

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2020.02.004

松材线虫 *galectin-1* 基因的克隆、原核表达和表达模式分析

任万兰^{1,2,3}, 张 驰³, 周 娇³, 侯有明^{1,2*}, 赵莉茜^{3,4*}

¹福建农林大学植物保护学院, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福建 福州 350002; ²福建农林大学植物保护学院, 福建省昆虫生态重点实验室, 福建 福州 350002; ³中国科学院动物研究所, 农业虫害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101; ⁴中国科学院生物互作卓越创新中心, 北京 100049

摘要:【目的】*galectin-1* 是凝集素的一种, 广泛存在于各种生物体内, 在生长发育、免疫调节方面起重要作用。本研究克隆和表达了松材线虫的 *galectin-1* 蛋白, 并分析了各个龄期的表达量。【方法】设计引物, 扩增松材线虫的 *galectin-1* 基因, 使用双酶切的方法连接 pET-28a 载体和目的基因, 转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆; 在不同温度下, 用不同浓度的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达, Western blot 检验蛋白表达情况; 采用 RT-PCR 技术检验松材线虫各个龄期 *galectin-1* 基因的表达情况。【结果】由 SMART 和 PredictProtein 软件分析可知, 该蛋白有 2 个结构域, 并且主要由无规卷曲和 β 折叠构成; 生物学信息分析显示, 松材线虫的 *galectin-1* 与小卷蛾斯氏线虫的相似性更高; 与日本血吸虫相比, 线虫能很好地聚集在一个分支上。Western blot 检测纯化蛋白大小与查询所得蛋白分子质量一致。RT-qPCR 结果显示, 以繁殖型 2 龄松材线虫 (L_2) 为对照, *galectin-1* 基因在繁殖型 3 龄 (L_3)、繁殖型 4 龄 (L_4)、扩散型 3 龄 (L_{III}) 和扩散型 4 龄 (L_{IV}) 松材线虫中的表达量高, 尤其是在 L_{III} 中的表达量最高; 雌雄成虫没有显著性差异。【结论】松材线虫的 *galectin-1* 基因在 pET-28a 原核表达系统中呈可溶性表达, 在不同龄期的表达量有差异。本研究为进一步研究松材线虫的 *galectin-1* 基因奠定了基础, 为松材线虫的防治提供了新的方向。

关键词: 松材线虫; 半乳糖凝集素-1 基因; 原核表达; RT-qPCR



开放科学标识码
(OSID 码)

Cloning, prokaryotic expression and expression pattern analysis profiling of the *galectin-1* gene of in the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*

REN Wanlan^{1,2,3}, ZHANG Chi³, ZHOU Jiao³, HOU Youming^{1,2*}, ZHAO Lilin^{3,4*}

¹State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; ²Fujian Province Key Laboratory of Insect Ecology, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; ³State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ⁴CAS Center for Excellence in Biotic Interactions, Beijing 100049, China

Abstract: 【Aim】Galectins (Gal), a family of lectins, are widely distributed in various organisms and play pivotal roles in many biological processes, including growth, development and immunity. In the present study, a galectin-coding gene was cloned and identified from *Bursaphelenchus xylophilus* (Bx), and we analyzed its expression patterns in different developmental stages. 【Method】Primers were designed to amplify the *galectin-1* gene of in *B. xylophilus*, while the pET-28a vector and the target gene were ligated by double enzyme digestion, then transformed into *Escherichia coli* DH5 α competent cells, and positive clones were screened. The expressed galectin-1 protein was induced with isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) at various temperatures and Western

blot was used to detect the expression of galectin-1 protein. Quantitative real time-polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to analyse the expression of this gene in different developmental stages of *B. xylophilus*. 【Result】 The cDNA of BxGal was cloned (Gen Bank Gene ID: GU130138.1). SMART and PredictProtein softwares indicated that the BxGal had two CRDs and was mainly composed of random coils and β -sheets. Bioinformatics analysis showed that BxGal was more similar to that in the insect parasitic nematode *Steinernema carpocapsae*. The phylogenetic tree indicated that nematodes clustered well, compared to *Schistosoma japonicum*. Developmental expression profiles revealed that the expression level of BxGal was the highest in the dispersing third-larval instar (L_{III} larvae), and lower in propagative larval stages, dispersing fourth-larval stage (L_{IV}) and in the reproductive adult. There was no difference between activity in males vs. females. 【Conclusion】 The *galectin-1* gene of *B. xylophilus* was soluble expressed in the pET-28a prokaryotic expression system, and its expression level varied in the different developmental stages. This study provides the basis cornerstones for further research of the BxGal and provides a new direction for the control of *B. xylophilus*.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; *galectin-1* gene; prokaryotic expression; RT-qPCR

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle 隶属滑刃目 Aphelenchida 寄生滑刃科(滑刃科) Parasiaphelenchidae (Aphelenchidae) 伞滑刃亚科 Bursaphelenchia 伞滑刃属(张星耀和骆有庆, 2004), 是一种世界性重大入侵害虫, 在世界范围内引起严重的森林病害, 特别是在亚洲和欧洲的国家 (Futai, 2008; Shinya *et al.*, 2013; Zhao & Sun, 2017)。松材线虫所引起的松材线虫枯萎病, 是松属树种最具破坏性的疾病之一, 造成全球环境和经济损失总计达数千万美元 (Tóth, 2011)。

在夏季, 松材线虫会经过卵、2 龄、3 龄、4 龄、成虫各个阶段, 此为繁殖周期 (L_1 — L_4)。到秋末时, 松材线虫会遇到低温、缺少食物、种群密度过大等不利环境, 这时, 松材线虫会由繁殖周期进入扩散周期。松材线虫会先形成扩散型 3 龄 (L_{III}), 当遇到枯死在松树里的沟胫天牛族的天牛幼虫时, 松材线虫 L_{III} 就会形成扩散型 4 龄 (L_{IV}), L_{IV} 进入沟胫天牛族天牛的气管内, 随着天牛羽化转移到新的寄主上, 危害寄主健康。松材线虫在松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope 气管中被携带, 两者间会产生免疫互作 (Zhou *et al.*, 2018)。研究表明, 携带松材线虫的松墨天牛中, miR-14、miR279 和 miR-312 表达量均显著升高, 其功能大多指向代谢、免疫等方面 (宁静等, 2018)。

凝集素是先天免疫机制的关键组成部分, 其功能包括激活促进吞噬作用和细胞内杀伤的信号传导途径, 以及激活促进吞噬作用和杀死潜在病原体的补体氧化酶和补体途径 (Vasta *et al.*, 2007)。半乳糖凝集素 (galectin) 是凝集素的一种, 构成了一个 β -半乳糖苷结合蛋白家族, 其特征在于独特的糖基识

别结构域 (carbohydrate recognition domain, CRD) 序列基序, galectin-1 是最早被发现的半乳糖凝集素家族中的一员, 以二聚体的形式存在, 在真核生物类群中广泛存在, 结构保守, 其功能是主要参与生长发育、免疫调节等各种生理功能 (Rabinovich, 2007)。基于结构特征, 哺乳动物半乳糖凝集素被分为 3 种类型: “原型”、“嵌合体”和“串联重复” (TR) (Cooper, 2002)。原型半乳糖凝集素是肽亚基的非共价连接的同型二聚体, 含有单个 CRD。嵌合体半乳糖凝集素具有富含脯氨酸和甘氨酸的 N-末端结构域, 在相反的 C-末端区域具有 CRD。TR 半乳糖凝集素含有 2 个由功能性接头肽桥接的 CRD。

半乳糖凝集素与早期发育和组织再生、恶性肿瘤分期、侵袭性或转移潜能、脂肪生成和 II 型糖尿病、调节先天和适应性免疫稳态有关, 以及对感染性和过敏性挑战的反应和癌症方面起关键作用 (Blidner *et al.*, 2015; Craig *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2015; Hill *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Pejnovic *et al.*, 2013; Rabinovich *et al.*, 2012; Vasta *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011)。galectin 既参与寄生虫的形态维持、生长发育等过程, 还与其寄生、在宿主体内存活及免疫调节功能有关 (Hao *et al.*, 2007; Kiel *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2004), 现已在多种寄生性线虫中发现, 如捻转血矛线虫 *Haemonchus contortus* Rud.、马来丝虫 *Brugia malayi* (Brug) Buckley、丝状网尾线虫 *Dictyocaulus filaria* Rudolphi、哥斯达管圆线虫 *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Cespedes、广州管圆线虫 *Angiostrongylus cantonensis* Chen。

松材线虫的 *galectin-1* 基因在 2011 年首次被发现 (Lee *et al.*, 2011), 其结构和功能的研究仍是空

白。本实验纯化了 *galectin-1* 蛋白,并对其进行了生物信息学分析,并检测了其在松材线虫不同龄期的表达量,为进一步研究松材线虫发育、免疫、与松墨天牛的免疫互作奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试线虫

松材线虫品系来自中国陕西,并在实验室饲养了数代。采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板培养灰葡萄孢,温度 25 ℃,无光照,7 d 左右灰葡萄孢基本长满平板培养基,接入大约 500 条松材线虫,在同样条件下培养线虫,8 d 左右松材线虫将灰葡萄孢吃完,用带有抗生素的磷酸盐吐温缓冲液(PBST)将松材线虫冲出。

各个龄期的获得:收集松材线虫的卵,在水中培养 24 h,发育成 2 龄幼虫(L_2);将 2 龄线虫接种到灰葡萄孢上培养 24 h,得到同步化繁殖型 3 龄松材线虫(L_3);2 龄线虫接种灰葡萄孢上,培养 48 h,得到同步化繁殖型 4 龄松材线虫(L_4);将 2 龄线虫接种到长满灰葡萄孢的 PDA 平板上,培养 72 h,得到同步化成虫松材线虫。用贝尔曼漏斗法收集各个龄期线虫。扩散性 3 龄(L_{III})来自安徽疫区树木,用贝尔曼漏斗法检出。扩散性 4 龄(L_{IV})来自室内天牛气管中。

将所收集的繁殖型线虫(L_n)、 L_{III} 和 L_{IV} 线虫离心($5000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min),除去多余的 PBST,加入 1 mL 35% 的蔗糖, $6000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 6 min,将上层的线虫转移到新的离心管中,加入 1 mL 带有抗生素的 PBST, $7000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 7 min,除去 PBST,收集线虫提 RNA。

1.2 线虫总 RNA 的提取,cDNA 的合成

根据 Trizol 试剂盒(Thermo Fisher 公司)说明书,提取各个龄期繁殖型线虫(L_n)、 L_{III} 和 L_{IV} 松材线虫的 RNA,使用 cDNAFast Quant RT Kit (with gDNase)(TIANGEN 公司)反转试剂盒合成 cDNA,并作为荧光定量 PCR 的模板。

1.3 *galectin-1* 基因的扩增和测序

根据 NCBI 上松材线虫 *galectin-1* 基因的 mRNA 完整编码序列(GenBank 登录号:GU130138),设计合成特异性引物 Galec-F: CCCGAATTCGGGATGACTGAGGAAAAGAAAAC 和 Galec-R: CCCAAGCTTGGGTAAATGGATCTGGATGCCAG (单下划线

为酶切位点 EcoR1 和 Hind3)。使用 Phusion High-Fidelity PCR Kit 高保真 DNA 聚合酶(NEB 公司)做载体 PCR 和目的基因片段 PCR,反应体系: cDNA 模板 1 μL , 上、下游引物各 1 μL , dNTP 混合液 0.4 μL , Taq 酶 0.2 μL , Taq 缓冲液 4 μL , 补充 ddH₂O 至 20 μL 。PCR 反应条件: 95 ℃ 1 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 循环 40 次; 72 ℃ 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,送深圳华大基因科技有限公司测序鉴定。

1.4 基因的生物信息学分析

ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/prot-param.html>) 预测蛋白质的分子量和等电点, Clustal Wprogram (<http://www.clustal.org/clustal2/>) 进行蛋白质序列比对, TMHMM 分析蛋白质跨膜结构域 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMH-MM/>), SMART 软件 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 分析蛋白质功能结构域, PredictProtein (<https://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/>) 预测二级结构, SWISS-MODEL 软件 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 预测三级结构和同源建模,在 NCBI 数据库中对松材线虫的 *galectin* 进行氨基酸序列的同源性比对,下载线虫的 *galectin* 的氨基酸序列,并用 MEGA 7 (neighbor-joining, NJ 法) 软件在 1000 次 bootstrap 检测后构建进化树。

1.5 重组质粒 pET-28a-*galectin-1* 的构建

用双酶切法处理目的基因与载体 pET-28a,限制性内切酶为 EcoR1 和 Hind3,使用 DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TaKaRa) 试剂盒链接目的基因与载体,再将产物热激转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。把细胞均匀涂布在含卡那霉素 ($100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 平板上,筛选阳性克隆,阳性菌液送深圳华大基因科技有限公司测序鉴定。

1.6 重组 *galectin-1* 蛋白的诱导表达和纯化

接种空载菌株和单克隆 pET-28a-*galectin-1* 重组质粒菌株分别于 5 mL 的 LB 培养基(含氨苄青霉素 $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 中,在温度 37 ℃、转速 $200\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的培养箱中培养 12 h。加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度分别为 0、0.1、0.5 和 1.0 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$,分别在 16、37 ℃ 诱导 16 h, $5000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,沉淀用 100 μL PBS 混匀,超声破碎后, $12000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清和沉淀,SDS 凝胶电泳后,考染 30 min,脱色过夜,检测

样品。采用镍柱亲和层析法纯化蛋白。将上清和沉淀的蛋白收集做 western blot。首先将蛋白跑 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后,在转膜 buffer 浸泡 20 min,转到硝酸纤维素膜(PVDF membrane)上,在 TBST 浸泡 10 min,使用快速封闭液封闭 10 min,一抗为鼠抗 His 标签,其浓度为 1 : 5000,4 ℃,过夜孵育,使用 TBST 洗膜 5 min,洗 3 次;再将二抗鼠抗,浓度为 1 : 10000,加到封闭液中摇床孵育 2 h,再用

TBST 洗 5 min,洗 3 次;用 ECL 显色液均匀涂抹在 PVDF 膜上,在黑暗中静置 5 min,再用医用 X 线胶片曝光,置于显色液 2 min,水洗,定影液 2 min,洗净晾干,扫描数据。

1.7 松材线虫各个龄期 *galectin-1* 基因定量表达
使用 Peimer premier 5.0 设计 *galectin-1* 基因的荧光定量 PCR 引物以及 β -actin 基因的引物,序列如表 1 所示:

表 1 引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')	引物用途 Use of primers
galectin-F	CCCGAATTCTGGGATGACTGAGGAAAAGAAAAC	RT-qPCR
galectin-R	CCCAAGCTTGGGTTAATGGATCTGGATGCCAG	
β -actin-F	GTGATCACCGTCGGAAAC	
β -actin-R	GAGCCTCCAATCCAGACG	

反应体系:SybGreen 10 μ L,Rox 0.4 μ L,上、下引物各 0.8 μ L,ddH₂O 6 μ L,模板 2 μ L。反应条件:95 ℃ 3 min;95 ℃ 5 s;56 ℃ 30 s;72 ℃ 30 s;40 个循环。以 L₂ 作为对照,比较松材线虫其他各个龄期的定量数据,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 相对定量法计算相对表达量。使用 SPASS 软件分析数据,分析方法为比较均值单因素方差。

2 结果与分析

2.1 松材线虫的 *galectin-1* 基因序列及特点

扩增松材线虫的 *galectin-1* 基因并进行测序分析,该序列与 NCBI 上所提交的基因序列(GU130138.1)一致,松材线虫 *galectin-1* 的 Genbank 编号为 ACZ13331.1,氨基酸残基数为 278,由 ProtParam 查询可知该蛋白的理论分子质量为 31.87 ku,等电点为 6.27。

2.2 松材线虫 *galectin-1* 蛋白的功能结构域分析

由 SMART 软件分析可知,松材线虫 *galectin-1* 蛋白的功能结构域有 2 个,即第 10~141 位氨基酸处的 GLECT 结构域(CRD)和第 147~276 位氨基酸处的 GLECT 结构域(CRD),由 5 个氨基酸残基的肽链接(图 1)。

2.3 松材线虫 *galectin-1* 蛋白二级和三级结构
由 PredictProtein 软件分析可知,*galectin-1* 蛋白的二级结构中无规卷曲占 54.35%, β 折叠占 45.65%,没有 α 螺旋。使用 SWISS-MODEL 软件对 *galectin-1* 蛋白同源建模,显示出该蛋白主要由无规卷曲和 β 折叠组成,结果与 Predict Protein 软件一致。每个半乳糖凝集素中,2 个 CRD 的结构相似,每个 CRD 具有典型的半乳糖凝集素折叠,该褶皱由反平行的 β -折叠构成, β -折叠由 β -三明治组合组成,没有任何 α -螺旋(图 2)。

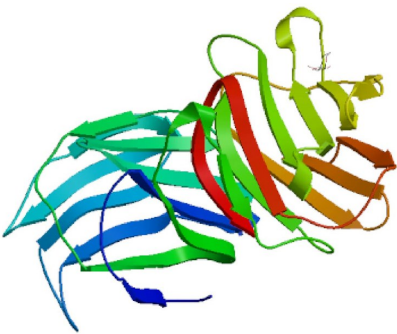


图 2 松材线虫 *galectin-1* 蛋白的三级结构预测
Fig.2 Predicted tertiary structures of galectin-1 of *B. xylophilus*

2.4 松材线虫 *galectin-1* 同源序列对比及系统发育树

通过对松材线虫 *galectin-1* 蛋白序列的 blast 与氨基酸系列分析(图 3),发现松材线虫与小卷蛾斯氏线虫 *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (TMS35925.1) 的相似性最高,为 84.36%;与鼠类圆线虫 *Strongyloides ratti* Sandground (XP_024498502.

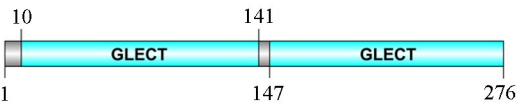


图 1 松材线虫 *galectin-1* 蛋白结构域的预测
Fig.1 Predicted domains in galectin-1 of *B. xylophilus*

1) 相似性为 82.01%。以日本血吸虫 *Schistosoma japonicum* Katsurada 为外群, 用 MAGE 7.0 建立成系统发育树 (图 4), 线虫都聚集在一个大分支上, 而小

卷蛾斯氏线虫、鼠类圆线虫和秀丽杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 在同一个小分支上, 与 blast 的结果一致。

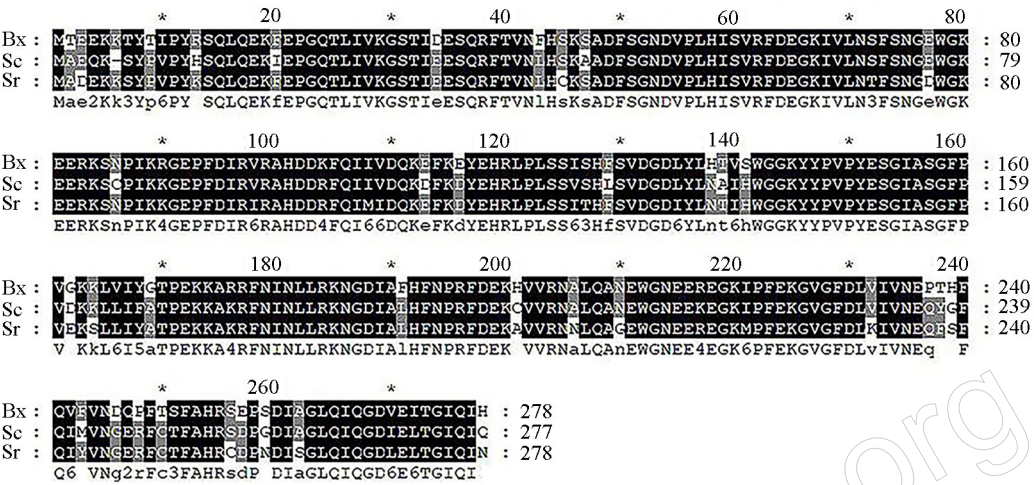


图 3 松材线虫与其他物种中 galectin-1 蛋白氨基酸序列比对

Fig.3 Alignment of galectin-1 amino acid sequences of *B. xylophilus* with other species

Bx: 松材线虫 (登录号: ACZ13331.1); Sc: 小卷蛾斯氏线虫 (登录号: TMS35925.1); Sr: 鼠类圆线虫 (登录号: XP_024498502.1)。

Bx: *B. xylophilus* (GenBank accession numbers: ACZ13331.1); Sc: *Steinernema carpocapsae* (GenBank accession numbers: TMS35925.1); Sr: *Strongyloides ratti* (GenBank accession numbers: XP_024498502.1)。

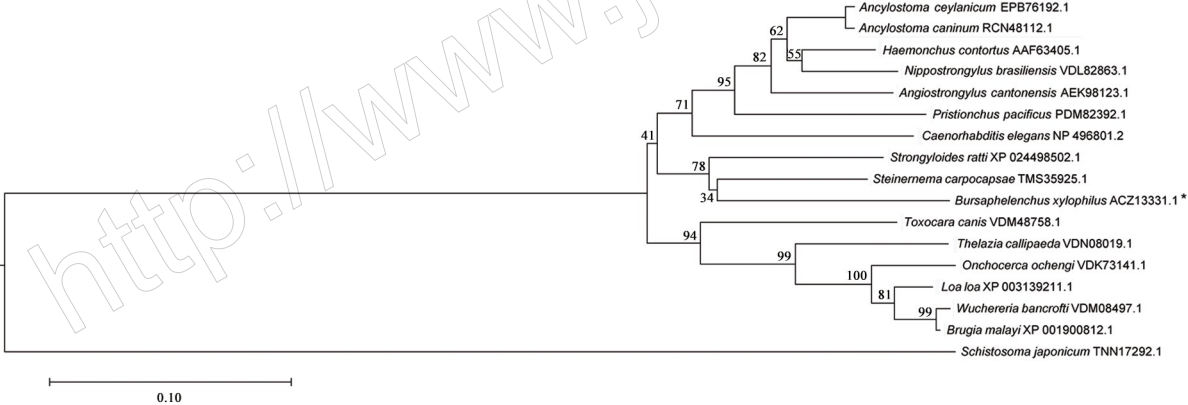


图 4 *galectin-1* 与其同源基因基于氨基酸序列构建的进化树 (邻接法)

Fig.4 Phylogenetic tree of *galectin-1* and its homologues based on amino acid sequences (neighbor-joining method)

2.5 松材线虫 *galectin-1* 蛋白的原核表达和 Western blot

镍柱亲和层析纯化蛋白的 Western blot 结果与查询所得蛋白分子质量一致。通过构建 *galectin-1*/pET-28a 重组表达载体, 并转化到 DH5 α 宿主菌中, 使用不同浓度的 IPTG, 分别在 37、16 $^{\circ}$ C 条件下诱导 16 h 表达重组蛋白 (图 5), 结果显示, 在 37 $^{\circ}$ C 条件下, 表达的 *galectin-1* 蛋白较多, 沉淀中蛋白的含量比上清多, 并且在有 IPTG 诱导后, 表达的 *galectin-1* 蛋白会更多。

2.6 各个龄期松材线虫 *galectin-1* 基因的定量表达

收集松材线虫各个龄期的 cDNA, 做 *galectin-1* 基因的 RT-qPCR, 结果表明, 相比繁殖型 2 龄, 繁殖型 3 龄、繁殖型 4 龄、扩散型 3 龄和扩散型 4 龄的 *galectin-1* 基因表达量都高, 并且呈显著差异 ($n=3$, $P>0.05$, t 检验), 与雌、雄成虫没有显著差异; 扩散型 3 龄与繁殖型 3 龄的表达差异显著 ($n=3$, $P>0.05$, t 检验), 扩散性 4 龄与繁殖型 4 龄没有显著差异, 雌、雄成虫之间没有显著差异 (图 6); 扩散型 3 龄中 *galectin-1* 基因的表达量最高。

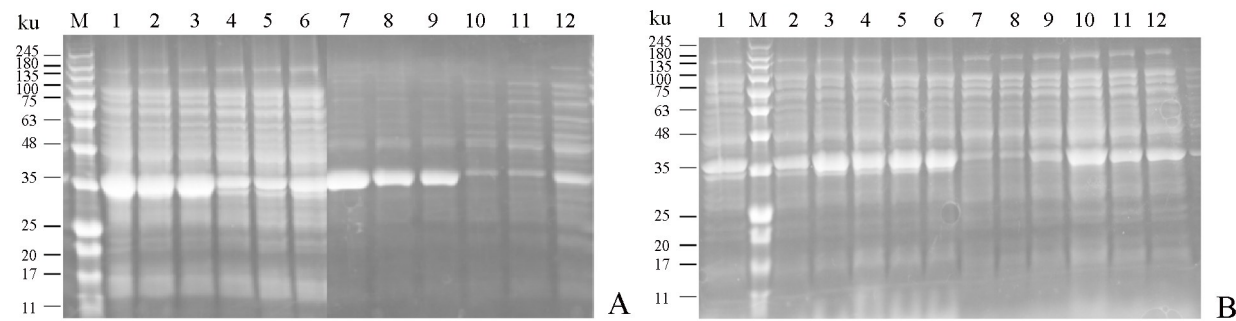


图 5 重组 galectin-1 蛋白诱导表达与蛋白纯化

Fig.5 Recombinant galectin-1 protein induced expression and protein purification

A: 重组蛋白 galectin-1/pET-28a 与空载对照在 37 °C 条件下表达;1~4:重组蛋白 galectin-1/pet-28a 分别在 1、0.5、0.1、0 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下的诱导表达;5~6:空载体在 1 和 0 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下的诱导表达;7~10:重组蛋白 galectin-1/pet-28a 分别在 1、0.5、0.1、0 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下的诱导表达;11~12:空载体在 1 和 0 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下的诱导表达;B: 重组蛋白 galectin-1/pET-28a 与空载对照在 16 °C 条件下表达;1~2:空载体在 0 和 1 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下的诱导表达;3~6:重组蛋白 galectin-1/pET-28a 分别在 0、0.1、0.5、1 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下的诱导表达;7~8:空载体在 0 和 1 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下的诱导表达;9~12:重组蛋白 galectin-1/pet-28a 分别在 1、0.5、0.1、0 mmol · L⁻¹ IPTG 条件下的诱导表达。M: 蛋白分子量标准。

A: The recombinant protein galectin-1/pET-28a was expressed at 37 °C with an empty control; 1~4: The recombinant protein galectin-1/pET-28a was induced at 1, 0.5, 0.1, 0 mmol · L⁻¹ IPTG, respectively; 5~6: Empty vector was induced at 1 and 0 mmol · L⁻¹ IPTG; 7~10: Recombinant protein galectin-1/pET-28a was induced at 1, 0.5, 0.1, 0 mmol · L⁻¹ IPTG, respectively; 11~12: Empty vector was induced at 1 and 0 mmol · L⁻¹ IPTG; B: The recombinant protein galectin-1/pET-28a was expressed at 16 °C with an empty control; 1~2: Induced expression of empty vector at 0 and 1 mmol · L⁻¹ IPTG; 3~6: The recombinant protein galectin-1/pET-28a was induced to express under the conditions of 0, 0.1, 0.5 and 1 mmol · L⁻¹ IPTG, respectively; 7~8: Induced expression of empty vector at 0 and 1 mmol · L⁻¹ IPTG; 9~12: The recombinant protein galectin-1/pET-28a was induced at 1, 0.5, 0.1, 0 mmol · L⁻¹ IPTG, respectively; M: Protein molecular weight marker.

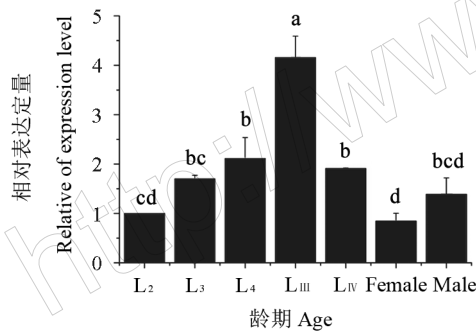


图 6 松材线虫各个龄期的相对表达定量

Fig.6 Quantitative expression of relative expression of *B. xylophilus* at various ages

不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。
The different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论与结论

本文通过原核表达体系,表达和纯化松材线虫 galectin-1 的蛋白,并预测其蛋白结构,通过与同源基因系统发育树的分析及其在松材线虫不同虫龄的表达量,初步探讨松材线虫 galectin-1 基因的可能生理功能。

松材线虫的 galectin-1 蛋白有 2 个 GLECT (CRD) 结构域,这 2 个结构域可结合碳水化合物,从而发挥生长发育、免疫或其他生理功能。松材线虫是一种植物寄生线虫,其传播需要与松墨天牛相

互作用,而通过 blast 以及氨基酸序列比对,系统发育树结果显示,松材线虫与动物寄生线虫更为接近,特别是昆虫寄生线虫小卷蛾斯氏线虫,说明松材线虫 Gal-1 的功能可能在与天牛相互作用时发挥作用。通过对松材线虫各个龄期做实时荧光定量 PCR,发现 L₂、L₃、L₄ 和 L_{III} 的 galectin-1 基因的表达量依次增高,可能与松材线虫的生长发育有关;L_{III} 和 L_{IV} 表达量差异显著,L_{III} 的 galectin-1 基因含量最高,可能与天牛蛹室周围的复杂环境有关,因为 L_{III} 受天牛幼虫所产生的萜烯物质吸引,从而聚集在天牛蛹室周围(Zhao *et al.*, 2007),而天牛蛹室周围有许多真菌和细菌,环境复杂,线虫从而产生更多的 galectin-1 提高免疫力。而 L_{IV} galectin-1 基因表达量的减少可能与天牛的免疫逃避相关;雌雄成虫表达量没有差异,说明与性别无关。

从 2011 年发现松材线虫的 galectin-1 基因,便再无其他报道。本研究克隆了松材线虫的 galectin-1 基因,并对其进行了生物信息学分析和各个龄期的 RT-qPCR,通过原核表达的方式表达该蛋白,最终获得了纯化后的蛋白,为今后研究松材线虫的 galectin-1 蛋白与松墨天牛之间的互作提供了参考,为松材线虫的防治提供了新方向。

参考文献

- 宁静, 张宾, 田浩楷, 柳小龙, 杨炳琰, 赵莉茜, 2018. 携带与非携带松材线虫的松墨天牛 miRNA 表达谱比较分析. *生物安全学报*, 27(1): 20–30.
- 张星耀, 骆有庆, 2004. 中国森林重大生物灾害. 北京: 中国林业出版社.
- BLIDNER A G, MENDEZ-HUERGO S P, CAGNONI A J, RABINOVICH G A, 2015. Rewiring regulatory cell networks in immunity by galectin-glycan interactions. *FEBS Letters*, 589: 3407–3418.
- COOPER D N W, 2002. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica Biophysica Acta General Subjects*, 1572(2/3): 209–231.
- CRAIG S E L, THUMMEL R, AHMED H, VASTA G R, HYDE D R, HITCHCOCK P F, 2010. The zebrafish galectin Drgal1-12 is expressed by proliferating muller glia and photoreceptor progenitors and regulates the regeneration of rod photoreceptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(6): 3244–3252.
- FENG C G, NITA-LAZAR M, NURIA GONZALEZ-MONTALBAN, WANG J Y, MANCINI J, RAVINDRAN C, AHMED H, VASTA G R, 2015. Manipulating galectin expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Methods in Molecular Biology*, 1207: 327–341.
- FUTAI K, 2008. *Pine wilt disease*. Tokyo: Springer.
- HAO L, WU K, CHEN X G, WANG Q, 2007. Cloning, prokaryotic expression and immunoreactivity evaluation of *Angiostrongylus cantonensis* galectin. *Journal of Southern Medical University*, 27(5): 584–587.
- HILL M, MAZAL D, BIRON V A, PEREIRA L, UBILLOS L, BERRIEL E, AHMED H, FREIRE T, RONDAN M, VASTA G R, LIU F T, IGLESIAS M M, OSAGA E, 2010. A novel clinically relevant animal model for studying galectin-3 its ligands during colon carcinogenesis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 58(6): 553–565.
- KIELI M, JOSH P, JONES A, JONES A, WINDON R, HUNT P, KONGSUWAN K, 2007. Identification of immuno-reactive proteins from a sheep gastrointestinal nematode, *Trichostrongylus colubriformis*, using two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *International Journal for Parasitology*, 37(13): 1419–1429.
- KIM J Y, CHO M K, CHOI S H, LEE K H, AHN S C, KIM D H, YU H S, 2010. Inhibition of dextran sulfate sodium (DSS)-induced intestinal inflammation via enhanced IL-10 and TGF- β production by galectin-9 homologues isolated from intestinal parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 174(1): 53–61.
- LEE D W, SEO J B, NAM M H, KANG J S, KIM S Y, KIM A Y, KIM W T, CHOI J K, UM Y, LEE Y, MOON I S, HAN H R, KOH S H, JE Y H, LIM K J, LEE S H, KOH Y H, 2011. A combination of biochemical and proteomic analyses reveals Bx-LEC-1 as an antigenic target for the monoclonal antibody 3-2A7-2H5-D9-F10 specific to the pine wood nematode. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(2): M900521–MCP200.
- LIU F T, YANG R Y, HSU D K, 2012. Galectins in acute and chronic inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253: 80–91.
- PANG J B, RHODES D H, PINI M, AKASHEH R T, CASTELLANOS K J, CABAY R J, COOPER D, PERRETTI M, FANTUZZI G, 2013. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. *PLoS ONE*, 8(2): e57915.
- PEJNOVIC N N, PANTIC J M, JOVANOVIĆ I P, RADOSAVLJEVIĆ G D, DJUKIC A L, ARSENIJEVIĆ N N, LUKIC M L, 2013. Galectin-3 is a regulator of metaflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Adipocyte*, 2(4): 266–271.
- RABINOVICH G A, VAN KOOYK B, COBB B A, 2012. Glycobiology of immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1253: 1–15.
- RABINOVICH G A, TOSCANO M A, JACKSON S S, VASTA G R, 2007. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(5): 513–520.
- SHINYA R, MORISAKA H, TAKEUCHI Y, FUTAI K, UEDA M, 2013. Making headway in understanding pine wilt disease: what do we perceive in the postgenomic era? *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(1): 1–8.
- VASTA G R, AHMED H, DU S J, HENRIKSON D, 2004. Galectins in teleost fish; zebrafish (*Danio rerio*) as a model species to address their biological roles in development and innate immunity. *Glycoconjugate Journal*, 21(8/9): 503–521.
- VASTA G R, AHMED H, TASUMI S, ODOM E W, SAITO K, 2007. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition. *Advances Experimental Medicine and Biology*, 598: 389–406.

- LEE Y, KIM S, LEE S, 2018. A first record of three aphid pests (Aphididae: Calaphidinae) on walnut in Korea. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 11(4): 531–537.
- MACE K C, MILLS N J, 2017. Connecting natural enemy metrics to biological control activity for aphids in California walnuts. *Biological Control*, 106: 16–26.
- MARTÍNEZ M L, LABUCKAS D O, LAMARQUE A L, MAESTRI D M, 2010. Walnut (*Juglans regia* L.): genetic resources, chemistry, by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12): 1959–1967.
- OLSON W, 1974. Dusky-veined walnut aphid studies. *California Agriculture*, 28(7): 18–19.
- PAULSEN C M, COTTRELL T E, RUBERSON J R, 2013. Distribution of the black pecan aphid, *Melanocallis caryaefoliae*, on the upper and lower surface of pecan foliage. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 146(2): 252–260.
- POLLEGIONI P, WOEXTE K E, CHIOCCHINI F, DEL LUNGO S, OLIMPERI I, TORTOLANO V, MAVOLTI M E, 2015. Ancient humans influenced the current spatial genetic structure of common walnut populations in Asia. *PLoS ONE*, 10(9): e0135980.
- POUTSMA J, LOOMANS A J M, AUKEMA B, HEIJERMAN T, 2008. Predicting the potential geographical distribution of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, using the CLIMEX model. *Biological Control*, 53: 103–105.
- ROSEHEIM J A, 1998. Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. *Annual Review of Entomology*, 43(1): 421–447.
- SLUSS R R, 1967. Population dynamics of the walnut aphid, *Chromaphis juglandicola* (Kalt.) in Northern California. *Ecology*, 48(1): 41–58.
- SUTHERST R W, BOURNE A S, 2009. Modelling non-equilibrium distributions of invasive species: a tale of two modelling paradigms. *Biological Invasions*, 11(6): 1231–1237.
- VAN DEN BOSH R, HOM R, MATTESON P, FRAZER B, MESSENGER P, DAVIIS C, 1979. Biological control of the walnut aphid in California: impact of the parasite, *Trioxys pallidus*. *Hilgardia*, 47(1): 1–13.
- WOODWARD F I, 1987. *Climate and plant distribution*. New York: Cambridge University Press.
- WILKINSON K N, GASPARIAN B, PINHASI R, AVETISYAN P, HOVSPYAN R, ZARDARYAN D, SMITH A, 2012. Areni-1 cave, armenia: a chalcolithic-early bronze age settlement and ritual site in the southern Caucasus. *Journal of Field Archaeology*, 37(1): 20–33.
- XI R T, 1989. Discussion on the origin of walnut in China. *Acta Horticulturae*, 284: 353–362.

(责任编辑:郑姗姗 郭莹)

(上接第 105 页)

- WANG J, YAN R F, XU L X, LI X G, 2007. The second glutamic acid in the C-terminal CRD affects the carbohydrate-binding properties of recombinant galectins of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 148(3/4): 247–255.
- YOUNG A R, MEEUSEN E N, 2004. Galectins in parasite infection and allergic inflammation. *Glycoconj Journal*, 19(7/8/9): 601–606.
- ZHAO L L, SUN J H, 2017. Pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhner) Nickle// *Biological invasions and its management in China*. Singapore: Springer: 3–21.
- ZHAO L L, WEI W, KANG L, SUN J H, 2007. Chemotaxis of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, to volatiles associated with host pine, *Pinus massoniana*, and its vector *Monochamus alternatus*. *Journal of Chemical Ecology*, 33(6): 1207–1216.
- ZHOU J, ZHAO L L, YU H Y, ZHANG W, HU S N, ZHOU Z, SUN J H, 2018. Immune tolerance of vector beetle to its partner plant parasitic nematode modulated by its insect parasitic nematode. *The FASEB Journal*, 32(9): 4862–4877.

(责任编辑:郭莹)