

新疆黄精凝集素基因的克隆、序列分析和表达

孙素荣, 张智, 李素丽, 胡俊, 张富春

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046

摘要: 用百合科黄精属植物凝集素基因的保守序列为引物, 从新疆黄精的叶中克隆出黄精凝集素的全长 cDNA。序列分析表明, 克隆获得的新疆黄精凝集素 (*Polygonatum roseum* agglutinin, PRA) 基因完整的 ORF 片段大小为 550 bp, 编码 1 条长 159 个氨基酸肽链, 没有内含子, 其中 N 端的 28 个氨基酸是信号肽。对新疆黄精凝集素 cDNA 序列同源性的分析比较发现, 黄精属植物凝集素基因之间有很高的同源性 (92%)。氨基酸序列比对和 SWISS-MODEL 同源建模分析表明, PRA 由 12 个 β -折叠片组成的 β -桶结构, 具有与单子叶植物甘露糖结合凝集素相似的空间结构。重组质粒 pGEX-4T-1-PRA 和 pMAL-p2x-PRA, 分别转化 *E. coli* BL21 进行原核表达, 新疆黄精凝集素能够以可溶性融合蛋白形式表达, 分子量约为 14 kD。构建真核表达载体 pcDNA3-PRA, 免疫小鼠后获得了抗血清。免疫印迹结果显示为单一的条带, 证明该抗血清具有针对 PRA 抗原的专一性。新疆黄精凝集素基因的克隆、原核和真核的表达以及抗血清的制备, 为进一步研究凝集素蛋白的性质和功能, 并为植物抗病虫基因工程研究提供有用的实验材料。

关键词: 新疆黄精, 凝集素, 序列比较, 原核表达

Cloning, Sequencing Analysis and Expression of a Putative Mannose-binding Lectin Gene from *Polygonatum roseum* in Xinjiang

Surong Sun, Zhi Zhang, Suli Li, Jun Hu, and Fuchun Zhang

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

Abstract: The genomic DNA were extracted from the leaves of *Polygonatum roseum* (Liliaceae) in Xinjiang and the primers were designed according to conservative sequences of *Polygonatum* lectins gene. The complete ORF of *Polygonatum roseum* agglutinin (PRA) gene was amplified as a fragment of 550 bp, which was identical with predicted size. Like most of the plant lectin genes, there was no intron in the PRA gene. The ORF of the gene encoded 159 amino acid residues, in which included a signal sequence of 28 amino acid residues at its N-terminus. The cDNA sequence had 92% identities compared with the published sequence. The amino acid sequence and SWISS-MODEL analysis indicated that the three-dimensional structure of PRA strongly resembled with that of monocot mannose-binding lectins, which comprised with three antiparallel four-stranded β -sheets arranged as a 12-stranded β -barrel. The recombinant pGEX4T-1-PRA and pMAL-p2x-PRA prokaryotic expression vectors were constructed to produce GST-PRA and MBP-PRA fusion proteins in *E. coli*, respectively. SDS-PAGE of the fusion protein demonstrated that the PRA lectin protein migrated at a size of 14 kD. The immunization was performed by intra-muscular injection of pcDNA3-PRA, and the antiserum was

Received: July 13, 2007; **Accepted:** October 9, 2007

Supported by: Science Research Key Project of Xinjiang Education Department (No. XJEDU2004110) and Innovation Research Group Foundation of Xinjiang Education Department (No. XJEDU2004G02).

Corresponding author: Fuchun Zhang. Tel: +86-991-8583259; Fax: +86-991-8583517; E-mail: zfcxju@xju.edu.cn

新疆高校科研计划重点项目 (No. XJEDU2004110), 新疆高校创新研究群体基金 (No. XJEDU2004G02)。

detected by ELISA. Western blotting analysis showed the antiserum specifically bound the lectin protein. The establishment of such an expression system might provide materials for further investigation of the properties and functions of PRA proteins. It also laid the basis for plant genetic engineering on its defensive functions to pests and diseases.

Keywords: *Polygonatum roseum*, agglutinin, sequence compare, prokaryotic expression

植物凝集素是一类非免疫来源、对糖及其缀合物专一识别并可逆结合的蛋白质^[1], 它的特异性识别不是针对植物内源多糖, 而是针对动物、微生物等外源多糖, 因此可作为植物的防御物质^[2]。植物凝集素根据进化及结构相关性可分为豆科植物凝集素、单子叶植物甘露糖结合凝集素等七个家族, 它们在植物各组织器官, 尤其在种子等营养和繁殖器官中广泛分布。

单子叶甘露糖结合凝集素(monocot mannose-binding lectins)广泛分布于石蒜科、兰科、百合科等植物, 在进化上属于彼此相关的家族, 其序列和结构上具有很高的同源性。通常由 2~4 个 11~14 kD 相同的亚基组成二聚体或四聚体, 每个亚基包含有 3 个典型的甘露糖结合位点(QDNY), 表现出 D-甘露糖结合的专一性。单子叶甘露糖结合凝集素由于其生理生化特性, 已被用于分析和分离含甘露糖及其糖缀合物的研究工具^[3]; 在医药方面, 由于它能与一些感染人和动物的逆转录病毒(如 HIV 等)的外壳蛋白糖链相互作用, 表现出潜在抗病毒功能^[4], 如雪花莲凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)^[5, 6]; 由于它也能与糖缀合物结合, 严重干扰小肠消化吸收功能, 尤其是对刺吸式昆虫和线虫等有毒性, 目前在农业植物转基因中得到广泛应用。例如, 雪花莲和苋菜凝集素的转基因作物表现了良好的抗蚜虫特性^[6, 7]。

新疆黄精(*Polygonatum roseum* Kunth)又名玫瑰黄精, 属百合科黄精属, 为多年生单子叶草本植物, 分布在西藏、云南、四川、甘肃、青海、宁夏、陕西和新疆。现代药理学研究认为, 黄精有抗衰老、降血压、防止动脉硬化及抗菌消炎、增强免疫力等功效^[4, 8]。黄精不仅是传统中药材, 而且也是出口创汇药品种之一。目前已克隆得到多条黄精凝集素 cDNA 片段, 但迄今为止, 关于新疆黄精的凝集素还缺乏系统深入的研究。

为了筛选到新疆黄精的凝集素基因并进行凝集素的功能活性检测, 有必要对新疆黄精的凝集素基

因进行克隆并进行序列分析。同时将克隆获得新疆黄精的凝集素基因 ORF 片段, 进行原核和真核表达, 制备相应的鼠抗血清, 为深入研究凝集素的结构、性质和生物学活性及功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料

新鲜的新疆黄精采自新疆昭苏县夏塔尔乡草地山水沟边。

1.1.2 菌株和质粒

原核表达载体 pGEX-4T-1、pMAL-p2x 及真核表达载体 pcDNA3, 以及 *E. coli* DH5 α 、BL21(DE3) 菌株和 TB1 菌株均为本实验室保存。

1.1.3 实验动物

雌性昆明白小鼠购自新疆医科大学动物实验中心。

1.1.4 主要试剂和仪器

ExTaq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Bam*H I 等限制性内切酶、DNA Marker、pMD18-T 测序载体试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; 谷胱甘肽(Glutathione) 珠状琼脂糖凝胶(Sepharose)4B 购自 Pharmacia 生物技术公司; 直链淀粉树脂(Amylose Resin)购自 NEB 公司; 羊抗鼠 IgG 购自华美公司; 弗氏佐剂购自 Sigma 公司; DNA 片段回收试剂盒购自上海生物工程公司; 测序由大连 TaKaRa 公司完成, 其余试剂均为国产分析纯试剂。PCR 扩增仪为 BIO-RAD Mycycler Thermal Cycler(美国)。

1.1.5 引物的设计与合成

根据 GenBank 已登录的多花黄精凝集素 PMA (*Polygonatum multiflorum* agglutinin, PMA)[GenBank: 21745387] 和囊丝黄精凝集素 PCA(*Polygonatum cyrtoneuma* Hua agglutinin, PCA)[GenBank: 21038762] 的 cDNA 序列, 设计新疆黄精凝集素(PRA)基因的克隆引物, 引物序列为: 上游引物: 5' ATGGCAGCTA GTA3'; 下游引物: 5' ACAAACACCAAACATGTG3'。

引物由上海生物工程公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取及 PCR 扩增基因、测序和序列分析

按 CTAB 法从新疆黄精叶中提取基因组 DNA。以新疆黄精总 DNA 为模板, PCR 扩增其凝集素基因, PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 反应产物进行 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。按回收试剂盒说明进行 PCR 产物的回收后, 克隆于 pMD18-T 载体上, 由大连 TaKaRa 公司测序。测序结果通过美国国立生物技术中心 (NCBI) 进行序列比对, 然后用 DNAMAN 软件将 DNA 序列翻译成蛋白质序列, 用 BLAST 软件做同源性比较分析。另将序列提交瑞士蛋白数据库, 进行蛋白质结构预测分析。

1.2.2 原核表达载体 pGEX4T-1-PRA 和 pMAL-p2x-PRA 的构建

设计带 BamH I 和 Sal I 酶切位点的上游引物 5' A CGGATCCATGGCAGCTAGTAGT3' 和下游引物 5' A CGTCGACCTCATTAAGCATCGCTCTA3', 对新疆黄精 PRA 基因编码区进行 PCR 扩增, 回收 PCR 产物, 用 BamH I 和 Sal I 进行双酶切, 将目的基因亚克隆至 pGEX4T-1 和 pMAL-p2x 载体上, 65°C 变性 15 min; 连接转化 *E. coli* DH5 α , 酶切鉴定后, 电泳结果与预期的 550 bp 的基因片段大小相符。送 TaKaRa 公司进行测序, 获得的正确重组子分别命名为 pGEX4T-1-PRA 和 pMAL-p2x-PRA。

1.2.3 重组质粒 pGEX4T-1-PRA 和 pMAL-p2x-PRA 在大肠杆菌中的表达和纯化

将 pGEX4T-1-PRA 和 TB1/pMAL-p2x-PRA 分别转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 挑取单菌落, 在 37°C 过夜培养。按 1% 接种于 5 mL 100 mg L⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 37°C 下振荡培养。菌液 OD₆₀₀ 达到 0.5~0.6 时, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 0.5 mmol L⁻¹。分别在 22°C 和 37°C 诱导 3 h (不加 IPTG 诱导为对照组); 诱导结束, 取不同温度条件下诱导的菌液, 以 12 000 \times g 离心后收集菌体, 加适量的磷酸缓冲液 (PBS) 重悬菌体, 进行超声处理, 超声后的菌液于 4°C 12 000 \times g 离心 20 min, 分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。

可溶性的 GST-PRA 纯化按照 Glutathione

Sepharose 4B 使用说明进行; MBP-PRA 的纯化按照 Amylose Resin 使用说明进行。对于包涵体 GST-PRA 蛋白纯化, 先用 1~3 mol/L 尿素对包涵体进行洗涤, 然后用 6 mol/L 尿素溶解包涵体蛋白。用 pH 8.5 复性缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCL, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 尿素浓度由 2 mol/L 开始逐渐降低) 对尿素溶解包涵体蛋白进行梯度透析复性, 每 8 h 换一次液, 32 h 后用 PBS 透析, 8 h 后 4°C 12 000 \times g 离心 20 min, 取上清进行 SDS-PAGE 检测。蛋白质的纯化过程均在 4°C 或冰浴中进行。

1.2.4 真核表达载体 pcDNA3-PRA 的构建

设计带 EcoR I 和 Xba I 酶切位点的上游引物 5' G ACAGGAATTCTCATGGCAGCTAGT AGTAGT3' 和下游引物 5' GACCGTCTAGACCCTCATTAAGC ATCGCTCTA3', 对 PRA 编码区进行 PCR 扩增, EcoR I 和 Xba I 酶切回收的 PCR 产物及载体 pcDNA3, 65°C 下变性 15 min; 连接转化 *E. coli* DH5 α , 酶切鉴定, 得到与预测结果一致的片段后, 送 TaKaRa 公司进行测序, 其中正确重组子命名为 pcDNA3-PRA。

1.2.5 小鼠免疫和 PRA 抗血清的制备

蛋白免疫: 选取 4 周龄雌性昆明小鼠 (体重为 19~21 g), 分 GST-PRA 和 MBP-PRA 两个免疫组, 各 4 只。第一次免疫用弗氏完全佐剂, 其余两次用弗氏不完全佐剂。分别将复性的包涵体 GST-PRA 和纯化的 MBP-PRA 蛋白加等体积佐剂充分乳化后, 经皮下多点注射进行免疫, GST-PRA 和 MBP-PRA 的剂量分别为 50 μ g/只和 30 μ g/只, 共免疫 3 次, 每次间隔 2 周。每次免疫前眼后底眶取血, 第三次免疫 1 周后摘眼球取血, 血清于 -20°C 冻存。

核酸免疫: 4 周龄昆明雌性小鼠 (体重为 19~21 g) 随机分为 pcDNA3 对照组和 pcDNA3-PRA 免疫组, 分别为 8 只和 10 只小鼠。在小鼠右后腿胫骨前肌中部注射 100 μ L 0.25% 普鲁卡因, 24 h 后在同一部位分别用生理盐水溶解的质粒 DNA 三点注射免疫, 每只小鼠注射质粒 DNA 100 μ L (质粒含量 1.5 μ g/ μ L), 分别于 2、4、6 周加强免疫。每次免疫前于小鼠眼后底眶取血并进行称重处理, 收集血清, -20°C 备用。

1.2.6 间接 ELISA 鉴定

以纯化的目的蛋白 GST-PRA 和 MBP-PRA 分别包被酶标板, 以免疫前的血清作为对照, 通过间接

ELISA 方法, 分别进行目的蛋白与 GST-PRA 和 MBP-PRA 蛋白免疫血清及 pcDNA3-PRA 基因免疫血清的反应试验。

1.2.7 Western blot 分析

将纯化的 GST-PRA 和 MBP-PRA 蛋白经 SDS-PAGE 后电转移至硝酸纤维素膜上, 1%BSA 封闭 2 h; 一抗鼠蛋白免疫血清的稀释度均为 1:500 (或一抗鼠核酸免疫血清的稀释度为 1:100), 一抗 37°C 哺育 1.5 h; 二抗 HRP 标记的羊抗鼠的稀释度为 1:500, 二抗 37°C 哺育 1 h; 加底物 DAB 显色, 拍照。

2 结果与分析

2.1 新疆黄精凝集素基因的扩增

以从新疆黄精叶中分离的总 DNA 为模板, 按前述设计的引物, 通过 PCR 扩增新疆黄精凝集素基因, 获得单一条带, 大小约为 550 bp (图 1), 与引物所对应片段的理论大小相符。经过多次 PCR 和测序, 结果表明我们获得了一个新疆黄精凝集素基因, 将其命名为 PRA 基因(GenBank 注册号为 gi:58761182)。

2.2 PRA 基因和推导的氨基酸序列分析及分子结构分析

对扩增片段的全序列测定结果见图 2。扩增到

的新疆黄精凝集素完整的 ORF 基因片段长度为 550 个碱基, 编码一条长 159 个氨基酸、分子量约 14kD 的多肽链。将序列在 NCBI 上进行 BLAST 同源性比较, 发现新疆黄精的核酸序列与多花黄精凝集素 PMA 和囊丝黄精凝集素 PCA 之间有很高的同源性 (达 92%)。

我们从基因组中扩增的 PRA 基因片段的结构基因区与报道的 cDNA 序列的编码区是一致的, 由此可推断, 新疆黄精凝集素基因中不存在内含子。这与已报道的多数其他植物凝集素基因的结果是一致的^[8]。

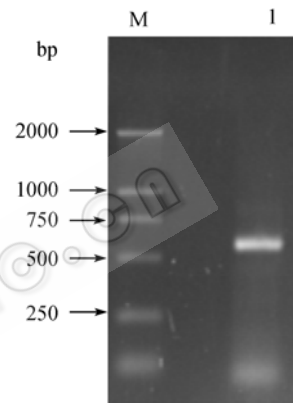


图 1 新疆黄精凝集素基因片段的 PCR 扩增
Fig. 1 Amplification of *Polygonatum roseum* agglutinin (PRA) genes
M: DL2000 marker; 1: PCR products of PRA genes

	P1																													
1	ATG	GCA	GCT	AGT	AGT	AGT	CCA	ATC	CTC	CTC	CTC	ATG	GCC	ACC	ATC	GCC	ATC	TTT	GGC	CTC	60									
1	M	A	A	S	S	S	P	I	L	L	L	M	A	T	I	A	I	F	G	L	20									
	Signal sequence																													
61	ATG	ATT	GCA	TCG	CCG	TGC	GCA	GCG	GTC	AAT	TCT	CTG	ACC	TCC	CCC	AAC	AGC	CTC	CCC	TCC	120									
21	M	I	A	S	P	C	A	A	V	N	S	L	T	S	P	N	S	L	P	S	40									
121	GGC	CAT	TCC	CTC	AAC	TCG	GAC	TCT	TAC	CGT	CTC	ATC	ATG	CAG	GGA	GAC	TGC	AAC	TTC	GTG	180									
41	G	H	S	L	N	S	D	S	Y	R	L	I	M	Q	G	D	C	N	F	V	60									
	mannose-binding sites III																													
181	TTG	TAC	GAC	TCA	GGC	AAC	CCT	GTT	TGG	GCG	TCC	AAC	ACC	GGC	GGG	CTC	GGC	AGT	GAC	TGC	240									
61	L	Y	D	S	G	N	P	V	W	A	S	N	T	G	G	L	G	S	D	C	80									
241	CGC	TTG	ACG	TTG	CAC	AAC	AAC	GGG	AAC	CTC	GTC	ATC	TAC	GAT	AGG	GGC	AAC	AAT	GTG	ATT	300									
81	R	L	T	L	H	N	N	G	N	L	V	I	Y	D	R	G	N	N	V	I	100									
	mannose-binding sites II																													
301	TGG	GAG	ACC	AAG	ACG	AAC	GGG	AAG	GAC	GAC	CAT	TAC	GTT	CTG	GTG	CTG	CAG	CAA	GAC	CGC	360									
101	W	E	T	K	T	N	G	K	D	D	H	Y	V	L	V	L	Q	Q	D	R	120									
361	AAT	GTG	GTC	ATC	TAC	GGC	CCT	GCA	GTT	TGG	GCA	ACC	AAC	AGT	GGA	CCG	GCC	GTC	GGA	CTC	420									
121	N	V	V	I	Y	G	P	A	V	W	A	T	N	S	G	P	A	V	G	L	140									
	mannose-binding sites I																													
421	ACC	CTT	GTT	CCG	CAT	AAC	GCT	ACT	GCT	ATT	GTT	CAT	GCT	AGA	GCG	ATG	CTT	AAT	GAG	TAA	480									
141	T	L	V	P	H	N	A	T	A	I	V	H	A	R	A	M	L	N	E	*	160									
481	TTA	AGC	AGT	AAT	TAA	ACC	TTT	AAT	GGT	<u>GAG</u>	<u>GTA</u>	<u>ATC</u>	<u>ATG</u>	<u>TTG</u>	<u>TAC</u>	GTT	GAT	CAG	TAT	TAG	540									
	P2																													
541	AAT	ATG	TGC	ATG	ATG	<u>CAC</u>	<u>ATG</u>	<u>TTT</u>	<u>GGT</u>	<u>GTT</u>	<u>TGT</u>																			573
	P3																													

图 2 新疆黄精凝集素 PRA 的碱基序列及由此推导的氨基酸序列

Fig. 2 DNA sequence and deduced amino acid sequence of PRA gene

The site of primer P1, P2 and P3 were underlined. The putative signal sequence and C-terminal sequence a of PRA involved cleavage in post-translation was shaded with a rude black background respectively. The three mannose-binding sites were underlined with arrow

通过比较由基因片段推导的氨基酸序列, 发现 PRA 与囊丝黄精凝集素(PCA)氨基酸序列同源性为 85%, 而与多花黄精凝集素(PMA)同源性为 79.8%, 表明 PRA 与 PMA、PCA 在进化上具有很高的相关性。按照文献[9], 推测 PRA 基因编码一个包含 28 个氨基酸信号肽的前体蛋白。N-端信号肽剪切位点可能在 A₂₈ 和 V₂₉ 氨基酸之间。与其它单子叶甘露糖结合凝集素比对, 推测 PRA 蛋白的 C-末端肽剪切位点可能在 G₁₃₃ 和 S₁₃₄ 之间。根据已发表的文献中该多肽链氨基酸构成的特点, 认为其 N 端 28 个氨基酸是信号肽, 富含 Ala; C 末端有 26 个氨基酸的末端延伸, 它们将在翻译过程中和翻译后被切除^[6]。将 PRA 与 PMA、PCA 等凝集素进行蛋白比对, 发现 PRA 蛋白含有与单子叶甘露糖结合凝集素一致的甘露糖结合位点盒(QXDXNXVXY, X 为不确定氨基酸), 但是 PRA 蛋白的第二个甘露糖结合位点相对于 GNA 发生了变异(成熟蛋白 Q₅₇→H₅₇, D₅₉→N₅₉), 其余两个甘露糖结合位点一致; 一些与维持空间结构相关的关键性疏水性氨基酸并没有发生改变。

将 PRA 蛋白序列提交 SWISS-MODEL, 进行同源模建分析(见图 3, 图 4)。PRA 蛋白是由 3 个或 4 个反向平行的β-折叠片组成的亚结构域(Subdomain I,

II and III)所形成的β-桶结构, 共 12 个β-折叠片。PRA 蛋白极可能以二聚体或四聚体存在, 因为组成 Subdomain I 的第四个β-折叠片必须从另外一个折叠相关的亚基(Subunit)的 C-端去借才能形成完整的 Subdomain I, 这与 GNA 等绝大多数单子叶甘露糖结合凝集素一致, 但与 Gastrodianin-1 不同^[10], Gastrodianin-1 由于 N₁₀₁, A₁₀₂, I₁₀₃ 等三个氨基酸的插入, 能自身回折而形成完整的 Subdomain I 结构, 因此它可能以单聚体存在。

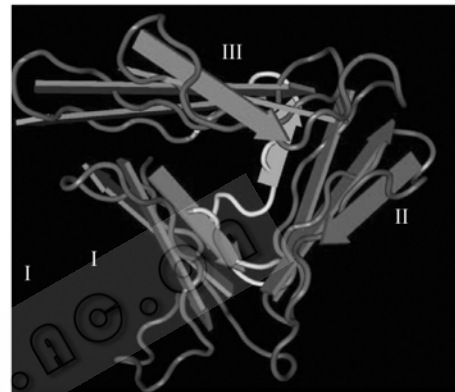


图 3 SWISS-MODEL 推测的 PRA 蛋白的三维立体结构
Fig. 3 The three-dimensional structure of PRA protein provided by SWISS-MODEL

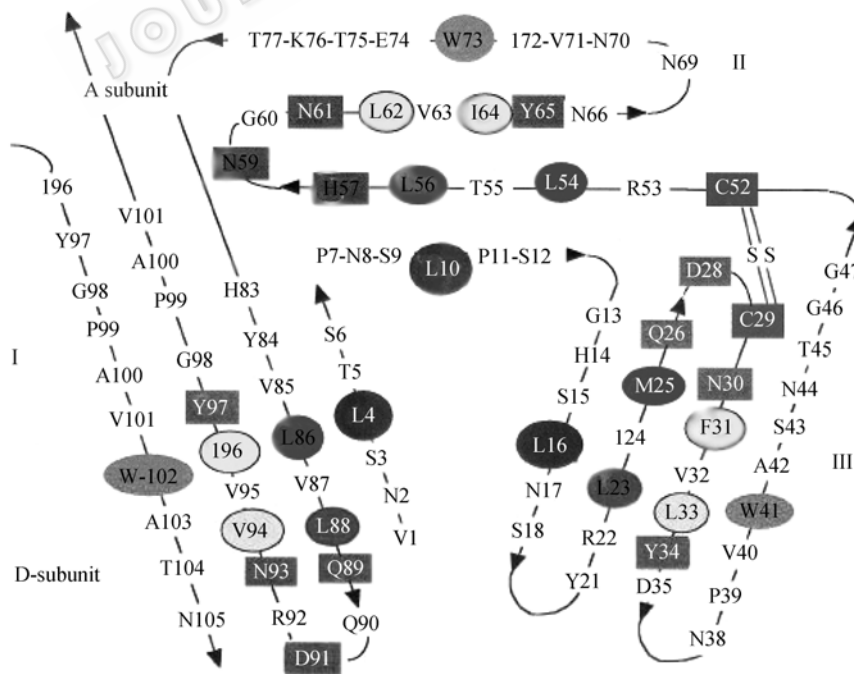


图 4 PRA 蛋白的亚结构域示意图
Fig. 4 Schematic illustration of the PRA subdomain

2.3 原核表达载体 pGEX4T-1-PRA 和 pMAL-p2x-PRA 和真核表达载体 pcDNA3-PRA 构建

经 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切 pGEX4T-1-PRA 和 pMAL-p2x-PRA, *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切 pcDNA3-PRA, 酶切电泳鉴定正确。

2.4 融合蛋白 GST-PRA 和 MBP-PRA 的诱导表达和纯化

在 37°C、0.5 mmol/L IPTG 条件下诱导 3 h, MBP-PRA 主要以可溶形式蛋白表达, 在 65 kD 左右出现一特异性的条带, MBP-PRA 为目的蛋白, 而空载体 pMAL-p2x 受诱导产生的含 MBP 的融合标签分子量为 51 kD 左右, 这一结果说明 MBP-PRA 融合蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达, 通过光密度扫描诱导的蛋白量可达到 28%; 对所表达的蛋白进行纯化, 得到一条 65 kD 左右的特异性条带, 见图 5。

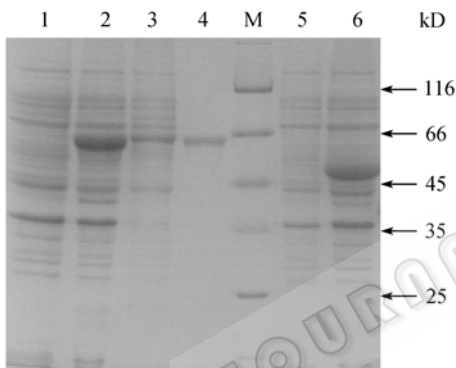


图 5 可溶性的 MBP-PRA 蛋白的表达与纯化

Fig. 5 Expression and purification of soluble MBP-PRA

1: TB1/pMALp2x-PRA, not induced by IPTG at 37°C; 2: TB1/pMALp2x-PRA, induced by IPTG at 37°C; 3: bacterial lysate; 4: purified GST-PRA by amylose resin; 5: TB1/pMALp2x, not induced by IPTG; 6: TB1/pMALp2x, induced by IPTG at 37°C; M: protein molecular weight marker

通过条件优化 GST-PRA 在 22°C、0.5 mmol/L IPTG 条件下诱导 3h, 主要以可溶形式蛋白表达, 在 40 kD 左右处出现一条明显的特异性蛋白带,其大小与预期的相当;未诱导 pGEX4T-1-PRA 对照则没有此带,表明目的蛋白 GST-PRA 已在大肠杆菌中得到表达。对所表达的蛋白进行纯化,除得到一条 GST-PRA 融合蛋白条带外,还出现一条 GST 样(26 kD 左右)大小条带,这可能是在诱导表达时只表达 GST 部的结果,见图 6;但在 37°C、0.5 mmol/L IPTG 条件下诱导 3 h, GST-PRA 主要以包涵体蛋白形式表达,对包涵体蛋白进行洗涤、溶解和复性,最终可得到纯度为 85% 以上的蛋白,见图 7。

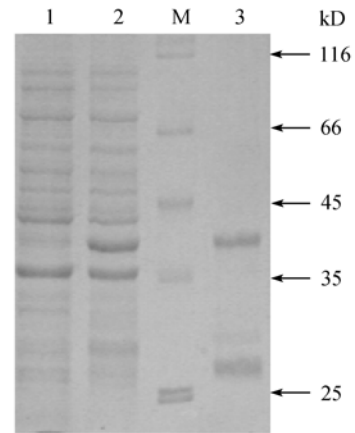


图 6 可溶性的 GST-PRA 蛋白的表达与纯化

Fig. 6 Expression and purification of Soluble GST-PRA

1: BL21/pGEX4T-1-PRA, not induced by IPTG at 22°C; 2: BL21/pGEX4T-1-PRA, by induced 0.5 mmol/L of IPTG; 3: purified GST-PRA by Glutathione Sepharose 4B; M: protein molecular weight marker

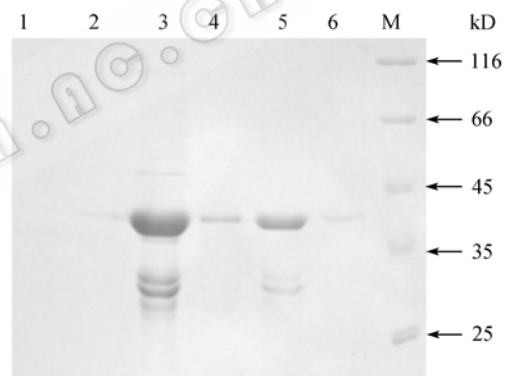


图 7 包涵体 GST-PRA 蛋白的纯化

Fig. 7 Purification of inclusion body GST-PRA

1: 1 mol/L urea of soluble proteins; 2: 2 mol/L urea of soluble proteins; 3: 2 mol/L urea of insoluble proteins; 4: 3 mol/L urea of soluble proteins; 5: 6 mol/L urea of soluble proteins; 6: 6 mol/L urea of insoluble proteins; M: protein molecular weight marker

2.5 抗血清制备和间接 ELISA 检测结果分析

进行目的蛋白 MBP-PRA 和 GST-PRA 与各自免疫后产生的特异性血清交叉反应试验,结果表明,表达蛋白 MBP-PRA 与用 GST-PRA 免疫后产生的特异性血清反应呈阳性反应(平均 OD 值为 0.472),表达蛋白 GST-PRA 与用 MBP-PRA 免疫后产生的特异性血清反应也呈阳性反应(平均 OD 值为 0.535),两个表达系统的检测结果比较相近。说明 MBP-PRA 和 GST-PRA 免疫小鼠后,在小鼠体内都产生了抗 PRA 的抗血清。以 MBP-PRA 包被酶标板,与 pcDNA3-PRA 核酸免疫产生的抗血清进行 ELISA 检测,也能检测到抗原抗体阳性反应(平均 OD 值为

0.286), 而阴性对照组的平均 OD 值仅为 0.11, 表明 PRA 在小鼠体内得到表达, 并产生了免疫应答。

2.6 表达产物的抗原性分析

Western blot 结果显示, 以纯化的 MBP-PRA 蛋白为抗原, 分别用 MBP-PRA 免疫和包涵体 GST-PRA 免疫产生的抗血清进行 Western blot 检测, 在 65 kD 左右均出现一条单一的蛋白带, 与预计的大小相符, 见图 8; 以纯化的包涵体 GST-PRA 蛋白为抗原, 分别用 MBP-PRA 免疫和包涵体 GST-PRA 免疫产生的抗血清进行 Western blot 检测, 结果在 40 kD 左右均出现一条单一的蛋白带, 与预计大小的相符, 见图 8。以上结果说明, 用 MBP-PRA 和包涵体 GST-PRA 蛋白免疫小鼠, 在两组小鼠中都引起了免疫应答, 产生了针对 PRA 的抗体。

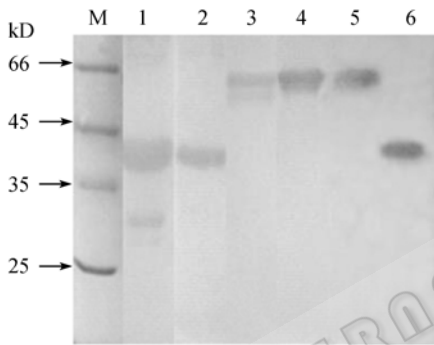


图 8 表达产物 MBP-PRA 和 Western blotting 检测

Fig. 8 Western blotting of MBP-PRA and GST-PRA

1, 2: GST-PRA as the antigen, detected by antiserum from mice immunized by MBP-PRA and GST-PRA, respectively; 3, 4: MBP-PRA as the antigen, detected by antiserum from mice immunized by MBP-PRA and GST-PRA, respectively; 5, 6: MBP-PRA and GST-PRA as the antigen, respectively, detected by antiserum from mice immunized by pcDNA3-PRA; M: protein molecular weight marker

分别以 MBP-PRA 和包涵体 GST-PRA 蛋白为抗原, 用 pcDNA3-PRA 基因免疫产生的抗血清进行 Western blot 检测, 从图 8 结果表明, 在 65 kD 和 40 kD 左右位置分别出现了单一的条带, 与预计相符, 证明该抗血清具有针对新疆黄精蛋白的抗原专一性。我们的实验结果表明用 pcDNA3-PRA 重组质粒免疫小鼠可以激发小鼠产生特异性的抗体, 这与 ELISA 结果相符。用 pcDNA3-PRA 重组质粒免疫小鼠后, 我们还发现 PRA 在体内的表达对小鼠的生长产生了显著影响, 在第二次免疫加强后, 免疫组小鼠生长相对于对照组明显产生了抑制现象(两次重复实验结果一致), 用 Excel 软件进行统计分析,

T-test 检验 $P < 0.05$ 差异性显著, 见图 9。

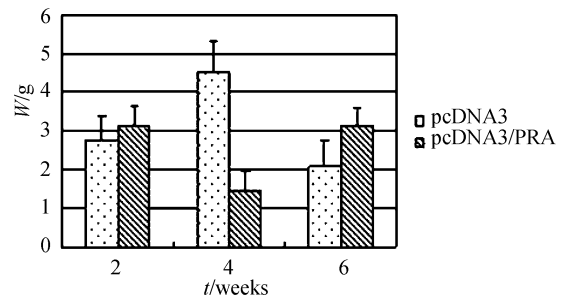


图 9 pcDNA3-PRA 重组质粒免疫昆明白小鼠后对小鼠生长的影响

Fig. 9 The effect of pcDNA3-PRA vaccine on growth of KunMingBai female mice

3 讨论

凝集素等植物天然毒素蛋白基因通常无内含子, 通过同源克隆法直接从基因组克隆出新疆黄精凝集素 PRA 基因, 避开了提取 RNA 及 RT-PCR 等繁琐过程。序列和分子结构分析表明, PRA 基因所编码的蛋白可能是由信号肽、成熟蛋白、C-末端剪切序列所组成的前体蛋白。其氨基酸序列与 PMA、PCA 的同源性分别为 79% 和 85%。鲍锦库等^[8, 11]对 PCA 进行了长期理化性质研究, 发现 PCA 对兔血细胞和肿瘤细胞具有强凝集作用, 还具有较强的温度和酸碱度的耐受性等其他理化特性; Van Damme 等对 PMA^[13]进行了深入研究。进化树分析表明, PRA、PMA 及 PCA 属于同一进化上亲缘关系很近的簇, 它们都属于百合科黄精属植物凝集素。已有研究表明 PMA 和 PCA 都具有抗一些感染人和动物的逆转录病毒功能^[4, 12]。对分子结构进行分析, 发现 PRA 蛋白的第二个甘露糖结合位点盒(HXNXNXVXY), 相对于典型的甘露糖结合凝集素结合位点发生了变异(Q₅₇→H₅₇, D₅₉→N₅₉), H₅₇ 由于不能为 D-甘露糖的结合提供 H 键, 同时会造成空间上的阻碍, 因此这个氨基酸的变异使得 PRA 蛋白的第二个甘露糖结合位点结合甘露糖的能力下降, 这样可能降低此蛋白的甘露糖结合能力^[4]。PMA 与 PRA 一致, 仅含有两个(QXDXNXVXY)甘露糖结合位点盒, 已有实验观察到了 PMA 相对于 GNA 等与甘露糖结合的能力有所降低, 但却表现出与胎球蛋白的强结合力和抗病毒活性^[13]; 而 PCA 仅含有一个(QXDXNXVXY), 而另外的两个(HXNXNXVXY)位点盒, 鲍锦库等认为可

能是唾液酸结合位点,然而 PCA 却表现出强凝集作用。PRA 与 PCA、PMA 在序列上的相似和变异显示了潜在的功能和价值。蛋白同源建模分析表明,PRA 的空间三维结构强烈保守,具典型的 12 个 β -折叠片所形成的 β -桶结构,是单子叶甘露糖结合凝集素家族中的一员。

将 PRA 基因分别构建到原核表达载体 pGEX-4T-1 和 pMAL-p2x 上,并在 *E. coli* 中都得到正确表达;同时成功纯化了可溶形式的 MBP-PRA 蛋白,并完成对包涵体蛋白 GST-PRA 的纯化。我们对 MBP-PRA 和 GST-PRA 蛋白进行了凝集兔红细胞活性检测,结果没有检测到融合蛋白的凝集活性。Liu 等^[9]在检测 MBP-gastrodianin 活性时,发现融合的 MBP-gastrodianin 未表现出抗真菌等活性。由此我们推测这可能是融合蛋白 MBP 或 GST 对 PRA 造成空间阻碍,不能形成正确的构象,阻碍功能蛋白二或四聚体的形成,从而影响活性。

我们首次将植物凝集素 PRA 基因,构建到 pcDNA3 上形成 DNA 疫苗,利用 DNA 疫苗免疫技术^[14],对小鼠进行肌肉免疫,通过 ELISA 和 Western blot 检测,证明 PRA 在小鼠体内得到表达,并引起免疫应答,该抗血清具有针对新疆黄精 PRA 抗原的专一性。此外,研究发现在第二次重组质粒免疫加强后,小鼠的生长受到显著抑制。Ilka 等^[15]较为系统阐述了植物凝集素的抗营养功能及可能造成的毒害。但对其在动物体内表达并对机体所造成的影响未见报道。肌肉免疫后对小鼠生长造成显著抑制的作用机制有待深入研究。新疆黄精凝集素基因的克隆、原核和真核的表达以及抗血清的制备,为进一步的免疫组化及电镜检测提供了必要条件,也将为植物抗病虫基因工程研究提供有用的实验材料。

REFERENCES

- [1] Peumans WJ, van Damme EJ. The role of lectins in plant defence. *Histochem J*, 1995, **27**: 253-271.
- [2] Peumans WJ, Barre A, Hao QRouge Pierre, et al. Minireview: Higher plants development structurally different motifs to recognize foreign glycans. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 2000, **12** (64): 83-101.
- [3] Balzarini J, Schols D, Neyts J, et al. Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, **35**: 410-416.
- [4] Barre A, Van Damme EJ, Peumans WJ, et al. Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins. *Plant Physiol*, 1996, **112**: 1531-1540.
- [5] Stoger E, Williams S, Christou P, et al. Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *strobion* avenae. *Mol Breed*, 1999, **5**: 65-73.
- [6] Zhao CY, Yuan ZQ, Qin HM, et al. Studies on transgenic tobacco plants expressing two kinds of insect resistant genes. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, **17**(3): 273-277.
赵存友, 袁正强, 秦红敏, 等. 转双抗虫基因烟草的研究. *生物工程学报*, 2001, **17**(3): 273-277.
- [7] Zhou YG, Tian YC, Mang KQ. Cloning of AHA gene from *Amaranthus hypochondriacus* and its aphid inhibitory effect in transgenic tobacco plants. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2001, **17**(1): 34-39.
周永刚, 田颖川, 莽克强. 苋菜凝集素基因的克隆及在转基因烟草中抗蚜性研究. *生物工程学报*, 2001, **17**(1): 34-39.
- [8] Bao JK, Zeng ZK, Zhou H. Purification and characterization of the *Polygonatum Cyrtionema* Hua lectin II. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1996, **12** (2): 165-169.
鲍锦库, 曾仲奎, 周红. 黄精凝集素 II 的纯化及部分性质研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 1996, **12** (2): 165-169.
- [9] Bendtsen JD, Nielsen H, Heijne GV, et al. Improved prediction of signal peptides: Signal P3.0. *J Mol Biol*, 2004, **340**: 783-795.
- [10] Liu W, Yang N, Ding JJ, et al. Structural mechanism governing the quaternary organization of monocot mannose-binding lectin revealed by the novel monomeric structure of an orchid lectin. *J Biol Chem*, 2005, **280**(15): 14865-14876.
- [11] Lü H, Gao S, Bao JK, et al. The Effect of different temperatures and pH value on the conformation and biological activity of *Polygonatum cyrtionema* Hua lectin II. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2003, **40**(2): 371-375.
吕辉, 高顺, 鲍锦库, 等. 温度和酸碱度对黄精凝集素生物学活性与构象的影响研究. *四川大学学报(自然科学版)*, 2003, **40**(2): 371-375.
- [12] Van Damme EJ, Barre A, Rouge P, et al. Molecular cloning of the lectin and a lectin-related protein from common Solomon's seal (*Polygonatum multiflorum*). *Plant Mol Biol*, 1996, **31**(3): 657-672.
- [13] An J, Wu CF, Gu Y, et al. *In vitro* plantlet regeneration from rhizome lumps and mannose-binding lectin analysis of *Polygonatum cyrtionema* Hua (family Liliaceae). *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*(TIGG), 2004, **16**: 33-64.
- [14] Helen SG, Katherine AB, Richard WT. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genetic Vaccines and Therapy*, 2003, 1-2.
- [15] Ilka MV, Jose Tadeu AO. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 2004, **44**: 385-403.