

半夏凝集素基因的克隆、生物信息学分析及其蛋白的亚细胞定位

赵 欢^{1,2,3}, 彭正松², 雷 杨³, 周永红^{1*}

1. 四川农业大学小麦研究所, 四川 成都 611130

2. 西华师范大学生命科学院, 四川 南充 637002

3. 四川农业大学水稻研究所, 四川 成都 611130

摘要: 目的 克隆半夏凝集素基因, 并对其进行生物信息学分析和亚细胞定位。方法 以半夏 *Pinellia ternata* 新鲜叶片的 DNA 为模板, 根据 Genbank 上的半夏凝集素的基因序列 (GU593718.1) 设计引物, 克隆了半夏凝集素 (PTA) 基因, 并构建植物表达载体 pI1300-CaMV35S-PTA-GFP, 在农杆菌 GV3101 中进行表达且观察了其在烟草中瞬时表达。结果 所克隆的 PTA 的开放阅读框为 810 bp, 其编码 269 个氨基酸; 具有 1 条信号肽、2 个 B-lectin 保守区域和 3 个甘露糖结合基序; PTA 氨基酸序列与 NCBI 中所报道的半夏、掌叶半夏 *P. pedatisecta*、滴水珠 *P. cordata* 凝集素的氨基酸序列的同源性分别达到 97%、85% 和 83%; 初步推测其定位于膜上, 现已在 NCBI 中登记 (登录号 KF154979)。结论 本实验通过对半夏凝集素的生物信息学分析和亚细胞定位分析, 为进一步研究半夏凝集素的抗病虫害机制奠定了基础。

关键词: 半夏; 半夏凝集素; 基因克隆; 瞬时表达; 亚细胞定位

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)13-1914-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.13.020

Genomic cloning, bioinformatics analysis, and subcellular localization of an agglutinin gene from *Pinellia ternata*

ZHAO Huan^{1,2,3}, PENG Zheng-song², LEI Yang³, ZHOU Yong-hong¹

1. Institute of Triticeae Research Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

2. College of Life Science, China Western Normal University, Nanchong 637002, China

3. Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: Objective To clone an agglutinin gene from *Pinellia ternata* and to analyze its bioinformatics and subcellular location. **Methods** Based on the published sequence GU593718.1 from Genbank, *P. ternata* agglutinin (PTA) was amplified and cloned from genomic DNA of the fresh leaves of *P. ternata*. The cloned PTA gene was further fused to the plant expression vector pI1300-CaMV35S-GFP to construct pI1300-CaMV35S-PTA-GFP, then transferred into cells of *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Its transient expression was observed in *Nicotiana tabacum*. **Results** The full length of PTA contained 810 bp with the deduced 269 amino acid residues; It contained one signal peptide, two conversation B-lectin domains and three mannose binding sites; PTA shared 97%, 85%, and 83% identity with the amino acid sequence from PTA, and *Pinellia pedatisecta* agglutinin (PPA), *Pinellia cordata* agglutinin (PCA), respectively; The PTA was localized to the plasma membrane; Its registration number is KF154979 in NCBI. **Conclusion** It would provide a stable foundation for the study on its effect against fungi, insects, and bacterium.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; *Pinellia ternate* agglutinin (PTA); gene cloning; transient expression; subcellular location

植物凝集素是一类具有高度特异性糖结合活性的蛋白, 含有一个或多个可与单糖或寡聚糖特异可逆结合的非催化结构域^[1]。van Damme 等^[2]根据进化和结构相关性, 将其分成 7 个家族, 分别为豆科凝

收稿日期: 2014-02-25

基金项目: 西南野生动植物资源保护省部共建教育部重点实验室开放基金项目 (XNYB01-4); 西华师范大学校级科研启动金 (08B021)

作者简介: 赵 欢 (1982—), 女, 博士在读, 讲师, 研究方向为药用植物资源评价与分析。

Tel/Fax: (028)86290947 E-mail: zhaohuan_2010@163.com

*通信作者 周永红, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物资源的保护与利用。

Tel: (028)86291005 Fax: (028)86291005 E-mail: zhoyh david@126.com

集素、雪花莲相关凝集素、含 Hevein 结构域的壳多糖结合蛋白、II 型核糖体失活蛋白 (RIP)、葫芦科韧皮部凝集素、木菠萝素 (jacalin) 家族和苋科凝集素。目前, 已经发现的植物凝集素超过 1 000 种, 广泛分布于豆科、茄科、大戟科、禾本科、百合科、天南星科和石蒜科等众多植物类群中。

半夏 *Pinellia terenata* (Thunb.) Breit. 为天南星科半夏属多年生草本植物, 是中国的传统中药, 以块茎入药, 具有消痞散结、燥湿化痰、降逆止呕的功效^[3]。半夏主要含有生物碱、谷甾酸、多糖、氨基酸、挥发油、半夏蛋白及无机元素等多种有效成分, 而凝集素是半夏蛋白的重要组成部分之一。半夏凝集素 (*Pinellia ternate agglutinin*, PTA) 隶属于雪花莲相关凝集素家族, 该家族成员可专一性结合对甘露糖, 具有抗虫、抗菌和凝血活性等药理作用^[4]。

自 Yao 等^[5]于 2003 年首次克隆了 PTA 基因以来, 半夏凝集素序列被大量报道, 就已报道的 PTA 序列而言, 该序列无内含子。目前, PTA 基因已相继成功转化了水稻、小麦、烟草、油菜、大青、菘蓝等, 抗虫鉴定表明, 相应的转基因植株对刺吸式害虫如褐飞虱、二化螟、麦蚜、桃蚜等均表现出一定抗性, 但对其亚细胞定位的研究尚未见报道^[6-11]。本实验以半夏新鲜叶片的 DNA 为模板, NCBI 库中已报道的 PTA 基因的序列设计特异性引物, 克隆了 PTA 基因的全长, 并将其连接到含有绿色荧光蛋白标记的真核表达载体 pI1300-CaMV35S 上, 通过对基因序列的分析与其亚细胞定位的初步研究, 旨在从分子水平阐明 PTA 抗病害的机制, 以期为 PTA 基因的抗病虫害机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为来自川半夏主产区四川省南充市的野生半夏, 经西华师范大学彭正松教授鉴定为半夏 *Pinellia terenata* (Thunb.) Breit.。农杆菌 GV3101、植物表达载体 pI1300-CaMV35S-GFP 和烟草 *Nicotiana tabacum* L. 均由四川农业大学水稻研究所植物病理实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 半夏 DNA 的提取及 PTA 基因的扩增 用常规的 CTAB 法提取半夏叶片的 DNA, 以其为模板用特异性引物 PTA_F: 5'-ACAGGTACCATGGCCTCCAAGCTCCTC-3' 和 PTA_R: 5'ACAGGTACCATTCACCTTCTCCGTCACCA-3' (划线部分为 kpnI

酶切位点的序列) 进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.2 PTA 基因对植物表达载体的转化 将 PCR 产物回收, 连接于 pEASY-Blunt Simple 载体, 鉴别阳性克隆 pEASY-Blunt-PTA, 经酶切和测序验证正确后, 从 pEASY-Blunt 载体上酶切、回收 PTA 基因, 将其连接于已切好的植物表达载体 pI1300-CaMV35S-GFP, 并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 然后鉴定阳性克隆并抽提质粒。将质粒通过冻融转化法导入农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 鉴定农杆菌阳性克隆, 备用。

1.2.3 序列分析 所获得的序列已提交至 GenBank, PTA 基因的序列号和蛋白质序号为 KF154979 和 AGV40777。引物设计使用 NTI 软件完成; 使用 <http://expasy.org/> 进行 PTA 基因的氨基酸序列翻译、相对分子量与等电点的预测; 使用 SignalP 和 Wolf 程序分别对其信号肽切割位点和亚细胞定位进行预测; 使用 <http://smart.embl-heidelberg.de/> 对其结合域进行预测; 使用 DNAMAN6.0 软件对相应的氨基酸序列进行比对, 并用 MEGA 软件对其进行聚类分析。

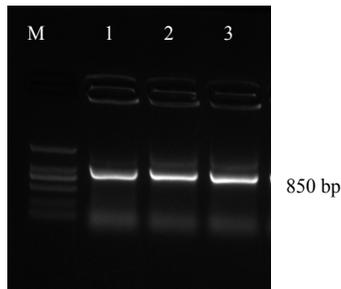
1.2.4 PTA 基因在烟草中的瞬时表达 将鉴定的农杆菌单克隆接种到 5 mL 含 Kan 和 Rif 的 YEB 液体培养基, 于 28 °C 培养 16 h 至吸光度 (A_{600}) 值为 0.5。将菌液 4 000 g/min 离心 10 min, 用 5 mL 缓冲液 10 mmol/L 氯化镁重悬, 用 1 mL 无菌医用注射器吸取菌液, 注射器尖端贴紧烟草叶片, 将菌液从下表皮缓缓注射进叶片中, 48 h 后将注射的叶片从烟草植株上取下, 在荧光共聚焦显微镜下观察 PTA 基因的亚细胞定位。注射实验重复 3~5 次。

2 结果与分析

2.1 PTA 的扩增及鉴定

以半夏叶片基因组 DNA 为模板, 用特异引物 PTA_F、PTA_R 进行扩增, 其 PCR 产物为单一明亮的特异性片段, 其大小约为 850 bp, 与预期片段大小相符 (图 1)。将 PCR 扩增片段纯化回收后, 克隆到 pEASY-blunt 载体, 再转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性重组子并酶切、回收 PTA 基因, 将回收后的 PTA 基因连接到预先酶切好的植物载体 pI1300-CaMV35S-GFP 上, 提取阳性重组质粒用 kpnI 单酶切, 结果表明, 酶切片段的大小约为 850 bp, 与

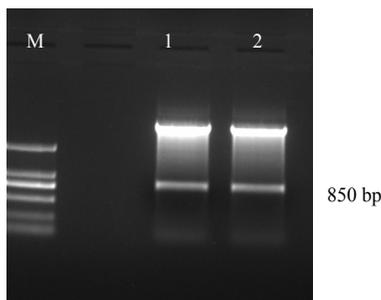
原 PCR 产物的长度一致 (图 2)。将重组质粒导入农杆菌 GV3101, 用 PTA_F 和 GFP_R 进行菌落 PCR 检测, 结果表明, 所选择的阳性克隆在约 1 000 bp 处均具有明显的条带 (图 3)。说明插入的 PTA 基因的位置、方向及阅读框均正确, 重组表达载体 pI1300-CaMV35S-PTA-GFP 构建成功。



M-Marker 1~3-PCR 产物
M-Marker 1—3-PCR productions

图 1 PTA 的 PCR 扩增

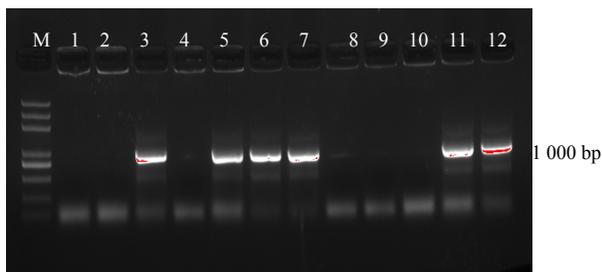
Fig. 1 PCR application of PTA



M-Marker 1~2-单酶切产物
M-Marker 1—2—the result of single digest

图 2 重组质粒 pI1300-CaMV35S-PTA-GFP 的单酶切结果

Fig. 2 Single digestion of recombinant plasmid pI1300-CaMV35S-PTA-GFP



M-Marker 3, 5~7, 11~12-阳性克隆的检测 1, 2, 4, 8~10-未检出
M-Marker 3, 5—7, 11—12-detection of positive colony 1, 2, 4, 8—10-not detected

图 3 菌落 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of colony

2.2 PTA 的序列分析

对 PTA 基因进行测序和分析, 发现目的片段的长度为 810 bp, 其编码氨基酸残基的长度为 269 bp。序列的 N 端含有一条 24 氨基酸的信号肽序列, 其剪切位点位于第 24 位的丙氨酸 (A₂₄) 与第 25 位的缬氨酸 (V₂₅) 之间。PTA 氨基酸序列中还含有 3 个保守的甘露糖位点结合位点基序, 分别为位于第 51~59 位氨基酸的 QXDCNAVLY, 第 172~180 位氨基酸的 QGDCNLVLY, 和第 234~242 位氨基酸的 QXXGXXVXY。进一步分析发现, 第 2 个甘露糖结合位点基序最为保守, 第 3 个甘露糖结合位点基序的特异性最强 (4/9)。此外, 该序列中还包含 2 个保守的 B-lectin 结合域, 分别位于第 27~131 位氨基酸和第 145~252 位氨基酸 (表 1 和图 4)。

2.3 PTA 的序列同源性分析

利用 DNAMAN 软件对克隆所得的 PTA (AGV40777) 在 GenBank 数据库中查询得到半夏属属 3 个种 6 条凝集素基因氨基酸序列的登录信息进行同源比较 (表 2)。其中, PTA 基因 (*Pinellia ternata* agglutinin, PTA, AAR27794、AAP20876 和 ABX47148) 3 条, 掌叶 PTA 基因 (*Pinellia pedtasecta* agglutinin, PPA, AAR27793 和 ADK56179) 2 条, 滴水珠凝集素基因 (*Pinellia cordata* agglutinin, PCA, ABK88277) 1 条。结果显示, 半夏属凝集素的种间序列长度差异较大, 其中, PTA 的氨基酸序列长度为 268~269 bp, 而 PPA 和 PCA 的序列长度均为 256~258 bp。相较于 PPA (序列同源性为 85.9%) 而言, PTA 序列间的差异小, 同源性高达 97.4%~100%。进一步分析发现, PTA AGV40777 和 AAR27794 间的序列同源性最高 (100%), PTA (AAP20876 和 ABX47148) 均与 PCA (ABK88277) 序列同源性最低 (82%)。以雪花莲凝集素基因的氨基酸序列为外类群 (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA, AAL07474 和 AAL07476), 采用 MEGA 软件的 Neighbor-joining (NJ) 方法对序列进行聚类, 聚类结果 (图 5) 表明, PTA 和 PPA AAR27793 聚为第 I 类, PPA ADK56179 和 PCA 聚为第 II 类, 而外类群的雪花莲凝集素单独聚为 III 类。

2.4 在烟草中的瞬时表达

应用 Wolf 程序对 PTA 基因的亚细胞定位进行预测, 分析表明 PTA 蛋白位于细胞膜上。为了进一步验证 PTA 的亚细胞定位, 本实验构建了 PTA

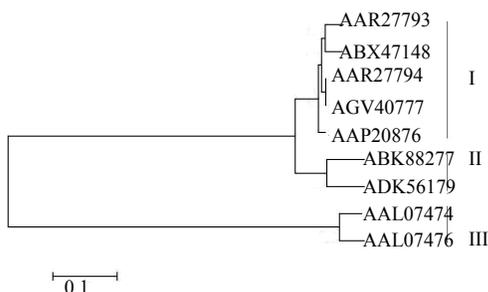
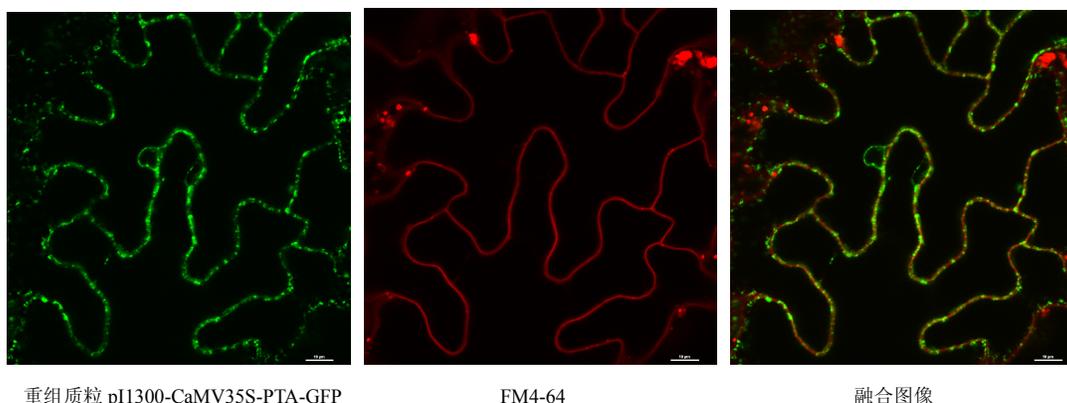


图 5 基于 NJ 方法构建半夏属凝集素家族的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree from PTA constructed by using NJ method

明, 克隆的 PTA 的蛋白质相对分子质量为 29 100, 编码一条 268 个氨基酸的前体蛋白, 且转基因纯系对褐飞虱的存活率和发育进度均有显著的抑制作用。

Xiao 等^[11]克隆了 PTA 并连同苏云金芽孢杆菌 *CryIAc* 基因同时导入大青, 结果发现, PPT 全长 804 bp, 蛋白质相对分子质量为 25 000, 转基因大青对小菜蛾 *Plutella xylostella* L. 和桃蚜的抗性增强。本实验克隆的 PTA 基因全长为 810 bp, 无内含子, 编码一条具有 269 个氨基酸的前体蛋白。此外, 该基因具有雪花莲相关的凝集素家族特有的特征信号序列和甘露糖结合位点基序, 与 NCBI 中已经登录



重组质粒 pI1300-CaMV35S-PTA-GFP

FM4-64

融合图像

图 6 PTA 在烟草叶片表皮细胞中的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular location of PTA in epidermal cells of tobacco leaves

的 PTA 的氨基酸序列相似性高于 97%, 说明不同半夏植株的凝集素序列具有高度保守性。

3.2 同源性分析

高等植物的凝集素基因是一个多基因家族, van Damme 等^[2]根据植物凝集素的进化及结构特点将其划分为 7 类。随着越来越多的新的植物凝集素被克隆, Jiang 等^[12]根据其序列中结合域的特点进一步将植物凝集素划分为 12 类。本实验克隆所得的 PTA 与 NCBI 已报道的半夏属 3 种 6 条凝集素的多序列分析结果表明, 半夏属植物的凝集素基因序列同源性很高。从半夏属凝集素甘露糖结合位点基序来看, 半夏属凝集素的 3 个甘露糖结合位点基序的保守性不同, 第 1 个甘露糖结合位点基序较为保守, 仅第 2 个氨基酸存在差异; 第 2 个结合位点的氨基酸序列完全一致; 而第 3 个结合位点保守性最低且基序存在种属特异性, 且同种的不同材料间也存在差异, 进一步支持了张正英^[13]的结论。梁江丽等^[14]通过原核表达获得了 PTA 和 PPA, 比较分析发现, PPA 的凝集活力

为三叶半夏凝集素的 4 倍, 从而推测凝集素第三个活性位点的氨基酸的差异可能是引起半夏和 PPA 凝集活性不同甚至药理作用不同的主要原因。本实验的发现, 半夏属不同种凝集素的第 3 个甘露糖结合位点基序不尽相同, 哪种凝集素的抗病虫功能最优, 还需进一步验证。

从半夏属凝集素序列的聚类结果来看, 所有的半夏凝集素序列聚为第 I 类, 滴水珠凝集素序列聚为第 II 类, PPA 在第 I、II 中均有分布, 究其原因可能是 PPA AAR22793 是仅在块茎中特异表达, 在不同的组织中分布着不同的同工凝集素^[15]。Liu 等^[16]应用 ISSR 和 SRAP 分析了半夏属 5 个种的亲缘关系, 研究表明, 滴水珠与掌叶半夏的遗传关系较近, 与半夏的遗传关系较远。本实验的聚类结果在一定程度上支持了 Liu 的结论, 但凝集素序列是否可作为半夏属间分类标准, 还值得进一步商榷。

3.3 亚细胞定位分析

Hwang 等^[17]通过对胡椒凝集素 (CaMBL1) 基

因的研究发现, CaMBL1 基因的氨基酸序列中含有 GNA-related lectin 结合域, 可特异识别番茄疮痂病辣椒斑点病菌 *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* 表面的甘露糖, 且该基因定位于质膜上。CaMBL1 基因可通过调节胡椒叶表面的细胞死亡、水杨酸的积累和防御基因的表达量, 从而起到抑菌作用。Chen 等^[18]研究了水稻 *Pi-d2* 基因对水稻稻瘟病的抗性, 结果发现, *Pi-d2* 基因的氨基酸序列含有一个 B-lectin 结合域和一个丝氨酸-苏氨酸激酶结合域, 且 *Pi-d2* 基因定位于质膜上, 过量表达 *Pi-d2* 基因可以增强转基因植株对稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* strain ZB15 的抗性。结合之前的报道, 本实验进一步采用 FM4-64 为探针荧光标记细胞膜, 初步将其定位于细胞膜上。

参考文献

- [1] Peumans W J, van Damme E J M. Lectins as plant defense proteins [J]. *Plant Physiol*, 1995, 109: 347-352.
- [2] van Damme E J M, Lannoo N, Peumans W J. Plant lectins [J]. *Adv Bot Res*, 2008.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [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: 529-534.
- [5] Yao J H, Zhao X Y, Liao Z H, et al. Cloning and molecular characterization of a novel lectin gene from *Pinellia ternate* [J]. *Cell Res*, 2003, 13(4): 301-308.
- [6] Yao J H, Pang Y Z, Qi H X. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternata* agglutinin confers enhanced resistance to aphids [J]. *Transgenic Res*, 2003, 12: 715-722.
- [7] 张红宇, 吴先军, 唐克轩, 等. 半夏凝集素基因 (*pta*) 导入水稻及其表达的初步研究 [J]. *遗传学报*, 2003, 30(11): 1013-1019.
- [8] 许铁峰, 张磊, 刘成洪, 等. 四倍体菘蓝转抗虫基因研究 II. 转半夏凝集素基因菘蓝的分子生物学检测 [J]. *中草药*, 2003, 34(9): 846-849.
- [9] 李淑洁, 李静雯, 张正英. 农杆菌介导的半夏凝集素基因 (*Pinellia ternate* agglutinin gene, PTA) 对小麦的遗传转化及鉴定 [J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(2): 50-56.
- [10] 李淑洁, 王红梅, 张正英. 半夏凝集素基因对油菜的遗传转化及 REAL-TIME PCR 分析 [J]. *作物杂志*, 2010, 4: 52-55.
- [11] Xiao Y, Wang K, Ding R X, et al. Transgenic tetraploid *Isatis indigotica* expressing Bt Cry1Ac and *Pinellia ternata* agglutinin showed enhanced resistance to moths and aphids [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39: 485-491.
- [12] Jiang S Y, Ma Z G, Srinivasan R H. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants [J]. *BMC Evol Biol*, 2010, 10: 79-103.
- [13] 张正英. 半夏凝集素基因的克隆与氨基酸序列初步分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(9): 1818-1823.
- [14] 梁江丽, 陈波, 田晓平, 等. 三叶半夏和掌叶半夏凝集素原核表达及特性研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 9(3): 80-84.
- [15] Wu Z M, Yan H B, Pan W L, et al. Transform of an ectopically expressed bulb lectin gene from *Pinellia pedatisecta* into tobacco plants conferring resistance to aphids (*Myzus nicotianae*) [J]. *Aust J Crop Sci*, 2012, 6(5): 904-911.
- [16] Liu L L, Yang Z J, Wei S H, et al. ISSR and SRAP markers in the genetic relationship analysis among *Pinellia* in China [J]. *J Med Plants Res*, 2012, 6(19): 3596-3602.
- [17] Hwang I S, Hwang B K. The Pepper Mannose-binding lectin gene *CaMBL1* is required to regulate cell death and defense responses to microbial pathogens [J]. *Plant Physiol*, 2011, 155: 447-463.
- [18] Chen X W, Shang J J, Chen D X, et al. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance [J]. *Plant J*, 2006, 46(5): 794-804.