

# 中华蜜蜂半乳糖凝集素 AcGalectin 的表达、纯化及性质分析

岳金金<sup>1, #</sup>, 马宇驰<sup>1, #</sup>, 刘全<sup>2</sup>, 姜莉莉<sup>1</sup>, 费东亮<sup>1</sup>, 张鹤<sup>1</sup>,  
孙莉<sup>1</sup>, 李明<sup>1</sup>, 马鸣潇<sup>1, \*</sup>

(1. 锦州医科大学畜牧兽医学院, 辽宁锦州 121000; 2. 辽宁省动物卫生监督预警中心, 沈阳 110001)

**摘要:**【目的】本研究旨在明确中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 半乳糖凝集素 (galectin) 的功能及其与病毒的相互作用。【方法】提取中华蜜蜂的总 RNA, 利用 RT-PCR 技术获得 Galectin 基因, 然后利用生物信息学软件对基因序列及其推导氨基酸序列和结构特征进行分析; 再依据大肠杆菌 *Escherichia coli* 密码子的偏嗜性对该基因密码子进行优化、原核表达, 并制备重组蛋白; 最后, 通过 Far-western blotting 技术检测纯化的重组蛋白与纯化的中蜂囊状幼虫病毒 (*Chinese sacbrood virus*, CSBV)、慢性蜜蜂麻痹病毒 (*Chronic bee paralysis virus*, CBPV) 和残翅病毒 (*Deformed wing virus*, DWV) 的结合情况。【结果】从中华蜜蜂中克隆到 Galectin 基因, 并将其命名为 AcGalectin (GenBank 登录号: MG557559), 其 cDNA 全长为 1 473 bp。AcGalectin 空间结构比较稳定, 包含一个半乳糖识别结构域。系统进化树表明, Galectin 明显分为两簇, 膜翅目蜜蜂科昆虫的 Galectin 形成一个簇, 而其他昆虫 Galectin 形成另一簇。经密码子优化后的 AcGalectin 基因能够在大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3) 中高效表达。纯化的重组 AcGalectin 蛋白可与 CSBV 和 CBPV 结合, 但不与 DWV 结合。【结论】结果表明 AcGalectin 与蜂病毒 CSBV 和 CBPV 有结合作用。本研究为 AcGalectin 在 CSBV 和 CBPV 感染过程中的功能研究奠定了基础。

**关键词:** 中华蜜蜂; 半乳糖凝集素; 基因克隆; 重组蛋白; 病毒; 免疫反应

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2018)05-0546-09

## Expression, purification and characterization of galectin AcGalectin in *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

YUE Jin-Jin<sup>1, #</sup>, MA Yu-Chi<sup>1, #</sup>, Liu Quan<sup>2</sup>, JIANG Li-Li<sup>1</sup>, FEI Dong-Liang<sup>1</sup>, ZHANG He<sup>1</sup>, SUN Li<sup>1</sup>, LI Ming<sup>1</sup>, MA Ming-Xiao<sup>1, \*</sup> (1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Liaoning Province Animal Health Monitoring and Earlier Warning Center, Shenyang 110001, China)

**Abstract:** 【Aim】 This study aims to explore the function of galectin in *Apis cerana cerana* and its interaction with the honeybee virus. 【Methods】 Galectin gene was amplified from *A. cerana ceranas* by RT-PCR using the extracted total RNA as the template, and then the sequence and structural characteristics of deduced amino acids were analyzed by using bioinformatics tools. The codons of the galectin gene were optimized based on the codon bias of *Escherichia coli*, and the recombinant protein was

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372435); 2017 年辽宁省自然科学基金指导计划立项项目(20170540375); 2015 年辽宁省教育厅项目(L2015315)

作者简介: 岳金金, 女, 1993 年 7 月生, 辽宁阜新, 硕士研究生, 研究方向为微生物学, E-mail: 1462239630@qq.com; 马宇驰, 男, 1995 年 5 月生, 辽宁营口, 硕士研究生, 研究方向为兽医学, E-mail: 2830129770@qq.com

# 共同第一作者 Authors with equal contribution

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jzykdxmmx@126.com

收稿日期 Received: 2017-12-28; 接受日期 Accepted: 2018-02-08

produced in *E. coli* and purified by affinity chromatography. The binding activities of the recombinant protein with *Chinese sacbrood virus* (CSBV), *Chronic bee paralysis virus* (CBPV) and *Deformed wing virus* (DWV) were analyzed by far-western blotting. 【Results】 A galectin gene was cloned from *A. cerana cerana* and named *AcGalectin* (GenBank accession no: MG557559), and its full-length cDNA is 1 473 bp in length. *AcGalectin* has a stable spatial structure containing a Gal-bind\_lectin domain. The phylogenetic tree constructed based on the amino acid sequences from *AcGalectin* and the previously reported galectins indicated that galectins form two clusters, one related to galectins from the Hymenoptera, and the other related to galectins from other insects. The codon-optimized *AcGalectin* gene could be highly expressed in host bacteria BL21 (DE3), and the purified recombinant *AcGalectin* protein could bind with CSBV and CBPV, but not with DWV. 【Conclusion】 The results indicate that *AcGalectin* can bind with CSBV and CBPV, and this lays a foundation for the further study on the function of *AcGalectin* in the process of CSBV and CBPV infections.

**Key words:** *Apis cerana cerana*; galectin; gene cloning; recombinant protein; virus; immune response

凝集素是一种非酶、非抗体可以特异性结合单糖或者多糖的蛋白质,具有分子识别功能,同时也具有抗病毒和抗菌的作用,它可与 HIV 病毒竞争 T 淋巴细胞上的糖蛋白受体,或抑制 HIV 逆转录以及抑制 HIV 病毒整合至人类基因组中来抑制 HIV 病毒增殖(牛耀辉等, 2006)。研究显示,凝集素在植物体内抗病原微生物中也发挥着重要作用,不仅能够通过细胞壁或胞外聚糖的间接机制来防御植物病毒,而且还具有杀真菌和昆虫的功能。依据来源可将凝集素分为 3 类,即动物凝集素、植物凝集素和微生物凝集素,其中,动物凝集素又可分为 C 型凝集素、I 型凝集素、P 型凝集素、五聚体蛋白和 S 型凝集素即半乳糖凝集素 5 个主要家族。

半乳糖凝集素(galectin)在凝集素家族中分布广泛,最早在哺乳动物中发现,因能特异性地结合半乳糖苷而得名。迄今为止,在哺乳类动物中已发现 15 种不同的半乳糖凝集素,均含有糖识别结构域(carbohydrate recognition domain, CRD),可特异性识别糖链末端的半乳糖苷,属于非膜整合性的可溶蛋白(Vasta, 2009)。研究表明,在无脊椎动物发生病原体感染时, Galectin 作为模式识别受体(pattern recognition receptors, PRR),可通过 CRD 特异性地结合半乳糖苷,引起免疫反应。例如,家蚕 BmGalectin-4 对革兰氏阴性菌、阳性菌和真菌的结合(王鹏等, 2014);白蛉 Galectin 具有特异性识别利什曼原虫表面的磷酸酯多糖的功能(Kamhawi *et al.*, 2004);菲律宾蛤仔 Galectin 可结合派琴虫 *Perkinsus olseni* 和弧菌 *Vibrio* 表面的半乳糖和 N-乙酰半乳糖胺而进行病原菌的识别(Kim *et al.*, 2008);海鳗的原型 Galectin 参与细胞对寄生虫的包

囊作用(Nakamura *et al.*, 2012);大西洋鳕鱼 Galectin-1 能凝集革兰氏阳性和阴性菌,参与其免疫防御过程(Rajan *et al.*, 2013);中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 的 Galectin 对多种病原菌具有较强的凝集活性,而且这种凝集可被 D-半乳糖和  $\alpha$ -乳糖抑制(Wang *et al.*, 2016)。然而目前有关蜜蜂的 Galectin 功能还未见报道。

蜜蜂属于膜翅目(Hymenoptera)蜜蜂科(Apidae)昆虫的统称,其中蜜蜂属 *Apis* 的东方蜜蜂 *Apis cerana*, 西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和黑小蜜蜂 *Apis andreniformis* 等 9 个蜂种对于人类生产生活有着十分重要意义,作为经济动物,不仅为人类提供丰富蜂产品,而且作为重要的授粉昆虫,能够为虫媒植物进行授粉,对提高农作物的产量和质量起到不可替代的作用。据统计,世界上约三分之一的农作物依靠蜜蜂授粉,全球昆虫授粉的经济价值估计为每年 2 120 亿美元,相当于世界农业生产总值的 9.5% (Tantillo *et al.*, 2015)。然而近年来,由于蜂病毒病的广泛流行,不仅严重威胁着养蜂业的发展,而且也给农业生产造成了不可估量的损失。蜜蜂在抗病毒侵袭过程中,不具备高等动物完善的免疫体系,缺乏特异的抗原抗体反应,但在长期进化过程中,形成了独特的先天免疫系统和免疫机制,从而可以保护自身免受外源物侵害。是否在蜜蜂机体中也存在着半乳糖凝集素蛋白,能够与蜂病毒存在相互作用,目前还尚不清楚。鉴于此,本研究根据西方蜜蜂数据库基因组信息,成功克隆到一个中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 半乳糖凝集素基因,在对其序列进行生物学信息分析之后,进行了人工密码子优化、表达,获得重组蛋白,并对该蛋白与蜜蜂常见病毒是否存在相

互作用进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试病料

疑似感染中蜂囊状幼虫病毒 (*Chinese sacbrood virus*, CSBV) 在封盖期未能正常封盖的中华蜜蜂工蜂幼虫于 2016 年 4 月份收集于辽宁省本溪市某养蜂场, 位于辽宁省东南部 (123. 73°E, 41. 3°N); 疑似感染慢性蜜蜂麻痹病毒 (*Chronic bee paralysis virus*, CBPV) 的意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica* 工蜂成蜂于 2017 年 7 月份收集于辽宁省辽中县某养蜂场, 位于辽宁省中部 (122. 7°E, 42°N); 疑似感染残翅病毒 (*deformed wing virus*, DWV) 的意大利蜜蜂工蜂成蜂于 2017 年 6 月份收集于辽宁省锦州市某养蜂场, 位于辽宁省西部 (121. 15°E, 41. 13°N); 健康中华蜜蜂 2-3 日龄工蜂幼虫和健康意大利蜜蜂工蜂成蜂收集于锦州医科大学实验动物养殖基地。上述蜜蜂的饲养场地环境良好, 蜜源充足, 满足蜜蜂生活需求。上述发病样本分别用生理盐水除去表面杂质, 放入离心管中, 经 RT-PCR 检测确诊后, 置于 -80°C 保存备用。

### 1.2 主要试剂和仪器

总 RNA 提取试剂盒、DNase 购自美国 Promega 公司; GST 标签抗体购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞、FlyCut *BamH I*、FlyCut *Xho I* 和低分子量蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; Taq DNA Polymerase 试剂盒购自 Invitrogen 公司; GST 重组蛋白纯化试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 试剂盒、限制性内切酶、Ex Taq™ DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等购自大连 TaKaRa 公司; 载体 pGEX6P-1 由本实验室保存。

超净工作台, -80°C 超低温冰箱, 购自中国海尔公司; 恒温振荡培养箱, 美国 Bio-Rad 公司产品; 台式低速离心机, 美国 Sigma 公司产品; PCR 仪, 英国 HYBAID 公司产品; 低温连接仪, 购自上海天能科技有限公司。

### 1.3 中华蜜蜂 Galectin 基因的克隆与测序

根据西方蜜蜂 Galectin 基因 (GenBank 登录号: XM-392379) 推导的氨基酸序列经 Blast 分析与中华蜜蜂 GAL-4 的氨基酸序列相匹配, 故以此基因序列

为靶基因, 设计一对含限制性内切酶 *BamH I* 和 *Xho I* 酶切位点的特异性引物, 正向引物: 5'-GCCGATCCATGGGTAAGTTTCTCCGGACG-3'; 反向引物: 5'-GCCTCGAGTTAGTCGTCCAGACCCAGACC-3'。提取健康中华蜜蜂幼虫的总 RNA, 进行反转录合成 cDNA, 并以 cDNA 为模板, 使用 Ex Taq DNA 聚合酶进行 PCR 反应。扩增体系: 10 × PCR Buffer 2.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, dNTP Mixture (10 mmol/L) 1 μL, ExTaq 酶 (5 U/μL) 0.25 μL, cDNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 19.75 μL, 25 μL 体系。扩增条件: 预变性 94°C 2 min; 94°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。将扩增的 AcGalectin 基因片段利用 DNA 凝胶回收试剂盒 (Axygen 公司) 进行回收、纯化, 克隆至 pMD18-T 载体, 并送往生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

### 1.4 序列分析

将测序后的中华蜜蜂 Galectin 基因编码氨基酸序列与从 NCBI 数据库下载源于昆虫的半乳糖凝集素的蛋白 (Galectin) 序列, 包括中华蜜蜂 (GenBank 登录号: PBC26441.1)、欧洲地熊蜂 *Bombus terrestris* (GenBank 登录号: XP\_003401978.1)、杜隧蜂 *Dufourea novaeangliae* (GenBank 登录号: KZC10048.1)、兰花蜜蜂 *Eufriesea mexicana* (GenBank 登录号: OAD54547.1)、小蜜蜂 *Apis florea* (GenBank 登录号: XP\_003696651.2)、无刺蜂 *Melipona quadrifasciata* (GenBank 登录号: KOX74850.1)、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (GenBank 登录号: XP001656933.1)、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* (GenBank 登录号: AGAP008844-PA)、家蚕 *Bombyx mori* (GenBank 登录号: AK386049)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (GenBank 登录号: NP001162838.1)、帝王蝶 *Danaus plexippus* (GenBank 登录号: EHJ77864.1)、人体虱 *Pediculus humanus corporis* (GenBank 登录号: XP002428817.1)、印度蚂蚁 *Harpegnathos saltator* (GenBank 登录号: EFN82261.1) 和海德氏果蝇 *Drosophila hydei* (GenBank 登录号: XP\_023165755.1), 使用 Clustal W 进行比对分析, 采用 MEGA4.0 软件, 根据邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树。并通过在线软件 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 对 AcGalectin 保守结构域的预测和功能分析, 同时, 利用 SWISS-MODEL 软件 (<http://swissmodel.expasy>。

org)对其三维结构进行建模和在线软件 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽分析,所有参数选择设置为默认值。

### 1.5 中华蜜蜂 Galectin 蛋白的密码子优化

通过在线优化软件 (<http://www.jcat.de/>和 <http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>),根据大肠杆菌对密码子嗜性,在保持编码氨基酸序列的前提下,同时兼顾 GC 含量,对克隆获得的中华蜜蜂 AcGalectin 基因进行密码子优化,进行化学合成,并加入相应的酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I 获得 opti-AcGalectin 基因。

### 1.6 中华蜜蜂 Galectin 蛋白的重组、表达、纯化与鉴定

将密码子优化后的 opti-AcGalectin 基因经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切克隆至 pGEX6P-1 载体,构建重组质粒 pGEX6P-1-opti-AcGalectin。然后,将重组质粒 pGEX6P-1-opti-AcGalectin 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,提取质粒,经酶切鉴定正确后,接种于 LB 液体培养基,于 37℃ 培养至  $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ ,分别加入 0.1, 0.25, 0.5 和 0 mmol/L 的 IPTG,在 30℃ 220 r/min 条件下诱导 8 h,离心收集菌体,加入 PMSF,经超声破碎后离心,分别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。初步鉴定后表达蛋白,使用 GST 重组蛋白纯化试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]纯化,获得 GST-AcGalectin 融合蛋白。在此基础上,以鼠抗 GST 标签抗体(1:2 000 稀释)作为一抗,HRP 标记山羊抗小鼠(1:5 000)作为二抗,对重组蛋白进行 Western blot 检测。

### 1.7 病毒的提纯与 RT-PCR 鉴定

参照 Hu 等(2016)报道的病毒纯化方法,取 50 头感染 CSBV 的中华蜜蜂患病工蜂幼虫,称量后加入 1.5 倍的灭菌水充分研磨,进行 CSBV 病毒提纯,将上清液先后经用 0.45  $\mu\text{m}$  与 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤除菌,阴性对照(50 头健康中华蜜蜂工蜂幼虫)采用同样方法进行处理。参照钟义等报道的病毒提纯方法(钟义等,2016),分别取 50 头感染 DWV 和 CBPV 的健康意大利蜜蜂患病工蜂成蜂,加入 10 mL 的 PBS 和 2 mL 的四氯化碳及 2 mL 乙醚放研钵内磨碎,采用梯度离心法提纯 DWV 和 CBPV,沉淀用适量的 STE 重悬,通过 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的滤器滤过除菌;同时收集 50 头健康意大利蜜蜂工蜂成蜂作为阴性对照,采用同样方法进行处理。提纯的病毒液置于 -80℃ 保存。

对提纯后的病毒,利用 TRIzol Reagent 提取总 RNA,通过 RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 试剂盒反转录合成 cDNA,利用 CSBV, DWV 和 CBPV 的特异性引物进行 PCR 检测。引物序列如下:CSBV-F: 5'-GATAAACCGAAGGATATAAGT-3'; CSBV-R: 5'-TTGTACGCGCGTAAATAAAC-3'。CBPV-F: 5'-AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG-3'; CBPV-R: 5'-TCTAATCTTAGCAGCAAAGCCGAG-3'。DWV-F: 5'-ATCAGCGCTTAGTGAGGAA-3'; DWV-R: 5'-TCGACAATTTTCGGACATCA-3'。反应体系:10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs Mixture(10 mmol/L)1  $\mu\text{L}$ , ExTaq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )0.25  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 19.75  $\mu\text{L}$ 。反应程序:预变性 94℃ 2 min; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。对 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳、回收、测序和 BLAST 比较。

### 1.8 Far-western blotting 检测 Galectin 重组蛋白与纯化病毒 CSBV, CBPV 和 DWV 的结合

将 1.7 节提纯的 CSBV, CBPV 和 DWV 病毒液和阴性对照组的提取液用 5  $\times$  SDS 上样缓冲液制样进行 SDS-PAGE 电泳,并用考马斯亮蓝进行染色。此外,将上述样品重新经 SDS-PAGE 电泳后,在电压 21 V, 20 min 条件下转至 PVDF 膜。转膜结束后将 PVDF 膜浸入 2% BSA 封闭液中,室温下在摇床上缓慢振荡 2 h,进行封闭。然后将 PVDF 膜放在含表达纯化的重组蛋白 pGEX6P-1-AcGalectin 的 TBST 中(纯化蛋白 pGEX6P-1-AcGalectin 蛋白:TBST = 1:100, v/v),室温缓慢振荡条件下作用 2 h。取出 PVDF 膜,用 TBST 溶液洗涤 5 次。再将 PVDF 膜放至鼠抗 GST 标签抗体(1:2 000 稀释)作为一抗的 TBST 溶液中,4℃ 过夜,然后用 TBST 溶液洗涤 5 次。再将 PVDF 膜放进 HRP 标记山羊抗小鼠(1:5 000)作为二抗的 TBST 溶液中,室温作用 1 h 后用 TBST 溶液洗涤 5 次,利用 ECL 发光液进行发光成像。

## 2 结果

### 2.1 中华蜜蜂 Galectin 基因的序列特征

从中华蜜蜂中克隆获得 Galectin 基因,将其命名为 AcGalectin,并上传到 GenBank (GenBank 登录号: MG557559),AcGalectin 全长 1 473 bp,编码一个 491 个氨基酸的蛋白,蛋白分子量约为 54.5 kD,等电点为 4.86,酸性氨基酸比例为 10.4%,碱性氨基

酸比例为 8.8%，含极性不带电荷氨基酸 (GSTCYNQ)43.2%，含非极性氨基酸 (AVLIPFWM) 37.5%，类似于其他半乳糖凝集素，AcGalectin 没有信号肽，但有一个潜在的 N-糖基化位点 (Asn<sup>440</sup>-His<sup>441</sup>-Ser<sup>442</sup>)。SMART 分析显示，AcGalectin 包含一个半乳糖识别结构域，位于 N 端第 17 - 144 位氨基酸，存在着与半乳糖结合特性相关的关键氨基酸

H59, R63, N72, W79 和 E82(图 1),位于 C 端 7 个低复杂度区,分别为第 182 - 222, 247 - 267, 291 - 315, 335 - 349, 384 - 420 及 469 - 480 位氨基酸(图 2)。系统进化树结果表明,源于昆虫的 Galectin 明显分为两簇,膜翅目蜜蜂科昆虫无刺蜂、欧洲地熊蜂、杜隧蜂、兰花蜜蜂的 Galectin 独立形成一簇,而其他昆虫 Galectin 形成另一簇(图 3)。

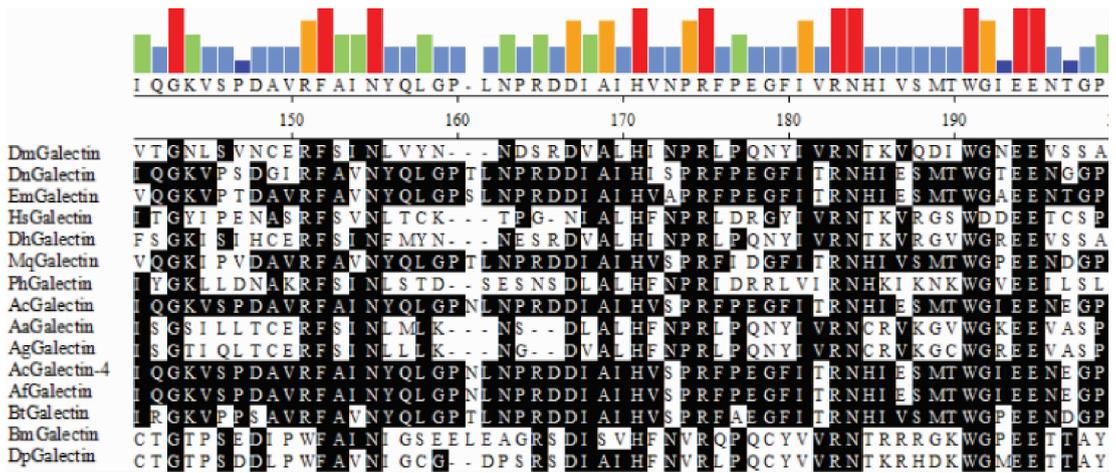


图 1 AcGalectin 与其他昆虫半乳糖凝集素蛋白氨基酸序列比对

Fig. 1 Amino acid sequence alignment between AcGalectin and galectin proteins from other insect species

Galectin 蛋白来源物种及 GenBank 登录号 Origin species of Galectin proteins and their GenBank accession numbers; AcGalectin: 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*, MG557559; AcGalectin-4: 中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*, PBC26441.1; BtGalectin: 欧洲地熊蜂 *Bombus terrestris*, XP\_003401978.1; DnGalectin: 杜隧蜂 *Dufourea novaeangliae*, KZC10048.1; EmGalectin: 兰花蜜蜂 *Eufriesea mexicana*, OAD54547.1; AfGalectin: 小蜜蜂 *Apis florea*, XP\_003696651.2; MqGalectin: 无刺蜂 *Melipona quadrifasciata*, KOX74850.1; AaGalectin: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*, XP001656933.1; AgGalectin: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*, AGAP008844-PA; BmGalectin: 家蚕 *Bombyx mori*, AK386049; DmGalectin: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, NP001162838.1; DpGalectin: 帝王蝶 *Danaus plexippus*, EHJ77864.1; PhGalectin: 人体虱 *Pediculus humanus corporis*, XP002428817.1; HsGalectin: 印度蚂蚁 *Harpegnathos saltator*, EFN82261.1; DhGalectin: 海德氏果蝇 *Drosophila hydei*, XP\_023165755.1. 图 3 同 The same for Fig. 3.

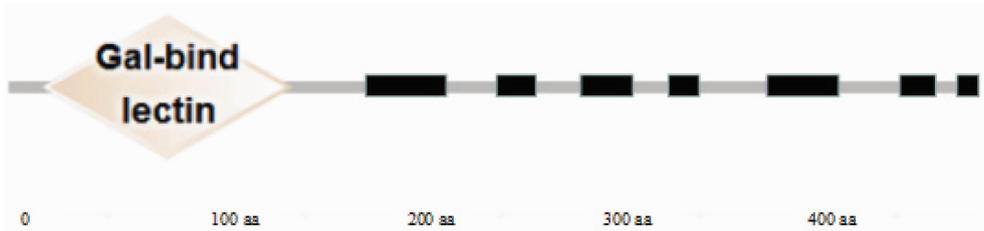


图 2 SMART 预测 AcGalectin 蛋白的结构图

Fig. 2 Structure of the predicted AcGalectin protein by SMART

Gal-bind lectin 代表糖结合区域,黑色区域为低复杂度区域,数字代表肽链长度。Gal-bind lectin represents the sugar-binding region, the black area is the low-complexity region, and the number represents the peptide chain length.

## 2.2 AcGalectin 的三维结构

利用 SWISS-MODEL 在线进行三维空间结构预测(图 4),输入 AcGalectin 的蛋白序列后发现序列与意大利蜜蜂的 Galectin-8 氨基酸序列一致性为 35.17%, Z-Score < 1,拉氏图显示 95% 的氨基酸在合理区域,表明 Galectin 的空间结构比较稳定。根据 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

在线进行分析表明,AcGalectin 基因编码的氨基酸在第 11 - 145 位氨基酸处存在一个糖识别结构域 (CRD),结合其三维构象预测,通过多个  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠形成的凸凹结构,具有典型的半乳糖凝集素糖识别结构域 (CRD) 的特征。通过对其信号肽进行预测,其 SignalP 值为 0.107,接近最低值 0.1,说明 AcGalectin 中不含信号肽。

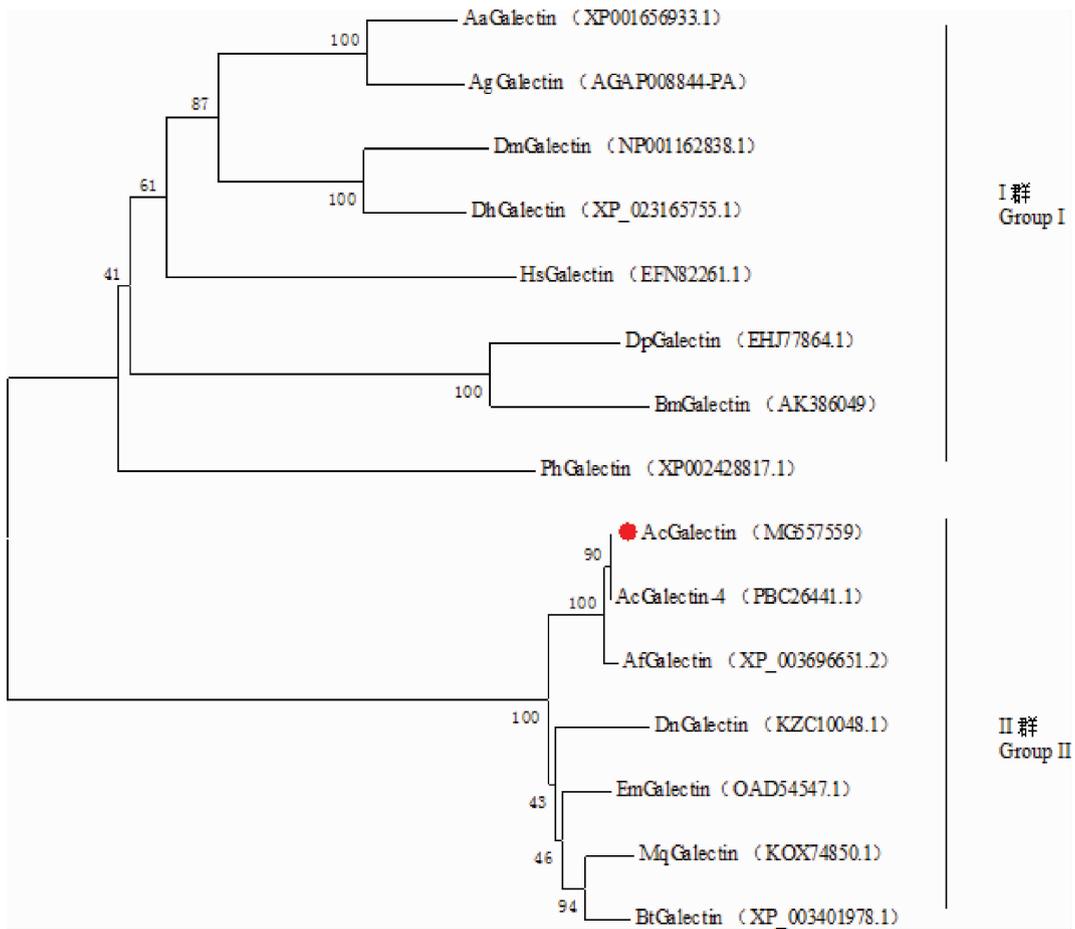


图3 基于氨基酸序列构建的昆虫半乳糖凝集素蛋白进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the amino acid sequences of insect galectins

括号中文字为 Galectin 蛋白的 GenBank 登录号。利用 Clustal Omega 进行序列比对,然后构建 NJ 系统进化树。系统树各分支上数字为 Bootstrap 值,表示 1 000 次循环检验的置信度。GenBank accession numbers of Galectin proteins are in brackets. The sequences were aligned by Clustal Omega and then a phylogenetic tree was constructed by NJ method. Bootstrap values (%) based on 1 000 replicates are indicated on the branches.

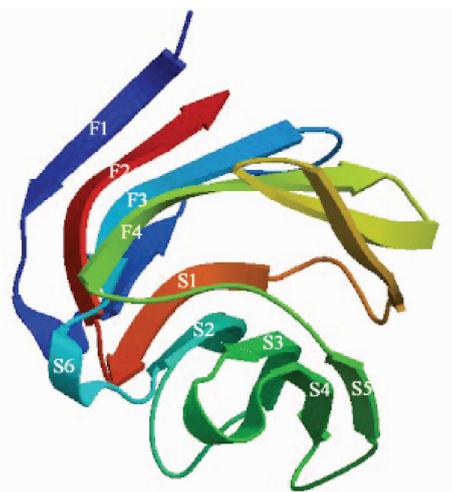


图4 AcGalectin 的三维结构

Fig. 4 Three-dimensional structure of AcGalectin

F1 - F4 和 S2 - S5 片层在外层形成凸面两侧, S1 和 S6 形成凹面底部。Convex surface is formed by F1 - F4 and S2 - S5, and convex bottom is formed by S1 and S6.

### 2.3 AcGalectin 的重组、表达、纯化与鉴定

将 opti-AcGalectin 基因与载体 pGEX6P-1 酶切后进行连接,转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,挑取阳性克隆进行酶切鉴定,结果与理论值一致,证明重组质粒 pGEX6P-1-opti-AcGalectin 构建成功。将含有重组质粒的 BL21 (DE3) 在液体 LB 培养基中培养至  $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ , IPTG 诱导后,进行 SDS-PAGE 电泳 (图 5: A)。结果表明,在 0.5 mmol/L IPTG 浓度下目的蛋白获得较好表达,且表达的蛋白以包涵体的形式存在。重组蛋白带在 GST 亲和层析柱纯化过程中,当还原性谷胱甘肽为 33 mmol/L 时,可有效洗脱目的蛋白 GST-AcGalectin 融合蛋白 (图 5: B)。使用 GST 抗体对 GST-AcGalectin 融合蛋白进行 Western blot 检测,结果显示在 75 kD 附近有特异性条带出现 (图 5: C),与预想结果一致,表明 AcGalectin 基因得到了表达。

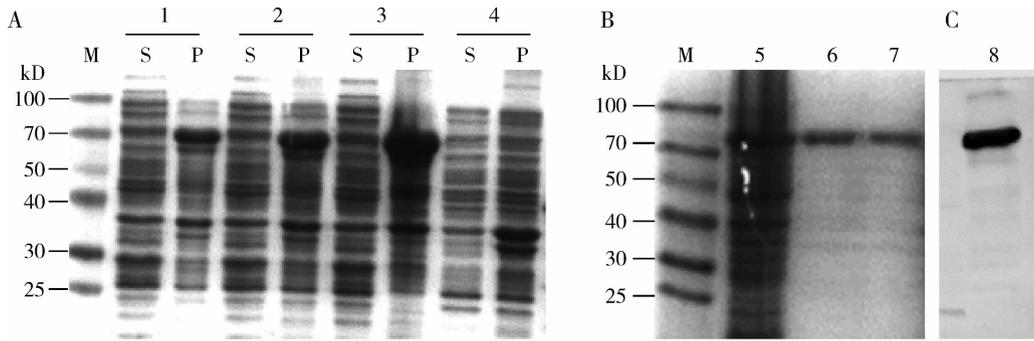


图5 GST-AcGalectin 的诱导表达(A)、蛋白纯化(B)与鉴定(C)

Fig. 5 Expression (A), purification (B) and identification (C) of GST-AcGalectin fused protein

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; P: 沉淀 Sediment; S: 上清 Supernatant; 1-4: 重组蛋白 AcGalectin 分别在 0.1, 0.25, 0.5 和 0 mmol/L 的 IPTG 下进行诱导表达 Recombinant AcGalectin after induction with 0.1, 0.25, 0.5 and 0 mmol/L IPTG, respectively. 5: 诱导沉淀 Induced sediment; 6, 7: 纯化后的 AcGalectin 蛋白 Purified AcGalectin protein; 8: Western blotting 检测纯化后的 AcGalectin 蛋白 Purified AcGalectin protein detected by Western blotting.

## 2.4 纯化病毒的 RT-PCR 鉴定

对从疑似感病蜜蜂中纯化获得的 CSBV, DWV 和 CBPV 的病毒液通过特异性引物进行 RT-PCR 检测,经琼脂糖凝胶电泳,结果显示分别在 455, 711 和 945 bp 处出现 CBPV, DWV 和 CSBV 的特异性条带(图 6)。测序结果经 BLAST 比较表明,CSBV 与中国分离株 CSBV-LNQY VP1 基因(GenBank 登录号: JX854440.1)的序列一致性 97%,DWV 与意大利分离株 DWV TC1 多蛋白基因(GenBank 登录号: EU375531)的序列一致性 96%,CBPV 与乌拉圭分

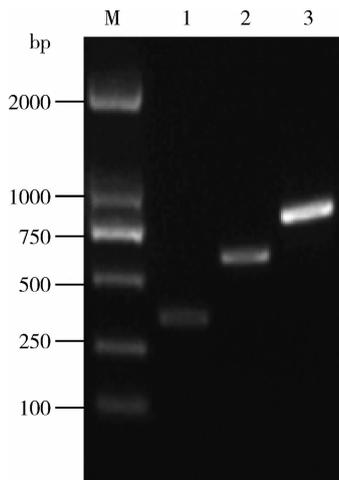


图6 病毒基因的扩增

Fig. 6 PCR amplification of virus gene

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: 分离纯化的 CBPV 样品扩增结果 Amplification product of isolated and purified CBPV sample; 2: 分离纯化的 DWV 样品扩增结果 Amplification product of isolated and purified DWV sample; 3: 分离纯化的 CSBV 样品扩增结果 Amplification product of isolated and purified CSBV sample.

离株 CBPV V5RNA 依赖性 RNA 聚合酶基因 (GenBank 登录号: AY763287.1) 的序列一致性 100%,结果表明在疑似感染病料中成功分离、纯化到 CSBV, DWV 和 CBPV。

## 2.5 AcGalectin 蛋白与纯化病毒 CSBV, DWV 和 CBPV 之间的相互作用

经过考马斯亮蓝的染色结果显示,所用病毒样品经纯化后,达到 Far-western blotting 检测要求。经 Far-western blotting 检测,纯化病毒 CSBV, DWV 和 CBPV 与 AcGalectin 作用结果显示,在 CSBV 和 CBPV 结构蛋白分子量大小处出现特异性条带,而纯化的 DWV 病毒、阴性对照(健康中华蜜蜂工蜂幼虫和健康意大利蜜蜂工蜂成虫)未出现特异性条带,表明 AcGalectin 能够与 CSBV 和 CBPV 存在结合作用,但与 DWV 没有发生结合作用(图 7)。

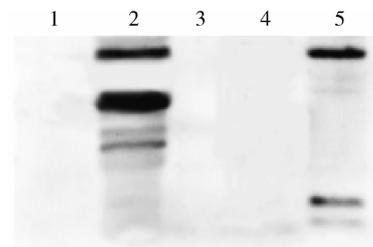


图7 Far-western blotting 分析 AcGalectin 蛋白与纯化病毒 CSBV, DWV 和 CBPV 之间的相互作用

Fig. 7 Interaction of AcGalectin with purified viruses CSBV, DWV and CBPV detected by Far-western blotting  
1: 健康中华蜜蜂工蜂幼虫 Healthy larval worker of *Apis mellifera ligustica*; 2: CSBV; 3: 健康意大利蜜蜂工蜂成虫 Healthy adult worker of *A. mellifera ligustica*; 4: DWV; 5: CBPV.

### 3 讨论

Galectin 属于动物凝集素,广泛存在于哺乳动物、鸟类、两栖动物、鱼类、线虫和真菌等生物体中,且具有高度保守性(Gray *et al.*, 2004),迄今为止,在哺乳类动物体内中已发现 15 种不同的半乳糖凝集素,在果蝇、蚊子和蚕等无脊椎动物中也陆续发现了 Galectin,有的还对其功能进行了分析。本研究从中华蜜蜂中克隆到 AcGalectin 基因,长为 1 473 bp。分析显示 AcGalectin 的 CRD 由 135 个氨基酸组成,AcGalectin 具有一个潜在的 N-糖基化位点(Asn<sup>440</sup>-His<sup>441</sup>-Ser<sup>442</sup>),通过  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠形成的凹凸结构可能作为结合糖类分子的功能域。研究显示,半乳糖凝集素具有诱导细胞凋亡(Xue *et al.*, 2017)、免疫调节(Advedissian *et al.*, 2017)和病原逃避宿主免疫作用(Lu *et al.*, 2017)等功能,可能预示中华蜜蜂的 AcGalectin 在蜂病毒感染、免疫调控和促进宿主细胞凋亡方面发挥十分重要的作用。本研究通过对 AcGalectin 基因序列及对蛋白结构的分析发现,AcGalectin 没有信号肽而且只含有典型的半乳糖凝集素结构域,与已报道的动物半乳糖结构相似(Almkvist and Karlsson, 2002; 郑利兵等, 2015; 郝贵杰等, 2016),推测 AcGalectin 可能是通过非经典的分泌方式到达细胞外,使得 AcGalectin 与其配体在外化后互作,发挥生物学功能。

CSBV, DWV 和 CBPV 是目前我国主要流行 3 个蜂病毒,CSBV 对中华蜜蜂具有较高致病性(Cavigli *et al.*, 2016),主要感染幼虫死亡,引起脂肪的液化而死亡,而感染成年蜂导致寿命缩短,生产能力降低。CBPV 主要引起蜜蜂神经元胞体和神经纤维区域受到病理性损伤,引起蜂群出现神经性震颤、丧失飞行能力,出现爬行现象,患病工蜂被健康工蜂攻击,俗称“爬蜂病”。DWV 是造成“蜂群崩溃综合症(colony collapse disorder, CCD)”的主要威胁因子之一(Wilfert *et al.*, 2016),主要侵害蜜蜂神经系统,引起蜜蜂翅膀残缺,甚至迅速死亡。本研究用纯化的 GST-AcGalectin 融合蛋白与纯化的 CSBV, DWV 和 CBPV 进行结合试验,结果发现 AcGalectin 与 CSBV 和 CBPV 之间存在结合反应,与 DWV 之间没有结合。已有研究表明 Gal-1 可通过稳定 HIV-1, 人嗜 T 细胞病毒(HTLV)(Gauthier *et al.*, 2008)和毛滴虫(Okumura *et al.*, 2008)对宿主细胞的吸附作用来增强其传染性,但是在 Nipah 病毒感染研究发现, Gal-1 可抑制病毒与宿主细胞的融合,促进 DC

分泌促炎性细胞因子(Levroney *et al.*, 2005)。本研究发现中华蜜蜂半乳糖凝集素蛋白 AcGalectin 与 CSBV 和 CBPV 发生结合反应,这说明 CSBV 和 CBPV 病毒粒子在包装、形成成熟结构蛋白过程中,经过糖基化修饰,使得 CSBV 和 CBPV 病毒粒子与 Galectin 发生结合。Chevin 等(2015)利用质谱分析对 CBPV 结构蛋白进行研究发现结构蛋白存在糖基化修饰,且糖基化蛋白分子量与本研究所观察到和 AcGalectin 结合的蛋白的分子量大小一致,这进一步证明了部分蜂病毒结构蛋白存在着糖基化修饰,但糖基化蜂病毒结构蛋白与 AcGalectin 结合对病毒的入侵以及蜜蜂的防御反应之间有什么关系,还需要进一步研究。

### 参考文献 (References)

- Almkvist J, Karlsson A, 2002. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.*, 19(7-9): 575-581.
- Advedissian T, Deshayes F, Viguier M, 2017. Galectin-7 in epithelial homeostasis and carcinomas. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(12): 2760.
- Cavigli I, Daughenbaugh KF, Martin M, Lerch ML, Banner K, Garcia E, Brutscher LM, Flenniken ML, 2016. Pathogen prevalence and abundance in honey bee colonies involved in almond pollination. *Apidologie*, 47(2): 251-266.
- Chevin A, Coutard B, Blanchard P, Dabert-Gay A-S, Ribière-Chabert M, Thiéry R, 2015. Characterisation of structural proteins from Chronic bee paralysis virus (CBPV) using mass spectrometry. *Viruses*, 7(6): 3329-3344.
- Gauthier S, Pelletier I, Ouellet M, Vargas A, Tremblay MJ, Sato S, Barbeau B, 2008. Induction of galectin-1 expression by HTLV-I Tax and its impact on HTLV-I infectivity. *Retrovirology*, 5(1): 105.
- Gray CA, Adelson DL, Bazer FW, Burghardt RC, Meeusen ENT, Spencer TE, 2004. Discovery and characterization of an epithelial-specific galectin in the endometrium that forms crystals in the trophoblast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(21): 7982-7987.
- Hao GJ, Lin F, Mu CK, Li RH, Yao JY, Pan XY, Yuan XM, Shen JY, Wang CL, 2016. Cloning and prokaryotic expression of galectin from *Portunus trituberculatus*. *Oceanol. Limnol. Sin.*, 47(6): 1241-1249. [郝贵杰, 林锋, 母昌考, 李荣华, 姚嘉赞, 潘晓艺, 袁雪梅, 沈锦玉, 王春琳, 2016. 三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)半乳糖凝集素 PtGAL 的基因克隆与原核重组表达. *海洋与湖沼*, 47(6): 1241-1249]
- Hu Y, Fei DL, Jiang LL, Wei D, Li FB, Diao QY, Ma MX, 2016. A comparison of biological characteristics of three strains of Chinese sacbrood virus in *Apis cerana*. *Sci. Rep.*, 6: 37424.
- Kamhawi S, Ramalho-Ortigao M, Pham VM, Kumar S, Lawyer PG, Turco SJ, Barillas-Mury C, Sacks DL, Valenzuela JG, 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119(3): 329-341.
- Kim JY, Kim YM, Cho SK, Choi KS, Cho M, 2008. Noble tandem-

- repeat galectin of manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Dev. Comp. Immunol.*, 32(10): 1131–1141.
- Levroney EL, Aguilar HC, Fulcher JA, Kohatsu L, Pace KE, Pang M, Gurney KB, Baum LG, Lee B, 2005. Novel innate immune functions for galectin-1: galectin-1 inhibits cell fusion by Nipah virus envelope glycoproteins and augments dendritic cell secretion of proinflammatory cytokines. *J. Immunol.*, 175(1): 413.
- Lu MM, Tian XW, Yang XC, Yuan C, Ehsan M, Liu XC, Yan RF, Xu LX, Song XK, Li XR, 2017. The N- and C-terminal carbohydrate recognition domains of *Haemonchus contortus* galectin bind to distinct receptors of goat PBMC and contribute differently to its immunomodulatory functions in host-parasite interactions. *Parasit. Vectors*, 10(1): 409.
- Nakamura O, Watanabe M, Ogawa T, Muramoto K, Ogawa K, Tsutsui S, Kamiya H, 2012. Galectins in the abdominal cavity of the conger eel *Conger myriaster* participate in the cellular encapsulation of parasitic nematodes by host cells. *Fish Shellfish Immunol.*, 33(4): 780–787.
- Niu YH, Chen CY, Zhao SL, Yang S, Tang J, 2006. Advance on the research of anti-HIV lectins. *Yunnan Chem. Technol.*, 33(6): 59–63. [牛耀辉, 陈朝银, 赵声兰, 杨苏, 唐嘉, 2006. 凝集素及其抗 HIV 研究进展. 云南化工, 33(6): 59–63]
- Okumura CYM, Baum LG, Johnson PJ, 2008. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol.*, 10(10): 2078–2090.
- Rajan B, Kiron V, Fernandes JMO, Brinchmann MF, 2013. Localization and functional properties of two galectin-1 proteins in Atlantic cod (*Gadus morhua*) mucosal tissues. *Dev. Comp. Immunol.*, 40(2): 83–93.
- Tantillo G, Bottaro M, Pinto AD, Martella V, Pinto PD, Terio V, 2015. Virus infections of honeybees *Apis mellifera*. *Ital. J. Food Saf.*, 4(3): 157–168.
- Vasta GR, 2009. Roles of galectins in infection. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7(6): 424.
- Wang M, Wang L, Huang M, Yi Q, Guo Y, Gai Y, Wang H, Zhang H, Song L, 2016. A galectin from *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing microbe agglutination and haemocytes encapsulation. *Fish Shellfish Immunol.*, 55: 10–20.
- Wang P, Wang W, Lü ZQ, 2014. Expression, purification and characterization of a galectin in the silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Entomol. Sin.*, 57(7): 806–814. [王鹏, 王维, 吕志强, 2014. 家蚕半乳糖凝集素 BmGalectin-4 的表达、纯化及性质分析. 昆虫学报, 57(7): 806–814]
- Wilfert L, Long G, Leggett HC, Schmid-Hempel P, Butlin R, Martin SJ, Boots M, 2016. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by Varroa mites. *Science*, 351(6273): 594–597.
- Xue H, Liu L, Zhao Z, 2017. The N-terminal tail coordinates with carbohydrate recognition domain to mediate galectin-3 induced apoptosis in T cells. *Oncotarget*, 8(30): 49824–49838.
- Zheng LB, Wu B, Liu ZH, Zhou LQ, Sun XJ, Tian JT, Yang AG, Zheng YX, 2015. Cloning and expression analysis of galectin from *Scapharca broughtonii* (SbGal). *Oceanol. Limnol. Sin.*, 46(5): 1061–1070. [郑利兵, 吴彪, 刘志鸿, 周丽青, 孙秀俊, 田吉腾, 杨爱国, 郑言鑫, 2015. 魁蚶(*Scapharca broughtonii*)半乳糖凝集素(SbGal)基因 cDNA 的克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 46(5): 1061–1070]
- Zhong Y, Shao HY, Fu LJ, Fei DL, Ma MX, 2016. The establishment of the chronic bee paralysis virus by semi nested PCR detection. *Chin. J. Virol.*, (4): 490–494. [钟义, 邵海英, 傅丽君, 费东亮, 马鸣潇, 2016. 慢性蜜蜂麻痹病毒半套式 PCR 检测方法的建立. 病毒学报, (4): 490–494]

(责任编辑: 马丽萍)