

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.07.019

## BcMid1 蛋白原核表达及其与绿原酸的作用

马志桃, 胡婷婷, 张丹凤, 叶应旺

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

**摘要:** Mid1 蛋白是真菌钙通道蛋白, 在维持细胞钙稳态方面发挥着重要作用。文章为探讨绿原酸对灰霉 (*Botrytis cinerea*) 生长的抑制与钙之间的关系, 利用平板实验观察绿原酸存在条件下外源钙离子对灰霉生长的影响, 并构建 BcMid1 原核表达载体, 在大肠杆菌 Rosetta 菌株中诱导 BcMid1 蛋白表达, 利用绿原酸的荧光特性探究 BcMid1 蛋白与绿原酸的体外结合情况。结果显示, 钙离子可以降低绿原酸对灰霉的生长抑制。成功构建的 pET-28a::BcMid1 重组载体可以在 Rosetta 菌株中表达 BcMid1 蛋白, SDS-PAGE 和荧光定量检测发现绿原酸和 BcMid1 蛋白可以结合, 结合常数为  $3.93 \times 10^4$  mol/L。结果表明, 绿原酸对灰霉的抑制与钙摄入相关, 并且 BcMid1 蛋白是绿原酸的潜在作用靶点。该文为进一步研究绿原酸对灰霉的抑制机理奠定了基础。

**关键词:** 灰霉; Mid1 基因; 绿原酸; 原核表达; 荧光

**中图分类号:** Q786

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1003-5060(2023)07-0986-05

## Prokaryotic expression of BcMid1 and its interaction with chlorogenic acid

MA Zhitao, HU Tingting, ZHANG Danfeng, YE Yingwang

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

**Abstract:** Mid1 protein is a fungal calcium channel protein that plays an important role in maintaining cellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) homeostasis. To study the relationship between the inhibitory effect of chlorogenic acid on the growth of *Botrytis cinerea* and  $\text{Ca}^{2+}$ , a plate inhibition experiment was applied to observing the effects of exogenous  $\text{Ca}^{2+}$  on *B. cinerea* growth with the presence of chlorogenic acid. A BcMid1 prokaryotic expression vector was constructed and the BcMid1 protein was expressed in *E. coli* Rosetta. The fluorescence characteristics of chlorogenic acid were used to investigate the *in vitro* binding of BcMid1 protein to chlorogenic acid. The results showed that  $\text{Ca}^{2+}$  could reduce the inhibition of chlorogenic acid on the growth of *B. cinerea*. The pET-28a::BcMid1 recombinant vector was successfully constructed and BcMid1 protein was expressed in Rosetta strain. SDS-PAGE and fluorescence quantification showed that chlorogenic acid and BcMid1 protein could bind, and their binding affinity was  $3.93 \times 10^4$  mol/L. These results indicate that the inhibition of chlorogenic acid on *B. cinerea* is associated with  $\text{Ca}^{2+}$  influx of *B. cinerea* cells, and BcMid1 protein is a potential target of chlorogenic acid. It lays a foundation for further study of the antifungal mechanism of chlorogenic acid on *B. cinerea*.

**Key words:** *Botrytis cinerea*; Mid1 gene; chlorogenic acid; prokaryotic expression; fluorescence

灰霉 (*Botrytis cinerea*) 是一种重要的植物病原真菌, 其寄主有 1 400 种, 包括多种重要粮食和经济作物<sup>[1]</sup>。该病原菌具有广泛的遗传变异性和

适应性, 在寒冷、干旱、饥饿等条件下可产生菌核以提高对不良环境压力的抗性, 因此十分难以控制<sup>[2]</sup>。

**收稿日期:** 2022-03-29; **修回日期:** 2022-05-17

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (31500214)

**作者简介:** 马志桃 (1997—), 女, 山西晋中人, 合肥工业大学硕士生;

张丹凤 (1985—), 女, 安徽安庆人, 博士, 合肥工业大学副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: zhangdanfeng@hfut.edu.cn;

叶应旺 (1977—), 男, 安徽望江人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师。

绿原酸又称 5-*o*-咖啡基奎宁酸,在植物中广泛存在<sup>[3]</sup>,具有调节人体糖代谢和脂代谢、诱导减肥、降血压、消炎、抗氧化等多种健康益处<sup>[4]</sup>,用于采后保鲜可延长水果货架期<sup>[5]</sup>。绿原酸还有广谱抗菌活性,具有作为生物杀菌剂的潜力。据报道绿原酸可上调拟茎点霉钙转运蛋白相关基因的表达<sup>[6]</sup>。本课题组之前的研究发现,绿原酸可引起真菌内质网应激,使内质网的钙离子释放到细胞质,破坏真菌细胞内钙稳态。但关于绿原酸对真菌外源钙摄入影响的相关报道较少。

真菌细胞膜上 Cch1 和 Mid1 组成的钙通道,感知施加于细胞壁和质膜的多种机械压力信号,允许  $\text{Ca}^{2+}$  快速流入细胞质,从而激活一系列靶基因表达,以维持细胞在环境压力下的生长<sup>[7-8]</sup>。Mid1 基因缺失会导致真菌径向生长速度减慢,但在培养基中添加外源性  $\text{CaCl}_2$  后可缓解 Mid1 敲除株的生长缺陷<sup>[9]</sup>。结合绿原酸对灰霉菌生长的抑制现象,本文推测绿原酸通过 Mid1 影响灰霉菌正常的钙流活动以达到抑制效果。因此,本研究在验证外源性钙可缓解绿原酸对灰霉菌生长抑制的基础上,探讨了绿原酸是否通过与 Mid1 蛋白互作抑制灰霉菌生长,为深入研究绿原酸抑制灰霉菌的生长机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

#### 1.1.1 菌株与载体

灰霉菌株(*Botrytis cinerea*, FJH5)来自中国农业大学种子健康中心;大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、Rosetta 以及蛋白原核表达载体 pET-28a(+)均存于合肥工业大学食品与生物工程学院实验室-80 °C 冰箱,该表达载体携带 6 $\times$ His 标签。

#### 1.1.2 试剂

绿原酸(纯度 $\geq$ 98%)购于北京百灵威科技有限公司;Taq DNA Polymerase、dNTPs、苯甲基磺酰氟(PMSF)、过硫酸铵(Aps)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸、30%丙烯酰胺(Acr)、四甲基乙二胺(TEMED)、硫酸卡那霉素均购于合肥博美生物科技有限责任公司;TransStartFastPfu DNA Polymerase、Quick Gel Extraction Kit 均购于北京全式金生物技术有限公司;Tianprep Mini Plasmid Kit 购于天根生化科技(北京)有限公司;T4 DNA Ligase、限制性内切酶(*Nde* I、*Xho* I)购于 New England Biolabs;DNA Marker(2 000/10 000 bp)、异丙基- $\beta$ -

D-硫代半乳糖苷(IPTG)、Mag-Beads His-Tag 蛋白纯化磁珠、PEG20000 均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白 Marker 购于 Thermo scientific;His-Tag (D3I10) XP Rabbit mAb 购于 Cell Signaling Technology;Goat Anti-Rabbit IgG 购于博士德生物。

#### 1.1.3 仪器设备

霉菌培养箱购于上海博讯实业有限公司医疗厂;立式高压蒸汽灭菌锅购于上海申安医疗器械厂;台式高速冷冻离心机购于湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;超声波破碎仪购于江苏海思睿智能科技有限公司;聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)扩增仪、蛋白小垂直板电泳槽、电泳仪电源均购于美国 BIO-RAO;化学发光凝胶成像系统购于上海天能科技有限公司;LAS4000mini 分子影像仪购于日本 Cytiva;LS-55 荧光分光光度计购于美国 Perkin Elmer 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 $\text{Ca}^{2+}$ 对灰霉菌丝生长的影响

用直径为 5 mm 的无菌打孔器取 7 d 左右菌龄的灰霉菌饼,分别接种于直径为 35 mm 的含 3 g/L 绿原酸的察氏(CD)培养基、添加 50 mmol/L  $\text{CaCl}_2$  的 CD 培养皿中心,倒置于 25 °C 霉菌培养箱中培养,观察菌落直径及生长状态。以不含绿原酸的 CD 培养基作为对照,每个处理进行 3 个重复,整个实验重复 3 次。

### 1.2.2 基因克隆

在 NCBI 数据库下载 *BcMid1* 目的基因登录号,利用 Primer Premier5 软件设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列(5'→3')如下:

F:CATATGCCTCTGCCAAAACCTCAGTCC,  
R:CTCGAGTCAGATGCCGCTCAACATGA。

以灰霉 cDNA 为模板,用高保真酶(Pfu 酶)进行 PCR 扩增,退火温度为 58 °C,得到目的基因片段。

### 1.2.3 重组质粒的构建

1) 双酶切。将 PCR 产物与蛋白表达载体 pET-28a 分别用限制性核酸内切酶 *Nde*I、*Xho*I 进行双酶切,37 °C 酶切 2 h,经琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收。

2) 连接。酶切后的胶回收产物用 T4 连接酶 16 °C 过夜连接。

3) 转化。连接产物转到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态中,涂布在含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸卡那霉素的 LB

培养基上过夜培养。

4) 鉴定。挑取长势良好的单克隆菌株摇菌, 菌落 PCR 鉴定, 取与阳性对照条带一致的菌液提取质粒双酶切验证是否可切开, 若能切开则送菌液测序。

#### 1.2.4 目的蛋白的原核表达及纯化

1) 将构建好的重组质粒 pET-28a :: *BcMid1* 转入大肠杆菌 Rosetta 感受态中, 选取阳性菌株扩大培养后, 加入 0.5 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导剂, 16 °C 诱导 10 h, 离心收集菌体。

2) 用 pH 值为 7.0 的 PBS 重悬菌体, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 PMSF、0.2 mg/mL 的溶菌酶, 静置 30 min, 超声破碎, 离心收集上清, 获得粗蛋白提取液, SDS-PAGE 检测目的蛋白表达情况。

3) 将粗蛋白提取液与 His 标签蛋白纯化磁珠 4 °C 孵育 1 h, 使目的蛋白与磁珠充分结合, 随后用含不同浓度咪唑的洗脱缓冲液从低到高梯度洗脱蛋白, 收集得到纯度较高的 *BcMid1* 蛋白。之后用透析袋在 4 °C 透析 12 h 以除去蛋白中的咪唑。

4) 将得到的 *BcMid1* 目的蛋白用 Western Blot 鉴定。*BcMid1* 蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 转到 PVDF 膜上, 膜依次用 5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h, His 标签兔抗室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 随后用现配的曝光液浸湿膜, 在提前预冷的分子影像仪上曝光。

#### 1.2.5 目的蛋白与绿原酸的体外相互作用

将 *BcMid1* 蛋白与 1 mmol/L 绿原酸 37 °C、100 r/min 避光孵育 2 h, 制备 2 份完全相同的蛋白胶进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。一份经考马斯亮蓝 R250 染色后 10% 醋酸脱色观察 *BcMid1* 蛋白条带位置; 另一份直接经荧光凝胶成像系统观察荧光位置。对比观察蛋白条带位置是否与荧光位置重合。参考文献[10]用荧光分光光度计进行绿原酸荧光测量。将绿原酸浓度固定在 10  $\mu$ mol/L, 室温下向含绿原酸的水溶液中依次等量滴加 *BcMid1* 蛋白, 混匀后检测 0~15.0  $\mu$ mol/L 范围内的 *BcMid1* 蛋白随浓度升高对绿原酸荧光强度的影响。并且以 *BcMid1* 蛋白浓度为横坐标, 绿原酸荧光强度为纵坐标绘制散点图, 观察两者的关系。其中激发波长 350 nm, 发射波长 600 nm, 激发和发射的狭缝宽度为 15 nm。参考文献[11], 根据 Stern-Volmer equation 计算绿原

酸与 *BcMid1* 蛋白的结合常数  $K_a$ , 即

$$\frac{F}{F - F_0} = 1 + \frac{1}{K_a} \frac{1}{c},$$

其中:  $F_0$ 、 $F$  分别为绿原酸中加入 *BcMid1* 蛋白前后的荧光强度;  $c$  为 *BcMid1* 蛋白浓度;  $K_a$  为两者的结合常数。

## 2 结果与分析

### 2.1 $Ca^{2+}$ 对灰霉菌落扩展的影响

利用 CD 培养基对灰霉进行钙饥饿培养, 探讨  $Ca^{2+}$  对灰霉菌落生长的影响, 结果如图 1 所示。3 个培养基分别为 CD(培养基 1)、含 3 g/L 绿原酸的 CD(培养基 2)、含 3 g/L 绿原酸和 50 mmol/L  $CaCl_2$  的 CD(培养基 3)。培养 3 d 后, 与对照组相比, 添加绿原酸后菌落直径降低 38.59%, 而在绿原酸存在条件下添加  $Ca^{2+}$  后灰霉菌落直径降低 22.63%, 说明在察氏培养基中添加  $Ca^{2+}$  可降低绿原酸对灰霉的抑菌作用 ( $P < 0.05$ ), 表明绿原酸对灰霉的抑制与  $Ca^{2+}$  相关。

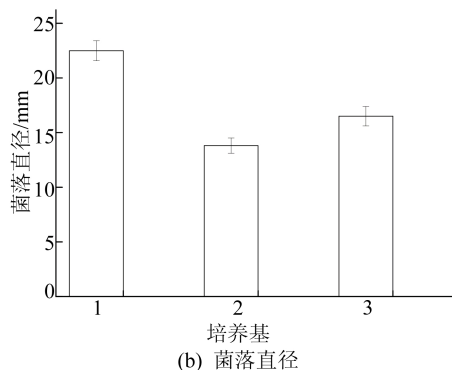
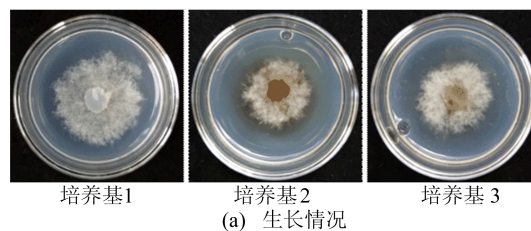


图 1  $Ca^{2+}$  对灰霉菌落扩展的影响

### 2.2 pET-28a :: *BcMid1* 重组质粒的构建

以灰霉 cDNA 为模板, 扩增 *BcMid1* 基因片段, 结果如图 2a 所示。图 2 中, M 为 DNA Marker, 泳道 1 为 PCR 产物。由图 2 可知, 得到与预期大小(2 022 bp)一致的特异性条带, 由此判断已扩增出 *BcMid1* 目的基因片段。*BcMid1* 基因扩增产物与 pET-28a 表达空载体经双酶切、胶回收后, 连接产物转化于 *E. coli* DH5 $\alpha$  过夜培养, 观察到平板上的单克隆菌株圆润饱满, 生长状态良

好。菌落 PCR 鉴定结果如图 2b 所示,2、3、4 号单克隆菌液与 1 号阳性对照大小一致,5 号为阴性对照,说明这 3 株菌为潜在阳性菌株。

将上述 2 号和 3 号菌株扩大培养提取质粒,进行 10  $\mu$ L 体系酶切验证,结果如图 2c 所示。图 2c 中:M 为 DNA Marker;泳道 1 和泳道 3 分别为 2 号菌液的质粒、酶切产物;泳道 2 和泳道 4 分别为 3 号菌液的质粒、双酶切产物。结果显示,提取的 2 个质粒均可酶切成 2 个条带,且条带大小与 pET-28a 空载(5 369 bp)、*BcMid1* 基因(2 022 bp)大小一致,表明目的基因片段成功连上载体。

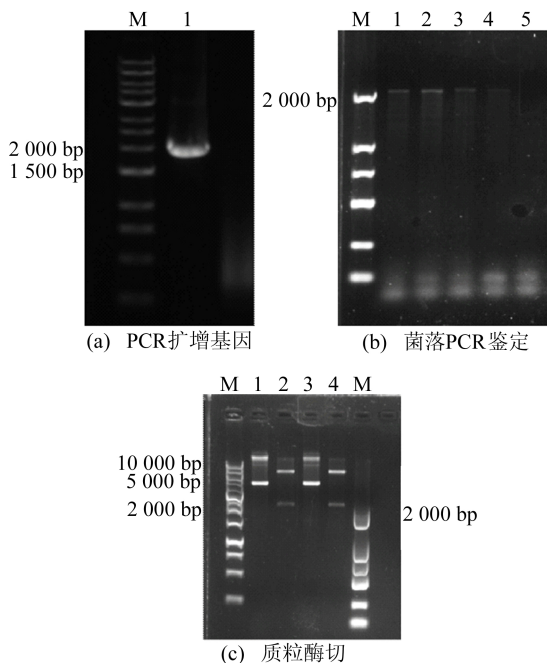


图 2 重组质粒的构建

选 2 号菌株送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果显示基因序列正确,表明重组质粒构建成功。

### 2.3 BcMid1 蛋白在 Rosetta 菌株中的原核表达

*E. coli* Rosetta 是表达型菌株,将重组质粒 pET-28a::*BcMid1* 转入其中,在 IPTG 诱导下可大量表达目的蛋白。Ni-NTA 琼脂糖珠可纯化携带 His 标签的 BcMid1 蛋白,经咪唑梯度洗脱获得纯度较高的 BcMid1 蛋白。经 4  $^{\circ}$ C 过夜透析除去咪唑和 PEG20000 浓缩后,进行 Western Blot 鉴定,结果如图 3 所示,M 为蛋白 Marker。由图 3a 可知,泳道 1 和泳道 2 为 BcMid1 蛋白,经纯化透析后蛋白条带单一明亮,说明获得的 BcMid1 蛋白质量较高。由图 3b 可知,泳道 1 和泳道 2 为 WB 曝光后的蛋白条带,条带大小符合预

期,说明收集的蛋白即为 BcMid1 蛋白。

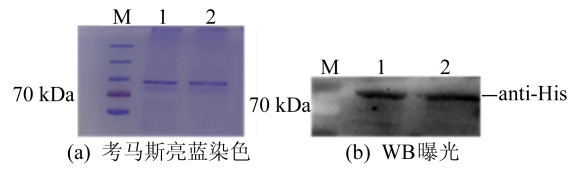


图 3 目的蛋白的表达纯化和 Western Blot 检测结果

### 2.4 BcMid1 蛋白与绿原酸的体外相互作用

将 BcMid1 蛋白与绿原酸孵育,结果如图 4 所示,M 为蛋白 Marker。由图 4a 可知,泳道 1 为孵育液经 SDS-PAGE 凝胶电泳后 BcMid1 蛋白条带位置。由图 4b 可知,泳道 1~泳道 3 为 BcMid1 蛋白条带位置观察到的荧光(绿原酸自发荧光),表明 BcMid1 蛋白是绿原酸作用于灰霉的潜在作用靶点。

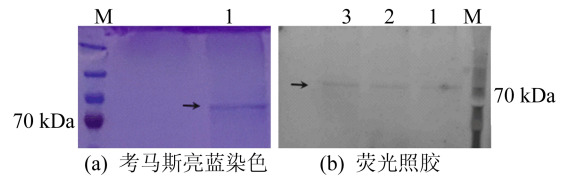
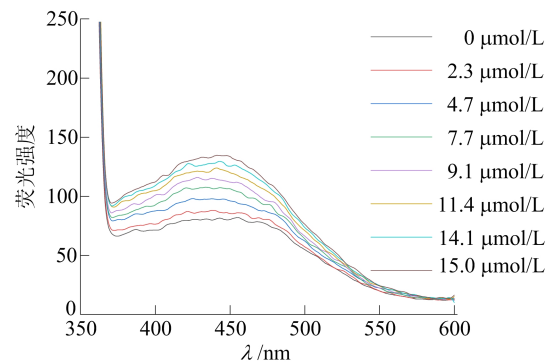
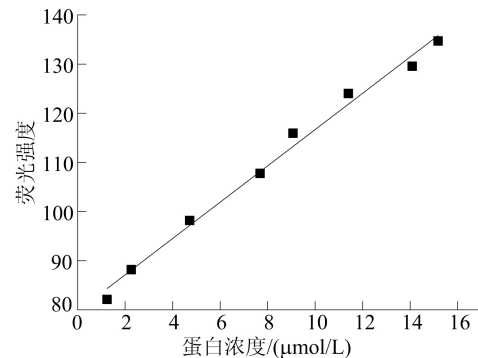


图 4 目的蛋白与绿原酸的结合

绿原酸荧光强度的变化可以初步反映其与 BcMid1 蛋白的结合情况,如图 5 所示。



(a) 绿原酸与BcMid1结合的荧光光谱



(b) 绿原酸荧光强度与BcMid1浓度关系

图 5 目的蛋白对绿原酸荧光强度的影响

由图 5a 可知,在 350 nm 激发下绿原酸在水中的荧光较弱,但随着 BcMid1 蛋白浓度的增加,绿原酸的荧光强度不断增强,这可能是由于两者结合形成复合物,使绿原酸在水溶液中的溶解度增加荧光增强。由图 5b 可知,在一定范围内绿原酸荧光强度与 BcMid1 蛋白浓度线性相关。根据计算可得  $K_a = (3.93 \pm 0.47) \times 10^4$  mol/L,这一现象进一步为绿原酸与 BcMid1 蛋白的体外结合提供了证据。

### 3 结 论

据报道钙稳态在真菌致病性和生长过程中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。本文发现,在不含钙的察氏培养基中,绿原酸导致灰霉对钙缺乏敏感度增加,而加入  $Ca^{2+}$  会缓解绿原酸对灰霉的抑制,且添加  $Ca^{2+}$  后菌丝生长更为茂盛。这与前人研究发现的钙离子可促进菌丝生长结果一致<sup>[12]</sup>。因此本文推测绿原酸对灰霉的抑制与钙摄入相关。

Mid1 蛋白是真菌特异性蛋白,与钙稳态密切相关。研究表明,Mid1 缺失的真菌突变株在低  $Ca^{2+}$  培养基中的生长速率降低<sup>[13]</sup>。这与本文研究发现的绿原酸胁迫下灰霉的生长对低  $Ca^{2+}$  敏感结果一致,表明绿原酸对灰霉的抑制可能与 Mid1 有关。通过 SDS-PAGE 和荧光定量检测发现,绿原酸和 BcMid1 蛋白可以结合且  $K_a = (3.93 \pm 0.47) \times 10^4$  mol/L,因此本文推测绿原酸通过结合 BcMid1 蛋白抑制灰霉  $Ca^{2+}$  流入,使胞内钙稳态失调,从而抑制灰霉生长、削弱致病力。但两者不同条件下的结合效率和结合能力、结合位点以及结合后对目的蛋白构象的改变还有待进一步研究。后续本课题组将通过分子对接模拟等手段多方式验证绿原酸与 BcMid1 蛋白的互作。

综上所述,本文通过体外平板实验发现绿原酸对灰霉的抑制与钙摄入相关。通过构建表达载体、利用大肠杆菌原核表达系统表达 BcMid1 蛋白,体外分析绿原酸与 BcMid1 蛋白的结合作用,初步发现 BcMid1 蛋白与绿原酸存在相互作用。本文为绿原酸通过 BcMid1 蛋白抑制钙通道,以降低灰霉生长和致病力的作用提供了初步证据,为揭示绿原酸对灰霉的潜在抑菌机理提供了方向。

### [参 考 文 献]

- [1] PETRASCH S, KNAPP S J, KAN J A L V, et al. Grey-mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(6): 877-892.
- [2] 花晨艳. 姜黄素对猕猴桃灰霉病抑制作用机理研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2019.
- [3] SANTANA-GÁLVEZ J, CISNEROS-ZEVALLOS L, JACOBO-VELÁZQUEZ D. Chlorogenic acid: recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome[J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 358.
- [4] 韩宇东. 杜仲叶绿原酸的提取、分离纯化及其抗氧化和降脂研究[D]. 遵义:遵义医学院, 2011.
- [5] 王轩, 包飞, 陈旭. 蒲公英中绿原酸酶法提取工艺及其对圣女果保鲜效果研究[J]. *农产品加工*, 2019(20): 39-43, 46.
- [6] 开凯. 绿原酸对猕猴桃和樱桃番茄采后病原菌抑制作用及机理研究[D]. 合肥:合肥工业大学, 2020.
- [7] LI W, SHRIVASTAVA M, LU H, et al. Calcium-calmodulin signaling pathway in *Candida albicans*: a potential drug target [J]. *Microbiological Research*, 2021, 249(2): 126786.
- [8] MISHRA R, MINC N, PETER M. Cells under pressure: how yeast cells respond to mechanical forces[J]. *Trends in Microbiology*, 2021(20): 34.
- [9] PATRICIA A D C, JESSICA C, WINKELSTRTER L K, et al. The involvement of the Mid1/Cch1/Yvc1 calcium channels in *aspergillus fumigatus* virulence [J]. *PLOS ONE*, 2014, 9(8): e103957.
- [10] SNEHARANI A, KARAKKAT J, SINGH S A, et al. Interaction of curcumin with  $\beta$ -Lactoglobulin-stability, spectroscopic analysis, and molecular modeling of the complex [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(20): 11130-11139.
- [11] KANG J, YUAN L, XIE M X, et al. Interactions of human serum albumin with chlorogenic acid and ferulic acid [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects*, 2004, 1674(2): 205-214.
- [12] YU Q, WANG H, CHENG X, et al. Roles of Cch1 and Mid1 in morphogenesis, oxidative stress response and virulence in *candida albicans* [J]. *Mycopathologia*, 2012, 174(5/6): 359-369.
- [13] HARREN K, TUDZYNSKI B. Cch1 and Mid1 are functionally required for vegetative growth under low-calcium conditions in the phytopathogenic ascomycete *Botrytis cinerea* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12(5): 712-724.

(责任编辑 张 镗)