

## 香蕉果实凝集素基因的克隆及原核表达

陈石<sup>1,2</sup>, 李春雨<sup>2</sup>, 孙清明<sup>2</sup>, 匡石滋<sup>2</sup>, 杨国顺<sup>1</sup>, 易干军<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128; <sup>2</sup>广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640)

**摘要:**【研究目的】植物凝集素具有重要的生理功能,通过原核表达香蕉凝集素基因(*BanLec*)并探讨其功能具有重要意义。【方法】提取了巴西蕉果肉总RNA,利用RT-PCR方法扩增*BanLec* cDNA全长序列,并对该序列进行分析。将*BanLec*克隆至表达载体pET-30a,并将筛选到的重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株中进行诱导表达。【结果】克隆到的*BanLec* cDNA序列为460 bp,开放读码框为426 bp,编码142个氨基酸。与其他已知的香蕉凝集素基因相比较,核苷酸和氨基酸序列同源性分别为94%和93%以上。SDS-PAGE分析结果表明,经IPTG诱导,*BanLec*基因以融合蛋白形式表达,相对分子量约为20 kD。【结论】该研究为探讨香蕉凝集素的活性及生化功能等奠定基础。

**关键词:**香蕉;香蕉凝集素基因;原核表达

**中图分类号:**S668.1 **文献标识码:**A

### Cloning and Expressing *BanLec* Gene from Pulp in *Escherichia coli*

Chen Shi<sup>1,2</sup>, Li Chunyu<sup>2</sup>, Sun Qingming<sup>2</sup>, Kuang Shizi<sup>2</sup>, Yang Guoshun<sup>1</sup>, Yi Ganjun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128;

<sup>2</sup>Institution of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guang Zhou 510640)

**Abstract:** 【OBJECTIVE】Plant lectin has important in vivo physiological functions, and it is necessary to expressing *BanLec* gene in *Escherichia coli* and investigate its functions. 【METHOD】Total RNA was extracted from Brazil banana pulp, and the *BanLec* cDNA sequence was amplified with Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and the sequence was analyzed. *BanLec* was cloned into pET-30a vector, and the recombinant plasmid pET-*BanLec* was screened. After transforming into *Escherichia coli* BL21 (DE3), the protein was induced to express. 【RESULT】The Sequence was analyzed with DNASTAR software and the result showed that its open reading frame was 426 bp and encoded a protein with 142 amino acids. The alignment showed that this gene shared high similarities with other known *BanLec* genes on the levels of nucleotides and amino acids (94% and 93%, respectively). The result of SDS-PAGE demonstrated that the *BanLec* gene was expressed by induction and the expression products migrated at a size of 20 kD. 【CONCLUSION】This research is helpful for investigating the activities or other physiological functions of banana lectins.

**Key words:** banana, *BanLec* gene, prokaryotic expression

凝集素(lectin)是一种含有非催化结构域并能可逆结合到特异单糖或寡糖上的植物保守性蛋白<sup>[1]</sup>。自

1888年Stillmark首次发现了蓖麻凝集素以来,人们已经发现了1000多种植物凝集素,并研究了其理化性质

**基金项目:**中国农业部948项目“香蕉抗枯萎病核心技术与种质的引进及创新研究”(2008-G1);广东省农业科学院科技计划项目“香蕉根系凝集素的分离纯化、基因克隆及其对枯萎病菌的影响”(07-博士-02)。

**第一作者简介:**陈石,男,1983年出生,广东化州人,硕士,研究方向:果树生物技术。通信地址:510640广东省广州市天河区大丰二街80号广东省农业科学院果树研究所, Tel: 020-38765390, E-mail: chenshi0759@163.com。

**通讯作者:**易干军,男,1966年出生,湖南娄底人,研究员,博士,研究方向:果树生物技术。通信地址:510640广东省广州市天河区大丰二街80号广东省农业科学院果树研究所, Tel: 020-38765869, E-mail: yiganjun@vip.163.com。

**收稿日期:**2009-01-16, **修回日期:**2009-03-20。

和结构功能。研究结果显示很多凝集素具有重要的功能,主要分为以下几方面:(1)对储存物质进行包装、运输等;(2)作为植物与微生物的共生介质<sup>[2-3]</sup>;(3)通过识别并结合病原菌细胞壁上的糖蛋白,以抵御真菌<sup>[4-5]</sup>,细菌<sup>[6-7]</sup>等的入侵;(4)被昆虫取食后,在消化道中释放出来,与昆虫肠道围食膜上的糖蛋白相结合,从而影响营养物质的正常吸收<sup>[8]</sup>,因此具有杀虫能力<sup>[9]</sup>。已经将凝集素基因转化进植物中,得到了很好的抗虫效果<sup>[10-11]</sup>。(5)成为研究多糖、糖蛋白结构、细胞表面受体、以及相关酶和糖蛋白的分离纯化等工作的重要工具,在欧洲等地已被广泛用于对肿瘤的治疗<sup>[12]</sup>。由此可见植物凝集素具有重要的生理功能,在农业、医学上具有巨大的应用前景。

香蕉凝集素是成熟果实中的一种重要蛋白<sup>[13]</sup>,但其具体功能尚不清楚。笔者克隆了一个香蕉凝集素基因,并在大肠杆菌中进行了表达,为探索其活性及生理功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间、地点

试验于2007—2008年在广东省果蔬新技术重点实验室进行。

### 1.2 材料

1.2.1 植物材料 香蕉果实采自中国香蕉种质资源圃,品种为巴西蕉。

1.2.2 主要试剂 限制性内切酶、逆转录酶、pMD18-T载体、PrimeSTAR HS DNA聚合酶、IPTG、X-Gal均购自TaKaRa公司。DNA片段回收试剂盒,B型质粒少量提取试剂盒均购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。氨苄青霉素购自Sigma公司。大肠杆菌菌株为TG1和BL21(DE3)、原核表达载体为pET-30a,为NOVOGEN公司产品。

### 1.3 方法

1.3.1 香蕉果肉总RNA的提取和与cDNA合成 香蕉果肉总RNA的提取按Wan等的方法提取<sup>[14]</sup>。将经检测为完整的RNA反转录成cDNA,具体步骤参照TaKaRa逆转录试剂盒提供的操作方案进行。

1.3.2 香蕉果实凝集素基因克隆 根据已公布的香蕉果实凝集素基因(AF001527)序列设计引物:Lectin-f:(5'-GCAGGATCCATGAACGGAGCGATC-3',划线处为酶切位点,下同),Lectin-r:(5'-TGTCTCGAGTTATGGCTCCAAGTAG-3'),扩增了香蕉果实凝集素基因。PCR产物回收后与pMD18-T载体连接,转化大肠杆菌TG1,得到重组子pMD-BanLec,并送至上海英骏生物技术有限公司(广

州分公司)测序。测序结果利用DNASar软件和NCBI网站的nucleotide blast、Blastx进行分析。

1.3.3 原核表达载体的构建及诱导表达 用Bam H I和Xho I消化pMD-BanLec质粒,并回收插入片断,与同样条件消化的pET-30a载体质粒相连接,连接产物转化大肠杆菌TG1菌株感受态细胞,筛选阳性克隆。鉴定正确的克隆再转化进表达宿主菌BL21(DE3),挑取阳性菌落,进行诱导表达。诱导表达过程:挑取单克隆,接种于含有1 mmol/L卡那霉素的LB液体培养基中37℃,220 r/min培养过夜,再按1:100接种量扩大培养,约1.5 h后测OD<sub>600</sub>,待OD<sub>600</sub>达0.6~0.8时加入IPTG(300 μg/ml)继续摇菌5 h。将细菌培养物冰浴5 min,然后以转速4 000 r/min,4℃离心5 min收集菌体。取1 ml菌液离心所得的菌体,加入100 μl PBS溶液,再加入50 μl 5×上样缓冲液,混匀后,煮沸10 min,12 000 r/min离心1 min,取10 μl上清液进行SDS-PAGE分析,浓缩胶和分离胶配制参照TaKaRa商品目录上的方法,后者浓度为12%。电泳完后用考马斯亮蓝R250进行染色20 min,然后脱色直至蛋白质条带清晰可见为止。同时,以转化pET-30a的大肠杆菌BL21(DE3)和不含质粒的大肠杆菌BL21(DE3)作为对照。

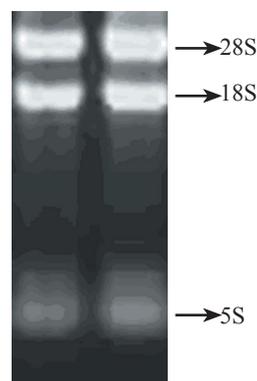


图1 香蕉果实总RNA电泳结果

## 2 结果与分析

### 2.1 香蕉果实总RNA的提取

电泳结果显示,提取的总RNA样品中28 S、18 S rRNA条带清晰完整(图1)。紫外分光光度法测定RNA样品的 $\lambda_{230}$ 、 $\lambda_{260}$ 和 $\lambda_{280}$ 的OD值,结果显示样品的OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub>值为2.1,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>值为1.9,这表明提取的RNA样品基本上排除了多糖、多酚和蛋白质等物质的污染,有较好的纯度。

### 2.2 BanLec基因的克隆及序列分析

以香蕉果肉cDNA为模板进行RT-PCR扩增,获得了一条约为460 bp的条带(图2)。回收目的片段后将其连接到pMD-18T载体上,筛选阳性克隆送公司测

序,结果表明,*BanLec*基因的开放阅读框(ORF)为426 bp,编码142个氨基酸,等电点为6.6。同源性比较表明,该cDNA序列与GenBank中已登录的其它*BanLec*基因序列(EU055641)、(AF001527)、(EU055642)、(AY103481)的核苷酸序列同源性分别为99%、98%、96%、94%,氨基酸序列与GenBank中已登录的其他*BanLec*氨基酸序列(ABS86033)、(AAB82776)、(AAM48480)、(ABS86034)的同源性分别为99%、97%、94%、93%。

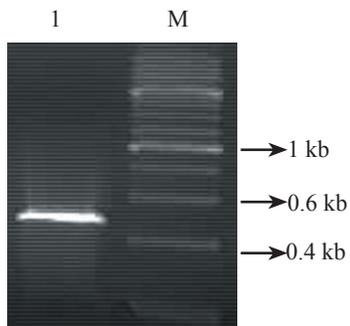


图2 *BanLec*基因的扩增结果

注:1: *BanLec*基因的PCR产物;M:200 bp marker。

### 2.3 原核表达质粒的构建及重组子的鉴定

大量提取pMD-*BanLec*和pET-30a质粒,同时用*Bam*H I和*Xho* I双酶切,回收插入片段和消化的表达载体,将两者按照摩尔比1:3混合后,利用*T<sub>4</sub>*连接酶进行连接,构建重组质粒pET-*BanLec*。经抗生素、PCR和酶切三重筛选之后,获得插入正确的*BanLec*的原核表达重组质粒。酶切鉴定结果如(图3)所示,经*Bam*H I和*Xho* I消化之后,产生出5.3 kb的pET30a载体DNA片段和约460 bp的插入片段。

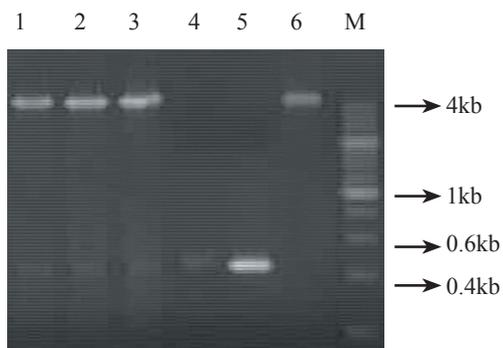


图3 pET-*BanLec*酶切鉴定

注:1,2,3: pet-*BanLec* /*Bam* H I和*Xho* I双酶切;4,5: *BanLec*基因pcr扩增;6: pET-30a/*Bam* H I和*Xho* I双酶切;M:200 bp marker。

### 2.4 SDS-PAGE 分析

将构建的pET-*BanLec*载体质粒转化进大肠杆菌BL21(DE3)感受态细胞中,加入IPTG进行诱导表达。

将获得的重组蛋白进行SDS-PAGE电泳,与转入空载体和非转化的大肠杆菌BL21(DE3)相比较,转化pET-*BanLec*重组质粒的宿主菌株过量表达出一分子量约为20 kD的条带(图4),这和pET-*BanLec*重组蛋白理论值基本相当,说明利用原核生物大肠杆菌可以成功表达出香蕉凝集素蛋白,为进一步研究其活性奠定基础。

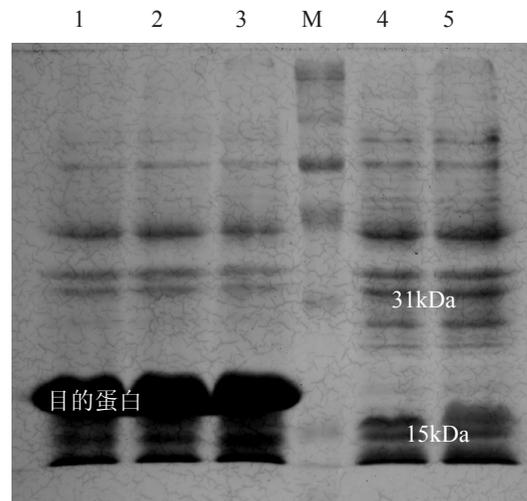


图4 pET-*BanLec*在大肠杆菌BL21(DE3)中表达的SDS-PAGE

注:1,2,3:转化pET-*BanLec*经IPTG诱导5 h的表达;4:空载体pET-30a转化BL21菌后的表达;5:无质粒转化的BL21(DE3)菌的表达。M:蛋白质中分子量Marker。

## 3 讨论

原核表达是最经济、最方便获得目的蛋白质的表达方法,被广泛应用于表达商业上的重要蛋白。植物凝集素的生化研究表明,虽然天然状态下的凝集素是一类高度糖基化的蛋白,但从原核生物与真核生物所表达的凝集素比较发现:糖基化对于其活性是非必需的<sup>[13]</sup>,而且在大肠杆菌中表达分子量为20 kD左右的蛋白比较理想,这为在大肠杆菌这类不具备糖基化修饰能力的原核生物中生产植物凝集素提供了依据。

目前人们对很多植物凝集素的理化性质和结构功能进行了研究,发现很多都具有重要的功能。金志强等<sup>[13]</sup>研究了*BanLec*基因的表达同时具有发育特异性和组织特异性,即仅在果实中表达,其他发育阶段和器官不合成这种蛋白质,而且其表达量随果实成熟度的变化而变化。因此推断它可能与香蕉果实发育阶段的防御性有关。但香蕉凝集素的其他理化性质和结构功能,目前还没有什么研究。笔者通过克隆*BanLec*基因,并使其在原核系统中得到大量的表达,将有助于进一步揭示香蕉凝集素在植物防御及其他理化性质和结构

功能,并为植物抗病、虫基因工程提供有用的素材。

#### 4 结论

笔者提取了香蕉果肉的总 RNA,采用 RT-PCR 方法扩增了 *BanLec* 基因,对其序列进行分析表明,最大开放读码框为 426 bp,编码 142 个氨基酸。与其它已知的香蕉凝集素基因相比较,核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 94%和 93%以上。将 *BanLec* 克隆至表达载体 pET-30a,并将筛选到的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,在 37 °C 经 IPTG (300 μg/ml) 诱导 5 h, SDS-PAGE 电泳分析显示, *BanLec* 基因在大肠杆菌中成功表达,表达的 *BanLec* 融合蛋白分子量大约为 20 kD。这将有助于进一步研究香蕉凝集素的理化性质和结构功能,为香蕉凝集素的开发利用奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Lis H, Sharon N. Lectins as molecules and tools. *Annu. Rev. Biochem.* 1986, 55:35-67.
- [2] Bohloo L B B, Schmidt E L. A possible basis for specificity in Rhizobium-legume root nodule symbiosis. *Science*, 1974, 185: 269-271.
- [3] Kijne J W, Bauchravitte M A, Diaz. Root lectins and Rhizobia. *Plant Physiol.*, 1997, 115:869-873.
- [4] 刘士庄,施承梁,许吕,等.棉花凝集素与棉花枯萎病关系的研究. *中国农业科学*, 1989, 22 (4) :49-53.
- [5] 许燕,袁筱萍,郝峥嵘,等.水稻凝集素对稻瘟病的抗性研究. *上海师范大学学报:自然科学版*, 1997, 26(2):99-100.
- [6] Sequeira L, Graham T L. Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. *Physiol. Plant Pathol.* 1977, 11(1):43-54.
- [7] Ayouba A, Causse H, Van Damme E J M, et al. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1994, 22:153-159.
- [8] 李友莲,吴海军.植物凝集素对桃蚜生长发育的影响. *山西农业大学学报*, 2000, 20 (2):93-97.
- [9] Pusztai A, Bardocz S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 1996, 8: 149-165.
- [10] Dutta I, Saha P, Majumder P, et al. The efficacy of a novel insecticidal protein, *Allium sativum* leaf lectin (ASAL), against homopteran insect monitored in transgenic tobacco. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3(6): 601-611.
- [11] Saha P, Majumder P, Dutta I, et al. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta*, 2006, 223 (6): 1329-1343.
- [12] Niwa H, Tonevitsky A G, Agapov II, et al. Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome-inactivating protein, complexed with galactose. *European Journal of Biochemistry*, 2003, 270(13):2739-2749.
- [13] 金志强,张德有,徐碧玉.香蕉凝集素基因的克隆及在成熟果实中的特异性表达. *遗传学报*, 2004, 31(5):508-512.
- [14] Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Analytic Biochemistry*, 1994, 223:7-12.
- [15] Hoffman L M, Donaldson D D. Synthesis of mitogenic phytohemagglutinin-L in *Escherichia coli*. *Bio-Technology*, 1987, 5: 157-160.