Dong W, Jiang D, Wang D, Li S, *et al.* Transcriptome and metabolome analyses of sugar and organic acid metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) fruit during fruit maturation. *Gene* 2015; 554(1): 64-74.
 - 45 Guo X, Xu J, Cui X, Chen H, Qi H. iTRAQ-based protein profiling and quality changes at different development stages of oriental melon. *BMC Plant Biol* 2017; 17(1): 28-48.
 - 46 段智, 李代强. 微小染色体维持蛋白在肿瘤中的意义. *中国现代医药杂志*(Duan Zhi, Li Daiqiang. The significance of micro chromosome maintenance protein in tumor. *Modern Medicine Journal of China*) 2007; 9(2): 139-40.
 - 47 Xu B, Guo JY, Li FG, Shangguan XX, Zhao B, Yang CQ, *et al.* A cotton BURP domain protein interacts with alpha-expansin and their co-expression promotes plant growth and fruit production. *Mol Plant* 2013; 6(3): 945-58.