

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.02.013

苹果响应钙信号转录因子 MdbHLH2 原核表达分析

苟莎莎¹, 安欣¹, 张玮玮², 胡康康¹, 张华¹, 姚改芳¹

(1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601; 2. 山东农业大学 园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271001)

摘要: 转录因子 MdbHLH2 能响应钙信号且影响苹果采后贮藏的性能。为进一步探究其结构和功能, 文章利用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 *MdbHLH2* 基因的编码序列 (coding sequence, CDS) 全长, 连接至 pMAL-c2X 原核表达载体, 并将重组质粒转入表达菌株 Rosetta(DE3); 利用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达融合 MBP 标签的 MdbHLH2 重组蛋白, 并用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 技术检测出 MdbHLH2-MBP 的重组表达蛋白。该结果为进一步研究 MdbHLH2 的结构和功能提供了重要依据。
关键词: 苹果; 转录因子 MdbHLH2; 原核表达; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG); 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)

中图分类号: Q943.2

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2025)02-0232-04

Prokaryotic expression analysis of calcium signal transcription factor MdbHLH2 in apple

GOU Shasha¹, AN Xin¹, ZHANG Weiwei², HU Kangdi¹, ZHANG Hua¹, YAO Gaifang¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China; 2. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271001, China)

Abstract: Transcription factor MdbHLH2 can respond to calcium signal and affect the postharvest storage performance of apple. In order to further explore its structure and function, the full length of *MdbHLH2* gene coding sequence (CDS) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into prokaryotic expression vector pMAL-c2X, and the recombinant plasmid was transformed into expression strain Rosetta(DE3). The recombinant MdbHLH2 protein fused with MBP tag was induced by isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), and the recombinant protein of MdbHLH2-MBP was successfully detected by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results provide an important basis for further study of the structure and function of MdbHLH2.

Key words: apple; transcription factor MdbHLH2; prokaryotic expression; isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG); polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

0 引言

苹果果实中含有多种有益和健康的营养成分, 如维生素和花青素。由于苹果具有抗氧化和抗炎特性, 通常用于维持均衡的饮食^[1]。矿物质

元素特别是钙, 在苹果生长发育、产量、果实品质调控等方面起着非常重要的作用, 也是果实品质形成的物质基础^[2]。据报道, 缺钙会导致苹果皮表面形成褐色凹陷斑, 表皮下的果肉组织变软、变褐^[3], 这会影响苹果的贮藏品质和贮藏寿命。采

收稿日期: 2022-08-24; 修回日期: 2022-12-02

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2019YFD1000103); 国家自然科学基金资助项目 (31901993) 和安徽省自然科学基金资助项目 (1908085MC72)

作者简介: 苟莎莎 (1996—), 女, 四川蓬溪人, 合肥工业大学硕士生;

张华 (1973—), 男, 江苏徐州人, 博士, 合肥工业大学教授, 博士生导师;

姚改芳 (1983—), 女, 河南郟县人, 博士, 合肥工业大学副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: 2017800495@hfut.edu.cn.

后钙外源添加已被证明可以有效减少苹果的生理病害、延缓衰老,并能维持果实较高的营养品质^[4-5]。

钙是植物生长发育过程中必需的营养元素之一,对植物细胞壁和细胞膜的稳定性具有重要作用。 Ca^{2+} 是植物细胞信号传导可中最重要的第二信使之—^[6], Ca^{2+} 信号传导可调节许多非生物应激反应。钙调蛋白(CaM)和钙调蛋白样(CML)蛋白^[7]是常规的 Ca^{2+} 结合蛋白,通常由1~6个EF手形蛋白结构域组成^[8]。文献^[9]研究表明,CMLs通过与相关转录因子(TFs)(例如AP2/ERFs和bHLHs)结合并通过向下游传导钙信号启动细胞反应;文献^[10]报道MdbHLH2在缺钙苹果中与正常苹果比较存在显著的差异表达,并发现MdERF2和MdbHLH2共转化激活MdCML5的转录。

bHLH蛋白以其蛋白质结构中的特征性基本螺旋环螺旋(bHLH)区域命名,是真核生物中广泛存在的转录因子类型。bHLH蛋白除了在N端有一个保守结构域(10~15个氨基酸残基)以外,还存HLH基序(2个 α 螺旋构成)的蛋白结构域^[11]。在苹果中已鉴定出MdbHLH3对能够促进苹果果实糖酸的积累^[12];在马铃薯和甜樱桃中发现bHLH在响应非生物胁迫中发挥作用^[13-14];在拟南芥中bHLH对其根毛的生长发育起重要作用^[15]。因此,bHLHs在植物发育和代谢过程中发挥着重要作用。

为了探究MdbHLH2的分子结构和功能,本研究通过基因工程手段得到体外表达的Md-bHLH2-MBP重组蛋白,对进一步探究该蛋白的结构、性质以及调控机制至关重要,为后续Pull-down及凝胶阻滞实验的开展奠定了重要的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

成熟期有苦痘病的‘蜜脆’苹果、大肠杆菌感受态DH5 α 、Rosetta(DE3)和pMAL-c2X原核表达载体菌株。

1.1.2 主要试剂

Phanta[®] Super-Fidelity DNA Polymerase, Fast Pure Gel DNA Extraction Mini Kit, Fast Pure Plasmid Mini Kit, Clon Express II One Step Cloning Kit,限制性核酸内切酶BamH I、

Hind III, dNTP mix, Exnase II, 10 \times DNA Loading Buffer, Trans 2K Plus DNA Marker, Trans 15K DNA Marker, 2 \times Taq mix 试剂盒, 预染分子量标准蛋白 Marker, 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、羧苄青霉素、氯霉素等。

1.1.3 主要仪器

电热恒温水浴锅、恒温培养振荡器、基因扩增仪、脱色摇床、Thermal Cycler 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)仪、凝胶成像系统、超净工作台等。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取及反转录

取0.05 g冻存的‘蜜脆’苹果果皮按照文献^[16]方法进行果皮总RNA的提取,将提取的RNA用反转录试剂盒(AG 11706 湖南艾科瑞生物)进行cDNA的合成。

1.2.2 MdbHLH2 基因片段克隆与纯化

利用CE Design 软件工具进行引物序列设计,获得原核表达引物序列如下。

MdbHLH2-c2X-F:aggatttcagaattcggatccATGGCAGCCTTTTCATACCAAAA;

MdbHLH2-c2X-R:acgacggccagtgcgaagcttTTAATTGAAAGAACAACAAGTTGCTGT。

上述引物序列的合成由合肥通用生物公司完成。

以‘蜜脆’苹果果皮的cDNA为模板,用高保真扩增酶进行PCR扩增,扩增条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min,35个循环,进行基因片段扩增,用1.5%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。利用DNA纯化试剂盒对扩增产物进行纯化,具体操作步骤参考DC301-01 FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit说明书(南京诺唯赞生物)。

1.2.3 MdbHLH2 原核表达载体的构建

本文用Fast Pure Plasmid Mini Kit试剂盒提取pMAL-c2X载体质粒并用限制性内切酶BamH I和Hind III在37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行酶切纯化回收线性化载体。利用C112-01 Clon Express II One Step Cloning Kit试剂盒(南京诺唯赞生物)将完成酶切的载体与纯化后的基因片段(Md-bHLH2)于PCR仪中37 $^{\circ}\text{C}$ 连接40 min,将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞DH5 α 中,涂布至含有羧苄青霉素抗性的固体LB培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱过夜倒置培养以筛选阳性克隆,挑取单克隆菌落进行PCR鉴定;提质粒送测序,若鉴定正确

则转入大肠杆菌感受态 Rosetta (DE3) 中,用含有氯霉素和羧苄青霉素抗性的固体 LB 培养基筛选阳性克隆,挑点进行菌落 PCR 鉴定,鉴定正确后,保存菌株于 -80°C 待用。

1.2.4 *MdbHLH2* 原核表达载体的诱导表达

将转入大肠杆菌感受态 Rosetta (DE3) 并鉴定正确的重组菌在 37°C 摇床上扩大培养至菌液 A_{600} 达到 $0.6\sim 0.8$,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂在 22°C 诱导 16 h ;诱导完成后 $8\,000\text{ r/min}$ 离心收菌 30 min ,用无菌水重悬菌体,破碎,加入等体积的上样缓冲液 (60 mmol/L Tris-HCL 缓冲液、 25% 甘油、 1 g/L 溴酚蓝溶液、 14.4 mmol/L SDS、 0.1% β -巯基乙醇,加蒸馏水至 10 mL),将混合样品煮沸 10 min 使蛋白变性,离心取上清,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 检测 (10% 分离胶和 5% 浓缩胶)。

2 结果与分析

2.1 *MdbHLH2* 基因片段扩增结果

以‘蜜桃’苹果果皮 cDNA 为模板扩增 *MdbHLH2* 基因片段并进行片段纯化,结果如图 1 所示。图 1 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1 表示 *MdbHLH2* 基因 PCR 产物;泳道 2 表示目的基因片段纯化后的结果。

由图 1 可知,样品 PCR 扩增出了 DNA 片段,且在 $1\,000\sim 2\,000\text{ bp}$ 之间有一条明显条带,与期望得到的 *MdbHLH2* 基因的片段大小相符 (*MdbHLH2* 的大小为 $1\,147\text{ bp}$),表明 *MdbHLH2* 基因克隆成功。

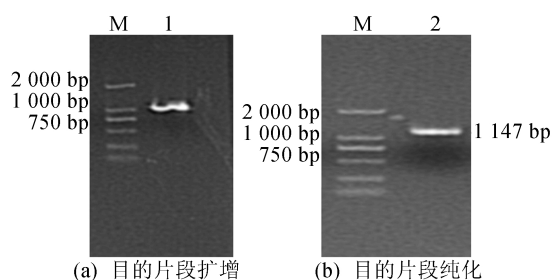


图 1 目的片段的扩增与纯化结果

2.2 *MdbHLH2* 原核表达载体构建结果

本实验提取 pMAL-c2X 载体质粒并进行酶切纯化,结果如图 2 所示。图 2 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1 表示提取的载体质粒;泳道 2、3 表示酶切纯化后的载体质粒。根据图 2 中的质粒条带位置,可知载体质粒提取成功 (pMAL-c2X

载体大小为 $6\,646\text{ bp}$)。

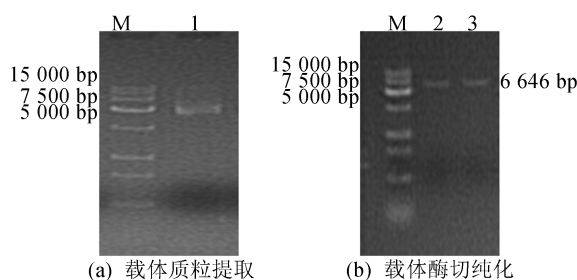


图 2 载体质粒提取及切胶纯化结果

将目的基因片段 *MdbHLH2* 与线性化载体 pMAL-c2X 进行重组反应,并将获得的重组产物进行下一步转化感受态细胞 DH5 α ,挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定,结果如图 3 所示。图 3 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 6 表示单克隆克隆 (*MdbHLH2* 基因 PCR 产物)。由图 3 可知,鉴定结果均为阳性菌落,条带大小正确。将鉴定正确的单克隆菌体扩大培养,提取质粒并测序。

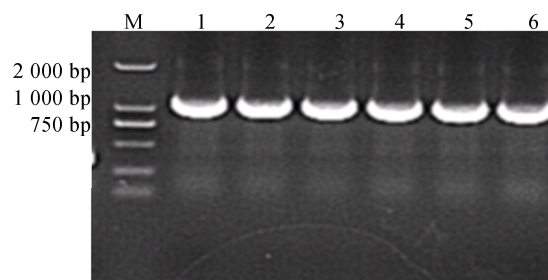


图 3 转化至大肠杆菌感受态 DH5 α 菌落 PCR 结果

将测序成功的重组质粒转入到表达载体 Rosetta (DE3),于 37°C 过夜培养并进行菌落 PCR 鉴定,结果如图 4 所示。图 4 中:M 表示 DNA Marker;泳道 1~泳道 6 表示单克隆克隆。由图 4 可知,鉴定结果均为阳性单克隆菌落。

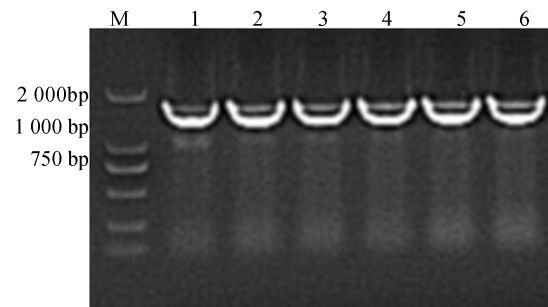


图 4 转化至大肠杆菌感受态 Rosetta (DE3) 菌落 PCR 结果

2.3 *MdbHLH2* 重组载体的原核表达分析

取 2.2 节鉴定正确的菌液进行培养,加入诱

导剂在 22 °C 诱导 16 h, 让菌株表达目的蛋白。对诱导表达的蛋白进行 PAGE 电泳实验, 结果如图 5 所示。图 5 中: M 表示蛋白 Marker; 泳道 1 表示诱导后菌株; 泳道 2 表示诱导前(未加诱导剂)菌株; 黑色方框区域表示目的蛋白。从图 5 能够看到明显的条带, 且位置正确(63 kDa), 表明已成功诱导出目的蛋白。

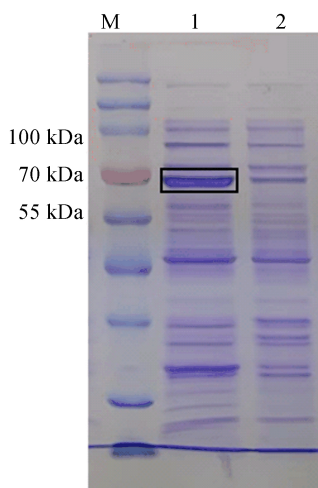


图 5 诱导表达蛋白的 PAGE 电泳图

3 讨 论

Ca 是植物营养的必需元素, 同时是植物体内的第二信使, 能够与钙调素(CaM)结合, 参与多种代谢活动, 如调节果实的呼吸和乙烯的释放、保持果实细胞壁和细胞膜的完整结构等。当苹果果树缺钙时, 会影响其对水分和养分的吸收, 使果实表面出现许多病斑, 影响果料贮藏品质。bHLHs 是一种普遍存在于动植物中的转录因子家族, 能够调控植物的生长发育。文献[16]发现 *MdERF2* 和 *MdbHLH2* 共转化激活 *MdCML5* 的转录影响苹果果实中的钙平衡。但是 *MdbHLH2* 对 *MdCML5* 的转录影响机制还需进一步研究。因此, 本文利用基因工程手段成功构建 *MdbHLH2*-MBP 原核表达载体, 并进行原核表达诱导, 利用 PAGE 技术检测目的蛋白的表达, 为后续探究该基因的功能和结构提供了实验依据。

[参 考 文 献]

[1] 王国义. 主产区苹果园矿质营养及其与果实品质关系的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.

- [2] 席凯. 富士苹果缺钙原因与对策研究[J]. 农业技术与装备, 2012(1): 51-53.
- [3] 李海山, 王景涛, 阚学森. 苹果果实缺钙的症状及防治措施[J]. 河北果树, 2007(4): 15-16.
- [4] 王田利. 钙对苹果生长的影响及预防缺钙措施[J]. 西北园艺(果树), 2020(5): 31-32.
- [5] 隋秀奇, 顾雨非, 郑亚琴, 等. 苹果缺钙引发的红黑点和苦痘烂果病的防治[J]. 果农之友, 2019(1): 29-30.
- [6] MCAINSH M R, PITTMAN J K. Shaping the calcium signature[J]. *New Phytologist*, 2009, 181(2): 275-294.
- [7] HE X, LIU W, LI W Q, et al. Genome-wide identification and expression analysis of CaM/CML genes in *Brassica napus* under abiotic stress[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2020, 255: 418-432.
- [8] MOHANTA T K, YADAV D, KHAN A L, et al. Molecular players of EF-hand containing calcium signaling event in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6): 1476.
- [9] SHEN L, YANG S, GUAN D, et al. CaCML13 acts positively in pepper immunity against *Ralstonia solanacearum* infection forming feedback loop with *CabZIP63*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11): 4186.
- [10] SUN H Y, ZHANG W W, QU H Y, et al. Transcriptomics reveals the ERF2-bHLH2-CML5 moduleresponses to H₂S and ROS in postharvest calcium deficiency apples[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(23): 13013.
- [11] MATUS J T, AQUEA F, ARCE-JOHNSON P. Analysis of the grape MYB R2R3 subfamily reveals expanded wine quality-related clades and conserved gene structure organization across *Vitis* and *Arabidopsis* genomes[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8(1): 1-15.
- [12] 于建强. 苹果 bHLH 转录因子 MdbHLH3 在调控果实糖酸代谢中的功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2022.
- [13] 冯建英, 李立芹, 鲁黎明. 马铃薯 bHLH 转录因子家族全基因组鉴定与表达分析[J]. *生物技术通报*, 2022, 38(2): 21-33.
- [14] 沈天娇. 甜樱桃 bHLH 家族转录因子发掘及抗寒功能鉴定[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.
- [15] 武家颂, 崔欣茹, 张景荣, 等. 拟南芥 bHLH 转录因子在根毛发育中的作用[J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 21(2): 144-151.
- [16] ALI S, KHAN A S, MALIK A U, et al. Effect of controlled atmosphere storage on pericarp browning, bioactive compounds and antioxidant enzymes of litchi fruits[J]. *Food Chemistry*, 2016, 206: 18-29.

(责任编辑 闫杏丽)