

引用格式:

乔克威, 滕进婧, 周小云, 李健, 刘明新, 杨华. 金柑 *MLP2-2* 基因抑制蛋白酶活性的功能分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 33–38.

QIAO K W, TENG J J, ZHOU X Y, LI J, LIU M X, YANG H. Functional analysis of *MLP2-2* in kumquat: the inhibitory effect on proteinase activity[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(1): 33–38.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 金柑 *MLP2-2* 基因抑制蛋白酶活性的功能分析

乔克威<sup>1</sup>, 滕进婧<sup>1</sup>, 周小云<sup>1</sup>, 李健<sup>1</sup>, 刘明新<sup>2</sup>, 杨华<sup>1\*</sup>

(1.湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省农作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** *MLP2-2* 基因是存在于金柑中的一种 H2B 蛋白互作基因。对金柑 *MLP2-2* 基因进行生物信息学分析, 发现 *MLP2-2* 蛋白序列中存在跨膜结构域, 与 Kunitz 蛋白酶抑制剂具有同源性; 对 2 年生金柑幼苗进行冷驯化, 提取叶片 RNA, 反转录获得 *MLP2-2* 基因的 cds 序列, 转入 pBRT7 质粒构建 pBRT7-*MLP2-2* 过表达载体后, 侵染 Rosetta(DE3)大肠杆菌工程菌, 获得目的蛋白, 并检测 *MLP2-2* 蛋白对金柑蛋白提取液的蛋白降解率。结果表明, *MLP2-2* 抑制了 16% 的金柑蛋白质的降解, 说明 *MLP2-2* 蛋白具有蛋白酶抑制剂活性。

**关 键 词:** 金柑; 神秘果素类似蛋白基因; 蛋白酶抑制剂

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)01-0033-06

## Functional analysis of *MLP2-2* in kumquat: the inhibitory effect on proteinase activity

QIAO Kewei<sup>1</sup>, TENG Jinjing<sup>1</sup>, ZHOU Xiaoyun<sup>1</sup>, LI Jian<sup>1</sup>, LIU Mingxin<sup>2</sup>, YANG Hua<sup>1\*</sup>

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Key Laboratory for Crop Germplasm Innovation and Resource Utilization of Hunan Province, Changsha, Hunan 410128, China)

**Abstract:** The miraculin-like protein gene *MLP2-2* is a H2B protein interaction gene in kumquat. Bioinformatics analysis of the *MLP2-2* gene found that the coded protein has a transmembrane domain and has homology with the Kunitz protease inhibitor. Two-year-old kumquat seedlings were subjected to cold acclimation, and the leaf RNA was extracted to obtain the cds sequence by reverse transcription to construct the pBRT7-*MLP2-2* over-expression vector, then it was transferred to Rosetta (DE3) *Escherichia coli* engineered bacteria to express the target *MLP2-2* protein. The effect of *MLP2-2* on protein degradation rate of total protein extraction from kumquat leaves was detected. The results show that *MLP2-2* inhibited kumquat protein degradation by 16%, indicating *MLP2-2* have protease inhibitor activity.

**Keywords:** kumquat; miraculin-like protein gene; protease inhibitor

*MLP* 蛋白是一种神秘果素类似蛋白<sup>[1]</sup>。1995 年, MASUDA 等<sup>[2]</sup>在神秘果果实中克隆了该神秘果素基因; 2006 年, TSUKUDA 等<sup>[3]</sup>从粗皮柠檬(*Citrus*

*jambhiri*)中克隆了 *RlemMLP2* 和 *RlemMLP3* 基因; 2010 年, GAHLOTH 等<sup>[4]</sup>从月橘中克隆了 *MLP* 基因。SO-ICHIRO 等<sup>[5]</sup>发现葡萄 *MLP* 蛋白对胰蛋白

收稿日期: 2021-05-21

修回日期: 2021-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200963); 湖南省教育厅项目(18A091)

作者简介: 乔克威(1993—), 男, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究, 1912013304@qq.com; \*通信作者, 杨华, 博士, 副教授, 主要从事生物化学及分子生物学研究, yhua7710@126.com

酶有抑制作用。李梦芸<sup>[6]</sup>对金柑进行冷驯化,发现随着冷驯化时间的延长,金柑中 *MLP2-2* 基因的相对表达量上升,认为该基因在金柑冷胁迫响应过程中起作用。对 *MLP2-2* 基因进行生物信息学分析,发现 *MLP2-2* 蛋白与豆类 Kunitz 蛋白家族蛋白酶抑制剂同源性较高。大部分芸香科植物中都含有 Kunitz 蛋白,该蛋白可以对细胞内蛋白酶活性进行调控<sup>[7]</sup>,抑制植物内源性蛋白活力,阻止蛋白的降解<sup>[8]</sup>。对 *MLP2-2* 基因的生物信息学分析也预示 *MLP2-2* 蛋白与胰蛋白酶存在互作。为验证 *MLP2-2* 蛋白在金柑冷胁迫中对蛋白酶的抑制功能,笔者对金柑进行冷驯化,促使金柑体内 *MLP2-2* 基因表达后提取叶片 RNA,反转录获得 cds 序列,以构建 pBRT7-*MLP2-2* 过表达载体,并转入 Rosetta(DE3)大肠杆菌进行工程菌表达,以获得目的蛋白 *MLP2-2*;将获得的纯化蛋白添加到正常金柑叶片总蛋白提取液中,以金柑叶片总蛋白降解率的变化来验证 *MLP2-2* 蛋白对金柑叶片总蛋白中蛋白酶的抑制作用。现将结果报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

2年生金柑苗由湖南农业大学柑橘改良中心提供;过表达载体质粒购于武汉伯远生物科技有限公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自天根生化公司。

RNA 提取、反转录、切胶回收和蛋白浓度检测等试剂盒均购自擎科生物科技有限公司;Rosetta (DE3)大肠杆菌工程菌、Binding buffer、Washing buffer、Elution buffer 均购自上海生工生物工程有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 *MLP2-2* 基因的生物信息学分析

运用 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)分析 *MLP2-2* 蛋白氨基酸序列和保守结构域;采用 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析 *MLP2-2* 蛋白跨膜结构;利用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>)分析 *MLP2-2* 蛋白构

型等信息。

#### 1.2.2 金柑 *MLP2-2* 基因的克隆与载体构建

根据 NCBI 数据库 *MLP2-2* 同源蛋白编码序列(登录号为 AB213396.1),全长 672 bp,编码 223 氨基酸残基,运用 SnapGene 软件设计其 cds 区域的 PCR 引物,上游引物,5'-ATGAAGATTTCATTAGC AACAACAC-3';下游引物,5'-TTACACAGACGTT GATCTTTCTG-3'。

冷驯化金柑幼苗,提取叶片总 RNA,反转录获得 cDNA 序列<sup>[9]</sup>。PCR 扩增目的基因,凝胶电泳分离产物,检测目的条带。切胶回收 *MLP2-2* 条带,经北京擎科生物科技有限公司测序比对后侵染 DH5 $\alpha$ ,用含有卡那霉素的抗性培养基培养大肠杆菌,挑选单克隆抗体,用 LB 培养基进行扩增,提取质粒。将菌落 PCR 产物送往北京擎科生物科技有限公司测序。

#### 1.2.3 *MLP2-2* 蛋白表达及检测

参照 ZHAO 等<sup>[10]</sup>的方法,将重组质粒转染 Rosetta (DE3)感受态细胞。参照李锁<sup>[11]</sup>的方法,诱导蛋白表达。参考汪家政等<sup>[12]</sup>的方法,采用镍柱纯化蛋白,采用 SDS-PAGE 检测蛋白的相对分子质量、蛋白浓度及杂蛋白含量,采用 Western Blot 检测 *MLP2-2* 蛋白表达。

#### 1.2.4 金柑蛋白降解率的检测

液氮研磨金柑叶片至粉末,取 0.5 g 粉末,添加 1 mL PBS 缓冲液,冰浴 30 min,其间每隔 5 min 振荡混匀 1 次。4℃、20 000 r/min 离心 30 min,取上清再次离心,上清液备用。分 2 组各取 100  $\mu$ L 蛋白提取液,对照组加入 1  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,测试组加入 1  $\mu$ L *MLP2-2* 蛋白,25℃孵育,分别在 10、20、30 h 取样,使用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒,检测样品中的蛋白浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 金柑 *MLP2-2* 基因的结构特征

依据 NCBI 网站对 *MLP2-2* 分析发现,*MLP2-2* 蛋白的氨基酸序列为:MetKISLATTLSFLILALASN

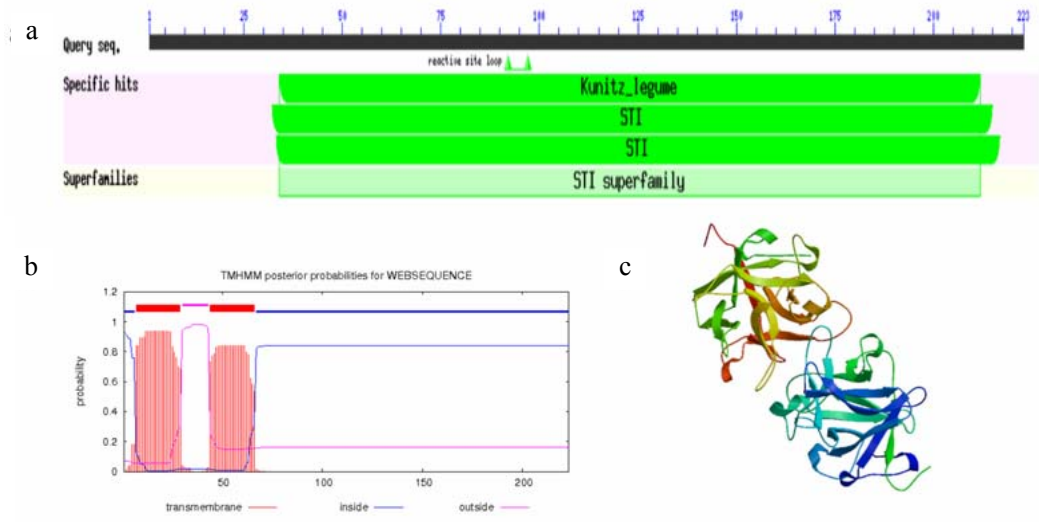
SLLVLGTSSVPEPLLDVNGNKVESTLQYYIVSAI  
WGAGGGGVSLHGGRNGYCPLDVIQLPSDTQNG  
IKLTLSPYNNSTIVRESADLNLRFSVLLSGRDYC  
NEQPLWKVDNYDAASGKWFITTGGLDGHPGAE  
TLLNWFKLEKIGNFPGTYKIVHCPSVCESCVKLC  
NNVGRSFEDGVRRLVLVRDDEPAFPVVLIPATER  
STSV。

对序列进行 cds 保守区段预测, 结果(图 1-a)发

现该蛋白存在反应位点环结构, 同时与豆类 Kunitz 蛋白酶抑制剂同源性较高。

运用 TMHMM 软件分析 MLP2-2 蛋白序列, 结果(图 1-b)发现,MLP2-2 蛋白存在 2 个跨膜结构区, 属于多次跨膜蛋白。

运用 SWISS-MODEL 软件对 MLP2-2 蛋白序列进行分析, 发现该蛋白由 2 个亚基构成, 与胰蛋白酶抑制剂有同源性(图 1-c)。



a MLP2-2 保守区片段预测; b MLP2-2 跨膜结构; c MLP2-2 蛋白三维结构。

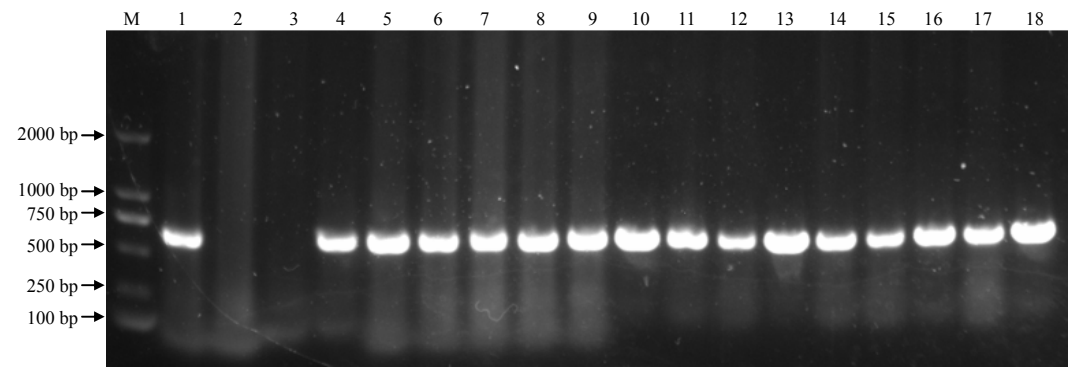
图 1 MLP2-2 蛋白结构的预测结果

Fig.1 Structure analysis of MLP2-2

2.2 pBRT7-MLP2-2 过表达载体

将 PCR 产物送样测序, 测序结果表明与 NCBI 数据库中目的基因一致。将测序后的 *MLP2-2* 基因片段转入质粒 pBRT7, 构建 pBRT7-MLP2-2 表达载体, 转化至大肠杆菌感受态细胞, 随机挑选 18 个阳性菌株摇床培养, 提取菌液进行 PCR 鉴定。结

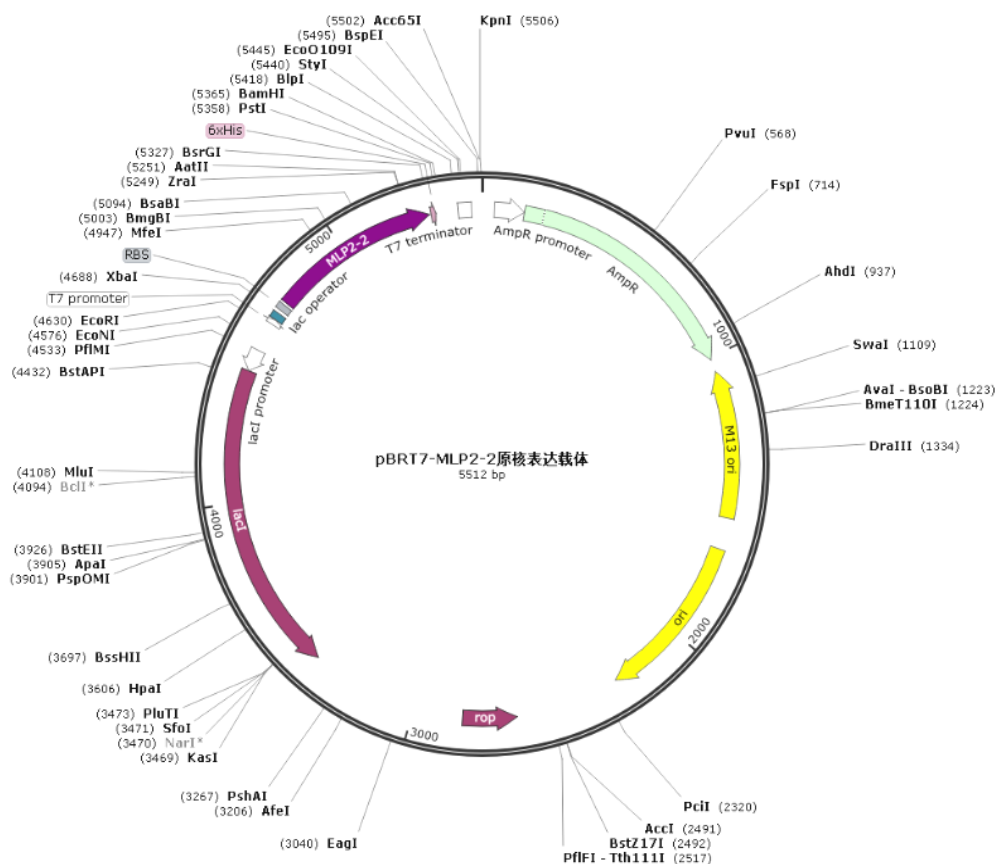
果如图 2 所示, 除 2、3 号菌株外, 均扩增出目的条带, 说明其余 16 个菌株均成功转入 *MLP2-2* 基因。测序结果与 *MLP2-2* 基因序列一致, 表明 pBRT7-MLP2-2 过表达载体构建成功。载体结构如图 3 所示。



M DNA Marker; 1~18 为菌株编号。

图 2 pBRT7-MLP2-2 原核表达载体的菌落 PCR 验证

Fig.2 Verification of the pBRT7-MLP2-2 prokaryotic expression vector by colony PCR

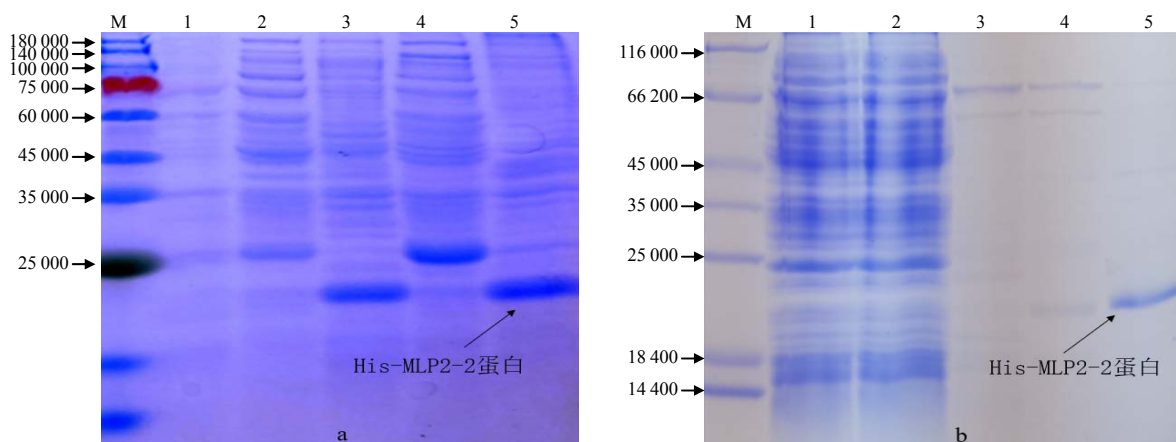


**图 3 pBRT7-MLP2-2 原核表达载体图谱**  
**Fig.3 Map of the pBRT7-MLP2-2 prokaryotic expression vector**

### 2.3 MLP2-2 蛋白融合表达情况

收集菌液，分别对诱导前总蛋白、20℃培养菌上清液、20℃培养菌体沉淀、37℃培养菌上清液、37℃培养菌体沉淀等5组进行SDS-PAGE蛋白凝胶电泳检测，检测目的蛋白位点和表达量。如图4-a所示，目的蛋白主要集中于菌体沉淀中，当培养温度在37℃时，目的蛋白相对表达量较高。

收集菌液沉淀, 分别对孵育流出液、洗杂流出液、洗脱流出液等组分分组处理, 制备样品, 进行蛋白质凝胶电泳, 结果发现, 孵育流出液和洗杂流出液样品特异性较低。对不同浓度洗脱液组分分析发现, 当洗脱液中咪唑浓度为 500 mmol/L 时, 蛋白样品特异性强, 洗脱效果最好, 蛋白浓度最高(图 4-b)。



a: M 蛋白 Marker; 1 诱导前总蛋白; 2 20 ℃ 上清; 3 20 ℃ 沉淀; 4 37 ℃ 上清; 5 37 ℃ 沉淀。  
b: M 蛋白 Marker; 1 上样; 2 流出; 3 20 mmol/L Imidazole 洗脱组分; 4 50 mmol/L Imidazole 洗脱组分; 5 500 mmol/L Imidazole 洗脱组分。

图 4 His-MLP-2-2 融合蛋白表达及镍琼脂糖亲和和层析纯化 SDS-PAGE 分析

对 His-MLP-2-2 单独进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳, 检验蛋白条带浓度及杂蛋白含量。结果(图 5-a)发现, 纯化蛋白单一性较强, 杂蛋白含量较低, 蛋白纯化效果较好。

为确定所获得的纯化蛋白为目的蛋白, Western Blot 技术方法, 用 TMB 显色试剂盒显色。结果如图 5-b 所示, 在对应位置出现明显目的条带, 证明该蛋白为目的蛋白。

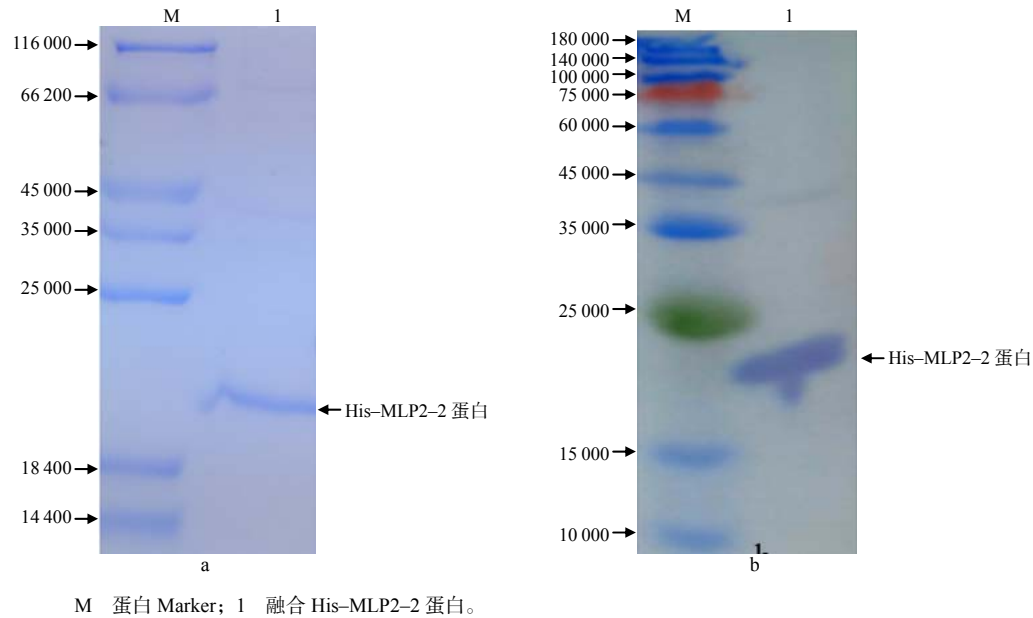


图 5 His-MLP2-2 纯化蛋白 SDS-PAGE 及 Western Blot 分析  
Fig.5 SDS-PAGE analysis and Western Blot analysis of the final purified His-MLP2-2 protein

2.4 MLP2-2 抑制金柑叶片总蛋白降解的效果

MLP2-2 蛋白对金柑叶片总蛋白的降解率检测结果(表 1)表明, 在 0~10 h, 对照组和添加 MLP2-2 蛋白组的降解率差别小, 降解率为 3.3%~3.7%。至 20 h 时, 对照组金柑蛋白降解率上升, 降解率达 6.5%, 而添加 MLP2-2 蛋白的处理组, 其金柑总蛋白降解率基本保持 3.4 %左右。至 30 h 时, 对照组金柑叶片总蛋白降解率大幅上升, 达到 19.2%, 而添加 MLP2-2 的处理组的蛋白降解率基本, 维持在 3.0%左右。说明 MLP2-2 具有蛋白酶抑制剂活性, 能抑制金柑叶片中总蛋白质的降解。

表 1 金柑蛋白提取液在不同时间段内的总蛋白降解率  
Table 1 Degradation rate of total protein in extraction from kumquat leaves at different times

处理	总蛋白降解率/%		
	10 h	20 h	30 h
CK	3.4±1.3	6.5±1.9	19.2±2.3
CK+I	3.7±2.8	3.4±2.3	2.7±1.2

CK 为金柑蛋白提取液; CK+I 为添加 MLP2-2 蛋白的金柑蛋白提取液。

3 结论与讨论

研究表明, 植物的抗冻有“耐受”和“避免”2 种机制<sup>[13-14]</sup>。避免冻害类植物以种子的形式越冬或在组织中积累大量的抗冻物质, 种子干燥后无法结冰, 从而避免冰冻的危害; 耐受冻害类植物既能忍受胞外冰晶的形成, 又可避免胞内冰晶的形成, 在低于胞外冰晶形成的温度时, 耐受冻害类植物才会出现冻害。由于耐受冻害类植物一般会产生抗冻蛋白, 可以使冰晶钝化, 细胞不会出现严重的破损。前期试验中发现, 金柑突然受到冰冻胁迫后, 叶片细胞严重失水, 大量的细胞出现破损, 最后死亡; 而经历冷驯化的金柑受到冰冻胁迫后, 叶片细胞失水也很严重, 大量的细胞出现破损, 但将其转移至温室后, 叶片细胞得到修复, 植株表现出较强的抗冻能力。金柑的抗冻表象有别于已知的 2 种抗冻机制, 推测在金柑中存在自身修复的抗冻机制。前期的研究也表明, *MLP2-2* 基因在金柑冷驯化过程中会特异性表达。对冷驯化诱导金柑幼苗表达 *MLP2-2* 基因

并克隆得到该基因,生物信息学研究表明,MLP2-2 与豆类 Kunitz 蛋白酶抑制剂同源性较高;MLP2-2 与胰蛋白酶存在互作。MLP2-2 转入大肠杆菌构建工程菌,经大量表达获得目的基因蛋白,经抑制蛋白酶活性研究推测,MLP2-2 是一种 Kunitz 蛋白酶抑制剂。双子叶植物中普遍存在 Kunitz 蛋白,Kunitz 蛋白能够调控蛋白酶的活性,有效抑制植物内源性蛋白活力,避免蛋白质过度降解,促进细胞内稳态平衡<sup>[7]</sup>。本研究中,对金柑蛋白降解率进行检测,发现金柑冷驯化过程中 MLP2-2 的特异性表达,抑制了金柑叶片细胞内的蛋白酶活性,减缓了细胞内功能蛋白的降解,从而维持了细胞的基本功能,增强了金柑抗冷胁迫能力。至于 MLP2-2 蛋白抑制了哪些蛋白酶,保护了哪些蛋白还需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] KURIHARA K, BEIDLER L M. Mechanism of the action of taste-modifying protein[J]. *Nature*, 1969, 222: 1176–1179.
- [2] MASUDA Y, NIRASAWA S, NAKAYA K, et al. Cloning and sequencing of a cDNA encoding a taste-modifying protein, miraculin[J]. *Gene*, 1995, 161(2): 175–177.
- [3] TSUKUDA S, GOMI K, YAMAMOTO H, et al. Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri lush*[J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60(1): 125–136.
- [4] GAHLOTH D, SELVAKUMAR P, SHEE C, et al. Cloning, sequence analysis and crystal structure determination of a miraculin-like protein from *Murraya koenigii*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 494(1): 15–22.
- [5] SO-ICHIRO O, MISAHO H, KAZUKI S, et al. Structural and functional analysis of miraculin-like protein from *Vitis vinifera*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*, 2018(11): 1125–1130.
- [6] 李梦芸. 金柑组蛋白 H2B 互作蛋白基因的表达分析及转化研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- [7] 张娴, 廖东颖, 侯绪卓, 等. 植物 Kunitz 型蛋白酶抑制剂的结构与功能[J]. *植物生理学报*, 2018, 54(9): 1391–1400.
- [8] JOSEFINA H N, IGNNICO M, TERESA J, et al. Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seedling growth[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2009, 47(3): 181.
- [9] 滕进婧, 李梦芸, 郭纯, 等. 冷冻胁迫转金柑 MLP2-1 基因拟南芥的转录组测序和代谢通路[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2018, 44(4): 376–381.
- [10] ZHAO X H, WANG W, WANG F Q, et al. A comparative study of  $\beta$ -1,4-endoglucanase (possessing  $\beta$ -1,4-exoglucanase activity) from *Bacillus subtilis* LH expressed in *Pichia pastoris* GS115 and *Escherichia coli* Rosetta(DE3)[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 539–545.
- [11] 李锁. 三种血清学诊断方法在大疱性类天疱疮中的应用[D]. 北京: 北京协和医学院, 2018.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[K]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [13] LEVITT J. Responses of Plants to Environmental Stress [M]. New York: Academic Press, 1980: 166–248.
- [14] FRANKS F. Biophysics and biochemistry at low temperature[J]. *FEBS Letters*, 1987, 220(2): 391.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维