

中国水仙凝集素基因的克隆及性质预测

于小清,陈段芬

(河北农业大学 园艺学院,河北 保定 071000)

摘要:为了探索植物凝集素在分子水平的作用机理,利用 RT-PCR 技术从中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)金盏银台中克隆到一个新的编码凝集素的基因。序列分析与预测结果表明,该基因 cDNA 片段总长为 609 bp,含有一个由 25 个氨基酸残基组成的信号肽和一个 519 bp 的完整开放阅读框;编码 172 个氨基酸,分子量为 18 712.31 Da;前体蛋白在氨基酸水平上与杂种多花水仙凝集素、雪花莲凝集素、石蒜凝集素的一致性分别为 83%,81%和 77%;其二级结构以 α -螺旋、不规则盘绕和延伸链为主;三级结构与雪花莲凝集素极其相似,是一种能与 D-甘露糖特异性结合的 B 型凝集素。

关键词:中国水仙;凝集素基因(*NLI*);序列分析;性质预测

中图分类号:S682.2⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)02-0047-04

Molecular Cloning of a Lectin Gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* and Characteristic Prediction

YU Xiao-qing, CHEN Duan-fen

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China)

Abstract: A new lectin gene (*NLI*) was cloned from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Jinzhanyintai. The results of sequence analysis indicated that the cDNA was 609 bp in length with an open reading frame (ORF) which was capable of encoding 172 amino acids; the protein precursor composed of a signal peptide with 25 amino-acid residue and a mature protein with 148 amino-acid residues, and its molecular weight was 18 712.31 Da. The homologous analysis showed that the identity between *NLI* and *Narcissus hybrid* cultivar lectin, *Galanthus nivalis* lectin and *Lycoris radiata* lectin was 83%, 81% and 77% respectively. Characteristic prediction results indicated that the secondary structure of *NLI* included α -helix, random coil and extended strand mainly, and its three-dimensional structure strongly resembled the snow-drop lectin, therefore the *NLI* should belong to bulb-type mannose specific binding lectin.

Key words: *Narcissus tazetta* var. *chinensis*; Lectin gene (*NLI*); Sequence analysis; Characteristic prediction

植物凝集素(Lectin)是含有至少一个非催化结构域并可特异结合到单糖或寡糖上的植物蛋白,广泛分布于豆科、茄科、大戟科、禾本科、百合科和石蒜科植物中,在植物的自我防御和免疫方面有着举足轻重的作用^[1,2]。近年来,随着对其研究的不断深入,植物凝集素在免疫学、肿瘤、生殖生理、细胞生物学等许多方面得到应用^[3]。单子叶甘露糖结合凝集素(Monocot mannose-binding lectin, MBL)是具有甘露糖及其衍生物结合专一性的糖结合蛋白,对肿瘤细胞、逆转录病毒具有特异而强烈的抑制作用,对同翅目昆虫具有高效的毒杀作用,所以在医学和农业应用领域均呈现出巨大的开发价值和广阔的应用前景^[4,5]。

在单子叶甘露糖结合凝集素研究中,石蒜科植物因其种类繁多,凝集素种类丰富而更加受人瞩目。迄今为止,已经从该科的雪花莲、葱莲、石蒜、朱顶兰和杂交多花水仙中克隆到多个凝集素基因,其中雪花莲凝集素基因被广泛应用于农业害虫的防治中^[6,7]。研究表明,水仙属植物的凝集素属甘露糖特异结合凝集素,具有免疫诱导、抑制 HIV-1 病毒活性和潜在的杀虫作用^[8,9]。Ooi 等^[10]已从中国水仙中得到了 3 种 N-末端氨基酸序列相似的凝集素,并证明该凝集素对病毒导致的多核体形成有抑制作用,还可使感染了牛免疫缺陷病毒的小牛肺细胞恢复活性,在医学领域具有重要的应用价值。但

收稿日期:2008-12-02

基金项目:河北农业大学新兴学科资助项目(QN200008)

作者简介:于小清(1983-),男,河北保定人,在读硕士,主要从事观赏植物分子育种方面的研究。

通讯作者:陈段芬(1968-),女,河北宁晋人,教授,博士,硕士生导师,主要从事观赏植物教学与研究。

目前为止,还未曾有中国水仙凝集素基因的克隆和序列分析报道,无法从分子水平上分析该类凝集素的作用机理。从中国水仙中克隆出编码该类凝集素的基因,不仅可以在分子水平上探索该类凝集素的作用机理,还可通过基因工程将该类基因转入农作物中进行抗虫育种,对农业生产具有重大意义。

1 材料和方法

1.1 植物材料和菌株

中国水仙品种金盏银台产自福建漳州。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 和根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 由本实验室保存。克隆载体为 Promega 的 pGEM - T easy 载体。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取中国水仙幼嫩花蕾的 RNA^[11]用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA。

1.3 基因的克隆与测序

根据石蒜科凝集素基因家族的保守区序列设计引物,用于 RT - PCR,引物 1:5' - atggctaagacaagcttc - 3';引物 2:5' - gacatgcacgcaaggttcaaag - 3'。上述引物由上海生工生物工程有限公司合成。

以中国水仙 cDNA 为模板,进行梯度 PCR。在引物 1 和引物 2 的反应体系中应用宝生物工程有限公司的 LA Taq 酶,反应条件为:94 预变性 5 min; 94 1 min,56 ~ 60 1 min,72 1 min,35 个循环; 72 延伸 10 min。PCR 产物电泳分析后用上海申能博彩生物科技有限公司试剂盒回收,按照 Promega 的 pGEM - T easy 载体快速连接试剂盒操作流程,将回收的 DNA 片段连到载体上,转化大肠杆菌,经蓝白斑筛选,提取阳性克隆质粒并酶切图谱分析后,送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。

1.4 序列的生物信息学分析

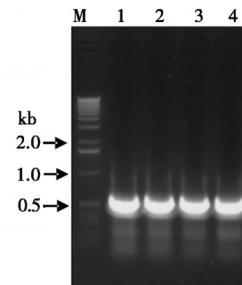
利用 DNASTar、MotifScan、SignalP、PSIPred 以及 SWISS MODEL 等生物软件分析测定 cDNA 序列及其编码蛋白质的结构特点,并与国际核酸和蛋白质数据库联网进行 blast 比较分析。

2 结果与分析

2.1 基因克隆与序列分析

以反转录合成的中国水仙 cDNA 作为模板,用引物 1 和引物 2 进行扩增反应,PCR 产物在 0.8 % 的琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色后发现在 550 bp 处有一条亮带(图 1),和预测大小基本一致,初步确定为目的基因。片段回收后与 pGEM - T easy 载体连接,转

化后将阳性克隆送公司测序。测序结果表明,插入片段为 609 bp,含有一个完整的开放阅读框(519 bp),命名为 *NIL1*,GenBank 登记号为 F195651。



1.55.9 ;2.56.7 ;3.57.8 ;4.59.3 ;M.1 kb 分子量标记。
1.55.9 ;2.56.7 ;3.57.8 ;4.59.3 ;M.1 kb ladder.

图 1 梯度 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 DNA fragments amplified by gradient PCR

利用 MotifScan、DNASTar 等生物学软件及 NCBI 在线 Blast 对 F195651 的序列进行分析发现,该基因包含一个完整的编码 172 个氨基酸的开放读码框(图 2),其编码肽链包含 2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(36 - 39;102 - 105),2 个 N - 肉豆蔻酰化位点(103 - 108;130 - 135),5 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(124 - 126;144 - 146;157 - 159;163 - 165;170 - 172)和 1 个二硫键位点(54 - 77)。肽链上包含 1 个 B 型凝集素结构域,3 个 D - 甘露糖结合位点(QDNVY)位于第 79 ~ 402 个碱基之间(图 2 划单线者)。

```

1 ATGGCTAAGACAAGCTTCTCTCATTTCTGGCCACCATCTTCTTGGGCTCATCTGTACCA
M A K T S F L I L A T I F L G V I T V P
61 TCTTGGCTCGGTGACAACAACATTTCTCTACTCGGTGAGACTCTCTCTCCGGAGAAATTT
S C L G D N N I L Y S G E T L S P G E F
121 CTCAACTACGCTAGATATATTTTATCATGCAAGAGCACTGCAATTTGCTTCTGTACGAC
L N Y G R Y I F I M Q E D C N L V L Y D
181 CTCGACAAGCCTATCTGGGCAACAAACACGGTGGCCTCGCCCTGACTGCCACCTCAAC
V D K P I W A T N T G C L A R D C H L N
241 ATCGACAGCGACGGAACTCGTCTGTACACGCAACGAAACGACCGGATTTGGCGGAGC
M Q S D G N L V V Y S Q T N D P I W A S
301 AACACCGGAGCGGAGAATCGGAATTACGTGCTGCTTTCAGAAAGCATCGGAACGTTCTG
N T G G E N G N Y V C V L Q K D R N V V
361 ATCTACGGAACCTGCTCGGCTACTGGAACATACACGGCGCTGTAGGAATTTCGGAA
I Y G T A R W A T C T Y T G A V G I P E
421 TCACCCCGCTCGGAGAGATATCTCTACTGCTGGAAGATAACTGGCTCGGAGAAATAT
S P P S E R Y P T A G K I T L A S E K Y
481 CCTACTCTGGAAGATAAAGTTAGTGACCGCAAGTAA
P T T G K I K L V T A K

```

图 2 *NIL1* CDS 区核苷酸序列及其推导出的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *NIL1*

利用 Signal P 进行信号肽分析后发现,该序列第 1 ~ 75 位编码一段含有 25 个氨基酸的信号肽(图 2 划方框者),具有明显跨膜区,其中第 1 ~ 4 个氨基酸在膜内,第 5 ~ 22 个氨基酸在膜上,第 23 ~ 172 个氨基酸在膜外。

由上可知,该基因具有典型的 D - 甘露糖特异性结合凝集素基因结构,编码一种 Bulb 型凝集素。

此外,通过 DANSTAR 软件预测,*NIL1* 编码的蛋白质等电点和分子量分别为 5.274 和 18 712.31 Da。

2.2 石蒜科凝集素氨基酸系统进化树比较

对 *NIL1* 基因编码的蛋白与数据库中已知的石蒜科凝集素氨基酸序列进行比较分析,结果显示 *NIL1* 与杂种多花水仙 (*Narcissus hybrid cultivar 2*) 的 *LECNPA 1* (AAA33546)、朱顶兰 (*Amaryllis vittata*) 的 *AGGLUTININ* (AAP57409) 以及雪花莲 (*Galanthus nivalis*) 的 *LECGNA 2* (AAA33346) 的一致性均在 81 % 以上,其中与杂种多花水仙的 *LECNPA 1* 和朱顶兰的 *AGGLUTININ* 一致性高达 83 %。与葱兰 (*Zephyran-*

thes candida) 的 *LECTIN* (AAP37975) 和红花石蒜 (*Ly-*
coris radiata) 的 *LECTIN* (BAD98798) 一致性分别为 78 % 和 77 %。图 3 是 *NIL1* 编码的蛋白质与上述物种蛋白质序列的比较分析结果,可以看出氨基酸序列的 5 端的保守性较高,而 3 端的保守性较低。

对上述凝集素蛋白进行系统进化树分析发现, *NIL1* 与杂种多花水仙的 *LECNPA 1* 聚在一支,从而证实了所克隆的 *NIL1* 基因可能是水仙属植物凝集素超基因家族的一员。

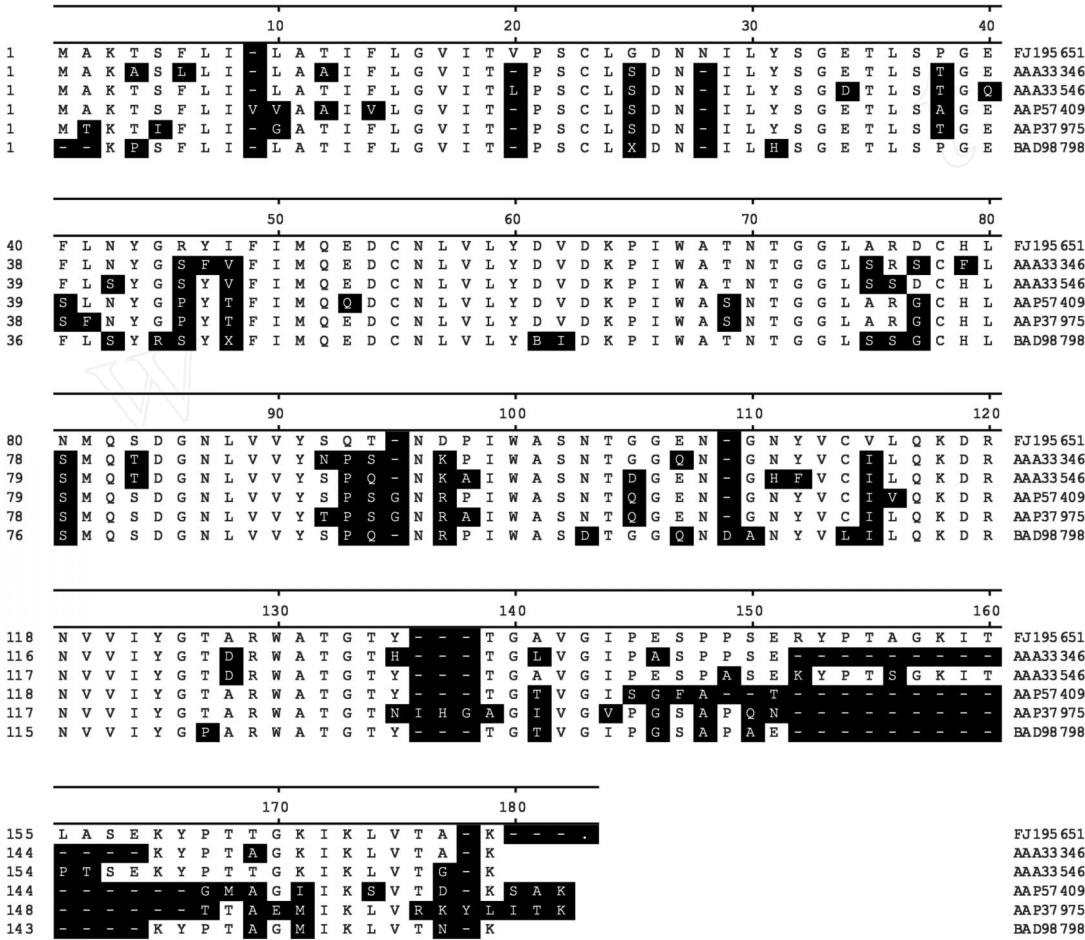


图 3 *NIL1* 编码的氨基酸序列与石蒜科其他物种凝集素的序列比较

Fig.3 Alignment of *NIL1* protein with other lectin proteins from Amaryllidaceae

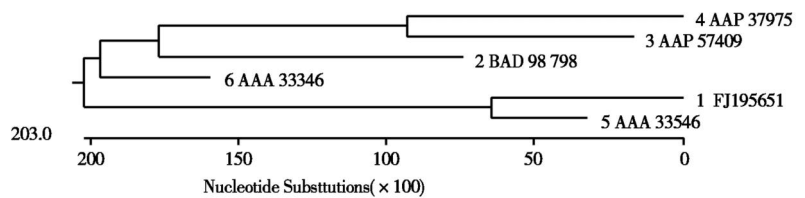


图 4 *NIL1* 基因编码蛋白与石蒜科其他物种凝集素的系统进化树分析

Fig.4 Polygenetic tree analysis of lectin proteins from Amaryllidaceae

2.3 二级结构比较

利用 PSIPred 软件对中国水仙 *NIL1* 与杂种多花水仙的 *LECNPA1* 和雪花莲的 *LECGNA2* 进行二级结构分析,结果见表 1。发现三者均以 - 螺旋、延

伸链和不规则盘绕为蛋白最主要的结构元件,各种二级结构在肽链中所占比例虽然有所差异,但差别不大,说明三者可能在功能上可能存在很大的相似性。

表 1 3 种凝集素基因编码蛋白的二级结构比较

Tab.1 The comparison of secondary structure between different lectins

二级结构的类型特异 Types of secondary structure	中国水仙 NIL1	所占比例/ % Percent	杂交多花水仙 LECNPA1	所占比例/ % Percent	雪花莲 LECGNA2	所占比例/ % Percent
Alpha helix	17	9.88	15	8.77	15	9.55
Extended strand	62	36.05	60	35.09	58	36.94
Random coil	93	54.07	96	56.14	84	53.51

2.4 三级结构比较

利用 SWISS MODEL 对中国水仙的 NIL1、杂交水仙的 LECNPA1 以及雪花莲的 LECGNA2 进行三级结构模拟,结果见图 5。由图 5 可知,NIL1 与 LECNPA1 和 LECGNA2 均通过经典的“ - prism II fold ”折叠模式行折叠成其高级结构^[4]。每个亚基由三个亚结构串联排列而成,而每个亚结构又由反向平行的

- 片层带组成,形成拓扑形态相似的极性糖结合表面,每个表面存在一个甘露糖结合位点(图 5 号所示)。上述结果表明,NIL1、LECNPA1 和 LECGNA2 可能具有相似的功能,但由于氨基酸组成、二级结构和空间构象的细微差异,其生物活性及其他性质可能会存在一定的差异^[12],所以仍需对其结构和功能进行深入研究。

图 5 NIL1 与杂交水仙、雪花莲三级结构的比较

Fig.5 Side view of the 3 - Dimensional models of NIL1 with LECNPA1 and LECGNA2

3 结论

中国水仙是我国传统栽培的一种优良观赏植物,其全株含有大量特殊的凝集素,在医学领域受到高度关注。利用 RT- PCR 技术,从中国水仙中克隆到一个新的凝集素基因 *NIL1*,并利用多种生物学软件对其进行了结构和功能预测,发现该基因编码具有 25 个氨基酸信号肽的凝集素蛋白前体,成熟蛋白包含 1 个典型的 Bulb 型凝集素结构域,其中有 3 个 D- 甘露糖结合位点。与数据库中已知的石蒜科凝集素氨基酸序列进行比较分析发现,NIL1 与杂交多花水仙的 LECNPA 1(AAA33546)、雪花莲的 LECGNA 2(AAA33346)的一致性高达 81 % 以上;三者的二级和三级结构存在着高度相似性,说明其功能可能也存在着高度的一致性,但氨基酸组成、二级结构和三级结构的细微差别也可能导致生物活性及功能等方面的差异。目前该基因的植物表达载体已经构建完成,并且已成功转入烟草和拟南芥中,对其功能的研究正在进行中。鉴于单子叶甘露糖结合凝集素,尤其是雪花莲、半夏等植物的凝集素在医学和农业应用领域广泛的应用前景^[4],相信 *NIL1* 基因功能的进一步鉴定也将在上述领域产生深远的影响。

参考文献:

[1] 梁 峰,常团结.植物凝集素的研究进展[J].武汉大学学报:理学版,2002,48(2):232 - 238.

[2] 董朝蓬,杜林方,段 真.植物凝集素研究进展[J].天然产物研究与开发,2003,15(1):71 - 76.

[3] Peumans W J, Van Damme E J M. Lectins as plant defense proteins[J]. Plant Physiology,1995,109:347 - 352.

[4] 徐小超,罗永挺,刘 超,等.单子叶甘露糖结合凝集素的结构及生物活性[J].天然产物研究与开发,2007,19(2):529 - 534.

[5] 潘 科,黄炳球,侯学文.植物凝集素在病虫害防治中的研究进展[J].植物保护,2002,28(4):42 - 44.

[6] Jouanin L, Bottino M B, Grard C, et al. Transgenic plats for insect resistance[J]. Plant Science,1998:1311 - 1317.

[7] Hilder V A, Powell K S, Gatehouse A M R, et al. Expressing of snowdrop lectin in transgenic tomato plants results in added protection against aphids[J]. Transgenic Research,1995,4:18 - 25.

[8] Lopez S, Armand - Ugon M, Bastida J, et al. Anti - human immunodeficiency virus type 1 (HIV - 1) activity of lectins from Narcissus species[J]. Planta Medica,2003,69(2):109 - 112.

[9] Summers C, Forrest J, Norval - M, et al. The potentially insecticidal *Narcissus pseudonarcissus* lectin demonstrates age - related mitogenicity[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology,2002,33(1):47 - 49.

[10] Ooi L S M, Ng T B, Sun S S M, et al. Mannose - specific isolectins with different hemagglutinating potencies isolated from Chinese daffodil (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) leaves [J]. Journal of Protein Chemistry,2000,19(2):163 - 168.

[11] Gao Z M, Li X P, Li L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo[J]. Chinese forestry science and technology,2006,5(3):52 - 54.

[12] 郭明雄,孙桂鸿,吴显辉,等.从生物大分子结构特征解析植物凝集素的多样性[J].武汉植物学研究,2003,21(2):155 - 165.