

柑橘果实成熟特异基因 *CsPMEI/InvI* 的克隆与序列分析

王国立^{1,2,3}, 安华明^{1,2}, 秦巧平³, 李孟娇³, 刘真真³, 陈佳莹³, 周倩³, 张岚岚³

(1. 贵州省果树工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 3. 浙江农林大学 农业与食品科学学院 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 临安 311300)

摘要: 果实成熟特异基因对于调控果实成熟及其品质形成具有重要的作用。在前期获得柑橘 *Citrus* 果实成熟特异基因片段的基础上, 以纽荷尔脐橙 *Citrus sinensis* ‘Newhall’ 成熟果实为试材, 应用 RT-PCR 和 RACE 技术, 分离获得果实成熟特异基因的 cDNA 全长序列, 命名为 *CsPMEI/InvI*, GenBank 登录号: KC198084; 生物信息学分析表明: 该基因全长 945 bp, 包含 618 bp 完整的开放阅读框, 编码 205 个氨基酸, 其编码的蛋白质分子式为 $C_{977}H_{1568}N_{296}O_{282}S_{10}$, 相对分子量为 22.29 kDa, 理论等电点为 9.84, 属于 InvI/PMEI(转化酶抑制子/果胶甲酯酶抑制子) 家族成员, 含有该家族严格保守的 Cys 残基, 存在 1 个 cAMP 和 cGMP-蛋白激酶磷酸化位点、3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点和 3 个 N-酰基化位点, 其二级结构主要以 α -螺旋为主。*CsPMEI/InvI* 基因的分离为进一步研究柑橘果实的成熟机制提供了基础。图 7 表 1 参 28

关键词: 园艺学; 成熟特异性; 果胶甲酯酶/转化酶抑制子; 基因克隆; 序列分析; 柑橘
中图分类号: S666.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2013)03-0336-07

Cloning and sequence analysis of fruit ripening-specific gene *CsPMEI/InvI* from citrus

WANG Guoli^{1,2,3}, AN Huaming^{1,2}, QIN Qiaoping³, LI Mengjiao³, LIU Zhenzhen³,
CHEN Jiaying³, ZHOU Qian³, ZHANG Lanlan³

(1. Guizhou Fruits Engineering Technology Research Centre, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. School of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: Fruit-ripening-specific expression genes play important roles on the regulation of fruit ripening and quality formation. A full-length cDNA of fruit ripening-specific gene, designated as *CsPMEI/InvI* (GenBank accession No. KC198084), was isolated from Newhall navel orange (*Citrus sinensis* ‘Newhall’) by RT-PCR and RACE. The full-length of *CsPMEI/InvI* was 945 bp, containing an open reading frame of 618 bp and encoding 205 amino acids. The molecular formula of encoded protein was $C_{977}H_{1568}N_{296}O_{282}S_{10}$ with a calculated molecular of 22.29 kDa and an isoelectric point of 9.84. The encoded protein belonged to InvI/PMEI family including highly-conserved Cys residue in the protein sequence, one cAMP and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site, three protein kinase C phosphorylation sites, two casein kinase II phosphorylation sites and three N-myristoylation sites. In its secondary structure, α -helix was the main structural conformation. [Ch, 7 fig. 1 tab. 28 ref.]

收稿日期: 2012-12-26; 修回日期: 2013-01-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101531); 贵州省农业科技攻关项目(黔科合农 G 字 20094003); 浙江省重点创新团队-果品产业创新团队项目(2009R50033-12); 浙江省果品新品种选育重大科技专项项目(2012C12904-1); 浙江省“重中之重”学科开放基金项目(2011KFJJ005); 浙江农林大学人才启动项目(2008FR066)

作者简介: 王国立, 从事果树分子生物学研究。E-mail: yuazhe866853@163.com。通信作者: 张岚岚, 副教授, 博士, 从事果树品质生理与分子生物学研究。E-mail: zlanapple@yahoo.com.cn

Key words: horticulture; ripening-specific; *PMEI/InvI*; gene cloning; sequence analysis; citrus

成熟是果实生长发育的最终阶段,伴随着一系列生理生化反应,如细胞壁修饰,叶绿素分解,色素合成^[1-4],不仅直接关系果实色泽、风味、香气、质地等品质的形成,而且影响果实采后储藏保鲜的性能。分子生物学研究结果表明:果实成熟是成熟相关基因表达调控的结果。目前,关于果实成熟分子机理研究较多集中于呼吸跃变型果实,以番茄 *Lycopersicon esculentum* 为最^[1-2,4-5]。柑橘 *Citrus* 是世界性经济果树,其果实成熟调控对鲜食、储藏保鲜及加工品质都至关重要。研究柑橘果实成熟相关基因的表达及调控,对揭示果实成熟的分子机制和利用生物技术提高果实品质均有十分重要的意义。目前,有关柑橘果实成熟相关基因的研究报道不多, Jacob-Wilk 等^[6]发现类胡萝卜素生物合成相关基因 *Thi* 在柑橘果实发育过程中随着成熟度的增加其表达也逐渐增强。Liu 等^[7]利用 cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA-AFLP)技术分离获得柑橘果实成熟与衰老过程中特异表达的 *CitNAC* 基因。我们前期利用 cDNA-AFLP 技术分离获得了 1 个成熟相关基因 *CsPMEI/InvI* 片段,并利用实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术分析了该基因在不同组织器官和不同果实发育时期的时空表达,发现该基因为柑橘果实成熟特异表达基因^[8]。本研究拟以纽荷尔脐橙 *Citrus sinensis* 'Newhall' 成熟果实为试材,利用 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)克隆 *CsPMEI/InvI* 全长 cDNA,并进行生物信息学分析与功能预测,探讨该基因在柑橘果实成熟过程中的作用,为柑橘果实成熟机制研究与果实品质改良提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料和试剂

纽荷尔脐橙成熟果实取自浙江省宁波市象山县试验站,将果实果肉切成小块置于盛有液氮的冰壶内带回实验室, -80 °C 超低温冰箱保存备用。

克隆用的大肠埃希菌 *Escherichia coli* TG1 为本实验室保存; LA *Taq*®(DRR02AM)酶,载体 pMD18-T,凝胶回收试剂盒, DL2000 DNA Marker, 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒, 5'-Full RACE Kit 试剂盒及高保真 PCR 试剂盒等购自 TaKaRa 公司; PCR 引物委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取 纽荷尔脐橙成熟果实果肉总 RNA 的提取参考 Gasic 等^[9]方法。利用琼脂糖凝胶电泳及 UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津)检测质量和浓度。

1.2.2 *CsPMEI/InvI* 基因的 RACE 扩增 根据 Zhang 等^[8]获得的 *CsPMEI/InvI* 基因片段设计特异引物(表 1),由上海生工生物工程(上海)有限公司合成。以成熟果实总 RNA 为模板,分别参照 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 和 5'-Full RACE Kit 使用说明进行操作合成相应的 cDNA 第 1 条链。以 3' RACE cDNA 第 1 条链为模板, 3RACEUP1/3RACE out primer 和 3RACEUP2/3RACE inter primer 为引物,进行巢式 PCR 扩增。以 5'RACE cDNA 第 1 条链为模板, 5RACEDP1/5RACE out primer 为引物,进行 PCR 扩增。反应体系和程序参照试剂盒使用说明。将扩增获得目标 PCR 产物经过回收、克隆,并送至上海生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.2.3 *CsPMEI/InvI* 基因全长 ORF 的分离 利用 DNAMAN 软件将 3'RACE, 5'RACE 和 *CsPMEI/InvI* 片段进行拼接,获得 *CsPMEI/InvI* 基因 cDNA 全长序列,利用 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分析获得其开放性阅读框。根据开放性阅读框设计特异引物 ORFNcoUP 和下游引物 ORFBglDP(表 1)。以成熟果实 cDNA 为模板, ORFNcoUP 和 ORFBglDP 为引物,利用 PrimeSTAR®HS DNA Polymerase 高保真酶进行聚合酶链式反应(PCR), PCR 程序为: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 56 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。将目标产物经过回收、克隆,送至上海生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.2.4 *CsPMEI/InvI* 基因生物信息学分析 利用 DNAMAN 推测 *CsPMEI/InvI* 基因编码的氨基酸序列;利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站中的 BLAST 对获得的核苷酸和推导的氨基酸序列进行同源性比对;利用 InterProScan 4.8 软件对 *CsPMEI/InvI* 进行保守结构域分析;使用 ProtParam 分析氨基酸基本

表1 柑橘 *CsPMEI/InvI* 基因克隆所用引物Table 1 Primers for *CsPMEI/InvI* gene cloning

引物	编号	序列/(5'→3')
3' RACE 引物	3'RACEUP1 (上游引物)	CGATTCGCCGCTAGGCACCAA
	3'RACEUP2 (上游引物)	TCTGGGCAACCAACAAAAAGT
	3' RACE out primer (通用引物 1)	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
	3'RACE inter primer (通用引物 2)	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
5' RACE 引物	5'RACEDP1 (下游引物)	ATAACCTGAGAGGCACTGAA
	5' RACE out primer (通用引物)	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
ORF 引物	ORFNcoUP (上游引物)	CAACGATCCATGGCTAAGCTTTCC
	ORFBglDP (下游引物)	GAAGATCTACCATAGGTTTCTCGGTG

成分；利用 DNAMAN 软件进行氨基酸同源性比对及绘制系统进化树；利用 SignalIP 4.0 进行信号肽预测；利用 PredictProtein 分析蛋白功能结构域；用 SOPMA 预测蛋白质二级结构。

2 结果与分析

2.1 *CsPMEI/InvI* 基因全长 cDNA 序列的获得

以纽荷尔脐橙成熟果实总 RNA 的逆转录产物为模板，利用 3'RACE 技术，分别获得长度为 370 bp 和 196 bp 的目的条带(图 1A, B)。利用 5'RACE 技术，扩增获得大小为 240 bp 的目的条带(图 1C)。将已知目标基因片段和 3', 5'端序列利用 DNAMAN 拼接后，获得目标基因 cDNA 序列全长，共 945 bp，命名为 *CsPMEI/InvI*，GenBank 登录号：KC198084。根据开放性阅读框(ORF)序列，设计特异引物，进行高保真 PCR，获得长度为 618 bp 的 ORF 序列(图 1D)，编码 205 个氨基酸。

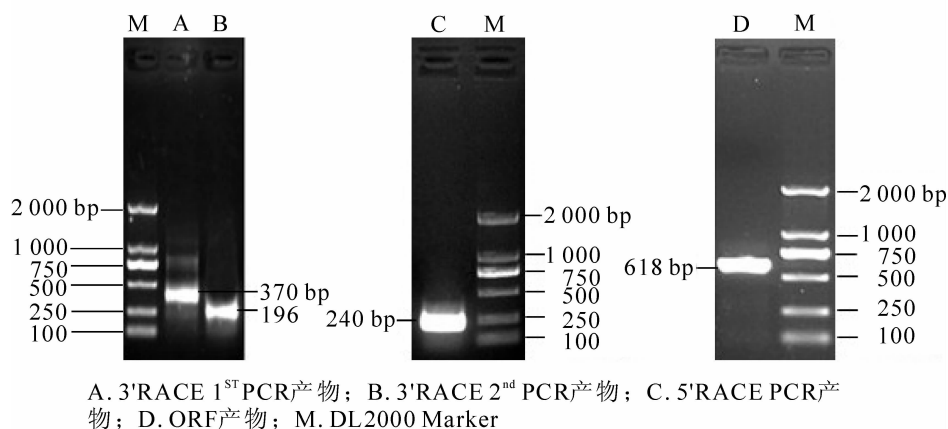


图1 纽荷尔脐橙 *CsPMEI/InvI* 基因 RACE 及 ORF 扩增电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR amplification for *CsPMEI/InvI* from *Citrus sinensis* 'Newhall'

2.2 *CsPMEI/InvI* cDNA 序列分析

2.2.1 *CsPMEI/InvI* 结构分析 利用 ProtParam 软件分析 *CsPMEI/InvI* 所编码的蛋白质相对分子量为 22.29 kDa，理论等电点为 9.84，分子式为 $C_{977}H_{1568}N_{296}O_{282}S_{10}$ 。InterProScan 4.8 分析表明：柑橘 *CsPMEI/InvI* 属于 InvI/PMEI 家族(图 2)。利用 PredictProtein 分析发现 *CsPMEI/InvI* 多肽链含有 InvI/PMEI 家族中保守的半胱氨酸(Cys)残基(图 3)，其中 4 个 Cys 残基形成 2 个分子内二硫键，第 5 个 Cys 残基具有 1 个自由的巯基^[10]。研究表明，DTT 处理可以破坏 Cys 间形成的分子内二硫键^[11]，从而减轻或使抑制子蛋白失去抑制作用，这说明保守位点 Cys 可能与抑制子功能有关，而第 5 个 Cys 的作用至今还未见报道^[12]。

此外，利用 PredictProtein 软件分析还发现该蛋白具有一些功能结构域：173~176 为 cAMP 和 cGMP-蛋白激酶磷酸化位点；38~40，118~120 和 202~204 为蛋白激酶 C 磷酸化位点；118~121 和 153~156 为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点；19~24，130~135 和 165~170 为 N-酰基化位点(图 3)。尽管在猕猴桃 *Actinidia*

deliciosa^[13]和无花果 *Ficus awkeotsang*^[14]中均报道了一些磷酸化位点，但是其作用目前尚不清楚^[13]。

SignalIP 4.0 软件分析显示 CsPMEI/InvI 多肽链 1~23 位氨基酸为信号肽，其分值为 0.795，由于在多肽链 N 端 24 位处存在 1 个 Ala 残基，所以推测在 23 与 24 位之间存在 1 个信号肽的剪切位点^[12]，其分值为 0.450(图 4)。利用 SOPMA 软件预测 CsPMEI/InvI 蛋白二级结构发现，该蛋白由大量的 α -螺旋、无

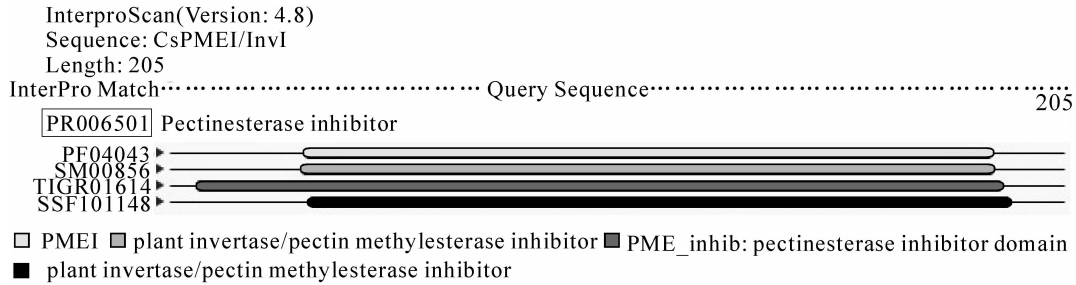


图 2 CsPMEI/InvI 的 InterProScan4.8 分析结果

Figure 2 Analysis results of CsPMEI/InvI with InterProScan4.8

```

1 AATAATAGTAGTCTGTCTTTCTGTTGCACAAAGATATATGGGCTAAGCTTTCCCTTTTCTC
                                     M A K L S L F S
61 ACTAGCTCTCTTCTCCACCTTTACTTGGCTGGAATGGCAGAATCTGCCATTCCCGGGCA
   L A L F F H L Y L A G M A E S A I P G H
121 TTCCACTCCCACAACTTTATCAGAAATTCGTGTAGAGCCACTCGATATCCAGCGTTATG
   S T P A N F I R N S C R A T R Y P A L C
181 CGTTCAGTGCCTCTCAGGTTATGGTCATGCCATCCGAAATGAGCATCAGCTTGCTGTAAC
   V Q C L S G Y G H A I R N E H Q L A V T
241 TGCCTTGTCCAGTGTAGCTTAAGCAGGGCACGGTCAGCTGCTGCTTTTGTGGCAAGCTGAC
   A L S V S L S R A R S A A A F V G K L T
301 TAAAGTTAGGGGAATCAAGAAGAGAGAGTTCCTAGCTGTGAAAGATTGCATAGAGAACAT
   K V R G I K K R E F L A V K D C I E N M
361 GGGTGACGGCGTAGACCGACTTAGTCAATCCGTCAGGGAGCTTGGCCATGTGGGACGAGC
   G D G V D R L S Q S...V...R...E L G H V G R A
421 TGTCGCCAGACTTTACGTGGCAGTGTAGTGTGAGACTTGGGTTAGTGGCCGACT
   V G Q D F T W H M S S V Q T W V S A A L
481 AACTGATGAGAACACTTGGCTTAGAAGGTTTTGATGGTCGTTTCATGGATGAAATGTAAA
   T D E N T C L E G F D G R F M D G N V K
541 GGCTGCGATCAGGAGAAGGGTCACAAATGTTGCCAAGTCACTAGTAACGCTCTTGCTTT
   A A I R R V T N V A Q V T S N A L A L
601 GGTAAATCGATTCGCCGCTAGGCACCAAGCTGCAGCAGTCACCGAGAAGCCTTAGATTTC
   V N R F A A R H Q A A A V T E K P *
661 GTCTAAGGTGACCTCTGCTGTCTTCTGTATAATATGGTATCTCAATATGATATCCCTTAG
721 GTTCGTGCTTAGTCTAGTTTCTGTCTTATATAAGAAAGTTTGGTTTTCTGGGCAACCAAC
781 AAAAAAGTACAGTCAGTATCTAAACATAAGAGTTTGTGTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGTTG
841 TTGTTGTTTTTTTTCCCTCTTTTAAAGATACTTGAGTTTTGTTTAAATAAAATAAAACTAA
901 ATGAAGCTAAAGAGTGTGCCAACTATTGCTTTGAAAAAAAAAAAAA
    
```

黑体 ATG 和 TAG 分别为起始密码子和终止密码子；波浪下划线为 cAMP 和 cGMP-蛋白激酶酸化位点；点式下划线为酪蛋白激酶 II 磷酸化位点；虚线下划线为 N-酰基化位点；边框内为蛋白激酶 C 磷酸化位点；斜体字为 InvI/PMEI 家族中 Cys 保守序列

图 3 CsPMEI/InvI 的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Figure 3 cDNA sequence of CsPMEI/InvI and its deduced amino acid sequence

规则卷曲和 β -折叠结构组成，其中 α -螺旋结构有 143 个，占 69.76%，无规则卷曲 58 个，占 28.29%，而 β -折叠均有 4 个，占 1.95%(图 5)。由此可知：CsPMEI/InvI 蛋白二级结构主要以 α -螺旋存在，与 PMEI^[12]的二级结构相符合。

2.2.2 CsPMEI/InvI 推导的氨基酸序列的同源性及其系统进化分析 将 CsPMEI/InvI 推导的氨基酸与 GenBank 中登录的 InvI/PMEI 家族中部分物种氨基酸序列进行同源性比对。结果表明：这些氨基酸的 C 端序列相对

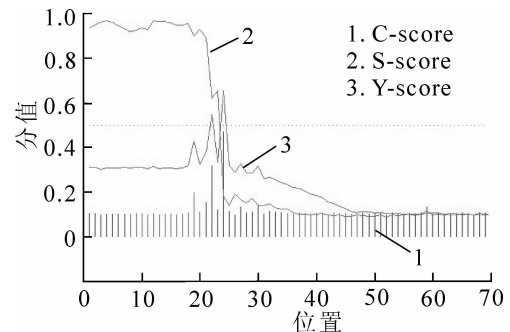


图 4 CsPMEI/InvI 信号肽预测

Figure 4 Predicted results of CsPMEI/InvI signal peptide

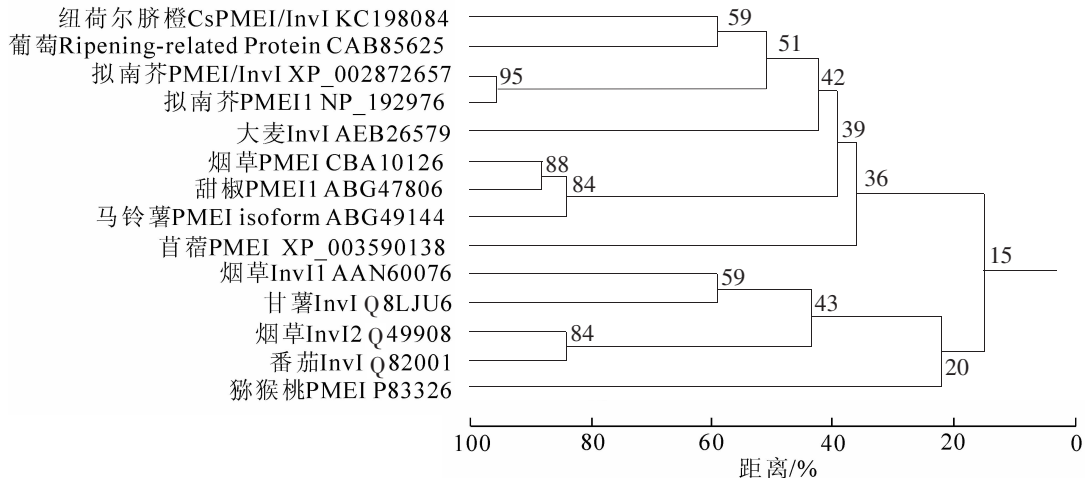


图 7 CsPMEI/InvI 与 InvI/PMEI 家族中部分物种氨基酸序列的聚类分析

Figure 7 Cluster analysis of amino acid sequence of CsPMEI/InvI and part of species from InvI/PMEI family

最近研究发现, 转化酶抑制子(InvI)和果胶甲酯酶抑制子(PMEI)在翻译后水平上能分别调控 Inv 和 PME 的活性^[19-20]。

目前, 关于 PMEI 和 InvI 已有较多研究报道。据报道多种植物如猕猴桃 *Actinidia chinensis*^[21-22], 马铃薯^[23], 无花果^[14]和香蕉 *Musa sapientum*^[24]等均存在 PMEI。猕猴桃果实 PMEI 蛋白能专一性抑制 PME 活性, 其编码基因在果实成熟期表达增强^[21-22]。InvI 在杏 *Prunus armeniaca*^[25], 甘薯^[26], 番茄^[19]和烟草^[27]等植物中均有报道。Greiner 等^[27]将烟草中编码 InvI 的 cDNA 在马铃薯转基因植物中进行表达, 发现在转基因马铃薯块茎中, 低温诱导还原糖的含量降低了 75%, 而对马铃薯块茎产量没有任何影响, 表明抑制子对 Inv 具有抑制作用。PMEI 和 InvI 不仅在基因序列上具有同源性, 同时在蛋白结构与功能上也具有相似性。Scognamiglio 等^[25]从杏成熟果实中分离获得 InvI 蛋白, 该蛋白能抑制番茄液泡转化酶的活性, 经分析发现该 InvI 与 PMEI 分子量相似, 部分氨基酸序列显示高度同源, 在蛋白质结构性能和二硫键排布上具有一致性。InvI/PMEI 家族成员间的同源性较低, 但是 PMEI(或 InvI)能特异地抑制 PME(或 Inv)活性^[25]。一些研究者认为^[11]该家族中保守的 Cys 可能更多地与 InvI 的功能有关。有些研究发现, 猕猴桃 PMEI 的一些氨基酸残基(Asn101, Asp109, Thr113 和 Asn147 等)通过与 PME 中的 3 个芳香氨基酸残基(Phe80, Tyr135 和 Trp223)形成分子间氢键相互作用, 而它们只存在于 PMEIs 中^[28]。目前, InvI 与 PMEI 在柑橘果实发育成熟过程中的作用还有待研究。

利用生物信息学手段对获得的 *CsPMEI/InvI* 全长 cDNA 进行结构和功能分析、预测, 发现该基因编码蛋白与 PMEI^[12]具有相似的二级结构, 即主要以 α -螺旋结构存在; 其编码的氨基酸与拟南芥 PMEI1 (NP_192976)的氨基酸同源性最高, 达到 58.1%; 而且该蛋白含有 InvI/PMEI 家族中保守的 4 个 Cys 残基, 此外还有 1 个自由的 Cys, 目前在转化酶抑制子中只发现含有 4 个保守的 Cys 残基^[15], 而在果胶甲酯酶抑制子中含有 5 个 Cys 残基^[12]。基于以上分析, 我们初步推断 *CsPMEI/InvI* 基因编码的蛋白应该为果胶甲酯酶抑制子(PMEI), 该蛋白可能通过调节 PME 的活性来调控果实品质, 但它在果实发育成熟过程中的具体作用机制还需要进一步的研究来证实。

参考文献:

- [1] FRAY R G, GRIERSON D. Molecular genetics of tomato fruit ripening [J]. *Trends in Genet*, 1993, **9**: 438 - 443.
- [2] SCHUCH W, BIRD C R, RAY J, *et al.* Control and manipulation of gene expression during tomato fruit ripening [J]. *Plant Mol Biol*, 1989, **13**: 303 - 311.
- [3] BARSAN C, SANCHEZ-BEL P, ROMBALDI C, *et al.* Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis [J]. *J Expl Bot*, 2010, **61** (9): 2413 - 2431.
- [4] KEVANY B M, TIEMAN D M, TAYLOR M G, *et al.* Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit [J]. *Plant J*, 2007, **51**: 458 - 467.
- [5] PALMA J M, CORPAS F J, DEL RIO L A. Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiol-

- ogy of fruit development and ripening [J]. *J Prot*, 2011, **74** (8): 1230 – 1243.
- [6] JACOB-WILK D, GOLDSCHMIDT E E, RIOV J, *et al.* Induction of a citrus gene highly homologous to plant and yeast thi genes involved in thiamine biosynthesis during natural and ethylene-induced fruit maturation [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, **35**: 661 – 666.
- [7] LIU Yongzhong, BAIG M N, FAN, *et al.* Identification and expression pattern of a novel NAM, ATAF, and CUC-Like gene from *Citrus sinensis* Osbeck [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2009, **27** (3): 292 – 297.
- [8] ZHANG Lanlan, CHEN Kunsong, XU Changjie. Identification and characterization of transcripts differentially expressed in peel and juice vesicle of immature and ripe orange (*Citrus sinensis*) fruits [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2008, **26** (2): 121 – 132.
- [9] GASIC K, HERNANDEZ A, KORBAN S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2004, **22**: 437a – 437g.
- [10] HOTHORN M, WOLF S, ALOY P, *et al.* Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins [J]. *Plant Cell*, 2004, **16** (12): 3437 – 3447.
- [11] GREINER S, KÖSTER U, LAUER K, *et al.* Plant invertase inhibitors: expression in cell culture and during plant development [J]. *Aust J Plant Physiol*, 2000, **27**: 807 – 814.
- [12] GIOVANE A, SERVILLO L, BALESTRIERI C, *et al.* Pectin methylesterase inhibitor [J]. *Biochim et Biophys Acta*, 2004, **1696** (2): 245 – 252.
- [13] IRIFUNE K, NISHIDA T, EGAWA H, *et al.* Pectin methylesterase inhibitor cDNA from kiwi fruit [J]. *Plant Cell Rep*, 2004, **23**: 333 – 338.
- [14] JIANG C M, LI C P, CHANG J C, *et al.* Characterization of pectinesterase inhibitor in jelly fig (*Ficus avkeotsang* Makino) achenes [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, **50**: 4890 – 4894.
- [15] RAUSCH T, GREINER S. Plant protein inhibitors of invertases [J]. *Biochim et Biophys Acta*, 2004, **1696**: 253 – 261.
- [16] JOLIE R P, DUVETTER T, HOUBEN K, *et al.* Carrot pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: study of activity, stability and inhibition [J]. *Innovative Food Sci Emerging Technol*, 2009, **10**: 601 – 609.
- [17] HOTHORN M, ENDE W V D, LAMMENS W, *et al.* Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2010, **40** (107): 17427 – 17432.
- [18] LUDIKHUYZE L, VAN LOEY A, INDRAWATI, *et al.* Effects of combined pressure and temperature on enzymes related to quality of fruits and vegetables: from kinetic information to process engineering aspects [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2003, **43** (5): 527 – 586.
- [19] JIN Yue, NI Di'an, RUAN Yongling. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level [J]. *Plant Cell*, 2009, **21**: 2072 – 2089.
- [20] DEDEURWAERDER S, MENU-BOUAOUICHE L, MARECK A, *et al.* Activity of an atypical *Arabidopsis thaliana* pectin methylesterase [J]. *Planta*, 2009, **229** (2): 311 – 321.
- [21] BALESTRIERI C, CASTALDO D, GIOVANE A, *et al.* A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*) [J]. *Eur J Biochem*, 1990, **193**: 183 – 187.
- [22] GIOVANE A, BALESTRIERI C, QUAGLIUOLO L, *et al.* A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit purification by affinity chromatography and evidence of a ripening-related precursor [J]. *Eur J Biochem*, 1995, **233**: 926 – 929.
- [23] MCMILLAN G P, PÉROMBELON M C M. Purification and characterization of a high pI pectin methyl esterase isoenzyme and its inhibitor from tubers of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* 'Katahdin' [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1995, **46**: 413 – 427.
- [24] WU M C, TSENG K C, HUANG T H, *et al.* Pectinesterase inhibitor in rubbery banana (*Musa sapientum* L.) [J]. *J Food Sci*, 2002, **67** (4): 1337 – 1340.
- [25] SCOGNAMIGLIO M A, CIARDIELLO M A, TAMBURRINI M, *et al.* The plant invertase inhibitor shares structural properties and disulfide bridges arrangement with the pectin methylesterase inhibitor [J]. *J Prot Chem*, 2003, **22** (3): 363 – 369.
- [26] HUANG G J, SHEU V, CHANG Y S, *et al.* Isolation and characterization of invertase inhibitor from sweet potato storage roots [J]. *J Sci Food Agric*, 2008, **88**: 2615 – 2621.
- [27] GREINER S, RAUSCH T, SONNEWALD U, *et al.* Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**: 708 – 711.
- [28] MATTEO A D, GIOVANE A, RAIOLA A, *et al.* Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein [J]. *Plant Cell*, 2005, **3** (17): 849 – 858.